

毛细管气相色谱法测定海带提取多糖中的 L- 褐藻糖含量

赵增芹^{1,2}, 刘希光^{1,2}, 牛锡珍¹, 张虹¹, 张全斌¹, 李智恩¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 建立快速而准确灵敏的方法测定海带 (*Laminaria japonica*) 提取多糖——褐藻多糖硫酸酯中的 L- 褐藻糖含量。海带多糖经酸解后, 转化成糖腈乙酸酯衍生物。采用 SGE AC 225 毛细管柱进行分离, 实验中以肌醇为内标物。从青岛产海带提取的褐藻多糖硫酸酯中仅含有 L- 褐藻糖和 D- 半乳糖 2 种单糖, 样品 10-1, 10-2, 10-3, 10-4 中的 L- 褐藻糖的平均含量分别为 32.907 2%, 32.314 7%, 31.292 4%, 32.357 1%, 回收率为 97.1%~99.9%, 变异系数为 0.23%~0.60%。采用气相色谱法测定海带多糖中的 L- 褐藻糖含量准确、可靠。

关键词: 海带 (*Laminaria japonica*); 褐藻多糖硫酸酯; L- 褐藻糖; 气相色谱法

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)10-0010-04

L- 褐藻糖 (L-fucose, L- 岩藻糖) 又名 6- 脱氧半乳糖, 是一种以 L 型异构体形态天然存在的稀有糖类^[1]。国内外大量研究发现 L- 褐藻糖具有多种生物学功能, 如可抑制白细胞形成 (即消炎作用)、治疗风湿性关节炎及合成某些免疫抗原等等。在生物体内, L- 褐藻糖主要存在于大多糖蛋白和糖酯等糖复合物糖苷链的非还原端及分子量较大的糖酯及血型抗原^[2]中。此外, 还存在于某些微生物的胞外多糖 (EPS) 中。但其更主要来源于褐藻多糖硫酸酯 (fucoidan)。褐藻多糖硫酸酯是一种水溶性多糖, 存在于褐藻的胞间组织中, 分子质量大且结构复杂^[3-5]。其组成因褐藻的种类而有所不同, 但其主要成分都是 L- 褐藻糖-4- 硫酸酯, 其次还伴随有少量的半乳糖、糖醛酸等。目前, 关于褐藻多糖硫酸酯的分离、纯化、结构组成以及其活性等方面的研究有大量报道, 但采用气相色谱法 (GC) 来测定其中的 L- 褐藻糖含量尚未见报道。气相色谱法测定单糖具有选择性好、样品用量少、分辨率高、灵敏快速等优点, 近年来, 在国内外已被广泛应用, 但由于糖类本身没有足够的挥发性, 所以在分析前必须进行衍生化处理, 使其转化成易挥发和热稳定的物质^[6]。

作者采用糖腈乙酸酯衍生化方法对从海带 (*Laminaria japonica*) 中提取到的褐藻多糖硫酸酯样品进行了分析测定, 得到了样品中各组成单糖的色谱峰, 并依据色谱图提供的数据对其中的 L- 褐藻糖进

行了定量分析, 以期能为从褐藻多糖硫酸酯中制备此种单糖提供一些理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

所用仪器为 HP5890 II 气相色谱仪 (美国惠普公司), 氢火焰离子化检测器 (FID); 无水吡啶 (AR); 乙酸酐 (AR); 硫酸 (AR); 盐酸羟胺 (AR); 三氟乙酸 (AR); 蒸馏水; L- 褐藻糖、D- 半乳糖、D- 木糖、D- 甘露糖、L- 鼠李糖均为标准单糖 (sigma 公司); 肌醇 (无锡默克尔精细化学品有限公司); 海带 (青岛产, 洗净, 烘干, 粉碎)

1.2 色谱条件

色谱柱: SGE AC225 2.5 mm × 30 m 弹性石英毛细管柱; 柱温: 215 °C; 进样口温度: 250 °C; 检测器温度: 250 °C; 分流比: 100:1; 高纯氮气为载气, 流速 1 mL/min。

收稿日期: 2003-06-23 修回日期: 2003-11-05

基金项目: 中国科学院方向性创新项目 (KZCX3-SW-215; 02-2-kj-hh-71(2003)10)

