

基于 GC-MS 的浒苔代谢产物提取方法研究

何艳丽^{1,2}, 王延辉¹, 陈方园¹, 孙平飞¹, 徐年军^{2*}

(1. 浙江医药高等专科学校制药工程学院, 浙江宁波 315100; 2. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要 [目的] 研究浒苔代谢产物的提取方法。[方法] 以浒苔为研究对象, 用不同的细胞破碎方式、溶剂提取体系、料液比等均一样本的代谢产物进行提取, 气相色谱-质谱法(GC-MS)鉴定代谢产物成分, 利用主成分分析等方法, 对不同的代谢提取体系进行评价。[结果] 溶剂体系甲醇-三氯甲烷-水(7:3:3)和液氮处理-球磨破碎-超声波的破壁方法提取并鉴定出 81 种代谢产物, 该方法具有高提取产率、高重现性、易操作和速度快等优点。[结论] 溶剂体系甲醇-三氯甲烷-水(7:3:3)和液氮处理-球磨破碎-超声波破壁是适合浒苔代谢产物提取的方法, 该方法可为浒苔及大型绿藻的代谢组学研究提供参考。

关键词 浒苔; 提取方法; 气相色谱-质谱; 代谢产物

中图分类号 S986.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)13-0072-04

Metabolite Profiling of Seaweed *Enteromorpha* Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HE Yan-li^{1,2}, WANG Yan-hui¹, CHEN Fang-yuan¹, XU Nian-jun^{2*} et al (1. School of Pharmaceutical Engineering, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, Zhejiang 315100; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211)

Abstract [Objective] To study the extraction method of *Enteromorpha* metabolites. [Method] *Enteromorpha* as the research object, using different cell crushing methods, solvent extraction system, solid-liquid ratio, the homogeneous sample metabolites were extracted; the metabolites were identified by GC-MS; using principal component analysis method, different metabolic extraction systems were evaluated. [Result] A total of 81 metabolites were extracted and identified by the solvent system of methanol: chloroform: water (7:3:3) and liquid nitrogen treatment-milling-ultrasonic breaking method, showing high extraction yield, high reproducibility, easy operation and fast and other characteristics. [Conclusion] It is a suitable method for extracting metabolites of *Enteromorpha* which can provide reference for metabonomics study of *Enteromorpha* and large green algae.

Key words *Enteromorpha*; Extraction method; GC-MS; Metabolite

浒苔(*Enteromorpha*)亦称苔条、苔菜,属绿藻纲石莼科,为大型海洋绿藻,广温、广盐、耐干旱,在我国近海广泛分布。在适合条件下容易出现爆发型增殖,给水产养殖造成严重困扰,其生态危害受到广泛关注。同时浒苔又有较高的营养价值,浒苔“烧末吹鼻止衄血,汤浸捣敷手背肿痛”,具有软坚散结、化痰消积、解毒消肿等作用;浒苔富含蛋白质、纤维素、碳水化合物和维生素等营养成分,在日韩等国家作为中高档的佐料消费^[1],且价格昂贵。

浒苔在近海中的绿潮爆发极具规律:每年 4、5 月份在山东、江苏、浙江等局部海域爆发,爆发期间对当地水产养殖造成极大损失^[2],对近海环境也产生不良影响,而其他时间附近海域则较少出现。关于其爆发机制以及如何减少其危害、提高对其有效利用仍需深入研究。近年来对浒苔的研究逐渐增多,但主要集中在其生理和繁殖状态观察方面^[3-4],浒苔绿潮爆发情况下,浒苔代谢组的研究还未见报道。

代谢组学为分析植物细胞活动、次生代谢网络提供了依据^[5-7]。近年来随着相关数据处理软件和植物代谢组数据库的完善,代谢组学的应用成为植物代谢通路研究不可或缺的一部分,其提取方法直接影响试验结果^[8-9],而不同物种的植物代谢产物具有一定的物种特异性,因此,建立并优化基于气相色谱-质谱法(GC-MS)的浒苔代谢产物提取方法很有必要。

