

裸藻中 α -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 α -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 α -生育酚。本文介绍了血红裸藻中 α -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 α -生育酚(0.6—1.0毫克/克),可供维生素生产的参考。

α -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^[13]。

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^[19]。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疗效;对于一些外科疾病如痔疮、溃疡等也有疗效^[19]。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^[14]。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 α -生育酚的含量最高,约为3—5毫克/克^[21];但小麦胚芽不能长期保存,而且材料来源较困难^[22]。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 α -生育酚含量为0.8毫克/克^[18]。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 α -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 α -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 α -生育酚的脂类^[7],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^[12],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^[4]。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 α -生育酚的脂类。最初我们曾用硅胶柱层析法除去杂质^[4],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^[7,8]。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^[5]。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 α -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 α -生育酚^[10]。

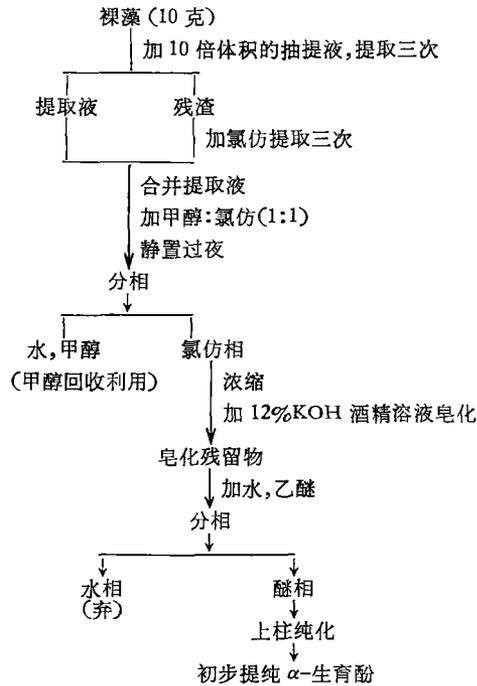
2. 纸层析法:用反相层析法。将2.5厘米宽25厘米长的 Whatman 1号滤纸条浸入2.5重量/体积的凡士林乙醚溶液,乙醚在空气中挥发后,剩下均匀的凡士林覆盖物^[7,8]。点样5微升后,平衡8小时,然后用75%酒精溶液作为展层剂进行上行层析。展层时间依温度而定,一般为10—12小时。展层后取出晾干,15分钟后,再用0.25%联吡啶酒精溶液和0.1%三氯化铁酒精溶液显色,在有 α -生育酚处,出现粉红色的圆斑,计算其 R_f 值(层析的比移值),再与标准 α -生育酚相比较。

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 α '-联吡啶—氯化铁酒精溶液显色, α -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 α -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 α -生育酚的吸附剂^[3,4,11]。我们用标准 α -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 α -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 α -联吡啶- FeCl_3 酒精溶液测试, 有红色反应者为 +。

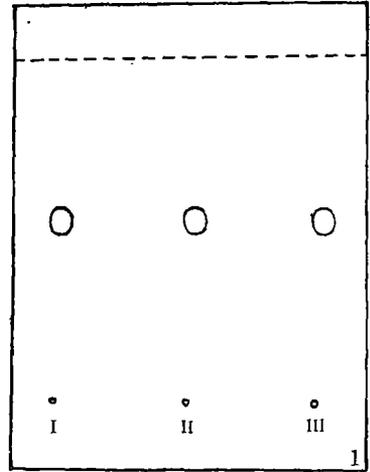
柱子呈现粉红色的带, 用各种溶剂甚至甲醇洗脱数次也未能全部洗下, 说明吸附很牢。将甲醇洗脱液用紫外分光光度计测试, 在 290 毫微米有吸收峰, 表明虽经多次洗脱, 尚有一定量的 α -生育酚留在柱上。用三级活性氧化铝作为吸附剂时, 回收率在 95% 以上。

纸层析 用反相纸层析法可以初步将 α -生育酚定性, 其 R_f 值随温度不同而有所差异, 在 24—27°C 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^[17], 标准 α -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 α -生育酚的含量比较

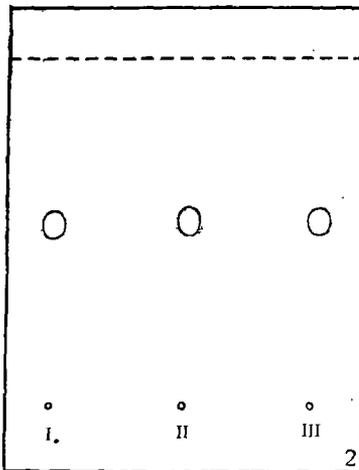
种	类	α -生育酚含量(毫克/克)
<i>Euglena gracilis</i>	Strain Z	846
<i>Euglena gracilis</i>		155
<i>Euglena sanguinea</i>		600—1,000
<i>Ochromonas malhamensis</i>		88
<i>Ochromonas malhamensis</i>		14.2
<i>Nostoc muscorum</i>		有
<i>Chlorella</i>	sp.	7
<i>Fucus diotrichum</i>		11.1
<i>Macrocystis</i>	sp.	12.1
棉子油		830—1,100
小麦		9
小麦胚芽油		3,000—3,500
菠菜		1,000
酵母		无

