

文章编号: 1674-5566(2010)03-0404-06

C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物的制备及其 抗氧化性的研究

孙涛, 巢骏, 熊小英, 康永锋, 谢晶

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 在非均相碱性体系中, 合成了 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物, 用 FT-IR 和 ¹H NMR 对产物的结构进行了表征。考察了 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物的超氧阴离子清除能力、羟基自由基清除能力、还原能力以及金属螯合能力。结果表明: C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物对超氧阴离子自由基 O₂⁻ 和羟基自由基 ·OH 的半抑制浓度分别是 0.42 mg/mL 和 0.26 mg/mL; 在还原能力体系中当吸光度达到 0.5 时, 所需 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物浓度是 2.44 mg/mL; 在金属螯合能力体系中, C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物对亚铁离子的半螯合浓度是 0.013 mg/mL; 即表明 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物在 4 个抗氧化体系中都表现出明显的抗氧化性。并且 D氨基葡萄糖盐酸盐在 4 个体系中表现出的抗氧化能力都不强, 说明 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物的抗氧化能力可能主要来自于 C₆₀ 保留下来的双键。

关键词: C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物; 超氧阴离子; 羟基自由基; 还原能力; 金属螯合能力

中图分类号: O 621 **文献标识码:** A

Research on synthesis of D-Glucosamine C₆₀ derivative and its antioxidant activities

SUN Tao CHAO Jun XIONG Xiao-ying KANG Yong-feng XIE Jing

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

Abstract: In heterogeneous phase alkaline system, D-glucosamine C₆₀ derivative was synthesized. The product was characterized by FT-IR and ¹H NMR. The antioxidant activities of D-glucosamine C₆₀ derivative including scavenging ability on superoxide anion and hydroxyl radical, reducing power and chelating ability were studied. The results showed that 50% inhibiting concentrations of D-glucosamine C₆₀ derivative for superoxide anion and hydroxyl radical were 0.42 mg/mL and 0.26 mg/mL, respectively; the effective concentration of D-glucosamine C₆₀ derivative at which absorbance was 0.5 for reducing power was 2.44 mg/mL; the 50% chelating concentration of D-glucosamine C₆₀ derivative for ferrous ions was 0.013 mg/mL, and D-glucosamine C₆₀ derivative had significant antioxidant activities in the four antioxidant systems. Antioxidant activities of D-glucosamine hydrochloride were weak in the four antioxidant systems, hence antioxidant activities of D-glucosamine C₆₀ derivative might be mainly from double bond which is kept in C₆₀.

Key words: D-glucosamine C₆₀ derivative; superoxide anion; hydroxyl radical; reducing power; chelating

收稿日期: 2009-09-24

基金项目: 上海海洋大学骆肇尧大学生科技创新基金项目 (G-7101-00-000727); 上海市生物医药和农业科技领域重点科技项目 (08391911500); 2009年上海市优秀学科带头人计划 (09XD1402000); 上海市教委重点学科 (J50704)

作者简介: 孙涛 (1970-), 女, 博士, 副教授, 主要从事富勒烯的生物活性方面的研究。E-mail: taosun@shou.edu.cn

ability

自由基与大量病理过程都有紧密联系^[1],它们会对生物体造成氧化伤害,加速人体的衰老^[2-5]。自从1985年Kuro等^[6]发现等碳原子簇以来,C₆₀水溶性衍生物的生物活性备受关注^[7]。C₆₀水溶性衍生物具有清除自由基、抑制癌细胞生长、抑制真菌生长、抑制细胞凋亡、保护皮肤免受紫外线伤害等作用^[8-12],其中它的抗氧化性尤为重要^[13-15]。D氨基葡萄糖盐酸盐可用作抗细菌感染及免疫药剂,是人体抗流感病毒的活化剂,是合成抗生素和抗癌药物的主要原料。向C₆₀上引入D氨基葡萄糖基团,可以克服C₆₀水溶性差的缺点,赋予衍生物良好的水溶性,同时又期望衍生物拥有D氨基葡萄糖盐酸盐的抗菌、抗炎、解毒等生物活性。

