

# 柱前衍生-高效液相色谱法测定浒苔多糖的组成

段元慧<sup>1</sup> 邢丽红<sup>2</sup> 丁海燕<sup>2</sup> 任丹丹<sup>1</sup> 宋海妹<sup>3</sup> 尚德荣<sup>2</sup> 翟毓秀<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 大连海洋大学食品科学与工程学院, 大连 116023)

(<sup>2</sup> 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>3</sup> 中国海洋大学生物工程开发有限公司, 青岛 266071)

**摘 要** 研究了浒苔多糖样品经三氟乙酸完全水解而无损失的最适条件, 并且在优化流动相洗脱程序等色谱条件的基础上, 建立了 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生-高效液相色谱法分析浒苔多糖的单糖组成及含量的方法。该方法采用配备紫外检测器的高效液相色谱仪, 在 250 nm 波长下进行测定, 外标法定量。结果表明, 在此条件下, 8 种单糖能够良好分离, 各单糖在 1 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内具有良好的线性关系, 相关系数  $r \geq 0.999$ , 回收率在 76.0% - 108% 之间, 相对标准偏差  $RSD < 10\%$ 。采用该方法对浒苔多糖样品进行组成及含量分析, 发现无论样品原料为何种浒苔, 浒苔多糖均以鼠李糖为主, 同时还含有葡萄糖醛酸、葡萄糖、木糖、半乳糖以及少量的甘露糖、半乳糖醛酸和岩藻糖。

**关键词** 浒苔多糖; 单糖; 衍生化; 高效液相色谱

**中图分类号** 文献标志码 A **文章编号** 1000-7075 (2014)02-0117-07

## Analysis of monosaccharides in Enteromorpha polysaccharide by pre-column derivatization high performance liquid chromatography

DUAN Yuan-hui<sup>1</sup> XING Li-hong<sup>2</sup> DING Hai-yan<sup>2</sup> REN Dan-dan<sup>1</sup>  
SONG Hai-mei<sup>3</sup> SHANG De-rong<sup>2</sup> ZHAI Yu-xiu<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Food Engineering College, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Aquatic Product Quality, Safety Test and Evaluation, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>3</sup> Biotechnology Development Co. Ltd, Ocean University of China, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** Nowadays, the function of Enteromorpha polysaccharide has attracted widespread attentions. However, due to the lack of test methods, the product quality and efficacy evaluation of Enteromorpha polysaccharide were compromised. In this study, the optimal conditions under which the samples of Enteromorpha polysaccharide were completely hydrolyzed by trifluoroacetic (TFA) acid without loss. Based on the optimization of the mobile phase elution procedures and other chromatographic conditions, the pre-column derivatization- high performance liquid chromatography (HPLC) u-

国家科技支撑计划项目(2007BAD62B01)和国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ14014906)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85846230

收稿日期:2013-09-16;接收日期:2013-10-25

作者科介:段元慧(1987-),女,硕士研究生,主要从事食品营养与安全研究。E-mail: happy.yuanhui@163.com

sing 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) to analyze the composition and content of monosaccharides in *Enteromorpha* polysaccharide was established. Monosaccharides in *Enteromorpha* polysaccharide were determined by HPLC under 250 nm wavelength, and were quantified by external standard method. It was found that 8 species of monosaccharides in *Enteromorpha* polysaccharide can be completely separated under the chromatographic condition. The monosaccharides had good linear relation in the range of 1 – 100  $\mu\text{g/ml}$ , and its correlation coefficient was equal to or greater than 0.999. The average recovery rate was between 76% and 108%, and the relative standard deviation (RSD) was below 10%. The strength of this method is the ability to analyze the composition of *Enteromorpha* polysaccharide, and it is found in this study that the most important monosaccharides in *Enteromorpha* polysaccharide were rhamnose; glucuronic acid, glucose, xylose, galactose, and small amounts of mannose, galacturonic acid and fucose were also detected.

