

羟基酪醇酶促聚合产物的表征及其抗氧化和热稳定性

谢普军^{1,2}, 黄立新^{1,2,*}, 张彩虹^{1,2}, 丁莎莎¹, 邓叶俊¹, 王晓杰¹

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 生物质化学利用国家工程实验室,

国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210042;

2. 南京林业大学林业资源高效加工利用协同中心, 江苏 南京 210037)

摘要: 利用漆酶对羟基酪醇(hydroxytyrosol, HT)进行酶促氧化聚合, 运用紫外-可见分光光度计、傅里叶红外光谱、凝胶色谱和液相色谱-质谱联用对聚合产物进行表征。结果表明, 形成的聚合物呈现多分散性($D=2.1$), 主要生成了三聚体、四聚体、六聚体化合物。同时, 以VC和2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(dibutyl hydroxy toluene, BHT)为阳性对照, 分别通过清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和热重-傅里叶变换红外光谱(thermogravimetry-Fourier transform infrared spectroscopy, TG-FTIR)联用的方法对其进行抗氧化性及热稳定性评价。结果表明, HT聚合物较HT和BHT具有更强的抗氧化性, 分别约是其2.28倍和5.7倍, 接近于VC(约是其72%)。基于热重微分曲线峰值温度(315.1℃)和残余质量所占百分比(66.09%)结果可知, HT聚合物的热稳定性较VC(228.1℃)、BHT(236.2℃)和HT(314.9℃)更强, 且FTIR结果表明, HT聚合物及其他受试化合物均是以羟基断裂开始, 脱氢形成醌式结构或脱水碳碳双键。这些数据可为HT的深加工利用提供理论和实践基础。

关键词: 羟基酪醇(HT); 漆酶; 聚合物; 凝胶色谱(GPC); 自由基清除; 热重; 傅里叶变换红外光谱(FTIR)

Characterization, Antioxidant Activity and Thermostability of Hydroxytyrosol Polymerization Products Catalyzed by Laccase

XIE Pujun^{1,2}, HUANG Lixin^{1,2,*}, ZHANG Caihong^{1,2}, DING Shasha¹, DENG Yejun¹, WANG Xiaojie¹

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, National Engineering Laboratory for Biomass Chemical Utilization, Key and Open Laboratory on Forest Chemical Engineering, National Forestry Administration, Jiangsu Key Laboratory of Biomass Energy and Material, Chinese Academy of Forestry, Nanjing 210042, China; 2. Co-Innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The oxidative polymerization of hydroxytyrosol was catalyzed by laccase. The resultant products were characterized by UV-Vis spectroscopy, FTIR spectroscopy, gel permeation chromatography (GPC) and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). The results showed that the products were polydisperse ($D = 2.1$), and mainly consisted of trimer, tetramer and hexamer. Meanwhile, the antioxidant activity and thermal stability of the polymers were assessed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay and thermogravimetry-Fourier transform infrared spectroscopy (TG-FTIR) with VC and dibutyl hydroxy toluene (BHT) as positive control. The results indicated that the antioxidant activity of hydroxytyrosol polymers was 2.28 and 5.7 times as strong as HT and BHT, respectively and was similar to VC (72% as strong). On the basis of DTG peak temperature (315.1℃) and residual percentage (66.09%), the polymers had better thermal stability than VC (228.1℃), BHT (236.2℃) and HT (314.9℃). 3D-FTIR spectra indicated that HT polymers together with the other tested compounds began with O-H bond breaking, forming a quinoid structure by dehydrogenation or carbon-carbon double bond by dehydration. All these findings will provide a good theoretical and practical foundation for deep hydroxytyrosol utilization.

Keywords: hydroxytyrosol; laccase; polymer; gel permeation chromatography (GPC); radical scavenging; thermogravimetry (TG); Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

收稿日期: 2017-04-12

基金项目: 中国林业科学研究院基本科研业务费专项(CAFYBB2016QA011);

“十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0600800)

第一作者简介: 谢普军(1986—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为农林产品深加工及功能食品。E-mail: xpjdz@163.com

*通信作者简介: 黄立新(1967—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为天然产物化学及新型干燥技术。

E-mail: l_x_huang@163.com

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816014

中图分类号: TQ351.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 16-0090-08

引文格式:

谢普军, 黄立新, 张彩虹, 等. 羟基酪醇酶促聚合产物的表征及其抗氧化和热稳定性[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 90-97.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816014. http://www.spkx.net.cn

XIE Pujun, HUANG Lixin, ZHANG Caihong, et al. Characterization, antioxidant activity and thermostability of hydroxytyrosol polymerization products catalyzed by laccase[J]. Food Science, 2018, 39(16): 90-97. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816014. http://www.spkx.net.cn

