

菹草石油醚组分中抑藻活性物质的 分离纯化和抑藻活性

孙颖颖^{1*}, 浦寅芳¹, 阎斌伦¹, 王长海²

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 菹草石油醚组分能显著抑制赤潮微藻米氏凯伦藻的生长, 为了获悉该组分抑制米氏凯伦藻的物质基础, 采用硅胶柱层析和制备薄层层析等方法, 对菹草石油醚组分中的抑藻活性物质进行分离纯化。进一步应用质谱、核磁共振碳谱和氢谱等技术, 鉴定抑藻活性物质。实验从菹草石油醚组分中分离纯化到4种抑藻活性物质。当浓度为16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 它们对米氏凯伦藻表现出一定的抑藻活性。结构鉴定表明, 此4种抑藻活性物质分别为二十五烷醇、邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯、棕榈酸和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯。此4种化合物为首次从菹草中分离得到。抑藻活性分析表明, 当浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 4个样品均能显著抑制赤潮异弯藻的生长。其中, 二十五烷醇和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯还能较明显地抑制东海原甲藻和球形棕囊藻的生长。

关键词: 菹草; 抑藻活性物质; 分离; 赤潮微藻

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

沉水植物作为水体生态系统中具有重要生态和环境功能的初级生产者^[1], 对保持水体功能和维持生态平衡有非常重要的作用。1969年, Fitzgerald^[2]发现沉水植物的代谢产物可以抑制浮游藻类生长。此后, 沉水植物抑藻活性的研究引起了研究者们广泛的兴趣。目前, 已经查明有40多种沉水植物具有明显的抑藻能力^[3], 例如穗状狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)、金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)、水剑叶(*Stratiotes aloides*)、伊乐藻(*Elodea nuttallii*)、轮叶狐尾藻(*M. verticillatum*)和菹草(*Potamogeton crispus*)等。在这些沉水植物中, 菹草生长快、耐污性较强、分布广泛, 是冬春季节沉水植被的优势种。研究报告, 菹草中存在黄酮^[4]、生物碱^[5]、长链脂肪酸^[6]、脂肪酸甘油酯、甾体和半日花烷型二萜^[7]等化合物。目前, 已经发现同属光叶眼子菜

(*P. lucens*)中的某些二萜具有抑制羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)的抑藻活性^[6, 8]。然而, 对于菹草中抑藻活性物质的分离纯化研究很少^[6, 9], 并且尚未见对赤潮微藻生长影响的研究。

前期研究发现, 菹草石油醚组分能显著抑制米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的生长^[10]。本研究在此基础上, 以米氏凯伦藻为检测目标, 采用硅胶柱层析和硅胶薄层层析分离方法, 纯化菹草石油醚组分中的抑藻活性物质。应用质谱、核磁共振碳谱和氢谱等技术, 鉴定出4种抑藻活性物质, 此4种化合物为首次从菹草中分离得到, 其中3种化合物是首次从沉水植物中分离得到。进一步分析此4种化合物对强壮前沟藻(*Amphidinium carterae*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、球

收稿日期: 2015-11-05 修回日期: 2016-05-16

资助项目: 国家海洋局重点实验室开放研究基金(MATHAB201504); 江苏省自然科学基金青年基金(BK20140446); 江苏省高校自然科学基金研究项目(13KJB170001)

通信作者: 孙颖颖, E-mail: syy-999@163.com

形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)和东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)的抑藻活性。不仅获悉了菹草石油醚组分中抑制赤潮微藻的化学基础, 而且为利用菹草生物防控赤潮奠定了良好的实验基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和东海原甲藻等赤潮微藻无菌株由上海光语生物科技有限公司提供, 在f/2培养基中培养, 培养温度为(20±0.1) °C, 光照强度40 μmol/(m²·s), 光暗比为12:12。

