

玛咖多糖-Fe(Ⅲ)配合物的制备与表征

潘蓉¹,魏金超²,高玉梅¹,陈芮^{1*}

(1.云南师范大学 化学化工学院,云南 昆明 650500;2.中国科学院 化学研究所,北京 100190)

摘要:采用热水浸提和超声辅助法制得玛咖多糖,通过检测玛咖多糖-Fe(Ⅲ)配合物在不同pH值、反应温度和时间的吸光度来优化玛咖多糖-Fe(Ⅲ)配合物的试验条件。结果表明:玛咖多糖-Fe(Ⅲ)配合物制备的最佳条件为pH9,反应温度70℃,反应时间150min。采用铁盐的特殊反应、红外光谱及紫外-可见吸收光谱对玛咖多糖-Fe(Ⅲ)配合物进行定性表征;采用邻菲罗啉分光光度法测得产品中Fe(Ⅲ)含量为13.31%,精密密度为0.46%。

关键词:玛咖多糖-铁(Ⅲ)配合物;络合;表征;定性分析

Preparation and Characterization of Maca Polysaccharide-Fe(Ⅲ) Complex

PAN Rong¹, WEI Jin-chao², GAO Yu-mei¹, CHEN Rui^{1*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China; 2. Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Maca polysaccharides were extracted by the methods of hot water and ultrasonic assistance. In order to gain the optimal condition for preparation of Maca polysaccharide-Fe(Ⅲ) complex, we detected the absorbance of samples though changing the temperature, pH and time. The optimal experimental condition was that when pH value was adjusted 9, the polysaccharide-Fe(Ⅲ) complex was prepared at 70℃ for 150 min. Using the characteristic reaction of ferric salt, infrared absorption spectra and ultraviolet-visible absorption spectra, we qualitatively characterized the property of Maca polysaccharide-Fe(Ⅲ) complex. The determination of iron in Maca was investigated by spectrometry with phenanthroline. The results suggested that the content of Fe(Ⅲ) in Maca polysaccharide-Fe(Ⅲ) complex was 13.31% and precision was 0.46%.

Key words: Maca polysaccharide-Fe(Ⅲ) complex; complexation; characterization; qualitative analysis

引文格式:

潘蓉,魏金超,高玉梅,等.玛咖多糖-Fe(Ⅲ)配合物的制备与表征[J].食品研究与开发,2020,41(24):86-90

PAN Rong, WEI Jinchao, GAO Yumei, et al. Preparation and Characterization of Maca Polysaccharide-Fe(Ⅲ) Complex[J]. Food Research and Development, 2020, 41(24): 86-90

缺铁性贫血病(iron deficiency anemia, IDA)是全球最常见的贫血病之一。采用第一代、第二代补铁剂治疗IDA具有副作用大、对肠胃刺激明显等不足。多糖铁作为第三代补铁剂通过降低患者的血清转铁蛋白受体的含量,提高血清铁蛋白的含量来改善血液学指标^[1],具有与常规硫酸亚铁相同的补铁作用。由于其中的铁在肠胃中以分子形式存在,不会对胃肠道产生

刺激作用及不出现二价铁常有的轻微呕吐、腹泻或便秘等症状^[2],因此,多糖铁类补铁剂的研发备受学者的青睐。

目前,多糖铁类补铁剂的研究主要包括银耳^[3]、紫菜^[4]、茶叶^[5]、大枣^[6]等常见的植物类多糖铁复合物及人参^[7]、白芍^[8]、当归^[9]、党参^[10]、黄芪^[11]等中药类多糖铁复合物。其中中药类多糖铁复合物具有自身活血补血的特点^[12]。

多糖铁类复合物(polysaccharide-iron complex, PIC)是以植物多糖为载体,络合三价铁后得到的,采用化

基金项目:国家自然科学基金(21565033)

作者简介:潘蓉(1997—),女(汉),本科,研究方向:化学。

* 通信作者:陈芮(1975—),女,副教授,主要从事生物质谱的研究。

学合成方法制备^[13-14]。根据铁盐的特殊反应,采用红外光谱法可以对多糖-铁(III)进行定性鉴别^[9,15-17]。

玛咖作为一种药食两用植物,具有极高的营养价值^[18]。其主要成分——玛咖多糖不仅具有调节免疫力、抗疲劳、抗氧化、抗衰老等作用^[19-21],在治疗贫血方面也具有一定的功效^[8]。至今虽然研究玛咖多糖^[22-24]及PIC^[3-11]的报道不少,但尚未有玛咖多糖-铁(III)配合物的研究报道。

