

羧甲基壳聚糖的降解及其抗氧化性能的研究

孙 涛, 周冬香, 朱颖娜, 毛 芳
(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要: 羧甲基壳聚糖是壳聚糖的一种重要衍生物。本研究采用过氧化氢氧化法对羧甲基壳聚糖进行降解, 并考察了降解时间及过氧化氢用量对降解的影响。用粘度法和改进的 Schales' 方法测定了降解产物的分子量。并用流动注射化学发光分析法检测了降解产物的抗氧化能力——对羟基自由基的清除活性。结果表明: 随着过氧化氢在降解体系中的浓度的增大, 降解产物的分子量将趋于一定值; 当 H_2O_2 在总反应体系中浓度大于 1.3 mol/L , 降解时间大于 16h, 将得到分子量低至 1100 左右的羧甲基壳聚糖; 经降解得到的羧甲基壳聚糖均具有一定的羟基自由基清除活性, 且分子量越小, 其抗氧化性能越强。

关键词: 羧甲基壳聚糖; 过氧化氢氧化法降解; 羟基自由基; 抗氧化活性

Study on Degradation of Carboxymethyl Chitosan and Their Antioxidant Activity

SUN Tao, ZHOU Dong-xiang, ZHU Ying-na, MAO Fang
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Carboxymethyl chitosan was oxidatively degraded with H_2O_2 . The effects of reaction time and concentration of H_2O_2 on the degradation were studied. Viscosity determination and modified Schales' procedure were applied to assay the molecular weights of degraded carboxymethyl chitosan. Antioxidant activity of degraded carboxymethyl chitosan was evaluated as hydroxyl radical scavenger by flow injection chemoluminescence technology. The results showed that the molecular weights of degraded products would be a relative constant value with the increase of H_2O_2 concentration. Carboxymethyl chitosan with molecular weight of about 1100 would be obtained when the H_2O_2 concentration is higher than 1.3 mol/L and reaction time is longer than 16h. All degraded carboxymethyl chitosans show certain hydroxyl radical scavenging activity, but the antioxidant activity is stronger at lower molecular weight.

Key words: carboxymethyl chitosan; H_2O_2 oxidative degradation; hydroxyl radical; antioxidant activity

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0054-04

羧甲基壳聚糖是一种重要的壳聚糖衍生物, 由壳聚糖在碱性条件下与氯乙酸反应而得。与壳聚糖相比, 其物理、化学性质均得到很大的改善: 具有 100% 水溶性、成膜性及极强的重金属螯合作用。这种中性、纯天然和完全无毒的产物在医学保健、工农业等领域均显示出更加优越的特点。目前已应用在高級化妆品添加剂、医药保健品、重金属螯合剂、药物缓释剂、植物生长剂和工业废水处理等诸多方面。然而研究表明: 羧甲基壳聚糖的许多独特生理活性和功能特性与其分子量大小密切相关^[1-2]。

H_2O_2 是一种很强的氧化剂, 可以使羧甲基壳聚糖主链上的 $-(1,4)$ 糖苷键发生氧化而断裂, 得到分子量相对较低的羧甲基壳聚糖。本文采用过氧化氢氧化法来降

解羧甲基壳聚糖, 并研究过氧化氢的浓度和降解时间对降解产物分子量的影响。

自由基又叫游离基, 在正常情况下, 体内自由基的产生和清除是平衡的, 一旦自由基产生过多或抗氧化体系出现故障, 体内自由基代谢就会出现失衡。活性氧自由基在有氧呼吸的生物体内普遍存在, 不能及时清除的自由基可以损伤神经系统, 造成早老年痴呆、震颤麻痹等症; 损伤细胞器, 促进衰老; 损伤遗传物质, 参与致癌、促癌; 造成脂质过氧化, 形成血栓、动脉粥样硬化、白内障等症^[3]。因此, 体内自由基的及时清除十分重要。

常用的自由基清除活性检测方法主要有: 电子自旋共振法、荧光光谱法和 HPLC 法等。这些方法存在仪器

收稿日期: 2005-11-20

基金项目: 上海水产大学校长基金(SFU200305); 上海市重点学科建设项目专项基金(T1102);

