

文章编号:1673-1689(2009)06-0781-05

海带生物有机活性碘的提取、分离、 纯化和结构验证测定

迟玉森, 庄桂东, 黄国清, 张凤, 李凤梅
(青岛农业大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 分离提取纯化海带中的有特殊补碘功效的有机活性碘, 确定其结构, 为科学补碘提供正确依据。方法步骤是: 水浸提后, 超微过滤除去大分子杂质; 等电沉淀富集有机活性碘; 活性炭柱特异性吸附分离后, 纸层析分离单体组分; 获得的单体组分经过熔点测定、质谱分析、红外光谱分析, 并与DIT(3,5-二碘酪氨酸)标准品对比, 确定其结构。结果发现, 海带浸提过程中, 存在三碘(无机碘、有机碘、总碘)溶出平衡曲线, 50~55 °C浸提温度下, 浸提周期10~12 h最为合理; pH 5.0~5.3的等电沉淀, 可以富集79%的海带有机碘; 纸层析, 得到80 mg海带有机活性碘纯品; 熔点测定结果, 该品的熔点为(323±2)°C, 与DIT标准品的(323±1.5)°C接近; 海带中有特殊补碘功效的有机活性碘质谱分析、红外光谱分析结果, 与DIT标准品分析结构吻合, 确定这种活性碘为3,5-二碘酪氨酸。

关键词: 海带; 活性碘; 有机碘

中图分类号: TS 254.58

文献标识码: A

Extraction, Purification, and Structural Identification of an Organic Active Iodide from Kelp

CHI Yu-shen, ZHUANG Gui-dong, HUANG Guo-qing, ZHANG Feng, LI Feng-mei
(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The target of this manuscript was to extract, purify and identify an organic iodide with the iodine supplementation activity from kelp. The maximum yields of organic iodine and total iodine were obtained when the kelp was extracted in 50~55 °C for 10~12 h and then 79% of organic iodine was recovered from kelp in the isoelectric precipitation in pH 5.0-5.3. At last, 80 mg pure organic active iodide was acquired through paper chromatography. By compared with that of the standard material and determined by mass chromatogram and infra-red spectrogram, the purified compound with iodine complementing function was identified as 3,5-diiodo-l-tyrosine (DIT).

Key words: kelp, active iodide, organic iodide

收稿日期: 2008-12-19

基金项目: 山东省科技攻关项目(2005-135)。

作者简介: 迟玉森(1962-), 男, 山东龙口人, 工学博士, 教授, 主要从事海洋活性物质研究。

Email: sd-chiyusen@163.com

碘是一种人体必需的微量元素^[1-3],人体不可或缺,但是需要量极小,每人每年大约需要 56 mg。碘缺乏时,机体会出现一系列的障碍,但是不慎过量摄入容易发生中毒。近一二年内,国内发生多起补碘过量的中毒事件,在社会引起极度的恐慌,使得人们谈碘色变。海带是一种药食同源的食品原料,是地球上含碘最高的生物,干海带含碘量高达 2 400~7 200 mg/kg^[4-5],千百年来,人们将其作为一种蔬菜长期食用。在长期的实践中,人们发现沿海大量食用海带的居民,其摄碘量为高碘地区居民的 166.7 倍,却不患高碘甲状腺;山东省长岛县的居民每人每年由海带中摄取的碘至少为 30 000 mg,为正常量的 556 倍,千百年来却从未中毒出现;甚至在 3 年自然灾害期间,几乎天天以海带为主食,也未出现任何中毒现象。这些事实,启发我们进一步去思考、探索和大胆地推测:海带中除了含有一般意义上的无机碘之外,还含有一种特殊形式的碘,这种特殊形式的碘,对于实现科学补碘、消除碘缺乏病,具有重要意义。

