

海藻糖类的气相色谱分析

I. 褐藻单糖的测定*

范晓 张燕霞 徐祖洪 李铁林**

(中国科学院海洋研究所)

我国海藻资源丰富,特别是褐藻类(如海带、马尾藻)分布广、产量大。纪明侯等^[3]曾对中国沿海经济褐藻所含有的主要化学成分如褐藻酸、甘露醇、碘、钾、粗蛋白、粗纤维以及灰分等进行了较全面的分析研究。目前,碘、甘露醇和褐藻胶等已有相当规模的工业生产,然而,至今我国还没有对海藻糖类进行深入系统地研究。为促进海藻化学的发展,适应海藻生理生态、生化等方面研究的需要,必须进一步了解海藻糖类的组成与结构。为此,迫切需要建立一个准确而快速的分析糖类的方法。

关于海藻单糖的测定,目前一般采用比色法^[4]、纸层析法^[6]、薄层层析法^[8]及酶分析法^[9]等。这些方法大多是分离较差、操作繁琐,而且对某些单糖很难准确地定性定量,在多种单糖同时存在的情况下更是如此。近年来广泛应用气相色谱法分析单糖,具有灵敏、快速及操作简便等优点,但必须先将糖转化为挥发性衍生物,如甲基酯^[7]、乙酰酯^[9]及三甲基硅醚^[10]等。本文根据李铁林等^[1]的单糖三甲基硅醚化衍生物及糖脲乙酰化衍生物的气相色谱分析法^[2],对褐藻单糖进行了测定,并对海藻样品的水解及衍生化条件进行研究。

实验部分

仪器与试剂

1. 气相色谱仪: GCHF 18.3 型(东德 V. E. B.), 氢火焰离子化检测器;
2. 固定液: SE-30 和 ECNSS-M;
3. 吡啶(A. R.);
4. 六甲基二硅胺烷(C. P.);
5. 三甲基氯硅烷(C. P.);
6. 盐酸羟胺(A. R.);
7. 醋酸酐(A. R.);
8. 氯仿(A. R.);
9. 标准单糖(A. R.): D-木糖, L-鼠李糖, L-褐藻糖(L-fucose), D-甘露糖, D-葡萄糖, D-半乳糖;

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 953 号。

本文承纪明侯研究员和中国科学院环境化学研究所陆德培副研究员指导,特此致谢。

** 中国科学院环境化学研究所。

10. 内标物: 正十八烷 (G. C.), 肌醇六乙酰酯 (G. C.)。

实验方法

1. 海藻样品的水解

先将海藻(海带或裙带菜)晒干,在 80℃ 烘干后研磨过 50 目筛。精称 0.5—1.0 g 于反应管中,加入 7 ml 1 N 硫酸,振荡后封管,置于沸水浴中加热水解 8 小时。然后取出冷却,在 65℃ 时用碳酸钡中和至 pH=6,再经过滤、洗涤,合并滤液和洗涤液,加入氢型阳离子交换树脂脱盐,脱盐液用 7 N 氢氧化铵中和至中性。真空浓缩至干,再放于真空干燥器中用五氧化二磷干燥过夜。

2. 海藻单糖硅醚化衍生物的制备

将上述最后制得的干品(含单糖的水解液干固物)置于具塞试管中,加入 10 mg 正十八烷(内标)和 1 ml 吡啶,注入 0.4 ml 六甲基二硅胺烷和 0.2 ml 三甲基氯硅烷,充分振荡后在室温下反应 10 分钟即可取样分析。与此同时,分别称取木糖、鼠李糖、褐藻糖(fucose)、葡萄糖、甘露糖及半乳糖等各 10 mg 混合,按上述方法进行硅醚化反应,制备出标准单糖的硅醚化衍生物。

3. 海藻单糖的糖脲乙酰化衍生物的制备

将海藻水解液的干固物放入具塞试管中,加入 50 mg 盐酸羟胺和 50 mg 肌醇乙酰酯(内标),注入 1 ml 吡啶,在 90℃ 水浴中加热 30 分钟,取出冷却至室温。然后加入 0.6 ml 醋酸酐,继续在 90℃ 水浴中加热 30 分钟后冷却,再加入 1 ml 蒸馏水并随之振荡,用 1 ml 氯仿萃取三次,合并萃取液,减压浓缩至干。干固物用 0.5 ml 氯仿溶解后即可取样分析。与此同时,制备出上述六种标准单糖混合物的糖脲乙酰化衍生物。