羟基酪醇 (hydroxytyrosol, HT) 也称3,4-二羟基苯乙醇, 结构式如图1所示, 是一种天然小分子酚类化合物, 广泛存在于油橄榄果、叶、初榨橄榄油和尤其富含于油橄榄榨油厂的废水中^[1], 具有抗氧化^[2-3]、抗炎^[4]、抗癌^[5]、保护心血管疾病^[6]和降血糖^[7]等活性功能。HT是最具有清除自由基活性的天然抗氧化剂之一, 其自由基清除率是槲皮素的2倍、表儿茶酸的3倍, 在保健品、药品和化妆品领域均有极为广泛的应用^[8]。然而, 研究表明, 对HT的应用研究发现, 存在抗氧化性的热稳定性较低, 常温存贮时容易发生氧化变质等问题^[9]。通常采用对HT结构中羟基进行酯化或酰基化等方法进行改性, 虽然提高了稳定性, 但却降低了抗氧化性。如Pereira-Caro等^[10]对HT进行羟基醚化反应, 但HT醚化产物的抗氧化性降低。而利用生物酶对HT进行催化氧化聚合反应, 形成的聚合物不仅能提高抗氧化性还能改善热稳定性^[11]。漆酶 (*p*-diphenol:oxygen oxidoreductase EC1.10.3.2.) 是一种含铜离子的多酚氧化酶, 与植物抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同属于铜蓝蛋白家族^[12]。广泛存在于日本紫胶漆树 (*Rhus vernicifera*)、白腐菌中^[13]。漆酶可催化多酚、甲基替代单酚、芳香胺、苯硫醇等易氧化的底物, 具有作用底物广, 专一性和稳定性高等特点^[14]。

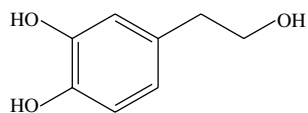


图1 HT化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of hydroxytyrosol

基于此, 本实验以HT和漆酶分别为底物和催化剂进行HT的聚合反应, 通过紫外-可见 (ultraviolet-visible, UV-Vis) 分光光度计、傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 和高效液相色谱-质谱联用 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 对聚合产物进行表征, 同时评价其清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基的抗氧化和热稳定性, 为HT的应用提供一定实践和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HT、漆酶 (源自彩绒革盖菌, *Coriolus versicolor*) 美国Sigma-Aldrich试剂有限公司; 甲醇 (色谱纯) 美国Tedia试剂有限公司; DPPH、2,2'-连氮-双-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸 (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS) (均为色谱纯) 西安沃尔森生物技术有限公司; 乙酸、乙酸钠 南京化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

T6 UV-Vis分光光度计 北京普析分析通用仪器有限公司; 5973 HPLC-MS仪 (电喷雾离子源) 美国安捷伦仪器有限公司; IS10 FTIR仪、Hypersil ODS2 C₁₈色谱柱 美国赛默飞仪器有限公司; GPC-2410示差折光检测器、1515等梯度HPLC、2414示差折光器 美国Waters公司; 209F3热重 (thermogravimetry, TG) 分析仪 德国Netzsch公司; GPC KD-802色谱柱 日本昭和电工株式会社; SDTQ600型综合热分析仪 美国TA公司。

1.3 方法

1.3.1 漆酶活性的测定

配制pH 5.0、0.05 mol/L的HAc-NaAc缓冲液和0.5 mmol/L ABTS溶液, 在25℃预热酶液及ABTS溶液。测定漆酶活性时, 取2.9 mL预热的ABTS溶液, 加入0.1 mL稀释后的漆酶溶液 (酶质量浓度1.8 g/L), 迅速摇晃使两者充分混合。用UV-Vis分光光度计记录420 nm波长处混合液的吸光度从一点 (A_1) 变化到另一点 (A_2) 所经历的时间, A_1 与 A_2 之间的吸光度差值统一为0.2, 测定所用漆酶活性。一个漆酶活力单位 (U) 是指: 漆酶在1 min转化1 μ mol ABTS, 使产物 $ABTS^+ \cdot$ 浓度从a增加至b^[15]。漆酶活性计算公式为:

$$\text{漆酶活性} = \frac{1000 \times k \times \Delta A \times 60 \times V_0}{\Delta T \times V \times C} \quad (1)$$

式中: $k=0.0492$; $ABTS^+ \cdot$ 浓度增加量 ΔA 为0.2; ΔT 为吸光度变化所经历的时间/s; V_0 为酶活测试底物和酶液的总体积/mL; V_1 为漆酶溶液体积/mL; C 为漆酶质量浓度/(g/L)。

1.3.2 酶促氧化聚合反应

就聚合反应而言, 3.4 mmol/L的HT溶解于50 mL乙酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 5)。该酶促聚合反应初始添加漆酶溶液(1.8 g/L, 约10 mL)。将载有不同试剂的烧瓶置于50 °C反应5 h, 再高温使漆酶失活。酶促反应过程中, 该反应的媒介颜色逐渐加深可用于指示聚合反应的大体进程, 聚合反应结束后, 将反应容器置于4 °C冰箱24 h, 使其聚合产物沉淀。然后沉淀物通过离心获得, 并用丙酮-去离子水(1:3, V/V)的混合溶剂洗涤若干次以去除未反应的酚类化合物与漆酶。生成的聚合物置于冻干机中除去溶剂, 再置于干燥器中备用。

1.3.3 HPLC-MS仪器条件

HPLC条件: 色谱柱: Hypersil ODS2 C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A: 0.1%醋酸溶液; B: 甲醇, 柱温25 °C。梯度洗脱条件: 0 min 0% B, 30 min 30% B, 50 min 40% B, 60 min 45% B, 80 min 100% B和100 min 0% B, 检测波长280 nm, 流速0.3 mL/min, 进样量20 μL。

