

研究简报

水溶性甲壳胺对卵磷脂氧化的抑制作用  
ANTIOXIDATIVE EFFECT OF WATER SOLUBLE CHITOSAN  
TO PHOSPHATIDYLCHOLINE

于广利 薛长湖 楼伟凤 徐家敏

(青岛海洋大学, 266003)

Yu Guangli Xue Changhu Lou Weifeng Xu jiamin

(Ocean University of Qingdao, 266003)

关键词 卵磷脂, 低聚甲壳胺, N,O-羧甲基甲壳胺, 羟丙基甲壳胺, 抗氧化

KEY WORDS PC, OLC, NOCC, HPC, Antioxidation

甲壳质资源丰富, 制备简单, 甲壳质脱乙酰基后得到甲壳胺, 甲壳胺由于具有溶于稀酸的性质, 使之具有很多甲壳质所没有的性质, 尤其随着近年来对甲壳质及甲壳胺衍生物研究的深入发展, 使该系列产品在化工、纺织、印染、造纸、烟草、照相、化妆品、超滤、生物医学、医疗卫生、废水处理、药物制剂等领域得到广泛应用, 从而创造了较大的经济效益<sup>[1-4]</sup>。

水溶性甲壳质或水溶性甲壳胺的制备是甲壳质衍生物研究引人瞩目的一个分支。它的合成方法根据其应用方向的不同而不同。如水溶性硫酸化甲壳胺作为抗凝剂(DP, 530); 水溶性低分子甲壳胺作为抑菌、保鲜剂; 羧甲基甲壳质可作为前药控释剂; O-羧甲基甲壳胺, N-羧甲基甲壳胺及N,O-羧甲基甲壳胺可作为金属离子螯合剂、食品保鲜剂; 羟丙基甲壳胺、磷酸化甲壳质, 羧甲基甲壳质与甲壳胺等水溶性甲壳质衍生物已成功应用于化妆品<sup>[5-8]</sup>。

本文参照文献制备了N,O-羧甲基甲壳胺、羟丙基甲壳胺及低聚甲壳胺三种水溶性甲壳胺衍生物, 研究了它们在自由基引发氧化下, 对卵磷脂的抗氧化作用。该三种衍生物为天然线性聚离子化合物, 属海洋新材料, 虽已在上面提到的诸多领域得到广泛应用, 但在抑制脂质氧化方面的研究, 目前尚无人开展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 冰醋酸(A.R.); 氯乙酸(A.R.); AAPH(日本);  $\alpha$ -dl-VE(日本); 三羟甲基氨基甲烷(EDH进口分装); 甲壳胺(自制); 其他试剂均为A.R.级。

1.1.2 仪器 液体快速混合器(KH-1型); HITACHI-655型高压液相色谱仪; 电动恒速搅拌器(JJ-1型); 超滤器(H-60型); 超滤膜(德国Kalle公司, 截留分子量4000-8000); 721型可见分光光度计(上海二分仪器厂); DDS-11A型电导率仪。

收稿日期: 1996-07-15。

## 1.2 实验方法

1.2.1 N,O-羧甲基甲壳胺的制备<sup>[9]</sup> 取甲壳胺一定量,用0.5%的稀醋酸溶解,用200目筛绢过滤,除去不溶物。在搅拌下,将滤液缓慢倒入碱性乙醇溶液进行再生,收集白色沉淀,水洗至中性,用丙酮脱水,60℃减压干燥,将再生甲壳胺(RCHS)放于干燥器中备用。取一定量的RCHS,放于三口瓶中,加入一定量的无水乙醇,在室温下膨胀1-2小时,置恒温水浴中,接回流装置,在不断搅拌下加入一定浓度的氢氧化钠,反应一定时间后,分数次加入计量的氯乙酸,继续反应一定时间后,停止搅拌。将反应产物从三口瓶中倒入烧杯,加入适量的冰醋酸,调节pH近中性,减压抽滤,用75%乙醇反复洗涤,将产品洗至中性,用丙酮脱水,60℃减压干燥得到白色粉末样品。

