

褐藻酸 9-氮杂茚比色定量方法的研究*

紀明侯 張燕霞

(中国科学院海洋研究所)

褐藻酸系 1881 年 Stanford^[19] 首次从褐藻中的昆布类分离出的一种褐藻藻体細胞壁內所特有的多醣。以后的工作^[12,14] 証实它为 C1, 4 鍵合的 β -D-多聚甘露糖醛酸。七十多年来,褐藻胶(这个名詞包括褐藻酸及其盐类)在許多工业特别是食品工业和紡織工业中找到了广泛的用途,目前在許多沿海国家都进行着生产。

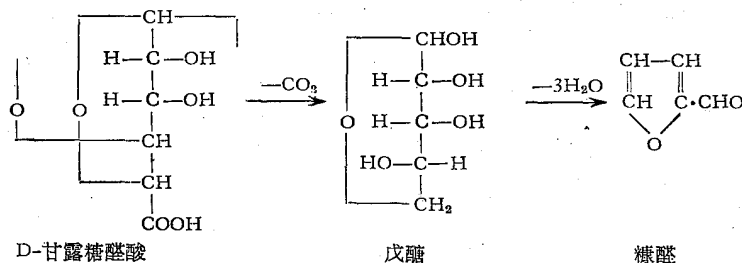
在我国,1953 年首次自馬尾藻中試制褐藻胶成功^[1],并肯定馬尾藻类是我国制造褐藻胶的良好原料,1954 年后不断进行車間試驗,1957 年初开始正式生产。随着海带的人工养殖产量不断增长,也将有部分可以用以提取褐藻胶。于是,褐藻胶在食品、医药、紡織、科学研究以其产品规格的鉴定方面都迫切地需要一个簡單而准确的定量方法,以便測定褐藻胶样品或者褐藻样品中的褐藻酸实际含量。自然,这对于研究褐藻的生理生化現象也是很重要的。

褐藻酸的定量方法至目前为止在文献中可查到的大致可分为重量法、滴定法、CO₂ 法、比色法。这些方法各有利弊,至今还没有一个很理想的定量方法。

重量法是比较最原始而粗糙的定量方法。即称取定量海藻加碳酸鈉溶液加热提取数次,加酸凝聚,干后称量^[3];或轉变成鈉盐称量^[2]。重量法的缺点即提取不完善,凝聚不完全,故提取量較低,但却接近工业上的实际提取量。

有的方法是将凝聚的褐藻酸鈣加酸处理轉变成褐藻酸,加入过剩碱使其溶解,用酸回滴定过剩碱^[5];或于褐藻酸中加乙酸鈣溶液,以碱滴定生成的乙酸^[7]。这些方法实际上是測定重量法所得产品中的褐藻胶含量,适于褐藻胶成品純度的鉴定用,而不适于測定海藻中褐藻胶的含量,因为提取和凝聚过程的限制,所得数值偏低。

褐藻酸經热酸(19% HCl)水解,可以产生 CO₂ 和糠醛^[14],即:



* 中国科学院海洋研究所調查研究报告第 163 号。

如果条件控制得好,反应可定量地进行。因而有的方法就用烧碱石棉剂或 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液吸收并测定所生成的 CO_2 , 以算出褐藻酸含量^[16]; Perlin^[18] 则不加溶剂或催化剂, 只于 255°C 进行高温热解脱羧, 测定其产生的 CO_2 。 CO_2 法是假定 CO_2 都是由糖醛酸的羧基生成的, 实际上是比较准确而可靠的测定方法, 惟其水解时间太长, 不能用作大量测定, 但可用以鉴定某一测定方法的准确性。

