

# 海洋褐藻羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)中 马尾藻甾醇、岩藻甾醇的分类纯化及抗菌、 抗氧化活性研究\*

孙 瑜 丁国芳 徐银峰

(浙江海洋大学 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心 舟山 316022)

**摘要** 本文评价海洋褐藻羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)中分离纯化的总甾醇、马尾藻甾醇(Saringosterol)和岩藻甾醇(Fucosterol)抗菌和抗氧化活性。马尾藻甾醇和岩藻甾醇化合物采用红外光谱、核磁共振光谱和高分辨质谱确定其结构。实验结果显示,总甾醇含量在 30、60 和 80mg/mL 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和变形链球菌(*S. mutans*)具有抑制作用。马尾藻甾醇和岩藻甾醇对金黄色葡萄球菌和变形链球菌具有高活性,最小抑制浓度范围为 4—32mg/mL。总甾醇还显示出对大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 1924 和 1356 的抗菌作用。而马尾藻甾醇和岩藻甾醇在 4—32mg/mL 浓度范围内体外对大肠杆菌的抗菌作用不明显。马尾藻甾醇和岩藻甾醇对耐药性革兰氏阳性临床分离菌株具有显著的抑菌活性。另外,药理实验结果显示,总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的抗氧化活性与它们清除 DPPH、ABTS、超氧化物和羟基自由基的能力有关。

**关键词** 甾醇;羊栖菜;马尾藻甾醇;岩藻甾醇;抗菌活性;抗氧化活性

**中图分类号** Q946; Q949.9

doi: 10.11693/hyhz20170100016

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)属于圆子纲、墨角藻目、马尾藻科、马尾藻属,是一种广泛分布在中国、韩国和日本沿海的海洋褐藻,在我国北起辽东半岛,南至雷州半岛均有分布。褐藻不仅作为食物,而且作为草药已被人们广泛消费。研究表明,褐藻中含有多种生物活性物质,其中所含的甾醇具有抗菌和抗氧化活性(Ayyad *et al*, 2003)。Kavita 等(2014)报道了从琉璃苣红色海藻提取的 24<sup>Δ5</sup> 甾醇,具有对人类致病细菌的抗菌活性。Cheng 等(2013)研究了来自海洋海绵(*Haliclona crassiloba*)的多羟基甾醇,此多羟基甾醇对一些革兰氏阳性菌株显示抑菌活性,最小抑制浓度(MIC)范围为 4—32μg/mL。此外, Lee 等(2003)报道了从海藻中分离出的一种胆固醇化合物,其抗氧化酶肝细胞溶质超氧化物歧化酶(SOD)过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶

GSH-px 活性分别为 33.9%、21.6%和 39.2%。

传染病在世界范围内引起的发病率和死亡率仍居高不下,抗微生物剂被认为是用于治疗传染病的领先药物。然而,由于抗菌素耐药性的发展、抗药性菌株的出现以及抗性临床分离物的快速全球传播,细菌感染的治疗仍然是一个重要的且具有挑战性的问题(Urakami *et al*, 2014; Banerjee *et al*, 2015)。针对耐药菌的一种潜在替代疗法是使用抗氧化药物。抗氧化药物可以治愈和预防一些由自由基引起的疾病。自由基是在身体中产生的高度反应性化学物质,具有损害细胞、细胞器、DNA、脂质、蛋白质和其他生物分子的潜力,导致癌症、心血管和神经变性疾病。因此,从生物系统中去除自由基对于细胞的可持续性至关重要。抗氧化剂也称为自由基清除剂,可以清除一些自由基(Ahmed *et al*, 2015; Anastácio *et al*,

\* 浙江省自然科学基金项目, LY12C20008 号。孙瑜, 副教授, E-mail: suny@zjou.edu.cn

收稿日期: 2017-01-18, 收修改稿日期: 2017-02-01

2015)。

马尾藻甾醇(Saringosterol)和岩藻甾醇(Fucosterol)是从褐藻中分离纯化的两种甾醇化合物,其结构式见图1。据报道这两种化合物作为药物具有抗动脉粥样硬化、抗肥胖、抗锥虫和抗结核作用(Jung *et al*, 2013; Kim *et al*, 2014; Zhen *et al*, 2015),但马尾藻甾醇和岩藻糖醇的抗菌活性尚未见报道。本文采用经典的抗菌和抗氧化模型对马尾藻甾醇和岩藻甾醇进行抗菌活性和抗氧化活性研究。

