

丁二酰化壳寡糖稀土配合物的抗氧化活性测定

李小芳¹, 冯小强¹, 孙长金¹, 杨 声²

(1. 天水师范学院 化学工程与技术学院, 甘肃 天水 741001; 2. 定西师范高等专科学校 化学系, 甘肃 定西 743000)

摘要: 合成了丁二酰化壳寡糖稀土(La, Nd, Eu)配合物, 并考察其稀土配合物对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除活性及其还原能力。实验表明: 对超氧阴离子自由基的清除能力以及还原能力依次为: 稀土配合物>丁二酰化壳寡糖>壳寡糖。在低浓度下对羟基自由基清除能力顺序为: 丁二酰化壳寡糖>稀土配合物>壳寡糖, 高浓度下丁二酰化壳寡糖和壳寡糖对羟基自由基清除能力急剧下降, 而稀土配合物的清除能力稳定。这可能是由于稀土配合物的稀土离子含量及稀土离子性质、分子电荷密度以及对自由基清除机理不同所致。

关键词: 丁二酰化壳寡糖; 稀土; 抗氧化活性

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)08-0047-04

doi: 10.11759/hyxx20141214001

人体的衰老与病变很大程度上是由于机体内自由基产生失衡, 导致机体产生过多的活性自由基。现代科学表明, 生物相溶性及清除自由基效率是衡量抗氧化剂对机体抗氧化性能的重要指标。天然抗氧化剂因抗氧化效率高、生物相溶性良好、热稳定性好、对机体无毒副作用等特点成为研究的热点。壳寡糖(简写 COS)是壳聚糖降解以后聚合度小于 20 的产物, 是有 2~20 个含氨基的葡萄糖通过 β -1, 4-糖苷键连接而成的碱性低聚糖, 其分子质量低, 水溶性好, 理化性质均得以改善。COS 由于主链上的 β -(1, 4)糖苷键发生断裂, 更多的活性羟基和氨基基团暴露出来, 因而具有良好的抗氧化能力。近年来, 低聚壳聚糖及其衍生物的抗氧化性日益受到关注。研究表明, 低聚壳聚糖羧甲基衍生物^[1], 酰化衍生物^[2-4]、季铵盐衍生物^[5]和硫酸酯金属配合物^[6]都有明显的抗氧化活性。但是对低聚壳聚糖酰化衍生物稀土配合物的抗氧化活性尚未有研究报道。课题组在前期工作中, 运用紫外和荧光光谱研究丁二酰化壳寡糖稀土配合物与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 发现配合物能够与 BSA 形成复合物, 从而猝灭 BSA 内源荧光, 该猝灭机制属于静态猝灭^[7-8]。同时, 还采用光谱和循环伏安法, 研究了丁二酰化壳寡糖稀土配合物与鲑鱼精 DNA 之间的作用方式, 结果发现配合物都能通过插入方式与 DNA 相互作用, 导致 DNA 分子的构象变化, 可有望成为一种新型抗癌药物^[9]。本实验通过对壳寡糖进行酰化, 依次和不同稀土离子进

行配位, 制得丁二酰化壳寡糖(简写 BCS)以及稀土配合物, 通过从清除羟自由基、超氧阴离子自由基和总还原能力三方面分别测定了、丁二酰化壳寡糖及其稀土配合物的抗氧化活性, 期望进一步寻找出更加丰富的生物功能特性, 从而拓宽壳寡糖应用范围。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

壳寡糖(济南海得贝海洋生物工程有限公司), 分子质量 5 000; 丁二酸酐(国药集团试剂有限公司); 抗氧化测试所需溶液由二次蒸馏水配制。721 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 丁二酰化壳寡糖及稀土配合物的制备

根据前期已报道的具体制备方法^[8]: 称取 3.0 g COS 溶于 75 mL 质量分数是 1.0 %的乙酸溶液, 搅拌下加 21 mL 吡啶; 称取 2.5 g 丁二酸酐, 溶于 220 mL 乙醇, 缓慢滴加到上述溶液中, 室温下反应 5 h。反应液中加入 3 倍体积的无水乙醇, 即刻有大量沉淀析出。抽滤, 用无水乙醇洗涤多次, 干燥得丁二酰化

收稿日期: 2014-12-14; 修回日期: 2015-02-03

基金项目: 天水师范学院“青蓝”人才工程和青年教师科研资助项目(TSA1305、TSA1307)

