

褐藻酸中糖醛酸组分的测定*

纪明侯 曹文达 韩丽君
(中国科学院海洋研究所)

褐藻胶于1883年首次由英国化学家 Stanford^[16] 从掌状海带(*Laminaria digitata*)加碱提取得到的。1929年, Nelson等^[9] 证实褐藻胶的组成单位为D-甘露糖醛酸。从此,人们一直认为D-甘露糖醛酸是褐藻胶的唯一组分。1955年, Fischer等^[4] 用纸层析法首次确定褐藻胶中除D-甘露糖醛酸外,尚含有L-古罗糖醛酸和少量葡萄糖醛酸。其后 Whistler等^[17]以及 Hirst等^[7]相继证实了褐藻胶中确实有L-古罗糖醛酸存在。

褐藻胶的物理和化学性质,例如粘度、凝胶的形成、对离子的选择性等与样品中的甘露糖醛酸(M)和古罗糖醛酸(G)的比值M/G有关^[4]。

Harrison等^[5]以及 Patrick等^[13]曾以不同M/G比值的褐藻酸钠喂给服以⁹⁰Sr的动物作饲养试验,发现G含量高的褐藻酸钠能有效地抑制⁹⁰Sr在动物消化道内的吸收。

我国褐藻胶工业自五十年代建立以来,产品已广泛地应用于食品、纺织、医药工业等各方面。但关于褐藻胶的组分与性质的关系,则尚未开始研究。为了开展这方面工作,必须首先在我国建立褐藻胶中M和G组分的测定方法。

为此,需先制备标准糖醛酸。不少作者提出了从褐藻胶提取甘露糖醛酸内酯的方法^[4,10,17],也有用人工合成法制备其内酯的^[2,11,15]。有关制备古罗糖醛酸及其内酯的文献极少,只有 Fischer等^[4]介绍了其制备方法,但该法要求严格,手续烦琐,不易得到纯的内酯结晶^[6]。

本文未采用 Fischer等^[4]用纤维素层析柱分离两糖醛酸作标准的方法,而参考了 Haug^[6]制备标准的部分方法,研究了将树脂分离后的糖醛酸洗脱液经浓缩处理后直接制备标准糖醛酸溶液的新方法,得到了满意的结果。还参照 Dubois等^[3]测定糖类的硫酸-苯酚比色法,对测定糖醛酸的比色条件作了必要的改进。经过实验确定了测定褐藻胶中M和G的含量及M/G比值的方法。

还研究了M和G在酸水解过程中的破坏比率,以此对所测定结果作了必要校正。

一、实验方法

1. 样品水解^[4]

称取50毫克褐藻酸钠样品,置玻璃试管中,在冰水冷却下,加入0.5毫升80% H₂SO₄溶液,室温(不低于20℃)水解18小时。再在冰水冷却下加入6.5毫升蒸馏水,使H₂SO₄浓度为2N,仔细封闭试管,于沸水中加热水解5小时。冷却后将水解液转移至小烧杯

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第611号。
本刊编辑部收到稿件日期:1980年1月25日。

中,加稍过量的 CaCO_3 中和,抽滤,用水洗涤至滤液体积为原水解液的二倍,用以分离糖醛酸。

2. 糖醛酸的分离

将 Dowex 1 × 2 阴离子树脂(200—400 目)用蒸馏水浸泡除去水溶性色素,装入 28 × 2 厘米的玻璃层析柱中,以 10% NaOH 溶液处理树脂使转变成 OH^- 型。再用 2*N* 乙酸淋洗树脂使转变成乙酸型,最后用 0.5*N* 乙酸充分淋洗。

水解液在上柱前,滴加 0.1*N* NaOH 溶液调节 pH 值至 8 左右,静置半小时,使水解液中的内酯全部转变成糖醛酸盐。水解液进柱后,用 1 升 0.5*N* 至 2*N* 的乙酸以 0.3 毫升/分的流速进行线性梯度洗脱,洗脱液用部分收集器(上海医疗器械十厂产, BJQ-74-2 型)计时收集,每管收集约 10 毫升。待洗脱液流尽后,树脂用 0.5*N* 乙酸充分淋洗,可重复使用。每柱可反复使用 10 至 20 次。

