

海藻化学分析方法

范晓 严小军 韩丽君

学苑出版社

DE28/19

海藻化学分析方法

范 晓
严小军 韩丽君

学苑出版社

图书在版编目(CIP)数据

海藻化学分析方法/范晓等著. —北京:学苑出版社,1996.2
ISBN 7-5077-1087-4

I. 海… II. 范… III. 海藻-化学分析-方法 IV. Q949.206

中国版本图书馆 CIP 数据核字(95)第 24124 号

特约责任编辑:李书琴 戴东

学苑出版社出版 发行

社址:北京万寿路西街 11 号 邮政编码:100036

北京商学院印刷厂印刷 新华书店经销

850×1168 1/32 5 印张 122 千字

1996 年 2 月北京第 1 版 1996 年 2 月北京第 1 次印刷

印数:1—1000 册 定价:6.00 元(平装)

10.00 元(精装)

· 前 言

当前,我国海藻化学工业已全面发展起来,海藻生理活性物质的研究正在世界范围内掀起新的热潮,因而海藻化学分析就显得越来越重要,并且需要有统一的先进方法。为了适应海藻化学研究发展的需要,我们编写了这本书。本书主要是根据作者多年从事海藻化学研究的工作实践和国内许多学者的有关论文,并参考了国外有关专著,如“Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods”(Hellebust, J. A. & J. S. Craigie, 1978),收集了有关海藻化学分析方法的先进技术和经验。编写时,我们力求把每一个分析方法从原理到测定步骤,尽可能地详细介绍;对有的化学成分,选编了几种不同的分析方法,以供读者根据自己的实验条件选择使用。对目前国内研究尚少的化学成分的分析方法也作了比较全面的介绍。

本书在编写过程中,得到了山东省水产局、中国科学院海洋研究所领导的支持,山东海洋大学、中国科学院海洋研究所有关同志的协助;徐祖洪研究员和张燕霞研究员参加了部分编写工作,曾呈奎院士和顾宏堪、纪明候研究员对本书进行了审阅与指导,在此一并致谢。

本书可能还存在一些缺点错误,希望读者对不当之处提出批评指正,以便进一步完善。

编 者

1995年10月18日

绪 论

1. 我国的经济海藻

中国海域辽阔,海岸线长,海藻资源丰富。就有经济价值的种类(即绿藻、褐藻、蓝藻、红藻四个门类)而言,据调查,中国沿海各地共有一百种之多。其中,最多而且被人类广泛采用的有如下种类:

(1) 褐藻 (*Phaeophyta*): 褐藻呈黄褐色,个体较大,寒温带地区生长较多,是海藻中最值得注意的一种工业原料。我国沿海常见的褐藻种类有铁钉菜 (*Ishige okamura*)、网膜藻 (*Hydroclathrus clathratus*)、萱藻 (*Scytosiphon lomentarius*)、鹅肠菜 (*Endarachne binghamiae*)、绳藻 (*Chorda filum*)、海带 (*Laminaria japonica*)、昆布 (*Ecklonia kurome*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)、鹿角菜 (*Pelvetia siliculososa*)、马尾藻属 (*Sargassum*) 中的铜藻 (*S. hornei*)、鼠尾藻 (*S. thunbergii*)、海黍子 (*S. kjellmanianum*)、海蒿子 (*S. pallidum*)、羊栖菜 (*S. fusiforme*) 以及半叶马尾藻 (*S. hemiphyllum*)、草叶马尾藻 (*S. graminifolium*)、裂叶马尾藻 (*S. siliquastrum*)、匍枝马尾藻 (*S. polysystem*)、莫氏马尾藻 (*S. maclurei*)、瓦氏马尾藻 (*S. vachellianum*) 和亨氏马尾藻 (*S. henslowianum*)。

