

铜藻的褐藻淀粉的提取和磺化方法

赵学武 王作芸

(山东海洋学院)

郑昆勤 许遵柔

(广东汕头制药厂)

提 要

本文报导了从铜藻中提取褐藻淀粉的试验情况。自1974年10月到1975年3月,按月采集藻样。分析其褐藻淀粉含量:结果表明,褐藻淀粉从无到有地递增,3月份最高,可达4.92%。

将干藻粉用稀盐酸溶液提取,再经乙醇分级沉淀法分离提纯,制备出褐藻淀粉,然后将其用甲酰氨—氯磺酸磺化,最适磺化温度和时间为35°C和45分钟,可得含硫量(S%)为 20 ± 1 的褐藻淀粉硫酸酯钠盐。这是一种具有降血脂疗效的药物。

马尾藻属的海藻是我国资源最丰富的野生藻类。早在50年代初期,曾呈奎和纪明侯等就曾对它的利用进行过研究,成功地利用马尾藻提取褐藻酸钠^[1],以后又进行提取碘、甘露醇和氯化钾等的综合利用试验。但迄今为止,被工业所利用的成分仍只少数。由于褐藻中还含有其它多种成分,若能进一步综合利用,必定会降低成本,为马尾藻的利用创造条件。

海藻含有的成分与陆生植物差异颇大。褐藻淀粉是一种普遍存在于褐藻体内的贮存多糖,主要组成是C₁和C₂。结合的 β -D吡喃葡萄糖多聚化合物,将其磺化为褐藻淀粉硫酸酯后,具有抗高血脂和改善血液微循环的作用。国外,已有作为降脂和防止冠心病有效药理试验报导^[4,5]。我们试制的褐藻淀粉硫酸酯,经过药理试验^[2],及上海心血管病研究所药理和初步临床观察^[3],证明其药效较显著,有可能成为防治冠心病的药物。此外,岳阳制药厂以此为主要组成成分之一,试制成双重造影硫酸钡粉剂^[4],已经鉴定为正式药品。因之,对马尾藻的褐藻淀粉的提取和磺化方法的研究,对开展马尾藻的工业利用有一定的意义。

材 料 与 方 法

马尾藻——铜藻(*Sargassum horneri* (Turn) C. Ag)采自广东省惠来县靖海镇海边。

(1) 湖南省科委,1980。岳阳 III 型胃肠双造影硫酸钡技术鉴定书(未发表)。

从 1974 年 10 月至翌年 3 月份,每月采集一次,天然晒干后留存待用。以后,又分别采集了 1976 年 3 月份和 1977 年 3 月份的藻体。

对褐藻淀粉含量的测定,由于考虑到是作为工业利用提取资料,因此将藻中的褐藻淀粉先分离和提纯后,再用 Cameron 等的方法^[6],测定褐藻淀粉的含量。提取方法是将铜藻粉与 0.1N 盐酸溶液(pH 2)以 1:10 比例混合,在室温下搅拌提取 2 小时,用 60 目筛绢滤掉藻渣,滤液呈黄褐色并且粘稠度较大,静置 24—48 小时后有沉淀出现,但经 Cameron 法测定证实此沉淀物不是褐藻淀粉。由此证明铜藻中不含不溶性褐藻淀粉,或者仅含有微量。因之,在以后的提取过程中,提取液不再静置,而直接在其中加入 95% 的乙醇至 50%(W/W),加入后生成大量胶体沉淀,离心弃去沉淀,再在上清液中继续加入乙醇至 80%(W/W),有淡黄色或灰白色沉淀出现,收集沉淀并用 95% 乙醇和无水乙醇洗涤,干燥后即得粗褐藻淀粉(纯度约 80%)。将粗褐藻淀粉重溶于水,加乙醇至 50%(W/W),离心弃去沉淀,继续加乙醇至 85%(W/W),收集沉淀并用乙醇洗涤,干燥后即得精品,纯度为 85—90%。

