

#### 4种大型红藻类菌胞素氨基酸的提取工艺优化与分离鉴定

韩秀, 钱亮亮, 程同杰, 沈彦, 邓小群, 朱文轩, 孙颖颖

#### Optimization of Extraction Process, Isolation and Characterization of Mycosporine-Like Amino Acids from Four Species of Marine Red Macroalgae

HAN Xiu, QIAN Liangliang, CHENG Tongjie, SHEN Yan, DENG Xiaoqun, ZHU Wenxuan, and SUN Yingying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021110358>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

##### 自然发酵酸浆中一株高产酸菌的分离与鉴定

Isolation and Identification of a High Acid-Producing Lactic Acid Bacteria in Acidic Fermentation Broth of Tofu  
食品工业科技. 2019, 40(9): 105-108,114

##### 溶藻弧菌噬菌体Va2001的分离鉴定及其应用

Isolation and Identification of a *Vibrio alginolyticus* Bacteriophage Va2001 and Its Application  
食品工业科技. 2021, 42(23): 102-109

##### 传统发面面肥中乳酸菌的分离与鉴定

Isolation and identification of lactic acid bacteria from Chinese traditional sourdough  
食品工业科技. 2017(14): 141-145

##### 水皮子蘑菇不同极性提取物中组分的分离与鉴定

Isolation and Identification of the Constituents of Extracts by Different Polar Solvents of the Edible Fungus “Shuipizi”  
食品工业科技. 2020, 41(21): 43-47

##### 污水中絮凝细菌的分离及鉴定

Isolation and Identification of Flocculent Bacteria from the Sewage  
食品工业科技. 2019, 40(22): 132-137,150

##### 一株高产丁酸的丁酸梭菌分离鉴定及其生物学性质研究

Isolation and Identification of a Strain of *Clostridium butyricum* with High Yield of Butyric Acid and Its Biological Characteristics  
食品工业科技. 2020, 41(7): 82-88,101



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

韩秀, 钱亮亮, 程同杰, 等. 4 种大型红藻类菌胞素氨基酸的提取工艺优化与分离鉴定 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 208–216. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110358

HAN Xiu, QIAN Liangliang, CHENG Tongjie, et al. Optimization of Extraction Process, Isolation and Characterization of Mycosporine-Like Amino Acids from Four Species of Marine Red Macroalgae[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 208–216. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110358

· 工艺技术 ·

## 4 种大型红藻类菌胞素氨基酸的提取 工艺优化与分离鉴定

韩秀<sup>1,2</sup>, 钱亮亮<sup>2</sup>, 程同杰<sup>1</sup>, 沈彦<sup>2</sup>, 邓小群<sup>1</sup>, 朱文轩<sup>1,2</sup>, 孙颖颖<sup>1,\*</sup>

(1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005;

2. 连云港市质量技术综合检验检测中心, 江苏连云港 222006)

**摘要:** 类菌胞素氨基酸 (Mycosporine-like amino acids, MAAs) 广泛存在于大型红藻中, 是一类具有良好应用前景的活性物质。本文采用单因素和正交试验, 分析了提取温度、时间、次数和料液比对红毛苔、石花菜、菊花江蕨和江蕨中 MAAs 提取物得率的影响, 优化提取 MAAs 工艺, 并对提取物进行了分离鉴定。结果表明, 毛苔、石花菜、菊花江蕨和江蕨中 MAAs 优化提取工艺分别为: 45 °C、3 h、4 次、1:25 g/mL; 45 °C、1 h、4 次、1:20 g/mL; 45 °C、2 h、3 次、1:15 g/mL; 40 °C、1 h、3 次、1:20 g/mL。应用上述提取工艺, 制备得到 4 种大型红藻 MAAs 提取物, 提取物得率依次为 249.3、197.9、146.4 和 449.5 mg/g, 其在紫外光谱和薄层层析板呈现 MAAs 紫外吸收特性和颜色反应。同时, 采用硅胶柱层析, 对红毛苔和江蕨 MAAs 提取物进行分离, 共得到 3 个组分 H1、J1 和 J2。通过紫外光谱扫描、高效液相色谱和质谱分析, 并与已有文献比较, 确定了其 MAAs 组成。H1 包括 shinorine、palythine 和 porphyra-334 (3 种 MAA 含量为组分 H1 含量的 95.4%)、palythenic acid (4.6%); J1 包括 shinorine、palythine 和 porphyra-334 (3 种 MAA 为组分 J1 含量的 96.3%)、palythenic acid (3.7%); J2 为 palythine 单体。

**关键词:** 类菌胞素氨基酸, 大型红藻, 提取工艺, 分离, 鉴定

中图分类号: Q949.29

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)18-0208-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110358



本文网刊:

## Optimization of Extraction Process, Isolation and Characterization of Mycosporine-Like Amino Acids from Four Species of Marine Red Macroalgae

HAN Xiu<sup>1,2</sup>, QIAN Liangliang<sup>2</sup>, CHENG Tongjie<sup>1</sup>, SHEN Yan<sup>2</sup>, DENG Xiaoqun<sup>1</sup>, ZHU Wenxuan<sup>1,2</sup>, SUN Yingying<sup>1,\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Lianyungang Comprehensive Inspection and Testing Center for Quality and Technology, Lianyungang 222006, China)

**Abstract:** Marine macroalgae is one of the good sources of mycosporine-like amino acids (MAAs), especially red macroalgae. As a new type of active substances with commercial development prospect, extraction, isolation and characterization of MAAs are far from enough for the application. To obtain the extraction process of MAAs from four species of red macroalgae (*Bangia fuscopurpurea*, *Gelidium amansii*, *Gracilaria confervoides*, and *Gracilaria* sp.), a series of single-factor and orthogonal experiments were carried out to analyze the effects of extraction temperature, time, times and solid-liquid ratio on the yields of MAAs. The extraction process of MAAs was optimized, and the extracts were isolated

收稿日期: 2021-11-30

基金项目: 江苏高校自然科学研究重大项目 (19KJA430010); 江苏省自然科学研究面上项目 (BK20211353); 2020 年江苏省研究生科研创新计划 (SJCX20\_1297); 江苏海洋大学大学生创新训练计划项目; 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 (SKLF-KF-201904); 连云港市“海燕计划”资助项目 (2020-QD-020)。

