藻蓝胆素二甲酯水加成物的形成和结构*

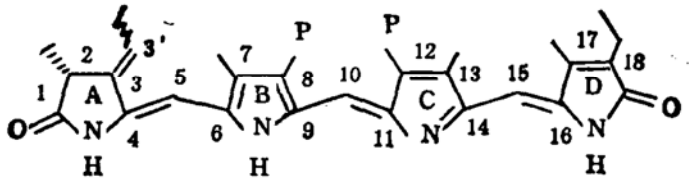
程凌江　　蒋丽金

(中国科学院感光化学研究所，北京 100101)

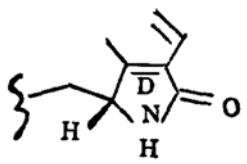
关键词　藻蓝胆素二甲酯、水、加成-消除反应

藻胆蛋白是红藻（Rhodophyta）、蓝绿藻（Cyanophyta）和隐藻（Cryptophyta）中类囊体膜外光合辅助色素，它们由开链四吡咯发色团辅基和脱辅蛋白以共价键结合而成．研究这些发色团辅基的化学性质及其衍生物的形成对阐述藻胆蛋白的光生物现象是很有意义的．

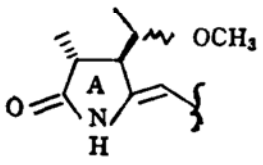
文献报道的从海藻或藻胆蛋白中提取开链四吡咯发色团主要用浓盐酸水解[1]、溴化氢-三氟乙酸裂解[2]和甲醇回流[3]等方法．本文从多管藻（*Polysiphonia urceolata*）中提取和分离出藻胆蛋白粗品，然后用 50% 的甲醇水溶液回流．甲酯化后分离除了得到已知化学结构的藻蓝胆素二甲酯(**1**)、藻红胆素二甲酯(**2**)、藻蓝胆素二甲酯甲醇加成物(**3**)和藻红胆素二甲酯甲醇加成物(**4**)外，还得到一种新的衍生素(**5**)．通过 UV-vis、^{1}H NMR 和 MS 技术，证明了 **1—4** 的结构与文献报道的一致[3-7]．新化合物在结构上与 **1—4** 有所差别．本文报道 **5** 的形成和结构．



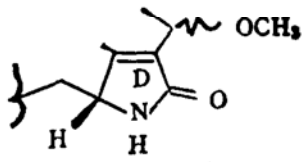
1 (P=$CH_2CH_2CO_2CH_3$)



2 (A、B、C环同1)



3 (B、C、D环同1)



4 (A、B、C环同1)

一、实　验

UV-vis 用 HP-8451A 型仪测定．IR 用 Perkin-Elmer 983G 型测定，KBr 压片．^{1}H NMR 用 Varian XL-400 型测定(溶剂 $CDCl_3$，内标 TMS)．MS 用 ZAB-HS 色质联用仪，FAB 离子源．化学试剂除硅胶G为青岛海洋化工厂产品外，其它均为北京化工厂产品．

本文 1991 年 3 月 10 日收到．1991 年 5 月 12 日收到修改稿．

* 国家自然科学基金资助项目，并得到北京中关村地区联合分析测试中心基金的资助．

将 500g 藻胆蛋白粗品溶于 800ml 蒸馏水中，离心除去不溶杂质后转入 2000ml 圆底烧瓶内，加入抗坏血酸 6g，甲醇 800ml. 混合均匀，通氩气 30min，在氩气保护下回流(油浴温度 110℃) 1.5h. 待回流液冷却后，加入氯仿 400ml，振荡，静置分层，用分液漏斗分出氯仿萃取液. 氯仿萃取液减压旋转蒸发至干. 其甲醇溶液在氩气的保护下继续回流 1.5h，冷却后用氯仿萃取，氯仿萃取液减压旋转蒸发至干，与前一次样品合并.

将上面所得到的固体溶于 10ml 甲醇中，通氩气 20min 后加 5ml 三氟化硼的乙醚溶液. 在氩气的保护下回流(油浴温度 65℃)10min. 将反应物倒入 50ml 蒸馏水中，用氯仿萃取(10 ml × 4)，氯仿溶液用水洗至中性并干燥后减压旋转蒸发至干，得固体总重约 50mg.

混合物用制备型硅胶板分离，展开剂：四氯化碳：乙酸乙酯 = 2:1，共有七条带，R_f 值分别为 0.7，0.6，0.48，0.36，0.2，0.1 和 0.05；前两条带对应的化合物分别为 **1** 及 **3**；第三、四两条带对应的为 **2** 的 Z、E(乙叉基的构型)两种异构体；第五条带对应于 **5**；第六、七两条带对应于 **4** 的几种异构体. 每条带分别收集后，用含 5% 甲醇的氯仿溶液萃取，氯仿萃取液经水洗、干燥和减压旋转蒸发后，得各化合物. 其中 **5** 的量约为 1mg. **5** 的性质如下：UV-vis: λ_{max} ($CHCl_3$) — 370，604nm；λ_{max}($CHCl_3$-$Zn(OAc)_2$) — 378，610nm；λ_{max}($CHCl_3$-AcOH) — 370，604nm. IR: ν_{max}(KBr) — 3400(NH)，2925，2840 (CH)，1730，1700，1650，1660 (C=O). MS: m/z(FAB) — 631 ($M^+ - 1$). ^1H NMR 见表 1.

