

石花菜醇提物抑菌活性和抗氧化活性研究

孙 杰, 王艳杰, 朱路英, 杨润亚
(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘 要: 本实验研究了石花菜醇提物的抑菌活性和抗氧化活性。采用生长速率法测定各相提取物的抑菌活性, 结果表明石花菜含有丰富的抗病原真菌资源; 采用水杨酸法和邻苯三酚法分别测定各相提取物对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力, 结果表明石花菜有较强的抗氧化能力。同时对各相提取物进行了系统的化学成分定性检测, 结果表明石花菜的生物活性可能与其中含有的海藻多糖、黄酮、甾体皂甙、内酯及香豆素等活性成分有关。
关键词: 石花菜; 抗氧化活性; 抑菌活性; 活性成分

Study on Antifungal and Antioxidant Activities of Alcohol Extract of *Gelidium amansii*

SUN Jie, WANG Yan-jie, ZHU Lu-ying, YANG Run-ya
(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The aim of this paper was to research the antifungal and antioxidant activities of *Gelidium amansii*. According to the results of mycelial growth of plant pathogenic fungi, *Gelidium amansii* had resourceful antifungal activities sources. The *Gelidium amansii* showed scavenging capacity to hydroxyl free radical generated by Fenton reaction and to superoxide anion generated by a pyrogallol autoxidation system. The active constituents might be seaweed polysaccharides, flavonoids, steroidal saponins, lactones and coumarins etc.

Key words *Gelidium amansii*; antifungal activities; antioxidant activity; active constituents

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0053-04

受独特的生态环境的影响, 大多数海藻能产生一些很有特色的代谢产物, 在抗病毒、抗菌、抗肿瘤方面显示出很大的潜力^[1]。由于植物源农药不易残留、不会引起生物富集现象, 因此成为目前农药研究领域的热点^[2], 最近十年人们对陆地植物的抑菌活性成分的化学结构、生物活性进行了深入的研究。但是国内鲜有关于海藻抑菌活性方面的报道。

在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种自由基, 它会损害人体内的细胞、破坏免疫系统及导致感染与各种退化病变, 因而使人体健康出问题。随着近年来人们对自身健康的关注, 绿色食品备受青睐, 因而研究开发天然食品抗氧化剂以取代化学合成的食品抗氧化剂已成为必然趋势^[3]。

石花菜(*Gelidium amansii*)别名牛毛菜、鸡毛菜、海草、草珊瑚、海冬菜等, 为红藻门石花菜科石花菜属植物, 分布于渤海、黄海、台湾北部的沿海地区^[4-6]。古代医药典籍记载, 石花菜味甘咸, 性寒, 全藻入药能清热解毒、缓泻, 有润肺化痰、滋阴降火、消热消炎、利便利尿之功效, 可用于治疗支气管炎、肠炎、

痔疮、便秘、肾盂肾炎等症^[7]。现代研究表明, 石花菜的粘性多糖-琼胶(脂)可用于医药、食品和作细菌培养基^[6]。此外, 石花菜还可食用, 可作酱菜、拌菜, 还可熬制成胶状用于制作凉粉、冻粉等^[8]。

迄今, 有关石花菜的生物活性的研究报道不多, 本实验对石花菜的成分进行提取和萃取, 研究五相提取物对七种植物病原真菌的抑菌活性和两种常见自由基的清除作用, 并通过进一步学成分的定性检测确定提取物中的可能的活性成分, 旨在为阐明石花菜的药用价值, 为进开发利用该天然药材提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试海藻

新鲜石花菜(*Gelidium amansii*)2007年3月份采集于烟台月亮湾海域, 由鲁东大学生命科学学院张萍教授鉴定。

1.1.2 供试菌种

收稿日期: 2007-07-25

作者简介: 孙杰(1974-), 女, 讲师, 博士研究生, 主要从事海洋活性物质研究。

苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、苹果褐腐病菌(*Sclerotinia fructigena*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* sp. *Niveum*)、玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata*)，七种菌种均由西北农林科技大学植物病理实验室提供。