菹草石油醚组分的制备参考文献[10]。

天然海水经过脱脂棉和300目筛绢过滤、煮沸、冷却, pH值和盐度分别调节至8.5和30备用(实验所用海水均做如上处理)。

无水甲醇、乙酸乙酯和丙酮为分析纯。

1.2 菹草抑藻活性物质的分离纯化和抑藻活性检测

硅胶柱层析分离 将菹草石油醚组分(4.5 g)加载于硅胶(200~300目)柱层析上(3 cm×40 cm), 氯仿/丙酮/甲酸(18:1:1, 体积比)为洗脱剂。洗脱馏分经减压蒸干和硅胶GF₂₅₄薄层层析检测、合并后, 收集到6个分离组分, YP1、YP2、YP3、YP4、YP5和YP6此6个组分重新溶解于适量甲醇中, 以进行抑藻活性检测和后续分离。分别将此6个组分加入到f/2培养基中, 混合均匀后, 接种米氏凯伦藻, 培养混合液总体积为25 mL。米氏凯伦藻接种细胞数量为(8~11)×10⁴个/mL, 样品终浓度为16 μg/mL(前期研究中, 浓度为16 μg/mL时, 菹草石油醚组分显著抑制了米氏凯伦藻的生长^[10]。因此, 设定抑藻活性组分和薄层纯样品的检测终浓度为16 μg/mL)。同时, 设定添加相同体积甲醇的对照组(甲醇加入体积不超过0.1 mL), 每个培养瓶设定3个平行样。培养瓶置于GXZ-260B智能型光照培养箱中培养, 温度(23±1) °C, 光照强度62 μmol/(m²·s), 光暗比为12:12。每天定时摇动培养瓶2次, 每次摇瓶2 min, 以防止微藻附壁生长。每隔1日从培养瓶中取5 μL培养液, 用Lugol's试剂固定后, 统计藻细胞数量的变化。

硅胶GF₂₅₄薄层层析分离 检测发现, 3个组分YP1、YP4和YP5具有明显的抑藻活性。称取质量后, 对YP1(0.889 g)、YP4(0.653 g)和YP5(0.645 g)进行硅胶GF₂₅₄薄层层析分离, 展开剂为氯仿/丙酮/甲酸(15:3:2, 体积比), UV₂₅₄下检测。YP1分离为YP11、YP12和YP13; YP4和YP5依次分离为YP41、YP42、YP43和YP44, 以及YP51、YP52、YP53和YP54。抑藻活性检测表明, 此11个再分组中, 仅YP11、YP42、YP43和YP51等4个再分组具有抑藻活性(检测方法同上)。以氯仿/丙酮/甲酸(15:3:2, 体积比)为展开剂, 将此4个再分组再次进行硅胶GF₂₅₄薄层层析分离。最终制备得到4个样品: ZCX0(0.038 g)、ZCX1(0.029 g)、ZCX2(0.042 g)和ZCX3(0.022 g)。纯度检测^[11]表明, 此4个样品达到了薄层纯。将此4种样品溶解于二甲基亚砜(DMSO), 采用Costar 96孔板进行薄层纯样品的抑藻活性检测。每孔培养体系终体积为200 μL, 由199 μL藻液和1 μL薄层纯样品溶液组成。实验藻液中DMSO终浓度为0.5%, 薄层纯样品溶液终浓度依次为0.4、2、10和50 μg/mL。强壮前沟藻、赤潮异弯藻、球形棕囊藻和东海原甲藻接种数量分别为46×10⁴、8×10⁴、3.45×10⁶和5×10⁴个/mL。每个浓度设定3个平行样。另外设定6个空白对照和6个含0.5%DMSO的阴性对照。阳性对照为重铬酸钾, 浓度分别为0.5、2、4、8和16 μg/mL。周围36孔加入200 μL蒸馏水, 以排除边缘效应, 减少实验过程中藻液的挥发。温度(23±1) °C, 光照强度62 μmol/(m²·s), 光暗比为12:12。培养期间每日振荡3次, 每隔24 h计数观察, 计算96 h的EC₅₀值。结果显示, ZCX0和ZCX3具有强烈的抑藻活性, ZCX1和ZCX2具有较弱的抑藻活性。

1.3 光谱测定

样品需进行HR-ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR(nuclear magnetic resonance)光谱测定。用Bruker AV III 600质谱仪测定NMR(四甲基硅烷, TMS为标准品), 用LTQ-Obitrap XL光谱仪进行HR-ESI-MS测定。

1.4 数据处理

实验数据采用SPSS 11.5进行独立样本检验统计分析, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

微藻生长抑制率: $I(\%) = (1 - N/N_0) \times 100$

式中, N 为处理组藻细胞数量($\times 10^4$ 个/mL); N_0 为对照组藻细胞数量($\times 10^4$ 个/mL)。藻细胞生长抑制率在20%~50%为较弱的抑藻活性, 生长抑制率 $\geq 50\%$ 为明显的抑藻活性。

2 结果与分析

2.1 菹草抑藻活性物质的结构鉴定

ZCX0, 二十五烷醇, 无色粉末; ESIMS m/z : 368 $[M]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H 3.64 (2H, t, $J=6.6$ Hz, H-1), 1.56 (2H, m, H-2), 1.25 (44H, br, H-3~24), 0.88 (3H, t, $J=6.6$ Hz, H-25); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz); δ_C 63.1 (C-1), 32.8 (C-2), 31.9 (C-23), 29.6-29.8 (C-5~21), 29.4 (C-4, 22), 25.7 (C-3), 22.7 (C-24), 14.1 (C-25)^[12]。

