

海洋浮游植物分解和代谢产物中高分子有机物的紫外、红外和¹H-核磁共振光谱特征*

王 琰 曹文达

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 用 GDX 102 树脂从海洋浮游植物三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornerutum*) 的分解产物和代谢产物中分离提取腐植类物质 (DHS, EHS) 及乙醇可溶物 (DES, EES), 用 ¹H-NMR, IR 和 UV 光谱进行结构分析, 并同海水中腐植质 (HS) 和乙醇可溶物 (ES) 做了比较。结果表明, DHS, EHS 和 HS 都以高支链烷烃、碳水化合物和氨基酸结构为主要组分, 另有少量芳烃和杂环化合物。它们的化学结构很相似, 说明 DHS 和 EHS 是海水腐植质的重要来源。

关键词 浮游植物 分解 代谢 腐植质

海洋高分子有机物对生物、地球化学和物理等过程有重要影响, 其中尤以生化稳定性为特征的腐植质的作用最为重要。由于腐植质在海水中浓度较低, 分离困难, 对海水腐植质的研究开展较晚。Kalle 在1931年用光度测定发现海水中黄色物质 (Gelbstoff) 的存在。Riley 等人 (1969) 用 Amberlite XAD-2 树脂从海水中吸附得到腐植物质。纪明侯等 (1982) 用 GDX-102 树脂从海水分离腐植物质。近年来, 由于现代分析技术的发展, 对海洋腐植质的结构有了广泛的研究 (Gillam, et al., 1987; Hatcher, et al., 1980; Wilson, et al., 1983), 但对海洋腐植质的重要前体物质——浮游植物代谢产物和分解产物研究甚少。腐植质特性与来源物质的性质、结构有密切关系, 研究海水腐植质前体物质的结构特征可进一步了解腐植质在海洋生态系统中的行为和功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornerutum*)

实验室培养的营养条件: N(10mg/L), P(1 mg/L), Fe(0.1 mg/L), 光强 5 000—6 000lx。光暗周期为 18:6, 温度在 15±1℃。

1.1.2 吸附树脂 GDX-102 天津试剂二厂生产。树脂先后用乙腈和苯在索氏萃取器

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2155 号。

国家自然科学基金资助项目, 49070274 号。

收稿日期: 1990年11月1日; 接受日期: 1991年7月25日。

抽提后装柱,用 3 倍体积的 0.5mol/L NaOH 和乙醇淋洗。

1.1.3 海水中高分子有机物 海水先通过细孔泡沫塑料过滤,加盐酸使之 pH 值为 2, 然后以每分钟小于 2 倍树脂床体积的流速逆向通过 GDX-102 吸附柱。吸附后先用 $\text{pH} = 2$ 的盐酸溶液淋洗,然后以蒸馏水淋洗树脂至流出液无氯反应,最后用 5 倍树脂床体积的 NH_4OH 溶液洗脱,得到腐植类物质 HS, 再用同体积的 95% 乙醇洗脱,得到乙醇可溶物 ES。

NH_4OH 洗脱液和乙醇洗脱液分别用旋转蒸发器在 $<45^\circ\text{C}$ 下减压浓缩至 20ml, 然后冻干,样品保存于干燥器中。

1.1.4 三角褐指藻代谢物中高分子有机物 将处于指数生长期的三角褐指藻离心分离,清液再用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤放置室内(不搅动),6 个月后用盐酸酸化至 $\text{pH} = 2$, 然后用上述 GDX-102 树脂吸附方法提取得到腐植类物质 (EHS) 和乙醇可溶物 (EES)。

1.1.5 三角褐指藻分解产物中高分子有机物 将离心得到的三角褐指藻放入盛海水(经沙芯滤斗过滤)的大型培养槽中,放置室内(不搅动),6 个月后用上述 GDX-102 树脂吸附法提取腐植类物质 (DHS) 和乙醇可溶物 (DES)。