Swingle 于 1922 年发现,3,5-二碘酪氨酸(缩写 DIT)在蝌蚪变青蛙的变态过程中,具有非凡的生理作用,被称为“活性碘(Active Iodine)”^[6]。笔者研究发现,DIT 在动物体内的代谢形式,与经典的“离子代谢理论”阐述的不同,是以分子形式参与代谢^[7]。并且发现,海带中不仅存在无机碘,而且还存在有机碘。这些有机碘在动物的补碘实验中,表现出非常高的补碘效率和安全性:无机碘超出常规用量 20 倍后,在动物身上就表现出毒性,而海带中的有机碘超出常规用量 100 倍,依然没有表现出毒性。为了进一步弄清海带中的有机碘,有效地开发利用海带资源,实现科学、安全补碘,笔者对海带中有机碘的提取、分离纯化工艺进行了研究,并对纯化后的海带有机碘进行了结构分析。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

海带,山东长岛经济开发有限公司提供;盐酸、NaOH、无水乙醇、磷酸、苯酚、甲醇、乙酸、戊醇,均为 AR 级;吡啶、茛三酮,均为生化试剂;酪氨酸(Tyr),纯度 $\geq 98\%$,Sigma 公司标准品;3,5-二碘酪氨酸(DIT),纯度 $\geq 98\%$,Sigma 公司标准品。

1.2 仪器与设备

层析缸;国产新华 1 号层析滤纸,面积大小为 7.5 cm \times 2.5 cm;超微过滤装置;日本 OP-1000A 质谱仪,电子能量 70 eV;Bio-Rad FTS 红外光谱

仪,溴化钾压片;WRS-1B 数字熔点仪;FT-IR200 型红外光谱仪。

1.3 方法

1.3.1 提取纯化工艺与测定流程 海带活性碘的提取路线见图 1。

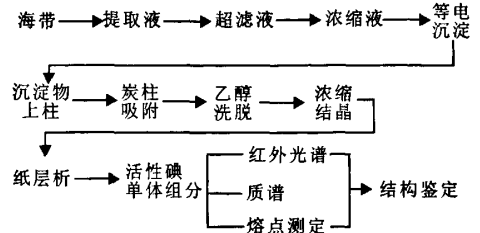


图 1 提取路线

Fig. 1 Flow chart

化学成分的分 离大致可以分为组分提取、组分分离和单体分离 3 个阶段,也可以根据预试验的结果灵活运用。

1.3.2 海带活性碘的提取、分离

海带活性碘的提取:海带所含碘成分具有良好的水溶性,以 50~55 °C 净化热水,对选取的海带原料进行控温浸提 12 h。

超滤去杂:用相对分子质量为 3 000 的超滤膜组件对提取液进行超滤,去除提取液中含有的褐藻胶等大分子物质。

组分等电分离:调超滤液的 pH 5.0~5.3,离心分离沉淀,得到等电富集物。

等电沉淀后体系中结合碘的测定:等电沉淀后,分别测定上清液和沉淀中的总碘、无机碘量,并计算结合碘总量。

1.3.3 富集组分的进一步分离 有资料报道,3,5-二碘酪氨酸就是一种活性碘。活性炭对酪氨酸等带有苯环的氨基酸类化合物,有特殊的吸附与洗脱能力。参考有关资料^[1],利用活性炭柱处理海带提取液的等电富集物,把海带生物活性碘和酪氨酸,与其它等电点附近的氨基酸分离,进一步纯化浓缩活性碘。

活性炭柱处理:取活性炭用水浸泡后装柱,通入 2 倍体积 2 mol/L NaOH,水洗至中性;再通入 2 倍体积 2 mol/L HCl,水洗至中性。

分离:富集后的等电沉淀物,用稀盐酸配成体积分数 5%~15% 的上柱液,进样体积流量 1 mL/min,5 min 后以每分钟增加 0.5% 流量梯度进样通入炭柱。适量水平衡后,通入含乙醇的 1 mol/L 氨水,洗脱体积流量为 4 mL/min,5 min 后以每分钟增加 2.5% 流量梯度洗脱。收集 pauly 反应阳性部

