

兰州百合多糖铁(III)配合物制备工艺的Box-Behnken响应面法优化及其体外抗氧化活性评价

李小军¹, 马晓辉^{1,2}, 段国建¹, 姜红³, 曾凡逵³, 高作旺⁴, 董文静⁵, 王引权^{1,2*}, 晋玲^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃兰州 730000) (2. 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃兰州 730000) (3. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃兰州 730000) (4. 兰州甜甜百合有限公司, 甘肃兰州 730000) (5. 甘肃科技馆, 甘肃兰州 730070)

摘要: 该研究以兰州百合多糖和 FeCl₃ 为原料, 以 Fe³⁺ 含量为评价指标, 采用单因素实验及 Box-Behnken 响应面法优化兰州百合多糖铁(III)配合物制备工艺, 获得最佳参数; 采用红外光谱(Infrared Spectroscopy, IR)和紫外可见光谱法(Ultraviolet-Visible Spectroscopy, UV)进行其结构分析, 通过对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除能力评价兰州百合多糖铁(III)配合物体外抗氧化活性。结果表明, 兰州百合多糖铁(III)配合物的制备最佳工艺为反应温度 61.10 °C、pH 值 6.92、反应时间 1.38 h, 在此反应条件下, 兰州百合多糖铁(III)配合物 Fe³⁺ 含量为 7.32%; IR 和 UV 分析表明说明兰州百合多糖成功与 Fe³⁺ 螯合; 兰州百合多糖铁(III)配合物和兰州百合多糖清除 DPPH 自由基的半抑制浓度(Half-maximal Inhibitory Concentrations, IC₅₀)分别是 0.63 mg/mL 和 0.79 mg/mL, 清除 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 分别是 0.71 mg/mL 和 0.76 mg/mL。该研究成功制备了具有抗氧化活性的兰州百合多糖铁(III)配合物, 为兰州百合资源的高值化利用和大健康新产品开发提供了一定的理论依据。

关键词: 兰州百合; 多糖铁(III)配合物; Box-Behnken 响应面法; 工艺优化; 抗氧化能力

文章编号: 1673-9078(2024)12-201-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1550

Optimization of Lanzhou Lily Polysaccharide-Fe (III) Complex Preparation using Box-Behnken Design and Evaluation of Its *in Vitro* Antioxidant Activity

LI Xiaojun¹, MA Xiaohui^{1,2}, DUAN Guojian¹, JIANG Hong³, ZENG Fankui³, GAO Zuowang⁴, DONG Wenjing⁵, WANG Yinquan^{1,2*}, JIN Ling^{1,2*}

(1.College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)(2.Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou

引文格式:

李小军,马晓辉,段国建,等.兰州百合多糖铁(III)配合物制备工艺的Box-Behnken响应面法优化及其体外抗氧化活性评价[J].现代食品科技,2024,40(12):201-208.

LI Xiaojun, MA Xiaohui, DUAN Guojian, et al. Optimization of Lanzhou lily polysaccharide-Fe (III) complex preparation using Box-Behnken design and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 201-208.

收稿日期: 2023-12-25

基金项目: 道地药材生态种植及质量保障项目(国中医药科技(2020)153号); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21); 西北中藏药省部共建协同创新中心项目(Xbzzy-2022-01); 甘肃省科技重大专项(23ZDFA013-1)

作者简介: 李小军(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源评价、保护与可持续利用研究, E-mail: lxzj912@foxmail.com

通讯作者: 王引权(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 药用植物栽培生理、植物营养和中药材质量综合评价, E-mail: kjkfpp@163.com;

共同通讯作者: 晋玲(1974-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中(藏)药资源评价、保护及可持续利用研究, E-mail: zyxyjl@163.com

730000, China)(3.Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)
(4.Lanzhou Tiantian Lily Limited Company, Lanzhou 730000, China)(5.Gansu Science and Technology Museum,
Lanzhou 730070, China)

Abstract: Lanzhou lily polysaccharides and ferric chloride were used as raw materials to prepare the Lanzhou lily polysaccharide-Fe (III) complex. The preparation conditions were optimized using the Fe^{3+} content as the evaluation index based on a single-factor experimental design and Box-Behnken response surface methodology. The structure of the polysaccharide-Fe(III) complex was analyzed using infrared spectroscopy and ultraviolet-visible spectroscopy, and its *in vitro* antioxidant activity was evaluated based on the DPPH and ABTS⁺ radical scavenging abilities. The results showed that the optimal parameters for the preparing Lanzhou lily polysaccharide-Fe(III) complex were as follows: reaction temperature of 61.10 °C, pH of 6.92, and reaction time of 1.38 h. The Fe^{3+} content of the complex was 7.32% under these reaction conditions. The results of infrared and ultraviolet analyses indicated that Lanzhou lily polysaccharides chelated with Fe^{3+} . Furthermore, the half-maximal inhibitory concentrations of the Lanzhou lily polysaccharide-Fe(III) complex and Lanzhou lily polysaccharides against DPPH radicals were 0.63 and 0.79 mg/mL, respectively. The corresponding half-maximal inhibitory concentrations against ABTS⁺ radicals were 0.71 and 0.76 mg/mL, respectively. Additionally, the antioxidant activity of the complex was considerably stronger than that of lily polysaccharides. The Lanzhou lily polysaccharide-Fe(III) complex with antioxidant activity was successfully prepared. The findings of this study provide a theoretical foundation for maximizing the use of Lanzhou lily resources and creating new health products.