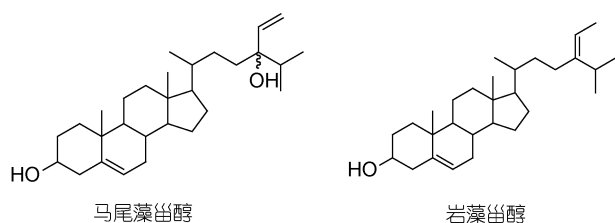


图1 马尾藻甾醇和岩藻甾醇结构

Fig.1 The structure of saringosterol and fucosterol

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)采于浙江省舟山市东港海边。熔点采用毛细管测定。红外光谱仪 FT-IR1730 (Bruker 公司),核磁共振光谱仪 AV-300 (Bruker 公司)。高分辨率质谱仪 MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik 德国)。DPPH (2,2-二苯基-1-苦基肼基)、ABTS (2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、变异链球菌(*S. mutans*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌、甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌、喹诺酮抗性金黄色葡萄球菌、喹诺酮抗性金黄色葡萄球菌购自 Sigma 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 甾醇的分离与纯化

将干燥的褐藻羊栖菜用 95%乙醇回流 1h,重复三次。所得乙醇萃取物过滤,并在真空下浓缩。将混合物用水溶解,依次用正己烷和乙酸乙酯萃取得到粗提物。将正己烷层进行硅胶柱分离,用正己烷-乙酸乙酯(10:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1)和乙酸乙酯-甲醇(4:1, 2:1, 1:1)进行洗脱,得到十个亚级分(sfr): sfr.1 至 sfr.10。将次级分 7 和 8 进行等度半制备 HPLC 分离,采用正己烷-乙酸乙酯(5:1),得到白色固体。经现代分析光谱确定为岩藻甾醇。岩藻甾醇的熔点和光谱数据如下。Mp. 122-124°C; IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3409, 2956, 1641,

1473, 1383, 1052, 1029;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$  0.71(3H, s, H-18), 0.97(3H, d,  $J=6.42$  Hz, H-21), 1.09(3H, s, H-19), 1.60 (3H, d,  $J=6.62$  Hz, H-29), 2.18(1H, m, H-25), 3.59(1H, m, H-3), 5.24(1H, q,  $J=6.81$  Hz, H-28), 5.39(1H, br d,  $J=5.12$  Hz, H-6); 10.15 (1H, s, -OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  145.98(C-24), 140.72(C-5), 120.98(C-6), 115.52(C-28), 72.04(C-3), 57.87(C-14), 56.08(C-17), 49.79(C-9), 43.10(C-13), 42.40(C-4), 40.13(C-12), 37.62(C-1), 37.11(C-10), 36.51(C-20), 35.43(C-22), 34.67(C-25), 32.10(C-8), 31.98(C-2), 31.65(C-7), 28.73(C-16), 25.75(C-23), 25.05(C-15), 22.43(C-27), 22.19(C-26), 21.34(C-11), 20.10(C-19), 19.04(C-21), 13.28(C-29), 11.98 (C-18); ESI-HRMS  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )的计算值: 413.3705, 实测值: 413.3709。综合分析上述数据与文献报道一致(Sheu *et al*, 1997)。

马尾藻甾醇的熔点和光谱数据如下。Mp. 158.6—161.3°C; IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3393, 2941, 1640, 1472, 1380, 1060, 1040;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta$  0.66—1.12 (15H, m,  $(-\text{CH}_3)_5$ ), 1.02—1.73 (20H, m,  $(-\text{CH}_2)_{10}$ ), 2.91-3.45 (6H, m,  $(-\text{CH})_6$ ), 5.30 (1H, q,  $J=6.82\text{Hz}$ , H-28), 5.42 (1H, br d,  $J=5.16\text{Hz}$ , H-6), 10.21 (1H, s, -OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):  $\delta$  145.09, 140.69, 121.88, 115.86, 71.74, 58.32, 56.74, 50.16, 44.03, 42.89, 41.80(C-4), 38.13, 37.83, 36.49, 35.98, 31.95, 31.93, 30.75, 30.12, 27.70, 27.58, 27.04, 22.30, 21.67, 21.20, 19.36, 15.34, 14.68, 13.34; ESI-HRMS  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}^{2+}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )的计算值: 428.3654, 实测值: 428.3647。综合分析上述数据与文献报道一致(Wächter *et al*, 2001)。

