

黄、渤海漂移浒苔(*Enteromorpha prolifera*)脂肪酸组成及聚类分析的研究*

杨佰娟¹ 郑立¹ 陈军辉¹ 臧家业¹ 王小如^{1,2} 黎先春¹

(1. 国家海洋局第一海洋研究所海洋生态研究中心 青岛 266061; 2. 厦门大学化学化工学院化学系 现代分析科学教育部重点实验室 厦门 361005)

提要 于 2008 年 7 月在黄、渤海区域采集了 17 个漂移浒苔样品, 结合 3 个本地种, 对其脂肪酸组成进行了 GC-MS 分析。结果表明, 所有浒苔中优势脂肪酸为十六碳酸, 相对含量在 27.82%—43.27% 之间。藻体中还含有丰富的 PUFA, 主要为 9,12,15-十八碳三烯酸、6,9,12-十八碳三烯酸、9,12-十八碳二烯酸、8,11,14-二十碳三烯酸, 另外还含有 EPA 不饱和脂肪酸。以欧式距离平方为距离测量技术, 类间距用平均链锁法, 对 20 个不同地理位置的浒苔样品进行聚类分析, 结果分为 4 大类, 所有漂浮浒苔聚为第一类, 青岛和连云港的本地种分别聚为另三类, 说明青岛近海漂浮的浒苔不是青岛本地生浒苔, 而是从外海漂移过来的, 第一类的聚类结果显示了浒苔的漂移路径。结果表明, 藻类脂肪酸的系统聚类分析为海洋绿藻分类与量化评价提供了一种好方法。

关键词 浒苔, 脂肪酸, 聚类分析

中图分类号 Q94.946

绿潮是大型海藻爆发性繁殖生长而在海面形成大规模漂浮藻体的一种生态灾害。早在 20 多年前, 欧洲就爆发了绿潮灾害, 随着沿岸海域污染的不断加重, 绿潮在全球沿岸海域爆发并造成严重危害的现象变得越来越频繁, 已经成为一种世界性的海洋灾害 (<http://www.waterquan.com/html/07/n-12307.html>)。近年来, 我国沿岸海域南至厦门、北到大连陆续发生浒苔、石莼等大型海藻异常繁殖生长形成的绿潮灾害, 对海洋生态系统、资源、环境与沿海经济造成了不同程度的破坏。2008 年 5 月在黄海南部爆发、6 月上旬开始在青岛沿海高密度聚集的浒苔绿潮是至今我国海域面积最大、危害最为严重的一次。目前采用最多的处置方法为打捞法, 打捞出的浒苔绝大部分直接运往垃圾处理场作填埋处理。但因浒苔的大规模爆发, 打捞出的数量十分巨大, 如 2008 年青岛附近海域爆发的浒苔, 打捞出近百万吨, 直接填埋处理不仅极大增加了垃圾处理场的处理负荷, 且因易腐烂成为新

的污染源; 同时因其中富含多种不饱和脂肪酸, 也造成了资源的巨大浪费。对浒苔进行综合利用, 可变为宝, 具有广阔的开发前景。目前中国缺乏对浒苔的开发利用的研究和探讨, 虽然吉宏武等(2005)、李宪瑾等(2002)报道了浒苔的脂肪酸组成, 但是黄、渤海不同地理位置常见浒苔脂肪酸组成方面的研究尚未见报道。本文以 2008 年黄、渤海爆发期的浒苔为研究对象, 分析了不同生长环境的浒苔的脂肪酸组成, 为浒苔的综合利用提供了基础研究资料。

海洋藻类种类繁多, 但随着研究的不断深入, 越来越多的证据表明, 在不同生活环境、许多形态上相似的藻类在化学组成有着相当大的差别。早在 20 世纪 40 年代(Millner, 1948)就提出可以用脂肪酸作为藻类的分类依据。近期, Zhukova 等(1995)肯定了这种分类的合理性, 指出特征脂肪酸或几种脂肪酸的组合可作为化学分类的标志。徐继林等(2004)等报道了脂类分析在海洋微藻化学分类学上的研究进展。许河峰

