

壳聚糖及其衍生物的抗氧化作用*

金黎明¹, 郑 爽², 杨 艳³, 赵小菁¹, 田文杰¹, 王雅玲¹, 范圣第¹

1(大连民族学院生命科学学院, 辽宁 大连, 116600) 2(天津理工大学化学化工学院, 天津, 300191)

3(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛, 266003)

摘 要 采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法和 DPPH 法, 研究 5 种壳聚糖及其衍生物——壳聚糖(chitosan)、壳寡糖(oligo-chitosan)、羧甲基壳聚糖(CM-chitosan)、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、氨基葡萄糖盐酸盐($\text{GlcNH}_2 \cdot \text{HCl}$)的体外清除羟自由基和 DPPH· 自由基的能力。结果表明: 在实验设置的浓度范围内, 对羟自由基的清除能力依次为 oligo-chitosan > chitosan > GlcNAc > $\text{GlcNH}_2 \cdot \text{HCl}$ > CM-Chitosan, 且其清除能力随着浓度的增加而增加。其中 2 mg/mL 的 Oligo-chitosan 对羟自由基的清除率最大达到 97.81%, 相当于 4 mmol/L 的 V_c 对羟自由基的清除能力。对 DPPH· 的清除能力大小依次为 oligo-chitosan > chitosan > $\text{GlcNH}_2 \cdot \text{HCl}$ > GlcNAc > CM-chitosan, 且其清除能力随着浓度的增加而增加。2 mg/mL oligo-chitosan 的清除率为 97.34%, 大于 6 mmol/L V_c 的清除速率 79.92%。2 种方法测定的结果比较一致。

关键词 壳聚糖, 衍生物, 抗氧化性, 1,1-二苯代苦味酰基自由基(DPPH·), 羟自由基

人体内的自由基主要有活性氧自由基(含 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 等)、活性氮自由基等。研究表明, 人体的衰老和疾病与这些自由基的堆积或消除密切相关^[1]。

壳聚糖(chitosan)是甲壳素(chitin)的 N-脱乙酰基的产物。壳聚糖分子中含有 3 种主要的活性官能团: 氨基(C-2), 一级羟基(C-3)和二级羟基(C-6), 这些基团的化学修饰能够产生大量的在不同领域具有应用价值的原材料^[2]。在过去的 20 多年中, 关于壳聚糖及其衍生物在抗氧化作用方面的研究主要体现在化学水平的抗氧化作用、细胞水平的抗氧化作用和动物整体水平的抗氧化作用。目前已有研究证明, 壳聚糖及其衍生物在细胞水平和动物整体水平上具有一定的抗氧化作用^[3], 但是, 对壳聚糖的单糖衍生物——N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖盐酸盐在化学水平的抗氧化作用, 尤其是在清除 DPPH 自由基方面的研究尚不多见。

1 材料与与方法

1.1 材料、试剂与仪器

壳聚糖(分子质量 15 万 u 左右, 脱乙酰度 > 90%), 氨基葡萄糖盐酸盐($\text{GlcNH}_2 \cdot \text{HCl}$), N-乙酰

氨基葡萄糖(GlcNAc)均购于莱州海力生物制品有限公司。壳寡糖, 实验室自制, 分子质量为 3 000u 左右。羧甲基壳聚糖, 实验室自制, 羧基化度为 75.21%。DPPH, Sigma 公司产品。无水乙醇, 95% 乙醇, H_2O_2 , KOH, 氯乙酸, 邻二氮菲, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 抗坏血酸(V_c)等均为国产商品试剂, 分析纯。

SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司), Seven Easy 型 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), UV-2100 型分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

1.2 清除羟自由基的测定

采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测壳聚糖及其衍生物清除羟自由基的能力, 并以 V_c 为对照实验^[4], 从而比较 5 种样品的抗氧化能力。

(1) 在试管中依次加入 0.2 mmol/L 磷酸缓冲液(PBS) 2 mL、去离子水 1 mL, 摇匀; 加入 0.75 mmol/L FeSO_4 1 mL, 充分混匀; 加入体积分数 0.01% H_2O_2 1 mL, 振荡 1 min; 加入 0.75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液 1 mL, 37°C 水浴 60 min。用分光光度计于 $\lambda=536$ nm 处检测反应体系的吸光度值 A_p 。