3. 洗脱液的定性鉴定

用微量移液管从各接受管量取 0.03 毫升洗脱液,按顺序滴加滤纸上,烘干后,喷以显色剂^[42],置 105℃ 烘箱中烘 5 分钟,凡含有糖醛酸的洗脱液,呈现黄棕色斑点。除最初的斑点为中性糖外,滤纸上将出现二大组斑点,前一组为古罗糖醛酸,后一组为甘露糖醛酸^[6]。根据显色斑点的位置,将两糖醛酸的洗脱液分别归并在一起,测量体积,进行比色定量分析。

4. 比色测定和结果计算

准确量取含糖醛酸的试液 2 毫升,注入直径 2 厘米的具塞试管中,加入 0.04 毫升 80% 苯酚溶液,摇匀,置 50℃ 水浴中保温,快速加入浓硫酸 5 毫升(直接注入,不沿壁流下),盖塞,静置 10 分钟,充分摇荡,放置 20 分钟后在 72 型分光光度计上(于 485 毫微米波长,1 厘米比色皿,并以 1*N* 乙酸加上述试剂作空白溶液)进行比色,对照工作曲线求出每 1 毫升试液中的糖醛酸含量,并按下式算出 M/G 比值:

$$M/G = \frac{Mv \times Mc}{Gv \times Gc} \times 0.68$$

此处, Mv , Gv : 分别为甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的洗脱液体积(毫升);

Mc , Gc : 分别为每 1 毫升洗脱液所含甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的量(毫克);

0.68: 水解时两糖醛酸的破坏比率校正系数(见后)。

5. 糖醛酸标准溶液的制备和工作曲线

取 4 克褐藻酸钠,在冰水冷却下与 80% 硫酸溶液 40 毫升混合,20℃ 水解 18 小时。水解物再在冰水冷却下加蒸馏水 520 毫升,使硫酸浓度为 2*N*,继续于沸水浴中回流水解 5 小时。冷后加稍过量的碳酸钙中和,抽滤,洗涤。滤液减压浓缩至约 100 毫升,加 2 克活性炭脱色,过滤后的水解液加入少量 0.5*N* 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8,备上柱。

将 Dowex 1 × 2 阴离子树脂装入 50 × 4 厘米的玻璃层析柱中,如前述方法处理至乙酸型。然后将碱化了的水解液上柱,以 10 升 0.5*N*—2*N* 的乙酸进行梯度洗脱。部分收集器每小时自动转动一次,每次收集 120 毫升洗脱液,用上述纸层析法定性鉴定,将含 M 和 G 各管的洗脱液分别合并为两部分,分别减压蒸馏,浓缩至小体积,加 30 毫升水稀释后,通过阳离子交换柱除去阳离子,减压浓缩至糖浆,加 30 毫升乙醇溶解,再减压浓缩至糖浆,如此反复 2—3 次,蒸馏液酸度降至 0.001*N* 以下,乙酸基本除尽。加 30 毫升蒸馏

水,滴加少量阴离子树脂(OH^- 型),以除去溶液的颜色和残存的阴离子(AgNO_3 检查无 Cl^- 反应)。滤去树脂后,溶液呈酸性。加 $0.5N$ NaOH 溶液碱化至 pH 8左右,静置半小

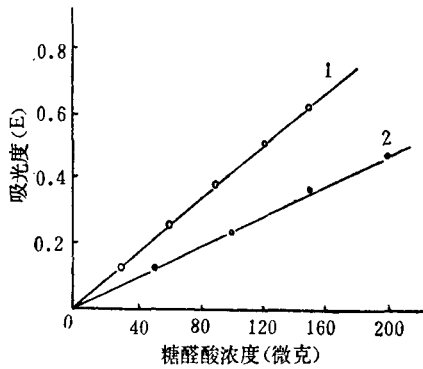


图1 古罗糖醛酸(G)和甘露糖醛酸(M)的工作曲线
1. G; 2. M。

时,使内酯都转化成糖醛酸钠盐。然后通过强酸性阳离子交换柱使所有的糖醛酸盐又转化成糖醛酸。取一定体积溶液,以酚酞作指示剂,用 $0.1N$ NaOH 溶液滴定至终点,从而确定溶液中糖醛酸的含量。

准确量取含有10毫克糖醛酸的溶液,移入100毫升容量瓶中,加入50毫升 $2N$ 乙酸,以蒸馏水稀释至刻度,则每毫升 $1N$ 乙酸溶液含100微克糖醛酸。

两种糖醛酸在相同条件下同硫酸-苯酚的显色强度差异很大,故必需分别制定工作曲线。即分别量取M和G的标准溶液0.4, 0.8, 1.2, 1.6和2.0

二、实验结果与讨论

(一) 糖醛酸标准溶液的纯度

洗脱液中含有大量乙酸,不能用 NaOH 直接滴定糖醛酸的浓度,须减压浓缩除去乙酸。在蒸发浓缩过程中,部分糖醛酸会转变成内酯,因此必须加入过量的 NaOH 使糖醛酸及其内酯都转变成糖醛酸盐,然后通过阳离子交换树脂转成单一的糖醛酸溶液。