本实验合成了C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物,并考察了它的超氧阴离子清除能力、羟基自由基清除能力、还原能力和金属螯合能力,希望可以为海洋生物产品在生物医学领域中的应用提供一些参考性数据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

C₆₀纯度>99.9%,由河南永新试剂公司生产,D氨基葡萄糖盐酸盐由上海高信试剂有限公司生产,HEPES、鲁米诺由国药集团化学试剂有限公司生产,Ferrozine由美国Fluka公司生产。甲苯、乙醇、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯化铁、氯化亚铁、邻苯三酚均为分析纯。

使用的仪器包括:Nicolet Nexus 470红外光谱仪(美国NICOLET),DMX 500型核磁共振波谱仪(德国Bruker),IFFM-D型流动注射化学发光分析仪,IFFS-A型多功能化学发光检测器。

1.2 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物的合成

按照文献^[16]设计合成C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物的方法,取375 mg D氨基葡萄糖盐酸盐和2.0 g NaOH溶于12 mL去离子水中,加入80 mL无水乙醇,搅拌下缓慢滴加C₆₀甲苯溶液250 mL(浓度为1 mg/mL),室温下搅拌5 d至有机层中紫色消失。分液移去无色有机层,将黑色溶液层

用蒸馏水稀释,然后再加入无水乙醇使产物沉淀,继续将产物用水和无水乙醇反复沉淀,经真空干燥得到黑褐色固体粉末产物。

1.3 C₆₀-D氨基葡萄糖衍生物的特征

对产物进行FT-IR和¹H MNR表征。红外光谱采用KBr压片法制样,测定波数范围为400~4 000 cm⁻¹,分辨率为0.8 cm⁻¹。核磁共振,500 MHz溶剂为D₂O。

1.4 超氧阴离子清除能力

用pH=10.20的0.5 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲溶液配制浓度为1.5×10⁻³ mol/L的鲁米诺溶液,用1×10⁻³ 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1×10⁻⁴ mol/L。以缓冲液作为溶剂,配制成不同浓度的样品溶液^[17]。

将鲁米诺溶液和邻苯三酚溶液混合,用流动注射化学发光分析仪测定超氧阴离子所产生的峰面积,先测试空白样,然后依次测试从稀到浓的样品溶液,进样时间10 s测试时间30 s。

$$S=(A_0-A_i)/A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中:S为样品对自由基的清除率;A₀为空白溶液峰面积;A_i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O₂^{•-}。

1.5 羟基自由基清除能力

用pH=7.40的0.05 mol/L KH₂PO₄-NaOH缓冲溶液分别配制浓度为6.4×10⁻⁴ mol/L的鲁米诺溶液、0.012 mol/L的H₂O₂和0.8 mg/mL的亚铁氰化钾溶液。以鲁米诺溶液作为溶剂,配制成系列不同浓度的样品溶液^[17]。

将H₂O₂溶液和亚铁氰化钾溶液混合,用流动注射化学发光分析仪测定羟基自由基所产生的峰面积,先测试空白样,然后依次测试从稀到浓的样品溶液,进样时间15 s测试时间25 s计算如公式(1)。

经SOD、过氧化氢酶及甘露醇检测,该体系产生的自由基为羟基自由基•OH。

1.6 还原能力的测定

还原能力测试根据文献^[18]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 磷酸缓冲液和 1% 铁氰化钾溶液各 2.50 mL 混匀。50℃ 水浴 20 min 后迅速冷却, 加入 2.50 mL 10% 三氯乙酸溶液, 混匀后在 3 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液 2.0 mL 加入 2.50 mL 去离子水和 0.50 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 静置 10 min 后在 700 nm 处测定吸光度。吸光度越高代表还原能力越强。

