



钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖的制备及其抗氧化活性的评价

刘广洋^{1,2}, 冯大伟¹, 靳志明^{1,2}, 刘胜一^{1,2}, 衣悦涛^{1*}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 对合成的钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖的结构进行红外光谱分析, 并利用ICP-MS测定钒的含量分别为2.9%和3.2%。同时对钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖清除羟基自由基与DPPH自由基的能力进行研究, 结果表明, 钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖清除DPPH·的能力和清除·OH的能力均比配体的清除能力有显著提高。此外, 对钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖清除羟基自由基和DPPH自由基的机理进行了讨论。

关键词: 钒氧海藻糖; 钒氧羧甲基海藻糖; 抗氧化; 羟基自由基; DPPH自由基

中图分类号: Q 539

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2013)07-0246-05

Preparation and antioxidant activity of synthesized vanadyl (IV) trehalose and vanadyl (IV) carboxymethyl trehalose

LIU Guang-yang^{1,2}, FENG Da-wei¹, JIN Zhi-ming^{1,2}, LIU Sheng-yi^{1,2}, YI Yue-tao^{1*}

(1.Yantai Institute of Coastal Zone Research Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003; 2.Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Vanadyl trehalose and vanadyl carboxymethyl trehalose were characterized by infrared spectroscopy (IR) and Inductively coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). The mass fraction in vanadyl trehalose and vanadyl carboxymethyl trehalose was 2.9% and 3.2%, respectively. The antioxidant activity of oxovanadium (IV) complexes was investigated employing in vitro systems including

收稿日期: 2012-12-18

*通讯作者

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业专项(2011418027)。

作者简介: 刘广洋(1987—), 男, 山东东阿人, 硕士研究生, 研究方向为海岸带资源化学的研究。

下, 结晶收率可达45%, 最终制得结晶塔格糖的含量达99.35%。塔格糖结晶条件的确定为塔格糖的工业化生产奠定了基础。

参考文献:

[1] 袁尔东. 功能性甜味剂塔格糖的生产及应用[J]. 食品与发

酵工业, 2005:31(1), 109-113

[2] 刘德海. 提高蔗糖结晶效率的研究进展[J]. 广东化工, 2006:33(07):14-17

[3] Takehiro Unno, Fuji-shi, et al. Process For Producing Crystalline Tagatose[P]. US Patent:20050188912A1, 2005-09-01



hydroxyl and DPPH radical scavenging methods. The in vitro antioxidant results revealed that the hydroxyl radical scavenging activities of the oxovanadium complexes were stronger than their ligands and DPPH scavenging activities of the oxovanadium complexes were also enhanced by complications. Furthermore, the mechanism of their antioxidant activities was discussed.

Key words: vanadyl trehalose; vanadyl carboxymethyl trehalose; antioxidant activity; hydroxyl radical; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

海藻糖(trehalose)是由两个吡喃型葡萄糖单体以1,1糖苷键连结而成的非还原性双糖^[1]。海藻糖理论上存在3种正位异构体,即 α -型、 β -型、 γ -型,通常所说的海藻糖是 α -型异构体,其余2种在自然界中很少见。海藻糖最常见的存在形式是二水化合物,分子式为 $C_{12}O_{22}H_{11} \cdot 2H_2O$,熔点为97℃,当加热到130℃时,失去结晶水,无水海藻糖熔点为214~216℃^[2]。由于结构明显不同于其他低聚糖,海藻糖具有很强的热稳定性、酸稳定性和化学稳定性,对生物体和生物分子具有独特的非特异性保护作用。研究表明,许多物种在饥饿、高温、冷冻、干燥等胁迫环境下表现出的抗逆耐受能力与它们体内存在的海藻糖的含量有直接关系。因此,海藻糖广泛应用于生物制品、食品、药品及作物育种等领域。

钒是人和动物必需的微量元素之一,具有类胰岛素、降血糖、抗癌症、抑制胆固醇合成及预防龋齿等作用。1985年,Heylig等的研究^[3]证实了钒的类胰岛素作用和降血糖作用。随后,科学工作者对无机钒化合物的生物活性进行了研究,发现这些钒化合物均具有良好的降血糖和抗癌活性,但是副作用比较明显。因此,对有机钒化合物的研究应运而生。和无机钒化合物相比,有机钒化合物脂溶性好、生物利用度高、毒副作用小,更适合开发成药物。钒氧海藻糖^[4]抑制UMR106癌细胞增殖的作用已有研究,但是钒氧海藻糖、钒氧羧甲基海藻糖的抗氧化功能研究尚未见报道。