### 1.3 体外抗菌活性评价

实验选取金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 4220, 503 和 209), 变异链球菌(*S. mutans* 3065 和 3289)和大肠杆菌(*E. coli* 1924 和 1356)。耐药性临床分离株的菌株是多重耐药金黄色葡萄球菌(MRSA CCARM 3167 和 MRSA CCARM 3506)和喹诺酮抗性金黄色葡萄球菌(QRSA CCARM 3505 和 QRSA CCARM 3519)。从几个诊所住院的各种患者收集临床分离物,遵循双重连续稀释技术(Song *et al*, 2012; Kaur *et al*, 2014),以测试在初步测试(革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌)中总甾醇、马尾藻甾醇、岩藻甾醇和药物对敏感微生物的最小抑制浓度(MIC),得到耐药革兰氏阳性细菌的临床分离株。将溶于二甲基亚砜的总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇加入到培养基(用于变形链球菌的脑心浸液和用于其他细菌的 MüllereHinton 琼脂)中,得到 50—200mg/kg 和 0.5—64mg/mL 的终浓度。将完全抑制微生物生长的测试物质的最低浓度记录

为 MIC(以 mg/mL 表示), 在 37°C 孵育 20h 后读取 MIC 值。得到细菌最终应用量为  $10^5$  CFU/mL。诺氟沙星和氧氟沙星用作阳性药物对照。所有实验进行三次。

#### 1.4 DPPH 自由基清除活性判定

参考 Aktumsek 等(2013)报道的方法测定总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的 DPPH 自由基清除活性。称取 24mg DPPH 溶解在 100mL 甲醇中, 制备得到自由基储备溶液, 置于冰箱备用。另用甲醇稀释 DPPH 储备溶液, 溶液要求在 517nm 处获得约  $0.96 \pm 0.02$  的吸光度。在试管中, 将 DPPH (3mL) 工作溶液与总固醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇(0.5—2.5mg/mL)或标准溶液混合到 100 $\mu$ L。在 517nm 下测试吸光度 30min。通过下式计算抗氧化剂或自由基清除效应的百分比: 抗氧化活性(%)=[(Ac-As)/Ac]×100 其中, Ac 和 As 分别是对照和样品的吸光度。对照组含有 100 $\mu$ L 甲醇代替植物样品。

#### 1.5 ABTS<sup>•+</sup>脱色测定

参考 Re 等(1999)报道的 ABTS<sup>•+</sup>脱色测定马尾藻甾醇和岩藻甾醇的抗氧化作用。取 9.5mL ABTS (7mmol/L)与 245 $\mu$ L 硫酸钾(100mmol/L)反应, 并用蒸馏水定容至 10mL, 制备 ABTS<sup>•+</sup>自由基溶液。溶液遮光室温下保持 18h, 然后用 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4), 735nm 处的吸光度为  $0.65 \pm 0.02$ 。用甲醇中制备总甾醇马尾藻甾醇和岩藻甾醇, 稀释度为 0.4—2.0mg/mL。将样品(10 $\mu$ L)置于试管中, 并与 3.0mL ABTS 自由基溶液充分混合。在 735nm 处记录其吸光度。采用下式计算样品的抗氧化活性百分比: 抗氧化活性(%)=[(Ac-As)/Ac]×100 其中 Ac 和 As 分别是对照和样品的吸光度。通过加入 10 $\mu$ L 甲醇代替样品制备对照组。

