

条斑紫菜多糖的含量测定及其部分理化性质研究

周存山, 马海乐*

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 条斑紫菜经脱脂, 浸提, 除蛋白, 醇沉, 超滤和脱色得精制多糖, Molish 反应和 Fehling 反应定性鉴定, 依次稀释法测定特性粘度, Dodgson 法测定硫酸基含量, 苯酚-硫酸法测定多糖含量, 并用精制多糖测得对半乳糖的换算因子。结果表明, 此测定方法简便灵敏, 供试液在 3h 内显色稳定, 重现性好, 平均回收率为 98.26%, RSD=4.77%(n=5), 换算因子 $f=1.35$, 在 $18.32\sim 54.96\mu\text{g}$ 范围内呈良好的线性关系, $r=0.99945$ 。特性粘度适中 $[\eta]=34.26\times 10^{-3}\text{ml/g}$, 硫酸基含量较高为 $21.63\pm 0.11\%$ (n=2)。

关键词: 条斑紫菜多糖; 苯酚-硫酸法; 特性粘度; 硫酸基; 含量测定

Determination and Some Properties of Polysaccharide from *Porphyra yezoensis*

ZHOU Cun-shan, MA Hai-le*

(College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract : The refined polysaccharide was obtained from *Porphyra yezoensis* by ways as follows: degreasing, extraction, removing protein, ethanol precipitation, ultra-filtration and decoloring. Then, assayed by means of Molish and Fehling reaction, the intrinsic viscosity was obtained by diluting analysis in sequent order, and the contents of sulfate group assayed by Dodgson's method. The contents of polysaccharide in *Porphyra yezoensis* were assayed by phenol-sulfuric acid method. Mean while the polysaccharide vs. galactose, or the converting factor was also made certain. The results showed that the method is simple, accurate and stable in 3h. Average recovery rate of the polysaccharide was 98.26% with 4.77% of RSD(n=5). The converting factor was 1.35. Excellent linearity appeared from $18.32\mu\text{g}$ to $54.96\mu\text{g}$, with $r=0.99945$. With moderate intrinsic viscosity, $[\eta]=34.26\times 10^{-3}\text{ml/g}$, rather high contents of sulfate group were obtained as $21.63\pm 0.11\%$ (n=2).

Key words : *Porphyra yezoensis* polysaccharide; phenol-sulfuric acid method; intrinsic viscosity; sulfate group

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0038-05

紫菜是我国的一种重要的经济藻类, 属名 *Porphyra C. Agardh*, 隶属原红藻纲, 红毛菜目, 红毛菜科, 紫菜属。现代药理研究证实, 紫菜多糖具有抗凝血、降血脂、降血糖、消炎、抗衰老和防止溃疡等多重生物活性功能^[1~3]。

紫菜中多糖含量的测定对于提取紫菜多糖所用原料品种的选择及提取工艺的优化评价都具有重要的意义。许多^[4~6]有关紫菜多糖的研究都是建立在以葡萄糖作标准曲线的基础上, 得到的也就是多糖的相对含量, 还有就是乘以校正系数 0.9 来修饰, 然而, 实际上 Yasuko Yoshizawa 等^[7~10]报道, 紫菜多糖是杂多糖, 且半乳糖含量比葡萄糖高, 达到水溶性多糖的 64.2%, 加上不同单糖及不同单糖组合与苯酚-硫酸试剂显色情况不同,

因而采用葡萄糖作标准得到的相对含量或者乘以校正系数的测定结果, 难免会有误差, 结果较真实含量往往偏低。本文采用苯酚-硫酸比色法^[11], 并用精制紫菜多糖测定出其对半乳糖的换算因子, 对条斑紫菜多糖含量进行了测定, 结果更接近真实含量, 同时还测定了其表现粘均分子量特征的特性粘度及表现藻类多糖活性功能所必须的硫酸基含量, 希望能为紫菜多糖的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

