

Study on Antioxidant Activity of Selenium Carboxymethyl-Chitosan[#]

Liang Sun¹, Xianling Qin¹, Yan Yang², Xiaojing Zhao¹, Shengdi Fan¹, Liming Jin^{1*}

¹College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian

²College of Life Science, Jinan University, Guangzhou

³College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao

Email: jlm@dlnu.edu.cn

Received: Sep. 17th, 2011; revised: Oct. 14th, 2011; accepted: Nov. 8th, 2011.

Abstract: The antioxidant activities *in vitro* of selenium carboxymethyl-chitosan were investigated by phenanthroline-Fe²⁺, pyrogallol autoxidation and T-AOC kit. The results showed that in the setting concentration range, the antioxidant activities increased with the elevation of concentration. The antioxidant activities of selenium carboxymethyl-chitosan were better than that of carboxymethyl-chitosan. The clearance rates of hydroxyl free radical and superoxide anion free radical of 1mg/mL selenium carboxymethyl-chitosan were 42.68% and 31.16%, respectively, and the total antioxidant activity was 0.863 Unit/mL. The results provide references of low toxicity and effective organic selenium products.

Keywords: Carboxymethyl-Chitosan; Selenium Carboxymethyl-Chitosan; Antioxidant Activity

硒化羧甲基壳聚糖的抗氧化作用研究[#]

孙良¹, 覃仙玲², 杨艳³, 赵小菁¹, 范圣第¹, 金黎明^{1*}

¹大连民族学院生命科学院, 大连

²暨南大学生命科学学院, 广州

³中国海洋大学海洋生命学院, 青岛

Email: jlm@dlnu.edu.cn

收稿日期: 2011 年 9 月 17 日; 修回日期: 2011 年 10 月 14 日; 录用日期: 2011 年 11 月 8 日

摘要: 采用邻二氮菲-Fe²⁺氧化法、邻苯三酚自氧化法以及总抗氧化能力试剂盒测定硒化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力。结果表明, 在实验设置的浓度范围内, 硒化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力随着浓度的增加而增加, 且硒化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力高于羧甲基壳聚糖。1 mg/mL 的硒化羧甲基壳聚糖对羟自由基的清除率为 42.68%, 对超氧阴离子自由基的清除率为 31.16%, 总抗氧化能力为 0.863 单位/mL。为研究低毒性、有效的有机补硒产品提供了思路。

关键词: 羧甲基壳聚糖; 硒化羧甲基壳聚糖; 抗氧化性

1. 引言

壳聚糖(chitosan)是甲壳素(chitin)的 N-脱乙酰基的产物, 因其良好的生物相容性、无毒性 and 可降解性被广泛应用于生物医药和保健等诸多领域。目前已有研究证明, 壳聚糖在化学水平、细胞水平和动物整体水平上具有一定的抗氧化作用^[1,2]。壳聚糖的缺点是难溶于水, 限制了其应用, 而羧甲基壳聚糖(carboxymethyl-chitosan)是壳聚糖经化学改性得到的水溶性衍生物, 其溶解性好、络合金属离子能力强, 扩大了壳

聚糖的应用范围, 可作为水处理的絮凝剂, 化妆品保湿剂, 果蔬的保鲜剂, 植物的生长促进剂, 药物辅料等^[3]。近年来的研究证实, 羧甲基壳聚糖也具有一定的抗氧化作用^[4,5]。

硒(selenium)是人体所必需的微量元素之一, 由于其本身具有极高的抗氧化能力, 因此它在延缓衰老、抗癌、增强人体免疫力等方面具有明显的功效, 甚至被人赞誉为“抗癌之王”。但是, 大多数无机硒化合物毒性比较大, 最低致死量相对较小, 因此应用受到极大的限制^[6]。所以, 寻找生物活性相对较高且毒性相对较低的有机硒替代品就成为给机体补硒的

[#]资助信息: 国家自然科学基金(21172028); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(DC110318, DC10040108)。

首要任务。目前已有研究表明,有机硒多糖作为补硒剂不仅稳定性好,溶出性高,而且释放出硒后配体多糖不会对机体产生毒副作用,是理想的补硒产品^[7,8],而对硒化壳聚糖的研究也引起了广泛的关注^[9,10]。但是,对硒化羧甲基壳聚糖(selenium carboxymethyl-chitosan)的研究较少。