1.2 分析方法

1.2.1 高分子有机物紫外光谱分析 取适量样品溶于水后用 751 G 分光光度计测定。

1.2.2 高分子有机物红外光谱分析 称取干燥后的样品约 1mg, 研成粉末后加入 200 mg KBr , 研磨均匀,压片,用岛津 IR-440 红外光谱仪测定。

1.2.3 高分子有机物 $^1\text{H-NMR}$ 谱分析 仪器为 JNM-Fx 90 Q 核磁共振仪,观察频率 89.55 MHz , 核磁管径 5cm。取 20mg 左右样品配成溶液,在室温放置 50d 后观察 $^1\text{H-NMR}$ 谱。腐植质用 D_2O 作溶剂,再加入几滴 NaOD (Wilson, et al., 1988), DSS 作内标,用同核门去偶 (NMG) 消除水峰, 观察偏置 54.55 kHz 。乙醇可溶物用 CDCl_3 作溶剂, TMS 作内标,观察偏置 54.4 kHz 。

2 结果和讨论

2.1 紫外光谱

DHS, EHS, DES, EES 在紫外区都有较强的吸收 (图 1), 200nm 波长处吸收最高, 随波长增加吸收强度逐渐降低, 这与海水腐植质和乙醇可溶物的紫外吸收相似 (纪明侯等, 1982)。DES 在 270nm, 225nm 附近有弱的吸收。腐植质是蛋白质、碳水化合物、脂肪酸及其它一些物质的天然杂缩产物, 含有各种碳-碳双键, 含氧基团如羟基、烷氧基、羰基、羧基, 在紫外区域都有较强的吸收。

2.2 红外光谱

DHS, EHS 和 HS 的 IR 谱有许多相同的特征吸收(如图 2)。在 $3400-3390\text{cm}^{-1}$ 处的吸收为氢键相连的醇羟基和酚羟基, $2980-2850\text{cm}^{-1}$ 为脂肪族 C-H 伸展吸收, 1720cm^{-1} 处的吸收峰是羰基和羧基, $1650-$

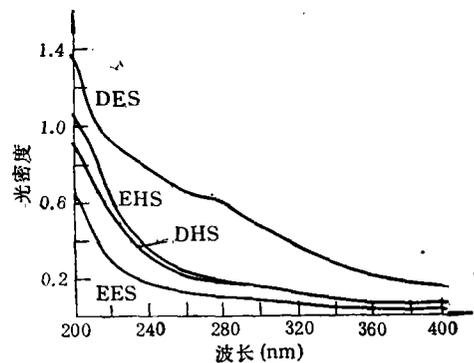


图 1 高分子有机物紫外光谱图
Fig. 1 UV spectra of high molecular weight compounds

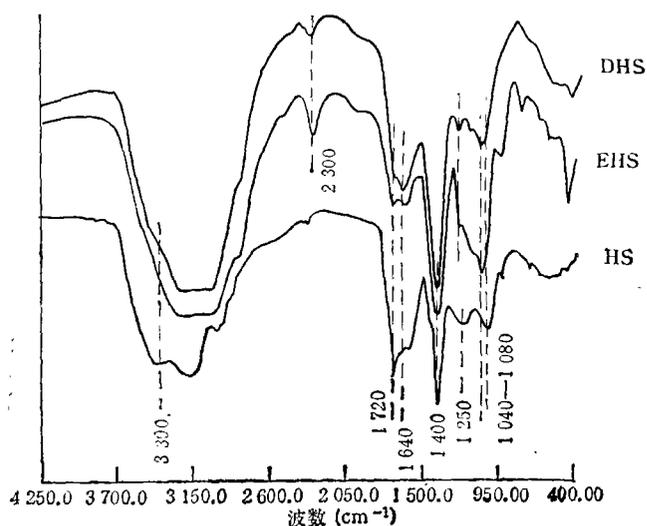


图 2 腐植质的红外光谱图

Fig. 2 Infra-red spectra of humic materials

1600cm^{-1} 为芳烃、碳—碳双键及带氢键的羰基吸收, $1450\text{—}1400\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是 COO^{-1} 对称伸展振动和脂肪烃 C—H 的扭曲振动, $1250\text{—}1220\text{cm}^{-1}$ 是醇、醚 C—O—C 伸展振动和 COOH 中 OH 扭曲振动, $1080\text{—}1040\text{cm}^{-1}$ 的吸收是多糖 C—O 伸展振动 (Rubinsztain, et al., 1986)。

