

The Antialgal Activities of Fractions and Compounds Isolated from *Potamogeton Malaianus*

Shenghua Zhang¹, Chenyan Hu², Zhenbin Wu, ²Yunni Gao²

¹Research Institute of Engineering and Technology, Yunnan University, Kunming, China

²State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072, China.

Email: shhzhang2007@yahoo.com.cn

Abstract: Antialgal fractions and compounds of *Potamogeton malaianus* were extracted using the best solvent and isolated by antialgal activity-guidance. Six active fractions were fractionated from the most active extracts, among them algal growth inhibition of five fractions could reach around 50%. 7 active compounds were purified after the further isolation. The chemical structure or fragment structures were determined by their mass spectra (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectra. Three compounds were identified as stigmasterol, hexadecanoic acid and octacosanoic acid, the fragment structures of other 4 compounds were described also, and needed further analysis. The algal growth inhibition of stigmasterol, hexadecanoic acid and octacosanoic acid could reach 32.1, 56.2 and 46.4% respectively at concentration of 20mg/L. Among the unknown 4 compounds, the algal growth inhibition of the most active compound could reach 81.6% at the concentration of 2mg/L, the antialgal growth inhibition of 2 unknown compounds were 82.8% and 70.3% when the concentration were 10 mg/L.

Keywords: Allelopathy; *Potamogeton malaianus*; *Selenastrum capricornutum*; Antialgal compound

马来眼子菜活性组分的抑藻效应研究

张胜花¹, 胡陈艳², 吴振斌², 高云霓²

¹云南大学工程技术研究院, 昆明, 中国, 650091

²中国科学院水生生物研究所, 武汉, 中国, 430072

Email: shhzhang2007@yahoo.com.cn

摘要: 采用藻类毒性实验示踪, 选择最佳溶媒提取马来眼子菜植物体内的抑藻活性组分和化合物, 分离得到 6 组活性组分, 除了其中一组活性较弱外, 其他五组在 20mg/L 时, 抑制率均在 50% 左右。对活性组分进行进一步的分离, 得到 7 中抑藻活性物质。采用质谱和核磁共振波谱来对化合物结构进行描述, 鉴定出了三种化合物, 分别为豆甾醇、棕榈酸和二十八碳酸, 另外四种分别对其化合物结构片段进行了分析。在这 7 种物质中, 活性最高的在 2mg/L 时对羊角月牙藻的抑制率即已达到 81.6%, 有两种未知结构的化合物在 10 mg/L 时对羊角月牙藻的抑制率达到 82.8% 和 70.3%。

关键词: 化感作用; 马来眼子菜; 羊角月牙藻; 抑藻物质

1 引言

如何有效控制富营养化水体中的藻类, 防止水华发生成为目前环境领域的研究热点和前沿。将水生植物及其化感物质应用于藻类控制具有良好的应用前景, 具有重要的环境和生态意义^[1], 因此引起了人们越来越多的

关注^[2-5]。虽然目前对眼子菜科植物体内抑藻化感物质提取、分离、鉴定等方面的研究已有一些报道^[6-8,9], 但马来眼子菜 (*Potamogeton malaianus*) 体内的抑藻物质的研究尚不多见。

本文报道了从马来眼子菜体内提取分离化感活性组分的方法, 研究了其对藻类的抑制效果, 并进一步分离出了几种可能的化感物质, 对其结构进行鉴定, 阐述其抑藻活性。

资助信息: 国家重大科技专项 (2008ZX07316-004), 云南省科技计划项目 (2009ZC005M), 云南大学校基金 (2009C19Q)

2 材料与amp;方法

2.1 试验材料

马来眼子菜采自湖北省洪湖，自然晾干粉碎后约 4.7 kg。藻类测试用羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)购自中科院水生生物研究所藻种库。

硅胶 200-300 目(青岛海洋化工厂)；薄层层析板: Merck 254nm 0.2mm(分析)和 Merck 254nm 0.5mm(制备)；ODS RPC18 填料(YMC)；Sephadex LH-20(Pharmacia)。

