

百合多糖铁复合物的合成及其铁含量的测定

李玉贤^{*}, 游志恒, 褚意新
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 从百合中提取百合多糖, 后与铁() 合成百合多糖铁复合物(LPC), 建立 LPC 中铁含量的测定方法。方法: 热水浸泡法提取百合多糖; 在碱性条件下, 百合多糖水溶液与三氯化铁反应合成 LPC; 用邻菲罗啉分光光度法和原子吸收光谱法测定 LPC 中铁() 的含量。结果: LPC 是深棕红色无定型粉末, LPC 中铁() 的含量: 邻菲罗啉分光光度法测定结果为 20.81%, 原子吸收光谱法测定结果为 20.10%。结论: 邻菲罗啉分光光度法和原子吸收光谱法的测定结果基本一致。

[关键词] 百合多糖; 百合多糖铁复合物; 合成; 铁含量的测定

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0047-03

Synthesis of Lily Polysaccharide-Fe() Complex and Determination of Fe()

LI Yu-xian[?], YOU ZHI-heng, CHU Yi-xin

(Department of Chinese Medicine, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: Lily polysaccharide was extracted from lily, then lily polysaccharide-Fe() complex (LPC) was synthesized with lily polysaccharide and FeCl₃. We will establish the method of determination of iron in LPC. **Method:** Lily polysaccharide was abstracted with warm water; LPC was synthesized with lily polysaccharide and FeCl₃ under the alkaline condition; The determination of Fe() was done with the method of ferroin- Fe() and atomic absorption spectrophotometry. **Result:** LPC was heavy brownish red and shapeless powder. Content of Fe() at LPC was 20.81% (ferroin- Fe()) and 20.10% (atomic absorption). **Conclusion:** The results are about the same.

[Key words] Lily polysaccharide; polysaccharide-Fe() complex; synthesis; determination of iron

多糖是多羟基醛或酮的缩聚物, 具有与多种金属离子配位的能力, 近年来国内外对补铁剂的研究表明^[1-2], 多糖铁() 复合物作为补铁剂不仅具有合适的配合稳定性, 对胃肠道无或甚少刺激作用, 而且当其释放铁之后, 配体多糖具有多方面的生物活性, 是对肌体有益的成分, 可被吸收利用, 不会产生毒副作用。另外, 多糖铁() 复合物中不含游离的二价或三价铁, 无铁离子所致的胃肠黏膜腐蚀和刺激作用; 与硫酸亚铁比较, 多糖铁能以分子形式存在, 很容易被小肠黏膜吸收, 从而改善造血功能, 提

高血清铁和转铁蛋白的水平^[3]。近年来, 有关多糖铁复合物作为补铁剂的研究已有不少报道^[4], 但有关百合多糖铁含量测定的研究还未见报道。为此, 笔者选用河南信阳产的百合为原料, 从中提取百合多糖^[5], 然后使其与铁() 进行络合反应, 制备百合多糖铁() 复合物(LPC), 并对其含铁量进行了测定。希望此研究能为百合资源的开发利用提供一条新途径。

1 材料

1.1 实验仪器 UV-2201 紫外-可见分光光度计(日本岛津); 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); 原子吸收光谱仪(Perkin Elmer 公司); DZF-1B 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂); X-5 显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司); FA2004 电子天平(上海

[收稿日期] 20100101(004)

[通讯作者] * 李玉贤, 女, 副教授, 主要从事教学和中草药活性成分提取及结构改造研究工作, Tel: (0371) 66686930, E-mail: lyx@hactcm.edu.cn

精密科学仪器公司); SHZ-C 型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); 电动搅拌器(常州国华电器有限公司)等。

1.2 药品及试液 百合(购于河南信阳), 所用试剂均为分析纯。铁() 标准储备液($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$): 精密称取 $0.7023 \text{ g Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 溶于少量纯水, 移入 1000 mL 量瓶中, 加 3 mL 盐酸, 用纯水定容至刻度; 铁() 标准使用液($10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用时现配): 吸取 10.00 mL 铁() 标准储备液, 移入 100 mL 量瓶中, 用纯水定容至刻度; 邻菲罗啉显色液: 称取 0.1 g 邻菲罗啉, 溶解于加有 2 滴盐酸的纯水中, 并稀释至 100 mL ; 10% 盐酸羟胺溶液: 称取 $10 \text{ g}(\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl})$, 溶于纯水中, 并稀释至 100 mL ; 醋酸钠溶液($\text{pH} 4.5$ 的缓冲液): 称取 68 g 醋酸钠溶于 500 mL 纯净水中, 加入冰乙酸 28.8 mL , 转移至 1000 mL 量瓶中, 用纯净水定容至刻度。

