·基础研究·

制首乌多糖 Fe(Ⅲ)配合物的合成及吸附动力学研究△

李石清，袁强，蒋福升，张婷，张春椿*
浙江中医药大学，浙江　杭州　310053

［摘要］ **目的：**制首乌多糖的制备，确定和优化制首乌多糖 Fe(Ⅲ)配合物的合成工艺条件，研究其吸附动力学特征。**方法：**采用水提醇沉法、脱色及透析方法，从制首乌中提取、精制制首乌多糖，制首乌多糖水溶液与 $FeCl_3$ 在碱性的条件下反应，制备制首乌多糖铁配合物(PIC)。采用邻菲罗啉分光光度法，分析不同条件下 PIC 中 Fe(Ⅲ)的含量变化，研究制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附动力学特征，对其结构进行红外光谱鉴定。**结果：**所制得 PIC 为红褐色粉末，pH 值 3～12，易溶于水，不溶于有机溶剂。在同一温度、不同时间下，制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附量随时间不断增大，于 1 h 后基本达到稳定；在同一时间、不同温度下制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附量随温度的升高而逐渐增大。通过红外光谱检测分析，制首乌多糖可与金属离子铁(Ⅲ)生成稳定配合物，发生配合基团以羟基为主，铁以聚合 β-FeOOH 铁核结构形式存在于 PIC 中。**结论：**制首乌多糖与金属铁离子结合，可形成稳定的 PIC，温度和时间可能是影响 PIC 制备工艺的关键因素；PIC 为新型口服补铁剂的开发提供思路。

［关键词］ 制首乌多糖；多糖 Fe(Ⅲ)；合成；吸附动力学
［中图分类号］ R284　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890(2019)10-1382-04
doi：10.13313/j.issn.1673-4890.20190225004

Study on Synthesis and Adsorption Kinetics of Refined *Polygonum multiflorum* Polysaccharide-Fe(Ⅲ) Complex

LI Shi-qing, YUAN Qiang, JIANG Fu-sheng, ZHANG Ting, ZHANG Chun-chun*
Zhejiang Chinese Medical University, *Hangzhou* 310053, *China*

［**Abstract**］ **Objective**: To determine the synthetic conditions of Fe(Ⅲ) complex of Polysaccharide from *Polygonum multiflorum*, And to study the kinetic characteristics of adsorption. **Methods**: Polysaccharides from Radix Polygoni Multiflori were extracted and refined by water extraction, alcohol precipitation, decolorization and dialysis. Under alkaline conditions, the aqueous solution of the polysaccharide was reacted with FeCl3 to synthesize the iron complex of Polysaccharide of *Polygonum multiflorum*(PIC). The change of Fe(Ⅲ) content in PIC under different conditions was analyzed by o-phenanthroline spectrophotometry. The adsorption kinetics of polysaccharide from *P. multiflorum* on Fe(Ⅲ) was studied and its structure was identified by infrared spectroscopy. **Results**: The prepared PIC was red-brown amorphous powder, soluble in water, no precipitation in the range of pH 3-12, insoluble in organic solvents and no hydrolysis. At the same temperature and different time, the amount of Fe(Ⅲ) adsorbed by polysaccharides from *P. multiflorum* increased with time, and reached a stable level after 1 hour. At the same time, the amount of Fe(Ⅲ) adsorbed by polysaccharides from *P. multiflorum* increased with the increase of temperature. Infrared spectrum analysis showed that the polysaccharides could form stable complexes with metal ion iron(Ⅲ). Hydroxyl group was the main coordination group, and iron existed in PIC in the form of polymerized beta-FeOOH iron core. **Conclusion**: Polysaccharides from from *P. multiflorum* can form stable PIC when combined with metal iron ions. Temperature and time may be the key factors affecting the preparation process of PIC. PIC provides ideas for the development of new oral iron supplements.

