

# 低聚羧甲基壳聚糖的抗氧化性能

孙 涛, 银旭红, 姚 倩, 周冬香, 邵则淮

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘要:** 将低聚壳聚糖(chitosan oligosaccharide, COS)醚化得到 *O*-羧甲基壳聚糖(*O*-carboxymethyl chitosan oligosaccharide, *O*-CMCOS)和 *N*-羧甲基壳聚糖(*N*-carboxymethyl chitosan oligosaccharide, *N*-CMCOS), 其取代度(substituting degree, DS)均为 0.54, 用红外光谱对其结构进行表征。同时, 考察了其结构对超氧阴离子的清除活性以及还原能力。结果表明, COS 及其衍生物清除超氧阴离子的活性及还原能力的强弱顺序均为: *O*-CMCOS > COS > *N*-CMCOS。

**关键词:** 低聚壳聚糖; 羧甲基壳聚糖; 取代度; 抗氧化; 还原能力

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)02-0054-03

甲壳素是自然界存储量仅次于纤维素的第二大天然多糖, 广泛存在于甲壳动物外壳、某些植物及真菌类细胞壁中, 其脱乙酰基为壳聚糖。壳聚糖具有良好的生物相容性、可生物降解性等多种生物活性, 在食品、化工、环保和生物医学等领域的应用研究取得了重大进展<sup>[1~3]</sup>。羧甲基壳聚糖是壳聚糖经羧甲基化后的一类壳聚糖衍生物。根据羧甲基的取代位置不同, 可以分为 *O*-羧甲基壳聚糖、*N*-羧甲基壳聚糖和 *N, O*-羧甲基壳聚糖。羧甲基在多糖主链上取代的位置和程度都会直接影响到羧甲基壳聚糖的各种性能, 是壳聚糖在生产、研究和应用中的重要技术指标。有关羧甲基壳聚糖的取代位置、取代度及其功能之间关系的研究, 尚未见很多报道。

本实验以低聚壳聚糖(Chitosan oligosaccharide, COS)为原料, 制备了相同取代度的 *O*-羧甲基壳聚糖(*O*-CMCOS)和 *N*-羧甲基壳聚糖(*N*-CMCOS), 并研究了其结构对抗氧化能力的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与仪器

低聚壳聚糖(分子质量为 5 ku), 购自浙江金壳生物化学有限公司; 鲁米诺, 硼氢化钠, 乙醛酸, 购自 Sigma 公司; 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。

79-3 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; DELTA-320-S 型 pH 计, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; DDS-307 电导率仪, 上海精密科学仪器有限公司; UV-2000 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯

上海仪器有限公司; FFM-D 型流动注射式化学发光仪, 西安瑞迈电子科技有限公司; EQUINOX55 傅立叶红外-拉曼光谱仪, 德国 BRUKER 公司。

### 1.2 羧甲基壳聚糖的制备及表征

#### 1.2.1 *O*-羧甲基壳聚糖的制备

将 5.0 g 壳聚糖加入到 50 mL 42% NaOH 溶液中, 在室温下边搅拌边分别加入 5.35、2.5 和 1.0 g 氯乙酸, 反应 28 h 后, 用 1 : 1 HCl 调节 pH 至 7, 然后用无水乙醇沉淀并多次浸泡洗涤。最后 60 °C 真空干燥, 即得到白色的 *O*-羧甲基壳聚糖<sup>[4]</sup>。

#### 1.2.2 *N*-羧甲基壳聚糖的制备

将 4 g 壳聚糖加入到含有 0.2 g 乙醛酸的 150 mL 的水溶液中, 搅拌反应 2 h。用 10% 的 NaOH 调节 pH 至 9, 然后加入 10 mL 10% 的 NaBH<sub>4</sub>, 继续搅拌 2 h, 然后调 pH 至中性, 然后用无水乙醇沉淀并多次浸泡洗涤, 最后 60 °C 真空干燥, 即得到白色的 *N*-羧甲基壳聚糖<sup>[5]</sup>。

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 500~4000 cm<sup>-1</sup>, 分辨率为 0.8 cm<sup>-1</sup>。取代度通过电位滴定法测得<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2009-02-28; 修回日期: 2009-06-29

基金项目: 上海市教育委员会科研项目(07zz134); 上海市重点学科建设专项基金项目(T1102)

作者简介: 孙涛(1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化学, 电话: 021-61900363, E-mail: taosun@shou.edu.cn

### 1.3 对超氧阴离子的清除

对超氧阴离子的清除根据文献<sup>[7]</sup>测定并稍做改进。用 pH 为 10.20 的 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲溶液配制浓度为 1.5×10<sup>-3</sup> mol/L 的鲁米诺溶液, 用 1×10<sup>-3</sup> mol/L 的盐酸配制浓度为 0.1 mol/L 的邻苯三酚储备液, 使用前用去离子水稀释至 1×10<sup>-4</sup> mol/L。以缓冲液作为溶剂, 配制成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=(A<sub>0</sub> - A<sub>i</sub>)/A<sub>0</sub>×100%。式中 A<sub>0</sub> 为空白溶液峰面积; A<sub>i</sub> 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超氧阴离子。

