

Antioxidant Activities of Fucosterol Extract from *Sargassum fusiforme*

Lin Zhao, Wei Wang, Yanbin Lu*

Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou Zhejiang
Email: luyanbin@zjgsu.edu.cn

Received: Nov. 25th, 2017; accepted: Dec. 11th, 2017; published: Dec. 18th, 2017

Abstract

The antioxidant activity of fucosterol extract was assessed through the determination of ·DPPH, ·O₂⁻ and ·OH radical scavenging rate and compared with VC and BHT. The results show that fucosterol extract from *Sargassum fusiforme* has good anti-oxidant activity in the concentration range of 20 - 200 µg/mL.

Keywords

Sargassum fusiforme, Fucosterol, Antioxidant Activity

羊栖菜岩藻甾醇提取物的抗氧化生物活性研究

赵琳, 王伟, 卢延斌*

浙江工商大学海洋食品研究院, 浙江 杭州
Email: luyanbin@zjgsu.edu.cn

收稿日期: 2017年11月25日; 录用日期: 2017年12月11日; 发布日期: 2017年12月18日

摘要

研究了羊栖菜岩藻甾醇提取物的抗氧化生物活性。实验以VC和BHT作为阳性对照, 分别对三种物质的总还原力、·DPPH自由基、·O₂⁻自由基以及·OH自由基进行了测定。结果表明: 在20~200 µg/mL的实验浓度范围内, 羊栖菜岩藻甾醇提取物表现出较好的抗氧化活性。

*通讯作者。

关键词

羊栖菜, 岩藻甾醇, 抗氧化活性

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)隶属褐藻门马尾藻科, 是一种暖温带 - 亚热带性海藻, 适宜生长于海水透明度较高、营养盐量丰富的海域。在我国, 北至辽东半岛, 南至闽粤沿海, 其均有分布, 其中尤以浙闽海域为盛; 在日本、韩国以及朝鲜部分海域亦有分布[1] [2] [3]。抗氧化剂在日常生活中的应用愈发广泛, 人工合成的抗氧化剂所导致的副作用日益凸显, 天然抗氧化剂因其绿色、安全的优点而亟待开发。据相关文献报道, 岩藻甾醇具有较强的抗氧化性[4]。本实验通过总还原力、·DPPH 自由基清除率、·O₂⁻ 自由基清除率以及·OH 自由基清除率对岩藻甾醇提取物的抗氧化活性进行初步探索, 为后期其他天然抗氧化剂的研究开发提供一定的理论依据[5] [6]。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

新鲜羊栖菜购买于浙江省温州市洞头县, 查阅《中国药典》相关规定, 将羊栖菜湿样用清水冲洗, 以去除泥沙, 切碎, 置于 55°C 真空烘箱中恒温烘干至恒重, 然后研制成粉末状, 密封, 在避光低温条件下储藏备用。·DPPH、VC、BHT、·O₂⁻、·OH 购于阿拉丁试剂公司。其它化学试剂均购自杭州汇谱化工有限公司。

2.2. 仪器

Milli-Q 超纯水装置, 美国 MILLIPORE 公司; Evolution 60S 紫外可见光分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司; iMARK 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

2.3. 实验方法

2.3.1. 羊栖菜岩藻甾醇粗提物的制备

称量约 150 g 的羊栖菜干粉, 以甲醇 - 二氯甲烷(1:1, v/v)进行热回流提取, 回流液经自然冷却后于高速冷冻离心机中以 5000 rpm 离心 10 min (室温), 取上清液后旋转蒸发, 获得羊栖菜岩藻甾醇粗提物 5.86 g, 将岩藻甾醇提取物样品以 95% 乙醇进行溶解, 配制成浓度分别为 20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL、100 μg/mL、150 μg/mL、200 μg/mL 的样品溶液。

2.3.2. 总还原力的测定

物质的总还原力是其潜在抗氧化性的标志。抗氧化剂因自身的还原能力而给出电子从而实现自由基的清除, 总还原力越强, 抗氧化性越强。因此通过总还原力的测定可以说明其抗氧化活性的强弱。岩藻甾醇提取物总还原力的测定参考相关文献[7]并稍作改动, 具体实验操作如下: 取各浓度样品溶液 0.5 mL, 向其中分别加入 0.2 mol/L PBS 缓冲液(pH = 6.6)和 1% K₃Fe(CN)₆ 各 1.25 mL, 待其混合均匀后, 于 50°C

恒温水浴锅中反应 20 min。取出后，加入 1.25 mL 10% 的三氯乙酸，混匀后以 1000 rpm 离心 10 min。取上清液 2.5 mL，并加入 2.5 mL 95% 乙醇以及 1 mL 0.1% 的 FeCl_3 ，混匀后测定其在 700 nm 下的吸光度。以 VC、BHT 重复上述实验作为阳性对照。为减小误差，各浓度样品均平行测定 3 次，取平均值。样品吸光度至越大，表明其总还原力越强。