作者简介: 赵增芹 (1978-), 女, 山东临沂人, 硕士, 研究方向: 海藻化学与海洋药物; 李智恩, 通讯作者, 电话: 0532-2898703

1.3 褐藻多糖硫酸酯的提取

实验中采用水提醇沉法提取褐藻多糖硫酸酯,其具体方法为:海带粉末→稀酸浸提→过滤→取滤液,滤渣同样条件提取1次→合并2次滤液→调节滤液pH至中性→减压浓缩→乙醇沉淀→无水乙醇、丙酮洗涤→真空干燥(60℃)→粗褐藻多糖硫酸酯,再把得到的粗褐藻多糖硫酸酯加水溶解脱盐、脱色后,采用乙醇重沉淀法进一步纯化,从而可得褐藻多糖硫酸酯纯品。

1.4 褐藻多糖硫酸酯的水解

称取编号为10-1, 10-2, 10-3, 10-4的褐藻多糖硫酸酯各1份,分别置于10 mL水解管中,加10 mL 2 mol/L的三氟乙酸(TFA)溶液溶解,封管,100℃水浴中水解4 h,减压浓缩至干。

1.5 衍生物的制备

1.5.1 标准糖样衍生物的制备

分别称取4~6 mg的L-褐藻糖、D-半乳糖、D-木糖、D-甘露糖、L-鼠李糖以及1 mg的肌醇置于1 mL的离心管中,加入10 mg 盐酸羟胺和0.5 mL的吡啶,在90℃水浴中加热反应30 min,并不时振荡,取出后冷却至室温,加入0.8 mL的乙酸酐,于90℃水浴中继续进行乙酰化反应30 min,并不时振荡,冷却后即得适于气相色谱分析的标准单糖衍生物。

1.5.2 褐藻糖的衍生化

分别称取编号为10-1, 10-2, 10-3, 10-4的褐藻多糖硫酸酯的水解样一定量,按1.5.1中的方法进行衍生化处理,得到的样品液即可按气相色谱内标法定量。

2 结果与分析

2.1 混合标准单糖衍生物色谱分析

按文献[7]记载方法进行衍生化反应,使各种标准单糖转化成糖腈乙酸酯衍生物。以标准单糖糖腈乙酸酯对各色谱峰进行定性和分离度的测定,色谱分析结果见图1。

2.2 各种单糖相对质量因子的测定

相对质量因子按下式计算:

$$F_i = (A_s \times W_i) / (A_i \times W_s)$$

式中 F_i 为单糖的校正因子; A_i 、 W_i 分别为对应单糖的峰面积和质量; A_s 、 W_s 分别为内标物的峰面积和质量。

5种单糖的相对质量校正因子见表1。

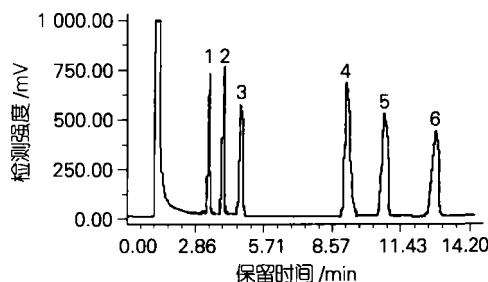


图1 混合标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物色谱分离

Fig. 1 Separation of the aldonitrile acetate of a mixture of standard sugars, Myo-inositol was used as an internal standard

色谱峰: 1. 鼠李糖; 2. L-褐藻糖; 3. 木糖; 4. 甘露糖; 5. 半乳糖; 6. 肌醇

Peak: 1. L-Rhamnose; 2. L-Fucose; 3. D-Xylose; 4. D-Mannose; 5. D-Galactose; 6. Myo-inositol

表1 标准单糖的保留时间和相对质量校正因子

Tab. 1 Retention time and response factor of standard sugars

组分	保留时间(min)	相对质量校正因子
鼠李糖	3.40	1.09
褐藻糖	4.01	0.96
木糖	4.13	1.02
甘露糖	9.14	1.05
半乳糖	10.81	1.26
肌醇	12.75	1.00

2.3 样品分析

样品的衍生化反应同标准单糖在同样色谱条件下进行,样品10-1, 10-2, 10-3, 10-4的色谱分析结果见图2,各样品的L-褐藻糖含量见表2,每个样品平行测量5次。