(2) 红藻 (*Rhodophyta*): 红藻一般生长在海洋深处或潮间带,都含有红藻红素和红藻蓝素,藻体不很大。近几年来,红藻的养殖及化学性质受到各国海藻学家的重视。我国常见的红藻有红毛藻属 (*Bangia*)、紫菜属 (*Porphyra*) (包括 7 种紫菜)、石花菜属 (*Gelidium*) (包括 9 种石花菜)、鸡毛菜属 (*Pterocladia*)、海萝属 (*Gloiopeltis*)、江蓠属 (*Gracilaria*)、麒麟菜属 (*Eucheuma*)、沙菜属 (*Hypnea*)、角叉菜属 (*Gymnogongrus*)、叉枝藻属 (*Chondrus*)、仙菜属 (*Ceramium*)、鹧鸪菜属 (*Caloglossa*)、松节藻属 (*Digenea*)。

(3) 绿藻(*Chlorophyta*): 常见种类有石莼属(*Ulva*)、浒苔属(*Enteromorpha*)和礁膜属(*Monostroma*)等。

2. 海藻的化学组成

海藻的生长环境与陆地植物的生长环境有天壤之别,特殊的接触介质决定了海藻机体的化学组成及结构的特殊性。海藻的化学组成又随着种类、生长海区、季节变化及环境因子(如生长基质、温度、光照、盐度、海流、潮汐及人为条件等)的不同而有显著的变化。因此,各类海藻的化学组成既有共性,又有各自的特性成分。以组分的化学性质分类,海藻体基本由下列四大类成分组成。

(1) 碳水化合物(糖类):海藻中的碳水化合物占其干重的50%以上,是藻体的主体成分。它包括:a. 红藻碳水化合物:琼胶(如江蓠琼胶、石花菜琼胶和紫菜胶等),卡拉胶(如海萝胶、麒麟菜胶、沙菜胶、叉红藻胶、红菜胶等红藻藻胶),红藻淀粉,低分子量的碳水化合物(如游离和结合单糖等),以及其它红藻多糖如木糖胶(Xylan)、甘露糖胶(Mannan)等;b. 褐藻碳水化合物:褐藻胶、褐藻淀粉、褐藻糖胶、纤维素、低分子量褐藻糖类(如甘露醇、中性单糖及糖苷等);c. 绿藻碳水化合物,如石莼胶、蕨藻胶、刚毛藻胶以及其它绿藻多糖。

(2) 含氮化合物:这一类组分是海藻中的生命活性物质,对于植物的生命活动非常重要,包括蛋白质和氨基酸、甜菜碱类化合物。

(3) 其它有机化合物:包括色素,如叶绿素、胡萝卜素、类胡萝卜素、藻胆色素等;维生素,如维生素B、C、E以及烟酸、叶酸、泛酸等;脂肪类化合物,如甾醇、糖酯、磷脂等类脂物以及各种脂肪酸等;有效成分和抗生物质(如驱虫剂、抗生素等)。

(4) 无机成分:海藻成分除了大部分有机物外,还有占海藻重量1/3—1/2的无机成分,它们是海藻细胞质与细胞壁成分中不可缺少的组成成分。包括常量元素,如K, Na, Ca, Mg, S, Cl, Sr等;微量元素如Cu, Mn, Cr, Pb, Rb, Zn, Ni, Co, I, Br等;其它无机成分如硫酸根、二氧化硅等。

3. 我国的海藻化学与海藻工业

人们很久以前就把海藻作为食品、肥料、饲料和药品。几百年前,我国人民就用简单的水煮法从石花菜等红藻中提取琼胶。1881年,英国人 Stanford 从狭叶海带中发现了褐藻酸,此后人们对海藻的化学成分、含量、化学组成结构及提取方法等进行了多方面的研究。这些研究所取得的成果大大丰富了人们对海藻的了解,并促进了经济海藻的养殖和工业应用。近几十年来,人们又对海藻营养生理、氨基酸、蛋白质、酶、色素及糖代谢等方面进行了较深入的研究。随着海藻工业的发展以及海藻制品在食品、医药、化工等领域经济效益的不断增长,人们对海藻的兴趣越来越浓厚,从事海藻研究的人也越来越多。