MS条件: 离子源为电喷雾离子源, 负离子模式。扫描范围 m/z 100~1 000, 干燥气体(N₂)干燥器体积流量10 L/min; 干燥器温度340 °C, 雾化器压力206.85 kPa。液相色谱与质谱之间分流, 进入质谱的流速为0.5 mL/min。

1.3.4 FTIR分析

原料及酶促反应产物都需要进行FTIR, 以8 cm⁻¹分辨率室温下进行400~4 000 cm⁻¹扫描。

1.3.5 GPC分析

由1515等梯度HPLC泵、2414示差折光器和GPC KD-802色谱柱组成。所有样品溶解于四氢呋喃(HPLC级), 进样量30 μg, 进样速率1.5 mL/min, 柱温35 °C。标准曲线通过使用聚乙二醇(分子质量400~612 000 Da)进行绘制, 也用于计算平均分子质量和聚合度。

1.3.6 DPPH自由基清除能力

配制不同质量浓度的纯品HT, 称取10 mg DPPH于100 mL容量瓶中并用甲醇溶解得到0.1 mg/mL醇溶液作为母液, 再准确移取3.9 mL母液于具塞试管中, 分别各加入0.1 mL不同浓度的HT聚合物、HT、VC和BHT, 混合均匀后在黑暗处室温反应30 min, 并在517 nm波长处测定各样品的吸光度, 进行清除DPPH自由基实验, BHT标准品进行对比, 考察HT和酶促聚合产物清除DPPH自由基抗氧化能力。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为DPPH醇溶液的初始吸光度; A_1 为反应30 min后溶液的吸光度。

1.3.7 TG-FTIR联用分析

保护气为高纯氮气, 流量为60 mL/min, 升温速率10 °C/min, 升温范围40~950 °C。

2 结果与分析

2.1 漆酶活性测定结果

以ABTS为底物, 通过在420 nm波长处测定吸光度的变化来确定漆酶活性^[16]。ABTS在漆酶的催化作用下可以迅速生成ABTS⁺·, ABTS⁺·在420 nm波长处的吸光系数远大于底物ABTS。随着ABTS⁺·浓度的增加, 吸光度也变大。吸光度在规定范围内变化时所经历的时间则表示为漆酶活性^[17]。

当加入漆酶溶液至ABTS溶液后, 在420 nm波长处每隔5 s中记录吸光度, 得到其经历的时间与吸光度的关系见图2, 漆酶催化ABTS的吸光度随时间的延长呈线性增加, 根据线性拟合得到如下方程:

$$Y = 0.099 + 0.00247X \quad (R = 0.999, s = 0.005, N = 25, P < 0.0001) \quad (3)$$

根据公式(2)的 R 为0.999及标准偏差为0.005, 说明公式(3)线性拟合良好, 且根据吸光度变化值0.2 ($\Delta Y = 0.2$)所经历的变化时间($\Delta X = 81$)约为81 s, 再代入公式(1)计算, 获得所购买的样品漆酶活性为121.5 U/mL。

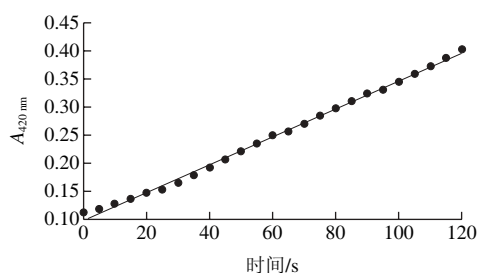
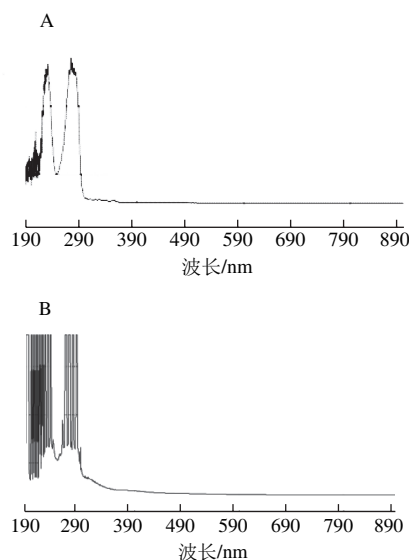


