

# 北部湾优势种皱瘤海鞘的化学成分及抗氧化活性

孙雪萍<sup>1</sup>, 谭小明<sup>1</sup>, 覃喜军<sup>1</sup>, 谭小青<sup>2</sup>, 刘布鸣<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530200)

(2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西中医药研究院, 广西南宁 530022)

**摘要:** 运用紫外分光光度法, 首次对北部湾优势种海鞘皱瘤海鞘 *Styela plicata* 各有机相的总还原力、DPPH 自由基、 $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的清除能力进行测试, 总还原力实验中乙酸乙酯相和水相在 100  $\mu g/mL$  时的吸光度分别为 0.149 和 0.122。DPPH 清除能力较好的是水相, 其  $IC_{50}$  为 6.10  $\mu g/mL$ 。水相和乙酸乙酯相对  $O_2^{\cdot-}$  的  $IC_{50}$  分别为 10.26  $\mu g/mL$  和 2.18  $\mu g/mL$ , 两者对  $\cdot OH$  的  $IC_{50}$  分别为 2.30  $\mu g/mL$  和 9.65  $\mu g/mL$ 。表明皱瘤海鞘次级代谢产物中的体外抗氧化活性组分主要集中于水相浸膏和乙酸乙酯相。运用正反相硅胶柱层析、Sephadex-LH20 凝胶柱层析法和半制备 HPLC 对乙酸乙酯相进行分离纯化, 运用 NMR、MS 波谱学方法结合理化性质和 TLC 技术纯化鉴定了其中 3 个多羟基甾体类化合物的结构为 cholestane-1,3,5,6-tetraol(1), (5)-cholestane-3,5,6-triol(2) 和 suberoretisteroids D(3), 这三个化合物均为首次从皱瘤海鞘中分离获得。实验结果为扩展皱瘤海鞘应用价值提供基础资料和指导, 也为食源性的天然抗氧化剂的开发提供资源。

**关键词:** 皱瘤海鞘 *Styela plicata*; 抗氧化; 化学成分; 多羟基甾醇

文章编号: 1673-9078(2020)06-54-59

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1024

## Chemical composition and Antioxidant Activity of *Styela plicata* dominant in Beibu Gulf

SUN Xue-ping<sup>1</sup>, TAN Xiao-ming<sup>1</sup>, QIN Xi-jun<sup>1</sup>, TAN Xiao-qing<sup>2</sup>, LIU Bu-ming<sup>2</sup>

(1. College Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

(2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China)

**Abstract:** The total antioxidative activity, and the scavenging abilities of DPPH, superoxide and hydroxyl free radicals of the different organic extracts from the dominant squirt *Styela plicata* of Beibu Gulf were evaluated for the first time by ultraviolet spectrophotometry. In the total reducing power experiments, the absorbance values of the ethyl acetate phase and water phase at the concentration of 100  $\mu g/mL$  were 0.149 and 0.122, respectively. The DPPH scavenging ability is greater in the water phase, with the  $IC_{50}$  value being 6.10  $\mu g/mL$ . The  $IC_{50}$  values of the water phase and ethyl acetate phase for superoxide anion were 10.26  $\mu g/mL$  and 2.18  $\mu g/mL$ , respectively, with their corresponding  $IC_{50}$  values for hydroxyl free radical were 2.30  $\mu g/mL$  and 9.65  $\mu g/mL$ , respectively. The results showed that the active components of the squirt's secondary metabolites possessing significant *in vitro* antioxidant activity were mainly concentrated in the aqueous phase and ethyl acetate phase. The ethyl acetate phase was subjected to further separation and purification by normal- and reversed-phase silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative HPLC. The structures of active compounds were characterized by spectroscopic methods including NMR and MS, and three of which were identified as polyhydroxy sterols cholestane-1,3,5,6-tetraol(1), (5)-cholestane-3,5,6-triol(2) and suberoretisteroids D(3). These three compounds were obtained from *S. plicata* for the first time.