我国的海藻化学研究及海藻工业从无到有,由小到大,不断壮大。解放前,我国只有以红藻石花菜为原料制造琼胶的几个小手工业工厂,褐藻工业和养殖业根本没有。50年代初,我国的科技工作者开始了海藻化学的研究,对中国沿海的海带、马尾藻、紫菜、江蓠等几种习见的经济藻类的化学成分,如粗蛋白、甘露醇、褐藻胶、氨基酸、琼胶、碘、钾等作了大量的分析研究工作,为海藻的工业开发提供了可靠的科学资料。50年代末,我国已建立起自己独特的海藻工业(特别是海带综合利用工业)。现在,我国的海藻养殖业和海藻利用工业兴旺发达,并正在研究开发新的应用途径,进一步发展海藻的综合利用。目前,我国的海藻工业产品如褐藻酸盐、甘露醇、琼胶等不仅在国内打开了销路,而且大量销往国外;养殖业和工业相互促进,迅速发展。我国海藻工业的种类和规模已越来越引起世界各国的注目。

4. 海藻化学分析方法

海藻资源的利用,首先要求了解本国不同地区生产的各种海藻所含的各种化学成分的含量及其季节变异性和地区变异性,然后以此为根据决定开发利用的藻种、采集季节和开发利用的具体方案。化学分析工作就是直接为这一目的服务的,尽管研究海藻化学所涉及

的学科较多(如有机化学、无机化学、胶体化学、海洋学、生物化学等),但最基本的是化学分析。所以,研究和确立正确的分析方法对于海藻的开发利用至关重要。

近几十年来,海藻化学研究发展很快。Renn (1989) 在第 13 届国际海藻会议上题为“海藻与生物技术:不可分割的伙伴”的报告中指出,海藻多糖独特的化学性质在现代生物技术中发挥着越来越重要的作用,例如褐藻胶包埋的胰岛素细胞皮下移植后释放胰岛素的时间延长,卡拉胶包埋工艺用于葡萄糖生产乙醇,琼胶用于分子克隆的繁殖和筛选,琼脂糖应用于电泳、免疫、色谱等多种生物技术中。另外,海藻微量化学成分的结构变化、有机物代谢的生态生化及其跟环境因子的关系等也得到了深入的研究,例如酚类化合物(Phenolic compounds)、甜菜碱类化合物(Betaines)以及萜类化合物(Terpenoids)的结构解析和生物活性的分析和筛选。这些都与海藻活性成分的独特性、海藻化学分析手段的发展密切相关。现代化的精密测定仪器,如气(液)相色谱、光谱、色质连用、核磁共振等仪器,以及示踪同位素和微量有机分析等方法都已不同程度地应用于海藻化学研究。

本书重点介绍了海藻多糖化学的分析方法,对海藻中其它有机和无机成分的分析也作了详细阐述,还列出了我国多种常见海藻的成分分析结果以供参考比较。由于我国的分析技术手段还比较落后,许多实验室更多地依靠传统的化学分析手段,因此本书兼顾了现代仪器分析方法和传统的化学分析方法。

目 录

绪论	(1)
第一章 褐藻胶	(1)
一、褐藻胶含量的测定	(3)
二、褐藻胶中 M/G 比的测定	(11)
三、褐藻胶分子量的测定	(16)
第二章 褐藻糖胶	(21)
第三章 褐藻淀粉和总糖	(31)
一、褐藻淀粉的含量测定	(32)
二、苯酚硫酸法测定总糖	(37)
三、气相色谱法测定海藻中的中性单糖	(38)
第四章 氨基酸和总氮	(44)
一、Kjedahl 定氮法测定总氮	(44)
二、氨基酸的测定	(47)
第五章 甘露醇	(59)
第六章 苯酚化合物	(68)
一、褐藻多酚	(71)
二、多管藻中的溴苯酚	(76)
第七章 粗纤维、脂肪类化合物和维生素	(81)
第八章 无机成分	(97)
一、碘的测定	(97)
二、钠含量测定	(108)
三、水分和灰分的测定	(114)
四、微量元素的测定	(116)
第九章 红藻多糖	(121)
一、卡拉胶	(121)
二、琼胶	(126)

