

## HPLC 检测南海蕨藻中的蕨藻红素

吴思超<sup>1</sup>, 江海燕<sup>1</sup>, 许少玉<sup>1</sup>, 庄伟强<sup>1</sup>, 李药兰<sup>2</sup>, 伍秋明<sup>3</sup>, 岑颖洲<sup>1</sup>

(暨南大学 1. 生命科学技术学院化学系; 2. 药学院中药与天然产物研究所; 3. 测试中心, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 建立南海大型经济海藻总状蕨藻的主要有效成分蕨藻红素的高效液相色谱(HPLC)定量分析检测方法。取干燥蕨藻加体积分数95%乙醇80℃加热回流3次,回流时间为3h,固液比为1:20。减压浓缩得蕨藻乙醇提取物浸膏,精密称取浸膏,甲醇10ml定容。采用Discovery C<sub>18</sub>(4.6mm×150mm,5μm)反相柱,DAD检测器。检测波长315nm,进样20μL,流动相为甲醇和水(质量分数1%三氟乙酸)梯度洗脱,流速1.0mL/min。蕨藻红素在1.006~10.06μg范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$ ,平均回收率为98.0%,RSD=0.92%。测得所采集的干燥总状蕨藻中蕨藻红素的质量分数为19.93mg/g。该方法灵敏、可靠、准确性高,可用于同属海藻的蕨藻红素的定量分析检测。

**[关键词]** 蕨藻红素; 高效液相色谱; 检测

**[中图分类号]** R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)01-0092-04

## Foundation of method of caulerpin in fern algae of South China Sea measured by HPLC

WU Si-chao<sup>1</sup>, JIANG Hai-yan<sup>1</sup>, XU Shao-yu<sup>1</sup>, ZHUANG Wei-qiang<sup>1</sup>,

LI Yao-lan<sup>2</sup>, WU Qiu-ming<sup>3</sup>, CEN Ying-zhou<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry of Life Science and Technology; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy; 3. Center of Experimental Technology of Jinan University, Guangzhou 510632 China)

**[Abstract]** A quantitative analysis meathod for the determination of is established in this paper caulerpin in Fern Algae of South China Sea by High Performance Liquid Chromatography(HPLC). Drying Caulerpa was extracted with 95% ethanol by heating circumfluence in 80℃ for 3 times and the refluxing time of 3 h, and the ratio 1:10. Then the ethanol extract was got by vaccuum concentration and dissolved with 10 ml methanol. HPLC was perfomed on Discovery C<sub>18</sub>(4.6mm×150mm,5μm),DAD detctor. The detection wavelengh was 315 nm, the mobile phase was methanol and water(quality score 1%TFA), velocity of flow was 1.0 mL/min,injection volume was 20 μL. The content of caulerpin showed good linearity in the range of 1.006~10.06 μg,  $r=0.9999$ . The average recovery was 98.0%, RSD=0.92%. The results showed that per gram dry Fern Algae contained 19.93 mg caulerpin. The quantitative analysis meathod is sensitive, reliable and selective, and can be used for the detective of culerpin existing in algae.

**[Key words]** caulerpin; high performance liquid chromatography; determination

海洋的面积约占地球表面积的70%,由于海洋生物的生态环境与陆地生物的迥然不同,这两类生

物的体内生物合成过程差别很大,所以海洋天然产物与陆地天然产物的化学成分与生物活性往往差别

**[收稿日期]** 2008-07-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(20472024,20772047);广东省自然科学基金研究团队项目(039213)

**[作者简介]** 吴思超(1983-),女,硕士研究生,研究方向:天然产物.通讯作者:岑颖洲,教授 电话:(020)85223420,E-mail:ofx@jnu.edu.cn

甚大。例如,在海洋独特的生态环境中,海藻属于被吞食的弱者,海藻为了对付海洋食草动物的大量吞食以维持自身的生存繁衍,有些海藻的体内会产生一些能促进自身大量快速繁殖的生长激素类物质<sup>[1]</sup>。这类物质就有可能开发为刺激许多农作物(包括浆果作物)生长和成熟的植物生长调节剂。国内外已有文献报道表明,藻藻红素(caulerpin)具有显著的促进植物增长的作用<sup>[2]</sup>,另外还有报道,该化合物还具有较好的抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>。迄今为止,国内外还未见有对藻藻红素的检测方法的相关文献报道。由于藻藻红素是总状藻藻的主要活性成分之一,为了进一步研究和开发这种颇具开发应用前景的天然植物增长激素,本文建立了一种能准确测定南海藻藻中的藻藻红素含量的 HPLC 定量分析检测方法。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