［**Keywords**］ refined *Polygonum multiflorum* polysaccharid; polysaccharide-Fe(Ⅲ) complex; synthesis; sorption kinetics

△［基金项目］ 浙江省平湖中药资源普查及合理利用研究(17-21205)；浙江省重中之重一级学科中药学学科科研开放基金(Yao2016012)；中央本级重大增减支项目(2060302)
*［通信作者］ 张春椿，副教授，研究方向：中药资源品质评价及开发利用；Tel：(0571)86613576，E-mail：888lishiqing@163.com

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。黑豆汁制后具有补肝肾、益精血、强筋骨等功效。其中，制首乌多糖为其主要有效成分，具有抗氧化、免疫调节和促进造血机能等作用[1-2]。因多糖分子中含有游离氨基(-NH_2)和羟基(-OH)，在氮原子上，孤对电子可投入至金属离子空轨道中，与 Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+} 金属离子反应，形成配合物[3-4]。本实验通过将精制的首乌多糖与 $FeCl_3$ 配合反应，研究其吸附动力学特性，为制首乌资源的利用及新型口服补铁剂的开发提供研究思路。

铁是构成人体必不可少的微量元素之一，可以促进发育，调节呼吸功能，增加机体的免疫力，治疗和预防因缺铁而引起的贫血。缺铁对人体发育、行为和智力、抵抗力等方面均有较大影响[5]。目前，临床上一般以亚铁 Fe(Ⅱ)制剂作为常用补铁剂，但偶有胃肠道刺激等不良反应，在稳定性和生物利用度方面也存在一些问题，其在体内产生的内源性自由基，可能会导致细胞膜损伤[6]。有文献报道，中药提取物多糖 Fe(Ⅲ)配合物作为补铁剂，具有生物利用率高，稳定性好等特点，对胃肠道副作用小。制首乌多糖作为其抗氧化、免疫调节和促进造血机能的主要有效成分，开发成补铁剂后有望起到补铁兼顾养血的功效[7]。

1　材料

TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)；BS224S 精密电子天平［赛多利斯科学仪器(北京)有限公司］；DF-101S 集热型恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂)。

制首乌购于浙江中医药大学中药饮片厂，经浙江中医药大学中药资源研究所俞冰副教授鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 干燥块根黑豆汁制后的炮制品。实验所用试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1 精制制首乌多糖的制备

取 100 g 制首乌药材，干燥，80% 乙醇索氏回流脱色，挥干溶媒，加 30 倍量水浸泡 1 h 后，煎煮 2 h，过滤，冷却，37 ℃水浴，加 α-淀粉酶适量进行水解，至制首乌水提液与碘液反应呈阴性，100 ℃煮沸 20 min 除酶，浓缩至 200 mL，氨水调 pH 至 8，置 50 ℃水浴锅中，边加 H_2O_2 边搅拌，直至呈现浅黄色，保温 2 h，挥去多余氨，sevage 法除蛋白，浓缩至 25 mL，加 3 倍量 95% 乙醇，静置过夜，抽滤取沉淀，蒸馏水溶解，流水透析 2 d，蒸馏水浸泡透析 1 d，浓缩至 20 mL，加 4 倍量的 95% 乙醇，抽滤，取沉淀，分别用无水乙醇、丙酮、乙醚润洗，真空干燥[3,8]，得粉红色精制多糖。

2.2 精制制首乌多糖 Fe(Ⅲ)配合物的合成

称取制首乌多糖 1.0 g、柠檬酸三钠 0.5 g，分别加到 250 mL 三颈瓶中，用蒸馏水 50 mL 溶解。置于 70 ℃水浴中，一边缓缓滴加 10% NaOH 溶液和 2 $mol \cdot L^{-1}$ $FeCl_3$ 溶液，一边搅拌，控制溶液 pH 值为 7～8。当出现棕红色不溶性沉淀时，立即停止滴加 10% NaOH 溶液和 2 $mol \cdot L^{-1}$ $FeCl_3$ 溶液，继续在热水浴中搅拌 1 h。待反应液冷却后，3500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min。取上层深红棕色的液体，加入 4 倍量体积 95% 乙醇，静置，使红棕色沉淀物质沉淀完全。离心分离，沉淀物质分别用 95% 乙醇、无水乙醇和无水乙醚各洗 3 次以上，进行真空干燥，得到制首乌多糖 Fe(Ⅲ)配合物(PIC)粗品。