作者简介: 韩秀 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生物提取与分离工程方面的研究, E-mail: 1162657033@qq.com。

\* 通信作者: 孙颖颖 (1978-), 女, 博士, 教授, 主要从事海洋生物提取与分离工程方面的研究, E-mail: syy-999@163.com。

and identified. The optimized extraction processes of MAAs were obtained as follows: 45 °C, 3 h, 4 times, 1:25 g/mL. 45 °C, 1 h, 4 times, 1:20 g/mL. 45 °C, 2 h, 3 times, 1:15 g/mL. 40 °C, 1 h, 3 times, 1:20 g/mL. Four MAAs extracts of red algae were prepared by using the above extraction process, and the yields were 249.3, 197.9, 146.4 and 449.5 mg/g, respectively. All of them showed UV absorption characteristics and color reaction of MAAs in UV spectrum and thin layer chromatography (TLC). Furthermore, MAAs extracts from *Bangia fusco-purpurea* (or *Gracilaria* sp.) were isolated by silica gel column chromatography to obtain one fraction H1 (or two fractions J1 and J2). MAAs composition and proportion of these fractions were determined by UV, HPLC and MS, and comparison with existing literatures. H1 included shinorine, palythine and porphyra-334 (the content of these three MAAs was 95.4% of the content of the fraction H1), and palythenic acid (4.6%). Shinorine, palythine, porphyra-334 (96.3% of the fraction J1), and palythenic acid (3.7%) were in J1. And J2 was palythine.

**Key words:** mycosporine-like amino acids; red macroalgae; extraction process; isolation; characterization

类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAAs)广泛分布于水生生物中,在大型红藻中含量丰富<sup>[1-2]</sup>。MAAs 是一类小分子次级代谢产物,骨架为氨基环己烯酮或氨基环己烯胺的环状结构(图 1),最大吸收波长在 310~360 nm,是一种天然高效紫外线吸收剂<sup>[3]</sup>。目前,已鉴定结构的 MAAs 接近 30 种,主要包括 asterina-330、mycosporine-glycine、porphyra-334 和 palythine 等<sup>[1-2]</sup>。研究表明,MAAs 具有明显的抗氧化作用,能抑制过氧化脂质生成、清除自由基、保护皮肤细胞不受氧自由基过度氧化的影响<sup>[3-4]</sup>,还具有调节渗透等多种生理活性<sup>[3]</sup>。

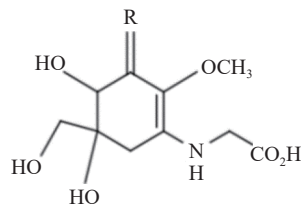


图 1 MAAs 基本结构

Fig.1 Basic structure of MAAs

大型海藻是 MAAs 的主要来源之一<sup>[5-7]</sup>, *usu-jirene*、*palythenic acid* 等 MAAs 仅存在于藻类<sup>[3,8]</sup>。大型红藻是 MAAs 的理想来源,不仅含量高,且种类丰富<sup>[2,7]</sup>,已探明的 MAAs 种类超过 22 种<sup>[2]</sup>, *prasiolin*<sup>[8]</sup> 和 *bostrychines A~F*<sup>[9]</sup> 等 MAAs 仅在大型红藻中发现。此外,大型红藻还含有很多未知 MAAs。目前,国内外对大型海藻 MAAs 研究尚处于初级阶段,多数集中在分布<sup>[10]</sup>、环境因子诱导<sup>[11]</sup>、活性等<sup>[3]</sup>,大型红藻 MAAs 的提取和分离研究非常少<sup>[3,12]</sup>。近 10 年,仅见 *Bangia atropurpurea*<sup>[13]</sup>、*Bostrychia scorpioides*<sup>[3]</sup>、麒麟菜(*Eucheuma* sp.)<sup>[4]</sup>、海萝藻(*Gloiopeletis furcata*)<sup>[14]</sup>、弓江藻(*Gracilaria arcuata*)<sup>[15]</sup>、张氏江藻(*Gracilaria changii*)<sup>[16]</sup> 和条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)<sup>[17]</sup> 等 MAAs 提取和分离的相关研究。我国大型红藻种类高达 600 多种<sup>[18]</sup>,绝大多数的 MAAs 提取和分离为研究空白,有必要进行深入研究。

本文整理了 2001~2021 年期间发表在 Web of Science、Springer、Google Scholar 和 CNKI 数据库收录的有关大型海藻 MAAs 研究,发现 MAAs 含量高于 3 mg/g 的大型红藻主要集中在头发菜目(Ban-

giales)和仙菜目(Ceramiales),龙须菜目(Gracilariales)也有少数大型海藻 MAAs 含量较高(图 2)。本文选定红毛苔(*Bangia fusco purpurea*)、石花菜(*Gelidium amansii*)、菊花江藻(*Gracilaria confervoides*)和江藻(*Gracilaria* sp.)4 种大型红藻,它们分别归属于头发菜目、仙菜目和龙须菜目。目前,国内外尚未见此 4 种 MAAs 的提取和分离研究。基于此,本实验研究了提取温度、时间、次数和料液比对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响,建立优化提取工艺。根据 MAAs 提取物得率和薄层层析检测结果,发现红毛苔和江藻中 MAAs 含量较高;进一步,采用硅胶柱层析对此 2 种大型红藻 MAAs 提取物进行分离。最后,通过紫外光谱(Ultraviolet spectrum, UV)、高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)和质谱(Mass Spectrometry, MS)测定,并与已有文献比较,鉴定 4 种大型红藻 MAAs 组成;以为大型海藻源 MAAs 的分离研究奠定实验基础和提供理论参考。

■ 头发菜目  
■ 隐丝藻目  
■ 仙菜目  
■ 龙须菜目  
■ 海藻膜目

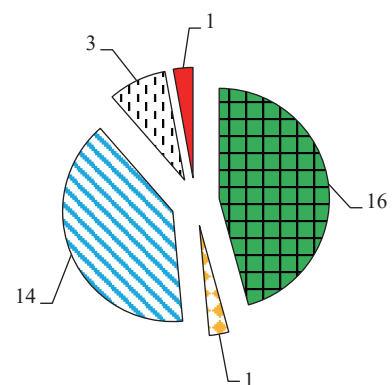


图 2 MAAs 含量>3 mg/g 的大型红藻的目类分布  
Fig.2 Ordered distribution of MAAs contents present at >3 mg/g in red macroalgae

