

灰树花多糖螯合铁的制备工艺研究

陈 柠, 聂文冰, 李丹婷, 李瑞瑾, 王 宇, 陈贵堂*

(中国药科大学工学院食品质量与安全教研室, 南京 211198)

摘 要: **目的** 对灰树花多糖和三价铁 Fe(III)的螯合工艺进行初步研究, 确定最佳螯合条件。 **方法** 灰树花粗多糖用 Sevag 法除蛋白后, 在碱性条件下与三氯化铁进行反应制得灰树花多糖与 Fe(III)的螯合物, 用邻菲罗啉法测定铁含量, 考察灰树花多糖与柠檬酸三钠的比例、螯合温度、螯合时间和溶液 pH 4 个因素对产品中铁含量的影响, 然后通过正交实验确定最佳螯合条件。 **结果** 灰树花多糖与柠檬酸三钠的比例对螯合效果的影响最大, 其次是螯合时间和螯合温度, 溶液 pH 的影响最小, 螯合的最佳工艺条件为灰树花多糖与柠檬酸三钠的比例为 2:1, 螯合温度为 50 °C, 螯合时间为 0.5 h, 溶液 pH 为 8。经验证, 此条件下制得的螯合物中铁含量最高, 为 3.08%。 **结论** 本研究的制备工艺条件可以实现灰树花多糖与 Fe(III)的有效螯合, 制得的灰树花多糖螯合铁有望成为一种新型的补铁剂。

关键词: 灰树花; 多糖; 三价铁; 螯合物; 制备工艺

Study on preparation process of *Grifola frondosa* polysaccharide-iron complex

CHEN Ning, NIE Wen-Bing, LI Dan-Ting, LI Rui-Xing, WANG Yu, CHEN Gui-Tang*

(Department of Food Quality and Safety, College of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: Objective To study the chelating process of the polysaccharide from *Grifola frondosa* and Fe(III), and determine the optimum chelate condition. **Methods** The action of polysaccharide from *Grifola frondosa* and iron trichloride was conducted under alkaline conditions after deproteinization by Sevag method, and the iron content in product was detected by phenanthroline method. The effects of mass ratio of polysaccharide from *Grifola frondosa* to trisodium citrate, chelating time, chelating temperature and pH value of solution on iron content in product were investigated by the single factor experiments, and the optimum chelating condition was determined by the orthogonal experiment. **Results** The mass ratio of polysaccharide from *Grifola frondosa* to trisodium citrate on iron content in chelate was the most influential factor, followed by chelating time, chelating temperature and pH value of solution. The optimum chelating condition were as follows: mass ratio of polysaccharide from *Grifola frondosa* to trisodium citrate was 2:1, chelating temperature was 0.5 h, chelating temperature was 50 °C, and pH value of solution was 8. The content of iron was the highest (3.08%) under the above conditions. **Conclusion** The effective chelating of the polysaccharide from *Grifola frondosa* and Fe(III) can be achieved by this process, and the *Grifola frondosa* polysaccharide-iron complex is expected to be a new type of iron supplement.

基金项目: 国家食用菌产业技术体系建设专项(CARS-24)、大学生创新药物研制能力提高项目(J1030830)

Fund: Supported by National Edible Fungus Industry Technology System Construction Project (CARS-24) and Innovative Training Program for College Students of China Pharmaceutical University (J1030830)

*通讯作者: 陈贵堂, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品化学与营养学。E-mail: caucgt@163.com

*Corresponding author: CHEN Gui-Tang, Ph.D, Associate Professor, China Pharmaceutical University, 639 Longmian Avenue, Jiangning District, Nanjing 211198, China. E-mail: caucgt@163.com

KEY WORDS: *Grifola frondosa*; polysaccharide; Fe(III); chelate; the preparation process