条斑紫菜 江苏省南通市海安县兰波实业有限公司; 无水乙醇、石油醚(沸程 $60\sim 90^\circ\text{C}$)、氯仿、正丁

收稿日期: 2005-03-31

* 通讯作者

基金项目: 江苏省高技术研究项目(BG2003319)

作者简介: 周存山(1979-), 男, 博士, 研究方向为生物资源活性成分的高效分离及其功能特性。

醇、丙酮、乙醚、半乳糖、苯酚、硫酸、硫酸铜、酒石酸钠钾、硫酸钾、三氯乙酸、氯化钡、明胶、盐酸等都为国产分析纯。

1.2 仪器

DZF-6020 型真空干燥箱 上海益恒实验仪器有限公司; UV-2102PCS 型一紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; SHB-111 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; R-200 旋转蒸发仪 Buchi 公司; 台式冷冻高速离心机 TGLL-18K 江苏太仓华美生化仪器公司; Pellicon 小型超滤系统 美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 紫菜多糖的提取与精制^[7~9]

1.3.1.1 紫菜多糖的提取

称取 50g 紫菜粉(40 目筛网粉碎), 用石油醚(沸程 60~90℃)300ml、90℃回流 1h, 脱脂 2 次, 离心(4000r/min, 10min)分离, 沉淀挥发溶剂后, 加入 400ml 蒸馏水, 沸水浴提取 2h, 然后再用 200ml 的蒸馏水, 沸水浴提取 2h, 合并提取液, 离心(4000r/min, 10min)分离, 上清液真空浓缩(60℃, 50r/min, 0.095MPa)至 100ml 左右, Sevage 法(提取液:氯仿:正丁醇=20:4:1, V/V)反复进行 6 次脱蛋白后, 搅拌下慢慢加入 4 倍体积的无水乙醇, 于 4℃静置 12h, 离心(4000r/min, 10min)分离, 收集沉淀, 真空干燥(45℃, 0.095MPa)至恒重, 即得紫菜粗多糖。称重, 计算得率, 4℃保存备用。

1.3.1.2 紫菜多糖的精制

紫菜粗多糖加水溶解, 用截留分子量 10kDa 的平面纤维素超滤膜超滤($\Delta P=0.1\text{MPa}$, $T=15^\circ\text{C}$), 收集分子量大于 10kDa 部份, 真空浓缩(60℃, 50r/min, 0.095MPa)至 20ml 左右, 搅拌下慢慢加入 4 倍体积的无水乙醇, 于 4℃静置 12h, 离心(4000r/min, 10min)分离, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮以及乙醚洗涤(分别 20ml \times 2), 真空干燥(45℃, 0.095MPa)至恒重, 即得紫菜精制多糖。称重, 计算得率, 4℃保存备用。

1.3.2 标准曲线的绘制

1.3.2.1 半乳糖标准液的配制

精密称取 105℃干燥至恒重的 D- 半乳糖 0.0229g, 置 500ml 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 即得浓度为 0.0458mg/ml 的 D- 半乳糖标准液, 4℃保存备用。

1.3.2.2 苯酚试液的配制

80% 苯酚: 80g 苯酚(沙浴蒸馏, 100g 苯酚加铝片 0.1g 和碳酸钠 0.05g, 收集 180~182℃馏分)加 20ml 蒸馏水使之溶解, 置 4℃避光保存。6% 苯酚: 临用前以 80% 苯酚配制。

1.3.2.3 标准使用液的设置

精密吸取 D- 半乳糖标准液各 0.40、0.60、0.80、1.00、1.20ml 于 15ml 具塞比色试管中且都用蒸馏水补至 2.0ml。

1.3.2.4 苯酚-硫酸法测定^[11]

分别于“1.3.2.3”标准使用液中依次加入 6% 苯酚溶液 1.00ml、浓硫酸 5.00ml, 摇匀, 静置 10min, 沸水浴 15min, 自来水冷却 10min, 于 490nm 测吸光度, 同时以 2.00ml 蒸馏水按同样方法做空白调零, 以横坐标为半乳糖的毫克数, 纵坐标为吸光度 $A_{490\text{nm}}$, 得标准曲线及回归方程, 如图 1。

