

# Synthesis and Antioxidant Activity of Carboxymethyl Chitosan-Fe

Shengyue Xiao, Jiahui Zhang, Liming Jin\*, Zhicheng Liu, Wanli Wu, Yuan Wu

College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian

Email: [jlm@dlnu.edu.cn](mailto:jlm@dlnu.edu.cn)

Received: May 14<sup>th</sup>, 2014; revised: May 20<sup>th</sup>, 2014; accepted: May 29<sup>th</sup>, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

The antioxidant activities *in vitro* of carboxymethyl chitosan-Fe which was synthesized before in our lab were investigated by pyrogallol autoxidation and DPPH method. The results showed that in the setting concentration range: 0.125 mg/mL - 2 mg/mL, the antioxidant activities increased with the elevation of concentration. The antioxidant activities of carboxymethyl chitosan-Fe were better than those of carboxymethyl chitosan. The clearance rates of superoxide anion free radical and DPPH of 2.0mg/mL carboxymethyl chitosan-Fe were 62.68% and 56.12%. The results proved the successful synthesis of carboxymethyl chitosan-Fe and it may become a multi-function organic ferruginous polysaccharide type.

## Keywords

Carboxymethyl-Chitosan, Carboxymethyl Chitosan-Fe, Antioxidant Activity

# 铁化羧甲基壳聚糖的抗氧化作用研究

肖升月, 张佳惠, 金黎明\*, 刘致铖, 吴万利, 吴 渊

大连民族学院生命科学学院, 大连

Email: [jlm@dlnu.edu.cn](mailto:jlm@dlnu.edu.cn)

收稿日期: 2014年5月14日; 修回日期: 2014年5月20日; 录用日期: 2014年5月29日

\*通讯作者。

## 摘要

目前的补铁剂正在向多糖铁方向发展,本文在前期成功合成了铁化羧甲基壳聚糖的基础上,采用邻苯三酚自氧化法、DPPH法测定铁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0.125 mg/mL~2 mg/mL内,铁化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力随着浓度的增加而增加,且铁化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力高于羧甲基壳聚糖。2.0 mg/mL的铁化羧甲基壳聚糖对超氧阴离子自由基的清除率为62.68%,对DPPH自由基的清除率为56.12%。结果提示,铁化羧甲基壳聚糖有望开发成为一种具有多重功能的生物多糖型补铁剂。

## 关键词

羧甲基壳聚糖, 铁化羧甲基壳聚糖, 抗氧化性

## 1. 引言

壳聚糖是一种从虾、蟹等动物中提取的天然碱性高分子多糖,具有良好的生物相容性、生物可降解性、抗癌和抗菌等作用,已被开发成了功能保健食品[1] [2]。由于壳聚糖不能直接溶解于水,故其应用也受到限制,壳聚糖经羧甲基化反应后生成的一类衍生物称为羧甲基壳聚糖,其具有良好的水溶性、保湿性、乳化性,而且由于羧基的引入,使其结合金属离子的能力与壳聚糖相比大大提高,其金属配合物在工业、农业、食品、环保、医药等方面的应用已有许多研究[3] [4]。另外,目前已有研究表明,壳聚糖和羧甲基壳聚糖具有一定的抗氧化作用[5] [6]。

缺铁性贫血是常见的营养缺乏病之一。长期以来,临床上一直首选硫酸亚铁制剂治疗缺铁性贫血,但硫酸亚铁的化学稳定性差,极易氧化成三价铁盐而不易被机体吸收,而且有明显的胃肠道刺激作用,不易被儿童接受。多糖是重要的生物大分子,具有配合多种金属离子的能力。近十几年来国内外对补铁剂的研究表明,多糖铁作为补铁剂不仅具有合适的配合稳定性,对胃肠道无或甚少刺激作用,而且当其释放铁之后配体多糖具有多种生物活性,可被机体吸收利用,提示多糖铁是一类很有前途的口服补铁剂[7] [8]。

笔者前期以三氯化铁和羧甲基壳聚糖为原料,成功合成了铁化羧甲基壳聚糖[9]。本文采用邻苯三酚自氧化法和DPPH法测定其抗氧化能力。

## 2. 试验部分

### 2.1. 试剂与仪器

试剂: 铁化羧甲基壳聚糖, 实验室自制。无水乙醇, 冰乙酸, 浓硝酸, 双氧水, 盐酸, 邻苯三酚, 邻二氮菲, 抗坏血酸( $V_C$ )等, 均为国产分析纯试剂。DPPH, Sigma 公司产品。