2 方法与结果

2.1 百合多糖的制备及其含量测定

2.1.1 百合多糖的制备 百合干燥品(500 g), 95% 乙醇回流提取脱脂, 药渣置于通风处晾干。脱脂后的药渣用水作溶剂在 65°C 水浴中浸提 3 次, 每次 2 h , 合并提取液, 离心, 得上清液, 用旋转蒸发器减压浓缩至 750 mL , 用 95% 乙醇调至含醇量为 80% , 静置, 离心得粗多糖沉淀。粗多糖经 Sevag 法除蛋白后, 加 3 倍量的无水乙醇使之沉淀, 将沉淀先后用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤, 真空干燥, 得百合多糖粗品 26 g 。

2.1.2 百合多糖的含量测定 用苯酚—硫酸法测定百合多糖粗品中多糖含量。结果多糖含量为 73.48% 。

2.2 LPC 的合成及一般性质

2.2.1 LPC 的合成 称取干燥百合多糖 2.0 g 、柠檬酸三钠 0.5 g 加入到 250 mL 的三颈瓶中, 用 60 mL 蒸馏水溶解。在 70°C 水浴中不停搅拌, 同时缓缓滴加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯化铁溶液和 20% 的氢氧化钠溶液, 控制溶液的 pH 在 $8.0 \sim 8.5$ 。当反应液中出现棕红色不溶性沉淀时, 立即停止滴加三氯化铁和氢氧化钠溶液, 继续在热水浴中搅拌 1 h 。待反应液冷却后, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 。取上层深红棕色液体, 加入约 3 倍量体积的 95% 乙醇, 溶液中出现红棕色沉淀物质, 静置使沉淀完全。离心分离, 沉淀分别用 95% 乙醇、无水乙醇、乙醚各洗 1 次, 真空

干燥, 得无定形红褐色粉末(粗品)。

将粗品溶于纯净水, 透析除盐后, 醇沉。沉淀分别用 95% 乙醇、无水乙醇、乙醚各洗 2 次, 真空干燥, 得百合多糖铁(精品) 1.71 g 。

2.2.2 LPC 的一般性质 LPC 是无定形红棕色粉末, 无臭、无味, 易溶于水, 且水溶液呈中性, 不溶于无水甲醇、无水乙醇、乙醚等有机溶剂。熔点高于 300°C 。LPC 的稳定性实验: 透析除盐后的 LPC 溶于水, 以 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 检验其水溶液, 结果不显示 $\text{Fe}(\text{II})$ 离子的特殊效应。证实 LPC 水溶液中不存在游离的 Fe^{3+} 。说明生成了较为稳定的复合物。

LPC 的水解实验: 配制 FeCl_3 、 FeSO_4 、LPC 的浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (LPC 中 Fe^{3+} 浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 准确吸取 20 mL 上述各溶液分别用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 标准溶液滴定, 同时用 pH 酸度计测定溶液的 pH , 实验测得: FeCl_3 开始浑浊时的 pH 为 2.64 , 出现大量浑浊时的 pH 为 6.71 。 FeSO_4 开始浑浊时的 pH 为 3.32 , 出现大量浑浊时的 pH 为 6.78 。LPC 在 pH 达 12 时仍无浑浊, 说明 LPC 在一定 pH 范围内具有特别的稳定性。

2.3 邻菲罗啉分光光度法测定 LPC 中的含铁量

2.3.1 最大吸收波长的选择 精密吸取标准溶液 6.00 mL , 样品溶液 1.50 mL , 分别置于 50 mL 量瓶中, 再分别加入 10% 盐酸羟胺溶液 1 mL , 邻菲罗啉显色液 2.5 mL 和醋酸钠溶液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 5 mL , 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 放置 $10 \sim 15 \text{ min}$ 。分别于 $300 \sim 800 \text{ nm}$ 以试剂溶液为空白进行扫描。结果样液和标液均在 510 nm 处有最大吸收, 故选择 510 nm 为测定波长。

2.3.2 标准曲线的制备 取 7 个 50 mL 量瓶, 分别准确加入标准铁使用溶液($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $0.00, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00 \text{ mL}$, 再分别加入 10% 盐酸羟胺溶液 1 mL , 邻菲罗啉显色液 2.5 mL 和醋酸钠溶液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 5 mL , 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 放置 $10 \sim 15 \text{ min}$, 在 510 nm 处以试剂溶液为空白, 用 UV-2201 紫外-可见分光光度计测定吸光度(A)。结果见表 1。以铁的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得回归方程: $A = 0.2142C - 0.0002, R^2 = 0.9996 (n=6)$ 。

2.3.3 样品中铁含量的测定 样品溶液的制备: 精密称取百合多糖铁复合物 6 份, 溶于少量蒸馏水, 转入 1000 mL 量瓶中, 用纯净蒸馏水定容至刻度。

精密吸取样品溶液 1.60 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 10% 盐酸羟胺溶液 1 mL, 邻菲罗啉显色液 2.5 mL 和醋酸钠溶液(1 mol · L⁻¹) 5 mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 放置 10 ~15 min, 在 510 nm 处测定 A。根据回归方程计算 Fe() 含量, 见表 2。

