

海藻中有机碘的研究 II. 存在形态及含量*

韩丽君 范 晓 李宪瑾

(中国科学院海洋研究所)

海藻具有独特的化学结构和组成特点。碘是海藻植物体最基本的元素,在海藻的代谢活动中起着非常重要而其他元素不可代替的作用。自 1897 年法国人 Eschle 首次在海藻中发现含碘有机化合物以后,又在不同的海藻中研究了碘的化学性质,并发现碘有机化合物几乎存在于所有的海藻中,并以 I-C 共价键的形式与生物分子结合。迄今,碘在海藻中以有机态和无机态两种形式并存,且在一定的条件下相互转化的观点已被普遍接受。Whyte 等 (1980) 的研究工作表明,海藻中的碘主要以碘离子的形式存在,约占总碘的 60%—90% 以上;有机态碘仅占总碘的 10%—40%。

作者在研究和测定了与本实验用的相同海带中有机碘的含量和分布 (韩丽君等, 1999) 的基础上进一步应用单向纸色谱和红外光谱,纯化并检测了新鲜海带中有机碘的存在形态。研究结果表明,有机态碘可分为氨基酸类衍生物和非氨基酸类衍生物。含碘氨基酸 (IAA) 占总有机碘的 51%, 其中游离氨基酸中的含碘氨基酸占总有机碘的 49% (其中大部分是以二碘酪氨酸为主的含碘酪氨酸), 只有 2% 左右的含碘氨基酸存在于结合氨基酸中。另外, 50% 左右的含碘有机化合物为非氨基酸类含碘有机化合物。红外光谱的检测进一步证明了新鲜海带中含碘氨基酸的结构基团。

一、材料与方法

(一) 样品处理

1. 海带的前处理

取一部分实验用新鲜海带用干净海水冲洗 2—3 次, 除去海带表层的杂质及附生物, 用滤纸将新鲜海带的表面水吸干, 置于塑料袋中。另取一部分新鲜海带加 100 mL 蒸馏水用组织捣碎机匀浆 2—3 min, 密封后一起置于冰箱中备用。

2. 游离氨基酸的提取

新鲜海带样品中加入 75% 的乙醇溶液, 其比例为 1:20, 室温下搅拌提取 24 h, 然

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3813 号。
国家“九五”攻关项目, 96-916 号。
收稿日期: 1999 年 10 月 28 日。

后抽滤, 滤渣用 75% 乙醇洗涤 3 次, 混合滤液旋转蒸发至干, 用 0.02 mol/L HCl 10 mL 溶解, 冰箱保存备用。

3. 结合氨基酸的提取

提取游离氨基酸的滤渣, 加入 6 mol/L 的 HCl 溶液负压封口, 沸水浴提取 24 h, 然后抽滤并洗涤滤渣 3 次, 混合滤液, 用旋转蒸发仪在 60 °C 左右旋转蒸发至干, 用 0.02 mol/L HCl 10 mL 溶解, 冰箱保存备用。

4. 总氨基酸的提取

一定量的新鲜海带加 6 mol/L 的 HCl 溶液, 其余方法同 3。

(二) 分析方法

1. 基本氨基酸的测定

氨基酸提取液用 853 氨基酸自动分析仪测定。

2. 含碘氨基酸的分离

氨基酸提取液通过混合分离层析柱达到分离的目的。首先上 PVPP (4 cm × 10 cm) 吸附高分子化合物, 除去影响下游测定的褐藻多酚化合物以及褐藻多糖类物质。732 阳离子交换树脂柱 (2.5 cm × 28 cm) 浓缩氨基酸, 同时洗脱除去各种离子以及中性分子。活性炭柱 (2.5 cm × 10 cm) 对芳香族氨基酸吸附能力大, 可以分离芳香族氨基酸和非芳香族氨基酸。