将所得 PIC 粗品溶于纯净水，流水透析 48 h 以上，除去盐和小分子物质，浓缩，加入 4 倍量体积 95% 乙醇，醇沉，沉淀物分别用 95% 乙醇、无水乙醇、无水乙醚各洗 2 次，真空干燥，得无定形红褐色粉末的精制多糖 Fe(Ⅲ)配合物 1.02 g。

2.3 PIC 的理化性质

2.3.1 PIC 的一般物理性质　PIC 是红褐色粉末，无臭、无味，易溶于水中，水溶液呈中性，不溶于无水甲醇、无水乙醇、乙醚等有机溶剂。

2.3.2 PIC 的稳定性试验　透析除盐后的 PIC 易溶于水，用 K_4［$Fe(CN)_6$］检验其水溶液[8]，未显示 Fe^{3+} 的特性，证实 PIC 水溶液中不存在游离 Fe^{3+}，说明所生成的配合物较稳定。

2.3.3 PIC 的水解实验　分别配制浓度为 0.01 $mol \cdot L^{-1}$ $FeSO_4$、$FeCl_3$、PIC(PIC 中 Fe^{3+} 浓度为 0.01 $mol \cdot L^{-1}$)，准确吸取上述溶液 20 mL，分别用 0.01 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 标准溶液进行滴定，同时测 pH 值变化。结果，pH 值为 2.56 时，$FeCl_3$ 开始沉淀，pH 值为 6.67 时，出现大量的沉淀物。pH 值为 3.45 时，$FeSO_4$ 开始沉淀，pH 值为 6.69 时，出现大量的沉淀物。PIC 在 pH 值 3～12 内均未出现沉淀，pH 值 <3 时开始出现沉淀物，说明 PIC 在 pH 值 3～12 稳定。

2.4 制首乌多糖 Fe(Ⅲ)配合物的吸附动力学研究

2.4.1 Fe^{3+}含量测定　分别准确移取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL 质量浓度为 10 μg·mL^{-1}的标准 Fe^{3+}溶液，置于 25 mL 量瓶，再加入 1 mL 的 10%盐酸羟胺溶液，2.5 mL 的 1 g·L^{-1}邻菲罗啉显色液和 5 mL 的 1 mol·L^{-1} NaAc 溶液，用蒸馏水稀释至刻度后摇匀，放置 10～15 min，以相对应试剂作为空白，于 510 nm 处测定吸光度。Fe^{3+}浓度作为纵坐标，吸光度作为横坐标，得回归方程为：$Y = 6.137\ 3X - 0.031\ 1$，$r = 0.999\ 3$。

2.4.2 吸附速率实验　在 50 mL 烧杯中，放入精确称取的制首乌多糖 0.05 g，加纯净水 19 mL，另取 2 mol·L^{-1}的Fe^{3+}溶液 1 mL 混匀，置 25 ℃恒温振荡容器中以 100 r·min^{-1}的恒速振荡，使其充分吸附，分别在 15、30、60、90、120、180、240 min，取 10 μL 溶液，分别置于 25 mL 的容量瓶中，同 2.4.1 操作方法测吸光度，绘制其吸附动力学的速率曲线。因反应溶液中 Fe^{3+}溶液所加入量固定，制首乌多糖铁配合物含量不同，而随时间变化，表现出吸附变化曲线。结果见图 1。

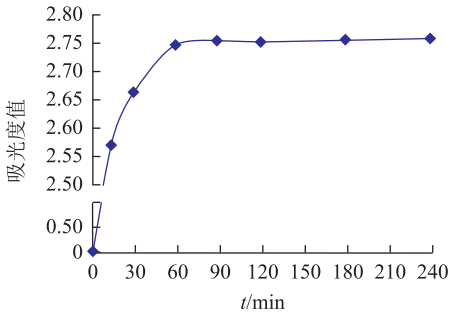


图 1　制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附速率曲线

2.4.3 等温吸附实验　精密称取制首乌精制多糖 0.05 g，平行 5 份，分别置 50 mL 带塞的三角锥瓶中，加蒸馏水 19 mL，然后加 2 mol·L^{-1} Fe^{3+}溶液 1 mL，摇匀，分别置 10、25、35、45、60 ℃恒温振荡器中，以 100 r·min^{-1}的恒速进行振荡。反应 1 h，取 10 μL 溶液置 25 mL 容量瓶中，同 2.4.1 操作方法测吸光度，并绘制吸附等温线，因反应溶液中 Fe^{3+}溶液所加入量固定，制首乌多糖铁配合物含量不同，而表现出吸附曲线。结果见图 2。