* 海洋公益性行业科研专项, 200805039 号; 国家海洋局第一海洋研究所基本科研业务费专项资金项目, 2008G47 号、2008T32 号; 国家自然科学基金资助项目, 20602009 号、40776098 号; 海洋 863 项目, 2007AA09Z435 号。杨佰娟, E-mail: ybj2008@fio.org.cn

通讯作者: 郑立, 博士, 副研究员, E-mail: zhengli@fio.org.cn

收稿日期: 2008-11-17, 收修改稿日期: 2009-01-12

(2003a)报道了 30 种海洋绿藻的脂肪酸分类与评价,取得了很好的效果。目前还未见同一种藻类在不同生活环境的分类研究。本文分别以脂肪酸含量为指标,首次将不同生长环境下浒苔样品进行聚类分析,以期揭示这些数据在藻类分类中蕴藏的内在规律,为海藻分类研究提供新的可能补充或参考方法。

1 材料

实验所用的新鲜浒苔均采于 2008 年黄、渤海浒苔爆发期的 7 月,浒苔的样品信息见表 1,其具体采样站位见图 1。采集的浒苔样本用无菌海水仔细清洗,洗去表面泥沙和其它附着物,60℃ 烘箱烘干备用。

2 方法

2.1 浒苔脂肪酸的制备

称取 20mg 左右的藻粉样品,置于螺口试管中,加 1ml 的饱和 KOH-CH₃OH 溶液,充氮气保护,混匀,置于 75℃ 水浴皂化 10min,冷却后加 2ml 的 1mol/L 的 HCl-CH₃OH 溶液(使 pH<2),混匀,置于 75℃ 水浴 10min。冷却,加 0.5ml 正己烷和 2ml 蒸馏水,充分振

荡,静置,取正己烷层,用气相色谱质谱仪分析。

2.2 色谱条件

色谱柱:HP-5MS 石英毛细管柱(30m×0.25mm id×0.25μm);载气:氦气,流速为 1ml/min,进样口温度 250℃,传输线温度为 300℃。电子能量 70eV,离子源温度 230℃,四极杆温度 150℃。升温程序为:初温 50℃,10℃/min 升到 280℃。进样量 1μl,分流进样(10:1),扫描方式为选择离子(SIM)方式。

2.3 脂肪酸的鉴定

参照标准样品和谱库 NIST 5.0 对脂肪酸进行定性。用归一化法计算出脂肪酸组分的百分含量,以占脂肪酸总量的百分比表示。

2.4 数据分析

采用统计软件 SPSS11.5 进行相关的数据分析及统计。

3 结果与讨论

3.1 浒苔脂肪酸的组成

从表 2 为采自黄海和渤海的 20 个不同地理位置的浒苔的脂肪酸组成,这 20 个浒苔的脂肪酸分布具

表 1 浒苔样品信息表
Tab.1 A summary of *E. prolifera* samples

序号	编号	样品信息	序号	编号	样品信息
1	QD1	青岛漂浮浒苔	11	J1	黄海漂浮浒苔
2	QD2	青岛漂浮浒苔	12	J2	黄海漂浮浒苔
3	QD3	青岛漂浮浒苔	13	J3	黄海漂浮浒苔
4	QD4	青岛漂浮浒苔	14	J4	黄海漂浮浒苔
5	QD5	青岛漂浮浒苔	15	J5	黄海漂浮浒苔
6	QD6	青岛虾池浒苔	16	J6	黄海漂浮浒苔
7	DFG	大风港漂浮浒苔	17	J7	黄海漂浮浒苔
8	RZ	日照漂浮浒苔	18	J8	海上漂浮浒苔
9	LYG1	连云港西大堤浒苔	19	J9	海上漂浮浒苔
10	LYG2	连云港车轴河浒苔	20	J10	海上漂浮浒苔