上海市教育委员会科研项目(07zz134)

作者简介: 孙涛(1970-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然多糖的功能化。

昂贵、操作复杂、检测方法缺乏专一性或灵敏度低等缺点,与之相比,化学发光法因具有灵敏、快速、操作简单、重现性好等优点而广泛应用于自由基的检测^[4]。

本文采用化学发光法考察羧甲基壳聚糖降解产物对羟基自由基的清除能力,研究降解产物的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

羧甲基壳聚糖为食品级,脱乙酰度为0.65,由上海微纳科技有限公司提供。

1.1.2 试剂

30% H_2O_2 溶液、氯化钠、铁氰化钾、葡萄糖、亚铁氰化钾、碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸氢二钾、邻苯三酚,上述试剂均为分析纯;鲁米诺 Sigma 公司。

1.1.3 仪器

乌氏粘度计(毛细管内径0.5~0.6 mm) 中国医药(集团)上海化学试剂公司;紫外分光光度计(WFZ UV2000型) 上海合利仪器有限公司;Delta 320型pH计 梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;IFFM-D型流动注射式化学发光仪 西安瑞迈电子科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 羧甲基壳聚糖的降解

称取羧甲基壳聚糖2g,放入100ml烧杯中;向烧杯中加入50ml蒸馏水,于磁力搅拌器上搅拌至全溶;加入适量30% H_2O_2 溶液;于磁力搅拌器上搅拌,室温反应至预定时间结束。将反应液放入干燥箱内恒温60下烘干,得羧甲基壳聚糖降解产物。

1.2.2 测试与表征

红外光谱在EQUINOX 55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400~4000 cm^{-1} ,分辨率为0.8 cm^{-1} 。

1.2.3 分子量的测定

粘度法^[5]:以0.1mol/L NaCl为溶剂,在25下用乌氏粘度计采用逐步稀释法测定羧甲基壳聚糖降解产物的特性粘度 $[\eta]$,并根据公式中 $[\eta]=K\bar{M}$ (式中, $K=7.92 \times 10^{-4}$, $a=1.0$)来计算降解产物的粘均分子量。

还原糖法^[6]:以0.3mol/L的 Na_2CO_3 溶液为溶剂,配制浓度为0.75mg/ml的铁氰化钾溶液。用蒸馏水为溶剂,用分析纯葡萄糖代替氨基葡萄糖,配制浓度为1mg/ml的葡萄糖溶液,并作梯度稀释。取各稀释液2ml,与2ml上述铁氰化钾溶液于比色管中混合均匀后,沸水浴上反应15min,冷却。用紫外分光光度计,在420nm波长下测吸光度。以吸光度为纵坐标,以葡萄糖在减色反

应体系中的最终浓度为横坐标,得标准曲线。

以0.6 mg/ml左右的羧甲基壳聚糖降解产物的待测溶液代替葡萄糖溶液。进行上述反应,并测样品吸光度,对照标准曲线,求出与该样品减色程度相当的葡萄糖百分浓度值。根据公式求出样品分子量。

$$M=180 \times \frac{A_0}{A_i}$$

式中, A_0 为羧甲基壳聚糖降解产物百分浓度; A_i 为葡萄糖百分浓度。

1.2.4 抗氧化性能测试

用流动注射化学发光法考察了羧甲基壳聚糖降解产物对羟基自由基 $\cdot OH$ 的清除活性。配制0.05mol/L pH7.4 KH_2PO_4 -NaOH缓冲溶液,并以此为溶剂配制 6.4×10^{-4} mol/L鲁米诺溶液,0.012mol/L H_2O_2 溶液,0.8mg/ml亚铁氰化钾溶液以及不同浓度的样品待测溶液。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。计算清除率。待测样品本身不发光,但它可以抑制自由基的化学发光体系,通过样品对该体系的发光强度的抑制程度来测定其对自由基的清除率,即测定其抗氧化能力。