#### 1.6 超氧自由基测定

参考 Jin 等(2014)的方法测定总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的超氧自由基清除能力。将样品溶解在不同浓度的蒸馏水中。然后, 将 0.1mL 试样溶液, 1mL 含有 NADH (557 $\mu$ mol/L)的 16mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1mL 含有 PMS (45 $\mu$ mol/L)的 16mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1mL 含有 NBT (108 $\mu$ mol/L)的 16mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)混合。将反应混合物在室温下温育 5min, 并通过分光光度计针对空白样品在 560nm 测吸光度。反应混合物的吸光度降低表明超氧化物阴离子清除活性增加。采用以下方程式计算清除超氧化物阴离子自由基的能力: 超氧化物清除速率(%)=[1- $A_1/A_0$ ]×100%。其中  $A_0$  是没有样品的混合溶液的吸光度;

$A_1$  是与反应溶液混合的测试样品的吸光度。

#### 1.7 羟基自由基清除测定

羟基自由基测定根据 Ghiselli 等(1988)的方法测量。将总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇用 DMSO 配成 0.5—6.0mg/mL。将 0.1mL 样品溶液与 0.6mL 缓冲液[0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)]反应, 0.12mmol/L EDTA 和 2.60mmol/L 脱氧核糖, 0.05mL 2.0mmol/L 抗坏血酸, 0.2mL 0.4mmol/L 硫酸亚铁铵和 0.05mL 的 20mmol/L  $H_2O_2$  加入到反应溶液中。将反应溶液在 37°C 下孵育 15min, 然后加入 1mL 硫代巴比妥酸(1%)和 1mL 三氯乙酸(2.0%)。然后, 混合物在 100°C 下反应 15min, 并用冰冷却。在 530nm 处测吸光度来检测羟基自由基的存在。对照组含有所有没有样品的反应试剂, 并测量为  $A_0$ 。  $A_i$  是样品的结果, 并且  $A_j$  包含所有样品, 用不同毫升磷酸盐缓冲液(20mmol/L pH 7.4, 含有 0.1mmol 氯化铁, 0.1mmol EDTA, 2.8mmol 脱氧核糖)代替磷酸盐缓冲液(20mmol/L pH 7.4) 0.1mL 1mmol Vit C 和 0.5mL 20mmol/L 过氧化氢。通过下式计算羟基自由基清除率: 羟基清除率(%)=[1-( $A_i-A_j$ )/ $A_0$ ]×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 化学分析

总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇通过胆固醇定量法反应显示出阳性反应, 这是甾醇物质的特征反应。通过 IR,  $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 和质谱表征了马尾藻甾醇的化学结构。马尾藻甾醇的 IR 光在  $3393cm^{-1}$  谱带为 -OH, 在  $2941cm^{-1}$  为 -CH<sub>3</sub> 和  $1640cm^{-1}$  为 -C=C-。在  $^1H$ -NMR  $10.21 \times 10^{-6}$  一般作为宽谱带为 -OH 峰, 在  $0.66 \times 10^{-6}$  (3H, s, H-18)和  $1.04 \times 10^{-6}$  (3H, s, H-19)处显示两个 -CH<sub>3</sub> 质子。=CH 质子在 5.42 (1H, br d, H-6)处显示为宽谱带, 在多个峰处显示 3.50 (1H, m, H-3), 这是以羟基甾醇为母核的特征 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -。在  $^{13}C$ -NMR 谱中 145.09(C-24), 140.69(C-5), 42.89(C-13), 36.49(C-10)处观察到马尾藻甾醇的四个 -C-基团。121.88(C-6), 115.86(C-28), 71.74(C-3), 58.32(C-14), 56.74(C-17), 50.16(C-9), 35.98(C-20), 34.67(C-25), 31.93, 在 41.80(C-4), 38.13(C-12), 37.83(C-1), 34.75(C-22), 30.12(C-2), 27.70(C-7), 27.58(C-16), 27.04(C-23), 24.12(C-15), 22.30, 在 21.67(C-27), 21.20(C-26), 19.36(C-19), 15.34(C-21), 14.68(C-29), 13.34(C-18)处为六个 -CH<sub>3</sub>-。

### 2.2 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的抗菌活性

通过在体外用不同菌株的最小抑制浓度(MIC)评

价抗菌活性(Winans *et al*, 1999)。实验结果如表 1 所示, 总甾醇在 30、60 和 80mg/kg 对金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 4220, 503 和 209)和变异链球菌(*S. mutans* 3065 和 3289)显示抑菌活性。马尾藻甾醇和岩藻甾醇在 4—32mg/kg 对金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 4220, 503 和 209)和变异链球菌(*S. mutans* 3065 和 3289)具有高抑菌活性, 但活性低于诺氟沙星和氧氟沙星。总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对革兰氏阴性菌株大肠杆菌

