

用葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和联大 茴香胺法测定褐藻中的褐藻淀粉*

赵学武 王作芸

(山东海洋学院)

主要由 β -D 葡萄糖苷 1, 3 键结合组成的褐藻淀粉, 普遍存在于褐藻体内, 在褐藻的代谢中占有一定的位置^[1], 并具有某些药用价值^[2], 对其含量的测定方法的研究, 无论是对褐藻生理的研究, 或是开展褐藻的综合利用, 均具有实用价值。

褐藻淀粉含量的测定方法, 主要是基于将其用稀酸水解后, 测出葡萄糖含量, 而后推算出褐藻中的含量。迄今仍有作者沿用此原理进行测定^[1, 3]。用葡萄糖氧化酶, 过氧化物酶和联大茴香胺法测定葡萄糖的方法, 由于酶的特异性高, 只同葡萄糖反应而不受其他还原糖的干扰, 精密度及操作步骤也较为理想, 早已在医学和工业方面采用^[4, 6], 但至今仍未见有试用于褐藻淀粉的含量测定的报导。

由于迄今仍缺乏我国褐藻中褐藻淀粉含量的测定及有关方法的资料, 为了便于开展褐藻的生理、生化及综合利用的研究, 我们进行了用葡萄糖氧化酶法测定褐藻淀粉含量的探索。

一、试剂及仪器

主要试剂: 葡萄糖氧化酶和褐藻淀粉为 Koch-Light Lab.Ltd. 产品; 过氧化物酶为 Bachringer Mannheim GmbH 产品; 葡萄糖为 Hopkin and Milliams Ltd. 产品; 联大茴香胺为北京化工厂产品。

仪器应用上海分析仪器厂产 751 分光光度计。测定工作曲线时, 曾同时用 Unicam S P 500 分光光度计进行过对比, 结果基本一致。

二、实验方法与计算

准确称取 1 克重的海藻粉, 加 50 毫升 1N 的盐酸, 在 $105 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温甘油油浴中回流加热 8—10 小时, 将水解液用 1N 的 NaOH 调至 pH = 7.0 后, 过滤, 将滤液稀释, 使其浓度范围约在葡萄糖含量 0.05—0.25 毫克/毫升之间。

本文 1980 年 4 月 5 日收到。

* 本文承中国科学院海洋研究所纪明侯提出宝贵意见, 特此致谢。

取 0.5 毫升海藻水解液, 加 5 毫升酶试剂, 放入 38°C 恒温水浴中保温 30 分钟后, 加 0.5 毫升 1:1HCl 中止反应, 在分光光度计 400 毫微米波长、1 厘米光路的比色杯中, 测定消光值; 另取 0.5 毫升 0.1 毫克/毫升的葡萄糖溶液和 0.5 毫升的蒸馏水, 按同样方法分别测定标准葡萄糖溶液的消光值和酶空白的消光值。

酶试剂的配制方法: 称取 224 毫克葡萄糖氧化酶, 5.6 毫克过氧化物酶, 1.2 毫克联大茴香胺柠檬酸盐(用乙醚溶解联大茴香胺后加入柠檬酸盐制备), 20 毫克柠檬酸和 120 毫克无水柠檬酸钠, 溶于 50 毫升蒸馏水中, 使用前过滤。试剂应在低温下保存。

按下式计算海藻中褐藻淀粉含量(%):

$$\text{褐藻淀粉含量}(\%) = \frac{\text{消光(海藻水解液)} - \text{消光(酶空白)}}{\text{消光}(0.1\text{毫克/毫升标准葡萄糖溶液}) - \text{消光(酶空白)}} \times 0.1 \times \text{海藻稀释毫升数} \times \frac{162}{180} \times \frac{1}{1000} \div \text{海藻重(克)} \times 100.$$

三、结果与讨论

本法之原理是葡萄糖氧化酶将葡萄糖氧化为葡萄糖酸和生成过氧化氢, 在有过氧化物酶的存在下, 过氧化氢与联大茴香胺发生显色反应, 此颜色的消光值与葡萄糖的浓度存在线性关系。因之葡萄糖浓度的范围、酶反应时间、颜色稳定程度以及被测物中包含的其他成分等的不同, 均会对此酶促反应的测定结果产生不同程度的影响, 需通过实验, 选择最适的测定条件。

最适浓度范围确定, 通过配制一系列标准葡萄糖溶液进行测定, 在葡萄糖溶液浓度为

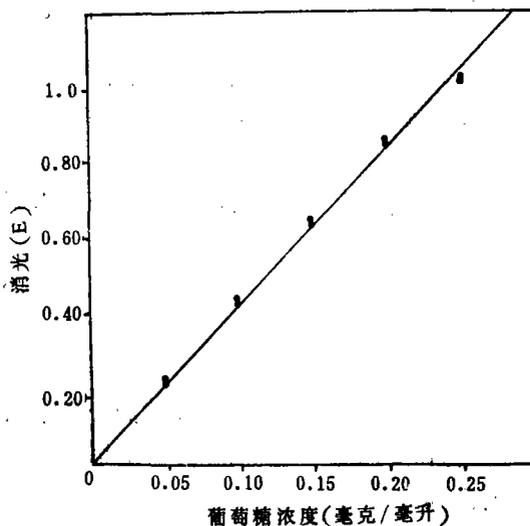


图1 标准葡萄糖溶液的工作曲线
(取四次实验的测定值)