另外还有的方法是利用酸水解生成的糠醛与不同试剂产生的颜色反应进行比色测定。Brown 等^[6]应用对-甲苯二酚 (Orcinol, 即 Bial 试剂) 与褐藻酸加热水解, 呈绿色反应, 以此比色, 但该试剂本身颜色易呈深暗, 不易控制, 且不易保存。Hanson 等^[11]以间-萘二酚 (Naphthoresorcinol) 与褐藻酸加热水解, 显色, 然后以戊醇抽提, 比色, 但该试剂价贵, 且操作较烦。Dische^[8]首次发现 9-氮杂茚(carbazole)与糖类有显色反应; Gurin 等^[10]则试用此法研究了包括褐藻酸在内的许多戊糖、己糖的定性和定量; 江上^[4]用此法试验了许多糖类的颜色变化; 后来 Dische^[9]又指出, 9-氮杂茚法的灵敏度当含 5% 糖醛酸时于 530 毫微米的吸收值为最大; 其后 Percival 等^[17]以及 Jensen 等^[11]都用此法作过褐藻酸的定量试验。

9-氮杂茚法简便, 所用试剂便宜。前人所做的定量操作大致是相似的。基本操作是: 取 0.1—0.4 克海藻以 0.2N H_2SO_4 处理, 然后以 Na_2CO_3 溶液提取, 取定量滤液 (或称取定量褐藻酸钠溶解于水) 于冰水中以每秒钟 1 滴的速度共加入 18 毫升浓 H_2SO_4 , 同时要不断搅拌, 然后, 放入 80°C 水浴中加热水解 5 分钟, 其后加入 0.2% 9-氮杂茚酒精液溶, 则显红色, 45 分钟后比色。

此方法中存在一些缺点, 本工作的目的在于改进此操作方法, 使其简化, 适于大量分析。

一、实验用器材与方法

试剂 9-氮杂茚酒精溶液系取 9-氮杂茚 (BDH, L. R.) 以 85% 乙醇配成 0.5% 溶液; 其他药品都为国产纯化级别。

比色仪器 对于褐藻酸钠成品的测定使用 H675 型 Spekker 光电比色计, 4 号绿色滤光片和 10 毫米比色槽; 对海藻中的褐藻胶含量测定时, 则因故改用上海沪江仪器厂出品荧光光电比色双用计, 530 号绿色滤光片和直径 12.5 毫米比色管。

水解装置 如图 1 所示。

CO_2 测定法 CO_2 测定装置如图 2 所示, 即将 Lunde 等^[15] 和 McCready 等^[16] 所用的测定装置稍加改进而成。准确称取 0.5 克烘干海藻粉末 (100 号筛孔以下), 加入 20 毫米 0.2N H_2SO_4 处理一夜, 过滤, 用水洗涤, 将海藻连同滤纸一起放入图 2 所示分解瓶中 (如用褐藻酸钠时则称取 0.2 克烘干品), 先抽气排出整个系统中的 CO_2 气, 然后分解瓶中注入 30 毫升 19% HCl , 两吸收瓶中各注入 25 毫升 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液, 分解瓶以砂浴加热至 140°C

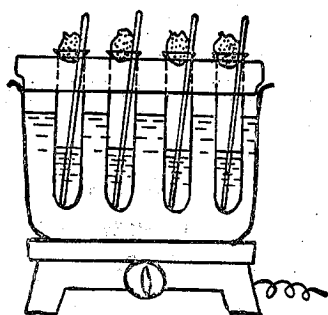


图1 水解浴
Fig. 1. Hydrolysis bath

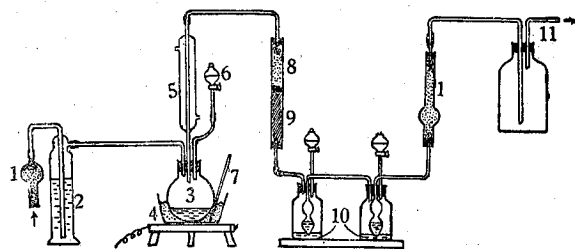


图2 CO₂ 测定法装置
Fig. 2. CO₂ determination apparatus

- | | |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1. 空气入口, 烧碱石棉剂 (Ascarite) | 6. 19% HCl |
| 2. 50% NaOH 溶液 | 7. 温度计 |
| 3. 分解瓶 | 8. 锌粒 (20 号筛孔) |
| 4. 砂浴 | 9. Dehydrite |
| 5. 冷凝管 | 10. 0.1N Ba(OH) ₂ 溶液 |
| | 11. 空气出口, 抽气 |