(1924 和 1356)均为显示抑菌活性。

### 2.3 对耐药革兰氏阳性菌株的临床分离株

表 2 显示, 马尾藻甾醇和岩藻甾醇对多种耐药性革兰氏阳性细菌的许多临床分离物的抗菌作用。在 4—32mg/mL 剂量下, 马尾藻甾醇和岩藻甾醇对多重耐药性革兰氏阳性细菌的临床分离物具有高度活性。而且诺氟沙星在 64mg/kg 剂量下对 QRSA 没有抑菌活性。氧氟沙星 64mg/mL 剂量下对 MRSA 没有抑菌活性。

表 1 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇抑制活性  
Tab.1 Inhibitory activity of the total sterols, saringosterol and fucosterol

| 组别          | 剂量<br>(mg/mL) | <i>S. aureus</i> |     |     | <i>S. mutans</i> |      | <i>E. coli</i> |      |
|-------------|---------------|------------------|-----|-----|------------------|------|----------------|------|
|             |               | 4220             | 503 | 209 | 3065             | 3289 | 1924           | 1356 |
| 总甾醇         | 30            | + <sup>a</sup>   | +   | +   | +                | +    | — <sup>b</sup> | —    |
|             | 60            | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 80            | +                | +   | +   | +                | +    | +              | +    |
| 马尾藻甾醇       | 4             | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 8             | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 16            | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 32            | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
| 岩藻甾醇        | 4             | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 8             | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 16            | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
|             | 32            | +                | +   | +   | +                | +    | —              | —    |
| 诺氟沙星(mg/mL) |               | 2                | 2   | 4   | 1                | 1    | 16             | 16   |
| 氧氟沙星(mg/mL) |               | 1                | 1   | 1   | 1                | 1    | >64            | >64  |

注: <sup>a</sup> 显示抑制细菌; <sup>b</sup> 对细菌没有抑制作用。 *S. aureus*: 金黄色葡萄球菌 4220、503 和 209; *S. mutans*: 变异链球菌 3065、3289; *E. coli*: 大肠杆菌 1924、1356

表 2 对多重耐药革兰氏阳性细菌菌株的临床分离物的  
MIC 值

Tab.2 MIC values against clinical isolates of  
multidrug-resistant Gram-positive bacterial strains

| 组别          | 剂量<br>(mg/mL) | MRSA           |      | QRSA |      |
|-------------|---------------|----------------|------|------|------|
|             |               | 3167           | 3506 | 3505 | 3519 |
| 马尾藻甾醇       | 4             | + <sup>a</sup> | +    | +    | +    |
|             | 8             | +              | +    | +    | +    |
|             | 16            | +              | +    | +    | +    |
|             | 32            | +              | +    | +    | +    |
| 岩藻甾醇        | 4             | +              | +    | +    | +    |
|             | 8             | +              | +    | +    | +    |
|             | 16            | +              | +    | +    | +    |
|             | 32            | +              | +    | +    | +    |
| 诺氟沙星(mg/kg) |               | -              | 8    | 4    | >64  |
| 氧氟沙星(mg/kg) |               | -              | >64  | >64  | 1    |

注: <sup>a</sup> 显示抑制细菌。MRSA: 甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 3167 和 3506; QRSA: 喹诺酮抗性金黄色葡萄球菌 3505 和 3519

### 2.4 DPPH 自由基清除活性

产生的若干自由基和氧物质可通过其氧化作用损伤蛋白质、DNA 和脂质等并引发衰老、动脉粥样硬化和癌症等症状。因此, 自由基的去除对于生物系统细胞可持续性而言非常重要。抗氧化剂, 被称为自由基清除剂具有捕获自由基物质的作用(Alam *et al*, 2013)。通过 DPPH 自由基清除试验检测了总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的自由基清除或抗氧化作用。结果如图 2a 所示。结果表明, 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对抑制这些自由基的形成具有显著的效果。总甾醇的清除效果低于马尾藻甾醇和岩藻甾醇。在 2.5mg/mL 的浓度下, 马尾藻甾醇、岩藻甾醇和总甾醇对 DPPH 自由基的清除率分别为 84.7%、81.5% 和 73.2%。

