

新鲜海蜇不同部位总糖含量的测定

孙鑫¹, 刘希光¹, 李海¹, 薛松¹, 高玉荣¹, 李鹏程², 于华华²

(1. 鲁东大学 化学与材料科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 以新鲜海蜇(*Rhopilema esculentum* Kishinouye)为原料, 将其冷冻干燥处理后, 采用改良的差示苯酚-硫酸法测定了海蜇不同部位的总糖含量, 并用正交实验优化了水解条件。实验结果表明, 海蜇的最佳水解条件为: 1 mol/L 硫酸, 90℃水解 120 min, 测得海蜇生殖腺、海蜇皮、海蜇头的总糖含量分别为 9.42%, 7.28%和 7.58%。

关键词: 海蜇(*Rhopilema esculentum* Kishinouye); 总糖含量; 正交实验; 苯酚-硫酸法

中图分类号: O69 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)08-0034-05

doi: 10.11759/hyxx20130424001

海蜇(*Rhopilema esculentum* Kishinouye)作为一种医食同源的古老海洋生物, 广泛分布于我国的四大海区沿海近岸, 是中国传统渔业生产的主要大型水母^[1]。海蜇含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物等化学物质, 可以鲜食, 也可以加工成腌制品。加工后其伞部称为海蜇皮, 口腕部称为海蜇头, 均具有很好的营养价值和药用价值^[2]。另外, 海蜇中还存在着相当数量的生殖腺, 俗称“海蜇花”, 在加工过程中一般被扔掉, 但在部分沿海地区, 也有将其加工成“蜇米”食用的, 其营养丰富, 味道鲜美^[3]。

中国是最早开发利用海蜇资源的国家, 但由于海蜇具有高含水量、易分解和自溶等特点, 限制了对它的研究。目前国内外的研究主要集中在海蜇的形态学变化^[4]、海蜇体内的无机成分分析^[5]、蛋白质组成、海蜇毒素的药理活性^[6]等方面。关于其碳水化合物含量方面的报道差别较大, 至今未有新鲜海蜇总糖含量的研究报道。本文以新鲜海蜇为研究对象, 经冷冻干燥处理后^[7-9], 采用正交实验优化水解条件, 参考海蜇多糖的组成^[10], 将葡萄糖和半乳糖以 1:1 的质量比混合, 配置成不同浓度的标准溶液, 在相同条件下测定标准溶液的吸光度, 绘制吸光度对浓度的曲线。采用改良的差示苯酚-硫酸法^[11-18]对其 3 个部位的总糖含量进行了测定, 以期对海蜇总糖的深入研究奠定基础, 为海蜇资源的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜海蜇(*R. esculentum*)于 2013 年 8 月下旬捕获

于烟台市芝罘岛附近海域, 捕获后, 加入冰块立即运送到实验室, 进行样品处理。将新鲜海蜇剥分为海蜇头、海蜇皮和海蜇花 3 部分, 自来水冲洗干净表面泥沙, 进行低温冷冻处理, 真空冷冻干燥后, 将样品装于密封袋中低温保存。

葡萄糖, 半乳糖, 浓硫酸, 浓盐酸, 氢氧化钠, 活性炭, 碳酸氢钠, 苯酚, 除浓硫酸为优级纯外其他所有试剂均为国产分析纯。6%苯酚: 取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g, 碳酸氢钠 0.05 g, 沸石, 蒸馏收集 182℃的馏分, 称取次馏分 10 g, 加水 150 g, 置棕色瓶中摇匀备用。

1.2 仪器与设备

LGJ-18S 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技有限公司); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); DZF-6050 型真空干燥箱等; FW100 型高速万能粉碎机; SHB-III 循环水式多用真空泵。

1.3 实验方法

1.3.1 对照品溶液的制备

精密称取 105℃干燥恒重的葡萄糖和半乳糖各 50 mg 左右, 溶解后转入 100 mL 的容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度配成浓度为 1.00 mg/mL 的混合糖溶液。

收稿日期: 2013-04-24; 修回日期: 2013-07-25

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2009BL014); 鲁东大学校科研基金(LY20082902)资助

作者简介: 孙鑫(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 应用有机化学, 电话: 13002750570, E-mail: sunxin920@163.com; 刘希光, 通信作者, 电话: 0535-6694100, Email: xgliu@ldu.edu.cn

1.3.2 标准曲线的制备

准确吸取标准混合糖溶液 40、60、80、100、120 μL 分别置于 10 mL 比色管中, 各加蒸馏水补足体积为 2.00 mL, 再各加入 1.00 mL 6% 的苯酚溶液摇匀, 迅速滴加浓硫酸 5.00 mL, 蒸馏水定容摇匀后于室温显色 20 min, 于 490 nm 波长处测定吸光度并作吸光度对浓度的标准曲线。