DHS 和 EHS 在 2300cm^{-1} 处有明显的吸收峰, 这是腈基的特征吸收。腈基是蛋白质、核酸、卟啉的分解产物 (Gillam, et al., 1985)。DHS 和 EHS 在 1720cm^{-1} 处的吸收相对较 HS 弱, 在 1640cm^{-1} 的吸收峰相对较强。IR 谱表明, DHS 和 EHS 含有许多活泼组分。

乙醇可溶物的 IR 谱如图 3。ES 在 2960cm^{-1} 处有很强的脂肪烃 C—H 伸展振动, 表明其丰富的烷烃结构组分, 1720cm^{-1} 处是羰基和羧基的吸收峰, 1460cm^{-1} 处有一个亚甲基吸收产生的弱峰, $1280\text{—}1170\text{cm}^{-1}$ 处有 C—O—C 伸展振动吸收, 在 $1080\text{—}1040\text{cm}^{-1}$ 为多糖 C—O 伸展振动吸收。DES 和 EES 在 2250cm^{-1} 处的弱吸收可能是腈基, 在 2050cm^{-1} 的吸收是叁键产生的。DES 和 EES 的羰基和羧基的主要吸收峰分别为 1750cm^{-1} 和 1680cm^{-1} , 另外在 900cm^{-1} 以下的指纹区, DES 和 EES 的吸收也比较复杂。从 IR 谱看出, ES 和 DES, EES 结构组分有较明显的差别。

2.3 核磁共振 $^1\text{H-NMR}$ 谱

样品溶解在 D_2O 中, 加入几滴 NaOD 溶液可引起 $^1\text{H-NMR}$ 信号最大飘移达 0.2ppm (Wilson, et al., 1988)。腐植质的 $^1\text{H-NMR}$ 共振信号可分为以下几个区域 (Wilson, et al., 1983): $0.5\text{—}1.8\text{ppm}$, 远离芳香环和羰基等吸电子基团的碳上的烷基质子。 $1.8\text{—}3.0\text{ppm}$, 同芳香环、羰基等吸电子相连的 α -碳上的质子。 $3.0\text{—}5.0\text{ppm}$, 醇、醚中同氧相连以及化合物中同氮、卤素相连的 α -碳上的质子。 $6.4\text{—}9.0\text{ppm}$, 芳香、烯、杂环化合物质子。