2.3.3. ·DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 是以氮为中心的自由基，性质非常稳定，自身呈紫色，其在 517 nm 下有强烈的吸收。当待测物具有降低烷基自由基、过氧化自由基、羟基自由基及切断脂质过氧化反应等能力时，表明该待测物也具有清除·DPPH 自由基能力。样品中氢与·DPPH 相结合即·DPPH 自由基中孤电子被配对时，其颜色由紫色逐渐变为黄色，直至反应结束，相应地，其在 517 nm 处的吸光度也逐步降低。因此可以通过吸光度的测定检验物质的清除·DPPH 自由基的能力，进而为该物质的抗氧化能力给出参考[8]。

准确量取 1 mL 1×10^{-4} mol/mL ·DPPH 乙醇溶液，向其中加入 1 mL 样品溶液，混匀，氮气保护下，于暗处反应 40 min 后，用 95% 乙醇做参比液，测定反应体系在 517 nm 处的吸光度 A_i ；同时测定 517 nm 处 1 mL ·DPPH 溶液与等体积 95% 乙醇混合液的吸光度 A_c 及 1 mL 岩藻甾醇样品溶液与等体积乙醇 95% 混合液的吸光度 A_j 。以 VC、BHT 重复上述实验作为阳性对照。各浓度岩藻甾醇提取物样品溶液均平行测定 3 次，·DPPH 自由基清除率的计算公式如下：

$$\cdot\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_c} \right] \times 100\% \quad (1)$$

其中：

A_c —1 mL DPPH 溶液加 1 mL 乙醇的吸光度；

A_j —1 mL 样品溶液加 1 mL 乙醇的吸光度；

A_i —1 mL 样品溶液加 1 mL DPPH 的吸光度。

2.3.4. ·O₂⁻ 自由基清除能力的测定

超氧阴离子(·O₂⁻)是氧类自由基的基础，具有转化成其他自由基的能力。作为机体内存活时间最久的自由基，超氧阴离子自由基可以引发自由基链式反应，从而生成活性相对更强的自由基。由于超氧阴离子自由基具有较强的扩散性及靶向性，从而对机体造成多种伤害：钝化机体内 SOD 酶及含-SH 的酶；氧化机体内抗坏血酸等。因此对·O₂⁻ 自由基的有效清除将极大地降低氧自由基的产生量[9]。

实验原理：邻苯三酚自氧化法。具体操作如下：将 4.5 mL 0.05 mol/L Tris-HCl (pH = 8.2) 于 25°C 恒温水浴中预热 20 min 后，分别向其中加入 1 mL 岩藻甾醇提取物样品溶液和 0.4 mL 25 nmol/L 邻苯三酚溶液，混匀并于 25°C 水浴中准确反应 5 min，立即向其中加入 2 滴 8 mol/L 的 HCl 以终止反应。在波长 320 nm 处，测定反应体系的吸光度 A_i ；另在预热 20 min 的 Tris-HCl (pH = 8.2) 中加入 1 mL 样品溶液和 0.4 mL 95% 乙醇，混匀后于 25°C 水浴中准确反应 5 min 后，于 320 nm 测其吸光度 A_j ；在预热 20 min Tris-HCl (pH = 8.2) 中加入 1 mL 乙醇和 0.4 mL 25 nmol/L 邻苯三酚混匀后于 25°C 水浴中准确反应 5 min，作为对照，于 320 nm 测其吸光度 A_c 。以 VC、BHT 重复上述实验作为阳性对照。岩藻甾醇提取物·O₂⁻ 自由基清除率的计算公式如下：

$$\cdot\text{O}_2\text{自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_c} \right] \times 100\% \quad (2)$$

其中：

A_i —样品溶液加邻苯三酚溶液的吸光度；

A_j —样品溶液加乙醇的吸光度；

A_c —邻苯三酚溶液加乙醇的吸光度。

2.3.5. ·OH 自由基清除能力的测定

羟自由基(·OH)是机体内最为活泼的自由基,其可以通过解聚或聚合蛋白质、裂解核酸及脂类等促使细胞及组织发生病变,进而对机体造成巨大伤害。清除·OH 自由基可以有效地预防早衰及心血管疾病等[10]。

实验原理: Fe^{2+} 与 H_2O_2 发生反应会产生·OH,其可以被水杨酸捕捉并产生有色物质,此有色物质在 510 nm 处有最大吸收。具体实验步骤为:取 2 mmol/L $FeSO_4$ 及 6 mmol/L H_2O_2 溶液各 25 mL,充分混匀后,向其中加入 6 mmol/L 水杨酸 75 mL,取 1 mL 混合液,加入 1 mL 95%乙醇,将其于 36.5°C 的恒温水浴锅中反应 10 min 后于波长 510 nm 下测吸光度 A_0 ;取混合液 1 mL,加入 1 mL 待测样品溶液,于 36.5°C 的恒温水浴锅中准确反应 10 min 后在波长 510 nm 下测吸光度 A_x 。以 VC、BHT 重复上述实验作为阳性对照。样品的·OH 自由基清除率计算公式如下:

$$\cdot OH \text{ 自由基清除率}(\%) = (A_0 - A_x) / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