使酸液沸腾, 2 小时后再注入 30 毫升 19% HCl, 然后再维持 2 小时。其间所生成的 CO₂ 气经过锌粒和 Dehydrite 去掉微量 HCl 气和水分, 通入 Ba(OH)₂ 溶液中被吸收。最后合并两瓶中的溶液以 0.1 N HCl 滴定剩余的 Ba(OH)₂, 算出 CO₂ 生成量, 减去空白测定值后算出样品中的褐藻酸含量。褐藻酸的单酯分子量以 176 计, 其钠盐以 198 计, CO₂ 的生成量对褐藻酸为 25.0%, 对其钠盐为 22.2%。

褐藻酸含量回滴定法 先制取褐藻酸, 水洗至无 Cl⁻ 反应, 以酒精脱水, 干后准确称取 0.05—0.1 克, 加入 25.0 毫升 0.02N NaOH 溶液, 溶解后以酚酞指示, 用 0.02N HCl 回滴定, 算出褐藻酸或其钠盐的实际含量。

二、实验结果与讨论

1. 标准溶液的配制 褐藻胶的比色定量时首先应解决的问题就是标准溶液的配制。以普通提取方法自褐藻中所得到的褐藻胶经提纯后如能直接用作标准则最为理想, 但事实上褐藻酸盐成品中还包含有某些量的无机物和有机物不纯杂质, 不全是褐藻酸盐。例如最初我们将海蒿子(一种马尾藻)用不同前处理(热水、稀硫酸处理除掉无机物)后, 制得的褐藻酸钠(灰分 25.6%)再加水溶解, 加酸凝聚, 水洗至无 Cl⁻ 反应, 加 NaOH 溶液使溶解, 乙醇脱水。如此反复提纯 4—6 次, 灰分仍为 24.8—25.3%。另外取一份样品溶解后包于玻璃纸中于蒸馏水中透析 10 天(每天换水一次), 其灰分由 25.0% 可降至 22.4%。由于灰分量依提纯次数而变, 因而作了多次标准曲线都稍有差异。最后乃采用滴定法, 由滴定值分别计算出各个浓度褐藻酸或其钠盐的实际含量(表 1)。这样所得数值不受褐藻胶中夹杂的不纯物的影响。

2. 水解用硫酸浓度 前人所用的方法中都强调加浓硫酸水解, 但这在操作中非常不方便: 一为加浓硫酸水解后加 9-氮杂蒽溶液时, 如条件控制不好, 很易产生绿色不正常颜

表 1 以标准 HCl 回滴定法算出褐藻酸的实际浓度
Table 1. Actual conc. of alginic acid calculated from back titration with
standard HCl soln

1. 褐藻酸来源	2. 粗褐藻酸的浓度 (毫克/毫升)	3. 褐藻酸含量 (%)	4. 褐藻酸的实际 浓度 (毫克/毫升)	5. 褐藻酸钠的实际 浓度 (毫克/毫升)
A. 海蒿子 (<i>Sargassum pallidum</i>) 1958-IX-17 采, 褐藻酸 灰分 0.69%	0.0473	89.8	0.0424	0.0477
	0.0873	89.8	0.0784	0.0882
	0.1239	89.8	0.1112	0.1252
	0.1700	89.8	0.1528	0.1728
	0.2200	89.8	0.1905	0.2142
B. 海蒿子 (<i>S. pallidum</i>) 1958-VIII-26 采, 褐藻 酸灰分 0.61%	0.0420	95.6	0.0401	0.0453
	0.0324	95.6	0.0786	0.0884
	0.1180	95.6	0.1128	0.1268
	0.1410	95.6	0.1348	0.1515
	0.1780	95.6	0.1700	0.1910
C. 海带 (<i>Laminaria japonica</i>) 1958-V-10 采	0.0492	90.5	0.0445	0.0501
	0.0940	90.5	0.0850	0.0956
	0.1040	90.5	0.0941	0.1055
	0.1545	90.5	0.1398	0.1572
	0.1810	90.5	0.1638	0.1840

