

火棘多糖铁(Ⅲ)复合物中铁含量检测方法的建立

蒋莉,付启明,王磊,蔡易睿,钟方旭,鄢又玉*

武汉轻工大学生物与制药工程学院,武汉 430023

摘要:为了优化建立火棘多糖铁(Ⅲ)复合物(PPC)中铁含量检测的方法。考察了邻菲罗啉溶液浓度(w/w,%)及用量(mL)、抗坏血酸溶液浓度(w/w,%)及用量(mL)、反应时间(h)及温度(°C)等因素对PPC中铁含量测定的影响。在单因素实验的基础上,运用响应面软件进一步优化PPC的检测条件。结果表明,PPC中铁含量的最佳检测条件为:向1.0 mL适宜浓度的PPC溶液中,依次加入1.5 mL 10%的抗坏血酸溶液及3.0 mL 0.1%的邻菲罗啉溶液,于45 °C水浴2.0 h后,冰水快速冷却,在室温下于510 nm波长处测其吸光度。该方法具有良好的重复性及重现性,回收率达99.93%。此方法也适合推广于其他植物多糖铁复合物中铁含量的测定。

关键词:火棘;多糖铁复合物;含量检测;响应面优化

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)4-0648-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.4.015

Establishment of a method for determination of iron in *Pyracantha fortuneana* polysaccharide-Fe (Ⅲ) complex

JIANG Li, FU Qi-ming, WANG Lei, CAI Yi-rui, ZHONG Fang-xu, YAN You-yu*

School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

Abstract: In order to get the optimum conditions for determination of iron in *Pyracantha* polysaccharide-Fe (Ⅲ) complex (PPC). The effects of *O*-phenanthroline concentration (w/w,%) and its amount (mL), ascorbic acid concentration (w/w,%) and its amount (mL), reaction time (h) as well as its temperature (°C) on the determination of iron in PPC were investigated. On the basis of single factor experiment, response surface software was used to further optimize the detection conditions of PPC. The results showed that the optimum conditions for the determination of iron content in PPC were as follows: 1.5 mL 10% ascorbic acid and 3.0 mL 0.1% *O*-phenanthroline solution were added successively to the PPC solution of 1.0 mL of suitable concentration, and the absorbance was measured at 510 nm at room temperature after a water bath at 45 °C for 2.0 h. The developed method had good reproducibility and reproducibility with a recovery rate of 99.93%, which can be applied to detect iron content in other plant polysaccharide-iron complexes.

Key words: *Pyracantha fortuneana*; polysaccharide-Fe complex; content determination; response surface optimization

火棘 *Pyracantha fortuneana* (Maxin.) Li 又名救军粮、火把果、红子、吉祥果、状元红等,是蔷薇科苹果亚科火棘属的一种常绿植物灌木,主产于云南、贵州、四川、湖南、湖北等地。其中全缘火棘、窄叶火棘、细圆齿火棘等三个品种在湖北分布较广,资源丰富。目前已被国家卫生部批准作为新食品资源^[1]。火棘果资源丰富,每年仅在湖北省的年产量就高达5万吨^[2]。火棘果中含有多种营养成分,如多糖、多

酚、果胶、黄酮、原花青素等^[3],其中可溶性多糖的含量占10%~13%左右。在现代科技中,人们将多糖与一些金属或者非金属相结合,产生了意想不到的功能效果^[4]。

缺铁性贫血(IDA)是当前发病率最高的营养素缺乏病之一,同时伴有慢性疲劳、烦躁不安、免疫功能紊乱、情绪或认知障碍、记忆力减退等症状,婴幼儿及学龄前儿童缺铁更有可能影响儿童脑部发育^[5,6]。铁补充剂的发展可分为三代:无机铁剂,小分子有机铁剂,多糖铁复合物。其中一代无机铁剂的铁腥味重,生物利用度低;二代小分子有机铁剂吸收易饱和,有游离铁毒性,治疗周期长^[7];第三代于

收稿日期:2018-07-27 接受日期:2018-12-13

基金项目:国家自然科学基金子课题(21602166)

