

几株丛粒藻烃类的气相色谱-质谱分析*

王修垣 赵 苓

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

宋一涛

(胜利油田地质科学研究院 山东 257015)

摘 要 用气相色谱-质谱分析定性鉴定了三株不同来源的丛粒藻(*Botryococcus braunii*)产生的烃类组分。丛粒藻株 A (USA) 和 B (Germany) 产生以 C_nH_{2n-2} 和 C_nH_{2n-4} 为主的烯基直链烃, 丛粒藻 C 得自我国云南省抚仙湖, 产生以丛粒藻烯和异丛粒藻烯为主的多分枝烃。讨论了不同丛粒藻产生不同烃类的原因。

关键词 丛粒藻, 烃类生产, 烃类的气相色谱-质谱分析

淡水生的丛粒藻由于富含烃类^[1~5], 并存在于国内外的石油有机沉积^[3, 6~8]中而引起注意。该藻可产生两类显然有别的烃类^[1~4], 一类以直链的不分枝的 C 原子数为 27~31 的二烯烃为主, 另一类以多分枝的丛粒藻烯和异丛粒藻烯为主。我们收集到不同来源的三株丛粒藻。为查明它们合成的烃类类型, 进行了产物的萃取和气相色谱-质谱分析。

1 材料和方法

1.1 藻株

Botryococcus braunii A (CCCFA 357, USA) 和 C (CCCFA760, 我国抚仙湖) 购自中国科学院武汉水生生物研究所。B. *braunii* B (807-1) 由联邦德国 Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut, Universität Göttingen 惠赠。

1.2 培养基和培养条件

250ml 三角瓶内装入改良的 Chu3 培养基^[2]100ml, 灭菌后接入同一培养基中静止培养 21~28d 的 B. *braunii* 培养液 30ml, 置制冷光照细菌培养摇床 G25-KLC 型 (New Brunswick Scientific Co., Inc) 上, 180r/min, 25℃ 培养 25d。

1.3 烃类的提取和分析

1.3.1 烃类的提取: 将培养 25d 的培养液过滤收集藻类细胞, 真空冷冻干燥, 加入重蒸氯仿, 抽提 8h, 浓缩后除去氯仿不溶物; 加入正己烷, 放置 12h, 除去正己烷不溶物。采用硅胶-氧化铝层析柱, 用正己烷、苯和丙酮相继洗脱, 将可溶有机物分离为烷烃和烯烃、芳烃、非烃组分。

1.3.2 色谱-质谱分析: 取烷烃和烯烃组分, 用美国 Finnigan MAT4021C 型色谱-质谱

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 3 月 9 日收到。

仪进行分析。色谱柱为涂 DB-5 的熔融硅毛细管柱, $30\text{m} \times 0.25\text{mm}$ (内径)。色谱载气为氮气, 柱温 $130 \sim 330^\circ\text{C}$, 以 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 330°C , 保持恒温。质谱操作条件是 EI 源, 离子化能量 70eV , 发射电流 $250\mu\text{A}$, 离子源温度 250°C 。化合物的定性是根据色谱保留时间与文献的质谱图^[9,10]对照确定。

2 结果

2.1 藻株 A 和 B 合成的烃类

丛粒藻株 A 和 B 的游离烯烃和烷烃的色谱-质谱分析结果见图 1、2 和 3 和表 1、2 和 3。从图 1 和表 1 可以看出, 这两株藻合成的烃类以烯烃为主 (约占 90%), 包括 3 个烯烃系列化合物: C_nH_{2n} ($n=27 \sim 33$), $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$ ($n=27 \sim 33$), $\text{C}_n\text{H}_{2n-4}$ ($n=29, 31$)。其中以 $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$ 烯烃为主, C_{31} 二烯烃为主峰。还含有 $\text{C}_{13} \sim \text{C}_{25}$ 的正构烷烃和 C_{15} 、 C_{16} 、 $\text{C}_{18} \sim \text{C}_{21}$ 的类异戊二烯烷烃。

