

文章编号:1673-1689(2009)03-0329-03

低聚壳聚糖 Zn(II)配合物清除 DPPH 活性的研究

银旭红, 孙涛*, 姚倩, 周冬香, 毛芳

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 控制反应物低聚壳聚糖和氯化锌的比例, 合成了两种金属含量不同的低聚壳聚糖锌配合物, 用红外光谱对产物结构进行表征, 原子吸收光谱证实两种配合物中的锌质量分数分别为 5.04% 和 8.68%。考察了其对于 DPPH 的清除活性, 结果表明: 两种配合物对 DPPH 有明显的清除效果, 锌质量分数为 5.04% 和 8.68% 的低聚壳聚糖锌配合物对 DPPH 的半抑制浓度 IC_{50} 分别为 1.50 mg/mL 和 1.76 mg/mL, 但均大于低聚壳聚糖对 DPPH 的半抑制浓度 IC_{50} 0.42 mg/mL, 这可能是因为金属离子的引进, 使部分活性氨基和羟基的数目减少所致。

关键词: 1,1-二苯基苦基苯肼; 壳聚糖; 壳聚糖金属配合物

中图分类号: TS 202.3; TQ 929.2

文献标识码: A

DPPH Scavenging Activity of Chitosan Oligosaccharide Zinc Complexes

YIN Xu-hong, SUN Tao*, YAO Qian, ZHOU Dong-xiang, MAO Fang

(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Two chitosan oligosaccharide zinc complexes with different zinc content were successfully prepared by controlling the molar ratio of chitosan oligosaccharide to zinc chloride, the content of zinc was 5.04% and 8.68%, respectively. The those chitosan oligosaccharide were identified by Atomic Absorption Spectrometry(AAS), and the structure of the complexes were characterized by FTIR spectra. DPPH scavenging activity of chitosan oligosaccharide and the two chitosan oligosaccharide metal complexes were evaluated, the result showed, the complexes have obvious effect on DPPH scavenging. The IC_{50} of chitosan oligosaccharide zinc (5.04%) and chitosan oligosaccharide zinc (8.68%) were 1.5 mg/mL and 1.76 mg/mL, respectively. But both higher than chitosan oligosaccharide, the IC_{50} was 0.42 mg/mL. That may be related with active amino and hydroxyl both were reduced by introducing the metal ion.

Key words: DPPH, Chitosan, Chitosan metal complex

甲壳素是自然界储量极为丰富的可再生天然多糖, 壳聚糖是其脱乙酰得到的聚氨基多糖。壳聚糖的活性与它的相对分子质量大小有关, 低聚壳聚糖有比高分子壳聚糖更强的生物活性, 其在医药、

保健食品和化妆品以及工业上有着广阔的应用前景。因此对低聚壳聚糖性质的研究已经成为热点^[1]。壳聚糖分子结构中游离的 $-NH_2$ 和 $-OH$ 具有良好的配位能力, 可与过渡及稀土金属离子进行

收稿日期: 2008-07-11

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的开发, 以及富勒烯衍生物的抗氧化性研究。Email: taosun@shou.edu.cn。

配位反应形成壳聚糖金属配合物,壳聚糖金属配合物具有众多的生物活性。近年来,壳聚糖金属配合物的抗氧化活性日益受到关注。研究表明,壳聚糖锌、铜金属配合物对超氧负离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和羟基-OH 有明显的清除活性。另也有文献报道低聚壳聚糖钴、铜金属配合物对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 有明显的清除活性^[2]。但关于低聚壳聚糖金属配合物对 DPPH 的清除能力还未见报道。

作者合成了锌含量不同的两种低聚壳聚糖锌配合物(COS-Zn),并考察了低聚壳聚糖及其两种金属配合物对 DPPH 的清除作用,为低聚壳聚糖及其金属配合物的进一步开发应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

低聚壳聚糖,购自浙江金壳生物化学有限公司(凝胶色谱测定其分子量为 5 000 Da); DPPH,购自 Sigma 公司;氯化锌、甲酸,分析纯,购自上海化学试剂公司;抗氧化测试所需溶液由二次蒸馏水配制。

仪器有磁力搅拌器、pH 计、分光光度计、EQUINOX55 型傅立叶红外-拉曼光谱仪、Z-5000 型塞曼原子吸收光谱分析仪。

1.2 壳聚糖 Zn(II) 的制备及表征

1.2.1 壳聚糖 Zn(II) 的合成 称取两份一定量的低聚壳聚糖,溶于体积分数 1% 甲酸溶液中(在甲酸中制备配合物金属含量较高),搅拌均匀,在磁力搅拌下分别滴加与低聚壳聚糖摩尔比为 1:1 和 2:1 的氯化锌水溶液,室温反应 3 h 后,加稀氨水调 pH 至 6.0,继续搅拌 3 h,用体积比为 1:1 的乙醇/丙酮混合溶剂将产物沉淀出来,抽滤,用体积分数 75% 的乙醇洗涤,沉淀,最后用无水乙醇洗涤,60 °C 烘干至恒重。