注: 1.数据来源于近 2001~2021 年 Web of Science、Springer、Google Scholar 和 CNKI 数据库收录的报道; 2.图中的数字代表属于该目类的、含有 MAAs 的红藻种类的数量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

红毛苔(*Bangia fusco purpurea*)、石花菜(*Gelidium amansii*)、菊花江藻(*Gracilaria confervoides*)、江藻

(*Gracilaria* sp.)、甲醇、乙醇 分析纯,江苏碧蓝海洋生物科技有限公司;甲醇、甲酸 色谱纯,DIKMA PURE 色谱溶剂;硅胶粉 200~300 目 青岛海洋化工有限公司。

CPA224S 电子天平德国 赛多利斯股份公司;DKZ-2 电热恒温振荡槽 上海精宏实验设备有限公司;R-210 真空旋转蒸发器 瑞士步琦;T9CS 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;QTUM0001X 超纯水机 法国 MILLIPORE;TSQ Quantum Access 液质联用仪 赛默飞世尔科技有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 原料处理 大型红藻干品经清洗、冷冻干燥、超微粉碎机粉碎后,过 40 目筛备用。

1.2.2 MAAs 提取工艺 称取大型红藻干粉末 10 g 加入到一定体积的 25% 甲醇溶液中,搅拌后密封放入恒温水浴摇床中,在设定温度下振荡浸提一定时间。提取结束后,取出冷却至室温,倒出浸提液。重新加入相同体积的 25% 甲醇溶液,按照上述条件重复浸提设定提取次数。浸提液合并、过滤和减压蒸发后,加入无水乙醇(含量为 80%), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下沉淀 6 h。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下,9000 r/min 离心 20 min,移出上清液,沉淀保留。用蒸馏水洗涤沉淀 2~3 次,洗涤液和先前的上清液合并, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  下减压浓缩后(除去有机溶剂),冷冻干燥,制备到 MAAs 提取物。

### 1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 提取温度对 MAAs 提取物得率的影响 提取温度设定为 35、40、45、50 和 55  $^{\circ}\text{C}$ ,提取时间、次数和料液比分别为 2 h、2 次和 1:20 g/mL。每个实验设定 3 个平行样,MAAs 提取同 1.2.2。

1.2.3.2 提取时间对 MAAs 提取物得率的影响 提取时间依次为 1、2、3 和 4 h,提取温度、次数和料液比设定为 45  $^{\circ}\text{C}$ 、2 次和 1:20 g/mL。每个实验设定 3 个平行样,MAAs 提取同 1.2.2。

1.2.3.3 提取次数对 MAAs 提取物得率的影响 设定提取次数为 1、2、3 和 4 次,提取温度、时间和料液比设定为 45  $^{\circ}\text{C}$ 、2 h 和 1:20 g/mL。每个实验设定 3 个平行样,MAAs 提取同 1.2.2。

1.2.3.4 料液比对 MAAs 提取物得率的影响 料液比分别为 1:10、1:15、1:20 和 1:25 g/mL,提取温度、时间和次数设定为 45  $^{\circ}\text{C}$ 、2 h 和 2 次。每个实

验设定 3 个平行样,MAAs 提取同 1.2.2。

1.2.4 正交试验 在上述单因素实验基础上,选定  $L_9(3^4)$  正交试验表,考察提取温度、提取时间、提取次数和料液比等 4 个因素对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响(表 1),实验中不设定平行样。

### 1.2.5 MAAs 提取物得率的计算

$$W = \frac{m}{M} \times 1000$$

式中:W 为 MAAs 粗提物得率,mg/g; m 为粗提物质量, g; M 为红藻粉末质量, g。

1.2.6 MAAs 分离 参照文献 [1,7],并对分离方法进行了主要改进。取 1.0 g MAAs 提取物加载在硅胶柱层析(3.0 cm $\times$ 25 cm, 200~300 目)上,洗脱剂为甲醇/乙醇/蒸馏水(8:10:0.5),洗脱速度为 1.0 BV/h,洗脱 2.5 倍柱体积(BV),每管 50 mL 洗脱馏分。馏分减压浓缩后,采用薄层层析和紫外光谱检测 MAAs<sup>[15]</sup>。

### 1.2.7 MAAs 检测

1.2.7.1 薄层层析定性检测 参照前期研究建立的薄层层析法<sup>[15]</sup>,并稍加改进。待测样品溶解于蒸馏水中,配制浓度为 1.6 g/L,点样在硅胶 G 板上,以甲醇/乙醇/蒸馏水(8:10:0.5, 体积比)为展开剂。展开结束后,吹干 G 板,喷洒碘化铋钾试剂(7.3 g 碘化铋钾,冰醋酸 10 mL,蒸馏水 60 mL),静置 15~20 min,呈现黄或橙色斑点为含氮化合物的阳性反应,可初步确定为目标提取物或目标组分。

1.2.7.2 紫外光谱检测 取 1 mL 上述薄层层析检测确定的目标提取物或目标组分,进行 200~400 nm 波长扫描。在 310~360 nm 范围内有吸收的待测样品,可确定为含有 MAAs。

1.2.7.3 高效液相色谱和质谱检测 MAAs 提取物 0.005 g 溶于 10 mL 蒸馏水,微孔滤膜过滤后,进行高效液相色谱(HPLC)和质谱(ESI-MS)检测。HPLC 分析:柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,色谱柱为 Waters HSS T3(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )。流动相 A 为 0.2% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.2% 甲酸甲醇溶液。洗脱梯度:0~20 min, B%: 0~70%;流速 1.0 mL/min,波长 330 nm;进样量 100  $\mu\text{L}$ 。ESI-MS 测定:喷雾气压 45 psi,氮气流速 10.0 L/min,干燥温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ,破碎电压 100 V,毛细管电压 4500 V,全扫描(Scan),参比离子质荷比:121.0509, 922.0098,为参比离子对测定结果进行实时校正,分辨率 m/z 在 922.0098 处全扫描响应为 11300,质荷比(m/z)范围在 120~1000。

