

不同相对分子质量 κ -卡拉胶马来酰衍生物的抗氧化活性

孙涛, 李铭, 陶慧娜, 谢晶, 毛芳

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 对 κ -卡拉胶进行酸降解, 经过透析得到两种卡拉胶低聚糖。分别与马来酸酐合成得到两种马来酰衍生物(MA 和 MB), 其相对分子质量分别为 3 200 和 4 540, 且取代度相近。对产物进行 FT-IR 表征, 并考察了其羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基的清除活性以及还原能力。结果表明: MA 清除羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基能力以及还原能力均优于 MB, 即相对分子质量可能是影响卡拉胶衍生物抗氧化活性的因素之一。

关键词: κ -卡拉胶; 酸降解; 马来酰基化; 抗氧化活性

中图分类号: R 284; Q 539 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)07-0694-04

Antioxidant Activity of Maleoyl κ -Carrageenans with Different Molecular Weight

SUN Tao, LI Ming, TAO Hui-na, XIE Jing, MAO Fang

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

Abstract: Two κ -carrageenan oligosaccharides were prepared by acidic degradation. Then the maleoyl derivatives (MA, MB) with similar degree of substitution (0.44) were synthesized with maleoyl anhydride, respectively. The products were characterized by FT-IR. Their antioxidant activities were evaluated by the scavenging of hydroxyl radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) and reducing power. The results indicated that MA showed higher antioxidant activities than that of MB, the reason may be related to the molecular weight.

Key words: κ -carrageenan, acidic degradation, maleoyl, antioxidant activity

2000 年, Yamada 等人通过引入不同长度的直链酸酐(C4、C6、C12)对降解后的 κ -和 λ -卡拉胶低聚糖进行酰基化, 结果发现, 酰基化后的 κ -和 λ -卡拉胶的抗 HIV 活性得到提高, 同时抗凝血活性降低^[1]。此后相继出现了用马来酸酐^[2]、琥珀酸酐^[3]、醋酸酐^[4]和邻苯二甲酸酐^[5]等酸酐对低相对分子质量 κ -卡拉胶进行结构改性的报道, 发现酰基化后的 κ -卡拉胶的生物活性得到大幅提高。研究表明, 多糖的抗氧化活性不仅受取代基团的影响, 同时也

受相对分子质量的影响^[6-7]。作者制备了取代度相近相对分子质量不同的两种卡拉胶马来酰衍生物, 考察了两种衍生物的抗氧化活性, 为探明卡拉胶衍生物抗氧化活性影响因素以及开发海洋多糖类抗氧化剂提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

κ -卡拉胶: 食品级, 上海联合食品添加剂有限公

收稿日期: 2011-09-25

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD38B09); 上海市教育委员会科研项目(J50704)。

作者简介: 孙涛(1970-), 女, 黑龙江依兰人, 理学博士, 副教授, 主要从事食品添加剂制备与应用研究。E-mail: taosun@shou.edu.cn

司产品;鲁米诺、DPPH;Sigma 公司产品;其余试剂均为分析纯,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。

WFZ UV2000 型紫外分光光度计;上海合利仪器有限公司产品;Delta 320 型 pH 计;梅特勒-托利多仪分析仪器上海有限公司产品;IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪;西安瑞迈科技有限公司产品。

1.2 κ-卡拉胶低聚糖的制备

将 30.0 g κ-卡拉胶(KC)溶于 1 200 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 HCl 溶液中,于 60 °C 下降解 4 h。冷却,用 0.2 mol/L NaOH 调节溶液 pH 至 7.0,先通过微孔过滤器过滤(0.45 μm),再用截留相对分子质量分别为 3 500 和 7 000 的透析袋在蒸馏水中透析 6 d,冷冻干燥后分别得到 κ-卡拉胶低聚糖 A 和 B 各约 1.2 g^[8]。

