

褐藻多酚合成的模拟研究*

严小军 范 晓 张燕霞 陈念红 韩丽君

(中国科学院海洋研究所)

褐藻多酚是间苯三酚的聚合物,结构复杂,有关生物合成途径方面的研究报道甚少。近年发现,褐藻多酚具有多种生物活性和医药价值(Ragan & Glombitza, 1986),因此,研究褐藻多酚的人工合成不仅可模拟研究褐藻多酚的生物合成过程,而且为寻找替代自然资源打下了基础。

作者在实验中观察到配制的间苯三酚溶液放置一段时间后会逐渐发黄,因此认为间苯三酚在放置过程中发生了氧化聚合,并对此作了进一步研究。

一、材料和方法

1. 试剂 间苯三酚水溶液(1993年8月19日配制, 10mg/100mL)、间苯三酚的碳酸氢钠缓冲液(1993年8月20日配制, 10mg/100mL)。

2. 方法 (1) 自氧化曲线测定: 利用 721 型分光光度计测定间苯三酚溶液在放置过程中的吸光度变化, (2) 自氧化产物的分子量变化(透析实验): 将自氧化产物置于透析袋(分子量截留值为 1000)放入蒸馏水中透析; (3) 自氧化产物的 HPLC 分析: 将自氧化产物用日本 Waters 公司的高效液相色谱仪进行分析(自动进样)。流动相为水, 固定相为 C18 反相柱, 紫外-可见检测仪进行检测分析。

二、结果和讨论

1. 自氧化曲线测定 图 1 是间苯三酚水溶液(10mg/100mL)放置 20 天后用 721 型分光光度计测定的吸光度曲线。无色的间苯三酚在放置过程中逐渐形成有色物质(外观上由淡黄色变至桔黄色), 吸收以靠近紫外区为最显著, 而 500nm 之后则基本无吸收。Haug 和 Larsen (1958) 曾以 420nm 吸光强度作为褐藻多酚含量分析的标准, 以此标准进行分析最为简便, 但缺乏好的参比物质(因为当时对褐藻多酚的化学本质尚不了解, 在近紫外区吸收仅是实验现象)。以现在的观点来看, 若以间苯三酚的自氧化产物作参比, 应该是不错的, 但有两点需要指出(图 2): (1) 在早期阶段, 吸光曲线基本呈直线上升,

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2581 号。

收稿日期: 1995 年 4 月 11 日。

即每天的吸光值增加 0.02, 即 $dA/dt = 0.02$ (式中 dA/dt 代表曲线斜率), 具有零级方程特征, 表明这种自氧化过程与浓度无关。

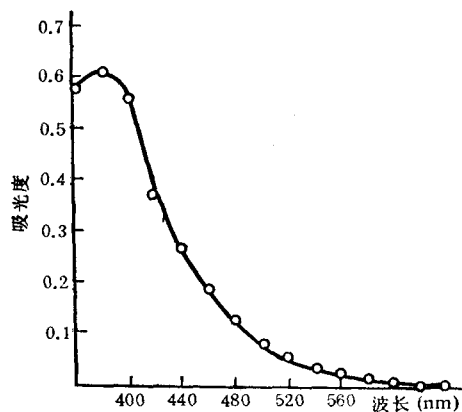


图1 间苯三酚自氧化的可见吸光曲线

当超过 20 天后, 呈色反应开始变慢, 最后变得相当稳定, 直至整个间苯三酚溶液开始形成絮状的黄色沉淀物。(2) 如果将间苯三酚溶液中加入碳酸氢钠缓冲液 (pH 值为 8.4), 溶液颜色的加深速度显著加快, 对放置一天形成的淡黄色溶液以盐酸调至酸性, 则黄色显著消失。若不加入盐酸, 放置 3 天后反应基本达到平衡, 吸光值变化较小。对放置 5 天后形成之黄色溶液以盐酸调节至酸性, 仍能使黄色显著降低, 但无法使其完全消失。