**KEY WORDS** *Enteromorpha* polysaccharide; Monosaccharide; Derivatization; High performance liquid chromatography (HPLC)

浒苔 *Enteromorpha prolifera* 属于绿藻门、石莼目、石莼科,是一种耐干性的大型经济藻类,在我国各海域均有分布,属黄海、东海海域优势种(金浩良等 2011)。关于浒苔品种,目前国际上已报道有 10 余个变种及变型(丁兰平等 2009),目前对于浒苔品种的鉴别是困难的。浒苔多糖是从浒苔中提取的含有硫酸基团的水溶性杂多糖(Qi *et al.* 2005; 徐宝芹等 2012)。研究显示,绿藻多糖通常可分为两类,一类为木糖-阿拉伯糖-半乳糖聚合物,另一类为葡萄糖醛酸-木糖-鼠李糖聚合物(吴明江等 2007; 张会娟等 2009; Lahaye *et al.* 1999),其具体组分和结构随绿藻种类的不同而有所不同。Li 等(2013)对浒苔多糖活性研究表明,浒苔多糖具有超强的抗氧化活性,抑制超氧阴离子自由基的能力强于维生素 C。Noda 等(1990)对多种海藻的抗肿瘤活性进行了筛选,发现绿藻中浒苔的抑制活性最强; Yu 等(2003)研究发现浒苔多糖具有降血脂的作用; Hellio 等(2001)发现浒苔多糖具有较强的抗菌、抗病毒活性;《本草纲目》中也记载浒苔具有抗凝血的活性(齐晓辉等 2010)。

目前多糖测定最常用的方法是苯酚-硫酸法,但该方法测定的是总糖含量,无法确定其单糖组成,且测定结果不稳定,受试剂、仪器的影响较大。由于碳水化合物的光学特性较差,利用高效液相色谱法时需利用紫外或者荧光试剂对样品进行衍生化处理测定(Lin *et al.* 2005)。Honda 等(1989)最先利用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化来增强碳水化合物的紫外吸收; Dai 等(2010)、丁成丽等(2012)利用 PMP 对盐生杜氏藻多糖、新疆桃胶多糖等样品进行柱前衍生化处理,衍生化产物较稳定,不易裂解,分析时不产生异构峰(Dai *et al.* 2010; 丁成丽等 2012)。在多糖的结构分析中,单糖组成的测定是一项重要内容,在本研究选择的色谱条件下,能够逐一分离多种单糖,方便地进行定性定量分析,可为将来浒苔多糖的定量研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

高效液相色谱仪(Agilent 1100),配紫外检测器;电子分析天平;恒温水浴震荡器;离心机;烘箱;涡旋仪;主要试剂:1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP),乙腈(色谱纯),磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),氢氧化钠(NaOH),三氟乙酸(TFA),三氯甲烷。

单糖及糖醛酸标准品:L-鼠李糖(Rha),D-甘露糖(Man),岩藻糖(Fuc),D-葡萄糖(Glu),D-半乳糖(Gla),木糖(Xyl),半乳糖醛酸(Gla-UA),D-葡萄糖醛酸(Glu-UA)。实验用水均为超纯水。

本研究所用样品为中国海洋大学生物工程开发有限公司提供的浒苔提取物干粉,其主要成分为多糖。实验时间为 2013 年 5 月 23 日 – 8 月 12 日。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 主要试剂的配制

1 mg/ml 单糖标准储备液:准确称取各单糖的标准品 10 mg,超纯水溶解并定容至 10 ml,配制成浓度为 1 mg/ml 的单糖标准储备液,于 4℃ 冰箱中冷藏保存。

混合标准溶液:取 1 mg/ml 的单糖标准储备液适量,分别稀释成浓度梯度为 1、5、10、25、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的混合标准溶液。此混合标准溶液现用现配。衍生化试剂 PMP:准确称取 8.71 g PMP,用甲醇定容至 100 ml。  
2 mol/L 的 TFA 溶液:准确量取 29.7 ml TFA,加水定容至 200 ml。0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液:准确称取 1.36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,加 80 ml 去离子水溶解,用氨水调节 pH 至  $6.9 \pm 0.01$ ,再用去离子水定容至 100 ml。  
50 mmol/L 磷酸缓冲液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH, pH 6.9):准确称取 6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,加 900 ml 去离子水溶解,用 0.3 mol/L NaOH 调节 pH 为  $6.9 \pm 0.01$ ,定容至 1000 ml,备用。

### 1.2.2 浒苔多糖的水解

准确称取浒苔多糖样品 0.1 g 于 25 ml 水解管中,加入 10 ml 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸溶液,封管后于 110℃ 烘箱中水解。分别采用不同的时间(1、2、3、4、5、6、8、10、12 h)于 110℃ 下水解,取出后室温冷却,加入 10 ml 浓度为 2 mol/L 的 NaOH 溶液中和,调节 pH 至中性,然后用 0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液定容至 25 ml。经衍生化处理后用高效液相色谱仪分析各单糖的含量变化。