1.2 仪器与试剂

RE-52A 型旋转蒸发仪、SHB-IV 型循环式多用真空泵、UV-480 型双光束紫外可见分光光度计、DELTA 320 型 PH 计、LS-B50L 型立式高压蒸汽灭菌器、YXS 型数显恒温水浴锅、超净工作台；DHG-9143BS-III 型电热恒温鼓风干燥箱、LBH-280 型生化培养箱。

甲醇、乙醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、丙酮、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、水杨酸、硫酸亚铁、三氯化铁、氯化钠、白明胶、氨水、碘、碘化钾、氯化汞、醋酸、无水醋酸铅、醋酸镁、 α -萘酚、浓硫酸、镁粉、3,5-二硝基苯甲酸、盐酸羟胺、氢氧化钾，均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 石花菜乙醇提取物的制备

海藻样品采集后，用干净的海水洗去表面的泥沙和附着物，阴干并粉碎，用 95% 乙醇室温浸泡提取三次，每次 72h，提取液合并后经旋转蒸发仪减压浓缩(温度<50℃)除去溶剂。浓缩物混悬于蒸馏水中，依次用石油醚、乙酸乙酯、氯仿和正丁醇萃取，每种溶剂萃取三次后合并，减压浓缩后得五相提取物。

1.3.2 石花菜乙醇提取物化学成分检测

采用试管法^[9]对各相提取物中可能的化学成分进行定性检测。将适量的提取物溶解于 30ml 95% 的乙醇中，如溶液颜色深需用活性炭脱色^[10]，混合均匀，即可用于化学成分预试。取提取液 1~2ml 于试管中，加检测试剂观察反应现象，正反应现象见表 1。

1.3.3 研究抑菌活性

采用生长速率法^[11]评价各相提取物对病原菌菌丝生长抑制效果。带提取物培养基的制备：分别称取 0.15g 五相提取物，用 5ml 丙酮溶解，将其倒入 150ml PDA 培养基中，混合均匀制成提取物浓度为 1mg/1ml 的培养基。将含提取物的培养基在无菌条件下倾注于干热灭菌的培养皿中，使培养基的厚度为 2~2.5cm，旋转平板，冷凝。往培养皿中接种直径为 7mm 的菌饼，另以加 5ml 不含提取物的纯丙酮的培养基为对照(CK)，也各接入直径为 7mm 的菌饼，对照与处理各重复三次。28℃ 恒温培养箱中培养 60h 后，采用十字交叉法测量菌落直径，取其平均值，按下列公式计算菌丝生长抑菌率。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{\text{CK净生长量} - \text{处理净生长量}}{\text{CK净生长量}} \times 100$$

式中，净生长量 = 三次重复平均值 - 菌饼直径(7mm)。

1.3.4 抗氧化活性研究

1.3.4.1 清除超氧阴离子自由基分析方法

利用邻苯三酚自氧化反应^[3,12]测定石花菜醇提取物对超氧阴离子自由基的清除作用。邻苯三酚在弱碱性环境中自身氧化分解产生 $O_2^{\cdot-}$ 的反应为：邻苯三酚 $\xrightarrow{\text{pH8.2}}$ $O_2^{\cdot-}$ + 其他产物。该体系常用于测定 SOD 或类 SOD 活性物质对 $O_2^{\cdot-}$ 的歧化活性。随着反应的进行， $O_2^{\cdot-}$ 在体系中会不断积累，导致反应液在 425nm 波长处有较强的光吸收。因此在上述波长处测定含样品反应液的光度，并与空白液比较便可得出样品清除 $O_2^{\cdot-}$ 的作用能力。

取 0.05mol/L pH8.2 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液 4.5ml，置于 25℃ 水浴中预热 20min，分别加入 1ml 样品和 0.4ml 25mmol/L 的邻苯三酚溶液，混合后于 25℃ 水浴中反应 5min，再加入 8mol/L HCl 溶液 1ml 终止反应。以 Tris-HCl 缓冲溶液作为参比，空白对照组以丙酮代替样品，每个处理重复三次。在 425nm 处

