

壳聚糖硫酸酯金属配合物的抗氧化活性

刘松^{1,2}, 邢荣娥¹, 蔡圣宝^{1,2}, 于华华¹, 李鹏程¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以吩嗪硫酸甲酯-NADH为超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)产生、检测体系和EDTANa₂-Fe(II)-H₂O₂为羟自由基(\cdot OH)产生、检测体系,对壳聚糖硫酸酯铜、锌配合物和不同分子质量壳聚糖进行了抗 $O_2^{\cdot-}$ 和 \cdot OH自由基的活性研究。结果表明,壳聚糖硫酸酯金属配合物对于 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的清除能力明显高于壳聚糖,在质量浓度为0.025 g/L时,壳聚糖硫酸酯铜配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的清除能力达到94.18%,壳聚糖硫酸酯锌配合物达到93.19%;壳聚糖硫酸酯铜、锌配合物对 \cdot OH自由基的清除能力(67.39%、60.46%)低于相同分子质量的壳聚糖(88.06%),而高于高分子质量壳聚糖761 ku(18.71%);壳聚糖分子质量大小对 $O_2^{\cdot-}$ 和 \cdot OH自由基的清除能力有较大影响,质量浓度为1.6 g/L壳聚糖分子质量为20 ku时,对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率达54.69%,而分子质量在761 ku时,对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率仅为35.50%;各样品对 $O_2^{\cdot-}$ 和 \cdot OH自由基的清除能力均随着质量浓度的增加而上升,壳聚糖硫酸酯铜、锌配合物在相当低的浓度下(0.025 g/L)就可以达到明显清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的效果($\geq 90\%$)。

关键词:壳聚糖;壳聚糖硫酸酯金属配合物;超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$);羟自由基(\cdot OH);抗氧化活性
中图分类号:Q539 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2009)11-0011-04

自由基是含有未成对或奇数电子的化学物质,到目前为止,生物体中最普遍的自由基来源是氧^[1]。氧自由基主要包括超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)或其质子化产物氢过氧自由基(HO_2^{\cdot})、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(\cdot OH)等^[2]。其中,超氧阴离子自由基产生最早,羟自由基的作用最强^[3]。氧自由基对机体具有巨大的损伤作用,如会引起蛋白质损伤、酶失活、膜质过氧化,导致衰老、肿瘤、动脉粥样硬化等许多疾病的发生^[4]。研究对自由基的清除已成为当今生物、医学、化学、药剂学等领域的重要课题。因此筛选对人体安全、高效的活性氧清除剂具有重要的意义。

海洋生物活性多糖具有较高抗氧化能力,如鼠尾藻多糖能有效地清除活性氧自由基⁵;浒苔多糖能提高超氧化物歧化酶(SOD)活力及降低血清过氧化物脂质(LPO)的含量^[6]。低分子质量琼胶有较好的清除羟自由基的能力^[7]。壳聚糖(CTS)是一种来源于甲壳类动物(蟹虾)的外壳及节肢类动物(蟑螂等)骨骼的天然碱性高分子多糖,对人体无毒、可生物降解。但高分子质量CTS分子结构紧密,抗氧化作用不很明显^[8];低聚壳聚糖人体易于吸收,具有活化淋巴细胞、增强机体免疫力、抗菌抑菌、抑制肿瘤细胞的生长等生理活性^[9],抗氧化活性优于高分子量CTS^[8];不同脱乙酰度、不同分子质量的壳聚糖对超氧阴离子自由基和亚油酸脂类自由基具有明显的抑制作用^[10]。

壳聚糖的硫酸酯化衍生物由于具有与肝素类似的结构和强聚阴离子性质,在抗凝^[11]、抗栓^[12]和抗病毒^[13]方面的研究均有报道,壳聚糖硫酸酯衍生物

对 $O_2^{\cdot-}$ 有明显的抗氧化活性^[14],但还未见有关壳聚糖硫酸酯金属配合物清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 \cdot OH自由基的报道。作者采用微波法制备了低分子质量的壳聚糖硫酸酯Cu²⁺、Zn²⁺配合物(LCTSS-Cu、LCTSS-Zn)。考察了壳聚糖硫酸酯金属配合物对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基(\cdot OH)的清除作用,为壳聚糖及其硫酸酯金属配合物的进一步开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖(CTS,青岛百成海洋生物资源有限公司产品),DD=84.1%,MW=7.61×10⁶,食用级。还原型辅酶I烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),硝基四氢唑蓝(NBT),吩嗪硫酸甲酯(PMS)均为sigma产品,藩红花为生物染色剂,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 低分子质量壳聚糖的制备