引文格式:

孙雪萍,谭小明,覃喜军,等.北部湾优势种皱瘤海鞘的化学成分及抗氧化活性[J].现代食品科技,2020,36(6):54-59

SUN Xue-ping, TAN Xiao-ming, QIN Xi-jun, et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Styela plicata* dominant in Beibu gulf [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 54-59

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 广西自然科学基金项目(2016GXNSFBA380011); 广西中医药大学 2017 年引进博士科研启动基金(B170033); 广西高校人文社科重点研究基地项目(0501801728)

作者简介: 孙雪萍(1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋天然产物

通讯作者: 刘布鸣(1956-), 男, 研究员, 研究方向: 中药质量标准

The experimental results provide fundamental information and guidance for increasing the application value of *S. plicata* and also offers resources for the development of food-derived natural antioxidants.

**Key words:** *Styela plicata*; antioxidative activity; Chemical composition; polyhydroxy sterols

近年来对海鞘类动物本身次级代谢产物化学成分及其生物活性的研究是海洋天然产物研究的热门领域。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、萜类等数十种化合物,且大部分都具有较强的生物活性,如抗肿瘤、抗病毒、抗菌、诱导肌浆网释钙和抑制钙调蛋白活性等<sup>[1]</sup>。抗氧化活性也是药理活性研究的重要指标之一,抗氧化剂清除人体自由基能力<sup>[2]</sup>,可改善人体机能自由基产生的损伤与危害<sup>[3]</sup>。研究人员已经对豆海鞘、玻璃海鞘、柄海鞘、真海鞘的抗氧化活性组分进行了筛选,并发现了其中的抗氧化活性成分,说明海鞘也是良好的天然抗氧化剂的资源之一<sup>[4-9]</sup>。

皱瘤海鞘(*Styela plicata*)是一种可以食用的北部湾优势种海鞘,由于其顽强的附着生长,在海洋工程中被认为是污损有害生物而被清除,其开发利用却被忽略。皱瘤海鞘分布遍及闽北罗源湾至东海最南端的南澳岛北部水域,局部的资源单位产量甚至可以达到湿重 10 kg/m<sup>2</sup> 以上,文献研究表明该海鞘调查过的海域水产养殖区可以获得竞争优势,较长时期内生物量大且稳定,有望在一定人工条件下以较低成本为开发利用提供足够的生物原料,从而更具有被大规模开发利用的潜力。现有文献表明皱瘤海鞘中含有丰富的次级代谢产物如生物碱类、脂肪酸、甾体和萜类等<sup>[10,11]</sup>。目前对皱瘤海鞘次级代谢产物药理活性的研究主要集中于各个组分的抗病毒<sup>[12]</sup>和抗肿瘤<sup>[13]</sup>研究,毛楷林等人研究表明皱瘤海鞘被囊多肽对 DPPH· 以及 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 具有良好的清除能力<sup>[14]</sup>。

本实验以广西北部湾的皱瘤海鞘为研究对象,通过模拟化学体系产生自由基,首次对皱瘤海鞘的不同极性部位进行抗氧化活性测定,以明确皱瘤海鞘乙醇提取物中的抗氧化活性部位,并对活性较好的部位进行初步的化学成分分析,为拓展皱瘤海鞘资源的应用领域和开发新的天然抗氧化剂提供数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 试 验 材 料

皱瘤海鞘(*S. plicata*)采自广西北海冠头岭沿岸,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、乙酸乙酯均为分析纯,购自成都

市科隆化工试剂厂;HPLC 用色谱纯甲醇,默克公司;柱层析硅胶,青岛海洋化工厂;凝胶 Sephadex LH-20, Amersham 公司。

#### 1.1.2 仪 器 与 设 备

超声波清洗仪(SB-800DTD),宁波新芝生物科技股份有限公司;旋转蒸发仪(RE-2000A),郑州世纪双科实验仪器有限公司;752 型紫外分光光度计,上海菁华仪器有限公司;电子天平(PL203),梅特勒-托利多仪器上海有限公司;核磁共振波谱仪(JEOL Eclips-600),日本电子;质谱仪(ESI-MS Q-TOF Ultima Global GAA076),美国 Waters 公司;高效液相色谱仪(D-2000),Elite Hitachi 公司。