Key words: *Lilium davidii* var. *willmottiae* (E. H. Wilson) Raffill; polysaccharide-Fe(III) complex; Box-Behnken response surface methodology; process optimization; antioxidant capacity

兰州百合 [*Lilium davidii* var. *willmottiae* (E. H. Wilson) Raffill] 为百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 川百合 (*Lilium davidii*) 的一个变种, 属多年生宿根草本植物, 兰州百合为我国特有的甜百合, 具有极高的食用、药用和观赏价值^[1]。多糖是兰州百合的主要活性成分之一, 具有显著的抗肿瘤、抗氧化、抑菌和提高免疫力等药理作用^[2]。研究表明, 多糖与一些金属和非金属离子形成的配合物更有其结构和生物活性的特殊性, 是生物体不可或缺的成分之一, 已广泛应用于医药、食品和保健品等行业^[3]。

铁 (Fe) 是人体必需的微量元素之一, 是血红蛋白和 55 种肌红蛋白的重要组成部分。铁不仅参与人体内血氧运输, 而且也是多种酶和酶系统的重要组成部分, 参与呼吸链电子传递、维生素 D 激活和神经递质代谢等多种酶系统以维持机体正常代谢和免疫功能^[4]。缺铁性贫血 (Iron Deficiency Anemia, IDA) 是指体内铁缺乏导致红细胞生成障碍所致的小细胞低色素性贫血。IDA 是全世界最常见和最广泛的营养缺乏性疾病, 尤其高发于孕妇和儿童^[5]。目前, IDA 的防治主要通过服用补铁剂来实现, 常见的补铁剂有硫酸亚铁、氯化亚铁、葡萄糖酸亚铁、乳酸亚铁等无机或小分子有机酸亚铁盐, 但 Fe (II) 在人体内的生物利用率较低、起效缓慢, 且易产生

内源性自由基, 导致细胞膜脂质过氧化进而造成机体损伤或刺激肠道等副作用^[6]。目前国内外研究较多的多糖铁 (III) 配合物是以低分子量多糖为载体, 并以多糖结构中的羟基、羧基等官能团作为配基, 通过共用孤对电子或 π 电子, 与三价铁离子形成稳定的配合物。由于多糖铁 (III) 配合物性质稳定且无游离铁存在, 因此对胃肠道无刺激, 能在体内被还原成 Fe (II) 后再吸收利用^[7]。多糖铁 (III) 配合物不仅保留了多糖和金属离子的活性, 而且还增强了它们的生物活性^[8]。研究表明, 多糖铁 (III) 配合物具有良好抗氧化活性^[9], 可调节血糖, 促进血液循环, 其最重要的是能有效防治 IDA^[10]。目前已从茯苓和刺梨等中药材中提取到具有免疫、抗氧化等生物活性的多糖, 经进一步分离纯化后与铁螯合制备成多糖铁^[11,12]。但由于中药材基原不同, 其多糖分子量、单糖组成、分支性质和修饰性质等结构特征不同, 同时受到提取、分离、纯化方法等因素的影响, 因此所制备多糖及多糖铁 (III) 配合物在结构特征、理化性状和生物活性等方面存在较大差异^[13]。

本研究以兰州百合为原料、以超声辅助提取法提取百合多糖, 采用 Box-Behnken 响应面法优化兰州百合多糖铁 (III) 配合物制备工艺, 分析研究兰州百合多糖铁 (III) 配合物结构及体外抗氧化活

性,为兰州百合的高值化利用及补铁剂的开发提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

材料:供试兰州百合干,由兰州市七里河区西果园镇兰州甜甜百合有限公司提供。无水乙醇、正丁醇、抗坏血酸(Vc)、邻菲罗啉、过氧化氢、三氯化铁、三氯乙酸和铁氰化钾($K_4[Fe(CN)_6]$)等均为国产分析纯,利安隆博华(天津)医药化学有限公司;DPPH、ABTS试剂盒,购自苏州科铭生物技术有限公司。

仪器:HH-501超级恒温水浴,金坛区白塔新宝仪器厂;RE-3000旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;SHB-III循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;NEXUS傅立叶变换红外光谱仪,美国热电-尼高力;FD-12CG冷冻干燥机,上海比朗仪器有限公司;5810 R高速冷冻离心机,Eppendorf;765紫外可见光光度计,上海仪电分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 兰州百合多糖的提取

将百合干(500 g)用为95% (V/V)乙醇在55℃的水浴下提取3次,除去油脂以及脂溶性小分子杂质,过滤之后将百合碎渣放置于通风橱,使多余的乙醇和水分挥发。用热水超声辅助提取法提取3次,离心(5 000 r/min)之后合并上清液,减压浓缩至初始体积的1/4,加入无水乙醇至醇体积分数为90% (V/V),置于4℃冰箱12 h后离心收集沉淀,冷冻干燥之后用去离子水溶解,利用酶(木瓜蛋白酶)结合sevage法(1/4体积的sevage试剂,氯仿:正丁醇=4:1)进行脱蛋白处理,减压浓缩之后再次用无水乙醇沉淀24 h,将得到的沉淀用少量水溶解之后流水透析(3 500 u)24 h,冷冻干燥之后得到兰州百合多糖^[4]。

