

文章编号: 1000-0615(2018)07-1019-07

DOI: 10.11964/jfc.20170310769

## 龙须菜苯丙烷类抑藻活性物质的分离纯化及其对6种赤潮微藻的抑藻活性

孙颖颖<sup>1\*</sup>, 周文静<sup>1,2</sup>, 郭赣林<sup>1</sup>, 浦寅芳<sup>1</sup>, 苏振霞<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院海洋生命与水产学院, 江苏连云港 222005;

2. 连云港市产品质量监督检验中心, 江苏连云港 222000)

**摘要:** 采用溶剂浸提、液液萃取、硅胶柱层析和硅胶薄层层析等分离方法以及红外光谱、质谱和核磁共振谱等光谱技术, 初次从龙须菜中纯化得到4种苯丙烷类化合物: 邻苯二丙酸、gossonorol、7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol和对羟基苯乙醇, 并进一步分析了这4种苯丙烷类化合物对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻、东海原甲藻和中肋骨条藻生长的影响。结果表明, 它们对以上6种赤潮微藻的生长表现出明显的选择性抑制作用。其中, 邻苯二丙酸、gossonorol和对羟基苯乙醇表现出更为广泛的抑藻活性。比较这4种苯丙烷类化合物和重铬酸钾对赤潮微藻生长的半抑制效应浓度 $EC_{50-96h}$ , 发现邻苯二丙酸对强壮前沟藻、赤潮异弯藻和球形棕囊藻, gossonorol和羟基苯乙醇对赤潮异弯藻和球形棕囊藻, 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol对赤潮异弯藻和米氏凯伦藻在生长抑制方面比重铬酸钾更具有优势。

**关键词:** 龙须菜; 赤潮微藻; 苯丙烷类抑藻活性物质; 生长抑制作用; 分离纯化

**中图分类号:** X 55; S 917.3

**文献标志码:** A

苯丙烷类代谢在陆地植物体内已经得到阐明, 一切含苯丙烷骨架的物质都是苯丙烷类代谢途径直接或间接的产物。例如, 生物碱、酚酸、黄酮和其他15碳化合物等均为苯丙烷类物质。目前, 已经发现大型海藻中含有苯丙烷类化合物<sup>[1-10]</sup>。在刺酸藻(*Desmarestia aculeata*)、酸藻(*D. viridis*)、糖海带(*Laminaria saccharina*)、凹顶藻属(*Laurencia*)红藻以及蕨藻属(*Caulerpa*)绿藻中存在苯乙胺生物碱、吲哚生物碱、卤代吲哚生物碱和其他类型生物碱<sup>[7]</sup>; 伸长海条藻(*Himanthalia elongata*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)和红皮藻(*Palmaria* sp.)中含有没食子酸<sup>[8]</sup>; 在刺状鱼栖苔(*Acanthophora spicifera*)中发现了对羟基苯甲酸和黄酮<sup>[9]</sup>; 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)和坛紫菜(*P. haitanensis*)中存在黄酮<sup>[8, 10]</sup>。然而, 有关大型海藻苯丙烷类化合物的分离纯化研究还很

少<sup>[1-2, 4, 10]</sup>, 大型海藻苯丙烷类抑藻活性物质的分离纯化研究在国内外尚未见报道。

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)广泛分布于热带、亚热带和温带海区, 在我国主要分布于广东、海南沿海地区。前期研究表明, 龙须菜中含有能明显抑制米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)等赤潮微藻生长的物质<sup>[11-12]</sup>, 经化合物鉴定试验, 确定此类物质为苯丙烷类化合物。在此基础上, 本文采用溶剂浸提、液液萃取、硅胶柱层析和硅胶薄层层析等分离方法, 对龙须菜苯丙烷类抑藻活性物质进行纯化; 并采用高分辨率电喷雾离子源质谱(HR-ESI-MS), 核磁共振谱氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)和核磁共振谱碳谱(<sup>13</sup>C-NMR)等光谱技术鉴定其结构。进一步分析不同浓度苯丙烷类抑藻活性物质与其对强壮前沟藻(*Amphidinium carter-*

收稿日期: 2017-03-28 修回日期: 2017-09-27

资助项目: 国家自然科学基金(41606120); 江苏省自然科学基金(BK2014044)