## 1.2 实 验 方 法

### 1.2.1 皱瘤海鞘乙醇浸膏和各极性层的制备

取鲜海鞘(1.5 kg)软体部位用剪刀剪碎,在常温下经 95%乙醇超声波提取 5 次(料液比 1:10,超声频率是 40 kHz,每次 30 min),用旋转蒸发仪减压浓缩乙醇提取液得浸膏(71.2 g),浸膏用蒸馏水分散,并依次用等体积的乙酸乙酯和正丁醇萃取,之后将剩下的水相和有机相萃取液用旋转蒸发仪减压浓缩,得到乙酸乙酯相浸膏 EA(8.0 g)、正丁醇相浸膏 BO(17.5 g)和水相浸膏 Wt(28.5 g)。

### 1.2.2 抗氧化活性的检测方法

#### 1.2.2.1 制 备 样 品 溶 液

称取各相浸膏 1.00 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 10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 100 μg/mL 的浓度梯度,备用。

#### 1.2.2.2 总还原力的测定

取 0.5 mL 样品,分别加入 1.25 mL PBS(0.2 mol/L)和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>(1%)溶液,混匀,于 50 °C 反应 20 min 后快速冷却,加入 1.25 mL 10%的三氯乙酸,混匀,于 3000 r/min 离心 10 min,取上清液 5.0 mL,加蒸馏水 4.0 mL,及 0.1% FeCl<sub>3</sub> 溶液 1 mL,混匀。10 min 后于 1 cm 比色皿中 700 nm 处测定吸光度。吸光度越大说明还原力越强,同时以 Vc 为对照。

#### 1.2.2.3 DPPH·清除能力的测定

参照文献<sup>[15]</sup>,向 96 孔板中加入 100 μL 不同浓度的样品溶液,三个样品重复,外加三个对照重复,然

后样品重复中加入 100  $\mu\text{L}$  DPPH·乙醇溶液  $A_1$  (0.14 mmol/L), 对照重复中加入 100  $\mu\text{L}$  乙醇  $A_2$ ; 三个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  乙醇溶液和 100  $\mu\text{L}$  DPPH·乙醇溶液 (0.14 mmol/L), 作为空白系  $A_0$ ; 使总体积达到 200  $\mu\text{L}$ , 振荡器混匀后, 室温, 避光放置 30 min 后, 在 518 nm 处测定吸光度, 平行测定 3 次, 计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

式中: 空白系  $A_0$ -DPPH·溶液 100  $\mu\text{L}$ +无水乙醇 100  $\mu\text{L}$  的吸光度; 样品系  $A_1$ -DPPH·溶液 100  $\mu\text{L}$ +样品溶液 100  $\mu\text{L}$  的吸光度; 对照系  $A_2$ -样品溶液 100  $\mu\text{L}$ +无水乙醇 100  $\mu\text{L}$  的吸光度; 公式中引入  $A_2$  是为了消除样品溶液本身颜色对实验测定的干扰。

#### 1.2.2.4 超氧阴离子 $O_2^-$ 清除能力测定

参考文献<sup>[16]</sup>方法, 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 HCl 溶液 (10 mmol/L) 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  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中放置 20 min 后, 然后立即加入 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的邻苯三酚溶液 0.5 mL (3 mmol/L), 立即混匀倒入比色杯中, 在 325 nm 处测定 A 值, 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, 吸光值为纵坐标, 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  $V_1$ 。

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

#### 1.2.2.5 羟自由基·OH 清除能力测定

参考文献<sup>[17]</sup>方法。A 样: 1 mL 邻菲罗啉水溶液 (0.75 mmol/L) + 2 mL PBS 缓冲液 (pH=7.4) + 1 mL  $\text{FeSO}_4$  溶液 (0.75 mmol/L) + 1 mL 样品 + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1% V/V) ..... 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, 536 nm 检测吸光度。

A 损: 1 mL 邻菲罗啉水溶液 (0.75 mmol/L) + 2 mL PBS 缓冲液 (pH=7.4) + 1 mL  $\text{FeSO}_4$  溶液 (0.75 mmol/L) + 1 mL 乙醇水 + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1% V/V) ..... 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, 536 nm 检测吸光度。

A 未损: 1 mL 邻菲罗啉水溶液 (0.75 mmol/L) + 2 mL PBS 缓冲液 (pH=7.4) + 1 mL  $\text{FeSO}_4$  溶液 (0.75 mmol/L) + 1 mL 乙醇/水 + 1 mL 乙醇/水 ..... 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, 536 nm 检测吸光度。