ZCX1, $C_{22}H_{34}O_4$, 淡黄色油状物; ESIMS m/z : 385 $[M+Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.50 (2H, m, H-3, H-6), 7.74 (2H, m, H-4, H-5), 4.29 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-1', 1''), 1.70 (2H, m, H-2', 2''), 1.44~1.26 (12H, m, H-3', 3'', H-4', 4'', H-5', 5''), 0.92 (6H, d, $J=7.8$ Hz, CH_3 -H-2', 2''), 0.90 (6H, d, $J=6.6$ Hz, CH_3 -H-6', 6''); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 167.7 (C-7, 8), 132.4 (C-1, 2), 130.9 (C-4, 5), 128.8 (C-3, 6), 68.1 (C-1', 1''), 38.7 (C-2', 2''), 30.3 (C-3', 3''), 28.9 (C-4', 4''), 23.7 (C-5', 5''), 14.0 (CH_3 -2', 2''), 10.9 ($3 \times$ - CH_3 -6', 6'')。上述数据与文献报道邻苯二甲

酸二(2-甲基己基)酯基本一致, 故将化合物ZCX1鉴定为邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯^[13]。

ZCX2, $C_{16}H_{32}O_2$, 无色油状物; ESIMS m/z : 279 $[M+Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 2.32 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H₂-2), 1.61 (2H, m, H₂-3), 1.23-1.28 (24H, m, H₂-4~15), 0.86 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H₃-16); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 180.1 (C-1), 34.1 (C-2), 24.7 (C-3), 29.1~29.7 (C-4~13), 31.9 (C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16)。上述数据与文献报道棕榈酸基本一致, 故将化合物ZCX2鉴定为棕榈酸^[14]。

ZCX3, $C_{24}H_{38}O_4$, 淡黄色油状物; ESIMS m/z : 413 $[M+Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.53 (2H, m, H-3, H-6), 7.72 (2H, m, H-4, H-5), 4.31 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-1', 1''), 1.72 (4H, m, H-2', 2''), 1.44~1.32 (8H, m, H-3', 3'', H-4', 4''), 0.99 (18H, d, $J=6.6$ Hz, $3CH_3$ -H-5', 5''); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 132.2 (C-1, 2), 128.8 (C-3, 6), 130.9 (C-4, 5), 167.7 (C-7, 8), 65.8 (C-1', 1''), 30.5 (C-2', 2''), 29.7 (C-3', 3''), 29.5 (C-4', 4''), 33.5 (C-5', 5''), 18.4 ($3 \times$ - CH_3 -5', 5'')。上述数据与文献报道苯二甲酸二(5, 5-二甲基己基)酯基本一致, 故将化合物ZCX3鉴定为邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯^[15]。

