

5 种褐藻的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸 比值测定*

曲艳艳 王伟伟 曹增梅 王娜 李晓捷 张壮志 梁广津

(山东东方海洋科技股份有限公司 国家海藻与海参工程技术研究中心
山东省海藻遗传育种与栽培技术重点实验室 烟台 264003)

摘要 通过 PMP 柱前衍生高效液相色谱法测定 5 种褐藻(多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子和萱藻)的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值(M/G)。结果显示,多肋藻在所测褐藻中的 M/G 值最大(2.22),其次为海带(2.10),萱藻最小(0.60)。多肋藻与海带的褐藻胶凝胶强度小,持水性好,而萱藻的褐藻胶凝胶强度大,持水性差。同一生长期、不同海带品种(系)的 M/G 值相差不大,海带在生长期的 M/G 值呈下降趋势,在成熟期达到最低。此研究结果可为褐藻在相关生产领域应用提供参考依据。

关键词 褐藻;甘露糖醛酸;古罗糖醛酸;M/G 值;高效液相色谱

中图分类号 S985 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0160-05

褐藻胶(Algin)是从褐藻门藻类的细胞壁中提取的(陈利梅等, 2010)、由甘露糖醛酸(Mannuronic acid, M)和古罗糖醛酸(Guluronic acid, G)以 C₁₋₄ 键混合连接起来的直链高分子水溶性多糖,两种糖醛酸的含量和结合方式因海藻的种类、生态环境和季节的不同而不同,直接影响着褐藻胶的凝胶强度和对金属离子的选择性,从而影响褐藻胶的理化性质及其应用(纪明候, 1997)。作为一种安全的功能高分子,褐藻胶广泛应用于食品、化工及药物开发等领域,不同领域对褐藻胶中 M 和 G 的含量要求不同(吴建东等, 2011)。

关于褐藻胶 M/G 值的测定方法主要有化学法、液相色谱法及气相色谱法。化学法操作繁琐费时,不适应大批量样品检测的需求(郑瑞津等, 2003);高效液相色谱法及气相色谱法操作较为简便,但高效液相法采用的 Waters 5-SAX 阴离子交换柱(郑瑞津等, 2003; Gacesa *et al*, 1993)分离褐藻胶 M 和 G 的效果不佳。采用 PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮)柱前衍生高效液相色谱法,褐藻胶 M 和 G 分离效果好,灵敏度高,受干扰峰影响小,适合快速、有效、批

量样品的褐藻胶 M/G 值的测定(吴健等, 2013)。

本研究利用 PMP 柱前衍生高效液相色谱法,针对 5 种褐藻(多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子和萱藻)的 M/G 值、海带不同品种(系)M/G 值进行比较,研究了海带生长期 M/G 值的变化规律,旨在为生产及研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收获期褐藻采集:多肋藻、“东方 6 号”海带、海蒿子、萱藻分别于 2014 年 4 月、6 月、5 月、5 月采集于山东荣成宁津附近海域;裙带菜于 2014 年 4 月采集于山东荣成朱口院附近海域。

海带在生长期 M/G 值的变化:“爱伦湾”海带于 2014 年 2-6 月采集于山东荣成宁津附近海域。

同一时期海带不同品种(系)间 M/G 值的比较:“东方 5 号”、“东方 6 号”、“爱伦湾”、“黄官 1 号”海带均于 2013 年 5 月采集于山东荣成宁津附近海域。

* 国家科技支撑计划项目(2012BAD55G01)、国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2012AA10A406)和烟台市科技发展计划项目(2013LGS002)共同资助。曲艳艳, E-mail: quyanchn@163.com

收稿日期: 2015-02-05, 收修改稿日期: 2015-08-10

1.2 试剂及仪器

β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古罗糖醛酸标准品(含量 $\geq 98\%$), 青岛博智汇力生物科技公司; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, $\geq 98\%$), Alfa Aesar 公司; 乙腈为色谱纯, 国药集团; 其他试剂均为分析纯, 国药集团。Agilent 1260 型高效液相色谱仪及 Zorbax SB-C18 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 美国 Agilent 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 褐藻胶的提取 称取适量褐藻干粉, 加入 30 倍体积的 0.5% NaCO_3 (m/v)溶液, 55 $^\circ\text{C}$ 水浴 1.5 h; 筛绢过滤藻渣, 将滤液离心, 取上清液。在上清液中加入适量盐酸, 边加边搅拌, 此时溶液中有褐藻酸产生, 静置 10 min, 离心取沉淀。转移沉淀, 加入 95% 乙醇, 用 40% NaOH 调节溶液 pH 至 8.0, 静置 40 min, 离心取沉淀, 得褐藻酸钠, 40 $^\circ\text{C}$ 烘干至恒重。