表 1 石花菜化学成分检测项目
Table 1 Assaying items of chemical constituents in *Gelidium amansii*

序号	检测项目	检测实验	正反应现象
1	酚性成分	三氯化铁试验	显绿、兰绿或暗紫色
2	鞣质	氯化钠白明胶试验	有混浊或白色沉淀
		醋酸铅实验	有絮状沉淀为可水解鞣质，无沉淀为缩合鞣质
3	生物碱	碘化汞钾实验	有白色或浅黄色沉淀
		碘化碘钾实验	有棕色沉淀
4	糖、多糖及甙类	α -萘酚试验	出现紫红色环
5	甾体皂甙	氯仿-浓硫酸试验	氯仿层显红或蓝色，硫酸层有绿色荧光
6	黄酮及其甙类	盐酸-镁粉实验	显红色
7	蒽酮及其甙类	醋酸镁实验	显红色
8	强心甙	3,5-二硝基苯甲酸试验	显红色或紫色
9	内酯、香豆素及其甙	异羟肟酸铁试验	显橙红色或紫色
10	挥发油	挥发油实验	有油状残渣并有特异香味，加热后油状物减少或消失

测定吸光度，取其平均值，按下列公式计算清除率。

超氧阴离子自由基清除率(%) = $\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$

式中，A₀ 为空白的平均吸光度；A₁ 为样品的平均吸光度。

1.3.4.2 清除羟基自由基分析方法

利用水杨酸法^[13-14]测定石花菜醇提物对羟基自由基的清除作用。产生·OH 自由基的反应体系是Fenton 反应：H₂O₂+Fe²⁺→OH⁻+·OH+Fe³⁺。自由基一般存活时间比较短而且活性高，而水杨酸能有效捕捉·OH 自由基且能产生在510nm 处有强吸收的有色化合物，添加水杨酸后立即测定吸光度记为A₀。若在水杨酸的体系中添加具有清除·OH 自由基作用的物质，就可以降低甚至完全清除·OH 自由基，而使有色物质的浓度降低，在此条件下测定吸光度A₁，则可以测定活性物质对·OH 自由基的清除效率。

加入9mmol/L FeSO₄ 1ml、9mmol/L 的水杨酸-乙醇1ml、样品1ml，再加入8.8mmol/L 的H₂O₂ 1ml，放入37℃水浴中反应0.5h。以双蒸水作为参比，空白对照组以丙酮代替样品，每个处理重复三次。在510nm 处测定吸光度，取其平均值，按下列公式计算清除率。

对羟基自由基的清除率(%) = $\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$

式中，A₀ 为空白的平均吸光度；A₁ 为样品的平均吸光度。

2 结果与分析

2.1 化学成分预试

反应现象如为阳性用“+”表示，为阴性用“-”表示。检测实验结果见表2。

从表2 中可以看出，石花菜提取物中可能含有鞣质

(包括缩合鞣质和可水解鞣质)、生物碱、糖类、甾体皂甙、黄酮及其甙类、内酯、香豆素及其甙及挥发油。这些化学成分都具有一定的生理和药理活性。据报道，海藻多糖有抑菌、抗氧化活性^[15]；黄酮类化合物不仅具有较强的防腐作用，而且又具有较强的抑菌抗氧化作用，同时还具有一定的药理活性^[16-17]；甾体皂甙具有止血、免疫调节、抗肿瘤、降胆固醇、止咳、祛痰、平喘活性及对心血管系统的作用^[18]。另外内酯、香豆素也具有一定的抑菌活性^[19]。

此外，五相提取物中所含有的物质均不完全相同，这可能和它们各自的生物活性强弱有一定的关系。

2.2 抑菌活性研究

经过筛选实验，石花菜醇提取物对七种真菌菌丝生长所表现的抑制活性结果见表3。

表3 石花菜醇提取物对植物病原真菌的抑制结果(%)
Table 3 Results of antifungal activities of alcohol extract of *Gelidium amansii* (%)