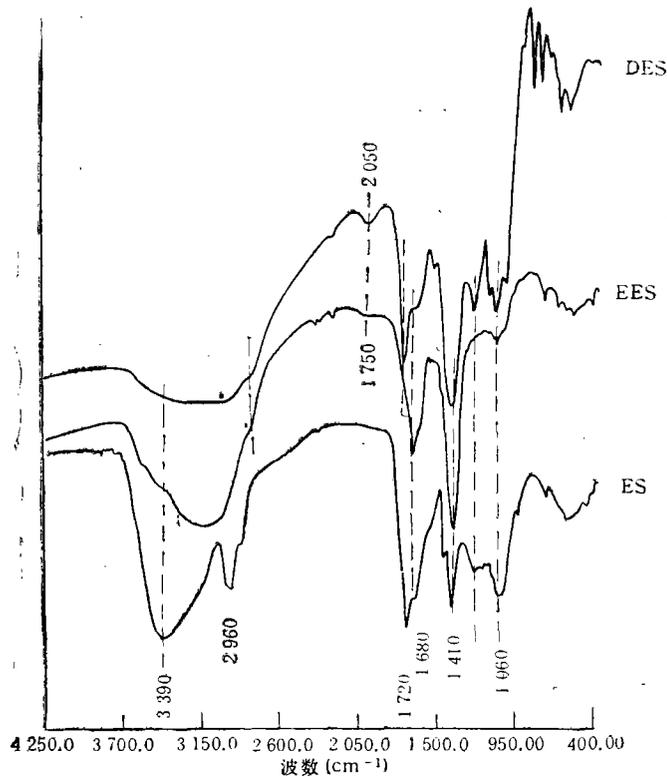
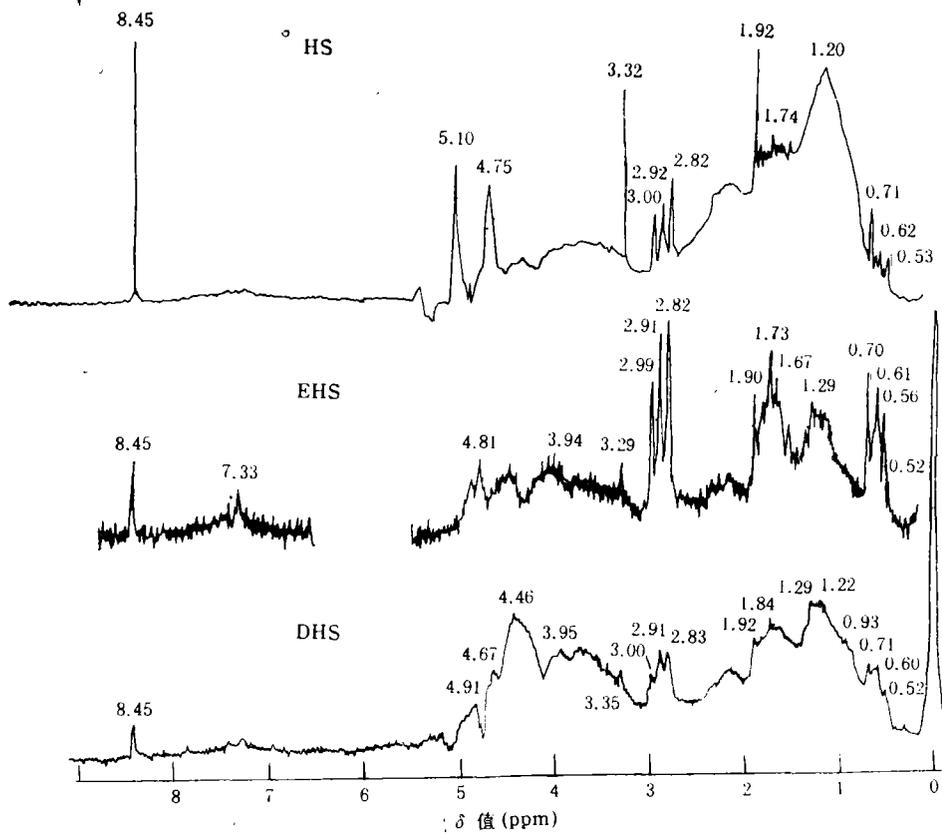


图 3 乙醇可溶物的红外光谱图

Fig. 3 Infra-red spectra of ethanol-soluble matter

从图 4 看出,HS 和 DHS,EHS 的 ^1H -NMR 谱比较相似,都有 0.52ppm,0.60ppm,0.70ppm 共振峰,0.92ppm 和 1.22ppm 信号分别是甲基和亚甲基;1.65—1.80ppm 间的许多信号可能是处于双键去屏蔽区及与卤素相连的 β -碳上的烷基质子;1.92 ppm 尖峰是 $\text{CH}_3\text{-CO}$ 基团质子,可能是乙酸分子;2.20ppm 处的宽信号是连接羰基、羧基或酯的亚甲基质子;2.82(2.83)ppm,2.91(2.92)ppm,2.99(3.00)ppm 较强的尖峰是芳香环侧链上的 $\alpha\text{-CH}_2$ 和碳碳或碳杂旁边的次甲基质子;3—4ppm 间的复杂信号表明醇、醚键和含氮官能团的存在,可能是氨基酸和碳水化合物;3.32ppm 尖峰是甲醇质子;4.0—5.5ppm 信号来自于醇 OH 基质子、NH 质子和卤代物 $\text{CH}_2\text{-X}$ 质子;7.33ppm 附近的弱信号可能是芳烃和杂环化合物;8.45ppm 尖峰是甲酸质子 (Wilson, et al., 1988)。