1.2.2 表征 红外光谱在 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 500~4 000 cm^{-1} ,分辨率为 0.8 cm^{-1} 。

原子吸收光谱在 Z-5000 型塞曼原子吸收光谱分析仪上进行,检测环境是室内温度 22 °C,相对湿度为 75%,检测依据为 JY/T 023-1996。

1.3 对 DPPH 自由基的清除

在装有 4 mL 浓度为 1×10^{-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 4 mL,摇匀,33 °C 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 。详见文献[3-4]。

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

式中, A_0 为 4 mL DPPH 无水乙醇溶液和 4 mL 去离子水的吸光度; A_i 为 4 mL 的 DPPH 无水乙醇溶液和 4 mL 样品的吸光度; A_j 为 4 mL 无水乙醇和 4 mL 样品的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱

图 1 是低聚壳聚糖及其衍生物的红外光谱图。3 种物质在 1 100 cm^{-1} 附近都有 3 个较强多糖特征吸收峰,分别是 1 034 cm^{-1} 、1 079 cm^{-1} 、1 154 cm^{-1} 。其中 1 034 cm^{-1} 附近峰是因分子中羟基 C—O 伸缩振动,1 079 cm^{-1} 和 1 154 cm^{-1} 附近双峰是因环内醚 C—O 伸缩振动。1 034 cm^{-1} 、1 079 cm^{-1} 、1 154 cm^{-1} 这些吸收峰都来自壳聚糖主链环状结构^[5-6],可作为判定低聚壳聚糖及其衍生物存在的特征吸收峰。

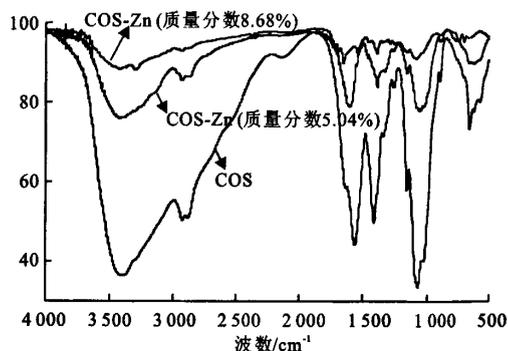


图 1 COS、COS-Zn(质量分数 5.04%) 和 COS-Zn(质量分数 8.68%) 的红外光谱

Fig. 1 Scavenging effects of COS, Zn-COS (5.04%) and Zn-COS (8.68%) on DPPH radicals

图 1 中 3 430 cm^{-1} 是由—OH 的伸缩振动和—NH 伸缩振动耦合而增宽的多重吸收峰,665 cm^{-1} 处是—NH 伸缩振动形成的吸收峰,在与 Zn 配位之后,两个峰都发生红移,COS-Zn(质量分数 5.04%) 红移到 3 428 cm^{-1} 、621 cm^{-1} ,COS-Zn(质量分数 8.68%) 红移到 3 426 cm^{-1} 、633 cm^{-1} ,这表明 Zn 和 N 原子之间形成了 N—Zn 配位键。2 910 cm^{-1} 附近的缔合峰变小,并随着金属含量的增加而消失。1 079 cm^{-1} 是—OH 的伸缩振动形成的吸收峰,在与 Zn 配位之后,发生红移,COS-Zn(质量分数 5.04%) 红移到 1 054 cm^{-1} ,COS-Zn(质量分数 8.68%) 红移到 1 067 cm^{-1} ,这表明—OH 也参与了配位^[7]。COS-Zn(质量分数 8.68%) 在 1 718 cm^{-1} 、1 287 cm^{-1} 附近出现了新的吸收峰,这可能是由于当壳聚糖与氯化锌的摩尔比达到 1:2