*通信作者 Tel:86-27-83956793; E-mail:yanyy75@163.com

1947年证明静脉注射多糖铁复合物的安全性,多糖铁复合物可治疗缺铁性贫血^[8]。多糖铁复合物作为铁元素补充剂在体内具有多糖的多种生物活性、普遍耐受性与较高的生物利用度,相对可减缓对胃肠道刺激,且吸收率不受胃酸减少及食物成分的影响。作为目前行之有效的缺铁性贫血补铁剂^[9],多糖铁复合物在应用于静脉补铁方面取得了较大的发展^[9]。

常见的多糖铁复合物的制备方法有氯化铁共热合成及硫酸铁铵化学合成等^[10,11],制得植物多糖类铁复合物一般为棕黑色粉末,易溶于水、无臭无味且不溶于无水甲醇、乙醇及乙醚等有机溶剂^[12]。本文是基于前人对多种植物多糖铁复合物的合成工艺优化^[13-17],进而改良合成火棘多糖铁复合物。利用紫外分光光度计检测多糖铁复合物中铁含量的原理^[18],结合其他植物多糖铁中铁含量的特定检测条件^[19,20],优化得到火棘多糖铁复合物中铁含量检测的最优条件。此方法可应用于补铁剂的制备与检测,同时也可推广应用于其它植物多糖铁复合物的含量测定。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

火棘果:2016年10月下旬采集于湖北省恩施来凤地区,经华中科技大学植物学博士杨悦鉴定为全缘火棘 *Pyracantha atalantioides* (Hance) Stapf 的果实。FeCl₃、邻菲罗啉、抗坏血酸、无水乙醇及氢氧化钠均为分析纯,实验用水为自制去离子水;UV-5900PC 紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;BS 系列分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;SB5200DTS 双频超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;HSJ-6 系列恒温水浴搅拌器,江苏金坛市科析仪器有限公司;HH-S1 数显恒温水浴锅,江苏金坛市医疗仪器厂;XH-C 漩涡混合器,江苏金坛市医疗仪器厂;GR21G 高速冷冻离心机,日本 HATACHI 公司;DHG-9070A 高速冷冻离心机,

日本 HATACHI 公司;DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PPC 的合成

称取一定量已脱色脱蛋白后的 PPC 冻干粉末,置于锥形瓶中,以去离子水溶解并加入柠檬酸三钠溶液,控制溶液 pH 在 8.0~9.0 之间,在搅拌状态下交替滴加 FeCl₃ 溶液和 NaOH 溶液,直到溶液中出现的红棕色沉淀不再溶解为止。70℃ 水浴 1.5 h。待溶液冷却至常温后,在 15 000 rpm 的转速下离心 15 min,将离心后的红棕色上清液转移至 2 倍体积的无水乙醇中,醇沉过夜。醇沉后的溶液再次离心,取沉淀用无水乙醇洗涤两次,15 000 rpm 离心 10 min,将离心后的沉淀冷冻干燥,保存备用,即为 PPC 冻干粉。

1.2.2 铁含量的测定

取冻干 PPC 粉末 0.05 g,以去离子水溶解并定容至 100 mL,即为待测样品溶液。取 1.0 mL 加入抗坏血酸溶液和邻菲罗啉溶液,去离子水定容至 50 mL,摇匀水浴一定时间后作紫外全波段扫描并确定于 510 nm 处测吸光度。

1.2.3 单因素实验

考察了反应时间(1.0、1.5、2.0、2.5 及 3.0 h)、抗坏血酸浓度(2%、4%、6%、8%、10%、12%)和用量(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL)、邻菲罗啉溶液的浓度(0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%)和用量(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL)以及水浴温度(20、30、40、50、60、70℃)对 PPC 中铁含量检测的影响。

1.2.4 响应面优化实验

在单因素实验的基础上,运用响应面软件中 Box-Behnken 设计原则,选择反应时间(A)、水浴温度(B)和 10% 抗坏血酸溶液的用量(C)这三个显著因素进一步优化,以吸光度值作为响应值。设计如下表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平及编码值

Table 1 Levels and factors of response surface tests

因素 Factors	水平 Levels		
	1	0	-1
反应时间 Reaction time (min)	1.0	2.0	3.0
水浴温度 Incubation temperature (°C)	20	40	60
10% 抗坏血酸用量 Ascorbic acid dosage (mL)	0.5	1.0	1.5

