

冠瘤海鞘抗菌活性筛选 及低极性组分气相色谱-质谱分析

徐艳¹, 张秀国², 黄国强¹, 张琴¹, 杨家林¹, 孙雪萍^{1*}

(1. 广西海洋研究所, 海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000;

2. 北京航空航天大学北海学院, 广西北海 536000)

摘要:目的: 研究冠瘤海鞘的抗菌活性部位及有效成分。方法: 采用抑菌圈法和最小杀菌浓度法, 对中国南海冠瘤海鞘的乙醇提取物和不同极性部位进行了抗菌活性测定, 并采用 GC-MS 技术对其石油醚相低极性组分进行了化学成分分析。结果: 结果显示, 抗菌活性成分主要在冠瘤海鞘的正丁醇相, 其次是石油醚相; 从冠瘤海鞘石油醚相中鉴定出 14 个化合物, 主要为脂肪类和甾醇类化合物; 从甾体组分中鉴定出 7 个化合物, 主要为胆固醇, 其中 4 个为首次从冠瘤海鞘中分离鉴定。结论: 冠瘤海鞘的正丁醇相和石油醚相具有明显的抗菌活性, 石油醚相以胆固醇类化合物为主。

关键词: 冠瘤海鞘, 抗菌活性, 气相色谱-质谱法 (GC-MS), 甾醇

Antibacterial activities and GC-MS analysis of low polar components from *Styela canopus* Savigny

XU Yan¹, ZHANG Xiu-guo², HUANG Guo-qiang¹, ZHANG Qin¹, YANG Jia-lin¹, SUN Xue-ping^{1*}

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai 536000, China;

2. Beihai College of Beihang University, Beihai 536000, China)

Abstract: Objective: To screen the antibacterial fractions and constituents of *Styela canopus* Savigny. Method: The antibacterial activities of the ethanolic extract and organic fractions of *S. canopus* from the South China Sea was evaluated by diameter of antibacterial circle and the minimum bactericidal concentration (MBC), and the low-polar compounds in the petroleum ether fraction were also analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results: The results showed that the antibacterial substances were mainly in the n-butanol and petroleum ether fraction, and 14 compounds were identified by GC-MS from petroleum ether fraction, most of which were lipids and sterols. Seven compounds were identified by GC-MS from the sterol component, and cholesterol was the dominant sterol. Four compounds were identified for the first time from *S. subcrenata*. Conclusion: The antibacterial activities of n-butanol and petroleum ether fraction from *S. canopus* were obvious, and cholesterol was the dominant sterol of petroleum ether fraction.

Key words: *Styela canopus* Savigny; antibacterial activity; gas chromatography-mass spectrometry; sterols

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0295-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.025

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]。海鞘是网箱、网笼等水产养殖设施上的主要有害海洋污损生物之一, 其优势种具有较大的生物量^[2-3]。我国海鞘资源相当丰富, 许多种属在国际上未见研究报道, 与国外相比, 国内丰富的海鞘资源不仅没有得到有效开发, 而且困扰着渔业和航海业的发展。

海鞘生理活性成分的研究正受到越来越多研究者的关注。目前国内外已经对数种海鞘进行了化学

成分研究, 多种海鞘类污损生物具有较高的药用价值, 其所含的生物碱、环肽等化学成分, 具有显著的抗肿瘤、抗 HIV 等生物活性^[4-5]。国内的王瑞等^[6]对不同海鞘醇提物的体外抗乙肝 HBsAg 和 HBeAg 的作用进行了比较; 王超杰等^[7]对广东大亚湾的冠瘤海鞘进行了化学成分研究的首次报道, 从其甲醇-氯仿提取物中分离出混合甾醇和神经酰胺两类化合物, 王超杰等^[8]还从冠瘤海鞘中分离出 4 种化合物, 分别为鲛肝醇、鲨肝醇、胞嘧啶和胸腺嘧啶脱氧核糖。我

收稿日期: 2014-08-11

作者简介: 徐艳 (1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 海洋活性物质, E-mail: xuyang0528@163.com。

* 通讯作者: 孙雪萍 (1982-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事海洋天然产物研究, E-mail: sunxueping2012@126.com。

基金项目: 广西科学院基本科研业务费资助项目 (13YJ22HYS15); 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 09321004)。

国对海鞘化学成份的研究仅有零星报道,多数未涉及到生理活性问题^[9-11]。本文对广西北海冠瘤海鞘(*Styela canopus* Savigny)的醇提取物以及不同极性部位进行了抗菌活性检测,研究了其对9种致病菌的抑制活性,并应用气质联用仪对活性部位进行了化学成分分析,为进一步研究其生物活性物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 样品 冠瘤海鞘(*S.canopus*)于2010年04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。

