

海藻糖类的气相色谱分析 III. 红藻糖苷的 提取与测定*

黄晓航 张燕霞 范晓

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

收稿日期: 1989年7月13日

关键词 红藻糖苷, 海藻, 气相色谱

提要 以气相色谱法分析红藻中游离低分子碳水化合物红藻糖苷。结果表明, 红藻糖苷可以用80%的乙醇提取, 然后用除色素除盐, 经硅醚化后用气相色谱进行定性与定量分析; 对于影响提取与硅醚化的各种因素进行了研讨, 并与传统的苯酚硫酸法进行了比较。

红藻中一般缺少大多数光合自养生物累积的游离单糖和寡糖, 而以游离状态存在一种特殊的低分子碳水化合物红藻糖苷(Floridoside)。本世纪初, Kylin^[1] 首次报道分离出这种糖苷类物质, 尔后 Colin 等人^[1] 证明其结构为 α -氧-甘油- α -D-半乳吡喃糖苷。据近年来 Majak 等^[7] 和 Craigie 等^[2] 报道, 在以红藻为材料的放射性同位素标记试验中, 红藻糖苷标记得快, 标记量大, 说明红藻糖苷是红藻重要的光合同化产物。所以, 分析红藻中的红藻糖苷, 对于研究红藻的光合作用、碳代谢及其它生理生化过程具有重要意义。

Kremer^[4] 和 Nagashima^[8] 分别研究了54种和36种海藻的化学组分, 发现在红藻中除仙菜目(Ceramiales)的一些种类外, 都含有红藻糖苷。藻体中是否存在红藻糖苷已成为一个重要的化学分类学特征。近年来 Nagashima^[9] 和 Luca 等人^[6] 的报道都以这种低分子碳水化合物的存在作为一种分类依据。

多年来, 国外常采用纸层析、薄层层析和气相色谱分析红藻糖苷, 其中气相色谱法具有灵敏、快速、操作简便、定性准确等优点。红藻糖

苷的提取测定方法国内尚未有报道, 为适应我国海藻生理、生态研究和海藻分类学研究的开展, 建立红藻糖苷的分析方法是十分必要的。本文以龙须菜(*Gracilaria sjostedtii*)为实验材料, 对红藻糖苷的提取和分析条件进行研究。

I. 实 验

I.1. 仪器与试剂

- I.1.1. 气相色谱仪 GCHF 18.3 型(东德 V.E.B), 氢火焰离子化检测器;
- I.1.2. 硅醚化试剂 Silyl-8 (进口分装);
- I.1.3. 标准红藻糖苷(瑞典 Lindberg);
- I.1.4. 内标物 正廿一烷(G.C.)。

I.2. 气相色谱分析条件

- I.2.1. 色谱柱 3m × 3mm 玻璃柱, 担体 Chromosorb W AW DMCS, 固定液 10% SE-30;

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1436号。承蒙吴超元教授指导和瑞典 Lindberg 教授提供标准红藻糖苷样品, 特此志谢。

本文的第(I),(II)部分分别发表于《海洋与湖沼》1984年第1期、《海洋科学集刊》第25集。

I.2.2. 操作条件 氮气入口压力 2.5kPa/mm², 氢气 1.6kPa/mm², 空气 0.65kPa/mm²;

I.2.3. 柱温 210°C, 检测器温度 270°C; 汽化室温度 270°C。

I.3. 实验步骤

I.3.1. 标准样品的硅醚化 在 5mg 标准红藻糖苷中加入 0.3ml 硅醚化试剂 (Silyl-8), 同时加入 500 μ g 正廿一烷作内标。在 40°C 水浴中保温 1h 后取出, 置室温下 4h 或保留过夜, 用微量进样器取大约 1 μ L 样品在气相色谱仪上瞬时进样分析。

I.3.2. 红藻样品的提取与硅醚化 将龙须菜用红外灯杀死, 在 80°C 下烘干磨碎、过 60 目筛。称取约 30~100mg 藻粉于 75°C 下用 80% 乙醇回流提取 15min, 重复 3 次。提取液合并后用沸点 60~90°C 的石油醚除去脂类及色素, 在 50°C 下减压蒸发至干。溶于蒸馏水后通过装有国产 732 阳离子交换树脂 (H⁺) 的柱, 用蒸馏水将柱洗至中性, 流出液和水洗液合并后用国产 717 阴离子交换树脂 (CO₃⁻) 中和。过滤、减压蒸发至干后保存于盛有 P₂O₅ 的真干干燥器中脱水。由此制得的干涸物再行硅醚化, 条件与标准样品相同。