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

式中, A_0 为未加抗氧化剂时的峰面积; A_i 为加入样品溶液时的峰面积。

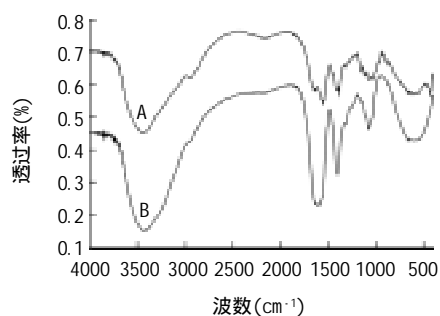
经SOD、 H_2O_2 酶及甘露醇检测,该体系产生的自由基为 $\cdot OH$ 。

2 结果与分析

2.1 降解产物的红外光谱

用红外光谱来考察羧甲基壳聚糖降解前后的结构变化。图1为降解前后的羧甲基壳聚糖的红外光谱图。图1(A)为分子量为75万的原料羧甲基壳聚糖的红外谱图。由图1可见:在1100 cm^{-1} 附近有特征的多糖吸收峰,其中1031 cm^{-1} 附近峰是分子中伯醇羟基C-O伸缩振动吸收峰,1068和1113 cm^{-1} 是环内醚键C-O伸缩振动的结果,1155 cm^{-1} 是分子中仲醇羟基C-O伸缩振动吸收峰。1400 cm^{-1} 附近出现了羧酸负离子 $-COO^-$ 的对称伸展振动吸收峰,而其不对称伸展振动吸收峰(1560 cm^{-1} 附近)与壳聚糖的酰胺带(1550 cm^{-1} 附近)相重叠,导致了1558 cm^{-1} 的较强的吸收峰。1650 cm^{-1} 为壳聚糖的酰胺带,吸收峰明显,由此说明了此羧甲基壳聚糖中还残留了一部分乙酰胺基。3444 cm^{-1} 强吸收峰是O-H伸展振动和多糖的分子间氢键共同作用的结果。

图1(B)为降解后分子量为1600的羧甲基壳聚糖红外光谱图。与A相比,1074 cm^{-1} 附近环内醚键C-O伸缩



A. $MW=7.5 \times 10^6$; B. $MW=1.4 \times 10^6$; C. $MW=1600$ 。

图1 羧甲基壳聚糖的FTIR谱图

Fig.1 FTIR spectrum of carboxymethyl chitosan

振动吸收峰较强,而 1030cm^{-1} 的伯醇羟基C-O吸收峰和 1150cm^{-1} 的仲醇羟基C-O伸缩振动吸收峰均不明显,这与羧甲基壳聚糖分子量小,分子间氢键大大减弱有关。 1402cm^{-1} 吸收峰相对增强, 1560cm^{-1} 和 1650cm^{-1} 附近的峰重叠为 1602cm^{-1} 附近的强吸收峰,说明分子量小的羧甲基壳聚糖中的羧酸根 $-\text{COO}^-$ 的含量相对增加,这可能与 H_2O_2 降解羧甲基壳聚糖时破坏1-4糖苷键产生部分羧酸根 $-\text{COO}^-$ 有关。

经红外测试表明,羧甲基壳聚糖降解后分子结构并没有发生明显改变,只是 $-(1,4)$ 糖苷键的断裂。

2.2 不同条件对降解的影响

2.2.1 过氧化氢用量对降解的影响

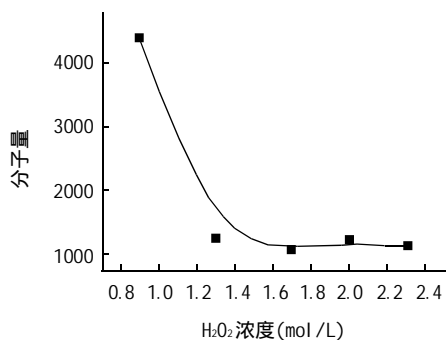


图2 过氧化氢用量对羧甲基壳聚糖降解的影响

Fig.2 Effect of concentration of H_2O_2 on degradation of carboxymethyl chitosan

固定降解体系中羧甲基壳聚糖的浓度为 40g/L ,反应时间为 4h ,考察不同 H_2O_2 用量降解的影响。如图2所示。由图2可看出:随着 H_2O_2 浓度的增大,降解产物的分子量不断降低,直到一相对固定值。整条曲线以 1.3mol/L 为分界点。当 H_2O_2 的浓度为 0.9mol/L 时,羧甲基壳聚糖的降解产物的分子量为 4350 ;当 H_2O_2 的浓度为 1.3mol/L 时,分子量骤降至 1250 ; H_2O_2 浓度在 $1.3 \sim 2.3\text{mol/L}$ 之间时,降解产物的分子量也稳定在 $1100 \sim 1200$ 左右,不再下降。因此, H_2O_2 浓度在 $1.3 \sim 2.3\text{mol/L}$