本实验以海藻糖为原料,通过羧甲基化得到羧甲基海藻糖,海藻糖和羧甲基海藻糖分别与硫酸氧钒络合得到钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖,并对钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖的抗氧化功能进行了研究,为其在食品、医药、保健品方面的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和药品

TU-1810紫外可见分光光度计:北京普析通用化学有限责任公司;FTIR-4100红外光谱仪:日本Jasco公司;ELAN DRC II电感耦合等离子体质谱仪:PerkinElmer(Hong Kong)Ltd.

海藻糖:阿拉丁试剂中国有限公司;DPPH:日本和光纯药工业株式会社;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 羧甲基海藻糖的制备

将4 g海藻糖倒入带有机机械搅拌装置的三颈烧瓶中,加入100 mL蒸馏水溶解,加入60 mL 1mol/L的NaOH溶液碱化1 h。然后分3次加入4.8 g氯乙酸,60℃下反应4 h并始终保持溶液pH大于9。滴加乙酸调pH值至7.0,真空浓缩,浓缩液用无水乙醇沉淀,沉淀用70%乙醇洗涤多次。产物溶于少量水,加入丙酮沉淀,抽滤,用无水乙醇洗涤多次,45℃真空干燥过夜得白色产品。

1.3 钒氧海藻糖衍生物的制备

将1 g海藻糖(羧甲基海藻糖)溶于20 mL蒸馏水中,40% NaOH溶液调pH到12,在整个反应过程中始终保持溶液pH 12。30℃水浴下搅拌30 min,加入0.25 g $VOSO_4$,反应4~8 h至溶液变澄清透明。反应液浓缩醇沉,沉淀用70%乙醇洗涤多次。产物溶于少量水,加入丙酮沉淀,抽滤,用无水乙醇洗涤多次,45℃真空干燥24 h得绿色固体产品。

1.4 羧甲基海藻糖和钒氧海藻糖衍生物结构的鉴定

取样品1~2 mg, KBr压片,在JASCO FTIR-4100红外光谱仪上进行红外分析。

1.5 钒含量的测定

按照ICP-MS水/废水中低含量金属离子的测定标准测定钒氧海藻糖衍生物中钒的含量。



1.6 羧甲基海藻糖和钒氧海藻糖衍生物抗氧化活性实验

1.6.1 对羟基自由基的清除作用 参照文献的方法[5]并稍作调整,反应体系含有0.15 mmol/L、pH7.4磷酸缓冲溶液1 mL,80 mg/L番红花红1 mL,0.03%的H₂O₂ 1 mL,0.945 mmol/L EDTA-Fe 1 mL,不同浓度的糖溶液0.5 mL,混合均匀后于37℃水浴中保温30 min,然后以蒸馏水调零测定520 nm处吸收值。清除率E%为:

$$E\% = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100$$

式中: A₁为加入糖溶液后的吸光值;

A₂为以对应体积的蒸馏水代替糖溶液吸光值;

A₃为以对应体积的蒸馏水代替EDTA-Fe()和糖溶液的吸光值。

1.6.2 对DPPH自由基的清除^[6] 用95%的乙醇准确配制浓度为 2×10^{-4} mol/L的DPPH溶液,取2 mL的DPPH溶液,2 mL不同浓度的糖溶液加入10 mL比色管中。混合均匀后避光放置30 min,然后以95%乙醇做参比测定525 nm处吸光值。清除率F%为:

$$F\% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$$

式中: A_i为加入糖溶液后的吸光值;

A_j为以对应体积的95%乙醇代替DPPH溶液的吸光值;

A_c为以对应体积的95%乙醇代替糖溶液的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 羧甲基海藻糖和钒氧海藻糖衍生物结构的鉴定