### 1.4 还原能力的测定

还原能力根据文献<sup>[8]</sup>测定并稍做改进。取 2.0 mL 不同浓度的样品, 加入 pH 为 6.60 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 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 10% 三氯乙酸溶液, 混匀后在 2000 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 0.1% 的三氯化铁溶液, 静置 10 min 后在 700 nm 处测定吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 红外光谱及取代度

图 1 是 COS, O-CMCOS 和 N-CMCOS 的红外光谱图。如图所示, 所有样品均在 1 100 cm<sup>-1</sup> 附近有较强的多糖特征吸收峰。其中 1 030 cm<sup>-1</sup> 和 1 074 cm<sup>-1</sup> 附近吸收峰分别是分子中伯羟基和仲羟基伸缩振动的结果。这两个吸收峰在 O-CMCOS 谱图中强度明显减弱, 由此说明 COS 的伯羟基和仲羟基发生了羧

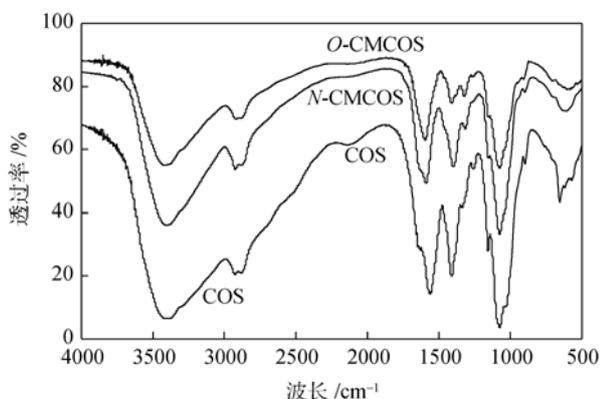


图 1 COS, O-CMCOS 和 N-CMCOS 的红外光谱  
Fig. 1 FTIR spectra of COS, O-CMCOS and N-CMCOS

甲基化反应。3 400 cm<sup>-1</sup>-OH 吸收峰明显变窄, 这是由于 C6 位上-OH 发生了醚化反应, -OH 减少而引起的。在 N-CMCOS 的谱图中, 伯胺 N-H 面内弯曲振动在 1 612 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰均有减弱, 说明了在 N 位发生了羧甲基的取代反应<sup>[9]</sup>。经过电位滴定法测试, O-CMCOS 和 N-CMCOS 的取代度均为 0.54, 这说明羧甲基取代 O-CMCOS 羟基和 N-CMCOS 氨基的程度相同。

### 2.2 对超氧阴离子的清除

超氧阴离子是一种毒性很大的活性氧, 故对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除能力是反映物质抗氧化活性的一个重要方面。图 2 为 COS 及其衍生物对超氧阴离子的清除曲线。由图可知, COS、O-CMCOS、N-CMCOS 清除超氧阴离子的能力随着浓度的升高而逐渐增强, 其半抑制浓度 IC<sub>50</sub>(对自由基抑制率为 50% 时, 所需自由基清除剂的浓度)分别为 2.34、2.07 和 3.32 g/L。即 COS 及其衍生物对超氧阴离子的清除活性顺序为: O-CMCOS > COS > N-CMCOS。

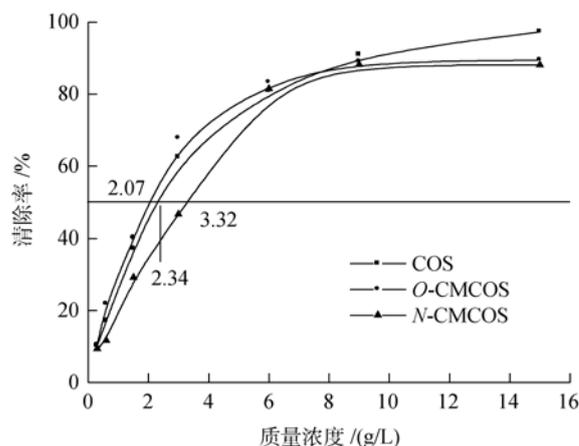


图 2 COS、O-CMCOS 和 N-CMCOS 对超氧阴离子的清除  
Fig. 2 Scavenging effects of COS, O-CMCOS and N-CMCOS on superoxide anion