表 1 正交试验因素及水平设计

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	因素			
	A: 提取温度( $^{\circ}\text{C}$ )	B: 提取时间(h)	C: 提取次数(次)	D: 料液比(g/mL)
1	40	1	2	1:15
2	45	2	3	1:20
3	50	3	4	1:25



1.2.8 大型红藻理化指标测定 采用 GB 5009.3-2016<sup>[19]</sup>、GB 5009.4-2016<sup>[20]</sup>、GB 5009.5-2016<sup>[21]</sup>、GB 5009.6-2016 标准方法<sup>[22]</sup>,测定大型红藻中水分、蛋白质、脂肪、碳水化合物等成分。

### 1.3 数据处理

实验数据采用 SPSS11.5 软件包进行独立样本检验统计分析,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种大型红藻 MAAs 提取工艺的优化

#### 2.1.1 单因素实验结果

2.1.1.1 提取温度对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响 由图 3 可知, 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率随提取温度的升高而增大, 在 40~45 °C 时, MAAs 提取物得率达到最大值。当提取温度继续增加时, 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率开始下降, 尤其红毛苔和江蓠 MAAs 提取物得率显著 ( $P < 0.05$ ) 降低。可能由于温度升高, 多糖<sup>[23]</sup> 等水溶性物质更易溶出, 在去除这些物质的过程中造成了更多的 MAAs 损失; 也可能是 MAAs 中某些 MAA 发生降解<sup>[24]</sup>, 具体原因还需要进一步研究。在 MAAs 提取过程中, 提取温度是一个容易被忽视的影响因素, 常见的提取温度在 4~45 °C<sup>[4]</sup> 范围内。本文研究表明, 提取温度是一个明显影响红毛苔等 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的因素, 45 °C 是较适宜的提取温度。

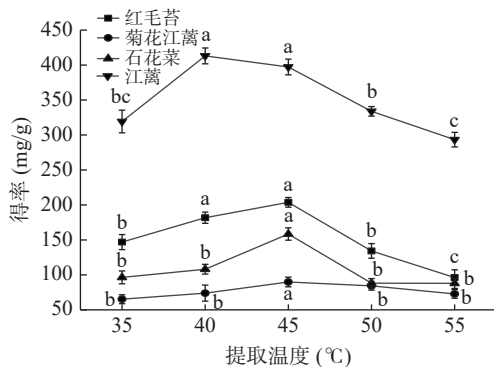


图 3 提取温度对 4 种大型红藻 MAAs 提取的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on MAAs extraction from four species of red macroalgae

注:不同小写字母表示差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ); 图 4~图 6 同。

#### 2.1.1.2 提取时间对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响

在图 4 中, 随提取时间的增加, 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率增大。提取时间为 2 h 时, MAAs 提取物得率均达到最大值。当提取时间继续增加时, 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率呈现下降趋势。这可能是提取时间过长, 水溶性物质溶出更多, 导致后续去除这些物质时 MAAs 损失量增大或者 MAAs 提取物出现热分解现象<sup>[25]</sup>。不同大型海藻 MAAs 提取时间从几分钟<sup>[7]</sup> 到十几小时<sup>[23]</sup> 不等, 推测这可能与 MAAs 在藻体中位置有关, 目前国内

外尚未见大型海藻中 MAAs 位置研究。除红毛苔外, 提取时间对其余 3 种大型红藻 MAAs 提取物得率有显著影响 ( $P < 0.05$ )。综上所述, 2 h 是 4 种红藻较适宜的提取时间。

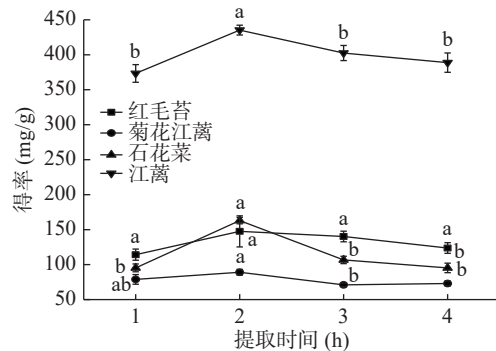


图 4 提取时间对 4 种大型红藻 MAAs 提取的影响

Fig.4 Effects of extraction time on MAAs extraction from four species of red macroalgae

#### 2.1.1.3 提取次数对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响

图 5 表明, 提取次数不超过 2 次 (或 3 次), 菊花江蓠和石花菜 (或红毛苔和江蓠) MAAs 提取物得率随提取次数增加而增大。当提取次数继续增加时, 除红毛苔外, 其它 3 种大型红藻 MAAs 提取物得率显著 ( $P < 0.05$ ) 下降。提取次数过多会促使更多水溶性杂质被提取出来, 导致在去除杂质过程中 MAAs 损失增加, 从而导致提取次数增加而 MAAs 提取物得率下降的现象。在海萝和江蓠等大型海藻 MAAs 提取过程中<sup>[14,16]</sup>, 提取次数也是 2 次或 3 次。综上所述, 本文选择的提取次数为 3 次。

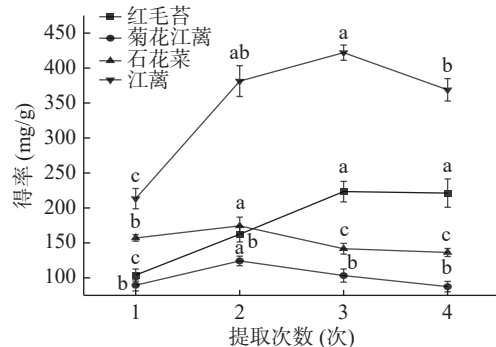


图 5 提取次数对 4 种大型红藻 MAAs 提取的影响

Fig.5 Effects of times on MAAs extraction from four species of red macroalgae

#### 2.1.1.4 料液比对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响

在 1:10~1:20 g/mL 范围内, 随料液比增加, 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率增大, 在 1:20 g/mL 时, MAAs 提取物得率达到最大值 (图 6)。料液比继续增加, MAAs 提取物得率开始下降, 特别是红毛苔和江蓠 MAAs 提取物得率下降显著 ( $P < 0.05$ ), 可能是越大的料液比溶出了越多水溶性杂质, 在除去其过程中导致了更多的 MAAs 损失。不同大型海藻 MAAs 提取时, 料液比相差甚远<sup>[23,25]</sup>。例如, 紫菜 *Porphyra*