1. Source of alginic acid;
2. Conc. of crude alginic acid (mg/ml);
3. Content of alginic acid;
4. Actual conc. of alginic acid (mg/ml);
5. Actual conc. of Na-alginate (mg/ml);
- A. Collected on 1958-IX-17; Ash content of alginic acid produced 0.69%;
- B. Collected on 1958-VIII-26; Ash content of alginic acid produced 0.61%;
- C. Collected on 1958-V-10.

色(正常颜色为红色);二为加酸速度太慢(每秒钟 1—2 滴,且温度不得升高),费时间太长,加完 18 毫升达一个半小时以上,并且消耗酸量也相当多。我们的实验结果证实,用 4:1 的稀硫酸完全可以代替浓硫酸。我们也试验过江上^[4]所用 8:1 的硫酸水解,但曲线的重复性并不好。

3. 硫酸与样品溶液的混合条件 前人曾强调加硫酸时,不得使温度上升,故必须在冰水中一边搅拌一边滴入硫酸。我们由于用 4:1 硫酸代替了浓硫酸,试验表明,只要在冰水中将样品溶液徐徐沿着盛有 4:1 硫酸的试管内壁注入,然后混合即可,虽然温度稍为上升一些,但对结果并无影响。为了比较起见,还将试管放于自来水中(与室温相同),试验所得消光数比在冰水中者稍为偏低;但如果此时用浓硫酸,则不论在冰水或自来水中都出现绿色的不正常现象。

4. 水解时间 前人都是在加酸后放 80℃ 水浴中加热 5 分钟,使褐藻酸水解成糠醛,然后加入 9-氮杂茚乙醇溶液,45 分钟后比色。我们考虑到所用酸浓度比前人所用较稀,水解时间应适当延长,水解温度应适当提高。我们试验了 30、45、60 分钟的水解时间,于

沸水中水解,其后加入 9-氮杂芴液,繼續于沸水中加热 10 分钟,取出,室温放冷 20、30、分钟后进行比色。表 2 結果表明,30 分钟可使褐藻酸水解完全;水解后放置 20—40 分钟,各比色讀数差异很小,为了使溶液能尽量接近室温,我們采用 40 分钟的放置時間。

表 2 不同水解時間和比色前的放置時間对比色讀数的影响

Table 2. The influence of different hydrolyzing time and standing time until colorimetric detn on the readings of colorimeter

1. 粗褐藻酸钠浓度 (毫克/毫升)	2. 水解時間 (分)	3. 加入9-氮杂芴 液之后加热時間 (分)	4. 比色前放置不同時間的消光($E \times 100$)		
			20 分	30 分	40 分
0.079 A. (制自海蒿子)	30	10	10.5	10.2	10.3
0.079	45	10	9.6	9.8	10.2
0.079	60	10	9.7	9.8	9.6
0.095 B. (制自海带)	30	10	9.6	9.7	9.7
0.095	45	10	9.7	9.7	9.4
0.095	60	10	9.4	9.6	9.7

1. Conc. of Na-alginate (mg/ml);
2. Hydrolyzing time (min.);
3. Heating time after the addition of carbazole soln (min.);
4. Extinction on standing different time (min.) until colorimetric detn.;
- A. Crude Na-alginate from *Sargassum pallidum*;
- B. Crude Na-alginate from *Laminaria japonica*.