2.2 抑藻活性物质的抑藻活性

ZCX1对强壮前沟藻的生长, 以及ZCX1和ZCX2对球形棕囊藻的生长均未表现出明显的抑制作用(图2)。除此之外, 其余样品均对强壮

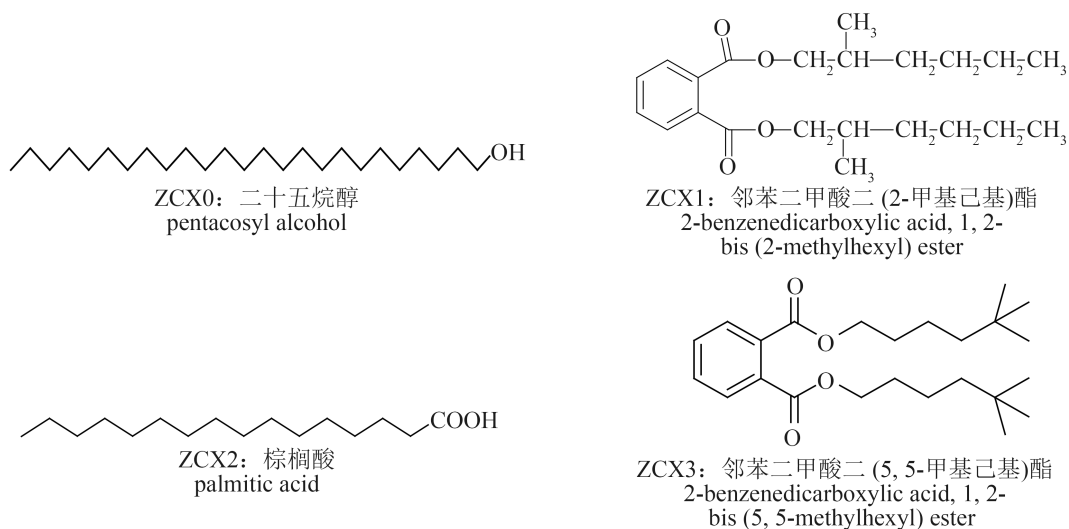


图1 ZCX0、ZCX1、ZCX2和ZCX3的结构

Fig. 1 Structure of four purified samples

前沟藻、赤潮异弯藻、球形棕囊藻和东海原甲藻的生长表现出一定的抑制作用。在浓度为 50 μg/mL 时, 4 个薄层纯样品均显著抑制了赤潮

异弯藻的生长; 样品 ZCX0 和 ZCX3 明显抑制了东海原甲藻的生长; ZCX3 还显著抑制了球形棕囊藻的生长。

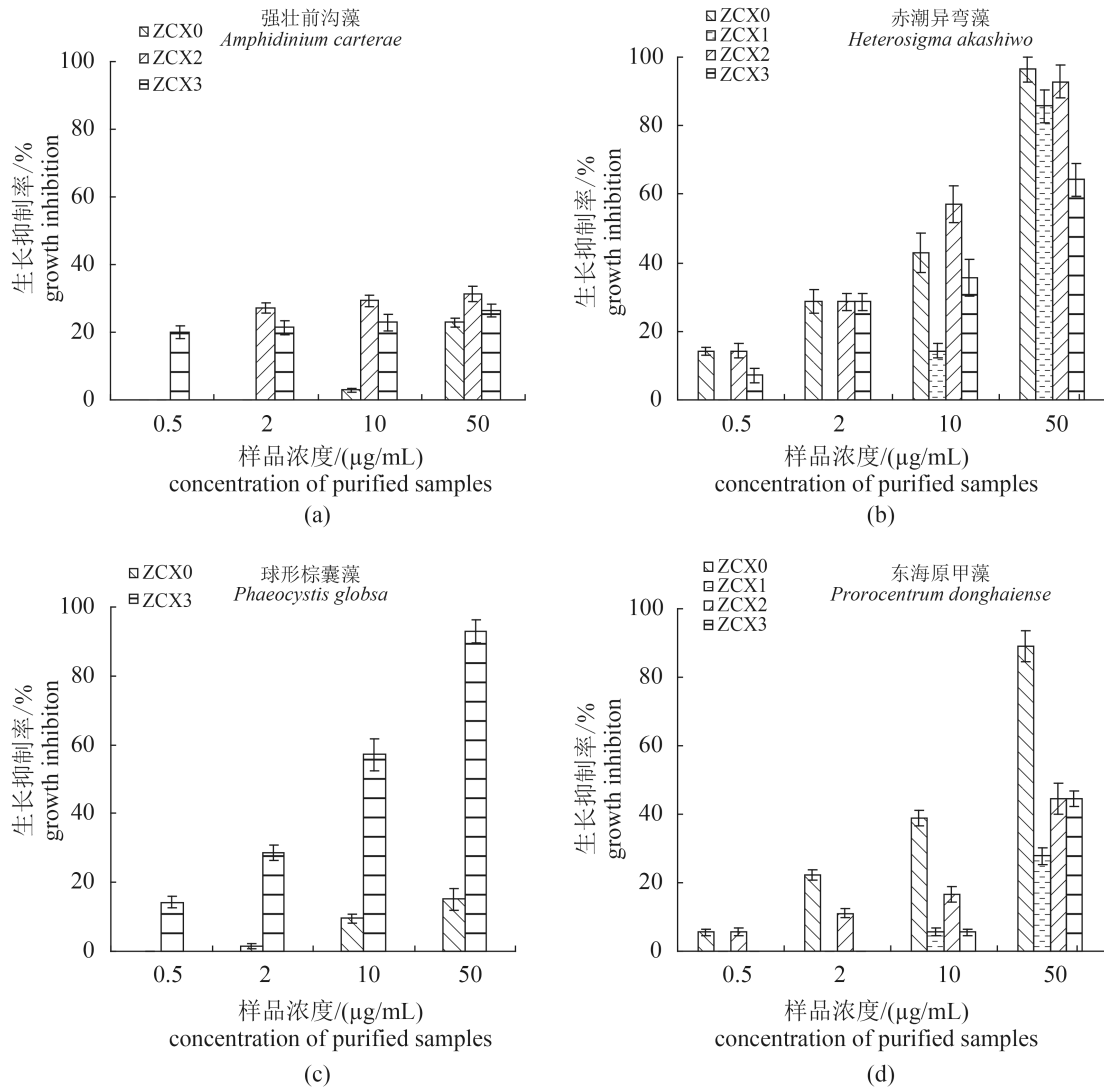


图 2 样品对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of four antialgal activity samples on the growth of four species of red-tide microalgae

进一步计算得出, 重铬酸钾对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、球形棕囊藻和东海原甲藻的 EC₅₀(96 h) 分别为 4.0、36、38 和 3.3 μg/mL。ZCX0、ZCX1、ZCX2 和 ZCX3 等 4 个样品对赤潮异弯藻的 EC₅₀(96 h) 均小于重铬酸钾对此 4 种赤潮微藻的 EC₅₀(96 h) (表 1)。