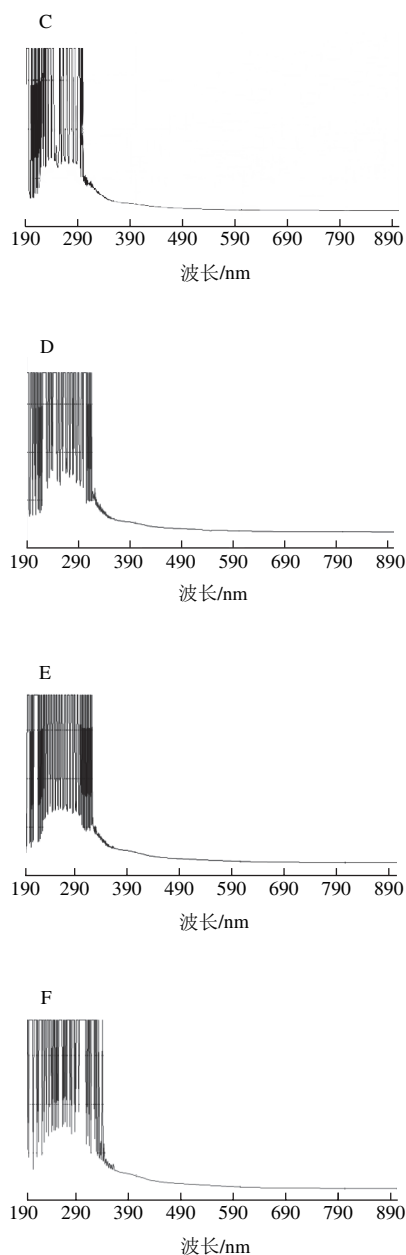
图2 漆酶活性的测定

Fig. 2 Determination of laccase activity

2.2 酶促聚合产物的表征

2.2.1 UV-Vis全扫描





A. HT; B~F.漆酶催化HT时间为1、2、3、4、5 h.

图3 HT聚合物的UV-Vis全波段扫描图

Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of hydroxytyrosol polymers

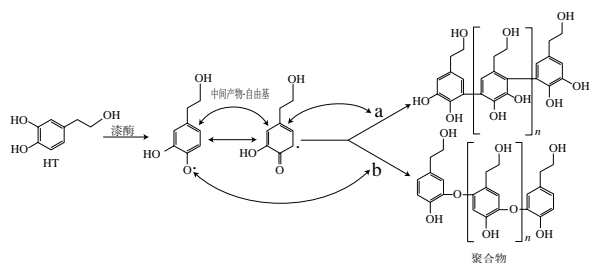


图4 HT酶促氧化聚合的反应过程

Fig. 4 Reaction process of hydroxytyrosol polymerization catalyzed by laccase

为掌握漆酶酶促酚类化合物进程,利用UV-Vis检测器对漆酶不同处理阶段的反应物每隔1 h进行测定。图3为HT与漆酶催化HT随时间(每隔1 h)的UV-Vis全波段扫描图。图3A表明HT的最大吸收波长为230 nm和280 nm。由图3B~F可知,漆酶催化HT过程中可能产生了自由基,形成了不同的聚合物,类似Briggs-Rauscher的振荡反应形成的图谱^[18-19],随着时间的延长,振荡吸收带宽变长,说明聚合反应持续剧烈进行。5 h后漆酶酶促氧化聚合反应完全,可能的反应历程如图4所示,有2类HT聚合物形成^[20]。

2.2.2 FTIR分析

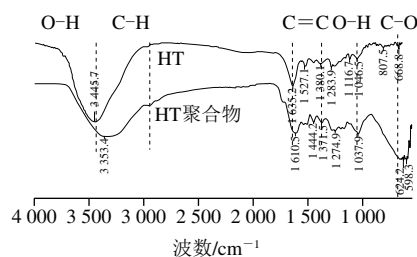


图5 HT与HT聚合物的FTIR

Fig. 5 FTIR spectra of hydroxytyrosol and its polymer

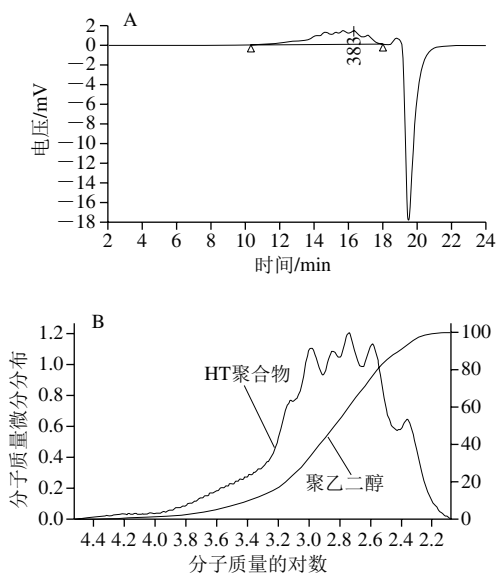
由图5可知,HT在波数为 3446 cm^{-1} 的羟基的O—H伸缩振动,而HT聚合物则在波数 3353 cm^{-1} 的羟基的O—H伸缩振动,且形成更宽的吸收峰。这些现象是由HT聚合物较HT具有更强的分子内氢键作用力导致的^[21]。在 2960 cm^{-1} HT聚合物较HT有更强的吸收峰,为C—H伸缩振动,HT和HT聚合物的C=C不对称伸缩振动吸收峰的波数分别在 1635 cm^{-1} 和 1610 cm^{-1} ,HT和HT聚合物的C—O伸缩振动吸收峰的波数分别在 1046 cm^{-1} 和 1037 cm^{-1} ,HT和HT聚合物的O—H面内弯曲振动 1380 cm^{-1} 和 1371 cm^{-1} ^[22]。

2.3 GPC和HPLC-MS检测结果

多分散性指数也即分布宽度指数 D (分散度)用于衡量聚合物分子质量分布的广度,其定义如下: D 为 m_w/m_n ,当 D 为1时,所有链长都相等的单分散聚合物(如蛋白质)是均一分子质量的聚合物; D 值大于1时, D 值越大,其分子质量分布越宽,多分散性程度越大。逐步聚合反应生成高聚物的 D 值通常在2.0左右,而连锁聚合反应产物的 D 值在1.5~2.0之间^[23]。

