

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0144 - 05

不同取代度马来酰 κ - 卡拉胶的抗氧化活性研究

孙涛, 朱云, 卫颖隽, 谢晶, 陶慧娜, 薛斌

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 对 κ - 卡拉胶进行酸降解, 经过透析得到 2 种低聚糖。进而分别马来酰化得到 2 种 κ - 卡拉胶马来酰衍生物(MA 和 MB)。对产物进行红外表征, 采用 GPC 方法测定 2 种衍生物的分子量分别为 4 350 和 4 540, 比色法测定其取代度分别为 0.61 和 0.44, 并考察了 2 种衍生物对超氧阴离子自由基 $O_2 \cdot^-$ 、DPPH 自由基、过氧化氢的清除活性以及还原能力。结果表明: MA 与 MB 对超氧阴离子自由基 $O_2 \cdot^-$ 的半抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.441 mmol/L 和 0.489 mmol/L; 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 分别为 0.101 mmol/L 和 0.273 mmol/L; MA 清除过氧化氢的 IC_{50} 为 0.052 mmol/L, 而 MB 在测试浓度范围内对过氧化氢未能达到半抑制; 当浓度为 0.5 mmol/L 时, MA 和 MB 的吸光度分别是 0.894 和 0.487。可见, MA 的抗氧化能力优于 MB, 即随着取代度的升高, 抗氧化能力增强, 这可能与马来酰基的吸电子性质有关。揭示了取代度对抗氧化活性的影响规律, 为 κ - 卡拉胶及其衍生物生物活性的深入研究相关依据和思路。

研究亮点: 研究了取代基团的性质对 κ - 卡拉胶衍生物抗氧化性能的影响。对分子量相近, 取代度不同的两种 κ - 卡拉胶马来酰衍生物进行了抗氧化性能测试。结果表明: 随着取代度的升高, 抗氧化能力增强。揭示了马来酰基的吸电子性质可以提升卡拉胶衍生物的抗氧化性能。

关键词: κ - 卡拉胶; 酸降解; 马来酰基; 抗氧化活性

中图分类号: Q 539; TS 202.3
文献标识码: A

自 2000 年, YAMADA 和 OGAMO^[1] 发现酰化后的 κ-和 λ-卡拉胶抗 HIV 活性得到提高, 同时抗凝血活性降低。此后相继出现了用马来酸酐^[2]、琥珀酸酐^[3-5]、醋酸酐^[6] 和邻苯二甲酸酐^[7] 等酸酐对低分子量 κ-卡拉胶进行结构改性的报道, 酰化反应的不断深入研究表明 κ-卡拉胶酰化后的抗氧化活性可能与其分子量、分子中羟基含量、取代基的性质以及取代度有关^[8-9]。本文将酸降解得到的低聚糖进行马来酰化, 制备得到分子量相近而取代度不同的两种马来酰 κ-卡拉胶, 进一步考察了取代度对抗氧化活性的影响。以期为其进一步的高值化研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

κ-卡拉胶(食品级, 上海联合食品添加剂有限公司); 鲁米诺、DPPH(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。

WFZ UV2000 型紫外分光光度计(上海合利仪器有限公司); Delta 320 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器分析仪器有限公司); IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈科技有限公司); JB90-D 型强力电动搅拌机, METTLER AE200 型

收稿日期: 2010-04-15 修回日期: 2010-05-02

基金项目: 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建设项目(J50704)

作者简介: 孙涛(1970-), 女, 副教授, 博士, 主要从事多糖的改性及生物功能方面的研究。Tel: 021 - 61900363, E-mail: taosun@shou.edu.cn

电子分析天平,JI80-2B 型台式离心机。

1.2 卡拉胶低聚糖的制备

将 30.0 g κ-卡拉胶(KC)溶于 1 200 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 HCl 溶液中,于 60 °C 下降解 4 h。冷却,用 0.2 mol/L NaOH 调节溶液 pH 至 7.0,先通过微孔过滤器过滤(0.45 μm),再用截留分子量分别为 7 000 和 14 000 的透析袋在蒸馏水中透析 6 d,冷冻干燥后分别得到 κ-卡拉胶低聚糖 B 和 C 各约 1.2 g^[10]。