### 1.2.3 衍生化处理

分别取配制好的单糖标准溶液和水解后的样品 1 ml 于试管中,分别加入 1 ml 浓度为 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液,振荡混匀,然后加入 1 ml 的衍生化试剂 PMP,振荡混匀后置于 70℃ 恒温水浴中反应 60-70 min。取出后冷却至室温,加入 1 ml 0.3 mol/L 醋酸溶液中和,震荡混匀,用 0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液定容至 5 ml,充分混匀,取 2 ml 于 10 ml 的玻璃试管中,然后加入 4 ml 氯仿萃取,充分震荡,使 PMP 衍生化试剂融入下层氯仿中,取上清液重复萃取两次,然后将上层水相过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,供高效液相色谱测定分析。

### 1.2.4 色谱条件

色谱柱:Agela Venusil XBP-C (2);柱温:30℃;流速:1.0 ml/min;流动相:流动相 A 为 15% 乙腈(V/V) + 50 mmol/L 磷酸缓冲液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH, pH 6.9),流动相 B 为 40% 乙腈(V/V) + 50 mmol/L 磷酸缓冲液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH, pH 6.9);梯度洗脱模式:时间梯度为 0 min  $\rightarrow$  9 min  $\rightarrow$  25 min  $\rightarrow$  45 min  $\rightarrow$  60 min  $\rightarrow$  65 min,相应的流动相 A 的浓度梯度为 100%  $\rightarrow$  92%  $\rightarrow$  80%  $\rightarrow$  75%  $\rightarrow$  70%  $\rightarrow$  100%;紫外检测器:波长 250 nm;进样体积:20  $\mu\text{l}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

为将浒苔多糖中各单糖高效分离并进行定性分析,本研究对浒苔多糖可能含有的甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖醛酸、半乳糖、木糖、岩藻糖 8 种标准单糖的 PMP 衍生物的高效液相色谱分离条件进行了优化。由于有机溶剂乙腈和高浓度的盐溶液相遇时会有盐析出,造成柱压不稳,将不同比例的乙腈和所需浓度的磷酸盐混合后作为流动相,能够避免这一现象的发生,且能够延长柱子的使用寿命。实验选用不同比例的磷酸盐和乙腈作为流动相,最终选定含乙腈体积比分别为 15% 和 40% 的 A、B 两种流动相。实验尝试不同 pH 值的盐溶液和乙腈混合作为流动相,结果显示,当盐溶液 pH = 6.9 时(与乙腈混合后溶液的 pH = 7.2-7.6),分离效果最理想。由于等度洗脱方式很难将 PMP 衍生化试剂与甘露糖、鼠李糖完全分离,实验比较分析了两种流动相的不同比例以及不同洗脱时间对分离效果的影响。结果表明,随着有机相比例较大的流动相 B 的比例增加,各单糖的出峰时间提前,分离所用时间较短,但是分离效果不理想,不易将混合标准溶液中的各物质完全分离。经过反复试验后得到最优的二元梯度洗脱模式,如表 1 所示。

该洗脱程序能够将 8 种单糖完全分离,且基线平稳、峰形良好,能够准确地进行定性定量分析,标准溶液色谱图见图 1。由于多糖水解后成分较复杂,分离时间较长,在保证分离效果的前提下,缩短出峰时间也是优化色谱条件的一项重要任务。另外,流动相的 pH 值也是影响分离效果的一个重要因素,pH 值的变化会改变各单糖的保留时间和分离效果,本方法中 pH 的最佳值为 6.9。

## 2.2 水解条件及衍生化条件的确定

由于之前的研究未涉及浒苔多糖及其相关产品水解成单糖的条件,而样品基质不同,水解所需条件也不同。实验研究了浒苔多糖在 110℃ 下水解 1、2、3、4、5、6、8、10、12 h 等不同时间对结果的影响,浒苔多糖中单糖随水解时间变化见图 2。结果表明,随着水解时间的延长,衍生化产物的峰面积先是上升,趋于平稳后开始显著减小或平缓地趋于减小。由图 2 可知,在 110℃ 条件下,浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸水解 5 h 时,浒苔多糖已水解完全,且含量稳定,基本无损失。考虑到含量的稳定性及水解的完全程度,将 110℃ 水解 5 h 确定为最佳的水解条件。

为确定衍生化实验的最佳条件,对 PMP 的用量及衍生化时间和温度做了实验分析,实验表明,PMP 与样品体积比为 1:1 时为最佳用量,最佳温度为 70℃,衍生化时间为 70–80 min。