2.2 抑藻活性组分的提取和分离

2.2.1 马来眼子菜体内抑藻活性组分的提取及粗分

将植物粉末加入乙酸乙酯按照 1: 30 质量体积比浸渍提取(3 d, 5 次, 暗处, 25℃)。浸提液过滤后, 减压旋干得乙酸乙酯浸膏 108 g。按照 Gunatilaka 等^[10]方法对乙酸乙酯浸膏进行液液萃取, 将浸提物极性分段为正己烷萃取浸膏(a, 44.7g)、氯仿萃取浸膏(b)、水溶液(d)和甲醇洗脱液(c)。将此四部分进行藻类生物测试(浓度约为 50 mg/L, 方法见 2.3), 选择藻类抑制效果最好的正己烷萃取浸膏进行下一步分离。

2.2.2 马来眼子菜抑藻活性组分的提取分离

对正己烷萃取浸膏的进一步分离主要采用藻类毒性示踪, 柱层析(硅胶柱层析、反相 ODS-C18 柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析)、薄层层析以及重结晶等分离纯化方法进行抑藻活性组分和活性物质筛选。具体的分离筛选方法见图 1 所示。

2.2.3 抑藻化合物结构鉴定

测定质谱和核磁共振谱来分析推测抑藻化合物的化学结构。质谱测定采用 LC-MS (Agilent1100, LC/MSD Trap SL) 和 EI-MS (Finigan TRACE2000) 仪测定, 核磁共振谱(NMR)采用 Oxford YH300/AS600MHz 核磁共振仪测定(TMS 内标, 溶剂为 CDCl₃ 和 MeOD)。

2.3 藻类生物测试

采用加拿大环保局(1992)^[11]推荐的 96 孔板法作为藻类测试的方法, 测定马来眼子菜对羊角月牙藻的生长抑制作用。根据处理组与空白对照的差值, 计算抑制率。样品用 DMSO 助溶, 所用 DMSO 的体积与样品溶液体积比为 0.3%, 15 个平行, 取平均值分析结果。选取苯酚为标准参照物, 进行方法的校正。

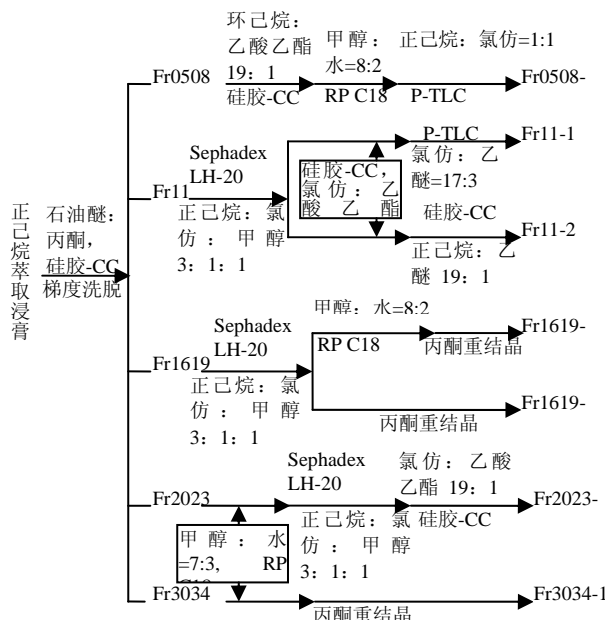


Figure 1 Isolation and purification process of antialgal compounds of *P. malaianus*

图 1 马来眼子菜抑藻活性组分的分离纯化流程图

3 结果

3.1 乙酸乙酯粗分物对羊角月牙藻的抑制效果

液液萃取后得到正己烷萃取浸膏(a)、氯仿萃取浸膏(b)、水溶液(d)和甲醇洗脱液(c)对羊角月牙藻的抑制效果见图 2 所示。结果显示, 正己烷萃取浸膏对羊角月牙藻有显著的抑制活性, 而氯仿萃取浸膏活性不强, 抑制率仅为 21.3%。甲醇洗脱液和剩余的水溶液对藻类抑制率为负, 没有明显的抑制作用。

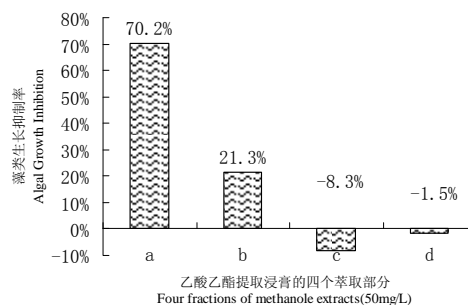


Figure 2 The algal growth inhibition of four different fractions of ethyl acetate extracts