分,即为与其它氨基酸分开的含酪氨酸、DIT 的洗脱液,浓缩备用。

1.3.4 纯化海带活性碘 DIT 的单向纸层析

炭柱分离后得到的是含酪氨酸与 DIT 的混合液,采用制备型的纸层析色谱法,进一步分离纯化,以获得用于结构测定的单体。

采用表 1 所列不同展开剂体系的试剂。

表 1 不同展开剂体系
Tab. 1 Developing solvents tested

序号	展开剂
I	pH 6.8 磷酸缓冲液-酚(体积比 2:8)
II	pH 12.0 的磷酸缓冲液-饱和酚
III	正丁醇-甲醇-水(体积比 6:1:1)
IV	正丁醇-乙酸-乙醇-水(体积比 8:2:2:5)
V	戊醇-吡啶-水(体积比 35:35:30)

分别以不同展开剂体系,采用上行层析,对被展开样品展开一定距离后取下吹干,茚三酮显迹检查结果,层析温度为(22±4)℃。选择分离效果较好的溶剂系统,作为纯化 DIT 的单向层析展开剂。

将待分离的样品溶于 1 mol/L 的盐酸中,在滤纸一端反复点样,以选好的溶剂系统为展开剂上行展开。与标样对照,得一个紫外检色带。将标记色带剪下,用 1 mol/L 盐酸洗脱后,过滤,真空浓缩至干,即得纯化的样品,判断纯度情况,以便确定可否进行下面的测定。

1.3.5 活性碘的结构鉴定 纯化的海带有有机碘样品,分别用质谱仪和红外光谱仪测定其结构。即分别采用红外光谱法和质谱法。直接进样,将活性碘试样点置于进样杆顶端的进样器上,直接进入质谱仪的离子源中,样品直接汽化。

2 结果与讨论

2.1 “三碘”曲线——活性碘提取周期的确定

海带中含有无机碘和有机碘两种碘,要提取的活性碘属于有机碘范畴。无机碘与有机碘溶出速度不一样,因此提取体系中的无机碘、有机碘、总碘含量随时间发生变化。见图 2。

由图 2 可见,浸提初期,无机碘迅速溶出,含量迅速升高,2 h 后无机碘含量曲线达最高点,总碘含量也达最高点;随着时间的延长,由于 I⁻ 被水中溶解的 O₂ 等氧化为 I₂ 而升华,无机碘含量下降,总碘含量随之下降,5 h 降至最低。

有机碘的溶出随时间逐渐增加。5 h 后,溶出

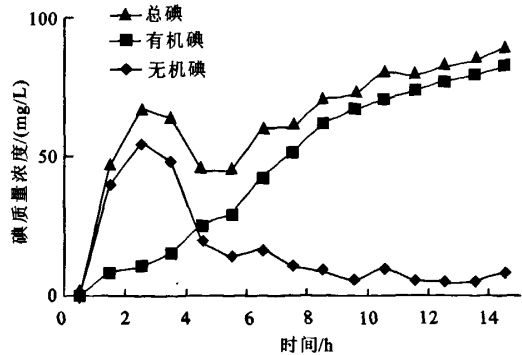


图 2 浸提液中“三碘”(总碘、无机碘、有机结合碘)随时间变化曲线

Fig. 2 Change of the amount of total iodine, inorganic iodine and organic iodine in liquid with the time