表 3 由标准曲线查得的粗褐藻酸钠样品中所含褐藻酸钠实际含量

Table 3. Actual content of Na-alginate in crude Na-alginate found from the standard curve

1. 褐藻酸钠来源	2. 粗褐藻酸钠浓度(毫克/毫升)	3. 平均消光 ($E \times 100$)	4. 褐藻酸钠的实际浓度 (毫克/毫升)	5. 褐藻酸钠含量(%)	6. 由 CO_2 法算得的褐藻酸钠含量(%)
A. 海 带	0.0513	6.5	0.0405	78.6	78.2
海 带	0.0529	6.0	0.0375	72.2	73.8
海 带	0.0544	6.3	0.0390	71.7	72.0
B. 海 蒿 子	0.0488	6.0	0.0370	75.8	75.2

1. Source of Na-alginate;
2. Conc. of crude Na-alginate (mg/ml);
3. Average extinction;
4. Actual conc. of Na-alginate (mg/ml);
5. Content of Na-alginate;
6. Content of Na-alginate calculated from CO_2 detn method;
- A. Na-alginate from *Laminaria japonica*; B. from *Sargassum pallidum*.

5. 改进后的比色法 取 10 毫升 4:1 的硫酸注入普通試管 (2×18 厘米) 中, 将其放于冰水中。吸取 1 毫升标准溶液 (已用回滴定法确定了其实际浓度) 或經脫色处理后的海藻提取液, 沿試管内壁徐徐流入試管中的硫酸上部, 以玻璃棒攪勻, 用紗布包的棉花塞将試管口塞好 (以防玻璃棒的水滴流下), 放沸水浴中 (图 1) 水解 30 分钟, 然后加入 0.3 毫

升 0.5% 9-氮杂苈乙醇溶液，显紅色，放沸水中再加热 10 分钟，最后于室温放置 40 分钟即以光电比色计进行比色。上述标准溶液用此法比色，所得到的标准曲线如图 3 所示，即不论是海带或者是馬尾藻，不同浓度的褐藻酸的消光数都落在一直线上，符合比色要求。

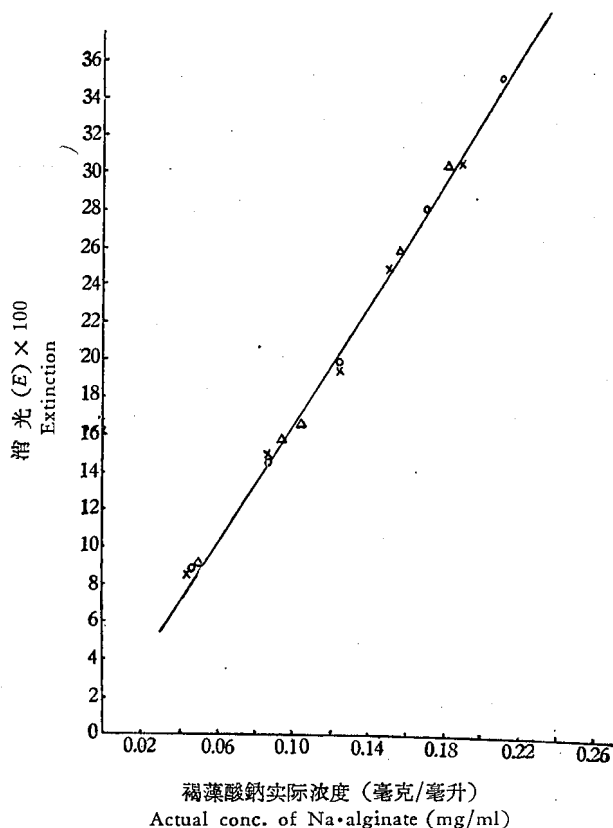


图 3 褐藻酸钠溶液的标准曲线
(使用 Spekker 光电比色计制作)