1.3 马来酰衍生物的制备

分别将 1.2 g 两种低分子量卡拉胶用 732 型阳离子氢型树脂在 4 °C 下交换 1 h,过滤,再用四丁基氢氧化铵调节溶液 pH 至 6.0,冻干,得 2 种卡拉胶四丁基铵盐。将卡拉胶四丁基铵盐 898 mg 溶解于 20 mL N,N-二甲基甲酰胺中,然后依次加入 131 mg 4-二甲基氨基吡啶,3.10 mL 三丁基胺,1.27 g 马来酰酐于装有磁力搅拌器和冷凝管的三口烧瓶中,通 N₂ 保护,在 60 °C 下反应 6 h,然后于 4 °C 的三水合乙酸钠的过饱和乙醇溶液中沉淀 1.5 h,用无水乙醇洗涤离心 3 次后,将沉淀溶于蒸馏水中,在 5% NaHCO₃ 溶液中透析 2 d,再在蒸馏水中透析 4 d,冻干后分别得 2 种低聚 κ-卡拉胶马来酰化产物 MA 和 MB 各约 0.6 g^[2]。

1.4 测试表征

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 400~4 000 cm⁻¹,分辨率为 0.8 cm⁻¹。

采用 GPC 法测定卡拉胶酰化衍生物的相对平均分子量及其分布。GPC 测试条件如下:流动相:0.1 mol/L 硝酸钠水溶液;监测器:Waters 2410 示差折光监测器;柱子:Ultrasphere 500,120 串连;温度:40 °C。标准物质为:葡聚糖。

1.5 取代度测定

配制一系列不同浓度的马来酰酐标准溶液,用石英比色皿于 254 nm 紫外光下测定吸光度。对吸光度与浓度作图可得吸光度与马来酰酐浓度的直线方程,利用该方程与衍生物在 254 nm 的吸光度可以求得衍生物的酰化取代度(DS)^[11]。

1.6 对超氧阴离子自由基的清除

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。

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

式中:S 为清除率(%);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·⁻^[12]。

1.7 对 DPPH 自由基的清除^[13]

在装 2.0 mL 浓度为 1 × 10⁻⁴ mol/L DPPH 无水乙醇溶液的比色管中,加入不同浓度的样品溶液 2.0 mL,摇匀,33 °C 避光静置半小时,在 517 nm 处测量吸光度 A_i。

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

式中:S 为清除率(%);A_i 为样品溶液吸光度;A_j 为无水乙醇代替 DPPH 的吸光度;A₀ 为用去离子水代替样品溶液的吸光度。

1.8 对过氧化氢的清除

配制 pH 7.20 的 0.2 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲溶液,用缓冲溶液配制 0.1 mol/L 的 H₂O₂ 溶液,在装有此 H₂O₂ 溶液的比色管中,加入不同浓度的样品溶液 2.0 mL,摇匀,33 °C 避光静置半小时,在 230 nm 处测量吸光度 A_i,计算方法如公式(2)。

1.9 还原能力的测定

取 2.0 mL 不同浓度的样品,加入 pH 6.6 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液和 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 2 000 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,静置十分钟后在 700 nm 处测定吸光度^[14]。

2 结果与讨论

2.1 马来酰 κ-卡拉胶的结构表征

图 1 为原料 κ-卡拉胶(KC)及两种马来酰 κ-卡拉胶(MA 和 MB)的红外光谱图。从图中可以看出,马来酰 κ-卡拉胶衍生物保留有原料 κ-卡拉胶的 3 个特征吸收峰,即 1 280 cm⁻¹ 吸收峰处的 O-S-O 对称伸缩振动吸收峰;840 cm⁻¹ 吸收峰

处的 C-O-S 伸缩振动吸收峰;930 cm^{-1} 吸收峰处的 3,6-内醚-D-半乳糖中 C-O-C 的伸缩振动吸收峰,这表明卡拉胶经过马来酰化后,其结构单元未发生变化。相较于 κ -卡拉胶原料,MA 和 MB 在 1 740 cm^{-1} 处出现了新的吸收峰,该处吸收峰归属于 C = O,这可能是由于氧化降解过程中部分 O-H 被氧化所致。卡拉胶马来酰衍生物在 1 580 cm^{-1} 和 1 430 cm^{-1} 处出现特征吸收峰,分别是由马来酰基中-COO⁻的不对称伸缩振动和对称伸缩振动引起的,1 650 cm^{-1} 的特征吸收峰归属于 C = C。综上可知: κ -卡拉胶低聚糖在与马来酸酐进行反应时生成了卡拉胶马来酰基衍生物^[2]。