2.4 回收率的测定

为了检验单糖在样品预处理过程中的损失,在同样的实验条件下,向样品10-1中加入一定量的L-褐藻糖标准品,平行测定5次,结果见表3。

3 讨论

褐藻多糖硫酸酯是一类主要由褐藻糖组成的不均一硫酸多糖,是褐藻细胞壁的组成成分,它的分子质量变化很大,从数ku到数千ku不等,其组成因褐藻的种类而有所不同,但都含有褐藻糖、硫酸基等。作者实验室前期薄层层析法表明,从青岛产海带提取到的褐藻多糖硫酸酯中,主要含有L-褐藻糖和D-半乳糖这两种单糖。作者此次的气相色谱分析结果也验证了这一点。

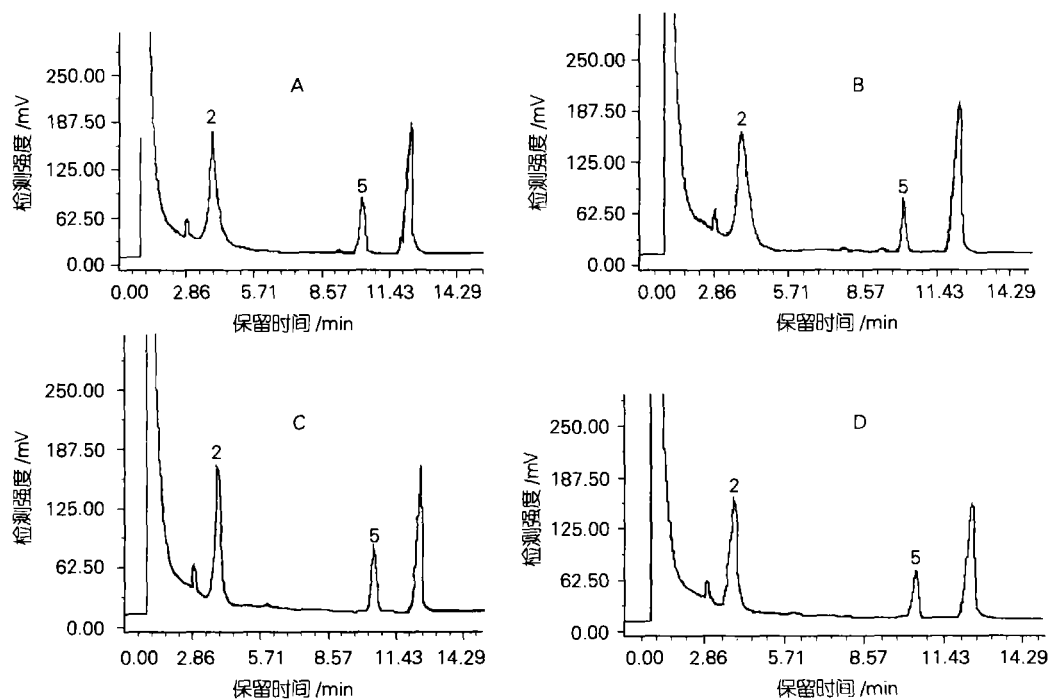


图 2 多糖样品的气相色谱图

Fig. 2 Gasic chromatographic results of the selected polysaccharide samples

A. 10-1; B. 10-2; C. 10-3; D. 10-4; 峰号同图 1

A. 10-1; B. 10-2; C. 10-3; D. 10-4; peak No. as Fig. 1

表 2 样品中 L-褐藻糖含量测定

Tab.2 the content of L-fucose in samples

样品	测定值 (%)					平均值 (%)	变异系数 (%)
10-1	32.786 4	32.893 6	32.954 7	32.984 2	32.917 2	32.907 2	0.23
10-2	32.146 8	32.225 6	32.226 8	32.431 7	32.542 6	32.314 7	0.51
10-3	32.254 0	32.371 8	32.246 8	32.105 7	32.563 2	32.292 4	0.60
10-4	32.428 0	32.361 5	32.429 6	32.156 6	32.410 0	32.357 1	0.36

表 3 回收率测定 (n = 5)

Tab.3 Recovery test (n = 5)

组 分	本底值 (%)	加入量 (mg)	得到值 (%)	回收率 (%)
L-褐藻糖	32.786 4	2	52.203 5	97.1
L-褐藻糖	32.893 6	2	52.727 5	99.2
L-褐藻糖	32.954 7	2	52.900 5	99.7
L-褐藻糖	32.9842	2	52.693 8	98.5
L-褐藻糖	32.9172	2	52.896 9	99.9

