

壳聚糖对亚硝酸盐清除作用的研究

孙艳辉, 董 英

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 研究了体外模拟胃液条件下壳聚糖对亚硝酸盐的清除作用; 用分光光度法测定了壳聚糖对亚硝酸盐的清除率, 考察了反应时间、壳聚糖用量、壳聚糖的脱乙酰度和分子量对清除亚硝酸盐效果的影响; 结果表明: 随反应时间的延长、壳聚糖用量的增加, 壳聚糖脱乙酰度的增高和分子量的降低, 壳聚糖对亚硝酸盐的清除能力升高; 分子量 0.98 万的壳聚糖 37.5mg 能完全清除亚硝酸盐。

关键词: 壳聚糖; 亚硝酸盐; 清除; 脱乙酰度; 分子量

Study on Effects of Chitosan to Scavenge Nitrite

SUN Yan-hui, DONG Ying

(School of Biology and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Under the condition of simulated gastric juice in vitro, the effect of chitosan to scavenge nitrite was studied. The scavenging rate was determined by spectrophotometric method. The effects of reaction time, the chitosan's use level, the deacetylated degree and the molecular weight to scavenge nitrite were investigated. The results showed that the scavenging capability of chitosan to nitrite increased with the extension of reaction time. The level increase of chitosan's use, the enhancement of the deacetylated degree and the reduction of molecular weight, 37.5mg by 85% deacetylated chitosan could scavenge nitrite wholly.

Key words: chitosan; nitrite; scavenge; the degree of deacetylated; molecular weight

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0071-03

N-亚硝基化合物是一种致癌性很强的化合物, 业已研究的近 300 种 N-亚硝基化合物中, 约 90% 以上具有动物致癌性。正常情况下, 人们直接从食物中摄入的亚硝胺量是微乎其微的, 但形成 N-亚硝胺类的前体物质亚硝酸盐、仲胺和叔胺却大量存在于食物中及产生于食物在体内的代谢过程中^[1]。亚硝酸盐与仲胺无论在实验室和自然条件下还是在人体和动物体内均能合成亚硝胺, 尤其在人和动物的胃中更适于合成亚硝胺^[2]。因此, 在体内外清除亚硝酸盐或阻断亚硝胺合成是防治癌病因产生的有效途径之一。已报道大蒜清、苦荞粉提取液和玉米提取物等具有清除亚硝酸盐的能力^[3~5]。

壳聚糖是由甲壳素经脱乙酰化反应而得到的一种生物高分子, 壳聚糖与纤维素等多种膳食纤维具有相似的特性^[6], 并且是惟一带有正电荷的动物性纤维, 其独特的化学结构和生理活性已成为近年来人们研究的焦点, 被欧美一些发达国家誉为人体“第六生命要素”^[7]。壳聚糖具有良好的生物相容性、可生物降解性, 以及无

毒副作用的安全特性, 越来越被人们广泛应用于医药、食品、化工、农业、环保等各个领域^[8]。在食品工业中, 壳聚糖可用于果蔬饮料的加工、食品工业废水处理、焙烤食品、食品防腐保鲜; 壳聚糖也可作为保健食品、酶的固定化载体、乳化剂、增稠剂和稳定剂^[9]等。关于壳聚糖清除亚硝酸盐的报道较少, 徐廷国等认为壳聚糖对清除饮用水中的亚硝酸盐有促进作用^[10], 陈忻等研究了丙酮酸改性壳聚糖对亚硝酸盐有清除作用^[11], 但他们没有分析清除作用的机理。本实验以美国药典提供的模拟胃液为依据, 建立体外模拟胃液体系, 详细考察了不同脱乙酰度、不同分子量壳聚糖的对亚硝酸盐的清除作用, 并分析了其作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖(脱乙酰度 90%, 分子量 68.5 万; 脱乙酰度 85%, 分子量 70.1 万) 浙江玉环海洋生物化学有限公

收稿日期: 2004-12-06

作者简介: 孙艳辉(1978-), 男, 博士研究生, 研究方向为生物资源的综合利用。

司;壳聚糖(脱乙酰度 95%,分子量 69.7 万)和氨基葡萄糖 江苏日欣实业集团有限公司;壳聚糖(脱乙酰度 85%,分子量分别为 39.6 万、12.4 万、5.2 万和 0.98 万) 自制。

模拟胃液^[12]:称取 2.0g NaCl,加双蒸水溶解,移入 1000ml 容量瓶,加入 7ml 浓盐酸,双蒸水定容至刻度。

0.4% 对氨基苯磺酸:称取 0.4g 对氨基苯磺酸(分析纯),溶于 100ml 20% 盐酸中,混匀,避光保存;

0.2% 盐酸萘乙二胺:称取 0.2g 盐酸萘乙二胺(分析纯),溶于 100ml 蒸馏水中,混匀,避光保存;