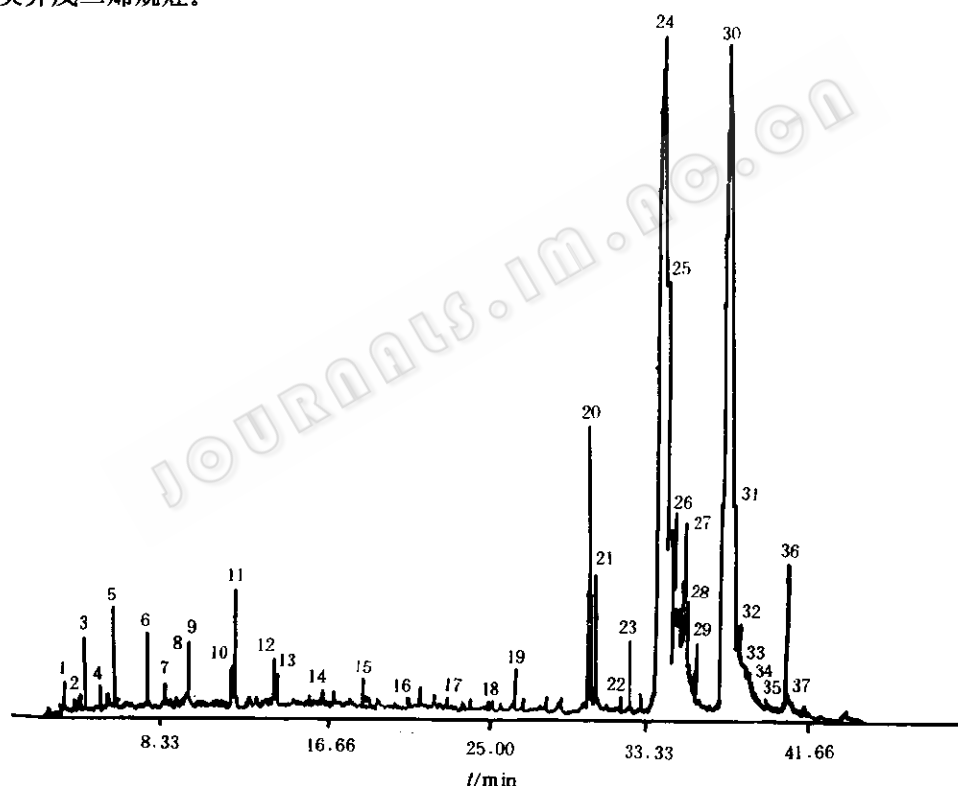


图 1 丛粒藻株 A 和 B 合成的正构烷烃、类异戊二烯烷烃和烯烃

Fig. 1 n-Alkanes, isoprenoid alkanes and alkenes synthesized by *B. braunii* A and B

丛粒藻株 A 和 B 合成的甾烷和萜烷类生物标志物含量很低, 我们采用了多离子扫描技术才得以测出。共检出正常甾烷 12 种 (图 2, 表 2), 三环二萜烷 8 种, 五环三萜烷 12 种 (图 3, 表 3)。五环三萜烷包括藿烷系列和伽马蜡烷。甾烷中明显地以生物型的 5α 、 14α 、 17α 、 20R -胆甾烷 (C_{27} 甾烷) 和 24 -乙基- 5α 、 14α 、 17α 、 20R -胆甾烷 (C_{29} 甾烷) 为主, 其他甾烷含量较低。

表 1 图 1 检出的烷烃和烯烃

Table 1 Alkanes and alkenes identified in Fig.1

峰号	分子式	分子量	化合物
No.	Molecular formula	Molecular weight	Compounds
1	$C_{13}H_{28}$	184	正十三烷
2	$C_{15}H_{32}$	212	2, 6, 10-三甲基十二烷
3	$C_{14}H_{30}$	198	正十四烷
4	$C_{16}H_{34}$	226	2, 6, 10-三甲基十三烷
5	$C_{15}H_{32}$	212	正十五烷
6	$C_{16}H_{34}$	226	正十六烷
7	$C_{18}H_{38}$	254	2, 6, 10-三甲基十五烷
8	$C_{17}H_{34}$	240	正十七烷
9	$C_{19}H_{40}$	268	2, 6, 10, 14-四甲基十五烷
10	$C_{18}H_{38}$	254	正十八烷
11	$C_{20}H_{42}$	282	2, 6, 10, 14-四甲基十六烷
12	$C_{21}H_{44}$	296	2, 6, 10, 14-四甲基十七烷
13	$C_{19}H_{40}$	268	正十九烷
14	$C_{20}H_{42}$	282	正二十烷
15	$C_{21}H_{44}$	296	正二十一烷
16	$C_{22}H_{46}$	310	正二十二烷
17	$C_{23}H_{48}$	324	正二十三烷
18	$C_{24}H_{50}$	338	正二十四烷
19	$C_{25}H_{52}$	352	正二十五烷
20	$C_{27}H_{52}$	376	二十七碳二烯
21	$C_{27}H_{54}$	378	二十七碳烯
22	$C_{28}H_{54}$	390	二十八碳二烯
23	$C_{28}H_{54}$	392	二十八碳烯
24	$C_{29}H_{54}$	404	二十九碳二烯
25	$C_{29}H_{58}$	406	二十九碳烯
26	$C_{29}H_{55}$	402	二十九碳三烯
27	$C_{29}H_{54}$	402	二十九碳三烯
28	$C_{30}H_{58}$	418	三十碳二烯
29	$C_{30}H_{60}$	420	三十碳烯
30	$C_{31}H_{60}$	432	三十一碳二烯
31	$C_{31}H_{62}$	434	三十一碳烯
32	$C_{31}H_{58}$	430	三十一碳三烯
33	$C_{31}H_{58}$	430	三十一碳三烯
34	$C_{32}H_{62}$	446	三十二碳二烯
35	$C_{32}H_{64}$	448	三十二碳烯
36	$C_{33}H_{64}$	460	三十三碳二烯
37	$C_{33}H_{66}$	462	三十三碳烯

