

铜藻中  $\beta$ -丙氨酸的分离及结构鉴定荣辉<sup>1,2</sup> 林祥志<sup>2\*</sup> 王龙梅<sup>1,2</sup> 苏永全<sup>1</sup><sup>1</sup>厦门大学海洋与地球学院; <sup>2</sup>国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

**摘要:** 非蛋白质氨基酸在抗癌、抗菌、抗结核、抗坏血病等方面有着重要的作用。本文主要对铜藻中的游离氨基酸进行检测分析和部分分离纯化及结构鉴定方面的研究, 为更好的开发利用这些天然产物提供技术支持。采用离子交换树脂层析法分离铜藻粗提液中的游离氨基酸, 收集 3 mol/L 的氨水洗脱液, 用 PITC-HPLC 柱前衍生反相高效液相色谱法对其进行检测分析, 结果显示粗提液中除含有多种组成蛋白质的氨基酸外还有 3 种未知组分, 且含量较高的常见蛋白质氨基酸为丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸。采用半制备高效液相色谱系统制备分离了其中一种未知组分的衍生物 MWZ2, 经真空冷冻干燥后为略黄固体粉末, 结合核磁共振波谱、高分辨质谱、红外光谱数据, 最终鉴定 MWZ2 去掉已知取代基团 PITC 后的成分为  $\beta$ -丙氨酸, 分子式为  $C_3H_7NO_2$ , 分子量为 89.09。

**关键词:** 铜藻;  $\beta$ -丙氨酸; 分离; 结构鉴定

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

Separation and Identification of  $\beta$ -alanine in *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag.RONG Hui<sup>1,2</sup>, LIN Xiang-zhi<sup>2\*</sup>, WANG Long-mei<sup>1,2</sup>, SU Yong-quan<sup>1</sup><sup>1</sup>College of Ocean and Earth Science, Xiamen University; <sup>2</sup>Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

**Abstract:** Non-protein amino acids were found to have many bioactivities such as anti-cancer, antibacterial, anti-tuberculosis, anti-scurvy and so on. Detection, separation and identification of free amino acids in *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag. were studied in this paper, which provided technical support for development and utilization of these natural products. Free amino acids were separated by ion-exchange column chromatography from the crude extracts of *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag. Amino acids were eluted with 3 mol/L  $NH_3OH$  and the eluate was collected. Many protein amino acids and three unknown components were discovered in *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag. by PITC-HPLC. The main protein amino acids were alanine, proline, valine. One unknown derivative component (MWZ2) was obtained by preparation HPLC. MWZ2 was slightly yellow solid powder after vacuum freeze-drying. According to analysis of NMR, HR-MS, IR spectroscopy data, the molecular structure of MWZ2 had been elucidated. MWZ2 was  $\beta$ -alanine after removed substituent component of PITC, its molecular formula was  $C_3H_7NO_2$ , molecular weight was 89.09.

**Key words:** *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag.;  $\beta$ -alanine; separation; structure identification

非蛋白质氨基酸是指除组成蛋白质的 20 种常见氨基酸以外的含有氨基和羧基的化合物。非蛋白质氨基酸多为蛋白氨基酸的类似物或取代衍生物, 如甲基化、磷酸化、羟化、糖苷化、交联等等。除此之外, 还包括  $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  氨基酸及 D-氨基酸<sup>[1]</sup>。非蛋白质氨基酸多以游离或小肽的形式存在于生物的各种细胞或组织中。据统计, 从动物、植物、微生物体内分离得到的非蛋白质氨基酸已达 700 余种, 其中已测

定分子结构的有 400 多种, 在植物中发现的约 240 种, 动物中发现的有 50 多种, 其余多存在于微生物中<sup>[2]</sup>。非蛋白质氨基酸可以作为合成其它含氮物质的前身, 如激素、抗生素、生物碱、色素等, 还可作为组成细菌细胞壁的成分。非蛋白质氨基酸还可参与储能, 充当神经递质, 参与跨膜离子通道的形成, 并在抗癌、抗菌、抗结核、护肝、降血压、升血压等方面都发挥了极其重要的作用<sup>[3]</sup>。