1.3.2 褐藻胶的降解 称取 50 mg 褐藻酸钠干品于试管中, 加入 0.5 ml 的 80% H_2SO_4 , 室温酸解 18 h。用水稀释 H_2SO_4 浓度至 2 mol/L, 沸水浴 5 h, 冷却至室温。用 CaCO_3 中和 pH 至 7.0, 离心取上清液, 滤纸过滤, 收集滤液, 得到褐藻胶 M 和 G 单糖溶液。

1.3.3 PMP 柱前衍生 称取 M、G 单糖标准品, 用蒸馏水配制成 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg/ml 系列浓度。取 200 μ l 标准品溶液, 加入 200 μ l 0.3 mol/L 的 NaOH , 混合均匀后, 加入 240 μ l 0.5 mol/L PMP 试剂, 涡旋混匀, 于 70 $^\circ\text{C}$ 水浴加热 1 h, 取出冷却至室温, 加入 200 μ l 0.3 mol/L HCl 中和, 氯仿萃取 3 次, 取水相过 0.22 μ m 滤膜, 待上机。褐藻胶单糖裂解液柱前衍生步骤同上。

1.3.4 高效液相色谱 Zorbax SB-C18 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.0)/ CH_3CN (83/17, 体积分数), 流速为 0.8 ml/min, 柱温为 30 $^\circ\text{C}$, 进样体积为 20 μ l, 检测器为 VWD, 检测波长为 245 nm。

1.3.5 M/G 校正系数的确立 称取 M 和 G 标准品各 250 mg(称量值), 分别进行酸解、衍生及液相分析。根据 M、G 线性回归方程计算酸解后 M 和 G 的质量(测定值), M 和 G 的回收率即为质量测定值与称量值之比, M/G 回收系数为 M 回收率与 G 回收率的比值。

2 结果与讨论

2.1 M 和 G 标准曲线的建立

以浓度 x (mg/ml)、峰面积 y ($\times 10^4$) 进行回归计算, 分别得到 M 和 G 的线性回归方程, M: $y=1.497x-$

$0.012(R^2=0.9998)$; G: $y=1.381x-0.017(R^2=0.9991)$ 。

2.2 M/G 校正系数的确立

糖醛酸在强酸作用下会受到一定程度的破坏, 且不同糖醛酸破坏程度不同, 因此, 确定甘露糖醛酸和古罗糖醛酸强酸作用下的回收率对于测定 M/G 值至关重要。表 1 为 M 和 G 标准品在酸解后的回收率, M、G 酸解后回收率不同, G 破坏程度明显大于 M, 在计算褐藻中褐藻胶 M/G 值时需要乘以校正系数 1/1.86, 即 0.54 进行校正。

表 1 糖醛酸酸解后的回收率
Tab.1 The recovery rate of M and G after acidolysis

次数 No.	糖醛酸 Alduronic acid	酸解前质		酸解后质		回收率 Recovery rate (%)	回收 系数 M/G	平均 值 Avg
		量 Weight before acidolysis (mg)	量 Weight after acidolysis (mg)	量 Weight before acidolysis (mg)	量 Weight after acidolysis (mg)			
I	M	2.5000	2.0054	80.22	1.87			
I	G	2.6000	1.1173	42.97	1.86			
II	M	2.6000	2.2462	86.39	1.85			
II	G	2.3000	1.0751	46.74				

2.3 5种褐藻 M/G 的测定

图 3 为褐藻胶裂解液的液相色谱图, 根据 M 单糖标准品(图 1)和 G 单糖标准品(图 2)确定 9.215 min 为 G, 10.089 min 为 M。M 和 G 分离度较好, 除 5 min 之前的试剂峰外, 其他干扰峰较小, 由此可推断, 褐藻胶酸解较彻底, 不存在未解聚的多聚体形态。

