

侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*)乙醇提取物抗氧化和抑菌活性研究

刘 蕾¹, 魏玉西¹, 王长云², 郭 奇¹, 万慧一¹, 赵 玲¹

(1. 青岛大学 生物系, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 医药学院 海洋药物研究所, 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 对中国南海侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*)乙醇提取物及其石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相进行了抗氧化和抑菌两种生物活性研究。结果表明: 中国南海侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对羟自由基的清除效果好, 在 50 mg/L 时清除效率均高于同浓度的合成抗氧化剂 TBHQ 和 BHT; 石油醚相、乙酸乙酯相对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除效率优于正丁醇相和乙醇提取物。另外, 对 5 种海洋细菌、4 种陆地细菌进行了抑菌活性测定, 发现乙醇提取物及其各萃取相对海洋细菌的最低抑菌浓度(MIC)为 100 g/L 左右, 对受试陆地细菌未见抑菌作用。

关键词: 侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*); 乙醇提取物; 抗氧化; 抑菌

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)09-0019-04

我国辽阔的海域蕴藏着丰富的珊瑚资源,其中,软珊瑚是热带及亚热带海洋中常见的海洋腔肠动物。随着近几年对该种属生物活性研究的逐步深入,不但发现了软珊瑚中含有丰富的天然代谢产物(如萜类、甾体类和胆固醇类^[1~4]等),且这些代谢产物的化学防御功能也相继被发现,主要表现在抗氧化、抗病原微生物、克生及附着等方面,如短足软珊瑚(*Cladiella* sp.)中的孕甾醇具有抗早孕及抑制肿瘤细胞生长活性^[5],肉芝软珊瑚(*Sarcophyton crassocaule* Mosre)中的一种多羟基甾醇对胃癌细胞(MGC-803)有中等程度的抑制活性^[6]。

侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*),俗称红海树珊瑚,分布于太平洋海域,属于腔肠动物门,珊瑚虫纲,八放珊瑚亚纲,海鸡头目,软珊瑚亚目,软珊瑚科。目前,国内对侧扁软柳珊瑚的研究报道仅见其提取物碱水不溶部分可使动物产生全身发软,重者四肢震颤、翻正反射消失等反应^[7]。作者对一种中国南海侧扁软柳珊瑚的乙醇提取物及其各萃取相进行了抗氧化及抑菌活性的初步研究,以丰富对该种属珊瑚的生物活性研究资料,进而为一些新的抗氧化及抑菌药物的发现打下基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料、试剂及仪器

1.1.1 材料

侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*)(Pallas

1766)于 2006 年 11 月采自北海涠洲岛并冷冻保存,种属由中国科学院南海海洋研究所邹仁林研究员鉴定,标本(GDNZ-1-14)存放于中国海洋大学医药学院天然药物化学一室。

菌种: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*), 四联微球菌(*Micrococcus tetragenus*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*); 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*), 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 沙蚕弧菌(*Vibrio nereis*)。以上菌种均由中国水科院黄海水产研究所提供。

1.1.2 主要仪器

旋转蒸发器 RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂; TU-1810 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 双列四孔水浴锅, 北京科伟永鑫实验仪器设备厂; 立式压力蒸气灭菌器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; SW-CJ-2G 型双人净化工作台, 苏州净化设备有限公司; CHA-S 气浴恒温振荡器, 江苏省金坛市医疗仪器厂。

收稿日期: 2009-12-30; 修回日期: 2010-04-08

基金项目: 国家海洋局“908”专项项目(908-01-ST12; 908-02-05-04)

作者简介: 刘蕾(1985-), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物检测与控制; 魏玉西, 通信作者, E-mail: yuxiw729@163.com; 王长云, 通信作者, E-mail: changyun@ouc.edu.cn

1.1.3 试剂

胰蛋白胨大豆琼脂培养基、营养琼脂, 北京陆桥技术有限责任公司; 特丁基对苯二酚(TBHQ)标准样品、2,6-二叔丁基-甲基苯酚(BHT), 美国 Merck 公司; 1,1-二苯基苦基苯肼基自由基(DPPH·)标准品, 美国 Sigma 公司; 七水硫酸亚铁、水杨酸、30%双氧水、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、浓 HCl、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相的制备

将新鲜的侧扁软柳珊瑚(干质量 1.2 kg)经淡水冲洗、切碎后, 用 95%的乙醇在室温下浸泡 3 次, 每次 7 d, 合并提取液, 减压浓缩后得到深褐色提取物(13.5 g)^[8,9]。该提取物除部分直接用于活性测定外, 余者全部混悬于 300 mL 水中, 依次用石油醚(400 mL × 3)、乙酸乙酯(400 mL × 3)、正丁醇(400 mL × 3)萃取。萃取液分别减压浓缩得到石油醚相浸膏(9.2 g)、乙酸乙酯相浸膏(2.0 g)和正丁醇相浸膏(1.2 g)。

