

# 裸藻中 $\alpha$ -生育酚的提取和测定

湖北省水生生物研究所  
藻类研究室藻类应用组

## 提 要

维生素E族中活力最高的是 $\alpha$ -生育酚。关于维生素E的医疗效用,目前的看法认为它不仅抗不孕药物,而且是治疗其它疾病如肝炎、高血压等的辅助药物。我们为了探索淡水藻类在医药上的应用,选择了鱼池中大量繁殖的血红裸藻作为材料,提取 $\alpha$ -生育酚。本文介绍了血红裸藻中 $\alpha$ -生育酚的提取和测定方法。实验结果表明血红裸藻中有较丰富的 $\alpha$ -生育酚(0.6—1.0毫克/克),可供维生素生产的参考。

$\alpha$ -生育酚是6-羟基色满的衍生物,由于它极易氧化,一般常作为生物抗氧化剂<sup>[13]</sup>。

关于维生素E的医疗效用及其作用机制,近年来讨论得很热烈<sup>[19]</sup>。根据1972年美国《科学新闻》报导:维生素E除了作为抗不孕药物外,尚可作为治疗消化系统炎症包括肝炎和肝硬变的辅助药物;同时,对于循环系统的疾病如高血压、动脉粥样硬化也有预防和治疗的效果;对于一些外科疾病如痔疮、溃疡等也有疗效<sup>[19]</sup>。甚至有人认为维生素E可以在大气污染严重的地区作为防护药物<sup>[14]</sup>。总之对维生素E作用的认识将随着人们不断的实践和科研工作的进展而逐步地深入。

维生素E在人工合成前,多半是从植物中提取的,即或是采用化学合成法,其中也有一部分原料如植醇也是从植物中取得的。在植物中,玉米胚芽油和小麦胚芽油中 $\alpha$ -生育酚的含量最高,约为3—5毫克/克<sup>[21]</sup>;但小麦胚芽不能长期保存,而且材料来源较困难<sup>[22]</sup>。如能找到一种来源广泛而又经济的材料,将对维生素E的生产提供有利条件。根据国外文献报道细致裸藻品系E (*Euglena gracilis* Strain Z),其 $\alpha$ -生育酚含量为0.8毫克/克<sup>[18]</sup>。虽然它的含量不及小麦胚芽油高,但这类藻类来源较广,容易获得。在我国池塘中普遍大量繁殖一种血红裸藻 (*Euglena sanguinea*),如能从此类裸藻中提取所需的 $\alpha$ -生育酚,可为提取维生素E提供新的材料来源。本文介绍我们对血红裸藻维生素E提取和测定的结果,供维生素生产的参考。

## 一、材料和方法

每年5—10月间,血红裸藻在鱼池中大量繁殖,水面上呈一层橙红色至暗红色水华。我们就利用这些自然生长的血红裸藻作为材料。取样时,用竹竿在水面上掠过,将藻归集于一角,用纱布网捞取,除去杂物后,即可直接作为提取 $\alpha$ -生育酚的原材料。

**提取** 用一般脂肪提取法虽可提出组织中含  $\alpha$ -生育酚的脂类<sup>[7]</sup>,但如用植物材料时,最好选用穿透性强、可以破裂脂合键的溶剂<sup>[12]</sup>,而且要求在提取过程中,氧化和酶解越少越好。我们采用氯仿:甲醇:水(1:2:0.8)作为抽提液,效果较好<sup>[4]</sup>。实验中每次提取样品量为5—10克,样品和提取液的比例为1:10。样品经反复提取三次后呈灰棕色,提取液为深棕红色。为了尽可能地提取完全,可再用氯仿提取三次,合并提取液。在提取液中加入氯仿和水(1:1)在分液漏斗中静置过夜并分相。

**排除杂质** 用上述方法提取,往往含有大量叶绿素及其他非  $\alpha$ -生育酚的脂类。最初我们曾用硅胶柱层析法除去杂质<sup>[4]</sup>,但经多次试验,不如用皂化法除杂质较为合适。皂化时,先将分相后的氯仿部分,在无氧条件下(通  $N_2$  或  $CO_2$ )浓缩至2—3毫升以后,加入12%氢氧化钾酒精溶液15—20毫升,相当于提取物重量15%;为了防止氧化,加入苯三酚1克,煮沸20分钟。皂化后,用冷蒸馏水50毫升将皂化后的剩余物质洗入分液漏斗中,用乙醚反复提取三次,每次约25毫升,一直提到乙醚无色时为止。合并乙醚提取液,用蒸馏水反复洗涤直至中性<sup>[7,8]</sup>。以后再将乙醚提取液在30—40℃、无氧条件下浓缩。此时绝大部分杂质均除去。