2.5 PIC 还原性实验

精密称定 PIC 0.2 g，置 100 mL 的容量瓶中，加蒸馏水、定溶至刻度，备用。分别取 pH 值为 1、2、3、4、5、6、7、8 的 HCl 或 NaOH 溶液 85 mL，分别取 PIC 储备液 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，并加入 10%的抗坏血酸溶液 3 mL，加入适量的稀 NaOH 或 HCl 溶液，定容，使溶液 pH 值为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0，混匀，置 37 ℃的水浴中进行还原反应[9]。在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 时，分别取还原液置 25 mL 容量瓶中，同 2.4.1 操作分别测吸光度。结果见表 1。

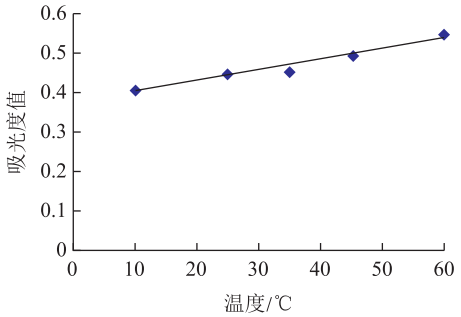


图 2　制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附等温曲线

表 1　吸光度与溶液 pH 值及反应时间的关系

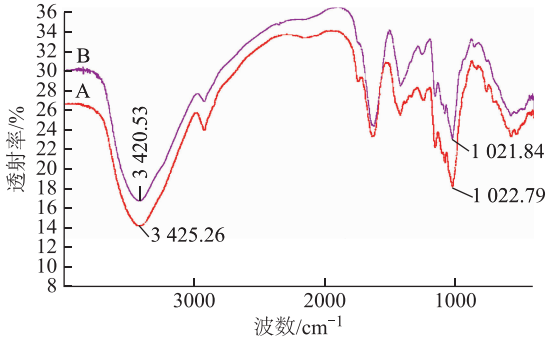
pH	吸光度值					
	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h
1.0	0.421	0.429	0.428	0.443	0.445	0.444
2.0	0.478	0.489	0.490	0.502	0.501	0.504
3.0	0.496	0.510	0.522	0.529	0.528	0.530
4.0	0.512	0.525	0.533	0.540	0.544	0.542
5.0	0.507	0.518	0.521	0.538	0.539	0.537
6.0	0.482	0.493	0.502	0.510	0.512	0.513
7.0	0.490	0.503	0.419	0.533	0.530	0.534
8.0	0.509	0.520	0.534	0.537	0.545	0.543

2.6 PIC 红外光谱分析

红外光谱分析可用于研究分子的结构和化学键，也可以作为表征和鉴别化学物种的方法，本实验对制首乌多糖与制首乌多糖铁的红外谱图进行比较研究，并与文献报道的数据比进行较。

红外光谱图(图 3)显示，在 3500～3400 cm^{-1}附近有强吸收峰出现，可能是由于制首乌多糖分子中有多个较强氢键作用的-OH 存在，为制首乌多糖中羟基的伸缩振动吸收峰。通过制首乌多糖和制首乌多糖铁红外光谱对照，发现制首乌多糖的结构并没有因金属离子络合反应而发生改变。1023、1021 cm^{-1}是分别与葡聚糖存在状态有关[10-11]。制首乌多糖铁在

700、900 cm^{-1}左右处的特征吸收与相关文献报道的 β-FeOOH 的特征吸收一致[12]，表明制首乌多糖配合物中的铁核可能是以聚合的 β-FeOOH 结构存在。