通信作者: 孙颖颖, E-mail: syy-999@163.com

ae)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、米氏凯伦藻、球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和中肋骨条藻等6种赤潮微藻生长的影响,获得苯丙烷类抑藻活性物质对每种赤潮微藻生长的半抑制效应浓度( $EC_{50-96h}$ ),为利用苯丙烷类抑藻活性物质生物防控赤潮微藻奠定实验基础和提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻、东海原甲藻和中肋骨条藻在f/2培养基中培养,培养温度( $20\pm 0.1$ ) $^{\circ}C$ ,光照强度 $40\mu mol/(m^2\cdot s)$ ,光暗比12:12。

龙须菜采自福建沿海,由苏州大学沈颂东教授鉴定。龙须菜于 $50^{\circ}C$ 下完全烘干后,粉碎至0.3 mm备用。

天然海水经过脱脂棉和300目筛绢过滤、煮沸并冷却后,pH值和盐度分别调节至8.5和30备用(实验所用海水均做如上处理)。

### 1.2 龙须菜苯丙烷类抑藻活性物质的提取和液液萃取

称取400 g龙须菜干粉末,置于锥形瓶内,加入500 mL混合溶剂( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{蒸馏水}}=7:7:6$ )浸泡,室温下浸提3~4次。4 000 r/min离心10 min,滤纸过滤后,合并浸提液。 $40^{\circ}C$ 减压浓缩后,加入2 mol/L HCl将pH调至2.0,4 000 r/min再次离心10 min。上清液用正己烷溶液萃取弃去后,下层用混合有机溶剂( $V_{\text{乙醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ )萃取3~4次,收集上层溶液。上层溶液经无水硫酸钠除水后, $40^{\circ}C$ 减压蒸干,获得粗提物。称量质量后,用无水乙醇溶液定容,保存于 $4^{\circ}C$ 。

### 1.3 龙须菜苯丙烷类抑藻活性物质的分离纯化

粗提物采用硅胶(200~300目)柱层析( $3\times 40$  cm)分离,以氯仿/丙酮/甲酸(体积比为18:1:1)为洗脱剂。洗脱馏分经减压浓缩和硅胶GF<sub>254</sub>薄层层析检测后合并收集。采用划线法,将目标馏分点样于硅胶GF<sub>254</sub>薄层层析板上,以氯仿/丙酮/甲酸(体积比为15:3:2)混合溶液为展开剂,在波长为254 nm紫外光下观察。相同条带合并后进行刮板,丙酮浸泡。离心过滤后,减压蒸干,制备得到4种组分。

重新溶解于丙酮,点样于硅胶GF<sub>254</sub>薄层层析板上,分别以环己烷/乙酸乙酯、氯仿/甲醇和正丁醇/醋酸/水混合溶液为展开剂,在波长为254 nm紫外光下观察。同时,采用通用型显色剂(10%硫酸溶液和碘)进行显色,以确定其纯度是否为薄层纯。

### 1.4 抑藻活性

分离纯化过程中的抑藻活性检测 在f/2培养基中,添加“龙须菜苯丙烷类抑藻活性物质的分离纯化”制备到的4种组分(组分溶解于无水乙醇溶液中)。随后,接种中肋骨条藻,接种细胞数量为 $28\times 10^4$ 个/mL,4种样品终浓度为 $40\mu g/mL$ ,同时设定添加相同体积无水乙醇溶液的对照组,每个处理3个重复。所有培养瓶置于GXZ-260B智能型光照培养箱中培养,温度( $26\pm 1$ ) $^{\circ}C$ ,光照强度 $40\mu mol/(m^2\cdot s)$ ,光暗比为12:12,每天定时摇动培养瓶3次,以防止微藻附壁生长。每隔1 d从培养瓶中取1 mL培养液,用Lugol氏试剂固定后,计数藻细胞数量。取样后向培养瓶中加入1 mL浓缩f/2培养液,以维持培养液体积恒定。

苯丙烷类抑藻活性物质对6种赤潮微藻生长的抑藻活性 将本实验制备到的薄层纯样品溶解于甲醇,制备到5 mg/mL母液。移取不同体积此溶液到f/2培养基中,混匀后接种赤潮微藻。样品的终浓度分别为0.4、2、10和50  $\mu g/mL$ 。同时,设定添加相同体积甲醇的阴性对照组(甲醇加入体积不超过总体积1%),并设定重铬酸钾为阳性对照组,浓度依次为0.5、1、2、4、8和16  $\mu g/mL$ 。上述实验组均设置3个平行样,置于GXZ-260B智能型光照培养箱中,培养条件同上。

