中 国 科 学
1992 年 4 月　　B 辑　　第 4 期

柞蚕黄茧生色物和生色机理研究*

纪 涛　胡皆汉　王 晶　郭和夫
（中国科学院大连化学物理研究所，大连 116012）
金东植　鞠景堂
（辽宁省柞丝绸科学研究所，丹东 118000）

摘　要

本文用电子光谱和电子自旋共振波谱研究柞蚕黄茧，搞清楚了黄褐色生色物质为龙胆酸与丝蛋白的交联物，并推测出其生色机理.

关键词：柞蚕茧，龙胆酸，电子自旋共振波谱

中国柞蚕茧及其丝织品产量在世界上一直处于遥遥领先的首位，柞丝绸与桑丝绸相似是人们喜爱的纺织品. 但是，柞蚕茧层（或者茧丝）最突出的一点，其颜色不是白的而是黄褐色. 它给生产和使用带来许多麻烦和难以解决的问题，是蚕业和丝绸业一直渴望弄清楚的难题. 本文用电子光谱和电子自旋共振（ESR）波谱对柞蚕黄茧进行研究，搞清楚了呈现黄褐色的生色物质为龙胆酸与丝蛋白的交联物，并推测出其生色机理. 本文采用的方法和得出的结论均未见文献报道.

一、实验与结果

1. 仪器，试剂和试样

紫外光谱仪，岛津 240 型；荧光光谱仪，日立 204A 型；电子自旋共振波谱仪，日本电子 JES-FE2xG 型. 甲醇，分析纯. 柞蚕黄茧，丹东市混茧；人工白茧，大连市金州区；桑蚕茧，河南省南阳市. 标样龙胆酸，上海试剂一厂.

2. 试样检测

（1）紫外光谱　柞蚕茧通常均为黄褐色，称为天然黄茧（简称黄茧）. 将黄茧茧层的表层和内层剥掉，取其中间层剪一小块，用制备红外光谱试样的压片机压平，直接测定其紫外光谱. 采用同样方法还测定了甲醇抽提后的黄茧，甲醇抽提前，后的人工白茧（简称白茧），桑蚕茧和与龙胆酸交联黄褐色的桑蚕茧层，它们的谱图如图 1 所示.

本文 1991 年 3 月 22 日收到，1991 年 11 月 23 日收到修改稿.
* 中国丝绸工业总公司和国家自然科学基金资助项目.

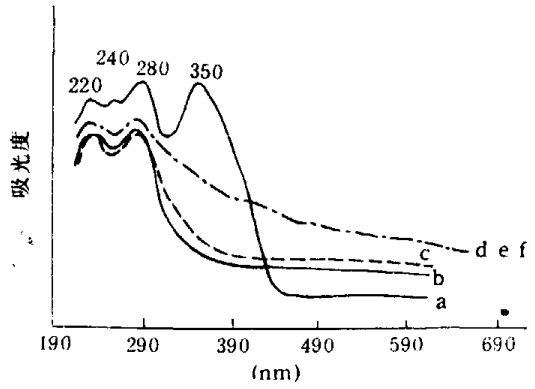


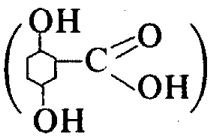
图 1 蚕茧固体试样紫外光谱

(a —— 抽提前人工白茧,b —— 桑茧, c —— 抽提后人工白茧,d,e —— 抽提前后天然黄茧,f —— 交联后桑蚕黄茧)

由图 1 可见,黄茧抽提前后其谱图无明显变化;白茧抽提前后谱图变化特大;抽提前黄茧与抽提前白茧谱图差别很大;抽提后黄茧与抽提后的白茧谱图也差别很大;抽提后的白茧和桑茧却相似;与龙胆酸交联后的桑茧和柞蚕黄茧的谱图相似.