作者简介: 李小芳(1983-), 女, 实验师, 硕士, 主要从事多元有机稀土配位研究, 电话: 18719501004, E-mail: ts1xfxq@163.com; 冯小强, 通信作者, 电话: 15337018100; E-mail: fengxiaoqiang1979@163.com

壳寡糖, 记作 BCS。

称取 0.5 g BCS 溶于适量蒸馏水中, 搅拌下逐滴加入稀土氯化物的水溶液, 室温下搅拌 3 h, 调节 pH 至中性, 继续反应 3 h。反应结束后加入 3 倍体积的丙酮, 立即析出沉淀。抽滤, 用丙酮洗涤多次直至滤液中无 Cl^- , 干燥得丁二酰化壳寡糖-镱、丁二酰化壳寡糖-铈和丁二酰化壳寡糖-镧配合物, 分别记作 BCS-Eu、BCS-Nd、BCS-La。分别用 1.0%(V/V) 的乙酸配置成 0.5 g/L、1.5 g/L、2.5 g/L 的溶液备用。

1.3 抗氧化活性实验

以质量分数是 1.0% 的乙酸溶液和维生素 C 分别为空白对照和阳性对照, COS、BCS 及配合物 BCS-Eu、BCS-Nd、BCS-La 对 $\text{OH}\cdot$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用以及还原能力的具体实验过程, 根据已报道文献[10]的经典实验过程操作, 每组样品进行 3 次平行实验, 结果为平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除

$\cdot\text{OH}$ 是机体中产生最多的含氧自由基, 对组织细胞的破坏作用最大, 它可以加成于碱基双键中造成碱基破坏, 从而产生结构突变。COS 通过酰化及酰化后再与稀土金属离子的配位作用, 从而引入了吸电子能力强的基团, 减低了分子的氢键作用, 使分子中的活性基团羟基和氨基大量暴露。分子中羟基上的氢与羟自由基反应, 而活性氨基则通过与溶液中的氢离子结合成氨基正离子再与羟自由基形成稳定结构, 从而达到清除羟自由基的作用。

当样品的质量浓度均为 1.0 g/L 时, 维生素 C 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的最大清除率为 84.2%, 而 COS、BCS、BCS-La、BCS-Nd 和 BCS-Eu 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的最大清除作用分别为 27.5%、38.2%、27.3%、30% 和 28.2%, 说明 COS、BCS 及稀土离子配合物对羟自由基均具有不同程度的清除效果, 总体上 BCS 及稀土离子配合物的清除效果强于 COS 本身(图 1), 这可能是由于在 BCS 中部分氨基被取代, 尽管氨基数目在减少, 但作为吸电子基团的 $-\text{COCH}_2=\text{CH}_2\text{COO}-$ 所起的作用占主导地位: 一方面, 它能降低 COS 分子中电子云密度, 从而降低了分子内、分子间的成键几率, 释放出更多的氨基和羟基与自由基反应; 同时, 也会使 O-H 和 N-H 键更易断裂, 使氨基和羟基的活性提高, 有利于清除自由基^[2]。这一解释同样适

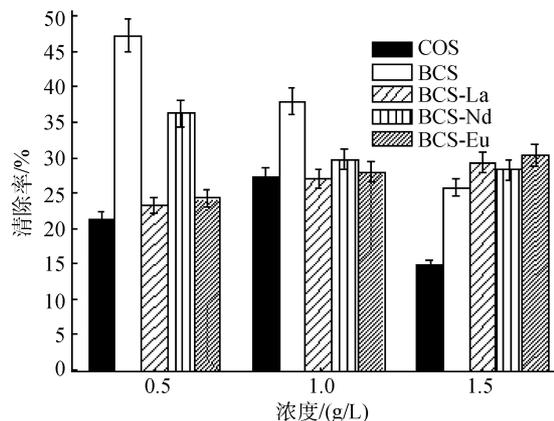


图 1 COS、BCS 及稀土离子配合物清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力
Fig.1 Scavenging hydroxyl radical capacity of COS, BCS and complexes

合样品清除超氧阴离子自由基的情况。同时还发现, 随着 BCS 质量浓度的增大, 清除率逐渐降低, 可能是因为浓度过大, 分子容易扭曲团聚, 这样暴露在外部的活性基团数量减少所致。

