

## 褐藻多酚连三羟基的测定\*

## DETERMINATION OF VICINAL PHENOLIC HYDROXYL IN BROWN ALGAL POLYPHENOL

严小军<sup>1</sup> 娄清香<sup>1</sup> 吴真真<sup>2</sup> 崔玉军<sup>2</sup><sup>1</sup> 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)<sup>2</sup> 青岛大学 266071)

关键词 褐藻多酚,连三羟基,总羟基

褐藻多酚具有抗氧化活性,羟基是决定褐藻多酚化学性质和生物学活性的最主要的官能团<sup>[1]</sup>。褐藻多酚结构中除通常的间羟基外,还具有部分连三羟基。可以肯定,由于连三羟基特殊的化学特征,其含量及其在总羟基中所占比例,必然会影响褐藻多酚的性质。因此,测量褐藻多酚连三羟基的含量和其在总羟基含量中所占比例对深入研究褐藻多酚性质是非常必要的,它可为探讨褐藻多酚的构效关系和生成机理提供定量研究的手段<sup>[2]</sup>。以往的研究者只以间苯三酚为标准物对褐藻多酚中总羟基进行过测定,核磁共振研究虽然表明褐藻多酚中除间三羟基外还含有连三羟基,但是无法对连三羟基的含量及其在总羟基中所占比例进行测定。本研究采用 FAS 法、FD 法首次对鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*)、海黍子 (*S. kyllimanianum*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)、海带 (*Laminaria japonica*) 中褐藻多酚连三羟基与总羟基含量进行了分别测定。

## 1 材料与方 法

## 1.1 实验材料

本实验所用海藻分别是海黍子 (*Sargassum kyllimanianum*)、鼠尾藻 (*S. thunbergii*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 和海带 (*Laminaria japonica*),均于 1999 年 4 月采自青岛市第二海水浴场。

## 1.2 FD 法测定试剂

所用试剂均为分析纯。(1)间苯三酚;(2)饱和碳酸钠溶液;(3)FD 试剂,即磷酸钨钼复合物。将 80 g 钨酸钠,20 g 钼酸钠,500 ml (85%) 磷酸和 250 ml 水混

合,加热回流 2 h,冷却后加水定容至 1 L。

## 1.3 FD 法测定操作步骤

(1) 标准工作曲线的绘制:按浓度梯度配制间苯三酚标准液,取间苯三酚标准液 1 ml 置于 15 ml 试管中,加水稀释至 7 ml,混合均匀,加入 1 ml Folin Denis 试剂摇匀,3 min 后加入 2 ml 饱和碳酸钠溶液,混合充分,于 710 nm 测定吸光值,绘制标准工作曲线。(2) 样品中褐藻多酚含量测定:将样品溶于蒸馏水,定容至 50 ml,其余操作同标准工作曲线,将测得数与标准工作曲线对照,即可得褐藻多酚含量。

## 1.4 FAS 测定试剂

(1) FAS 试剂:将 500 g 尿素加入 500 ml 0.1 mol/L 的醋酸缓冲液中,配成 50% (w/v) 尿素-醋酸溶液 (pH=4.4);将硫酸亚铁铵溶于 1 mol/L HCl 配成 5% 的硫酸亚铁铵溶液;将阿拉伯胶溶于去离子水配成 1% 的溶液。于测定前将尿素-醋酸溶液、阿拉伯胶溶液、硫酸亚铁铵溶液按 89:10:1 混和,即配成 FAS 试剂。(2) 1 mg/ml 连苯三酚溶液。(3) 二甲基甲酰胺 (DMF)-醋酸缓冲液:将 500 ml DMF 加入 500 ml 1% 的醋酸溶液,调 pH 至 4.4。(4) 鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*)、海黍子 (*S. kyllimanianum*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)、海带 (*Laminaria japonica*) 样品:取一定质量的上述海藻,加入一定量的 DMF 醋酸缓冲液浸泡

\* 国家九五攻关项目 96-916-04-01 号;国家 973 项目 G1999 012004 号。中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3827 号。

收稿日期:1999-12-14;修回日期:2000-4-30

24 h 时,过滤,用氯仿萃去脂溶性色素,然后将水相冷冻干燥,制成样品。

### 1.5 FAS 法测定步骤

(1) 标准工作曲线的绘制:按浓度梯度配置连苯三酚标准液,取连苯三酚标准液 2 ml 置于 15 ml 试管中,加入 FAS 试剂 8 ml,混合均匀,放置 15 min,再于 578 nm 比色,并绘制标准工作曲线。(2) 褐藻多酚中连三羟基数的测定:将样品溶于蒸馏水,定容至 50 ml,其余操作同标准工作曲线,将测得数与标准工作曲线对照,即可得褐藻多酚中连三羟基数。

### 1.6 仪器

721 型分光光度计

## 2 实验结果

### 2.1 测定连三羟基方法的有效性

FD 法测定的原理是利用酚羟基的还原性,即酚羟基可以被 FD 试剂氧化,而磷酸钠与磷钨酸钠则被多酚定量还原成稳定的“钨蓝”和“钼蓝”,因此,该方法实质上测量的是待测物质中的酚羟基总数。该方法具有很好的精确度和准确度,已为许多实验研究所采用及证实<sup>[4]</sup>。FAS 法的测定原理,是利用亚铁离子与邻羟基的螯合作用,产生发色基团。因此,在这个测定体系中,间羟基没有反应活性。通过总羟基和邻羟基数量的分别测定,可以表征褐藻多酚复杂结构中不同羟基数量的比例。由图 1 可见,该方法的标准工作曲线线性良好,相关曲线基本通过原点,相关系数为 0.999 9。