漆酶酶促聚合HT为逐步聚合反应生成高聚物,由图6A可知,HT聚合物出峰时间在10~18 min,通过与聚乙二醇(分子质量400~612 000 Da)标准曲线进行对比,得到的 m_n 为547 Da, m_w 为1 152 Da, m_z 为4 885 Da,一般情况下,具有多分散样品, $m_n < m_w < m_z$ ^[24]。由此可知,分布宽度指数 D (分散度) = $m_w/m_n = 2.1$,HT经漆酶氧化聚合反应可能是逐步聚合的过程,由图6B可知,峰从右到左的分子质量(m_w)分别为1 370、914、608、458 Da

和306 Da, 由此对应的聚合度分别为9、6、4、3、2, 从积分面积分析主要以聚合物度3、4、6的化合物为主。

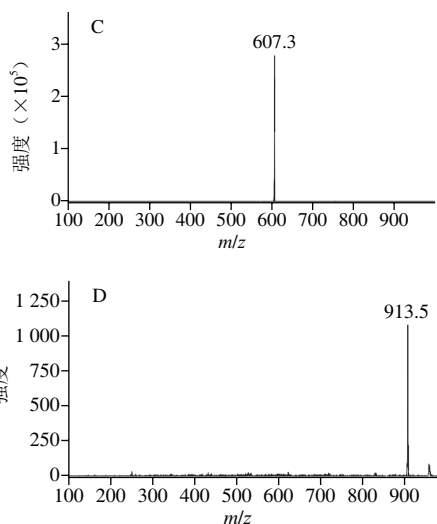
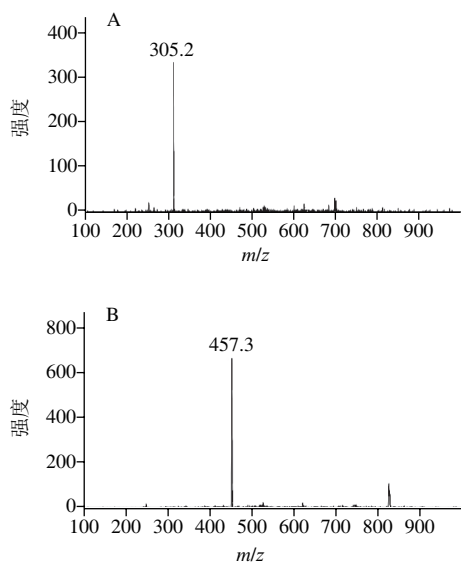


A.自动定量色谱图; B. GPC校正曲线。

图6 HT聚合物的GPC图

Fig. 6 GPC of hydroxytyrosol polymer

为进一步验证HT聚合物的聚合度, 使用HPLC-MS, 负电模式下检测其分子离子, 由于HPLC-MS中质谱的最大负离子峰为1 000, 因此, 聚合度大于6的HT聚合物, 则无法检测到^[25]。由图7可知, HT酶促聚合的产物包括4种, 分别为: 1) HT二聚体 ($[M-H]^-$ 质谱离子信号峰, 305.2; 得到[M], 306.2; 图7A); 2) HT三聚体 ($[M-H]^-$ 质谱离子信号峰, 457.3; 得到[M], 458.3; 图7B); 3) HT四聚体 ($[M-H]^-$ 质谱离子信号峰, 607.3; 得到[M], 608.3; 图7C); 4) HT六聚体: ($[M-H]^-$ 质谱离子信号峰, 913.5; 得到[M], 914.5; 图7D)。



A.二聚体; B.三聚体; C.四聚体; D.六聚体。

图7 HT聚合物的HPLC-MS

Fig. 7 HPLC-MS of hydroxytyrosol polymers

2.4 抗氧化性评价

为测定HT及其聚合物清除DPPH自由基能力, 以VC和BHT为阳性对照。由图8可知, IC_{50} (HT聚合物) 为0.25 mg/mL, IC_{50} (HT) 为0.57 mg/mL, IC_{50} (BHT) 为1.4 mg/mL和 IC_{50} (VC) 为0.18 mg/mL。因此, HT聚合物较HT更强清除DPPH自由基, 约是其2.28倍, 较VC的清除DPPH自由基能力更弱, 约是后者的72%, 而HT的清除DPPH自由基比BHT明显更强, 清除DPPH自由基的能力约是BHT的2.5倍。因其具有高效的抗氧化性使其可在食品、药品和化妆品领域广泛应用。

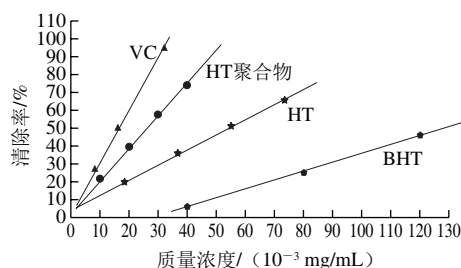
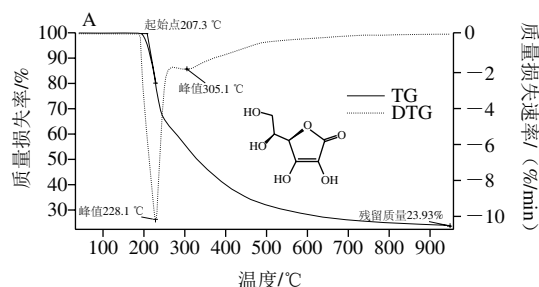