*rosengurtii*、角石花菜(*Gelidium corneum*)和 *Ahnfeltiopsis devoniensis* 等大型红藻 MAAs 提取时,料液比设定为 1:100 g/mL;海萝 MAAs 提取料液比为 1:67 g/mL;麒麟菜和张氏江蓠 MAAs 提取时的料液比与本文的研究结果接近,为 1:30 g/mL<sup>[16,25]</sup>。综上所述,1:20 g/mL 是 4 种红藻较适宜的提取料液比。

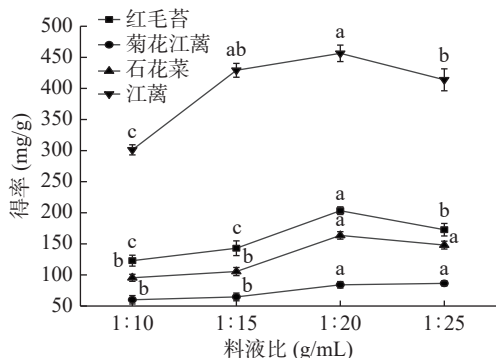


图6 料液比对4种大型红藻 MAAs 提取的影响  
Fig.6 Effects of solid-liquid ratio on MAAs extraction from four species of red macroalgae

在前期研究基础上<sup>[15]</sup>,本文选取 25% 甲醇为提取溶剂,从红毛苔等 4 种大型红藻中提取 MAAs。在已有报道中,MAAs 常用提取溶剂为 15%~75% 甲醇溶液<sup>[25]</sup>,还有其它溶剂,例如,乙腈<sup>[12]</sup>、0.2% 醋酸水溶液(加入 0.5% 甲醇)<sup>[26]</sup> 和-辛基十二醇<sup>[27]</sup> 等。通过上述单因素实验,发现适当增大提取温度、时

间、次数和料液比有利于 4 种大型红藻 MAAs 的提取。

2.1.2 正交试验结果 在单因素实验基础上,采用正交试验,进一步分析提取温度、时间、次数和料液比对 4 种大型红藻 MAAs 提取物得率的影响,结果见表 2。通过对正交试验结果进行直观分析(计算过程略),可得到红毛苔、石花菜、菊花江蓠和江蓠 MAAs 优化提取工艺,即分别为:45 °C、3 h、4 次、1:25 g/mL;45 °C、1 h、4 次、1:20 g/mL;45 °C、2 h、3 次、1:15 g/mL;40 °C、1 h、3 次、1:20 g/mL。

应用上述优化提取工艺,制备到红毛苔、石花菜、菊花江蓠和江蓠 MAAs 提取物,提取物得率依次为 249.3、197.9、146.4 和 449.5 mg/g。Lee 等<sup>[28]</sup> 采用 50% 乙醇提取大型红藻海萝和马泽藻(*Mazzaella* sp.),提取物得率依次为 10.32% 和 11.77%,本文中 4 种大型红藻提取物得率明显高于它们。在 4 种大型红藻 MAAs 提取过程中,还发现红毛苔 MAAs 提取液经过处理后,仍然非常混浊,而其它 3 种大型红藻 MAAs 提取液澄清透明,本文认为很可能是大型红藻成分含量不同所致。采用国标方法<sup>[19-22]</sup>,测定了 4 种大型红藻营养成分(表 3)。表 3 表明,红毛苔蛋白质含量明显高于其它大型红藻。在后续研究中,可对红毛苔 MAAs 提取液进行更有效的蛋白质去除。

2.2 4 种大型红藻 MAAs 的检测

将 4 种大型红藻 MAAs 提取物进行薄层层析检

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment

实验号	因素				MAAs提取物得率(mg/g)			
	A	B	C	D	红毛苔	石花菜	菊花江蓠	江蓠
1	1	1	1	1	173.5	176.2	122.2	434.7
2	1	2	2	2	182.2	193.1	141.5	448.9
3	1	3	3	3	248.2	185.8	130.4	436.2
4	2	1	2	3	200.1	192.4	145.3	445.3
5	2	2	3	1	246.9	190.6	142.6	426.8
6	2	3	1	2	213.5	178.1	120.1	440.1
7	3	1	3	2	222.7	188.5	132.3	420.3
8	3	2	1	3	199.3	170.3	119.6	415.9
9	3	3	2	1	170.2	174.2	139.7	410.1
红毛苔	k <sub>1</sub>	201.30	198.77	195.43	196.87			
	k <sub>2</sub>	220.17	209.47	184.17	206.13			
	k <sub>3</sub>	197.40	210.63	239.27	215.87			
	R	22.77	11.87	55.10	19.00			
	适宜组合					A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub>		
石花菜	k <sub>1</sub>	185.03	185.70	174.87	180.33			
	k <sub>2</sub>	187.03	184.67	186.57	186.57			
	k <sub>3</sub>	177.67	179.37	188.30	182.83			
	R	9.37	6.33	13.43	6.23			
适宜组合					A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>			
菊花江蓠	k <sub>1</sub>	131.37	133.27	120.63	134.83			
	k <sub>2</sub>	136.00	134.57	142.17	131.30			
	k <sub>3</sub>	130.53	130.07	135.10	131.77			
	R	5.47	4.50	21.53	3.53			
适宜组合					A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>			
江蓠	k <sub>1</sub>	439.93	433.43	430.23	423.87			
	k <sub>2</sub>	437.40	430.53	434.77	436.43			
	k <sub>3</sub>	415.43	428.80	427.77	432.47			
	R	24.50	4.63	7.00	12.57			
适宜组合					A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>			

表 3 4 种大型红藻营养成分测定结果

Table 3 Detection results of nutrient content from four red macroalgae

营养成分(g/100 g)	大型红藻种类			
	红毛苔	石花菜	菊花江蓠	江蓠
水分	7.37	9.54	8.93	4.36
蛋白	42.59	15.60	9.13	18.45
脂肪	3.50	2.47	2.25	3.48
灰分	14.20	29.74	25.92	54.38
碳水化合物	32.34	42.65	54.17	19.33