现将谱图予以简要说明. 上述试样均出现 220 nm 和 280 nm 两个谱峰,由于柞蚕丝和桑蚕丝均由 18 种氨基酸组成,其中有紫外吸收的仅有酪氨酸(208nm, 275 nm), 色氨酸(218 nm, 278 nm)和苯丙氨酸(208 nm, 258 nm)[1], 又由于它们在两种茧丝中的含量接近且较多[1],所以各柞茧和桑茧均出现这两个谱峰且峰形相似;黄茧抽提前后谱图无明显变化,表明黄茧能被甲醇抽提的物质甚少,经检测甲醇抽提液中含有微量的龙胆酸;白茧抽提前有 240nm 和很强的 350nm 两个谱峰,经甲醇抽提后这两个谱峰全部消失,而其抽提液的最大吸收波长 λ_{max} 330nm,这与龙胆酸-β-葡萄糖苷(简称龙胆酸糖苷)的标准紫外光谱相同,表明抽提前白茧中出现的 240nm 和 350nm 两个谱峰来自龙胆酸糖苷,而 350 nm 与 330nm 有 20 nm 之差,240 nm 未检测出来,这可能是试样状态所致;抽提前黄茧中不存在或者有很少的游离龙胆酸糖苷而抽提前白茧层中含有较多的游离龙胆酸糖苷,所以谱图相差很大;黄茧在 350nm 以后直至 600nm 出现连续吸收,大于约 400 nm 进入可见区,恰是柞茧产生黄褐色的反映;而抽提后的白茧在可见区几乎无吸收并与桑茧相似,这是它们呈现白色的必然. 至此图 1 谱图的差异和谱峰的变化基本上都解释清楚了.

上述实验的结果表明,柞茧生色物与龙胆酸糖苷有关. 人工白茧放在潮湿空气中,便逐渐地变为黄褐色,称为人工黄茧,其紫外光谱与天然黄茧一致(谱图略),当人工白茧用甲醇抽提后放置在潮湿空气中再也不变黄了,也证明了颜色与龙胆酸糖苷有直接关系. 而龙胆酸糖苷本身几乎无颜色,故在此称为潜在生色物质.

现将黄茧在可见区出现的连续吸收予以解释. 这是个与龙胆酸有关的红移现象,我们知道柞蚕茧层中含有 β-糖苷酶,它可把龙胆酸糖苷水解为龙胆酸[2]. 根据龙胆酸  结构和紫外光谱波长变化规律可知,若丝蛋白中各种活性基团只与龙胆酸中的 —OH, $-C\lesseqgtr^{O}_{OH}$ 基团直接进行交联反应,形成醚、酯和酰胺等,其紫外吸收不可能红移至可见区;只有丝蛋白中的含有弧电子的 O,N 等活性基团,直接与龙胆酸苯核进行亲核取代反应,由于共轭效应和诱导效应,才可能使谱峰产生如此大的红移直至可见区. 用龙胆酸与桑茧进行交联反应,白色的桑茧则变成黄褐色,其紫外谱图与柞蚕黄茧的谱图一致(图 1-f),也表明了这种解释

1)王 晶,中国科学院大连化学物理研究所硕士论文(1987).

的合理性[1].

综上所述,丝蛋白与龙胆酸交联主要交联在其苯核上,丝蛋白参与交联的基团,应当是 OH, OR, NH_2, NHR 和NR_2 等,由于已发生了交联的基团种类和数目不同,才出现了连续吸收,这种多种形式的交联物则呈现出黄褐色.

(2)荧光光谱　测定固体茧层的紫外光谱的同时,还测定了它们的荧光光谱. 在激发波长 E_x 415 nm 激发下,甲醇抽提后的白茧和桑茧都只出现 1 条雷利发射谱,整个谱线背景很低;甲醇抽提前的天然黄茧和人工黄茧均出现发射波长 E_m445 —600nm 的连续谱;甲醇抽提后的天然和人工黄茧也同样地出现了至 E_m600nm 的连续发射谱,但 E_m 445 nm 龙胆酸的谱峰减弱或消失. 在激发波长 E_x 285 nm 激发下,人工白茧出现两个发射谱峰 E_m335nm 和 E_m 435 nm,当白茧用甲醇抽提后 E_m 435 nm 消失,只剩下 E_m 335 谱峰,且抽提液也出现了 E_m 435 nm 谱峰. 显然,E_m 335 nm宽峰为丝蛋白中芳香氨基酸基团的谱峰,而 E_m 435 nm 为龙胆酸糖苷的谱峰;甲醇抽提后的黄茧和桑茧层均出现 E_m 335 nm,且黄茧的甲醇抽提液还出现了 E_m 445 nm 的谱峰,说明黄茧中还残留着少量的还未与丝蛋白交联的微量的游离龙胆酸(荧光谱图全略).