1.2.5 方法学验证

经过响应面优化得到 PPC 中铁含量检测的最优条件后,进一步对该方法进行方法学验证,即考察

其重复性、重现性、稳定性及回收率等。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

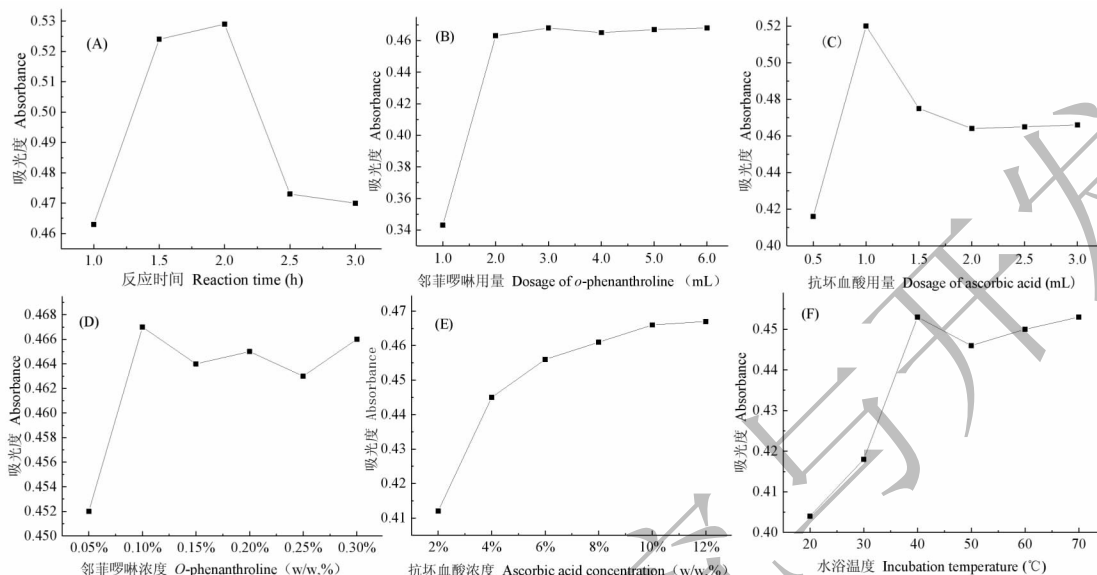


图1 反应时间(A)、邻菲罗啉用量(B)、抗坏血酸用量(C)、邻菲罗啉浓度(D)、抗坏血酸浓度(E)及水浴温度(F)对火棘多糖铁Ⅲ复合物中铁含量的测定的影响

Fig. 1 The influence of reaction time(A), the dosage of *O*-phenanthroline (B) and ascorbic acid(C), *O*-phenanthroline concentration(D), ascorbic acid concentration(E) and incubation temperature (F) on the determination of iron content from PPC

如图1(A)所示,当反应时间小于2.0 h时,随着时间延长,吸光度先急剧上升再渐趋平缓,至2.0 h时吸光度最大。因为邻菲罗啉不能和 Fe^{3+} 直接络合或与 Fe^{3+} 形成的配合物稳定性差,说明此过程中抗坏血酸正不断将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与邻菲罗啉发生直接络合,反应时间接近2.0 h时, Fe^{3+} 全部被还原为 Fe^{2+} ,吸光度达到极值。随反应时间继续延长,抗坏血酸在还原 Fe^{3+} 时会使溶液酸性增强,一定程度上部分破坏邻菲罗啉与 Fe^{2+} 的络合物,使吸光度值逐渐减小。由此可知,邻菲罗啉检测 PPC 中铁含量的最佳反应时间为2.0 h。由图1(B)可知,随着邻菲罗啉溶液用量增加,吸光度先增加并于添加量3.0 mL时达到极值,后趋于平缓,说明邻菲罗啉用量达3.0 mL时,已足够与体系中 Fe^{2+} 完全反应。继续增加其用量吸光度无明显变化,故确定邻菲罗啉溶液的最佳用量为3.0 mL。由图1(C)可知,当抗坏血酸溶液的用量增加至1.0 mL期间,吸光度先增至极值,说明1.0 mL抗坏血酸已基本将体系中 Fe^{3+} 完全还原为 Fe^{2+} ,继续增加用量,体系酸性增强且体系含水量增加,反而破坏了络合物的稳定,因此抗坏血酸溶液用量取1.0 mL最适。同理,

