

海藻中甜菜碱的研究^{*}

韩丽君 范 晓 周永航

(中国科学院海洋研究所)

甜菜碱是一种氨基酸或亚氨基酸的衍生物。1984 年 Blunden 等用生物检测法测定海藻中细胞激动素的水平时,偶然发现了甜菜碱这类和细胞激动素有类似活性的化合物。目前已在两百多种海藻中发现了 18 种甜菜碱及 3 类甜菜碱脂。海藻中甜菜碱的分布十分广泛且结构多样。由于甜菜碱对植物的生长有明显的生理响应,所以被看作是海藻中的一类活性物质。

我国具有丰富的海藻资源,但对海藻中甜菜碱及其类似物的研究还未开展过,本研究旨在对我国的一些大型经济海藻中的甜菜碱含量进行测定,为含量较高的海藻资源开发提供依据。同时还对海藻中这类生物活性物质的提取建立基本的方法,以便为其作为药物和植物生长调节剂的开发打下基础。

一、材料与方法

(一) 材 料

- | | | |
|----------|-------------------------------------|--------------------|
| 1. 孔石莼 | (<i>Ulva pertusa</i>) | 1998 年 4 月采自青岛太平角。 |
| 2. 浒苔 | (<i>Enteromorpha prolifera</i>) | 1998 年 4 月采自青岛太平角。 |
| 3. 鸡毛菜 | (<i>Pterocladia capillacea</i>) | 1998 年 5 月采自青岛太平角。 |
| 4. 海黍子 | (<i>Sargassum miyabei</i>) | 1998 年 5 月采自青岛太平角。 |
| 5. 鼠尾藻 | (<i>Sargassum thunbergii</i>) | 1998 年 6 月采自青岛太平角。 |
| 6. 海带(干) | (<i>Laminaria japonica dry</i>) | 时间,地点同上。 |
| 7. 海带(鲜) | (<i>Laminaria japonica fresh</i>) | 时间,地点同上。 |
| 8. 多管藻 | (<i>Polysiphonia urceolata</i>) | 1998 年 4 月采自青岛太平角。 |

^{*} 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3466 号。

收稿日期:1998 年 7 月 8 日。

(二) 方 法

1. 鲜海藻的处理

新鲜采集的海藻样品用海水冲洗干净后,用吸水纸将海藻表面的水分吸干,然后称取一定重量的样品备用。

2. 干海藻的处理

与鲜藻同时采集的海藻样品用海水冲洗干净后直接在阳光下晒干,塑料袋密封保存。

3. 定性检测

采用德尔根多夫(Dragendorff's)阳性反应定性检测法。称取一定重量的鲜海藻,切碎后与无水酒精一起在匀浆机中破碎,萃取 24h 后抽滤保留萃取液。萃取液用旋转蒸发仪减压浓缩除去乙醇和水分,并将贴壁的大量色素和盐分去掉,保留澄清的溶液。过阳离子交换树脂,用氨水洗脱后的溶液用旋转蒸发仪减压浓缩、蒸干后重新溶解于水得到纯化的样品溶液,用于定性分析。

4. 定量分析

雷氏盐特异沉淀法测定海藻中的甜菜碱。重复定性的制备方法,得到重新溶解于水的纯化样品后加饱和的雷纳克酸盐(雷氏盐)溶液形成雷纳克酸季胺化合物沉淀。用乙醚洗脱后加丙酮形成深红色溶液。抽滤,抽滤液加硝酸银形成雷纳克酸银沉淀。加助滤剂帮助抽滤,水洗沉淀,收集的滤液即为硝酸季胺化合物溶液。用于定量分析的硝酸季胺化合物用标定好的 NaOH 溶液滴定。

三、结果与讨论

1. 德尔根多夫定性分析

海藻中的甜菜碱及其类似物包括季胺化合物和叔硫化合物两类,季胺化合物又包括甜菜碱和非甜菜碱的季胺化合物,非甜菜碱的季胺化合物和叔硫化合物构成了甜菜碱的类似物。所有这些化合物均为德尔根多夫阳性化合物,与德尔根多夫试剂反应呈阳性,产生深褐色的沉淀。定性结果列于表 1。

表 1 甜菜碱及其类似物的德尔根多夫阳性反应定性检测结果*

海藻样品溶液 (5ml)	Dragendorff's 试剂	
	初始加入量 1 滴	第二次加入量 5 滴
浒苔	+	+++
鸡毛菜	+	+++
海黍子	—	+
海带	—	+
水(对照)	—	—

* 表中的“+”表示沉淀物生成的估量。

初始加入一滴 Dragendorff's 试剂,浒苔和鸡毛菜便产生了少量的沉淀,海黍子、海带和水无任何反应。继续加入 5 滴 Dragendorff's 试剂,浒苔和鸡毛菜的溶液中则明显地产生了大量的棕褐色沉淀,而海带和海黍子只有少量的沉淀形成。对照(水)无任何反应。定