## 2.3 标准曲线和检出限

以单糖浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果表明,各单糖标准溶液在 1–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内呈现良好的线性关系。各单糖的保留时间、标准曲线回归方程、相关系数、线性范围及检出限见表 2。

## 2.4 方法的回收率和精密度

为确定方法的准确性和可靠性,进行了加标回收实验和精密度实验。对水煮醇沉的浒苔多糖样品进行 5 次加标测定分析,加标浓度分别为 10、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,结果见表 3,各单糖的平均加标回收率在 76%–108% 之间,相对标准偏差均小于 10%,表明该方法的准确度和精密度可以满足浒苔多糖样品的测定要求。

## 2.5 浒苔多糖样品的测定

浒苔多糖样品经前述水解和衍生化处理,经三氯甲烷萃取过滤膜后上机测定。样品 A 为某公司脱盐脱蛋白所得浒苔多糖样品,样品 B 为某药业公司中试产品,样品 C 为某研究所实验室提取产品,样品 D 为某公司液体浒苔产品。4 种浒苔多糖样品的色谱图如图 3 所示。

表 1 流动相梯度洗脱比例

Table 1 Elution program of the mobile phase

时间梯度 Time gradient (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0	100	0
10	92	8
25	80	20
45	75	25
60	70	30
65	100	0

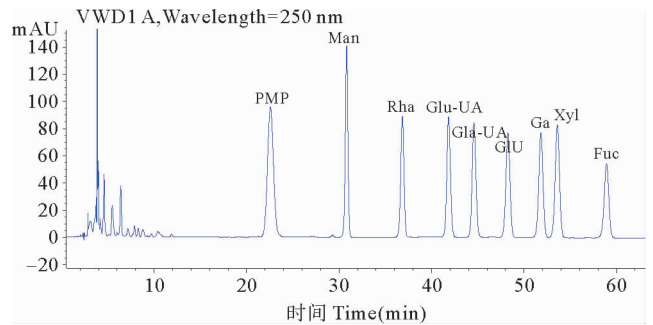


图 1 单糖标准溶液 PMP 衍生物的色谱图

Fig. 1 Chromatograph of PMP-labeled monosaccharide standards

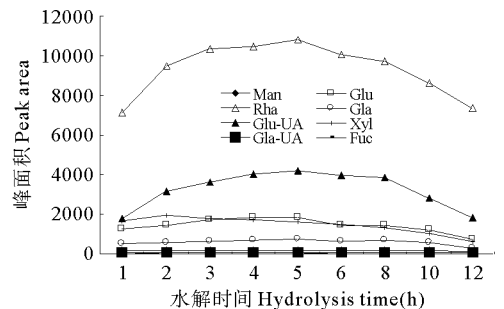


图 2 浒苔多糖中各单糖含量随水解时间的变化  
Fig. 2 Variation of the Enteromorpha monosaccharides contents versus hydrolysis time

表2 单糖的线性回归方程、相关系数、线性范围及检出限

Table 2 Regression equation, correlation coefficients, linear range and detection limit of monosaccharides

标准溶液 Standard solution	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>R</i> Correlation coefficient	线性范围 Linear range (μg/ml)	检出限 Detection limit (μg/ml)
甘露糖 Man	30.820	$y = 27.791x + 13.155$	0.9998	1—100	0.5
鼠李糖 Rha	36.845	$y = 21.586x + 2.898$	0.9997	1—100	1.0
葡萄糖醛酸 Glu-Ua	41.831	$y = 27.698x - 4.899$	0.9998	1—100	1.0
半乳糖醛酸 Gla-Ua	44.578	$y = 24.092x + 3.569$	0.9997	1—100	1.0
葡萄糖 Glu	48.258	$y = 23.817x + 10.853$	0.9995	1—100	1.0
半乳糖 Gla	51.819	$y = 23.905x + 33.204$	0.9996	1—100	1.0
木糖 Xyl	53.598	$y = 27.063x + 14.522$	0.9998	1—100	1.0
岩藻糖 Fuc	58.915	$y = 20.704x + 21.846$	0.9990	1—100	1.0

表3 方法的加标回收率和精密度结果 ( $n = 5$ )Table 3 Recoveries and RSD of the present method ( $n = 5$ )