1.2.2 兰州百合多糖铁(III)配合物的制备

根据文献方法^[11],将兰州百合多糖、柠檬酸钠(0.5 g)和20 mL蒸馏水混合,将其加热并保持在60℃,然后滴加六水氯化铁溶液(2 mol/L),边加边搅拌,控制反应体系pH值6~7(NaOH),直至反应液中出现红棕色不溶性沉淀,停止加入,70℃水浴1 h,离心10 min(5 000 r/min),上清液用无水乙醇沉淀,将得到的沉淀用少量水溶解之后流水

透析(3 500 u)24 h,离心并冷冻干燥,得到兰州百合多糖铁(III)配合物。

1.2.3 加热温度、时间、pH值和质量比(氯化铁与兰州百合多糖质量比)对百合多糖铁 Fe^{3+} 含量的影响

根据Feng等^[15]的方法分别对加热温度、时间、pH值和质量比4个单因素进行考察,分析各因素对兰州百合多糖铁(III)配合物制备工艺的影响规律。条件分别是反应温度:30、45、60、75、90℃;反应时间:0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,pH值:5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; $m_{氯化铁}:m_{兰州百合多糖}=1.0、1.5、2.0、2.5、3.0$ 。

1.2.4 兰州百合多糖铁(III)配合物制备工艺优化

根据单因素实验的结果,以 Fe^{3+} 含量作为评价指标,选择反应温度、pH值和反应时间这3个单因素进行百合多糖铁(III)配合物制备工艺条件优化实验,采用Box-Behnken Design原理设计了17个实验进行响应面优化。所设计的实验因素和水平设计见表1。

表1 Box-Behnken Design响应面优化试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in Box-Behnken Design response surface test

| 因素 | 水平 | | |
|-----------|------|------|------|
| | -1 | 0 | 1 |
| 反应温度(A)/℃ | 45.0 | 60.0 | 75.0 |
| pH值(B) | 6.0 | 7.0 | 8.0 |
| 反应时间(C)/h | 1.0 | 1.5 | 2.0 |

1.2.5 兰州百合多糖铁(III)配合物中 Fe^{3+} 含量测定

采用邻菲罗啉分光光度法^[16]:取样品10 mg,用去离子水定容至25 mL,充分溶解后取上述溶液0.5 mL,依次加入10% (m/V)盐酸羟胺0.5 mL,10% (m/V)邻菲罗啉1.25 mL,pH值4.5的醋酸盐缓冲液2.5 mL,充分混匀,静置30 min,测其在510 nm下的吸光值。以硫酸亚铁铵为标准品,绘制标准曲线,所有测定均为3次重复。

1.2.6 兰州百合多糖铁(III)配合物的结构分析

1.2.6.1 红外光谱(FT-IR)分析

精密称取兰州百合多糖及兰州百合多糖铁(III)配合物各2 mg及溴化钾200 mg,放入精密鼓风干燥箱,以105℃烘干至恒重,取出分别使用研钵充分研磨混合后压片机压片。使用傅里叶变换近红外光谱仪测定百合多糖及百合多糖铁(III)配

合物在 500~4 000 cm^{-1} 范围内的红外吸光度, 得到红外光谱图。

1.2.6.2 紫外光谱分析

将兰州百合多糖和兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物用去离子水配成 0.1 mg/mL 的溶液, 参比溶液为去离子水, 在波长 200~400 nm 范围内用紫外光谱扫描。

1.2.7 兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物抗氧化活性

测定方法参考苏州科铭生物技术有限公司购买的 DPPH (DPPH-1-D)、ABTS⁺ (ABTS-1-D) 自由基试剂盒说明书。

1.2.7.1 兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物对 DPPH 自由基的清除作用

精确吸取 20 μL 不同质量浓度的兰州百合多糖及兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物溶液 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/mL), 加入 380 μL DPPH 试剂, 充分混匀, 室温避光反应 20 min, 取 200 μL 至 96 孔板测定 515 nm 吸光值, 以 Vc 为阳性对照, 自由基清除率计算公式如下:

$$S_D = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

S_D —DPPH 自由基清除率, %;

A_1 —20 μL 的蒸馏水与 380 μL 的 DPPH 试剂的吸光度;

A_2 —20 μL 样品溶液与 380 μL 的样品溶液的吸光度。

1.2.7.2 兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物对 ABTS⁺ 自由基的清除作用

精确吸取 10 μL 不同质量浓度的兰州百合多糖及兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物溶液 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/mL), 加入 190 μL ABTS 试剂, 充分混匀, 室温避光反应 10 min, 取 200 μL 至 96 孔板测定 734 nm 吸光值, 以 Vc 为阳性对照, 自由基清除率计算公式如下:

$$S_A = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

S_A —ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_1 —10 μL 的蒸馏水与 190 μL 的 DPPH 试剂的吸光度;