1.1.2 供试菌种 7株人体致病菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、四联球菌(*Micrococcus tetragenus*)和藤黄八叠球菌(*Micrococcus luteus*);2株海洋致病菌:副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*),菌株均为海南师范大学化学化工学院郑彩娟老师赠送。

1.1.3 培养基 根据文献^[12]进行培养基的制备,抑菌圈(DIZ; Diameter of inhibition zone, mm)的测定选用LB(Luria-Bertani)平板,最小杀菌浓度(MBC; minimum bactericidal concentration, mg/mL)的测定选用LB液体培养基。

1.1.4 试剂与仪器 乙醇、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯均为分析纯,购自成都市科龙化工试剂厂;旋转蒸发器 日本东京理化器械株式会社;蒸发工作站 英国GeneVac公司;高速多功能粉碎机 永康市天祺盛世工贸有限公司;正相硅胶 青岛海洋化工有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 供试样品的制备 鲜海鞘洗净、去壳(提取后干重271.5 g),于组织捣碎机中匀浆,经95%的乙醇室温浸泡提取6次,每次30min,过滤,合并提取液,减压浓缩后得浸膏(73.5 g)。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(9.8 g)、乙酸乙酯相(6.5 g)、正丁醇相(2.7 g)和水相(43.5 g)。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

甙体组分3.7 g。

1.2.2 初筛方法 初筛采用纸片扩散法(disk-diffusion method)^[13],全部操作均为无菌操作,实验为单浓度三次重复。

1.2.3 最小杀菌浓度的测定 采用试管稀释法(Tube dilution method)^[14]测定了初筛有活性样品的最小杀菌浓度。

1.2.4 GC-MS分析条件 ThermoTrace GC ultra DSQ II色质联用仪,色谱柱:VF-5MS(30 mm×0.25 mm×0.25 μm);电离源:70 eV;操作系统:Xcalibur;谱库NIST02;石油醚相的升温程序:50℃保持2 min,以5℃/min升至130℃,再以25℃/min升至300℃;甙体组分的升温程序:160℃开始,以10℃/min升至260℃,然后5℃/min升至300℃,保持10 min。

2 结果与分析

2.1 冠瘤海鞘提取物的抑菌活性

由表1可以看出,冠瘤海鞘软体组织的5种提取物对供试细菌的抑菌作用表现不同,冠瘤海鞘正丁醇相的抑菌效果最好,其次是石油醚相,乙醇提取物、乙酸乙酯相和水相的抑菌效果较弱。

冠瘤海鞘正丁醇相对所有供试菌株都表现出抑菌活性,其中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果最好,抑菌圈直径达到8 mm,对藤黄八叠球菌和白色念珠菌的最小杀菌活性分别为25 mg/mL和50 mg/mL,对蜡状芽孢杆菌、副溶血弧菌和鳃弧菌的最小杀菌活性均为100 mg/mL,对金黄色葡萄球菌、四联球菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的最小杀菌浓度均大于100 mg/mL。

冠瘤海鞘石油醚相对5株菌(金黄色葡萄球菌、四联球菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌)表现出抑菌活性,但对此5株菌的最小杀菌浓度均大于100 mg/mL。

冠瘤海鞘水相对4株供试菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌和副溶血弧菌)表现出抗菌活性,其中对副溶血弧菌的最小杀菌浓度为100 mg/mL,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌的最小杀菌浓度均大于100 mg/mL;冠瘤海鞘乙酸乙酯相对3株供试菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和藤黄八叠球菌)表现出抑菌活性,对藤黄八叠球菌的最小杀菌浓度为25 mg/mL,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最小杀菌浓度均为100 mg/mL;冠瘤海鞘乙醇提取

表1 冠瘤海鞘乙醇提取物及各有机相的抗菌活性

Table 1 The antimicrobial activity of the ethanolic extract and organic fractions from *S.canopus*

样品	抑菌圈直径(DIZ; mm)								
	金黄色葡萄球菌	四联球菌	大肠杆菌	蜡状芽孢杆菌	白色葡萄球菌	副溶血弧菌	鳃弧菌	枯草芽孢杆菌	藤黄八叠球菌
乙醇提取物	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-
石油醚相	7	6.5	6.5	6.5	-	-	-	6.5	-
乙酸乙酯相	6.5	-	-	-	-	-	-	6.5	6.5
正丁醇相	8	7.5	8	7.0	7.0	7.5	6.5	6.5	7
水相	6.5	-	6.5	6.5	-	6.5	-	-	-

