

冠瘤海鞘克生活性筛选及低极性组分 GC-MS 分析*

Allelopathic Activity Evaluation and GC-MS Analysis of the Low Polar Components from *Styela canopus* Savigny

徐 艳, 童万平, 孙雪萍**

XU Yan, TONG Wan-ping, SUN Xue-ping

(广西海洋研究所海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000)

(Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要:为研究冠瘤海鞘(*Styela canopus* Savigny)的抗卤虫活性部位及有效成分,采用卤虫致死活性筛选模型,对冠瘤海鞘的提取物及甾体粗晶进行了生物活性测定,并采用 GC-MS 技术对石油醚相进行了成分分析。结果表明:乙醇提取物和各有机相均有明显克生活性,冠瘤海鞘甾体粗晶的克生活性是石油醚相的 3.2 倍;从冠瘤海鞘石油醚相中鉴定出 12 个化合物,主要为脂肪类和甾醇类化合物,而且冠瘤海鞘抗卤虫活性成分主要在乙酸乙酯相和石油醚相中,石油醚相中的甾醇类化合物是冠瘤海鞘的克生活性物质之一。

关键词:冠瘤海鞘 卤虫致死活性 甾醇 GC-MS中图分类号:P714⁺.5,R914 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2013)04-0276-03

Abstract: To screen the allelopathic fractions and active constituents of *Styela canopus* Savigny, the allelopathic effects of ethanolic extract and organic fractions of *S. canopus* from the South China Sea were evaluated by the model of lethality to brine shrimp *Artemia salina*, and the low-polar compounds in the petroleum ether fraction were analysed by GC-MS. The results showed that the allelopathic substances were mainly in the ethyl acetate and petroleum ether fraction. And the allelopathic effects of a sterol mixture which were isolated from *S. canopus* were about three times higher than the effect of petroleum ether fraction. The components in the petroleum ether fraction were analyzed by GC-MS, and 12 compounds were identified for the first time, most of which were lipids and sterols. It was proposed that sterols should be the main allelopathic substances in the petroleum ether fraction of *S. canopus*.

Key words: *S. canopus*, allelopathic effects, sterols, GC-MS

海鞘(Ascidian)是尾索动物亚门(Uronordata)海鞘纲的尾索动物,主要分布在热带及亚热带海域^[1],目前国内外已经对数种海鞘进行了化学成分研

究,已发现海鞘类生物中含有生物碱类、肽类、吲哚类、重金属螯合剂、多硫化物、大环内酯、萜类等 10 种化合物,且大部分具有较强的生理活性,如抗肿瘤、抗病毒、抗菌、诱导肌浆网释钙、抑制钙调蛋白活性等^[2-7],因此,有关海鞘生理活性成分的研究正受到越来越多研究者的关注,南海有着丰富的海鞘资源,但国内对海鞘化学成份的研究还刚刚开始^[8-10]。

研究以广西北海冠头岭冠瘤海鞘(*Styelacnopus* Savigny)为研究对象,采用卤虫致死活性筛选模型,对其乙醇提取物、各有机相以及石油醚相的甾体粗晶进行了克生活性测定,并采用 GC-MS 技术对

收稿日期:2013-09-13

修回日期:2013-10-02

作者简介:徐 艳(1981-),女,硕士研究生,助理研究员,主要从事海洋天然产物研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107011-8);广西科学院基本科研业务费项目(13YJ22HYS15)资助。

** 通讯作者:孙雪萍(1982-),女,博士研究生,助理研究员,主要从事海洋天然产物研究。

活性有机相进行分析,为海鞘的深入科学研究提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

冠瘤海鞘(*S. canopus*)样品于2009年12月采自广西北海,由国家海洋局厦门第三海洋研究所郑成兴研究员鉴定,存放于广西海洋研究所海洋生物标本馆,样品编号为20100420;卤虫(*Artemia salina*)卵,购于海风集团有限公司。

1.2 仪器与试剂

旋转蒸发仪 Eyela NE-1101 (日本 Rikakikai 公司);显色剂为硫酸香草醛溶液,喷洒后加热显色;石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等均为分析纯。

1.3 提取与分离

鲜海鞘洗净、去壳(提取后干重 271.5g),于组织捣碎机中匀浆,经 95% 乙醇提取 3 次,每次 1d,过滤,合并两次提取液,减压浓缩后得浸膏(73.5g)。浸膏用水分散后,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,减压浓缩后得到石油醚相(9.8g)、乙酸乙酯相(6.5g)、正丁醇相(2.7g)和水相(43.5g)。石油醚相经正相硅胶层析,石油醚:乙酸乙酯(100:1~1:1)洗脱,得石油醚相白色甾体粗晶 3.7g。