### 2.5 根据 ABTS<sup>•+</sup>部分脱色测定的抗氧化活性

ABTS 自由基测定是适用于亲脂性和亲水性抗氧

化剂, 包括羟基肉桂酸酯, 类胡萝卜素和血浆抗氧化剂的脱色测定(Zhang *et al*, 2013)。通过用过硫酸钾氧化 ABTS 产生  $ABTS^{+}$  形成自由基分子, 再进行还原反应。图 2b 中显示了总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的 ABTS 自由基清除作用, 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇表现出令人满意的 ABTS 自由基清除作用, 其浓度排列总甾醇<岩藻甾醇<马尾藻甾醇。在 2.5mg/kg 的浓度下, 马尾藻甾醇, 岩藻甾醇和总甾醇的清除率分别为 86.9%、82.4%和 70.7%。

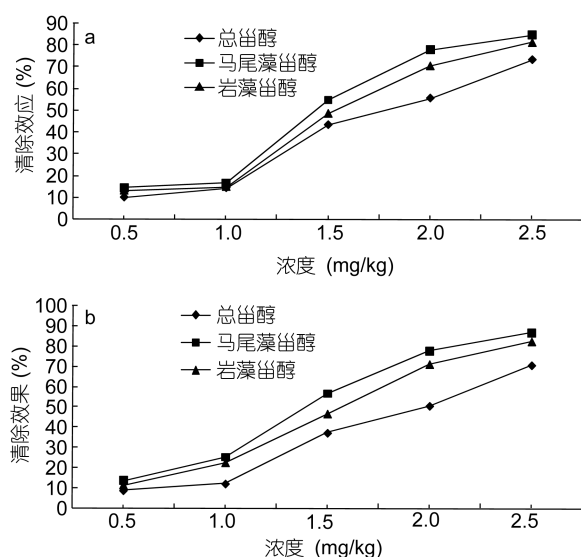


图 2 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对 DPPH 自由基(a)和 ABTS 自由基(b)的清除活性

Fig.2 Scavenging activity of total sterols, saringosterol and fucosterol on DPPH radical (a) and ABTS radical (b)

## 2.6 超氧自由基测定

超氧化物基团是通过许多生物学和光化学反应产生的高毒性物质。超氧自由基可以分解形成单线态氧和羟基(Chen *et al*, 2015)。总甾醇、岩藻甾醇和马尾藻甾醇对超氧化物阴离子的清除效果显示在图 3a 中。总甾醇、岩藻甾醇和马尾藻甾醇表现出具有剂量效应关系的显著清除活性。总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对超氧化物自由基的清除效应为的总甾醇<岩藻甾醇<马尾藻甾醇, 并且在 2.5mg/kg 的浓度下的影响为分别为 60.3%、44.5%和 34.6%。

## 2.7 羟基自由基测定

羟基自由基是反应性较强并且能诱导邻近的双分子分解, 因此消除羟基自由基增强抗氧化能力。羟基容易在酸的存在下 Fe(II)络合物与  $H_2O_2$  的反应产生的双分子的氧化损伤。水杨酸具有吸收-OH 以产生着色材料的能力。添加的羟基自由基清除剂与水杨酸

竞争, 使得着色材料的含量下降。该方法用于评价天然化合物的羟基自由基清除能力(Yang *et al*, 2011; Lapshina *et al*, 2015)。总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的清除效果见图 3b 中。清除羟基自由基的活性是随浓度增加而加强, 且马尾藻甾醇和岩藻甾醇的清除效果总是远低于总甾醇。在 2.5mg/kg 的浓度下, 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对羟基自由基的清除率分别为 85.8%、65.6%和 45.3%。

