

# D-氨基葡萄糖盐酸盐的制备及抗氧化特性的研究

张兰杰, 候冬岩, 辛 广, 谷 昊, 赵素云  
(鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114005)

**摘 要:** 从盘锦河蟹壳制备甲壳素, 后者用盐酸水解, 再纯化得到D-氨基葡萄糖盐酸盐, 同时研究了其对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除作用和对超氧( $\text{O}_2\cdot^-$ )自由基的抑制效果。

**关键词:** 河蟹外壳; 甲壳素; D-氨基葡萄糖盐酸盐; 自由基

Study on Preparation and Antioxidation Effects of D-Glucosamine Hydrochloride

ZHANG Lan-jie, HOU Dong-yan, XIN Guang, GU Hao, ZHAO Su-yun  
(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114005, China)

**Abstract:** D-glucosamine hydrochloride is accessible through the purification of hydrochloride hydrolysed chitin derived from the river crab in Panjin. The D-glucosamine hydrochloride shows good anti-oxidation effects on the hydroxyl free radical and the oxygen free radicals.

**Key words** outer cover of river crab; chitin; D-glucosamine hydrochloride; free radical

中图分类号: S886.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0103-03

D-氨基葡萄糖盐酸盐(D-glucosamine hydrochloride, 简称D-GAH), 其结构为D-葡萄糖分子中C<sub>2</sub>-羟基被氨基所取代, 因氨基显碱性, 与盐酸可成盐。D-葡萄糖胺是1878年由Ledderhose发现的第一个被确认其结构的氨基单糖, 在体内具有重要的生理意义。参与肝肾解毒, 发挥抗炎、护肝的作用; 刺激婴儿肠道中双歧杆菌的增生等<sup>[1]</sup>。还能在医药上作为抗菌消炎药物, 用于治疗风湿性关节炎和胃溃疡疾病, 若与抗生素一起使用, 可促进抗生素在血液中的吸收, 降低副反应<sup>[2]</sup>。同时也可抑制癌细胞的生长, 是合成新型抗癌药氯脲霉素的主要原料<sup>[3]</sup>。在食品中, 是婴儿配方乳中添加的一种重要微量糖类成分, 还是合成VB<sub>6</sub>和核黄素中间体的起始原料, 此外也可应用于化妆品和饲料添加剂中, 用途十分广泛<sup>[4]</sup>, 国内外需求量正日益增加。

辽宁盘锦地区处于辽河入海口, 具有独特的海、淡水资源, 是中国著名的“蟹都”。近些年来, 盘锦地区大胆实施了“蟹田种稻”, 使得养蟹和种田两不误。2004年, 全地区河蟹养殖面积130万亩。盘锦已经成为中国北方最大的河蟹人工孵化和养殖销售基地, 蟹壳资源十分丰富。我们利用盘锦河蟹外壳作原

料, 制备了D-氨基葡萄糖盐酸盐, 同时对其抗氧化活性进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

河蟹外壳由盘锦养蟹专业户惠赠。

### 1.2 试剂

氨基葡萄糖盐酸盐标准品(分析纯) 玉环红星生化制品厂; 水杨酸(分析纯) 上海化学试剂三厂; 连苯三酚(分析纯) 贵州遵义化工厂; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 甲壳素的制备

取经过预处理后的干蟹壳100g, 加水400ml及80ml浓盐酸, 充分搅拌, 进行两次酸除钙处理, 另用500ml 15%的氢氧化钠, 进行脱蛋白处理, 水洗至中性。脱色、干燥, 得甲壳素14.12g。产品外观片状、不透明。

#### 1.3.2 壳聚糖的制备

取甲壳素14.12g, 加300ml 50%氢氧化钠, 在95℃的条件下保温1.5h, 滤去碱液, 水洗至中性, 低

收稿日期: 2006-04-28

基金项目: 鞍山师范学院科学基金资助项目(200302)