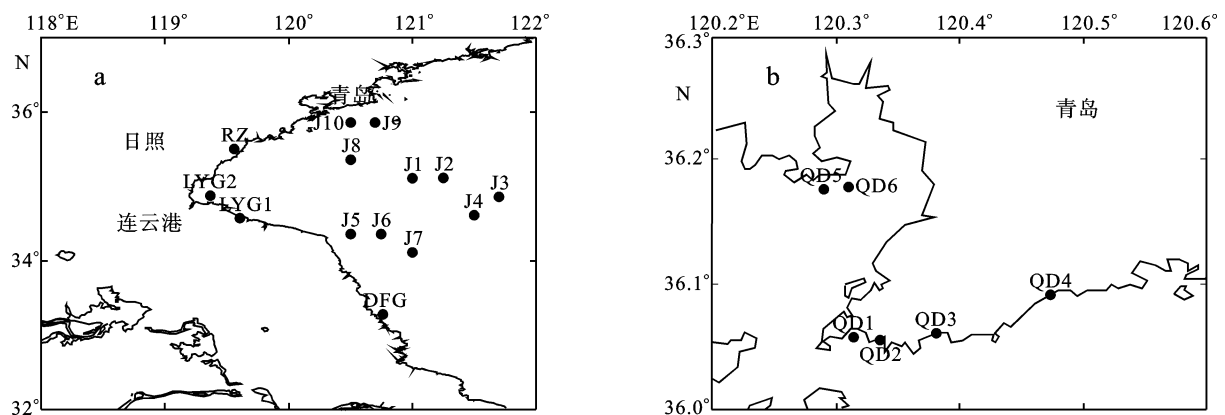


图 1 浒苔采样站位

Fig.1 Location of sampling stations
a. 青岛以外采样站位, b. 青岛地区采样站位

有明显的绿藻脂肪酸分布特征(Jamieson *et al.*, 1972), 其主要脂肪酸是 16:0、十六碳不饱和脂肪酸、18:0、十八碳不饱和脂肪酸、十八碳多不饱和脂肪酸[主要是 18:2、18:3(n-3)、18:3(n-6)]的含量较高, 绿藻中 C16、C18 PUFAs 含量较高(Dembitsky *et al.*, 1991), 此外高含量的 C18:3(n-3)也是绿藻脂肪酸组成的突出特征。表 2 所列的黄海和渤海的浒苔中饱和脂肪酸主要成分为十六碳酸, 相对含量在 27.82%—43.27%, 十四碳酸和十八碳酸含量比较低, 其相对含量为 0.13%—10.34%。其中, 连云港西大堤浒苔的饱和脂肪酸含量最高, 可达 49.11%, 青岛地区的不饱和脂肪酸含量也在 40% 以上(除 QD6 外), 其余地区的含量在 30% 左右。目前, 心血管疾病已经成为导致人类死亡的第一大疾病, PUFA 对心血管疾病具有较好的预防和治疗作用(梁英等, 1997)。海藻是 PUFAs 的重要来源, 中国闽浙地区当地人们一直有采食浒苔的习惯。从表 2 可知, 浒苔中含有丰富的 PUFA, 其总相对含量在 40.16%—64.38%, 主要为 9,12,15-十八碳三烯酸(20.41%—39.41%)、6,9,12-十八碳三烯酸(0.08%—2.06%)、9,12-十八碳二烯酸(8.87%—22.19%)、8,11,14-二十碳三烯酸(5.60%), 另外还含有 EPA 不饱和脂肪酸。浒苔样本的多不饱和脂肪酸总含量在 40.16%—64.38% 之间, 含量最高的为 J6, 可以在保健品方面进行开发利用。从表 2 的不同地区的浒苔脂肪酸的组成可以看出, 不同来源的浒苔脂肪酸组成虽然有差异, 但基本特征是不变的。