采用微波降解法^[15]自制了低分子质量样品LCTS,由黏度法测得其分子量为20 ku。

1.2.2 壳聚糖硫酸酯Cu²⁺、Zn²⁺配合物的制备

以低分子质量壳聚糖(20 ku)为原料,按照文献

收稿日期:2008-10-14;修回日期:2008-12-05

基金项目:国家863计划重点项目(2007AA091601);中国科学院知识创新工程项目(KZX-2-YW-209)

作者简介:刘松(1973-),男,四川南充人,博士,副研究员,主要从事海洋生物活性物质研究,E-mail:liusong2000@sina.com;李鹏程,通信作者,研究员,E-mail:pcli@ms.qdio.ac.cn

[16]方法制备壳聚糖铜、锌配合物(LCTS-Cu、LCTS-Zn)。取250 mL烧杯为微波反应容器,准确称取一定量LCTS-Cu、LCTS-Zn配合物,在冰水浴中搅拌下加入DMF-SO₃磺化试剂50~100 mL,放置于微波炉中,在一定微波辐射功率下反应3~6 min,取出后迅速加入3~5倍量的95%乙醇溶液,低温放置2 h,形成白色沉淀真空过滤,75%乙醇溶液洗涤数次,最后用无水乙醇洗涤2次,加入一定量的去离子水溶解,加1 mol/L NaOH溶液调样品液pH至7~8,将样品液转入透析袋(截流分子质量=3 500)内,蒸馏水透析3~4 d。采用旋转蒸发浓缩透析液至10~20 mL,冷冻干燥后,干燥器保存备用。用BaCl₂-明胶法测定硫酸根含量(硫酸根占葡萄糖残基的比例)分别为36.9%(LCTSS-Cu)和38.1%(LCTSS-Zn)。

1.2.3 壳聚糖及其硫酸酯金属配合物对超氧自由基的清除作用^[17]

采用还原型辅酶I-吩嗪硫酸甲酯-氯化硝基四氮唑蓝体系(NADH-PMS-NBT)产生阴离子自由基(O₂⁻)。反应体系为3.0 mL的Tris-HCl缓冲液(16 mmol/L, pH8.0),其中含有78 μmol/L还原性辅酶I(NADH)、50 μmol/L硝基四氮唑蓝(NBT)、10 μmol/L吩嗪硫酸甲酯(PMS)以及不同浓度的样品溶液(0.025~1.6 g/L)。超氧阴离子自由基和NBT的显色反应采用分光光度法在560 nm波长下测定反应液的吸光度(A)。空白用Tris-HCl缓冲液替换NADH,对照用Tris-HCl缓冲液代替样品液。按以下公式计算清除率(E):

$$E(\%) = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100 \quad (1)$$

式中,A₁为对照试验吸光度;A₂为样品吸光度。

1.2.4 壳聚糖及其硫酸酯金属配合物对羟自由基(·OH)的清除作用

根据Fenton反应原理,H₂O₂在Fe²⁺存在的情况下生成·OH,·OH可使番红花T褪色,在520 nm可测出·OH的生成情况,进而检测出样品对·OH的清除活性。参考文献[18]的方法,略做修改。反应终体积4.5 mL,其中含150 mmol/L磷酸钠盐缓冲液(pH7.4)1 mL、1.0 mmol/L的番红花T1 mL、2 mmol/LEDTANa₂·Fe²⁺0.5 mL(新鲜配制)、不同浓度的样品液1.0 mL,ω=0.3H₂O₂1 mL(新鲜配制),于试管中混匀,37℃水浴中反应30 min后,测定样品在520 nm处的吸光度(A),空白组以1.0 mL蒸馏水替代供试样品,对照组以1.5 mL蒸馏水替代供试样品和EDTANa₂·Fe²⁺。按以下公式计算清除率(E):

$$E(\%) = (A_2 - A_3) / A_1 \times 100 \quad (2)$$

式中,A₁为对照试验吸光度;A₂为样品吸光度;A₃为

样品空白吸光度。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖及其硫酸酯金属配合物对O₂⁻的清除活性

