

文章编号:1673-1689(2009)02-0188-04

# 壳聚糖/壳寡糖衍生物的制备及其抗氧化性能研究

姚倩, 孙涛\*, 徐轶霞, 刘彦洋

(上海水产大学 食品学院, 上海 200090)

**摘要:** 壳聚糖和壳寡糖经化学改性得到季铵盐衍生物-O-2'-羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖/壳寡糖, 通过红外光谱对其结构进行表征。考察了两种季铵盐衍生物对DPPH自由基的清除活性以及还原能力。当质量浓度为0.6 mg/mL时, 壳聚糖季铵盐和壳寡糖季铵盐对DPPH自由基的清除率分别为9.5%和29.3%。在还原体系中, 当质量浓度为2.5 mg/mL时, 其吸光度分别为0.11和0.43。结果表明: 通过化学改性, 得到的壳聚糖季铵盐衍生物水溶性优良、具有抗氧化活性; 壳寡糖季铵盐清除自由基的活性和还原能力强于壳聚糖季铵盐衍生物。这可能由于壳寡糖分子链短, 更多活性氨基和羟基暴露出来参与抗氧化反应所致。

**关键词:** 壳聚糖; 壳寡糖; 季铵盐; 抗氧化; DPPH; 还原能力

**中图分类号:** TS 202.3

**文献标识码:** A

## Preparation of Chitosan/ Chitosan Oligosaccharide Derivatives and Their Antioxidant Activities

YAO Qian, SUN Tao\*, XU Yi-xia, LIU Yan-yang

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** O-2-hydroxypropyltrimethylammonium chloride chitosans were synthesized from chitosan (CTS) and chitosan oligosaccharide (COS). The antioxidant activities were evaluated for the scavenging of DPPH radical and the determination of reducing power. At a concentration of 0.6 mg/mL, the scavenging effects of CTS and COS quarternary ammonium salt derivative towards DPPH were 9.5% and 29.3%, respectively. In reducing power system, the absorbances were 0.11 and 0.43 at a concentration of 2.5 mg/mL. After chemical modification, CTS quarternary ammonium salt derivative with excellent water solubility and antioxidant activity was obtained; COS quarternary ammonium salt derivative had stronger free radical scavenging ability and reducing power than CTS quarternary ammonium salt. The results may be attributed to the fact that COS had more active amino and hydroxyl groups in the polymer chain.

**Key words:** chitosan, chitosan oligosaccharide, quarternary ammonium salt, antioxidant activity, DPPH, reducing power

收稿日期: 2008-02-21

基金项目: 上海市教育委员会科研项目(07zz134), 上海市重点学科建设专项基金项目(T1102)。

\* 通讯作者: 孙涛(1970-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工学博士, 副教授, 主要从事多糖的改性及生物功能开发研究。

Email: taosun@shfu.edu.cn

壳聚糖是一种天然碱性高分子多糖,具有良好的生物相容性、生物降解性等多种特性,在食品、生物医学和化工等领域有着广泛的应用。近年来壳聚糖及其衍生物的抗氧化作用备受关注<sup>[1-4]</sup>。但壳聚糖分子水溶性很差,几乎没有抗氧化能力。通过化学改性,可以获得水溶性优良的壳聚糖衍生物。与壳聚糖相比,壳寡糖分子链短,水溶性好,其物理、化学性质均得到很大的改善。季铵盐衍生物是一类重要的壳聚糖衍生物,近年来关于壳聚糖季铵盐抗氧化性能已逐渐开始研究<sup>[5-7]</sup>。但目前还未见O-取代的壳聚糖季铵盐抗氧化活性的报道,壳聚糖衍生物和壳寡糖衍生物抗氧化能力的研究也尚属空白。作者就壳聚糖、壳寡糖相对应的O-季铵盐衍生物清除DPPH自由基作用和还原能力进行了初步探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

壳聚糖,相对分子质量为 $8.5 \times 10^5$ (CTS)、相对分子质量为 $5 \times 10^3$ (LCTS);浙江金壳生物化学有限公司提供。DPPH:Sigma公司产品;苯甲醛、2,3-环氧丙基三甲基氯化铵、无水乙醇、异丙醇、丙酮、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、磷酸氢二钾、氢氧化钠:分析纯,上海化学试剂公司产品。