但是, BCS 与稀土离子配位形成配合物后, 发现对羟自由基清除能力较 BCS 减弱。在低浓度时, 稀土配合物与 BCS 对羟自由基清除能力差别明显, 但随着浓度的提高, 抑制活性很快达到饱和, 稀土配合物对羟自由基清除能力反而较 BCS 增强。并且 BCS-Eu、BCS-La 随着样品质量浓度的增大, 对羟自由基清除率逐渐提高, 而 BCS-Nd、BCS 在质量浓度达到 0.5 g/L 时清除率达到最高值为 37%、47%, 此后随浓度增大清除率呈下降趋势。相比之下用不同的稀土离子作配位中心对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用依次是 $\text{BCS} > \text{BCS-Nd} > \text{BCS-Eu} > \text{BCS-La} > \text{COS}$ 。当浓度均为 0.5 g/L 时, 不同稀土离子配合物清除 $\cdot\text{OH}$ 能力存在明显差异, BCS 对羟自由基的清除作用最强可达 47%。随着浓度的增加当浓度达到 1.5 g/L 时 BCS-La、BCS-Nd、BCS-Eu、BCS 对羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率相差不大可能是浓度过大时分子间的氢键作用增强影响了抗氧化效果。

2.2 对超氧阴离子自由基的清除

本实验采用邻苯三酚自氧化法产生超氧阴离子自由基, 用分光光度计测定各试样在不同浓度下对超氧阴离子自由的歧化活性的吸光度值, 计算其清除率。

当样品的质量浓度均为 1.0 g/L 时, 维生素 C 对超氧阴离子自由基的最大清除率为 56.8%, 而 COS、

BCS、BCS-Nd、BCS-Eu 和 BCS-La 的最大清除作用分别为 15 %、17 %、19 %、21 % 和 20.8 %，说明 COS、BCS 及稀土离子配合物对超氧阴离子自由基均具有不同程度的清除效果，总体上 BCS 及稀土配合物的清除效果强于 COS 本身，在不同浓度下稀土配合物对超氧阴离子自由基清除效果普遍强于 BCS(图 2)，这可能是由于 BCS 与稀土离子配位后，分子上电荷密度增大，更加有利于与超氧阴离子自由基作用。当样品的质量浓度均为 1.5 g/L 时，对超氧阴离子自由基的清除作用依次为 BCS-La>BCS-Eu>BCS-Nd>BCS>COS。其中 BCS-Nd、BCS-Eu 在试样质量浓度 0.5 g/L 时清除作用最强，清除率分别为 22.5 %、26.5 %，此后浓度与清除率呈负相关趋势。而对于 COS、BCS 和 BCS-La，浓度与清除率趋于正相关。据图 2 所示，酰化壳寡糖及酰化壳寡糖稀土配合物对清除超氧阴离子自由基能力较 COS 显著提升。

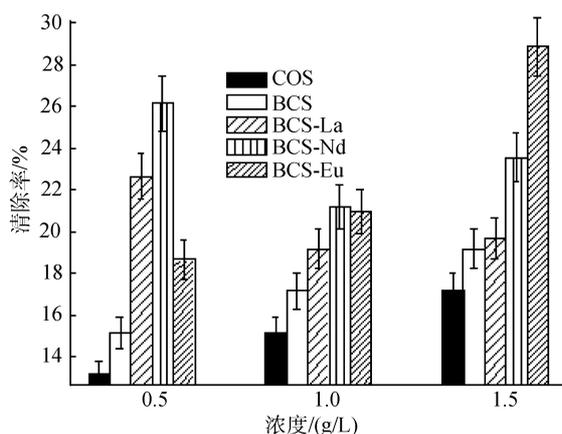


图 2 COS、BCS 及稀土离子配合物对 $\cdot O_2^-$ 的清除
Fig.2 Scavenging superoxide anion radical capacity of COS, BCS and complexes

2.3 还原能力测定

还原能力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标，研究表明抗氧化活性和还原能力之间存在着密切的关系。实验采用铁氰化钾法测定试样在 700 nm 的吸光度，来间接反映还原能力的强弱。一般吸光度值越大，则还原能力越强。如图 3 所示，BCS、BCS-La、BCS-Nd、BCS-Eu 的还原能力均比 COS 略有增强，但不同稀土配合物间的还原能力相差不大，可能是所选配位中心离子同属镧系元素，具有相似的化学性质的缘故。而且试样质量浓度在 0.5~1.5 g/L 的范围内随着浓度的增大，还原能力也随之增强。

