

响应面法优化水溶性大豆多糖-铁(II)配合物的合成工艺

何瑞雪^{1,2}, 高文宏¹, 曾新安², 朱思明^{1,*}

(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2.广州现代产业技术研究院, 广东 广州 511458)

摘要: 优化水溶性大豆多糖-铁(II)配合物的合成工艺, 在单因素试验基础上, 应用响应面法二次回归正交旋转组合试验设计, 分析水溶性大豆多糖与催化剂柠檬酸三钠的质量比、pH值、反应时间及温度对配合物铁含量的影响, 建立相应的预测模型。方差分析结果表明: 质量比、pH值对铁含量有显著影响。优化所得的较优工艺参数为水溶性大豆多糖与柠檬酸三钠质量比 1.89:1、pH 3.89、反应时间 1.56h、温度 60.6℃。对应的铁含量的预测值为 23.08%, 实际平均值为 21.89%。结果表明: 应用响应面法所得到的水溶性大豆多糖-铁(II)配合物的合成工艺参数是可行的。

关键词: 水溶性大豆多糖; 亚铁; 合成; 响应面法

Optimization of Synthesis of Soluble Soybean Polysaccharide-Iron (II) Complex by Response Surface Methodology

HE Rui-xue^{1,2}, GAO Wen-hong^{1,2}, ZENG Xin-an², ZHU Si-ming^{1,*}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. Guangzhou Institute of Modern Industrial Technology, Guangzhou 511458, China)

Abstract: In order to optimize the synthesis process of soluble soybean polysaccharide-iron (II) complex, based on the single factor tests, a dual quadratic rotary combination design was used to analyze the effects of mass ratio between soluble soybean polysaccharide and catalyst sodium citrate, pH, reaction time and reaction temperature on iron content of SSPS-Fe (II). A prediction model was established. The analysis of variance revealed that mass ratio and pH could significantly affect iron content of SSPS-Fe (II). The optimal synthesis conditions were mass ratio between soluble soybean polysaccharide and catalyst sodium citrate of 1.89:1, pH 3.89, reaction time of 1.56 h and reaction temperature of 60.6 °C. The iron content predicted by the model was 23.08%, which was consistent with the experimental value.

Key words: soluble soybean polysaccharide; ferrous; synthesis; response surface methodology

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0098-05

铁是人体内必需的微量元素之一, 是血红蛋白和肌红蛋白的核心部分, 细胞中许多有重要功能的酶也都含有铁, 是人体许多正常生理过程中不可缺少的物质。缺铁性贫血(iron deficiency anemia, IDA)是最常见的疾病之一, 严重威胁着人类健康^[1]。国内外已有不少多糖铁配合物的研究, 如已上市的补铁剂力蜚能^[2]、葡聚糖铁^[3-5]、海藻酸铁^[6]、当归多糖铁^[7-9]、

地黄多糖铁^[10]、人参多糖铁^[11]等, 研究表明, 多糖铁类配合物不仅可以避免胃肠道刺激, 还具有副作用小, 溶解度好, 铁含量高等优点, 是一种很有前途的补铁剂。

水溶性大豆多糖(soluble soybean polysaccharide, SSPS)是从豆科大豆子叶部分用热水浸取所得水溶性多糖类物质, 是以鼠李半乳糖醛酸和高聚半乳糖酸为主链,

收稿日期: 2011-04-13

基金项目: 广东省科技计划项目(2008A080403009; 2008A080403010); 中国博士后基金资助项目(20090450873); 广州市重大科技专项(2010U1-D00021)

作者简介: 何瑞雪(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: 568852532@163.com

* 通信作者: 朱思明(1976—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为制糖工程。E-mail: rachy5108@sina.com

半乳糖和阿拉伯糖为侧链结合的结构体, 结构类似果胶^[12-16], 不仅具有膳食纤维所具有的生理功能特性, 还具有许多其他优越的食品功能特性, 如乳化及乳化稳定性、抗氧化性、抑菌性、成膜性、抗黏结性及泡沫稳定性, 可用作乳化剂、分散剂、稳定剂及吸附剂等。SSPS 属酸性多糖, 糖分子含有羟基和羧基等亲核能力强的供电子基, 易与金属离子配合。本实验拟以 SSPS 为载体, 与亚铁进行配合反应, 采用响应面法优化合成工艺, 以期开发为强化铁的食品添加剂和营养型口服铁剂, 并进一步扩大 SSPS 的应用领域。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