4. 气相色谱分析条件

(1) 色谱柱: 3 m×3 mm 玻璃柱。担体是 Chromo-sob W AW DMCS (80—100 目),固定液用 10% SE-30 (分析单糖硅醚化衍生物用)或 4% ECN SS-M (分析单糖糖脲乙酰化衍生物用)。

(2) 操作条件: 硅醚化衍生物用 10% SE-30 色谱柱分析。载气 N₂ 流速 20 ml/min,氢气为 25 ml/min,空气为 200 ml/min。柱温: 190℃,检测器温度: 230℃,汽化室的温度: 230℃。

糖脲乙酰酯衍生物使用 4% ECNSS-M 色谱柱分析。载气 N₂ 流速为 30 ml/min,氢气为 25 ml/min,空气为 200 ml/min。柱温: 200℃,检测器温度: 250℃,汽化室温度: 280℃。

结果与讨论

海藻样品中单糖的定性分析

对水解后的干固物分别制备成硅醚化衍生物和糖脲乙酰化衍生物,各自进行测定。结果如图 1, 2。由标准单糖的衍生物鉴定表明: 褐藻中含有木糖、鼠李糖、褐藻糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖等六种中性单糖。

根据色谱图测得裙带菜的中性单糖和标准糖的相对保留值完全相吻合,且两者的糖脲乙酰化衍生物的相对保留值也完全一致(见表 1, 2)。

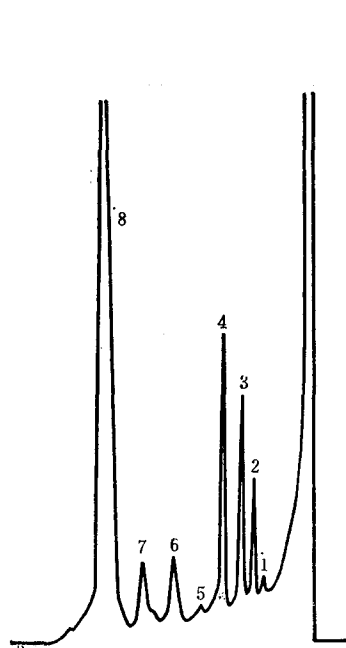


图1 裙带菜中单糖硅醚化衍生物出峰图
1.鼠李糖; 2.褐藻糖; 3.木糖; 4.正十八烷(内标物); 5.甘露糖; 6.半乳糖; 7.葡萄糖; 8.甘露醇。

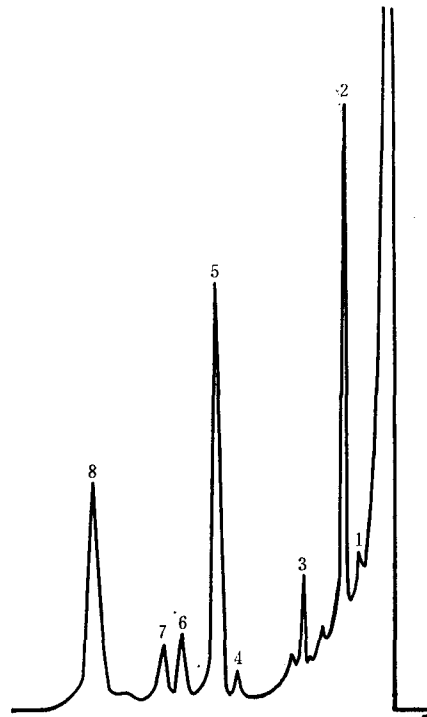


图2 裙带菜单糖糖腈乙酰化衍生物出峰图。
1.鼠李糖; 2.褐藻糖; 3.木糖; 4.甘露糖; 5.甘露醇; 6.葡萄糖; 7.半乳糖; 8.肌醇乙酰酯(内标)。

表1 单糖硅醚化衍生物的相对保留值

单 糖	相对保留值(a)	
	标 准 糖	裙 带 菜
鼠 李 糖	0.53	0.53
褐 藻 糖	0.66	0.66
木 糖	0.77	0.77
甘 露 糖	1.26	1.26
半 乳 糖	1.60	1.60
葡 萄 糖	1.83	1.83
十 八 烷	1.00	1.00