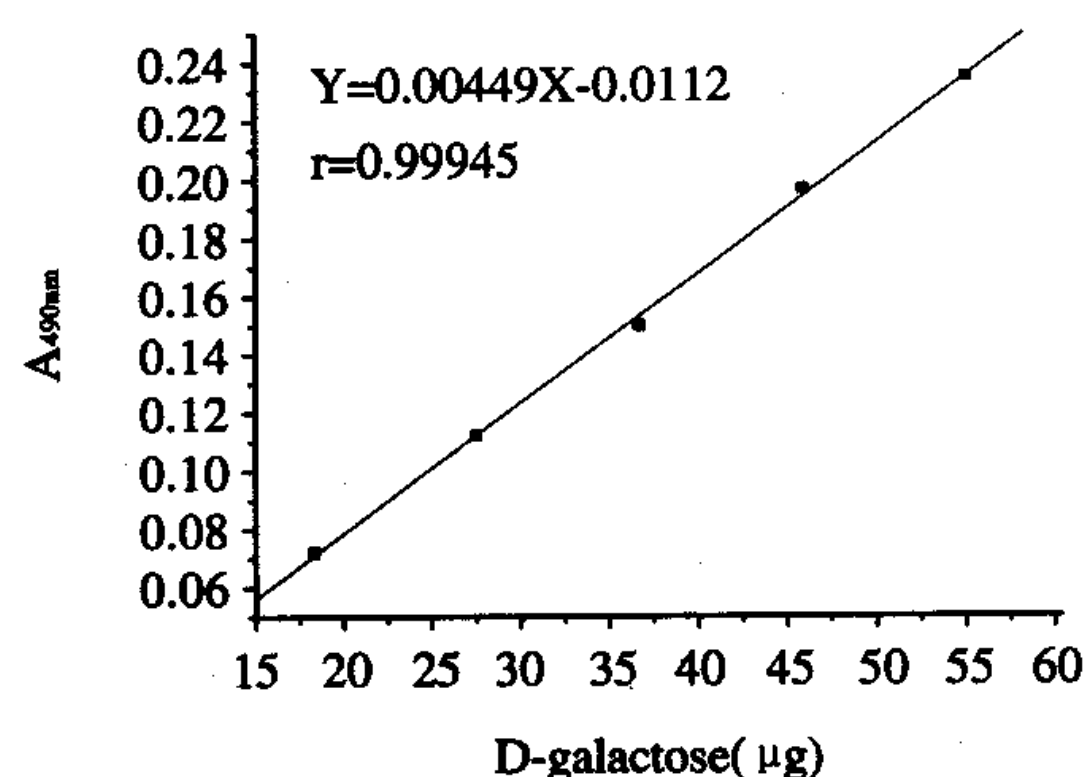


图1 苯酚-硫酸法测定多糖含量的标准曲线

Fig.1 Standard curve of Determination polysaccharide by phenol-sulfuric acid method

1.3.3 换算因子的测定

精密称取精制多糖 2.0mg 左右(精度 $d=0.1\text{mg}$), 置于 100ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 摇匀, 得样品溶液。按“1.3.2.4”的方法测定, 并由回归方程计算出半乳糖含量, 按公式(1)计算出换算因子。

$$\text{换算因子 } f = \frac{W}{C \cdot D} \quad (1)$$

式(1)中: W 为称取多糖的重量(mg), C 为精制多糖液中半乳糖的含量(mg/ml), D 为多糖的稀释倍数。

1.3.4 紫菜中多糖含量的测定

1.3.4.1 紫菜多糖溶液的准备

称取紫菜粉(40 目筛网粉碎)1.00g, 加 80%(V/V)乙醇 20ml, 回流 1h, 趁热过滤, 滤渣用 80%(V/V)热乙醇洗涤(10ml \times 2)。分离滤渣, 滤纸用蒸馏水洗涤(10ml \times 2), 合并后, 沸水浴提取 1h, 趁热过滤, 滤渣用热蒸馏水洗涤(10ml \times 2), 离心(4000r/min, 10min)分离, 上清液置于 100ml 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀备用。