含糖醛酸的洗脱液在减压浓缩过程中除生成部分内酯外,糖醛酸不免受到某些程度的破坏,以致溶液色泽加深,这会给比色造成误差。但色泽很易被阴离子树脂吸附^[6],因此在加 NaOH 打开内酯环之前,加入阴离子树脂(OH^- 型)即可使溶液无色。

洗脱液除糖醛酸外,不应含有阴离子,否则在 NaOH 转化内酯时,阴离子将生成相应的盐,通过阳离子树脂后将对糖醛酸浓度的滴定值造成误差。由于Dowex 1×2阴离子树脂对大部分阴离子的选择性大于糖醛酸,因此在加入阴离子树脂除去色泽时稍增加树脂用量,即可将阴离子一并除去(AgNO_3 检查无 Cl^- 反应),此时由于树脂的吸附将损失部分糖醛酸。

经过上述步骤纯化后的糖醛酸标准溶液,用纸层析法^[4]鉴定在滤纸上只出现单一斑

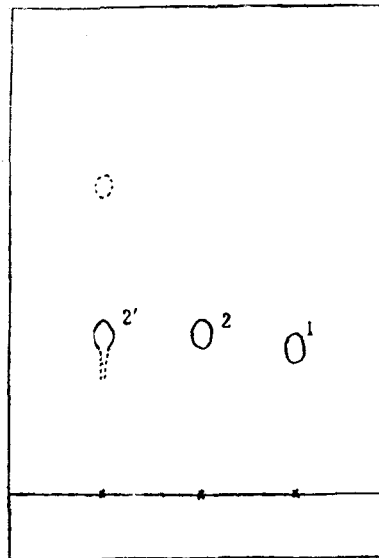


图2 糖醛酸的纸层析图谱
1. G; 2. M; 2' 不纯的M。

点, 古罗糖醛酸的 R_f 值为 0.38, 甘露糖醛酸为 0.42。如果出现一个以上的斑点或有拖尾现象, 表明该糖醛酸溶液还不纯, 不能用作标准, 需继续纯化 (图 2)。

实验证明, 不论从洗脱液直接制备的糖醛酸标准溶液, 还是由甘露糖醛酸内酯结晶配制的标准溶液, 都得到一致的比色结果 (表 1), 表明两者的纯度是相同的。

表 1 不同标准糖醛酸溶液的吸光度 (E) 比较

甘露糖醛酸	糖醛酸含量	40 微克	80 微克	120 微克	160 微克	200 微克
M_1		0.094	0.202	0.285	0.373	0.468
M_2		0.099	0.195	0.292	0.378	0.472

M_1 ——由洗脱液经浓缩、纯化的甘露糖醛酸标准溶液;

M_2 ——由甘露糖醛酸内酯结晶¹⁾配制的甘露糖醛酸标准溶液。

(二) 水解液中糖醛酸的柱层析分离效果

将马尾藻褐藻酸钠经硫酸水解后, 按上述实验方法进行柱层析分离, 乙酸洗脱液的流出体积自 507 至 643 毫升之间的 136 毫升溶液含古罗糖醛酸, 乙酸浓度由 1.08N 至 1.31N; 洗脱液的流出体积自 651 至 810 毫升之间的 159 毫升溶液含甘露糖醛酸, 乙酸浓度由 1.31N 至 1.54N。由图 3 的图形看, 两糖醛酸的分离效果很明显, 与 Larsen 等^[8]所得图形基本相同。用英国 AIL 公司的褐藻酸钠 (Manucol SS/LM) 水解、层析, 糖醛酸在乙酸洗脱液中的分布图形, 基本与图 3 相吻合。