图8 HT与其聚合物清除DPPH自由基

Fig. 8 Scavenging effect of HT and its polymer on DPPH radicals

2.5 热稳定性评价



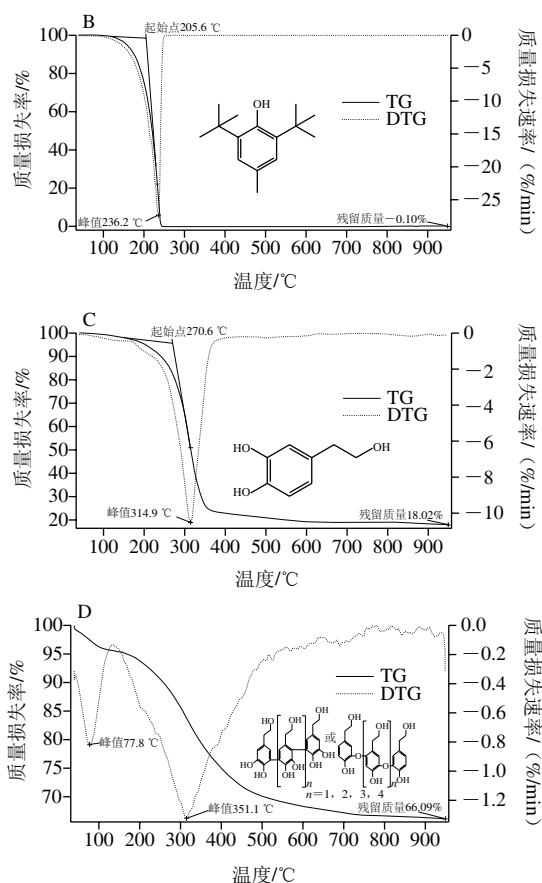


图9 VC (A)、BHT (B)、HT (C) 和HT聚合物 (D) 的热重图
Fig. 9 TG-DTG of VC (A), BHT (B), HT (C) and HT polymers (D)

由图9可知, VC在温度207~250 °C开始质量损失加快, 在温度228.1 °C左右质量损失率达到峰值, 最后残余质量为初始值的23.93%。BHT在温度206~250 °C开始质量损失加快, 在温度236.2 °C左右质量损失率达到峰值, 最后残余质量为0%。HT在温度271~350 °C开始发生剧烈质量损失, 在温度314.9 °C左右质量损失率达到峰值, 最后残余质量为18.02%。HT聚合物在温度40~100 °C开始发生剧烈质量损失, 在温度77.8 °C左右质量损失率达到峰值, 随后在250~450 °C开始发生剧烈质量损失, 在温度315.1 °C左右质量损失率达到峰值, 最后残余质量为66.09%。由图9D可知, HT聚合物开始出现质量损失温度降低, 可能是由于HT聚合物富含亲水性羟基, 容易与酶促反应体系中的水结合, 形成了聚合物-水的复合物^[26]。从而使其在0~100 °C加热过程中就出现形成的结合水先脱去的质量损失现象, 且HT聚合物在100 °C以内并没有化学键的断裂。另外, 由于该聚合物是二、三、四和六聚体的混合物, 其中二聚体与HT的热重微分曲线 (differential thermal gravity, DTG) 峰值温度相近, 热稳定性相似, 而三、四和六聚体热稳定性更高。此外, 基于最后残余质量百分比值可知, HT聚合物 (66.09%)

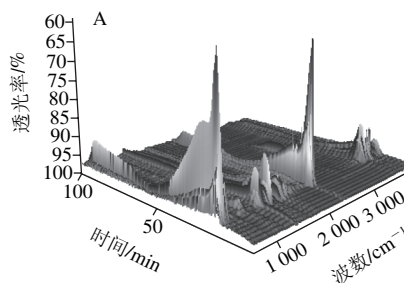
显著大于HT (18.02%)。基于样品发生剧烈质量损失率的峰值温度结果, 发现HT聚合物与HT具有相似的热稳定性, 但较VC和BHT表现出更高的热稳定性。此外, 基于残留质量所占百分数结果, 发现HT聚合物是所有样品的耐热程度表现最好的。综合上述结果表明, HT聚合物稳定性较HT具有更强的热稳定性 (VC初始质量: 20.18 mg; BHT初始质量: 218.14 mg; HT初始质量: 316.26 mg; HT聚合物初始质量: 49.49 mg)。

图10为VC、BHT、HT和HT聚合物的0~100 min内组合形成的三维FTIR吸收光谱图。VC特征吸收峰为: 在3 500 cm^{-1} 处为O—H的伸缩振动, 2 350 cm^{-1} 为 CO_2 的不对称伸缩振动 (中间过程出现的3 020 cm^{-1} 特征吸收为 $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动, 而后消失), 1 510 cm^{-1} 为 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动, 660 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动。基于FTIR结果可知, VC随着温度升高, 分子内先脱水, 形成碳碳双键, 再进一步使内酯键断裂脱羧基 (中间产物 CO_2 生成)^[27]。