0.05—0.25 毫克/毫升之范围内, 消光值与浓度呈线性关系(见图 1), 当浓度高于 0.3 毫克/毫升以上时, 消光与浓度的比值略有降低。葡萄糖浓度为 0.05 毫克/毫升的消光值是 0.217 ± 0.004 , 浓度为 0.25 毫克/毫升的消光值是 1.039 ± 0.017 。由于大部分褐藻的褐藻淀粉含量在 1—10% 之间, 而且褐藻淀粉的重量和水解后产生的葡萄糖的重量相近, 因之, 根据测定标准葡萄糖溶液的最适浓度的结果, 对海藻粉的稀释倍数, 通常约为一千倍为宜。

采用葡萄糖氧化酶法不同作者, 选用的保温时间有所不同, 从最短为 10 分钟到最长为 30 分钟止^[4,6], 由于保温时间的长短会影响酶促反应的进行完全与否, 为此, 在本实验的条件下, 对保温时间的

影响进行了测定。共选用了 10 分钟、20 分钟和 30 分钟三种保温时间, 在保温时间到之后, 加 1:1 浓度的盐酸中止反应, 然后进行消光的测定, 结果见表 1, 保温 10 分钟的消光值明显低于保温 20 分钟的消光值。用标准葡萄糖溶液 (浓度为 0.1 毫克/毫升) 测定之结果, 平均约低 20%, 用海藻水解液测定之结果, 平均约低 26%, 而 20 分钟后, 再增加保温时间至 30 分钟, 其消光值仅略有提高, 相差数在测定误差范围内。由此证明, 保温时间 10 分钟, 酶促反应尚未进行完全, 而增加到 20 分钟的保温时间时, 则反应已基本上完成, 为能保证反应充分进行, 在以后的实验中均采用了 30 分钟的保温时间。

表1 不同保温时间对显色反应的影响

样 品	保温时间 (分)	消 光 (E)	实测葡萄糖量 (毫克/毫升)
葡萄糖溶液 (0.1毫克/毫升)	10	0.336	0.0787
	20	0.420	0.0984
	30	0.427	0.1000
海藻水解液	10	0.145	0.0340
	20	0.189	0.0443
	30	0.197	0.0461

表2 对褐藻淀粉测定的精密度

实验编号	测定结果 (褐藻淀粉%)
1	87.2
2	83.6
3	84.4
4	85.1
5	88.1
6	88.6
平均值	86.1
标准偏差	±2.10
相对标准偏差	2.44%

本法对褐藻淀粉的测定的精密度结果见表 2, 用纯品褐藻淀粉作试样, 经盐酸水解后进行测定, 褐藻淀粉的含量为 86.1%, 相对标准偏差为 2.44%。所测之含量较低, 数值偏低之原因, 主要是因褐藻淀粉和一般的高等植物的淀粉之含水性质极为类似, 含水量较高。次之, 还由于其组成中含有约二十分之一的非葡萄糖成分^[7], 曾用其他方法测定提纯的褐藻淀粉的含量, 也曾得出同样偏低的结果, 含量在 82—88%。

在用酶法测定血液中葡萄糖含量的研究中, 曾发现血中的成分如蛋白质等, 对此方法发生干扰, 需另外进行样品处理, 方能得出满意的结果^[8]。由于海藻中也含有蛋白质和其他多种成分, 为了确定这些成分是否会影响测定结果, 我们进行了在海藻样品中外加不同量的褐藻淀粉的实验, 结果见表 3。选用了一种褐藻淀粉含量高的铜藻 (*S. horneri*), 1978 年采于福建东山岛, 含量为 10.3%; 一种含量低的铜藻, 1978 年采于广东靖海, 含量为 1.65%, 分别加入已知准确重量褐藻淀粉, 进行实测的结果, 所加的褐藻淀粉重量与实测的重量平均相差为 1.70% 和 3.92%, 均在标准偏差范围内, 由此证明海藻水解液中的全部组成成分, 不对本方法的精密度发生干扰。将海藻水解后, 只要进行中和, 不需再经任何处理, 就可直接用于测定。尽管海藻中存在有一定量的蛋白质, 可能由于其含量低于血液, 而且又经过水解处理过程, 因之, 不再对测定发生影响。

