

海藻糖类的气相色谱分析

II. 红藻及红藻多糖中 D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖的测定*

张燕霞 范 晓

(中国科学院海洋研究所)

红藻中的糖类主要以多糖形式存在(琼胶、卡拉胶等),其中主要的单糖组分是 D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖,除此之外还含有少量的木糖、葡萄糖及甘露糖等成分。由于各单糖的相互干扰,难以用比色等普通化学分析方法对每一种单糖准确地定性定量。作者曾研究过褐藻中单糖的气相色谱测定法^[3],但该方法不能测定 3,6-内醚半乳糖,因为这种内醚糖对酸水解不稳定。据 Dutton 和 Nozawa 等人报道^{[4][5]},将多糖经甲醇分解后进行气相色谱分析,结果令人满意。本文用琼胶(Difco bacto-agar)作代表,研究探讨了红藻胶甲醇-HCl 分解的条件,确定了红藻胶中 D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖的气相色谱分析方法,并将其应用于红藻中 D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖的分析。

一、实 验

1. 仪器与试剂

- (1) 气相色谱仪: GCHF 18.3 型(东德),氢火焰离子化检测器;
- (2) 担体: Chromosorb W AW DMCS (80—100 目) (Gaschro Tech);
- (3) 固定液: 10% SE-30 (Gaschro Tech. Co. Ltd. Tokyo);
- (4) 硅醚化试剂: Silyl-8 (G. C.) (Macherey-Nagal);
- (5) 标准单糖: D-半乳糖 (A. R.); 3,6-内醚半乳糖(自制,色谱呈单峰,参照 Bulletin of the Chemical Society of Japan. V.26 (1953): 463—467);
- (6) 琼胶: Difco Bacto-agar.

2. 实验方法

(1) 无水甲醇-HCl 的制备

无水甲醇的制备: 取 500ml 甲醇 (A. R.) 置于 1000ml 圆底烧瓶中,加入 100g 氧化钙,装上回流冷凝管,其上方装有氯化钙干燥管,然后置于 80℃ 恒温水浴中回流干燥 4 小时,放至室温后进行蒸馏,接收管出口处装有氯化钙干燥管。收集 64—64.5℃ 馏分的

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1011 号。
收稿日期: 1983 年 9 月 22 日。

甲醇即为无水甲醇。

无水甲醇-HCl 的制备^[2]: 取 50g 氯化钠放入 250ml 三角烧瓶中, 装上分液漏斗。出气管装上浓硫酸洗瓶、氯化钙干燥管及安全瓶。最后将其通入无水甲醇接收瓶中, 接收瓶的出气口装有氯化钙干燥管。操作时, 将浓硫酸逐滴加入氯化钠瓶中, 产生的氯化氢气体经浓硫酸、氯化钙干燥后被无水甲醇吸收, 吸收至近饱和时, 即为无水甲醇-HCl 储备液。由吸收前后的重量变化算出氯化氢的百分比。用此储备液可冲稀配制成所需要的不同浓度。

(2) 样品和标准糖的甲醇分解

先将红藻或红藻多糖样品置于红外灯下烘干, 粉碎后过 60 目筛。精确称取 30mg 放入 10ml 的安瓿瓶中, 加入 1ml 1.5% 甲醇-HCl 溶液, 置冰水浴中冷却数分钟后封管。然后置于 80℃ 恒温水浴中加热 12 小时, 冷至室温后开管。甲醇分解液用碳酸银中和至 pH = 6—7, 滤纸过滤后再用甲醇洗涤 3—5 次, 每次用 1ml。滤液和洗涤液合并, 于 80℃ 水浴蒸干。最后放在 P_2O_5 真空干燥器中干燥过夜。按上述同样步骤, 用标准糖制得 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的甲基糖苷衍生物。

(3) 三甲基硅醚 (TMS) 衍生物的制备

上述甲醇分解样品中加入 10ml 正十七烷 (内标物) 及 0.2ml 硅醚化试剂 (Silyl-8), 充分震摇后放置 4 小时, 即可取样分析。每次取 0.4—1.0 μ l 进行气相色谱分析。