每个浓度设三个平行, 计算清除率, 其计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \times 100\%$$

式中:  $A_0$ -损伤管的吸光值;  $A_1$ -未损伤管的吸光值;  $A_2$ -加样品液的吸光值。

### 1.2.3 乙酸乙酯相浸膏的分离纯化

对乙酸乙酯相粗浸膏经过正常常压硅胶柱层析洗脱 (流动相为  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=95:5, 90:10, 80:20, 50:50$ ), 得到四个组分 Fr.1~Fr.4, 其中 Fr.1 组分经过凝胶柱层析 (Sephadex LH-20, 流动相为甲醇), 得到五个组分 Fr.1.1~Fr.1.5, 其中呈粉末状的 Fr.1.5, 纯甲醇中易结晶, 且对这部分粉末用二氯甲烷溶解后进行 TLC 薄层层析, 并用 5% 硫酸-香草醛显色剂显色, 呈现蓝紫色, 这推测这一白色粉末混合物为甾体类化合物。经过半制备高效液相色谱分离制备 (流速 2 mL/min,  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=70:30$ , 半制备柱 ODS  $10 \times 250$  mm, 5  $\mu\text{m}$ , 检测波长为 223 nm) 获得纯化化合物 1 (3.0 mg)、2 (4.5 mg) 和 3 (4.0 mg)。

#### 1.2.4 数据处理

所有数据均采用平均值 (Mean)  $\pm$  标准差 (SD) 表示。采用 SPSS 13.0 软件进行一维方差分析 (one-way ANOVA), 采用 Origin 8.6 对数据进行画图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 皱瘤海鞘各有机相的总还原力

由图 1 可知, 在试验浓度范围内, 皱瘤海鞘水相和乙酸乙酯相浸膏与 Vc 同样随着浓度的升高, 吸光度逐渐增大, 抗氧化效果增强, 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 以上两相的吸光度分别为分别是 0.149、0.122, Vc 的吸光度为 0.231。所以皱瘤海鞘乙醇提取物中具有较好还原力的组分集中在水相, 其次是乙酸乙酯相。

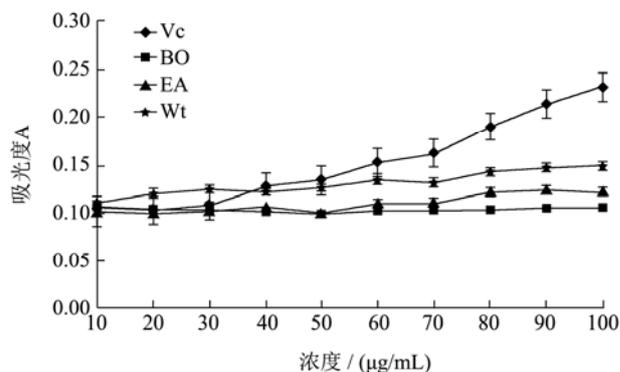


图 1 皱瘤海鞘各有机相的总还原力

Fig.1 Total reduction ability of each extraction from *S. spicata*

### 2.2 皱瘤海鞘各有机相的 DPPH·清除能力

由图 2 可知, 不同浓度的各相皱瘤海鞘萃取物对 DPPH 自由基均有清除作用, 特别是水相浸膏清除 DPPH 自由基的能力在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时水相的清除率为 80.56%, 水相浸膏和 Vc 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 6.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 13.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 呈现出良好的量-效关系, 而在 100