量超过无机碘的升华量,总碘量又趋缓慢上升。10 h 后,溶液中无机碘降至很低,有机碘浸出接近平衡,含量几乎不再增加,因而浸提周期定为 12 h。

2.2 等电沉淀、富集有机结合碘

等电沉淀的目的,是使与酪氨酸结合的碘化酪氨酸以及等电点相近的其它氨基酸(如酪氨酸等)沉淀析出,从而与体系中的其它组分分离开来。

表 2 是体系中沉淀物与上清液中有有机碘与无机碘含量的测定结果。结果表明,大部分结合碘富集于沉淀物之中,有机活性碘由等电沉淀而得以富集。

表 2 上清液中有有机碘与无机碘含量的测定结果

Tab. 2 Contents of total and inorganic iodide in the supernatant

项目	总碘质量/mg	无机碘质量/mg	有机碘质量/mg	富集率/%
上清液	350	289	61	21
沉淀物	279	44	235	79

2.3 纸层析

2.3.1 展开剂体系的选取 选用 5 种展开剂系统,在纸层析上对几种氨基酸的分离效果进行考察。结果发现 5 种展开剂的分离效果均比较理想,两种氨基酸层析 R_f 值见表 3。层析结果见图 3。

表 3 Tyr 和 DIT 在各种展开剂的 R_f 值

Tab. 3 R_f values of Tyr and DIT in different developing solvents

展开剂序号	R _f 值	
	Tyr	DIT
I	0.59	0.15
II	0.65	0.30
III	0.27	0.10
IV	0.54	0.14
V	0.85	0.30

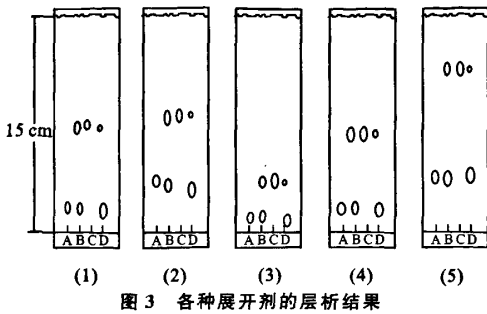


图3 各种展开剂的层析结果
Fig.3 Paper chromatograms of DIT and Tyr in different developing solutions

由图可知,5种展开剂对两种氨基酸的分离,斑点圆整清楚,组分间 R_f 值均大于0.05,基本符合理想展开剂的各项条件。特别是其中的Ⅲ、Ⅳ溶剂系统,层析速度非常快,因此选择这两个系统作进一步考察,发现这两种展开系统,只要展开层达10 cm,就可以将两种组分明显分开,此时二者的展开时间分别为:层析剂Ⅲ为45 min,而层析剂Ⅳ为95 min,因此选用层析剂Ⅲ为理想的展开剂系统。

2.3.2 纸层析纯化 用16张单向纸层析的展开图谱,通过层析展开和分离提纯,得到活性碘纯品80 mg。

2.4 活性碘的结构鉴定

2.4.1 熔点测定结果 海带活性碘样品外观为淡黄色粉末,与从美国Sigma公司购得的标准品DIT几乎一样。数次测定结果表明,熔点为 $(323 \pm 2)^\circ\text{C}$,与平行测定的DIT标准品的熔点 $(323 \pm 1.5)^\circ\text{C}$ 非常接近,且熔点变动范围很小,表明样品比较纯,可以用于进行结构分析。见表4。

表4 海带活性碘样品与DIT标准品熔点测定结果
Tab.4 Melting points of the active iodide and the DIT standard