测(图 7)、紫外波长扫描(未列出)和高效液相色谱-质谱分析(图 8)。从图 7 可以看出,它们在硅胶板上均呈现了一个或几个黄色斑点(含氮化合物的阳性反应),这表明提取物中可能含有 MAAs 成分。紫外光谱扫描显示此 4 种大型红藻 MAAs 提取物在 310~360 nm 范围内有吸收,符合 MAAs 特征吸收<sup>[3]</sup>。

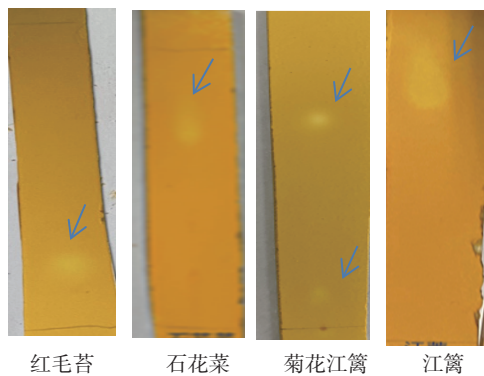


图 7 4 种大型红藻 MAAs 薄层层析检测结果

Fig.7 TLC detection results of MAAs from four red macroalgae

至此,在没有 MAAs 标准品作为参照情况下,仍能确定提取物中存在 MAAs。由此可见,硅胶薄层层析检测和紫外波长扫描结合可用于大型海藻 MAAs 检测。此外,图 7 中斑点面积大小可反映待测样品中 MAAs 含量高低,这对于筛选高含量 MAAs 的大型海藻而言非常直观。

HPLC 是 MAAs 常用分析和分离方法<sup>[4,23,25]</sup>,本文也采用 HPLC 来分析 4 种大型红藻 MAAs 组成。从图 8 能够清晰地看出,红毛苔 MAAs 提取物出现了 8 个吸收峰,停留时间 4.8 min 处吸收峰最明显;菊花江蓠 MAAs 提取物在停留时间 2.7 和 4.8 min 处吸收峰较明显;石花菜 MAAs 提取物分别在停留时间 2.8、3.1、3.7 和 6.5 min 处出现了较明显的吸收峰;江蓠 MAAs 提取物则在停留时间 2.4、2.7、3.3 和 4.8 min 处有较明显的吸收峰。由此表明,4 种大型红藻 MAAs 提取物中 MAAs 组成可能有所差异。

### 2.3 硅胶柱层析分离和质谱测定

上述实验表明,红毛苔和江蓠 MAAs 提取物得率较高,故将它们进行硅胶柱层析分离。红毛苔

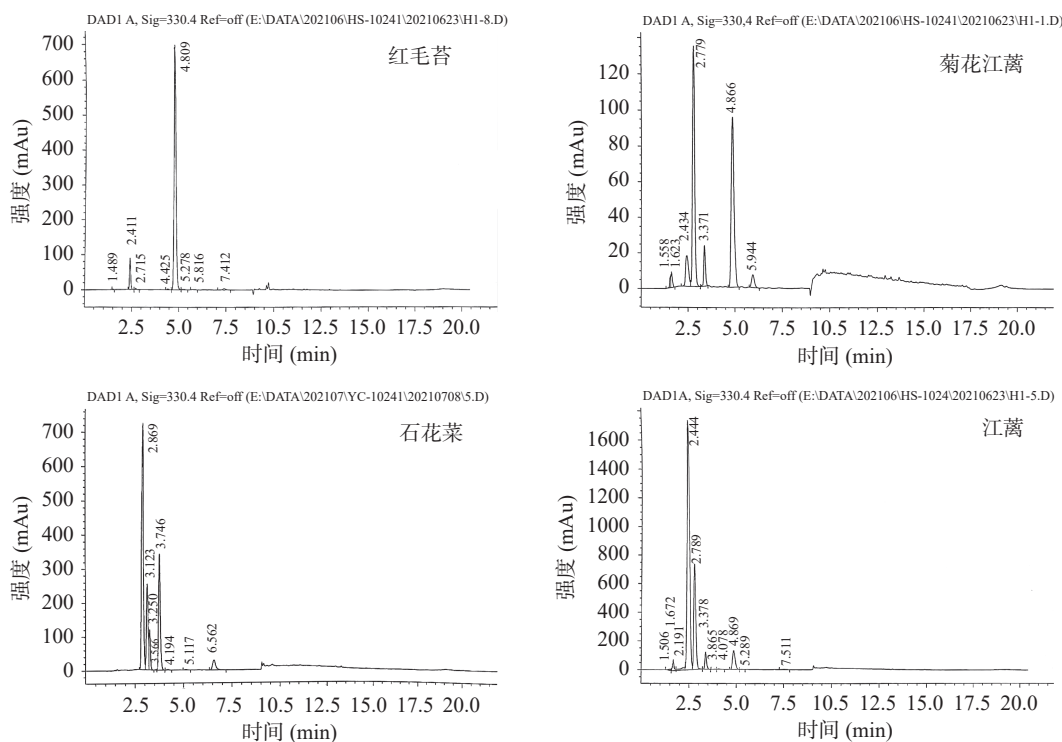


图 8 4 种大型红藻 MAAs 提取物的高效液相色谱图

Fig.8 HPLC detection of MAA extracts from four red macroalgae

MAAs 提取物经分离获得 1 个组分 H1(第 5 管~第 8 管); 江蓠 MAAs 提取物经分离获得 2 个组分 J1(第 5 管)和 J2(第 9 管~第 11 管)(图 9)。随后,测定此 3 个组分的 HPLC 和 MS。根据 HPLC 和 MS 信息,并参考文献 [23-24],能鉴定出组分 H1、J1 和 J2 中 MAAs 组成(表 4),即组分 H1 中有 4 种 MAA,shinorine、palythine、porphyra-334 和 palythenic acid; 组分 J1 中有 4 种 MAA,shinorine、palythine、porphyra-334 和 palythenic acid; 组分 J2 为 palythine 单体。硅胶柱层析<sup>[1,7]</sup>、离子交换柱层析<sup>[4,14,23]</sup>、高效液相色谱<sup>[4,23,29]</sup>、C<sub>18</sub> 固相萃取小柱<sup>[14]</sup>和 HILIC<sup>[30]</sup>等被用于大型海藻 MAAs 分离,其中,采用硅胶柱层析分离 MAAs 报道较少。上述结果表明,经硅胶柱层析