单糖 Monosaccharides	空白值 Blank (μg/ml)	不同添加浓度的回收率 Recovery rate of different addition level			
		25 μg/ml		10 μg/ml	
		回收率 Recovery rate (%)	相对标准偏差 RSD (%)	回收率 Recovery rate (%)	相对标准偏差 RSD (%)
甘露糖 Man	1.5	107.5	1.3	101.2	1.2
鼠李糖 Rha	3.4	87.3	7.7	75.7	6.5
葡萄糖醛酸 Glu-Ua	2.8	105.4	5.3	91.9	5.1
半乳糖醛酸 Gla-Ua	—	96.7	0.6	96.0	3.2
葡萄糖 Glu	6.6	97.9	4.8	92.1	8.1
半乳糖 Gla	1.5	108.2	0.8	101.7	6.0
木糖 Xyl	3.5	91.1	2.6	85.7	8.4
岩藻糖 Fuc	—	88.8	3.7	82.9	7.4

“—”表示该物质含量低于检出限 Means the content is below the detection limit

由图3可见,各单糖的分离效果较好,重复性好,可方便地进行定性和定量计算。由于样品各不相同,原料产地、品种、加工方式等的差异,导致样品测定中各单糖的含量差异较大,但从色谱图来看,浒苔多糖样品所含的单糖种类一致,只是含量不同,且鼠李糖均为主要单糖。表4为样品中各单糖的含量,其中,样品A各单糖含量较高,鼠李糖达到了192.04 g/kg。

### 3 结论

本研究对浒苔多糖及其相关产品完全水解成单糖而又无损失的临界条件进行研究,并在Honda等(1989)的研究基础上利用PMP对样品进行衍生化处理,通过调节流动相比例及洗脱程序等色谱条件,实现了8种目标单糖的完全分离,从而实现了浒苔多糖中各单糖的快速定性定量分析。该方法操作简单、重现性好,准确度和精密度满足测定要求,为研究浒苔多糖的结构组成、生理活性及定量分析提供了技术基础。

采用本方法对浒苔多糖的衍生化产物进行单糖的组成和含量的测定分析,测定结果显示,浒苔多糖样品中主要含有鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、半乳糖醛酸、甘露糖及岩藻糖等,其中鼠李糖含量最高,葡