样品名称	外观	熔点/ $^\circ\text{C}$
海带活性碘样品	淡黄色粉末	323 ± 2.0
DIT标准品	淡黄色粉末	323 ± 1.5

2.4.2 质谱测定 活性碘样品的质谱数据见表5,其特征碎片的相对丰度列于表6。

表5 海带活性碘的质谱测定数据
Tab.5 MS results of the bioactive iodine

离子碎片 相对分子质量	离子碎片 相对丰度/%	离子丰度	离子碎片 相对分子质量	离子碎片 相对丰度/%	离子丰度
41.0	2.1	8 550	104.0	2.4	9 580
42.0	2.2	8 730	105.0	7.3	29 240
43.0	2.7	10 920	106.0	6.5	25 730
44.0	14.2	56 500	107.0	5.0	20 090
45.0	1.6	6 200	108.0	2.0	8 160
46.0	4.9	19 560	109.0	2.7	10 740
50.0	5.7	22 570	127.0	6.5	26 120
51.0	9.9	39 400	128.0	9.6	38 100
52.0	3.6	14 390	131.0	1.1	4 400
53.0	9.5	37 730	133.0	1.4	5 670
54.0	1.0	4 050	134.0	2.6	10 460
55.0	1.7	6 740	135.0	1.1	4 440
57.0	3.4	13 480	136.0	1.7	6 890
61.0	1.1	4 450	194.0	1.6	6 400
62.0	2.3	9 100	231.0	1.1	4 370
63.0	2.9	11 640	232.0	8.7	34 600
66.0	1.2	4 910	233.0	32.7	130 300
67.0	1.9	7 460	234.0	6.7	26 580
68.0	1.3	5 070	254.0	4.1	16 210

续表 5

离子碎片 相对分子质量	离子碎片 相对丰度/%	离子丰度	离子碎片 相对分子质量	离子碎片 相对丰度/%	离子丰度
74.0	39.6	158 100	260.0	1.1	4 390
75.0	7.4	29 450	261.0	2.8	11 200
76.0	6.0	24 050	262.0	1.3	5 240
77.0	7.7	30 580	359.0	100.0	398 900
78.0	5.1	20 440	360.0	30.2	120 400
79.0	2.4	9 630	361.0	2.3	9 180
80.0	1.9	7 620	387.0	1.1	4 420
82.0	1.3	5 340	388.0	4.0	15 940
89.0	1.4	5 760	433.0	4.6	18 370

表 6 海带活性碘特征碎片的相对丰度

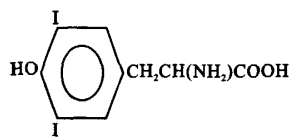
Tab. 6 Relative abundance of various fragments of the active iodine

特征碎片	m/z	相对丰度/%
M^+	433	4.3
$M^+ - C_2H_4NO_2$	388	4.0
$M^+ - CHO_2$	359	100
$M^+ - C_2H_4NO_2I$	233	29.1

2.4.3 红外光谱测定 IR (KBr) cm^{-1} : 1 702, 1 683 (C=O), 3 251-3 183(NH), 1 620, 1 510 (苯

环)。

2.4.4 综合判断 海带活性碘样品的 MS(质谱)与 IR(红外光谱)测定结果,以及熔点测定结果(323 ± 2) $^{\circ}C$,与化合物 3,5-DIODO-L-TYROSINE 完全吻合,因此可以确定海带中的活性碘即为 3,5-二碘酪氨酸。分子式为: $C_9H_9I_2NO_3$; 化学结构式为:



参考文献(References):

- [1] 高福成,迟玉森. 新型海洋食品[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:5.
- [2] 马泰. 碘缺乏病[M]. 北京:人民卫生出版社,1993.
- [3] 张梅申. 有待开发的补碘食物[J]. 食品科技,1994(5):16.
ZHANG Mei-shen. Developing food supplied Iodine[J]. *Food Science and Technology*, 1994(5):16. (in Chinese)
- [4] Takagi M. Studies on the catalase in marine algae, on the catalase activity in marine algae[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1953, 18(10):483.
- [5] 李爱杰. 海带若干化学成分及过氧化氢酶活力的季节变化研究[J]. 水产学报,1995,2(3):77.
LI Ai-jie. Study on the variation of chemical composition and catalase activity in kelp with seasons[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1995,2(3):77. (in Chinese)
- [6] Swingle W W. Iodine and anuran metamorphosis[J]. *Science*, 1922,56(1460):720-721.
- [7] 迟玉森. 3,5-二碘酪氨酸在动物体内的代谢研究[J]. 营养学报, 2001,23(6):130.
CHI Yu-sen. Study on metabolism of 3,5-diiodo-l-tyrosine in mice body[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2001,23(6):130. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平)