菌株	石油醚相	乙酸乙酯相	氯仿相	正丁醇相	水相
苹果炭疽病菌	-	26.89	-	-	-
苹果褐腐病菌	15.73	100.00	-	41.57	43.82
番茄灰霉病菌	95.10	79.72	65.04	100.00	-
番茄早疫病菌	30.45	68.48	5.91	45.45	38.64
小麦赤霉病菌	-	-	-	-	-
西瓜枯萎病菌	62.00	66.00	5.50	61.00	21.50
玉米弯孢病菌	39.68	67.86	5.16	20.63	38.89

注：“-”表示促进作用。

从表3 中可以看出，三相提取物有不同程度的抑菌活性，最高抑菌率为100%，这表明石花菜中存在广泛的抗病原真菌资源。其中乙酸乙酯相对五种植物病原真菌有抑制活性，尤其是对苹果褐腐病菌则是完全抑制了它的生长。石油醚相和正丁醇相的抗菌谱是一样的，只是对番茄灰霉病菌和西瓜枯萎病菌有明显的抑制活性。氯仿相和水相无明显的抑菌活性，原因可能是在提取的过程中，由于理化条件控制失当造成了提取物的失活。

表2 石花菜化学成分检测结果
Table 2 Assay result of chemical constituents in *Gelidium amansii*

序号	检测项目	石油醚相	乙酸乙酯相	氯仿相	正丁醇相	水相
1	酚性成分	-	-	-	-	-
2	鞣质	+	+	+	+	+
		可水解鞣质	缩合鞣质	缩合鞣质	缩合鞣质	可水解鞣质
3	生物碱	+	-	-	-	-
4	糖、多糖及甙类	+	+	+	+	+
5	甾体皂甙	+	+	-	-	-
6	黄酮及其甙类	+	-	-	-	-
7	萘醌及其甙类	-	-	-	-	-
8	强心甙	-	-	-	-	-
9	内酯、香豆素及其甙	+	+	-	-	-
10	挥发油	+	+	+	-	-

五相提取物的抑菌活性主要表现在对番茄灰霉病菌和西瓜枯萎病菌上,石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相对其均有抑制活性。番茄早疫病菌和玉米弯孢病菌只对乙酸乙酯提取物敏感,而苹果炭疽病菌对所有的提取物都不太敏感。另外,有些提取物对病原真菌的抑菌率为负值,表明它们之间不是拮抗作用而是协同作用,这可能是因为提取物中含有某些营养成分(譬如糖类)能促进病原真菌的生长,但具体机制尚不清楚。

2.3 抗氧化活性研究

2.3.1 清除超氧阴离子自由基实验研究

石花菜醇提取物对超氧阴离子自由基的清除结果见表4。

表4 石花菜醇提取物对超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除率(%)
Table 4 Scavenging capacity of alcohol extract of *Gelidium amansii* to hydroxyl free radical and superoxide anion radical(%)

自由基	石油醚相	乙酸乙酯相	氯仿相	正丁醇相	水相
超氧阴离子自由基	4.61	30.26	13.65	14.64	14.31
羟基自由基	33.56	37.76	33.40	33.70	27.93

注:清除率>0就表示有清除自由基活性,即具有抗氧化能力。

从表4中可以看出,石花菜提取物对超氧阴离子自由基均有一定的清除作用,即有一定的抗氧化能力。其中,乙酸乙酯相的抗氧化最强,而石油醚相的清除作用最弱,其余三相对超氧阴离子自由基的清除能力相仿。

2.3.2 清除羟基自由基实验研究

从表4中可以发现,石花菜对羟基自由基有一定的清除作用,相应的抗氧化能力也较强。特别是乙酸乙酯相的清除作用最强,水相的最弱,而其他三相对羟基自由基的清除能力相仿。并且石花菜提取物对羟基自由基的清除能力显著高于对超氧阴离子自由基的清除能力,这是因为同一种物质对于不同的自由基有不同的清除能力。