藻类生长抑制实验对毒物的毒性分级标准为 96 h-EC₅₀ < 1 μg/mL 时为极高毒, 在 1~10 μg/mL 范围内为高毒, 在 10~100 μg/mL 为中毒, 超过 100 μg/mL 为低毒。二十五烷醇对赤潮异弯藻和

东海原甲藻具有中等毒性, 对强壮前沟藻和球形棕囊藻具有低毒作用; 邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯对赤潮异弯藻具有中等毒性, 对东海原甲藻仅具有低毒; 棕榈酸对赤潮异弯藻具有高毒, 对东海原甲藻具有低毒; 邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯对赤潮异弯藻和东海原甲藻具有中等毒性, 对球形棕囊藻具有低毒作用(表 1)。

3 讨论

近年来, 用于赤潮的预防、控制和减缓的

表 1 重铬酸钾和4个薄层纯样品对赤潮微藻生长的EC₅₀
 Tab. 1 EC₅₀ of potassium dichromate and four samples on the growth of four species of red-tide microalgae $\mu\text{g/mL}$

化合物 compounds	强壮前沟藻 <i>A. carterae</i>	赤潮异弯藻 <i>H. akashiwo</i>	球形棕囊藻 <i>P. globosa</i>	东海原甲藻 <i>P. donghaiense</i>
重铬酸钾 potassium dichromate	4.0±0.42	36±0.42	38±2.97	3.3±0.31
二十五烷醇 pentacosyl alcohol	140±4.38	18±1.21	104±5.76	17.5±1.28
邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯 1,2-benzenedicarboxylic acid, 1, 2-bis(2-methylhexyl) ester	—	23±2.57	—	129±3.96
棕榈酸 palmitic acid	—	4.5±0.22	—	137±4.17
邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯 1,2-benzenedicarboxylic acid, 1, 2-bis(5,5-methylhexyl) ester	—	20±1.07	93±2.65	59±2.79

注: —未计算出

Notes: —not calculated

技术与方法引起了科学界和相应管理机构的高度重视^[16-17]。这些技术与方法中,利用植物间化感作用来进行赤潮的预防、控制和减缓表现出显著的应用潜力。借鉴于淡水水华控制的研究成果,研究者们将某些陆生植物应用于赤潮微藻治理的研究中。例如,大麦(*Hordeum vulgare*)秆^[18]、小麦(*Triticum sp.*)秸秆^[19]、凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)根系^[20]、玉米(*Zea mays*)秸秆^[21]和玉米叶^[22]等。目前,将沉水植物用于赤潮微藻治理的研究较少。

在本研究中,采用一系列分离方法和光谱技术,分离纯化并鉴定了菹草石油醚组分中的4种抑藻活性物质,二十五烷醇、邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯、棕榈酸和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯。此4种化合物为首次从菹草中分离得到,其中,二十五烷醇、邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯也是首次从沉水植物中分离得到。

二十五烷醇为直链醇,目前,尚未见其抑藻活性的报道。本研究发现二十五烷醇能抑制赤潮微藻的生长(图2),这是针对二十五烷醇抑藻活性的首次研究。在厚叶解曼藻(*Kjellmaniella crassifolia*)中鉴定出1个直链醇hexadecan-1-ol^[23],但未见其抑藻活性有关研究。

目前,已经发现某些植物中的邻苯二甲酸酯类化合物具有抑藻活性^[24-27]。例如,稻草浸泡液能抑制微囊藻的生长。GC-MS检测发现,活性物质中最为典型的酯类物质为邻苯二甲酸二丁酯及其衍生物^[24]。Choe等^[25]采用GC-MS分析发现艾蒿(*Artemisia argyi*)中的抑藻物质主要是邻苯二甲酸二辛酯和邻苯二甲酸二乙基己基酯等。王立新等^[26]发现能显著抑制铜绿微囊藻(*Microcystis*

aeruginosa)生长的黑藻(*Hydrilla verticillata*)乙醚提取物中含有3种邻苯二甲酸酯类化合物。石莼(*Ulva clathrata*)中的邻苯二甲酸二异丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二丁酯(DIBP)在较低浓度时(<4.0 $\mu\text{g/mL}$)能显著抑制短裸甲藻(*Gymnodinium breve*)^[27]。在本研究中,化合物2和4是邻苯二甲酸酯类化合物,实验发现了此2种化合物对赤潮异弯藻和东海原甲藻的抑藻活性(图2),这是邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯对赤潮微藻抑藻活性的首次报道。采用外源添加的方式,研究者们发现了邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)对海洋微藻生长可能的影响^[28],具体影响机制还在研究中。