A_2 —10 μL 样品溶液与 190 μL 的样品溶液的吸光度。

1.3 数据处理与分析

运用 Excel 软件对数据整理, Design-Expert 11 对响应面实验结果进行处理, IBM SPSS Statistics

26 进行单因素方差分析, Origin 2018 绘图, 所有实验均做 3 次重复。

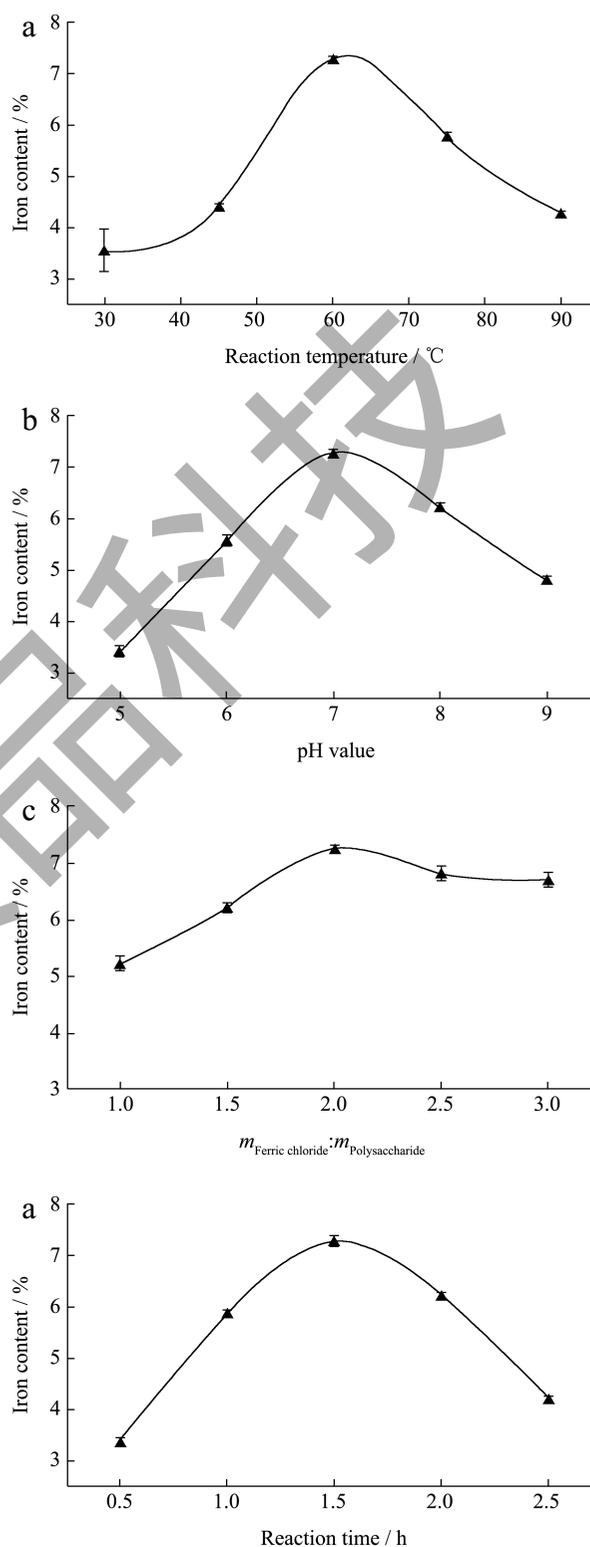


图 1 单因素对兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物中 Fe^{3+} 含量的影响

Fig.1 Effect of single factor on Fe^{3+} content of Lanzhou lily polysaccharides-iron (Ⅲ) complex ($n=3, \bar{X} \pm S$)

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

单因素试验结果如图 1 所示, 可以看到反应温度、pH 值、三氯化铁与兰州百合多糖的质量比和反应时间均对兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物的 Fe³⁺ 含量有影响。可能原因是升高温度有利于多糖与铁离子的结合, 但当温度高于 70 °C 后, 会导致多糖的活性基团变性, 破坏多糖结构, 进而影响多糖铁的生成^[17], 当反应体系酸性较强时, 多糖中的糖苷键会由于发生水解反应而被破坏。当反应体系碱性较强时, 铁离子会与氢氧根结合, 生成碱式盐, 甚至氢氧化铁沉淀, 从而阻碍了与多糖的结合^[18], 提高三氯化铁的占比虽然理论上可以提高多糖铁中的 Fe³⁺ 含量, 但三氯化铁属于强酸弱碱盐, 会通过水解作用使反应体系的酸性增强, 从而降低多糖结构的稳定性^[19]; 随着加热时间的增长, 导致已经结合在多糖上面的铁离子脱落, 导致 Fe³⁺ 含量的降低^[20]。

2.2 响应面优化试验分析

Box-Behnken 响应面法将每个因素的变化范围在小范围内用二次函数模型来拟合, 简化了步骤。与其他试验方法相比, 响应面法可以通过二维等高线图或者三维曲面图, 连续地对试验因素各个水平进行直观分析, 甚至找出预设水平以外的最优参数值, 更适合中药提取工艺的优化^[21]。

根据表 1 所展示的三因素和三水平试验方案, 采用 Box-Behnken Design 设计方法, 以反应温度、pH 值和加热时间为自变量, 兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物的 Fe³⁺ 含量为响应值, 设计 17 次响应面正交试验, 结果见表 2。