性结果表明,海藻中含有甜菜碱及其类似物。绿藻中的浒苔和红藻中的鸡毛菜所含季胺化合物及叔硫化合物的含量明显高于褐藻。

2. 甜菜碱的含量

雷纳克酸根离子与季胺基团的反应具有较强的特异性,从而形成雷纳克酸季胺化合物沉淀。尽管非甜菜碱季胺化合物也同时被雷氏盐沉淀出来,但由于它们没有羧基或磺酸基(如牛磺酸甜菜碱等),加之酸性较弱,因而在 pH 值为 6 的条件下不足以被碱滴定。甜菜碱脂为脂溶性化合物,不在分离得到的产物中,所以甜菜碱的总含量不包括甜菜碱脂。用标定好的 NaOH 滴定后甜菜碱的含量列于表 2。

表 2 几种主要海藻中甜菜碱的含量

	海藻种类	定容容量 (ml)	NaOH 滴定量(ml)(平均值)	取样量 (ml)	甜菜碱 (mmol/kg,鲜藻)
绿藻	石莼	250	37.23	50	7.76
	浒苔	250	35.47	50	14.78
红藻	鸡毛菜	250	12.48	50	3.45
	多管藻	250	17.78	50	7.43
褐藻	海黍子	250	6.28	50	0.52
	鼠尾藻	250	0.96	50	0.072
	海带(鲜)	250	2.71	50	0.15
	海带(干)	250	4.25	50	0.69(干品)

从表 2 可以看出,绿藻和红藻的甜菜碱含量较高,石莼和浒苔的甜菜碱含量分别为 7.76mmol/kg 和 14.78mmol/kg,明显地高于褐藻中的海黍子(0.52mmol/kg)、鼠尾藻(0.072mmol/kg)和海带(0.15mmol/kg)。

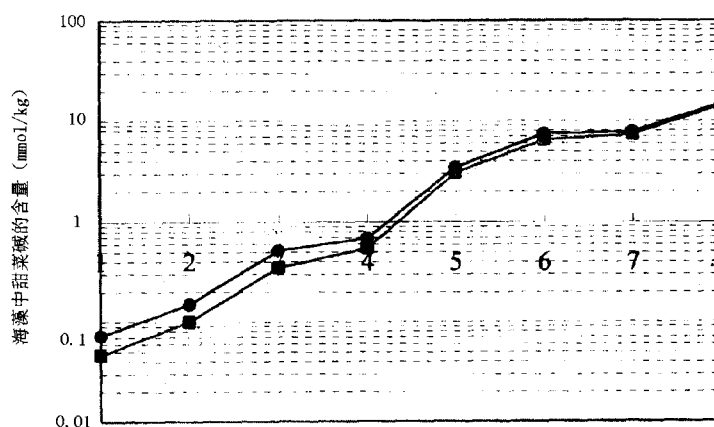


图 1 雷氏盐沉淀法的重复性实验结果

●第一次定量结果;■第二次定量结果(横坐标为海藻种类,顺序同表 2)

海藻中的甜菜碱在提取过程中经离子交换树脂和雷氏盐沉淀可能有一定的损失,因此甜菜碱在海藻中的实际含量应比测定的结果稍高。甜菜碱的含量越高,这种影响越小。浒苔和石莼的甜菜碱含量较高,这种影响可以忽略。对含量较低的海黍子,鼠尾藻和海带

来讲,这种影响则应予考虑。图 1 显示了雷氏盐沉淀法的重复性实验的结果。

实验结果表明了海藻中甜菜碱的浓度在 10mmol/kg 以上基本没有影响,所测定的甜菜碱含量接近实际含量,含量越低,这种影响越大。在实际的提取过程中和其在作物生长过程中的活性作用时这种影响将不得不考虑。

3. 甜菜碱最低重量百分含量的估算

根据 Hanson 等(1978)的文献报道,海藻中甜菜碱的种类多达 18 种以上,最广泛、含量最高的是甘氨酸甜菜碱。按甘氨酸甜菜碱的分子量估算海藻中最低湿重百分含量,再根据海藻的水分析算出干重百分含量,其结果列于表 3 和图 2。

表 3 海藻中甜菜碱的最低重量百分含量

海藻种类	甜菜碱含量 (mmol/kg, 鲜藻)	湿重百分含量 (%)	干重百分含量 (%)
石莼	7.76	0.10	0.50
浒苔	14.78	0.18	0.90
鸡毛菜	3.45	0.04	0.20
多管藻	7.43	0.09	0.45
海黍子	0.52	0.006	0.030
鼠尾藻	0.072	0.001	0.005
海带(鲜)	0.15	0.002	0.01
海带(干)	0.69	0.0018	0.009