利用苯甲醛和甲壳胺反应,于410nm测定OD值,作出标准曲线。从标准曲线上查出相应的伯胺浓度,计算出伯胺含量(NH<sub>2</sub>%)。总羧甲基度(CMT%)用电导率仪进行测定。则:N-羧甲基度(NCM%)=75.54% - NH<sub>2</sub>%;O-羧甲基度(OCM%)=CMT% - NCM%。实验所得样品的取代度及在水溶液(pH7左右)中的溶解性见表1。

表1 NOCC分子中O-与N-羧甲基度及在水溶液中的溶解性

Table 1 The Carboxymethyl substitution and solubility of NOCC

| 样品号(No)           | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| CMT%              | 93.3 | 79.8 | 82.8 | 129  | 146  | 98.2 | 80.6 | 87.6 | 90.4 |
| NCM%              | 60.7 | 33.5 | 43.5 | 71.0 | 75.4 | 63.6 | 37.8 | 49.8 | 53.4 |
| OCM%              | 32.6 | 46.3 | 39.3 | 58.0 | 70.4 | 34.6 | 42.8 | 37.8 | 37.0 |
| 溶解性<br>solubility | ±    | ±    | +    | ++   | ++   | ±    | ±    | +    | -    |

注: + 代表溶解性; ± 微溶; - 不溶; ++ 全溶

由表1可以看出,所得样品由于制备条件的不同,其N-及O-羧甲基度有很大的差别,从而使各样品的溶解性也不同。从溶解性来看,在中性条件下No.4, No.5样品能完全溶解。这两个样品不但NCM%高,而且OCM%也较高。本文仅以No.4样品(NCM%71; OCM%58)为对象,研究它在一定浓度下对PC氧化的抑制作用。

取适量NOCC(No.4)溶于100倍水中,0.45μm的微孔滤抽滤,用丙酮脱水再生,60℃烘干。重蒸水(含10mM Tris-Buffer)溶解,配成贮存液。

1.2.2 羟丙基甲壳胺的制备<sup>[10]</sup> 将RCHS在碱性(NaOH 2.5M)异丙醇中膨胀24h,加入10-20倍环氧丙烷,35℃下回流反应48h。减压抽滤,用超纯水溶解后再抽滤,向滤液中加入足量丙酮使HPC沉出,过滤。将HPC用重蒸水溶解,再加丙酮精制,60℃干燥,用Tris-Buffer(pH7.4)溶解,配成贮存液。

1.2.3 低聚甲壳胺的制备<sup>[11]</sup> 取精制甲壳胺,加200倍10M HCl,53℃回流降解24-72h,用KOH中和,活性炭脱色,0.45μm滤膜抽滤,然后超滤,加100倍丙酮4℃放置5h,得到米黄色沉淀物,真空干燥,于-20℃冰箱中保存备用。临用前用Tris-Buffer(pH7.4)溶解,配成贮存液。

1.2.4 PC-OOH的测定 HPLC分析条件: Spherisorb-C<sub>8</sub>, 5μm, 5.0×150mm; UV 235nm; 流动相: 甲醇/水(95/5); 流速: 1.0ml/min; 进样量: 10μl。

## 1.3 水溶性甲壳胺对PC氧化的抑制实验

1.3.1 相同浓度下NOCC、HPC及OLC对PC氧化的抑制实验 各实验组的成份组成如下: 对照组: 5mM PC, 100μl AAPH, 10mM Tris-Buffer; 维生素C组: 5mM PC, 100μl AAPH, 10mM Tris-Buffer, V<sub>C</sub>(0.2%, w/w); 维生素E组: 5mM PC, 100μl AAPH, 10mM Tris-Buffer, V<sub>E</sub>(0.3%, w/w); N,O-羧甲基甲壳胺组: 5mM PC, 100μl AAPH, 0.3% NOCC(w/w); 羟丙基甲壳胺组: 同NOCC组(0.32%, w/w); 低聚甲壳胺组: 同NOCC组(0.32%, w/w)。