分离,红毛苔和江蓠 MAAs 提取物能获得较好的初步分离。此外,也测定了石花菜和菊花江蓠 MAAs 提取物的高效液相色谱和质谱。同样地,也得到它们中可能的 MAAs 组成。

Shinorine、palythine 和 porphyra-334 是大型红藻中常见 MAA<sup>[31]</sup>,palythenic acid 目前仅在大型红藻 *Solieria chordalis* 中发现<sup>[31]</sup>,该 MAA 在浮游植物和微藻中较为常见。石花菜和菊花江蓠中存在 palythinol、gadusol 和未知 MAA(M-328 和 M-330),这些未知 MAA 需要后续继续进行研究。

### 3 结论

本文优化了红毛苔、石花菜、菊花江蓠和江蓠 MAAs 的提取工艺,发现当提取温度、时间、次数和料液比依次为 45 °C、3 h、4 次、1:25 g/mL;45 °C、1 h、4 次、1:20 g/mL;45 °C、2 h、3 次、1:15 g/mL;40 °C、1 h、3 次、1:20 g/mL 时,能获得最大的 MAAs 提取物得率,提取物得率依次为 249.3、197.9、146.4 和 449.5 mg/g。将紫外光谱和薄层层析检测结合,对 4 种大型红藻 MAAs 提取物进行定性检测的同时还能粗略比较提取物中 MAAs 含量高低,可作为大型海藻 MAAs 的快速筛选方法。硅胶柱层析可用于红毛苔和江蓠 MAAs 提取物的分离,能获得较好的初步分离效果。经紫外光谱扫描、高效液相色谱和质谱分析,并与已有文献比较,确定了红毛苔和江蓠中 MAAs 为 shinorine、palythine、porphyra-334 和 palythenic acid; 石花菜和菊花江蓠 MAAs 主要由 shinorine、palythine、porphyra-334、palythenic acid 和 palythinol 组成,还有少量未知 MAAs。

本文建立了红毛苔、石花菜、菊花江蓠和江蓠的提取和初步分离工艺,并明确了其 MAAs 组成,为大型海藻源 MAAs 提取和分离鉴定提供了技术和理论

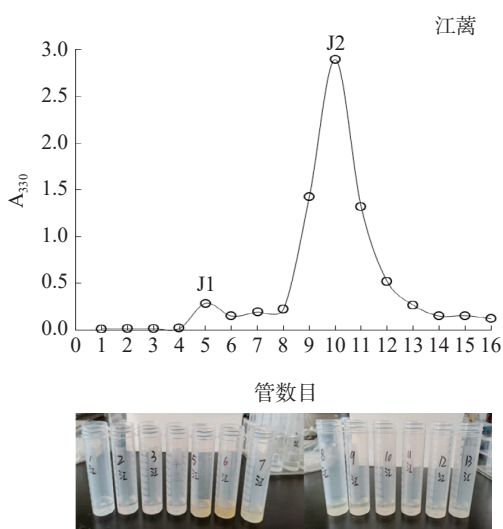


图 9 江蓠 MAAs 提取物的硅胶柱层析分离

Fig.9 Isolation of MAA extracts from through *Gracilaria* sp. through silica gel column chromatography

表 4 MAAs 提取物硅胶柱层析分离组分的最大吸收波长、质谱、相对峰面积和 MAAs 组成

Table 4 Maximum absorption wavelength, MS values, relative peak area and composition of the isolated fractions of MAA extracts by silica gel column chromatography

组分	最大吸收波长 $\lambda_{max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup>	Mass	MAA 种类	MAA 或 MAAs 占相应组分总含量的比例(%)
H1	333	333.1	332	Shinorine	95.4 (3种MAA混合物)
	319	245.1	244	Palythine	
	334	347.0	346	Porphyra-334	
	337	329.0	328	Palythenic acid	
J1	333	333.1	332	Shinorine	96.3 (3种MAA混合物)
	319	245.1	244	Palythine	
	334	347.0	346	Porphyra-334	
	337	329.0	328	Palythenic acid	
J2	319	245.1	244	Palythine	100
	268	205.0	204	Gadusol <sup>[32]</sup>	
	332	333.1	332	(MAAs前体)	
	319	245.1	244	Shinorine	
	332	347.0	346	Palythine	
	330	303.1	302	Porphyra-334	
石花菜MAAs提取物	332	347.0	346	Palythine	49.6 16.6 3.45 23.6 6.34
	330	303.1	302	Porphyra-334	
	328	222.7	221	Palythinol	
	333	333.1	331	Unknown MAA	
	319	245.1	244	Shinorine	
	334	347.0	346	Palythine	
菊花江蓠MAAs提取物	331	303.1	302	Porphyra-334	5.62 39.0 2.93 1.80
	336	329.0	328	Palythinol	
	330	-	-	Palythenic acid	
	330	-	-	Unknown MAAs	
	330	-	-	Unknown MAAs	