磺化方法是将 100 份甲酰氨在冰浴中搅拌并逐滴加入 36 份氯磺酸,全过程控制温度不超过 5°C,然后加入 10 份褐藻淀粉,搅拌并加温(35°C)磺化 45 分钟,磺化后搅拌加入 750 份 95% 乙醇,静置 1 小时后,滤取沉淀,将沉淀用 95% 乙醇洗涤 3 次后,溶于 75 份水中,搅拌加入 15 份 10N 氢氧化钠,减压搅拌 1 小时后,通过阳离子交换树脂 H⁺型(Merck I),收集 pH 2 的交换液,离子柱以少量蒸馏水冲洗,合并交换液与冲洗液,用 NaOH 调至 pH 8,加入 1 倍半的 95% 乙醇,静置过夜,过滤,将滤渣用蒸馏水溶解,加入活性炭搅拌约 1 小时,滤去活性炭,调 pH 至 7.5,加入 1 倍半 95% 的乙醇,静置 4 小时以上,滤取沉淀,用 95% 乙醇洗涤 2 次,在 60°C 下干燥,即得褐藻淀粉硫酸酯。

磺化后成为褐藻淀粉硫酸酯的含硫量(S%),是样品经酸水解,加 BaCl₂ 生成的沉淀经灰化,以重量法测定;比粘度——在 20°C 下用滚球式粘度计分别测定蒸馏水和 2% 褐藻淀粉硫酸酯水溶液的粘度;比旋光度——在室温中以钠光源用旋光计测定 2% 褐藻淀粉硫酸酯水溶液;毒性——将褐藻淀粉硫酸酯的生理盐水溶液,注射于平均体重为 18—20 克的健康小白鼠腹腔中,以最大耐受量为 10 毫克/只作为合格。

实验结果与讨论

1. 铜藻褐藻淀粉含量的季节变化

铜藻从 10 月份开始长成幼小苗体,到翌年 3 月份生长为成体,藻体上有生殖托出现。将 1974—1975 年各个月份采集到的样品进行含量分析,其结果:10 月份无;11 月份 2.12%;12 月份 2.57%;翌年 1 月份 3.31%;2 月份 3.28%;3 月份 4.32%。由于采集条件所限,1976 年和 1977 年只采集了 3 月份的藻样进行分析。1975 年 3 月份 4.32%;1976 年 3 月份 3.45%;1977 年 3 月份 3.82%。系先经提纯后再测定含量,这种测定法对实际生产上的提取利用虽有参考价值,但因提取过程中将损失掉一部分褐藻淀粉,因之,上述的测定数值将比藻体的实际含量低。

从季节来分析广东铜藻的褐藻淀粉含量的变化,与北欧的海带属和墨角藻属的含量

变化明显不同。马尾藻属的含量是春季最高,秋季低;而海带属和墨角藻属却通常是初春最低,秋季高^[6,9]。但从藻体的个体发育时期来进行比较,含量的变化规律仍有相同趋势,即褐藻淀粉都是在藻体快速生长期含量最低,生长减缓和转入成熟时期,藻体积累量最高。

2. 铜藻褐藻淀粉的提取方法

铜藻不同于其它的能够提取可溶性褐藻淀粉的藻类品种,它的盐酸提取液中含有较多的有粘性的多糖,经沿用 Black 等的提取方法,直接加乙醇至 80%(W/W)使其沉淀,或继续用离子交换树脂处理,均无法得到纯度较高的产品^[7]。我们改用乙醇分级沉淀办法,先加乙醇至 50%(W/W),弃去生成的沉淀,然后再加乙醇至 80%(W/W),沉淀出褐藻淀粉,再精制一次,则可得到纯品,不需再经离子交换树脂处理。Black 等也曾用酒精分级沉淀法提纯掌状海带 *L. digitata* 的粗褐藻淀粉^[7],纯度与我们的第一次的粗制品相近,为 80.1%。但因其用的第一次沉淀的酒精浓度太高,为 70%,以致回收率太低,只有 14%。

用酒精分级沉淀法提纯褐藻淀粉,酒精的耗损是主要成本之一。应尽量设法提高提取液的浓度,以节约酒精用量,可通过下述三方面进行:

(1) 藻与水的不同比例对褐藻淀粉提取率的影响 将藻与盐酸溶液以 5:100;10:100 和 20:100 比例分别进行提取,其中以 5:100 之比例的提取率最高,为 4.23%。其次是 10:100,提取率为 3.82%。结果见表 1。

表 1 藻与提取液的不同比例对提取率的影响

藻 粉(克)	提取液(毫升)	褐藻淀粉(克)	提 取 率(%)
20	400	0.847	4.23
40	400	1.528	3.82
80	400	2.714	3.39

(2) 一次提取与连续提取对褐藻淀粉提取率的影响 将藻粉与盐酸提取液按 10:100 之比例,一份提取液只提取一次,另一份提取液连续提取 3 份或 4 份藻粉(连续提取时,均系每次提取完后,补加提取液至 10 份,再进行下一步的提取)。一次与三次连续提取进行比较,一次提取率为 2.15%,三次连续提取率为 1.75%,连续提取比一次提取约低 25%。一次与四次连续提取进行比较,一次提取的提取率为 4.9%,四次连续的为 3.4%,连续提取比一次提取约低 30%。结果见表 2。

表 2 定量提取液一次提取与连续提取对提取率的影响

提 取 方 式	藻 粉(克)	褐藻淀粉(克)	提 取 率(%)
一 次	500	10.75	2.15
连续三次	500 × 3	26.36	1.75
一 次	100	4.92	4.9
连续四次	100 × 4	13.64	3.4

尽管连续三次或四次提取仅达到一次提取的提取率的70%左右,但由于其提取液的含量要比一次提取约大三倍,这将大大地减少提纯过程中的酒精的消耗。由于藻粉比较便宜,在成本中占的比重比酒精耗损小。因之,从成本核算考虑,连续提取方法在工业生产中仍有一定的实用价值。

(3) 将提取液减压浓缩对褐藻淀粉提取率的影响 将同一份提取液分为相等的二份,一份按上述之提取方法制备;另一份先用 NaOH 中和后,经减压浓缩(550—600 毫米汞柱,60°C)为原体积的 1/3,然后再按相同的提取方法制备。经减压浓缩处理的提取率为 1.59%,未经减压浓缩处理的为 1.55%,两者基本相等。

3. 铜藻褐藻淀粉的最适磺化条件

磺化条件对褐藻淀粉的磺化程度、褐藻淀粉硫酸酯的得率、药物的药效和毒性的大小,均有明显的影响^[4,10],其中影响较大的条件是温度、磺化时间以及甲酰氨与褐藻淀粉的比例等因子。为了确定最适磺化条件,我们应用了正交试验设计。根据预备试验的结果,当磺化温度为 20°C、35°C 和 50°C,磺化时间为 45 分、60 分和 120 分,含硫量均可控制在 17—20% 的范围内。因之采用正交试验设计 $L_9(2^7)$ 表。见表 3。

表 3 褐藻淀粉磺化条件试验设计表

水 号	因 素	温 度°C	时 间(分)	甲 酰 氨: 氯 磺 酸
	1		35	45
2		50	90	66:24

试验结果见分析表(表 4)。最适磺化条件的选择以得率为标准,其他指标如含硫量、比粘度、比旋和毒性仅作为磺化后产品的质量参考指标。通过分析,以温度为 35°C、时间 45 分和氯磺酸与褐藻淀粉比例——甲酰氨 100 份;氯磺酸 36 份;褐藻淀粉 10 份为最适

表 4 正交试验结果分析表

试 验 号	A	B	A×B	C	A×C	B×C	得 率 (点)	S%	比 旋 [α] _D ²⁵	比 粘 25°C	毒 性
	1	2	3	4	5	6					
1	1	1	1	1	1	1	23.66	19.7	-11.4	1.15	合格
2	1	1	1	2	2	2	20.09	18.1	-5.95	1.17	合格
3	1	2	2	1	1	2	28.33	19.3	-10.7	1.15	合格
4	1	2	2	2	2	1	17.38	17.0	-5.92	1.20	合格
5	2	1	2	1	2	1	15.52	17.9	-2.98	1.21	合格
6	2	1	2	2	1	2	15.32	17.4	+6.26	1.09	合格
7	2	2	1	1	2	2	16.65	18.7	+5.94	1.14	合格
8	2	2	1	2	1	1	11.00	18.3	+2.12	1.09	合格
K_1	89.46	74.59	17.40	84.16	78.81	67.56					
K_2	58.49	73.36	76.55	63.79	69.64	80.39					
$K_1 \sim K_2$	30.97	1.23	-5.15	20.37	8.67	-12.83					