1 引言

灰树花(*Grifola frondosa*)是隶属于担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、树花菌属的大型真菌,又名栗子蘑、贝叶多孔菌、莲花菌或干佛菌,是一种药食两用菌。灰树花营养丰富,尤其是灰树花多糖具有多种生物活性,使其具有抗肿瘤、抗衰老及提高免疫力等多种功能^[1,2]。铁是人体所必需的微量元素,若人体对铁的摄入量不足,血红蛋白的合成会减少,进而使红细胞中血红蛋白的含量减少,导致人体内各组织器官的供氧不足,威胁人体健康。缺铁会导致缺铁性贫血,缺铁性贫血在我国人群中普遍存在,而妇女及儿童的发病率较高,严重威胁了我国居民的身体康^[3]。补充足量的铁是防治缺铁性贫血最根本的方法,因此,高生物利用度的铁营养强化剂一直以来都是研究热点。目前广泛使用的铁补充剂主要包括无机铁和有机铁两大类,其中无机铁的代表物质是硫酸亚铁,其补铁效果虽好,但具有明显的副作用,如口腔异味、胃肠道刺激以及易发生铁中毒等。研究表明,多糖具有与多种金属配位结合的能力,而多糖与三价铁(III)离子相结合形成的配合物具有较强的稳定性且对胃肠刺激较小^[4],副作用也较小,它不仅可以作为补铁剂为人体提供所需要的铁,还可以发挥多糖本身的药用价值并增强其生物活性,是目前比较有效的缺铁性贫血补铁剂,因此受到越来越广泛的关注。本研究报道了一种灰树花多糖铁的制备工艺,以期开发新型的多糖铁补铁剂提供研究基础。

2 材料与方

2.1 实验仪器

Tu-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); LD-5-10 离心机(北京医用离心机厂); RE52-99 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DZF-1B 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂); FA2004 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); HH-42 型数显恒温搅拌循环水箱(常州国华电器有限公司); 78-1 型电动搅拌器(常州国华电器有限公司)。

2.2 材料与试剂

灰树花粗多糖:本实验室自制,经苯酚硫酸法测定,其多糖含量为30%。

邻二氮菲、苯酚、六水合硫酸亚铁铵和葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司); 盐酸羟胺、氯化铁、醋酸钠、氯仿、柠檬酸三钠、浓硫酸和盐酸(南京化学试剂有限公司); 氢氧化钠(西陇化工有限公司)。所有试剂均为分析纯。

2.3 实验方法

2.3.1 灰树花粗多糖的预处理

称取20 g灰树花粗多糖,加入400 mL蒸馏水溶解,加入6 g活性炭,80℃水浴1 h;搅拌脱色后,于4000 r/min条件下离心15 min,将上清液用菊形滤纸过滤;将滤液经旋转蒸发浓缩至原体积的1/3;浓缩后的灰树花多糖溶液用Sevag法除蛋白^[5,6]:浓缩液与氯仿-正丁醇混合液(4:1)按20:3(V:V)的比例混合,用电磁搅拌器搅拌30 min后于4000 r/min离心15 min,取上清液加入相应量的上述Sevag溶液(氯仿-正丁醇混合液)重复以上操作,至多糖中的蛋白除尽;在多糖液中加入约3倍体积的90%乙醇,过夜醇沉后于4000 r/min条件下离心10 min,将得到的沉淀真空冷冻干燥后备用。经苯酚硫酸法^[7-10]测定,此干燥物的多糖含量为72.3%。

2.3.2 灰树花多糖螯合铁实验

称取一定量制得的灰树花粗多糖干燥物,加入一定比例的柠檬酸三钠,溶于6 mL蒸馏水中,加入过量2 mol/L的FeCl₃溶液,用20%的NaOH调节溶液的pH值至7~8之间,可以看到有红棕色沉淀产生;在70℃左右的水浴中不停搅拌,水浴1 h;4000 r/min离心5 min,取上清液加入3倍体积的95%乙醇溶液,4000 r/min离心5 min;倾去上清液,将沉淀分别用95%乙醇、无水乙醇和无水乙醚洗涤,最后将灰树花多糖螯合铁置于培养皿中真空干燥,于510 nm波长处测定其吸光度,由此得到其中的铁含量^[11-14]。

2.3.3 铁标准曲线的制作

采用邻菲罗啉比色法^[15-17],取8个50 mL容量瓶,分别用移液管准确加入铁标准溶液(10 μg/mL的(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O)0.00、4.00、6.00、8.00、12.00、14.00、18.00和20.00 mL,再分别加入10%的盐酸羟胺溶液1 mL、0.1%的邻菲罗啉显色液2.5 mL和1 mol/L醋酸钠缓冲溶液5 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,放置10~15 min。在510 nm波长处以蒸馏水为空白对照样品,测定其吸光度;以铁标准溶液中的铁含量为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2.3.4 单因素实验