萄糖和葡萄糖醛酸次之。

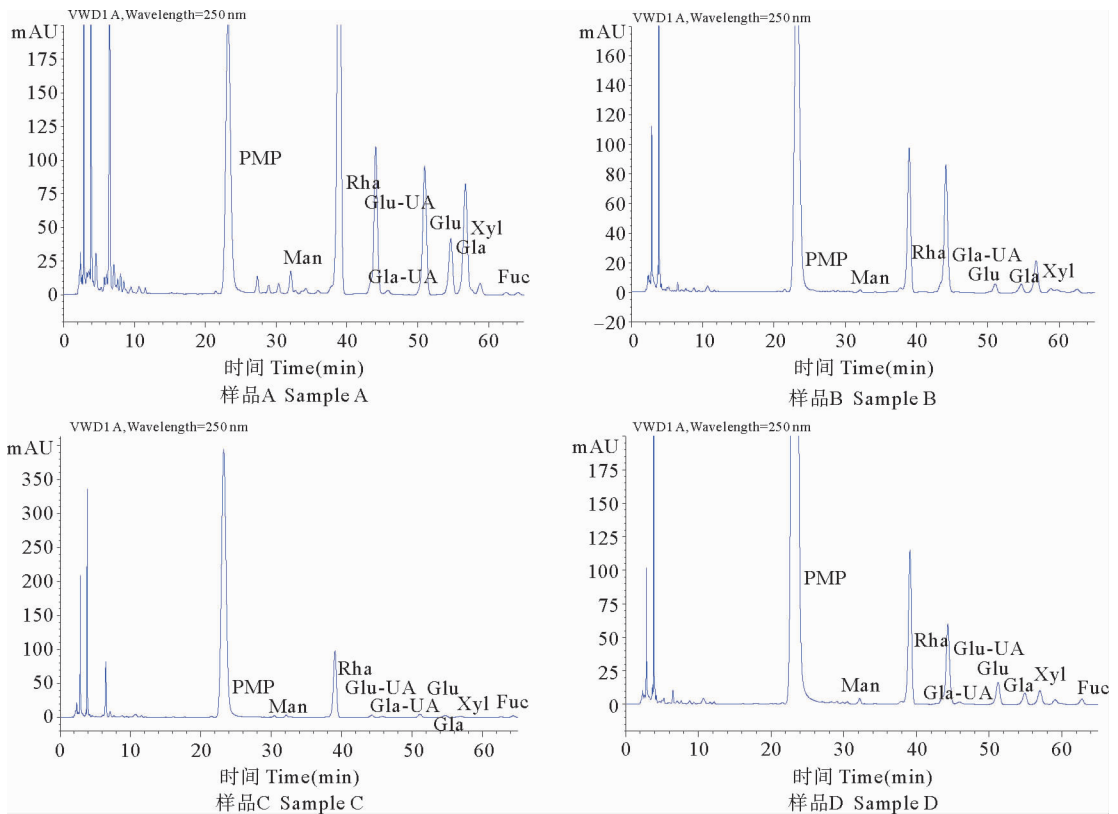


图3 4种浒苔多糖样品衍生化产物的高效液相色谱图

Fig. 3 Chromatographs of derivatized *Enteromorpha* polysaccharide in four samples

表4 4种浒苔多糖样品中各单糖含量

Table 4 Content of monosaccharides in four *Enteromorpha* polysaccharides samples

单糖 Monosaccharide	样品 A(g/kg) Sample A	样品 B(g/kg) Sample B	样品 C(g/kg) Sample C	样品 D(g/kg) Sample D
甘露糖 Man	3.56	0.51	1.19	1.44
鼠李糖 Rha	192.04	57.08	63.07	75.04
葡萄糖醛酸 Glu-Ua	42.39	50.72	2.36	37.80
半乳糖醛酸 Gla-Ua	1.23	—	—	—
葡萄糖 Glu	46.33	4.34	3.83	14.27
半乳糖 Gla	15.38	3.45	2.13	5.90
木糖 Xyl	26.81	10.83	1.35	6.14
岩藻糖 Fuc	0.87	1.64	0.67	3.16

“—”:该物质含量低于检出限 Means the content is below the detection limit

## 参 考 文 献

- 丁兰平, 栾日孝. 2009. 浒苔 (*Enteromorpha prolifera*) 的分类鉴定、生境习性及其分布. 海洋与湖沼, 40(1): 68-71
- 丁成丽, 刘力, 王强. 2012. 柱前衍生高效液相色谱法分析新疆桃胶的多糖组成. 分析科学学报, 28(3): 319-322
- 齐晓辉, 李红燕, 郭守东, 陈萌, 陈艳丽, 徐健, 侯玉娇, 毛文君. 2010. 4种不同来源浒苔中多糖的提取分离及理化性质. 中国海洋大学学报,

40(5): 15 - 18

- 吴明江,焦丽丽,孙永旭,李天宝,张丽萍. 2007. 浒苔多糖 EPⅢ的分离与鉴定. 东北师大学报(自然科学版), 39(1): 97 - 100
- 张会娟,毛文君,房芳,李红燕,齐晓辉. 2009. 绿藻多糖结构与生物活性研究进展. 海洋科学, 33(4): 90 - 93
- 金浩良,徐年军,严小军. 2011. 浒苔中生物活性物质的研究进展. 海洋科学, 35(4): 100 - 106
- 徐宝芹,张立新,王帆. 2012. 缘管浒苔粗多糖的气相色谱-质谱分析和初步分离. 科技信息, (19): 7 - 8
- Dai J, Wu Y, Chen SW and 4 others. 2010. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. Carbohydr Polym 82(3): 629 - 635
- Hellio C, De La Broise D, Dufossé L and 2 others. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. Mar Environ Res 52(3): 231 - 247
- Honda S, Akao E, Suzuki S and 3 others. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. Anal Biochem 180(2): 351 - 357
- Lahaye M, Cimadevilla EA, Kuhlenkamp R and 3 others. 1999. Chemical composition and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). J Appl Phycol 11(1): 1 - 7
- Li B, Liu S, Xing R and 6 others. 2013. Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. Carbohydr Polym 92(2): 1991 - 1996
- Lin X, Xu DS, Feng Y and 1 other. 2005. Determination of *Ophiopogon japonicus* polysaccharide in plasma by HPLC with modified postcolumn fluorescence derivatization. Anal Biochem 342(2): 179 - 185
- Noda H, Amano H, Arashima K and 1 other. 1990. Antitumor activity of marine algae. Hydrobiologia 204 - 205(1): 577 - 584
- Qi HM, Zhao TT, Zhang QB and 3 others. 2005. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). J Appl Phycol 17(6): 527 - 534
- Yu PZ, Zhang QB, Li N. 2003. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. J Appl Phycol 15(1): 21 - 27