条件。

从参考指标中可以看出,当温度为 50°C 时,产品的比旋和比粘度降低,说明温度偏高时,引起褐藻淀粉本身的水解。温度过高不仅影响产品的质量,而且由于褐藻淀粉的分解破坏,也引起了得率的降低。

褐藻淀粉的磺化程度,亦即其含硫量与药效和毒性关系非常密切。磺化后含硫量高的产品,不仅缺乏降低高血脂的药效,而且产生过高的抗凝血作用^[10]和较大的毒性。故磺化最优条件的选择,必须以能使含硫量稳定在药效较高而且毒性较低的水平上。通过正交试验选出的磺化条件,除可使含硫量保持在 20% 左右和毒性较低外,同时经过进一步的药效试验,证明不同批次的产品,均具有明显的血脂澄清作用^[21]。

参 考 文 献

- [1] 曹益奎、纪明候,1962。马尾藻胶的研究,1.海蒿子褐藻胶的提取条件。海洋科学集刊 1:140—158。
- [2] 汕头制药厂、山东海洋学院等,1978。褐藻淀粉硫酸酯的试制及药理实验。中草药通讯 2:17—18。
- [3] 韩琴琴、庄汉忠、陈丽珠,1980。褐藻淀粉硫酸酯降脂及抗凝作用初步研究。中华心血管杂志 8(3):218—220。
- [4] Adams, S. S. *et al.*, 1957. The anticoagulant activity and toxicity of laminarin sulfate K. *J. Pharm. and Pharmacol.* 9: 459—463.
- [5] Besterman, E. M. M., 1970. Experimental coronary atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 12 (1): 75—83.
- [6] Black, W. A. P., 1949. Seasonal variation in chemical composition of some of the littoral seaweeds common to Scotland. II. *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis* and *Pelvetia canaliculata*. *J. Soc. Chem. Ind.* (London) 68: 183—189.
- [7] Black, W. A. P., W. J. Corbhill, E. T. Dewar and F. N. Woodward, 1951. Manufacture of algal chemicals. III. Laboratory scale isolation of laminarin from brown marine algae. *J. Appl. Chem.*, I, 505—517.
- [8] Cameron, M. C., A. G. Ross and E. G. V. Percival, 1948. Methods for the routine estimation of mannitol, alginic acid and combined fucose in seaweeds. *J. Soc. Chem. Ind.* (London) 67: 161—164.
- [9] Chapman, A. R. O., and J. S. Craigie, 1977. Seasonal growth in *Laminaria longicrusis*: relations with reserve carbohydrate storage and production. *Mar. Biol.*, 46 (3): 209—213.
- [10] O' Neill, A. N., 1955. Sulfated derivatives of laminarin. *Can. J. Chem.* 33: 1097—1101.

METHODS FOR EXTRACTION AND SULPHATING OF LAMINARAN FROM *SARGASSUM HORNERI* (TURN) C. Ag

Zhao Xuewu and Wang Zuoyun

(Department of Marine Biology, Shandong College of Oceanology)

Zheng Kunqin and Xu Zunrou

(Shantou Pharmaceutic Factory)

Abstract

The seasonal variation of laminaran content in *Sargassum hornori* collected

monthly from October, 1974 to March, 1975. The investigation reveals that there is no laminaran in October. The content gradually increased from November until it reached a maximum of 4.32% in March of the next year.

Dried seaweeds are extracted with a dilute HCl solution. The laminaran was isolated and purified by the method of fractional precipitation with alcohol.

Laminaran was sulfated in formamide with chlorosulphonic acid. The optimum sulphating temperature and treating times were found to be at 35°C and for 45 min. The resultant Na laminaran sulfate contains about 20% S.