为了对灰树花多糖螯合铁的制备工艺进行优化,分别研究了灰树花多糖和柠檬酸三钠的投料比、螯合时间、螯合温度及溶液pH值4个因素对产品中铁含量的影响。

(1)灰树花多糖与柠檬酸三钠的投料比

柠檬酸三钠作为催化剂,对多糖铁的螯合效果具有重要影响。设置灰树花多糖与柠檬酸三钠的比例为2:1、3:1、4:1、5:1和6:1进行研究。

(2)螯合时间

在6个不同时间(0.5、1、1.5、2、2.5和3 h)条件下进行研究。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表
Table 1 Factors and levels of the $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

| 水平 | 因素 | | | |
|----|------|----------|---------|---------------|
| | A/pH | B/温度(°C) | C/时间(h) | D/多糖与柠檬酸三钠的比值 |
| 1 | 6 | 50 | 0.5 | 2:1 |
| 2 | 7 | 60 | 1.0 | 3:1 |
| 3 | 8 | 70 | 1.5 | 4:1 |

(3) 整合温度

温度在影响反应速率的同时, 也会影响最终产品的铁含量。设置 5 个不同制备温度: 40、50、60、70、80 °C 进行研究。

(4) 溶液 pH 值

选取 pH 值分别为 6、7、8、9、10、11 的溶液为反应条件进行多糖铁的整合。

根据以上设定的条件, 按照预实验的制备步骤进行灰树花多糖整合铁的制备, 并用邻菲罗啉法测定产品的铁含量。

2.3.5 正交实验及其验证

根据单因素实验结果, 以 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表(表 1)对灰树花多糖整合铁的制备工艺进行进一步研究。按照“2.3.2”中所述的实验步骤进行整合, 测定产物的铁含量, 用正交软件分析计算得到最佳工艺条件, 并对最佳条件进行验证。

2.4 数据分析

采用 Excel 2003 和正交实验助手 V3.1 软件进行数据分析。测定结果以平均值±标准差表示。

3 结果与分析

3.1 铁标准曲线的绘制

以铁标准溶液中的铁含量为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 曲线的回归方程为 $Y=0.0038X+0.0071$, $r^2=0.99993$, 铁含量在 0~200 μg 之间呈良好的线性关系(图 1)。

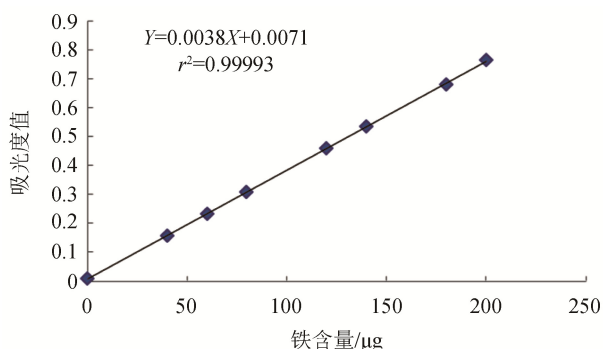


图 1 铁的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of Fe

3.2 单因素实验

3.2.1 灰树花多糖与柠檬酸三钠的质量比对产品中铁含量的影响

将灰树花多糖与柠檬酸三钠按质量比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1, 在 pH 为 8、70 °C 条件下水浴 1 h, 按预实验步骤进行整合, 所得产品中铁含量的测定结果如图 2 所示。由图 2 可知, 在一定范围内, 随着灰树花多糖比例的增加, 所得整合物的含铁量上升, 当多糖与柠檬酸三钠的比值为 3:1 时, 整合物的含铁量最高; 当多糖的比例进一步增加时, 所得整合物的含铁量逐步下降, 故选择灰树花多糖与柠檬酸三钠的最佳质量比为 3:1。