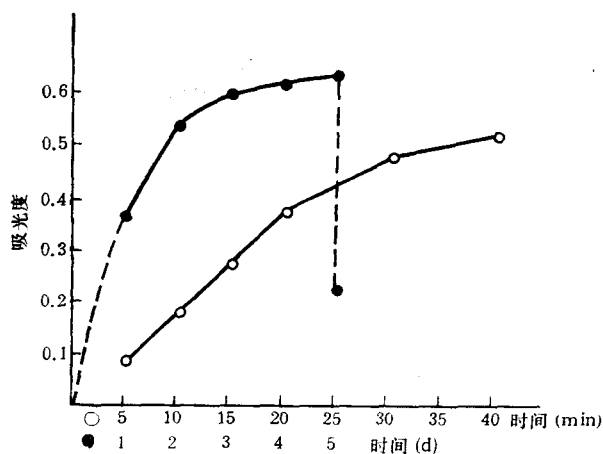


图2 间苯三酚自氧化产物的时间曲线

○ 间苯三酚水溶液 (10mg/100mL); ● 碳酸氢钠缓冲液

2. 自氧化产物的透析实验观察及相关现象 将间苯三酚的自氧化产物置于动物肠衣半透膜中, 放入蒸馏水透析后发现大量黄色物质溶出。随着自氧化时间增加, 非透析物质增加 (肉眼可见透析袋中存留物的颜色有显著差异), 说明起初的产物大部分是小分子物质, 随着时间增加, 分子量增加。渗透出的小分子物质在透析池中形成絮状物质。

3. 自氧化产物的 HPLC 分析 图 3 是自氧化产物的三维 HPLC 检测图谱, 分析样品为间苯三酚的碳酸氢钠溶液, 放置数天后进行透析, 可见大量黄色物质渗出, 对非渗出物作分析, 极性强者先洗脱。间苯三酚聚合物的极性随聚合度增加而增加, 从吸收曲线看, 有两个较强的吸收峰, 分别在 210nm 与 275nm 左右, 与褐藻多酚的紫外吸收相似 (Ragan & Glombitza, 1986)。在洗脱初期, 具有多个杂乱峰, 可见生成的聚间苯三酚具有结构多态性。图 4 是各洗脱峰紫外吸光曲线。在最后洗脱的物质仅具有 210nm 吸收