三、红藻淀粉	(130)
四、D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖的测定	(134)
第十章 色素	(138)
参考文献	(145)

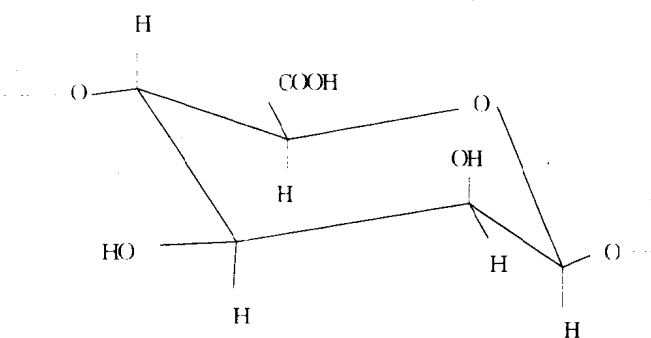
第一章 褐藻胶

褐藻胶(*Algin*)是所有褐藻中都含有的主要成分,它存在于藻体的细胞壁中,主要以褐藻酸钙、镁、钾、铈等形式存在,在藻体表层主要是钙盐,在藻体内部肉质部分主要是钾、钠、镁盐。

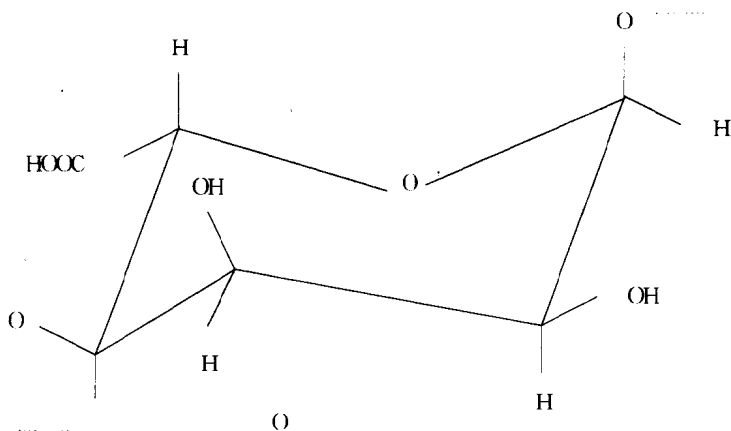
褐藻胶是英国人 *Stanford* 在 1881 年首次从狭叶海带 (*Laminaria stenophylla*) 中加碱提取出来的,直到 1929 年美国才正式开始工业性生产。我国在 1957 年开始生产褐藻胶。近几十年来褐藻胶生产发展特别迅速,在国际市场上占有重要地位。据估计,1980 年全世界生产褐藻胶达 22,000 吨(不包括我国产量),其中美国占 66%,挪威占 15%,法国占 6%,日本占 7%。生产褐藻胶的主要原料有巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)、海带 (*Laminaria japonica*)、掌状海带 (*L. digitata*)、极北海带 (*L. hyperborea*)、泡叶藻 (*Ascophyllum nodosum*)、昆布 (*Ecklonia maxima*) 等。

所谓褐藻胶一般是指褐藻酸盐,最普通的是褐藻酸钠,它的用途极为广泛,主要应用于纺织(50%)、食品(30%)、造纸(6%)、电焊条(5%)、医药(5%)及其它(4%)。

褐藻胶是一种由糖醛酸单体组成的线性多糖,是具有独特的水溶性的胶。和纤维素相比,纤维素是均匀的聚合物,只含有一种类型的糖单元,而褐藻酸是非均匀聚合物,它包含两种不同的结构单元,即 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古罗糖醛酸。这两种糖醛酸的原始差别仅在于 C_5 的羟基位置不同,成环后的构象不同,而进一步聚合成长链后的空间结构则差别非常大。下面是两种糖醛酸单元的椅型构象。