表 1　**5** 的 ^1H NMR 数据 ($CDCl_3$，TMS — 0ppm，400MHz)

氢归属	δ_H (ppm)	多重度，偶合常数 (Hz)	积分
18'-CH_3	0.876	*t* 6.8	3H
2-CH_3	1.356	*d* 6.8	3H
3'-CH_3	1.491	*d* 6.8	3H
7-CH_3	2.012	*s*	11H
13-CH_3	2.031	*s*	
17-CH_3	2.206	*s*	
18-CH_3	2.053	*m*	
α-CH_2	2.551	*t* 6.0	4H
β-CH_2[a]	2.887，2.927	*m*	4H
2-H	3.428	*q* 6.8	1H
$COOCH_3$	3.674，3.683	*s*	6H
3'-H[b]	4.766，4.792	*m*	1H
5-H	5.805	*s*	1H
10H[c]	6.025，6.043	*s*	1H
15-H[c]	6.602，6.611	*s*	1H

a) 两个三重峰叠加成多重峰，δ_H 由照 2.551ppm 而得；
b) 两个四重峰叠加成多重峰，δ_H 由照 1.491ppm 而得，立体异构体；
c) 立体异构体的两组峰.

二. 5 的鉴定

5 在薄层层析板上位于 **2** 和 **4** 之间，它的分子量为 632，是 **1** 与水分子量之和. 根据它的 R_f 值和分子量可知它可能是类似于 **3** 的藻蓝胆素水加成物. 但是，它在氯仿中的 UV-vis λ_{max} = 604nm 和 370nm，加酸后 λ_{max} 值没有变化，峰的形状和强度也变化不大(图 1). **3** 的 UV-vis λ_{max} — 350，590nm，加酸后，λ_{max} 红移至 358nm 和 624nm. 由此可见，在共轭骨架

面，**3** 与 **5** 是不同的．在 ^{1}HNMR 谱中，我们首先注意到位于 4.78ppm 的氢信号，从信号的位置看，它不是四吡咯化合物的双键碳上的氢，但比一般饱和碳氢远偏于低场．通过重水交换，此信号没有变化，表明它不是活泼氢．用双照技术照射 4.78ppm 信号时，全谱只有 1.491ppm 处的双峰变成单峰．1.491ppm 处信号可归属为 2-CH_3 或 3-CH_3，所以 4.78ppm 处的信号归属为 2-H 或 3′-H．参考文献对 **1** 和 **2** 的鉴定 2-H 的信号在 3.428ppm，所以 4.78ppm 的信号可归属为 3′-H．由于照射 4.78ppm 时全谱仅 1.491ppm 处信号有变化，所以 3-碳上没有氢原子．与 3′-H 的化学环境类似的仲醇的 CH 氢的 δ 值在 4ppm 附近，3′-H 的信号偏于低场是由于 3-碳双键及羟基的共同作用引起的．照射 2-H 信号 3.428ppm 只引起 1.356ppm 处 2-CH_3 的双峰变成单峰，其它地方的峰形没有变化，这进一步说明 3-碳上没有氢原子．在照射 1.491ppm 时，4.78ppm 处的复杂峰变成双峰(4.766、4.792ppm)．这两个峰的强度相等，它们不是因与 3-碳上氢偶合产生的(3-碳上没有氢)，而可能是 3′-碳的不对称性引起的．15-H 和 10-H 也为强度相等的两个信号．由此可见，**5** 实际上是一对差向异构体．由于它们的性质极其相近，常规的方法是很难分离的．表 1 中 **5** 的^{1}HNMR 信号归属是由上面的分析并结合 **1** 和 **3** 的^{1}HNMR 数据得到的[2,4,5]．从 UV-vis，MS 及^{1}H NMR 数据，得到 **5** 的具体结构如下：

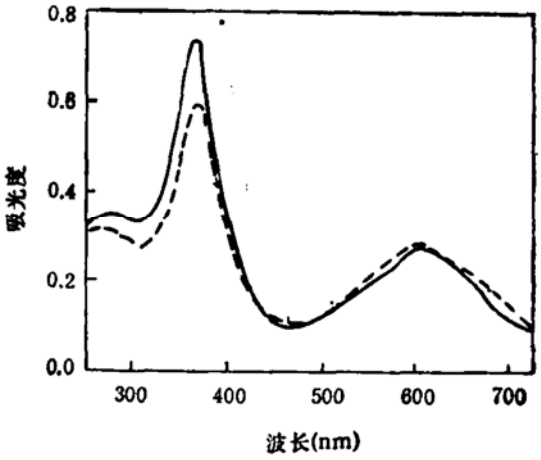
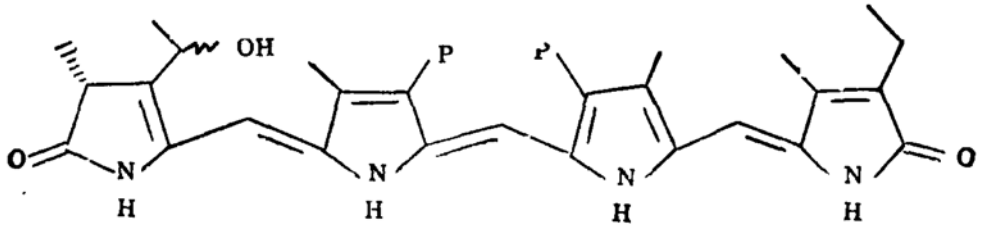