1.3.3 样品的预处理

将真空冷冻干燥的海蜇皮、海蜇头和海蜇花 3 部位样品冻干后经粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 未能过筛部分经冻干之后再次粉碎过筛, 直至全部样品过筛为止。

1.3.4 样品的水解

精密称取干燥至恒重的 3 个部位的海蜇粉样品各 0.2 g 左右, 分别置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 1 mol/L H_2SO_4 10 mL, 混匀, 封口, 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中水解 2 h, 然后过滤, 用蒸馏水冲洗残渣, 以酚酞为指示剂, 用 10% NaOH 溶液中和滤液至微红色, 定容至 100 mL 容量瓶中。

1.3.5 样品的测定

精密量取 2 mL 样品水解稀释液于 10 mL 比色管中, 加入 1 mL 苯酚溶液, 5 mL 浓硫酸溶液, 定容, 混匀。在室温下显色 20 min 后在 490 nm 波长处测定吸光度 A_1 。以同样的方法取样品水解稀释液 2 mL, 加入蒸馏水 1 mL, 浓硫酸 5 mL, 定容, 混匀, 在室温下显色 20 min 后在 490 nm 波长处测定吸光度 A_2 , 作为空白对照。用 A_1 减去 A_2 得到 ΔA , 并根据标准曲线计算出样品中的总糖含量。上述测定每个样品重复 3 次, 取 3 次测定的平均值作为最终的结果。

1.3.6 回收率的测定

精密称取各样品 0.2 g 左右, 每一样品 3 个重复, 根据测定结果分别加入大约与各测定样品所含糖的数量相当的混合糖, 然后加入 1 mol/L H_2SO_4 10 mL, 于 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热水解 2 h, 其余同测定总糖含量的步骤。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理方法的选择

分别采用烘箱烘干和冷冻干燥对新鲜海蜇样品进行预处理。烘箱烘干处理的海蜇成深褐色坚硬的块状物, 粉碎时比较困难, 粉末颜色较深, 需活性炭脱色, 脱色过程同时会伴随糖类化合物的吸附, 使测定结果偏低; 冷冻干燥处理的海蜇样品为浅黄色蓬松多孔的物质, 易于粉碎, 粉末颜色较浅, 不需活性

炭脱色, 利用差示法即可消除杂质对测定的干扰, 不会造成大的误差。所以选择了冷冻干燥预处理海蜇样品。

2.2 水解条件的选择

酸水解条件对测定结果影响明显且十分复杂, 酸的强度、浓度不足, 或水解时间不够, 都可因水解不完全而产生负误差, 而水解时间过长也可导致一些单糖的重新聚合, 产生负误差^[12]。以海蜇头样品为实验对象, 分别对酸的种类、浓度、水解时间和水解温度等方面进行了研究。

水解因素的选择及其水平的确定。

由于吸光度(ΔA)/样品质量(m)与总糖含量(%)成线性关系, 所以可以用 $\Delta A/m$ 的值来比较水解情况, 以确定适宜的水解条件。水解结果见表 1~4, 实验结果均取 3 次实验平均值。

表 1 不同的酸对水解的影响

Tab.1 Effect of different kinds of acid on hydrolysis

酸	吸光度 (A_1)	空白对照 (A_2)	质量 (g)	吸光度(ΔA)/ 样品质量(m)
盐酸	0.435	0.012	0.2008	2.106
硫酸	0.498	0.015	0.2010	2.403
三氟乙酸	0.461	0.011	0.2005	2.244

表 2 酸的浓度对水解的影响

Tab.2 Effect of acid concentration on hydrolysis

酸浓度 (mol/L)	吸光度 (A_1)	空白对照 (A_2)	质量 (g)	吸光度(ΔA)/ 样品质量(m)
1	0.512	0.010	0.2010	2.498
2	0.522	0.016	0.2005	2.524
3	0.490	0.012	0.2009	2.380

表 3 温度对水解的影响

Tab.3 Effect of temperature on hydrolysis

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	吸光度 (A_1)	空白对照 (A_2)	质量 (g)	吸光度(ΔA)/ 样品质量(m)
80	0.531	0.010	0.2007	2.596
90	0.547	0.012	0.2009	2.663
100	0.511	0.013	0.2005	2.484

表 4 时间对水解的影响

Tab.4 Effect of time on hydrolysis

时间 (h)	吸光度 (A_1)	空白对照 (A_2)	质量 (g)	吸光度(ΔA)/ 样品质量(m)
1	0.472	0.011	0.2004	2.300
2	0.496	0.013	0.2010	2.403
3	0.414	0.009	0.2006	2.019

