

豆海鞘 *Cnemidocarpa* sp. 提取物的抗氧化活性研究

徐艳¹, 邹杰¹, 陈瑞芳¹, 王欣², 孙仁杰², 张琴^{1*}

1. 广西壮族自治区海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室(北海 536000);

2. 广西科学院广西红树林研究中心, 广西红树林保护与利用重点实验室(北海 536000)

摘要 为了对豆海鞘的抗氧化活性进行研究, 将豆海鞘匀浆后于室温下用乙醇提取, 然后用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 得到不同极性的提取物, 分别对提取物进行抗氧化检测, 同时与合成的抗氧化剂抗坏血酸(VC)进行对照, 并对有抗氧化活性的提取物进行化学成分分析。试验结果表明石油醚层具有良好的抗氧化作用, 既能清除羟自由基, 又能清除超氧自由基, 且清除效果优于阳性对照VC; 从石油醚层中分离鉴定出4个化合物, 其中不饱和脂肪酸9-油酸为主要成分。豆海鞘石油醚相具有明显的抗氧化活性, 不饱和脂肪酸9-油酸是其主要成分。

关键词 豆海鞘; 抗氧化活性; 气质联用; 化学成分

Study on Antioxidation Activity of *Cnemidocarpa* sp. Extracts

XU Yan¹, ZOU Jie¹, CHEN Ruifang¹, WANG Xin², SUN Renjie², ZHANG Qin^{1*}

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

2. Guangxi Key Laboratory of Mangrove Conservation and Utilization, Guangxi Mangrove Research Center of Guangxi Academy of Sciences (Beihai 536000)

Abstract To investigate the antioxidant activity of *Cnemidocarpa* sp. from the South China Sea *in vitro*, the homogenate of *Cnemidocarpa* sp. was extracted by ethanol, petroleum ether, ethyl acetate, and n-butanol in order to get fractions with different polarities, and then the antioxidant activity of the extracts was tested, compared with one synthetic antioxidants ascorbic acid. The chemical components of extracts with antioxidant activity were analyzed. The results showed that the petroleum ether fraction exhibited high antioxidant activity, and it could scavenge hydroxyl radical and superoxide radical together, when the scavenging effect was better than that of positive control of VC. Four compounds were found in the petroleum ether fraction, which was mainly composed of unsaturated fatty acids of 9-Octadecenoic acid (Z). The antioxidant activity of petroleum ether fraction of *Cnemidocarpa* sp. was obvious, and the unsaturated fatty acids 9-Octadecenoic acid (Z) was the main component of the fraction.

Keywords *Cnemidocarpa* sp.; antioxidant activity; gas chromatography-mass spectrometry; chemical components

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], 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]。目前国内外已经对数种海鞘进行了化学成分研究, 发现海鞘类生物中含有生物碱类、肽类、吡啶类、重金属螯合剂、多硫化物、大环内酯和萜类等数十种化合物, 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^[4-5], 因此有关海鞘生理活性成分的研究正受到越来越多

的研究者关注^[6-9]。目前为止, 尚未见到有关豆海鞘 *Cnemidocarpa* sp. 抗氧化提取物的研究和报道。试验以广西北部湾的豆海鞘(*Cnemidocarpa* sp.)为研究对象, 通过模拟化学体系产生自由基, 对豆海鞘的不同极性部位进行了抗氧化活性测定, 并采用气质联用技术对有活性的极性部位进行了化学成分分析, 为海鞘的深入科学研究提供理论依据和参考。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

[9] 赵永昌, 柴红梅, 李树红, 等. 云南羊肚菌居群多样性研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 444-447.
[10] 熊川, 李小林, 李强, 等. 四川秋季发生的两种羊肚菌生境调查与鉴定[J]. 菌物学报, 2016, 35(1): 29-38.
[11] 李渊. 羊肚菌分类、分布及分子遗传学研究现状[J]. 山西农业科学, 2016, 44(4): 565-568.
[12] 张黎光, 李峻志, 祁鹏, 等. 毒蕈中毒及治疗方法研究进展[J]. 中国食用菌, 2014, 33(5): 1-5.

[13] 闫晓雪, 时小东, 张国珍, 等. 西南地区部分野生羊肚菌ITS序列鉴定及生境分析[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(6): 48-53.
[14] DU XH, ZHAO Q, YANG ZL, et al. How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*)?[J]. Mycologia, 2012b, 104(6): 1351-1368.
[15] 杜习慧. 羊肚菌属分子系统学和生物地理学研究-兼论该属两个物种的群体遗传学[D]. 昆明: 中国科学院植物研究所, 2012.