如上所述,荧光光谱与紫外光谱的结论是一致的. 即白茧中含有潜在生色物龙胆酸糖苷,可被甲醇抽提,其茧为白色;黄茧中龙胆酸已与丝蛋白交联,在可见区出现连续吸收,其茧为黄褐色;黄茧中尚存在微量的游离龙胆酸可被甲醇抽提,但已交联的龙胆酸再也抽提不下来了.

(3)电子自旋共振波谱　为了研究龙胆酸与丝蛋白的交联机理,测定了龙胆酸在碱性溶液中的反应.

1)龙胆酸在醇钠-醇溶液中的氧化　取标样龙胆酸甲醇溶液(2.5×10^{-2} mol/L)3ml 置于小容量瓶中,加入约 20mg 金属钠反应 1 min,用微量注射器取出 10 μl 注入毛细管中,再将毛细管放入测试管中进行静态测定. 约 10 min 出现不稳定的自由基信号,并逐渐消失,

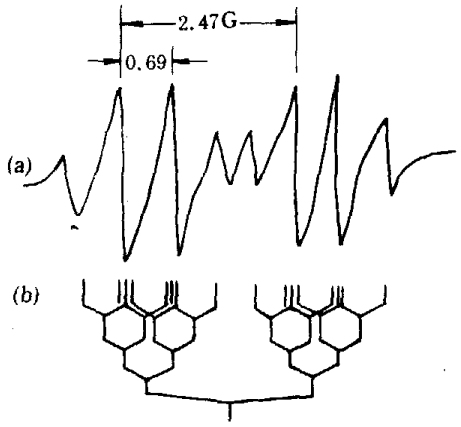


图 2　龙胆酸在甲醇钠-甲醇液中氧化的 ESR 谱(a)和解析谱(b)

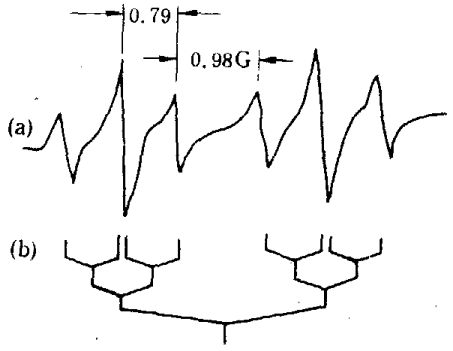


图 3　龙胆酸在乙醇钠-乙醇液中氧化的ESR谱(a)和解析谱(b)

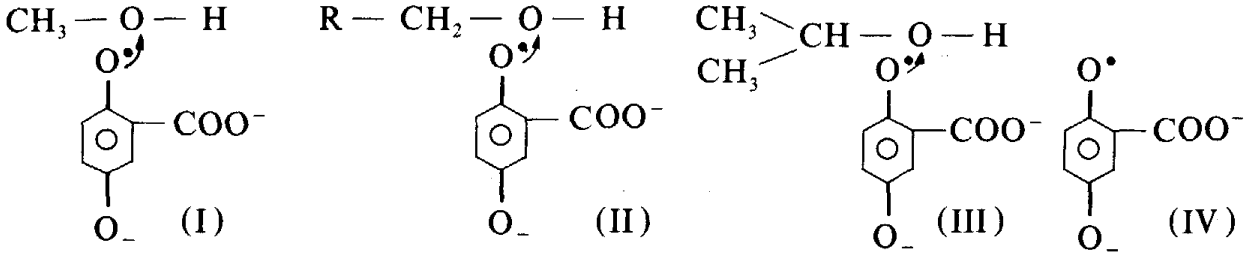
35min 时,开始出现稳定的自由基信号,录谱于图 2. 出现 8 条 ESR 超精细色裂谱线,将溶液放置一夜再测该自由基信号照旧出现. 同样方法还测定了龙胆酸在乙醇钠-乙醇溶液;正丁醇钠-正丁醇溶液;正戊醇钠-正戊醇溶液. 它们均出现 6 条而不是 8 条 ESR 超精细谱线,其自由基寿命均保持 8 h 以上,录其中一谱于图 3.