1.3.4.2 紫菜中多糖含量的测定

精密吸取“1.3.4.1”的样品液, 且做一定倍数(D)的稀释, 取 1ml 于 15ml 具塞试管中, 按“1.3.2.4”的方法测吸光度, 由回归方程计算供试液中多糖含量, 按式(2)计算样品中多糖的含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{f \cdot C \cdot D}{W} \% \quad (2)$$

式(2)中: C 为样品溶液中半乳糖的浓度(mg/ml), D 为样品溶液的稀释倍数, f 为换算因子, W 为相应的样品重量(g)。

1.3.5 重现性试验

精确称取条斑紫菜粉(40目筛网粉碎)5份各1.0mg左右(精度d=0.1mg),按“1.3.4”测定条斑紫菜多糖含量。

1.3.6 稳定性试验

精密吸取按“1.3.4.1”方法制备的样品溶液,取1.0ml于15ml具塞试管中,按“1.3.2.4”中的测定方法,每隔30min测定一次光密度,连续3h考察其稳定性。

1.3.7 加样回收率的测定

精密称取条斑紫菜粉(40目筛网粉碎)5份各1.0mg(精度d=0.1mg),按“1.3.4.1”中方法制备,按“1.3.2.4”中的方法测定吸光度,同时准确取出一定量加入精制条斑紫菜多糖约10mg,按“1.3.2.4”中的方法测定吸光度,计算回收率。

1.3.8 条斑紫菜多糖的理化性质研究

1.3.8.1 外观及溶解性:观察条斑紫菜精制多糖的形状、颜色等,并将其溶于水、乙醇、丙酮和乙醚,观察其溶解性。

1.3.8.2 Molish 试剂反应

取2%(W/W)的精制多糖溶液1ml加入试管中,滴加 α -萘酚试剂两滴,混匀,然后沿试管壁慢慢加入浓硫酸2ml,观察有无紫色环出现。

1.3.8.3 Fehling 试剂反应

分别取Fehling试剂A液(3.45g硫酸铜和50 μ l浓硫酸,以蒸馏水定容于500ml的容量瓶)和B液(6.25g氢氧化钠和6.85g酒石酸钠钾,以蒸馏水定容于25ml的容量瓶)各2ml于试管中,混匀,加入2%(W/W)的精制多糖溶液3滴,沸水浴加热2~3min,观察溶液颜色的变化。

1.3.8.4 特性粘度的测定^[11]

取出10.00ml浓度为C=11.3mg/ml的精制多糖溶液,依次加入5.00ml蒸馏水,得到2C/3、C/2、C/3、2C/3、C/4的系列浓度,恒温于25 \pm 0.5 $^{\circ}$ C,采用乌氏粘度计(内径0.5 \pm 0.05mm)测定不同浓度的流出时间,同时以蒸馏水做空白测定,分别计算相对粘度、增比粘度和比浓粘度,绘制特性粘度曲线,如图2,以外推法求特性粘度 $[\eta]$ 。

