

文章编号: 1673-1689(2010)03-0406-04

取代度相同的 N-酰化低聚壳聚糖清除 自由基作用的研究

孙涛, 银旭红, 谢晶, 李立, 赖克强, 周冬香
(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 低聚壳聚糖经 N-酰化得到取代度相同的 N-马来酰低聚壳聚糖和 N-邻苯二甲酰低聚壳聚糖, 其取代度均为 0.25。用红外光谱对其结构进行表征, 凝胶色谱测定其相对分子质量大小。并考察了其对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和 1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)的清除能力。结果表明: 取代度相同, N-邻苯二甲酰低聚壳聚糖对 OH、DPPH 的清除能力优于 N-马来酰低聚壳聚糖。这说明取代度相同时, 取代基的结构会影响 N-酰化低聚壳聚糖对自由基的清除活性。

关键词: 低聚壳聚糖; N-酰化; 抗氧化; 取代度

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

The Radical Scavenging Effect of N-Acyl Chitosan Oligosaccharide

SUN Tao, YIN Xu-hong, XIE Jing, LI Li, LAI Ke-qiang, ZHOU Dong-xiang
(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: N-maleyl chitosan oligosaccharide (NMCOS) and N-phthaloyl chitosan oligosaccharide (NPCOS) with the same substituting degrees (0.25) were synthesized. The structure were characterized by FTIR spectra, the molecular weight was measured by Gel Permeation Chromatography (GPC). Their antioxidant activity were evaluated by the scavenging of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH). The results showed NPCOS have stronger hydroxyl and DPPH radical scavenging activity than that of NMCOS. The results presented here demonstrated that the antioxidant activity of N-acyl Chitosan Oligosaccharide with the same substituting degrees was determined by the substituting groups.

Key words: chitosan oligosaccharide, N-acyl, antioxidant activity, substituting degree

自由基引起的氧化对机体具有巨大的损伤作用, 如引起蛋白质损伤、酶失活、导致衰老、肿瘤、动脉硬化等多种疾病^[1-2]。因此筛选高效的活性氧清

除剂具有重要的意义。低聚壳聚糖是壳聚糖的降解产物, 其分子单元结构中有大量的氨基和羟基, 具有良好的抗氧化性^[3-5], 同时也决定了它可以进

收稿日期: 2009-06-15

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项目专项基金(T1102), 上海市生物医药和农业科技领域重点科技项目(08391911500), 2009 年上海市优秀学科带头人计划(09XD1402000)。

作者简介: 孙涛(1970-), 女, 黑龙江依兰人, 理学博士, 副教授, 主要从事多糖的改性及生物功能的开发。

Email: taosun@shou.edu.cn

行多种化学改性。N-酰化改性是低聚壳聚糖的一种重要改性方式, 研究报道N-酰化壳聚糖具有良好的吸湿保湿和抑菌作用^[6-7], 但是其抗氧化性, 尤其是其N-取代基结构和取代度与其抗氧化性能之间的关系还尚未见报道。作者通过制备取代度相同的N-马来酰和N-邻苯二甲酰化低聚壳聚糖, 通过考察其对羟基自由基·OH和DPPH的清除活性, 研究了取代基团的结构对N-酰化低聚壳聚糖的抗氧化活性的影响, 为低聚壳聚糖衍生物抗氧化性能的进一步研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

低聚壳聚糖, 购自浙江金壳生物化学有限公司(凝胶色谱测定其相对分子质量为5 000 000); 鲁米诺, DPPH, 购自Sigma公司; 其余试剂均为分析纯, 购自上海化学试剂公司; 磁力搅拌器, pH计, 分光光度计, 电导率仪, EQUINOX55傅立叶红外-拉曼光谱仪, Waters 515型凝胶色谱仪。

1.2 壳聚糖衍生物的制备

称取5.0 g低聚壳聚糖加入100.0 mL蒸馏水溶解, 搅拌溶解, 称取1.0 g马来酸酐(0.5 g邻苯二甲酸酐), 用20.0 mL丙酮溶解, 然后缓慢加入反应器, 在室温下搅拌反应15 h, 然后用丙酮沉淀, 过滤, 产物用丙酮反复洗涤, 最后在60℃烘干, 得到N-马来(邻苯二甲)酰低聚壳聚糖衍生物^[8]。

1.3 结构表征

1.3.1 红外光谱 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。

1.3.2 相对分子质量的测定 凝胶色谱法测定N-酰化低聚壳聚糖相对分子质量大小。测试条件如下: 柱子: TOSOH BIOSEP TSK-Gel G4000SWXL (D 7.8 mm×300 mm); 流动相: 0.2 mol/L醋酸钠和醋酸缓冲溶液, pH=4.8; 色谱仪: Waters 515型凝胶色谱仪, 检测器: Waters 2410示差折光检测器(美国Waters公司); 进样量: 50 μL; 柱温: 40℃; 标准品: 葡聚糖。