笔者通过比较不同的细胞破碎方法和提取溶剂等提取

因素,对适合浒苔水相代谢产物的提取方法进行优化;通过该方法,测定并解析基于 GC-MS 的浒苔中基本的代谢图谱,为后续的浒苔代谢组研究和类似的大型海洋绿藻的代谢组研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 主要试剂:三氯甲烷、正己烷、石油醚、甲醇、均为色谱级试剂,购自 Thermo Fisher 公司;衍生化试剂 N-甲基-三甲基硅基三氟乙酰胺(MSTFA),购自 Aldrich。

主要仪器:GC-MS 气质联用仪(Trace1300-ITQ900,赛默飞,美国);色谱柱为 TR-5ms 弱极性色谱柱(30 m × 0.25 μm × 0.25 mm);JXFSTPRP-24 球磨仪,上海净信科技;CV200 冷冻旋转蒸干仪,北京艾吉姆。

1.2 方法

1.2.1 藻种及培养方法。浒苔分离自象山港塔头旺近海海域,加冰并在 5 h 内运输至实验室。正式试验前进行纯化培养,采用人工海水,盐度 30, f/2 培养基(不加硅)加富,温度为(25.0 ± 0.5)℃,光照强度为 4 000 lx,光暗周期 12 h:12 h,隔天换水。

1.2.2 代谢物提取方法。2 种细胞破碎方法:a.液氮研磨-超声波;b.液氮处理-球磨破碎-超声波。此处的液氮处理为样品取出后,加入液氮用于酶等生物活性物质的灭活,不研磨。3 种溶剂体系:①甲醇-三氯甲烷-水(7:3:3);②甲醇-水(7:3);③甲醇-正己烷-三氯甲烷-水(1:1:1:1)。采用上述 2 种破碎方法和 3 种溶剂体系提取浒苔代谢产物。

具体操作如下:准确称取 20 mg 浒苔冻干样品($n=3$),采用液氮研磨后,加入 1 mL 提取溶剂,冰浴超声波 1 min 停顿 1 min,重复 10 次。与 3 种溶剂组合后优选出最佳溶剂组

基金项目 浙江省教育厅基金项目(Y201432453)。

作者简介 何艳丽(1983—),女,浙江宁波人,实验师,硕士,从事海洋药物研究。*通讯作者,教授,博士,从事海洋生物学研究。

收稿日期 2017-02-22

合后,分别结合 3 种细胞破碎方法,选择最佳细胞破碎方式,最后进行料液比试验。

1.2.3 GC-MS 测试条件。柱前衍生,衍生条件:挥干有机相→加入 50 μL 甲氧氨基化试剂(甲氧氨基盐酸盐, 20 mg/mL 吡啶溶液)→30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵化 90 min→加入 90 μL MSTFA 衍生化试剂→37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵化 30 min→室温放置 2 h。

进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,不分流进样,流速 1.0 mL/min。程序升温:50 $^{\circ}\text{C}$ 保留 3 min,10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 250 $^{\circ}\text{C}$,保留 5 min。传输线温度 250 $^{\circ}\text{C}$,EI 源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,质荷比 35~500。

2 结果与分析

2.1 溶剂提取优化 以提取代谢物种类、有效峰面积为指标,对不同的溶剂提取体系进行效果评价。液氮研磨后分别采用 3 种溶剂体系提取。结果如图 1 和图 2 所示,组合 a② 提取的物质较少,只有 61 种,a①和 a③较多,溶剂体系①和③提取物质种类没有显著差异,但③中杂峰较多,有效峰面积仅为 72%,因此,选择①甲醇-三氯甲烷-水(7:3:3)作为提取溶剂。