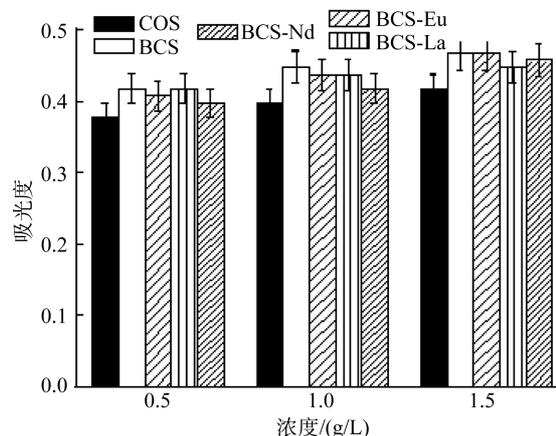


图 3 COS、BCS 及稀土离子配合物的还原能力
Fig.3 Reducing power of COS, BCS and complexes

3 结论

从清除羟自由基、清除超氧阴离子自由基和还原力三个体外抗氧化实验，可以看出 BCS、BCS-La、BCS-Nd、BCS-Eu 较 COS 均具有很好的抗氧化能力，表现出了不同程度的抗氧化能力。在 COS 分子链上引入吸电子基团 $-COCH_2=CH_2COO-$ 后，降低 COS 分子中电子云密度，从而降低了分子内、分子间的成键几率，释放出更多的氨基和羟基与自由基反应，所以 BCS 的抗氧化活性较 COS 增强。稀土配合物中，由于不同种类稀土离子的引入，分子中电子云密度增大，更加有利于进攻自由基，故而抗氧化活性较 BCS 增强。

参考文献:

- [1] 孙涛, 银旭红, 姚倩, 等. 低聚羧甲基壳聚糖的抗氧化性能[J]. 海洋科学, 2010, 34(2): 54-56.
- [2] 孙涛, 银旭红, 甘建红, 等. 不同取代度 N-马来酰低聚壳聚糖的抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22: 890-893.
- [3] 李铭, 熊小燕, 谢晶, 等. N-琥珀酰低聚壳聚糖的抗氧化性能研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26: 1680-1684.
- [4] 孙涛, 银旭红, 谢晶, 等. 不同取代度 N-邻苯二甲酰壳聚糖抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23: 713-716.
- [5] Guo Z Y, Xing R G, Liu S, et al. Synthesis and hydroxyl radicals scavenging activity of quaternized carboxymethyl chitosan[J]. Carbohydr Polym, 2008, 73: 173-177.

- [6] 刘松, 邢荣娥, 蔡圣宝, 等. 壳聚糖硫酸酯金属配合物的抗氧化活性[J]. 海洋科学, 2009, 33(11): 11-14.
- [7] 李小芳, 冯小强, 杨声, 等. 丁二酰化壳寡糖镧配合物的合成及与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱实验室, 2013, 30(3): 1211-1215.
- [8] 李小芳, 冯小强, 杨声, 等. 丁二酰化壳寡糖铈配合物的合成及与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 发光学报, 2012, 33(8): 905-910.
- [9] 李小芳, 冯小强, 杨声, 等. 丁二酰化壳寡糖稀土配合物与鲱鱼精 DNA 相互作用的电化学及光谱学研究[J]. 发光学报, 2013, 34(12): 1662-1666.
- [10] 李小芳, 冯小强, 杨声, 等. 硫脲壳聚糖金属配合物的抗氧化活性研究, 天然产物研究与开发[J]. 2012, 24: 1813-1815.

Antioxidant activity of succinic-oligochitosan rare earth complexes

LI Xiao-fang¹, FENG Xiao-qiang¹, SUN Chang-jin¹, YANG Sheng²

(1. Chemistry engineering and technology College of Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China;
2. Ding Xi Teachers' College, Dingxi 743000, China)

Received: Dec., 14, 2014

Key words: Succinic-oligochitosan; rare earth; antioxidant activity

Abstract: Succinic-oligochitosan rare earth (La (III), Nd (III), and Eu (III)) complexes were synthesized and characterized. Their antioxidant activities were evaluated by scavenging of superoxide radicals, and hydroxyl radicals and determination of reducing power. The results indicated that all the samples showed obvious antioxidant activity, the order of their scavenging effect on superoxide radicals and reducing power was complex>succinic-oligochitosan>oligochitosan; the order of their scavenging effect on hydroxyl radicals was succinic-oligochitosan>complex>oligochitosan at lower concentration. However, the scavenging effect of succinic-oligochitosan and oligochitosan was weakened sharply, and the scavenging effect of complex was stable at lower concentration. The results may be related to the content and properties of rare earth ion, molecular charge density and the different scavenging mechanisms against free radicals.

(本文编辑: 康亦兼)