1.7 金属螯合能力的测定

按照文献 [19] 稍加修改测定反应产物的金属螯合能力。取不同浓度的样品溶液 3.50 mL, 加入 0.1 mL 2.0 mmol/L 的氯化亚铁溶液和 0.20 mL 5.0 mmol/L 的 ferrozine 溶液, 混和均匀。混合液室温静置 10 min 并于 562 nm 处测定其吸光度。用下式计算其金属螯合能力:

$$C(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中: C 表示样品对金属的螯合能力; A_0 表示用水代替样品所测得的吸光度; A_i 表示样品所测得的吸光度; A_j 表示样品本身的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 结构表征

D 氨基葡萄糖盐酸盐的红外图谱和 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物的红外图谱如图 1 和图 2 所示。 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物保留了 D 氨基葡萄糖盐酸盐的在 3 370 cm^{-1} 处 (N-H)、2 880 cm^{-1} 处 (-CH-), 1 605 cm^{-1} (N-H 的面内弯曲振动峰) 和 1 063 cm^{-1} 处 (C-O-C) 的吸收峰, 还在 521 cm^{-1} 处多出一个吸收峰, 521 cm^{-1} 吸收峰是取代 C_{60} 的标志, 与文献 [20-22] 报道的结果一致, 说明 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物同时具有 D 氨基葡萄糖盐酸盐和 C_{60} 的吸收峰。

在 1.30~1.40 ppm, C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物的 ^1H NMR 图谱如图 3, 2.02 ppm 处的吸收峰是 C_{60} -H 的吸收峰, 2.90, 3.63, 3.76 和 3.80 ppm 处的吸收峰是 D 氨基葡萄糖的吸收峰。以上表征说明合成的产物是目标化合物。

2.2 超氧阴离子清除能力

抗氧化剂通过氧化或还原反应抑制自由基的产生或直接清除自由基。 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物对超氧阴离子的清除很可能与 C_{60} 的氧化反应类似, 通过 $\text{O}_2 \cdot$ 生成一个活性氧中间体, 在 C=C 键上加成为环氧结构^[23], 就是说, 打开一个 C

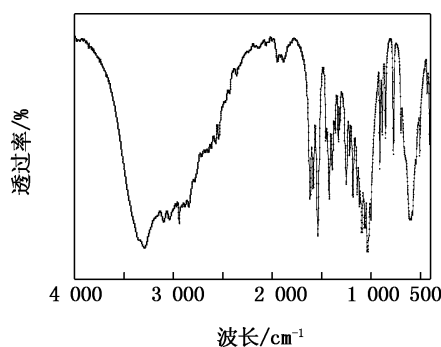


图 1 D 氨基葡萄糖盐酸盐的红外图谱

Fig. 1 IR of D-glucosamine hydrochloride

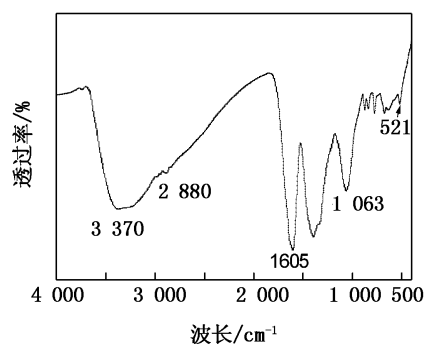


图 2 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物的红外图谱

Fig. 2 IR of D-glucosamine C_{60} derivative

=C 键, 可以消耗一个超氧阴离子。 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物和 D 氨基葡萄糖盐酸盐的超氧阴离子清除能力如图 4 所示: 随着浓度的增加, C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物和 D 氨基葡萄糖盐酸盐的超氧阴离子清除能力逐渐增强, 两者对超氧阴离子的半抑制浓度分别是 0.42 mg/mL 和 14.1 mg/mL 与 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物相比, D 氨基葡萄糖盐酸盐在超氧阴离子清除能力体系中的半抑制浓度是 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物的 33 倍。

2.3 羟基自由基清除能力

羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 是毒性最大的活性氧, 对细胞内 DNA 的破坏作用最大, 它可以加成至碱基双键中造成碱基破坏, 从而产生突变。 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物对羟基自由基的清除反应应以向 C=C 键的多加成为主^[24], 可能是以打开一个 C=C 键加成两个 $\cdot\text{OH}$ 的方式进行的, 也就是说, 一个 C=C 键可以清除两个羟基自由基。 C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物和 D 氨基葡萄糖盐酸盐的羟基自由基清除能力如图 5 所示: 随着浓度的增加, C_{60} -D 氨基葡萄糖衍生物的羟基自由基清除