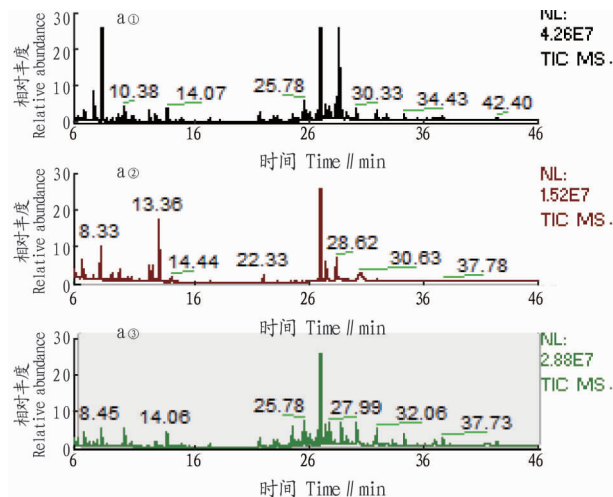


图 1 不同溶剂提取 GC-MS 总离子流色谱

Fig.1 Extraction of total GC-MS by different solvents

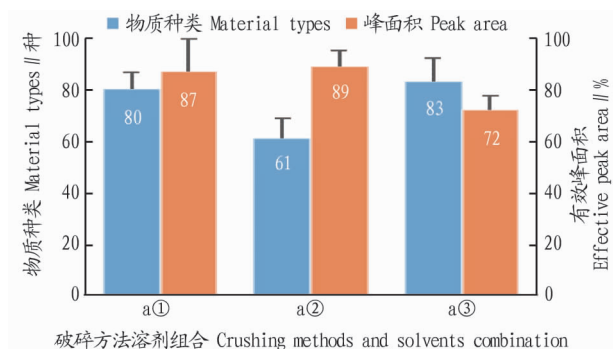


图 2 不同溶剂提取物质种类和有效峰面积

Fig.2 Material types extracted by different solvents and effective peak area

2.2 细胞破碎方式的选择及料液比优化 以提取的代谢物种类、有效峰面积和重现性为依据,对细胞破碎方式进行优化。由图 3 可以看出,液氮研磨-超声波破碎细胞的提取

物质种类较多,平均为 82 种,但其与液氮处理-球磨仪-超声波处理方法提取的物质总数没有显著差异。

重现性:图 4 中, b1~b8 为同一组样品的重复, a1~a9 为同一样品的重复。在主成分分析图中,每个样品数据对应一个点,样品数据越相似,其在主成分分析图上对应的点之间的距离就越近,其集中程度反映了处理样品重现性的高低。理想状态下, b1~b8 和 a1~a9 分别集中在一起,从图 4 可以看出,三角形和正方形分布于中间轴的两侧,说明 2 组差异显著。 b1~b8 高度集中,而 a1~a9 分散于右边半个区域,即方法 a①组内差异明显比方法 b①大。这可能是液氮研磨是人工手动,当样品数量多时,对人力消耗较大,造成研磨重现性差。另外,由于液氮研磨是将样品直接置于研钵中,研磨过程会损耗一部分样品,样品量少的情况不适合用该方法。球磨仪破碎和超声波破碎细胞时,可以将样品称重后放 EP 管中,破碎后直接加入萃取溶剂,避免了二次转移,减少了对样品的损耗,对样品量的要求降低。另外,利用球磨仪破碎时采用了批量处理,这应该是其组内差异小的原因之一。基于此,将样品前期用液氮灭活,然后采用球磨仪和超声波进行细胞破碎的方法是较好的代谢组细胞破壁方法。

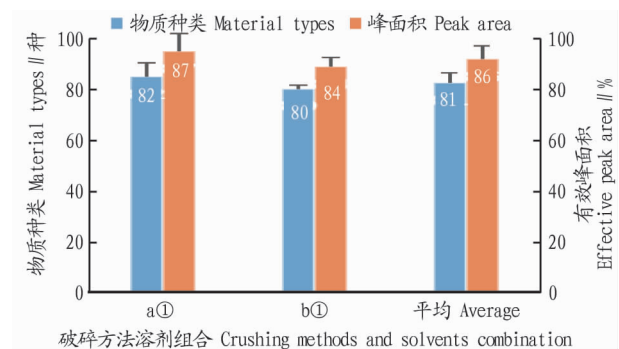


图 3 不同破壁方法提取物质种类和有效峰面积

Fig.3 Metabolites and effective peak area by different crushing methods

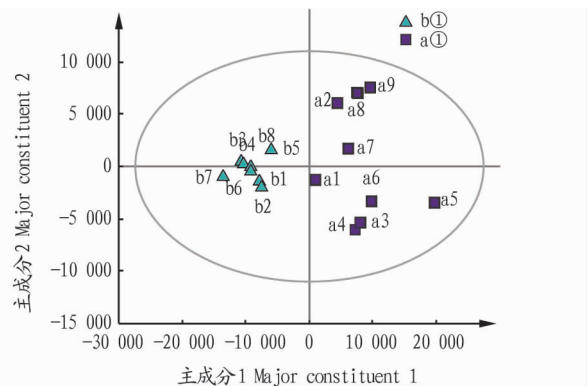


图 4 2 种破壁方式的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of two crushing methods