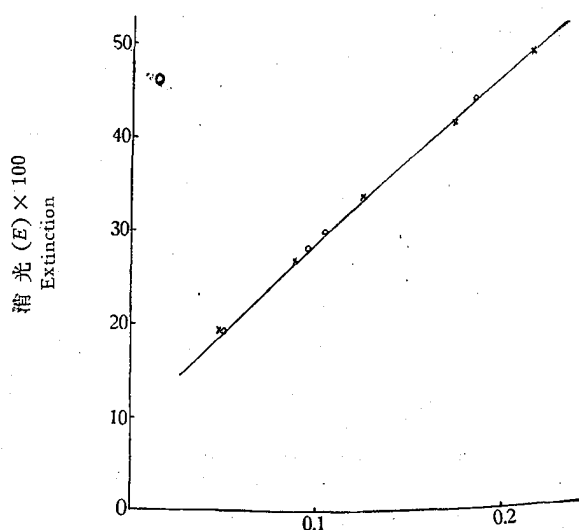
Fig. 3. Standard curve of Na-alginate using Spekker electrophotometer
 × Na-alginate from *Sarg. pallidum* 海蒿子褐藻酸钠 (1958-VIII-26 采原料)
 ○ Na-alginate from *Sarg. pallidum* 海蒿子褐藻酸钠 (1958-IX-17 采原料)
 △ Na-alginate from *Lam. japonica* 海带褐藻酸钠 (1958-V-10 采原料)

6. 用作褐藻酸钠纯度的测定 利用上述比色方法和标准曲线对于在实验室以不同方法制备的几份褐藻酸钠进行了比色测定，结果如表 3 所示。同时还以 CO_2 测定法(装置如图 2)测定了 CO_2 生成量，计算出褐藻酸量以作比较。

由结果看，比色法与 CO_2 法所得褐藻酸钠实际含量很相符合，相差在 2% 以下。这就表明本方法不论在加酸条件、酸浓度以及水解条件等都是满意的，适于褐藻胶成品纯度的鉴定用。

7. 用作海藻中褐藻酸含量的测定 此比色法还适于对褐藻中的褐藻胶含量的测定，褐藻酸的提取方法基本上是用 Percival 等^[7]对海带类所用的方法。但我们对馬尾藻的测定中发现提取液的色素太浓，以致所得测定数值比 CO_2 测定者偏高，其后经在提取液中加入

活性炭处理后,得到了滿意的結果。我們用最后确定的方法测定了几份馬尾藻和海带中的褐藻胶含量。方法是:准确称取 0.1 克烘干海藻粉末(100 号篩孔以下),加入 20 毫升 0.2N H_2SO_4 , 攪拌,放置一夜,滤去酸液,水洗 4—5 次,将海藻与滤紙一同移入 100 毫升錐形瓶中,加入 50 毫升 3% Na_2CO_3 溶液,放水浴上(80—85°C)时刻搖动加热处理 $2\frac{1}{2}$ 小时。然后取下,室温放置一夜,过滤,充分水洗約 7~8 次,将滤液与洗滌液合并,并稀释至 250 毫升。吸取其 25 毫升,加入 2 克活性炭,攪拌并放置 40 分钟,过滤。准确吸取 1 毫升滤液,按照上述比色法用国产螢光光电比色双用比色計进行比色測定[因仪器更換,故用該仪器对前述标准溶液重新作了标准曲綫(图 4)]。与此同时,为了比較起見,还以 CO_2 測定法和一般工业式定量法测定了海藻中的褐藻酸含量,以鈉盐表示,所得結果如表 4。



褐藻酸鈉实际浓度 (毫克/毫升)
Actual conc. of Na-alginate (mg/ml)

图 4 褐藻酸鈉溶液的标准曲綫
(使用上海产螢光光电比色双用計制作)

Fig. 4. Standard curve of Na-alginate soln using
Shanghai-made electrophotometer

- Na-alginate from *Laminaria japonica* 海带褐藻酸鈉 (1958-V-10 采原料)
× Na-alginate from *Sargassum pallidum* 海蒿子褐藻酸鈉 (1958-IX-17 采原料)

所得数值表明,比色和 CO_2 測定法很相吻合。并且几次个别測得的比色結果的相对平均偏差在 1% 以下,例如: 3 号海藻取三次样品所得結果分別为 26.4, 26.6, 26.8%, 平均 26.6%; 4 号海藻分別为 24.9, 24.4, 24.8%, 平均 24.7%, 67 号海藻分別比色測得为 24.9, 24.4, 24.2%, 平均为 24.5%。由此可見,此法用以測定海藻中褐藻胶含量是較理想的。一般工业式定量法由于提取和过滤不完善,并且加酸凝聚时,据我們的經驗,低