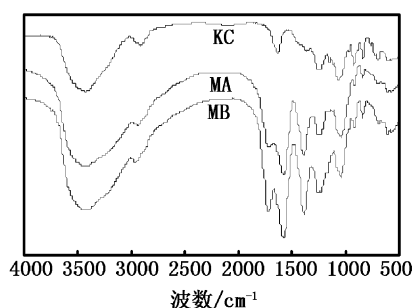


图1 原料卡拉胶及马来酰化衍生物的红外光谱图
Fig. 1 FTIR spectra of the κ -carrageenan polysaccharide and the maleoyl derivatives

GPC 结果及取代度测试结果表明: κ -卡拉胶原料(KC)及马来酰化衍生物(MA 和 MB)的平均相对分子质量分别为:350 000、4 350 和 4 540;其马来酰基取代度分别为 0.61 和 0.44。

2.2 对超氧阴离子自由基的清除

超氧阴离子是一类较毒的活性氧自由基,由多种生物反应和光化学反应产生,它还能分解形成更强的活性氧物质,如单线态氧和羟自由基,导致脂质过氧化。邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化,释放出 $\text{O}_2 \cdot^-$,生成有色的中间产物。当有自由基清除剂存在时,可清除 $\text{O}_2 \cdot^-$,阻止中间有色产物的积累^[15]。

天然多糖的抗氧化活性与其分子中的羟基含量有关^[16-17]。 κ -卡拉胶清除自由基的能力可能也是通过分子中的羟基与自由基反应而达到清除目的,衍生化后部分羟基被取代,剩余的羟基仍然可以与自由基反应从而清除自由基。

图2为两种马来酰 κ -卡拉胶(MA 和 MB)对超氧阴离子自由基的清除曲线。由图可知,其清

除超氧阴离子自由基的能力随着浓度的升高而逐渐增强,其半抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.441 mmol/L 和 0.489 mmol/L。可知,MA 清除超氧阴离子自由基能力较 MB 强。

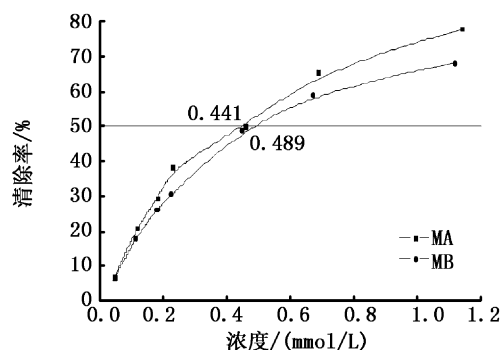


图2 酰化衍生物对超氧阴离子自由基的清除
Fig. 2 Superoxide radicals scavenging abilities of the acylated derivatives

2.3 对 DPPH 自由基的清除

DPPH 是一种相当稳定的自由基,可接受氢或电子形成稳定的分子。马来酰 κ -卡拉胶分子链中的活性羟基可以提供氢与 DPPH 结合,从而达到清除 DPPH 的目的。图3为2种马来酰 κ -卡拉胶(MA 和 MB)对 DPPH 自由基的清除曲线。由图可知,其清除 DPPH 自由基的能力随着浓度的升高而逐渐增强,其半抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.101 mmol/L 和 0.273 mmol/L。可知,MA 清除 DPPH 自由基能力较 MB 强。

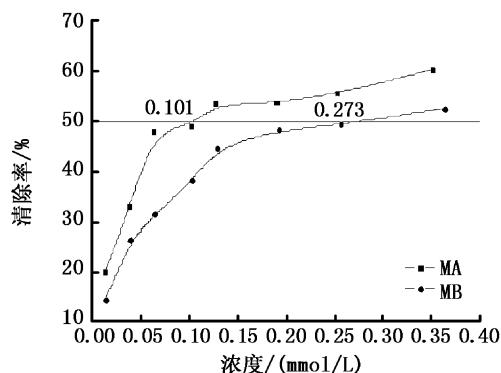


图3 酰化衍生物对 DPPH 自由基的清除
Fig. 3 DPPH radicals scavenging abilities of the acylated derivatives

