

# 水溶性壳聚糖的制备及其对超氧阴离子清除活性的研究\*\*

尹学琼 林 强 张 岐 冯玉红 杨丽春

(海南大学理工学院化工系 海口 570228)

**摘 要** 提出了一种新的壳聚糖降解法——壳聚糖金属配位控制降解法,该方法能在室温,以比直接氧化法更快的速度将壳聚糖降解为分子量分布更窄的水溶性壳聚糖。以比色法对所得水溶性壳聚糖及其  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  配合物进行了抗超氧阴离子活性研究,结果显示水溶性壳聚糖及其配合物对超氧阴离子均具有明显的清除活性。质量浓度为  $0.5 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  时,壳聚糖对超氧阴离子的清除率达 80.3%,铜配合物的清除率为 84.1%;相同条件下,高分子壳聚糖和单糖没有明显的清除作用,清除率仅为 13%、9.5%。随着样品质量浓度降低,水溶性壳聚糖及其金属配合物对的清除活性逐渐下降。

**关键词** 水溶性壳聚糖 制备 壳聚糖金属配合物 超氧阴离子

## Preparation of Water-soluble Chitosan and Study of Scavenging Superoxide Anion Radical Activity of Chitosan and its Copper Complex

Yin Xueqiong, Lin Qiang, Zhang Qi, Feng Yuhong, Yang Lichun

(Department of Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228)

**Abstract** A new method that was called metal-coordination controlled degradation for chitosan depolymerization was reported here. With this method, water-soluble chitosan with narrow MW distribution could be obtained at room temperature. The scavenging superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ) activity of the obtained chitosan(LMC) and its complex with  $\text{Cu}(\text{II})$  was investigated. The results showed that when mass concentration of samples was  $0.5 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$ , the scavenging  $\text{O}_2^-$  activity of LMC and LMC- $\text{Cu}(\text{II})$  were 80.3%, and 84.1% respectively, but those of high molecular weight chitosan(820kD) and D-Glucosamine were only about 13% and 9.5%. The scavenging activity of LMC and its complex decreased with the decrease of their mass concentration.

**Key words** Water-soluble chitosan, Preparation, Complex, Superoxide anion radical, Scavenging activity

甲壳素是迄今发现的唯一天然碱性多糖物,广泛存在于甲壳纲动物的甲壳,蟑螂、蚕等昆虫的表皮和藻类、菌类的细胞壁中,其年生物产量上百亿吨,是仅次于纤维素的第二大类天然高分子多糖物。壳聚糖(CTS)是甲壳素的脱乙酰化产物,分子量小于 10000 的水溶性壳聚糖具有许多优于壳聚糖大分子的功能性质,如活化淋巴细胞、增强机体免疫力、抗菌抑菌、抑制肿瘤细胞的生长、降低血脂和胆固醇等生理活性,且不同分子量大小的壳聚糖的生理活性强弱存在一定差异,因此壳聚糖的降解成为所需分子量大小的低分子量壳聚糖是目前壳聚糖研究的热点

尹学琼 男 E-mail: xq88@21cn.com

国家自然科学基金资助项目(20061001)及海南省海南省教育厅高等学校科研基金资助项目

2002-12-26 收稿, 2003-03-29 修回

之一<sup>[1,2]</sup>。壳聚糖现有降解方法(酶解法、氧化法、酸解法、物理法)均存在各自难以克服的问题,壳聚糖分子结构中的游离-NH<sub>2</sub>、-OH 具有良好的配位能力,可与过渡及稀土金属离子进行配位反应,壳聚糖金属配合物的 X 射线衍射图与热分析结果表明,壳聚糖金属配合物存在有利于壳聚糖分子链断裂的弱势结构<sup>[3,4]</sup>。结合壳聚糖配合物的上述性质和壳聚糖降解研究进展<sup>[5,6]</sup>,本课题组首次提出壳聚糖金属配位控制降解法,即向壳聚糖的醋酸稀溶液中加入适量金属盐溶液,通过控制壳聚糖与金属离子摩尔数的比例控制配位点的个数,并使配位点在壳聚糖高分子链中均匀分布,以保证配位结点之间未配位糖苷链中糖数的均一性;采用氧化剂对配合物进行氧化降解,使壳聚糖分子在配位结点或其附近的弱势结构处断键,生成分子量大小均匀的低分子量壳聚糖。