### 1.2 壳聚糖/壳寡糖季铵盐的制备和表征

将12.0 g壳聚糖/壳寡糖溶于480 mL质量分数10%的醋酸溶液中,加入无水乙醇240 mL,室温搅拌55 min并逐渐滴加苯甲醛60 mL,继续搅拌2 h后于烘箱中放置20 h,加稀氢氧化钠溶液调pH值至中性,溶液析出沉淀。将所得沉淀体用无水乙醇多次洗涤,烘干后置于三口烧瓶中,加入异丙醇164 mL和2,3-环氧丙基三甲基氯化铵30 g,水浴70℃搅拌反应16 h后抽滤,将所得固体多次反复用异丙醇洗涤,干燥后加入0.25 mol/L的盐酸乙醇溶液,室温搅拌30 h后放入烘箱蒸去大部分乙醇,得胶状物,加入40 mL水充分溶解,将溶液用丙酮沉淀并抽滤,所得固体用丙酮多次洗涤。将固体放入烘箱中烘干,得最终目标产物<sup>[8]</sup>。

红外光谱测定在EQUINOX55傅立叶红外-拉曼光谱仪上进行,采用KBr压片法制样,测定波数范围为500~4000  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率为0.8  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.3 对DPPH自由基的清除

在装有2 mL的浓度为 $1 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH无水乙醇溶液的比色管中,加入不同浓度的样品溶液2 mL,摇匀,33℃避光静置30 min,在517 nm处

测量吸光度 $A_i$ 。用去离子水代替样品溶液,得吸光度 $A_0$ ,无水乙醇代替DPPH,得吸光度 $A_j$ 。<sup>[9]</sup>

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100 \%$$

式中, $A_0$ 为2 mL 0.1 mmol/L的DPPH无水乙醇溶液和2 mL去离子水的吸光度; $A_i$ 为2 mL 0.1 mmol/L的DPPH无水乙醇溶液和2 mL样品的吸光度; $A_j$ 为2 mL无水乙醇和2 mL样品的吸光度。

### 1.4 还原能力的测定

还原能力根据文献<sup>[10]</sup>测定并稍做改进。取2 mL不同浓度的样品,加入pH=6.6的0.2 mol/L磷酸缓冲液的质量分数1%铁氰化钾溶液各2.5 mL,混匀,50℃水浴20 min后迅速冷却,加入2.5 mL质量分数10%的三氯乙酸溶液,混匀后在2000 r/min下离心10 min,取上清液2 mL,加入2.5 mL去离子水和0.5 mL质量分数0.1%的三氯化铁溶液,静置10 min后在700 nm处测定吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 红外光谱

壳聚糖、壳寡糖及其季铵盐衍生物的红外图谱如图1所示。壳聚糖CTS在1100  $\text{cm}^{-1}$ 附近有3个较强吸收峰,分别是1034、1079、1154  $\text{cm}^{-1}$ 。其中1034  $\text{cm}^{-1}$ 附近峰由分子中羟基C-O伸缩振动引起,1079  $\text{cm}^{-1}$ 和1154  $\text{cm}^{-1}$ 附近双峰是环内醚C-O伸缩振动的结果。这组较强峰是判定壳聚糖及其衍生物存在的特征吸收峰。O-H伸展振动,多糖的分子间氢键作用以及N-H键伸缩振动吸收在3431  $\text{cm}^{-1}$ 形成强吸收峰。与CTS相比,低聚壳聚糖COS在1413  $\text{cm}^{-1}$ 处表现出很强的吸收峰,这与其分子内糖苷键被打开有关。壳聚糖季铵盐OCTS和壳寡糖季铵盐OCOS在1480  $\text{cm}^{-1}$ 附近均出现 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_3$ 的C-H弯曲振动强吸收峰,说明在羟基位置引入了季铵盐侧链。