海水乙醇可溶物 ES 的 ^1H -NMR 谱(图 5)中,0.88ppm,0.96ppm,1.05ppm,1.17ppm 是靠近吸电子基团的甲基质子信号;1.20ppm 是亚甲基信号;1.25ppm 处很强的峰是聚亚甲基质子 (IR 谱中 2960 cm^{-1} 附近有很强的烷烃 C—H 伸展振动吸收),这种高支链烷烃可能来源于海洋生物的脂肪酸 (Stuermer, et al., 1978); 1.46ppm 峰是靠近吸电子基团的亚甲基;2.18ppm 是与羰基相连的 α -碳质子;3.98ppm 处很强的共振峰可能来自于 -CHO -和 $\text{-CH}_2\text{O}$ 基团信号 (IR 谱中 3400 cm^{-1} 处有很强的由氢键联接的醇羟基吸收峰)。

图4 腐植质 $^1\text{H-NMR}$ 谱图Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ spectra of humic materials

代谢产物中乙醇可溶物 EES 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱比较简单, 在 0.88ppm, 1.10ppm, 1.17ppm 有较弱的甲基质子峰, 1.26ppm 为亚甲基质子信号, 3.07ppm 的强信号可能是硅藻通过代谢排泄出来的碳水化合物和氨基酸结构。

分解产物中乙醇可溶物 DES 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱给出较多的结构信息。0.88ppm 是甲基质子, 0.96ppm, 1.04ppm, 1.11ppm, 1.17ppm 是靠近吸电子基团的甲基共振信号; 1.25ppm 处强的共振信号表明 DES 含有很多聚亚甲基结构。1.31ppm, 1.35ppm, 1.37ppm, 1.45ppm 是靠近吸电子基团的亚甲基质子。3—4.5ppm 间的信号比较复杂, 可能是蛋白质、碳水化合物、脂肪酸等的分解产物。

ES, DES, EES 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱表明它们之间的结构有较大差别。

海洋高分子有机物 $^1\text{H-NMR}$ 谱线比较宽, Schnitzer (1985) 认为是由于存在氢键和一些顺磁性金属离子。Farmer (1985) 研究表明, 腐植质经碱水解或氧化, 一些低分子量化合物可以从腐植质大分子网络中释放出来, 这些小分子化合物在 $^1\text{H-NMR}$ 谱上呈现离散共振尖峰 (Gillam, et al., 1987)。Wilson (1988) 用 $^1\text{H-NMR}$ 从不同来源的腐植酸中检测到了二酸、醋酸、甲醇、乳酸和一些芳香甲氧基化合物等低分子量组分。本实验中 HS, DHS, EHS 样品在加有 NaOD 的 D_2O 溶液中放置 50 d, 结果得到许多离