注:抑菌圈直径以平均值表示;“-”表示无活性。

表2 冠瘤海鞘乙醇提取物及各相的最小杀菌浓度

Table 2 Minimum bactericidal concentration of the ethanolic extract and organic fractions from *S.canopus*

样品	最小杀菌浓度(MBC; mg/mL)								
	金黄色葡萄球菌	四联球菌	大肠杆菌	蜡状芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	藤黄八叠球菌	鳃弧菌	白色葡萄球菌	副溶血弧菌
乙醇提取物	/	/	/	/	/	/	/	>100	/
石油醚相	>100	>100	>100	>100	>100	/	/	/	/
乙酸乙酯相	100	/	/	/	100	25	/	/	/
正丁醇相	>100	>100	>100	100	>100	25	100	50	100
水相	>100	/	>100	>100	/	/	/	/	100

注：“>100”表示最小杀菌浓度大于100mg/mL；“/”表示未测。

表3 冠瘤海鞘石油醚相 GC-MS 分析

Table 3 GC-MS analysis of the petroleum ether fraction from *S.canopus*

序号	保留时间 (min)	化合物	分子式	相对含量 (%)	分子量
1	25.45	2-甲基十二碳酸, 2-Methyl-dodecanoic acid	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	0.23	214
2	25.81	肉豆蔻酸甲酯, Methyl tetradecanoate	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	7.2	242
3	26.73	2-甲基十一烷酸, 2-Methyl-undecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1.69	200
4	27.55	10,13-二甲基肉豆蔻酸甲酯, Methyl 10,13-dimethyl tetradecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	5.18	270
5	27.86	1,2-环氧十六烷, 1,2-Epoxyhexadecane	C ₁₆ H ₃₂ O	2.67	240
6	28.24	十三酸甲酯, Methyltridecanoate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	8.94	228
7	28.69	二氢胆固醇, Dihydrocholesterol	C ₂₇ H ₄₈ O	22.21	388
8	28.76	(E)-9-十二烯酸甲酯, (E)-9-Dodecenoic acid methyl ester	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	19.86	212
9	28.91	壬酸甲酯, Nonanoic acid, methyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	13.50	172
10	29.32	(Z,Z)-9,15-十八烷二烯酸甲酯, (9Z,15Z)-9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	1.10	294
11	29.55	2-甲基-6-亚甲基-1,7-辛二烯-3-醇, 2-Methyl-6-methylene-octa-1,7-dien-3-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	4.57	152
12	29.99	顺-15-十四酸甲酯, Methyl cis-15-tetracosenoate	C ₂₅ H ₄₈ O ₂	1.84	380
13	30.99	1,14-十四烷二醇, 1,14-Tetradecanediol	C ₁₄ H ₃₀ O ₂	0.85	230
14	31.24	(S)-12-甲基十四酸甲酯, Methyl 12-methyl tetradecanoate	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.54	256

物仅对白葡萄球菌有抑菌作用,其最小杀菌浓度大于100 mg/mL。

2.2 石油醚相化学成分分析

为探讨冠瘤海鞘石油醚相中抗菌活性物质的组成,本文对石油醚相进行了 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(见图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14个化合物,均为首次从冠瘤海鞘中分得,结果见表3。

GC-MS 分析表明,鉴定出的化合物占冠瘤海鞘石油醚相总质量的90.38%,以二氢胆固醇(Dihydrocholesterol)为主,占22.21%;其次是(E)-9-十二烯酸甲酯((E)-9-Dodecenoic acid methyl ester)和壬酸甲酯(Nonanoic acid, methyl ester),各占19.86%和13.50%。冠瘤海鞘石油醚相以脂肪类化合物为主,共有10个,其中饱和脂肪酸类化合物9个(见表3),不饱和脂肪酸类化合物只有1个:(Z,Z)-9,15-十八烷二烯酸甲酯((9Z,15Z)-9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester);另外还有醇类化

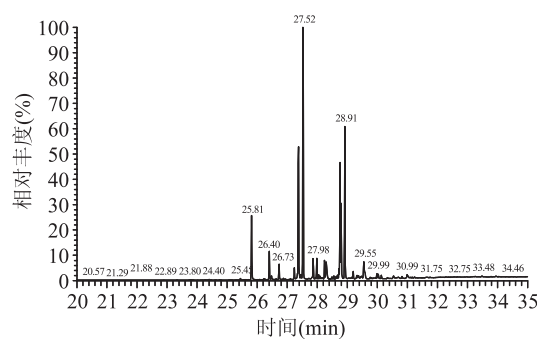


图1 冠瘤海鞘石油醚相气质分析总离子流

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

合物2个:2-甲基-6-亚甲基-1,7-辛二烯-3-醇, (2-Methyl-6-methylene-octa-1,7-dien-3-ol)和1,14-十四烷二醇(1,14-Tetradecanediol),胆甾醇类化合物1个:二氢胆固醇(Dihydrocholesterol),以及1个环氧烷类化合物:1,2-环氧十六烷(1,2-Epoxyhexadecane)。