1.3.3 取代度的测定 准确称量N-酰化低聚壳聚糖0.100 0 g置500 mL烧杯内, 准确加入0.103 8 mol/L HCl标准溶液20.00 mL溶解样品, 再加入去离子水200 mL稀释、混匀, 用0.468 5 mol/L NaOH标准溶液返滴, 测定电导率值, 得电导率-氢氧化钠体积关系图, 添加趋势线, 求其回归方程, 从

而计算N-酰化低聚壳聚糖的取代度^[9]。

1.4 对羟基自由基·OH的清除

用pH=7.40的0.05 mol/L KH₂PO₄-NaOH缓冲溶液分别配制浓度为6.4×10⁻⁴ mol/L的鲁米诺溶液、0.012 mol/L H₂O₂和0.8 mg/mL亚铁氰化钾溶液。以缓冲液作为溶剂, 配制系列不同浓度的样品溶液。用流动注射化学发光分析仪依次测定从稀到浓的样品溶液, 读出峰面积。清除率=(A₀-A_i)/A₀×100%。式中A₀为空白溶液峰面积, A_i为样品溶液峰面积。经SOD, 过氧化氢酶及甘露醇检测, 该体系产生的自由基羟基自由基·OH^[10]。

1.5 对DPPH自由基的清除

在装有2.0 mL的浓度为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2.0 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A₀, 无水乙醇代替DPPH, 得吸光度A_j。清除率=[1-(A_i-A_j)/A₀]×100%^[11]。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱

图1是低聚壳聚糖及其N-酰化低聚壳聚糖的红外光谱图。NMCOS中1 640 cm⁻¹为烯烃的V_{C=C}振动峰; 1 707 cm⁻¹附近出现为不饱和羧基因共轭作用的C=O振动吸收峰; 860 cm⁻¹附近为G-H面外振动吸收峰, 在壳聚糖未见此峰, 这些峰证实了NMCOS中马来酸基的存在^[12]。在NPCOS中, 1 640 cm⁻¹为烯烃的V_{C=C}振动峰; 在750 cm⁻¹附近的吸收峰为邻二取代苯的δ_{A-H}面外弯曲振动峰, 这些峰证明了邻苯二甲酸基的存在^[13]。NMCOS和NPCOS在1 560 cm⁻¹附近的仲酰胺的δ_{NH}振动峰在衍生物中明显增大, 同时在1 320 cm⁻¹附近出现V_{C-N}伸缩振动峰, 并且在1 073 cm⁻¹和1 023 cm⁻¹处的C₃仲羟基和C₆伯羟基的G-O的伸缩振动吸收峰与壳聚糖相比没有明显变化, 这均证明反应发生在氨基上^[7]。凝胶色谱法测得NMCOS和NPCOS的相对分子质量大小分别为5 733和5 029。电导法测定其取代度均为0.25。

2.2 对羟基自由基·OH的清除能力的影响

羟基自由基·OH是一种化学性质很活泼的自由基, 它易与生物大分子发生反应, 如氨基酸、蛋白质和DNA, 对机体危害极大, 与衰老、肿瘤等密切相关^[15]。

NMCOS和NPCOS对羟基自由基·OH的清除

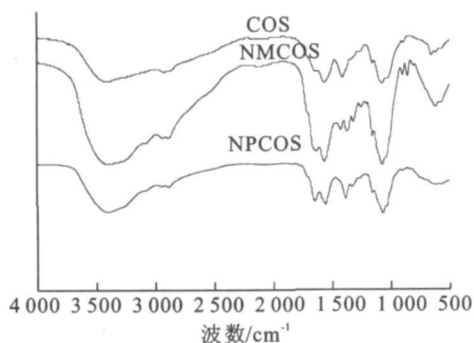


图1 COS、NMCOS和NPCOS的红外光谱

Fig.1 FTIR spectra of COS, NMCOS and NPCOS

活性如图2。随着浓度的增加, NMCOS 和 NPCOS 对羟基自由基·OH 的清除能力逐渐增强。NPCOS 清除羟基自由基·OH 的 IC_{50} (清除率达到50%时所需自由基清除剂的浓度)为0.06 mmol/L, 而 NMCOS 没有达到 IC_{50} 。即取代度相同时, NPCOS 对羟基自由基·OH 的清除能力更强。