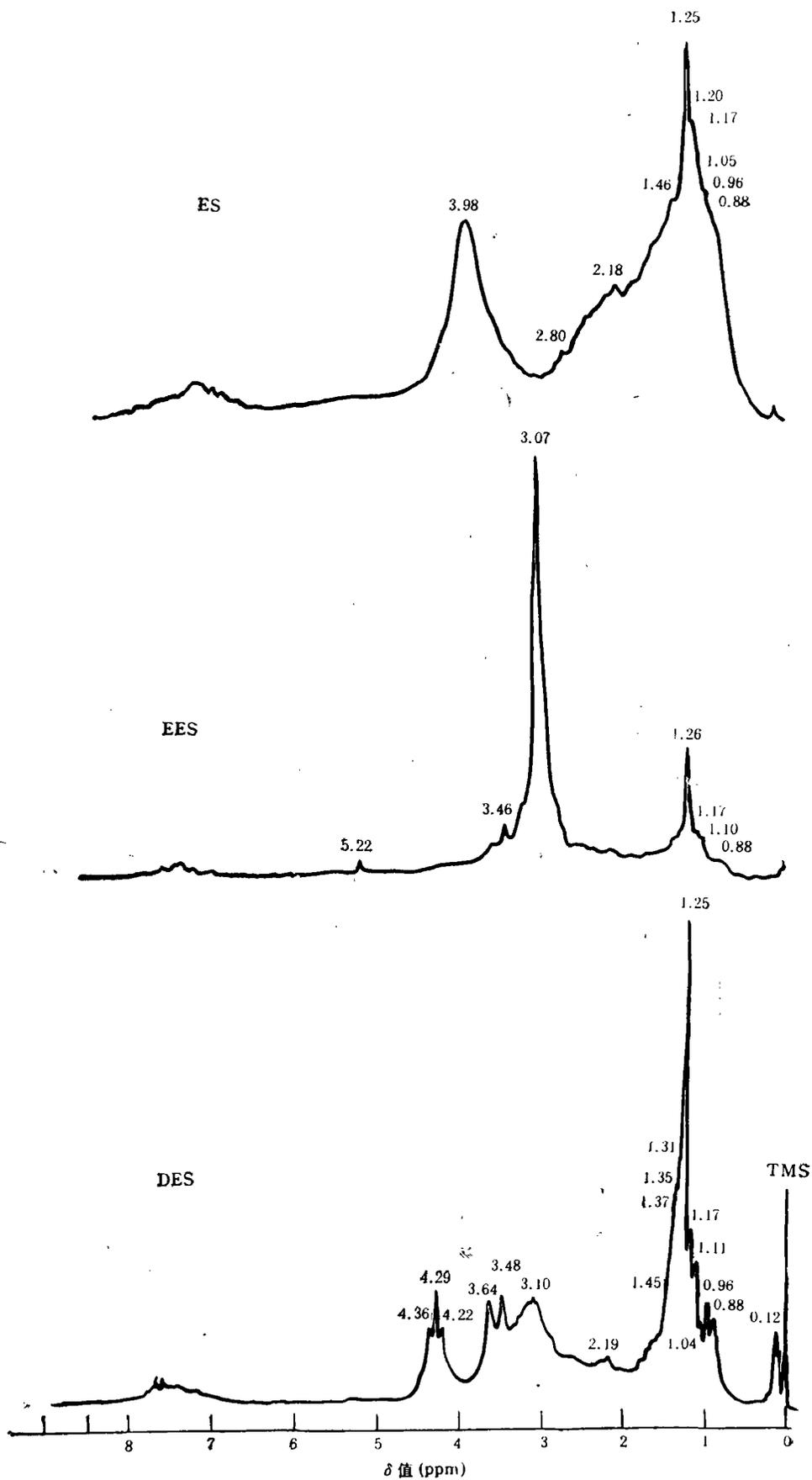


图 5 乙醇可溶物的 ¹H-NMR 谱

Fig. 5 ¹H-NMR spectra of ethanol-soluble materials

散共振尖峰,存在甲酸、甲醇、醋酸及其他一些小分子化合物。DHS 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱离散尖峰比较少,说明一些小分子化合物没有释放出来,或 DHS 中一些来源于生物体的化合物尚未被明显分解。

IR 谱和 $^1\text{H-NMR}$ 谱表明,三角褐指藻分解和代谢产物中的高分子化合物 (DHS, DES, EHS, EES) 和 HS, ES 含有少量的芳烃和杂环化合物。芳香结构可能是不饱和脂肪酸的脱氢环化聚合物以及微生物的芳香代谢产物。Gillam 等人(1987)用 ^{13}C , $^1\text{H-NMR}$ 证明海洋腐植质含有大量羧基、烷基及少量芳香烯碳,并且芳香烯碳大部分是不带质子的。从本实验结果看出, $^1\text{H-NMR}$ 谱上芳香质子信号比较弱。

以上结果表明, EHS 和 DHS 还处于腐植化过程中,有可能继续被微生物降解或经过化学反应形成稳定的产物。由此可见,浮游植物分解产物和代谢产物是海洋腐植质的重要来源。