1)纪　涛等, 桑丝与龙胆酸交联反应电子光谱研究,精细化工, 待发表.

根据谱线超精细分裂规则和谱线的相对强度，可知甲醇钠-甲醇溶液中自由基物种有4个偶合质子，且3个是等同的，则$(2\times3\times1/2+1)(2\times1\times1/2+1)=8$条谱线，再结合谱峰相对强度比1:3:3:1:1:3:3:1，如图2(b)所描述的解析谱(理论谱)与实验谱符合.

同理，可解释图3的6条超精细分裂谱线，它有3个偶合质子，其中2个是等同的，根据谱线分裂规则，$(2\times2\times1/2+1)(2\times1\times1/2+1)=6$条谱线，其相对强度比为1:2:1:1:2:1，如图3(b)描述的理论谱与实测谱也相符.

自由基模型讨论. 实验结果表明该类新自由基模型应该如下:



龙胆酸氧化产生自由基，其自由基向醇上的氧靠近，且单电子定域在氧附近. 若以此推理，龙胆酸在仲醇钠-仲醇溶液中氧化，应出现4条ESR超精细分裂谱线. 当我们测定龙胆酸在异丙醇钠-异丙醇溶液中氧化的ESR谱时，果然得到了4条超精细分裂谱线(谱图略)，说明我们提出的新的自由基模型是合理的[3]. 另外，该自由基模型很容易解释该类自由基寿命长的原因，即自由基受到醇和龙胆酸包围保护所致.

该项实验表明，龙胆酸在该条件下可被氧化，发现了新的自由基系列并给出了其自由基模型(I, II, III)，但醇尚不能取代龙胆酸苯环上的氢.

2)龙胆酸在碱性水溶液中的氧化　采用同上方法，用微量注射器依次向毛细管中注入龙胆酸(1×10^{-3}mol/L)和NaOH (0.2*N*)水溶液，其体积比以3:2为例，再把毛细管抽入ESR测试管中进行静态测定. 获得了与文献[4]相同的ESR谱(见图4)，随着观测时间的延长又录到了另一种ESR谱(见图5)，表明龙胆酸在此氧化过程相继出现两种自由基物种，我们对后一种自由基物种曾进行了深入研究(图5)，给出了其自由基模型(IV)[4].

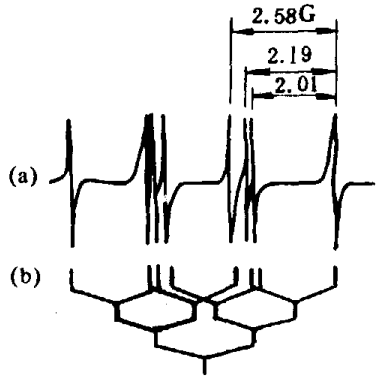


图4 龙胆酸在NaOH水溶液中氧化首先出现的ESR谱(a)和解析谱(b)

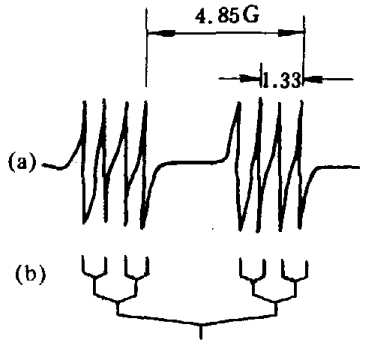


图5 龙胆酸在NaOH水溶液中氧化随后出现的ESR谱(a)和解析谱(b)

3)龙胆酸在碱性水溶液中的取代　龙胆酸在碱性水溶液中的氧化，速度快自由基寿命短，继续延长反应时间或者提高碱的浓度则出现取代反应. 以龙胆酸(1×10^{-2}mol/L)和

2*N* NaOH 水溶液其体积比为 1 :1,可连续出现相对稳定的 5 种 ESR 谱,见图 4 — 8. 结合龙胆酸结构和电子自旋共振波谱理论可知,图 4,5为氧化反应谱,而图 6 — 8 则为取代反应谱. 图 6 和图 7ESR 超精细分裂谱线反映出龙胆酸苯环上剩下 2 个等性和 2 个不等性质子;图 8 谱线则表明其苯环上只剩下一个质子. 在这个简单的体系中,显然是 OH 基团取代了龙胆酸苯环上的氢. 因此,说明已进行了取代反应. 对此本文还进行了模拟,其模拟谱与实测谱一致. (模拟谱略).