利用 Design-Expert 11 软件对表 2 得到的结果进行统计分析, 可以得到兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物合成的二次回归拟合方程:

$$Y=7.26+0.248 7A+0.295 4B+0.076 7C+0.055 0AB-0.077 5AC-0.054 2BC-1.30A^2-0.874 3B^2-0.685 2C^2$$

对所得的的回归拟合方程进行方差分析和显著性检验(表 3), 由表 3 可知, 该模型 $P<0.000 1$, 为极度显著, 失拟项不显著, 且一次项 A、B, 二次项 A²、B²、C² 影响为极显著 ($P<0.000 1$), C 为显著 ($P<0.05$); 模型 $R^2=0.998 0$, $R^2_{adj}=0.995 5$, 均接近于 1, 这说明该模型预测值与实际值拟合较好, 可以用于实际试验结果的预测。表 3 中

$FA=117.24$, $FB=165.36$, $FC=11.14$, 由此可知, 各因素对兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物 Fe³⁺ 含量影响大小顺序为: pH 值>反应温度>反应时间。

表 2 Box-Behnken Design 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken Design response surface test design and results

| 编号 | A | B | C | Fe ³⁺ 含量/% | 编号 | A | B | C | Fe ³⁺ 含量/% |
|----|-------|------|------|-----------------------|----|-------|------|------|-----------------------|
| 1 | 60.00 | 7.00 | 1.50 | 7.30 | 10 | 60.00 | 8.00 | 2.00 | 6.06 |
| 2 | 75.00 | 8.00 | 1.50 | 5.63 | 11 | 60.00 | 6.00 | 1.00 | 5.24 |
| 3 | 75.00 | 7.00 | 2.00 | 5.55 | 12 | 60.00 | 7.00 | 1.50 | 7.22 |
| 4 | 45.00 | 7.00 | 2.00 | 5.19 | 13 | 45.00 | 7.00 | 1.00 | 4.86 |
| 5 | 60.00 | 7.00 | 1.50 | 7.32 | 14 | 75.00 | 6.00 | 1.50 | 5.03 |
| 6 | 75.00 | 7.00 | 1.00 | 5.52 | 15 | 60.00 | 8.00 | 1.00 | 6.04 |
| 7 | 60.00 | 7.00 | 1.50 | 7.25 | 16 | 60.00 | 6.00 | 2.00 | 5.47 |
| 8 | 45.00 | 8.00 | 1.50 | 5.04 | 17 | 60.00 | 7.00 | 1.50 | 7.23 |
| 9 | 45.00 | 6.00 | 1.50 | 4.66 | | | | | |

表 3 Box-Behnken Design 响应面优化兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物制备工艺试验回归方差分析结果

Table 3 Experimental regression model variance analysis results of Box-Behnken response surface optimisation of Lanzhou lily polysaccharides-iron(Ⅲ) complex preparation process

| 异来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|---------|-----|---------|----------|----------|-----------------|
| 模型 | 14.86 | 9 | 1.65 | 391.08 | <0.000 1 | significant |
| A | 0.495 | 1 | 0.495 | 117.24 | <0.000 1 | |
| B | 0.698 2 | 1 | 0.698 2 | 165.36 | <0.000 1 | |
| C | 0.047 | 1 | 0.047 | 11.14 | 0.012 5 | |
| AB | 0.012 1 | 1 | 0.012 1 | 2.87 | 0.134 3 | |
| AC | 0.024 | 1 | 0.024 | 5.69 | 0.048 5 | |
| BC | 0.011 7 | 1 | 0.011 7 | 2.78 | 0.139 4 | |
| A ² | 7.07 | 1 | 7.07 | 1 674.99 | <0.000 1 | |
| B ² | 3.22 | 1 | 3.22 | 762.36 | <0.000 1 | |
| C ² | 1.98 | 1 | 1.98 | 468.16 | <0.000 1 | |
| 残差 | 0.029 6 | 7 | 0.004 2 | | | |
| 失拟项 | 0.022 3 | 3 | 0.007 4 | 4.13 | 0.102 1 | not significant |
| 纯误差 | 0.007 2 | 4 | 0.001 8 | | | |
| 总差 | 14.89 | 16 | | | | |

注: $P<0.000 1$ 为高度显著, $P<0.05$ 为显著。

2.3 响应面图分析

对影响因素的响应面图和等高线图进行分析, 可以直观地发现两因素对兰州百合多糖铁(Ⅲ)配

合物 Fe^{3+} 含量的影响 (图 2)。响应面图形的陡峭程度可以反应因素对响应值的影响程度, 相应面图越陡峭, 影响程度越高, 反之影响程度小; 等高线图的形状反应因素对响应值的影响程度, 形状接近椭圆形, 则说明两因素对响应值交互影响程度越高^[22]。pH 值效应面相对反应温度更陡峭, 说明 pH 值相较于反应温度对兰州百合多糖铁 (III) 配合物 Fe^{3+} 含量影响程度高, 反应温度效应面相对反应时间更陡峭, 说明反应温度相较于反应时间对兰州百合多糖铁 (III) 配合物 Fe^{3+} 含量影响程度高, pH 值效应面相对反应时间更陡峭, 说明前者对于兰州百合多糖铁 (III) 配合物 Fe^{3+} 含量影响优于后者, 三组图可以看到等高线形状均接近于椭圆形, 说明两两组合因素交互作用均比较明显。