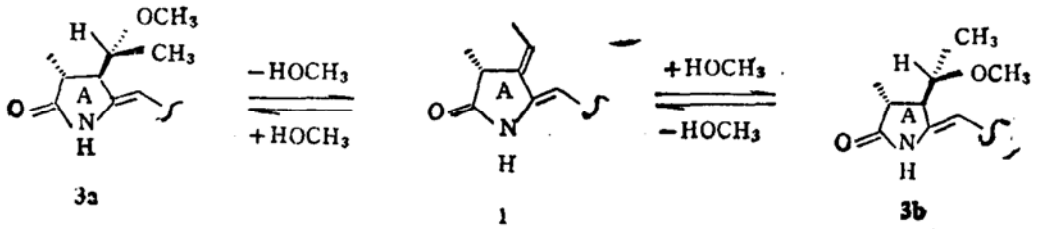
图 1　**5** 的 UV-vis 谱
——氯仿中；----氯仿-乙酸中



5 (P=$CH_2CH_2CO_2CH_3$.

三、讨　论

1 在甲醇中回流可以产生 **3**[8]．此反应是一个平衡反应，当反应达到一定程度时，反应混合物的组成不再发生变化．将 **3** 在甲醇中回流，有一部分 **3** 变成 **1**，并且最终达到反应初始物为 **1** 时的相同比例．**3** 的两个异构体之间也存在平衡．它们之间的平衡转化可表示如下：



3a　　**1**　　**3b**

水分子具有与甲醇类似的作用基团羟基，因此，它与 1 作用的机理和甲醇与 1 作用类似。用纯甲醇回流藻蓝蛋白制取 1 得到的副产物只有 3；而用甲醇水溶液做溶剂时的副产物既有 3 又有 5，并且 3 的量大大地减少了。在甲醇水溶液中回流时也存在下面的平衡转化：

$$3 \underset{+HOCH_3}{\overset{-HOCH_3}{\rightleftharpoons}} 1 \underset{-H_2O}{\overset{+H_2O}{\rightleftharpoons}} 5$$

文献报道 3 的 A 环取代基只处于反式[8]，这是由于 2 位和 3 位取代基之间的张力引起的。从上面的平衡可以看出 5 可能存在具有与 3 相同共轭骨架的异构体，而 3 也可能存在具有与 5 相同共轭骨架的异构体。由于羟基体积较小，藻蓝胆素水加成物以 5 的共轭结构最稳定。

1 和 2 的巯基加成物溶于氯仿中室温下放置几天以后，用薄层色谱法分析可以检测到相应的化合物 1 或 2。酸可促进这一反应[9]。由此可见 1 和 2 的巯基加成物与 1 和 2 之间也存在平衡转化。

一般情况下，脱辅蛋白与藻胆色素连接后，其平衡总偏向于连接的一边。所以，如果不使用甲醇，直接回流藻胆蛋白的水溶液是得不到藻胆色素的[9]。在甲醇溶液中回流时，甲醇使蛋白变性，蛋白对色素的保护作用消除，加上断裂 C — S 键后所产生的 SH 基团立即被破坏，所以平衡向断裂方向进行。分离出色素更有利于断裂反应[10]，更进一步地证明了有关藻胆色素的加成-消除反应为平衡反应。

参 考 文 献

[1] O'Carra, P., O'hEocha, C., Carroll, D. M., *Biochemistry*, 3(1964), 1343—1350.
[2] Schram, B. L., Kroes, H. N., *Eur. J. Biochem.*, 19(1971), 581—594.
[3] 马金石、方娟、孙贤育，生物化学与生物物理进展，1986，6：23—26.
[4] Gossauer, A., Hinze, R. P., Kutschan, R., *Chem. Ber.*, 114(1981), 132—146.
[5] Fu, E., Friedmann, L., Siegelman, H. W., *Biochem. J.*, 179(1979), 1—6.
[6] Gosseuer, A., Weller, J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 100(1978), 5928—5933.
[7] 易国良、蒋丽金、马金石，有机化学，10(1990)，126-128.
[8] Gossauer, A., *Tetrahedron*, 39(1983), 1933—1941.
[9] 程凌江，中国科学院感光化学研究所博士论文，北京，1990.
[10] Arciero, D. M., Bryant, D. A., Glazer, A. N., *J. Biol. Chem.*, 263(1988), 18343—18349.