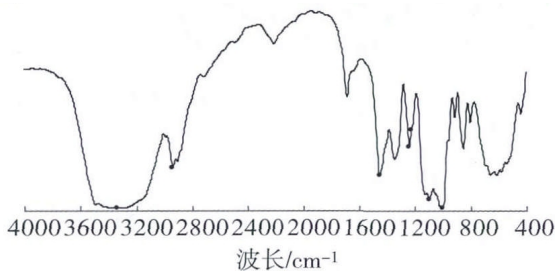


图1 海藻糖红外光谱图

图1为海藻糖的红外光谱图^[7],在3343.96 cm⁻¹处的吸收峰是羟基的伸缩振动,一般由多个峰叠加而成,峰带较宽;2942.84 cm⁻¹处的吸收峰是C-H的伸缩振动,有振动耦合所产生的多重分裂峰;1450~1241 cm⁻¹处为O-H弯曲振动吸收峰,有振动耦合所产生的多重分裂峰;1126~1095 cm⁻¹处为C-O伸缩振动吸收峰,有振动耦合所产生的多

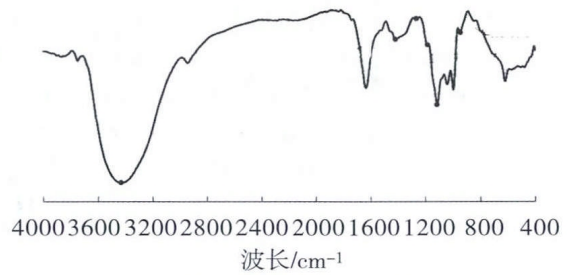


图2 钒氧海藻糖红外光谱图

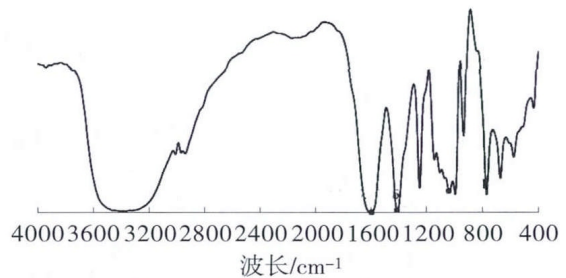


图3 羧甲基海藻糖红外光谱图

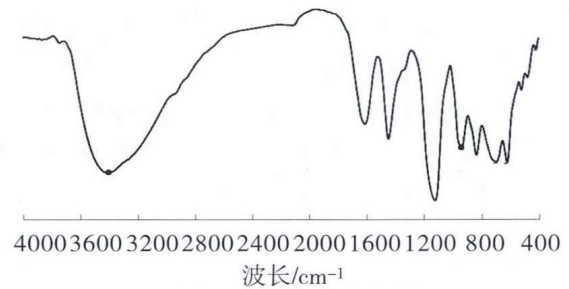


图4 钒氧羧甲基海藻糖红外光谱图

重分裂峰;1095~900 cm⁻¹处为C骨架振动峰。

对比钒氧海藻糖的红外光谱图(图2)和海藻糖的红外光谱图(图1)可以发现,钒氧海藻糖的3428.81 cm⁻¹处的羟基伸缩振动吸收峰明显变窄减弱,1419.35~1268.93 cm⁻¹处的O-H弯曲振动吸收峰变窄减弱或部分消失,说明了部分羟基与氧钒离子发生了络合反应;1187.94~1114.65 cm⁻¹处的C-O伸缩振动吸收峰减弱或部分消失,表明醚键的氧原子参与了与氧钒离子的络合;在944.95 cm⁻¹处出现新的吸收峰,经查阅相关文献^[4,8],确定为V=O的伸缩振动;以上分析表明,氧钒离子与海藻糖以化学键的形式结合。

对比羧甲基海藻糖的红外光谱图(图3)和海藻糖的红外光谱图(图1)可以发现,羧甲基海藻糖的羟基伸缩振动吸收峰移向高波数,可能是羟基与-CH₂COOH结合,使得羟基的氢键缔合作用减弱,羟基的吸收峰增强;1596.77 cm⁻¹处出现的强吸收峰是羧酸盐的羰基非对称伸缩振动,1411.64 cm⁻¹处的强吸收峰是羧酸盐的羰基对称伸缩振动,1041.37 cm⁻¹处是C-O-C(脂肪醚)的振动峰,以