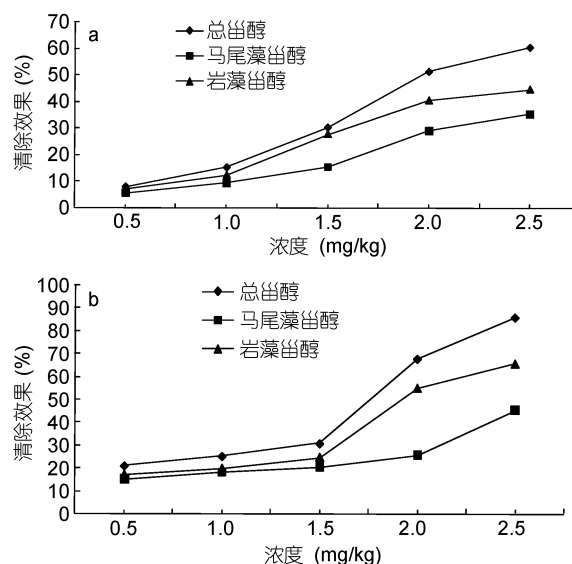


图 3 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对超氧化物基团(a)和羟基自由基(b)的清除作用

Fig.3 Scavenging effects of total sterols, saringosterol and fucosterol on superoxide radicals (a) and hydroxyl radicals (b)

## 3 结论

总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌均具有抑菌活性。马尾藻甾醇和岩藻甾醇 MIC 为 4—32mg/mL 对于金黄色葡萄球菌和变异链球菌具有高活性。而总甾醇对革兰氏阴性菌株大肠杆菌(1924 和 1356)显示出抗菌作用。但是, 马尾藻甾醇和岩藻甾醇在 4-32mg/mL 体外对革兰氏阴性菌株没有表现出抗菌作用。马尾藻甾醇和岩藻甾醇对多重耐药性革兰氏阳性细菌的临床分离物具有高度活性。另外, DPPH 自由基、ABTS 自由基、超氧化物自由基和羟基自由基测定中的所有数据表明, 总甾醇、马尾藻甾醇和岩藻甾醇的抗氧化活性与它们清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、超氧自由基和羟基的能力有关。