2.3 浒苔代谢产物分析 经 Nist 数据库比对,结合已有文献^[5]和 Massbank 数据库参考,分析并鉴定提取浒苔代谢产物 81 种。其中,氨基酸 18 种,含量占 11.511%,涵盖常见的必需氨基酸和非必需氨基酸;酸类 24 种,含量 11.600%,主要是参与三羧酸循环的小分子羧酸,为重要的代谢组分;糖

表1 浒苔代谢产物鉴定

Table 1 Identification of *Enteromorpha* metabolites

分类 Classification	序号 Serial No.	保留时间 Retention time//min	峰面积 Peak area//%	名称 Name	分类 Classification	序号 Serial No.	保留时间 Retention time//min	峰面积 Peak area//%	名称 Name	
氨基酸 Amino acid	1	7.69	0.346	L-丙氨酸		24	28.77	1.530	硬脂酸	
	2	9.40	0.219	缬氨酸		芳香酸 Aromatic acid	1	9.96	0.088	苯丙酮酸
	3	10.22	0.020	L-亮氨酸		2	13.07	0.070	邻甲基水杨酸	
	4	10.54	0.115	异亮氨酸		3	17.75	0.043	5-羟基水杨酸	
	5	10.67	7.478	脯氨酸		醇 Alcohol	1	5.88	3.518	己醇
	6	10.72	0.152	甘氨酸		2	10.07	0.045	1,3,5-环己烷三醇	
	7	11.17	0.246	脯氨酸		3	10.18	1.089	甘油	
	8	11.46	0.432	丝氨酸		4	22.76	0.085	L-艾杜醇	
	9	11.64	0.002	L-焦谷氨酸		5	25.01	0.000	薄荷醇	
	10	11.82	0.165	苏氨酸		6	25.56	0.001	香茅醇	
	11	12.65	0.002	β -丙氨酸		7	27.27	0.697	肌醇	
	12	14.88	0.001	蛋氨酸		糖 Sugar	1	20.53	0.000	D-果糖
	13	15.14	0.160	DL-焦谷氨酸		2	23.56	0.365	D-(-)-阿拉伯糖	
	14	18.28	1.729	左旋谷氨酸		3	25.11	0.572	D-(+)-甘露糖	
	15	18.68	0.001	L-苯丙氨酸		4	25.40	0.000	β -D-葡萄糖	
	16	20.88	0.241	天门冬酰胺		5	25.63	0.001	D-(+)-半乳糖	
	17	23.96	0.200	左旋谷酰胺		6	28.13	0.001	D六磷酸果糖	
	酸 Acid	18	26.11	0		酪氨酸	7	28.56	1.255	α -乳糖
1		4.24	3.932	草酸	8	29.01	4.535	D潘糖		
2		7.30	0.051	乙醇酸	9	32.30	0.663	海藻糖		
3		7.82	0.030	3,4-二羟基苯甲酸	10	33.04	60.387	蔗糖		
4		8.34	0.515	丙二酸	胺类 Amine	1	5.40	0.167	尿素	
5		8.59	0.059	3-羟基丁酸	2	10.12	0.129	乙醇胺		
6		8.91	0.061	4-戊基苯甲酸	3	12.76	0.094	色胺		
7		9.21	0.001	琥珀酸	烯醇 Enol	1	26.69	0.287	顺-3,顺-6-壬二烯醇	
8		10.26	0.001	2-丙烯酸	2	26.84	0.001	桃金娘烯醇		
9		10.94	0.295	琥珀酸	3	26.89	0.001	(1R)-(-)桃金娘		
10		11.01	0	甘油酸	烷烃 Alkane	1	6.99	0.381	十六烷	
11		11.89	0.001	甲基丙二酸	2	10.38	0.286	十三烷		
12		12.55	0.218	乙基丙二酸	3	11.05	0.063	正十八烷		
13		13.35	0.458	3-甲基-2-氧基戊酸	4	15.28	0.101	二十二烷		
14		13.93	0.188	苹果酸	5	21.99	0.422	正二十三烷		
15		14.06	0.368	二氨基丙酸	6	29.50	0.342	二十七烷		
16		14.44	0.033	6-氨基乙酸	7	32.08	0.190	二十六烷		
17		15.67	1.850	甘油酸	其他 Other	1	7.70	0.346	庚酸戊酯	
18		23.08	0.001	DL-2-羟基丁酸	1	9.12	0.001	7-羟基-4-甲基香豆素		
19		23.36	0.226	L-(+)-酒石酸	1	13.62	0.001	维生素C		
20		26.25	0.314	α -酮戊二酸	1	24.88	0.001	反-2-辛烯酸		
21		27.19	0.001	棕榈酸	1	27.71	0.659	苜蓿烯		
22		28.59	1.255	亚麻酸	1	21.57	0.001	反-2-辛烯醛		
23	28.62	0.214	反油酸							