μg/mL 时乙酸乙酯相和正丁醇相对 DPPH 自由基的清除率分别为 12.15% 和 7.11%，清除能力较弱。

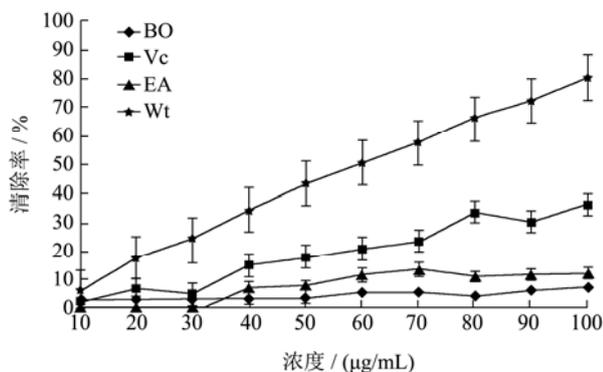


图2 皱瘤海鞘各有机相的 DPPH · 清除率

Fig.2 The DPPH scavenging rate of each extraction from *S. plicata*

### 2.3 皱瘤海鞘各有机相的超氧阴离子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除能力

不同浓度皱瘤海鞘各有机相与 Vc 同样，样品清除超氧阴离子的能力，随着浓度的升高，抗氧化效果逐渐增强，由图 3 可见，在实验浓度范围内，皱瘤海鞘各相对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 均有较好的清除作用，皱瘤海鞘正丁醇相与阳性对照 Vc 的清除作用相当，其次是乙酸乙酯相和水相。正丁醇相、乙酸乙酯相、水相和 Vc 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.47 μg/mL、2.18 μg/mL、10.26 μg/mL 和 0.36 μg/mL。

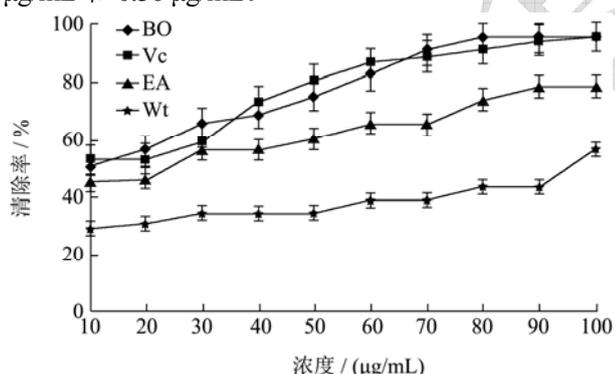


图3 皱瘤海鞘各相对超氧阴离子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除能力

Fig.3 The superoxide scavenging ability of each extraction from *S. plicata*

### 2.4 皱瘤海鞘各有机相的羟自由基 ·OH 清除能力

由图 4 可见，在实验测定浓度范围内，皱瘤海鞘水相和乙酸乙酯具有较强的清除 ·OH 的作用，且优于阳性对照 Vc，对 ·OH 的清除能力，在 100 μg/mL 时，

水相和乙酸乙酯相对 ·OH 的清除率分别是 91.94% 和 48.90%。正丁醇相浸膏在浓度较低时与 Vc 的清除效果相当，在达到 100 μg/mL 时活性增强明显，清除率可达到 81.18%。水相、Vc、乙酸乙酯层和清除 ·OH 的 IC<sub>50</sub> 分别为 2.30 μg/mL、8.43 μg/mL、9.65 μg/mL 和 10.89 μg/mL。·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 ·OH 清除率的检测具有重要意义<sup>[16]</sup>。

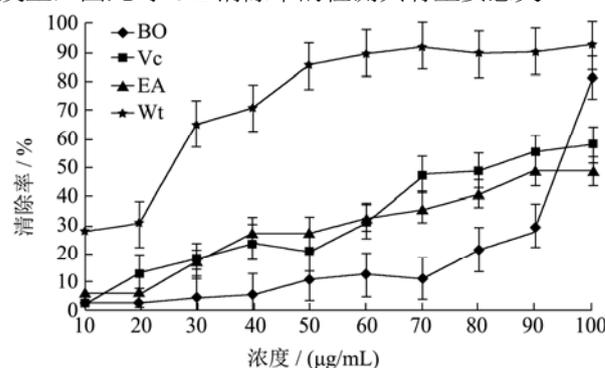


图4 皱瘤海鞘各相对羟自由基 ·OH 清除能力

Fig.4 The hydroxyl free radical scavenging ability of each extraction from *S. plicata*