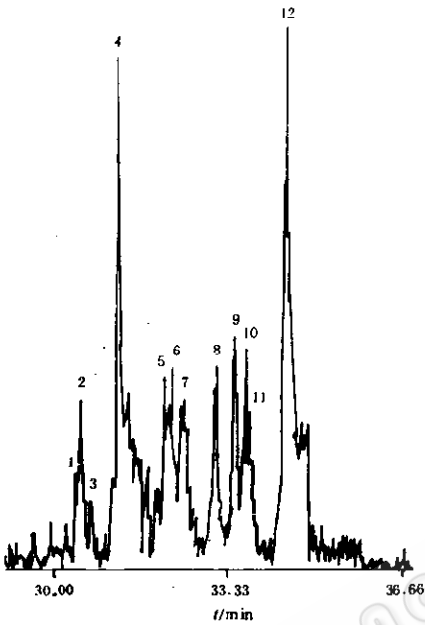


图 2 丛粒藻株 A、B 合成的甾烷

Fig.2 Steranes synthesized by *B. braunii* A and B

表 2 图 2 检出的甾烷

Table 2 Steranes identified in Fig.2

峰号	分子式	分子量	化合物
No.	Molecular formula	Molecular weight	Compounds
1	C ₂₇ H ₄₈	372	5 α , 14 α , 17 α , 20S-胆甾烷
2	C ₂₇ H ₄₈	372	5 α , 14 β , 17 β , 20R-胆甾烷
3	C ₂₇ H ₄₈	372	5 α , 14 β , 17 β , 20S-胆甾烷
4	C ₂₇ H ₄₈	372	5 α , 14 α , 17 α , 20R-胆甾烷
5	C ₂₈ H ₅₀	386	24-甲基-5 α , 14 α , 17 α , 20S-胆甾烷
6	C ₂₈ H ₅₀	386	24-甲基-5 α , 14 β , 17 β , 20R-胆甾烷
7	C ₂₈ H ₅₀	386	24-甲基-5 α , 14 β , 17 β , 20S-胆甾烷
8	C ₂₈ H ₅₀	386	24-甲基-5 α , 14 α , 17 α , 20R-胆甾烷
9	C ₂₉ H ₅₂	400	24-乙基-5 α , 14 β , 17 α , 20R-胆甾烷
10	C ₂₉ H ₅₂	400	24-乙基-5 α , 14 β , 17 β , 20R-胆甾烷
11	C ₂₉ H ₅₂	400	24-乙基-5 α , 14 β , 17 β , 20S-胆甾烷
12	C ₂₉ H ₅₂	400	24-乙基-5 α , 14 α , 17 α , 20R-胆甾烷