未降解的壳聚糖(CTS)、低分子质量壳聚糖LCTS、壳聚糖硫酸酯LCTSS和壳聚糖硫酸酯铜、锌配合物(LCTSS-Cu、LCTSS-Zn)对O₂⁻的清除率结果如图1所示。由图可见CTS和LCTS对O₂⁻的清除率很低,LCTSS对O₂⁻则具有明显的清除活性,在质量浓度为0.2 g/L时清除率可达91.96%。而LCTSS-Cu和LCTSS-Zn在相当低的质量浓度(0.025 g/L)时,对O₂⁻的清除率就已经达90%以上。

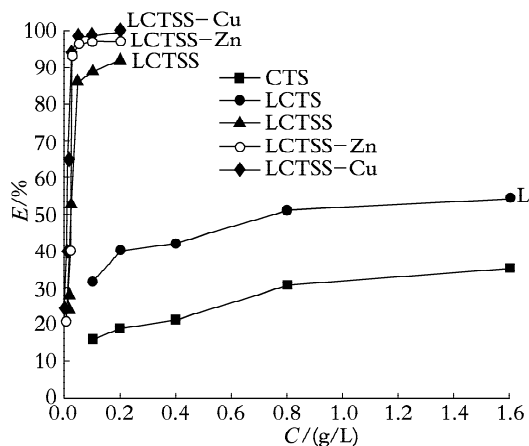


图1 壳聚糖硫酸酯金属配合物(LCTSS-Cu、LCTSS-Zn)及壳聚糖硫酸酯(LCTSS)与不同分子质量壳聚糖(CTS、LCTS)对O₂⁻的清除作用比较

Fig.1 Scavenging effect of the complexes of sulfation chitosan with metalion and sulfated chitosans with different molecular weights on superoxide radical

由图1还可看出,随着样品质量浓度增大,它们对O₂⁻的清除作用加强。尤其是壳聚糖硫酸酯金属配合物LCTSS-Cu和LCTSS-Zn在很小的浓度变化范围内(0.005~0.025 g/L)对O₂⁻的清除作用发生剧变,0.025 g/L时对O₂⁻的清除率已达到90%以上。由图可查出LCTSS-Cu和LCTSS-Zn清除O₂⁻的IC₅₀(清除率达到50%时的浓度)为0.009、0.017 g/L,为已经报道^[19]的盐藻聚糖硫酸酯IC₅₀的几分之一。这说明壳聚糖硫酸酯金属配合物是一种活性极强的O₂⁻的清除剂。

实验表明,硫酸基是影响配合物清除O₂⁻活性的重要因素,而金属离子的加入,使配合物抑制作用显著增强。在低浓度时,壳聚糖硫酸酯金属配合物与壳聚糖硫酸酯的对O₂⁻作用差别明显,但随着浓度的提高,抑制活性很快达到饱和,清除率达90%以

上。两种金属离子比较,铜配合物的活性略高于锌配合物,表明 Cu^{2+} 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑制活性强于 Zn^{2+} , Cu^{2+} 是影响配合物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性的重要因素之一。

壳聚糖分子中存在还原端羰基和伯、仲—OH、— NH_2 , 可与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 发生反应,清除掉 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。壳聚糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除效果随着分子质量降低而增强,这与其他生理活性(如抗菌抑菌、吸湿保湿等)^[20] 有相似的规律。这可能是高分子量壳聚糖由于氢键作用,结构紧密,使得壳聚糖分子中活性官能团与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用机率降低;而壳聚糖降解后其活性官能团暴露,易与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 充分作用。这一解释同样适用于对羟自由基的清除作用。

2.2 壳聚糖及其硫酸酯金属配合物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性

各样品对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除活性见图 2。由图 2 可以看出,壳聚糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力随着分子质量降低而增强。在质量浓度为 3.2 g/L 时未降解的壳聚糖(CTS)对羟自由基清除率仅为 18.06%,而低分子量壳聚糖(LCTS)对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率高达 88.02%。壳聚糖硫酸酯铜、锌配合物对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力高于壳聚糖硫酸酯和高分子量的壳聚糖,但低于低分子质量的壳聚糖,这说明硫酸基本身对于清除 $\cdot\text{OH}$ 作用不大,但与金属离子结合后,其活性有明显增强。从图 2 还显示出 LCTSS-CuS 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力强于 LCTSS-Zn,说明 Cu^{2+} 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用强于 Zn^{2+} 。