1.2.2 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相不同浓度溶液的配制

取侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相少许, 于旋转蒸发器中真空加热蒸干(45℃), 然后用水及适量的二甲基亚砜配制成浓度为 1 g/L 的母液, 供生物活性测定时稀释后使用。

1.2.3 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相抗氧化活性的测定

1.2.3.1 对羟自由基清除率的测定

H₂O₂ 和 Fe²⁺混合发生 Fenton 反应, 生成具有很高反应活性的·OH, 其能被水杨酸有效捕捉并生成有色物质; 但若加入具有·OH 清除作用的物质, 便会与水杨酸竞争, 从而使有色产物生成量减少^[10,11]。本实验以 Smironff 等的方法为基础并加以适当改进, 在 10 mL 的试管中依次加入 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液 2 mL, 不同浓度的提取物样品溶液 2 mL, 6 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 2 mL, 摇匀, 静置 10 min, 再加入 6 mmol/L 的水杨酸溶液 2 mL, 摇匀, 静置 30 min 后于 510 nm 处测其吸光值。

清除率计算公式为: 清除率 $S\% = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$

其中, A₀ 为空白对照, A_i 为含水杨酸时样品液的

吸光值; A_j 为不含水杨酸时样品液的吸光值。

1.2.3.2 对 DPPH·自由基清除率的测定

DPPH·是一种稳定的自由基, 其结构中含有 3 个苯环, 1 个 N 原子有 1 个孤对电子, 其乙醇溶液呈紫色, 在 517 nm 附近有强吸收, 当溶液中加入自由基清除剂时, 孤对电子被配对, 颜色由紫色向黄色变化, 在 517 nm 处的吸光度变小, 而吸光度变小的程度与自由基被清除的程度呈定量关系, 因而可用分光法进行定量分析^[12]。

取 DPPH·0.099 2 g 以无水乙醇定容于 25 mL 容量瓶作为储备液(0.01 mmol/mL), 4℃避光保存。使用时取 2 mL 储备液用无水乙醇定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀备用。向不同试管加入等体积不同浓度的溶剂、提取物样品液, 25℃下恒温反应 30 min 后于 λ = 517 nm 处测定其吸光值。

清除率计算公式为: $S\% = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$

其中, A_i 为样品液和 DPPH·混合液的吸光值, A_j 为样品液和无水乙醇混合液的吸光值, A₀ 为 DPPH·和无水乙醇混合液的吸光值。

1.2.3.3 对超氧阴离子自由基清除率的测定

邻苯三酚在碱性条件下能发生自氧化, 生成有色中间产物(在 325 nm 处有最大吸收)和 O₂^{-·}, 后者对自氧化又起催化作用, 依据有色中间物生成量的多少, 可判断 O₂^{-·}生成量的多少。当有自由基清除剂存在时, 有色产物的生成量减少, 可测定该自由基清除剂的活性。用 10 mmol/L HCl 配制 3 mmol/L 邻苯三酚溶液, 0.2 mol/L Tris 与 0.2 mol/L HCl 配制 Tris-HCl 缓冲溶液(pH8.2)。于各试管中分别先加入不同浓度的提取物样品液、Tris-HCl 缓冲溶液、双蒸水, 于 28℃下恒温反应 25 min。取出试管后立即滴加邻苯三酚(28℃下预热), 用紫外分光光度计测量滴加邻苯三酚后第 100 s 时在 λ = 325 nm 处的吸光值^[13,14]。

清除率计算公式为: 清除率 $S\% = [1 - (A_x - A_{x_0})/(A_0 - A)] \times 100\%$

其中, A_x 为 Tris-HCl、样品液、双蒸水和邻苯三酚混合液的吸光值; A_{x0} 为 Tris-HCl、样品液和双蒸水混合液的吸光值, A₀ 为 Tris-HCl、双蒸水和邻苯三酚混合液的吸光值, A 为 Tris-HCl、双蒸水和 HCl(0.3 mL, 10 mmol/L)混合液的吸光值。

1.2.4 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相的抑菌活性测定

取活化好的菌种, 用无菌水将枯草杆菌、金黄色

葡萄球菌、大肠杆菌和四联微球菌四种陆地菌,用海水将副溶血弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌和沙蚕弧菌 5 种海洋菌,分别制成一定密度($10^8 \sim 10^9$ cfu/mL)的菌悬液。取已灭菌的培养皿,倒入溶化后冷却至 45℃左右的培养基 20 mL,随即快速而轻巧地晃动平皿,待培养基冷却后取 100 μ L 的菌悬液注入培养皿中用涂布棒将其均匀地涂抹在培养基上^[15,16]。参照 Bulet 等^[17]的平板生长抑制法,用无菌玻璃吸管在含菌平板上打直径 3 mm 的孔穴,每孔穴加提取物 10 μ L,平行做 3 组。加样后,枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和四联微球菌置于 37℃培养 24 h,量取抑菌圈直径(扣除所打孔径)并取平均值;副溶血弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏菌和沙蚕弧菌置于 28℃培养 48 h,量取抑菌圈直径(扣除所打孔径)并取平均值。