**纯化** 为了进一步纯化,将浓缩液用柱层析法分离<sup>[5]</sup>。将市售酸性氧化铝10克加入40毫升石油醚及0.8毫升蒸馏水,使之成为三级活性氧化铝,充分搅拌均匀后装柱。柱上端加入少许无水硫酸钠,以吸去样品中微量的水分。将浓缩后的乙醚液2毫升加入柱中,再用50毫升石油醚洗脱,洗脱速度为每分钟3毫升左右。收集的洗脱液,在无氧条件下除去石油醚,供测定用。

### 测定

1. 紫外分光光度法:用 Zeiss VSU I 型万用分光光度计测定吸收光谱,以标准  $\alpha$ -生育酚酒精溶液作比较。选择波长范围为260—300毫微米,如测定样品在290毫微米有吸收峰,则可初步肯定含有  $\alpha$ -生育酚<sup>[10]</sup>。

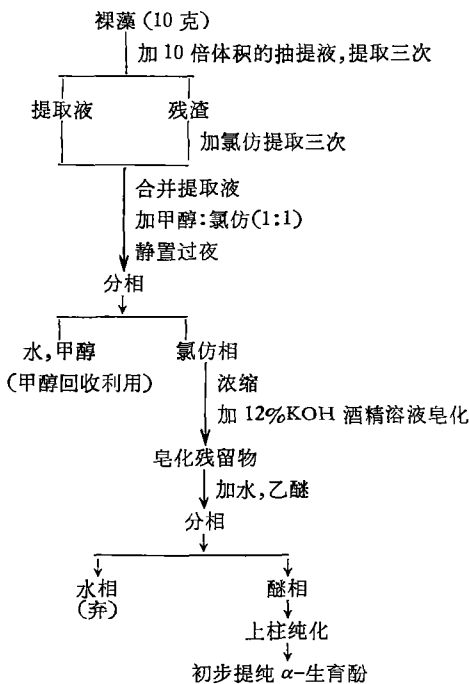
2. 纸层析法:用反相层析法。将2.5厘米宽25厘米长的 Whatman 1 号滤纸条浸入2.5重量/体积的凡士林乙醚溶液,乙醚在空气中挥发后,剩下均匀的凡士林覆盖物<sup>[7,8]</sup>。点样5微升后,平衡8小时,然后用75%酒精溶液作为展层剂进行上行层析。展层时间依温度而定,一般为10—12小时。展层后取出晾干,15分钟后,再用0.25%联吡啶酒精溶液和0.1%三氯化铁酒精溶液显色,在有  $\alpha$ -生育酚处,出现粉红色的圆斑,计算其  $R_f$  值(层析的比移值),再与标准  $\alpha$ -生育酚相比较。

3. 薄板层析法:采用硅胶G薄板。硅胶(200目)8.5克和煅石膏1.5克,少许羧纤钠混合磨匀,加入二倍体积的水充分搅匀;在硅胶开始变稠时倒出,涂于7.5×20厘米玻璃板上;薄板厚度为0.4毫米,在室温中干燥过夜,使用前在110℃活化一小时。点样量1—5微升,推进剂为苯或氯仿。在温度高于25℃时不需平衡,用上行层析。展层时间40—50分。展层后取出,用  $\alpha$   $\alpha'$ -联吡啶—氯化铁酒精溶液显色,  $\alpha$ -生育酚呈粉红色的斑点。

操作步骤如下页图示。

## 二、试验结果和讨论

**吸附剂的选择** 选择合适的吸附剂对于分离  $\alpha$ -生育酚是相当重要的一环。根据文献



报道, 硅胶、氧化镁、白土、氧化铝等均可作为分离  $\alpha$ -生育酚的吸附剂<sup>[3,4,11]</sup>。我们用标准  $\alpha$ -生育酚作回收率试验, 观察到三级活性氧化铝回收率较高, 而硅胶、氧化镁、白土、一级活性氧化铝等效果较差(见表 1)。如将洗脱后的硅胶柱及氧化铝柱(一级)加入显色剂时,

表 1 不同吸附剂对  $\alpha$ -生育酚吸附能力的比较\*

吸附剂 测定项目	白 土		硅 胶		氧 化 镁		氧化铝(三级)		氧化铝(一级)	
	试 测	UV	试 测	UV	试 测	UV	试 测	UV	试 测	UV
洗脱剂										
石 油 醚	—	270	—	270	—	270	+++	290	—	270
1% 乙醚石油醚	—	270	—	270	—		痕	280	—	270
乙 醚	—		—	280	—		—	280	—	
氯 仿	—	280	—	280	—		—	280	+	290
甲 醇	+	290	+	290	—		—	280	+	290