### 2.2 对DPPH自由基的清除

稳定的DPPH体系是一种广泛用于评价抗氧化剂自由基清除能力的方法。其主要原理为DPPH可以接受自由基清除剂提供的电子或氢从而形成稳定分子。图2为壳聚糖和壳寡糖季铵盐对DPPH自由基的清除曲线,由图可以看出,OCTS和OCOS对DPPH自由基均有一定的清除作用。它们对DPPH自由基的清除能力随着质量浓度的升高而逐渐增强。当质量浓度为0.6 mg/mL时,

OCOS对DPPH自由基的清除率为29.3%，而OCTS对DPPH自由基的清除率仅达到9.5%。结果表明，壳寡糖季铵盐对DPPH自由基的清除效果更好。

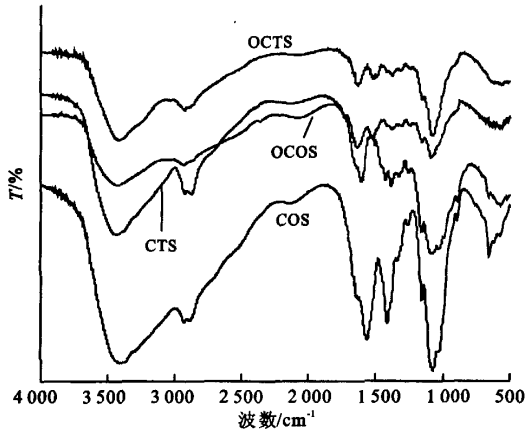


图1 壳聚糖、壳寡糖及其季铵盐衍生物的红外图谱

Fig.1 FTIR spectra of CTS, COS and their derivatives

壳聚糖以及衍生物抗氧化能力的大小与活性羟基和氨基密切相关。壳聚糖及衍生物分子链中的氨基和羟基形成氢键，影响了活性基团和自由基的反应。而壳寡糖及其衍生物分子链短，更多的活性羟基和氨基暴露出来，更易于和自由基充分作用，因而壳寡糖季铵盐具有良好的清除自由基能力。

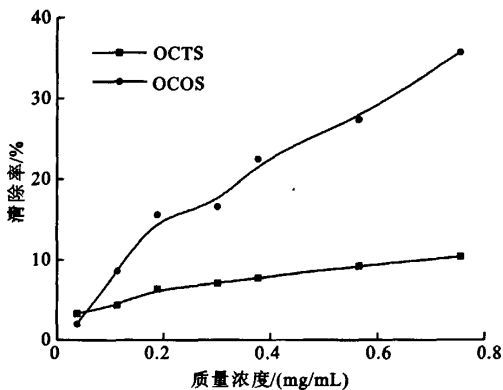


图2 壳聚糖/壳寡糖季铵盐对DPPH自由基的清除

Fig.2 Scavenging effects of OCTS and OCOS on DPPH radical

### 2.3 还原能力

还原能力是抗氧化剂提供电子能力的重要指标，还原能力与抗氧化活性之间有着密切的关系<sup>[11]</sup>。抗氧化物质通过提供电子可阻断 $Fe^{2+}$ 向 $Fe^{3+}$ 的转变，表现出一定的还原能力，同样也可以

通过提供电子和自由基反应，表现出抗氧化活性。图3为壳聚糖/壳寡糖季铵盐的还原能力曲线。由图可以看出，OCTS和OCOS的还原能力随着质量浓度的增大而逐渐增强。在0.5~2.5 mg/mL的质量浓度范围内，随着质量浓度增大OCOS的还原能力的增加非常显著。同样情况下OCTS的还原能力则增加相对缓慢。当质量浓度为2.5 mg/mL时，OCTS和OCOS的吸光度分别为0.11和0.43。结果表明，OCOS的还原能力明显优于OCTS。这主要是由于分子链比较短，OCOS分子链中活性羟基和氨基比较多，提供电子能力强，故表现出比OCTS强的还原能力。