II. 结果与讨论

II.1. 样品的硅醚化条件

II.1.1. 不同的硅醚化温度 样品加入硅醚化试剂于 10°C, 40°C 和 70°C 下保温 1h 后取样分析, 见图 1。结果表明, 温度高, 样品硅醚化的速度快, 单位内标峰面积大, 且不易出现异构峰, 但在 70°C 下, 若瓶口封闭不严, 会因挥发或水汽进入造成单位内标峰面积的下降。所以宜在 40°C 下保温进行硅醚化。

II.1.2. 不同的硅醚化时间 样品加入硅醚化试剂于 10°C 下保温 0.5, 1, 2, 4, 6, 24h 后取样分析, 见图 2。结果表明, 单位内标峰面积值随时间的增加而增加, 到一定时间后则基本趋于稳定, 并在较长时间里保持不变。因此, 一般宜将样品先在较高温度下保温 1h 以利硅醚化,

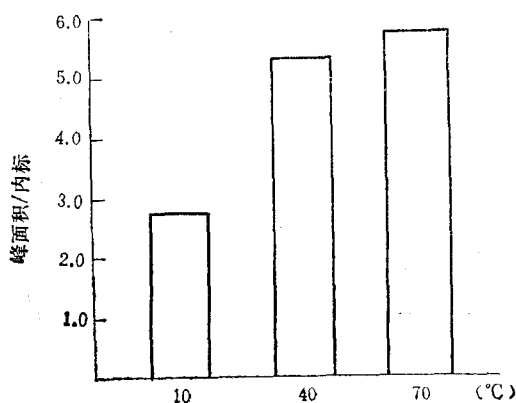


图 1 不同温度下 1h 的硅醚化结果

Fig. 1 Effect of temperature on trimethylsilylation in 1 h

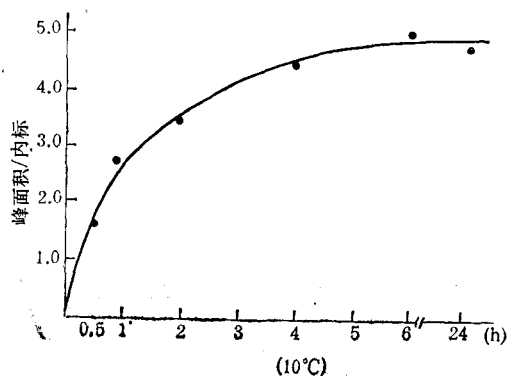


图 2 不同时间下的硅醚化结果

Fig. 2 Effect of duration on trimethylsilylation at 10°C

然后置于室温下 4h 或保留过夜, 再取样分析, 以保证结果的重复性。

II.1.3. 不同的硅醚化试剂用量 4mg 样品分别加入 0.1, 0.25, 0.5, 1mL 试剂硅醚化后取样分析, 见图 3。结果表明, 硅醚化试剂用量不足会大大影响单位内标峰面积值, 造成定量分析的误差。试剂用量以每 5mg 样品不少于 0.25~0.50mL 试剂为宜。