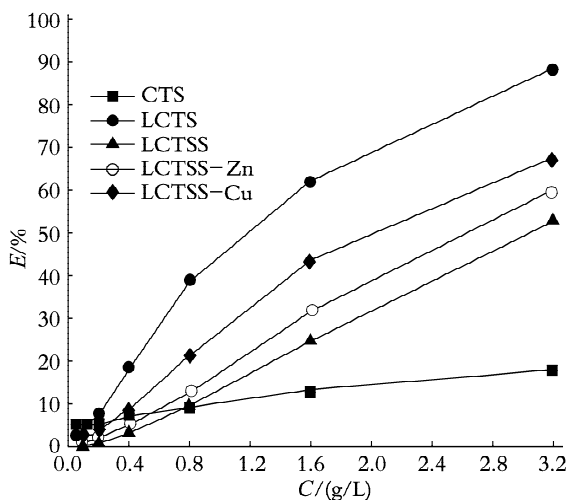


图 2 壳聚糖硫酸酯金属配合物(LCTSS-Cu, LCTSS-Zn)及壳聚糖硫酸酯(LCTSS)与不同分子量壳聚糖(CTS, LCTS)对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用比较

Fig. 2 Scavenging effect of the complexes of sulfation chitosan with metalion and Sulfated chitosans with different molecular weights on hydroxyl radical

图 2 还说明各样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力随着浓度增大而增强。LCTS、LCTSS-Cu 和 LCTSS-Zn 的 IC_{50} 分别为 1.22、2.05 和 2.61 g/L,其作用比常用的羟自由基抑制剂甘露醇(IC_{50} 为 4.0 g/L)^[21] 为强。

多糖及其降解产物中存在大量含有活泼氢的羟基,而羟自由基可与多糖中的活泼氢原子形成相当稳定的大分子自由基。壳聚糖中还有大量活泼氨基的存在, NH_2 先与溶液中的氢作用形成氨正离子 NH_3^+ , 然后再与羟自由基作用形成稳定物质^[22]。壳聚糖硫酸酯铜、锌配合物由于其 C_2 位氨基和 C_3 位羟基均参与了配位反应, C_6 位羟基参与了酯化反应,使得壳聚糖配合物中羟基和氨基含量大大减少,因此对 $\cdot\text{OH}$ 抑制作用降低。

参考文献:

- [1] Wickens A P. Ageing and the free radical theory [J]. *Respiration Physiology*, 2001, 128: 379-391.
- [2] 孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999. 66.
- [3] 李平, 王艳辉, 马润宇. 山茱萸多糖 PFCAⅢ 抗氧化性能研究[J]. 北京化工大学学报, 2003, 30(3): 35-38.
- [4] 赵文恩, 韩雅珊, 苏震, 等. 类胡萝卜素对 H_2O_2 -NaOCl 体系生成的 $^1\text{O}_2$ 的猝灭作用[J]. 生物物理学报, 1997, 13(1): 137-142.
- [5] 张尔贤, 俞君丽, 肖湘. 鼠尾藻多糖清除氧自由基作用的研究: I. 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 $\cdot\text{OH}$ 抑制活性的评价[J]. 中国海洋药物, 1995, 14(1): 1-4.
- [6] 周惠萍, 蒋巡天, 浒苔多糖的降血脂及其对 SOD 活力和 LPO 含量的影响[J]. 生物化学杂志, 1995, 11(2): 161-165.
- [7] 吴立根, 王岸娜, 毛文君. 低分子量琼胶的抗氧化活性研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(5): 93-96.
- [8] 尹学琼, 林强, 张岐, 等. 低聚壳聚糖及其金属配合物的抗 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性研究[J]. 应用化学, 2002, 19(4): 325-328.
- [9] 柴海平, 张文清, 金鑫荣. 低聚壳聚糖功能性质及应用[J]. 大学化学, 1999, 4: 36-38.
- [10] 蒋焯, 薛培华, 陈士明, 等. 壳聚糖对超氧阴离子自由基和亚油酸脂类自由基的抑制作用[J]. 科学通报, 2002, 47(3): 182-184.
- [11] Hagiwara K, Kuribayashi Y, Lwai H, et al. A sulfated chitin inhibits hemagglutination by Theileria sergenti merozoites [J]. *Carbohydr Polym*, 1999, 39(3): 245-248.
- [12] Amiji M M. Platelet adhesion and activation on an amphoteric chitosan derivative bearing sulfonate groups Colloids Surf B [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1998, 10: 263-271.
- [13] Nishimura S I, Kai H, Shinada K, et al. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 306: 427-433.
- [14] Rong-e Xing, Song Liu, Huahua Yu, et al. Prepara-