BHT的特征吸收峰为酚羟基、苯环及甲基官能团吸收。在3 610 cm^{-1} 处为酚羟基中O—H的伸缩振动, 3 000~3 010 cm^{-1} 为苯环上 $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动, 2 970 cm^{-1} 为叔丁基 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动, 而1 440 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动, 基于FTIR结果可知, BHT随着温度的升高, 特征吸收峰逐渐降低, 尤其以2 970 cm^{-1} 最为显著, 叔丁基中 CH_3 断裂, 同时中间产物 $\text{C}=\text{O}$ 1 680 cm^{-1} 的官能团吸收峰产生, 说明酚羟基脱氢形成醌式结构, 温度继续升高, 醌式结构消失, 苯环结构也消失^[28]。

HT的特征吸收峰为邻二苯酚羟基、苯环、烷烃和醇羟基官能团吸收。3 300~3 700 cm^{-1} 为酚羟基和醇羟基中O—H的伸缩振动, 3 100~3 190 cm^{-1} 为苯环上 $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动, 还包括苯环中 $\text{C}=\text{C}$ 1 200 cm^{-1} 的伸缩振动。 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动峰950 cm^{-1} 。基于FTIR结果可知, 羟基先发生变化, 醇羟基脱水形成 $\text{C}=\text{C}$ 1 610 cm^{-1} 双键, 而酚羟基脱氢形成邻醌结构, 形成了 $\text{C}=\text{O}$ 1 750 cm^{-1} ^[29-30]。

HT聚合物的特征吸收峰与HT有相似也有显著不同, 由于聚合物中含有聚合度为2~6。羟基的吸收更强, 且1 500~1 700 cm^{-1} , 且对应的峰宽较HT更强, HT偶合形成 $\text{C}-\text{C}$ 聚合物键能大不易断裂, 而聚合物的羟基易发生断裂形成烯烃、羰基。



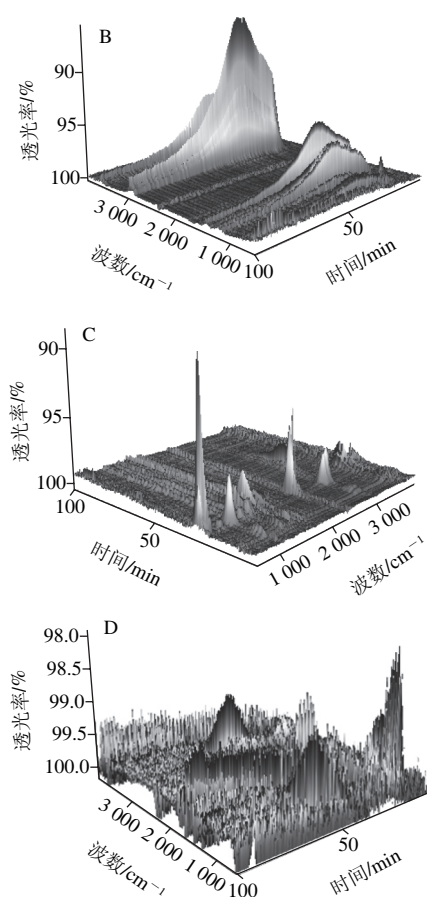


图10 VC (A)、BHT (B)、HT (C) 和HT聚合物 (D) 的三维FTIR图

Fig. 10 Three dimensional IR spectra of VC (A), BHT (B), HT (C) and HT polymers (D)

3 结论

本实验以漆酶为催化剂, 通过对HT进行氧化聚合, 既提高其抗氧化性又增强稳定性。采用UV-Vis、FTIR、GPC和HPLC-MS对聚合产物进行表征。结果表明, 漆酶酶促氧化聚合HT的聚合物的聚合度为2、3、4、6和9, 主要的聚合物HT的三聚体、四聚体和六聚体, 所需的条件为酶活121.5 U/mL、反应时间5 h、pH 5、反应温度50 °C。HT聚合物清除DPPH自由基的抗氧化性较HT和BHT均更强, 分别为其2.28倍和5.7倍, 接近于VC, 约是其72%。从峰值温度和残余质量所占的比例的结果表明, HT聚合物(所占比例66.09%)为所有化合物中最高, 也即稳定性最强。

参考文献:

[1] FERNEZ-BOLANOS J G, OSCAR L, JUAN J, et al. Hydroxytyrosol and derivatives: isolation, synthesis, and biological properties[J]. Current Organic Chemistry, 2008, 12: 442-463. DOI:10.2174/138527208784083888.

[2] 原姣姣, 叶建中, 王成章, 等. 橄榄酰基酪醇的生物合成及其衍生物研究进展[J]. 林产化学与工业, 2015, 35(2): 154-162. DOI:10.3969/j.issn.0253-2417.2015.02.024.

[3] BISIGNANO G, TOMAINO A, LO CASCIO R, et al. On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1999, 51(8): 971-974. DOI:10.1211/0022357991773258.

[4] SILVA S, SEPODES B, ROCHA J, et al. Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, 26(4): 360-368. DOI:10.1016/j.jnutbio.2014.11.011.

[5] SABA E, PANINA-BORDIGNON P, PAGANI I, et al. 5-Hydroxytyrosol inhibits HIV-1 replication in primary cells of the lower and upper female reproductive tract[J]. Antiviral Research, 2017, 142: 16-20. DOI:10.1016/j.antiviral.2017.03.003.

[6] HMIMED S, BELARBI M, VISIOLI F. Hydroxytyrosol augments the redox status of high fat diet-fed rats[J]. Pharma Nutrition, 2016, 4(4): 139-142. DOI:10.1016/S1471-4914(02)02382-1.