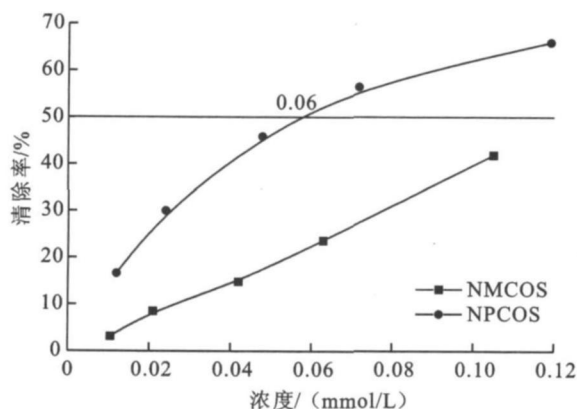


图2 NMCOS 和 NPCOS 对羟基自由基的清除

Fig.2 Scavenging effects of NMCOS and NPCOS on hydroxyl radical

低聚壳聚糖及其衍生物中有大量的羟基和氨基, 对羟基自由基·OH 有如下作用^[16]: (1) 羟基的氢原子与羟基自由基·OH 作用而达到清除目的; (2) 氨基和羟基自由基·OH 反应生成稳定的大分子自由基; (3) NH_2 先与溶液中的氢作用形成氨正离子 NH_3^+ , 再与羟基自由基·OH 作用形成稳定物质。对取代度相同的 NMCOS 和 NPCOS, 氨基与羟基数目相同。而清除羟基自由基·OH 的活性不同, 这与取代基团有关。NMCOS 和 NPCOS 均是在低聚壳聚糖氨基上引入取代基, NMCOS 的取代基是 $-COCH=CHCOO^-$, NPCOS 的取代基是 $-COC_6H_4COO^-$, 两种基团都是吸电子基团, 能降低低聚壳聚糖主链上的电子云密度, 使分子内、分子间生成氢键的几率降低, 使氨基与羟基的活性增强, 易与自由基反应。但是 $-COC_6H_4COO^-$ 的吸电子效应比 $-COCH=CHCOO^-$ 的吸电子效应强,

故取代度相同时, NPCOS 对羟基自由基·OH 的清除能力比 NMCOS 强。

2.3 对 DPPH 的清除能力的影响

图3 是 NMCOS 和 NPCOS 对 DPPH 的清除曲线图。NMCOS 和 NPCOS 对 DPPH 的清除能力均随着浓度的增加而增强。NMCOS 和 NPCOS 的 IC_{50} 分别是 1.2 mmol/L 和 0.88 mmol/L。NPCOS 清除 DPPH 的能力比 NMCOS 强。

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。其主要原理是 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。在低聚壳聚糖及其衍生物中, 主要是氨基和羟基提供氢与 DPPH 结合, 从而达到清除 DPPH 的目的。在本体系中, NMCOS 和 NPCOS 取代度相同, 氨基和羟基数目相同, 但 $-COC_6H_4COO^-$ 基团的吸电子作用比 $-COCH=CHCOO^-$ 基团的吸电子作用强, 从而 NPCOS 的供氢能力比 NMCOS 强, 故清除 DPPH 的能力强。

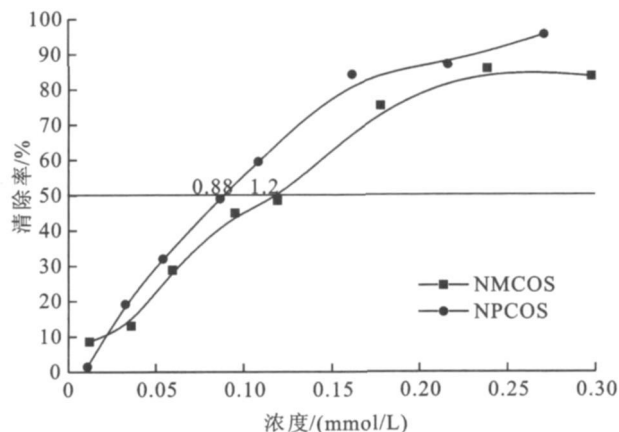


图3 NMCOS和NPCOS对DPPH 自由基的清除

Fig.3 Scavenging effects of NMCOS and NPCOS on DPPH radical

3 结 语

作者对低聚壳聚糖进行酰化, 制得取代度相同的 NMCOS 和 NPCOS。并且考察了其对羟基自由基·OH 和 DPPH 的清除能力。结果表明: 取代度相同时, 尽管氨基和羟基的数目相同, 但是 NMCOS 和 NPCOS 对羟基自由基·OH 和 DPPH 的清除效果不同。这说明不同的 N-取代基对低聚壳聚糖清除自由基的影响不同。与 NMCOS 相比, NPCOS 引进的 $-COC_6H_4COO^-$ 的吸电子能力比 $-COCH=CHCOO^-$ 较强, 故其清除羟基自由基·OH 和 DPPH 的能力较强。这一结果为低聚壳聚