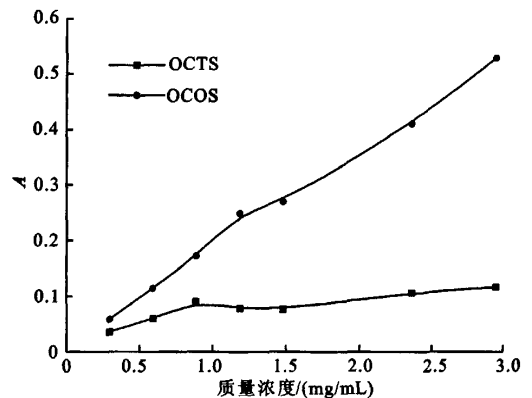


图3 壳聚糖/壳寡糖季铵盐的还原能力

Fig.3 Reducing power of OCTS and OCOS

### 3 结语

作者对壳聚糖和壳寡糖进行化学改性，在其羟基位置引入季铵盐侧链，从而合成了季铵盐衍生物-O-2'-羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖/壳寡糖。产物的抗氧化活性通过DPPH和还原体系考察。化学改性之后，得到的壳聚糖季铵盐衍生物水溶性优良、具有抗氧化活性。壳寡糖季铵盐清除自由基的活性和还原能力强于壳聚糖季铵盐衍生物。

壳聚糖以及衍生物抗氧化能力的大小与活性羟基和氨基密切相关。壳聚糖水溶性很差，没有抗氧化能力。对壳聚糖进行化学改性，得到的壳聚糖季铵盐衍生物水溶性优良，并且表现出一定的抗氧化能力。但是与壳寡糖的同类衍生物相比，壳聚糖季铵盐的抗氧化活性稍显逊色。这主要是由于壳寡糖及其衍生物分子链短，分子间力小，暴露出来更多的活性氨基和羟基，因而具有更优秀的抗氧化能力。

## 参考文献(References):

- [1] Sun T, Xie W M, Xu P X. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 58(4): 379-382.
- [2] Kogan G, Skorik Y A, Zitnanova I, et al. Antioxidant and antimutagenic activity of N-(2-carboxyethyl) chitosan[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 201: 303-310.
- [3] 孙涛, 周冬香, 朱颖娜, 等. 羧甲基壳聚糖的降解及其抗氧化性能的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1):54-57.  
SUN Tao, ZHOU Dong-xiang, ZHU Ying-na, et al. Study on degradation of carboxymethyl chitosan and their antioxidant activity[J]. *Food Science*, 2007, 28(1):54-57. (in Chinese)
- [4] Alexandrova V A, Obukhova G V, Domnina N S, et al. Modification of chitosan for construction of efficient antioxidant biodegradable macromolecular systems[J]. *Macromolecular Symposia*, 1999, 144: 413-422.
- [5] Zhu X Y, Wu J M, Jia Z S. Superoxide anion radical scavenging ability of quaternary ammonium salt of chitosan[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2004, 15(7): 808-810.
- [6] Guo Z Y, Liu H Y, Chen X L, et al. Hydroxyl radicals scavenging activity of N-substituted chitosan and quaternized chitosan[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16:6348-6350.
- [7] 沈巍, 王建新, 赵成英. 壳聚糖季铵盐合成及其抗氧化性能研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 465-469.  
SHEN Wei, WANG Jian-xin, ZHAO Cheng-ying. Synthesis and antioxidant activity of quaternized chitosan[J]. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19(3): 465-469. (in Chinese)
- [8] 林友文, 许晨, 卢灿辉. O-2'-羟丙基氯化铵壳聚糖的合成与表征[J]. 合成化学, 2000, 8(2): 167-170.  
LIN You-wen, XU Chen, LU Can-hui. Synthesis and characterization of O-2'-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan[J]. *Chinese Journal of Synthetic Chemistry*, 2000, 8(2): 167-170. (in Chinese)
- [9] 许钢. 红薯中黄酮提取及抗氧化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 22-27.  
XU Gang. Studies on the extracting and antioxidant activities of flavonoids in sweet potatoes[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(4): 22-27. (in Chinese)
- [10] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1995, 43(1): 27-32.
- [11] Duh P D, Du P C, Yen G C. Action of methanolic extract of mung bean bulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1999(11), 37:1055-1061.

(责任编辑:朱明)