棕榈酸在水生植物中分布比较广泛,已经从马来眼子菜(*P. malainus*)^[29]、宽叶香蒲(*Typha latifolia*)^[30]和普生轮藻(*Chara vulgaris*)^[31]等水生植物中分离得到。然而,棕榈酸的抑藻活性研究主要集中在羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、小球藻(*Chlorella sp.*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)等淡水微藻^[32],对赤潮微藻生长的影响研究较少。目前,仅见棕榈酸对中肋骨条藻^[23]、新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)^[33]、赤潮异弯藻^[34]、东海原甲藻^[35]和微小原甲藻(*P. minimum*)^[36]等赤潮微藻的抑藻作用研究,尚未见对球形棕囊藻和强壮前沟藻抑制作用的报道。本研究表明,棕榈酸除对赤潮异弯藻具有明显的抑制作用外,对强壮前沟藻、球形棕囊藻和东海原甲藻的抑制作用较弱(图2)。

此外,本研究中抑藻活性物质对不同的赤潮微藻表现出不同程度的抑制作用,可能与赤潮微藻的细胞结构有关,但还需要进一步研究

来确定。

综合分析, 二十五烷醇和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯具有抑藻活性的应用潜力, 在后续工作中, 将进行此2种抑藻活性物质的抑制作用机制研究, 以期利用菹草抑藻活性物质生物防控微藻赤潮提供理论依据。

4 结论

采用一系列分离方法, 从菹草石油醚组分中分离纯化得到4种抑藻活性物质, 当它们浓度为16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对赤潮微藻表现出一定的抑藻活性。经鉴定, 此4种抑藻活性物质分别为二十五烷醇、邻苯二甲酸二(2-甲基己基)酯、棕榈酸和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯, 它们为首次从菹草中分离得到。二十五烷醇和邻苯二甲酸二(5,5-甲基己基)酯显著抑制了赤潮异弯藻的生长, 还能较明显地抑制东海原甲藻和球形棕囊藻的生长。

参考文献:

- [1] 薛培英, 李国新, 赵全利. 轮叶黑藻和穗花狐尾藻对铜的吸收机制研究[J]. 环境科学, 2014, 35(5): 1878-1883. Xue P Y, Li G X, Zhao Q L. Mechanisms of copper uptake by submerged plant *Hydrilla verticillata* (L. f.) royle and *Myriophyllum spicatum* L.[J]. Environmental Science, 2014, 35(5): 1878-1883 (in Chinese).
- [2] Fitzgerald G P. Some factors in the competition or antagonism among bacteria, algae, and aquatic weeds[J]. Journal of Phycology, 1969, 5(4): 351-359.
- [3] 肖溪, 楼莉萍, 李华, 等. 沉水植物化感作用控藻能力评述[J]. 应用生态学报, 2009, 20(3): 705-712. Xiao X, Lou L P, Li H, et al. Algal control ability of allelopathically active submerged macrophytes: A review[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(3): 705-712 (in Chinese).
- [4] Ostrofsky M L, Zettler E R. Chemical defences in aquatic plants[J]. The Journal of Ecology, 1986, 74(1): 279-287.
- [5] Les D H, Sheridan D J. Biochemical heterophylly and flavonoid evolution in north American *Potamogeton*[J]. American Journal of Botany, 1990, 77(4): 453-465.
- [6] Waridel P, Wolfender J L, Lachavanne J B, et al. ent-Labdane glycosides from the aquatic plant *Potamogeton lucens* and analytical evaluation of the lipophilic extract constituents of various *Potamogeton* species[J]. Phytochemistry, 2004, 65(7): 945-954.
- [7] 叶淼, 刘书婷, 翟文珠, 等. 丽娃河菹草化学成分的研究[C]//中国化学会第八届天然有机化学学术研讨会论文集. 济南: 中国化学会, 2010. Ye M, Liu S T, Zhai W Z, et al. Study on the chemical constituents of liwa river *Potamogeton crispus* [C]//Symposium of China Chemistry Symposium on the Eighth Session of the Organic Chemistry. Jinan: Chinese Chemical Society, 2010(in Chinese).
- [8] DellaGreca M, Fiorentino A, Isidori M, et al. Antialgal furano-diterpenes from *Potamogeton natans* L.[J]. Phytochemistry, 2001, 58(2): 299-304.
- [9] Waridel P, Wolfender J L, Lachavanne J B, et al. Identification of the polar constituents of *Potamogeton* species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSⁿ and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside[J]. Phytochemistry, 2004, 65(16): 2401-2410.
- [10] 孙颖颖, 王长海. 菹草提取物对3种赤潮微藻生长的抑制作用[J]. 可持续发展, 2012, 2(1): 13-21. Sun Y Y, Wang C H. Growth inhibition of the three species of red tide microalgae by extracts from *Potamogeton crispus*[J]. Sustainable Development, 2012, 2(1): 13-21 (in Chinese).
- [11] Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, et al. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*[J]. Fisheries Science, 1996, 62(6): 923-926.
- [12] 高增平, 李世文, 陆蕴如, 等. 中药绵马贯众的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(4): 260-262. Gao Z P, Li S W, Lu Y R, et al. Studies on the chemical constituents of *Dryopteris crassirhizoma*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2003, 38(4): 260-262 (in Chinese).
- [13] 艾力·沙吾尔, 古丽斯玛依·艾拜都拉. 新疆有毒植物骆驼蓬挥发油的化学成分测定[J]. 生物技术, 2009, 19(4): 56-58. Ali S, Gulisimayi A. Determination of chemical components of volatile oil from *Peganum harmala* L. by GC/MS[J]. Biotechnology, 2009, 19(4): 56-58 (in Chinese).
- [14] 舒任庚, 徐昌瑞, 刘庆华, 等. 青钱柳化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 680-681. Shu R G, Xu C R, Liu Q H, et al. Studies on the chemical constituents *Cyclocarya paiturus* (Batal.) Iljinsk[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1995, 20(11): 680-681 (in Chinese).