### 1.5 光谱测定

样品需进行HR-ESI-MS, $^1H$ -NMR和 $^{13}C$ -NMR光谱测定。用Bruker AV III 600质谱仪测定NMR(TMS为标准品),在LTQ-Orbitrap XL光谱仪进行HR-ESI-MS测定。

### 1.6 数据处理

实验数据采用SPSS 11.5软件包进行独立样本检验统计分析, $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

微藻生长抑制率( $I, \%$ )= $(1-N/N_0)\times 100$ ,式中, $N$ 为处理组藻细胞数量( $\times 10^4$  cell/mL); $N_0$ 为

对照组藻细胞数量( $\times 10^4$ 个/mL)。生长抑制率以第4天藻细胞数量进行计算。

## 2 结果

### 2.1 龙须菜苯丙烷类抑藻活性物质的分离纯化

采用溶剂浸提和液液萃取方法, 从400 g龙须菜干粉中制备得到2.5 g深棕色粗提物。将此粗提物溶解于无水乙醇溶液, 进行硅胶柱层析和硅胶薄层层析制备。最终, 制备得到A<sub>1</sub>(0.101 g)、A<sub>2</sub>(0.184 g)、A<sub>3</sub>(0.113 g)和A<sub>4</sub>(0.129 g)等4种组分。此4种组分分别在氯仿: 甲醇、环己烷: 乙酸乙酯和正丁醇: 醋酸: 水等3种展开剂下展开, 均显示出唯一的斑点。同时, 将上述4种组分点样于硅胶G板上, 经10%硫酸溶液和碘显色剂以及三氯化铁溶液显色剂显色, 结果均显示出唯一的斑点, 表明4种组分的纯度已达薄层纯。

4种组分中, 组分A<sub>2</sub>和A<sub>4</sub>对中肋骨条藻的生长表现出抑制作用。组分A<sub>1</sub>明显( $P < 0.05$ )促进了中肋骨条藻的生长, 使得此组藻细胞数量为对照组藻细胞数量的1.1倍(图1)。在本实验设定的浓度下, 组分A<sub>3</sub>未对中肋骨条藻的生长产生显著的影响(图1)。

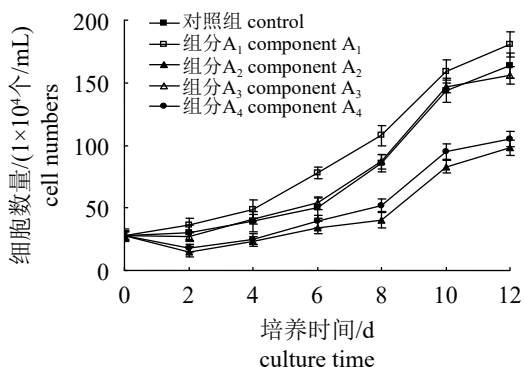


图1 4种薄层纯分离组分对中肋骨条藻生长的影响

Fig. 1 Effects of four kinds of separated components on the growth of *S. costatum*

经HR-ESI-MS, <sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR光谱测定, 确定了组分A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>和A<sub>4</sub>依次为邻苯二丙酸、gossonorol、7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol和对羟基苯乙醇。