铜藻 *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag. 属于马尾藻属, 是非食用海藻, 主要分布于我国东海、南海沿岸, 资源相当丰富, 常用作饲料、藻胶、饮料的原料, 部分地区作为中药海藻使用。目前已从马尾藻

收稿日期: 2013-01-08 接受日期: 2013-04-02

基金项目: 国家海洋局海洋公益项目(200805041)

\* 通讯作者 Tel: 86-592-2195562, E-mail: lxz8848@263.net

中发现多类具有生物活性的化合物,主要有甾类化合物、萜烯类化合物、甘油糖脂、间苯三酚衍生物及其聚合物等物质,铜藻的化学成分研究较少,仅报道含褐藻酸、甘露醇、多糖、甾醇等<sup>[4]</sup>。本论文主要开展了铜藻中游离非蛋白质氨基酸的检测分析、部分分离及结构鉴定研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

铜藻 *Sargassum horneri* (Turn.) C. Ag.: 采自中国福建沿海,由汕头大学丁兰平教授鉴定,保存在国家海洋局第三海洋研究所藻类种质资源库内。

### 1.2 试剂及仪器

氨基酸混合标准品(Sigma),PITC(异硫氰酸苯酯,Sigma),乙腈、正己烷、甲醇等均为色谱纯,HCl(优级纯),其他试剂均为分析纯。

主要仪器:高效液相色谱仪(日本岛津,LC-20A),半制备高效液相色谱仪(日本岛津,LC-8A),核磁共振仪(美国Bruker,Mercury-400),红外光谱仪(美国Bruker,VERTEX 70),高分辨质谱仪(美国Waters,LCT Premier XE)。

### 1.3 铜藻游离氨基酸的分离

取一定量粉碎的铜藻藻粉用75%的乙醇(料液比为1:5)浸泡24 h,然后40℃超声提取30 min,共三次。旋蒸浓缩至无乙醇(40℃下),将水相用乙酸乙酯(水相:乙酸乙酯为1:1~5)萃取三次,留水相。将水相浓缩至一定体积,过阳离子交换树脂,接3 mol/L氨水洗脱液,浓缩至干,用0.1 mol/L的HCl定容,待检测分析。

### 1.4 PITC-HPLC柱前衍生反相高效液相色谱法检测<sup>[5]</sup>

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub>(5 μm,250 mm × 4.6 mm);柱温38℃;SPD-M20A检测器,检测波长254 nm;进样量10 μL。流动相A:0.1 mol/L醋酸钠(用冰乙酸调pH为6.5)-乙腈(体积比为97:3)的溶液;流动相B:乙腈-水(体积比为4:1)的溶液。线性洗脱程序:0.0 min 0% B;13 min 7% B;23 min 23% B;29 min 35% B;35 min 40% B;40 min 100% B;45 min 100% B;47 min 0% B。流速为1.0 mL/min。

A的配制:3 g醋酸钠溶解在370 mL水中,用冰乙酸调pH至6.5,加入28 mL乙腈,用0.45 μm的

滤膜过滤。

#### 1.4.2 对照品混合溶液和样品的衍生

取对照品混合溶液或样品200 μL置于离心管中,加入0.1 mol/L PITC-乙腈溶液100 μL,1.0 mol/L三乙胺-乙腈溶液100 μL,混匀,室温下放置1 h后加入400 μL正己烷,漩涡混合器振荡1 min,静置10 min。用移液器吸取下层溶液,经0.22 μm滤膜过滤后进样进行色谱分析。