糖及其衍生物的深入研究有指明了方向。

参考文献(References):

- [1] Joshua A, Sonnen, John C, et al. Montine. Free radical-mediated damage to brain in alzheimer's disease and its transgenic mouse models [J]. **Free Radic Biol Med**, 2008, 3: 219- 230.
- [2] Nordberg J, Arner E S J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system [J]. **Free Radic Biol Med**, 2001, 31: 1287- 1312.
- [3] LIU Hong-Tao, LI Wen-Ming, XU Gang, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide- induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. **Pharm Res**, 2009, 59: 167-175.
- [4] 姚倩, 孙涛, 徐铁霞, 等. 壳聚糖/壳寡糖衍生物的制备及其抗氧化性能研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 188- 191.
- YAO Qian, SUN Tao, XU Yixia, LIU Yanyang. Preparation of chitosan/chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activities[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 188-19. (in Chinese)
- [5] 银旭红, 孙涛, 姚倩, 等. 低聚壳聚糖 Zn(II) 配合物清除 DPPH 活性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 329- 331.
- YIN Xuhong, SUN Tao, YAO Qian, et al. DPPH scavenging activity of chitosan oligosaccharide zinc complexes [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 329- 331. (in Chinese)
- [6] 孟晓荣, 张敏, 赵亚娟等. 壳聚糖及其水溶性衍生物的制备与结构表征[J]. 陕西师范大学学报, 2007, 35: 62- 65.
- MENG Xiao-rong, ZHANG Min, ZHAO Yajuan, et al. Preparation and performance of chitosan and its water-soluble derivatives[J]. **Journal of Shaanxi Normal University**, 2007, 35: 62- 65. (in Chinese)
- [7] 易喻, 杨好, 应国清, 等. N -邻苯二甲酰化壳聚糖的合成与性能[J]. 化工进展, 2006, 25 :542- 545.
- YI Yu, YANG Hao, YING Guoqing, et al. Synthesis and properties of N-phthaloyl-chitosan [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2006, 25: 542- 545. (in Chinese)
- [8] Valéry A, Romuald C, Dragoslav M, et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases [J]. **Joint Bone Spin**, 2007, 74: 324- 329.
- [9] 王周玉, 蒋珍菊, 李富生, 等. 水溶性N-酰化壳聚糖的合成与表征[J]. 四川工业学院学报, 2004, 23: 73- 75.
- WANG Zhou-yu, JIANG Zhen-ju, LI Fusheng, et al. Synthesis and Characterization of Water-soluble N-acyl Chitosan [J]. **Journal of Sichuan University of Science and Technology**, 2004, 23: 73- 75. (in Chinese)
- [10] 霍秀颖, 张小华, 吴清. 电导滴定测定N-琥珀酰壳聚糖取代度[J]. 北京中医药大学学报. 2007, 30: 700- 702.
- HUO Xiuying, ZHANG Xiaohua, WU Qing. Determination of substitution degree of N-succinyl-chitosan by conductometric titration[J]. **Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine**, 2007, 30: 700- 702. (in Chinese)
- [11] Sun Tao, Xie Weng-ming, Xu PX. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives [J]. **Carbohydr Polym**, 2004, 58(4): 379- 382.
- [12] 陆占国, 郭红转, 封丹. 芫荽茎叶精油成分及清除 DPPH 自由基能力研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32: 24- 27.
- LU Zhang-guo, GUO Hong-zhuan, FENG Dan. Study on chemical constituent of coriander leaf essential oil and scavenging capacity against the DPPH radical [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2006, 32: 24- 27. (in Chinese)
- [13] 王周玉, 蒋珍菊, 胡星琪. 水溶性N-马来酰化壳聚糖的合成[J]. 应用化学, 2002, 19: 1002- 1004.
- WANG Zhou-yu, JIANG Zhen-ju, HU Xing-qi. Synthesis of Water-soluble N-Maleoyl chitosan [J]. **Chinese Journal of Applied Chemistry**, 2002, 19: 1002- 1004. (in Chinese)
- [14] Hirano S, Ohe Y, Ono H. Selective N-acylation of chitosan [J]. **Carbohydr Res**, 1976, 47: 315- 320.
- [15] I-Chuan Sheih, Tung-Kung Wu, Tony J. Fang Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems[J]. **Biores Technol**, 2009, 100(13): 3419- 3425.
- [16] Xie W M, Xu P X, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives[J]. **Bioorg Med Chem Lett**, 2001, 11: 1699- 1701.

(责任编辑: 朱明)