### 2.5 单体化合物结构鉴定

运用 NMR、MS 波谱学方法结合上述理化性质，并与文献中的核磁数据对照，鉴定出化合物 1-3 为多羟基甾体类化合物，结构如图 5 所示。

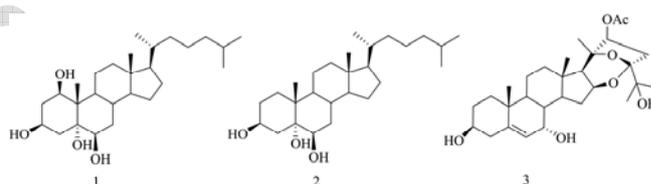


图5 化合物 1-3 的结构

Fig.5 The Structures of Compounds 1-3

化合物 1: 白色粉末，ESI-MS 在  $m/z$  459 处给出准分子离子峰  $[M+Na]^+$ ，提示化合物分子量为 436。结合 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR 推出其分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>，不饱和度为 4。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) 谱在低场区给出三个连氧气氢信号 δ<sub>H</sub> 4.00 (1H, m, H-3), 3.94 (1H, dd,  $J=11.9, 4.9$  Hz, H-6), 3.42 (1H, brs, H-6) 高场区给出五个胆甾类特征甲基的氢信号 1.22 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0.90 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.87 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.86 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.70 (3H, s, H<sub>3</sub>-18); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) 在低场区给出四个连氧碳信号，其中一个季碳信号 δ<sub>C</sub> 77.9 (s, C-5)，三个叔碳信号 77.4 (d, C-6), 74.7 (d, C-1), 66.3 (d, C-3)，在高场给出五个甲基碳信号 δ<sub>C</sub> 23.7 (q, C-26), 23.5 (q, C-27), 19.7 (q, C-19)，

13.3 (q, C-21), 10.6 (q, C-18)。与文献<sup>[17]</sup>数据对比确定化合物1为多羟基甾醇类化合物 cholestane-1,3,5,6-tetraol。

化合物2: 白色粉末, ESI-MS在 $m/z$  421处给出准分子离子峰 $[M+H]^+$ , 提示分子量为420。<sup>1</sup>H NMR谱在低场区给出两个连氧氢信号 $\delta_H$  4.10 (1H, m, H-3)和3.54 (1H, brs, H-6), 说明化合物至少含有两个羟基, <sup>1</sup>H NMR谱 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) 也给出五个甾体类特征甲基的氢信号 $\delta_H$  1.18 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0.90 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.86 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.85 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.67 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 与化合物1比较, 二者化合物结构相似, 推测化合物2中少了一个羟基基团, 这与质谱给出的分子量一致。与文献<sup>[18]</sup>数据对比确定化合物2为多羟基甾醇类化合物(5)-cholestane-3,5,6-triol。

化合物3: 白色粉末, ESI-MS在 $m/z$  527处给出准分子离子峰 $[M+Na]^+$ , 提示化合物分子量为504, 结合<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C NMR推出其分子式为C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub>, 不饱和度为3。<sup>1</sup>H NMR谱 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) 在低场区给出一个烯氢信号 $\delta_H$  5.62 (1H, dd,  $J=5.4, 1.4$  Hz, H-6), 四个连氧氢信号 $\delta_H$  4.67 (1H, dd,  $J=11.0, 4.8$  Hz, H-22), 4.50 (1H, m, H-16), 3.88 (1H, brs, H-7)和3.59 (1H, m, H-3)。高场区给出一个乙酰基的特征甲基氢信号 $\delta_H$  2.10 (3H, s, H<sub>3</sub>-AcO), 五个甲基氢信号 $\delta_H$  1.32 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-21), 1.24 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 1.16 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 1.07 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 1.02 (3H, s, H<sub>3</sub>-19)。<sup>13</sup>C NMR谱 (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) 在低场区给出一个羰基碳信号 $\delta_C$  170.5 (s, C-AcO), 两个烯碳信号 $\delta_C$  146.7 (s, C-5), 123.7 (s, C-6), 一个缩酮碳信号 107.9 (s, C-24), 六个连氧碳信号 $\delta_C$  72.8 (d, C-16), 71.3 (d, C-3), 65.3 (d, C-7), 82.5 (s, C-20), 79.6 (d, C-22), 72.4 (s, C-24), 高场给出五个甲基碳信号 $\delta_C$  14.2 (q, C-18), 18.2 (q, C-19), 23.7 (q, C-21), 23.4 (q, C-26), 24.1 (q, C-27)。与文献<sup>[19]</sup>数据对比确定化合物3为多羟基甾醇类化合物 suberoretisteroids D。