3. 混合分离层析柱洗脱能力及吸附容量的测试

25 mL DIT (二碘酪氨酸) 标准溶液上样 PVPP 柱, 蒸馏水洗脱后用适当 HCl 调 pH 约为 2, 上样 732 阳离子交换树脂柱, 用 2 mol/L 的氨水洗脱, 旋转蒸发、浓缩, 调 pH 约为 2, 上样活性炭柱, 用含少量乙醇的 2 mol/L 氨水洗脱, 自动部分收集器收集 Pauly 反应阳性部分, 旋转、蒸发、浓缩, Pauly 反应测定氨基酸的含量。

制备 DIT 标准溶液 10, 20, 50, 100, 200, 300 μ L 于冰水中放置 2—3 h, 按顺序加入 Pauly 试剂, 待颜色稳定 10 min 后, 于 420 nm 比色, 对照为蒸馏水。

4. 含碘氨基酸的定性分析

取不同量的标准 DIT 溶液分别点样于滤纸上 (15 cm × 30 cm, Whatman No. 1, 英格兰 W. & R. Balston L. TD 生产), 单向纸层析, 展层液为正丁醇:88% 甲醇:水 (15:3:2), 层析完毕用 0.5% 茚三酮 65 °C 显色 30 min, 测量 DIT 斑点的 R_f 值, 依次剪下显色斑点, 并在同一滤纸上剪一块大小相同的空白作对照, 用 4 mL 洗脱液 [0.1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:75% 乙醇 (2:38)] 浸泡 70 min, 520 nm 下测定 OD 值, 以氨基酸浓度对 OD 值作图, 获得氨基酸的标准曲线。以同样方法进行样品的定性检测。

5. 含碘氨基酸的定量分析

含碘氨基酸样品浓缩后各取 20 μ L, 以 DIT 标准溶液作为对照点样滤纸上, 层析方法同上。显色后剪下与标准 R_f 值相对应的含碘氨基酸样品斑点, 同样条件下测定含碘氨基酸的 OD 值。查 DIT 标准曲线求得样品中含碘氨基酸的含量。

6. 含碘氨基酸的红外光谱鉴定

含碘氨基酸粗提液采用上述方法进行单向纸层析, 剪下与标准 R_f 值相对应的位置,

以 0.1 mol/L 的氨水洗脱, 重复几次后, 合并洗脱液, 蒸发、浓缩、结晶、压片, 以 PHP 公司的傅立叶变换红外光谱仪测定。

二、结果与讨论

1. 混合层析柱的洗脱能力

25 mL DIT 标准溶液上柱洗脱后浓缩为 53 mL, Pauly 反应后于 420 nm 处测得 OD 为 9.11, 然后查标准曲线 (图 1), 求得 53 mL 洗脱液中 DIT 的含量为 20.8 mg, 因此, 标准样品经过混合分离层析柱后的得率为: $20.8/25 = 83.2\%$ (图 1)。

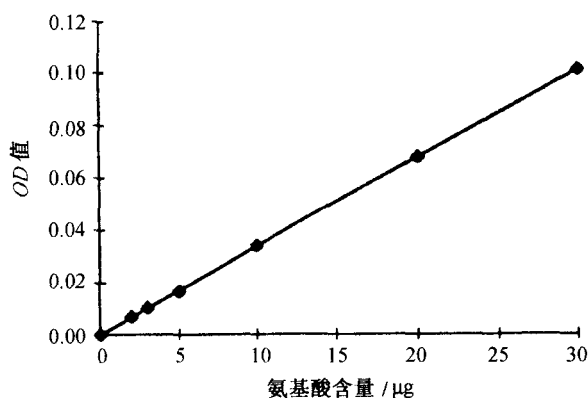


图 1 Pauly 法测 DIT 的标准曲线

2. 新鲜海带中含碘氨基酸的含量

新鲜海带的提取液与标准 DIT 的单向纸层析结果见图 5。根据 R_f 的计算公式, 算出标准 DIT 的 R_f 值为 $14/16.8 = 0.83$, 与 R_f 值相对应的样品斑点剪下后洗脱, 520 nm 下比色测 OD 值, 根据图 2 的 DIT 标准曲线, 计算样品含碘氨基酸的含量, 结果见表 1。