水溶性大豆多糖(水分 $\leq 7.0\%$, 粗蛋白质 $\leq 8.0\%$, 粗灰分 $\leq 10.0\%$) 广州华汇生物实业有限公司; 硫酸亚铁、柠檬酸三钠、邻菲罗啉、硫酸亚铁胺、盐酸羟胺、无水乙醇、盐酸、乙酸钠均为 AR 级。

1.2 仪器与设备

TU-1901 双光束分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; PHSJ-4A 型实验室 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; CR22G 高速冷冻离心机 日本日立集团。

1.3 方法

1.3.1 SSPS-Fe(II)配合物的合成

称取一定量的水溶性大豆多糖及催化剂柠檬酸三钠, 用蒸馏水溶解, 在恒温水浴条件下滴加一定量的硫酸亚铁溶液, 使 SSPS 与二价铁质量比为 1:1(按照 0.100g SSPS 滴加 2mL 0.89mmol/mL 硫酸亚铁进行), 同时用 1% 盐酸或 10% 醋酸钠溶液调节 pH 值, 滴加完成后继续搅拌反应特定时间, 冷却后用无水乙醇醇析 1h, 5000r/min 离心分离 5min, 沉淀用 95% 乙醇、无水乙醇洗涤, 直至洗液不含二价铁离子。50℃热风干燥后得 SSPS-Fe(II)配合物。

1.3.2 配合物铁离子含量测定

采用邻菲罗啉分光光度法测定 SSPS-Fe(II)配合物的铁含量, 标准曲线的绘制参见文献[17]。

准确称取 1.3.1 节所得的 SSPS-Fe(II)配合物 0.020g, 蒸馏水溶解后定容于 50mL 容量瓶中, 准确移取 1.00mL 溶液于 25mL 比色管中, 加入 10% 盐酸 0.5mL, 10% 盐酸羟胺溶液 1mL, 放置 30min, 再加入 0.15% 邻菲罗啉显色液 2mL 和 10% 醋酸钠溶液 5mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 显色 10min 后, 于 510nm 处测定吸光度(A)。根据回归方程计算 Fe(II)含量, 并计算配合物的铁含量。

$$\text{配合物的铁含量} \% = \frac{m_1}{m} \times 100$$

式中: m_1 为配合物中铁离子含量/g; m 为配合物总量/g。

1.3.3 单因素试验

分别研究了水溶性大豆多糖与柠檬酸三钠的质量比、水浴温度、pH 值及反应时间对 SSPS-Fe(II)配合物铁含量影响, 按 1.3.1 节方法进行合成, 4 个因素的固定值分别为水溶性大豆多糖与柠檬酸三钠质量比 1:1、水浴温度 60℃、pH4.6、反应时间 1h。各单因素试验设计见 2.1 节。

1.3.4 响应面试验设计

在单因素试验的基础上, 根据二次回归正交旋转组合设计原理, 选取 SSPS 与柠檬酸三钠的质量比(A)、pH 值(B)、反应温度(C)、反应时间(D)4 个因素作为自变量, 配合物铁含量(Y)为响应值, 设计了四因素五水平共 30 个试验点的响应面分析试验, 其因素水平设计见表 1。

表 1 水溶性大豆多糖-铁(II)配合物合成试验因素与水平设计
Table 1 Factors and levels in dual quadratic rotary combination design

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
A 质量比	1:3	1:2	1:1	2:1	3:1
B pH	3.00	3.50	4.00	4.50	5.00
C 反应温度/℃	40.00	50.00	60.00	70.00	80.00
D 反应时间/h	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 SSPS 与柠檬酸三钠质量比对配合物铁含量影响

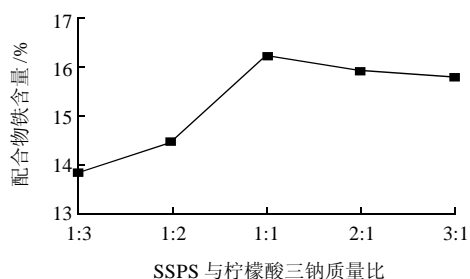


图 1 质量比对 SSPS-Fe(II)铁含量影响

Fig.1 Effect of mass ratio between soluble soybean polysaccharide and catalyst sodium citrate on iron content of SSPS-Fe(II)