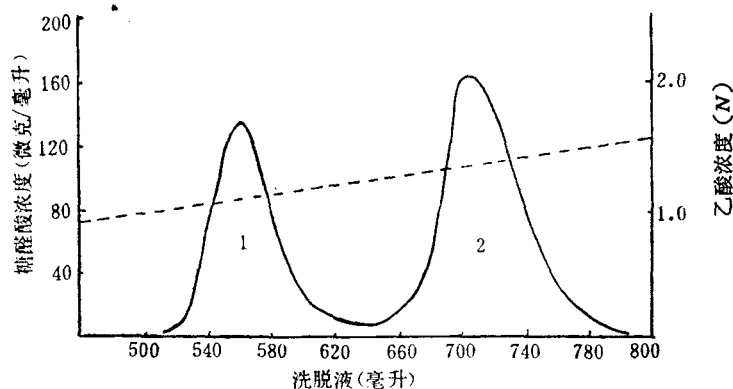


图 3 乙酸洗脱液中 G 和 M 的浓度分布

1. G; 2. M。

(三) 糖醛酸在强酸水解下的破坏比率

各种糖醛酸在强酸中水解, 其破坏比率是不同的^[6], 因此确定其破坏比率对各糖醛酸

1) 由纪祥礼同志制备。

含量与比值的计算是很必要的。

将含有 G 和 M 各 30 毫克的纯标准溶液减压浓缩至糖浆状,按上述方法进行水解。当用 80% 硫酸室温水解 18 小时后,水解物色泽变深,用蒸馏水稀释硫酸至 2N 浓度时,呈浅黄色。继续在沸水中水解 5 小时后,水解液中出现少量棕色凝聚物,溶液变深色,显然糖醛酸受到一定程度的破坏。为了测定 G 和 M 两糖醛酸的破坏比率,将两糖醛酸水解液分别进行柱层析分离和比色分析,得到两糖醛酸的回收率如表 2 所示。

表 2 糖醛酸水解分离后的回收率

次数	糖醛酸	标准样品重量 (毫克)	水解分离后重量 (毫克)	回收率 (%)	M/G 回收比值	平均 M/G 回收比值
第一次	M	30.14	19.89	66.0	1.45	1.46
	G	30.36	13.80	45.5		
第二次	M	30.14	21.24	70.5	1.47	
	G	30.36	14.50	47.8		

由表 2 结果看, G 的破坏比率大于 M, 平均 M/G 回收比值为 1.46。因此, 比色测定的 M/G 值必须乘以校正系数 $\frac{1}{1.46}$ (即 0.68) 进行校正。此值与 Haug 等^[6] 的系数 0.66 基本相同。

(四) 比色条件

Dubois 等^[3] 曾用苯酚与硫酸比色测定了各种常见的糖类, 例举了苯酚用量和吸收光谱。但没有见到有关古罗糖醛酸和甘露糖醛酸的具体比色资料。因此, 本文对测定这两种糖醛酸所需的苯酚用量、吸收光谱、硫酸加入速度和颜色稳定性等进行了实验。

1. 苯酚用量

于 2 毫升含 100 微克糖醛酸的溶液中, 分别加入不同量的苯酚, 按上述比色法测其吸

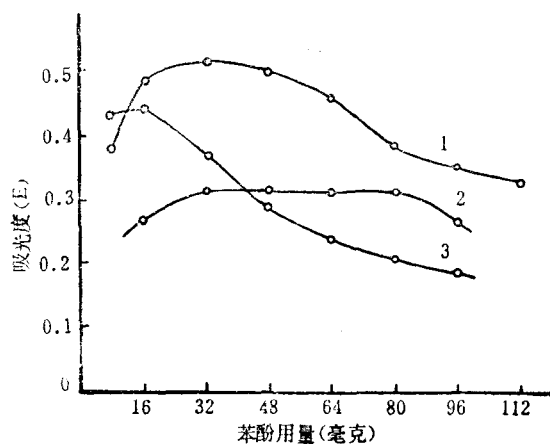


图 4 苯酚不同用量对吸光度的影响

1. G (100 微克); 2. M (100 微克); 3. 半乳糖醛酸 (50 微克)(作比较)。

光度。如图 4 所示, 对古罗糖醛酸的苯酚用量在 16 至 48 毫克之间发色量较高, 以 32 毫克的 E 为最大。对甘露糖醛酸的苯酚用量, 从 32 至 80 毫克的范围内可得到基本相同的吸光度。为统一操作, 两糖醛酸都采用 32 毫克苯酚为最适用量。

2. 吸收光谱

如图 5 所示, 甘露糖醛酸的苯酚硫酸显色液的最大吸收峰在 484 毫微米处; 古罗糖醛酸在 486 毫微米处。两个峰基本吻合, 为了统一操作, 选用 485 毫微米为最适比色波长。