5 μ g/ml 亚硝酸钠标准溶液:亚硝酸钠(分析纯)于硅胶干燥器中干燥 24h,精密称取 0.100g,加水溶解,移入 500ml 容量瓶中,定容至刻度,冰箱中贮存。临用时吸取此液 2.50ml,置于 100ml 容量瓶中,加水定容至刻度。

1.2 主要仪器

UNICO7200 型分光光度计,PHS-3C 型酸度计,电子天平,恒温水浴锅等。

1.3 实验方法

根据 NO₂⁻在酸性条件下,与对氨基苯磺酸发生重氮化反应,生成的物质在显色剂盐酸萘乙二胺的作用下可显色,从而可测定其吸光度^[13]。

各称取一定质量的壳聚糖放于 50ml 容量瓶中,加入 25ml 模拟胃液,加入 5 μ g/ml 的亚硝酸钠溶液 2ml,然后把混合物置于 37℃ 水浴锅中避光反应一定时间;加入 0.4% 对氨基苯磺酸 2ml,摇匀静置 5min;再加入 0.2% 盐酸萘乙二胺显色剂 1ml,摇匀加水定容,静置 15min 后以蒸馏水作空白测各溶液的吸光度 A_i,其中把含 0mg 壳聚糖的溶液所测得的吸光度定为 A₀,即空白值。按以下公式计算壳聚糖对 NO₂⁻的清除率:

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

式中: A_i 加壳聚糖测得的吸光度,
A₀ 未加壳聚糖测得的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 不同反应时间对亚硝酸盐清除率的影响

向模拟胃液体系中加入 7.5mg 脱乙酰度 95% 的壳聚糖,按 1.3 操作,分别反应不同的时间,计算清除率,结果如图 1。

由图 1 可见,随着反应时间的延长,壳聚糖对亚硝酸盐的清除率逐渐增大。反应 15、30、45 和 60min,壳聚糖分别能清除 7.74%、12.14%、14.98% 和 16.35% 的亚硝酸盐。反应 60min 后,再延长 30min,对亚硝

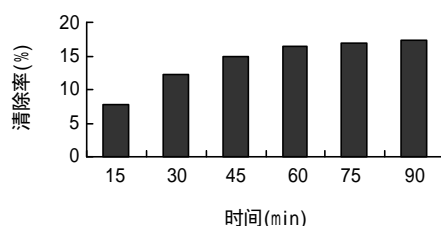


图 1 反应时间对亚硝酸盐清除率的影响

Fig.1 Effect of reaction time on the scavenging rate of chitosan to nitrite

酸盐的清除率仅有 0.99% 的增长。因此,以下的反应时间都定为 60min。

2.2 不同壳聚糖用量对亚硝酸盐清除率的影响

把不同质量的脱乙酰度 95% 的壳聚糖加入反应体系中,反应 60min,测定对亚硝酸盐的清除率,结果如图 2。

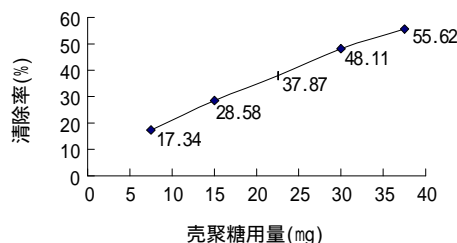


图 2 壳聚糖用量对亚硝酸盐清除率的影响

Fig.2 Effect of the chitosan's use level on the scavenging rate of chitosan to nitrite

由图可知,壳聚糖对亚硝酸盐的清除作用随着用量的增加越来越强。当用量达由 7.5mg 增加到 37.5mg 时,清除率由 17.34% 增加到 55.62%。

2.3 不同脱乙酰度的壳聚糖对亚硝酸盐清除率影响

为考察不同脱乙酰度的壳聚糖对亚硝酸盐清除率影响,把 37.5mg 的脱乙酰度分别为 95%、90% 和 85% 分子量相近的壳聚糖加入模拟胃液中,反应 60min,测定吸光度,计算清除率,结果如表 1。

表 1 脱乙酰度对亚硝酸盐清除率影响

Table 1 Effect of the degree of deacetylated on the scavenging rate of chitosan to nitrite

脱乙酰度(%)	95	90	85
清除率(%)	55.62	51.8	47.05

可以看出,壳聚糖的脱乙酰度对清除亚硝酸盐有很大的影响,随脱乙酰度的降低,清除率降低。脱乙酰度 85% 的壳聚糖的清除能力比脱乙酰度 95% 的壳聚糖的降低了 8.57%。

2.4 不同分子量的壳聚糖对亚硝酸盐清除率的影响

把氨基葡萄糖(GA)和脱乙酰度 85% 分子量分别为

70.1 万、39.6 万、12.4 万、5.2 万和 0.98 万的壳聚糖各 37.5mg 放入模拟胃液体系, 考察清除亚硝酸盐的效果。结果如表 2 所示:

表 2 分子量对亚硝酸盐清除率的影响

Table 2 Effect of molecular weight on the scavenging rate of chitosan tonitrite

分子量(万)	70.1	39.6	12.4	5.2	0.98	G A
清除率(%)	47.05	50.28	61.27	79.72	100	2.3

结果表明, 壳聚糖对亚硝酸盐的清除作用随相对分子量的降低而升高。分子量为 12.4 万和 5.2 万的壳聚糖对亚硝酸盐的清除率分别是 61.27% 和 79.72%。分子量为 0.98 万的低聚糖能完全清除体系中的亚硝酸盐。而氨基葡萄糖对亚硝酸盐的清除率很低, 仅为 2.3%。

2.5 讨论

亚硝酸盐中 N 的氧化数为 +3, 处于中间状态, 因此, 它既可以当氧化剂, 又可当还原剂。亚硝酸盐无论在酸性或碱性介质中, 其氧化性都大于还原性, 其氧化性是主要的。在酸性溶液中还原剂作用下, 亚硝酸盐及其盐本身被还原为 NO。凡具有氧化还原当量的天然食物, 均具有一定的抗氧化活性及清除 NO₂⁻ 的能力。

壳聚糖对亚硝酸盐的清除作用, 可能与其抗氧化性有关。壳聚糖分子中存在还原端羰基和大量 -OH、-NH₂, 可与氧自由基发生反应, 具有很强的抗氧化性^[14,15]。模拟胃液体系中壳聚糖用量越大, 游离 -NH₂ 越多, 抗氧化能力越强, 随时间延长, 亚硝酸盐分解越增加; 同样, 壳聚糖脱乙酰度升高, 自由 -NH₂ 增多, 清除亚硝酸盐能力增强。高分子量的壳聚糖分子中链间互相缠结, 且存在分子间分子内氢键, 使得一般的试剂与壳聚糖分子中活性官能团作用机会降低, 导致反应活性较低; 低分子量壳聚糖结构松散, 分子链缠结程度较小, 活性官能团暴露, 增大了与 NO₂⁻ 充分作用的概率, 故清除亚硝酸盐的能力明显提高。氨基葡萄糖盐酸盐对 NO₂⁻ 的清除作用很不明显, 可能与分子中的 -NH₂ 被 HCl 络合成盐有关。

3 结论

本文采用模拟胃液体系就壳聚糖对亚硝酸盐的清除作用进行了考察, 证明壳聚糖对亚硝酸盐有明显的清除作用。这种清除作用随反应时间的延长、壳聚糖的用

量的增加、壳聚糖分子量的降低和脱乙酰度的增加而增加, 分子量 0.98 万的壳聚糖 37.5mg 能完全清除亚硝酸盐, 从而在分子水平上从一个方面揭示了壳聚糖作为保健品的机理。

参考文献:

- [1] 周奇文. 实用食品加工新技术[M]. 中国食品出版社, 1998. 25-28.
- [2] 胡荣梅, 马立珊. N-亚硝基化合物分析方法[M]. 科学出版社, 1980. 4-9.
- [3] 赵云斌, 胡樱, 王增珍, 等. 大葱清除亚硝酸盐的实验研究[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 76-78.
- [4] 薛长晖, 王佩维, 姚晨之. 苦荞粉提取液对 NO₂⁻ 清除作用的体外试验研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2002, 10: 48-49.
- [5] 许钢. 玉米提取物抑制亚硝化反应的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(4): 42-45.
- [6] Chobot VKJOL. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. Chitin and chitosan[J]. Ceska Slov Farm, 1995, 44(4): 190.
- [7] 顾其胜, 侯春林. 第六生命要素: 几丁质、几丁聚糖、甲壳质、壳糖胺[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1999.
- [8] 李树品, 康战燕, 苏学艳. 壳聚糖与人体生理机能调节[J]. 山东科学, 1998, 11(1): 57-62.
- [9] 郭开宇, 赵谋明. 甲壳素/壳聚糖的研究进展及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1): 59-63.
- [10] 徐廷国, 陈忻, 曹国栋. 壳聚糖抑制饮用水中亚硝酸盐形成的研究[J]. 精细化工, 2003, 20(10): 619-621.
- [11] 陈忻, 胡秀梅, 洪祥乐. 丙酮酸改性壳聚糖的制备及应用[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 110-113.
- [12] Board of Trustees. The united states pharmacopeia[M]. 1995. 2053.
- [13] 樊明涛. 食品分析与检验[M]. 世界图书出版西安公司, 1998. 204-207.
- [14] Pyo-Jam Park, Jae-Young Je, Se-Kwon Kim. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 55: 17-22.
- [15] Janak Y V A Kamil, You-Jin Jeon1. Free radical scavenging activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (Clupea harengus)[J]. Food Chemistry, 2002, 79: 69-77.

欢迎订阅 2006 年《食品科学》杂志