1.3.8.5 Dodgson 法定量测定硫酸基含量^[12]

硫酸基标准溶液:精密称取105 $^{\circ}$ C干燥至恒重的硫酸钾108.75mg,以1mol/L的盐酸溶解,并定容于100ml

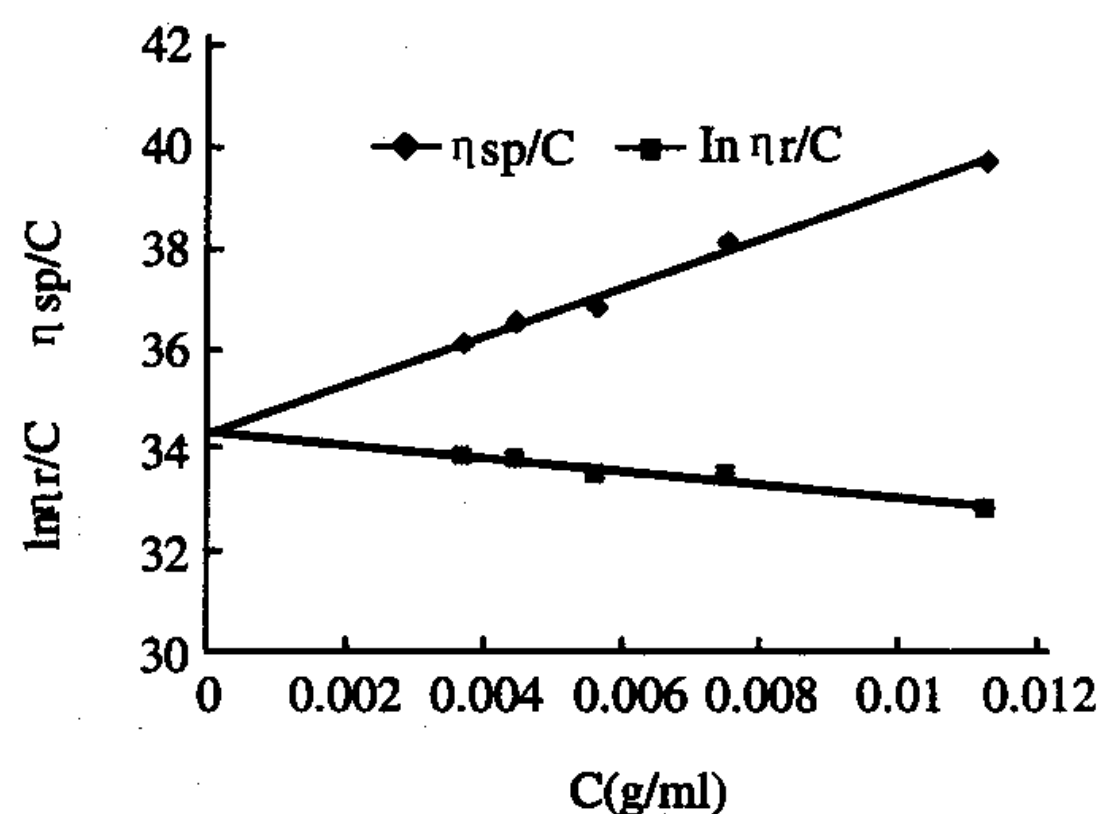


图2 条斑紫菜多糖特性粘度曲线

Fig.2 Intrinsic viscosity curve of *Porphyra yezoensis* polysaccharide

的容量瓶中,摇匀,即得600 μ g/ml的硫酸基标准溶液。

准确吸取硫酸基标准溶液40、80、120、160、200 μ l,各以1mol/L的盐酸溶液补至200 μ l,以200 μ l的1mol/L的盐酸溶液作空白,分别加入3.8ml三氯乙酸溶液(3%, W/W)及1.0ml氯化钡明胶溶液(0.5g氯化钡溶于100ml的明胶溶液),摇匀,于360nm测吸收度 A_1 ,以1.0ml明胶溶液(0.5%, W/W)代替1.0ml的氯化钡明胶溶液按照上面的方法操作,测定吸收度为 A_2 ,以硫酸基的毫克数为横坐标,纵坐标为吸收度 $A_{360nm}=A_1-A_2$,得标准曲线及回归方程,如图3。