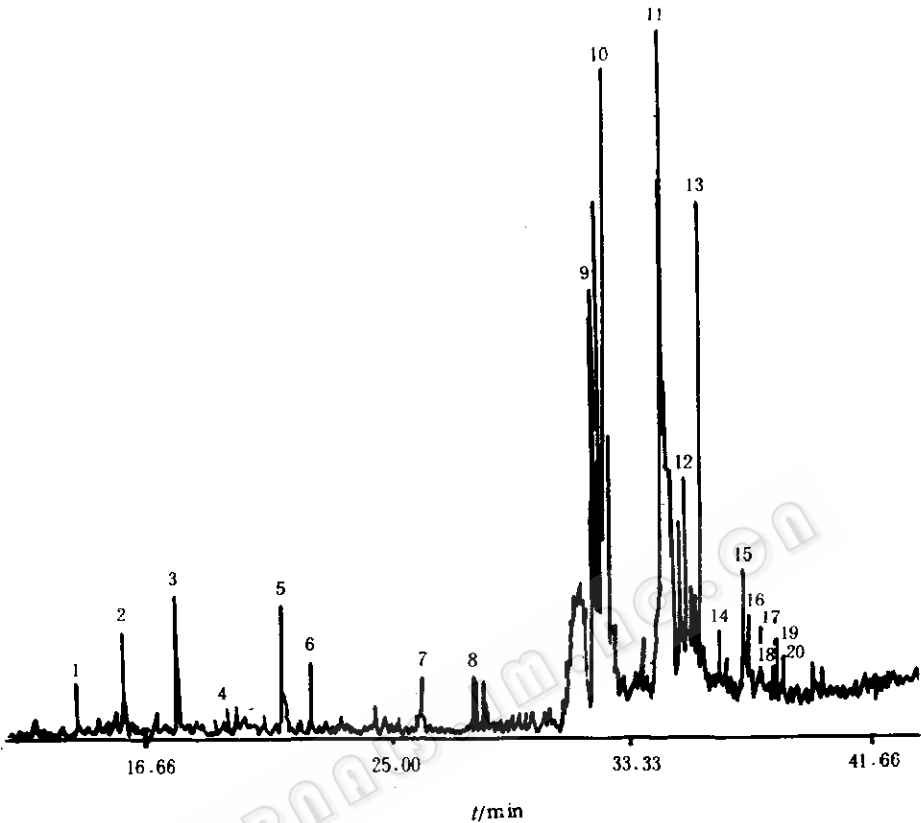


图 3 丛粒藻株 A 和 B 合成的萜烷

Fig.3 Terpanes synthesized by *B. braunii* A and B

表 3 图 3 检出的萜烷

Table 3 Terpanes identified in Fig.3

峰号 No.	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	化合物 Compounds
1	C ₁₀ H ₃₄	262	三环二萜
2	C ₂₀ H ₃₄	276	三环二萜
3	C ₂₁ H ₃₅	290	三环二萜
4	C ₂₂ H ₄₀	304	三环二萜
5	C ₂₃ H ₄₂	318	三环二萜
6	C ₂₄ H ₄₄	332	三环二萜
7	C ₂₅ H ₄₆	346	三环二萜
8	C ₂₆ H ₄₈	360	三环二萜
9	C ₂₇ H ₄₆	370	18α-22, 29, 30-三降萜烷(T ₀)
10	C ₂₇ H ₄₆	370	17α-22, 29, 30-三降萜烷(T _m)

续表 3

峰号	分子式	分子量	化合物
No.	Molecular formula	Molecular weight	Compounds
11	C ₂₉ H ₅₀	398	17 α , 21 β -30-降藿烷
12	C ₂₉ H ₅₀	398	17 β , 21 α -30-降莫烷
13	C ₃₀ H ₅₂	412	17 α , 21 β -藿烷
14	C ₃₀ H ₅₂	412	17 β , 21 α -莫烷
15	C ₃₁ H ₅₄	426	17 α , 21 β -30-升藿烷(22S)
16	C ₃₁ H ₅₄	426	17 α , 21 β -30-升藿烷(22R)
17	C ₃₀ H ₅₂	412	伽玛蜡烷
18	C ₃₁ H ₅₄	426	17 β , 21 α -30-升莫烷(22R)
19	C ₃₂ H ₅₄	440	17 α , 21 β -30, 31-二升藿烷(22S)
20	C ₃₂ H ₅₄	440	17 α , 21 β -30, 31-二升藿烷(22R)