细胞在新陈代谢过程中或受到外界危险因子(辐射、农药、食品添加剂等)作用时,会产生活性氧(O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>等),活性氧与生物酶、细胞膜中的脂肪酸以及核酸等物质作用,会导致细胞凋亡,使得人体衰老,心、肝、肺、皮肤等器官发生病变,严重的会引发癌症等恶性病症<sup>[7,8]</sup>。因此筛选对人体安全、高效的活性氧清除剂有着重要的意义,目前,超氧阴离子自由基 O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除剂主要有酶类物质、非酶类有机物及合成小分子有机金属配合物<sup>[9,10]</sup>,壳聚糖具有良好的金属配位能力,可与过渡金属离子形成配合物,且其分子结构中有大量活性基团如-OH、-NH<sub>2</sub>、-C=O,使得壳聚糖及其配合物具有较强的反应活性。因此,本文对降解所得水溶性壳聚糖及其 Cu(OAc)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 配合物的抗超氧阴离子活性进行了研究。

## 1 实验部分

### 1.1 实验药品与设备

蛋氨酸、核黄素、V<sub>E</sub>、氮蓝四唑(NBT)、D-葡萄糖胺盐酸盐(GA)均为 Sigma 产品,壳聚糖(CTS,脱乙酰度 90%,浙江丰润生物化学公司),冰乙酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Cu(OAc)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 均为国内产,分析纯。

Perkin Elmer AA-100 型原子吸收光谱仪(美国),Perkin Elmer 1000 型红外光谱仪(美国),721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂,上海),乌氏粘度计、高效液相色谱(JASCO PU-1596 高压梯度泵,RI-1530 示差检测器,Jordi Gel GBR 1000A GPC 凝胶渗透色谱分离柱,流动相:乙腈:水(65:35),流速 1.0 mL/min)、电子自旋共振波谱仪(JEOL JES-FEIXG,美国;调制频率 100 kHz,幅度  $6.3 \times 10^{-4}$  T(T 为特斯拉),291 K)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 水溶性壳聚糖及其配合物的制备 称取 0.5g 壳聚糖,加入 30mL 1% HAc 溶液,搅拌,溶解后加入 50mL 水稀释;向上述溶液加入 10mL 一定浓度的 Cu(OAc)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 溶液,室温反应一定时间,用 0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液调节 pH,使壳聚糖金属络合物析出,用蒸馏水洗涤脱除游离金属离子。以 30 mL 1% HAc +50 mL 水 溶解所得壳聚糖铜络合物,加入一定量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温搅拌,进行氧化降解,定时用乌氏粘度计测量溶液粘度,判断壳聚糖降解程度;以相同方法处理未络合的壳聚糖,并对二者降解结果进行对比。取一半降解产物,脱除壳聚糖铜络合物降解产物的金属离子,调节 pH 析出低聚壳聚糖,过滤、洗涤、干燥即得低聚壳聚糖;用水溶解所得壳聚糖,以凝胶渗透色谱(GPC)法进行分子量大小及分布情况检测。将另一半未脱除金属的降解产物用相同方法析出、处理得水溶性壳聚糖铜配合物。红外光谱、原子吸收光谱仪、电子自旋共振波谱仪分析所得水溶性壳聚糖(脱金属产物)及其金属配合物的结构组成。

1.2.2 清除  $O_2^{\cdot-}$  活性的测定 以蛋氨酸和核黄素在光照下产生  $O_2^{\cdot-}$ , NBT 与  $O_2^{\cdot-}$  作用会有明显颜色变化, 若加入的壳聚糖或其金属配合物可清除掉  $O_2^{\cdot-}$ , 颜色变化程度将减弱; 用分光光度计测定体系在 560 nm 的吸光度, 以吸光度的变化来判断抗氧化剂对  $O_2^{\cdot-}$  的清除效果。以 pH=7 的缓冲溶液配制浓度分别为  $3 \times 10^{-3}$  mol/L、 $18 \times 10^{-6}$  mol/L、 $225 \times 10^{-6}$  mol/L 的蛋氨酸、核黄素、NBT 溶液, 各取上述溶液 0.5 mL, 加入比色管, 并向比色管加入 0.5 mL 一定浓度水溶性壳聚糖或壳聚糖配合物溶液; 将比色管在日光灯下照射约 30 min, 空白样变色后, 将各样放入分光光度计, 测定各样品的吸光度。清除率按下式计算:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