沸水浴加热时间对于多聚嵌段结构的水解起到关键作用, 实验探索了沸水浴加热的最佳水解时间为 5 h。PMP 柱前衍生高效液相色谱法作为一种准确有效的测定褐藻胶 M/G 值的方法, 也可适用于其他褐藻胶类药物制品 M/G 值的测定(吴健等, 2013)。

由图 4 可知, 收获期 5 种褐藻 M/G 值由大到小依次为多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子、萱藻, 最大值为 2.22, 最低值为 0.60, 多肋藻约为萱藻的 4 倍。M/G 值的差异反映了不同来源褐藻胶凝胶特性的不同, M/G 值高, 其凝胶强度低, 持水性好, 弹性好, 因而多肋藻、海带较适用于对弹性要求高、持水性要求好的工业领域以及要求高 M 含量的医药、食品等领域, 例如食品涂膜、增稠剂、医药材料等(朱思明等, 2003; Clark, 1996; Fujihara *et al.*, 1992)。萱藻褐藻胶的 G 含量较高, 凝胶强度大, 硬度大, 质地脆, 持水性差, 该特点不仅适用于去除有毒金属离子, 而且在含钙食品中可作为胶凝剂、添加剂(朱思明等,

2003; 刘树兴等, 2001; Sellimi *et al*, 2015), 另外, 此类褐藻胶在纺织、橡胶等领域得到广泛应用(黄来英等, 2000; 金骏等, 1993; 隋战鹰, 1993)。

在生产领域, 除了根据褐藻胶的特性进行原材料的选择, 还应考虑原材料褐藻胶产量的高低。本研究中, 多肋藻的褐藻胶含量为 27.87%, 海带为 22.11%。多肋藻能较大程度满足对 M/G 值要求较高的工业领域, 养殖量大、产量高的海带在此领域也颇受欢迎。

2.4 海带不同品种(系)间 M/G 值的比较

同一生长期海带品种(系)间 M/G 值相差不大, 接

近 2.0(图 5), M 含量基本维持在 15%左右, G 含量基本维持在 8%左右, 褐藻胶特性颇为相似。海带 M/G 值存在一定差异, 原因可能为气候、水温等自然条件对海带的生长带来一定影响, 造成测定值的偏差。

2.5 海带生长期 M/G 值的变化

为了探究海带在生长期的 M/G 值以及 M、G 含量的变化, 选择 2 月薄嫩期至 6 月成熟期海带, 测定 M/G 值以及 M、G 含量变化情况(图 6)。结果显示, 海带在生长过程中, M/G 值呈下降趋势, M 含量呈下降趋势, G 含量呈上升趋势, 即海带在成熟期的