3. 硫酸加入速度

硫酸的加入速度对糖醛酸的显色反应影响甚大。硫酸直接对着试液表面快速加入, 混合较好, 发热量高, 有利于显色反应; 如果硫酸沿管壁缓慢加入, 混合不匀, 发热量低, 则显色不完全。糖醛酸同苯酚无显色反应, 只有当加入浓硫酸发生高温使糖醛酸逐渐断裂, 生成糠醛及其衍生物^[1]时, 苯酚才与之起缩合反应, 生成有色缩合物。因此, 温度对显色反应的影响很大(表 3)。

表 3 硫酸加入速度对显色的影响

硫酸加入速度	糖醛酸含量	吸光度
对着液面快速(5毫升/5秒)加入	50 微克	0.176, 0.169
对着液面慢速(5毫升/50秒)加入	50 微克	0.145, 0.144
沿管壁慢速(5毫升/60秒)加入	50 微克	0.094, 0.050

4. 显色液的稳定性

显色液的颜色比较稳定, 放日光下暴露数小时变化很小, 暴露 10 小时以上, 吸光度才略有下降(图 6)。

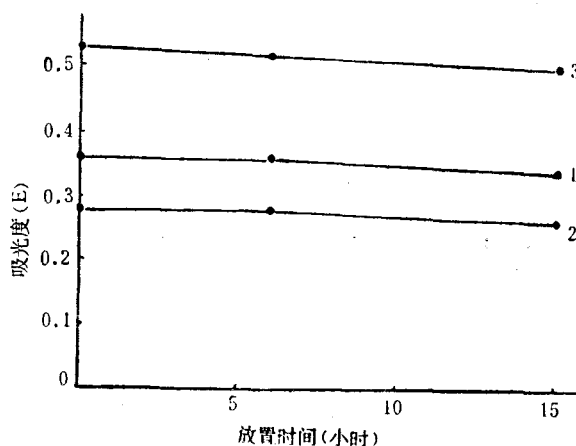


图 6 显色液放置不同时间对吸光度的影响

1. G; 2. M; 3. 半乳糖醛酸(作比较)。

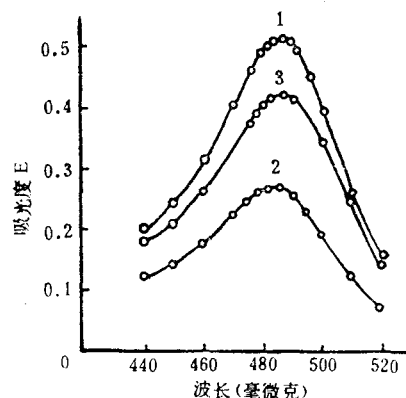


图 5 糖醛酸显色液的吸收曲线

1. G; 2. M; 3. 半乳糖醛酸(作比较)。

(五) 几种褐藻酸钠的 M/G 比值

用上述分析方法测定了几种褐藻的褐藻酸钠的 M/G 比值, 并乘以校正值 0.68 (表 4)。

表 4 几种褐藻的褐藻酸钠 M/G 比值*

褐 藻 酸 钠 的 来 源	● M/G
半叶马尾藻 (<i>Sargassum hemiphyllum</i>)	1.06
裂叶马尾藻 (<i>Sargassum siliquastrum</i>)	1.13
海 带 (<i>Laminaria japonica</i>)	2.01

* 郭玉彩同志协助分析。

三、结 语

1. 用 Fischer 等水解方法对褐藻酸钠进行水解, 经过阴离子树脂吸附, 以乙酸梯度洗脱。乙酸洗脱液经蒸发浓缩、纯化、碱化、通过阳离子树脂, 以碱滴定法确定古罗糖醛酸和甘露糖醛酸的浓度, 得到了两个标准的糖醛酸溶液, 以此分别制作了工作曲线。并着重讨论了制备过程中的各种条件。