β -D-甘露糖醛酸单元的椅型构象



α -L-古罗糖醛酸单元的椅型构象

在整个褐藻胶大分子中,这两种糖醛酸是通过 C1,4 连接的,它没有分支和侧链,是由下列三种不同的块(segment)嵌合而成的。

……M—M—M—M—M—M—M…… 聚甘露糖醛酸块

……G—G—G—G—G—G—G…… 聚古罗糖醛酸块

……M—G—M—G—M—G—M—G…… 交替块

褐藻胶的三种块的比例变化取决于海藻的种类、产地、季节和藻体的不同部位。聚甘露糖醛酸块和聚古罗糖醛酸块的抗酸水解和氧化能力要比交替块强,不同结构的褐藻胶的性质和稳定性也不同。

褐藻胶是一种高分子电解质,其糖醛酸单元在水中能解离,其碱金属盐溶于水,而海藻酸本身和它的二价金属离子(Mg, Hg 除外)和三价金属离子一般不溶于水。褐藻胶溶液在 pH=5—10 时较稳定,在 pH=3—3.5 时形成海藻酸凝胶,在 pH=11.5—12 时也能形成凝胶。褐藻胶产品应在低温、干燥处保存。褐藻胶的变色温度为 150℃,炭化温度为 340℃,灰化温度为 480℃,比重为 1.59,燃烧热为 2.5Cal/g。其溶液在 20℃时的 $[\alpha]_D$ 为 $-113^\circ \rightarrow -148^\circ$ 。褐藻酸钠的分子量理论值为 198,加上一个水合分子则为 216。

褐藻胶与二价金属离子结合能力顺序如下:

当褐藻胶中 D-甘露糖醛酸含量高时,

$Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn, Mn > Mg$;

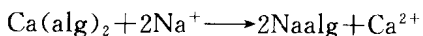
当褐藻胶中 L-古罗糖醛酸含量高时,

$Pb > Cu > Ba > Sr > Cd > Ca > Co, Ni, Zn, Mn > Mg$ 。

一、褐藻胶含量的测定

1. 重量法

〔原理〕 海藻体内的褐藻胶是以钙、镁、钠、钾及铯等盐的形式存在。加碳酸钠溶液使植物体细胞破坏,并使水不溶性褐藻酸盐转变为可溶性的钠盐(此过程称为消化)。再加酸将褐藻酸钠转变为水不溶性的褐藻酸。加碱后又转化为褐藻酸钠,脱水干燥后称重。



本方法是将所有褐藻酸盐转化为褐藻酸钠计量。

〔试剂〕 碳酸钠固体, 1:1 盐酸, 95% 乙醇, 1mol/L 氢氧化钠溶

液, 30—40% 甲醛溶液。

〔测定步骤〕

(1) 称取切碎的海藻样品(预先测定水分)20g, 加 6000ml 1% 甲醛溶液 4 小时, 过滤后再用蒸馏水洗一次; 在试样中加 500ml 水和 5g 固体碳酸钠, 在 50—70℃ 加热 0.5 小时; 再继续电动搅拌 0.5 小时, 待藻体全部呈糊状, 加水稀释至 1000ml。

(2) 用 100 目尼龙筛绢过滤; 滤渣再加少量水, 加温, 搅拌, 再过滤; 合并两次滤液, 最后通过 250 目筛绢过滤。滤液加 1:1 盐酸调 pH = 2, 放置 30 分钟, 让成凝胶的褐藻酸老化, 用 100 目筛绢过滤, 使大部分酸液自然流出后, 加 1mol/L 氢氧化钠溶液中和, 不断搅动, 尽量中和完全。加入 2 倍(褐藻酸钠溶液)体积的 95% 乙醇沉淀脱水, 用尼龙筛绢过滤挤干, 于 105℃ 烘干 3 小时, 称重。