类10种,含量67.78%;另有芳香酸、醇类、萜、烯醇等。

3 结论与讨论

通过比较不同的细胞破碎方法和提取溶剂等提取因素,发现选择提取溶剂采用甲醇-三氯甲烷-水(7:3:3);细胞破壁方法采用将样品前期用液氮灭活,然后采用球磨仪和超声波进行细胞破碎得到的代谢产物较多(81种),平行性和重复性都较另外几种方法稳定,GC-MS分离鉴定出24种酸、10种糖、18种氨基酸等物质。

溶剂提取方法的结果与张晓飞等^[10]的研究结果相近,

这说明植物中一部分代谢产物相对保守,但是3种溶剂的比例不同,可能因为这2种植物中的极性和非极性的代谢产物比例不同。该提取方法与分类提取的差异不大,有些甚至还由于单独分类提取:如齐晓辉等^[11]等提取浒苔多糖,最后得到12种,该试验得到了10种;提取和分离鉴定的氨基酸中谷氨酸含量较高,这与徐大伦^[12]的研究相近,并且该方法提取的氨基酸为18种,比徐大伦的提取方法多了1种;该方法分离鉴定出的24种酸中,其中亚麻酸含量较高,这与孙伟红等^[13]的研究结果相同。综上,该方法对不同种类小分子代

谢物得到了比较充分的提取,为进一步研究浒苔代谢奠定基础。

参考文献

- [1] 尹琳琳,杨佰娟,郑立,等. 浒苔脂肪酸前处理方法优化及 GC/MS 分析[J]. 海洋科学,2010,34(11):46-50.
- [2] 孙元芹,李翹楚,李红艳,等. 浒苔生理活性与开发利用研究进展[J]. 水产科学,2013,32(4):244-248.
- [3] 李俭平. 浒苔对氮营养盐的响应及其氮营养盐吸收动力学和生理生态研究[D]. 青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2011.
- [4] 刘峰. 黄海绿潮的成因以及绿潮浒苔的生理生态学和分子系统学研究[D]. 青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2010.
- [5] SUN Y Y, WANG H, GUO G L, et al. Isolation, purification, and identification of anti-algal substances in green alga *Ulva prolifera* for anti-algal activity against the common harmful red tide microalgae[J]. Environmental science and pollution research, 2016, 23(2):1449-1459.
- [6] WANG Y, YU Z M, SONG X X, et al. Effects of macroalgae *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) on growth of four species of bloom-forming dinoflagellates[J]. Aquatic botany, 2007, 86