1.4 卤虫致死活性测试

依照 Solis 改良法^[11,12],取 24 孔培养板,每孔加 1mL 含卤虫幼体的溶液(每孔 20 个卤虫),每个粗提物及各相浸膏样品设置 100 μ g/mL,50 μ g/mL,20 μ g/mL 3 个终浓度,甾体粗晶设置 50 μ g/mL,25 μ g/mL,10 μ g/mL 3 个终浓度,同时设置空白对照组(加处理过的海水 1mL)和 DMSO 对照组(含与测试样品相当浓度的 DMSO),每个浓度的样品设 3 个平行样,制成测试培养板,培养 24h 后,记录卤虫死亡个体数目。

结果评定:死亡率(%)=死亡个体平均数/个体总数 \times 100%。

1.5 GC-MS 分析

ThermoTrace GC ultra DSQ II 色质联用仪。色谱柱:VF-5MS(30m \times 0.25mm);电离源:70eV;操作系统:Xcalibur;谱库 NIST02;程序升温:50 $^{\circ}$ C 保持 2min,以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 130 $^{\circ}$ C,再以 25 $^{\circ}$ C/min 升至 300 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 提取物的克生活性

经卤虫致死活性检测,冠瘤海鞘乙醇提取物有明

显的克生活性,在 100 μ g/mL 时,对卤虫的致死率为 22.0%,经萃取后,乙酸乙酯相的克生活性最高,在 100 μ g/mL,卤虫致死率分别为 66.5%,其次为石油醚相,在 100 μ g/mL 时,卤虫致死率分别为 35.0%(表 1),且冠瘤海鞘乙醇提取物和各相的卤虫致死率与浓度呈正相关。

表 1 冠瘤海鞘乙醇提取物、各有机相和甾体粗晶的卤虫致死活性

Table 1 Lethal effects on brine shrimp *A. salina* of the ethanolic extract, *n*-butanol fractions and sterols from *S. canopus*

样品 Sample	致死率 Lethality(%)		
	20 μ L	50 μ L	100 μ L
冠瘤海鞘乙醇提取物 Ethanolic extract of <i>S. canopus</i>	11.6	15.0	22.0
冠瘤海鞘石油醚相 Petroleumether fraction of <i>S. canopus</i>	10.3	12.6	35.0
冠瘤海鞘乙酸乙酯相 Ethyl acetate fraction of <i>S. canopus</i>	20.0	16.6	66.5
冠瘤海鞘正丁醇相 <i>n</i> -butanol fraction of <i>S. canopus</i>	11.6	13.3	16.65
冠瘤海鞘水相 Water fraction of <i>S. canopus</i>	18.3	16.6	15.0
冠瘤海鞘甾体粗晶 A sterol mixture from <i>S. canopus</i>	20.0	21.6	40.0

为研究冠瘤海鞘克生活性成分,应用 GC-MS 对冠瘤海鞘石油醚相进行了成分分析,并对冠瘤海鞘甾体粗晶的克生活性进行了检测,结果,冠瘤海鞘石油醚相甾体粗晶在 50 μ g/mL 时的克生活性约为石油醚相的 3.2 倍,且其致死率随着浓度的升高而增大,呈现浓度依赖性。结果显示冠瘤海鞘甾体类化合物是冠瘤海鞘石油醚相的有效克生活性成分,也是冠瘤海鞘生物活性成分之一。

2.2 石油醚相低极性化合物组成分析

为探讨石油醚相中克生活性物质的组成,对石油醚相进行 GC-MS 分析。冠瘤海鞘石油醚相经甲酯化处理后用 GC-MS 联用仪分析,得冠瘤海鞘石油醚相总离子流谱(图 1),共检测到 30 个峰,总离子流色谱图中的各峰经质谱扫描后得到相应的质谱图,通过 Xcalibur 工作站 NIST 标准质谱图库进行检索,共鉴定出其中的 12 个化合物(均为首次从冠瘤海鞘中分得)结果见表 2。

GC-MS 分析表明,石油醚相主要为低极性化合物,脂肪类化合物最多(6 个),以不饱和脂肪酸为主,主要有 Methyl hexadecanoate、Methyl cis-7-hexadecenoate 和 9-Methyl heptadecanoic acid, methyl ester,还有较多的甾醇类化合物(4 个),全部为胆甾醇类,分别为 Cholestan-3 β -ol (VAN)、Cholesterol、

Ethyl iso-allocholate 和 24(R)-25-Dihydroxyvitamin D3, 以及 2 个长链烷烃 1,1-Dimethoxyoctane 和 1-nonadecene (表 2)。

据文献报道, 柳珊瑚中的甾体类化合物, 在生物间相生相克或生态交感中起着十分重要的作用^[13,14], 甾体类化合物往往具有对珊瑚礁热带鱼类的拒食活性^[15], 根据实验结果分析, 甾醇类化合物可能是冠瘤海鞘中的克生活性物质, 在其生境中起化学防御作用, 而冠瘤海鞘脂肪类化合物的克生活性还有待于进一步研究。本研究结果对活性化合物的追踪分离及化学防御作用的研究具有借鉴意义。