由图1(D)可知,随着邻菲罗啉溶液浓度增加,吸光度先升后渐趋平缓,邻菲罗啉为0.1%时吸光度达到极值,说明此时体系中已经有足量的邻菲罗啉可与 Fe^{2+} 充分反应,选此浓度较为合适。由图1(E)可知,随抗坏血酸溶液浓度增加,吸光度先急剧上升,于10%时达到极值,而后趋于平缓。说明一定量10%抗坏血酸已足够将 PPC 中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,继续增加用量已无现实意义,故抗坏血酸溶液浓度10%最佳。由图1(F)可知,随着水浴温度升高,吸光度总体呈先升后降趋势。说明一定范围内升高温度有助于加快进行,但温度过高易使络合物分解,故选40℃较适。

2.2 响应面优化实验

在单因素实验基础上,确定10%抗坏血酸、3.0 mL 0.1%邻菲罗啉溶液前提下,进一步以响应面 Box-Behnken 设计优化了反应时间、水浴温度和10%抗坏血酸溶液用量3个显著因素对含量检测的影响,具体如表2所示。

优化实验完成后,以 Design Expert8.06 软件对结果进行二次多项式拟合,得到回归方程: $Y = 0.43 + 0.00625A + 0.023B + 0.013C - 0.003AB - 0.002AC$

+ 0.005 75BC - 0.003 375A² - 0.068B² - 0.023C²。对其进行方差与显著性分析,结果如下表 3 所示。

表 2 响应面实验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

实验序号 No.	水平 Factors			吸光度 Absorbance
	A 反应时间 Reaction time (h)	B 水浴温度 Incubation temperature (°C)	C 抗坏血酸用量 Ascorbic acid dosage (mL)	
1	1.0	20	1.0	0.321
2	3.0	20	1.0	0.338
3	1.0	60	1.0	0.377
4	3.0	60	1.0	0.382
5	1.0	40	0.5	0.425
6	3.0	40	0.5	0.443
7	1.0	40	1.5	0.452
8	3.0	40	1.5	0.462
9	2.0	20	0.5	0.351
10	2.0	60	0.5	0.383
11	2.0	20	1.5	0.367
12	2.0	60	1.5	0.422
13	2.0	40	1.0	0.424
14	2.0	40	1.0	0.427
15	2.0	40	1.0	0.426
16	2.0	40	1.0	0.428
17	2.0	40	1.0	0.425

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance results

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	2.70×10^{-2}	9	3.05×10^{-3}	465.85	<0.0001	**
A	3.13×10^{-4}	1	3.13×10^{-4}	47.81	0.0002	**
B	4.37×10^{-3}	1	4.37×10^{-3}	668.81	<0.0001	**
C	1.28×10^{-3}	1	1.28×10^{-3}	195.10	<0.0001	**
AB	3.60×10^{-5}	1	3.60×10^{-5}	5.51	0.0513	
AC	1.60×10^{-5}	1	1.60×10^{-5}	2.45	0.1616	
BC	1.32×10^{-4}	1	1.32×10^{-4}	20.23	0.0028	**
A ²	4.80×10^{-5}	1	4.80×10^{-5}	7.34	0.0302	*
B ²	2.00×10^{-2}	1	2.00×10^{-2}	2989.90	<0.0001	**
C ²	2.20×10^{-3}	1	2.20×10^{-3}	337.11	<0.0001	**
残差 Residual	4.58×10^{-5}	7	6.54×10^{-6}			
失拟项 Lack of fit	3.58×10^{-5}	3	1.20×10^{-5}	4.77	0.0828	
净误差 Net error	1.00×10^{-5}	4	2.50×10^{-6}			
总和 Total	2.70×10^{-2} $R^2 = 0.9983$	16	$R^2_{Adj} = 0.9962$			

注: * 表示差异性显著 ($0.01 < P < 0.05$), ** 表示差异性极显著 ($P < 0.001$)。

Note: * indicated significant difference, $0.01 < P < 0.05$; ** indicated extremely significant difference, $P < 0.001$.