- (2):139-147.
- [7] 滕中秋,付卉青,贾少华,等. 植物应答非生物胁迫的代谢组学研究进展[J]. 植物生态学报,2011,35(1):110-118.
- [8] TRETYN A, LUKASIEWICZ-RUTKOWSKA H, KOPCEWICZ J. Isolation, purification and identification of acetylcholine in *Pharbitis nil* seedlings[J]. Acta Physiol Plant, 1997, 19(3):303-309.
- [9] WANT E J, O'MAILLE Q, SMITH C A, et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2005, 78(3):743-752.
- [10] 张晓飞,段礼新,龚月桦,等. 用气相色谱-质谱联用比较牛耳草代谢物的提取方法[J]. 生物工程学报,2014,30(2):294-304.
- [11] 齐晓辉,李红燕,郭守东,等. 4种不同来源浒苔中多糖的提取分离及理化性质[J]. 青岛:中国海洋大学学报(自然科学版),2010,40(5):15-18.
- [12] 徐大伦. 浒苔主要化学组分的分析及多糖活性的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [13] 孙伟红,冷凯良,王志杰,等. 浒苔的氨基酸和脂肪酸组成研究[J]. 渔业科学进展,2009,30(2):106-114.

(上接第 43 页)

表 3 南淝河理化指标污染贡献率

Table 3 Pollution contribute rate of the parameters in Nanfei River

变量 Variable	A		B		C		%
	点源营养污染 Point source pollution	有机物点源污染 Organic point source pollution	点源营养污染 Point source pollution	有机物点源污染 Organic point source pollution	农业营养物面源污染 Agricultural nutrient non-point source pollution	生物化学过程 Biochemical process	
TN	68.9	26.0	66.4	24.1	69.5	22.4	
NH ₃ -N	72.5	36.0	72.6	22.6	63.9	14.9	
TP	78.7	21.0	74.3	32.4	78.9	17.1	
DO	8.2	9.1	13.4	ND	21.3	2.9	
pH	23.0	18.0	6.7	17.3	ND	88.4	
BOD ₅	ND	55.3	14.3	34.7	18.7	76.1	
COD	58.0	75.4	53.7	84.6	24.5	27.9	

注:ND表示未检测到
Note:ND was not detected

(2) 聚类分析结果,可将南淝河水体大致分为 3 个类别: A 类水体采样点分布于南淝河干流的中游段及支流板桥河上, NH₃-N 及 TN 污染最为严重; B 类水体分布在在四里河、二十埠河及店埠河三大支流, COD 污染较严重; C 类水体大多位于排污河流的下游和支流长乐河上, 由于污染源头的减少和沿途的自净作用, 污染情况相对最轻。

(3) A 类地表水体的污染主要来源于点源营养物质和点源有机物; B 类地表水体的污染主要来源于点源营养物质和点源有机物; C 类地表水体的污染主要来源于农业面源营养物和生物化学过程。

(4) 今后要根据不同河段的具体情况改善南淝河的水质, 在 A 类和 B 类地区建立更多的污水处理厂, 减少污水的直接排放, 加强流域内或跨流域调水, 保证其有一定的生态用水; 对 C 类地区则需要采取最佳管理措施, 以减少非点源污染。同时, 要加强流域内河道生态综合整治。

参考文献

- [1] TU J, XIA Z G, CLARKE K C, et al. Impact of urban sprawl on water quality in eastern Massachusetts, USA[J]. Environmental management, 2007, 40(2):183-200.
- [2] 纪岚, 杨立武, 李箐. 南淝河水污染现状与可持续发展对策研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2006, 30(4):92-94.
- [3] 汪天祥, 许士国, 韩成伟. 改进主要成分分析法在南淝河水质评价中的应用[J]. 水电能源科学, 2012, 30(10):34-36.
- [4] 陈彦光. 地理数学方法: 基础和应用[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [5] LI W Z, LI X Y, WANG H L, et al. Spatial distribution of the main contaminations in aquatic environment in Fuyang River[J]. Acta scientiae circumstantiae, 2012, 32(11):2814-2819.
- [6] SIMEONOV V, STRATIS J A, SAMARA C, et al. Assessment of the surface water quality in Northern Greece[J]. Water research, 2003, 37(17):4119-4124.
- [7] 赵洁, 徐宗学, 刘星才, 等. 辽河河流水体污染源解析[J]. 中国环境科学, 2013, 33(5):838-842.
- [8] LIU Y, GUO H C, YANG P J. Exploring the influence of lake water chemistry on chlorophyll a: A multivariate statistical model analysis[J]. Ecological modelling, 2010, 221(4):681-688.