表 1 铁浓度与吸收度的关系

No.	C/mg · L ⁻¹	A
1	0.100 0	0.022 0
2	0.200 0	0.043 5
3	0.400 0	0.084 5
4	0.600 0	0.125 7
5	0.800 0	0.172 8
6	1.000 0	0.214 5

2.3.4 邻菲罗啉铁溶液的稳定性实验 将同一样品液按 5 项平行配制 5 份, 在室温、避光条件下, 放

置 20, 40, 60, 120, 180, 240 min, 测定相应吸光度值。RSD 为 0.47%。可见邻菲罗啉铁水溶液比较稳定, 4 h 内 A 值基本保持不变。

表 2 样品中铁含量测定结果

No.	样品量 /g	A	C /mg · L ⁻¹	含铁量 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.127 7	0.181 0	0.846 0	20.71		
2	0.128 3	0.183 4	0.857 3	20.88		
3	0.129 3	0.186 0	0.869 3	21.01	20.81	0.706
4	0.127 5	0.181 3	0.847 8	20.78		
5	0.128 4	0.181 0	0.846 4	20.60		
6	0.127 6	0.182 5	0.8533	20.90		

2.3.5 回收率实验 精密称取百合多糖铁复合物样品 5 份, 分别加入一定量的铁标准品, 按样品中铁含量测定方法测定, 计算回收率, 结果见表 3。

表 3 百合多糖铁加样回收率

No.	样品量 /g	样品含铁量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.127 8	0.851 0	0.850 0	1.693 4	99.11		
2	0.128 9	0.858 4	0.850 0	1.709 3	100.11		
3	0.130 6	0.869 7	0.850 0	1.714 8	99.42	99.71	0.439
4	0.126 2	0.840 4	0.850 0	1.691 2	100.09		
5	0.129 3	0.861 0	0.850 0	1.709 6	99.84		

2.4 用原子吸收光谱法测定 LPC 中的含铁量 在 50B 原子吸收光谱仪上, 用火焰法, 在灯电流 5.0 mA、狭缝 0.5 nm、波长 248.3 nm、火焰高度 7.5 mm、空气流 6.5 L · min⁻¹、乙炔流量 1.5 L · min⁻¹ 条件下, 采用 GB11911-89 分析法测定 LPC 中铁的含量, 测定结果含铁量为 20.10%。

3 讨论

3.1 为确保试验结果的准确性, 试验过程中所用玻璃仪器均用稀硝酸浸泡 24 h 后用纯净水洗净备用。

3.2 含量测定结果表明: 用邻菲罗啉分光光度法测定 LPC 中铁含量的方法简捷快速, 精密度高, 铁含量测定结果与原子吸收光谱法测定结果一致。

3.3 防治缺铁性贫血最主要方法是给肌体补充足够的铁, 补充铁最常用、最方便、最重要的方法是口服。口服补铁剂在体内主要的吸收部位在十二指肠和空肠上段(pH 6 ~7), 它必须是水溶性的。以往最常用的硫酸亚铁是一种游离的铁离子制剂, 有明显的副作用, 如胃肠道刺激、口腔异味及铁中毒等, 故限制了它的使用。LPC 在生理条件下可溶, 且无游离的铁离子存在, 应无相应的副作用。现代药理学研究表明, 百合具有镇咳祛痰、滋阴润肺和强壮作

用, 从中分离得到的百合多糖能够作用于肌体的细胞免疫系统, 对免疫功能具有明显的调理作用^[6]。据此, 笔者设计合成的百合多糖铁复合物有望成为营养型口服补铁剂。

[参考文献]

- [1] Sas G, Nemesaszky E, Brauer H. On the therapeutic effects of trivalent and divalent iron deficiency anemia [J]. *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 1984, 34(1): 1575.
- [2] 王耀莉, 史锁洪, 朱霖, 等. 多糖铁复合物治疗儿童缺铁性贫血[J]. *新药与临床*, 1994, 13(4): 251.
- [3] 吴晓亮. 多糖铁复合物治疗成人缺铁性贫血的临床观察[J]. *中国实用医药*, 2008, 3(12): 72.
- [4] 李玉贤, 裴晓红. 大枣多糖铁() 配合物的合成及一般性质研究[J]. *中成药*, 2006, 28(5): 707.
- [5] 高现朝, 马宏伟. HPLC 法分析百合多糖的单糖组成[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(8): 27.
- [6] 苗明三, 杨林莎. 百合多糖免疫兴奋作用[J]. *中国药理与临床*, 2003, 19(1): 15.

[责任编辑 邹晓翠]