显色后, 颜色稳定时间的测定见表 4, 当样品加酶液保温 30 分钟后, 加 1:1 盐酸中止反应, 立即测定消光值, 然后每间隔 30 分钟测定一次, 到 2 小时后为止。在 1 小时内的消光值的变化数在相对偏差范围之内, 而延长至 2 小时, 消光值呈现降低。曾有作者用 530 毫微米的波长进行分光光度法测定^[6], 我们在本实验的同一条件下, 用 530 毫微米和

表3 海藻样品中的褐藻淀粉含量的测定

测定结果 (毫克)	样品编号	铜藻 I*			铜藻 I		
		1	2	3	1	2	3
总 量		103	190	211	24.8	114	197
海藻中的褐藻淀粉		103	103	103	24.8	24.8	24.8
外加褐藻淀粉		0	85.1	168	0	86.0	170
实测外加褐藻淀粉		0	87.5	169	0	89.2	177
相对误差%			2.82	0.595		3.72	4.12

* 铜藻 *Sargassum horneri* (Turn) C. Ag.

I. 1978年采用福建东山; II. 1978年采自广东靖海.

表4 显色后颜色稳定时间的测定

样 品	波长 (毫微米)	放置时间 (分)	消光 (E)
葡萄糖溶液 (0.1毫克/毫升)	400	0	0.425
		30	0.424
		60	0.425
		120	0.420
	530	0	0.154
		30	0.158
		60	0.144
		120	0.149
葡萄糖溶液 (0.2毫克/毫升)	400	0	0.839
		30	0.863
		60	0.863
		120	0.847
	530	0	0.321
		30	0.307
		60	0.304
		120	0.301

和400毫微米的波长之测定进行了比较实验,从表4中可以看出,530毫微米的消光值比较小,因之,我们的实验仍采用400毫微米波长。从显色颜色稳定时间的测定结果,显色后样品的测定易在60分钟内完成为宜。

酶液配制后,在放置期间内,本身会自行发生轻微的显色反应,经我们测定,每10分钟约增加0.01消光值,因之,进行测定时,除对样品和酶空白必须采用同一份酶试剂外,还注意避免取两者的酶试剂的间隔时间太长,以免影响精密度。

四、结 语

通过实验证实,葡萄糖氧化酶,过氧化物酶和联大茴香胺法,可用于测定海藻样品中的褐藻淀粉含量,测定方法是0.5毫升海藻水解液(葡萄糖溶液浓度在0.05—0.25毫克/毫升之范围内)加5毫升酶试剂(22.4毫克葡萄糖氧化酶,0.56毫克过氧化物酶,1.2毫

克联大茴香柠檬酸盐, 2毫克柠檬酸, 12毫克柠檬酸钠), 在38°C下保温30分钟, 加0.5毫升1:1盐酸, 在400毫微米波长下用分光光度计测定。精密度测定的结果, 相对标准偏差为2.44%。海藻需先经1N盐酸水解, 水解液的其他成分对测定的精密度不发生干扰。

参 考 文 献

- (1) Chapman, A. R. O. and Craigie, J. S., *Mar. Biol.*, 46 (1978), 3, 209—213.
- (2) Besterman, E. M. M., *Atherosclerosis*, 12 (1970), 1, 75—83.
- (3) Chapman, A. R. O. and Craigie, J. S., *Mar. Biol.*, 40 (1977), 3, 197—205.
- (4) Comer, J. P. and Brichley, H. F., *Anal. Chem.*, 31 (1959), 1, 109.
- (5) Kramer, L., et al., *J. Clin. and Lab. Invest.*, 1960, 12, 76—79.
- (6) 中国科学院微生物研究所纤维素酶组, *微生物学报* 16(1976), 3, 240—248.
- (7) Black, W. A. P., Cornhill, W. J., Dewar, E. T. and Woodward, F. N., *J. Applied. Chem.*, 1951, 1, 505—517.

DETERMINATION OF LAMINARAN IN BROWN ALGAE BY GLUCOSE OXIDASE, PEROXIDASE AND DIANISI- DINE METHOD

Zhao Xuewu and wang Zuoyun

(Shandong College of Oceanology, Qingdao)

ABSTRACT

Glucose oxidase, peroxidase and dianisidine method may be used to determine laminaran in brown algae. Its procedure was that the seaweed was hydrolyzed and filtrated, then 0.5 ml of filtrate (the concentration of glucose should be from 0.05 mg to 0.25 mg per ml) was added to a test tube and 5ml of an enzyme reagent (22.4 mg glucose oxidase, 0.56 mg peroxidase, 1.2 mg dianisidine citrate, 2 mg citric acid monohydrate and 12 mg sodium citrate dihydrate) was added. The tube was shaken and held for 30 min at 38 °C. Then 0.5 ml 1:1 HCl was added. The color was read at 400nm by spectrophotometer. It was found that the relative standard deviation was 2.44%. The seaweed need hydrolysis by 1 N HCl before it was used. The accuracy of determination was not interfered by the hydrolysis products.