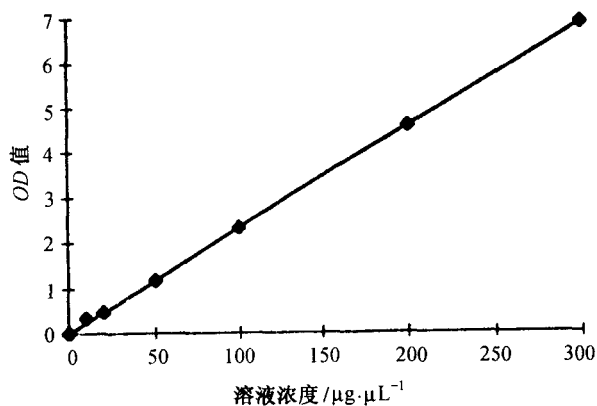


图 2 茚三酮法测 DIT 的标准曲线

由于含碘酪氨酸是氨基酸的卤代衍生物, 含量比较丰富, 因此分离浓缩后可以根据含碘酪氨酸溶解度的不同, 用单相纸色谱进行定量、定性检测。从图 5 可以明显的看到, 与 DIT 标准 R_f 值相对应的位置有一系列斑点与酪氨酸的位置相差较大 (酪氨酸的 $R_f = 0.41$), 由此判断斑点是以 DIT 为主的含碘氨基酸。各斑点的颜色深度在不同氨基酸提取液中差别很大, 这反映出含碘氨基酸含量的不同, 以总氨基酸提取液中为最高, 其含量约占新鲜海带的 0.139 mg/g , 而这部分含碘氨基酸只占总有机碘的 51%, 还有近 50% 的含碘氨基酸以非氨基酸衍生物的形式存在, 其中包括二碘酪氨酸 (T2) 和甲状腺素 (T4) 等 (图 3)。

表 1 新鲜海带样品中含碘氨基酸的含量 (鲜重)

海带氨基酸 粗提取液	海带 重量/g	OD 值	IAA 含量 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	IAA 中碘 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	IAA 中的 碘占总碘 百分比/%	IAA 中的碘占 总有机碘的 百分比/%
游离氨基酸 提取液	60	0.045	0.133	0.079	5.9	49
总氨基酸提取液	110	0.086	0.139	0.081	6.1	51