1.3 马来酰衍生物的制备

分别将 1.2 g 两种低相对分子质量卡拉胶用 732 型阳离子氢型树脂在 4 °C 下交换 1 h,过滤,再用四丁基氢氧化铵调节溶液 pH 值至 6.0,冻干,得两种卡拉胶四丁基铵盐。将卡拉胶四丁基铵盐 898 mg 溶解于 20 mL N,N-二甲基甲酰胺中,然后依次加入 131 mg 4-二甲氨基吡啶,3.10 mL 三丁基胺,1.27 g 马来酰酐于装有磁力搅拌器和冷凝管的三口烧瓶中,通 N₂ 保护,在 60 °C 下反应 6 h,然后于 4 °C 的三水合乙酸钠的过饱和乙醇溶液中沉淀 1.5 h,用无水乙醇洗涤离心 3 次后,将沉淀溶于蒸馏水中,在质量分数 5% NaHCO₃ 溶液中透析 2 d,再在蒸馏水中透析 4 d,冻干后分别得两种低聚卡拉胶马来酰化产物 MA 和 MB 各约 0.6 g^[2]。

1.4 测试表征

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 400~4 000 cm⁻¹,分辨率为 0.8 cm⁻¹。

采用 GPC 法测定卡拉胶酰化衍生物的相对平均分子质量及其分布。GPC 测试条件如下:流动相:0.1 mol/L 硝酸钠水溶液;监测器:Waters 2410 示差折光监测器;柱子:Ultrasphere 500,120 串联;温度:40 °C。标准物质为:葡聚糖。

1.5 取代度测定

配制一系列不同浓度的马来酰酐标准溶液,用石英比色皿于 254 nm 紫外光下测定吸光度。对吸

光度与浓度作图可得吸光度与马来酰酐浓度的直线方程,利用该方程与衍生物在 254 nm 的吸光度可以求得衍生物的酰化取代度(DS)^[9]。

1.6 对羟基自由基·OH 的清除

用 pH 为 7.40 的 0.05 mol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲溶液分别配制浓度为 0.64 mmol/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为羟基自由基·OH^[10]。

1.7 对 DPPH 自由基的清除

在装 2.0 mL 浓度为 0.1 mmol/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 °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 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]。

1.8 还原能力的测定

还原能力根据文献[12]测定并稍做改进。取 2.0 mL 不同浓度的样品,加入 pH=6.6 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液和 1% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL,混匀,50 °C 水浴 20 min 后迅速冷却,加入 2.5 mL 质量分数 10% 三氯乙酸溶液,混匀后在 2 000 r/min 下离心 10 min,取上清液 2.0 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 结果与分析

2.1 κ-卡拉胶马来酰衍生物的结构表征

图 1 为原料卡拉胶(KC)和两种马来酰衍生物(MA 和 MB)的红外光谱图。从图中可以看出,MA 和 MB 均保留原料卡拉胶的 3 个特征吸收峰^[2],即 1 270 cm⁻¹ 吸收峰处的 O-S-O 对称伸缩振动吸收峰;840 cm⁻¹ 吸收峰处的 C-O-S 伸缩振动吸收峰;930 cm⁻¹ 吸收峰处的 3,6-内醚-D-半乳糖中 C-O-C 的伸缩振动吸收峰,这表明卡拉胶经过马来酰化后,其结构单元未发生变化。MA 和 MB 在 1 580

cm^{-1} 和 $1\,430\text{ cm}^{-1}$ 处出现特征吸收峰, 它们分别是由马来酰基中 -COO- 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动引起的, 在 $1\,650\text{ cm}^{-1}$ 的特征吸收峰归属于 $\text{C}=\text{C}$, 这表明酰化后的产物为卡拉胶的马来酰基化衍生物^[2]。

GPC 结果及取代度测试结果表明: 卡拉胶原料 (KC)、马来酰衍生物 (MA 和 MB) 的平均相对分子质量分别为: 3.5×10^5 、 $3\,200$ 和 $4\,540$; 其取代度分别为 0.45 和 0.44 。

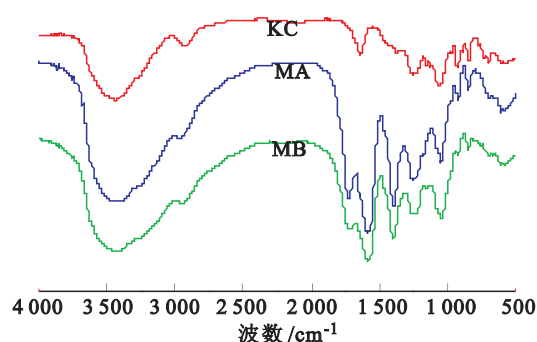


图 1 原料卡拉胶及两种衍生物的红外光谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of κ -carrageenan polysaccharide and the acylated derivatives