PITC-乙腈溶液:36 μL PITC和2.164 mL乙腈混合。

三乙胺-乙腈溶液:417 μL三乙胺和2.583 mL乙腈混合。

### 1.5 未知组分的制备分离

为确定检测到的未知组分的结构,采用半制备型高效液相色谱仪对衍生后的游离氨基酸粗提物进行制备分离。收集到的目标产物浓缩后经不加醋酸钠的流动相再次分离除去盐后经旋蒸除去有机溶剂,再进行冷冻干燥,收集样品待结构鉴定。

色谱柱:Shim-Pack PRC-ODS(20 × 250 cm);SPD-20A检测器,检测波长254 nm;进样量5 mL。流动相A:0.1 mol/L醋酸钠(用冰乙酸调pH值为6.5)-乙腈(97:3 v/v)的溶液;流动相B:乙腈-水(4:1 v/v)的溶液。线性洗脱程序:0.0 min 0% B;13 min 7% B;23 min 23% B;29 min 35% B;35 min 40% B;40 min 100% B;45 min 100% B;47 min 0% B。流速为18 mL/min。

### 1.6 未知组分的结构鉴定

将制备分离到的高纯化合物样品分别进行核磁共振波谱(400 M)、高分辨质谱、红外光谱分析以确定其结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 铜藻游离氨基酸的分离

铜藻粉末先经乙醇超声提取,再经乙酸乙酯萃取,最后经阳离子交换树脂层析除去大量的蛋白质、脂质、多糖等,所收集的3 mol/L氨水组分经茚三酮乙醇溶液显色反应后发现,其含有高浓度的氨基酸组分,随后并进行了PITC-HPLC法检测分析。此分离方法运用有机溶剂和超生萃取相结合的方式,减少了提取时间,且增加了提取效果。

### 2.2 PITC-HPLC法检测分析

#### 2.2.1 线性关系分析

分别取100,50,25,10,5 μL的对照品混合氨基

酸标准溶液,使其按照上述方法进行衍生,以各种氨基酸峰面积  $Y$  为纵坐标,氨基酸实际摩尔浓度  $X$  为横坐标,进行线性回归分析。结果表明 17 种氨基酸在  $0.078 \sim 1.25 \text{ mol/L}$  与峰面积比具有良好的线性关系。氨基酸混合标准品液相色谱图和得到的每种氨基酸的线性回归方程分别见图 1 和表 1。

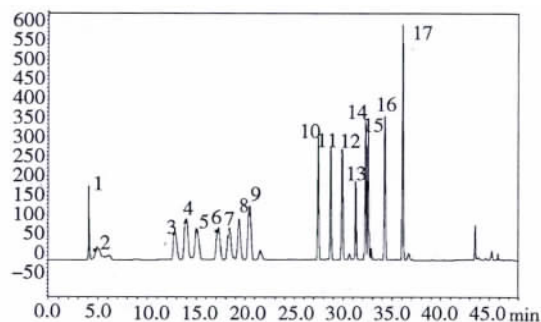


图 1 17 种混合氨基酸标准品液相色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the mixed standard samples by PITC-HPLC

(1: Asp, 2: Glu, 3: Ser, 4: Gly, 5: His, 6: Arg, 7: Thr, 8: Ala, 9: Pro, 10: Tyr, 11: Val, 12: Met, 13: Cys-Cys, 14: Ile, 15: Leu, 16: Phe, 17: Lys)