### 2.2 4种苯丙烷类抑藻活性物质对6种赤潮微藻生长的抑藻活性

邻苯二丙酸、gossonorol、7,10-epoxy-ar-bis-

abol-11-ol和对羟基苯乙醇等4种苯丙烷类化合物对6种赤潮微藻的生长表现出明显的( $P < 0.05$ )选择性抑制作用(图2)。

当苯丙烷类化合物浓度为10  $\mu$ g/mL时, 除了米氏凯伦藻和球形棕囊藻外, 邻苯二丙酸强烈地抑制了其余4种赤潮微藻的生长( $P < 0.05$ ), 对它们的生长抑制率超过50%; gossonorol对赤潮异弯藻、球形棕囊藻和东海原甲藻的生长表现出明显地抑制作用( $P < 0.05$ ), 对此3种赤潮微藻的生长抑制率分别为93.75%、54.55%和61.11%; 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol仅对赤潮异弯藻表现出明显地生长抑制作用( $P < 0.05$ ), 对该赤潮微藻的生长抑制率超过80%; 对羟基苯乙醇则显著抑制了赤潮异弯藻、球形棕囊藻、东海原甲藻和中肋骨条藻( $P < 0.05$ ), 对它们的生长抑制率在50%以上(图2)。综合来看, 邻苯二丙酸、gossonorol和对羟基苯乙醇表现出更为广泛地抑藻活性。

邻苯二丙酸对强壮前沟藻、赤潮异弯藻和球形棕囊藻生长的半抑制效应浓度EC<sub>50-96 h</sub>明显小于重铬酸钾对此3种赤潮微藻生长的EC<sub>50-96 h</sub> ( $P < 0.05$ ); gossonorol对赤潮异弯藻、球形棕囊藻和东海原甲藻生长的EC<sub>50-96 h</sub>明显小于重铬酸钾对此3种赤潮微藻生长的EC<sub>50-96 h</sub> ( $P < 0.05$ ); 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol对赤潮异弯藻和米氏凯伦藻生长的EC<sub>50-96 h</sub>明显小于重铬酸钾对此2种赤潮微藻生长的EC<sub>50-96 h</sub> ( $P < 0.05$ ); 对羟基苯乙醇对赤潮异弯藻和球形棕囊藻生长的EC<sub>50-96 h</sub>明显小于重铬酸钾对此2种赤潮微藻生长的EC<sub>50-96 h</sub> ( $P < 0.05$ )。这就表明, 邻苯二丙酸在抑制强壮前沟藻、赤潮异弯藻和球形棕囊藻, gossonorol在抑制赤潮异弯藻和球形棕囊藻, 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol在抑制赤潮异弯藻和米氏凯伦藻, 以及对羟基苯乙醇在抑制赤潮异弯藻和球形棕囊藻生长方面比重铬酸钾更有优势。

## 3 讨论

本实验采用一系列分离方法, 初次从大型海藻—龙须菜中纯化得到邻苯二丙酸、gossonorol、7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol和对羟基苯乙醇4种苯丙烷类化合物。目前, 国内外有关大型海藻苯丙烷类化合物的分离纯化研究很少<sup>[1-2, 4, 10]</sup>。在此基础上, 发现此4种苯丙烷类化合物对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻、东海原甲藻和中肋骨条藻等6种赤潮微藻的生长具有选择性抑制作用, 国内外尚未见邻苯