支撑。然而,目前尚未获得较高纯度 MAAs,并且对此 4 种大型红藻中特定 MAA 缺乏针对性分离纯化方法。在后续工作中,需要继续开展 MAAs 纯化制备研究。

### 参考文献

- [1] ORFANOUDAKI M, HARTMANN A, KARSTEN U, et al. Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species[J]. *Journal of Phycology*, 2019, 55(2): 393–403.
- [2] SUN Y Y, ZHANG N S, ZHOU J, et al. Distribution, contents, and types of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine macroalgae and a database for MAAs based on these characteristics [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(1): 43–66.
- [3] ATHUKORALA Y, TRANG S, KWOK C, et al. Antiproliferative and antioxidant activities and mycosporine-like amino acid profiles of wild-harvested and cultivated edible Canadian marine red macroalgae[J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 1–17.
- [4] 牛美英. 麒麟菜中类菌胞素氨基酸(MAAs)的提取、纯化、鉴定及抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014. [NIU M Y. The study on the isolation, purification, identification and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in *Eucheuma*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.]
- [5] LAMARE M D, LESSER M P, BARKER M F, et al. Variation in sunscreen compounds (mycosporine-like amino acids) for marine species along a gradient of ultraviolet radiation transmission within doubtful sound, New Zealand[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2004, 38(5): 775–793.
- [6] HOYER K, KARSTEN U, SAWALL T, et al. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 211: 117–129.
- [7] ORFANOUDAKI M, HARTMANN A, MILADINOVIC H, et al. Bostrychines A–F, six novel mycosporine-like amino-acids and a novel betaine from the red alga *Bostrychia scorpioides*[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(6): 356–371.
- [8] AGUILERA J, BISCHOF K, KARSTEN U, et al. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress[J]. *Marine Biology*, 2002, 140: 1087–1095.
- [9] KORBEE N, HUOVINEN P, FIGUEROA F L, et al. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Marine Biology*, 2005, 146: 645–654.
- [10] GUIHENEUF F, GIETL A, STENGEL D B. Temporal and spatial variability of mycosporine-like amino acids and pigments in three edible red seaweeds from western Ireland[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30: 2573–2586.
- [11] BRIANI B, SISSINI M N, LUCENA L A, et al. The influence of environmental features in the content of mycosporine-like amino acids in red marine algae along the Brazilian coast[J]. *Journal of Phycology*, 2018, 54(3): 380–390.
- [12] HARTMANN A, MURAUER A, GANZERA M. Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 138: 153–157.
- [13] CHUANG L F, CHOU H N, SUNG P J. Porphyra-334 isolated from the marine algae *Bangia atropurpurea*: Conformational performance for energy conversion[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(9): 4732–4740.
- [14] 张婉. 海萝藻中类菌胞素氨基酸的提取与抗氧化保湿特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016. [ZHANG W. Study on extraction, antioxidation and moisturizing activities of MAAs from *Gloiopeltis furcata*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.]
- [15] 孙颖颖, 杨子轩, 周静, 等. 大型海藻类菌胞素氨基酸提取工艺及定性检测研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(3): 205–211. [SUN Y Y, YANG Z X, ZHOU J, et al. Extraction process and a qualitative detection method of mycosporine-like amino acids from six species of marine macroalgae[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(3): 205–211.]
- [16] 金宁宁. 江蒿中类菌胞素氨基酸(MAAs)分离纯化及应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012. [JIN N N. Study on the isolation, purification and application of mycosporine-like amino acids (MAAs) in *Gracilaria changii*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.]
- [17] 张苗苗. 紫菜中类菌胞素氨基酸(MAAs)制备工艺的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015. [ZHANG M M. The preparation techniques of mycosporine-like amino acid from *Porphyra yezoensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.]
- [18] 丁兰平, 黄冰心, 谢艳齐. 中国大型海藻的研究现状及其存在的问题[J]. *生物多样性*, 2011, 19(6): 798–804. [DING L P, HUANG B X, XIE Y Q. Advances and problems with the study of marine macroalgae of China seas[J]. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 798–804.]
- [19] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.3-2016 食品安全国家标准, 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China's National Health and Family Planning Commission. GB 5009.3-2016 National Food Safety Standard. Determination of moisture in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
- [20] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准, 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China's National Health and Family Planning Commission. GB 5009.5-2016 National Food Safety Standard. Determination of protein in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
- [21] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China's National Health and Family Planning Commission. GB 5009.6-2016 National food safety standard. Determination of fat in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
- [22] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China's National Health and Family Planning Commission. GB 5009.4-2016 National food safety standard. Determination of ash in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
- [23] 李峰. 大型海藻角叉菜活性成分的研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019. [LI F. Study on the active constituents of macroalgae *Chondrus ocellatus* Hølemaes[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019.]

- sity, 2019. ]
- [ 24 ] ZHANG Z, TASHIRO Y, MATSUKAWA S, et al. Influence of pH and temperature on the ultraviolet-absorbing properties of porphyra-334[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71(6): 1382–1384.
- [ 25 ] ELIPE M V S. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 497(1): 1–25.
- [ 26 ] 应锐, 张朝辉, 段筱杉, 等. 紫菜中类菌孢素氨基酸纯化工艺的优化及其抗紫外辐射作用研究[J]. *海洋科学*, 2017, 41(2): 71–80. [ YING R, ZHANG C H, DUAN X S, et al. Optimization of purification process of mycosporine-like amino acid from *Porphyra haitanensis* and study on its antiultraviolet activity[J]. *Marine Science*, 2017, 41(2): 71–80. ]
- [ 27 ] 贺庆梅. 海藻中紫外线吸收物质的制备与特性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008. [ HE Q M. Study on preparation and character of UV-absorbing compound in seaweeds[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. ]
- [ 28 ] LEE M H, KIM Y K, YOON N Y, et al. Study on UV absorption materials derived from red algae *Gloiopeltis fucatas* and *Mazzaella* sp. in Russia[J]. *Fish Aquat Sci*, 2012, 15(4): 361–363.
- [ 29 ] CHAVES-PENA P, CODA F D L, FIGUEROA F L, et al. Quantitative and qualitative HPLC analysis of mycosporine-like amino acids extracted in distilled water for cosmetic uses in four Rhodophyta[J]. *Marine Drugs*, 2019, 18(1): 27–40.
- [ 30 ] HARTMANN A, BECKER K, KARSTEN U, et al. Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(10): 6291–6305.
- [ 31 ] BEDOUX G, HARDOUIN K, MARTY C, et al. Chemical characterization and photoprotective activity measurement of extracts from the red macroalga *Solieria chordalis*[J]. *Botanica Marina*, 2014, 57(4): 291–301.
- [ 32 ] PLACK P A, FRASER N W, GRANT P T, et al. Gadusol, an enolic derivative of cyclohexane-1, 3-dione present in the roes of cod and other marine fish. Isolation, properties and occurrence compared with ascorbic acid[J]. *Biochemical Journal*, 1981, 199(3): 741–747.