2 结果与分析

2.1 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相的抗氧化活性

2.1.1 对羟自由基的清除率

侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对羟自由基的清除效果见图 1。由图 1 可见,各样品对羟自由基的清除率均较高,在 50 mg/L 时清除率均达到 50%以上,其中乙醇提取物和正丁醇相的清除率相近(分别为 66.26%和 66.26%),乙酸乙酯相次之(63.84%),石油醚相为 54.43%,均高于相同浓度下合成抗氧化剂 TBHQ(12.00%)和 BHT(8.12%)。说明侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对羟自由基具有极强清除活性。

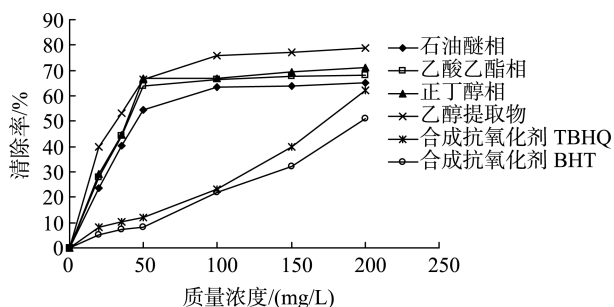


图 1 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相与 TBHQ、BHT 对羟自由基的清除率比较

Fig.1 OH-scavenging capacities of various organic extracts of *Subergorgia suberosa*, TBHQ and BHT

2.1.2 对 DPPH 自由基的清除率

侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对 DPPH

自由基的清除效果见图 2。可见,在相同浓度下各样品对 DPPH 自由基均有一定的清除效果,乙酸乙酯相的清除率明显高于其他两相及乙醇提取物。但与合成抗氧化剂 TBHQ 和 BHT 相比,侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相的清除率明显偏低。

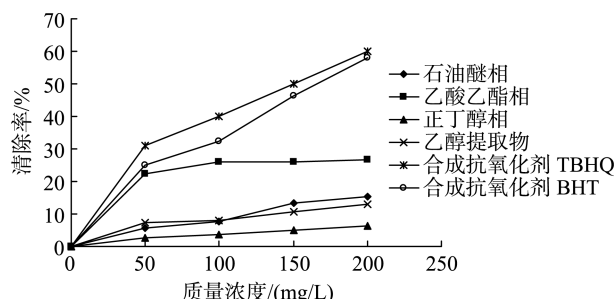


图 2 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各有机相与 TBHQ、BHT 对 DPPH 自由基的清除率比较

Fig.2 DPPH-scavenging capacities of various organic extracts of *Subergorgia suberosa*, TBHQ and BHT

2.1.3 对超氧阴离子自由基的清除率

侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对超氧阴离子自由基的清除效果见图 3。由图 3 可见,侧扁软柳珊瑚乙醇提取物的石油醚相和乙酸乙酯相对超氧阴离子自由基的清除率明显高于正丁醇相和乙醇提取物。在 50 mg/L 时,石油醚相和乙酸乙酯相的清除效果(分别为 22.18%和 23.95%)与合成抗氧化剂 TBHQ(26.67%)相近,但低于合成抗氧化剂 BHT(47.143%)。

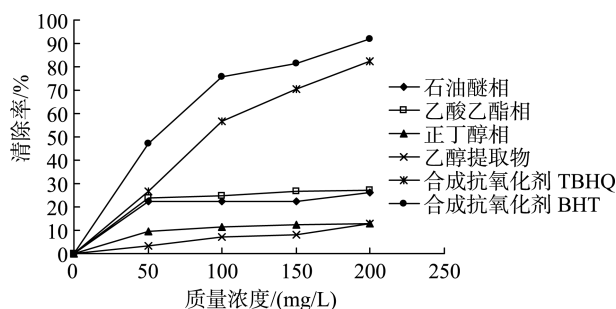


图 3 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各有机相与 TBHQ、BHT 对超氧阴离子自由基的清除率比较

Fig.3 O₂•⁻-scavenging capacities of various organic extracts of *Subergorgia suberosa*, TBHQ and BHT

2.2 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相的抑菌活性

侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对 5 种海洋细菌的抑菌活性见表 1。可见,各样品在 100 g/L