本文报道了玛咖多糖-铁(III)配合物的制备方法,并对其进行了定性表征和定量分析。以期这种制备玛咖多糖-铁(III)配合物的研究思路能为其它大分子螯合铁类补铁剂的研发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-8000s 型紫外-可见分光光度计:上海菁海仪器有限公司;ALPHA-II 型红外光谱仪:德国布鲁克·道尔顿公司;PHS25 型 pH 计:上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 试剂及配制

硫酸亚铁胺 $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 、邻菲罗啉、葡萄糖、亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 、三氯化铁 $(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ 、硫酸亚铁 $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 、柠檬酸钠 $(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ 、盐酸羟胺 $(\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl})$ 、醋酸钠、氢氧化钠、盐酸、冰乙酸、无水乙醇、乙醚、丙酮、三氯甲烷、正丁醇、苯酚、浓硫酸(均为分析纯):天津市风船化学试剂科技有限公司; α -淀粉酶(3 700 U/g,生化试剂):北京索莱宝科技有限公司。

100 mg/L 铁(II)标准储备液:精密称取 0.702 3 g 硫酸亚铁胺,溶于少量蒸馏水后,加入 3 mL 盐酸,定容至 1 000 mL。

10.0 mg/L 铁(II)标准使用液(使用时现配):精确吸取 10.00 mL 铁(II)标准储备液稀释至 100 mL。

500 mg/L 柠檬酸钠溶液:称取 0.500 0 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水中,稀释至 1 000 mL。

邻菲罗啉显色液:称取 0.1 g 邻菲罗啉,溶解于加有 2 滴盐酸的蒸馏水中,稀释至 100 mL。

10% 盐酸羟胺溶液:称取 10 g $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 溶解并稀释至 100 mL。

醋酸钠缓冲液(pH4.5):称取 68 g 醋酸钠溶于 500 mL 蒸馏水中,加入冰乙酸 28.8 mL,稀释至 1 000 mL。

0.01 mol/L 三氯化铁溶液:称取 0.270 3 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 用蒸馏水溶解并稀释至 100 mL。

0.01 mol/L 的硫酸亚铁溶液:称取 0.278 0 g $\text{FeSO}_4 \cdot$

$7\text{H}_2\text{O}$ 用蒸馏水溶解并稀释至 100 mL。

0.5 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 2 g 氢氧化钠用蒸馏水溶解并稀释至 100 mL。

10%的亚铁氰化钾溶液:称取 10 g 亚铁氰化钾用蒸馏水溶解并稀释至 100 mL。

玛咖:云南省昆明市丰熙茶行。

2 方法

2.1 玛咖多糖的提取

玛咖切片粉碎后,准确称取 100 g 玛咖粉末,按照料液比 1:20(g/mL)加入蒸馏水,超声 40 min 后,将溶液在 90 °C 下浸提 2 h,离心 5 min,弃去沉淀,蒸发上清液。

用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)调节 pH 值至 6.0 左右,加入 α -淀粉酶,在 60 °C 下酶解,随后加入无水乙醇醇析 12 h;离心 5 min 收集沉淀,加入蒸馏水溶解,采用 Sevag 法除蛋白。对蛋白除尽的液体再次醇析 12 h 后,用乙醚、丙酮洗涤沉淀 2 次,真空干燥后,保存备用。采用该法得到的玛咖多糖为 5.291 5 g,产率约为 5.29%。

Sevag 法除蛋白:移取玛咖多糖溶液 100 mL,按体积比 5:1 加入三氯甲烷-正丁醇(5:1,体积比)混合液,振摇 30 min,经离心分离后吸取上清液。重复此过程,直至玛咖多糖稀释液在 260 nm ~280 nm 不出现吸收峰。

2.2 玛咖多糖-Fe(III)配合物的制备

移取 1 mL 500 mg/L 玛咖多糖溶液、0.25 mL 柠檬酸钠溶液和 3 mL 三氯化铁溶液,用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值,用蒸馏水补至 15 mL。将上述溶液分别置于不同温度的水浴中加热 1 h。即得玛咖多糖-Fe(III)配合物。