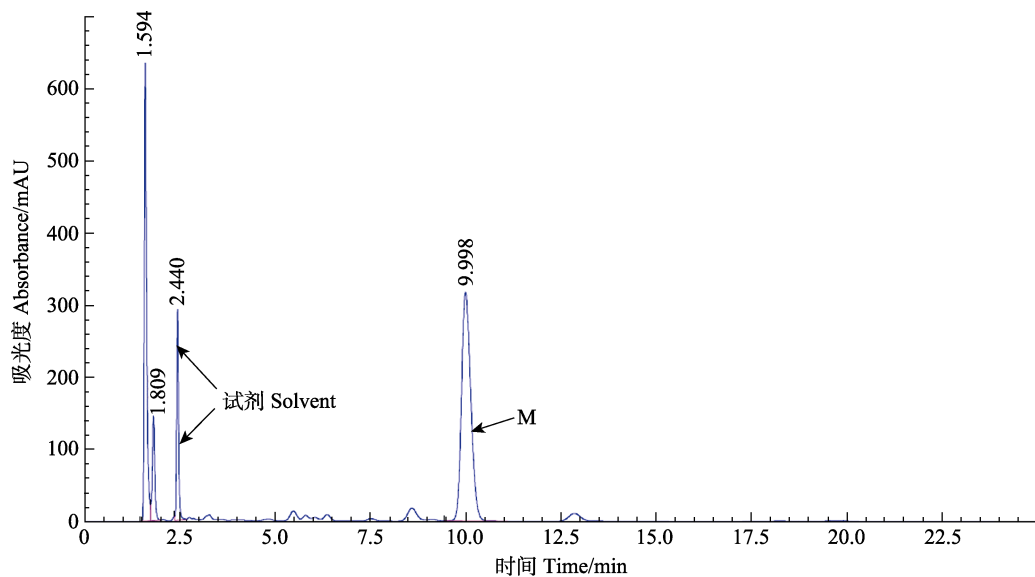


图 1 甘露糖醛酸标准品的液相色谱

Fig.1 The standard liquid chromatogram of Mannuronic acid

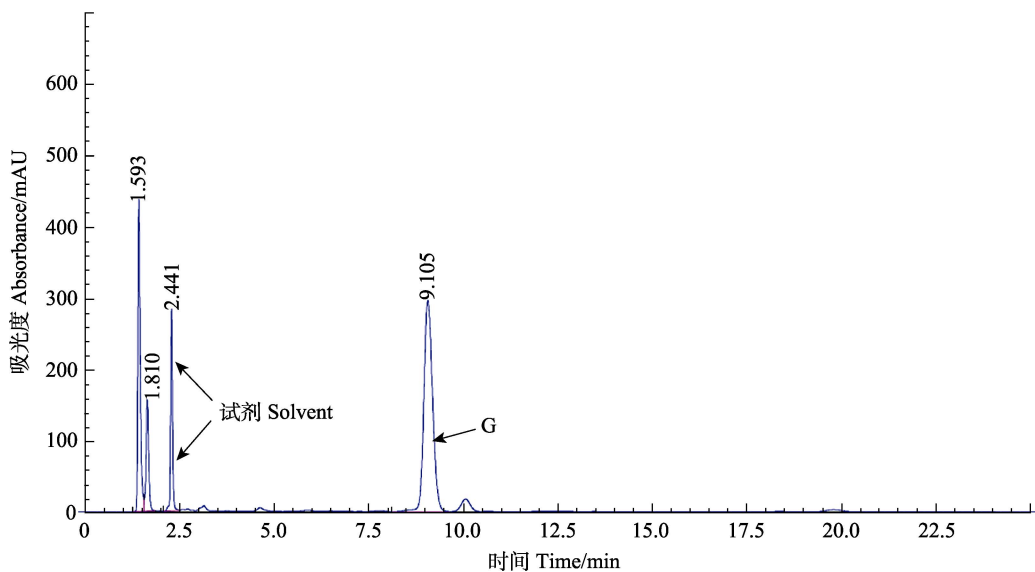


图 2 古罗糖醛酸标准品的液相色谱

Fig.2 The standard liquid chromatogram of Guluronic acid

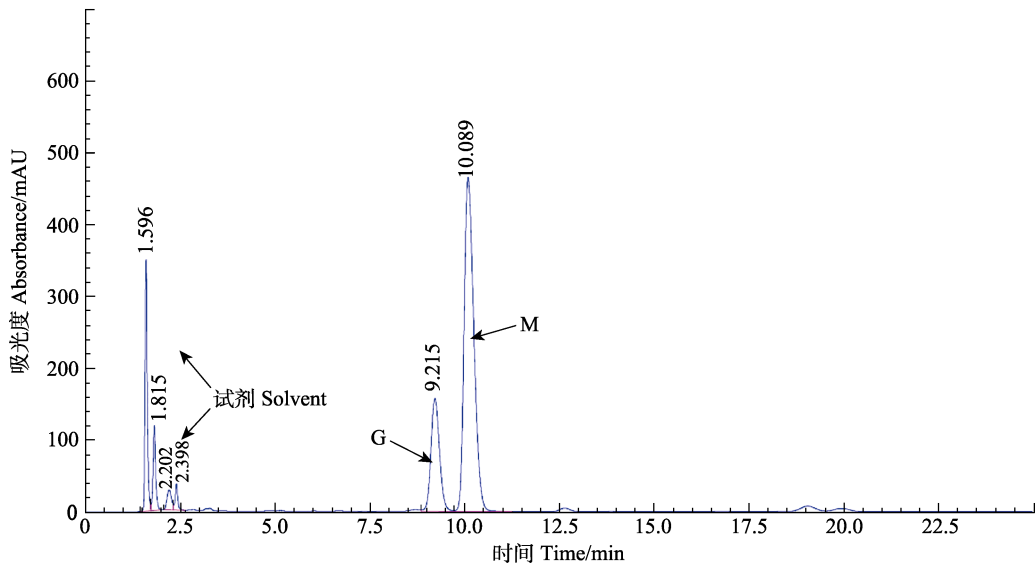


图 3 褐藻胶裂解液的液相色谱

Fig.3 The liquid chromatogram of the degraded algin

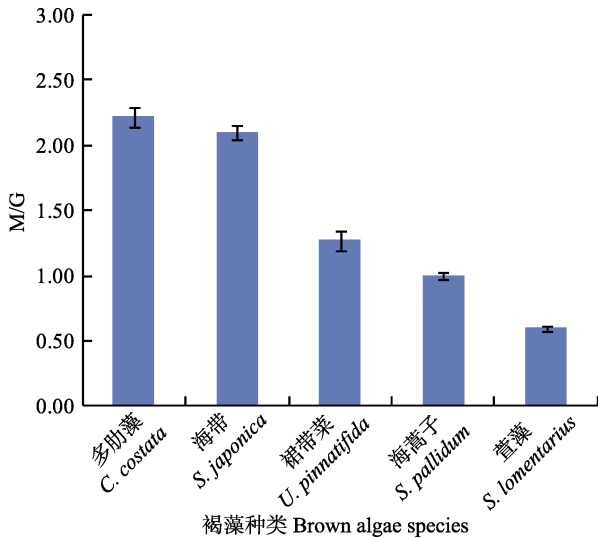


图 4 不同褐藻种间 M/G 值

Fig.4 M/G ratios of different brown algae species