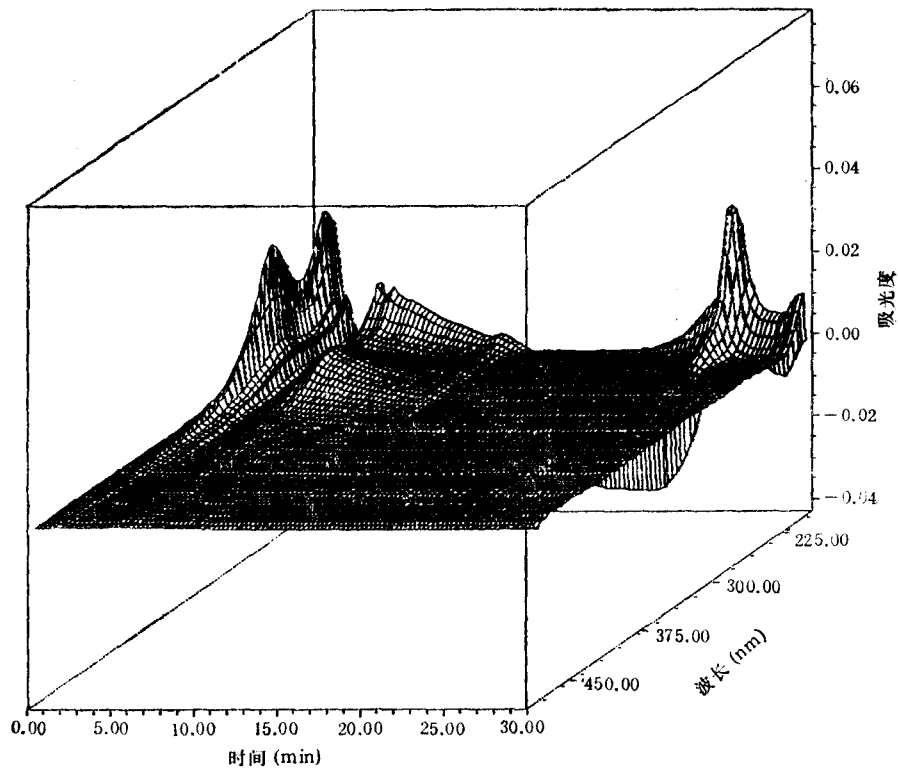


图3 间苯三酚自氧化产物的三维 HPLC 分析

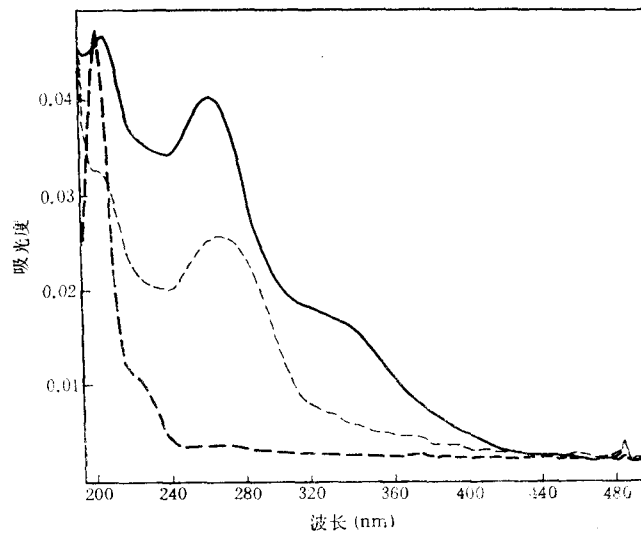


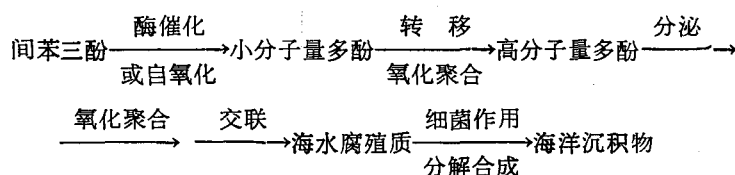
图4 间苯三酚自氧化产物的 HPLC 分析(间苯三酚碳酸氢钠缓冲液)

峰,与间苯三酚的吸收曲线类似。

4. 褐藻多酚合成途径的探讨 尽管褐藻多酚分子量分布有较大的种间差异 (Ragan & Glombitza, 1986),但是有一点可以肯定,天然褐藻多酚的分子量分布是弥散型

的,小分子量部分约占5%,中间部分占70%,高分子量占25% (Ragan and Craigie, 1976)。Kylin (1938) 指出,褐藻多酚有老化趋势,即随着藻体年龄增大,多酚的聚合度增加。Pelligrini (1980) 用电子显微镜观测了褐藻多酚的合成过程,发现藻泡中贮存的小分子量褐藻多酚在转移至溶酶体的过程中发生老化,并进一步分泌到细胞外的环境中。Craigie 和 McLachlan (1964) 指出,海藻中酚类物质的外分泌作用是相当强的,它是近岸海水有机物的重要组成部分。

根据以上实验结果,作者将褐藻多酚的合成途径与代谢过程假定为:



三、结 论

迄今为止,褐藻多酚的生物合成途径尚无文献报道,本实验作为一种尝试,许多结果仅具有定性意义,但也得出了一些有用的结论。

(1) 间苯三酚容易发生自氧化,在 pH 值高的情况下更易发生,因此,褐藻多酚一旦分泌进入海水介质中,就可以发生进一步的氧化聚合。

(2) 人工模拟合成的聚间苯三酚与天然的褐藻多酚具有相似的紫外吸收波长特征,可用于褐藻多酚定量分析时的参比物。

(3) 褐藻多酚的小分子量部分可以发生老化(聚合)现象,这一过程可以是自发的,但小分子量褐藻多酚的生物合成途径尚无法确证。

参 考 文 献

- Craigie, J. S. & J., McLachlan, 1964, Excretion of colored ultraviolet absorbing substances by marine algae, *Can. J. Bot.*, 42:23—33.
- Haug, A. & B., Larsen, 1958, Phenolic compounds in brown algae, I. The presence of reducing compounds in *Ascophyllum nodosum*, *Acta. Chem. Scand.*, 12:650—657.
- Kylin, H., 1938, Bemerkungen uber die Fucosanblasen der phaeophyceen, *K. Fysiogr. Sallsk. Lund Forh.*, 8(20):1—10.
- Pelligrini, L., 1980, Cytological studies on physodes in the vegetative cells of *Cystoseira stricta*, *J. Cell. Sci.*, 41:209—231.
- Ragan, M. A. & J. S., Craigie, 1976, Physodes and the phenolic compounds of brown algae, Isolation and characterization of phloroglucinol polymers from *Fucus vesiculosus*, *Can. J. Biochem.*, 54: 66—73.
- Ragan, M. A. & K. W., Glombitza, 1986, Phlorotannins, brown algal polyphenols, *Progress in Phycological Research* (Round/Chapman eds) Vol4, Biopress Ltd, 130—241.

STUDIES ON SYNTHESIS SIMULATION OF PHLOROTANNINS*

Yan Xiaojun, Fan Xiao, Zhang Yanxia, Chen Nianhong and Han Lijun
(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences*)

ABSTRACT

Phlorotannins are polymers of phloroglucinol known only from brown algae with various bioactivities. But studies on biosynthesis pathway of phlorotannins have rarely been reported. Studies on the autoxidation process of phloroglucinol revealed that polymerization occurred during autoxidation and that the ultraviolet spectrum of polymers was similar to that of phlorotannins. High Performance Liquid Chromatography analysis indicated that molecular weight distribution of polymers was diverse and similar to natural analogue.

* Contribution No. 2581 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.