表 4 以不同方法測定褐藻中的褐藻酸含量 (以鈉鹽表示)

Table 4. Content of alginic acid (as Na salt) by different determination methods

1. 海藻 編號	2. 褐藻 種名	3. 採集地點與日期	4. 比色法		5. CO ₂ 測定法			6. 普通工業測定法 測得褐藻 酸鈉(%)
			A. 平均 消光 (E × 100)	B. 褐藻 酸鈉 (%)	C. 海藻樣 品稱量 (克)	D. CO ₂ 生 成量(克)	E. 褐藻酸 鈉(%)	
2	F. 海蒿子	青島, 1954-VI-16	29.0	20.3	0.6030	0.0279	20.8	12.6
3	海蒿子	青島, 1954-VIII-14	34.0	26.4	0.8980	0.0537	26.9	18.4
4	海蒿子	青島, 1954-XI-15	33.8	24.9	0.5728	0.0318	25.0	19.3
59	G. 海帶	大連, 1959-V-12	27.0	22.4	0.6530	0.0325	22.4	—
67	H. 海帶	青島, 1959-IV-18	31.2	24.9	0.9620	0.0547	25.6	23.4
79	I. 海帶	煙台, 1959-V-14	28.0	23.5	0.7090	0.0370	23.5	—

1. No. of raw material;

2. Brown algae;

3. Date and locality of collection;

4. Carbazole method;

5. CO₂ detn method;6. Content of Na-alginate by general industrial method (% ⁹⁰ oven-dried raw material);

A. Average extinction;

B. Na-alginate (% ⁹⁰ oven-dried raw material);

C. Seaweed sample taken (g.);

D. CO₂ evolved (g.);E. Na-alginate (% ⁹⁰ oven-dried raw material);F. *Sargassum pallidum* collected in Tsingtao;G. *Laminaria japonica* collected in Dalian, Tsingtao and Yantai respectively.

分子量褐藻酸部分凝聚不出來，損失量增多，特別是貯藏已久的海藻其損失量尤為顯著，因而所得最後結果偏低，但它卻近似於工業的實際提取量，故在工廠條件下可適用。

三、結 語

褐藻酸定量法中 9-氮杂芴比色法是一種較方便而準確的方法，惟前人所用方法中有一些缺點，故至今還很少被採用。我們將其加以改進後很適於大量分析。實驗結果大致如下：

1. 標準褐藻酸溶液系將不同份褐藻酸加碱溶解，然後以標準酸回滴定過剩碱，分別計算出褐藻酸的實際含量，以此比色作圖，這樣比用提純的褐藻酸鈉直接配制要準確得多。

2. 確定水解所用的硫酸以 4:1 的濃度較前人所強調的濃硫酸為適宜。加酸條件也改為直接加入，而不是一滴一滴地加入，這樣既可節省大量酸，又能縮短操作時間，由原來的 2 小時縮短至數分鐘，且不會產生不正常的顏色。但水解時間須由過去的 5 分鐘適當地延長至 30 分鐘，以保證水解完全。

3. 最後，列出改進後的比色方法。用此比色定量法與 CO₂ 測定法測定了粗制褐藻酸

和褐藻中的褐藻酸含量(以鈉盐表示),所得結果互相比較很相符合。个别比色結果的重复性也很好,相对平均偏差在1%以下。表明改进后的方法是滿意的,适于对褐藻酸鈉产品和褐藻中褐藻酸的大量样品定量分析。