在分析时发现, 褐藻中所含有的甘露醇在衍生化过程中同样形成硅醚化衍生物和糖腈乙酰化衍生物, 也同样能出峰。因其含量大, 大约是糖组分含量的几十倍, 这就影响了其他糖的分离, 如图3所示, 海带中的甘露醇峰影响了葡萄糖的分离。因此, 在对海带等甘露醇含量高的褐藻进行气相色谱分析时, 最好选用有机试剂先将甘露醇萃取出全部或大部分, 以消除干扰。

海藻单糖两种衍生物的气相色谱分析法比较

硅醚化和糖腈乙酰化法都具有反应灵敏、各单糖分离好的特点。但在进行样品单糖

表 2 单糖糖脲乙酰化衍生物的相对保留值

单 糖	相对保留值 (a)	
	标 准 糖	裙 带 菜
鼠 李 糖	0.12	0.12
褐 藻 糖	0.16	0.16
木 糖	0.29	0.29
甘 露 糖	0.50	0.50
葡 萄 糖	0.68	0.68
半 乳 糖	0.72	0.72
肌醇乙酰酯	1.00	1.00

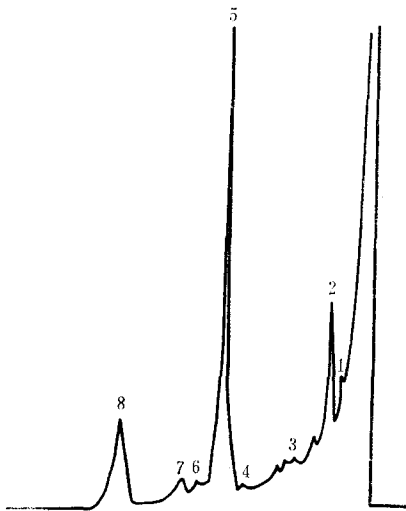


图 3 海带中单糖糖脲乙酰化衍生物色谱图
1.鼠李糖; 2.褐藻糖; 3.木糖; 4.甘露糖; 5.甘露醇; 6.葡萄糖; 7.半乳糖; 8.肌醇乙酰酯(内标)。

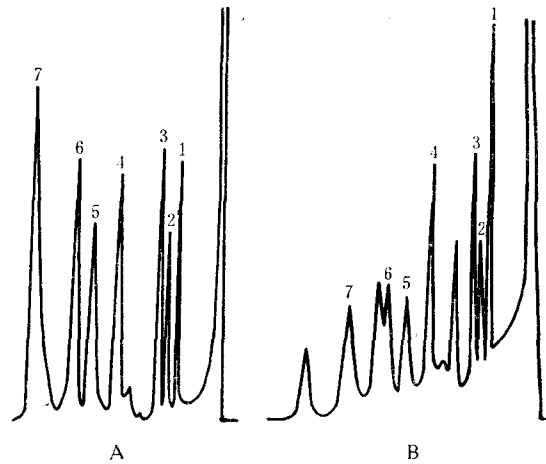


图 4 标准单糖的硅醚化衍生物出峰图

A. 未水解样品 B. 水解后样品 1.鼠李糖; 2.褐藻糖; 3.木糖; 4.甘露糖; 5.半乳糖; 6.葡萄糖; 7.甘露醇。

的硅醚化衍生物的色谱分析时,葡萄糖出现杂峰,褐藻糖在经水解前后峰形有变化(如图 4),而用糖脲乙酰化法则无杂峰出现,不受水解过程的影响(如图 5)。

由图 4,5 可知,单糖硅醚化衍生物出峰情况在水解前后有区别。我们曾对标准结晶状单糖在低温下进行快速衍生化,也可得到单峰。由于在进行海藻样品的单糖气相色谱分析前,必须经过水解、除盐以及浓缩等步骤,最后得到的糖样不是结晶状的,所以避免不了杂峰出现;而单糖的糖脲乙酰化衍生物则不受干扰,峰形亦不变。因此,我们认为对于褐藻单糖的气相色谱分析用糖脲乙酰化法较为适宜。

单糖衍生物的峰面积与含量的关系

称取 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg 不同量的标准单糖,各自按上述条件进行糖脲乙酰化,并进行气相色谱分析,计算出各自的峰面积,得出糖的衍生物的峰面积与样品量的关系曲线。如图 6, 7 所示。结果表明,鼠李糖、褐藻糖和木糖含量不超过 5 mg,而葡萄糖、甘露糖和半乳糖含量不超过 10 mg 时,其出峰面积与样品量呈良好的线性关系。