2.2 丛粒藻 C 合成的烃类

从图 4~5(表 4)的结果可以看出, 该藻株合成的烃类与前两株明显不同。无论是正己烷馏分, 还是苯馏分, 均以丛粒甾烯和异丛粒甾烯为主。

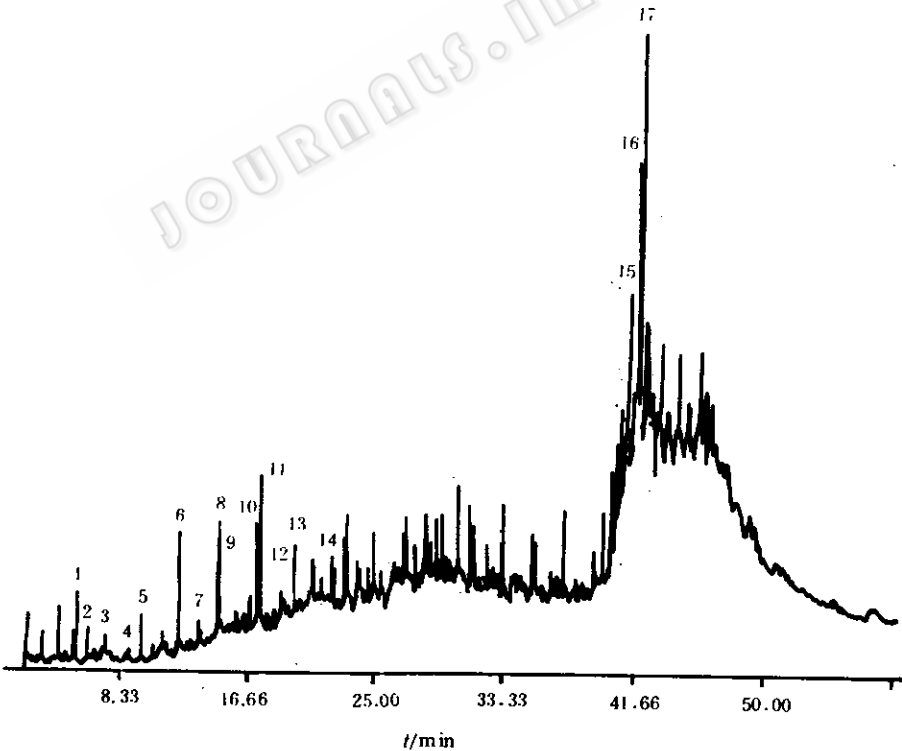


图 4 丛粒藻株 C 正己烷馏分的烃类

Fig.4 Hydrocarbons in n-hexane fraction from culture broth of *B. braunii* C

表 4 图 4 和图 5 检出的烃类

Table 4 Hydrocarbons identified in Table 4 and 5

峰号	分子式	分子量	化合物
No.	Molecular formula	Molecular weight	Compounds
1	C ₁₃ H ₂₈	184	正十三烷
2	C ₁₅ H ₃₂	212	2,6,10-三甲基十二烷
3	C ₁₄ H ₃₀	198	正十四烷
4	C ₁₆ H ₃₄	226	2,6,10-三甲基十三烷
5	C ₁₅ H ₃₂	212	正十五烷
6	C ₁₆ H ₃₄	226	正十六烷
7	C ₁₈ H ₃₈	254	2,6,10-三甲基十五烷
8	C ₁₇ H ₃₆	240	正十七烷
9	C ₁₉ H ₄₀	268	2,6,10,14-四甲基十五烷
10	C ₁₈ H ₃₈	254	正十八烷
11	C ₂₀ H ₄₂	282	2,6,10,14-四甲基十六烷
12	C ₂₁ H ₄₄	296	2,6,10,14-四甲基十七烷
13	C ₁₉ H ₄₀	268	正十九烷
14	C ₂₀ H ₄₂	282	正二十烷
15	C ₃₄ H ₅₈	466	异丛粒藻烯
16	C ₃₄ H ₅₈	466	异丛粒藻烯
17	C ₃₄ H ₅₈	466	异丛粒藻烯
18	C ₃₄ H ₅₈	466	异丛粒藻烯
19	C ₃₄ H ₅₈	466	异丛粒藻烯

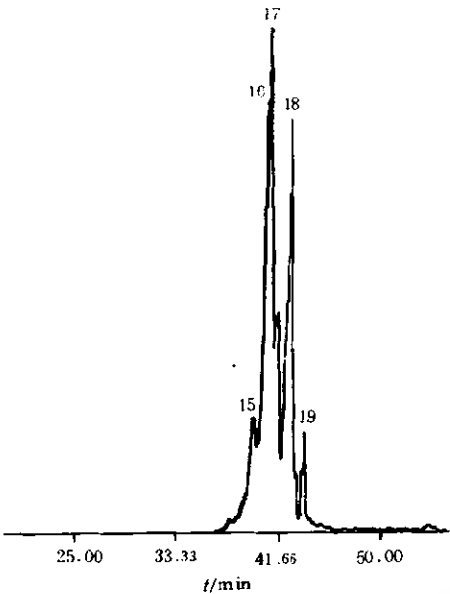


图 5 丛粒藻株 C 苯馏分的烃类

Fig.5 Hydrocarbons in benzol fraction from cultur broth of *B. braunii* C

3 讨论

上述结果表明,不同来源的三株藻产生的烃类明显地分成两种类型。丛粒藻株 A 和 B 产生以 C_nH_{2n-2} 和 C_nH_{2n-4} 为主的烯基直链烃(A 类),丛粒藻株 C 则产生以丛粒藻烯为主的烃类(B 类)。丛粒藻 C 得自我国抚仙湖。本文首次报道了该藻合成的烃类的特征。