2.2 对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除

图 2 描述了 κ -卡拉胶马来酰衍生物 (MA 和 MB) 对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果。它们对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强, 其半抑制浓度分别为 0.069 , 0.135 mmol/L 。即清除羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的能力为: $\text{MA} > \text{MB}$ 。

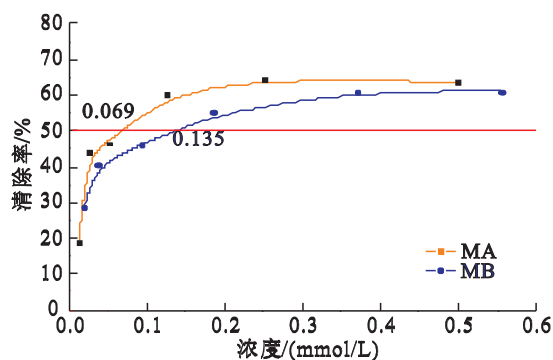


图 2 酰化衍生物对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除

Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activities of the acylated derivatives

2.3 对 DPPH 自由基的清除

图 3 描述了 κ -卡拉胶马来酰衍生物 (MA 和 MB) 对 DPPH 自由基的清除效果。它们对 DPPH

自由基的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强, 其对于 DPPH 自由基的半抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.069 和 0.273 mmol/L 。即清除 DPPH 自由基的能力为: $\text{MA} > \text{MB}$ 。

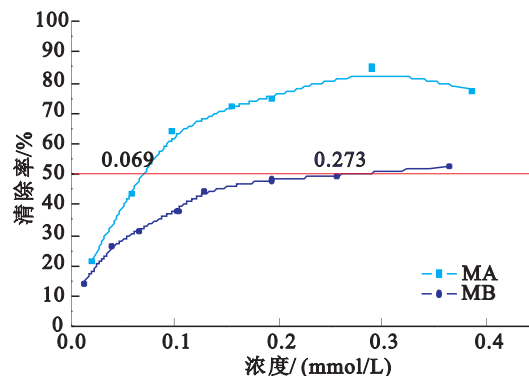


图 3 酰化衍生物对 DPPH 自由基的清除

Fig. 3 DPPH radical scavenging activities of the acylated derivatives

2.4 还原能力的测定

还原能力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标, 通过提供电子, 阻断了 Fe^{2+} 向 Fe^{3+} 的转变, 从而表现出一定的还原能力。研究表明, 抗氧化活性和还原能力之间存在着密切的关系。图 4 描述了 κ -卡拉胶马来酰衍生物 (MA 和 MB) 的还原能力。由图可知, 随着浓度的增加, 样品的吸光值也随之增加, 还原能力逐渐增强。在 0.8 mmol/L 时, 其吸光度分别为 0.894 和 0.747 。即还原能力为: $\text{MA} > \text{MB}$ 。

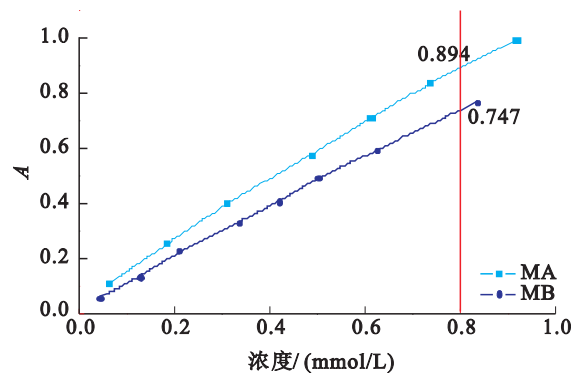


图 4 酰化衍生物的还原能力

Fig. 4 The Reducing power of the acylated derivatives

综上所述, MA 对于羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基的清除活性以及还原能力均强于 MB。卡拉胶衍生物的抗氧化活性可能主要是分子中羟基含量、取代基团性质以及取代度协同作用的结果。作

者合成了取代度相近但相对分子质量不同的卡拉胶马来酰衍生物,抗氧化性能比较结果显示:相对分子质量为3200的MA优于相对分子质量为4540的MB,即MA中与自由基反应的羟基较MB多。造成这一结果的原因可能由于,较相对分子质量小的衍生物相比,相对分子质量较大的卡拉胶马来酰衍生物分子中的羟基易于形成分子内或分子间氢键,使得其与自由基反应的羟基数目减少,从而其抗氧化性能下降。