时,—OH 和—NH 与 Zn 的配位达到饱和,COS-Zn(质量分数 8.68%)中的锌与—CH 和—CN 发生配位引起的。

2.2 原子吸收光谱

COS-Zn(摩尔比 1:1)中 Zn 的质量分数为 5.04%,COS-Zn(摩尔比 2:1)中 Zn 的质量分数为 8.68%。

2.3 对 DPPH 自由基的清除

图 2 为 COS、COS-Zn(质量分数 5.04%)和 COS-Zn(质量分数 8.68%)对 DPPH 自由基的清除曲线。由图 2 可知,它们对 DPPH 都有明显的清除作用,且清除能力随着自由基清除剂质量浓度的升高而逐渐增强。COS 对 DPPH 清除的 IC_{50} (IC_{50} 是指对 DPPH 的清除率达到 50%时所需自由基清除剂的质量浓度)是 0.42 mg/mL,COS-Zn(质量分数 5.04%)对 DPPH 清除的 IC_{50} 是 1.50 mg/mL,COS-Zn(质量分数 8.68%)对 DPPH 清除的 IC_{50} 是 1.76 mg/mL。DPPH 是一种相当稳定的自由基,可接受氢或电子形成稳定的分子。壳聚糖分子链中的活性氨基和羟基可以提供氢与 DPPH 结合,从而达到清除 DPPH 的目的。而 COS-Zn 分子链中的活性羟基和氨基分别被 Zn 取代之后,活性基团数目减少,供氢能力下降,故与 COS 相比,其清除 DPPH 的活性降低,且随着金属量的提高,其清除 DPPH 的活性降低。

参考文献(References):

- [1] Campaniello A, Bevilacqua M, Sinigaglia M R. Corbo Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries[J]. *Food Microbiology*, 2008, 8(25): 992-1000.
- [2] 陈燕青, 丁德润, 邵焯, 等. Dy(III)与低聚壳聚糖配合物的制备与抗氧化活性研究[J]. 上海工程技术大学学报, 2005, 4(19): 305-308.
CHEN Yan-qing, DING De-run, SHAO Ye, et al. Preparation of Dy(III)-low molecular chitosan complex and its antioxidant activity[J]. *Journal of Shanghai University of Engineering Science*, 2005, 4(19): 305-308. (in Chinese)
- [3] 张婷, 糜漫天, 唐勇, 等. 光皮木瓜多酚类的提取和清除 DPPH 的抗氧化活性[J]. 营养学报, 2007, 5(29): 485-489.
ZHANG Ting, MI Man-tian, TANG Yong, et al. The extraction of polyphenol contents of chaenomeles sinensis and its effect on scavenging DPPH radical[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2007, 5(29): 485-489. (in Chinese)
- [4] Sun Tao, Yao Qian, Zhou Dongxiang, et al. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 21(18): 5774-5776.
- [5] 姚倩, 孙涛, 徐轶霞. 低聚壳聚糖衍生物的制备及其抗氧化性能[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 530-533.
YAO Qian, SUN Tao, XU Yi-xia. Preparation of chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activity[J]. *Natural Product Research and Development*, 2008, 20(3): 530-533. (in Chinese)
- [6] 杜经武, 来水利, 颜妍焯. H_2O_2/ClO_2 法制备低聚壳聚糖[J]. 陕西科技大学学报, 2008, 26(4): 89-91.
DU Jing-wu, LAI Shui-li, YAN Heng-ye. Preparation of low-molecular-weight chitosan in H_2O_2/ClO_2 solution[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2008, 26(4): 89-91. (in Chinese)
- [7] 况伟. 低聚水溶性壳聚糖与锌的络合[J]. 食品与机械, 2006, 1(22): 14-17.
KUANG Wei. Complex ation between low-molecular water-soluble chitosan and zinc Ion[J]. *Food and Machinery*, 2006, 1(22): 14-17. (in Chinese)

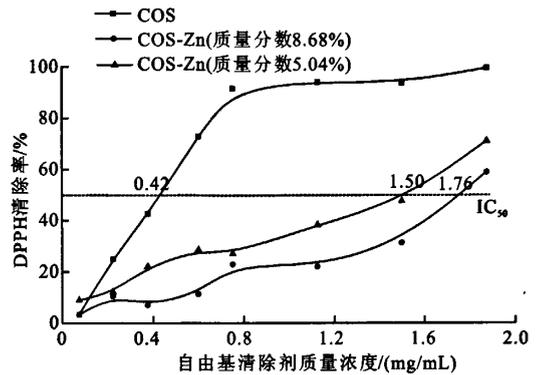


图 2 COS、COS-Zn(质量分数 8.68%)和 COS-Zn(质量分数 5.04%)对 DPPH 自由基的清除

Fig. 2 Scavenging effects of COS, COS-Zn(5.04%) and COS-Zn(8.68%) on DPPH radicals

3 结语

实验中利用低聚壳聚糖和 $ZnCl_2$ 在室温条件下合成了两种金属含量不同的低聚壳聚糖锌配合物,并对它们对 DPPH 的清除能力进行了评估。结果表明,低聚壳聚糖锌配合物对 DPPH 的清除能力低于低聚壳聚糖,并且随着配合物中的金属含量的增加,其对 DPPH 的清除能力降低。这可能是由于金属离子的引入,破坏了部分活性氨基和部分活性羟基。本实验为低聚壳聚糖金属配合物的研究方向的确提供了理论基础。