丛粒藻株 A 和 B 所产烃类的气相色谱-质谱的定性分析结果一致,只在烃类组分相对含量有区别,因此,只列出其中一株的分析结果。

关于丛粒藻产生这两类不同烃类化合物的原因文献中看法不一。Brown 等^[2]推测,这是该藻生理状态不同所致:A 类可能是绿色正常细胞的典型产物,B 类可能是在 A 类烃消失后出现于休眠的褐色细胞中。然而,取自自然界的绿色样品只含有 B 类烃^[3],在室内的培养物中也未发现产生 A 类烃和 B 类烃的互变现象^[11,12],甚至在后静止期亦未发现丛粒藻烯的痕迹^[12]。因此推测,丛粒藻所产烃类的性质与其生理状态无关,更可能的是与藻株的特性有关,或存在着丛粒藻变种^[12]。我们的结果支持后一种观点。

本文作者之一,曾用氯仿-甲醇提取藻株 A 的培养物进行气相色谱分析,检测出

C_nH_{2n-2} ($n = 25, 27, 29, 31$) 和 C_nH_{2n-4} ($n = 29, 31$) 两个烯基直链烃系列^[5]。这次用不同的样品处理方法和分析鉴定手段, 由同一株藻(前者为纱布固定化细胞培养)得到了不尽一致的结果。检出的 C_nH_{2n} 烯烃系列, C_{28} 、 C_{30} 和 C_{32} 偶数碳烯烃, $C_{13} \sim C_{25}$ 正构烷烃, 类异戊二烯烷烃系列及多种甾、萜烷类生物标志物, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Maxwell J R, Douglas A G, Eglinton G *et al.* *Phytochem*, 1968, 7: 2157.
- [2] Brown A C, Knights B A, Conway E. *Phytochem*, 1969, 8: 543.
- [3] Wake L V, Hillen L W. *Biotechnol Bioeng*, 1980, 22: 1637~1656.
- [4] Largeau C, Casadevall E, Barkaloff C *et al.* *Phytochem*, 1980, 19: 1043~1051.
- [5] Yang L W, Wang X Y. *Revue Roumaine de Chimie*, 1989, 34(1): 397~401.
- [6] 何承全. 古生物学报, 1981, 20(2): 115~125.
- [7] 周光甲, 李树青, 陈致林, 等. 第二届有机地球化学讨论会论文集. 北京: 石油工业出版社, 1984. 177~190.
- [8] 宋一涛. 石油与天然气地质, 1991, 12(1): 22~33.
- [9] 菲尔普 R P (傅家谟, 盛国英译). 化石燃料生物标志物. 北京: 科学出版社, 1987, 78, 208~217, 137~145, 51~54.
- [10] 汪 玘. 有机化合物的命名. 北京: 高等教育出版社, 1982. 8~14.
- [11] Wolf F R, Cox E R. *J Phycol*, 1981, 17: 395.
- [12] Casadevall E, Dif D, Largeau C *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1985, 27: 286~295.

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRIC ANALYSES OF HYDROCARBONS PRODUCED BY DIFFERENT STRAINS OF *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

Wang Xiuyuan Zhao Ling

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Song Yitao

(Geological Research Institute, Shengli Oilfield, Shandong 257015)

Abstract The hydrocarbon components produced by three strains of *Botryococcus braunii* Kutzig were qualitatively identified by gas chromatography-mass spectrometric analyses. Strain A (USA) and B (Germany) produced the same hydrocarbons, chiefly C_nH_{2n-2} and C_nH_{2n-4} linear alkenyl hydrocarbons. The strain C from Fuxian lake, Yunnan province, China, produced mainly botryococcenes and iso-botryococcenes, highly branched and unsaturated hydrocarbons. The reason of production of different hydrocarbon types by different strains of *Botryococcus braunii* Kutzig was discussed.

Key words *Botryococcus braunii* Kutzig, Hydrocarbon production, Gas chromatography-mass spectrometric analyses of Hydrocarbon