从表 1 的数据中可以发现, 96% 以上的含碘氨基酸是游离氨基酸, 只有 4% 存在于结合氨基酸中。

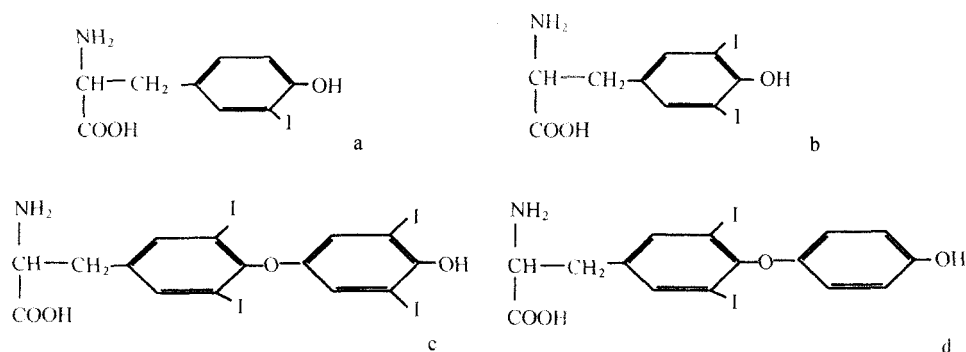


图 3 部分含碘氨基酸的化学结构

a. MIT; b. DIT; c. T4; d. 3, 5-二碘甲状腺原氨酸

3. 红外光谱定性检测结果

对照 Sadtler DIT 标准红外光谱图, 含碘氨基酸的红外光谱解析见图 4。

实验结果表明, 新鲜海带中含碘有机化合物的存在形态非常复杂, 概括起来可分为氨基酸衍生物和非氨基酸衍生物。含碘蛋白质、含碘脂肪酸、含碘多糖以及含碘多酚类均属于非氨基酸类衍生物, 这部分碘的含量约占总有机碘的 49% 左右。氨基酸类衍生物以含碘酪氨酸为主, 如 MIT (一碘酪氨酸) 和 DIT 等, 另外还有少量含碘组氨酸等, 这部分碘的含量约占总有机碘的 51% 左右, 其中 96% 是以游离氨基酸的形式存在, 只有