图 2 乙酸乙酯提取物的 4 种萃取液抑藻活性测试结果

3.3 马来眼子菜活性组分对羊角月牙藻的抑制效果

抑藻活性最强的正己烷萃取浸膏经硅胶柱层析

后, 点板合并馏分后, 经藻类毒性测试发现, Fr0508、Fr11、Fr1215、Fr1619、Fr2023、Fr3034 都具有显著的抑藻活性, 见图 3 所示。除了抑藻活性较弱的 Fr1215, 其他活性组分在 20mg/L 时对羊角月牙藻的抑制率均在 50% 左右, 其中 Fr11 活性最高, 对藻类生长的抑制率为 57.8%。

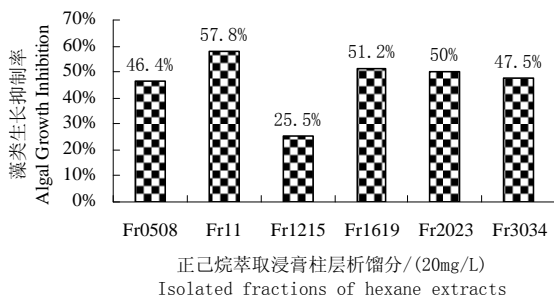


Figure 3 The algal growth inhibition of fractions separated from hexane extracts

图 3 马来眼子菜正己烷萃取浸膏活性组分的抑藻效果

3.4 马来眼子菜体内抑藻活性物质的鉴定

3.4.1 活性物质结构鉴定

Fr0508-1: APCI-MS ($[M+H]^+$), 451.4. 254nm 与 365nm 处有吸收。NMR 分析该化合物含有两个酮基及多个碳碳双键。

Fr 11-1: APCI-MS ($[M+H]^+$): 429, NMR 显示含有两个羰基, 一个碳碳双键, 含有很多甲基, 不含苯环。

Fr 11-2: APCI-MS ($[M+H]^+$): 463; NMR 显示含有多个活性氢且为共轭结构, 有两个碳连接了氧原子。

Fr1619-1: EI-MS ($[M+H]^+$): 413, 将其 MS 和 NMR 与文献对照^[12] (Leitão et al., 1992), 鉴定为豆甾醇。

Fr1619-2: EI-MS ($[M+H]^+$): 257, 具有典型脂肪酸裂解碎片峰; NMR 氢谱与文献^[13]对照一致, 鉴定为棕榈酸

Fr2023-1: EI-MS 对所得的化合物 PML20-1 给出分子离子峰 424 及典型脂肪酸裂解碎片峰。NMR 氢谱和碳谱数据与文献^[14]对照一致鉴定为二十八碳酸。

Fr3034-1: APCI-MS ($[M+H]^+$): 469.3; NMR 氢谱显示 PML30-1 含有 4 个双键氢, 其中两个为共轭氢, 碳谱显示存在酮基。

3.4.2 马来眼子菜中分离的化合物对羊角月牙藻生长的抑制效果

分离得到的 7 个化合物抑藻活性测试结果见表 1 所示。

Table 1. The algal growth inhibition of 7 compounds isolated from *P. malaiianus*

表 1. 分离出的化合物对羊角月牙藻生长的抑制效果

化合物编号	浓度(mg/L)	羊角月牙藻抑制率(%)
Fr 0508-1	2	81.6±5.1
Fr11-1	10	82.8±4.7
Fr11-2	10	70.3±4.3.0
Fr1619-1	20	32.1±2.1
Fr1619-2	20	56.2±3.7
Fr2023-1	20	46.4±2.9
Fr3034-1	20	63.1±5.0