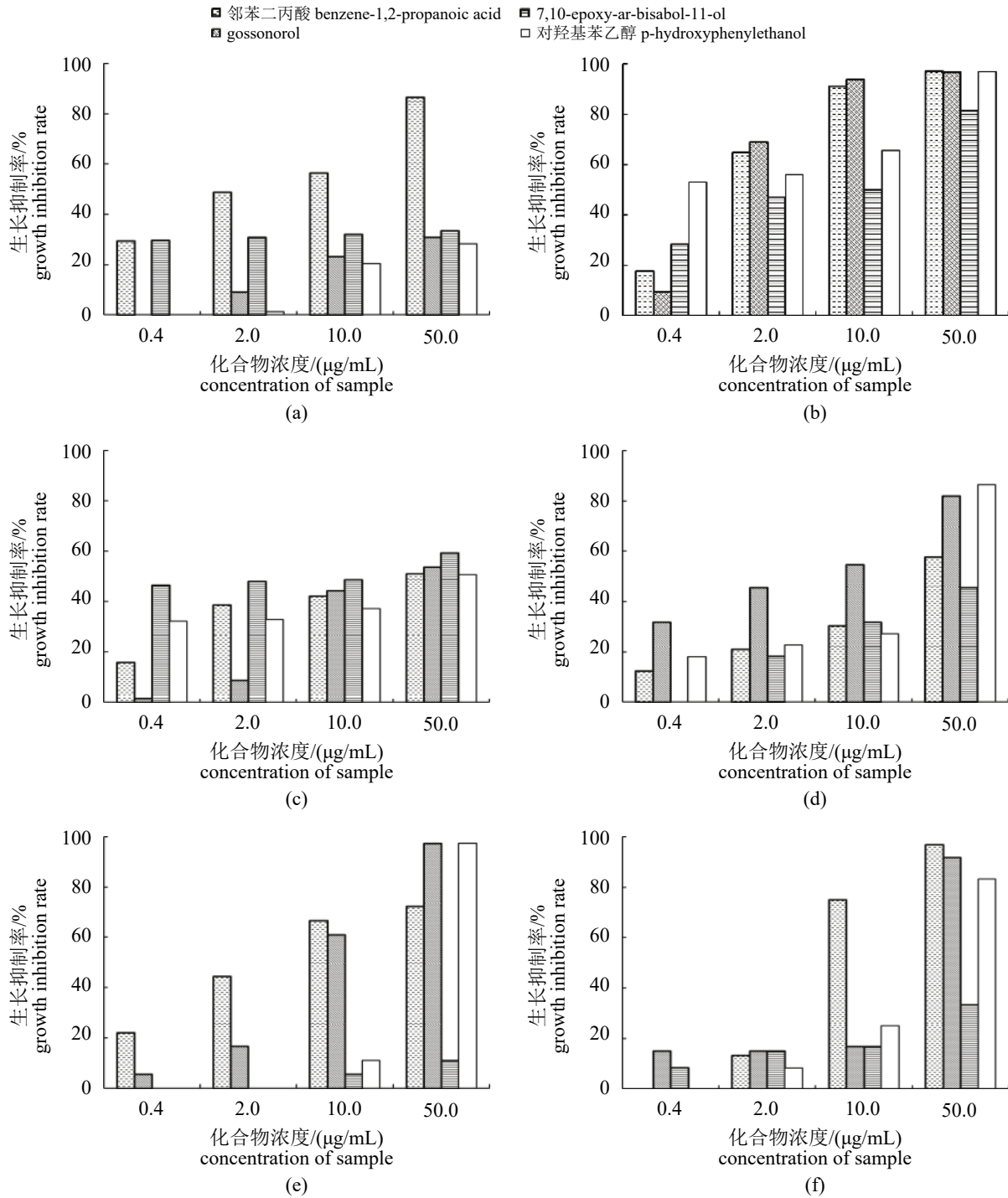


图 2 4种苯丙烷类抑藻活性物质对6种赤潮微藻生长的抑制作用

(a) 强壮前沟藻; (b) 赤潮异弯藻; (c) 米氏凯伦藻; (d) 球形棕囊藻; (e) 东海原甲藻; (f) 中肋骨条藻

Fig. 2 Growth inhibition of four kinds of phenylpropanoid antialgal substances against six red tide microalgae

(a) *A. carterae*; (b) *H. akashiwo*; (c) *K. mikimotoi*; (d) *P. globosa*; (e) *P. donghaiense*; (f) *S. costatum*

二丙酸、gossonorol、7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol和对羟基苯乙醇对6种赤潮微藻的抑藻活性报道。

研究已经证实，苯丙烷类化合物具有抑藻活性。例如，大麦(*Hordeum vulgare*)秸秆降解过

程中产生的反式肉桂酸和阿魏酸对蓝藻铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)具有很强的抑制作用<sup>[13]</sup>。含有较高含量的

-香豆酸和阿魏酸等苯丙烷类物质以及脂肪酸的稻秆浸出液能抑制球形棕

表 1 重铬酸钾和4种苯丙烷类抑藻活性物质对6种赤潮微藻生长的半抑制效应浓度(EC<sub>50-96 h</sub>)  
 Tab. 1 EC<sub>50-96 h</sub> of potassium dichromate and four kinds of phenylpropanoid antialgal substances against

		six red tide microalgae					μg/mL
赤潮微藻	重铬酸钾	邻苯二丙酸	gossonorol	7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol	对羟基苯乙醇		
red tide microalgae	potassium dichromate	benzene-1,2-propanoic acid			p-hydroxyphenylethanol		
强壮前沟藻 <i>A. carterae</i>	3.9	2.7	268	—	105		
赤潮异弯藻 <i>H. akashiwo</i>	36	1.5	1.7	3.7	2.2		
米氏凯伦藻 <i>K. mikimotoi</i>	16	37	27	1.5	58		
球形棕囊藻 <i>P. globosa</i>	38	4.1	3.0	75	12		
东海原甲藻 <i>P. donghaiense</i>	5.0	86	5.1	—	19		
中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>	2.7	6.0	13	852	16.5		