由图1可以看出,配合物的铁含量随着SSPS与柠檬酸三钠质量比提高先增大后减小,在1:1时达到最大值16.2%。

2.1.2 pH值对配合物铁含量影响

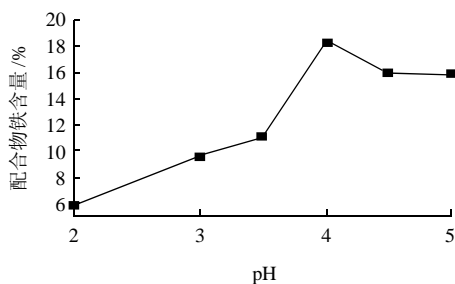


图2 pH值对SSPS-Fe(II)铁含量的影响

Fig.2 Effect of pH on iron content of SSPS-Fe(II)

由图2可以看出,随着pH值增加,配合物铁含量先急剧增大后减小,在pH4时达到最大值18.4%。

2.1.3 反应温度对配合物铁含量影响

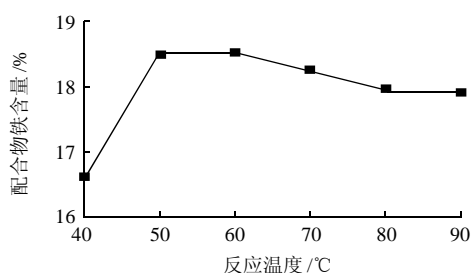


图3 反应温度对SSPS-Fe(II)铁含量影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on iron content of SSPS-Fe(II)

由图3可知,50℃以上对配合物铁含量影响不大,在60℃时达到最大值18.5%。

2.1.4 反应时间对配合物铁含量影响

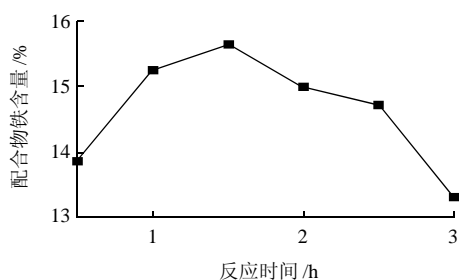


图4 反应时间对SSPS-Fe(II)铁含量影响

Fig.4 Effect of reaction time on the iron content of SSPS-Fe(II)

由图4可知,随着反应时间增加,配合物铁含量先增大后减少,在1.5h时达到最大值15.6%。

2.2 SSPS-Fe(II)配合物合成工艺回归模型的建立

表2 SSPS-Fe(II)配合物合成工艺响应面设计及其结果

Table 2 Dual quadratic rotary combination design matrix and corresponding results

试验号	A	B	C	D	配合物铁含量/%
1	-1	-1	-1	-1	16.1048
2	1	-1	-1	-1	21.0517
3	-1	1	-1	-1	16.2404
4	1	1	-1	-1	21.0609
5	-1	-1	1	-1	15.5518
6	1	-1	1	-1	21.0616
7	-1	1	1	-1	14.7484
8	1	1	1	-1	20.7138
9	-1	-1	-1	1	15.4737
10	1	-1	-1	1	21.2356
11	-1	1	-1	1	14.8059
12	1	1	-1	1	20.8575
13	-1	-1	1	1	15.6197
14	1	-1	1	1	21.3584
15	-1	1	1	1	15.2232
16	1	1	1	1	20.7115
17	-2	0	0	0	11.4670
18	2	0	0	0	20.2524
19	0	-2	0	0	20.1480
20	0	2	0	0	17.8108
21	0	0	-2	0	18.2699
22	0	0	2	0	19.1255
23	0	0	0	-2	17.4770
24	0	0	0	2	19.1881
25	0	0	0	0	22.3600
26	0	0	0	0	21.2540
27	0	0	0	0	21.9635
28	0	0	0	0	22.0053
29	0	0	0	0	21.5670
30	0	0	0	0	22.1931

利用 Design-Expert 7.1.6 软件对表2 试验数据进行回归拟合,得到配合物铁含量(Y)对SSPS与柠檬酸三钠的质量比(A)、pH值(B)、反应温度(C)、反应时间(D)的二次多项回归模型方程如下(去掉不显著项):

$$Y = 21.89 + 2.58A - 0.32B - 1.46A^2 - 0.68B^2 - 0.75C^2 - 0.84D^2$$

对30个试验点的响应值进行回归分析,方程的回归方差分析见表3。由表3可知,建立的模型 $P < 0.01$,说明模型极显著。 A 、 B 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 项对配合物的铁含量影响极显著, C 影响显著。失拟项 $P > 0.05$,不显著,且模型的相关系数 R^2 为0.9749,说明该模型拟合程度良好,试验误差小,可用来分析和预测SSPS-Fe(II)配合物合成工艺结果。