\* UV 指紫外光吸收光谱的吸收峰; 试测 指用  $\alpha$ -联吡啶-FeCl<sub>3</sub> 酒精溶液测试, 有红色反应者为 +。

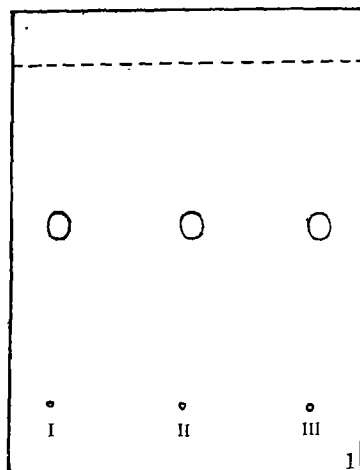
柱子呈现粉红色的带, 用各种溶剂甚至甲醇洗脱数次也未能全部洗下, 说明吸附很牢。将甲醇洗脱液用紫外分光光度计测试, 在 290 毫微米有吸收峰, 表明虽经多次洗脱, 尚有一定量的  $\alpha$ -生育酚留在柱上。用三级活性氧化铝作为吸附剂时, 回收率在 95% 以上。

**纸层析** 用反相纸层析法可以初步将  $\alpha$ -生育酚定性, 其  $R_f$  值随温度不同而有所差异, 在 24—27℃ 条件下, 标准维生素 E 的  $R_f$  为 0.55—0.80, 样品为 0.60—0.80。斑点位置及大小基本一致(见图 1)。

**薄板层析** 用氯仿作为推进剂<sup>[17]</sup>, 标准  $\alpha$ -生育酚及样品的  $R_f$  值随温度不同而有变

表2 藻类及其他高等植物中  $\alpha$ -生育酚的含量比较

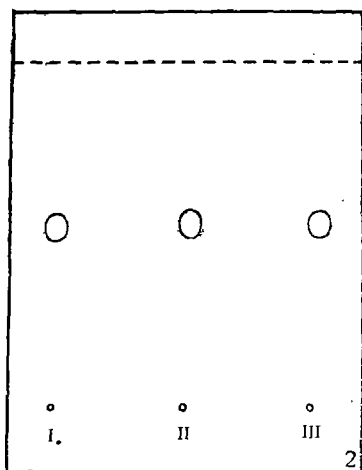
种 类	$\alpha$ -生育酚含量(毫克/克)
<i>Euglena gracilis</i> Strain Z	846
<i>Euglena gracilis</i>	155
<i>Euglena sanguinea</i>	600—1,000
<i>Ochromonas malhamensis</i>	88
<i>Ochromonas malhamensis</i>	14.2
<i>Nostoc muscorum</i>	有
<i>Chlorella</i> sp.	7
<i>Fucus diotrichum</i>	11.1
<i>Macrocyctis</i> sp.	12.1
棉子油	830—1,100
小 麦	9
小麦胚芽油	3,000—3,500
菠 菜	1,000
酵 母	无

图1  $\alpha$ -生育酚反相纸层析图形

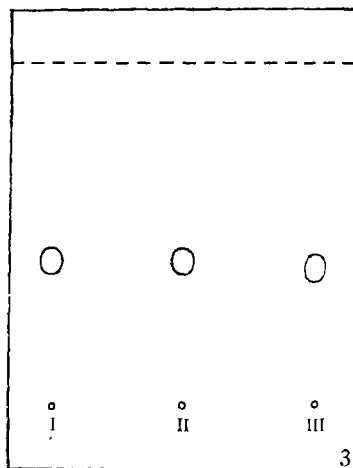
反相层析, 凡士林乙醚滤纸; 溶剂为 75% 酒精; 平衡时间, 8 小时; 展层时间, 12 小时; 温度, 25°C。  $R_f$  值: II 是标准  $\alpha$ -生育酚,  $R_f$  值为 0.50; I 和 III 是样品的  $R_f$  值, 分别为 0.51 和 0.50。

化。用氯仿作为推进剂时尚有一些  $\alpha$ -生育酚和黄色杂物相混; 用丙酮: 醋酸 (5:1) 上行层析时黄色杂物被带走, 只剩下粉红色的斑点, 说明柱层析后仍有少数杂物未被排除。改用苯作为推进剂<sup>[10]</sup>, 展层时间为 40 分, 杂色物和  $\alpha$ -生育酚已明显分开。其  $R_f$  值在 15°C 时为 0.24—0.35, 30°C 为 0.45—0.51 (见图 2, 3)。