能力逐渐增强; D-氨基葡萄糖盐酸盐在这个浓度范围内几乎没有羟基自由基清除能力; C₆₀-D-氨基

葡萄糖衍生物对羟基自由基清除的半抑制浓度是 0.26 mg/mL。

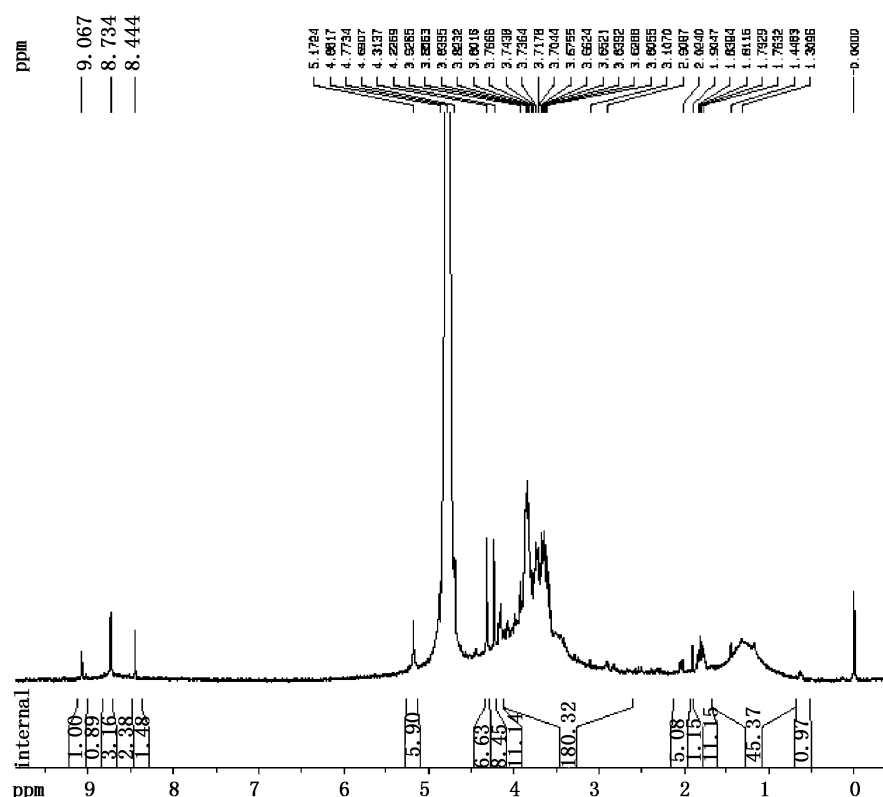


图 3 C₆₀-D-氨基葡萄糖衍生物的¹H NMR图谱

Fig 3 ¹H NMR of D-glucosamine in C₆₀ derivative

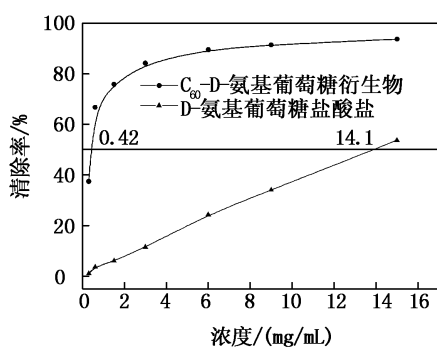


图 4 C₆₀-D-氨基葡萄糖衍生物和 D-氨基葡萄糖盐酸盐的超氧阴离子清除能力曲线图

Fig 4 Scavenging ability on superoxide anion of D-glucosamine in C₆₀ derivative and D-glucosamine in hydrochloride