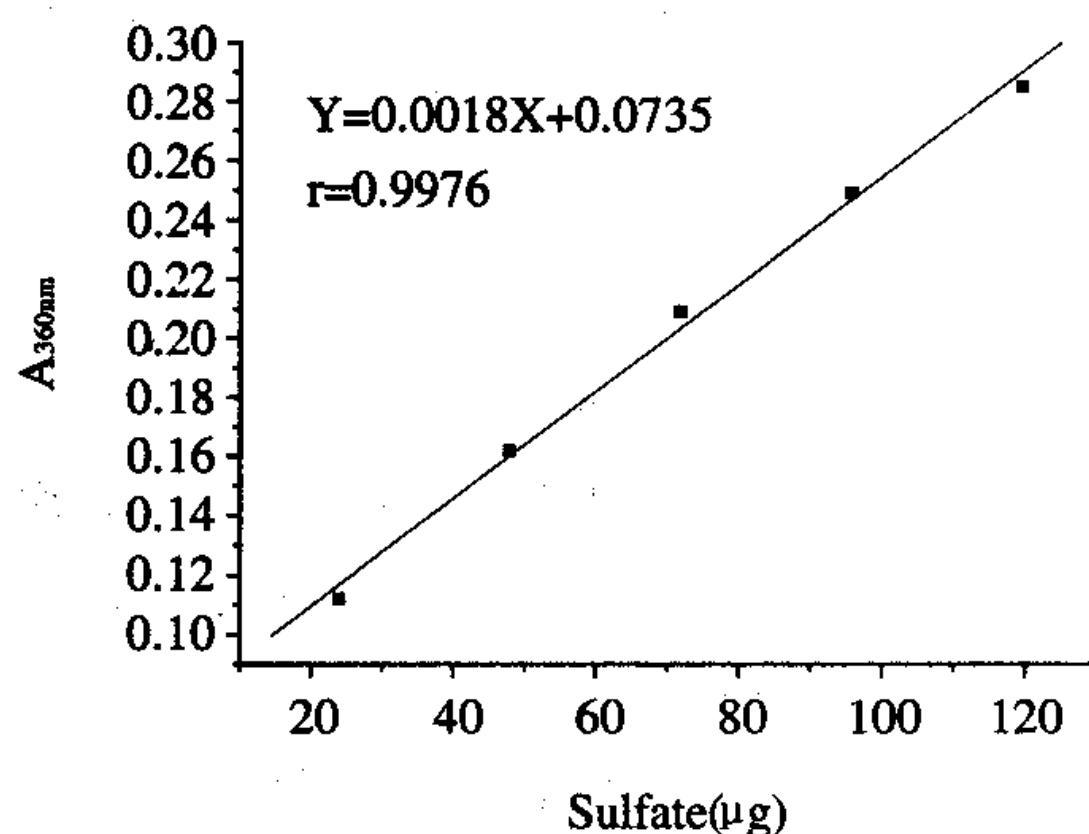


图3 Dodgson 法定量测定硫酸基含量的标准曲线

Fig.3 Standard curve of determination sulfate group by Dodgson's method

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 紫菜粗多糖的得率

以50g条斑紫菜(40目筛网粉碎)制得粗多糖(6.541 \pm 0.636)g,得率为(13.08 \pm 1.79)%(n=2)。

2.1.2 精制紫菜多糖的得率

以50g条斑紫菜(40目筛网粉碎)制得精制多糖(3.119 \pm 0.214)g,得率为(6.24 \pm 0.6)%(n=2)。

2.1.3 换算因子

以0.0027g精制多糖以蒸馏水定容于100ml的容量瓶中,测得换算因子 $f=1.34$;为防止干燥后多糖复溶性问题,利用等体积多糖提取液,醇沉洗涤后,一份直接加蒸馏水溶解,另一份真空干燥至恒重,测得换算因子 $f=1.36$,则最终取换算因子取 $f=1.35$ 。

2.1.4 重现性

以条斑紫菜为样品测定多糖含量,检测此方法的重现性,结果见表1, $RSD=1.82\%(n=5)$ 。

表1 重现性试验结果
Table 1 Repeatability of the determination

样品号	1	2	3	4	5
多糖含量	6.34	6.15	6.05	6.24	6.12

2.1.5 稳定性

测定结果见表2。

表2 显色稳定性试验结果
Table 2 Stability of absorbance in the determination

时间(h)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
A_{490nm}	0.067	0.066	0.066	0.067	0.066	0.066	0.067