由表 3 分析可知, F 值 = 465.85, 同时 P 值 < 0.000 1 即 $P < 0.001$, 表示差异性极显著。其中 BC、A、B、C、 B^2 和 C^2 的值均较小 ($P < 0.01$) 对响应值的影响极为显著, 表中数据也反映出失拟项的 F 值 = 4.77, P 值 = 0.082 8 (> 0.05), 说明差异性不显著。在方差分析表中, 判定系数 $R^2 = 0.998 3$ 与

校正判定系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.996 2$, 这两个值非常接近, 且都接近于 1, 说明这个回归方程对响应面软件设计的实验拟合效果好、误差较小。可知这个模型完全可以用来拟合检测 PPC 中铁含量时反应时间、水浴温度和 10% 抗坏血酸用量对检测的影响。进一步对模型进行两因素效应分析, 结果见图 2。

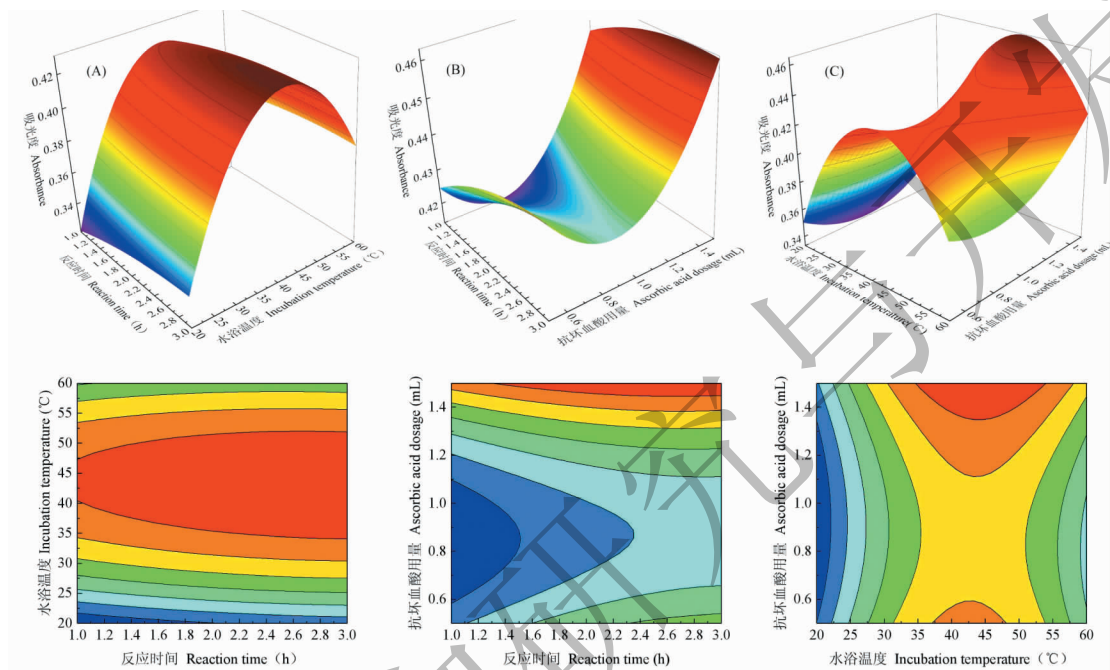


图 2 火棘多糖铁Ⅲ复合物中铁含量测定响应面及等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plot of iron content from PPC

注: A. 水浴温度与反应时间; B. 抗坏血酸用量与反应时间; C. 抗坏血酸用量与水浴温度。

Note: A Reaction time and incubation temperature, B Reaction time and ascorbic acid dosage, C Incubation temperature and ascorbic acid dosage

由图 2 结合表 3 分析可知, 水浴温度与反应时间交互作用较显著, 吸光度随温度升高先增后减, 在 45 °C 左右达到极值, 水浴温度对结果的影响比反应时间更为显著。反应时间与抗坏血酸溶液用量交互作用不显著, 相对而言, 水浴温度与抗坏血酸溶液用量交互作用最显著。

通过软件 (Design Expert 8.0.6) 分析得到检测 PPC 中铁含量的最佳条件是反应时间为 2.01 h, 水浴温度为 44.4 °C, 10% 抗坏血酸溶液用量为 1.5 mL, 在此条件下测得吸光度值应为 0.464。为了验证该响应面结果的可行性, 对所得最佳条件进行了优化和验证实验。在反应时间 2.0 h, 水浴温度 45 °C, 抗坏血酸溶液用量 1.5 mL 条件下进行了 5 组平行试验, 平均值为 0.449, 相对标准偏差 3.23%, 在误差允许范围内, 说明该响应面优化出的结果比较可靠。