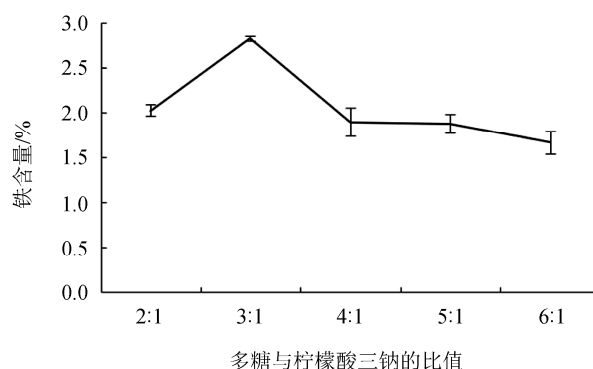


图 2 灰树花多糖与柠檬酸三钠的质量比对产品中铁含量的影响
($n=3$)

Fig. 2 Effect of mass ratio of polysaccharide from *Grifola frondosa* to trisodium citrate on iron content in product ($n=3$)

3.2.2 整合时间对产品中铁含量的影响

将灰树花多糖和柠檬酸三钠按 3:1 的比值在 70 °C、pH 为 8 的条件下分别水浴 0.5、1.0、1.5、2、2.5、3.0 h 进行整合, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 当反应时间为 1 h 时, 所得整合物的含铁量最高, 因此选择最佳整合时间为 1 h。

3.2.3 整合温度对产品中铁含量的影响

将灰树花多糖和柠檬酸三钠按 3:1 的比值分别在 40、50、60、70、80 °C、pH 为 8 的条件下水浴 1 h, 按预实验步骤进行整合, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, 随着温度的增加, 所得整合物的含铁量逐渐增加, 当温度为 60 °C 时达

到峰值,之后铁含量快速下降,故选择最佳螯合温度为 60 °C。

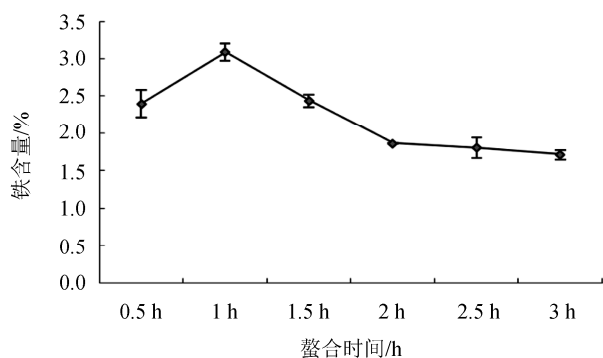


图3 螯合时间对产品中铁含量的影响($n=3$)

Fig. 3 Effect of chelating time on iron content in product ($n=3$)

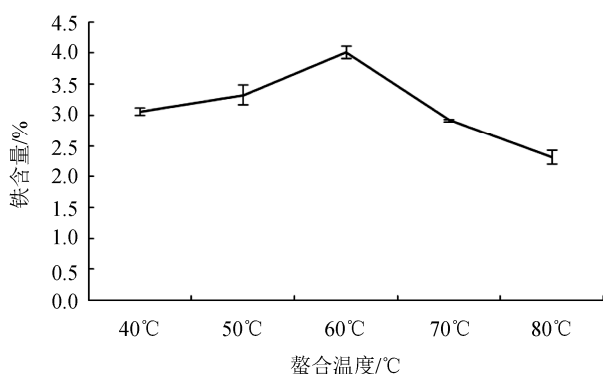


图4 螯合温度对产品中铁含量的影响($n=3$)

Fig. 4 Effect of chelating temperature on iron content in product ($n=3$)

3.2.4 溶液 pH 对产品中铁含量的影响

选择灰树花多糖与柠檬酸三钠的比值为 3:1, 螯合温度为 60 °C, 溶液 pH 分别为 6、7、8、9、10、11, 水浴 1 h, 产品中铁含量的测定结果如图 5 所示。由图 5 可知, 当反应液 pH 值为 7 时, 所得螯合物的含铁量最高, 所以选择最佳螯合 pH 为 7。