(4) 气相色谱条件

使用前述仪器和试剂。色谱柱为长 3m, 内径 3mm 的玻璃柱, 载气 (N_2)、助燃气(空气)和燃烧气 (H_2) 的流速分别为 20, 200 和 25ml/min, 色谱柱温 185℃, 检测器温度和汽化室温度均为 230℃。

二、结果与讨论

1. 样品的甲醇分解

(1) 甲醇-HCl 浓度的影响: 称取 8 份 0.05g 琼胶, 分别置于 1ml 安瓿瓶中, 各自加入 1ml 浓度为 0.7%, 1.4%, 2.1%, 2.8%, 3.5%, 4.2%, 5.0% 和 7.0% 的甲醇-HCl 溶液, 按上述实验方法甲醇分解 12 小时, 制备出它们的硅醚化衍生物, 气相色谱分析结果如图 1 所示。

由图 1 可看出, 琼胶经甲醇-HCl 分解和气相色谱分析, 其半乳糖的峰面积几乎不受甲醇-HCl 浓度的影响。而 3, 6-内醚半乳糖峰面积则与甲醇-HCl 的浓度有极大关系: 当甲醇-HCl 的浓度在 1.5% 以下时, 峰面积随浓度的增加而增大, 而在 1.5%—5.0% 之间时, 峰面积随浓度的增大而减小, 这可能是由于有内醚键的存在而使 3, 6-内醚半乳糖不易形成甲基苷; 但当无水甲醇中的 HCl 浓度过大时, 又因这种糖本身不稳定, 易受到破坏, 而使测定值降低。由实验结果表明, 甲醇-HCl 的浓度以 1.5% 为最好。

(2) 甲醇-HCl 分解时间的影响: 称取 6 份 0.05g 琼胶样品分别置于 1ml 安瓿瓶中, 各自加入 1ml 1.5% 甲醇-HCl, 按上述方法分别加热 4, 8, 12, 16, 28, 48 小时, 再依法分别制得其三甲基硅醚衍生物, 气相色谱分析结果如图 2。