### 2.3 还原能力的测定

还原能力和抗氧化活性之间有着密切的关系。抗氧化物质通过提供电子阻断 Fe<sup>2+</sup> 向 Fe<sup>3+</sup> 的转变, 表现出一定的还原能力, 同样也可以通过提供电子和自由基反应, 表现出抗氧化活性。COS 及其衍生物的还原能力如图 3 所示。随着浓度的增加, 各样品的吸光值随之增加, 还原能力逐渐增强。当质量浓度为 2.0 g/L 时, COS、O-CMCOS 和 N-CMCOS 的吸光度分别是 0.72、0.96 和 0.65。即 COS 及其衍生物的还原能力大小顺序为: O-CMCOS > COS > N-CMCOS。

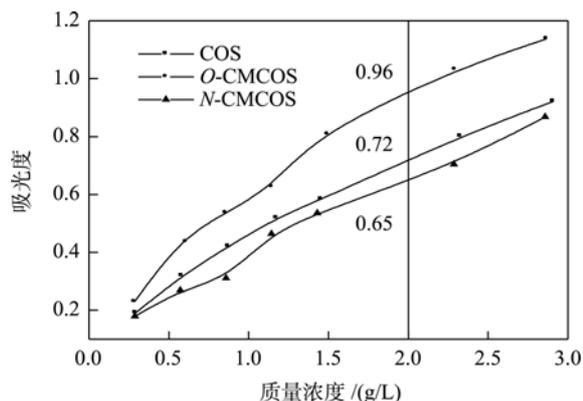


图3 COS、O-CMCOS 和 N-CMCOS 的还原能力

Fig. 3 Reducing power of COS, O-CMCOS and N-CMCOS

### 3 结论

本实验通过对 COS 进行醚化, 制备了取代度均为 0.54 的 O-CMCOS 和 N-CMCOS。抗氧化测试结果表明: COS 及其衍生物对超氧阴离子的清除能力与还原能力的顺序大小均为: O-CMCOS > COS > N-CMCOS。壳聚糖以及衍生物抗氧化能力的大小与活性羟基和氨基密切相关。低聚壳聚糖由于主链上的  $\beta$ -(1,4)糖苷键发生断裂, 更多的活性羟基基团暴露出来, 因而具有良好的抗氧化能力。在 COS 分子链上引入羧甲基后, 由于  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  是推电子基团, 它可以使活性羟基和氨基的电子云密度增大, 更有利于活性羟基和氨基与自由基反应, 故 O-CMCOS 的抗氧化活性与 COS 相比有所增强。而对于 N-CMCOS 来说, 羧甲基的引入虽然使活性氨基和羟基的电子云密度增大, 但同时也减少了游离氨基的含量, 所以 N-CMCOS 的抗氧化活性相对最弱。这一结果也说明氨基在 COS 及其衍生物抗氧化活性中的

重要性。

参考文献:

- [1] Sweetie R K, Ramesh C, Arun S. Chitosan glucose complex- A novel food preservative[J]. *Food Chem*, 2008, 106: 521-528.
- [2] Liu G Z, Zhu Y B, Du J Y, *et al.* Research advances of chitosan's application in agriculture[J]. *Chin Agric Sci Bul*, 2007, 23: 377-381.
- [3] Wang X Y, Du Y M, Yang J H, *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan/layered silicate nanocomposites [J]. *Polymer*, 2006, 47: 6 738-6 744.
- [4] Yu X F, Guan Y L, Yang D Z, *et al.* Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 79(7): 1 324-1 335.
- [5] 陈浩凡, 潘仕荣, 王琴梅. 不同取代羧甲基壳聚糖的制备及其结构测定[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2003, 32(2): 152-156.
- [6] Muzzarelli R A A, Tanfani F, Emanuelli M, *et al.* N-(carboxymethylidene)chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: Novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate[J]. *Carbohydrate Research*, 1982, 107(2): 199-214.
- [7] 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  $\text{O}_2^-$  和羟基自由基  $\cdot\text{OH}$  的检测[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(11): 182-187.
- [8] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1995, 43(1): 27-32.
- [9] Kogan G, Skorik Y A, Zitnanova I, *et al.* Antioxidant and antimutagenic activity of N-(2-carboxyethyl) chitosan[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 201(3): 303-310.

## Antioxidant activity of carboxymethyl chitosan oligosaccharide

SUN Tao, YIN Xu-hong, YAO Qian, ZHOU Dong-xiang, SHAO Ze-huai

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

Received: Feb. 28, 2009

**Key words:** chitosan oligosaccharide; carboxymethyl chitosan oligosaccharide; substituting degree; antioxidant activity; reducing power

**Abstract:** O-carboxymethyl chitosan oligosaccharide (O-CMCOS) and N-carboxymethyl chitosan oligosaccharide (N-CMCOS) with the same substituting degree (0.54) of carboxymethyl group were prepared by the etherification of chitosan oligosaccharide (COS), with their structures characterized by FTIR spectra. The orders of COS, O-CMCOS and N-CMCOS scavenging effect on superoxide anion and reducing power were O-CMCOS > COS > N-CMCOS.

(本文编辑: 康亦兼)