甲醇(色谱纯),天津市化学试剂一厂;二重蒸馏水(质量分数 1‰三氟乙酸)。甲醇,乙醇,石油醚,乙酸乙酯均是分析纯,购自天津市化学试剂一厂。

总状藻藻:广东海洋大学吉宏武等人在南海湛江海域采集海藻样品,由青岛海洋研究所范晓鉴定其生物种属。

### 1.2 主要仪器

HP1100 系列高效液相色谱仪,包括 1311A 四元泵,1313 自动进样器,1316A 柱温箱,1314 紫外—可见检测器,1315BDBAD; Agilent 化学工作站。德国 BRUKER 公司 EQUINOX-55 型红外光谱仪; Bruker Daltonics APEX II 4.70 型号的 FT-ICR MS 高分辨质谱;500MHz 超导核磁共振仪(德国 Bruker 公司);0.45  $\mu\text{m}$ ,25 mm 微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);电子天平(上海精天电子仪器有限公司);UV-2102PC-型紫外分光光度计(尤尼柯仪器有限公司);HHS 型数显恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);RE-52AAB 旋转蒸发器(上海鹏嘉科技有限公司);SHZ-D 型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂)。

### 1.3 藻藻红素标准品的制备

将新鲜的藻体用乙醇浸泡,乙醇提取物减压浓缩后用乙酸乙酯萃取,萃取物经硅胶柱(10~40  $\mu\text{m}$ )减压柱层析,V(石油醚)/V(乙酸乙酯)梯度淋洗,再经硅胶柱梯度洗脱,V(石油醚)/V(乙酸乙酯)

=7/3 的洗脱部分经乙醇重结晶提纯,得橙红色晶体,mp. 为 319~320  $^{\circ}\text{C}$ 。通过波谱技术确定其结构。

### 1.4 对照品溶液的配制

精密称取藻藻红素标准品适量,加甲醇配制成 50.3 mg/L 的藻藻红素对照品储备溶液。

### 1.5 样品溶液的制备

取粉碎后的干燥总状藻藻 5 g,精密称定,置于 100 mL 圆底烧瓶中,精密加体积分数 95% 乙醇 50 mL 在 80  $^{\circ}\text{C}$  下水浴回流 2 h。减压浓缩得总状藻藻乙醇提取物的浸膏,精密称取浸膏 10.5 mg,用甲醇定容于 25 mL 容量瓶中。用 0.45  $\mu\text{m}$  纤维素滤头过滤,作为样品溶液。

## 2 方法与结果

### 2.1 结构鉴定方法与结果

通过 MS 和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱测定样品的相对分子质量和结构。

MS 以及  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱确定其分子式为  $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ ,相对分子质量为 398。质谱数据显示正离子峰  $[\text{M}+\text{H}]^+$  为 399,负离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  为 397,所以确定相对分子质量为 398。由于在  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱上只显示 12 个共振信号,恰为分子式中含碳数的一半,同时  $^1\text{H}$ -NMR 谱上的氢质子共振信号,也表明该化合物为对称性分子,红外光谱 3 383  $\text{cm}^{-1}$  单一尖峰以及 1 265  $\text{cm}^{-1}$  强吸收峰说明存在仲胺,其中 3 383  $\text{cm}^{-1}$  为  $\nu_{\text{N-H}}$ ,1 265  $\text{cm}^{-1}$  为  $\nu_{\text{C-N}}$ 。1 688  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) 说明存在羰基,1 059  $\text{cm}^{-1}$  为  $\nu_{\text{C-O-C}}$ 。3 055  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ),1 629  $\text{cm}^{-1}$  及 1 487  $\text{cm}^{-1}$  (骨架振动)说明存在芳香环。 $^1\text{H}$ -NMR 中  $\delta$  为 7.18、7.25、7.47、7.59 的 4 个峰构成 abcd 偶合系统,为邻二取代苯环上 4 个氢的特征,从而进一步确定分子中吡啶结构的存在。值得注意的是  $\delta$  为 12.55 的质子。因为此化合物呈中性,所以位于如此低场的质子一定是吡啶环上的氢。此氢原子受分子内氢键的影响而向低场位移,所以分子中的羧酸甲酯必位于吡啶环所连的邻位上。通过与有关文献的该化合物的光谱数据比较,确定该化合物为藻藻红素,经结合高效液相等仪器分析结果,该样品的纯度达到 99% 以上。其化学结构如图 1。