## 参 考 文 献

Ahmed D, Khan M M, Saeed R, 2015. Comparative analysis of

- phenolics, flavonoids, and antioxidant and antibacterial potential of methanolic, hexanic and aqueous extracts from *Adiantum caudatum* leaves. *Antioxidants*, 4(2): 394—409
- Aktumsek A, Zengin G, Guler G O *et al*, 2013. Screening for *in vitro* antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol*, 49(11): 2914—2920
- Alam M N, Bristi N J, Rafiquzzaman M, 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 21(2): 143—152
- Anastácio A, Carvalho I S, 2015. Development of a beverage benchtop prototype based on sweet potato peels: optimization of antioxidant activity by a mixture design. *Int J Food Sci Nutr*, 67(5): 496—506
- Ayyad S E, Sowellim S Z, El-Hosini M S *et al*, 2003. The structural determination of a new steroidal metabolite from the brown alga *Sargassum asperifolium*. *Z Naturforsch C*, 58(5—6): 333—336
- Banerjee K, Banerjee S, Das S *et al*, 2015. Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. *J Colloid Interface Sci*, 453: 48—59
- Chen Y L, Mao W J, Tao H W *et al*, 2015. Preparation and characterization of a novel extracellular polysaccharide with antioxidant activity, from the mangrove-associated fungus *Fusarium oxysporum*. *Mar Biotechnol (NY)*, 17(2): 219—228
- Cheng Z B, Xiao H, Fan C Q *et al*, 2013. Bioactive polyhydroxylated sterols from the marine sponge *Haliclona crassiloba*. *Steroids*, 78(14): 1353—1358
- Ghiselli A, Nardini M, Baldi A *et al*, 1988. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J Agric Food Chem*, 46(2): 361—367
- Jin W H, Zhang W J, Wang J, *et al*, 2014. A study of neuroprotective and antioxidant activities of heteropolysaccharides from six *Sargassum* species. *Int J Biol Macromol*, 67: 336—342
- Jung H A, Jin S E, Ahn B R *et al*, 2013. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*, 59: 199—206
- Kaur G, Gupta P, Harjai K *et al*, 2014. Synthesis of new thiobarbituric acid derived spiroheterobicyclic compounds and their antimicrobial activity. *Drug Dev Res*, 75(3): 202—210
- Kavita K, Singh V K, Jha B, 2014. 24-Branched  $\Delta^5$  sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microbiol Res*, 169(4): 301—306
- Kim K B W R, Kim M J, Ahn D H, 2014. Lipase inhibitory activity of chlorophyll *a*, isofucosterol and saringosterol isolated from chloroform fraction of *Sargassum thunbergii*. *Nat Prod Res*, 28(16): 1310—1312
- Lapshina E A, Zamaraeva M, Cheshchevik V T *et al*, 2015. Cranberry flavonoids prevent toxic rat liver mitochondrial damage *in vivo* and scavenge free radicals *in vitro*. *Cell Biochem Funct*, 33(4): 202—210
- Lee S, Lee Y S, Jung S H *et al*, 2003. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch Pharm Res*, 26(9): 719—722
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al*, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10): 1231—1237
- Sheu J H, Wang G H, Sung P J *et al*, 1997. Cytotoxic sterols from the formosan brown alga *Turbinaria ornata*. *Planta Med*, 63(6): 571—572
- Song M X, Zheng C J, Deng X Q *et al*, 2012. Synthesis and bioactivity evaluation of rhodanine derivatives as potential anti-bacterial agents. *Eur J Med Chem*, 54: 403—412
- Urakami T, Hamada Y, Magarihuchi H *et al*, 2014. Enterococcal endocarditis complicated with ruptured infected-intracranial aneurysm: with pharmacokinetic-pharmacodynamic documentation in proof of the successful antimicrobial treatment. *J Infect Chemother*, 20(12): 810—813
- Wächter G A, Franzblau S G, Montenegro G *et al*, 2001. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *J Nat Prod*, 64(11): 1463—1466
- Winans K A, King D S, Rao V R *et al*, 1999. A Chemically synthesized version of the insect antibacterial glycopeptide, dipteracin, disrupts bacterial membrane integrity. *Biochemistry*, 38(36): 11700—11710
- Yang Y L, Liu D, Wu J *et al*, 2011. *In vitro* antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. *Int J Biol Macromol*, 49(5): 1031—1037
- Zhang X, Chen H X, Zhang N *et al*, 2013. Extrusion treatment for improved physicochemical and antioxidant properties of high-molecular weight polysaccharides isolated from coarse tea. *Food Res Int*, 53(2): 726—731
- Zhen X H, Quan Y C, Jiang H Y *et al*, 2015. Fucosterol, a sterol extracted from *Sargassum fusiforme*, shows antidepressant and anticonvulsant effects. *Eur J Pharmacol*, 768: 131—138

## SARINGOSTEROL AND FUCOSTEROL, TWO STEROLS FROM *SARGASSUM FUSIFORME* WITH ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES

SUN Yu, DING Guo-Fang, XU Yin-Feng

(Zhejiang Ocean University, Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Biomedical Products, Zhoushan 316022, China)

**Abstract** In the present study, we evaluated the antibacterial and antioxidant properties of saringosterol and fucosterol extracted from *Sargassum fusiforme* against Gram-positive and Gram-negative bacteria using DPPH radical scavenging assay, ABTS<sup>•+</sup> radical decolorization assay, superoxide radical assay and hydroxyl radical assay. Total sterols showed inhibitory effects against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* at 30 and 60mg/mL. Saringosterol and fucosterol were highly active against *S. aureus* and *S. mutans* with minimum inhibitory concentrations ranging 4—32mg/mL. Total sterols also displayed antibacterial effects against *Escherichia coli* strains 1924 and 1356. However, saringosterol and fucosterol did not exhibit antibacterial effects against *E. coli* at 4—32mg/mL in vitro. Additionally, saringosterol and fucosterol were highly active against multidrug-resistant Gram-positive clinical isolates. The antioxidant activities of total sterols, saringosterol and fucosterol were related to their ability to scavenge DPPH, ABTS, superoxide and hydroxyl radicals, indicated that the antioxidant activities of the total sterols, saringosterol and fucosterol were related to their ability to scavenge DPPH radical, ABTS radical, superoxide radical, and hydroxyl radical.

**Key words** sterols; *Sargassum fusiforme*; saringosterol; fucosterol; antibacterial property; antioxidant property