作者简介: 张兰杰(1957-), 女, 教授, 主要从事生物化学的教学与科研。

温干燥, 得壳聚糖 10.87g。

### 1.3.3 D-GAH 制备

取壳聚糖 10.87g, 加入三口瓶中, 在搅拌下缓缓加入 36% 盐酸 100ml, 90℃, 回流 3.5h。然后加入 30ml 蒸馏水, 20g 活性碳, 70℃保温 30min, 趁热过滤, 热水洗涤, 洗液与滤液合并, 减压蒸馏, 残液加 5 倍体积的无水乙醇, 搅拌后, 4℃静置, 过夜后产品析出。再用无水乙醇洗涤、低温干燥, 得粗 D-GAH 7.05g。

### 1.3.4 D-GAH 的精制

取粗 D-GAH 7.05g, 用 50ml 蒸馏水, 加热至 60℃, 加 1.0g 活性碳, 保温 20min, 趁热过滤, 滤液在 5 倍体积无水乙醇中搅拌后, 4℃静置, 过夜后产品析出。经过滤、干燥得精制产品 6.67g, 含量采用乙酰丙酮法测定。

### 1.3.5 D-GAH 的鉴定

#### 1.3.5.1 D-GAH 的红外光谱

用 NICOLET-550 型付立叶红外光谱仪, 溴化钾压片法, 测得制备品 D-GAH 的红外光谱图 2, 并与 D-GAH 纯品的红外光谱图 1 比较分析。

#### 1.3.5.2 D-GAH 旋光度的测定

准确称取 D-GAH 2.3179g, 迅速溶解, 定容至 100ml 后, 每隔一定的时间, 用旋光仪测定溶液的旋光度, 由公式  $[\alpha]_D^{25} = \alpha / LC$  计算比旋光度, 绘出时间-比旋光度曲线, 见图 3。

### 1.3.6 D-GAH 的抗氧化特性

#### 1.3.6.1 对 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的抑制作用

采用连苯三酚自氧化法测定<sup>[5]</sup>, 略有改动。在碱性条件下(pH8.2), 连苯三酚发生自氧化反应, 生成  $O_2^{\cdot-}$  和有色的中间产物, 该有色的中间产物在  $\lambda=325nm$  有一特征性吸收光谱, 当加入  $O_2^{\cdot-}$  的抑制剂时,  $O_2^{\cdot-}$  的生成受到抑制, 连苯三酚自氧化过程受阻, 溶液在  $\lambda=325nm$  时吸光度减弱。因此可通过测定  $A_{325}$  的值, 判定抑制剂对  $O_2^{\cdot-}$  的抑制作用, 并可比较不同浓度的抑制剂对  $O_2^{\cdot-}$  的抑制作用。体系总体积 3ml, pH8.2; 50mmol Tris-HCl 缓冲液, 加入连苯三酚 10 $\mu$ l, 以缓冲液作空白, 测其 4min 之内吸光度的变化率  $A_0$  值。在体系中加入不同浓度的 D-GAH 溶液, 按上述方法, 分别测定  $A_1$  值, 其抑制率按下式计算:

$$O_2^{\cdot-} \text{ 抑制率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

#### 1.3.6.2 对 $\cdot OH$ 自由基的清除作用

参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型<sup>[6]</sup>,  $H_2O_2$  与二价铁离子混合后产生  $\cdot OH$ ,  $\cdot OH$  自由基具有很高