[7] JEMAI H, FEKI A, SAYADI S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in Alloxan-diabetic rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(19): 8798-8804. DOI:10.1021/jf901280r.

[8] REFILOE E Z, AYESHA P, TUKAYI K, et al. Novel, Biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 11509-11517. DOI:10.1021/jf300883h.

[9] 范文霞, 蔡友华, 刘学铭, 等. 毛云芝菌漆酶的分离纯化和性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 422-425. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.12.095.

[10] PEREIRA-CARO G, MADRONA A, BRAVO L, et al. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives[J]. Food Chemistry, 2009, 115: 86-91. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.11.069.

[11] 张磊, 崔元臣. 苯酚的酶促聚合反应研究[C]//全国高分子材料科学与工程研讨会论文集. 武汉: 武汉大学, 2012: 81-84.

[12] ADAM A, TIWARI R, SINGH S, et al. Laccase production by a novel white-rot fungus *Pseudolagarobasidium acaciicola*, LA 1 through solid-state fermentation of *Parthenium* biomass and its application in dyes decolorization[J]. Waste and Biomass Valorization, 2016, 7(6): 1-9. DOI:10.1007/s12649-016-9550-0.

[13] ZHU C, BAO G, HUANG S. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper[J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2016, 30(2): 1-7. DOI:10.1080/13102818.2015.1135081.

[14] HAKULINEN N, ROUVINEN J. Three-dimensional structures of laccases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences Cmls, 2015, 72(5): 857-868. DOI:10.1007/s00018-014-1827-5.

[15] SUN X, BAI R, ZHANG Y, et al. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(7): 1673-1680. DOI:10.1007/s12010-013-0463-0.

[16] NIKU-PAVOLLA M L, KARHUNEN E, et al. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*[J]. Biochemical Journal, 1988, 254: 877-884. DOI:10.1042/bj2540877.

[17] EGGERT C, TEMP U, ERIKSSON K E. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. FEBS Letters, 1997, 407(1): 89-92. DOI:10.1016/S0014-5793(97)00301-3.

[18] MILOS M, MAKOTA D. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and

- p*-cymene in a model system using the Briggs-Rauscher oscillating reaction[J]. Food Chemistry, 2012, 131(1): 296-299. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.08.042.
- [19] MENGSHUO L, GANG H, YANGYANG C. Evaluation of the antioxidant capacity of natural polyphenolic compounds using a macrocyclic Ni-(II) complex-catalysed Briggs-Rauscher reaction[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 987-991. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.004.
- [20] ZAVADA S R, BATTSENGEL T, SCOTT T F. Radical-mediated enzymatic polymerizations[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(2): 195-221. DOI:10.3390/ijms17020195.
- [21] 杨帆, 于鹏云, 赵娟, 等. 乙二醇的分子间氢键结构动力学的飞秒非线性红外光谱[J]. 物理化学学报, 2015, 31(7): 1275-1282. DOI:10.3866/PKU.WHXB201504211.
- [22] TAHIR H E, ZOU X, LI Z, et al. Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2017, 226: 202-211. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.01.024.
- [23] ULITIN N V, DEBERDEEV T R, BERLIN A A. Controlling the molecular weight and polydispersity index of polystyrene by varying the initial parameters of addition-fragmentation radical polymerization[J]. Russian Journal of Physical Chemistry B, 2014, 8(2): 227-232. DOI:10.1134/S1990793114020225.
- [24] KHOUDARY K, SARKIS N, SALLOUM G, et al. Formation study of bisphenol A resole by HPLC, GPC and curing kinetics by DSC[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2016, 9: 1225-1232. DOI:10.1016/j.arabjc.2012.01.011.
- [25] ZWANE R E, PARKER A, KUDANGA T, et al. Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(46): 11509. DOI:10.1021/jf300883h.
- [26] 柳明珠, 彭树馥. 制备超强吸水性聚合物的一种新方法[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2002, 38(3): 63-67. DOI:10.3321/j.issn:0455-2059.2002.03.013.
- [27] YOHANAN P C, TRESA V H, PHILIP D. FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of vitamin C[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2006, 65(3/4): 802-804. DOI:10.1016/j.saa.2005.12.044.
- [28] PALAFOX M A, TARDAJOS G, GUERRERO-MARTÍNEZ A, et al. FTIR, FT-Raman spectra, density functional computations of the vibrational spectra and molecular geometry of biomolecule 5-aminouracil[J]. Chemical Physics, 2007, 340(1/2/3): 17-31. DOI:10.1016/j.chemphys.2007.07.032.
- [29] BALACHANDRAN V, MURUGAN M, KARPAGAM V, et al. Conformational stability, spectroscopic (FT-IR & FT-Raman), HOMO-LUMO, NBO and thermodynamic function of 4-(trifluoromethoxy) phenol[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 130: 367-375. DOI:10.1016/j.saa.2014.04.043.
- [30] GEORGE K M, RUTHENBURG T C, SMITH J, et al. FT-IR quantification of the carbonyl functional group in aqueous-phase secondary organic aerosol from phenols[J]. Atmospheric Environment, 2015, 100: 230-237. DOI:10.1016/j.atmosenv.2014.11.011.