3 结 语

用HCl水解法制备并通过透析得到两种卡拉胶低聚糖,分别与马来酸酐合成得到马来酰衍生物(MA和MB)。抗氧化性能测试表明,当取代度相近时,相对分子质量越低,抗氧化能力越强。表明相对分子质量可能是影响其抗氧化活性的重要因素。作者为κ-卡拉胶的抗氧化活性研究以及多糖类抗氧化剂的研究与开发提供一定的参考。

参考文献(References):

- [1] Yamada T, Ogamo A. Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect[J]. *Carbohydr Polym*, 2000, 41: 115—120.
- [2] Yun-peng Jiang, Xi-kun Guo. O-Maleoyl derivative of low-molecular-weight κ-carrageenan: synthesis and characterization[J]. *Carbohydr Polym*, 2005, 61: 441—445.
- [3] 郭锡坤, 田秀芳, 庄东红等. κ-卡拉胶的 O-琥珀酰基化衍生物的制备与表征[J]. 汕头大学学报, 2006, 21(1): 23—32.
GUO Xi-kun, TIAN Xiu-fang, ZHUAN Dong-hong, et al. Preparation and characterization of O-succinyl derivative of κ-carrageenan[J]. *Journal of Santou University*, 2006, 21(1): 23—32. (in Chinese)
- [4] 唐凤翔, 陈方, 李峰等. 小分子量海藻硫酸多糖 κ-卡拉胶的乙酰化[J]. 福州大学学报, 2006, 5: 755—759.
TANG Feng-xiang, CHEN Fang, LI Feng, et al. Acetylation of low-molecular-weight κ-carrageenan[J]. *Journal of Fuzhou University*, 2006, 5: 755—759. (in Chinese)
- [5] 郭锡坤, 余成艳. 邻苯二甲酰基化 κ-卡拉胶的合成及其生物活性[J]. 汕头大学学报, 2007, 22(1): 37—41, 53.
GUO Xi-kun, YU Cheng-yan. Preparation and the biological activities of phthaloyl κ-carrageenan[J]. *Journal of Santou University*, 2007, 22(1): 37—41, 53. (in Chinese)
- [6] 姚倩, 孙涛, 徐轶霞等. 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 Yi-xia, et al. Preparation of chitosan/chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activities[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(2): 188—191. (in Chinese)
- [7] 孙涛, 陶慧娜, 周冬香等. 不同降解方式对 κ-卡拉胶低聚糖抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(7): 24—27.
SUN Tao, TAO Hui-na, ZHOU Dong-xiang, et al. The effects of different degradation methods on antioxidant activities of κ-carrageenan oligosaccharides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(7): 24—27. (in Chinese)
- [8] 王长云, 顾谦群, 周鹏等. 红藻多糖卡拉胶分子修饰研究 I. 酸降解[J]. 中国海洋药物, 2003(2): 24—27.
WANG Chang-yun, GU Qian-qun, ZHOU Peng, et al. Molecular modification of carrageenan, a polysaccharide from red seaweed *Kappaphycus striatum* I. acidic degradation[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2003, 3: 24—27. (in Chinese)
- [9] 郭锡坤, 孙文兵, 林树东. 水杨酸改性 κ-卡拉胶的研究[J]. 汕头大学学报, 2008, 3(23): 51—57, 62.
GUO Xi-kun, SUN Wen-bing, LIN Shu-dong. Research on κ-Carrageenan modified by salicylic acid[J]. *Journal of Santou University*, 2008, 3(23): 51—57, 62. (in Chinese)
- [10] 孙涛, 周冬香, 毛芳等. 流动注射化学发光法对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和羟基自由基 $\cdot OH$ 的检测[J]. 食品工业科技, 2006, 11: 182—184.
SUN Tao, ZHOU Dong-xiang, MAO Fang, et al. Flow injection chemiluminescence determination of the superoxide anion radical $O_2^{\cdot-}$ and hydroxyl radical $\cdot OH$ [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 11: 182—184. (in Chinese)
- [11] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, et al. HPLC Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1998(62): 1201—1204.
- [12] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 27—32.