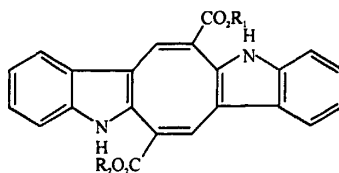


图1 藻藻红素

## 2.2 检测波长的确定

取配好的蕨藻红素标准品溶液,于200~400 nm进行紫外扫描,结果显示蕨藻红素对照品溶液在315 nm波长处有最大吸收峰,故选择315 nm为测定波长。

## 2.3 色谱条件

分别吸取上述对照品溶液和样品溶液20 μL,注入液相色谱仪,测定蕨藻红素的峰面积,按外标法计算其含量。

分别以甲醇与水(质量分数1%三氟乙酸)按一定比例的混合液作为洗脱剂作等度洗脱( $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=90:10、70:30、50:50$ ),结果发现用90:10的洗脱剂洗脱时在4~5 min就出峰,分离效果较好,其它配比则长时间不出峰,分离效果不好。结合蕨藻红素标准品和总装蕨藻乙醇粗提物,用甲醇与水按一定配比的洗脱剂作梯度洗脱,出峰时间延后20~30 min,分离效果则更为理想。总状蕨藻醇提物高效液相分离谱图如图2。

色谱条件:Discovery C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相甲醇与水(质量分数1%三氟乙酸)梯度洗脱,洗脱条件为甲醇与水的配比在30 min内由10:90变为90:10;流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:室温;检测波长315 nm。

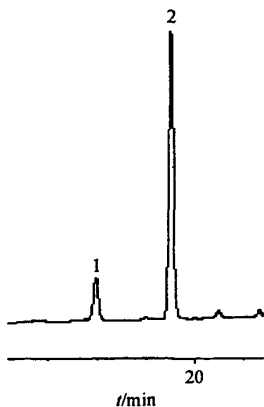


图2 总状蕨藻醇提物谱图

## 2.4 标准品的标准曲线与线性范围

精密吸取蕨藻红素标准品溶液(50.3 mg/L)2、6、10、15、20 μL,注入液相色谱仪,按上述条件测定峰面积,以峰面积对进样量(mg/L)进行回归,峰面积为纵坐标Y,样品质量浓度(mg/L)为横坐标X作标准曲线。结果表明蕨藻红素进样量在1.006~10.06 μg有良好的线性关系,蕨藻红素的线性回归方程为 $Y=50.165X-5.322$ , $r=0.9999$ 。该方法最

低检测限(按 $S/N=3$ 计)为8 ng。

## 2.5 精密度试验

精密吸取上述标准品溶液,连续进样5次(20 μL),测定峰面积, $RSD=0.22\%$  ( $n=5$ ),表示仪器精密度良好。

## 2.6 提取条件的考察

分别比较乙醇体积分数30%、50%、70%、90%、95%和无水乙醇对总状蕨藻的提取效果。取相同海藻样品5份,每份10 g,分别加入10倍量的不同溶剂,80℃加热回流2 h;将提取液滤过,采用HPLC测定蕨藻红素的质量分数,结果测得其质量分数(以每g总状蕨藻乙醇提取浸膏中含有的蕨藻红素质量比计,下同此)分别为9.90、11.32、14.51、16.77、18.23、18.31 mg/g,表明无水乙醇的提取效果最好。但从工艺提取制备成本考虑,应选用体积分数95%乙醇作为提取溶剂。

分别比较50、70、90℃的体积分数95%乙醇水浴提取对总状蕨藻的提取效果。取相同海藻样品3份,每份10 g,分别在不同温度下提取2 h,提取液滤过,测定蕨藻红素的质量分数。结果测得其质量分数分别为15.68、17.32、18.81 mg/g,表明水浴提取温度为90℃时其提取效果最佳。

在乙醇提取单因素研究结果的基础上,采用 $L_9(3^3)$ 正交方法对提取工艺参数进行优化,正交试验因素水平及实验结果与分析见表1与表2。

表1 正交试验因素水平表

水平	次数	t/h		固液比
	A	B	C	
1	1	1		1:10
2	2	2		1:15
3	3	3		1:20

表2 正交试验结果

试验号	A	B	C	$w(\text{蕨藻红素})/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
1	1	1	1	9.91
2	1	2	2	13.53
3	1	3	3	15.60
4	2	1	2	18.10
5	2	2	3	18.57
6	2	3	1	18.22
7	3	1	3	19.83
8	3	2	1	19.36
9	3	3	2	18.75
$K_1$	0.130	0.159	0.158	
$K_2$	0.183	0.171	0.168	
$K_3$	0.193	0.175	0.177	
R	0.063	0.016	0.022	

由极差分析结果可知,正交优化条件为  $A_3C_3B_3$ ,即蕨藻红素最佳提取工艺参数为在体积分数 95% 乙醇 80 ℃ 条件下加热回流 3 次,回流时间为 3 h,固液比为 1:20. 在该条件下重复试验测得提取浸膏里蕨藻红素质量分数为 19.93 mg/g.