氧化步骤: 先将PC超声乳化, 然后, 37℃培养5min, 加入100μl AAPH(0.1M)自由基引发剂引发, 每隔一

定时间取  $10\mu\text{l}$  用高压液相色谱分析测定 PC-COOH 含量。

1.3.2 不同浓度 OLC 对 PC 氧化的抑制实验 取  $50\mu\text{l}$  PC(0.1M),  $\text{N}_2$  吹干, 加入一定量的 OLC(加量分别为 PC 的 0.1%, 0.3%, 3% 和 10%), 超声乳化, 补加 Tris-Buffer, 使总体积为 1.0ml, 快速混合 1min, 于  $37^\circ\text{C}$  恒温 5min, 立即加入  $100\mu\text{l}$  AAPH(0.1M) 引发, 其它步骤同上。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三种水溶性甲壳胺对 PC 氧化的抑制

相同浓度(0.3%)下, 三种水溶性甲壳胺对 PC/AAPH 氧化体系中 PC 氧化的抑制情况见图 1。

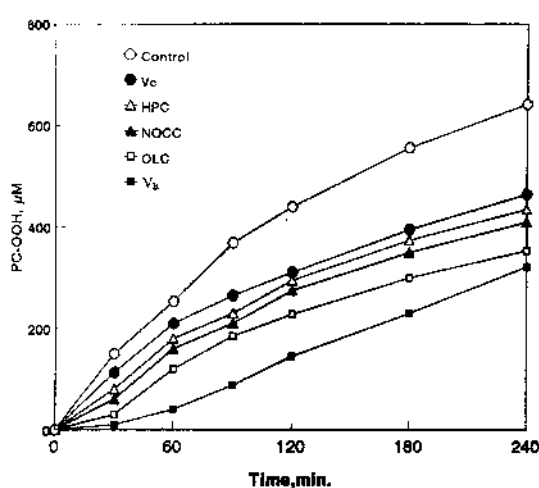


图 1 三种水溶性甲壳胺对 PC 氧化的抑制作用

Fig.1 The antioxidative effects of three water soluble chitosan to PC

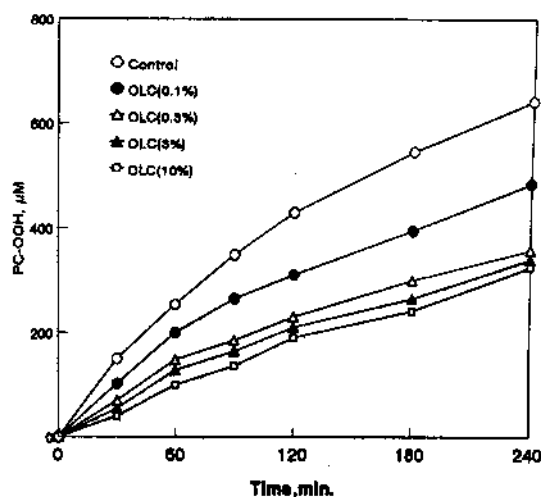


图 2 不同浓度的 OLC 对 PC 氧化的抑制情况

Fig.2 The antioxidative effects of different concentration of OLC to PC

从图 1 可知, 在相同浓度下, OLC, NOCC 及 HPC 对 PC 氧化都有一定的抑制作用, 效果明显好于对照组, 且较 0.2% 的  $\text{V}_\text{C}$  效果好, 但均较 0.3% 的  $\text{V}_\text{E}$  效果差。从该类多糖的分子结构可知, OLC 较 NOCC 效果好, 也许是由于前者具有较多游离的  $-\text{NH}_2$ , 易和卵磷脂发生亲合作用, 从而起到延迟 PC 的氧化所致, HPC 分子中含有较多的羟丙基, 水溶性较好, 虽抗氧化效果不如 OLC, 但在其它方面却显示独特的作用。在实际应用中, NOCC 与 OLC 已在食品上被作为防腐、保鲜剂, 也有报道将甲壳胺作为脂类络合剂。另外, 德国和日本已将 HPC 用于化妆品中, 并申请了专利; NOCC 已用于水果、蔬菜及水产品的保鲜上。