3 讨论

对石花菜的抑菌活性研究表明,乙酸乙酯相的抑菌活性最强,不仅抗菌谱比较广泛而且抑菌能力也较强,甚至可以达到完全抑制病原菌的生长。可以作为植物源杀菌剂进一步研究。石油醚相和正丁醇相对番茄灰霉病菌和西瓜枯萎病菌有明显的抑制活性。对石花菜的抗氧化能力相关的实验表明石花菜的五相提取物均有一定的抗氧化能力。其中,乙酸乙酯相对两种自由基的清除作用都是最强的。结合石花菜五相提取物的化学成分检测结果,可以发现石花菜的抑菌活性和抗氧化活性可能

与其中的海藻多糖、黄酮类物质及其甙类、甾体皂甙、内酯、香豆素等活性成分有关,具体的作用机制还有待于进一步研究。

石花菜醇提取物的乙酸乙酯相有明显的抑菌活性和抗氧化能力,对五种植物内生真菌均有抑制活性,对超氧阴离子自由基和羟基自由基都有一定的清除作用。但在化学成分预试时并没有发现特殊之处,分析原因可能在于:一是只是做了化学成分的定性检测,并没有对检测到的活性成分作定量研究,乙酸乙酯相中含有的活性成分含量可能比其他相高;二是实验设计的检测项目是有限的,乙酸乙酯相中可能还有其他的成分与抑菌活性和抗氧化活性有关,这些都有待于作进一步的研究。作者所在实验室在本研究基础上,采用生物活性追踪法,正在对石花菜醇提取物的乙酸乙酯相进行具体化学成分的分离、纯化和鉴定工作。

参考文献:

- [1] 于德泉,吴毓林.海藻天然产物研究进展[M].北京:化学工业出版社,2005:348-352.
- [2] 吴文君,胡兆农.我国植物源害虫控制剂的研究与开发[J].农药,1995,34(2):6-8.
- [3] 李平,王艳辉,马润宇.山茱萸多糖PFCAIII抗氧化性能研究[J].北京化工大学学报,2003,30(3):35-38.
- [4] 姚振生.药用植物学[M].北京:中国中医药出版社,2003:165.
- [5] 郑汉臣,蔡少青,等.药用植物学与生药学[M].北京:人民卫生出版社,2003:194.
- [6] 张义浩,赵盛龙,吴常文,等.海洋生物——藻类[M].杭州:浙江大学出版社,2002:22.
- [7] 石花菜清热解暑[J].糖尿病新世界,2006(3):37.
- [8] 郭本功.海上时蔬石花菜[J].中国烹饪,2004.
- [9] 徐任生,陈仲良.中草药有效成分提取与分离[M].上海:上海科学技术出版社,1983:9-19.
- [10] 黄涛.有机化学试验教程[M].北京:高等教育出版社,2003:48.
- [11] 杨润亚,程亮,刘珂.南蛇藤果内生真菌的抑菌活性研究[J].鲁东大学学报:自然科学版,2006,22(3):228-231.
- [12] XU Li, LI Hong-mei, HUANG Yi-bing, et al. A study on anti-oxidative activity of soybean peptides with linoleic acid peroxidation systems[J]. Chem Res Chinese U, 2006, 22(2): 205-208.
- [13] DENG W G, FANG X W, WU J L. Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron[J]. Rad Phys Chem, 1997, 50(3): 271-276.
- [14] 秦慧民,朱思明,于淑娟.橙皮苷及铜配合物的抑菌抗氧化活性研究[J].食品科技,2006(6):81-83.
- [15] 张翼,李晓明,王斌贵.海藻生物活性物质研究的回顾与展望[J].科技前沿与学术讨论,2005(10):56-60.
- [16] 孙德梅.金银花叶提取物的抗氧化活性和抑菌作用研究[J].河南科学,2000,20(5):32-34.
- [17] 戴玉锦,冯玲,卢明.柚皮提取物的抗氧化性及抑菌作用研究[J].江苏农业科学,2007(1):178-180.
- [18] 丁怡.天然甾体皂甙研究进展[J].中国新药杂志,2000,8(9):91-92.
- [19] 安利,李晓明,高锦明,等.乙酰穿心莲内酯的制备及其抑菌活性和化感作用比较研究[J].西北植物学报,2006,26(9):1905-1910.