2.1.6 加样回收率

测定结果见表3,平均回收率为98.26%, $RSD=4.77\%(n=5)$ 。

表3 加样回收率测定结果
Table 3 Recovery rate of the determination

取样量(g)	原含量(mg)	加样量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)
1.0014	62.14	10.2	71.65	93.24
1.0035	62.54	10.4	72.33	94.35
1.0046	62.31	10.7	72.84	98.41
1.0008	62.18	10.1	72.76	104.75
1.0113	62.71	10.5	73.27	100.57

2.1.7 精制条斑紫菜多糖的理化性质

精制条斑紫菜多糖为无定形白色粉末,溶于水,不溶于乙醇、丙酮和乙醚。Molish反应为阳性, Fehling试剂反应为阴性。特性粘度 $[\eta]=34.26 \times 10^{-3} \text{ml/g}$,硫酸基含量为 $(21.63 \pm 0.11)\%(n=2)$ 。

2.2 讨论

2.2.1 苯酚-硫酸比色法测定多糖的原理是多糖在浓硫酸的作用下,先水解为单糖,迅速脱水形成糠醛衍生物,然后与苯酚起显色反应,己糖在490nm(戊糖和糖醛酸在480nm)有特征吸收。本法简单快速,显色稳定,灵敏度高,适合于检测柱层析收集样品中多糖的定量分析。

2.2.2 比色反应中,苯酚加入后一定要摇匀,然后再迅速加入硫酸,这样比色就不会分层,特别要注意控制比色反应的时间和温度,要保证沸水浴15min后立即

用自来水冷却,这样会等到重现性较好的结果。

2.2.3 在多糖含量测定中,得到相应多糖对照品较困难,往往是采用单糖如葡萄糖代替为对照品,测定样品多糖的相对含量,还有的就是建议乘以0.9作为校正系数来修正。本实验中经过脱脂,Sevage法除蛋白,醇沉,超滤除去小分子杂质,有机溶剂脱色,并进行Molish反应和Fehling试剂鉴定,得到了较为纯净的条斑紫菜多糖。然后针对条斑紫菜多糖中半乳糖的含量较葡萄糖高,使用半乳糖作出标准曲线,并算出其与紫菜多糖的换算因子,这样来分析紫菜多糖可以避免一些系统误差,结果比较准确真实。

2.2.4 师然新^[13]等研究了降解的角叉菜多糖的抗肿瘤活性,证实了具有适中分子量的多糖具有较高的抑瘤率。根据Mark-Houwink经验式 $[\eta]=kM^\alpha$,可知多糖的特性粘度与其粘均分子量呈指数关系,然而建立特性粘度与其功能性质的关系相对重均和数均分子量与其功能性关系较为简便。史宝军^[14]等研究了灰树花多糖硫酸酯化与其抗肿瘤的关系,证实了硫酸基是灰树花多糖抗肿瘤活性所必须的基团。本文测定了条斑紫菜多糖的特性粘度及其硫酸基的含量,发现其特性粘度适中,且硫酸基含量较高,因此,可能具有较好的抗肿瘤活性。对于其抗肿瘤活性与其粘度特性及硫酸基含量的关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周慧萍,陈琼华.紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用[J].中国药科大学学报,1990,21(6):358-360.
- [2] 肖美添,杨军玲,林海英,等.紫菜多糖的提取及抗流感病毒活性研究[J].福州大学学报(自然科学版),2003,31(5):631-635.
- [3] 王长云,管华诗.多糖抗病毒研究进展II、硫酸多糖抗病毒作用[J].生物工程进展,2000,20(2):3-8.
- [4] 陶平,许庆陵,姚俊刚,等.大连沿海13种食用海藻的营养组成分析[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2001,24(4):406-410.
- [5] 何洁,崔铁军,王家骥,等.4种药用海藻有效成分的分析与利用[J].中国海洋药物,1996,15(2):26-30.
- [6] 范晓,韩丽君,郑乃余.我国常见食用海藻的营养成分分析[J].中国海洋药物,1993,(4):32-37.
- [7] Yasuko Yoshizawa, Atsushi Enomoto, Hirofumi Todoh, et al. Activation of macrophages by polysaccharide fractions from marine alga (*Porphyra yezoensis*) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57(11):1862-1866.
- [8] Yasuko Yoshizawa, Akio Amentani, Jun Tsunehiro, et al. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(10):1933-1937.
- [9] 吕燕,陈颖,汪水娟,等.坛紫菜多糖的分离纯化和化学结构分析[J].南京中医药大学学报(自然科学版),2000,16(3):159-163.
- [10] 张伟云,陈颖,汪水娟,等.条斑紫菜中四个多糖组分的提纯及组成分析[J].食品科学,2000,21(11):50-52.
- [11] 张惟杰.糖复合物生化研究技术(第二版)[M].杭州:浙江大学出版社,1998.11-12.