参 考 文 献

- [1] 科学通报, 1953。褐藻胶試制成功。7: 98。
- [2] 曾呈奎、紀明侯, 1962。馬尾藻褐藻胶的研究 I。海蒿子褐藻胶的提取条件。海洋科学集刊, 1: 140—158。
- [3] 越智主一郎、高桥武雄, 1933。褐藻类ノ化学的成分ニ关スル研究。东京工业試驗所报告, 第28回, 第4号。
- [4] 江上不二夫, 1941。カルバゾール法による糖類及びその誘導体の確認及び定量。日本化学会志, 62: 277—280。
- [5] Black, W. A. P. and J. N. Woodward, 1954. Alginates from common British brown marine algae. "Natural Plant Hydrocolloids", Advances in Chemistry Series, 11: 83—91.
- [6] Brown, E. G. and T. J. Hayes, 1952. The determination of small quantities of alginates in rayon finishes and on yarn. *Analyst*, 77: 445—453.
- [7] 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.
- [8] Dische, Z., 1930. Some new characteristic color tests for thymonucleic acid and a microchemical method for determining the same in animal organs by means of these tests. *Mikrochemie*, 8: 4—32. (C.A., 24:1879, 1930.)
- [9] ———, 1947. A new specific color reaction of hexouronic acids. *J. Biol. Chem.*, 167: 189—198.
- [10] Gurin, S. and D. B. Hood, 1939. The identification and estimation of hexoses in polysaccharides and glycoproteins by the carbazole method. *J. Biol. Chem.*, 131: 211—213.
- [11] Hanson, W. R., C. T. Mill and R. T. Williams, 1944. A study of the determination of glucuronic acid by the naphthoresorcinal reaction, with the photoelectric absorptiometer. *Biochem. J.*, 38: 274—279.
- [12] Hirst, E. L., J. K. N. Jones and W. O. Jones, 1939. Structure of alginic acid. I. *J. Chem. Soc.*, 1939: 1880—1885.
- [13] Jensen, A., I. Sunde and A. Haug, 1955. The quantitative determination of alginic acid. *Norweg. Inst. Seaweed Res., Report No. 12.*
- [14] Lunde, G., 1937. Der Meerestang als Rohstoffquelle. *Angew. Chem.*, 50: 731—734.
- [15] Lunde, G., E. Heen und E. Öy, 1938. Untersuchungen über Alginsäure. I. Über die Konstitution der Alginsäure. *Koll. Zeit.*, 83: 196—210.
- [16] McCready, R. M., H. A. Swenson and W. D. Maclay, 1946. Determination of uronic acids. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)*, 18: 290—291.
- [17] Percival, E. G. V. and A. G. Ross, 1948. A colorimetric method for the estimation of alginic acid in seaweed specimens. *J. Soc. Chem. Ind. (London)*, 67: 420—421.
- [18] Perlman, A. S., 1952. Thermal decarboxylation of uronic acids. *Can. J. Chem.*, 30: 278—290.

STUDIES ON THE CARBAZOLE COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ALGINIC ACID

M. H. JI AND Y. X. ZHANG

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

(ABSTRACT)

Among the methods for the determination of alginic acid in brown algal samples, the carbazole colorimetric method is the most convenient and accurate one. But the method as employed by earlier workers has many drawbacks and so up to date it was seldom used. In the present investigation we have tried to improve the method and make it practicable for alginic acid determination in the routine analysis of algal samples. The results obtained in the investigation may be summarized as follows:

1. Standard solution of alginic acid was prepared by neutralizing various quantities of alginic acid with alkali and back-titrating the excess alkali with acid. Then the actual contents of alginic acid were calculated respectively.

2. A diluted solution of H_2SO_4 ($4 \text{ H}_2\text{SO}_4 : 1 \text{ H}_2\text{O}$) was employed in the hydrolysis instead of concentrated H_2SO_4 as employed by earlier workers. We have found that in this way, not only smaller amount of the acid was used and the procedure completed in a few minutes instead of $1\frac{1}{2}$ —2 hours, but also the production of an abnormal color could be avoided. The dil. H_2SO_4 was added in bulk instead of adding the required concentrated H_2SO_4 drop by drop. However, the time of hydrolysis required should be prolonged from 5 min. in the previous method to 30 min. in the present method.

3. An improved colorimetric method was given. Results obtained by this method for the determination of alginic acid in crude algin product and brown algal samples were compared favorably with those by the CO_2 -method, and the relative average deviation of the improved method was below 1%. It has been shown that the method as improved by the present study is quite satisfactory and accurate enough for the routine analysis.