豆海鞘 (*Cnemidocarpa* sp.) 样品于2011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。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。

1.2 主要试验仪器与设备

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)。

2 试验方法

2.1 豆海鞘乙醇浸膏和各极性层的制备

鲜活豆海鞘洗净, 于组织捣碎机中匀浆, 经95%乙醇提取6次, 每次1 h, 过滤, 合并两次提取液, 减压浓缩后得浸膏 (276.0 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层 (7.2 g)、乙酸乙酯层 (38.5 g)、正丁醇层 (86.2 g) 和水层 (82.8 g)。称取乙醇浸膏和各极性层1.000 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入100 mL无水乙醇, 经60 °C水浴后, 置于超声频率40 kHz、功率200 W超声波清洗器内超声, 直至溶解, 然后稀释成20, 40, 60, 80和100 μg/mL的浓度梯度, 备用。

2.2 抗氧化活性的测定

2.2.1 羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除率的测定^[10]

向25 mL容量瓶中依次加入1.0 mL 7.5 mmol/mL邻二氮菲溶液、5.0 mL PBS (pH 7.4)、1.0 mL 7.5 mmol/mL FeSO_4 溶液、一定量的抗氧化剂溶液 (损伤管及未损伤不加提取液)、1.0 mL体积分数为0.1% H_2O_2 (未损伤管不加), 以蒸馏水定容, 暗处放置60 min, 在536 nm处测吸光度。以上每加一次试剂均需混匀, 同时以VC为对照。羟自由基清除率按式 (1) 计算。

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{未损}} - A_{\text{损伤}}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2 超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除率的测定^[10]

在试管中加入4.5 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.2) 缓冲液和4.1 mL蒸馏水 (6根试管中加入0.1 mL蒸馏水作为自氧化速率 V_0 , 6根试管中加入0.1 mL 10 mmol/L的HCl溶液作为参照, 其余试管加入0.1 mL不同浓度的样品溶液), 混合均匀, 于37 °C恒温水浴中放置20 min后, 然后立即加入0.5 mL 37 °C预热的邻苯三酚溶液 (3 mmol/L), 立即混匀倒入比色杯中, 在325 nm处测定吸光度 A , 每反应30 s记录一组, 共反应5 min。将记录的数据以时间为横坐标, 吸光度为纵坐标, 作直线回归, 得到的斜率表示邻苯三酚自氧化速率 V_0 、样品清除速率超氧阴离子的速率 V_1 。清除率按式 (2) 计算。

$$\text{清除率} = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100\% \quad (2)$$

2.3 GC-MS分析

用氢氧化钾-甲醇甲酯化法对豆海鞘石油醚层进行脂肪酸甲酯化, 加入正己烷进行脂肪酸甲酯的萃取。静置分层后, 取上层有机相 (正己烷) 适当稀释, 用针筒式微孔滤膜过滤器过滤后进行气相色谱-质谱仪进样分析。

气相色谱条件: 色谱柱为VF-5MS石英毛细柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); MS条件: 电子轰击 (EI) 离子源, 电子能量70 eV, 操作系统为Xcalibur, 谱库为NIST 02; 石油醚层; GC-MS分析参数: 初始温度50 °C, 保持2 min, 程序升温至130 °C, 速度5 °C/min, 再以25 °C/min升至300 °C。

3 结果与分析

3.1 豆海鞘对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

$\cdot\text{OH}$ 是体内活性最强的自由基, 是在生命活动的氧化代谢过程中产生的, 可导致大量疾病发生, 因此对 $\cdot\text{OH}$ 清除率的检测具有重要意义^[11]。由图1可知, 在试验浓度范围内, 豆海鞘石油醚层和乙酸乙酯层具有清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用, 且优于阳性对照VC, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力随其浓度增大而升高, 在8 mg/mL时, 石油醚层和乙酸乙酯层对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别是97.8%和28.1%, 正丁醇层、水层、乙醇浸膏和VC的清除效果相当, 清除率分别为7.8%, 7.1%, 6.6%和2.5%, 石油醚层的清除效果显著。

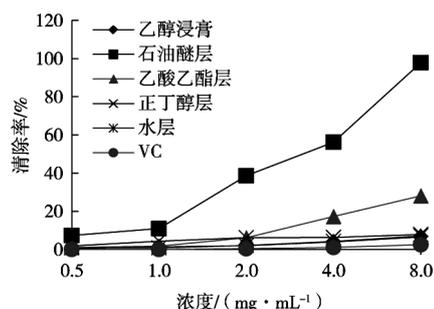


图1 豆海鞘提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

3.2 豆海鞘对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用

在邻苯三酚体系中, 邻苯三酚的自身氧化速度比较快, 在加入了提取物后, 由于提取物中含有能提供活泼氢的化合物, 从而阻断自由基反应, 因此抗氧化是通过供氢来完成清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应。由图2可知, 在试验浓度范围内, 豆海鞘正丁醇层和水层的清除效果最好, 其次是石油醚层, 它们对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率随着浓度的增加而增大, 具有浓度依赖性, 在0.25 mg/mL时, 正丁醇层、水层和石油醚层的清除率分别为138.6%, 134.1%和113.6%, VC的清除率为97.7%, 正丁醇层、水层和石油醚层的清除效果优于阳性对照VC; 乙醇层和VC的清除效果相当, 乙酸乙酯层的清