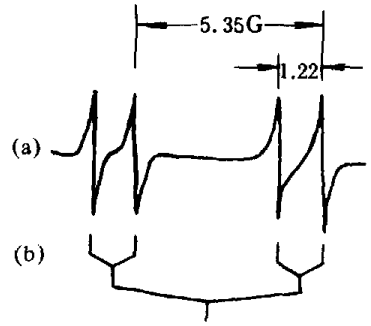


图 6　龙胆酸在NaOH 液中取代首先出现的 ESR 谱(a)和解析谱(b)

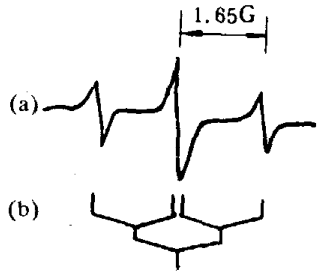


图 7　龙胆酸在NaOH 液中取代随后出现的 ESR 谱(a)和解析谱(b)

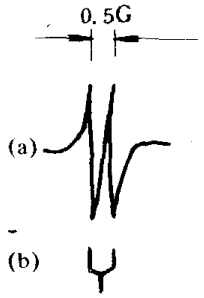
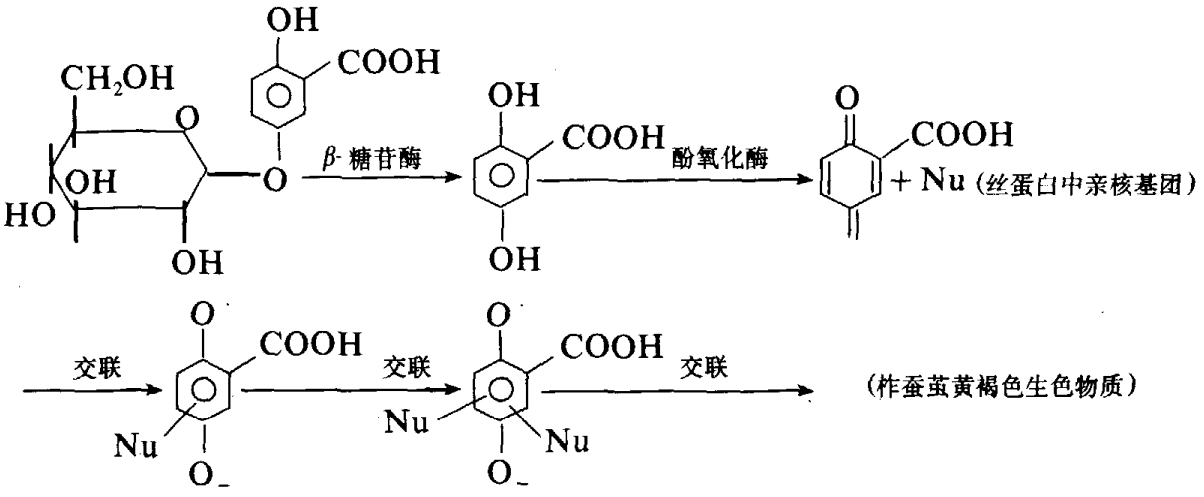


图 8　龙胆酸在NaOH 液中取代最后出现的 ESR 谱(a)和解析谱(b)

二、结　　论

1. 柞蚕茧层黄褐色生色物质为龙胆酸与丝蛋白的交联物.

2. 柞蚕茧层黄褐色生色机理的推测. 首先是β 糖苷酶水解龙胆酸糖苷[3]; 第二步是龙胆酸被酚氧化酶氧化,生成带羧基的对苯二醌;第三步再与丝蛋白中各个基团进行交联反应形成黄褐色. 该推测机理可用下式表示:



参　考　文　献

[1]　日本生化学会编, 生化学データブック,I, 东京化学会同人, 1979, 62.

[2]　胡皆汉等, 丝绸, 1987, 11 :16 — 18.

[3]　纪涛等, 精细化工, 5(1988), 60 — 63.

[4]　纪涛等, 波谱学杂志, 5(1988), 4 : 329 — 334.