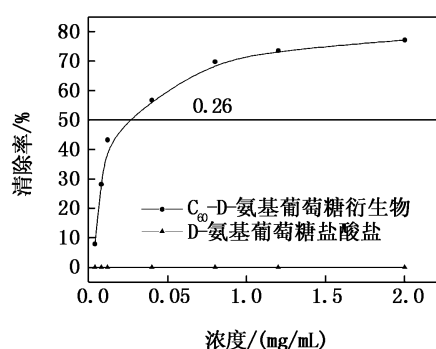


图 5 C₆₀-D-氨基葡萄糖衍生物和 D-氨基葡萄糖盐酸盐的羟基自由基清除能力曲线图

Fig 5 Scavenging ability on hydroxyl radical of D-glucosamine in C₆₀ derivative and D-glucosamine in hydrochloride

2.4 还原能力

还原能力是表示抗氧化物提供电子的能力的重要指标,研究表明抗氧化活性和还原能力之间存在着密切的关系。一些金属离子(例如铁离

子、铜离子)在自由基氧化过程中起到催化剂的作用,具有还原能力的 C₆₀-D-氨基葡萄糖衍生物能够还原金属离子,从而使一些金属离子失去催化作用。C₆₀-D-氨基葡萄糖衍生物和 D-氨基葡萄糖

糖盐酸盐的还原能力如图 6 所示:随着浓度的增加, C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的吸光值随之增加, 即表示还原能力也逐渐增强; D 氨基葡萄糖盐酸盐在这个浓度范围内几乎没有还原能力; 在吸光度是 0.5 时, 所需 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的浓度是 2.44 mg/mL。

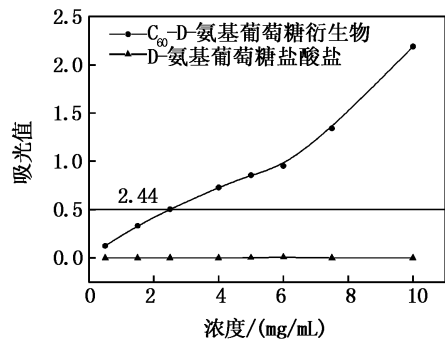


图 6 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物和 D 氨基葡萄糖盐酸盐的还原能力曲线图

Fig 6 Reducing power of D-glucosamine C₆₀ derivative and D-glucosamine hydrochloride

2.5 金属螯合能力

金属离子在自由基氧化过程中起催化剂作用, 将金属离子螯合可以钝化金属离子的催化作用, 大大降低自由基的氧化作用。C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物和 D 氨基葡萄糖盐酸盐的金属螯合能力如图 7 所示: 随着浓度的增加, C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的金属螯合能力逐渐增强; D 氨基葡萄糖盐酸盐在这个浓度范围内几乎没有金属螯合能力; 当螯合率达到 50% 时, 所需的 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的浓度是 0.013 mg/mL。

D 氨基葡萄糖盐酸盐在超氧阴离子、羟基自由基清除能力、还原能力和金属螯合能力 4 个体系中表现出的抗氧化能力都不强, 而 C₆₀ 是典型的缺电子烯烃, 具有很强的电子亲和能力, 与自由基反应以双键的多重加成为主, 说明 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的抗氧化能力可能主要来自于 C₆₀ 上保留下来的双键。

3 结论

本实验合成了 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物, 并采用了超氧阴离子清除能力、羟基自由基清除能力、还原能力和金属螯合能力 4 个指标, 综合考察了 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的抗氧化能力, 发

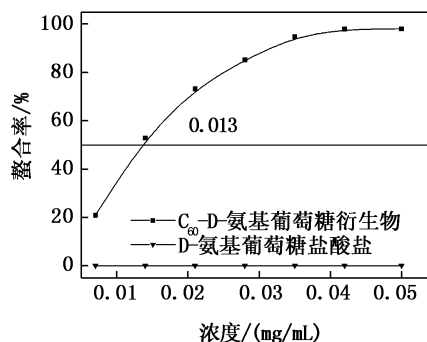


图 7 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物和 D 氨基葡萄糖盐酸盐的金属螯合能力曲线图

Fig 7 Chelating ability of D-glucosamine C₆₀ derivative and D-glucosamine hydrochloride