**紫外吸收光谱及粗定量结果** 用标准  $\alpha$ -生育酚与样品相对照, 曲线图形基本上一致, 但标准样品峰比较明显, 测试样品峰较小, 可能是杂质未除尽的干扰 (见图 4)。文献中报

图2 裸藻中  $\alpha$ -生育酚薄板层析图形

吸附剂为硅胶 G; 推进剂为苯; 温度为 30°C。II 为标准  $\alpha$ -生育酚, 其  $R_f$  值为 0.50; III 和 I 为样品,  $R_f$  值为 0.51。

图3 裸藻中  $\alpha$ -生育酚薄板层析图形

吸附剂为硅胶 G, 推进剂为氯仿, 温度为 10°C。II 为标准样品, 其  $R_f$  值为 0.40; I 和 III 为样品,  $R_f$  值分别为 0.39 和 0.40。

道  $\alpha$ -生育酚吸收光谱为 292 毫微米<sup>[10]</sup>, 我们用标准  $\alpha$ -生育酚进行测试, 测定波长为 285、288、290、292、294。其高峰点在 290 毫微米, 以后就 290 毫微米作为  $\alpha$ -生育酚吸收峰, 提取的样品经柱层析后用紫外分光光度计初测, 如在 290 毫微米有吸收峰, 则按其光密度和标准样品相比较, 推算出其  $\alpha$ -生育酚的含量。根据十四次测试结果, 血红裸藻中  $\alpha$ -生育酚粗含量在 1.2 毫克/克左右。但由于柱层析后还带有杂质, 所以其含量偏高, 经薄层层析后进一步除去杂质, 其含量约为 0.6—1.0 毫克/克。

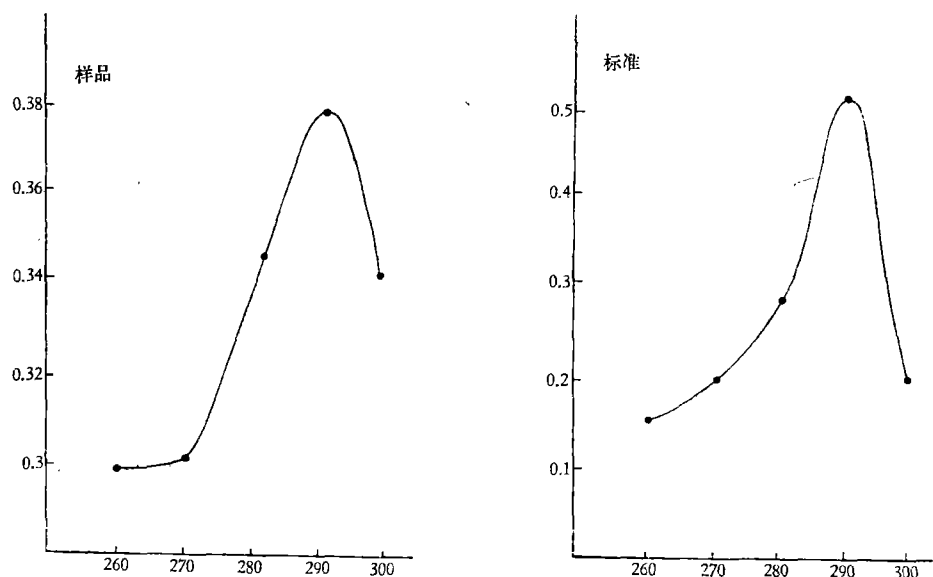


图4 裸藻中  $\alpha$ -生育酚酒精溶液紫外吸收光谱和标准  $\alpha$ -生育酚吸收光谱的比较

样品为血红裸藻  $\alpha$ -生育酚酒精溶液, 标准为  $\alpha$ -生育酚酒精溶液。

**讨论** 近年来, 有关藻类中  $\alpha$ -生育酚及醌类研究逐渐增多<sup>[9,15]</sup>, 除作含量分析外, 多侧重于机理上的探讨, 如研究  $\alpha$ -生育酚及其他醌类和光合作用中电子传递的关系, 以及用  $\alpha$ -生育酚及其他醌类作为生化分类的指标<sup>[4]</sup>。我们的目的是试图从藻类利用的角度, 探索常见的大量生长的藻类中  $\alpha$ -生育酚含量, 以便为今后藻类在医药上的应用开辟途径。根据文献报导, 低等植物中的酵母是没有  $\alpha$ -生育酚的<sup>[16]</sup>。藻类中虽普遍地存在  $\alpha$ -生育酚, 但其含量以裸藻为最高<sup>[9,18]</sup>, 同时用它和高等植物相比较, 裸藻中的含量也可与棉子油相当<sup>[20]</sup> (见表2)。