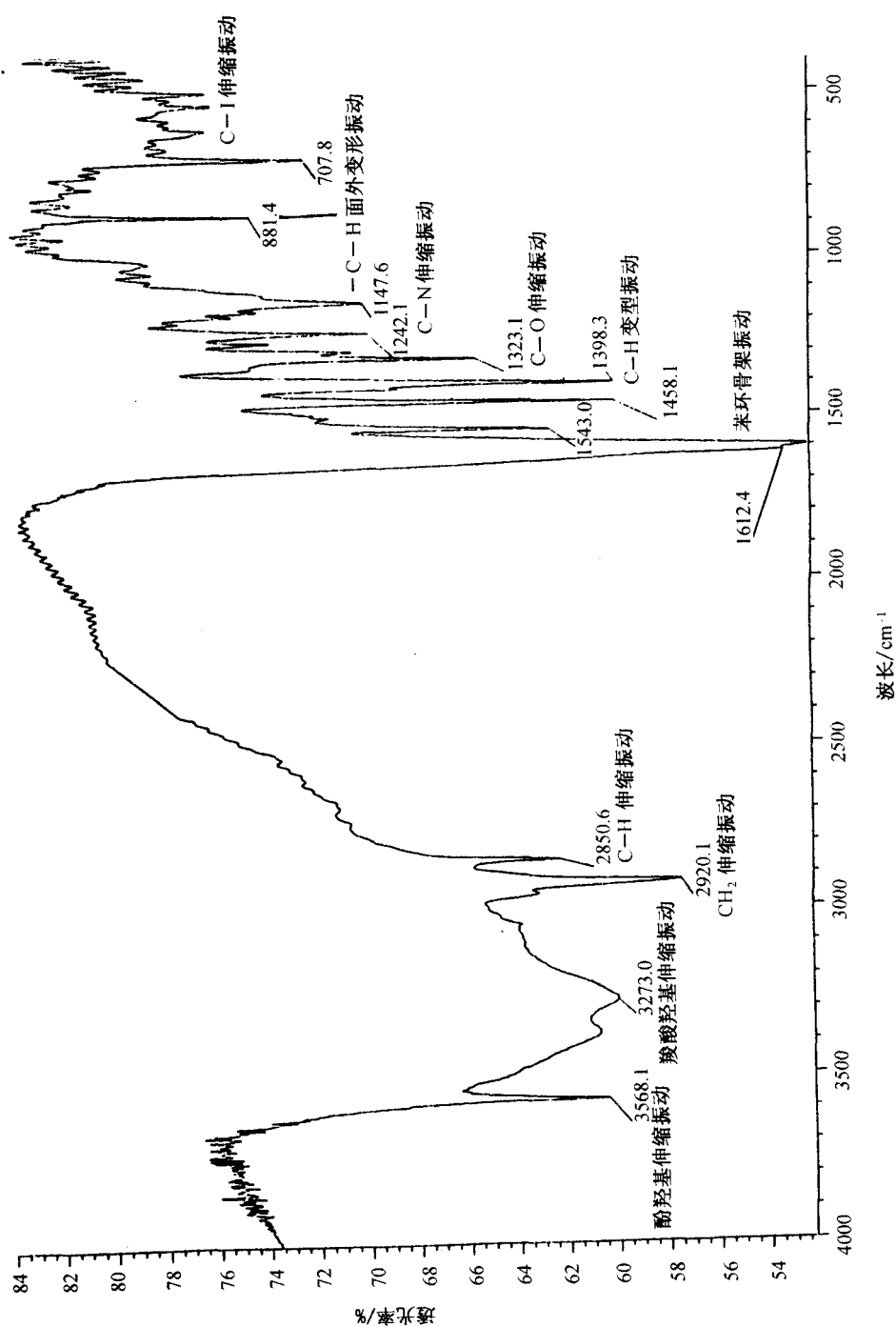


图4 含碘氨基酸的红外光谱解析图

4% 存在于结合氨基酸中。

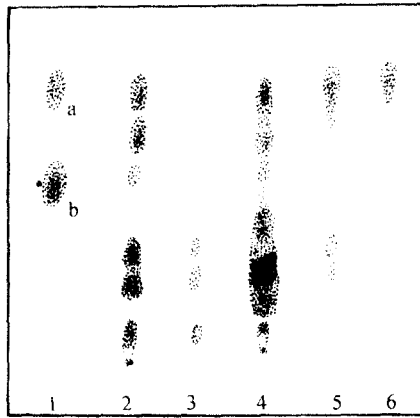


图 5 DIT 及含碘氨基酸样品的纸色谱

1. 标准 DIT 和酪氨酸色谱带；2. 海带样品的 HCl 粗提液上柱 PVPP 柱和 732 阳离子柱后的色谱带；3. 海带样品的乙醇提取液上柱 PVPP 柱和 732 阳离子柱后的色谱带；4. 海带样品 HCl 粗提液的色谱带；5. 海带样品的 HCl 粗提液上柱混合分离，层析柱后的色谱带；6. 标准 DIT 的色谱带；a. DIT；b. 酪氨酸

海水中的碘浓度约为 $60 \mu\text{g/L}$ ，碘离子以亚稳态的形式存在，这在热力学上是不稳定的，因此含量很少，只占总碘量的 20%—30% (Riley *et al.*, 1971)。大量存在的是稳定的 IO_3^- ，碘离子的浓度在海藻富集碘的过程中起决定性的作用 (Jackson, 1969)，因为对海藻来讲，碘离子的吸收是一个主动过程 (Klemperer, 1957)，其吸收能力是碘酸盐的 8—10 倍。海藻是碘的巨大吸附剂，海洋中的碘是如何被富集和吸收的呢？也就是说海水中的碘离子是怎样通过海藻细胞膜进入海藻细胞的呢？1926 年 Certz 发现海藻中有一种类似酶的物质，能把碘化物氧化为碘，并把该酶命名为碘化物氧化酶，此酶是不溶性的，镶嵌于细胞膜的外侧。Shaw (1959) 用 ^{131}I 的放射自显影研究了海藻吸收碘的过程，发现碘化物氧化酶在吸收碘的过程中起着重要的作用，并提出了 HIO 海藻富集碘的机制模型，但是随着研究水平的不断提高，HIO 模型已经不能完全解释实验中的许多现象，同时随着环境生态学、仿生学、医药保健的发展，

迫切需要解决海藻富集碘的机制，以及碘在海藻植物体内的存在形态。以上问题的解决不仅能建立一个全新的生物学概念，同时还可以利用现代生物工程技术模拟海藻细胞膜的结构和特点，实现制碘工艺的仿生化，消除由此而造成的环境污染，具有重大的理论和经济意义。