3 结果与讨论

3.1 玛咖多糖-Fe(III)配合物最佳反应条件的探究

向玛咖多糖-铁(III)配合物溶液中加入 1 mL 10% 盐酸羟胺溶液、2.5 mL 邻菲罗啉溶液和 5 mL 醋酸钠溶液,用蒸馏水稀释至 50 mL,显色 15 min 后,测定吸光度,考察反应温度、pH 值、络合时间对玛咖多糖-Fe(III)配合物吸光度的影响。

3.1.1 温度与 pH 值的选择

反应温度和 pH 值对玛咖多糖-铁(III)配合物吸光度的影响见图 1。

从图 1 可见,当温度为 70 °C、pH9 时,吸光度最低,表明此时游离 Fe^{3+} 浓度最小,玛咖多糖和 Fe(III)的

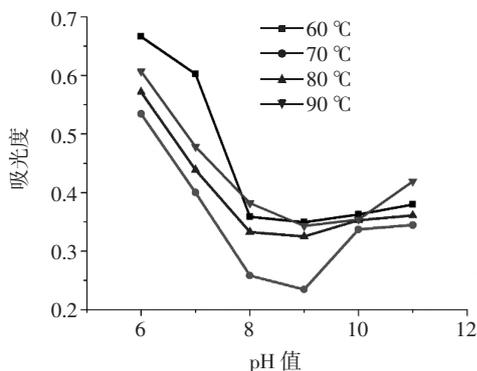


图1 反应温度和 pH 值对玛咖多糖-铁(III)配合物吸光度的影响

Fig.1 The effect of temperature and pH value on absorbance of Maca polysaccharide-Fe(III) complex

络合程度最高。

3.1.2 络合时间的选择

在 pH9 的反应条件下,控制反应温度为 70 °C,在不同络合时间下测定样品的吸光度,结果见图 2。

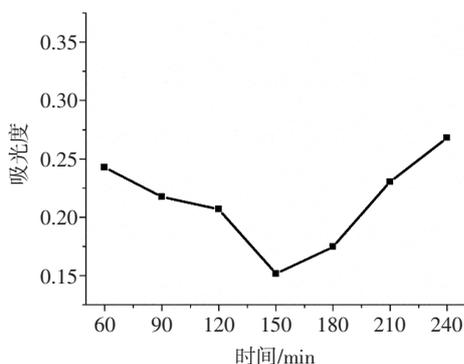


图2 络合时间对玛咖多糖-铁(III)配合物吸光度的影响

Fig.2 The effect of time on absorbance of Maca polysaccharide-Fe(III) complex

由图 2 可见,随着反应时间的延长,吸光度先减小后增大,当络合时间为 150 min 时吸光度最低。

综上所述,制备玛咖多糖-铁(III)配合物的最佳反应条件为:溶液 pH9,反应温度 70 °C,反应时间 150 min。

3.2 玛咖多糖-铁(III)配合物的定性鉴别

3.2.1 配合物的性质

采用该方法制备得到的玛咖多糖-铁(III)配合物为无臭、无味、易溶于水、不溶于有机试剂的棕色粉末。

在 0.01 mol/L 的三氯化铁溶液、0.01 mol/L 的硫酸亚铁溶液和 500 mg/L 玛咖多糖-铁(III)配合物溶液中分别滴加 0.5 mol/L 的氢氧化钠标准溶液,用 pH 酸度计测定它们分别在刚产生沉淀和产生大量沉淀时的 pH 值。结果发现:三氯化铁溶液刚产生沉淀时的 pH 值为 2.56,产生大量沉淀时的 pH 值为 6.62;硫酸亚铁溶液刚产生沉淀时的 pH 值为 3.33,产生大量沉淀时

的 pH 值为 5.57;而玛咖多糖-铁(III)配合物在 pH 值 ≥ 13 时都没有出现沉淀现象,这一事实表明玛咖多糖-铁(III)配合物在碱性条件下具有一定的稳定性。

3.2.2 游离铁的鉴别

取少量 500 mg/L 玛咖多糖-铁(III)配合物溶液,加入 10% 的亚铁氰化钾溶液,未见普鲁士蓝沉淀现象发生,表明配合物中没有游离的 Fe^{3+} 。

取少量玛咖多糖-铁(III)溶液,滴加 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液,无明显现象,进一步表明配合物中没有游离的 Fe^{3+} 。