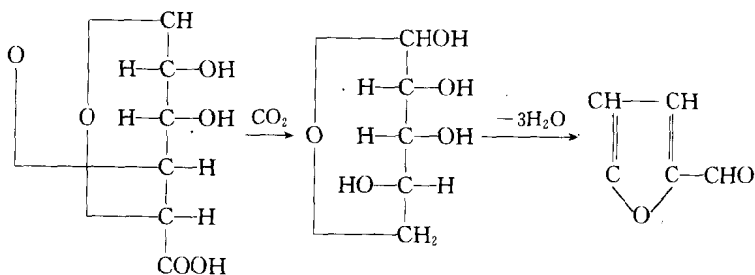
(3) 计算:

$$\text{褐藻酸钠}(\%) = (G/W) \times 100\%$$

式中, G 为褐藻酸钠干重(g), W 为海藻样品干重(g)。

2. 9-氮杂茚比色法

〔原理〕 海藻中的褐藻胶在浓酸和加热条件下, 脱水产生糠醛。如褐藻胶中的 D-甘露糖醛酸反应如下:



D-甘露糖醛酸

戊糖

糠醛

利用 9-氮杂茚与糠醛有显色反应, 在 530nm 吸收值最大, 可进

行比色。

〔试剂〕 (1) 9-氮杂芴乙醇溶液: 用 85% 乙醇为溶剂配制 0.5% 的 9-氮杂芴乙醇溶液。(2) 0.02mol/L 氢氧化钠标准溶液; 0.1mol/L 硫酸溶液, 4:1 硫酸溶液, 3% 碳酸钠溶液, 0.02mol/L 盐酸溶液。(3) 活性炭(脱色用)。

〔测定步骤〕

(1) 试样溶液的制备: 准确称取 0.5g 烘干的海藻粉末(约为 40 目), 加入 20ml 0.1mol/L 硫酸溶液, 搅拌放置过夜。用滤纸过滤除去酸液, 用水洗 4—5 次后, 将海藻样品及滤纸一起置于 100ml 三角瓶中。加入 50ml 3% 碳酸钠溶液, 放在 80—85℃ 的水浴上, 搅拌加热 2.5 小时, 然后室温放置过夜。

样品液过滤, 并充分洗涤(约用水 100ml), 将滤液与洗涤液合并, 稀释至 250ml。吸取 25ml 该溶液, 加 2g 活性炭, 搅拌 30 分钟后过滤。吸取 1ml 溶液进行比色。

(2) 精制褐藻酸及其定量: 取褐藻酸水洗至无氯离子为止, 以乙醇脱水, 70℃ 烘干。准确称取精制的褐藻酸 0.1g, 加 25ml 0.02mol/L 氢氧化钠溶解(转化), 以酚酞作指示剂, 用 0.02mol/L 盐酸回滴过量的游离碱, 并稀释至 100ml。

$$\text{标准褐藻酸钠浓度 (mg/ml)} = \frac{C_{\text{OH}} \times V_{\text{OH}} - C_{\text{H}} \times V_{\text{H}}}{100} \times 198$$

式中, C_{OH} 为氢氧化钠的摩尔浓度 (mol/L); V_{OH} 为氢氧化钠的体积数 (ml); C_{H} 为回滴用盐酸的摩尔浓度 (mol/L); V_{H} 为回滴用盐酸的体积数 (ml); 198 为褐藻酸钠的分子量。

(3) 标准比色曲线的绘制: 取 6 支试管, 各加入 100ml 4:1 硫酸溶液, 于冷水浴中冷却。吸取标准褐藻酸钠溶液 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25ml 分别沿试管壁徐徐注入试管中硫酸的上部, 并用水补充至总体积为 1ml。混匀后, 用棉花塞塞紧, 在沸水浴中水解 30 分钟, 然后加入 0.3ml 0.5% 的 9-氮杂芴乙醇溶液, 显红色, 再放入