表 1 17 种氨基酸的线性回归方程

Table 1 The linear regression equations of 17 kinds of amino acids

氨基酸 Amino acid	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 Relative coefficient (r)
天冬氨酸( Asp)	$Y = 8.9285X - 0.0336$	0.9981
谷氨酸( Glu)	$Y = 9.2682X - 0.0193$	0.9893
丝氨酸( Ser)	$Y = 2.4630X - 0.0003$	0.9972
甘氨酸( Gly)	$Y = -0.4924X + 0.0124$	0.9972
组氨酸( His)	$Y = 0.7016X + 0.0081$	0.9967
精氨酸( Arg)	$Y = 0.3592X + 0.0619$	0.9962
苏氨酸( Thr)	$Y = 1.9368X + 0.0048$	0.9971
丙氨酸( Ala)	$Y = 0.8506X + 0.0033$	0.9971
脯氨酸( Pro)	$Y = -0.9416X + 0.0120$	0.9972
酪氨酸( Tyr)	$Y = -1.1209X + 0.0106$	0.9974
缬氨酸( Val)	$Y = -0.3864X + 0.0005$	0.9969
蛋氨酸( Met)	$Y = 0.0996X - 0.0296$	0.9947
胱氨酸( Cys)	$Y = -0.9390X - 0.0108$	0.9931
异亮氨酸( Ile)	$Y = -1.0240X + 0.0069$	0.9972
亮氨酸( Leu)	$Y = -0.8027X + 0.0079$	0.9969
苯丙氨酸( Phe)	$Y = -1.0405X + 0.0073$	0.9965
赖氨酸( Lys)	$Y = -3.6177X + 0.0070$	0.9971

## 2.2.2 方法的精密度、重复性及稳定性试验

取对照品溶液  $200 \mu\text{L}$  按照上述方法衍生后连续进样 5 次,以色谱峰峰面积为指标计算 RSD,考察其精密度,17 种氨基酸标准溶液的精密度的 RSD 在  $0.20\% \sim 2.49\%$  ( $n = 5$ ),均在允许范围内;取对照品溶液  $200 \mu\text{L}$  按照上述方法衍生后分别在 0、4、8、12、24、48、56 h 进样,以色谱峰峰面积为指标计算 RSD,考察其稳定性,17 种氨基酸标准溶液的稳定性 RSD 在  $0.28\% \sim 1.31\%$  ( $n = 7$ ),均在允许范围内;取同一批铜藻样品 5 份,按上述方法提取、衍生、测定,以色谱峰峰面积为指标分别计算 RSD,考察方法的重复性,铜藻所含各种氨基酸峰面积的 RSD 在  $0.70\% \sim 2.23\%$ ,同样均在允许范围内。

## 2.2.3 回收率试验

吸取已知含量的铜藻样品  $100 \mu\text{L}$ ,准确加入氨基酸混标  $100 \mu\text{L}$ ,按照上述方法分别衍生、进样,外标法定量,如此平行 5 次,计算各氨基酸的回收率和相对标准偏差,平均回收率在  $78.50\% \sim 101.82\%$ ,相对标准偏差在  $0.51\% \sim 3.45\%$ ,均在允许范围内。

## 2.2.4 PITC-HPLC 检测结果

通过与 17 种混合标准品液相色谱图比较分析发现铜藻样品中除了蛋氨酸、胱氨酸外包含 15 种其他常见蛋白质氨基酸及 3 种未知组分,且含量较高的常见蛋白质氨基酸为丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸。3 种未知组分的衍生物分别为 MWZ1 ( $6.3 \text{ min}$ )、MWZ2 ( $12.9 \text{ min}$ )、MWZ3 ( $26.6 \text{ min}$ ),见图 2。

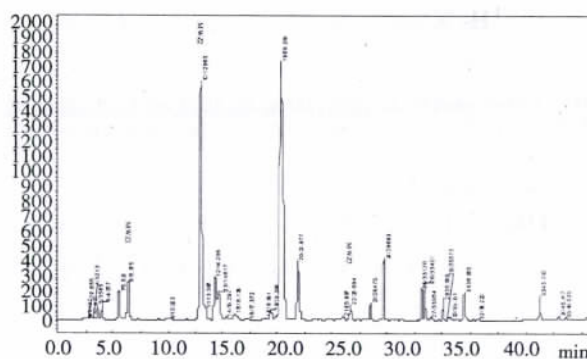


图 2 铜藻样品液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram of *Sargassum horneri* (Turn.) Ag. sample by PITC-HPLC