### 2.2 OLC 对 PC 氧化的抑制

不同浓度的 OLC 对 PC 氧化的抑制情况见图 2。

从图 2 可以看出, OLC 浓度过低时, 抗 PC 氧化的效果不好, 浓度越大抗氧化效果越好。比较 3% 与 10% 的抗氧化效果, 虽然 10% 的效果比 3% 好些, 但二者的差异不大, 说明了过多地增加 OLC 的浓度, 并不能完全抑制 PC 的氧化。实验中发现, 当 OLC 浓度大于 3% 后, 所得到的卵磷脂乳化体系不稳定, 放置一定时间后出现分层现象, 当 OLC 浓度增到 10% 时, OLC 与 PC 相互作用, 稍微静置即产生沉淀, 而混合后又可形成乳浊液。由于 OLC 量的多少对 PC 的存在形态影响极大, 所以测定 PC-COOH 时, 必须保证乳化体系的均匀稳定性, 否则将影响结果的准确性。

从以上的研究结果可看出:水溶性甲壳胺具有抑制多不饱和脂质(如 PC)氧化的作用,浓度增高将有益于提高其抗氧化性能。本文从水溶性甲壳胺对脂类的结合,包容作用出发,探讨了 OLC、NOCC 及 HPC 在 PC/AAPH 乳化体系中,对 PC 氧化的抑制情况,但对其抗氧化的详细机理没有进一步探讨,然就甲壳胺及其衍生物具有延缓多不饱和脂质氧化这一点来看,对于将水溶性甲壳胺用于多脂鱼类或其它含不饱和脂质的食品的保鲜上具有实际意义。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 曾宪放等,1994. 甲壳质和甲壳胺的化学修饰及应用. 中国海洋药物, 4:29-34.
- [ 2 ] 于广利等,1994. 甲壳胺回收食品加工废水中蛋白研究. 海洋科学,3:1-4.
- [ 3 ] 于广利等,1996. 水溶性壳多糖的制备及其对铅离子螯合作用. 中国海洋药物,15(4):13-17.
- [ 4 ] 于广利等,1995. 甲壳胺和 N-亚甲基甲壳胺对贻贝酶解液中氨基酸吸附性研究. 中国水产科学,2(3):63-67.
- [ 5 ] 于广利等,1994. 不同聚合度壳多糖对鲜鱼鲜猪肉保鲜作用. 中国海洋药物,3:45-49.
- [ 6 ] 于广利等,1995. 新型虾保鲜剂(PPR-1)在对虾保鲜中的应用. 青岛海洋大学学报,25(2):180-186.
- [ 7 ] 黑川 秀雄,1987. 毛发化妆料组成物,IP 昭 62-221615.
- [ 8 ] Yu Guangli et al., 1996. Effects of low molecular weight chitosan(LMC-1) on shrimp preservation. *Chn. J. of Oceano. and Lim.* 14(2): 189-192.
- [ 9 ] Muzzarelli RAA et al., 1988. Carboxymethylated chitins and chitosans. *Carbohydr. Res.* 8: 1-21.
- [10] Gerhard Maresch et al., 1989. Hydroxypropylation of chitosan. *Chitin and hitosen, Gudmund Skjak - Break (ed). Elsevier Sci. Publisher Ltd., England: 389-395.*
- [11] Sylvia T.H., et al., 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79: 5046-5049.