结果显示, 抑藻活性最强的化合物为 Fr 0508-1、Fr 11-1、Fr 11-2 三种化合物。当 Fr 0508-1 浓度仅为 2 mg/L 时, 其对羊角月牙藻的抑制率已达 81.6%, 属于抑制活性非常强的化合物。Fr 11-1 和 Fr 11-2 在 10 mg/L 时对羊角月牙藻的抑制率达到 82.8% 和 70.3%。但由于这三种化合物确切的结构尚需进一步解析, 所以无法确定高抑藻活性的原因。Fr1619-1 豆甾醇的抑制率为 32.1%, Fr1619-2 棕榈酸在浓度为 20 mg/L 时对羊角月牙藻的抑制率超过 50%。Fr2023-1 二十八碳酸, 是一种长链脂肪酸, 对藻类也显示了一定的抑制效果。Fr3034-1 在 20 mg/L 时的抑制率达到 63.1%。

4 讨论与结论

4.1 讨论

目前对眼子菜科沉水植物化感作用及抑藻活性物质的研究已有一些报道, 该科植物中的一些常见种类已进行过类似研究。已有研究表明马来眼子菜对斜生栅藻^[15]和铜绿微囊藻^[9]等藻类有显著的化感抑制作用。但关于马来眼子菜中抑藻活性成分的研究还鲜见报道。

本文发现马来眼子菜正己烷提取物对羊角月牙藻的抑制效果最强, 乙酸乙酯提取物稍弱, 甲醇提取物反而没有表现出抑藻活性。甲醇作为溶媒所提取出来的化合物不仅可以包含正己烷、乙酸乙酯提取物, 而且也将很多极性较大的化合物溶解出来, 因此本文的结果表明, 马来眼子菜体内的极性较大的化合物对羊

角月牙藻有一定的促进作用,从而抵消了弱极性及中等极性提取物的抑制作用。乙酸乙酯浸膏经液液萃取后发现正己烷萃取液具有非常显著的抑藻活性,这进一步证明了马来眼子菜体内对羊角月牙藻抑制效果最强的化合物属于弱极性和中等极性。

Kittakoop 等^[16]从马来眼子菜中分离得到四种呋喃型半日花烷二萜,对病毒和细菌有显著的抑制能力。本文从马来眼子菜中分离得到 7 种化合物,他们都对羊角月牙藻表现出一定的抑制效果。化合物 Fr 0508-1、Fr 11-1、Fr 11-2 的核磁共振谱图与已有的眼子菜科提取分离方面的文献作比,没有发现与之相同的结构,虽然它们尤其是 Fr 0508-1 具有高的抑藻活性,但是结构尚需进一步解析。本实验中分离得到两种脂肪酸,且在高浓度下都具有一定的抑藻活性,这与戴树桂等^[17]报道的香蒲中分离到的棕榈酸具有较高的抑藻活性的研究结果一致。本文中分离到的一种甾醇类化合物豆甾醇在较大浓度下,也显示了对羊角月牙藻的毒性,这与 Aliotta^[18]早期的研究结果一致。1998 年 Della-Greca^[19]的研究结果表明很多纯的甾醇类物质没有显著的抑藻活性,马蹄莲中提取的甾醇类物质之所以表现出抑藻活性是由于提取分离过程中存在的一些微量物质造成的。因此马来眼子菜种提取到的豆甾醇表现出一定的抑藻活性很可能也是由于存在一些微量物质造成的。

4.2 结论

(1) 马来眼子菜乙酸乙酯浸膏的正己烷萃取部分具有最高的抑制活性,因此马来眼子菜提取物种具有强烈抑藻活性的化合物属于极性较弱的化合物。

(2) 从马来眼子菜提取物中分离到了 7 个活性化合物,包含两种长链脂肪酸(棕榈酸和二十八碳酸)和一个甾体类化合物(豆甾醇),另外 4 个活性化合物的结构还需要进一步的鉴定。活性最强的 PML0508-1 在 2 mg/L 时就能对羊角月牙藻产生 81.6% 的抑制率。

致 谢

感谢张甬元先生、刘保元先生、成水平博士对实验设计方面的指导,感谢王红强博士、葛芳杰硕士在实验过程中的帮助。

References (参考文献)

[1] Li F M, Hu H Y, Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical from *Phragmites communis*[J], *Applied*