的反应活性, 存活的时间短, 但在反应体系中加入水杨酸, 能有效地捕捉  $\cdot OH$  并产生有色物质。该产物在 510nm 波长处有强吸收, 若加入具有清除  $\cdot OH$  功能的待测物, 便会与水杨酸竞争  $\cdot OH$ , 从而使紫色产物的生成量减少, 采用固定时间反应法, 在 510nm 处测定待测物反应液的吸光度, 并与空白液进行比较, 可测定待测物对  $\cdot OH$  的清除作用。清除率按下式计算:

$$\cdot OH \text{ 清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 产品的制备结果

按本工艺制得的 D-GAH 为白色无定形粉末, 五批制备结果见表 1, 平均回收率为 6.18%, 纯品平均含量 97.98%。

表 1 D-GAH 的制备结果  
Table 1 Results of preparation of D-glucosamine hydrochloride

号数	1	2	3	4	5
蟹壳(g)	50	70	100	150	200
甲壳素(g)	7.10	10.15	14.12	22.71	27.25
粗品 D-GAH(g)	5.87	7.95	10.87	14.18	19.97
纯品 D-GAH(g)	3.71	4.91	6.67	8.65	11.29
粗品 D-GAH 平均含量(%)			89.14		
纯品 D-GAH 平均含量(%)			97.98		
D-GAH 平均产率(%)			94.27		
提纯倍数			1.1		
回收率(%)			6.18		

### 2.2 D-GAH 的红外光谱分析

制备品 D-GAH 红外光谱图 2 中, 3300 $cm^{-1}$  左右的峰是 N-H 键的伸缩振动; 2950 $cm^{-1}$  峰是 C-H 键的伸缩振动; 1600 $cm^{-1}$  峰是 N-H 键的面内弯曲振动; 1060 $cm^{-1}$  峰是 C-N 键的伸缩振动; 920 $cm^{-1}$  峰是 N-H 键的面外弯曲振动; 与标准品 D-GAH 红外光谱图 1 相吻合。可见制备品具有氨基葡萄糖的结构, 并以其盐酸

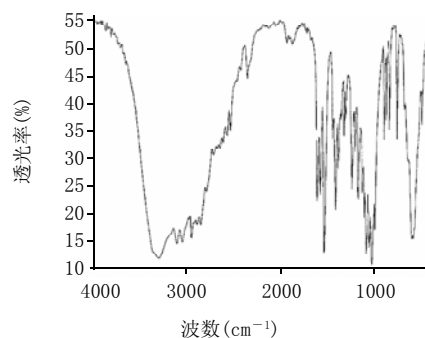


图 1 标准品 D-GAH 的红外光谱图  
Fig.1 Infrared spectrum of D-glucosamine hydrochloride standard

盐的形式存在。

### 2.3 D-GAH 的旋光度的测定

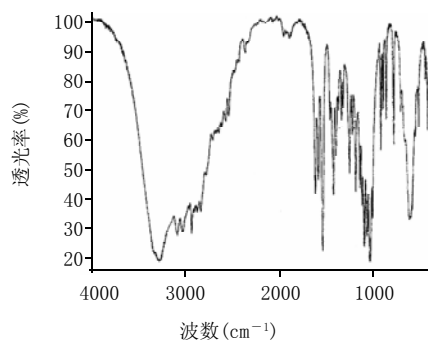


图2 制备品 D-GAH 的红外光谱图

Fig.2 Infrared spectrum of D-glucosamine hydrochloride from outer cover of river

由图2可以看出, D-GAH 存在变旋现象, 这与 $\alpha$ 和 $\beta$ 的构型转换有关。在溶液放置4h后, 比旋光度开始达到平衡,  $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+72.5^\circ$ , 与文献值<sup>[7]</sup>相符。

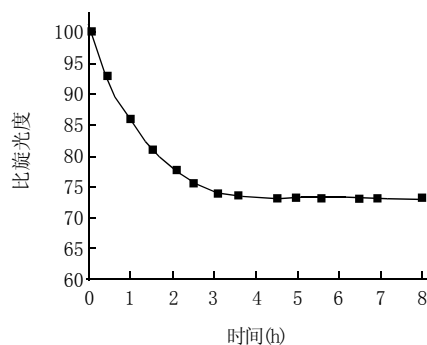


图3 D-GAH 溶液比旋光度随时间的变化(室温 25℃)

Fig.3 Changes of specific rotation of D-glucosamine hydrochloride solution with time(room temperature 25℃)