图 1 α -生育酚反相纸层析图形

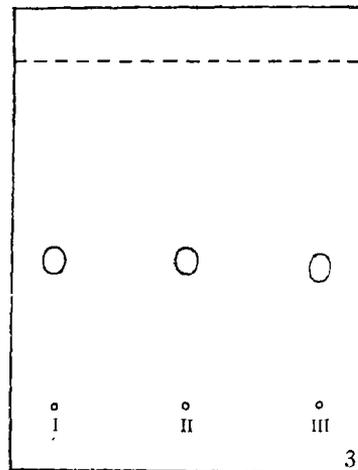
反相层析, 凡士林乙醚滤纸; 溶剂为 75% 酒精; 平衡时间, 8 小时; 展层时间, 12 小时; 温度, 25°C。 R_f 值: II 是标准 α -生育酚, R_f 值为 0.50; I 和 III 是样品的 R_f 值, 分别为 0.51 和 0.50。

化。用氯仿作为推进剂时尚有一些 α -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^[10], 展层时间为 40 分, 杂色物和 α -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 α -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 α -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 α -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 α -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 α -生育酚吸收光谱为292毫微米^[10],我们用标准 α -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 α -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 α -生育酚的含量。根据十四次测试结果,血红裸藻中 α -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。

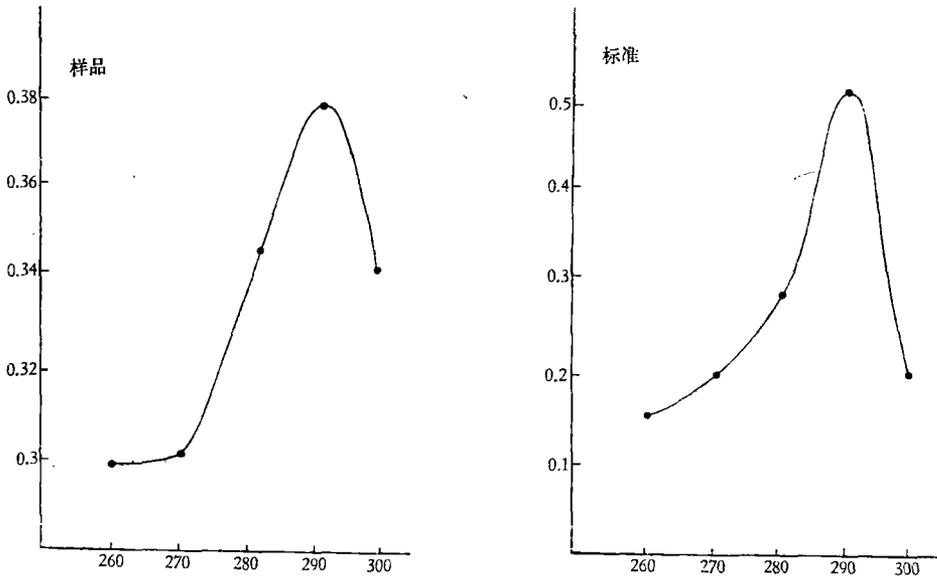


图4 裸藻中 α -生育酚酒精溶液紫外吸收光谱和标准 α -生育酚吸收光谱的比较
样品为血红裸藻 α -生育酚酒精溶液,标准为 α -生育酚酒精溶液。

讨论 近年来,有关藻类中 α -生育酚及醌类研究逐渐增多^[9,15],除作含量分析外,多侧重于机理上的探讨,如研究 α -生育酚及其他醌类和光合作用中电子传递的关系,以及用 α -生育酚及其他醌类作为生化分类的指标^[4]。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 α -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 α -生育酚的^[16]。藻类中虽普遍地存在 α -生育酚,但其含量以裸藻为最高^[9,18],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^[20](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 α -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 α -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 α -TOCOPHEROL IN FRESHWATER ALGA, *EUGLENA SANGINEA*

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

ABSTRACT

Among the vitamin-E group, α -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 α -tocopherol in freshwater alga *Euglena sanguinea* is described. It is interesting that there is a considerable amount (0.6—1.0 mg/g) of α -tocopherol in this alga.