3.2 聚类分析结果

3.2.1 数据的标准化 在聚类分析分析中, 数据的选择和数据的预处理是分析成功与否的一个重要因素。文献指出, 若原始指标变量数量级差异较大, 则变量值大的对综合指标(公共因子)的影响也大(游家兴, 2003); 因此在模式判别方法分析法之前, 首先对样本原始数据转化成标准化值, 以消除由于数据变换的幅度、范围以及数据分布的非正态性对模式识别判别结果的影响。标准化处理会保持原始指标数值的相对稳定性。本文应用 SPSS11.5 统计软件包中的描述性分析(Descriptives)对原始数据进行标准化处理后进行主成分分析。将原始数据变量转换成新的标准化值变量 z_x 的公式为:

$$z_x = \frac{x - \bar{x}}{s} \tag{1}$$

式中, s 表示原变量的标准偏差, \bar{x} 表示原变量的平均值。

3.2.2 多变量综合聚类分析 聚类分析是直接比较各事物之间的性质, 将性质相近的归为一类, 将性质差别较大的归入不同的类。聚类分析作为多元分析的一个重要分支, 自诞生几十年来, 已取得了丰硕的研究成果, 现在也有越来越多的科学工作者将其应用于药的质量控制(陈军辉等, 2006)、海洋微藻的分类研究(许河峰, 2003b), 作者将聚类分析应用于 20 个不同地理位置的浒苔样品进行聚类分组, 再用 SPSS11.5 中的 Hierarchical Cluster 对测定的结果进行聚类, 方法选择 Between-groups linkage(类间平均链锁法), 在距离测量技术上选择 Squared Euclidean distance(欧式距离平方)。经过 19 步(20 个样本), 然后根据表中的数值顺序用 Average Linkage 法作图得图 2。

图 2 为层次聚类分析的树形图, 直观地显示了整个聚类过程。由图 2 可见, 全部 20 种浒苔归属一类时, 类合并距离尺度为 25; 在距离尺度仅为 6 左右时, 结果分为 4 类时, 在此处划一虚线。可以看出浒