### 2.4 D-GAH 的抗氧化特性

#### 2.4.1 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用

用双蒸水配制 D-GAH 标准溶液(10mg/ml)100ml, 然后分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0ml, 按 1.3.6.1 的实验方法, 测定吸光度值, 计算抑制率。结果表明 D-GAH 含量在 2.0~10mg/ml 范围内, 对  $O_2^{\cdot -}$  具有明显的抑制作用, 并随浓度的增加而增加, 几乎呈直线关系, 见图4。

#### 2.4.2 对 $\cdot OH$ 的清除作用

用 1% 的 D-GAH 溶液, 然后分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0ml, 按 1.3.6.2 的实验方法, 测定吸光度值, 实验结果表明: D-GAH 溶液对  $\cdot OH$  具清除作用, 随着浓度的增加而逐渐增强, 其清除作用和溶液中 D-GAH 的含量在一定的范围内(1.0~10mg/ml)呈线性关系, 见图5。

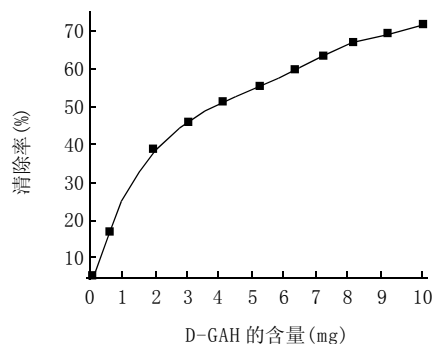


图4 D-GAH 清除  $O_2^{\cdot -}$  活性的量效关系  
Fig.4 Relationship between concentration and scavenging effect of D-GAH on  $O_2^{\cdot -}$

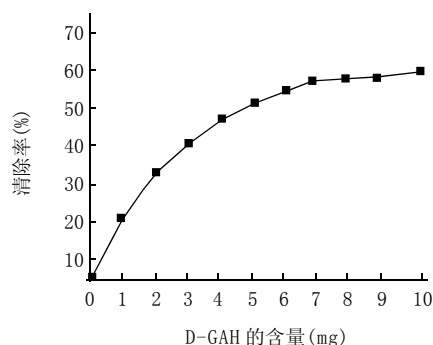


图5 D-GAH 清除  $\cdot OH$  活性的量效关系  
Fig.5 Relationship between concentration and scavenging effect of D-GAH on  $\cdot OH$

盘锦河蟹壳不仅原料易得, 而且甲壳素及衍生物 D-GAH 的含量较高, 产品的颜色和形状也很美观。更重要的是用盘锦河蟹壳制备的 D-GAH 具有很强的抗氧化能力, 极有前景成为新型的天然食品防腐剂, 因此对河蟹壳的深加工不仅可以减少它对环境的污染, 还具有一定的经济意义。

### 参考文献:

- [1] MUZZARELLI R A A. *In vivo* biochemical significance of whitin-based medical item's[M]//DUMITRIU S. Polymeric biomaterials. New York: Marcel Dekker, 1993: 179-197.
- [2] PRUDDEN J F, NYACK U. Method and agent for treating inflammatory disorders of the gastrointestinal tract: US, 4006224[P]. 1977.
- [3] 湖南医药工业研究所401组. 抗癌药氯脲霉素研究简报[J]. 医药工业, 1979(10): 38.
- [4] INGLE T R, VAIDYA S H, PAI M U. Production of D-glucosamine hydrochloride(GAH) from fish canning waste[J]. Research and Industry, 1973, 18: 54-56.
- [5] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217-219.
- [6] 王开发, 王隆华, 支崇远, 等. 玉米花粉黄酮类物质对清除自由基的作用[J]. 中国养蜂, 2001, 52(6): 4-5.
- [7] 黄金城, 杨其蕴, 梁诗. 蝉蜕制备盐酸盐氨基酸葡萄糖的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1993, 5(3): 28-29.