M/G 值最低。由此可以推断, 海带褐藻胶在生物合成过程中是由 D-甘露糖醛酸逐渐转变成 L-古罗糖醛酸, 此结论与纪明候(1997)所阐述的观点相吻合。海带在 4 月 M/G 值出现短暂的上升, M 含量上升, G 含量下降, 原因可能为海带在此生长阶段由 M 转化为 G 的速率相比于海带的生长速率有所下降。

3 结语

本研究比较了 5 种褐藻(多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子和萱藻)种间 M/G 值的大小, 多肋藻和海带凝胶特性较为接近, 其凝胶强度小, 持水性好, 而萱藻凝胶特性则相反; 同一时期不同海带品种(系)间 M/G

值差异不明显, 因而褐藻胶特性相差不大。海带在整个生长期的 M/G 值呈下降趋势, 在收获期达到最低。

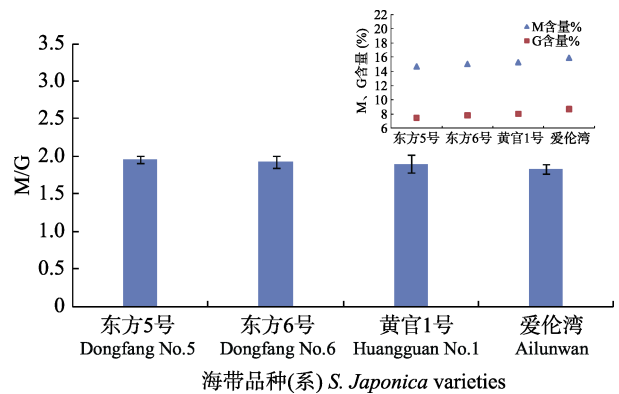


图 5 海带不同品种(系)间 M/G 值以及 M、G 含量

Fig.5 M/G ratios and the contents of M and G in different varieties (lines) of *S. japonica*