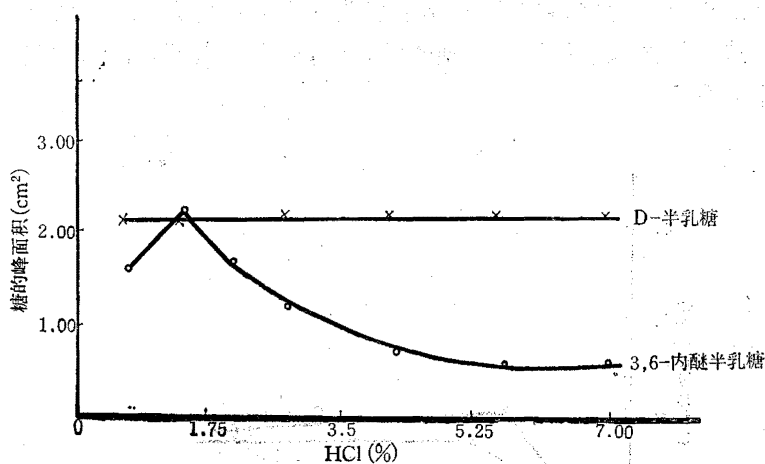


图1 琼胶用不同浓度甲醇-HCl 分解峰面积变化曲线

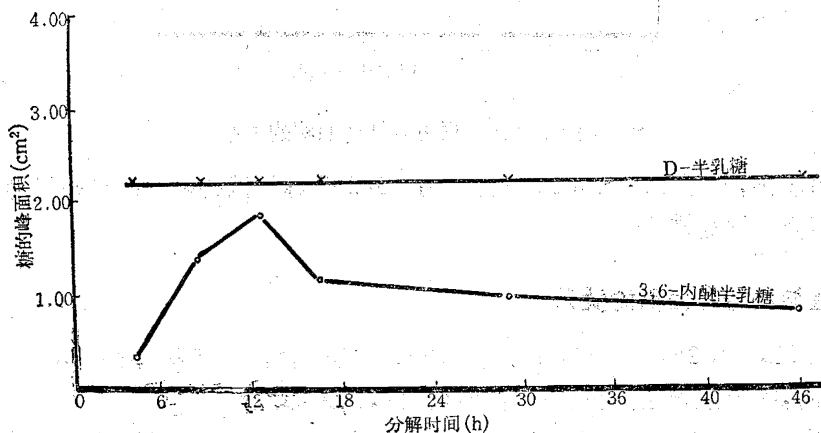


图2 不同甲醇-HCl 分解时间与糖峰面积的关系

由图2可看出,样品在甲醇分解时,半乳糖几乎不受加热时间的影响,从4小时到48小时,测得的峰面积基本相同。而3,6-内醚半乳糖受加热时间的影响较大:在12小时以内峰面积随加热时间的增加而增大,12小时到20小时,峰面积随加热时间的增加而减小,20小时以后变化缓慢。如前所述,由于3,6-内醚半乳糖形成甲基糖苷较半乳糖困难,当水解时间太短时,只能有部分的甲基糖苷生成,但时间过长,又使内醚糖被破坏而降低了测定值。实验结果表明,加热时间选在12小时为宜。

2. 硅醚化试剂与样品量配比试验

Sweeley^[6] 提出将糖类转变为三甲基硅醚衍生物进行气相色谱分析,其试剂配比为:10mg 糖样加入1ml 硅醚化试剂(吡啶:六甲基二硅胺烷:三甲基氯硅烷=10:5:2)。在硅醚化反应时产生大量沉淀,分析前必须离心除去。李铁林等^[1] 曾用加水处理法除去沉淀。但对于海藻样品分析,这个方法并不理想。本试验直接采用 Silyl-8 (Macherey Nagal)

硅醚化试剂对样品进行衍生化,并做了样品量与硅醚化试剂用量的配比试验。即称取 50 mg 琼胶,按上述选定的试验条件制得各糖的糖苷后,分别加入不同体积的硅醚化试剂,气相色谱分析结果如图 3。

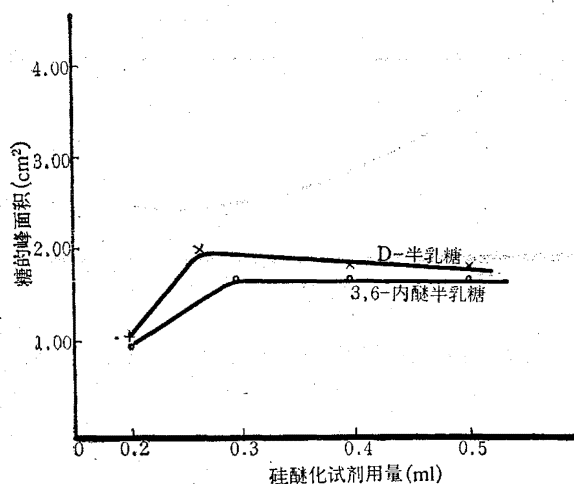


图 3 硅醚化试剂用量与糖峰面积的关系

从图 3 可看出,对于 30—50mg 琼胶,使用 0.3ml 硅醚化试剂就可获得较满意的结果,而且反应时不会有沉淀产生。

3. 样品量与色谱峰面积的关系

分别称取 10, 20, 25, 30, 35, 45, 80, 100 mg 的琼胶,用 1.5% 甲醇-HCl 在 80℃ 加热分解 12 小时,按上述选定的试验条件色谱分析,结果如图 4。