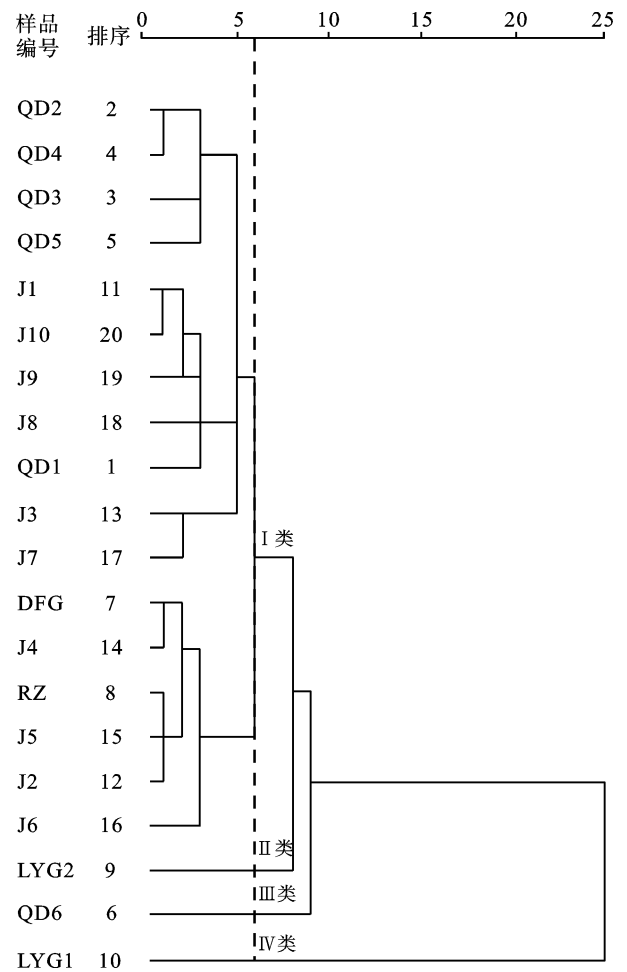


图 2 浒苔聚类分析图

Fig.2 Dendrogram of *E. prolifera*

苔 QD2、QD4、QD3、QD5 首先分为一类, J1、J10、J9、J8、QD1 分为一类, J3、J7 分为一类, 在步长 5 是三类聚为一类, DFG、J4、RZ8、J5、J2、J6 聚为一类, 在步长为 6 时, 与上述样品聚为一类, 这一类的主要特点都是海上漂浮的浒苔。LYG1、LYG2 和 QD6 的浒苔各为一类, QD6 的浒苔为青岛本地生虾池的浒苔, 连云港的两个浒苔样本也是本地生浒苔。2008 年 6 月青岛近海浒苔大面积爆发(乔方利等, 2008), 其后的卫星遥感监测表明, 青岛大面积爆发的浒苔是外海漂移过来的, 而且在漂移过程中浒苔不断增长, 最终呈现了罕见的大面积漂浮聚集态势。从本文的聚类分析结果可以看出, 青岛近海漂浮的浒苔不是来源于青岛本地生浒苔, 也不是来源于连云港的浒苔, 而是外海漂移过来的, 第一类的聚类结果显示了浒苔的漂移路径, 与文献报道的结果一致(乔方利等, 2008)。

图 3 为聚类分析结果四类浒苔样本的总离子流图, 从图 3 中可以看出, 四类浒苔样本脂肪酸组成的分布非常相似, 但在含量上差异非常大, 聚类分析可以对这些含量上细微的差异很好的区分开。聚类分析又称集群分析, 它是研究“物以类聚”的一种数理统计方法, 聚类分析可将一些观察对象依据某些特征加以归类, 在生物学和医学分类问题中有着广泛的应用。聚类分析用于不同地理位置的浒苔分类的研究

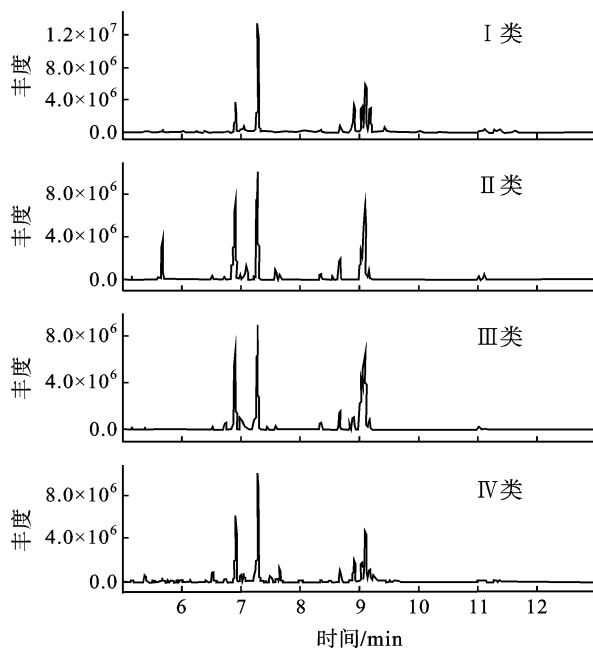


图 3 不同类别浒苔气相色谱分离图

Fig.3 Chromatogram of different types of *E. prolifera*

未见报道, 本文探索性地以浒苔中的脂肪酸为分析变量, 对不同浒苔样品进行聚类分类研究。取得了良好的结果。在进行聚类分析时, 对欧氏距离、马氏距离、绝对值距离均做了尝试, 其中以欧氏距离分类效果最佳, 最终为本文采用。