3.2.3 络合铁的鉴别

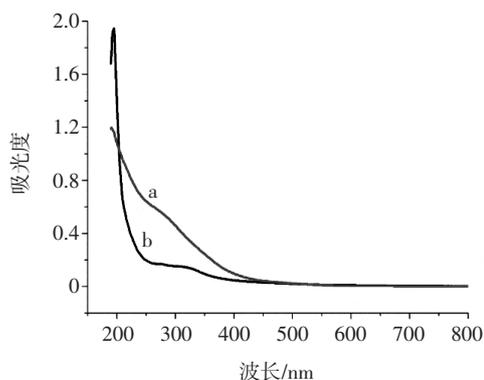
移取 10 mL 玛咖多糖-铁(III)溶液,加入 5 mL 浓盐酸,煮沸 5 min。溶液由透明棕色变为透明黄色。冷却后,加入 10% 的亚铁氰化钾溶液,出现普鲁士蓝沉淀现象,说明该配合物为玛咖多糖-铁(III)配合物。

取同样量的玛咖多糖-铁(III)溶液进行酸化煮沸后,滴加 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液,溶液迅速产生红棕色沉淀,进一步说明该配合物为玛咖多糖-铁(III)配合物。

3.3 玛咖多糖-铁(III)配合物的结构分析

3.3.1 紫外-可见吸收光谱分析

邻菲罗啉分光光度法作为表征和检测多糖铁中铁含量的主要方法在多糖铁的合成中被广泛应用。由于玛咖多糖-铁(III)配合物中不含有游离的 Fe^{3+} ,但当加入强酸加热后,再向溶液加入鉴别试剂时却能表现出特殊的铁盐反应。玛咖多糖和玛咖多糖-铁(III)配合物的紫外-可见吸收光谱见图 3。



a. 玛咖多糖-铁(III)配合物 50 mg/L; b. 玛咖多糖 500 mg/L。

图3 玛咖多糖和玛咖多糖-铁(III)配合物的紫外-可见吸收光谱

Fig.3 The ultraviolet-visible absorption spectra of Maca polysaccharides and Maca polysaccharides-Fe(III) complex

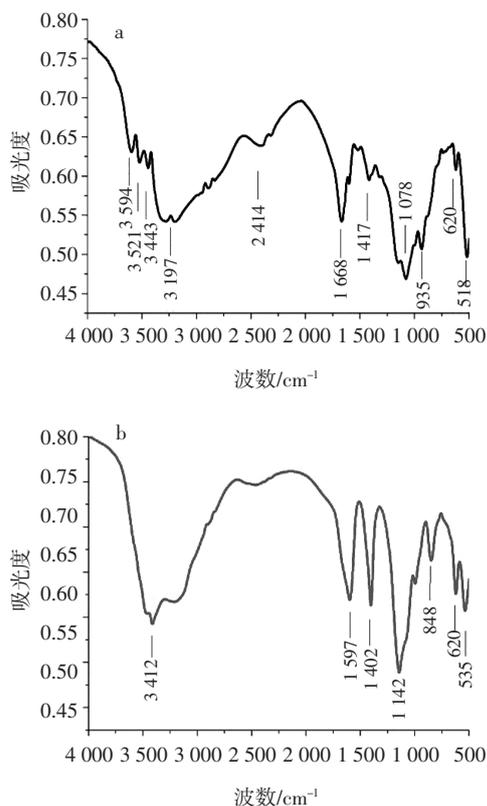
由图 3 可知,玛咖多糖的吸收峰出现在 340 nm 左右;而玛咖多糖-铁(III)配合物的吸收峰出现在 270 nm。通过与玛咖多糖的吸收光谱进行对比,发现玛咖多糖-铁(III)配合物的吸收峰在波长 200 nm~450 nm 时上升

缓慢,但吸光度均大于玛咖多糖的吸光度。

综上,玛咖多糖-铁(III)配合物的紫外吸收光谱出现的明显变化归因于结构的改变,即表明采用该方法可以成功地制得玛咖多糖-铁(III)配合物。

3.3.2 红外吸收光谱分析

采用 KBr 压片法分析了样品的红外吸收光谱。图 4 为玛咖多糖和玛咖多糖-铁(III)配合物的红外谱图。



a. 玛咖多糖;b. 玛咖多糖-铁(III)配合物。

图 4 玛咖多糖和玛咖多糖-铁(III)配合物的红外吸收光谱
Fig.4 Infrared absorption spectra of Maca polysaccharides and Maca polysaccharides-Fe(III) complex