2. 对比色条件, 如苯酚用量、吸收波长、加酸速度、显色液的稳定性等作了系统试验, 确定了最适操作条件。

3. 测定了样品经强酸水解后糖醛酸的破坏比率, $G > M$, 平均 M/G 回收比值为 1.46, 即测得的 M/G 必须乘以系数 0.68 予以校正。

4. 用确定的分离、比色方法测定了几种褐藻所含褐藻胶的 M/G 比值。

参 考 文 献

- [1] 高桥武雄, 1951. 海藻工业。(纪明侯译, 轻工业出版社, 1961年)
- [2] Ault R. G., W. N. Haworth and E. L. Hirst, 1935. Preparation of d-mannuronic acid and its derivatives. *J. Chem. Soc.* 517—518.
- [3] Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P.A. Ribers and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350—356
- [4] Fischer, F. G. und H. Z. Dörfel, 1955. Die Polyuronsäuren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen I). *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* 302: 186—203.
- [5] Harrison, G. E., E. R. Humphreys, A. Sutton and H. Shepherd, 1966. Strontium uptake in rats on alginic acid-supplemented diet. *Science* 152: 655—656.
- [6] Haug, A. and B. Larsen, 1962. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chem. Scand.* 16: 1908—1918.
- [7] Hirst, E. L. 1958. Polysaccharides of the marine algae. *Proc. Chem. Soc.* 1958: 177—187.
- [8] Larsen, B and A. Haug, 1961. Separation of uronic acids on anion exchange columns. *Acta Chem. Scand.* 15: 1397—1398.
- [9] Nelson, W. L. and L. H. Cretcher, 1929. The alginic acid from *Macrocystis Pyrifera*. *J. Amer. Chem. Soc.* 51: 1914—1922.
- [10] Nelson, W. L. and L. H. Cretcher, 1930. Isolation and identification of d-mannuronic acid lactone from *Macrocystis pyrifera*. *J. Amer. Soc.* 52: 2130—2132.
- [11] Niemann, C., R. J. McCubbin and K. P. Link, 1934. Synthesis of the hexuronic acids V. The synthesis of l-mannuronic acid from l-mannosaccharic acid. *J. Biol. Chem.* 104: 737—741.

-
- [12] Partridge, S. M., 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugar. *Nature* 164: 443.
- [13] Patrick, G. T., E. F. Carr and E. R. Humphreys, 1967. Inhibition by alginates of strontium absorption *in vivo* and *in vitro*. *Inst. J. Radiat. Biol.* 12: 427—434.
- [14] Smidsrød, O. and A. Haug. 1968. Dependence upon uronic acid composition of some ion-exchange properties of alginates. *Acta Chem. Scand.* 22: 1989—1997.
- [15] Stacey, M. and P. I. Wilson, 1944. Synthesis of uronic acids. Part III. d-Mannuronic acid. *J. Chem. Soc.* 1944: 587—588.
- [16] Stanford, C. C. 1883. On algin: a new substance obtained from some of commoner species of marine algae. *Chem. News* 47: 254—257.
- [17] Whistler, R. L. and K. W. Z. Kirby, 1959. Notiz über die Zusammensetzung der Alginsäure von *Macrocystis Pyrifera*. *Hoppe-seyler's Physiol. Chem.* 314: 46—48.

DETERMINATION OF URONIC ACID COMPONENTS IN ALGINIC ACID*

Ji Minghou Cao Wenda and Han Lijun

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

The present paper deals with the methods of preparation and determination of mannuronic acid and guluronic acid in alginic acid with reference to Fischer's hydrolysis condition and Haug's fractionation method, and with some improvements.

The standard curves of two uronic acids were prepared as follows. 4 g. of sodium alginate were hydrolyzed with 80% H_2SO_4 for 18 hrs and then with $Nn H_2SO_4$ at $100^\circ C$ for 5 hrs. The hydrosyzate was allowed to pass through a column of Dowex 1×2 anion exchange resin in acetate form and was fractionated by a gradient elution with acetic acid (0.5—2 N) (Fig. 3), containing 120 ml of eluate in each fraction. The eluates showing two uronic acids after identification by paper chromatography were combined in two portions. Each portion was evaporated under diminished pressure, submitted to a column of cation exchanger, and evaporated again to eliminate the trace of acetic acid. A small amount of anion exchanger were added to the syrup solution to remove the color and the residual anions. The solution after adding an excessive amount of NaOH solution to transform uronic acids into Na salts was passed through a column of cation exchange resin. A definite volume of effluent was titrated with NaOH solution to determine the contents of two uronic acids, with which the standard curves were prepared.

Various colorimetric conditions such as the amount of phenol used, the wavelength of absorption, the velocity of the addition of acid and the stability of developed color were ascertained as well. (Fig. 4, 5, 6; Tab. 3).

The destroying ratio of M/G was determined as 1:1.46, so the M/G ratios obtained were calibrated by multiplying the correction coefficient 0.68. (Tab. 2).

Sodium alginate samples from different species of Chinese brown seaweeds were treated by acid hydrolysis, absorption on resin, elution with acetic acid and fractionation, and their M/G ratios were determined by colorimetry and calculation from the standard curves (Tab. 4).

*Contribution No. 611 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.