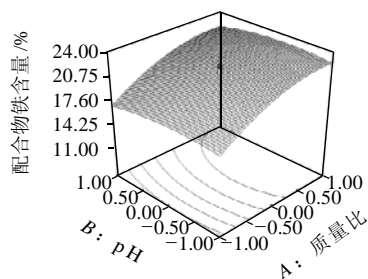
表3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the regression equation

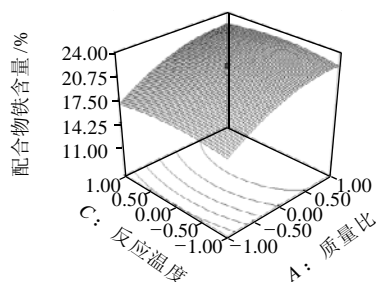
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	242.6138	14	17.3296	41.5982	< 0.0001	**
A	159.4120	1	159.4120	382.6561	< 0.0001	**
B	2.5155	1	2.5155	6.03835	0.0267	*
C	0.0007	1	0.0007	0.0017	0.9675	
D	0.1970	1	0.1970	0.4728	0.5022	
AB	0.0085	1	0.0085	0.0204	0.8884	
AC	0.0786	1	0.0786	0.1886	0.6703	
AD	0.2020	1	0.2020	0.4849	0.4968	
BC	0.1046	1	0.1046	0.2510	0.6236	
BD	0.0733	1	0.0733	0.1759	0.6808	
CD	0.5337	1	0.5337	1.2812	0.2755	
A ²	58.6650	1	58.6650	140.8208	< 0.0001	**
B ²	12.7779	1	12.7779	30.6724	< 0.0001	**
C ²	15.5510	1	15.5510	37.3289	< 0.0001	**
D ²	19.5507	1	19.5507	46.9298	< 0.0001	**
残差	6.2489	15	0.4166			
失拟	5.4087	10	0.5409	3.2186	0.1045	
纯误差	0.8402	5	0.1680			
总回归	248.8627	29				

注: *. $P < 0.05$, 差异显著; **. $P < 0.01$, 差异极显著。

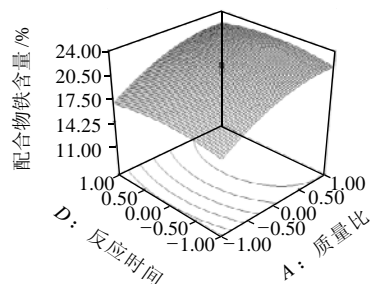
2.3 响应面图



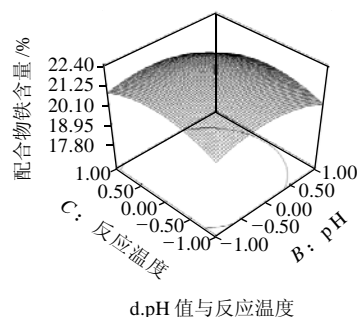
a. 质量比与pH值



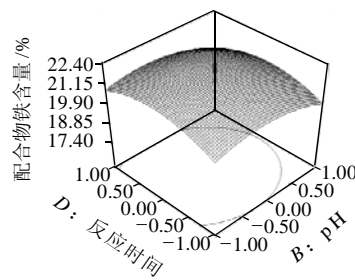
b. 质量比与反应温度



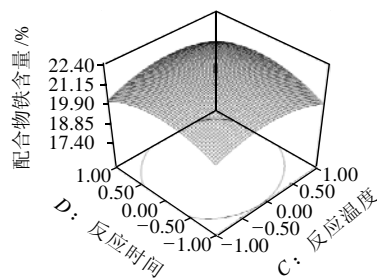
c. 质量比与反应时间



d. pH值与反应温度



e. pH值与反应时间



f. 反应温度与反应时间

固定水平: 质量比 1:1、pH4.00、反应温度 60.00℃、反应时间 1.50h。

图5 各两因素交互作用对配合物铁含量影响的响应面图

Fig.5 Response surface plots for the effect of cross-interaction among factors on iron content of SSPS-Fe(II)