经 GC-MS 分析,从冠瘤海鞘甾体粗晶中鉴定出7个化合物,其中化合物1、3、5、7为冠瘤海鞘中首次分离鉴定。所鉴定化合物占甾体粗晶总质量的

表4 冠瘤海鞘甾体组分的GC-MS分析
Table 4 The GC-MS analysis of the sterol component from *S.canopus*

序号	保留时间 (min)	化合物	分子式	相对含量 (%)
1	20.25	(22Z)-26,27-二降-麦角甾-5,22-二烯-3 β -醇, (22Z)-26,27-Dinoregosta-5,22-dien-3 β -ol	C ₂₆ H ₄₂ O	3.53
2	21.97	胆甾-5,22-二烯-3 β -醇, Cholesta-5,22-dien-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₄ O	8.56
3	22.43	胆甾醇, Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	33.33
4	23.03	麦角甾-5,22-二烯-3 β -醇, Ergosta-5,22-dien-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₆ O	14.89
5	24.02	26,26-二甲基-麦角甾-5,24(28)-二烯-3 β -醇, 26,26-Dimethyl-5,24(28)-ergostadien-3 β -ol	C ₃₀ H ₅₀ O	20.95
6	24.41	豆甾-7,22-二烯-3 β -醇, (24S)-5 α -Stigmasta-7,22-dien-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O	2.77
7	25.37	豆甾-5-烯-3 β -醇, Stigmast-5-en-3 β -ol	C ₂₉ H ₅₀ O	6.39

90.42%,其中,2个胆甾醇衍生物:胆甾-5,22-二烯-3 β -醇和胆甾醇,占甾体粗晶总质量的41.89%;3个麦角甾:22(Z)-26,27-二降-麦角甾-5,22-二烯-3 β -醇、麦角甾-5,22-二烯-3 β -醇和26,26-二甲基-麦角甾-5,24(28)-二烯-3 β -醇占甾体粗晶总质量的39.37%;另外2个豆甾醇:豆甾-7,22-二烯-3 β -醇和豆甾-5-烯-3 β -醇所占比重最小,为9.16%。

3 结论

本研究结果表明,广西沿海冠瘤海鞘的正丁醇相和石油醚相具有明显的抗菌活性;冠瘤海鞘石油醚相以胆甾醇类化合物为主;从冠瘤海鞘甾体粗晶中鉴定出7个甾体,其中甾体1、3、5、7为首次分离鉴定。研究结果对冠瘤海鞘抗菌活性物质的进一步分离纯化具有一定的指导意义。

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):221-224.
- [2]郑成兴.中国沿海海鞘的物种多样性[J].生物多样性,1995,3(4):201-205.
- [3]樊成奇,陆亚男,缪宇平,等.东海水产养殖区七种海鞘优势种相关活性物质研究进展与利用前景[J].海洋渔业,2009,31(2):207-214.
- [4]周怡,张晾,肖宁,等.海鞘抗肿瘤生物碱类物质研究最新

进展[J].亚太传统医药,2008,4(2):57-63.

[5]张立新,薛峰,唐美君.海鞘化学成分及其生物活性的研究进展[J].海洋科学,2008,32(6):71-78.

[6]王瑞,万新祥.不同海鞘醇提取物体外抗乙肝HBsAg和HBeAg作用的比较[J].中国药理学通报,2005,21(5):606-608.

[7]王超杰,韩光,苏镜媛,等.冠瘤海鞘的化学成分[J].分析化学研究简报,2001,29(2):168-170.

[8]王超杰,苏镜媛,曾陇梅.冠瘤海鞘 *Styela canopus* 的化学成分研究[J].中国海洋药物,2000(1):1-3.

[9]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.

[10]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.

[11]王超杰,苏镜媛,曾陇梅.皱瘤海鞘的化学成分研究[J].分析化学,2001,29(11):1311-1611.

[12]黄培堂,王嘉玺,朱厚础.分子克隆实验指南[M].3版.北京:科学出版社,2008,19-32.

[13]Espine-ingroff A, White T, Pfaller M A. Antifungal Agents and Susceptibility Tests. Manual of Clinical Microbiology [M]. 7th Edn. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999: 1640-1652.

[14]Sydney M M, Finegold M D, Ellen Baron J O. Banley and Scotts Diagnostic Microbiology [M]. 7ed. 1986: 176-177.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。