根据我们分析结果可以看出, 血红裸藻含有相当丰富的  $\alpha$ -生育酚, 其含量达 0.6—1 毫克/克。而且血红裸藻生长繁殖时间长, 根据我们在所内养殖场鱼池测定产量的结果, 1973 年 5—10 月, 虽然阴雨连绵、血红裸藻产量平均每亩每月可达 20—30 公斤 (干重)。此种藻类虽可作为鱼的饵料, 但大量繁殖时对鱼生长亦不利, 如能捞取出来作为提取  $\alpha$ -生育酚的材料, 则可一举两得; 其粗制品, 尚可作为畜类及家禽促进繁殖的药物。

## 参 考 文 献

- [1] 韦庆昆等译(施乃德曼著), 1950. 维生素的制造, 336—356 页. 食品工业出版社。
- [2] 龙焜等译(别列卓夫斯基著), 1959. 维生素化学, 273—293 页. 中国工业出版社。
- [3] 上海第一医学院生化教研组译(拉琴斯基著), 1957. 生物学中的色层分析法, 99 页. 科学出版社。
- [4] Antia, N. J. & I. D. Desai, 1970. The Tocopherol, Vitamin K & related isoprenoid quinone composition of a unicellular red algae. *J. Phycol.*, 6:305.
- [5] Bligh, E. G., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911.
- [6] Booth, V. H., 1963. Determination of tocopherols in plant tissue. *Analysts*, 88:627.
- [7] Brown, F., 1951. The estimation of vitamin E. *Biochem. J.*, 51:237.
- [8] Brown, F., 1952. The estimation of vitamin E. *Biochem. J.*, 52:523.
- [9] Green, J., 1959. Tocopherols in Micro-organisms. *Nature*, 184:1339.
- [10] Kofler, M. etc., 1962. Physicochemical properties and assay of the tocopherols. *Vitamins and Hormones*, 20:407.
- [11] Laidman, D. L. & G. S. Hall, 1972. Adsorption column chromatography of tocopherols. *Methods in Enzymology*. Vol. XVIII, Vitamin & Coenzyme. Part C:349.
- [12] Laidman, D. L. etc., 1972. Extraction of tocopherols from plant tissue. *Methods in Enzymology*. Vol. XVIII, Vitamin & Coenzyme. Part C:366.
- [13] Mengel, D. B., 1972. Vitamin E. The biological & environmental antioxidant. *J. Agr. Food Chem.*, 20:481.
- [14] Mengel, D. B., 1972. Vitamin E and Smog. *Science News*, 102:26.
- [15] Sheridan, P. Richard, 1972. A qualitative & quantitative study of plastoquinone A in two thermophilic blue-green algae. *J. Phycol.*, 8:43.
- [16] Shinner, W. A. & P. A. Sturm, 1968. Investigation of algae & yeast for tocopherol & tocopherolquinone content. *Phytochemistry* 7:1893.
- [17] Sturm, P. A. & W. A. Skinner, 1966. Quantitative determination of individual tocopherol by thin layer chromatographic separation & spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 38:1244.
- [18] Threlfall & T. W. Goodwin, 1967. Nature, intracellular distribution & formation of terpenoid quinones in *Euglena gracilis*. *Biochem. J.*, 103:573.
- [19] Trotter, R. J., 1972. Vitamin E, who need it? *Science News* 101:33.
- [20] Williaus, J., P., 1968. Separation & estimation of quinones & tocopherol from *Vicia Faba*, leaves. *J. Chrom.*, 36:504.

## EXTRACTION AND DETERMINATION OF $\alpha$ -TOCOPHEROL IN FRESHWATER ALGA, *EUGLENA SANGINEA*

SECTION OF APPLIED PHYCOLOGY, LABORATORY OF PHYCOLOGY,  
INSTITUTE OF HYDROBIOLOGY, HUPEI

### ABSTRACT

Among the vitamin-E group,  $\alpha$ -tocopherol is the most active member. As to its curative effects the modern concept is that it is not only a medicine for fertility, but also an accessory drug in the cure of hepatitis, hypertension, etc. In the present paper, a method of extraction and determination of  $\alpha$ -tocopherol in freshwater alga *Euglena sanguinea* is described. It is interesting that there is a considerable amount (0.6—1.0 mg/g) of  $\alpha$ -tocopherol in this alga.