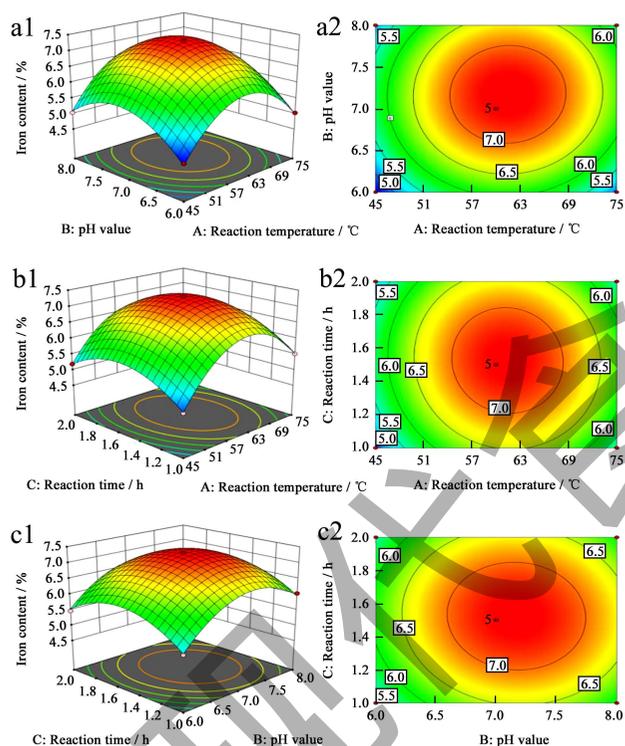


图 2 两因素相互作用对 Fe^{3+} 含量的响应面曲线图

Fig.2 Response surface curves of effects of interaction of two factors to iron content

2.4 验证试验

综合兰州百合多糖铁 (III) 配合物制备影响因素, 响应面软件拟合出的最佳制备工艺条件为: 反应温度为 $61.10\text{ }^\circ\text{C}$, 反应体系 pH 值为 6.92 , 反应时间为 1.38 h , 在此反应条件下, 兰州百合多糖铁 (III) 配合物 Fe^{3+} 含量为 7.19% 。对以上结果进行验证性试验, 验证条件与预测最优条件保持一致, 得到的兰州百合多糖铁 (III) 配合物 Fe^{3+} 含量为 7.32% ,

与预测值接近, 说明该模型可以用于兰州百合多糖铁 (III) 配合物制备工艺条件优化。

2.5 兰州百合多糖铁 (III) 配合物的结构分析

2.5.1 红外图谱分析

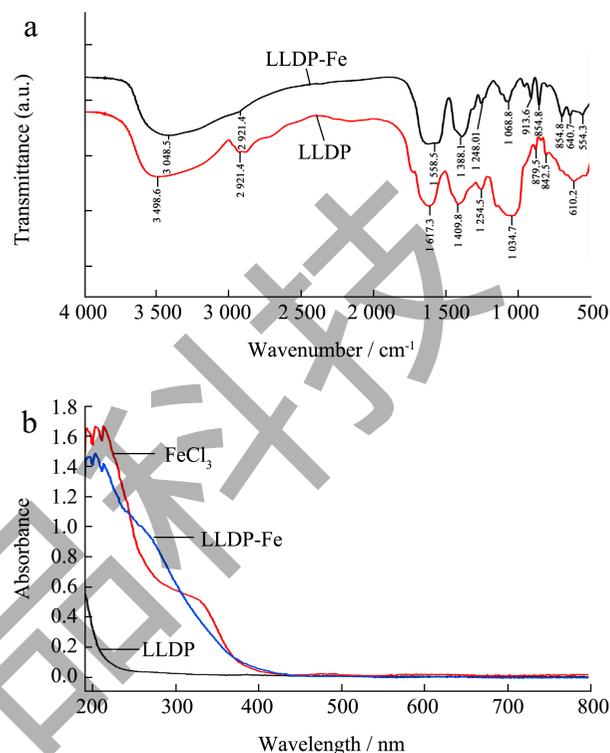


图 3 兰州百合多糖与兰州百合多糖铁 (III) 配合物的红外光谱图 (a) 和紫外-可见光光谱图 (b)

Fig.3 Fourier infrared spectra (a) and UV-Vis spectra (b) of Lanzhou lily polysaccharides and Lanzhou lily polysaccharides-iron (III) complex

兰州百合多糖与兰州百合多糖铁 (III) 配合物红外图谱如图 3a 所示, 可以看到二者吸收图谱基本一致, 说明结合 Fe^{3+} 并未改变兰州百合多糖的基本结构, 但是兰州百合多糖铁 (III) 配合物相较于兰州百合多糖, 主要吸收峰均向低波数发生了偏移。兰州百合多糖铁 (III) 配合物的 OH- 伸缩振动吸收峰相较于兰州百合多糖从 3498.6 cm^{-1} 位移到了 3408.5 cm^{-1} ; 2921.4 cm^{-1} 为二者的 C-H 伸缩振动吸收峰, 但是峰形发生了改变; 1617.3 cm^{-1} 和 1409.8 cm^{-1} 分别归属于兰州百合多糖的 OH- 的弯曲振动吸收峰和 C=O 伸缩振动吸收峰, 兰州百合多糖铁 (III) 配合物的相应吸收峰分别位移到了 1558.5 、 1388.1 cm^{-1} ; 1254.5 cm^{-1} 是兰州百合多糖羧基中的 C-O 伸缩振动, 兰州百合多糖铁 (III) 配合物的相应吸收峰位移到了 1248.01 cm^{-1} 。此外兰州