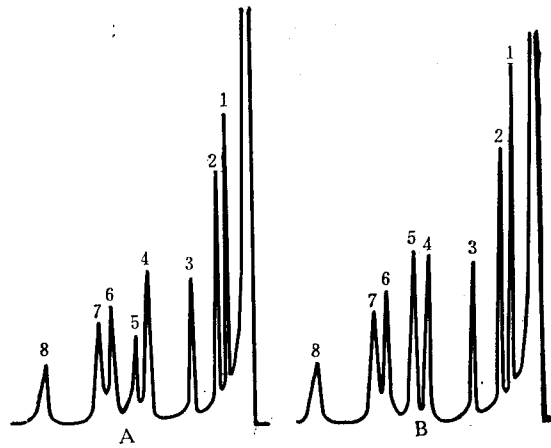


图 5 标准单糖的糖脲乙酰化衍生物出峰图

A. 未水解样品 B. 水解后样品 1. 鼠李糖; 2. 褐藻糖; 3. 木糖; 4. 甘露糖; 5. 甘露醇; 6. 葡萄糖; 7. 半乳糖; 8. 肌醇乙酰酯。

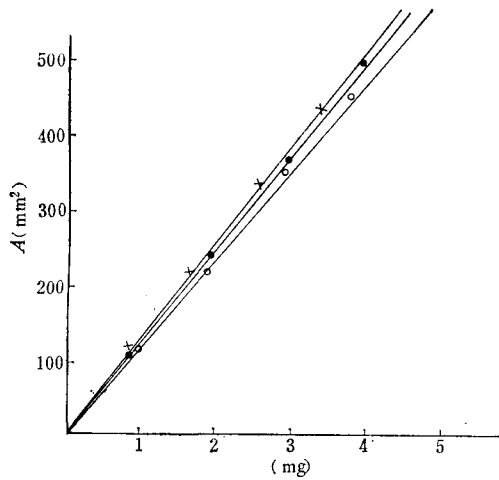


图 6 糖的峰面积与样品量的关系

1. 褐藻糖; 2. 鼠李糖; 3. 木糖。

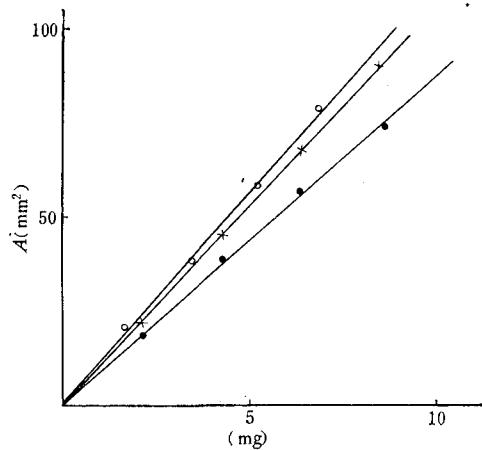


图 7 糖的峰面积与样品量的关系

1. 甘露糖; 2. 葡萄糖; 3. 半乳糖。

表 3 裙带菜中各单糖含量及其回收率

单 糖	糖 含 量		糖 回 收 率			最小检出量 (μg)
	%	相对比值	理论含量	实测含量	%	
鼠李糖	0.07	0.09	4.31 mg	3.77 mg	87.67	0.97
褐藻糖	0.82	1.00	4.00 mg	3.48 mg	87.00	0.85
木 糖	0.09	0.11	4.09 mg	3.63 mg	88.75	0.94
甘露糖	0.13	0.15	7.55 mg	6.29 mg	83.31	0.70
葡萄糖	0.37	0.45	8.60 mg	7.31 mg	85.00	2.10
半乳糖	0.96	1.17	9.00 mg	7.51 mg	83.44	2.10

同样方法,单糖的硅醚化衍生物的峰面积与样品量在一定限度内也呈线性关系。当按下述比例进行硅醚化,即六甲基二硅胺烷:三甲基氯硅烷:吡啶=2:1:5,则各糖在不超过15 mg时,其峰面积与糖样量呈直线关系(图略)。

褐藻样品中单糖的定量测定

按前述的预处理步骤及选定的糖脲乙酰化法色谱条件对裙带菜中的单糖进行定量测定,得到裙带菜中各单糖含量间相对比值。(即以褐藻糖为1,其他各糖相对于该糖的比例)同时测定了各单糖的回收率及最小检出量,如表3。