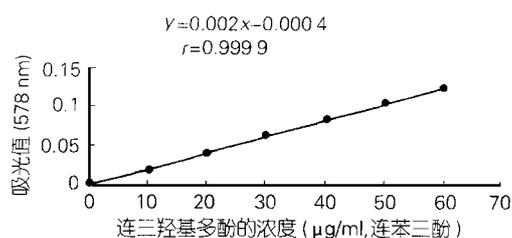


图 1 褐藻多酚连三羟基测定的工作曲线

### 2.2 不同海藻中多酚羟基的结构特征

表 1 是几种褐藻中褐藻多酚羟基的含量测定结果。 $P_1/M$  代表单位重量藻体的总羟基数量,可以看出,墨角藻目 (Fucales) 马尾藻科 (Sargassaceae) 的鼠尾藻、海黍子中的褐藻多酚含量较高,分别为 3.7% 和

4.3%, 裙带菜较低,为 2.6%, 海带最低,仅为 0.89%。 $P_2/M$  代表单位重量藻体的邻羟基数量,可以看出,测定的褐藻多酚中普遍存在一定数量的连三羟基,其中鼠尾藻、海黍子中的褐藻多酚的连三羟基数分别为 0.90% 和 1.1%, 而裙带菜和海带中的邻羟基数量仅为 0.044% 和 0.023%。

实验结果发现, $P_2/P_1$  的比例可以用来表征褐藻多酚的基本化学结构和与邻羟基数量有关的化学性质。鼠尾藻、海黍子的多酚结构中,邻羟基占总羟基数的比例高,并且都接近 25%; 海带目 (Laminariales) 的裙带菜、海带中的褐藻多酚的连三羟基数占总羟基数的比例较低,为 1.7% 和 2.6%, 处于同一个数量级。虽然鼠尾藻、海黍子与裙带菜中褐藻多酚的总含量处于同一个数量级,相差不大,但是鼠尾藻、海黍子中连三羟基的数量大约占褐藻多酚总羟基数的 1/4, 而裙带菜、海带褐藻多酚中含连三羟基的褐藻多酚所占的比例极小,比鼠尾藻、海黍子中含连三羟基的褐藻多酚低一个数量级。所以,可以认为涩味的强度与含连三羟基的褐藻多酚的含量有关;含连三羟基的褐藻多酚可能是鼠尾藻、海黍子等马尾藻属的海藻具有涩味以致不能食用的原因。由此,我们得到一个有意义的结论,在褐藻多酚的化学结构中,起决定性作用的是邻羟基,褐藻多酚的连三羟基数占总羟基数的比值 ( $P_2/P_1$ ) 可以表征褐藻多酚的羟基官能团的化学行为。

$P_2/P_1$  表征了褐藻多酚主要官能团的化学反应活性,由此可以区分与鉴定不同海藻来源的褐藻多酚。为褐藻多酚抗氧化剂产业化的质量指标体系建立了一个与抗氧化活性直接相关的化学结构指标。在抗氧化活性研究中,我们已经发现:全部由连三羟基组成的焦性没食子酸丙酯清除 DPPH 自由基的能力是 1:1.5, 即一个连三羟基型酚羟基可以清除 1.5 个 DPPH 自由基;全部由间羟基组成的间苯三酚清除自由基的能力是 1:0.9, 即一个间羟基型酚羟基只能清除 0.9 个 DPPH 自由基。而对于含有一定数量连三羟基的褐藻多酚来说,一个酚羟基可以清除 1.0 个 DPPH 自由基,介于两者之间<sup>[2]</sup>。

从化学防御的角度来看,不同来源褐藻多酚的  $P_2/P_1$  值也可以说明一些问题。因为,从形态分化的角度看,马尾藻具有更为明显的形体分化特征,是相对于海带和裙带菜更为高等的海洋植物,这些植物显然具有更高比例的连三羟基,使马尾藻具有更有效的

## 实验与技术

### EXPERIMENT & TECHNOLOGY

表 1 几种褐藻中褐藻多酚羟基的测定 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

褐藻	$M^*$ (g)	$P_1^{**}$ (mg)	$P_2^{***}$ (mg)	$P_1/M$ (%)	$P_2/M$ (%)	$P_2/P_1$ (%)
鼠尾藻	8.0	29.40 ± 0.06	7.20 ± 0.04	3.7	0.90	24.4
海黍子	4.0	17.20 ± 0.03	4.40 ± 0.05	4.3	1.1	25.6
裙带菜	2.5	6.50 ± 0.04	0.11 ± 0.04	2.6	0.044	1.7
海带	5.5	4.90 ± 0.07	0.13 ± 0.03	0.89	0.023	2.6

\*  $M$  藻体干重; \*\*  $P_1$  羟基总量,以相当于间苯三酚的质量数来表示; \*\*\*  $P_2$  连三羟基量,以相当于连苯三酚的质量数来表示。

化学防御作用,如抵抗微生物感染、抵御草食性动物的摄食等。马尾藻大量分泌的多酚化合物所造成的化学环境使其产生了特殊的群体优势,在自然环境中可以形成很大的自然生物群落,如非常特殊的马尾藻海。本文所得到的结果与马尾藻的生理生态特征相吻合。

### 参考文献

- 1 严小军. 海洋科学集刊, 1996, 37: 61 ~ 65
- 2 范晓, 严小军等. 水生生物学报, 1999, 23(5): 494 ~ 499
- 3 陈予敏, 严小军, 范晓. 海洋与湖沼, 1997, 28(3): 232 ~ 236
- 4 严小军, 娄清香, 周天成等. 海洋科学, 1996, 5: 39 ~ 42
- 5 Yan, X. et al. J. Appl. Phycol., 1996, 8: 201 ~ 203

(本文编辑:张培新)