通过对比发现,这两种物质的红外光谱图存在显著的差异。玛咖多糖在 $3\ 600\ \text{cm}^{-1}\sim 3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 处出现精确的吸收峰,而玛咖多糖-铁(III)配合物只在 $3\ 412\ \text{cm}^{-1}$ 处出现一个强吸收峰,对应于 O-H 的伸缩振动;玛咖多糖在 $1\ 668\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰对应于 C=O 伸缩振动,在 $1\ 417\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰对应于 C-O 伸缩振动,在 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰对应于 C-O-C 的对称伸缩振动;玛咖多糖-铁(III)配合物在这 3 处的吸收峰增强并移动到 $1\ 598$ 、 $1\ 402\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 142\ \text{cm}^{-1}$ 处。玛咖多糖-铁(III)配合物的红外谱图在 $848\ \text{cm}^{-1}$ 出现了铁的氢氧化物的特征吸收峰。这是由于铁(III)与玛咖多糖的络合引起-OH 吸收峰发生改变。这一结果说明玛咖多糖-铁(III)配合物中的-OH 参与了 Fe^{3+} 的配

位反应。

3.4 玛咖多糖-铁(III)配合物中铁含量的测定

由于在强酸且加热的条件下,玛咖多糖-铁(III)配合物的结构会被破坏,导致络合铁变为游离铁^[10],因此采用邻菲罗啉分光光度法测定玛咖多糖-铁(III)配合物中铁的含量。

3.4.1 标准曲线的绘制

移取 $10\ \text{mg/L}$ 标准铁溶液 0 、 1.00 、 2.00 、 4.00 、 6.00 、 $8.00\ \text{mL}$ 及 $10.00\ \text{mL}$, 分别加入 10% 盐酸羟胺溶液 $1\ \text{mL}$ 、邻菲罗啉显色液 $2.5\ \text{mL}$ 和 $1\ \text{mol/L}$ 醋酸钠溶液 $5\ \text{mL}$, 用蒸馏水稀释至 $50\ \text{mL}$, 摇匀,放置 $10\ \text{min}\sim 15\ \text{min}$, 以第一份溶液为参比,测定 $510\ \text{nm}$ 处的吸光度。以铁浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,如图 5 所示,得到回归方程: $A=0.214\ 4c-0.013\ 7$, $R^2=0.991\ 8$ 。

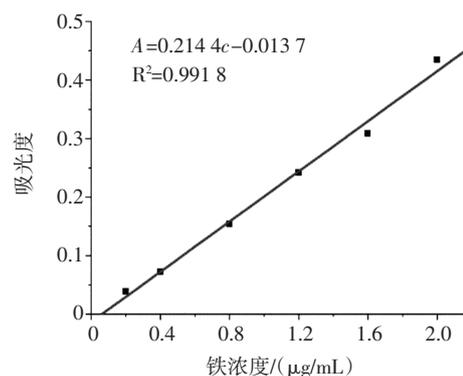


图 5 铁溶液的标准曲线

Fig.5 The standard calibration curve of iron solution

3.4.2 样品中铁的含量

准确称取 $0.010\ 0\ \text{g}$ 玛咖多糖-铁(III)配合物,加入 $3\ \text{mL}$ 浓盐酸溶液和少量蒸馏水,煮沸 $5\ \text{min}$,冷却至室温($25\ ^\circ\text{C}$)后,定容至 $100\ \text{mL}$ 。分别从中吸取 0 、 1.00 、 2.00 、 3.00 、 4.00 、 $5.00\ \text{mL}$ 置于比色管中,按 3.4.1 方法测定溶液的吸光度($n=3$),结果见表 1。

表 1 样品中铁含量的测定

Table 1 Determination of the content of Fe(III) in Maca polysaccharides-Fe(III) complex

编号	吸光度	浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	铁含量/%
1	0.043 4	0.266 3	13.32
2	0.101 3	0.536 4	13.41
3	0.157 0	0.796 2	13.27
4	0.213 5	1.059 7	13.25
5	0.272 0	1.332 6	13.31