结果表明,裙带菜中主要含有半乳糖、褐藻糖及葡萄糖。其次是甘露糖、木糖和鼠李糖。样品经水解、除盐及浓缩等步骤后,各糖的回收率可达83—88%。最小检出量1—2 μg 。

小 结

1. 将海藻样品用硫酸水解、碳酸钡中和、阳离子交换树脂除盐,然后真空减压浓缩,干固体制备成三甲基硅醚衍生物或糖脲乙酰酯的衍生物再进行气相色谱分析,为测定海藻糖类提供了一个准确、快速而简易的分析方法。

2. 用本方法测定了几种褐藻,结果表明一般含有鼠李糖、褐藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,其回收率均能达到83—89%。

参 考 文 献

- [1] 李铁林、吴昌贤、蒋挺大,1981。糖和糖醇的气相色谱分析 I. 单糖三甲基硅醚衍生物。分析化学 9(3): 295—298。
- [2] 李铁林、吴昌贤、张燕霞,1982。糖和糖醇的气相色谱分析 II. 糖脲乙酰酯衍生物气相色谱分析的改进。分析化学 16(5): 272—276。
- [3] 纪明侯、张燕霞,1960。我国经济褐藻的化学成份研究 I. 各种经济褐藻的主要化学成份。海洋与湖沼 4(3—4): 161—168。
- [4] Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton et al., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350—365.
- [5] Easterwood, V. M. and Byron J. L. Huff, 1969. Carbohydrate analysis by gas chromatography of acetylated aldonitriles. *Svensk. papperstidn.* 72: 768—772.
- [6] Jarvis, M. C. and J. Duncan, 1974. Paper chromatography of plant sugars. *J. chromatogr.* 92(2): 454—456.
- [7] Kircher, H. W., 1960. Gas-Liquid partition chromatography of methylated sugars. *Anal. Chem.* 32(9): 1103—1106.
- [8] Petre, R., R. Dennis, Betty P. Jackson, et al., 1972. Thin-layer chromatography of sugar and uronic acid in plant extracts on cellulose. *Planta Med.* 21(1): 81—88.
- [9] Roth, H., S. Segal and D. Bertali, 1965. The quantitative determination of galactose an enzymic method using galactose oxidase, with applications to blood and other biological fluids. *Anal. Biochem.* 10: 32—35.
- [10] Sweeley, C. C., R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells, 1963. Gas of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.* 85(16): 2497—2507.

GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SUGARS IN SEAWEEDS

I. DETERMINATION OF NEUTRAL MONOSACCHARIDES IN BROWN SEAWEEDS*

Fan Xiao Zhang Yanxia Xu Zuhong and Li Tielin**

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

A method for the determination of neutral monosaccharides in brown seaweeds by gas chromatography is described. Results obtained are as follows:

1. Hydrolysis and neutralization of samples. The sample was hydrolyzed with 1 N H_2SO_4 at 100° C for 5 h. The hydrolyzate was neutralized with $BaCO_3$ at 65° C and treated with ion exchange resin. Then, the solution was neutralized with NH_4OH solution.

2. Trimethylsilyl derivatives (TMS derivatives). The dried sugars after hydrolysis described above were treated with 1 ml of anhydrous pyridine, 0.2 ml of hexamethyldisilyl and 0.1 ml trimethylchlorosilane. The mixture was allowed to stand 30 min at room temperature prior to chromatographic analysis.

Acetylated aldonitriles derivatives. The dried sugars after hydrolysis described above were dissolved in 1 ml pyridine and 50 mg of hydroxylamine hydrochloride were added to the solution. The solution was heated at 90° C for 30 min. Then, 0.6 ml of acetic anhydride was added, and this mixture was heated at 90° C for 30 min.

3. Gas chromatography. The gas chromatograph used is Type GCHF 18.3, equipped with a dual-flame detector system, using coiled glass column, 3 m by 3 mm (i.d.), packed with 10% SE-30 on 80/100 chromosorb W AW DMCS for TMS derivative and with 4% ECN-SS-M on 80/100 chromosorb W AW DMCS for acetylated aldonitriles. Nitrogen was used as the carrier gas a flow rate of 30 ml/min. The temperature of the column was kept at 200° C, the injection part being at 250° C and the detector at 280° C.

4. Result of analysis shows that the neutral monosaccharides in brown seaweeds generally consist of rhamnose, fucose, xylose, mannose, glucose and galactose. The recovery reaches 83—89%.

* Contribution No. 953 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

** Institute of Environmental Chemistry, Academia Sinica.