4 结语

从脂肪酸分析结果看, 浒苔的主要脂肪酸是 16:0、十六碳不饱和脂肪酸、18:0、十八碳不饱和脂肪酸、十八碳多不饱和脂肪酸[主要是 18:2、18:3(n-3)、18:3(n-6)]。通过选系统聚类分析可将 20 个不同地理位置浒苔按其脂肪酸的内在数理统计规律划归 4 类, 青岛近海漂浮的浒苔不是来源于青岛本地生浒苔, 也不是来源于连云港的浒苔, 而是外海漂移过来的, 与文献报道的结果一致。本文存在的主要问题是缺乏具体鉴定 20 个浒苔样品是否为同一属, 需要进一步的研究和探讨。

参 考 文 献

- 吉宏武, 赵素芬, 2005. 南海 3 种可食绿藻化学成分及其营养评价. 湛江海洋大学学报, 19(3): 19—23
- 乔方利, 马德毅, 朱明远等, 2008. 2008 年黄海浒苔爆发的基本状况与科学应对措施. 海洋科学进展, 26(3): 409—410
- 许河峰, 2003a. 30 种海洋绿藻的脂肪酸分类与评价. 海洋科学, 27(8): 77—80
- 许河峰, 2003b. 基于脂肪酸组成的海洋微藻化学计量学分类研究. 海洋通报, 22(3): 69—72
- 李宪雍, 范晓, 韩丽君等, 2002. 中国黄、渤海常见大型海藻的脂肪酸组成. 海洋与湖沼, 33(2): 215—224
- 陈军辉, 谢明勇, 王凤美等, 2006. 聚类分析法用于西洋参样品分类研究. 分析测试学报, 25(2): 20—24
- 徐继林, 严小军, 2004. 脂类分析在海洋微藻化学分类学上的研究进展. 海洋通报, 23(2): 65—72
- 梁英, 麦康森, 孙世春等, 1997. 对筒柱藻属 33 株总脂含量及脂肪酸组成的比较研究. 青岛海洋大学学报, 29(3): 457—462
- 游家兴, 2003. 如何正确运用因子分析法进行综合评价. 统计教育, 5: 10—11
- Dembitsky V M, Pechenkinna Shubina E E, Raventsvel O A, 1991. Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. Phytochemistry, 30(7): 2279—2283
- Jamieson G R, Reid E H, 1972. The component fatty acids of some marine algal lipids. Phytochemistry, 11(4): 1423—1432
- Millner H W, 1948. The fatty acids of *Chlorella*. J Biochem, 176: 813—817
- Zhukova N V, Aizdaicher N A, 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. Phytochemistry, 39(2): 351—356

CLUSTER ANALYSIS ON FATTY ACID COMPOSITION OF *ENTEROMORPHA PROLIFERA* OFF NORTHERN CHINA COAST

YANG Bai-Juan¹, ZHENG Li¹, CHEN Jun-Hui¹, ZANG Jia-Ye¹,
WANG Xiao-Ru^{1,2}, FRANK S. C. Lee¹

(1. Research Center for Marine Ecology, The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061;
2. Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Science of the Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Fatty acids composition of 20 *Enteromorpha prolifera* samples from the Yellow Sea and the Bohai Sea were determined with GC-MS. The result indicates that C16 are the predominant fatty acid, taking 27.82% to 43.27%. C18:2 (cis, cis-9,12)(n-6), C18:3 (gamma) (all cis-6,9,12)(n-6), C18:3 (alpha) (all cis-9,12,15)(n-3) and EPA are major polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in *E. prolifera*. The samples were numerically classified in fatty acid composition using Squared Euclidean distance and between-group linkage method as clustering algorithm. The 20 samples were divided into four groups by cluster analysis. All the floating *E. prolifera* samples are placed in Group I, and other native species in Qingdao and Lianyungang are classified into other three groups. The floating *E. prolifera* that bloomed in Qingdao coastal area in 2008 were not originated from local native species but from the open sea. Hierarchical cluster analysis was proved to be a good method of quantitative evaluation and classification of marine green algae.

Key words *Enteromorpha prolifera*, Fatty acids, Cluster analysis