本实验制备了硒化羧甲基壳聚糖,并采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法、邻苯三酚自氧化法以及总抗氧化能力试剂盒测定其抗氧化能力。

2. 材料与方法

2.1. 材料、试剂与仪器

羧甲基壳聚糖,实验室自制,羧基化度为 75.21%。总抗氧化能力试剂盒,上海天呈科技有限公司。亚硒酸钠、邻苯三酚、无水乙醇、过氧化氢、氢氧化钾、氯乙酸、邻二氮菲、硫酸亚铁、抗坏血酸(V_C)等均为国产试剂,分析纯。

SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),Seven Easy 型 PH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),UV-2100 型分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

2.2. 硒化羧甲基壳聚糖的制备

参考徐春兰等^[9]介绍的方法进行制备。准确称取羧甲基壳聚糖 1.0 g,加入 49 mL 的去离子水和 1 mL 1%的冰乙酸,搅拌溶解至澄清。将 1.33 g 亚硒酸钠溶于 10 mL 的去离子水中,缓慢加入到羧甲基壳聚糖溶液中,混匀后放置 2 h,使其充分反应。加入 3 倍体积的无水乙醇,室温条件下过夜醇析,抽滤,再用无水乙醇洗涤 2 次,冷冻干燥即得硒化羧甲基壳聚糖样品。

2.3. 清除羟自由基的测定

采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法测定硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖清除羟自由基的能力,并以 V_C 为对照实验^[11]。

1) 在试管中依次加入 0.2 mmol/L PBS 2 mL、去离子水 1 mL,摇匀;加入 0.75 mmol/L FeSO_4 1 mL,充分混匀;加入 0.01% H_2O_2 1 mL,振荡 1 min;加入 0.75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液 1 mL,37°C 水浴

60 min。用分光光度计于 $\lambda = 536 \text{ nm}$ 处检测反应体系的吸光度值 A_p 。

2) 以 1 mL 去离子水替代(1)中的 1 mL H_2O_2 ,其余条件同(1),测其吸光度值 A_b 。

3) 分别以不同浓度样品 1 mL 替代(1)中的去离子水,测其吸光度值 A_{s1} 。

4) 分别以不同浓度 V_C 溶液 1 mL 替代(1)中的去离子水,测其吸光度值 A_{s2} 。

5) 按以下公式计算测试物及阳性对照物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率(d):

$$d = \left(\frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \right) \times 100\%$$

2.4. 清除超氧阴离子自由基的测定

采用邻苯三酚自氧化法测定硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖清除超氧阴离子的能力,并以 V_C 为对照实验。

1) 取 4.5 mL Tris-HCl 加入 0.1 mL 样品溶液,混匀后在 25°C 下预热 20 min;然后加邻苯三酚 0.4 mL,在 25°C 下继续保持 4 min,加 0.5 mL 浓盐酸终止反应。在 325 nm 波长处测吸光度为 A_i ;

2) 用 0.4 mL 的去离子水代替(1)中的 0.4 mL 邻苯三酚,其余操作同上,测其吸光度为 A_j ;

3) 空白管:用 0.1 mL 去离子水代替 0.1 mL 样品溶液,吸光值为 A_o ;

4) 计算各管对超氧阴离子的清除率(d):

$$d = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_o} \right) \times 100\%$$

2.5. 总抗氧化能力的测定

分别取 0.100 g 的硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖,加水定容到 100 mL,配制成 1 mg/mL 的样品溶液。按照总抗氧化能力试剂盒说明书进行操作,在 520 nm 处测吸光值,并根据公式进行计算。

$$\text{总抗氧化能力} = \frac{\text{ODu} - \text{ODc}}{0.01} \div 30 \times N \times n \text{ (单位/mL)}$$

式中,ODu:测定管吸光度值;

ODc:对照管吸光度值;

N:反应体系稀释倍数(反应总体积/取样量);

n:样本测试前稀释倍数。

总抗氧化能力单位定义: 在 37°C 时, 每分钟每毫升样本中使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位。

3. 结果与讨论

3.1. 硒化羧甲基壳聚糖对羟自由基的清除作用

由图 1、图 2 可见, 硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖都具有一定的抗氧化能力; 且其抗氧化能力都随着浓度的升高而增强; 相同浓度的硒化羧甲基壳聚糖抗氧化能力要高于羧甲基壳聚糖, 且随浓度升高, 这种趋势愈明显。以浓度为 1 mg/mL 的硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖为例, 在此浓度下, 他们对羟自由基的清除率分别为 42.68% 和 35.18%, 接近于浓度为 0.5 mg/mL 的 V_C 对羟自由基的清除率。