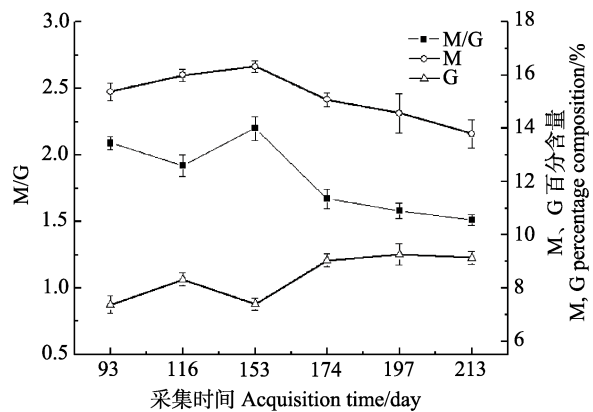


图 6 海带生长期 M/G 值的变化情况

Fig. 6 The change of M/G of *S. japonica* during the growth period

以上研究结果可为褐藻胶性能选择提供参考依据。

参 考 文 献

- 朱思明, 于淑娟, 彭志英, 等. 海藻酸(盐)的生产、应用及研究现状. 中国食品添加剂, 2003, 6: 61-65
- 刘树兴, 李宏梁, 黄峻榕. 食品添加剂. 北京: 中国石油出版社, 2001, 2-5
- 纪明候. 海藻化学. 北京: 科学出版社, 1997, 235-236
- 吴建东, 于广利, 王培培, 等. 高古罗糖醛酸含量的萱藻 (*Scytosiphon lomentarius*) 多糖细微结构研究. 海洋科学, 2011, 35(1): 40-43
- 吴健, 薛依婷, 赵峡, 等. 柱前衍生液相色谱法测定藻酸双酯钠的含量. 中国海洋药物, 2013, 32(4): 1-7
- 陈利梅, 李德茂, 赵玉山, 等. 海带不同部位褐藻胶含量及其凝胶性能的研究. 中国食品添加剂, 2010, 2: 124-126
- 金骏, 林美娇. 海藻利用与加工. 北京: 科学出版社, 1993, 37-38
- 郑瑞津, 吕志华, 于广利, 等. 褐藻胶 M/G 比值测定方法的比较. 中国海洋药物杂志, 2003, 6: 35-39
- 黄来英, 洪文生, 黄恺. 食品增稠剂. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, 25-26
- 隋战鹰. 褐藻胶用途多. 植物杂志, 1993, 2: 17-19
- Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. The molecular and cellular biology of wound repair, 2nd ed. New York, London: Plenum Press, 1996, 3-50
- Fujihara M, Nagumo T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. Carbohydr Res, 1992, 224(3): 343-347
- Gacesa P, Squire A, Winterburn PJ. The determination of the uronic acid composition of alginate by anion-exchange liquid chromatography. Carbohydr Res, 1993, 118(1): 1-8
- Sellimi S, Younes I, Ayed HB, et al. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. Int J Biol Macromol, 2015, 72: 1358-1367

(编辑 刘丛力)

Determining the Ratio of Mannuronic Acid to Guluronic Acid(M/G) of Five Species of Brown Algae

QU Yanyan^①, WANG Weiwei, CAO Zengmei, WANG Na, LI Xiaojie,
ZHANG Zhuangzhi, LIANG Guangjin

(Shandong Oriental Ocean Group Co. Ltd., National Algae and Sea Cucumber Engineering Technology Research Center,
Key Laboratory of Algae Genetic Breeding and Cultivation Techniques of Shandong Province, Yantai 264003)

Abstract In this study we compared the ratios of mannuronic acid to guluronic acid (M/G) in different brown algae species of *Costaria costata*, *Scytosiphon lomentarius*, *Sargassum pallidum*, *Undaria pinnatifida*, *Saccharina japonica*, and monitored the change of M/G during the growth of *S. japonica*. The M/G ratio was determined with a high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization technique. The results showed that *C. costata* had the highest M/G ratio (2.22), which was followed by *S. japonica* (2.10), and *S. lomentarius* had the lowest value (0.60). These demonstrated that algin of *C. costata* and *S. japonica* had small intensity but excellent water-holding capacity, and that algin of *S. lomentarius* had the opposite properties. The M content showed the order as *C. costata* (18.84%) > *S. japonica* (14.83%) > *S. lomentarius* (8.77%). The algin of *S. lomentarius* had the lowest level of M (14.58%) and the highest G content. The characteristics including fast growth rate, high yield, and commercial cultivation would make *S. japonica* as suitable material in food industry that requires excellent elasticity and water-holding capacity, such as food coating and thickener. They could also be largely applied in medicine that demands high M content. The algin of *S. lomentarius*, owing to its high G content and combination with Ca²⁺ and other metal cations to form compact structures, can be applied to the removal of toxic metal ions as well as calcium in foods. Algin with high G content could also be used as gelatinizers, additives in the food industry, textile and rubber industries. M/G ratios of different species of *S. japonica* were similar, and they declined over time and reached the minimum at maturity, which was caused by the transformation from M to G during the growth. Our study provided more information for both industrial production and scientific research.

Key words Brown algae; Mannuronic acid; Guluronic acid; M/G; HPLC

① Corresponding author: QU Yanyan, E-mail: quyanchn@163.com