注: “—”表示未计算出

Notes: “—” not calculated

囊藻的生长<sup>[14]</sup>。金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)生物碱能明显抑制斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)的生长<sup>[15]</sup>。侧生藻(*Fischerella* sp.)分泌的生物碱类物质12-epi-hapalindole eisonitrile和12-epi-hapalindole F能抑制桶形鱼腥藻(*Anabaena doliolum*)和绿藻(*Monoraphidium convolutum*)<sup>[16]</sup>或微囊藻(*Microcystis* sp.)和聚球藻(*Synechococcus* sp.)<sup>[17]</sup>的生长。伊乐藻(*Eloдея nuttallii*)中的生物碱对铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)具有明显的化感作用<sup>[18]</sup>。Harrison等<sup>[19-20]</sup>和Durance等<sup>[21]</sup>发现含有阿魏酸和香草酸等酚酸的大叶藻(*Zostera marina*)水提取物能抑制筒柱藻(*Cylindrotheca fusiformis*)和中肋骨条藻等附生硅藻的生长。杨维东等<sup>[22]</sup>指出没食子酸、(+)-儿茶素和香草醛的浓度为23.5 μg/mL、13.0 μg/mL和263.2 μg/mL时能有效抑制塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的生长。李赞辉等<sup>[23]</sup>报道木犀草素、黄芩素和黄芩苷等黄酮分别在69.9、74.0和44.8 μg/mL时,能明显抑制塔玛亚历山大藻、米氏凯伦藻和海洋卡盾藻(*Chattonella marina*)的生长。当香草酸、对羟基苯甲酸和焦性没食子酸浓度分别为1 142.9、1 391.3和1 523.8 μg/mL时,对中肋骨条藻的生长抑制率超过50%<sup>[24-25]</sup>。6,7-二羟基香豆素和7-羟基香豆素分别为109.5和493.8 μg/mL时,对中肋骨条藻的生长抑制率超过30%<sup>[26]</sup>。本研究中,浓度为10 μg/mL时,邻苯二丙酸、gossonorol和对羟基苯乙醇致使3种或4种试验赤潮微藻的生长受到显著抑制。结果表明,此3种苯丙烷类化合物对赤潮微藻的抑制作用更为强烈。

最后,比较4种苯丙烷类化合物和重铬酸钾对赤潮微藻生长的半抑制效应浓度EC<sub>50-96 h</sub>,发

现邻苯二丙酸在治理强壮前沟藻、赤潮异弯藻和球形棕囊藻, gossonorol在治理赤潮异弯藻和球形棕囊藻, 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol在治理赤潮异弯藻和米氏凯伦藻,以及对羟基苯乙醇在治理赤潮异弯藻和球形棕囊藻上比重铬酸钾更有优势。目前,上述4种苯丙烷类化合物对6种赤潮微藻生长的EC<sub>50-96 h</sub>为初次报道,这为利用龙须菜中的苯丙烷类化合物生物防控赤潮微藻奠定了良好的实验基础。

#### 参考文献:

- [1] 徐效华, 苏镜娱. Caulerpin的分离鉴定及生物活性[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1996, 35(2): 64-66.  
Xu X H, Su J Y. The separation, identification and bioassay of Caulerpin[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1996, 35(2): 64-66(in Chinese).
- [2] Schröder H C, Badria F A, Ayyad S N, et al. Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1998, 5(2): 119-126.
- [3] Mao S C, Guo Y W, Shen X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(11): 2947-2950.
- [4] Guella G, N'Diaye I, Fofana M, et al. Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(6): 1165-1170.
- [5] 程凡, 周媛, 吴军, 等. 海洋绿藻盾叶蕨藻的化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 856-857.