Fenton 反应是体内产生羟自由基(OH·)的重要机理, OH· 是造成组织脂质过氧化, 蛋白质解聚, 核酸断裂, 多糖解聚的重要活性氧, OH· 清除率是反映抗氧化剂的抗氧化作用的重要指标。因此, 本实验结果可作为硒化壳寡糖抗氧化作用的一个证据。

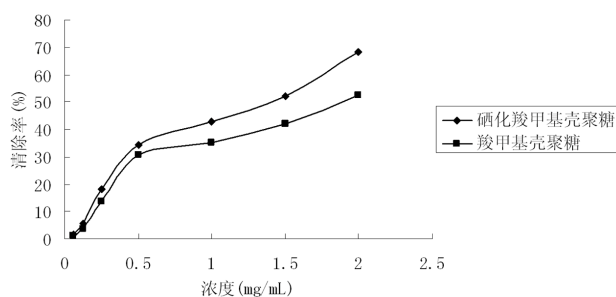


Figure 1. Curve: Clearance rates on OH· of selenium carboxymethyl-chitosan and carboxymethyl-chitosan

图 1. 硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖对 OH· 的清除率曲线

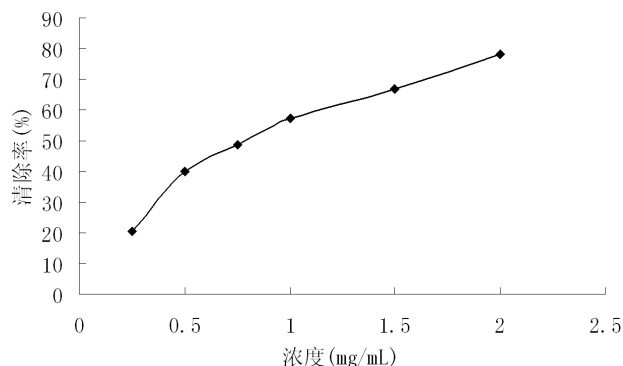


Figure 2. Curve: Clearance rates on OH· of V_C

图 2. V_C 对 OH· 的清除率曲线

3.2. 硒化羧甲基壳聚糖对超氧阴离子的清除作用

由图 3、图 4 可见, 硒化羧甲基壳聚糖相对于羧甲基壳聚糖而言, 对超氧阴离子自由基具有更好的清除能力。以浓度为 1.0 mg/mL 的硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖为例, 其对超氧阴离子自由基的清除率分别为 31.16% 和 22.94%, 接近于浓度为 0.5 mg/mL 的 V_C 对超氧阴离子自由基的清除率。本方法测得的结果与邻二氮菲-Fe²⁺法测定的结果基本一致。

利用某些体系在氧化过程中有超氧阴离子自由基(O²⁻·)的生成, O²⁻·与某些化合物的作用, 产生具有特定吸收的有色物质, 利用分光光度计进行测定。受试物若能清除 O²⁻·, 则吸光度发生变化, 可间接判断受试物对 O²⁻·的清除作用。邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化, 自氧化过程中产生 O²⁻·, O²⁻·又加速邻苯三酚自氧化速率, 同时产生有色中间物质, 有色中间产物的积累在滞后 30 s~45 s 与时间成良好的线性关系, 一般维持 4 min, 随后减慢。有色中间产物在 325 nm 有强烈的光吸收。由于自氧化的速率依赖于 O²⁻·的浓度,

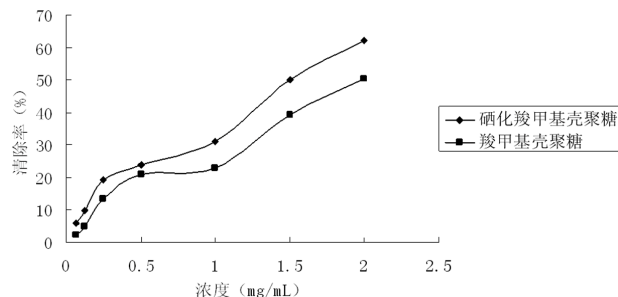


Figure 3. Curve: Clearance rates on O²⁻· of selenium carboxymethyl-chitosan and carboxymethyl-chitosan