其中,  $A_0$  为空白样的吸光度,  $A$  为样品的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳聚糖金属配位控制降解情况

向壳聚糖醋酸溶液加入  $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$  溶液( $Cu^{2+}$  摩尔数与壳聚糖糖元摩尔数比 1:8), 在室温络合 5h, 形成配合物后, 加入  $H_2O_2$  100 $\mu$ L 进行降解反应, 定时取样测定不同降解时间溶液的粘度, 并与不加金属盐相同条件降解结果对比, 结果如图 1。由图 1 可见, 加入  $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$  的降解体系溶液特性粘度下降速度比不加金属盐的体系明显要快, 降解 1h, 加盐体系粘度下降 86.3%, 3h 已下降 96.3%, 此后粘度变化不太明显; 而不加盐体系, 降解 1、3h, 粘度下降率分别为 10.6、18.2%, 远远低于加盐体系, 随着时间增长, 溶液粘度进一步下降。结果表明, 从壳聚糖溶液粘度变化看, 使壳聚糖形成配合物再进行氧化降解可以大大加快壳聚糖分子降解速度。

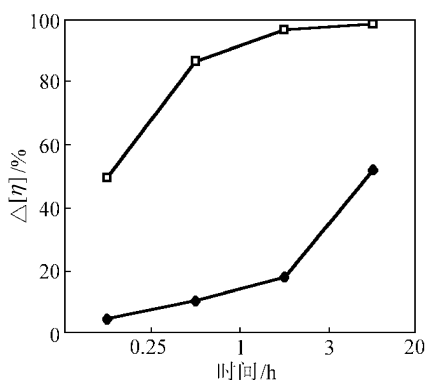


图 1 壳聚糖金属配合物控制降解情况

Fig.1 Metal-coordination controlled degradation of chitosan

◆-control ■-Cu

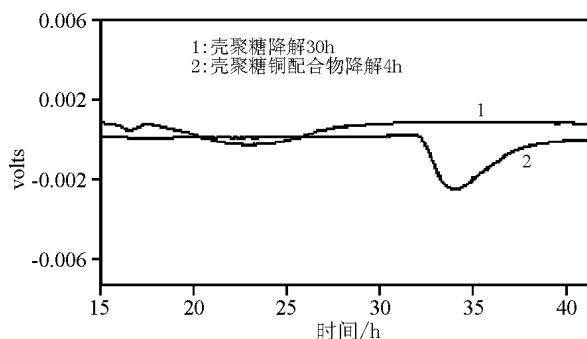


图 2 壳聚糖降解产物的分子量分布图

Fig.2 MW distribution of degraded chitosan

壳聚糖分子量对壳聚糖的各种物理化学及生物性能均有较大影响, 因此控制壳聚糖降解反应制备分子量分布窄的低分子量壳聚糖显得尤为必要。本文采用高效液相色谱—凝胶渗透色谱法(HPLC-GPC)对壳聚糖配位降解及直接降解的产物进行了分子量分布测定, 结果如图 2。由图 2 可见, 壳聚糖以金属配位降解 4h 所得产物呈现一个尖锐吸收峰; 而壳聚糖直接降解 30h 产物峰平而宽, 且保留时间比配位降解产物短。GPC 测定结果表明金属配位降解法可以在更短的时间内将壳聚糖降解为分子量分布窄的低分子量壳聚糖。