现 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物在 4 个抗氧化体系中都表现出明显的抗氧化性, 并且 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的抗氧化能力主要来自于 C₆₀ 上保留下来的双键。通过对 C₆₀-D 氨基葡萄糖衍生物的抗氧化性研究, 为进一步研究该衍生物奠定了基础。

参考文献:

- [1] Stoian I, Oros A, Mokloveanu E. Apoptosis and free radicals [J]. *Biochem Mol Med*, 1996, 59: 93-97.
- [2] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 16.
- [3] Fridovich I. The biology of oxygen radicals [J]. *Science*, 1978, 201: 875-880.
- [4] Bawn K, Fridovich I. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 206: 414-419.
- [5] Nordberg J, Amer J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system [J]. *Free Radical Bio Med*, 2001, 31: 1287-1312.
- [6] Kroto H W, Heath J R, O'Brien S C, et al. C₆₀: Buckminsterfullerene [J]. *Nature*, 1985, 318: 162-163.
- [7] 孙大勇, 刘子阳, 郭兴华, 等. 水溶性 C₆₀ 衍生物的合成及其生物活性 [J]. *应用化学*, 1996, 13(4): 1-4.
- [8] 刘绪峰, 官文超, 程珍贤. C₆₀ 吡啶咯烷羧酸衍生物的合成及其清除超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 的活性 [J]. *应用化学*, 2006, 23(1): 30-33.
- [9] 江贵长, 郑启新. 富勒烯-赖氨酸衍生物的合成及其体外抗癌活性研究 [J]. *材料导报*, 2005, 19(8): 135-138.
- [10] 林阳辉, 蔡瑞芳. C₆₀ 负离子与 1,2-二溴丁二酸钠的高选择性加成反应与生物活性研究 [J]. *化学学报*, 2005, 63(8): 774-776.
- [11] Hu Z, Liu S H, Wei Y, et al. Synthesis of glutathione C₆₀

- derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells [J]. *Neurosci Lett* 2007, 429: 81—86.
- [12] Li X, Hiroya T, Kentaro M, et al. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes [J]. *Biomed Pharmacotherapy* 2005, 59: 351—358.
- [13] 林永生, 吴振奕, 詹梦熊, 等. 球烯配合物的研究 [J]. *化学通报*, 1996, 9: 5—9.
- [14] 石志强, 李玉良, 王树, 等. 多受阻酚富勒烯衍生物的合成及其抗氧化作用 [J]. *科学通报*, 2001, 46(14): 1169—1172.
- [15] 孙大勇, 祝严师, 刘子阳, 等. 水溶性富勒醇对活性氧自由基的清除 [J]. *科学通报*, 1997, 42(8): 836—840.
- [16] Glen P M. Reactions between aliphatic amines and [60] fullerene, a review [J]. *C R Chimie* 2006, 9: 952—959.
- [17] Sun T, Xie W M, Xu P X. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives [J]. *Carbohydr Polym* 2004, 58: 379—382.
- [18] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. *Agric Food Chem* 1995, 43: 27—32.
- [19] Chan W C, Lin Y Y, Chew Y L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a low land plantation in Malaysia [J]. *Food Chem* 2007, 102: 1214—1222.
- [20] Bunker C E. Fullerene-styrene random copolymer: Novel optical properties [J]. *Macromolecules* 1995, 28(10): 3744—3748.
- [21] Cao T, Webber S E. Free radical copolymerization of styrene and C₆₀ [J]. *Macromolecules* 1996, 29(11): 3826—3830.
- [22] Jiang G C, Guan W C, Zheng Q X. Synthesis of fullerene-acrylamide copolymer nanoball and its lubrication properties [J]. *Chinese Chem* 2004, 22(8): 877—881.
- [23] Deng J P, Mou C Y, Han C C. Electrospay and laser desorption ionization studies of C₆₀O and C₆₀O₂ [J]. *J Phys Chem* 1995, 99(41): 1906—1910.
- [24] Hirsch A. Addition reactions of buckminsterfullerene (C₆₀) [J]. *Synthesis* 1995: 895—899.