该实验是在 100℃的水浴下用 2 mol/L 的 3 种酸水解 2 h 得出的结果,从结果中可以看出硫酸的水解效果最好,所以选择硫酸作为水解多糖的酸。

该实验是在 100℃的水浴下用 3 种不同浓度的硫酸水解 2 h 得到的数据,从中可以看出酸的浓度过高或过低都会对水解产生不利影响。酸的浓度过低会导致水解不足,酸的浓度过高而发生副反应导致单糖损失。

该实验是用 2 mol/L 的硫酸在 3 种不同水浴温度下水解 2 h 的结果,从中可以看出水解温度又是一个影响水解的重要因素,当水解温度过低时多糖的水解不够充分,水解温度太高时水解的单糖结构可能被破坏。

该实验是在 100℃的水浴下用 2 mol/L 的硫酸水解不同时间得出的实验结果,从中可以看出短时间的水解是有利的,长时间的水解可能会导致单糖的重新聚合或分解,所以水解时间不宜过长。

2.3 正交实验的安排

2.3.1 正交实验的水平安排

根据对单因素水平的探索,确定的水平因素如表 5 所示。

表 5 正交因素水平表

Tab.5 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	(A)时间 (h)	(B)酸浓度 (mol/L)	(C)温度 (°C)
1	1	1	80
2	2	2	90
3	3	3	100

2.3.2 正交实验的结果

由正交实验所得的各组实验结果如表 6。

从正交实验的结果来看,影响海蜇总糖提取的因素从大到小依次是水解温度,水解所用酸的浓度和水解时间。优选实验条件为: 1 mol/L 硫酸在 90℃下水解 2 h。

2.4 实验结果及实验方法的验证

2.4.1 混合糖的标准曲线图

葡萄糖和半乳糖混合糖标准曲线方程为 $y=8.4875x+0.3525$, $R^2=0.9999$, 浓度单位为 g/L, 标准曲线如图 1。

该标准曲线是由葡萄糖和半乳糖按 1:1 的质量

表 6 正交实验结果

Tab.6 Results of orthogonal test

序号	时间(A)	浓度(B)	温度(C)	吸光度(ΔA)
1	1	1	1	0.396
2	1	2	2	0.451
3	1	3	3	0.432
4	2	1	2	0.608
5	2	2	3	0.510
6	2	3	1	0.549
7	3	1	3	0.382
8	3	2	1	0.408
9	3	3	2	0.361
K1	1.297	1.382	1.353	
K2	1.667	1.369	1.420	
K3	1.151	1.342	1.324	
k1	0.426	0.461	0.451	
k2	0.556	0.456	0.473	
k3	0.384	0.447	0.441	
R	0.172	0.014	0.032	
优选水平	A2	B1	C2	A>C>B

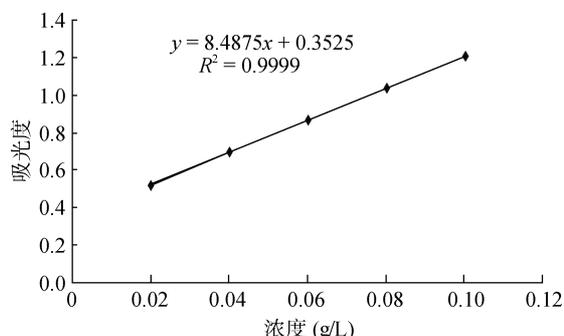


图 1 混合糖标准曲线图

Fig.1 Specification curve of sugar mixture

比例混合后按照 1.3.3 的实验方法测定的,从线性相关度上来看该曲线可以用来做总糖测定的标准曲线。

2.4.2 海蜇各个部分的总糖含量

经过正交实验优化实验条件后,我们在最佳的水解条件下水解海蜇样品,并测定吸光度 ΔA ,由标准曲线计算出总糖浓度,再计算出总糖的含量,实验结果如表 7 所示。

从表 7 中可以得出海蜇皮、海蜇头和海蜇花的总糖含量分别为 7.28%、7.58%和 9.42%,从测定结果的精密度来看,分析结果基本上是满意的。

2.4.3 加标回收率的测定

样品的加标回收率如表 8 所示。

表 7 样品的总糖含量

Tab.7 The content of total sugar in jellyfish samples

样品	实验号	质量(g)	吸光度	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
海蜇皮	1	0.2013	0.601	7.28	7.28	0.619
	2	0.2004	0.602	7.33		
	3	0.2009	0.599	7.24		
海蜇头	1	0.2001	0.601	7.33	7.58	3.84
	2	0.2008	0.609	7.51		
	3	0.2010	0.622	7.90		
海蜇花	1	0.2003	0.671	9.37	9.42	1.63
	2	0.2008	0.679	9.59		
	3	0.2012	0.670	9.30		

表 8 加标回收率及各部分含糖量

Tab.8 The recovery of standard addition and sugar contents in jellyfish samples

样品	样品质量(mg)	样品含糖量(mg)	混合糖加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)
海蜇皮	216.5	15.7	16.2	31.2	95.7
海蜇头	209.3	15.9	15.4	30.8	96.7
海蜇花	211.2	20.1	19.7	39.5	98.5