*通讯作者; 基金项目: 国家自然科学基金项目 (31402304), 广西自然科学基金项目 (2015GXNSFBB139005), 广西科学院基本科研业务费 (15YJ22HYS16)

除效果很微弱,在0.25 mg/mL时,乙醇层和乙酸乙酯的清除率分别为93.2%和50.0%,清除效果不如阳性对照VC明显。

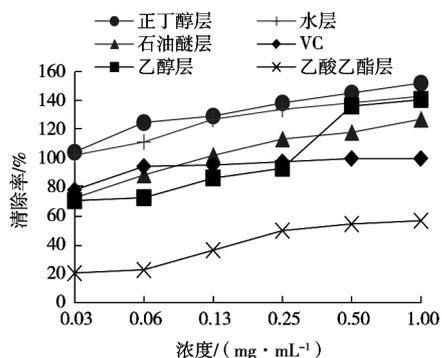


图2 豆海鞘提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

3.3 豆海鞘石油醚层的化学成分分析

豆海鞘石油醚层具有良好的清除羟自由基和超氧自由基的作用,并优于阳相对照VC,为了探讨豆海鞘石油醚层的化学组成,试验对其进行了GC-MS分析,得到总离子流图谱(图3),对各峰通过Xcalibur工作站NIST标准质谱图库进行检索,共鉴定出4个化合物(表1),占总质量的91.7%,包括三种饱和脂肪酸和一种不饱和脂肪酸,分别为:14-甲基十五酸甲酯、硬脂酸甲酯、棕榈酸甲酯和9-油酸甲酯,主要化合物为单不饱和脂肪酸:9-油酸甲酯,相对含量为51.22%,其次为饱和脂肪酸:14-甲基十五酸甲酯,相对含量为27.38%,这四个化合物均为首次从豆海鞘中分离鉴定。

表1 豆海鞘石油醚相的成分分析

序号	保留时间/min	化合物	分子式	相对含量/%	分子量
1	23.793	14-甲基十五酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	27.38	270.256
2	23.816	棕榈酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	3.6	270.256
3	24.621	硬脂酸甲酯	$C_{19}H_{38}O_2$	9.5	298.287
4	24.532	油酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	51.22	296.272

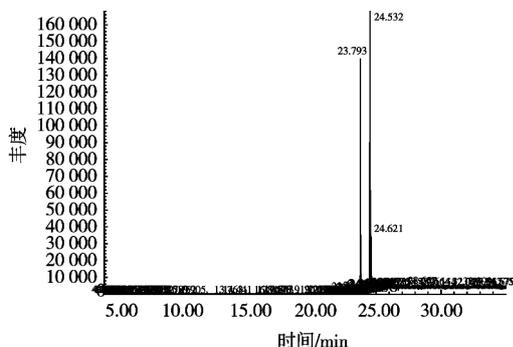


图3 豆海鞘石油醚相气质分析色谱图

4 结论

豆海鞘石油醚层具有良好的抗氧化作用,既能清除羟自由基,又能清除超氧自由基,且清除效果优于阳性对照VC,并在试验浓度范围内,具有浓度依赖性。化学成分分析结果显示,豆海鞘石油醚层的主要成分为脂肪酸类化合物,占总质量的91.7%,其中单不饱和脂肪酸9-油酸甲酯的相对含量为51.22%,是主要的组成成分。不饱和脂肪酸具有良好的抗氧化活性,已经有许多报道^[12-16],不饱和脂肪酸(9-油酸)是否是豆海鞘抗氧化功效的物质基础,还有待于进一步深入研究。

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, 张暄, 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 尤努斯江·吐拉洪, 吐尔洪·买买提. 超声提取香青兰中黄酮及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 72-76.
- [11] 王勇, 杨静, 孙响, 等. 毛蚶提取物的抗氧化活性分析[J]. 中国海洋药物, 2008, 27(3): 11-14.
- [12] 王亚婷, 何轶, 王瑞忠. GC法同时测定蜂房药材中5个脂肪酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 420.
- [13] 张伟敏, 钟耕, 王炜. 单不饱和脂肪酸营养及其生理功能研究概况[J]. 粮食与油脂, 2005(3): 13-15.
- [14] 李凯, 周宁, 李赫宇, 等. 共轭油酸生理功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7): 226-228.
- [15] 刘桂林, 聂向庭, 张福娥. 甲鱼脂肪酸和微量元素含量的分析及其抗氧化作用研究[J]. 营养学报, 2000, 22(4): 325-327.
- [16] 回瑞华, 侯冬岩, 刘晓媛, 等. 黑蚂蚁的脂肪酸及抗氧化性能的分析[J]. 分析实验室, 2008, 27(5): 54-57.