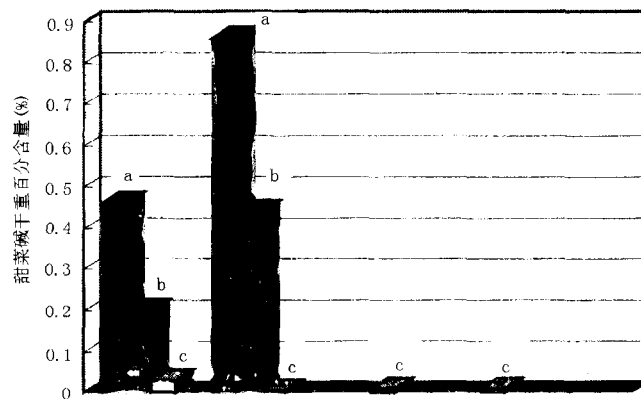


图 2 七种海藻样品的最低干重百分含量

a. 两种绿藻; b. 两种红藻; c. 三种褐藻(四种样品)

(海藻种类同图 1)

从表 3 和图 2 的结果可以看出,红藻和绿藻的甜菜碱含量较高,其中浒苔的含量高达 0.9%。褐藻的百分含量较低,其中海带的含量只有 0.01%,浒苔的含量是海带含量的 90 倍。将海藻中甜菜碱的浓度换算成重量百分浓度的目的是可以更直观地考虑应用海藻中的甜菜碱。

根据已有的文献,海藻中某些特定的甜菜碱及其类似物在同属不同种类的海藻中的分布具有明显的一致性。分布一致性很高的甜菜碱及其类似物将可以作为分类学指示物来对海藻进行分类(Storey *et al.*, 1977,; Blunden *et al.*, 1982)。此外,由于海藻中甜菜碱

及其类似物的种类和含量都很丰富,而且已发现的具有药物活性的这类物质的生物毒性很低,因此可以作为药物和药物辅剂进行开发。早在1962年 Wheeler 就认为甜菜中的甘氨酸甜菜碱是一种植物生长剂,1993年 Whapham 等对南非昆布的海藻提取液(Mixicrop)中的几种甜菜碱和植物叶绿素体的含量关系进行了研究,发现浓度很低的甜菜碱就能大大提高作物叶绿素的含量。因此,甜菜碱对制备海藻液体肥料,用于促进作物生长,改善作物品质有很大的开发潜力。

参 考 文 献

- Amico, V. *et al.*, 1976, Amino acids, sugar and sterols of some Mediterranean brown algae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 4: 143—146.
- Blunden, G., 1977, Cytokinin activity of seaweed extracts. In: *marine Natural Products Chemistry*, Plenum Press, New York, 337—344.
- Blunden, G. *et al.*, 1982, Lysine betaine and other quaternary ammonium compounds from British species of the Laminariales. *J. Nat. prod.*, 45(4): 449—452.
- Blunden, G. *et al.*, 1984, Biologically active compounds from the British marine algae. In: Krogsgaard-Larsen CP, Christensen S and Kofod H (eds) *Natural Products and drug Development, Alfred Benzon Symposium*, 20: 179—190.
- Blunden, G. *et al.*, 1986, NMR spectra of betaine from Marine algae, *Magnetic resonance in chemistry*, 24: 965—971.
- Byerrum, R. U. *et al.*, 1956, Utilization of betaine as a methyl group donor, *PL. physiol., Lancaster*, 31: 374—377.
- Gorham, J., 1984, Separation of plant betaines and their analogues by cation-exchange high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 287: 345—351.
- Hanson, A. D. *et al.*, 1978, Betaine accumulation and (¹⁴C) formate metabolism in water-stressed barley leaves. *PL. physiol. Lancaster*, 62: 305—312.
- Misako Kato, *et al.*, 1996, Distribution of betaine lipids in marine algae, *Phytochemistry*, 42(5): 1341—1345.
- Storey, R. *et al.*, 1977, Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance, *Phytochem.*, 16: 447—453.
- Whapham, C. A. *et al.*, 1993, Significance of betaines in the increased chlorophyll content of plants treated with seaweed extract. *J. Appl. Phycol.*, 5: 231—234.
- Wheeler A. W., 1962, Betaine: A plant-growth substance from sugar-beet (*Beta vulgaris*), *J. exp. Bot.*, 14: 265—271.

STUDIES ON THE BETAINES IN SEAWEED*

Han Lijun, Fan Xiao, Zhou Yonghang
(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

Based on the special chemical characteristics of betaines and their analogues, ion-exchange chromatography was selected to extract and separate them from marine algae. Dragendroffs reagent (KBiI₄) was used to test the existence of betaines and their analogues in marine algae. The total content of betaines from seven species was obtained by using the sediment method of Reinkeate salt. The result shows that the content of betaines in two species of *Chlorophyta* and two species of *Rhodophyta* are relatively high, the content of betaines in *Enteromorpha prolifera* can even to 0.9%. The content in the three species of *Phaeophyta* is relatively low.

The total results obtained by above methods will be great value to determine how to exploit and utilize betaines and their analogues in marine algae.

* Contribution No. 3466 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.