β -CD/1-MCP 包结物热分解反应 最可几机制的判断

何 翊^{1,2}, 孙 挺^{1,*}

(1.东北大学理学院化学系, 辽宁 沈阳 110004;

2.吉林化工学院环境科学与工程系, 吉林 吉林 132022)

摘 要: 本文用热重法测定了 β -CD 与 1-MCP 包结物在程序升温条件下的热降解失重过程, 采用 Satava-Sestak 法, 并结合 Ozawa 法和 Kissinger 法, 推断出可能的热分解反应机理, 获得了热分解反应的动力学参数。结果表明: β -CD 与 1-MCP 包结物热分解反应的机理为随机成核和随后生长反应, 反应机理函数为 2/3 级反应, 动力学方程为: $d\alpha/dT = [(A/\phi)\exp(-E/RT)] \cdot [3(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{1/3}] / 2$, 其降解反应的活化能 E_s 为 102.14 kJ/mol, 指前因子 A_s 值为 3.63×10^{10} 。

关键词: 1-甲基环丙烯; β -环糊精; 热分解反应机理; 热重法; 非等温动力学

Decide on Probable Reaction Mechanism of Thermal Decomposition of β -CD and 1-MCP Inclusion Complex

HE Yi^{1,2}, SUN Ting^{1,*}

(1.Department of Chemistry, College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110004, China;

2.Department of Environmental Science and Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology,
Jilin City 132022, China)

Abstract: The inclusion complex of β -CD and 1-MCP was subjected to programmed heating process and weight-temperature data were recorded by thermogravimetric analyzer. Probable decomposition kinetics parameters were suggested by means of Satava-Sestak method, Ozawa method and Kissinger method as well. And kinetics parameters were obtained, too. The experimental result showed that the decomposition kinetics model for β -CD and 1-MCP was stochastically becoming stone with succedent growth, while the activating energy was 102.14 kJ/mol, with pre-exponential factor as 3.63×10^{10} . The kinetic equation of thermal decomposition is expressed as: $d\alpha/dT = [(A/\phi)\exp(-E/RT)] \cdot [3(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{1/3}] / 2$.

Key words: 1-methylcyclopropene; β -cyclodextrin; mechanism of the thermal decomposition reaction; thermogravimetry; non-isothermal kinetics

中图分类号: R927.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0042-04

收稿日期: 2005-04-26

* 通讯作者

基金项目: 国家 863 项目(2002AA340640)

作者简介: 何翊(1973-), 男, 博士研究生, 主要从事功能材料的研究。

[12] Dodgson K S, Price R G. A note on the determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J]. Biochem J, 1962, 84:106-110.

[13] 师然新, 徐祖洪, 李智恩. 降解的角叉菜多糖抗肿瘤活性[J]. 海洋与

湖沼, 2000, 31(6): 653-656.

[14] 史宝军, 聂小华, 许泓渝. 灰树花多糖硫酸酯的制备及其抗肿瘤活性[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(8): 383-385.