沸水浴中加热 10 分钟,最后于室温放置 40 分钟,进行比色。以消光度与褐藻酸钠浓度作标准曲线。

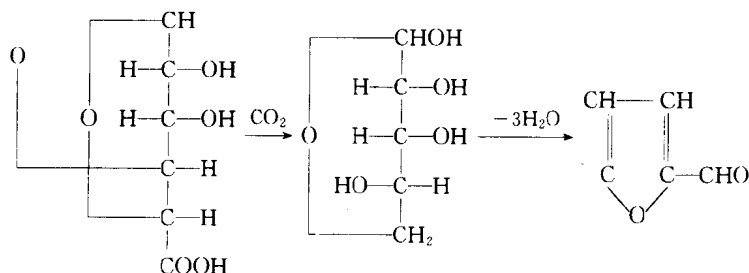
(4)计算:由试样的消光度从标准曲线上查得相应的褐藻酸钠浓度(mg/ml),计算出样品中所含的褐藻酸钠的含量。

$$\text{褐藻酸钠}(\%) = \frac{C_y \times 0.001 \times V}{W} \times 100\%$$

式中, C_y 为从标准曲线上查得的褐藻酸钠的浓度(mg/ml); V 为稀释总体积(ml); W 为海藻样品的重量(g)。

3. 脱羧法

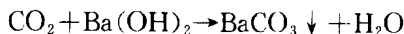
〔原理〕 海藻中的褐藻酸盐用强酸在高温下水解,产生二氧化碳和糠醛。如控制反应条件,反应可定量地进行。由已知浓度的标准氢氧化钡溶液吸收释放出来的二氧化碳并生成碳酸钡沉淀。用标准酸滴定剩余的氢氧化钡,即可算出褐藻酸盐的含量。



D-甘露糖醛酸

戊糖

糠醛



实验中,用纯的糖醛酸同时进行测定,先求得实际的得率系数,用此系数校正样品测定值。

〔材料和试剂〕 (1)海藻样品:海藻样品予以粉碎、干燥,使其水分含量小于 25%,过 60 目筛,于 105℃ 烘干 4 小时,精确称量。(2) 0.2mol/L 盐酸,19%(W/W) 盐酸,0.5mol/L 盐酸标准溶液。(3)

0.05mol/L 氢氧化钡溶液：称取 8.0g 八水合氢氧化钡溶于 600ml 50—60℃ 蒸馏水中（蒸馏水预先加热煮沸 30 分钟除去二氧化碳，冷却至室温），并直接过滤至 1000ml 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度。用标准盐酸标定出其标准浓度。瓶口塞紧。（4）1% 酚酞指示剂：溶解 10mg 酚酞于 10ml 96% 乙醇和 10ml 蒸馏水中。（5）氮气（不含二氧化碳）。

〔测定步骤〕

（1）样品处理：准确称取 150—200mg 海藻样品于 100ml 锥形瓶中，加 20ml 0.2mol/L 盐酸，在慢速振荡器上放置过夜。提取液用滤纸过滤。滤渣用 35ml 19% 盐酸定量地转移至反应器内。

（2）分析程序：测定所用的装置如图 1.1 所示。

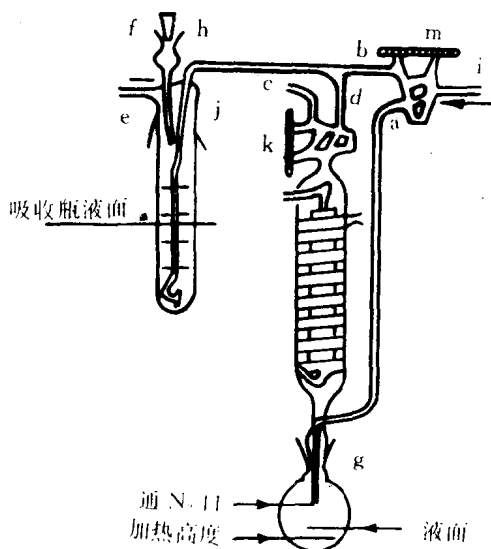


图 1.1