- and Environmental Microbiology*, 2005, 71, P6545-6553.
- [2] Nakai S, Inoue T, Hosomi M, *et al.*, Growth Inhibition of Blue-green Algae by Allelopathic Effects of Macrophytes[J], *Water Science and Technol*, 1999, 39, P47-53.
- [3] Leu E, Krieger-Liszky A, Goussias C, *et al.*, Polyphenolic Allelochemicals from the Aquatic Angiosperm *Myriophyllum spicatum* Inhibit Photosystem[J], *Plant Physiology*, 2002, 130, P2011-2018.
- [4] Mulderij G, Smolders A J P, Van Donk E, Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton[J], *Freshwater Biology* 2006, 51, P554-561.
- [5] Shao J, Wu Z, Yu G, *et al.*, Allelopathic Mechanism of Pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): From Views of Gene Expression and Antioxidant System[J], *Chemosphere*, 2009, 75, P924-928.
- [6] DellaGreca M, Fiorentino A, Isidori M, *et al.*, Antialgal Furanoditerpenes from *Potamogeton natans* L.[J], *Phytochemistry*, 2001, 58, P299-304.
- [7] Cangiano T, DellaGreca M, Fiorentino A, *et al.*, Lactone Diterpenes from the Aquatic Plant *Potamogeton natans*[J], *Phytochemistry*, 2001, 56, P469-473.
- [8] Cangiano T, DellaGreca M, Fiorentino A, *et al.*, Effect of ent-labdane Diterpenes from Potamogetonaceae on *Selenastrum capricornutum* and other Aquatic Organisms[J], *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28, P1091-1102.
- [9] Zhang S H, Cheng S P, Wang H Q, *et al.*, Allelopathic Interactions between the *Potamogeton* spp and Toxic Cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) [J], *Allelopathy Journal*, 2009, 23, P379-390.
- [10] Gunatilaka L A A, Bolzani V S, Dagne E, *et al.*, Limonoids Showing Selective Toxicity to DNA Repair-deficient Yeast and other Constituents of *Trichilia emetica*[J], *Journal of natural products*, 1998, 61, P179-184.
- [11] Environment Canada, Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum* [M]. Environmental Protection Series, 1992. 1-25.
- [12] Leitão S G, Kaplan M A C, Monache F D, *et al.*, Sterols and Sterol Glucosides from two *Aegiphila* Species[J], *Phytochemistry*, 1992, 31, P2813-2817.
- [13] Liu Yue, Liu Jing, Yu Shishan, *et al.*, Studies on Chemical Constituents of *Cyanachum forrestii*[J], *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2007, 32(6), P500-503(Ch).
刘悦, 刘静, 庾石山, 等, 大理白前化学成分研究[J], *中国中药杂志*, 2007, 32(6), P500-503.
- [14] Liu Jianghai, Zhao Yu-ying, Qiao Liang, *et al.*, Studies on Chemical Constituents from *Buddleja lindleyana* Fert. [J], *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2001, 26(1), P41-43(Ch).
陆江海, 赵玉英, 乔梁, 等, 醉鱼草化学成分研究[J], *中国中药杂志*, 2001, 26(1), P41-43.
- [15] Wu Z, Deng P, Wu X, *et al.*, Allelopathic Effects of the Submerged Macrophyte *Potamogeton malaianus* on *Scenedesmus obliquus*[J], *Hydrobiologia*, 2007, 592, P465-474.
- [16] Kittakoop P, Wanasith S, Watts P, *et al.*, Potent Antiviral Potamogetonyde and Potamogetonol, New Turanoid Labdane Diterpenes from *Potamogeton malaianus*[J], *Journal of Natural Products*, 2001, 64, P385-388.
- [17] Dai Shugui, Zhao Fan, Jin Zhaohui, *et al.*, Allelopathic Effect of Plant's Extracts on Algae and the Isolating and Identifying of Phototoxins[J], *Environmental Chemistry*, 1997, 16(3), P268-271(Ch).
戴树桂, 赵凡, 金朝辉, 等, 香蒲植物提取物的抑藻作用及其分离鉴定[J], *环境化学*, 1997, 16(3), P268-271(Ch).
- [18] Aliotta G, Greca ND, Monaco P, *et al.*, In vitro Algal Growth Inhibition by Phytotoxins of *Typha latifolia*[J], *Journal of Chemical Ecology*, 1990, 16, P2637-2646.
- [19] DellaGreca M, Ferrara M, Fiorentino A, Antialgal Compounds from *Zantrdeschia aethiopica*. *Phytochemistry*, 1998, 49, P1209-1304.