计算得到玛咖多糖-铁(III)配合物中铁含量为 13.31% , 相对标准偏差(relative standard deviation,

RSD)为0.46%。

4 结论

本试验以玛咖粉为原料,采用热水浸提法结合超声波辅助法提取粗玛咖多糖,用 Sevag 法除去其中的游离蛋白质;采用三氯化铁法使提取纯化的玛咖多糖和铁(III)反应制备玛咖多糖-铁(III)配合物。该络合反应的最佳条件为:70℃、调节溶液的pH9,反应150 min。该方法制备的玛咖多糖-铁(III)配合物为无臭、无味、易溶于水、不溶于有机试剂,且具有良好稳定性的棕色粉末。采用邻菲罗啉分光光度法测定玛咖多糖-铁(III)配合物中铁的含量为13.31%,RSD为0.46%。

参考文献:

- [1] 魏俊芳. 多糖铁复合物治疗缺铁性贫血的效果及其机制探讨[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2014(6): 480-482
- [2] NAUDE S, CLIJSEN S, NAULAERS G, et al. Iron supplementation in preterm infants: a study comparing the effect and tolerance of a Fe²⁺ and a nonionic Fe^{III} compound[J]. Journal of Clinical Pharmacology, 2000, 40(12): 1447-1451
- [3] 王桥, 曾昭晖. 银耳多糖铁(III)配合物的合成及其理化性质的研究[J]. 首都医科大学学报, 1991, 12(4): 270-274
- [4] 孟凡德, 赵全芹, 刘学启, 等. 紫菜多糖 Fe(III)配合物的制备及其理化性质[J]. 华西药学杂志, 2001, 16(1): 34-35
- [5] 李玉贤, 裴晓红. 茶叶多糖铁的合成及其铁含量的测定[J]. 茶叶科学, 2005, 25(1): 71-74
- [6] 李玉贤, 刘艳菊. 大枣多糖铁的合成及其铁含量的测定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9112-9114
- [7] 石德成. 人参多糖铁的制备及一般特性[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 1988(3): 109-113
- [8] 裴晓红, 许闽, 李亚飞, 等. 白芍多糖铁(III)配合物的合成及一般性质研究[J]. 中医学报, 2005, 20(1): 28-29
- [9] 戴立泉, 王凯平, 张玉. 当归多糖铁的定性鉴别及其铁含量的初步研究[J]. 中国药师, 2005, 8(7): 608-610
- [10] 张新国, 陈文洁, 曾艳龙, 等. 党参多糖铁的合成及鉴别[J]. 中医药学报, 2011, 39(1): 77-81
- [11] 王佳, 李进霞, 孙树茂, 等. 黄芪多糖铁制备及表征[J]. 山西大同大学学报(自然科学版), 2018, 34(5): 13-15
- [12] 陈志祥. 当归多糖铁复合物的分子结构、分子式及分子量研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008
- [13] WANG J, CHEN H, WANG Y, et al. Synthesis and characterization of a new *Inonotus obliquus* polysaccharide-iron(III) complex [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 75: 210-217
- [14] LU Q, XU L, MENG Y, et al. Preparation and characterization of a novel *Astragalus membranaceus* polysaccharide-iron(III) complex [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93 (Part A): 208-216
- [15] ZHOU Y, LI P, BRANTNER A, et al. Chemical profiling analysis of Maca using UHPLC-ESI-Orbitrap MS coupled with UHPLC-ESI-QqQ MS and the neuroprotective study on its active ingredients[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44660
- [16] 张永忠, 余龙江, 金文闻, 等. 玛咖多糖抗氧化保健作用研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 327-333
- [17] 周意, 栾洁, 刘玉香, 等. 玛咖多糖对果蝇的抗衰老作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 151-154
- [18] MUHAMMAD I, ZHAO J, DUNBAR D C, et al. Constituents of *Lepidium meyenii* "Maca"[J]. Phytochemistry, 2002, 59: 105-110
- [19] 何丹鸿, 袁曦, 林功丹, 等. 多糖铁复合物微丸中铁离子的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(1): 107-108
- [20] 周玉燕, 刘慧. 多糖铁复合物定性及定量鉴别方法初步研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2009, 19(1): 27-29
- [21] 展筱林, 田红伟, 王静. 紫外-可见分光光度法测定多糖铁复合物的铁含量[J]. 药学研究, 2015, 34(11): 645-647
- [22] WANG W, ZOU Y, LI Q, et al. Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages[J]. Process Biochemistry, 2016, 51: 542-553
- [23] KANG C, HAO L, ZHANG L, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the leaves of Maca (*Lepidium meyenii*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 2611-2619
- [24] LI Y, XIN Y, XU F, et al. Maca polysaccharides: Extraction optimization, structural features and anti-fatigue activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 618-624

收稿日期:2019-10-08