## 2.3 制备分离

由于 3 种未知组分衍生物中 MWZ1、MWZ3 的含量过低而未进行制备分离,最终采用半制备高效

液相色谱系统制备分离到 1 种未知衍生组分 MWZ2,其制备分离 HPLC 色谱图分别如图 3, MWZ2 的出峰时间为 10.6 min。收集未知组分经无盐流动相除盐后旋转蒸发除去有机溶剂,再经真空冷冻干燥后 MWZ2 为略黄固体粉末。

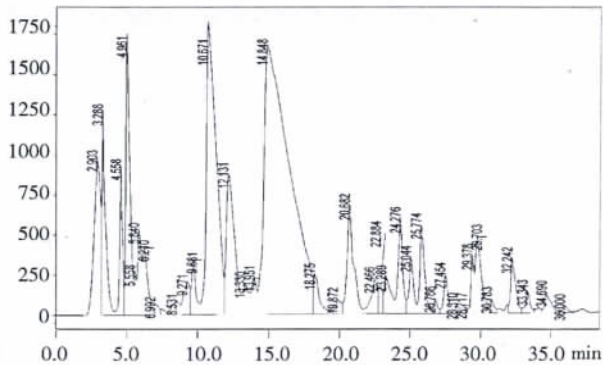
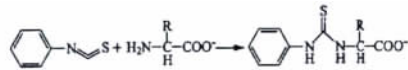


图 3 MWZ2(10.6 min)的 HPLC 制备分离图

Fig. 3 Separation of MWZ2(10.6 min) by PITC-HPLC

## 2.4 结构鉴定

分离获得的 MWZ2 是衍生剂异硫氰酸苯酯 (PITC) 与铜藻样品某一组分通过衍生反应生成的衍生物,其反应方程式如下。



MWZ2 为黄色固体粉末,IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3436 ( $\text{NH}_2$ ), 3292 ( $\text{COOH}$ ), 1564, 1413, 805 (Ph), 1022 ( $\text{C}=\text{S}$ ); TOF-MS-ESI  $m/z$  (%): 226, 2804 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.48 ~ 6.96 (m, 5H), 4.91 (m, 1H), 2.94 (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 176.0, 130.4, 129.6, 126.5, 125.1, 57.8, 39.2。结合核磁共振波谱、高分辨质谱、红外光谱数据,最终推测 MWZ 去掉已知取代基 PITC 后的成分为  $\beta$ -丙氨酸,它的分子式为  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ ,分子量为 89.09,其分子结构式如图 4。

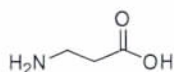


图 4  $\beta$ -丙氨酸

Fig. 4  $\beta$ -Alanine

## 3 讨论

目前,用于氨基酸分离纯化的方法有沉淀法、膜分离法、萃取法以及离子交换法等,其中以离子交换

法应用最为广泛。该法根据氨基酸是两性电解质这一特性,以及目的氨基酸与杂质氨基酸  $\text{pK}$ 、 $\text{pI}$  值的差异,利用离子交换树脂对各种氨基酸吸附能力的不同进行分离纯化<sup>[6]</sup>。本实验采用 Dowex 50W-X8 型阳离子交换树脂对铜藻游离氨基酸粗提样品进行分离,收集高浓度氨水洗脱液,经检测发现分离效果较好,含有多种氨基酸组分。

近些年来,随着氨基酸的广泛应用,用液相色谱法检测氨基酸的分析水平也不断提高,柱前衍生是先将氨基酸转化成衍生物,再进行色谱分离的一种衍生方法,操作简便、快速,灵敏度高,并在短时间内能分离 20 多种氨基酸,针对各种衍生剂的研究与开发,目前应用广泛的方法有异硫氰酸苯酯 (PITC) 法、邻苯二甲醛-巯基乙醇 (OPA) 法、 $\beta$ -氨基喹啉基-N-羟基-琥珀酰亚胺基甲酸酯 (AQC) 法等<sup>[7]</sup>。PITC-HPLC 法与其它柱前衍生法相比,其衍生过程简便,衍生物齐全,而衍生物的高灵敏度、高稳定性,使各种氨基酸含量的检测结果更加准确可靠,不失为一种快速、准确、经济的方法<sup>[8]</sup>,可广泛应用于海洋藻类中非蛋白质氨基酸的检测分析研究。但由于本实验所用的氨基酸标准品 (Sigma) 仅为 17 种常见蛋白质氨基酸混合品,缺乏 20 种常见氨基酸中的天冬酰胺、谷氨酰胺、色氨酸,并不能判定另外两种未知组分就一定是非蛋白质氨基酸,另还需考虑寡肽等的可能性,具体需进一步分离纯化来确定,但因含量过低而未进行。