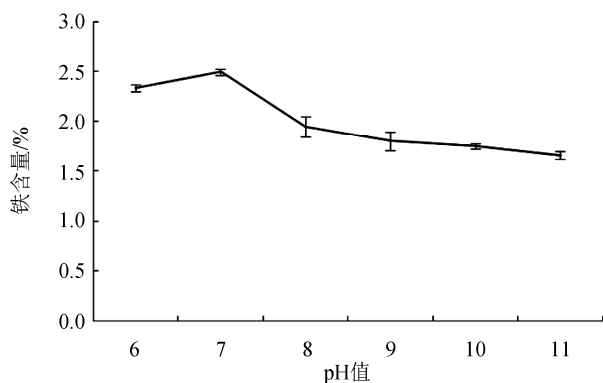


图5 溶液 pH 对产品中铁含量的影响($n=3$)

Fig. 5 Effect of pH value of solution on iron content in product ($n=3$)

3.3 正交实验及其验证

正交实验方案及结果分析见表 2。由表 2 可以看出: 极差值 R 反映出影响灰树花多糖与 Fe(III)螯合效果的各影响因素的排列顺序为 $D > C > B > A$, 即灰树花多糖与柠檬酸三钠的质量比 > 螯合时间 > 螯合温度 > 溶液 pH, 最佳反应组合为 $A_3B_1C_1D_1$, 即灰树花多糖与柠檬酸三钠的质量比为 2:1、反应时间为 0.5 h、温度为 50 °C、溶液 pH 为 8。经验证实验, 在此条件下, 所得螯合物的含铁量最高, 为 3.08%。可见本研究所得正交实验的优化结果可靠。

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

| 试验号 | A | B | C | D | Fe 含量(%) |
|-----|----------|-----------|-----------|---------|----------|
| 1 | 1 (pH=6) | 1 (50 °C) | 1 (0.5 h) | 1 (2:1) | 2.323 |
| 2 | 1 | 2 (60 °C) | 2 (1 h) | 2 (3:1) | 1.313 |
| 3 | 1 | 3 (70 °C) | 3 (1.5 h) | 3 (4:1) | 0.645 |
| 4 | 2 (pH=7) | 1 | 2 | 3 | 1.297 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.416 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1.245 |
| 7 | 3 (pH=8) | 1 | 3 | 2 | 1.360 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1.446 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1.619 |
| k1 | 1.427 | 1.660 | 1.671 | 1.786 | |
| k2 | 1.319 | 1.392 | 1.410 | 1.306 | |
| k3 | 1.475 | 1.170 | 1.140 | 1.129 | |
| R | 0.156 | 0.490 | 0.531 | 0.657 | |

4 结论

采用单因素实验和正交实验确定了灰树花多糖与 Fe(III)螯合制备灰树花多糖铁的最佳工艺条件: 多糖与柠檬酸三钠的质量比为 2:1, 螯合温度为 50 °C, 螯合时间为 0.5 h, 溶液 pH 为 8。采用此优化后的工艺制得的螯合物中铁含量为 3.08%。本研究能够为拓展灰树花资源利用及开发新型的多糖铁补铁剂提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] 陈贵堂, 王丽敏, 姚舒愉, 等. 灰树花子实体多糖和蛋白的同步提取工艺优化[J]. 食品科技, 2014, 39(7): 248-251, 257.
Chen GT, Wang LM, Yao SY, et al. Exaction of polysaccharide and protein from *Grifola frondosa* [J]. Food Sci Technol, 2014, 39(7): 248-251, 257.
- [2] 顾华杰, 沈晨斌, 严志舟, 等. 灰树花多糖的提取及抗氧化活性[J]. 生物加工过程, 2012, 10(1): 19-24.
Gu HJ, Shen CB, Yan ZZ, et al. Exaction of *Grifola frondosa* polysaccharides and test of their antioxidative activities [J]. Chin J