SSPS与柠檬酸钠质量比、pH值、反应温度、反应时间4个因素之二取0水平时,其他2个因素对于配合物铁含量的影响见图5。从图5可知,在实验范围内,配合物的铁含量均随SSPS与柠檬酸钠的质量比、pH值、反应温度、反应时间的增加先增加后减少,质量比、pH值对配合物的铁含量影响明显强于其他两个因素。由铁含量回归方程的方差分析可知,四个因素对配合物铁含量的影响没有交互作用。

综上所述,4个因素对配合物铁含量影响的大小顺序依次为:质量比>pH值>反应温度≈反应时间。利用Design-Expert 7.1.6软件对SSPS-Fe(II)配合物的合成工艺条件进一步优化,给出了配合物铁含量较高的条件为SSPS与柠檬酸钠三钠的质量比1.89:1、pH3.89、反应时间1.56h、温度60.6℃。

2.4 验证实验

为了验证模型的可靠性,采用上述优化条件进行 SSPS-Fe(II)配合物的合成。在此条件下做5次重复实验,结果铁含量预测值23.08%,实测平均值21.89%。预测值与实际值接近,因此,通过响应面优化法得到的 SSPS-Fe(II)配合物的合成工艺可以用来指导实际生产。

3 结 论

根据单因素试验结果,采用响应面法对 SSPS-Fe(II)配合物的合成反应条件进行优化,以配合物的铁含量作为评价指标,对各因素水平进行分析,得出 SSPS-Fe(II)配合物合成的较优条件为:SSPS与柠檬酸三钠的质量比1.89:1、pH3.89、反应时间1.56h、温度60.6℃。在此条件下,SSPS-Fe(II)配合物的铁含量为(21.89±0.47)%,实验证明该工艺是可行的。本研究结果表明,SSPS的应用领域可以扩大到强化铁的食品添加剂和营养型口服补铁剂,具有很大的商业价值。

参考文献:

- [1] CAROL B. The state of the world children 2001[M]. New York: UNICEF Publications, 2001.
- [2] COE E M, BOWEN L H, SPEER J A, et al. The recharacterization of a polysaccharide iron complex (Niferex)[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1995, 58(4): 269-278.
- [3] LAZARO F J, LARREA A, ABADIA A R. Magnetostructural study of iron-dextran[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2003, 257(2/3): 346-354.
- [4] KNIGHT B, BOWEN H L, BEREMAN R D, et al. Comparison of the core size distribution in iron dextran complexes using Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1999, 73(4): 227-233.
- [5] SIMBERG D, PARK J H, KARMAI P P, et al. Differential proteomics analysis of the surface heterogeneity of dextran iron oxide nanoparticles and the implications for their *in vivo* clearance[J]. Biomaterials, 2009, 30(23/24): 3926-3933.
- [6] SREERAM K J, SHRIVASTAVA H Y, NAIR B U. Studies on the nature of interaction of iron(III) with alginates[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2004, 1670(2): 121-125.
- [7] 陈作伟, 钟盛林, 郭桂凤. 当归多糖铁的合成及一般特性[J]. 中成药, 1998(10): 1-2.
- [8] 戴立泉, 王凯平, 张玉, 等. 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(7): 608-610.
- [9] 赵燕, 杨兴斌, 李晓晔, 等. 当归多糖铁配合物的制备及其药用性能的初步研究[J]. 微量元素与健康研究, 2005(6): 20-22.
- [10] 裴晓红, 李玉贤, 李娟. 地黄多糖铁(III)配合物的合成及一般性质研究[J]. 河南科学, 2005(4): 499-501.
- [11] 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): 109-114.
- [12] 谭永辉, 王文生, 秦玉昌, 等. 豆渣中水溶性大豆多糖的提取与应用[J]. 大豆科学, 2008, 27(1): 151-153.
- [13] 赵国志, 刘喜亮, 刘智锋. 水溶性大豆多糖类开发与应用[J]. 粮食与油脂, 2006(8): 15-17.
- [14] LI Jun, MATSUMOTO S, NAKAMURA A, et al. Characterization and functional properties of Sub-Fractions of soluble soybean polysaccharides [J]. Biotechnology, 2009, 73(12): 2568-2575.
- [15] KARR L K, KADZERE C T, GRIESHOP C M, et al. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review[J]. Livestock Production Science, 2005, 97(1): 1-12.
- [16] CAREL T M, SINMON R, MIRANDA M H, et al. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid[J]. Carbohydrate Research, 2008, 328(4): 539-547.
- [17] 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(7): 47-49.