2.3 测定方法评价

2.3.1 标准曲线关系考察

配制不同浓度的 PPC 溶液 (0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 mg/mL) 置于容量瓶中, 按优化得到的最佳检测条件测定其中铁的含量。以吸光度为纵坐标, PPC 溶液浓度为横坐标。得出标准曲线的回归方程为 $Y = 0.728X + 0.0154$ ($R^2 = 0.9995$), 在浓度 0.30 ~ 0.70 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.2 重复性实验

按最佳检测条件, 配制 PPC 浓度为 0.30 及 0.70 mg/mL 的样品两份。由同一实验操作人员在 510 nm 波长下平行测定 5 组数据, 计算标准偏差和相对标准偏差。结果如表 4。

分析可知, 两份样品测出的吸光度值的标准偏差分别为 0.001 和 0.002, 相对标准偏差分别是 0.64% 和 0.37%, 重复性良好。

表 4 重复性实验

Table 4 Repeatability tests of the determination results

火棘多糖铁浓度 PPC concentration (mg/mL)	吸光度 Absorbance A ₁	吸光度 Absorbance A ₂	吸光度 Absorbance A ₃	吸光度 Absorbance A ₄	吸光度 Absorbance A ₅	平均值 Average value A	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD (%)
0.30	0.235	0.235	0.234	0.236	0.238	0.236	0.001	0.64%
0.70	0.546	0.542	0.544	0.541	0.542	0.543	0.002	0.37%

2.3.3 重现性实验

同上,配制 PPC 浓度为 0.30 及 0.70 mg/mL 的样品两份。在不同实验室环境下,由不同的实验操作人员在 510 nm 波长下平行测定 5 组数据,计算标准偏差和相对标准偏差。结果如下表 5。

分析可知,两份样品测出的吸光度值得标准偏差为 0.002 8 和 0.003 2,相对标准偏差为 1.27% 和

0.59%,重现性良好。

2.3.4 稳定性实验

同上,配制 PPC 浓度为 0.30 及 0.70 mg/mL 的样品两份。待反应完全后,每隔 10 分钟取样品测吸光度,连续测 6 次,计算标准偏差和相对标准偏差。结果如表 6。

表 5 重现性实验

Table 5 Reproducibility tests of the determination results

火棘多糖铁浓度 PPC concentration (mg/mL)	吸光度 Absorbance A ₁	吸光度 Absorbance A ₂	吸光度 Absorbance A ₃	吸光度 Absorbance A ₄	吸光度 Absorbance A ₅	均值 Average value A	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD (%)
0.30	0.229	0.226	0.226	0.225	0.232	0.228	0.002 8	1.27%
0.70	0.534	0.535	0.542	0.538	0.536	0.537	0.003 2	0.59%

表 6 稳定性实验

Table 6 Stability tests of the determination results

火棘多糖铁浓度 PPC concentration (mg/mL)	吸光度 Absorbance A ₁	吸光度 Absorbance A ₂	吸光度 Absorbance A ₃	吸光度 Absorbance A ₄	吸光度 Absorbance A ₅	吸光度 Absorbance A ₆	平均值 Average value A	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD (%)
0.30	0.241	0.239	0.239	0.241	0.240	0.238	0.240	0.001	0.51%
0.70	0.552	0.555	0.553	0.554	0.547	0.548	0.552	0.003	0.59%

由表中数据可知,两份样品测出的吸光度值的标准偏差分别为 0.001 和 0.003,相对标准偏差分别为 0.51% 和 0.59%,说明此样品在 1.0 h 内测定吸光度较稳定。

2.3.5 回收率实验

同上,配制 PPC 浓度为 0.30 及 0.70 mg/mL 的样品 5 份,每份 1 mL,分别加入 0.20 g 铁标准品,同上操作,反应完全后在 510 nm 波长测定吸光度并计算总铁含量。计算回收率和相对标准方差,结果如表 7。经分析可知,此方法的相对标准偏差为 0.320%,回收率可达 99.93%。

3 结论

在单因素实验的基础上,通过响应面软件优化建立火棘多糖铁复合物中铁含量检测条件。结果表明,最佳检测条件为:1.0 mL 适宜浓度的 PPC 溶液,加 1.5 mL 10% 抗坏血酸溶液以及 3.0 mL 0.1% 的邻菲罗啉溶液后,定容至 50 mL 并于 45 °C 水浴 2.0 h,反应完全后以冰水快速冷却,于 510 nm 测定吸光度值。此方法的重复性和重现性良好,且在 1.0 h 内检测稳定,回收率高达 99.93%。测定的体系中,虽然抗坏血酸溶酸性较大,对测定吸光度存在一定影响,但因加完试剂后定容稀释处理,基本可忽略 pH