表 2 冠瘤海鞘石油醚相中低极性化合物的 GC-MS 分析

Table 2 GC-MS analysis of chemical components of the petroleum ether fraction from *S. canopus*

序号 Peak No.	保留时间 Retention time	化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	M
1	25.81	Tetradecanoic acid, methyl ester	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
2	26.40	1-nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	266
3	27.38	Methyl cis-7-hexadeceno- ate	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268
4	27.52	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
5	28.2	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	386
6	28.69	Cholestan-3beta-ol (VAN)	C ₂₇ H ₄₈ O	388
7	28.76	10-Octadecenoic acid, methylester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
8	28.91	9-Methyl heptadecanoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298
9	29.2	1,1-Dimethoxyoctane	C ₁₀ H ₂₂ O ₃	174
10	29.55	10-undecenoic acid, 2-me- thoxy-methylester	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	228
11	29.69	Ethyl iso-allocholate	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	436
12	30.83	24(R), 25-Di- hydroxyvitamin D3	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	416

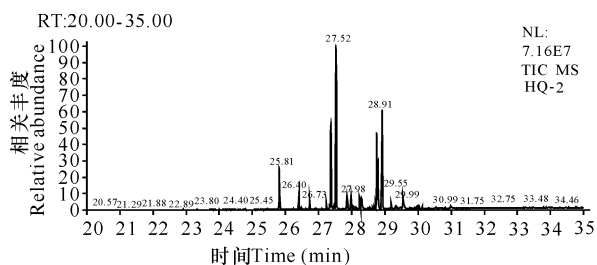


图 1 冠瘤海鞘石油醚相气质分析总离子流

Fig. 1 Total ion current (TIC) chromatogram of petroleum ether fraction from *S. canopus*

3 结论

据报道, 在生物间相生相克或生态交感中柳珊瑚中的甾体类化合物起着十分重要的作用^[13,14], 甾体

类化合物往往具有对珊瑚礁热带鱼类的拒食活性^[15], 而本文实验结果表明, 甾醇类化合物可能是冠瘤海鞘中的克生活性物质, 在其生境中起化学防御作用, 而冠瘤海鞘脂肪类化合物的克生活性还有待于进一步研究。该结果对活性化合物的追踪分离及化学防御作用的研究具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] 李春荣, 万新祥. 皱瘤海鞘有效部位 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 中药材, 2006, 29(3): 221-223.
- [2] Rashid M A, Gustafson K R, Cartner L K, et al. New nitrogenous constituents from the South African marine Ascidian *Pseudodistoma* sp. [J]. Tetrahedron, 2001, 57(27): 5751-5755.
- [3] Litscher E, Honegger T G. Glycoprotein constituents of the vitelline coat of *Phallusia mammillata* (Ascidacea) with fertilization inhibiting activity [J]. Developmental Biology, 1991, 148(2): 536-551.
- [4] Azumi K, Yokosawa H, Ishii S, et al. Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi* [J]. Biochemistry, 1990, 29(1): 159-165.
- [5] Teruya T, Sasaki H, Suenaga K, et al. Hexamollamide, a hexapeptide from an Okinawan ascidian *Didemnum molle* [J]. Tetrahedron Letters, 2008, 49(36): 5297 - 5299.
- [6] Takeara R, Jimenez P C, Wilke D V, et al. Antileukemic effects of *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidacea) constituents [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(3): 363-369.
- [7] 耿越, 张薛. 海鞘类天然产物的最新研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(6): 73-78.
- [8] 李亮, 王长云, 郭跃伟. 中国黄海柄海鞘的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 4-8.
- [9] 劳彦斌, 蒋亭, 李军, 等. 柄海鞘 *Styela clara* 次生代谢产物的化学研究(I) [J]. 中国海洋药物, 2001, 20(2): 12-15.
- [10] 王超杰, 苏镜娉, 曾陇梅. 皱瘤海鞘的化学成分研究 [J]. 分析化学, 2001, 29(11): 1311-1311.
- [11] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A microcell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp) [J]. Plants Med, 1993, 59(3): 250-252.
- [12] 杰利·L·麦克劳林, 顾哲明. 两种简易的抗肿瘤活性初筛方法[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(10): 617-619.
- [13] 方芳, 严涛, 刘庆. 化学生态学在海洋污损生物防除中的应用[J]. 应用生态学报, 2005, 16(10): 1997-2002.
- [14] Tomono Y, Hirota H, Imahara Y, et al. Four new steroids from two octocorals [J]. J Nat Prod, 1999, 62(11): 1538-1541.
- [15] Epifanio R, Maia L F, Pawlik J R, et al. Antipredatory secosterols from the octocoral *Pseudopterogorgia americana* [J]. Mar Ecol Prog Ser, 2007, 329: 307-310.

(责任编辑: 尹 闯)