百合多糖铁(Ⅲ)配合物相较于兰州百合多糖的 $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 以下的波数发生了明显的变化,其中 $699.5\ \text{cm}^{-1}$ 和 $640.7\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰显著增大,这与 β -羟基氧化铁($\beta\text{-FeOOH}$)特征吸收峰一致^[23],这与先前的研究一致^[24]。综上可知,本试验制得的样品形成了 $\beta\text{-FeOOH}$ 铁核,并且因为 Fe^{3+} 的加入导致兰州百合多糖红外图谱的变化。

2.5.2 紫外-可见光光谱分析

利用紫外分光光度仪在 $190\sim 900\ \text{nm}$ 范围内扫描,检测是否含有蛋白质($280\ \text{nm}$)和核酸($260\ \text{nm}$)缀合物等;铁离子(Fe^{3+})在紫外光区域有一定的吸收特性,其紫外吸收谱通常表现在 $200\sim 350\ \text{nm}$ 波长范围内的吸收峰^[25], $310\ \text{nm}$ 处的吸光度(OD)通常用于反映 Fe-O 键的量^[26]。由图3b可以发现在兰州百合多糖和兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物当中并未发现蛋白质和核酸缀合物吸收峰,说明没有以上两种物质;兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物和 FeCl_3 在 $200\sim 400\ \text{nm}$ 的吸光度相似,且与兰州百合多糖相比,兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物在 $310\ \text{nm}$ 的紫外吸收显著增强,表明配合物中形成了 Fe-O 键。综上可以说明成功制备了兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物。

2.6 抗氧化活性分析

自由基在人体内积累,会加速细胞衰老甚至凋亡,引起多种如炎症、癌症、糖尿病等疾病发生^[27]。在先前的研究中,多糖铁复合物具有很强的DPPH自由基清除活性^[28]。ABTS是一种以氮原子为中心的自由基,在体外非常稳定,常用于体外检测物质的抗氧化活性^[29]。兰州百合多糖和兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物对DPPH自由基和 ABTS^+ 自由基的清除活性如图4所示,可以发现二者对DPPH自由基和 ABTS^+ 自由基均有一定的清除作用,清除率随浓度的增大而增大,存在量效关系。经计算,兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物和兰州百合多糖清除DPPH自由基 IC_{50} 从小到大分别为兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物($0.63\ \text{mg/mL}$)<兰州百合多糖($0.79\ \text{mg/mL}$),清除 ABTS^+ 自由基 IC_{50} 从小到大分别为兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物($0.71\ \text{mg/mL}$)<兰州百合多糖($0.76\ \text{mg/mL}$),由此可知兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物的抗氧化能力强于兰州百合多糖,可能是因为 Fe^{3+} 的加入,与多糖的活性基团发生了相互作用,但是均低于Vc阳性对照组,表明兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物具有良好的抗氧化活性,这与当前的关于植物多糖铁(Ⅲ)配合物的研究相似^[30]。

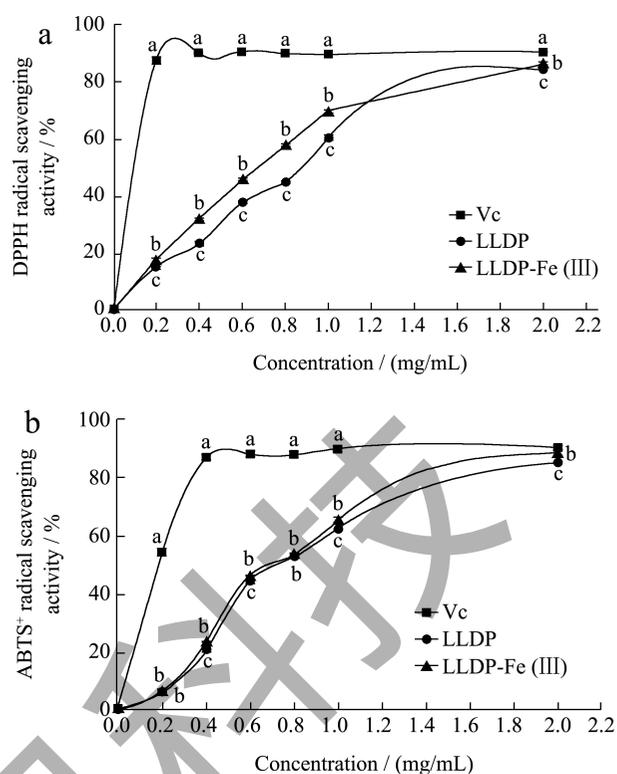


图4 兰州百合多糖与兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物对DPPH自由基(a)、 ABTS^+ 自由基(b)清除率
Fig.4 DPPH radical (a) and ABTS^+ radical (b) scavenging activity by Lanzhou Lilium polysaccharide and Lanzhou lily polysaccharides-iron (Ⅲ) complex

注: $n=3$, a、b、c表示在同一浓度下Vc、兰州百合多糖和兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物对自由基的清除活性有显著性差异($P<0.05$)。