表7 回收率实验($n=5$)Table 7 Result of recovery test ($n=5$)

样品溶液吸光度 Absorbance	样品含铁量 Original amount (mg)	标准品加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average value (%)	相对标准偏差 RSD (%)
0.230	0.295	0.200	0.493	99.60		
0.234	0.300	0.200	0.499	99.72		
0.229	0.293	0.200	0.495	100.39	99.32	0.32
0.232	0.298	0.200	0.497	99.84		
0.234	0.300	0.200	0.501	100.12		

对检测的影响。此方法操作简单,结果可靠,可推广至其他多糖铁复合物中铁含量的测定。

参考文献

- Li SJ. *Pyracantha fortuneana* resources chemistry and its antioxidant effect[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), 2011.
- Jiang LH, Xiong YF, Li X, et al. Advances on research of effective constituents of wild *Pyracantha fortuneana* [J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2007, 26(2): 8-10.
- Huang R, Fu XH. Advances on research of functional composition of *Pyracantha fortuneana* [J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2014, 33(5): 37-41.
- Wang XH, Bai HQ, Wulangerile. Progress in the studies of polysaccharide metal complex [J]. J Inner Mongolia Univ Nation(内蒙古民族大学学报), 2014, 29: 516-519.
- Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis [J]. Blood, 2010, 116: 4754-4761.
- Powers JM, Daniel GL, McCavit TL, et al. Deficiencies in the management of iron deficiency anemia during childhood [J]. Pediatric Blood & Cancer, 2016, 63: 743-745.
- Wang FH, Zhao W, Chen JF, et al. Research progress in iron supplement [J]. Prog in Pharm Sci(药学进展), 2016, 9: 680-688.
- Macdougall IC. Evolution of IV iron compounds over the last century [J]. J Ren Care, 2009, 35(S2): 8-13.
- Mao K, Ma YX, Pan CH, et al. Research progress in new types of intravenous iron [J]. Chin J New Drug(中国新药杂志), 2015, 6: 659-663.
- Wang BQ, Xu ZP, Lu XH. Research progress of polysaccharide-iron complex [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2007, 23: 44-46.
- Dong YR, Cheng GT. Research progress of polysaccharide-iron compound [J]. J Food Safe Qua(食品安全质量检测学报), 2015, 6: 2890-2895.
- Chen GX, Xian H. Research progress of plant polysaccharide iron complex [J]. Chongqing J Res Chin Drugs Herbs(重庆中草药研究), 2009, 2: 35-42.
- Zhao P, Zhang TT, Zhang LH, et al. The response surface method optimization pour egg leaves five plus polysaccharide (III) synthetic technology conditions of iron [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2014, 11: 2418-2420.
- Wang F, Ma WL, Hu ZX, et al. Optimization of *Gynostemma* polysaccharide-Fe complex of preparation with response surface methodology [J]. Food Ind(食品工业), 2014, 35(5): 81-86.
- Ren GM, Guo X, Cheng ZX. Optimization of synthesis of lentinan-iron (III) complex by response surface methodology [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2014, 4: 251-255.
- Zhao P, Li WH, Li L, et al. Synthesis and adsorption kinetics of *Limonium bicolor* polysaccharide-iron (III) complex [J]. Chem Eng(化学工程), 2014, 11: 6-9.
- Dong YR, Wang Y, Zhao LY, et al. Separation, purification of polysaccharides and preparation of polysaccharide-iron complex from *Flammulina velutipes* [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2017, 1: 208-213.
- Zhang XL, Tian HW, Wang J. Determination of iron content in iron polysaccharide complex by UV-VIS [J]. J Pharm Res(药学研究), 2015, 11: 645-647.
- Li YX, You ZH, Zhu YX. Synthesis of lily polysaccharide-Fe (III) complex and determination of Fe(III) [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 7: 47-49.
- Wulangerile, Li YT, Bai HQ, et al. Purified preparation of *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce polysaccharide-Fe complex and assay of Fe [J]. J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 4: 571-574.