- [15] Lee Y J, Jung H C, Kim E I, *et al.* Method for preparing isotactic polypropylene with high melting fluidity using Ziegler-type catalyst system containing internal/external-electron donor and titanium/magnesium[J]. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*, 2010, 3: 145-153.
- [16] Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2012, 4(1): 143-176.
- [17] Tang Y Z, Gobler C J. The green macroalga, *Ulva lactuca*, inhibits the growth of seven common harmful algal bloom species via Allelopathy[J]. *Harmful Algae*, 2011, 10(5): 480-488.
- [18] Terlizzi D E, Ferrier M D, Armbruster E A, *et al.* Inhibition of dinoflagellate growth by extracts of barley straw (*Hordeum vulgare*)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2002, 14(4): 275-280.
- [19] 高洁, 杨维东, 刘洁生, 等. 利用小麦秸控制赤潮生物生长的研究[J]. *海洋环境科学*, 2005, 24(1): 5-8, 31.
Gao Y, Yang W D, Liu J S, *et al.* Studies on wheat straw to inhibit the growth of *Phaeocystis globosa*[J]. *Marine Environmental Science*, 2005, 24(1): 5-8, 31 (in Chinese).
- [20] 陈芝兰, 杨维东, 刘洁生, 等. 凤眼莲根系分泌物对塔玛亚历山大藻的化感作用[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(3): 313-317.
Chen Z L, Yang W D, Liu J S, *et al.* Allelopathic effects of *Eichhornia crassipes* roots on *Alexandrium tamarense*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(3): 313-317(in Chinese).
- [21] 杨维东, 欧阳好婧, 刘洁生. 玉米秸秆对塔玛亚历山大藻生长的影响及化学基础研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(9): 2470-2474.
Yang W D, Ouyang Y J, Liu J S. Inhibitory effects and chemical basis of cornstalk on the growth of *Alexandrium tamarense*[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(9): 2470-2474 (in Chinese).
- [22] 欧阳好婧, 杨维东, 刘洁生. 玉米叶对我国几种典型赤潮藻生长的影响研究[J]. *海洋环境科学*, 2009, 28(4): 383-386.
Ouyang Y J, Yang W D, Liu J S. Study on effect of corm leave on growth of some HABs algae[J]. *Marine Environmental Science*, 2009, 28(4): 383-386 (in Chinese).
- [23] 卢慧明, 谢海辉, 杨宇峰, 等. 大型海藻龙须菜的化学成分研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(2): 166-170.
- [24] Lu H M, Xie H H, Yang Y F, *et al.* Chemical constituents from the macroalga *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2011, 19(2): 166-170 (in Chinese).
- [24] 朱擎, 冯菁, 吴为中, 等. 稻草浸泡液的抑藻效果与抑藻活性组分的初步分析[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2009, 45(1): 178-182.
Zhu Q, Feng J, Wu W Z, *et al.* Preliminary analysis on algal inhibition by rice straw extract and allelopathic components[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2009, 45(1): 178-182 (in Chinese).
- [25] Choe S, Jung I. Growth inhibition of freshwater algae by ester compounds released from rotted plants[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2002, 8(4): 297-304.
- [26] 王立新, 张玲, 张余霞, 等. 黑藻(*Hydrilla verticillata*)养殖水对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的抑制效应及其机制[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2006, 32(6): 672-678.
Wang L X, Zhang L, Zhang Y X, *et al.* The inhibitory effect of *Hydrilla verticillata* culture water on *Microcystis aeruginosa* and its mechanism[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(6): 672-678 (in Chinese).
- [27] 田志佳. 大型海藻化感物质对短裸甲藻的抑制作用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Tian Z J. Inhibition effect of allelochemicals from large seaweeds on *Gymnodinium breve*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- [28] 何瑞. 邻苯二甲酸二丁酯对海洋微藻生长的影响及机制[D]. 广州: 暨南大学, 2014.
He R. Effects and mechanisms of DBP on the growth of marine microalgae[D]. Guangzhou: Jinan University, 2014 (in Chinese).
- [29] Alamsjah M A, Hirao S, Ishibashi F, *et al.* Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5): 713-720.
- [30] 胡陈艳, 葛芳杰, 张胜花, 等. 马来眼子菜体内抑藻物质分离及常见脂肪酸抑藻效应[J]. *湖泊科学*, 2010, 22(4): 569-576.
Hu C Y, Ge F J, Zhang S H, *et al.* Isolation of antialgal compounds from *Potamogeton malaianus* and algal inhibitory effects of common fatty acids[J]. *Journal of*