实验中还观察到在加入硅醚化试剂之前, 先加入少量吡啶(约 0.05mL)促进样品溶解, 有利于样品的硅醚化。

II.2. 样品的工作曲线

取 2, 4, 7, 11, 15mg 样品经硅醚化后取样

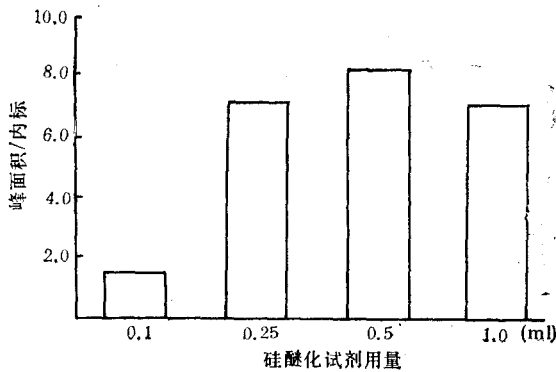


图3 硅醚化试剂不同用量的结果

Fig. 3 Effect of amount of trimethylsilylation agent on trimethylsilylation

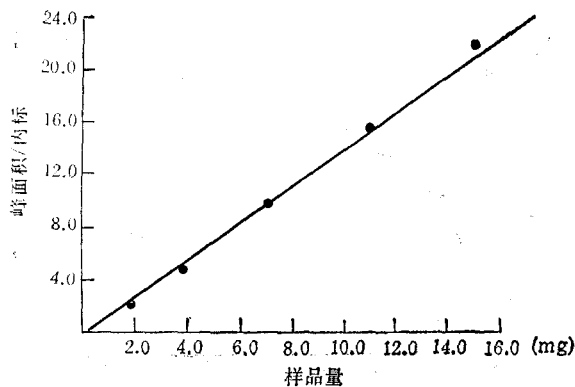


图4 样品的工作曲线

Fig. 4 Standard curve of samples

分析,见图4。结果表明,红藻糖苷在15mg以内,峰面积与样品量呈良好的线性关系,可以用于定量分析。

II.3. 红藻样品中糖苷的分析

II.3.1. 红藻样品中红藻糖苷的定性与定量 龙须菜的乙醇提取物经各步预处理制得的干涸物,经硅醚化后进样分析,并以标准红藻糖苷为对照,见图5。结果表明,二者的相对保留值完全一致。从龙须菜中乙醇提取的碳水化合物主要是红藻糖苷,其含量约为35mg/g(干重),其它中性单糖含量甚微。

II.3.2. 红藻样品的不同提取条件 取龙须菜的干藻粉用80%乙醇在a. 室温下提取24h; b. 室温下提取48h; c. 50℃下回流提取20min,

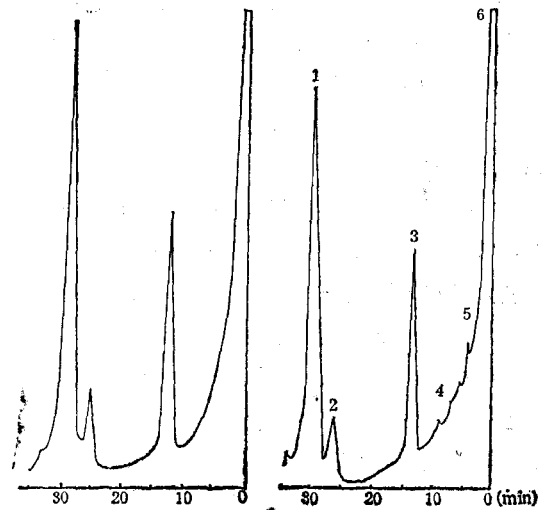


图5 标准红藻糖苷(左)和龙须菜乙醇提取物(右)硅醚化衍生物气相色谱出峰图

1,2.红藻糖苷; 3.正廿一烷(内标); 4,5.其它单糖; 6.溶剂峰

Fig. 5 Profile of gas chromatography: authentic floridoside (left) extract of *Gracilaria sjoestedtii* (right)

重复三次,提取液合并; d. 75℃下回流提取15min,重复三次,提取液合并。以上各种提取方法得值见表1。结果表明,四种方法无明显差异,唯75℃下得率较高,表明较高温度下提取可能较彻底。

II.4. 回收率与精密度

将经提取、脱脂、脱盐、过滤、脱水各步骤制得的标准样品干涸物与不经以上步骤处理的标准样品同时硅醚化后分别取样分析,后者为100%,测得的回收率为102.6%。

将标准样品经硅醚化后多次上机分析,测得的相对偏差为5.87%。结果表明,在应用本方法对红藻糖苷进行提取制备、分析测定过程中所造成的误差在气相色谱分析允许值范围内,可以用此方法进行定量分析。

II.5. 方法比较

应用本方法和经典的Kochert^[3]的苯酚硫酸法分别对实验条件下连续培养的龙须菜样品游离糖含量进行分析和结果比较。结果表明本

表 1 不同提取条件下测得的红藻糖苷含量

Tab. 1 Contents of floridoside in different extraction conditions

提取条件	室温下提取 (24h)	室温下提取 (48h)	50°C 下提取 (20min×3)	75°C 下提取 (15min×3)
含量 (mg/g, 干重)	30.57	30.86	29.43	35.86