## 2.7 稳定性试验

取供试品溶液,按以上色谱条件,于 0、2、4、6、8、10、16 h,测定峰面积,结果  $RSD = 0.72\%$  ( $n = 7$ ),显示样品在 16 h 内稳定.

## 2.8 重复性试验

取在最佳工艺条件下提取得到的样品 6 份,分别精密称定,按方法提取进 20  $\mu$ L 并测定峰面积,计算蕨藻红素质量分数,结果该批样品中含蕨藻红素平均值为 19.93 mg/g(即每 g 总状蕨藻乙醇提取浸膏中含 19.93 mg 蕨藻红素), $RSD = 0.62\%$  ( $n = 6$ ),表明该方法重现性良好.

## 2.9 加标回收试验

采用加样回收法,精密称取已测知蕨藻红素质量分数的总装蕨藻乙醇粗提物样品 6 份,分别精密加入不同质量的蕨藻红素对照品,测定其质量分数,计算回收率,结果见表 3. 本法具有良好的回收率.

表 3 加样回收试验结果

样品中蕨藻红素的 质量/mg	加入蕨藻红 素对照品 质量/mg	回收质 量/mg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
19.13	10.09	28.42	97.3		
19.29	11.07	29.96	98.7	97.9	0.75
19.12	10.05	28.53	97.8		
19.14	18.51	38.29	99.2		
19.46	18.77	38.13	98.3	98.4	1.13
19.33	18.89	37.34	97.7		
19.22	22.67	40.59	96.9		
19.40	23.10	42.16	99.2	97.8	0.89
19.38	23.45	41.67	97.3		

## 3 讨论

(1) 迄今为止,还没有检索到应用 HPLC 定量检测蕨藻内蕨藻红素的方法的相关报道,本文所建立的高效液相色谱检测条件为:Discovery C<sub>18</sub> 色谱

柱 (416 mm × 150 mm, 5  $\mu$ m), 检测波长 315 nm, 进样 20  $\mu$ L, 洗脱液为甲醇和水梯度洗脱, 洗脱条件为甲醇与水的配比在 30 min 内由 10:90 变为 90:10, 流速 1.0 mL/min, 该条件下蕨藻红素的出峰时间为 19.426 min.

(2) 在所确定的检测条件下测定样品中的蕨藻红素,方法简单、快捷、容易操作. 系统适用性实验、方法的专属性和方法确证实验表明,该方法专属性强,精密度和准确度高,重现性较好,可满足样品的分析测定要求.

(3) 根据对蕨藻红素的有关研究报道<sup>[4-5]</sup>,蕨藻红素无毒性,具有显著的促进植物生长的活性,是一种具有开发前景的天然的植物生长激素,其广泛存在于南海蕨藻中,生物来源十分丰富,而且含量较高(约占藻体干品的 1% 左右). 蕨藻是中国南海的资源十分丰富的经济海藻,所以深入开展南海蕨藻的高值化深加工综合利用研究,对充分利用海洋资源发展沿海地方经济及保护海洋生态环境都具有特殊的意义<sup>[6]</sup>. 本文所建立的测定南海蕨藻内的蕨藻红素含量的 HPLC 检测法,为蕨藻红素的研究及开发提供了一种具有实际应用价值的快速、准确的分析手段.

## [参考文献]

- [1] 黄丽波. 海藻中植物生长激素 Caulerpin 的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, (2): 74-78.
- [2] ANJANEYULUA S R. Two caulerpin analogs and a sesquiterpene from *Caulerpa racemosa* Phytochemistry[J]. 1991, 30(9): 3041.
- [3] 杨宜婷. 麒麟菜中蕨藻红素抗肿瘤活性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(7): 851-852.
- [4] RAUB M F, CARDELLINA J H. The green algal pigment caulerpin as a plant growth regulator[J]. Phytochemistry, 1987, 26(3): 619-623.
- [5] 苏镜娱. Caulerpin 的分离鉴定及生物活性[J]. 中国海洋药物, 1992, 11(2): 25-27
- [6] SCHWEDE J G, CARDELLINA II J H, GRODE S H, et al. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *caulerpa* [J]. Phytochemistry, 1987, 26(1): 155-158.

[责任编辑:黄建军]