### 3 结论

3.1 伴随着医学科学的进步和生活水平的提高, 人们对于抗氧化抗衰老和治未病越来越重视, 自由基是人体在正常代谢过程中产生的损伤性物质, 体内的大量堆积可导致多种疾病的产生, 寻找有效、安全的、具有自由基清除活性的天然抗氧化剂已经成为研究的热点之一。本实验首次对皱瘤海鞘次级代谢产物进行抗氧化活性筛选, 皱瘤海鞘中具有较好还原能力的组分集中在水相和乙酸乙酯相, 在100  $\mu\text{g/mL}$  时吸光度分

别为分别是0.149和0.122。DPPH·清除能力较好的是水相浸膏, 其IC<sub>50</sub>为6.10  $\mu\text{g/mL}$ , 呈现出良好的量效关系。皱瘤海鞘各有机相都呈现了良好的O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力, 正丁醇层、乙酸乙酯相、水相对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的IC<sub>50</sub>分别为0.47  $\mu\text{g/mL}$ 、2.18  $\mu\text{g/mL}$ 和10.26  $\mu\text{g/mL}$ 。水相和乙酸乙酯相清除·OH的IC<sub>50</sub>分别为2.30  $\mu\text{g/mL}$ 和9.65  $\mu\text{g/mL}$ 。表明皱瘤海鞘次级代谢产物中的体外抗氧化活性组分主要集中于水相浸膏和乙酸乙酯相, 且有3个多羟基甾醇类化合物也为首次从皱瘤海鞘中分离获得。本研究结果为皱瘤海鞘作为抗氧化剂的应用提供了基础数据和指导, 也为开发新的食源天然抗氧化剂提供了资源。

3.2 本实验选取的四个指标是研究人员在筛选优良的抗氧化剂中常用的方法, 简便、快速、准确。但是本实验所选总还原力和清除自由基的方法都是在非生理条件下进行的, 这些结果是不能外推为体内的结果<sup>[20]</sup>。因此, 实验下一步将是采用细胞学实验和体内外实验相结合的方法综合评价皱瘤海鞘的抗氧化活性。且在测试浓度范围内水相对DPPH·自由基和羟自由基·OH清除能力优于阳性对照Vc, TLC分析发现极性大的水相和正丁醇相成点性不好, 分离难度大, 水相的抗氧化物质基础成分分析正在进行中。

### 参考文献

- [1] Faulkner D J. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 1992, 3: 350-352
- [2] 杨云舒, 姜子涛, 李荣. 广枣黄酮清除自由基能力以及抗氧化性能的细胞模型法评价[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 92-97  
YANG Yun-shu, JIANG Zi-tao, LI Rong. Evaluation of free radical scavenging ability and antioxidant activity of flavonoids from *Choerospondias axillaris* Fruits using cell model [J]. Food Science, 2016, 37(9): 92-97
- [3] 赵贵. 人体自由基及食药抗氧化作用[J]. 开卷有益-求医问药, 2019, 1: 57-58  
ZHAO Gui. Journal for beneficial readings drug information & medical advices [J]. Kai Juan You Yi-Qiu Yi Wen Yao, 2019, 1: 57-58
- [4] 徐艳, 邹杰, 陈瑞芳, 等. 豆海鞘 *Cnemidocarpa* sp. 提取物的抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2018, 39(5): 212-214  
XU Yan, ZOU Jie, CHEN Rui-fang, et al. Study on antioxidation activity of *Cnemidocarpa* sp. extracts [J]. The Food Industry, 2018, 39(5): 212-214
- [5] 范林林. 黄海养殖真海鞘营养成分及其降血糖和抗氧化作用研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2015  
FAN Lin-lin. Study on nutrient contents and activity of