L-褐藻糖和 D-半乳糖作为六碳糖以来一直皆采用苯酚-半胱氨酸-硫酸法进行比色定量测定,但由于共存糖基间可能发生干扰,对 L-褐藻糖的定量带来一定的误差。Djundjic^[6]的研究表明,高含量的褐藻

糖的存在(褐藻糖量 10 倍于半乳糖)并不影响半乳糖的测定结果;相反,高含量的半乳糖会造成褐藻糖“表观含量”偏高。因此,采用比色法难以准确地测定褐藻多糖硫酸酯中的 L-褐藻糖含量。

就高效液相色谱而言, 虽然它能有效地同时测定样品中的多个单糖^[8], 但通常采用的糖分析专用柱, 价格昂贵, 分析成本甚高, 是国内许多生产部门和科研单位难以承受的, 并且由于示差折光检测器灵敏度低而受限制。虽然可通过制备糖的紫外标记衍生物, 从而采用紫外检测器检测以提高灵敏度, 但操作繁琐。

鉴于气相色谱的选择性好、分辨率高等优点, 作者采用高分辨率、高灵敏度的毛细管柱和衍生化技术, 使得从青岛产海带提取的多糖——褐藻多糖硫酸酯中的 L-褐藻糖和 D-半乳糖两种单糖得以分离, 该方法重现性好、精密度高, 达到了分离目的, 并且较准确地进行了定量分析。

参考文献:

[1] Araki E, Kamiya K, Kawauchi A, *et al.* Clinical assessment of urinary free fucose level [J]. *Rinsho Byori*, 1992, 40: 868- 874.

[2] Flowers H. Chemistry and biochemistry of Dand Lfucose [J]. *Adv Carbohydr Chem Bi*, 1981, 39: 279- 345.
[3] Springer G F, Wuzel H A, Mcneal G M. Isolation of anticoagulant fraction from crude fucoidan [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957, 94: 404- 409.
[4] Bernardi G, Springer G F. Properties of highly purified fucan [J]. *J Bio Chem*, 1962, 237: 75- 80.
[5] Kloareg B, Demarty M, Mabeau S, *et al.* Polyanionic characteristic of purified sulphated homofucans from brown algae [J]. *Int J bio Macromol*, 1986(6): 380- 386.
[6] Wang Jing, Wang Qing, Xiang Wensheng. Application of chromatography to the analysis of carbohydrates [J]. *Chinese J Anal Chem*, 2001, 29(2): 222- 227.
[7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 15- 40.
[8] Wu Weizhi, Luo Lian, Yu Shiyuan. High performance liquid chromatographic analysis of plant monosaccharides [J]. *Chinese J Chromatogr*, 1994, 12(3): 210- 211.

Determination of L-fucose content in polysaccharide extracted from *Laminaria japonica* using capillary gas chromatography

ZHAO Zeng-qin^{1,2}, LIU Xi-guang^{1,2}, NIU Xi-zhen¹, ZHANG Hong¹, ZHANG Quan-bin¹, LI Zhi-en¹
(1. Department of Chemistry, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Jun., 23, 2003

Key words: *Laminaria japonica*; fucoidan; fucose; gas chromatography

Abstract: To establish a better method for determining the content of L-fucose in fucoidan samples, a polysaccharide was extracted from *Laminaria japonica*. Hydrolysis of the polysaccharides was carried out with 2 mol/L CF₃COOH. Hydrolyzates were derivatized to the aldonitrile acetates and analyzed by GC using a capillary column on a HP 5890 II gas chromatography equipped with a flame ionization detector (FID). Myo-inositol was used as internal standard. Nitrogen was used as the carrier gas with a flow rate of 1 mL/min and a split ratio of 100: 1. Chromatography runs at isothermal 215℃, while the injector and detector were set at 250℃. The polysaccharide was composed of L-fucose and D-galactose. The contents of L-fucose in the selected fucoidan samples were about 32% with the recovery from 97.1% to 99.9% and the coefficient of variation from 0.23% to 0.60%. The results showed that the gas chromatographic method for determining the content of L-fucose in fucoidan is convenient and reliable.

(本文编辑: 张培新)