实验表明,取样量在 0.035g 以下时,色谱峰面积与样品量呈良好的线性关系。

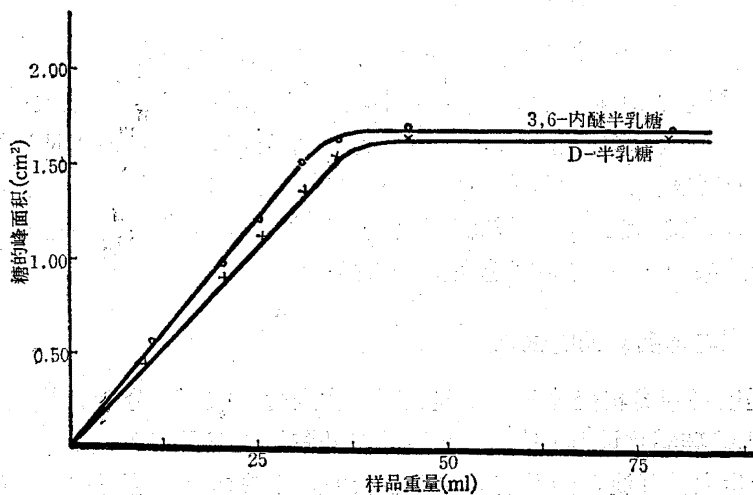


图 4 样品量与糖峰面积的关系

4. 红藻多糖中 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的回收率试验

称取 3 份琼胶, 其中 2 份分别加入标准 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖, 按上述选定的试验条件对三份样品进行定量测定, 其回收率如表 1 所示。

表 1 红藻多糖中糖类回收率实验结果

测定值 糖样	琼胶中糖 含量 (mg)	加入琼胶 中标准糖 (mg)	实测糖含量 (mg)	糖的回收率 (%)
D-半乳糖	5.9	10.0	15.8	99.2
3, 6-内醚半乳糖	6.1	4.0	9.5	94.1

从表 1 可看出; 用气相色谱分析红藻多糖中的 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖, 回收率均能达到 94.0% 以上, 结果是理想的。

5. 红藻和红藻多糖中 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的定量分析

称取 30mg 江蓠或琼胶, 按上述选定的试验条件进行色谱定量分析, 结果如表 2 和图 5, 6。

从图 5, 6 可看出, 红藻(江蓠)或红藻多糖样品经甲醇分解、硅醚化反应后, 气相色谱

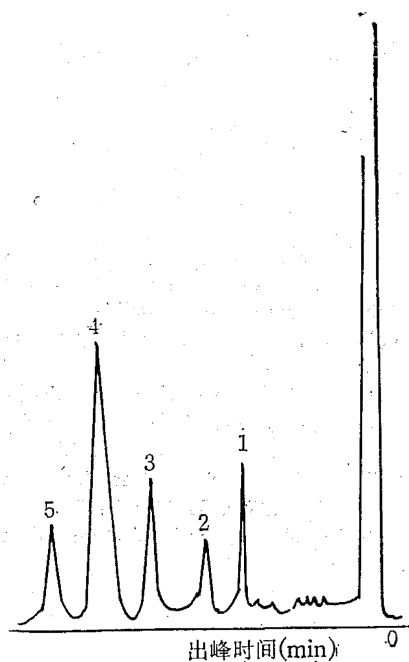


图 5 琼胶气相色谱分析图谱
1. 正十七烷(内标); 2. 3, 6-内醚半乳糖;
3, 4, 5. D-半乳糖

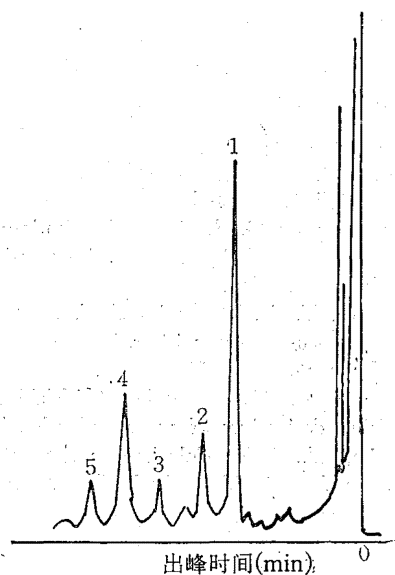


图 6 江蓠 (*Gracilaria Verrucosa*) 气相色谱
分析图谱
1. 正十七烷(内标); 2. 3, 6-内醚半乳糖;
3, 4, 5. D-半乳糖

表2 红藻多糖的分析结果比较

糖类 分析方法 样品	D-半乳糖 (%)			3, 6-内醚半乳糖 (%)		
	本方法	比色法 ^[7]	比色法 ^[2]	本方法	比色法 ^[7]	比色法 ^[2]
琼 胶 Difco bacto-agar [®]	54.5	55.8	52.3	39.6	43.2	37.6