上分析表明,海藻糖成功羧甲基化。

对比钒氧羧甲基海藻糖的红外光谱图(图4)和羧甲基海藻糖的红外光谱图(图3)可以发现,钒氧羧甲基海藻糖的羟基吸收峰由 3463.53 cm^{-1} 移向低波数 3405.67 cm^{-1} ,并且吸收峰变窄减弱,表明部分羟基与氧钒离子发生络合;羧酸盐的羰基非对称伸缩振动峰和羧酸盐的羰基对称伸缩振动峰均变窄减弱,说明羧基中的氧原子与氧钒离子的络合;查阅文献确定在 937.24 cm^{-1} 处出现新的吸收峰为 $\text{V}=\text{O}$ 的伸缩振动;以上分析表明,氧钒离子与羧甲基海藻糖以化学键的形式结合。

2.2 钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖的抗氧化功能

2.2.1 对羟基自由基的清除作用

羟基自由基是一种反应活性最强的氧自由基,存在时间短,可直接攻击接触到的所有生物大分子^[9]。EDTANa₂-Fe()-H₂O₂体系产生的·OH可使番红红花褪色,·OH的含量与番红红花的褪色程度呈定量关系,因此可用比色法来测量·OH的含量。

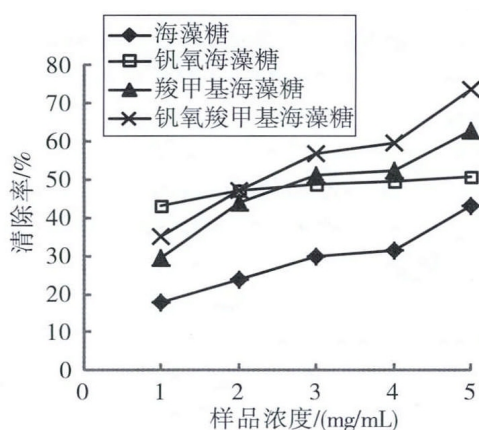


图5 海藻糖及其衍生物清除羟基自由基

由图5可知,4种样品的浓度与其清除羟基自由基的能力成正比关系。当样品浓度为1~5 mg/mL时,海藻糖对·OH的清除率为17.8%~43.2%,羧甲基海藻糖的清除率为29.6%~63.0%,钒氧海藻糖的清除率为43.3%~50.9%,钒氧羧甲基海藻糖的清除率为35.15%~73.1%。与同浓度下各自的配体相比,钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖清除·OH的能力均得到明显的提高。

2.2.2 对DPPH自由基的清除作用

二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)是一种非常稳定的自由基,在乙醇和乙醇-水溶液中呈深紫色。自由基清除剂可以提供一电子与DPPH自由基的单电子配对而使其吸收逐渐消失,其褪色程度与清除剂的配对电子数成定量关系^[16]。由图6可知,4种

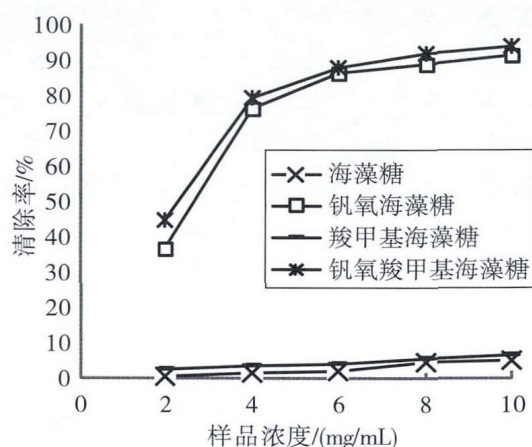


图6 海藻糖及其衍生物清除DPPH自由基

糖化合物对DPPH·的清除能力随它们的浓度增大而增强。在测定浓度2~10 mg/mL内,海藻糖对DPPH·的清除率为0.7%~5.1%,羧甲基海藻糖的清除率为2.7%~6.5%,钒氧海藻糖的清除率为36.6%~91.7%,钒氧羧甲基海藻糖的清除率为45.1%~94.2%。在相同浓度下,钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖对DPPH·清除能力与各自的配体相比,均有显著的提高。

2.3 讨论

氧自由基约占人体内产生的自由基总量的95%,又统称为活性氧自由基。羟自由基是一种氧化能力最强的活性氧自由基,存在时间极短,但对人体造成严重危害。研究表明,人体代谢产生的羟自由基能够损伤糖类、蛋白质、有机酸、核苷酸和磷脂等大分子^[10],并且诱导正常细胞凋零或癌变。多糖清除羟基自由基的机理有以下几种^[11-13]:

- (1)多糖的醇羟基可以络合产生·OH的必需金属离子,抑制·OH的产生。
- (2)多糖的醇羟基的氢原子和·OH直接作用。
- (3)多糖分子中碳氢链上的氢原子和·OH结合成水,碳原子生成的碳自由基可以进一步被氧化形成过氧自由基,最后分解成无害的产物。

钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖清除·OH的效果比配体强,这可能是由于钒是过渡金属元素,d轨道电子容易得到或失去。EPR实验表明,钒氧离子中的钒元素可以在V()和V()2种价态之间维持平衡^[14]。钒的这种氧化还原特性使得钒氧离子具有直接清除自由基的作用^[15],钒氧离子的加入对·OH的清除起到协同作用,所以在同浓度下,钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖对·OH的清除能力比其配体的增强显著。



多酚类化合物清除DPPH·的机理是化合物提供氢原子或者ArOH或ArO·提供单电子与DPPH·配对^[16]。因此,多糖清除DPPH·的机理可能是糖(ROH或RO·)提供单个电子或者醇羟基提供氢原子与DPPH·配对,达到清除目的;钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖清除DPPH·的作用明显强于配体,可能是由于钒是过渡金属元素,d轨道电子可以与DPPH·直接作用,钒氧离子的加入对DPPH·的清除起到协同作用。

3 结论

本研究以海藻糖为原料,通过羧甲基化得到羧甲基海藻糖,海藻糖和羧甲基海藻糖分别与钒氧离子络合,经过红外光谱法表征,结果表明成功合成了钒氧海藻糖和钒氧羧甲基海藻糖。利用ICP-MS测定钒氧褐藻多糖和钒氧褐藻寡糖中的钒含量分别为2.9%和3.2%。抗氧化实验表明海藻糖和羧甲基海藻糖络合钒氧离子后,其清除·OH的能力和DPPH自由基的能力均得到显著提高,为钒氧海藻糖的抗氧化应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Winther L R, Qvist J, Halle B. Hydration and Mobility of Trehalose in Aqueous Solution[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2012, 116:9196-9207
- [2] 朴春红,刘仁杰,王丹,等.酵母体内海藻糖定量方法研究[J]. 食品科技, 2010, (6):284-286
- [3] Heyliger C E, Tahiliani A G, McNeill J H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats[J]. Science(New York, NY), 1985, 4693(227):1474
- [4] Barrio D A, Williams P A M, Cortizo A M, et al. Synthesis of a new vanadyl (IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2003, 8(4):459-468
- [5] Guo Z, Xing R, Liu S, et al. The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan[J]. Bioorganic&medicinal chemistry letters, 2005, 20(15):4600-4603
- [6] Ajisaka K, Agawa S, Nagumo S, et al. Evaluation and comparison of the antioxidative potency of various carbohydrates using different methods[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2009, 57(8):3102-3107
- [7] 杨基础,董燊,杨小民.海藻糖对固定化酶的保护作用[J]. 化工学报, 2000, 51(2):193-197
- [8] Etcheverry S B, Williams P A M, Baran E J. Synthesis and characterization of oxovanadium (IV) complexes with saccharides[J]. Carbohydrate research, 1997, 302(3):131-138
- [9] Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. Analytical biochemistry, 1987, 165(1):215-219
- [10] Lee J M, Kwon H, Jeong H, et al. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by Ganoderma lucidum[J]. Phytotherapy Research, 2001, 15(3):245-249
- [11] Volpi N, Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺-mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate[J]. Journal of biochemistry, 1999, 125(2):297-304
- [12] Lin H Y, Chou C C. Antioxidative activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives[J]. Food research international, 2004, 37(9):883-889
- [13] Shon M Y, Kim T H, Sung N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of Phellinus baumii (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts[J]. Food Chem, 2003, 82(4):593-597
- [14] Willsky G R, White D A, McCabe B C. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by Saccharomyces cerevisiae[J]. J Biol Chem, 1984, 259(21):13273-13281
- [15] Mohammadi M, Yazdanparast R. Radical scavenging abilities and hepatoprotective effect of (N, N'-Bis(salicylidene) ethane-1, 2-diaminato) oxovanadium (IV) complex in CCl₄-treated rats[J]. Exp Toxicol Pathol, 2010, 62(5):533-538
- [16] Kishk Y F M, Al-sayed H. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(2):270-277

《食品科技》2013年每册25元,全年300元
订阅热线:010-67913893