3 结论

本研究采用Box-Behnken响应面法优化的兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物制备最佳工艺为:反应温度 $61.10\ ^\circ\text{C}$ 、pH值6.92、反应时间1.38 h。在此反应条件下,兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物 Fe^{3+} 含量为7.32%。在设置浓度范围内兰州百合多糖和兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物的抗氧化能力随浓度增大而变大,存在量效关系。与多糖相比,百合多糖铁的抗氧化能力显著增强,但其作用机理有待进一步研究。本研究为开发具有潜在抗氧化活性的兰州百合多糖铁(Ⅲ)配合物补铁剂提供了理论依据,也为兰州百合资源的高值化利用奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 惠和平,金辉,杨晓燕,等.兰州百合多糖BHP-1的化学结构与形貌分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(8):170-175.
- [2] XIAN H, WANG P, JING H, et al. Comparative study

- of components and anti-oxidative effects between sulfated polysaccharide and its iron complex [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 1303-1309.
- [3] 王晓晖,白海泉,乌兰格日乐.多糖金属配合物的研究进展[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2014,29(5): 516-519.
- [4] RUTH B R, M.PILAR V. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019, 51: 126-138.
- [5] 邹尧,竺晓凡.缺铁性贫血[J].中国实用儿科杂志,2010, 25(2):158-160.
- [6] 王方海,赵维,陈建芳,等.补铁剂研究进展[J].药学进展, 2016,40(9):680-688.
- [7] 李玉贤,裴晓红.大枣多糖铁(III)配合物的合成及一般性质研究[J].中成药,2006,28(5):707-709.
- [8] CHEN X, HUANG G. Synthesis and antioxidant activities of garlic polysaccharide-Fe(III) complex [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 813-818.
- [9] 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: 208-216.
- [10] CUI J, LIY, YU P, et al. A novel low molecular weight *Enteromorpha* polysaccharide-iron (III) complex and its effect on rats with iron deficiency anemia (IDA) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 108: 412-418.
- [11] YUE Z G, HUANG J J, SUN M J, et al. Preparation, characterization, antioxidant and antianemia activities of *Poria cocos* polysaccharide iron (III) complex [J]. *Heliyon*, 2023, 9: e12819.
- [12] CHEN G J, KAN J Q. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and assessment of its antioxidant *in vitro* and *in vivo* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 107(Pt A): 166-174.
- [13] 许梦粤,曾长立,王红波.药食同源植物多糖提取方法、结构解析和生物活性研究进展[J].食品研究与开发, 2023,44(19):216-224.
- [14] PENG Y Y, JIANG H, WU Y F, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of a novel polysaccharide-iron(III) from *Flammulina velutipes* scraps [J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2022, 15: 104190.
- [15] FENG G, ZHANG X F. Production of a *codonopsis* polysaccharide iron complex and evaluation of its properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1227-1240.
- [16] 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.
- [17] 高洁,武晓磊,孔爽,等.响应面法优化商洛百合多糖的提取工艺研究[J].陕西农业科学,2022,5:68-72.
- [18] 崔洁芬,杜春影,迟永洲,等.浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征[J].食品工业科技,2018,5:161-165.
- [19] 刘冲英,李瑾,周宁,等.响应面法优化地黄多糖铁(III)合成工艺[J].中国药学杂志,2020,55(20):1703-1710.
- [20] 钟普鹏,胡嘉宁,胡德宝,等.姬松茸多糖铁(III)合成方法的研究[J].食品科技,2021,3:232-237.
- [21] 候永杰,陈达鑫,赵小雪,等.Box-Behnken响应面法优化莲子心生物碱的提取工艺[J].今日药学,2023,33(11):831-835.
- [22] GE Q, HUANG J, MAO J W, et al. Optimization of total polysaccharide extraction from *Herba lophatheri* using RSM and antioxidant activities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 67: 37-42.
- [23] WANG J, CHEN H X, WANG Y W, et al. Synthesis and characterization of a new *Inonotus obliquus* polysaccharide-iron(III) complex [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 75: 210-217.
- [24] GAO W H, HUANG Y P, HE R X, et al. Synthesis and characterization of a new soluble soybean polysaccharide-iron(III) complex using ion exchange column [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 1242-1247.
- [25] WANG L, LI X Y, WANG B B. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium modified polysaccharides from *Hohenbuehelia serotina* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1362-1368.
- [26] WU H H, LIU Z Y, DONG S Y, et al. Formation of ferric oxyhydroxide nanoparticles mediated by peptides in anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein hydrolysate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(1): 219-224.
- [27] HU J, JIA X J, FANG X B, LI P, et al. Ultrasonic extraction, antioxidant and anticancer activities of novel polysaccharides from *Chuanxiong* rhizome [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 85: 277-284.
- [28] JIA N, QIAO H R, ZHU W, et al. Antioxidant, immunomodulatory, oxidative stress inhibitory and iron supplementation effect of *Astragalus membranaceus* polysaccharide-iron (III) complex on iron-deficiency anemia mouse model [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 213-221.
- [29] KHAWLA B J, FATMA C, SAMEH M, et al. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels [J]. *Food Chemistry*, 2016, 205: 97-105.
- [30] XIU Y W, WANG X, YU S Y, et al. Structural characterization, *in vitro* digestion property, and biological activity of sweet corn cob polysaccharide iron (III) complexes [J]. *Molecules*, 2023, 28(7): 2961.