参 考 文 献

- 纪明侯等, 1982, 海洋腐植质的研究 I. 用 GDX-102 吸附树脂分离海水腐植质, *海洋与湖沼*, **13**(4): 370—378.
- Farmer, V. C. and Pisaniello, D. C., 1985, Against an aromatic structure for soil fulvic acid, *Nature*, **313**: 474—475.
- Gillam, A. H. et al., 1987, Structural analysis of sea loch sedimentary humic substance by ^{13}C - ^1H -dipolar dephasing NMR, *Org. Geochem.*, **11**(2): 91—101.
- Gillam, A. H. and Wilson, M. A., 1985, Pyrolysis-GC-MS and NMR studies of dissolved seawater humic substances and isolates of a marine diatom, *Org. Geochem.*, **8**(1): 15—25.
- Hatcher, P. G. et al., 1980, ^1H and ^{13}C NMR of marine humic acids, *Org. Geochem.*, **2**: 77—85.
- Riley, J. P. and Tayloy, D., 1969, The analytical concentration of traces of dissolved organic materials from sea water with Amberlite XAD-I resin. *Analys. Chem. Acta*, **46**: 307—309.
- Rubinsztain, Y. et al., 1986, Characterization of melanoidins by IR spectroscopy I. Galactoseglycine melanoidins, *Org. Geochem.*, **9**(3): 117—125.
- Schnitzer, M., 1985, Aromaticity of soil fulvic acid, *Nature*, **316**: 658.
- Stuerner, D. H. and Harvey, G. R., 1978, The isolation of humic substances and alcohol-soluble organic matter from seawater, *Deep-Sea Res.*, **24**: 303—309.
- Wilson, M. A. et al., 1983, ^1H -nuclear magnetic resonance study of a soil humic acid, *J. Soil Sci.*, **34**: 297—304.
- Wilson, M. A. et al., 1983, Analysis of the structure of dissolved marine humic substances and their phytoplanktonic precursors by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance, *Chem. Geology*, **40**(3/4): 187—201.
- Wilson, M. A. et al., 1988, Low molecular weight species in humic and fulvic fractions, *Org. Geochem.*, **12**(1): 7—12.

^1H -NMR, IR AND UV SPECTROSCOPIC CHARACTER OF HIGH MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS FROM DEGRADATION AND EXCRETION PRODUCTS FROM MARINE PHYTOPLANKTON*

Wang Yan Cao Wenda

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

Marine humic materials have significance in aquatic ecosystem, participating in many biological, chemical and physical processes occurred in ocean. There is an extensive relationship between the properties of humic materials and their precursors. The investigation of structural character of the humic precursors leads to the further knowledge of the function of humic material in aquatic ecosystem. The work has firstly isolated humic precursors (DHS, EHS) and ethanol-soluble substances (DES, EES) from degradation and excretion products from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by GDX-102 resin. The structure of the compounds isolated has been investigated by ^1H -NMR, IR and UV spectroscopy, comparison with marine humic materials (HS) and ethanol-soluble substance (ES) being made. The results indicate the similarity of chemical structure of HS, DHS and EHS. Alkyl chains, carbohydrates and amino acid derivatives and to a lesser extent aromatic, heterocyclic materials are important contributors to the structure of HS, DHS and EHS. Many low molecular weight compounds (such as formate, methanol and acetic acid) were released from macromolecular network of humic material after basic hydrolysis, forming many discrete signals in ^1H -NMR spectroscopy. The presence of many active groups in EHS and DHS, such as nitriles (probably they are degradation products from proteins, nucleic acids and porphrin), indicates that EHS and DHS are still in the processes of humification. There are structural differences among ES, EES and DES. Alkyl chains (probably from lipids in algae) are present in greater proportion in ES and DES than in EES. There appears to be different types of carbonyl groups occurred in ES, EES and DES (the carbonyl-group absorbance of ES, EES and DES in IR spectra are 1720 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} and 1680 cm^{-1} , respectively). Active components are present in EES and DES, indicating their potential instability.

Key words Phytoplankton Degradation Excretion Humic materials

* Contribution No. 2155 from the Institute of Oceanology, Academia, Sinica.