- Lake Sciences, 2010, 22(4): 569-576 (in Chinese).
- [31] 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): 268-271.
Dai S G, Zhao F, Jin Z H, *et al.* Allelopathic effect of plant's extracts on algae and the isolating and identifying of phototoxins[J]. Environmental Chemistry, 1997, 16(3): 268-271 (in Chinese).
- [32] 张庭延, 郑春艳, 何梅, 等. 亚油酸对铜绿微囊藻的抑制机理[J]. 中国环境科学, 2009, 29(4): 419-424.
Zhang T Y, Zheng C Y, He M, *et al.* The inhibitory mechanism of linoleic acid on *Microcystis aeruginosa*[J]. China Environmental Science, 2009, 29(4): 419-424 (in Chinese).
- [33] 汤海峰, 易杨华, 姚新生, 等. 褐藻果叶马尾藻化学成分的研究[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(6): 11-15.
Tang H F, Yi Y H, Yao X S, *et al.* Studies on the chemical constituents from marine brown algae *Sargassum carpophyllum*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2002, 21(6): 11-15 (in Chinese).
- [34] 汤海峰, 易杨华, 姚新生, 等. 铁钉菜化学成分的研究(3)[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 269-273.
Tang H F, Yi Y H, Yao X S, *et al.* Studies on the chemical constituents from marine brown alga *Ishige okamurai* (3)[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 27(4): 269-273 (in Chinese).
- [35] 崔峰. 浒苔对赤潮微藻的化感抑制作用以及化感物质的结构鉴定[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
Cui F. Studies on allelopathy effects of *Ulva prolifera* on red tide microalgae and allelochemicals identification[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [36] 张可. 海马齿对三种赤潮微藻生长的克生作用研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2011.
Zhang K. Allelopathic effect of *Sesuvium portulacastrum* on the growth of three red tide microalgae[D]. Xiamen: Xiamen University, 2011 (in Chinese).

Isolation and purification of antialgal activity substances from petroleum ether extracts of the submerged macrophytes *Potamogeton crispus* and the antialgal activities analysis

SUN Yingying^{1*}, PU Yinfang¹, YAN Binlun¹, WANG Changhai²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Resources and Environment Science Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Previous studies showed that the petroleum ether extracts from the submerged macrophytes *Potamogeton crispus* significantly inhibited the growth of *Karenia mikimotoi*. Further, four antialgal activity compounds (1–4) were successfully isolated through a combination of silica gel column chromatography and repeated preparative thin-layer chromatography in this paper. These four antialgal compounds showed antialgal activities against *K. mikimotoi*. Furthermore, their structures were identified on the basis of spectrum data. There are pentacosyl alcohol, 1, 2-benzenedicarboxylic acid, 1, 2-bis(2-methylhexyl) ester, palmitic acid, and 1, 2-benzenedicarboxylic acid, 1, 2-bis(5,5-methylhexyl) ester. These four compounds were isolated from *P. crispus* for the first time, and compounds 1, 2, and 4 were isolated from the submerged macrophytes for the first time. This paper provided solid experiment foundation for further study. Furthermore, at the concentration of 50 µg/mL, these four antialgal compounds significantly inhibited the growth of *Heterosigma akashiwo*; and pentacosyl alcohol and 1, 2-benzenedicarboxylic acid, 1, 2-bis(5,5-methylhexyl) ester exhibited more significant antialgal activity against *Prorocentrum donghaiense* and *Phaeocystis globosa*.

Key words: *Potamogeton crispus*; antialgal activity substances; isolation; red tide microalgae

Corresponding author: SUN Yingying. E-mail: syy-999@163.com

Funding projects: Foundation of Key Laboratory of Integrated Monitoring and Applied Technologies for Marine Harmful Algal Blooms, S.O.A. (MATHAB201504); Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK20140446); Natural Science Research Project of Jiangsu Province of China (13KJB170001)