## 2.2 壳聚糖及其金属配合物的表征

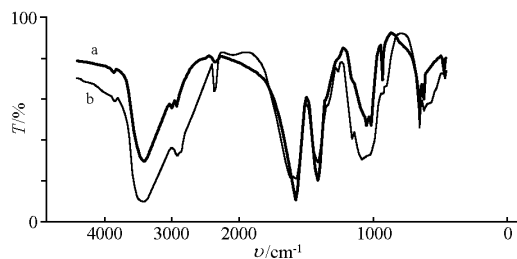


图 3 水溶性壳聚糖及其铜配合物的红外光谱图

Fig 3 IR spectrum of water-soluble chitosan and its copper complex

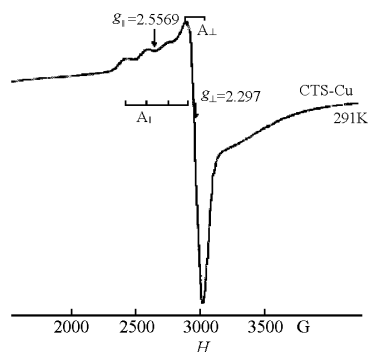


图 4 壳聚糖铜配合物的 ESR 图

Fig 4 ESR of chitosan-copper complex

图 3 是壳聚糖及其铜配合物的红外光谱图, b 为水溶性壳聚糖, a 为壳聚糖铜配合物, 由图可见, 壳聚糖中 N-H 在  $3436\text{ cm}^{-1}$  处和  $618\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰在配合物中分别移动  $7\text{ cm}^{-1}$  和  $3\text{ cm}^{-1}$ ,  $1083\text{ cm}^{-1}$  处的  $\nu_{\text{C-OH}}$  消失, 在  $1044$ 、 $1014\text{ cm}^{-1}$  出现两个峰, 证明壳聚糖金属配合物中确实存在配位键; 另外, 降解产物与壳聚糖相比, 峰形没有明显差异, 只是在  $1710\text{ cm}^{-1}$  处有一弱的吸收峰出现, 说明壳聚糖降解产物有少量羰基生成。以原子吸收分光光度计检测壳聚糖金属配合物及脱金属后壳聚糖中金属含量, Cu 含量为  $3.81\%$ , 脱除金属后金属含量为  $0$ 。GPC 测定结果显示水溶性壳聚糖的平均分子量约为  $1000$ 。本文自制壳聚糖铜配合物粉末在室温下的 ESR 谱如图 4,  $g_{||}=2.5569$ ,  $g_{\perp}=2.297$ , 分析波谱可知, 壳聚糖铜配合物属于四方棱锥的空间构型<sup>[11]</sup>。

## 2.3 壳聚糖及其铜配合物的抗超氧阴离子活性

**2.3.1 不同聚合度壳聚糖的抗超氧阴离子活性** 向超氧阴离子引发体系加入已配制好的样品溶液(质量浓度为  $0.5 \times 10^{-2}\text{ g/mL}$ ), 分光光度计测量各样品的吸光度, 计算清除率。不同聚合度壳聚糖(未降解壳聚糖(HMC)、水溶性壳聚糖(LMC)及其铜配合物(LMC-Cu)、氨基葡萄糖盐酸盐(GA))对超氧阴离子的清除活性如表 1。由表 1 可见, 未降解的壳聚糖及单糖的清除率极低, 分别仅为  $13\%$  和  $9.5\%$ , 而水溶性壳聚糖的清除率则可达  $80.3\%$ , 与壳聚糖相比, 其铜配合物具有更高的清除率, 为  $84.1\%$ 。

表 1 不同聚合度壳聚糖及壳聚糖配合物的抗超氧阴离子活性  
Tab.1  $\text{O}_2^{\cdot -}$  scavenging ability of chitosan with different MW and CTS-Cu

	control	GA*	HMC	LMC	LMC-Cu
Absorbance	0.269	0.243	0.234	0.055	0.043
$\text{O}_2^{\cdot -}$ scavenged/%		9.5	13	80.3	84.1

**2.3.2 质量浓度对壳聚糖抗超氧阴离子活性的影响** 由表 1 可见, 水溶性壳聚糖及其铜配合物在质量浓度  $0.5 \times 10^{-2}\text{ g/mL}$  时, 对超氧阴离子具有很好的清除活性, 故降低壳聚糖的质量浓度, 考察质量浓度对清除率的影响, 本文分别选择  $0.5 \times 10^{-2}$ 、 $0.4 \times 10^{-2}$ 、 $0.3 \times 10^{-2}$ 、 $0.2 \times 10^{-2}$ 、 $0.1 \times 10^{-2}$  和  $0.05 \times 10^{-2}\text{ g/mL}$  5 种浓度的样品进行考察, 结果如图 5。图 5 表明随着样品质量分数降低, 壳聚糖金属配合物 LMC-Cu(II)及配合物脱金属后所得水溶性糖对超氧阴离子的清除活性均相应降低, 但在相同浓度时, LMC-Cu(II)的清除率较脱金属产物高。