这个范围中, H_2O_2 量对降解影响不大。这可能与虽然反应体系中 H_2O_2 浓度高,但真正参与降解的 H_2O_2 量并没有真正增加有关。

2.2.2 反应时间对降解的影响

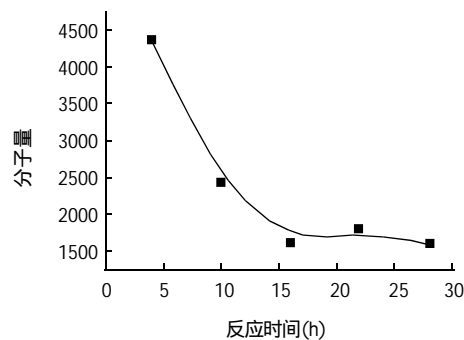


图3 反应时间对羧甲基壳聚糖降解的影响

Fig.3 Effect of degradation time on degradation of carboxymethyl chitosan

图3是当羧甲基壳聚糖浓度为 40g/L , H_2O_2 浓度为 0.9mol/L 时,不同的反应时间对降解的影响。由图3可看出:当反应时间为 4h 时,羧甲基壳聚糖的降解产物的分子量为 4350 ;当反应时间为 16h 时,分子量已低至 1620 ;继续反应下去分子量变化不大。

2.3 羧甲基壳聚糖的抗氧化性

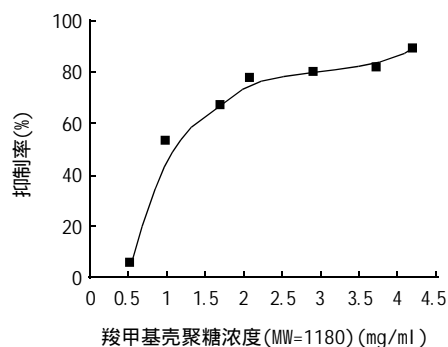


图4 羧甲基壳聚糖(MW=1180)对羟基自由基的清除

Fig.4 Inhibiting effect of carboxymethyl chitosan (MW=1180) on hydroxyl radical

通过检测羧甲基壳聚糖降解产物对羟基自由基的检测来考察其抗氧化性。图4为分子量为 1180 的羧甲基壳聚糖在不同浓度下对羟基自由基的清除效果。由图4可看出:随着羧甲基壳聚糖浓度的增大,其对羟基自由基的清除率不断增大。当浓度为 1.1mg/ml 时,其对羟基自由基的清除能力为 50% ,即 50% 抑制浓度 IC_{50} 为 1.1mg/ml 。当体系中羧甲基壳聚糖的最终浓度为 4.2mg/ml ,其对羟基自由基的清除率达到最大为 89% 。

图5为分子量为 4430 的羧甲基壳聚糖在不同浓度下对羟基自由基的清除效果。由图5可看出:随着浓度的

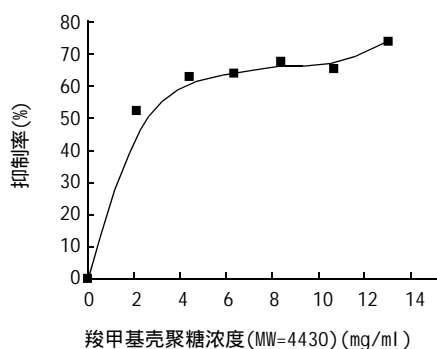


图5 羧甲基壳聚糖(MW=4430)对羟基自由基的清除

Fig.5 Inhibiting effect of carboxymethyl chitosan (MW=4430) on hydroxyl radical

增大,清除率不断上升。浓度在4.5mg/ml以上时,清除率的上升趋势趋于平缓。该羧甲基壳聚糖对羟基自由基的半抑制浓度约为2.6mg/ml,在反应体系中其最终浓度为13mg/ml是对羟基自由基的清除率达到最大为74%。