时对鳗弧菌、哈维氏弧菌和溶藻弧菌均有抑菌活性。其中,石油醚相的抑菌活性最强。此外,乙酸乙酯相

在此浓度下对沙蚕弧菌和副溶血弧菌也有微弱的抑菌效果。

表 1 侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及其各萃取相对 5 种海洋细菌的抑菌效果

Tab. 1 Bacteriostatic effects various organic extracts of *Subergorgia suberosa*

	抑菌圈大小(cm)				
	鳗弧菌	哈维氏弧菌	沙蚕弧菌	副溶血弧菌	溶藻弧菌
乙醇提取物	0.90	0.30	—	—	0.50
石油醚相	1.50	1.15	—	—	0.70
乙酸乙酯相	1.55	0.70	0.70	0.50	0.90
正丁醇相	0.75	0.50	—	—	0.30

3 结论

通过浸提法得到侧扁软柳珊瑚的乙醇提取物,再将提取物经过萃取分别得到石油醚相、乙酸乙酯相及正丁醇相浸膏。抗氧化实验结果表明,在 50 μg/mL 浓度下,对羟自由基的清除效果侧扁软柳珊瑚乙醇提取物(66.76%)及其各萃取相(石油醚相 54.43%,乙酸乙酯相 63.84%,正丁醇相 66.26%)均优于相同浓度下合成抗氧化剂 BTH(8.12%)、TBHQ(12%);对超氧阴离子的清除效果石油醚相(22.18%)和乙酸乙酯相(23.95%)与合成抗氧化剂 TBHQ(26.67%)相近,其具体抗氧化活性成分尚有待进一步研究。另外,侧扁软柳珊瑚乙醇提取物及各萃取相对鳗弧菌、哈维氏弧菌和溶藻弧菌均有一定抑菌活性,并且石油醚相的抑菌活性相对优于其他两相及乙醇提取物;乙酸乙酯相对沙蚕弧菌和副溶血弧菌表现出微弱抑菌活性。

参考文献:

[1] 闫素君,刘丽娟,郭万成,等.短足软珊瑚 *Cladiella latissima* 中二萜化合物研究[J].有机化学,2004,24(增刊):374-374.
 [2] 王正镰,许实波,刘清,等.唇软珊瑚胆甾烷的抗炎作用[J].热带海洋,1999,18(2):27-32.
 [3] 姚宗仁,钟惠民.豆荚软珊瑚 *Lobophytum* sp.化学成分的研究[J].青岛科技大学学报,2009,30(2):135-142.
 [4] 黄新苹,朱校斌,邓志威,等.中国南海圆裂短足软珊瑚的甾体成分研究[J].海洋科学,2009,33(6):86-93.
 [5] 张广文,马祥全,闫素君,等.南海短足软珊瑚 *Cladiella* sp.中两个新孕甾醇苷的分离[J].高等学校化学学报,2005,26(1):81-83.

[6] 张翠仙,闫素君,张广文,等.肉质软珊瑚中新的多羟基甾醇的分离[J].高等学校化学学报,2007,28(4):686-688.
 [7] 廖克旺,黄锦秋,刘文珊.侧扁软柳珊瑚中镇静催眠有效成分的提取分离及药理作用观察[J].华南国防医学杂志,1992,2:41-43.
 [8] 钟惠民,王现杰,唐旭丽,等.中国南海软珊瑚 *Simularia* sp.细胞的毒活性成分[J].青岛科技大学学报,2009,30(1):26-30
 [9] 李国强,张艳玲,林文翰.西松烷二萜类海洋活性成分研究进展[J].中国海洋大学学报,2006,36(3):370-376.
 [10] 魏玉西,徐祖洪.褐藻中高分子质量褐藻多酚的抗氧化活性研究[J].中草药,2003,34(4):317-319.
 [11] 魏玉西,于曙光.两种褐藻乙醇提取物的抗氧化活性研究[J].海洋科学,2002,26(9):49-51.
 [12] 董捷,尹策,张红城,等.杏花花粉中苦杏仁苷的抗氧化性研究[J].食品科学,2007,28(8):65-68.
 [13] 郭晓强,颜军,邬晓勇,等.决明子水溶液多糖的纯化及抗氧化活性研究[J].食品科学,2007,28(8):205-208.
 [14] 金宁,刘通讯.山楂原花青素的抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2007,33(1):45-47.
 [15] 沈萍,范秀容.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1999.214-230.
 [16] 郭道森,魏玉西,李丽,等.毛蚶血浆中抗菌蛋白的纯化及抗菌活性研究[J].海洋科学,2005,29(3):25-29.
 [17] Bulet Cociancich S, Dimarcq J, et al. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(36): 24520-24525.

(下转第 29 页)