- Bioproc Eng, 2012, 10(1): 19–24.
- [3] 李玉贤, 刘艳菊. 大枣多糖铁的合成及其铁含量测定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9112–9114.
Li YX, Liu YJ. Synthesis of jujube polysaccharide-iron complex and determination of Fe content [J]. J Anhui Agric Sci, 2011, 39(15): 9112–9114.
- [4] 秦卫东, 马利华, 庄平, 等. 金针菇多糖整合亚铁的制备[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2009, 24(4): 15–18.
Qin WD, Ma LH, Zhuang P, *et al.* Preparation of *Flammulina velutipes* polysaccharides-ferrous chelate complex [J]. J Xuzhou Institute Technol (Nat Sci Ed), 2009, 24(4): 15–18.
- [5] 唐小俊, 张名位, 池建伟, 等. 灰树花多糖提取工艺优化及多糖冲剂的研制[J]. 食用菌, 2006, (6): 58–60.
Tang XJ, Zhang MW, Chi JW, *et al.* Optimization of extraction technology of polysaccharide from ash tree and preparation of polysaccharide granules [J]. Edib Fungi, 2009, 24(4): 15–18.
- [6] 王卫国, 王继花, 吴强, 等. 灰树花多糖脱色技术研究[J]. 中国食用菌, 2002, 22(6): 49–51.
Wang WG, Wang JH, Wu Q, *et al.* Study on decoloration technology of polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. Edib Fungi China, 2002, 22(6): 49–51.
- [7] 刘晓涵, 陈永刚, 林励, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 270–272.
Liu XH, Chen YG, Lin L, *et al.* Comparison of methods in determination of polysaccharide in *Lycium barbarum* L. [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(9): 270–272.
- [8] 张志军, 刘建华, 李淑芳, 等. 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 193–195.
Zhang ZJ, Liu JF, Li SF, *et al.* Study on the content of *Ganoderma lucidum* polysaccharides by phenol sulfuric acid method [J]. Sci Technol Food Ind, 2006, 27(2): 193–195.
- [9] 廖艳丽, 马雪梅, 陈贵堂, 等. 灰树花子实体中水溶性多糖提取工艺优化研究[J]. 农产品加工·学刊, 2012, (2): 11–14.
Liao YL, Ma XM, Chen GT, *et al.* Optimization of processing parameters for extraction of soluble polysaccharide of *Grifola frondosa* [J]. Proc Agric Prod, 2012, (2): 11–14.
- [10] Huang GL, Tan JT, Tan XC, *et al.* Preparation of polysaccharides from wax gourd [J]. Int J Food Sci Nut, 2011, 62 (5): 480–483.
- [11] Zhang YY, Liu JH. Optimization of process conditions for preparing an iron-polysaccharide complex by response surface methodology [J]. Chem Biochem Eng Q, 2011, 25(1): 75–81.
- [12] Wang KP, Zhang Y, Dai LQ. Preparation and identification of *Angelica sinensis* polysaccharide-iron complex [J]. Chem Res Chin Univ, 2005, 21(6): 668–672.
- [13] 高文宏, 何瑞雪, 万真真. 水溶性大豆多糖-铁(III)的制备及结构表征[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 127–132.
Gao WY, He RX, Wan ZZ. Preparation and structure characterization of water soluble soybean polysaccharide Fe (III) [J]. J South China Univ Technol (Nat Sci Ed), 2012, 40(5): 127–132.
- [14] 邓晓磊, 张建华, 周金娥, 等. 玉米多糖铁制备工艺优化及铁含量测定[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2008, 28(11): 1398–1401.
Deng XL, Zhang JH, Zhou JE, *et al.* Preparation of corn polysaccharide-Fe(III) complex and assay of Fe(III) [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci Ed), 2008, 28(11): 1398–1401.
- [15] 李玉贤, 游志恒, 褚意新. 百合多糖铁复合物的合成及其铁含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 47–49.
Li YX, You ZH, Chu YX. Synthesis of lily polysaccharide-Fe(III) complex and determination of Fe(III) [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16(7): 47–49.
- [16] Deng F, Zhang FQ, Mu L, *et al.* Determination of Fe (III) from the polysaccharide-Fe(III) complex of cortex magnoliae officinalis leaves [J]. Med Plant, 2012, 3(3): 8–9, 12.
- [17] 姚雪霞, 戴存礼, 李晓林, 等. 邻菲罗啉分光光度法测定微量铁实验条件的探讨[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(3): 16–19.
Yao XX, Dai CL, Li XL, *et al.* Investigation the experimental condition for determination of trace iron by phenanthroline spectrophotometry [J]. Res Explo Lab, 2015, 34(3): 16–19.

(责任编辑: 刘 丹)

作者简介



陈 柠, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 1191684692@qq.com



陈贵堂, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品化学与营养学。

E-mail: caucgt@163.com