注：A. 制首乌多糖；B. 制首乌多糖铁。

图 3　制首乌多糖与制首乌多糖铁红外光谱分析谱图

3　讨论

本实验采用水提醇沉、脱色及透析等方法制备精制制首乌多糖，制备了制首乌多糖铁配合物，并确定了制首乌多糖铁配合物的理化性质：红褐色粉末，无味，不溶于无水甲醇、无水乙醇、乙醚等有机溶剂，易溶于水，并且其水溶液呈中性，其 pH 值 3～12 相对稳定。PIC 水溶液中不存在游离的 Fe^{3+}，说明生成了相对较为稳定配合物。故口服后可避免游离铁离子对胃肠道造成刺激。

吸附动力学研究表明，在同一温度、不同时间下，制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附量随时间增加不断增大，并于 1 h 后基本达到稳定；在同一时间、不同温度下制首乌多糖对 Fe(Ⅲ)的吸附量随温度的升高而逐渐增大。在相同 pH 值下、不同时间下，PIC 的还原性随时间不断增大于 2 h 后基本达到最大；在同一时间、不同 pH 值下，PIC 的还原性随 pH 值的升高而逐渐增大。

铁在人体发育中具有重要的作用，可以促进发育，调节呼吸功能，增加机体的免疫力，治疗和预防因缺铁而引起的贫血。缺铁对人体发育、行为和智力、抵抗力等方面均有较大影响。补铁剂使用不当，可在体内产生内源性自由基，会导致细胞膜损伤。中药提取物多糖 Fe(Ⅲ)配合物作为补铁剂，具有生物利用率高，稳定性好等特点，对胃肠道副作用小。经黑豆汁制后的何首乌不仅具有补肝肾、益精血、强筋骨等功效，而且其主要有效成分多糖具有抗氧化、免疫调节和促进造血机能等作用，制何首乌经水提醇沉法提取物质主要为多糖类成分，相对安全性高，而且释放出铁后的配体多糖还具有多种生物活性，可能有兼顾造血与补铁作用，故 PIC 可能有较高的生物利用度，有望成为一种新型的口服补铁剂。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：中国中医药科技出版社，2015：122-123.

[2]　陈璐，李晋奇，汪洋，等. 补气生血口服液何首乌渗漉工艺优化研究[J]. 中医药导报，2016，22(7)：71-76.

[3]　梁雅，张素清. 灵芝多糖 Fe(Ⅲ)配合物的合成及吸附动力学研究[J]. 中国生化药物杂志，2017，37(2)：40-42.

[4]　杨相，张豆豆，罗琳，等. 锰、钼、硼三种微量元素对黄芪生长指标总多糖含量及生理特性的影响[J]. 中国现代中药，2018，20(2)：184-188.

[5]　孙晓琦，武天琦，李璐. 锌铁铜锰微量元素与老年人常见疾病的关系[J]. 现代食品，2018，18(14)：43-45.

[6]　杨帆. 改性类人胶原蛋白铁的制备工艺及生物学功效[D]. 西安：西北大学，2017：4.

[7]　崔洁芬，杜春影，迟永洲. 浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征[J]. 食品工业科技志，2018，39(5)：161-165.

[8]　陈占科，王淑美，陈静，等. 制何首乌多糖的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(19)：44-46.

[9]　景永帅，张瑞娟，吴兰芳，等. 北沙参多糖铁配合物的制备结构特征及生物活性[J]. 食品化学，2018，39(24)：65-70.

[10]　张语凡，王蕾，彭诗涛，等. 何首乌不同炮制时间与方式的薄层特征图谱鉴别[J]. 中华中医药杂志，2018，33(11)：5182-5185.

[11]　肖榕，林艳，雷思敏，等. UPLC 指纹图谱结合模式识别分析不同产地生/制何首乌[J]. 中国中药杂志，2017，42(12)：2305-2310.

[12]　杨秀芳，陈梅，马养民. 大豆低聚糖铁(Ⅲ)、硒(Ⅳ)配合物制备及其表征[J]. 粮食与油脂，2011，8(8)：47-49.

（收稿日期：2019-02-25　　编辑：王笑辉）