仪器: DF-101S 型恒温磁力搅拌器(巩义市英峪于华仪器厂); DHG-9070A 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); Seven Easy 型 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化能力

采用邻苯三酚自氧化法测定羧甲基壳聚糖和铁化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℃ 下预热 20 min; 然后加邻苯三酚 0.4 mL, 在 25℃ 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  $A_0$ 。
- (4) 计算各管对超氧阴离子的清除率( $d$ ):

$$d = \left( 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100\%$$

### 2.2.2. DPPH 法抗氧化能力

采用 DPPH 法检测羧甲基壳聚糖和铁化羧甲基壳聚糖清除 DPPH 自由基的能力, 以 VC 作对照实验 [10]。利用 DPPH 溶液的特征紫红色团的吸收, 用紫外-可见分光光度法测定加抗氧化剂提取液后在波长 517 nm 处吸收的下降, 表示其对有机自由基消除能力。按表 1 加反应液。

用力摇匀, 将  $A_i$  所表示的样品在室温下静置 30 min 后, 加入比色皿中进行吸光度的测定, 测出  $A_0$ 、 $A_i$ 、 $A_j$  所表示样品的吸光度值, 清除率按下面公式计算:

$$SA(\%) = 1 - (A_i - A_j) / A_0 \times 100\%$$

式中:  $A_0$ ——未加样品溶液的 DPPH 溶液的吸光度;

$A_i$ ——加入样品溶液后的 DPPH 溶液的吸光度;

$A_j$ ——单独样品溶液的吸光度。

绘制不同浓度样品 - 自由基清除速率曲线。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 铁化羧甲基壳聚糖对超氧阴离子的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化, 自氧化过程中产生  $O^{\cdot-}$ ,  $O^{\cdot-}$  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 30~45 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  $O^{\cdot-}$  的浓度, 消除  $O^{\cdot-}$  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  $O^{\cdot-}$  的能力 [11]。

从图 1 中可以看出, 在实验设置的浓度范围 0.125 mg/mL~2 mg/mL 内, 羧甲基壳聚糖和铁化羧甲基壳聚糖对超氧阴离子自由基均有不同程度的清除作用, 随着糖浓度的增加而增强, 且铁化羧甲基壳聚糖的清除能力更强, 可能是由于铁离子的引入, 使得化合物的抗氧化能力得以协同加强。以浓度为 2.0 mg/mL 的羧甲基壳聚糖和铁化羧甲基壳聚糖为例, 其对超氧阴离子的清除率分别为 42.20% 和 62.68%, 而 2.0 mg/mL 的 Vc 清除率为 41.98%。本文所采用的自由基模型体系产生的超氧阴离子自由基浓度远大于生物体内自由基的浓度, 因此, 铁化羧甲基壳聚糖是一种良好的自由基清除剂。

### 3.2. 铁化羧甲基壳聚糖对 DPPH 的清除作用

DPPH 分析法被广泛应用于清除自由基物质性质的研究。DPPH 是一种合成的有机自由基, 分子中由于存在多个吸电子的  $-NO_2$  和苯环的大  $\pi$  键, 所以氮自由基能稳定存在。DPPH 孤对电子在 517 nm 波长处有强吸收, 其乙醇水溶液呈很深的蓝紫色, 当加入具有抗氧化性的受试物后, 孤对电子被配对, 吸收消失或减弱, 在 517 nm 波长处可以动态监测 DPPH 被清除的效果, 这种效果通常用对 DPPH 的抑制率来表示。显然, 抑制率越大, DPPH 自由基清除越彻底, 受试物的抗氧化活性越强。

由图 2 可见, 在实验设置的浓度范围 0.375 mg/mL~2 mg/mL 内, 铁化羧甲基壳聚糖相对于羧甲基壳

Table 1. Sample volumes of DPPH experiment

表 1. DPPH 实验加样表

符号	加入量
$A_0$	2 ml DPPH溶液 + 2 ml无水乙醇
$A_i$	2 ml DPPH溶液 + 2 ml样品溶液
$A_j$	2 ml样品溶液 + 2 ml去离子水