参 考 文 献

- 纪明侯等, 1976, 海带中各种氨基酸含量的季节变异, 海洋科学集刊, 11: 255—269.
- 范晓、王孝举, 1994, 海藻中的碘, 海洋科学, 4: 16—20.
- 侯晓琳, 1995, 超热中子活化法测定碘和溴, 岩矿测试, 14 (1): 31.
- 韩丽君、范晓, 1999, 海藻中有机碘的含量测定, 中国水生生物学报, 23 (5): 489—494.
- Hirano, S. *et al.*, 1983, Chemical form of radioactive iodine in seawater and its effects upon marine organisms, *Radioisotopes*, 32: 319—322.
- Jackson, A., 1969, A colorimetric estimation of the iodine content of seaweeds, *School Sci. Rev.*, 51: 113—116.
- Katamine S, *et al.*, 1987, Difference in bioavailability of iodine-rich food and food colors, *Nutr. Rep. Int.*, 35 (2): 289.
- Klemperer, H. G., 1957, The accumulation of iodine by *Fucus ceranoides*, *Biochem. J.*, 67: 381—390.
- Munda, I. M., 1987, Distribution and use of economically important seaweed in Iceland, *hydrobiologia*, 151/152: 257—260.
- Mairh, O. P. *et al.*, 1989, Seasonal variation, bioaccumulation and prevention of loss iodine in seaweeds, *Phytochemistry*, 28 (3): 307—310.
- Rao, C. K. and Indusekhar, V. K., 1989, Distribution of certain cations and anions in seaweeds and seawater of Saurashtra coast and their geochemical significance, *Indian J. Mar. Sci.*, 18: 37—42.

- Riley, J. P. and Chester, R., 1971, Introduction to Marine Chemistry, Academic Press (London and New York), 206—305.
- Shaw, T. I., 1959, The mechanism of iodine accumulation by the brown seaweed *Laminaria digitata*, I. The uptake of ^{131}I , *Proc. Roy. Soc.*, 50: 356—371.
- Shaw, T. I., 1960, The mechanism of iodine accumulation by the brown seaweed *Laminaria digitata*, II. The Respiration and iodine uptake, of ^{131}I , *Proc. Roy. Soc.*, 52: 109—117.
- Whyte, J. N. C. and Englar, J. R., 1980, Seasonal Variation in the inorganic Constituents of the marine algae *Nereocystis luetkeana*, part I. Metallic elements, *Bot. Mar.*, 23: 13—17.
- Whyte, J. N. C. and Englar, J. R., 1980, Seasonal Variation in the inorganic Constituents of the marine algae *Nereocystis luetkeana*, part II. Non-metallic elements, *Bot. Mar.*, 23: 19—24.
- Whyte, J. N. C. *et al.*, 1981, Composition changed on freshwater leaching of the marine algae, *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 38: 194—198.
- Wifladt, A. M. and Lund, W., 1989, Determination of iodine in seaweed and table salt by indirect atomic-absorption method, *Talanta*, 36 (3): 395—399.
- Woittiez, J. R. W. *et al.*, 1991, The determination of iodine, iodate, total inorganic iodine and charcoal-adsorbable iodine in seawater, *Mar. Chem.*, 34: 247—259.

STUDIES ON ORGANIC IODINE IN SEAWEED II. THE STATES AND CONTENT OF ORGANIC IODINE IN SEANEED*

Han Lijun, Fan Xiao, Li Xiancui

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

Laminaria japonica was collected from the coast of Qingdao in April, 1995. Based on a first paper (determination of the content of organic iodine in seaweed, *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23 (5): 489—493), the existing states and content of organic iodine in seaweed were investigated by paper chromatography and infrared spectrum. The result shows that iodine in *Laminaria japonica* occurs as organic iodo-compounds and inorganic iodine. The main organic iodo-compounds are amino-acids derivative and non-amino-acids derivative. 51% of total organic iodine compounds are iodo-amino acids and their main existing state is 3,5 -diiodotyrosine.

49% of iodo-amino acids existed in free state amino acids and another 2% in combined state. Infra-spectrometry was used to confirm the structure groups of iodo-amino acids from fresh *Laminaria japonica*.

* Contribution No. 3813 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.