- tion of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro [J]. *CarbohydrPolym*, 2005, 61: 148-154.
- [15] 刘松, 邢荣娥, 于华华, 等. 微波辐射对不同介质相壳聚糖的降解研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(10): 30-33.
- [16] 刘松, 邢荣娥, 于华华, 等. 壳聚糖/羧甲基壳聚糖金属配合物对氧自由基的清除作用研究[J]. *功能高分子学报*, 2004, 17(4): 645-648.
- [17] Liu F, Ooi V E C, Chang S T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts [J]. *Life Sciences*, 1997, 60(10): 763-771.
- [18] 吴慧平, 孔令东, 吴美娟, 等. 当归不同炮制品清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(10): 599-601.
- [19] 薛长湖, 陈磊, 李兆杰, 等. 岩藻聚糖硫酸酯体外抗氧化特性的研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(4): 583-588.
- [20] 杨冬芝, 刘小非, 李治, 等. 壳聚糖抗菌活性的影响因素[J]. *应用化学*, 2000, 17(6): 598-602.
- [21] Ponti V, Dianzani M V, Cheeseman K J, *et al.* Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phernasine mehtosulate [J]. *Chem Biol Interact*, 1978, 23: 281-291.
- [22] Xie W M, Xu P X, Liu Q, *et al.* Graft-copolymerization of methylacrylic acid onto hydroxypropyl chitosan [J]. *Polymer Bulletin*, 2002, 49: 47-54.

Antioxidant activity of the complexes of sulfation chitosan with metalion

LIU Song^{1,2}, XING Rong-e¹, CAI Sheng-bao^{1,2}, YU Hua-hua¹, LI Peng-cheng¹

(1. Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Oct. , 14, 2008

Key words: chitosan; the complexes of sulfation chitosan with metalion; superoxide radical; hydroxyl radical; antioxidant activity

Abstract: The $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ scavenging activities of the complexes of sulfation chitosan with copper(II) or zinc(II) and DMW chitosan were investigated. Colorimetric method was used, where phenzine methosulphate (PMS)/dinucleotide-reduced (NADH) and Fe/ H_2O_2 were used as producing reagents and Nitro blue tetrazolium (NBT) and Fanhonghua as detecting reagents for $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$. As expected, we obtained several satisfying results, as follow:

Firstly, compared with DMW chitosan, the complexes of sulfation chitosan with copper(II) or zinc(II) had the stronger inhibition effect on $O_2^{\cdot-}$. For example, when mass concentration of samples was 0.025 g/L, the $O_2^{\cdot-}$ scavenging activity of the complexes of sulfation chitosan with copper(II) and the complexes of sulfation chitosan with zinc(II) were 94.18% and 93.19% respectively. Secondly, scavenging activity of the complexes of sulfation chitosan with copper(II) or zinc(II) (67.39%, 60.46%, 3.2 g/L) on $\cdot OH$ was between low molecular weight chitosan (20 ku, 88.06%, 3.2 g/L) and high molecular weight chitosan (761 ku, 18.71%, 3.2 g/L). Thirdly, low molecular weight chitosan had stronger scavenging effect on $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ than high molecular weight chitosan. At 1.6 g/L, the scavenging activity of low molecular weight chitosan (20 ku) on $O_2^{\cdot-}$ reached 54.69%, while that of high molecular weight chitosan (761 ku) was 35.50%. Finally, the scavenging activity of several samples increased with increase in their mass concentration. However, the complexes of sulfation chitosan with copper(II) or zinc(II) had a quite strong scavenging action to $O_2^{\cdot-}$, their scavenging activity barely had obvious changing over 0.025 g/L. This result also showed that the complexes of sulfation chitosan with metalion were very effective antioxidant.

(本文编辑:张培新)