- Cheng F, Zhou Y, Wu J, *et al.* Chemical constituents of *Caulerpa peltata*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2008, 19(4): 856-857(in Chinese).
- [6] Percot A, Yalçın A, Aysel V, *et al.*  $\beta$ -Phenylethylamine content in marine algae around Turkish coasts[J]. *Botanica Marina*, 2009, 52(1): 87-90.
- [7] Güven K C, Percot A, Sezik E. Alkaloids in marine algae[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(2): 269-284.
- [8] Yoshie-Stark Y, Hsieh Y P, Suzuki T. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan[J]. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 2003, 89: 1-6.
- [9] 王超杰, 王明焱, 苏镜娉, 等. 南中国海海藻刺状鱼栖苔的化学成分研究( I ) [J]. *波谱学杂志*, 1998, 15(3): 237-242.
- Wang C J, Wang M Y, Su J Y, *et al.* Research on the chemical constituent of *Acanthophora spicifera* in the south China sea ( I ) [J]. *Chinese Journal of Magnetic Resonance*, 1998, 15(3): 237-242(in Chinese).
- [10] 赵国玲, 刘承初, 谢晶, 等. 坛紫菜不同溶剂组分的抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2010, 31(17): 186-191.
- Zhao G L, Liu C C, Xie J, *et al.* Antioxidant effects of the soxhlet extraction product from *Porphyra haitanensis* and its different solvent-soluble fractions[J]. *Food Science*, 2010, 31(17): 186-191(in Chinese).
- [11] Sun Y Y, Zhang J, Xu S Z, *et al.* Growth inhibition of *Karenia mikimotoi* by extracts from *Gracilaria lemaneiformis* using five solvents[M]//Zhu E G, Sambath S. *Information Technology and Agricultural Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012: 199-210.
- [12] 孙颖颖, 张静, 刘泓君, 等. 龙须菜对3种赤潮微藻生长的影响[J]. *海洋通报*, 2011, 30(3): 328-333.
- Sun Y Y, Zhang J, Liu H J, *et al.* Effects of macroalga *Gracilaria lemaneiformis* on the growth of three species of red tide microalgae under laboratory conditions[J]. *Marine Science Bulletin*, 2011, 30(3): 328-333(in Chinese).
- [13] Xiao X, Chen Y X, Liang X Q, *et al.* Effects of Tibetan hulless barley on bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) measured by different physiological and morphologic parameters[J]. *Chemosphere*, 2010, 81(9): 1118-1123.
- [14] 杨维东, 高洁, 刘洁生, 等. 稻秆浸泡化学组分变化对抑制球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)生长的影响[J]. *生态学报*, 2007, 27(12): 5184-5192.
- Yang W D, Gao J, Liu J S, *et al.* Inhibitory effects on *Phaeocystis globosa* and chemical composition of extracts from straws under different conditions[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(12): 5184-5192(in Chinese).
- [15] 袁峻峰, 章宗涉. 金鱼藻(*Ceratophyllum demersum* Kom.)对藻类的生化干预作用[J]. *生态学报*, 1992, 13(1): 45-50.
- Yuan J F, Zhang Z S. Biochemical interference of aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* on algae[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1992, 13(1): 45-50(in Chinese).
- [16] Doan N T, Rickards R W, Rothschild J M, *et al.* Allelopathic actions of the alkaloid 12-*epi*-hapalindole eisonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(3-5): 409-416.
- [17] Etcheagaray A, Rabello E, Dieckmann R, *et al.* Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA 19[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16(3): 237-243.
- [18] 王红强, 成水平, 张胜花, 等. 伊乐藻生物碱的GC-MS分析及其对铜绿微囊藻的化感作用[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 361-366.
- Wang H Q, Cheng S P, Zhang S H, *et al.* Analysis of Alkaloid from *Elodea nuttallii* by GC-MS and its Allelopathic activity on *Microcystis aeruginosa*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 361-366(in Chinese).
- [19] Harrison P G, Chan A T. Inhibition of the growth of micro-algae and bacteria by extracts of eelgrass (*Zostera marina*) leaves[J]. *Marine Biology*, 1980, 61(1): 21-26.
- [20] Harrison P G, Durance C D. Reductions in photosynthetic carbon uptake in epiphytic diatoms by water-soluble extracts of leaves of *Zostera marina*[J]. *Marine Biology*, 1985, 90(1): 117-119.
- [21] Quackenbush R C, Bunn D, Lingren W. HPLC determination of phenolic acids in the water-soluble extract of *Zostera marina* L. (eelgrass)[J]. *Aquatic Botany*, 1986, 24(1): 83-89.
- [22] 杨维东, 张信连, 刘洁生. 酚酸类化感物质对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. *中国环境科学*, 2005, 25(4): 417-419.
- Yang W D, Zhang X L, Liu J S. The influence of allelochemicals on the growth of *Alexandrium tamarense*[J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(4): 417-419(in Chinese).
- [23] 李赞辉, 吴婷, 杨维东, 等. 十种黄酮类化合物对两种赤潮藻的抑制作用[J]. *暨南大学学报(自然科学版)*,