从实验结果来看,海蜇 3 个部位的样品加标回收率在 95.7%~98.5%,从数值上来看能够达到分析实验的要求,在实际工作中具有可行性,适合于海蜇总糖含量的测定。

3 结论

通过苯酚-硫酸法测定出海蜇不同部位的含糖总量,其中海蜇花的总糖含量最高为 9.42%,海蜇头的总糖含量为 7.58%,海蜇皮的含糖含量最低为 7.28%。

本文从两个方面改进了苯酚-硫酸法,一方面是用葡萄糖和半乳糖的混合糖做标准曲线,来模拟海蜇总糖的组成,并用其配制的溶液绘制标准曲线;另一方面是用吸光度差示法除去海蜇总糖水解后产生的杂质对吸光度的影响。通过单因素实验和正交实验相结合的方法得出了海蜇总糖的最佳水解条件,提高了海蜇总糖测定的准确性。最后在加标回收率的结果上来看我们测定的结果是比较准确的。在实验中也有不足之处,为了正交试验的简单化,没有把酸作为正交实验设计的一个因素,但从实验结果来看测定方法还是可行的。

该研究对于含水量较高的海洋生物的总糖含量的测定具有一定的指导和参考价值,而且有助于海蜇的药用价值的进一步研究,指导人们的饮食和消费^[19]。

参考文献:

- [1] 洪惠馨. 水母和海蜇[J]. 生物学通报, 2002, 37(2): 13-16.
- [2] 丁进锋, 苏秀榕. 海蜇胶原蛋白提取工艺及促愈合作用研究[J]. 食品科学, 2012, 31(24): 19-23.
- [3] 刘保家, 李素梅, 柳东, 等. 食品加工技术工艺和配方大全(中)[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1998, 333.
- [4] 丁耕芜, 陈介康. 海蜇的生活史[J]. 水产学报, 1981, 5(2): 93-114.
- [5] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物成分表[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992, 104.
- [6] 李联泰, 高健, 安贤惠, 等. 海蜇毒素的分离纯化及其性质的初步研究[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 108-114.
- [7] 刘希光, 于华华, 赵增芹, 等. 海蜇不同部位脂肪酸的组成研究[J]. 分析化学研究简报, 2004, 32(12): 1635-1638.
- [8] 周艳明, 刘丹, 胡睿. 冷冻干燥法制备植物酯酶[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 140-142.
- [9] 马齐, 王丽娥. 鹿茸低温冷冻干燥加工技术[J]. 经济动物学报, 2007, 11(1): 21-26.
- [10] 刘希光. 海蜇的化学组成及其生物活性研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2004.

- [11] 李丹. 苯酚-硫酸法测定食品总糖方法的应用和改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4): 506.
- [12] 陈玲玲, 乌艳红, 乌仁图雅, 等. 苯酚-硫酸法的改进及其在牧草中的应用[J]. 饲料工业, 2011, 32(23): 30-32.
- [13] Dubios M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28: 350-356.
- [14] 徐光域, 颜军, 郭晓强, 等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 342-345.
- [15] 鲁吉珂, 古国峰, 汪瑞, 等. 蝉花多糖提取工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 196-199.
- [16] 侯五爱, 岳志劲. 苯酚-硫酸法测定北芪菇多糖的含量[J]. 光谱实验室, 2013, 30(5): 2475-2477.
- [17] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format[J]. Analytical biochemistry, 2005, 339(1): 69-72.
- [18] 郁玮, 杨小明, 刘伟民, 等. 酚-硫酸法测定无花果多糖含量的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 256-262.
- [19] 马永全, 于新, 黄小红. 海蜇的药用与食用价值研究进展[J]. 广东农业科学, 2009, 9: 153-156.

Determination of total sugar concentration in different parts of fresh jellyfish

SUN Xin¹, LIU Xi-guang¹, LI Hai¹, XUE Song¹, GAO Yu-rong¹, LI Peng-cheng², YU Hua-hua²

(1. College of Chemistry and Materials Science, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences Qingdao 266071, China)

Received: Apr., 24, 2013

Key words: Jellyfish; total sugar content; orthogonal experiment; phenol-sulfuric acid method

Abstract: In this paper, different parts of fresh jellyfish (*Rhopilema esculentum*) were lyophilized, and the total sugar contents were determined by improved differential phenol-sulfuric acid method. The hydrolysis conditions of the treated jellyfish samples were optimized by orthogonal test. The optimal hydrolysis conditions of lyophilized jellyfish were 1 mol/L H₂SO₄ at 90°C for two hours. The result showed that the total sugar content was 9.42% in the gonad tissue, 7.28% in the umbrella tissue and 7.58% in the oral arms tissue of dried jellyfish, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)