图 3. 硒化羧甲基壳聚糖和羧甲基壳聚糖对 O²⁻· 的清除率曲线

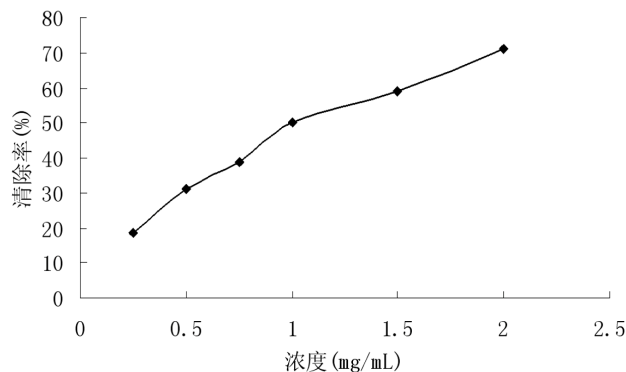


Figure 4. Curve: Clearance rates on O²⁻· of V_C

图 4. V_C 对 O²⁻· 的清除率曲线

消除 O^{2-} 则抑制自氧化反应, 阻止中间产物的积累, 从而评价受试物清除 O^{2-} 的能力^[12]。

3.3. 硒化羧甲基壳聚糖的总抗氧化能力

通过计算可得, 硒化羧甲基壳聚糖的总抗氧化能力为 0.863 单位/mL, 高于羧甲基壳聚糖的总抗氧化能力 0.493 单位/mL。

4. 结论

本实验以亚硒酸钠和羧甲基壳聚糖为原料, 合成了一种新型的有机硒产品——硒化羧甲基壳聚糖。通过邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法、邻苯三酚自氧化法以及总抗氧化能力试剂盒测定其抗氧化能力, 结果表明, 在实验设置的浓度范围内, 硒化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力随着浓度的增加而增加, 由于分子中引入了硒这种具有抗氧化能力的元素, 其抗氧化能力要高于单一的羧甲基壳聚糖, 并且随浓度升高, 这种趋势愈加明显。

本实验结果表明, 合成的硒化羧甲基壳聚糖是一种具有较好抗氧化能力的有机硒多糖, 为进一步研究低毒性、高活性的有机补硒剂提供了思路与参考。

5. 致谢

本实验由国家自然科学基金(21172028), 中央高

校基本科研业务费专项资金资助项目(DC110318, DC10040108)资助。特此感谢。

参考文献 (References)

- [1] 金黎明, 杨艳, 刘万顺等. 壳寡糖及其衍生物对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(理学版), 2007, 42(7): 1-4.
- [2] 金黎明, 郑奕, 杨艳等. 壳聚糖及其衍生物的抗氧化作用研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 66-68.
- [3] 王海青. 壳聚糖及其衍生物的开发及应用[J]. 日用化学工业, 2003, 12(5): 18-22.
- [4] 林友文, 林青, 郑景峰等. 壳聚糖、羧甲基壳聚糖的降脂及抗氧化作用[J]. 中国海洋药物, 2003, 3: 16-19.
- [5] 丁诚实, 沈业寿, 彭世奇. 羧甲基壳聚糖抗衰老作用的研究[J]. 实用老年医学, 2006, 20(3): 171-173.
- [6] 孔涛, 曲韵笙, 朱连勤等. 壳聚糖硒的合成及其理化性质[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 21.
- [7] 尚德静, 李庆伟, 崔乔等. 灵芝多糖 SeGLP-1 抗氧化与抗肿瘤作用的研究[J]. 营养学报, 2002, 24(3): 249-251.
- [8] 张宏莲, 傅中滇, 陈婉蓉. 硒云芝多糖对小鼠脏器组织及全血抗氧化能力的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2001, 19(3): 192-194.
- [9] 徐春兰, 钦传光, 朱卫宁等. 硒化壳聚糖的制备及其体外抗氧化活性研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(9): 45-48.
- [10] 曲韵笙, 朱连勤. 壳聚糖硒对小鼠的抗氧化作用研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2009, 26(1): 12-14.
- [11] 范冠宇, 谢虹, 吴志刚. 水溶性几丁聚糖对羟自由基的清除作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(6): 676-677.
- [12] 张海容. 沙棘多糖和黄酮清除氧自由基的研究[J]. 化学通报, 2006, 6: 25-30.