- reduced blood sugar and antioxidant of *Halocynthia roretzi* cultured in yellow sea [D]. Yantai: Yantai University, 2015
- [6] 郑兰红,吕梅,刘均洪,等.玻璃海鞘营养成分及相关生物功能研究进展[J].海洋湖沼通报,2016,2:94-98  
ZHENG Lan-hong, LV Mei, LIU Jun-hong, et al. Proceedings in the studies on the nutrients of *Ciona* and their biological functions [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2016, 2: 94-98
- [7] 时亚南,许波.玻璃海鞘不同极性提取物体外抗氧化活性的研究[J].食品工业科技,2011,5:102-104  
SHI Ya-nan, XU Bo. Study on antioxidative activity in vitro of different polarity extracts from *Ciona intestinalis* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 5: 102-104
- [8] 陈斌.柄海鞘(*Styela clava*)DHA 和 EPA 高纯制备及化学成分的生物活性研究[D].北京:中国科学院研究生院,2011  
CHEN Bin. High purity preparation of EPA and DHA, Chemical constituents and its bioactivities from *Styela clava* [D]. Beijing: Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, 2011
- [9] 侯秀秀.真海鞘壳化学成分分离鉴定及其生物活性研究[D].大连:大连海洋大学,2015  
HOU Xiu-xiu. Isolation and Characterization of Constituents from *Halocynthia roretzi* drasche chell and it's biological activities [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2015
- [10] 王超杰,苏镜娱,曾陇梅.皱瘤海鞘的化学成分研究[J].分析化学研究简报,2001,29(11):1311-1314  
WANG Chao-jie, SU Jing-yu, ZENG Long-mei. Chemical constituents of the tunicate *Styela Plicata* from the dayawan bay [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2001, 29(11): 1311-1314
- [11] YOU Gui-Hong, ZHANG Yi-Ping, HONG Zhuan, et al. Studies on the chemical constituents of *Styela plicata* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2017, 36(1): 83-86
- [12] WANG Rui, DU Zhen-Lan, DUAN Wen-Jun, et al. Antiviral treatment of hepatitis B virus-transgenic mice by a marine organism, *Styela plicata* [J]. World Journal of Gastroenterol, 2006, 12(25): 4038-4043
- [13] Palanisamy S K, Trisciuglio D, Zwergel C, et al. Metabolite profiling of ascidian, *Styela plicata*, using LC-MS with multivariate statistical analysis and their antitumor activity [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2017, 32(1): 614-623
- [14] 毛楷林,林芳,徐腾,等.皱瘤海鞘被囊多肽的抗氧化活性[J].热带生物学报,2017,8(4):431-35,458  
MAO Kai-lin, LIN Fang, XU Teng, et al. Antioxidative activity of polypeptides extracted from *Styela plicata* tunic [J]. Journal of Tropical Biology, 2017,8(4): 431-35, 458
- [15] 赵杰,杨仁华,罗文羲,等.灯盏乙素体外抗氧化活性的实验研究[J].昆明医科大学学报,2015,36(5):1-4  
ZHAO Jie, YANG Ren-hua, LUO Wenxi, et al. Experimental study on antioxidant activity of scutellarin in vitro [J]. Journal of Kunming Medical University, 2015, 36(5): 1-4
- [16] 曲柳青,高嘉唯,崔素萍,等.芸豆蛋白抗氧化组分在大豆油热氧化过程中的抗氧化作用[J].中国粮油学报,2019,34(2): 40-44  
QU Liu-qing, GAO Jia-wei, CUI Su-ping, et al. Anti-oxidant effect of kidney bean protein antioxidant components in thermal oxidation of soybean oil [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(2): 40-44
- [17] Kobayashi M, Hayashi T, Hayashi, K, et al. Marine sterols. XI. polyhydroxysterols of the soft coral *Sarcophyton glaucum*: isolation and synthesis of 5-cholestane-1,3,5,6-tetrol [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1983, 31(6): 1848-1855
- [18] ZHAO Ke-jun, WANG Yong-feng, HAN Li. 4,5-Epoxycholestane-3,6-diols: templates for generating the full set of eight cholestane-3,5,6-triol stereoisomers in multigram scales, but not for a cholestane-3,4,6-triol [J]. Steroids, 2007, 72(1): 95-104
- [19] ZHANG Wen, GUO Yue-Wei, GAVAGNIN Margherita, et al. Suberoretisteroids A-E, five uncommon polyoxygenated steroid 24-ketals from the hainan gorgonian *Suberogorgia reticulata* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2005, 88(1): 813-820
- [20] 刘志东,郭本恒,王荫榆.抗氧化活性检测方法的研究进展[J].天然产物研究与开发,2008,20(3):563-567  
LIU Zhi-dong, GUO Ben-heng, WANG Yin-yu. Methods to determine antioxidative activity [J]. Natural Product Research and Development, 2008, 20(3): 563-567