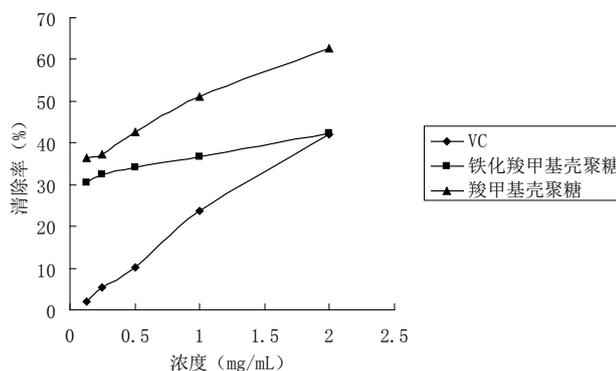


Figure 1. Curve of scavenging effect on superoxide radicals

图 1. 对超氧阴离子的清除率曲线

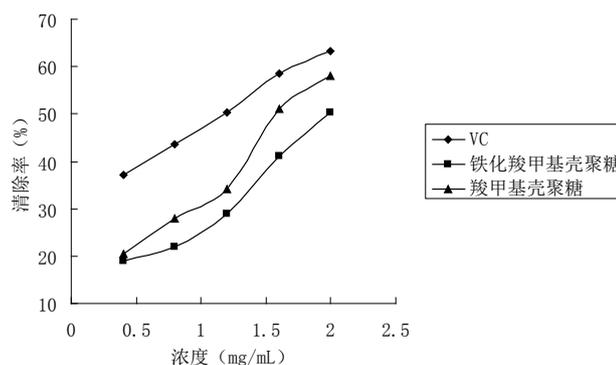


Figure 2. Curve of scavenging effect on DPPH

图 2. 对 DPPH 的清除率曲线

聚糖而言，对 DPPH 具有更好的清除能力，2.0 mg/mL 铁化羧甲基壳聚糖的清除率为 56.12%，这与超氧阴离子的实验结果较为一致。

#### 4. 结论

本实验采用邻苯三酚自氧化法、DPPH 法测定铁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 0.125 mg/mL~2 mg/mL 内，铁化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力随着浓度的增加而增加，且铁化羧甲基壳聚糖的抗氧化能力高于羧甲基壳聚糖，这可能是由于铁离子的引入，使得化合物的抗氧化能力得以协同加强。实验结果提示，铁化羧甲基壳聚糖有望开发成为一种具有多重功能的生物多糖型补铁剂，其生物生理活性还有待于进一步研究。

#### 基金项目

辽宁省教育厅项目(L2013510); 中央高校基本科研业务费(DC110318); 大连民族学院大学生创新创

业训练计划资助项目(X2013033); 大连民族学院“太阳鸟”项目。

### 参考文献 (References)

- [1] 张伟, 林红, 陈宇岳 (2006) 甲壳素和壳聚糖的应用及发展前景. *南通大学学报(自然科学版)*, **1**, 30-33.
- [2] 潘雪龙, 彭湘红 (2000) 甲壳素壳聚糖及其衍生物在医药工业中的应用. *湖北化工*, **2**, 3-5.
- [3] 张新娜, 孙君社, 王淑豪, 等 (2011) 羧甲基壳聚糖亚铁配合物的表征及其对 CO 的吸附研究. *高等化学工程学报*, **1**, 91-95.
- [4] 王海青 (2003) 壳聚糖及其衍生物的开发及应用. *日用化学工业*, **5**, 18-22.
- [5] 金黎明, 郑奕, 杨艳, 等 (2008) 壳聚糖及其衍生物的抗氧化作用研究. *食品与发酵工业*, **11**, 66-68.
- [6] Jeon, T.I., Hwang, S.G., Park, N.G., et al. (2003) Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*, **187**, 67-73.
- [7] 党真 (2010) 壳聚糖铁的合成及其铁含量的测定. *武汉理工大学学报*, **24**, 45-47.
- [8] 朱凤华, 王吉才, 朱连勤, 等 (2009) 壳聚糖铁对仔猪生长性能及免疫功能的影响. *畜牧与兽医*, **8**, 29-32.
- [9] 金黎明, 全文颖, 李春超, 等 (2013) 铁化羧甲基壳聚糖的合成及结构表征. *化学世界*, **9**, 533-534, 564.
- [10] 胡喜兰, 韩照祥, 陶莹, 等 (2006) DPPH·法测定 17 种植物的抗氧化活性. *食品科技*, **10**, 264-268.
- [11] 张海容 (2005) 沙棘果皮多糖清除氧自由基的活性研究. *植物学通报*, **6**, 703-707.