2.4 对过氧化氢的清除

过氧化氢不是活性氧,但它能够形成毒性最大的羟基自由基,引发细胞膜中的不饱和脂肪酸发生过氧化反应,从而产生危害。图4描述了2

种马来酰化 κ-卡拉胶(MA 和 MB)对过氧化氢的清除效果。它们对过氧化氢的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强,MA 的半抑制浓度 IC_{50} 为 0.052 mmol/L,而 MB 在测试范围内未能达到半抑制。可知,MA 清除过氧化氢能力较 MB 强。

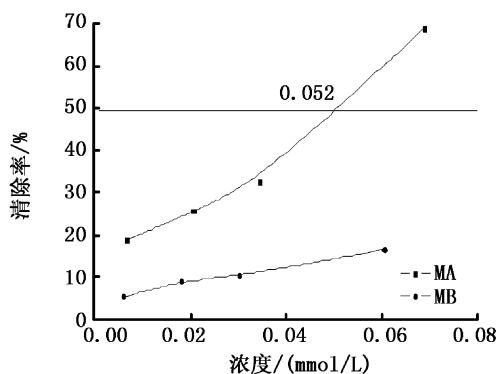


图 4 酰化衍生物对过氧化氢的清除

Fig.4 Scavenging abilities of the acylated derivatives on H₂O₂

2.5 还原能力

还原能力和抗氧化活性之间有着密切的关系^[18]。抗氧化物质通过提供电子可阻断 Fe^{2+} 向 Fe^{3+} 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。两种马来酰化衍生物的还原能力如图 5 所示。随着浓度的增加,样品的吸光值随之增加,还原能力逐渐增强。当浓度为 0.5 mmol/L 时,MA 和 MB 的吸光度分别是 0.894 和 0.487。可知,MA 的还原能力较 MB 强。

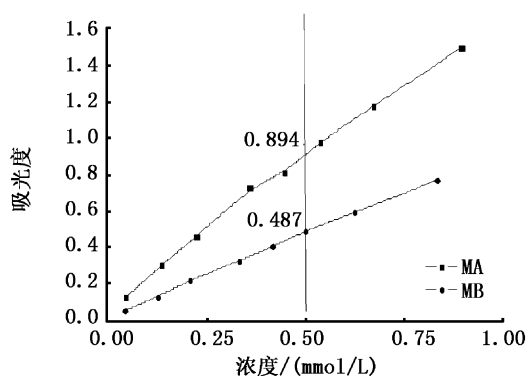


图 5 酰化衍生物的还原能力

Fig.5 Reducing power of the acylated derivatives

由此可知,MA 清除超氧阴离子自由基、DPPH 自由基、过氧化氢的能力以及还原能力较 MB 强。其中 MA 取代度(0.61)较 MB(0.44)

高,而其分子量相近。通过计算可知:一个 MA 分子约含有 12 个羟基,而一个 MB 分子约含有 18 个羟基。

马来酰基通过取代羟基而接枝在分子上,卡拉胶经过马来酰化后引入了吸电子基团—CO—C₂H₄—COO⁻,由于其吸电子作用可能使母体卡拉胶分子的电子云密度降低,使得 O—H 键更易断裂,提高了剩余羟基中氢的活性,给电子能力提高并且更易与自由基反应,从而使其抗氧化活性增强,由此可能使得取代度越高,抗氧化能力越强。因此,尽管 MB 含有的羟基数目较多,但 MA 分子中较多的吸电子基团却可能反而使其剩余羟基的活性更强,这可能是 MA 分子的抗氧化能力较强的原因。

3 结论

通过将 2 种 κ-卡拉胶低聚糖进行进一步马来酰基化得到两种取代度不同而分子量相近的衍生物(MA 和 MB)。抗氧化性能测试表明,具有较高取代度的 MA 抗氧化能力较强,这可能与引入更多的吸电子基团有关。进一步证明了 κ-卡拉胶衍生物的抗氧化活性与取代度有关,为 κ-卡拉胶的进一步高值化研究提供参考。

参考文献:

- [1] YAMADA T, OGAMO A. Preparation of *O*-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect[J]. Carbohydr Polym, 2000, 41(2): 115-120.
- [2] JIANG Y P, GUO X K. *O*-Maleoyl derivative of low-molecular-weight κ-carrageenan: synthesis and characterization[J]. Carbohydr Polym, 2005, 61(4): 441-445.
- [3] 郭锡坤,田秀芳,庄东红,等. κ-卡拉胶的 *O*-琥珀酰基化衍生物的制备与表征[J]. 汕头大学学报,2006,21(1): 23-32.
- [4] 卢克祥,孙涛,王惠英,等. 低分子量 κ-卡拉胶衍生物的制备及其抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技,2008,29(5): 251-253,273.
- [5] 田秀芳,郭锡坤. 低相对分子质量 κ-卡拉胶氧-琥珀酰基化反应的动力学研究[J]. 精细化工,2007,24(10): 996-999.
- [6] 唐凤翔,陈方,李峰,等. 小分子量海藻硫酸多糖 κ-卡拉胶的乙酰化[J]. 福州大学学报,2006,34(5): 755-759.
- [7] 郭锡坤,余成艳. 邻苯二甲酰基化 κ-卡拉胶的合成及其生物活性[J]. 汕头大学学报,2007,22(1): 37-41,53.
- [8] 孙涛,陶慧娜,卢克祥,等. 低分子量 κ-卡拉胶及其邻苯二甲酰基化衍生物的抗氧化活性研究[J]. 湖南农业科学,

- 2009(10):25-27,31.
- [9] 孙涛,陶慧娜,卢克祥,等.低分子量κ-卡拉胶马来酰基化衍生物的制备及抗氧化活性的研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(6):1028-1031.
- [10] 王长云,顾谦群,周鹏,等.红藻多糖卡拉胶分子修饰衍生物 I. 酸降解[J].中国海洋药物,2003,22(2):24-27.
- [11] 郭锡坤,孙文兵,林树东.水杨酸改性κ-卡拉胶的研究[J].汕头大学学报,2008,23(3):51-57,62.
- [12] 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 $O_2^{\cdot-}$ 和羟基自由基 $\cdot OH$ 的检测[J].食品工业科技,2006,27(11):182-184.
- [13] YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, *et al.* HPLC Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,1998, 62(6): 1201-1204.
- [14] YEN G C, CHEN H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. *Agric Food Chem*, 1995, 43(1): 27-32.
- [15] FORREST V J, KANG Y H, MCCLAIN D E, *et al.* Robinson and Narayani Ramakrishnan. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox [J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16(6): 675-684.
- [16] LI W J, JIANG X, XUE P H, *et al.* Inhibitory effects of chitosan on superoxide anion radicals and lipid free radicals[J]. *Chin Sci Bull*,2002, 47(11): 887-889.
- [17] XIE W M, XU P X, LIU Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(13), 1699-1701.
- [18] DUH P D, DU P C, YEN G C. Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage [J]. *Food Chem Toxicol*,1999, 37(11): 1055-1061.

Antioxidant activity of maleoyl κ-carrageenans with different substituting degrees

SUN Tao, ZHU Yun, WEI Ying-juan, XIE Jing, TAO Hui-na, XUE Bin

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

Abstract: Two κ-carrageenan oligosaccharides were prepared by acidic degradation. Then the maleoyl derivatives (MA, MB) were synthesized with maleoyl anhydride, respectively. The products were characterized by FTIR, the molecular weights (4 350, 4 540) were measured by gel permeation chromatography (GPC) method, and the substituting degrees (0.61, 0.44) were determined by colorimetry method. Their antioxidant activities were evaluated by the scavenging of superoxide anion, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH), H_2O_2 and reducing power. The 50% inhibition concentrations (IC_{50} s) against superoxide anion of MA and MB were 0.441 and 0.489 mmol/L, respectively. As for DPPH radical scavenging, the IC_{50} s of MA and MB were 0.101 and 0.273 mmol/L, respectively. The IC_{50} against H_2O_2 of MA was 0.052 mmol/L, MB failed to achieve half-inhibition in the test concentration. At a concentration of 0.5 mmol/L, and the absorbance of MA and MB was 0.894 and 0.487, respectively. The results indicated that MA showed better antioxidant activities than MB. The maleoyl derivatives with higher substituting degrees have better antioxidant activity. It may be related to the nature of substituting group. In this paper, the relationship between the substituting degrees of the acylated κ-carrageenan oligosaccharides and their antioxidant activities was first reported. This research will be helpful to expand their applications in biomedicine.

Key words: κ-carrageenan; acidic degradation; maleoyl; antioxidant activity