- 2012, 33(1): 72-75.
- Li Y H, Wu T, Yang W D, *et al.* Inhibitory effects of ten flavonoids against two harmful algae[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2012, 33(1): 72-75(in Chinese).
- [24] 孙颖颖, 刘筱潇, 阎斌伦, 等. 对羟基苯甲酸对2种赤潮微藻生长的影响[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(7): 36-39, 124.
- Sun Y Y, Liu X X, Yan B L, *et al.* Effects of p-hydroxybenzoic acid on the growth of two species of red tide microalgae[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(7): 36-39, 124(in Chinese).
- [25] 孙颖颖, 董晓柯, 李光成, 等. 3种酚酸对中肋骨条藻生长的抑制作用[J]. *环境科学与技术*, 2015, 38(3): 26-30.
- Sun Y Y, Dong X K, Li G C, *et al.* Growth inhibition of three kinds of phenolic acids on *Skeletonema costatum*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 38(3): 26-30(in Chinese).
- [26] 孙颖颖, 王长海. 香豆素对中肋骨条藻生长及生理特性的影响[J]. *环境科学与技术*, 2014, 37(S1): 19-23, 66.
- Sun Y Y, Wang C H. Preliminary analysis of growth inhibition effects of two kinds of coumarins on *Skeletonema costatum*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(S1): 19-23, 66(in Chinese).

## Isolation and purification of phenylpropanoid antialgal substances from *Gracilaria lemaneiformis* and their growth inhibition effects on six species of red tide microalgae

SUN Yingying<sup>1\*</sup>, ZHOU Wenjing<sup>1,2</sup>, GUO Ganlin<sup>1</sup>, PU Yinfang<sup>1</sup>, SU Zhenxia<sup>1</sup>

(1. College of Marine Life and Fisheries, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Lianyungang Products Quality Supervision and Inspection Center, Lianyungang 222000, China)

**Abstract:** Four phenylpropanoid antialgal compounds (1-4) were successfully isolated from *Gracilaria lemaneiformis* through a combination of solvent soak, liquid-liquid extraction, silica gel column chromatography and repeated preparative thin-layer chromatography. On the basis of the spectral data, the compounds were identified as benzene-1,2-propanoic acid (1), gossonorol (2), 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol (3), and p-hydroxyphenylethanol (4). These 4 compounds were isolated from marine macroalgae for the first time. Further, a quantitative relationship between the inhibition of algal growth and the concentration of each phenylpropanoid antialgal compound was determined and important parameters for future practical HAB control, e.g. EC<sub>50-96 h</sub>, were also obtained. The results indicated that isolated compounds 1-4 possessed selective antialgal activity against the growth of several red tide microalgae (*Amphidinium carterae*, *Heterosigma akashiwo*, *Karenia mikimitoi*, *Phaeocystis globosa*, *Prorocentrum donghaiense*, and *Skeletonema costatum*). Their antialgal activity against the tested red tide microalgae has not been previously reported. Among them, benzene-1,2-propanoic acid (1), gossonorol (2) and p-hydroxyphenylethanol (4) showed more extensive antialgal activities against the tested red tide microalgae. Furthermore, benzene-1,2-propanoic acid (1) against *A. carterae*, *H. akashiwo* and *P. globosa*; gossonorol (2) and p-hydroxyphenylethanol (4) against *H. akashiwo* and *P. globosa*; and 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol (3) against *H. akashiwo* and *K. mikimitoi* possessed better application potential than potassium dichromate as a characteristic antialgal agent against these red tide microalgae.

**Key words:** *Gracilaria lemaneiformis*; red tide microalgae; phenylpropanoid antialgal substances; growth inhibition; isolation and purification

**Corresponding author:** SUN Yingying. E-mail: syy-999@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41606120); Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK2014044)