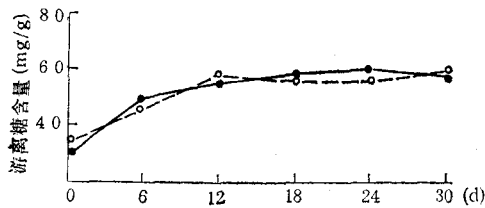


图 6 气相色谱法和苯酚硫酸法对连续培养的龙须菜游离糖含量分析结果

● — ● 气相色谱法分析结果
○ --- ○ 苯酚硫酸法分析结果

Fig. 6 Contents of low molecular weight carbohydrates of *G. sjostedtii* in continuing cultivation measured by both gas chromatography and phenol sulfuric acids method

方法定性准确(图 5), 定量结果可靠(图 6), 重复性好。而后一种方法在样品组分未知或组成复杂的情况下, 是无法对各组分分别进行定性和定量分析的。

III. 结 语

本方法的研究结论如下:

III.1. 红藻糖苷是红藻中以游离状态存在的一种低分子碳水化合物。可用 80% 乙醇提取, 经除脂、除色素和除盐后旋转蒸发至干而制得。

III.2. 红藻糖苷经硅醚化, 可用气相色谱法

进行定性和定量分析。

III.3. 红藻糖苷的气相色谱分析法和苯酚硫酸法相比较, 不仅定性准确, 而且定量可靠。

参 考 文 献

- [1] Colin, H. and E. Gueguen, 1930. La constitution du principe sucre de *Rhodymenia Palmata*. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 191: 163—164.
- [2] Craigie, J. S., J. Mclachlan and R. D. Tocher, 1968. Some neutral constituents of the Rhodophyceae with special reference to the occurrence of the floridosides. *Can. J. Bot.* 46: 605—611.
- [3] Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. in Handbook of phycological methods. Hellebust, J. A. & Craigie, J. S. Cambridge Univer. Press. 95—98.
- [4] Kremer, B. P., 1978. Patterns of photoassimilatory products in Pacific Rhodophyceae. *Can. J. Bot.* 56: 1655—1660.
- [5] Kylin, H., 1918. Weitere beitrage zur Biochimie der Meeresalgen. *Z. Physiol. Chem.* 101: 236—247.
- [6] Luca, P. D. and A. Moretti, 1983. Floridosides in *Cyanidium Caldarium*, *Cyanidioschyzon Merolae* and *Caldieria Sulphuraria* (Rhodophyta, Cyanidiophyceae). *J. Phycol.* 19: 368—369.
- [7] Majak, W., J. S. Craigie and J. Mclachlan, 1966. Photosynthesis in Algae I: Accumulation products in the Rhodophyceae. *Can. J. Bot.* 44: 541—549.
- [8] Nagashima, H., 1976. Distribution of low molecular weight carbohydrates in marine red algae. *Bull. Jap. Soc. Phycol.* 24: 103—110.
- [9] Nagashima, H. and I. Fukuda, 1981. Low molecular weight carbohydrates in *Cyanidium Caldarium* and some related algae. *Phytochemistry*. 20: 439—442.

**GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SUGARS IN SEAWEEDS III.
EXTRACTION AND DETERMINATION OF FLORIDOSIDE IN RED
SEAWEEDS***

Huang Xiaohang, Zhang Yanxia and Fan Xiao
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

Received: July 13, 1989

Key Words: Floridoside, Seaweed, Gas chromatography

Abstract

Floridosides were extracted from the powder of smashed algae samples with 80% EtOH in 15 min ($\times 3$). The EtOH soluble fractions were combined, evaporated to dryness at 50°C. The lipids and pigments were removed with petroleum ether, then the insoluble fractions were dissolved in H₂O and deionized by using ion exchange resins. The neutral fractions were filtered and evaporated to dryness and kept in vacuo over P₂O₅.

Floridosides were treated with Trimethylsilylation reagent (Silyl-8), heated at 40°C for 1 hour and allowed to stand for 4 hours at room temperature prior to Gas Chromatography in 3m \times 3mm glass column (packed with 10% SE-30) with N₂ as carrier gas (2.5kPa/mm²). Column temperature was 210°C, injector and FID detector temperatures were 270°C. Heneicosane was used as the inner standard.

The effects of temperature, time and reagent amount on the extraction and trimethylsilylation of floridoside were investigated. The optimal conditions were selected.

* Contribution No. 1436 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.