(2) 以 1 mL 去离子水替代(1)中的 1 mL H_2O_2 , 其余条件同(1), 测其吸光度值 A_B 。

(3) 分别以不同浓度壳聚糖及衍生物样品 1 mL 替代(1)中的去离子水, 测其吸光度值 A_{s1} 。

(4) 分别以不同浓度 V_c 溶液 1 mL 替代(1)中的

第一作者: 博士, 讲师(杨艳博士为通讯作者)。

* 国家自然科学基金项目(30771584), 辽宁省教育厅高校科研计划项目(20060153, 20081117), 大连民族学院博士科研启动基金资助项目(20056106)

收稿日期: 2008-03-03, 改回日期: 2008-10-09

去离子水,测其吸光度值 A_{s2} 。

(5)按以下公式计算测试物及阳性对照物对·OH 的清除率(d):

$$d/\% = \frac{A_s - A_p}{A_B - A_p} \times 100$$

(6)根据数据绘制样品浓度-清除率曲线。

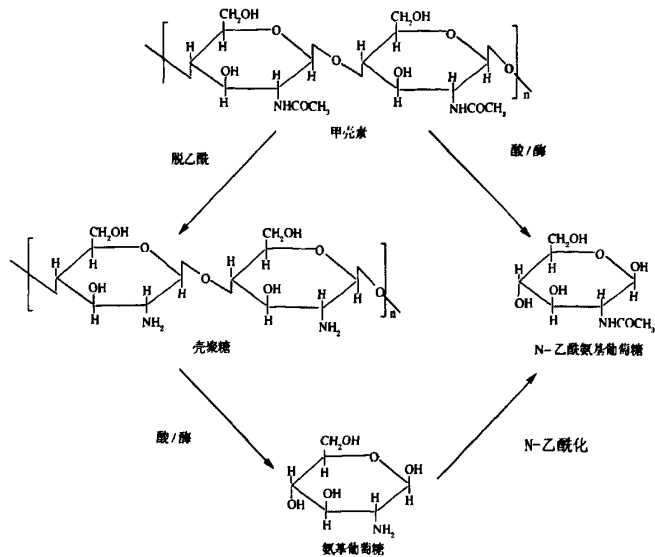


图1 甲壳素、壳聚糖与 N-乙酰氨基葡萄糖、氨基葡萄糖的关系

1.3 DPPH 自由基清除实验

采用 DPPH 法检测壳聚糖及其衍生物清除 DP-PH 自由基的能力,以 V_c 作对照实验,从而进一步证明五种样品的抗氧化能力^[5]。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖及其衍生物对羟自由基的清除作用

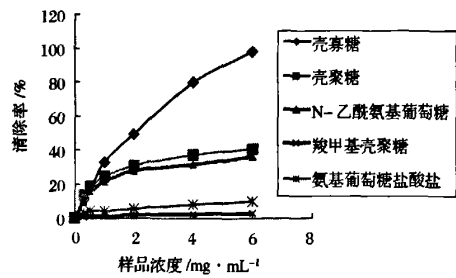


图2 壳聚糖及其衍生物对·OH 的清除率曲线

由图2可见,5种壳聚糖及其衍生物清除羟自由基的能力依次为 oligo-chitosan>chitosan>Glc-NAc>GlcNH₂ · HCl>CM-Chitosan,且几种样品对羟自由基的清除能力都随着浓度的增加而增加,其中 2 mg/mL 的 Oligo-chitosan 对羟自由基的清除率最大达到 97.81%,相当于图3显示的对照实验中 4 mmol/LV_c 对羟自由基的清除能力。

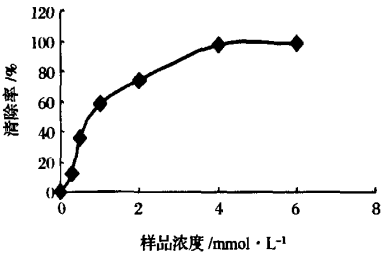


图3 V_c 对·OH 的清除率曲线

Fenton 反应是体内产生羟自由基的重要机理,羟自由基是造成组织脂质过氧化,蛋白质解聚,核酸断裂,多糖解聚的重要活性氧,羟自由基清除率是反映抗氧化剂的抗氧化作用的重要指标。因此,本实验结果可作为壳聚糖及其衍生物抗氧化作用的一个证据,并为其抗氧化机制的进一步研究提供线索。

2.2 壳聚糖及其衍生物对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH · 分析法被广泛应用于清除自由基物质性质的研究。DPPH · 是一种合成的有机自由基,分子中由于存在多个吸电子的-NO₂ 和苯环的大 π 键,所以氮自由基能稳定存在。若体系中添加的样品能将其清除,则提示样品有降低羟自由基(·OH)、烷自由基(R·)或过氧自由基(O₂⁻·)和打断脂质过氧化链反应的作用^[6]。