图6是原料羧甲基壳聚糖(MW=7.5 × 10⁵)在不同

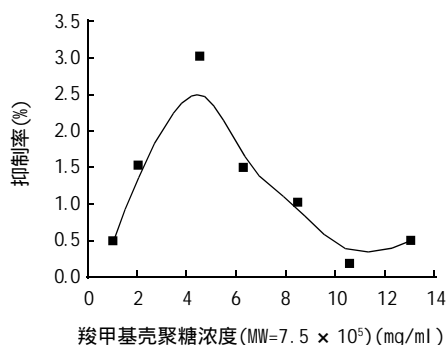


图6 羧甲基壳聚糖(MW=7.5 × 10⁵)对羟基自由基的清除

Fig.6 Inhibiting effect of carboxymethyl chitosan (MW=7.5 × 10⁵) on hydroxyl radical

浓度下对羟基自由基的清除效果。由图6可以看出,在测定浓度下,原料羧甲基壳聚糖对羟基自由基的抑制率都低于5%,可以说它对羟基自由基基本没有清除能力。

由图4、5和6可知,分子量越小的羧甲基壳聚糖,其对羟基自由基的清除效果越好,即其抗氧化性越好。

3 结论

氧化法对羧甲基壳聚糖的降解结果表明:降解时间越长,H₂O₂用量越多,降解效果越好。当H₂O₂在总反应体系中浓度大于1.3mol/L,降解时间大于18h,将得到分子量低至1100的羧甲基壳聚糖。羧甲基壳聚糖对羟基自由基的抑制率随着其浓度的增大而升高。分子量越小的羧甲基壳聚糖,其半抑制浓度越小,说明其抗氧化性越好。分子量在1200左右的羧甲基壳聚糖的抗氧化性较好。

参考文献:

- [1] 陈凌云, 杜予民, 刘义. 羧甲基壳聚糖的结构与抗菌性能研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 2000(2): 191-194.
- [2] CHEN Xi-guang, WANG Zhen, LIU Wan-shun, et al. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts[J]. Biomaterials, 2002, 23(23): 4609-4614.
- [3] NIKI E, YOSHIDA Y, SAITO Y, et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 338(1): 668-676.
- [4] ANAGNOSTOPOULOU M A, KEFALAS P, PAPAGEORGIOU V P, et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2006(1): 19-25.
- [5] WEI W, SHU Q B, WEN Q. Dilute solution properties of chitosan[J]. Acta Polymerica Sinica, 1991(2): 202-203.
- [6] 胡健, 赵国骏. 射线辐照降解壳聚糖的研究[J]. 扬州大学学报: 自然科学版, 1999(5): 51-53.

信息

巴西加紧酸性水果的基因测序与品种改良

据巴西科技部网站报道,自2001年开始对酸性水果基因组研究以来,巴西目前已对酸性水果的约5.5万个基因进行了测序,研究人员同时使用基因测序成果对酸性水果病虫害进行研究。这项研究对改良酸性水果品种,以及提高其抵御病虫害的能力具有重要意义。

酸性水果,主要是指柑橘类水果。它的病虫害问题是长期以来困扰业内人士的一大难题。圣保罗酸性水果农业经济研究所人士称,有关酸性水果基因组测序与品种改良项目得到了巴西科技部全国科技发展委员会的支持。该项目主要针对橙子、蜜橘及一些杂交的酸性水果品种进行基因测序研究,通过比较各品种的基因资料,确定这些水果中与抗病虫害、抗干旱、提高水果与果汁的色质和营养成分等有关的基因,进而找到控制水果病虫害、改良品种质量的最有效的方法。此外,该项目还研究如何解决水果水分含量低的问题。

为了对已获得的资料和研究成果进行评价,圣保罗酸性水果农业经济研究所还建立了一个测试网络,在经过挑选的种植园进行水果品种改良检测。在圣保罗和巴拉那州有超过800个新的水果杂交品种正在试种。