分析的图谱峰形及其比例是很对应的。从表2可见,用本法测定琼胶中两种糖含量与比色法测定的结果一致。

我们用本方法直接测定海藻(江藻)中的两种单糖,测得的结果与比色法测定结果基本一致。用气相色谱法测得江藻中D-半乳糖和3,6-内醚半乳糖的含量分别为9.50%和6.50%。

三、结 语

(1) 将红藻或红藻多糖加1.5%甲醇-HCl溶液,于80℃加热12小时,可以使样品分解完全,制备出D-半乳糖和3,6-内醚半乳糖的甲基糖苷。

(2) 含甲基糖苷的甲醇分解物可与Silyl-8硅醚化试剂反应,制备出较稳定的三甲基硅醚衍生物,而且反应后不产生沉淀。

(3) 本法测得D-半乳糖和3,6-内醚半乳糖的回收率分别为99.2%和94.13%。

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的气相色谱分析。分析化学 9(3): 295—298。
- [2] 张燕霞、史升耀、范晓, 1980。红藻中半乳糖和3,6-内醚半乳糖的比色分析。海洋湖沼通报 4: 48—54。
- [3] 范晓、张燕霞、徐祖洪, 1984。海藻糖类的气相色谱分析 I. 褐藻中单糖的测定。海洋与湖沼 15(1): 91—97。
- [4] Dutton, Guy G. S., 1973. Applications of gas liquid chromatography to carbohydrates. part 1. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Vol. 28 pp. 12—101. Academic press, New York and London.
- [5] Nozawa, Y., Y. Hiraguri and Y. Ito, 1969. Studies on the stability of neutral monosaccharides by gas chromatography, with reference to the analysis of sugar components in the polysaccharides. J. Chromatog. 45: 244—249.
- [6] Sweeley, W. W., R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells, 1963. Gas chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substance. J. Amer. Chem. Soc. 85(16): 2497—2507.
- [7] Yaphe, W., 1960. Colorimetric determination of 3, 6-anhydro-galactose and galactose in marine algae polysaccharides. Anal. Chem. 32: 1327—1330.

GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF MONOSACCHARIDES IN SEAWEED.

II. DETERMINATION OF D-GALACTOSE AND 3, 6-ANHYDROGALACTOSE IN RED SEAWEED AND ITS POLYSACCHARIDE*

Zhang Yanxia, Fan Xiao
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

A method for determination of D-galactose and 3,6-anhydrogalactose in red seaweed by gas chromatography is described. Results obtained in investigation may be summarized as follows:

1. Methanolysis Thirty milligrams of each of the monosaccharide standards (D-galactose and 3,6-anhydrogalactose) and of the polysaccharides (Difco bacto-agar) were refluxed with 1 ml of 1.5% anhydrous methanolic HCl in a sealed ampoule at 80°C for 12 hr. The hydrolysates were neutralized with silver carbonate. The neutralized solutions were filtered and evaporated to dryness at 80°C.

2. Preparation of TMS (Trimethylsilyl) derivatives To each methanolized sample containing n-heptadecane (internal standard) was added 0.2 ml of silylating reagent (Silyl-8). The reaction mixture was shaken vigorously for 60 sec, then warmed for 10 min at 60°C. 0.4—1.0 μ l of each mixture were used for injection into the gas chromatograph.

3. Gas chromatograph A gas chromatograph of GCHF. 18.3 equipped with a flame ionization detector was employed throughout this investigation. The glass column, 3 m long with I. D. of 3 mm was packed with 10% SE-30 and Chromosorb W AW DMCS. (80—100 mesh). Chromatography was carried out isothermally at 185°C with the injection port at 230°C. Flow rates, adjusted for optimal efficiency, were 20 ml/min, 25 ml/min and 200 ml/min for nitrogen (as carrier gas) hydrogen and air respectively.

4. The recoveries of D-galactose and 3,6-anhydrogalactose were 99.2% and 94.1% respectively.

* Contribution No. 1011 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.