由图4可见,5种壳聚糖及其衍生物清除 DPPH ·

的能力大小依次为 oligo-chitosan>chitosan>Glc-NH₂·HCl>GLcNAc>CM-chitosan, 且其清除能力随着浓度的增加而增加。其中壳寡糖的清除自由基的能力最强, 2 mg/mL oligo-chitosan 的清除率为 97.34%, 大于图 5 所显示的对照实验中 6 mmol/L V_C 的清除速率 79.92%。本方法测得的结果与邻二氮菲-Fe²⁺ 法测定的结果基本一致。

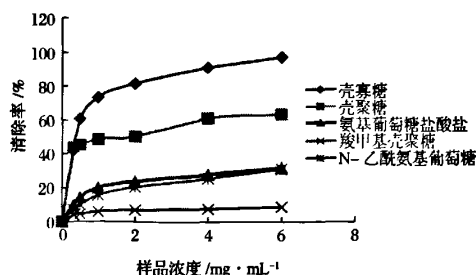


图 4 壳聚糖及其衍生物对 DPPH· 的清除率曲线

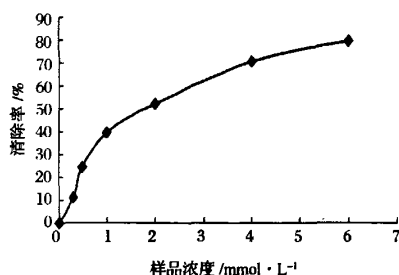


图 5 V_C 对 DPPH· 的清除率曲线

应用邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法和 DPPH 法研究了壳聚糖、壳寡糖、羧甲基壳聚糖、N-乙酰氨基葡萄糖、氨基葡萄糖盐酸盐在化学水平上的体外抗氧化能力, 为笔者前期的对壳聚糖及其衍生物的体内抗氧化能力实验做了补充。实验结果进一步证明了壳聚糖及其衍生物具有较强的抗氧化能力, 为筛选取材天然的具有抗氧化能力的食品和药物的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 钟远声, 李熙灿, 谢学明, 等. 萜萜清除 DPPH 自由基能力的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(1): 144~145
- 2 Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects[J]. Adv Food Nutr Res, 2005, 49: 93~135
- 3 金黎明, 杨艳, 刘万顺, 等. 壳寡糖及其衍生物对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(理学版), 2007, 42(7): 1~4
- 4 范冠宇, 谢虹, 吴志刚. 水溶性几丁聚糖对羟自由基的清除作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(6): 676~677
- 5 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553~555
- 6 胡喜兰, 韩照祥, 陶莹, 等. DPPH· 法测定 17 种植物的抗氧化活性[J]. 食品科技, 2006, 14(10): 264~268

Study on Antioxidant Activity of Chitosan and Its Derivatives

Jin Liming¹, Zheng Yi², Yang Yan³, Zhao Xiaojing¹,
Tian Wenjie¹, Wang Yaling¹, Fan Shengdi¹

1 (College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

2 (College of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300191, China)

3 (College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT The antioxidant activities *in vitro* of chitosan, carbomethyl-chitosan (CM-Chitosan), oligo-chitosan, N-acetyl-glucosamine (GLcNAc) and GlcNH₂·HCL were investigated by phenanthroline-Fe²⁺ and DPPH methods. The results showed that in the setting concentration range, the antioxidant activities increased with the elevation of concentration. The activity of scavenging hydroxyl free radical of chitosan and its derivatives was that Oligo-chitosan > Chitosan > GLcNAc > GlcNH₂·HCL > CM-Chitosan. The highest scavenging rate of hydroxyl free radical using 2 mg/mL of Oligo-chitosan could be 97.81%, which was similar to the activity using 4 mmol/L of V_C. The activity of scavenging DPPH free radical was that Oligo-Chitosan > Chitosan > GlcNH₂·HCL > GLcNAc > CM-Chitosan. The highest scavenging rate of DPPH free radical using 2 mg/mL Oligo-chitosan could be 97.34%, more than the rate 79.92% of 6mmol/L V_C. The results were consistent by two methods.

Key words chitosan, derivatives, antioxidant activity, 1,1- diphenyl- 2- pierylhydrazyl (DPPH·), hydroxyl free radical