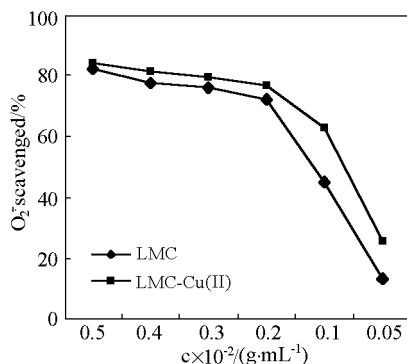


图 5 浓度对壳聚糖及其铜配合物清除率的影响

Fig.5 Plots of mass concentration of samples vs their  $O_2^{\cdot -}$  scavenged activity

壳聚糖分子中存在还原端羰基和伯、仲-OH、-NH<sub>2</sub>，可与超氧阴离子发生反应，清除掉超氧阴离子。实验结果表明，高分子量的壳聚糖及葡萄糖胺盐酸盐对超氧阴离子的清除效果较差，清除率仅约 10%，而低分子量壳聚糖对超氧阴离子则有较好的清除效果，壳聚糖的这一活性与其它生理活性(如抗菌抑菌、吸湿保湿等)有相似的规律<sup>[12]</sup>，这可能是由于高分子量壳聚糖的分子链互相缠结，且分子内存在 N<sub>2</sub>-O<sub>6</sub> 和 O<sub>3</sub>-O<sub>5</sub> 氢键，使得壳聚糖分子中活性官能团与超氧阴离子作用机会降低，从而反应活性较低；降解后聚壳聚糖活性官能团暴露，易与超氧阴离子充分作用，故对超氧阴离子的清除活性明显提高。

壳聚糖铜配合物的 ESR 谱表明壳聚糖铜配合物属于平面四方锥型构型，该结构极有利于超氧阴离子从轴向与 Cu(II)配位形成 Cu(II)-O<sub>2</sub><sup>·-</sup>中间体，并发生电子转移，Cu(II)得到一个电子被还原为 Cu(I)，O<sub>2</sub><sup>·-</sup>被氧化以 O<sub>2</sub> 的形式失放出来，达到清除超氧阴离子的目的，该作用机理与某些超氧化物歧化酶(SOD)类似<sup>[13,14]</sup>。壳聚糖与超氧阴离子作用仅仅依靠其分子结构中的 NH<sub>2</sub>、OH、还原端羰基等活性基团，而配合物还存在 Cu(II)与 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>的氧化还原反应，因此壳聚糖铜配合物较壳聚糖表现出更佳的超氧阴离子清除活性。

#### 参考文献

- [1] 顾云, 王绿娅, 张颖等. 中国海洋药物, 2000, 3: 45.
- [2] 袁向华, 蔡妙颜, 郭礼远等. 生命的化学, 2001, 21(2): 165.
- [3] K Okuyama, K Moguchi, M Kanenari et al. Carbohydrate Polymers, 2000, (41): 237~247.
- [4] 王爱勤, 张余平, 俞贤达. 化学通报, 1999, (8): 32~34.
- [5] 金鑫荣, 柴平海. 化工进展, 1998, 2: 17.
- [6] S Tanioka, Y Marsui, T Irie. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(12): 2001.
- [7] 宋俊峰, 邵勇, 过玮. 科学通报, 2000, 45(14): 1505.
- [8] 莫简. 生物化学与生物物理进展, 1981, 2: 23.
- [9] 高秀蕊, 石双群, 宁秀芹. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(1): 70.
- [10] 邵勇, 过玮, 宋俊峰. 化学学报, 2001, 59(7): 1015.
- [11] S Shulamith. Macromolecules, 1986, 19: 192.
- [12] 杨冬芝, 刘晓非, 李治等. 应用化学, 2000, 17(6): 598.
- [13] A Emanuele, M M Ligia, G Cadia et al. Bioelectrochem. Bioenergetics, 1995, 36: 165.
- [14] 史卫良, 陈德余, 陈士明等. 无机化学学报, 2001, 17(2): 139.