本研究从铜藻中发现  $\beta$ -丙氨酸组分并鉴定了其结构,它是自然界中唯一存在的  $\beta$  型氨基酸<sup>[9]</sup>,其氨基位于碳链的  $\beta$  位,与它常见的类似物左旋  $\alpha$ -丙氨酸不同,它没有手性中心。 $\beta$ -丙氨酸是一种重要的非蛋白质氨基酸,在生物体内  $\beta$ -丙氨酸并不参与蛋白质或酶的合成,通常它由二氢尿嘧啶和肌肽的降解产生。 $\beta$ -丙氨酸也是自发生成的缩氨酸肌肽和维生素 B5 的重要组分,在正常状态下  $\beta$ -丙氨酸被最终代谢为乙酸。 $\beta$ -丙氨酸是肌肽少有的几个前体物质之一。已经证实,补充  $\beta$ -丙氨酸有助于提升肌肉组织内肌肽的含量,从而消除运动员疲劳,提升肌肉活动能力,但如果  $\beta$ -丙氨酸摄入量(以溶液或胶囊服用)超过 10 mg/每千克体重,将诱发机体感觉异常<sup>[10]</sup>。铜藻资源丰富,我们的研究为更好的利用此藻提供了新的方向。

## 参考文献

- 1 Li Y (李英), Wang X (王霞), Yang F (杨帆). Studies on

- the function and application of non-protein amino acids. *J Shanghai Institute of Technology* (上海应用技术学院学报) 2003 3: 194-98.
- 2 Cao WG(曹稳根), Li WH(李卫华), Ye ZJ(叶子坚). 非蛋白质氨基酸的生物合成及其生物学作用. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源) 1995 17(2): 47-49.
  - 3 Yan AX(闫爱新), Tian GL(田桂玲), Ye WH(叶蕴华). Progress in modification of bioactive peptides with non-protein amino acids and their application in the studies of structure-activity relationship. *Chin J Chem* (有机化学) 2000, 20: 299-305.
  - 4 Yuan QX(袁清香), Fu L(付玲). Study on the Chemical Constituents of Brown Alga *Sargassu Horneri*. *Guangdong Chem Industry* (广东化工) 2007 33(5): 42-43.
  - 5 Liu LM(刘丽敏), Wang HM(王海敏), Yu HX(虞海霞), et al. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定西洋参中游离氨基酸. *Chin Tradit Pat Med* (中成药) 2009 31: 275-278.
  - 6 Wu CL(武彩莲), Guo CJ(郭长江). Separation and purification of amino acids by ion exchange. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源) 2005 27(4): 50-53.
  - 7 Liang WQ(梁卫青), Wei QM(魏克民), Pu JB(浦锦宝), et al. Determination of amino acids in silkworm extract by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J Med Res* (医学研究杂志) 2008 37(8): 42-45.
  - 8 Lv YG(吕莹果), Zhang H(张晖), Meng XY(孟祥勇), et al. Methods for amino acid analysis and derivatization. *Cereals & Oils* (粮食与油脂) 2009 1(7): 35-38.
  - 9 Huang XM(黄秀敏), Zhang ZB(张正波), Hong M(洪敏), et al. Study on isolation and purification of beta-alanine by biosynthesis. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源) 2008 30(3): 46-50.
  - 10 Coxon M, Chakauya E, Ottenhofteal H. Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Coenzymology* 2005 33: 74-76.