其中:

A_0 —空白对照的吸光度;

A_x —加入样品溶液后测得的吸光度。

3. 结果与分析

3.1. 总还原力的测定

VC、BHT、岩藻甾醇提取物的总还原力测定结果如图 1 所示。实验所测浓度范围内,三者均具有一

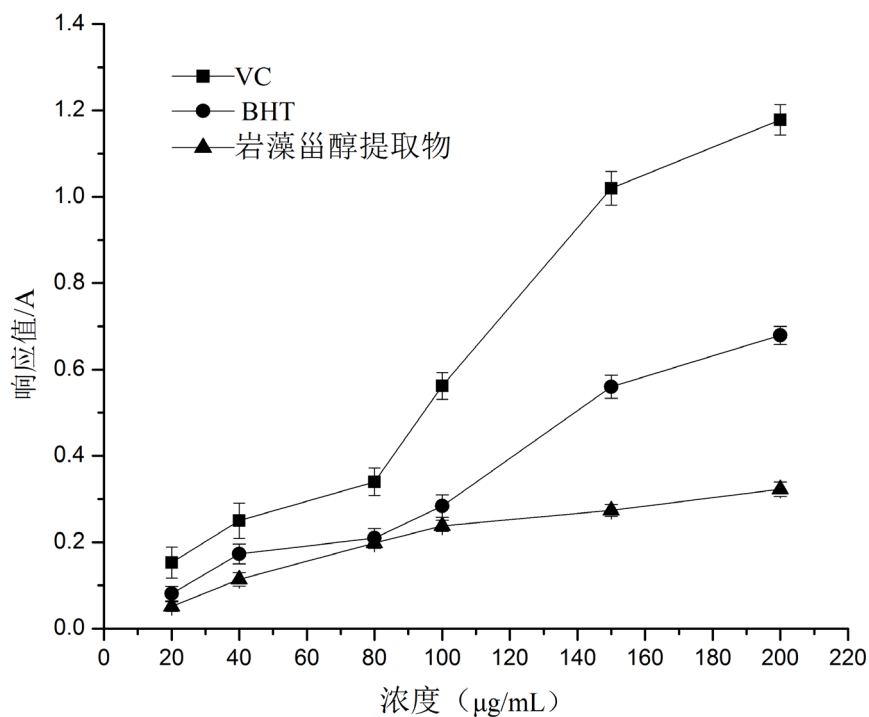


Figure 1. Reducing power of VC, BHT and fucosterol extract

图 1. VC、BHT、岩藻甾醇提取物的总还原力

定的还原能力,且三者的还原能力与各自浓度呈正相关。其中,在样品浓度低于 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,三者的还原能力相差不大,响应值均在 0.3 以内;在浓度在 40~80 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,VC 的还原能力迅速提高;80 $\mu\text{g/mL}$ 以后,三者之间还原能力差距越来越大,基本呈现倍数关系。综合三者相比较,岩藻甾醇提取物的还原能力较低,VC 的还原能力明显强于 BHT 和岩藻甾醇提取物。

3.2. $\cdot\text{DPPH}$ 自由基清除能力的测定

VC、BHT、岩藻甾醇提取物的 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基清除能力测定结果如图 2 所示。VC、BHT、岩藻甾醇提取物在实验浓度范围内均表现出较强的 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基清除能力,且清除能力与各自的浓度均呈正相关。其中,VC 的 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基清除能力明显强于岩藻甾醇提取物及 BHT。当浓度在 20~60 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,岩藻甾醇提取物的清除能力最弱,但当浓度超过 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,随着浓度的增加,岩藻甾醇提取物的清除率上升幅度明显快于 BHT;当浓度在 60~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,岩藻甾醇提取物的清除率均高于 BHT,但当浓度超过 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,其清除率增幅逐渐趋于平缓而 BHT 的清除率增幅逐渐增大;当浓度在 150~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,岩藻甾醇提取物与 BHT 的 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基清除能力基本持平。

3.3. $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基清除能力的测定

VC、BHT、岩藻甾醇提取物的 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基清除能力测定结果如图 3 所示。VC、BHT、岩藻甾醇提取物在实验所测浓度范围内表现出较强的 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基清除能力,且清除能力与各自的浓度均呈正相关。其中,当浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,岩藻甾醇提取物的清除率为 6.27%,VC 与 BHT 的清除率分别为 12.06% 和 10.67%;当浓度增加到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,岩藻甾醇提取物的清除率达到 53.57%,而 VC 与 BHT 的清除率分别达到 83.62% 及 81.20%。

3.4. $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力的测定

VC、BHT、岩藻甾醇提取物的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力测定结果如图 4 所示。VC、BHT、岩藻甾醇提

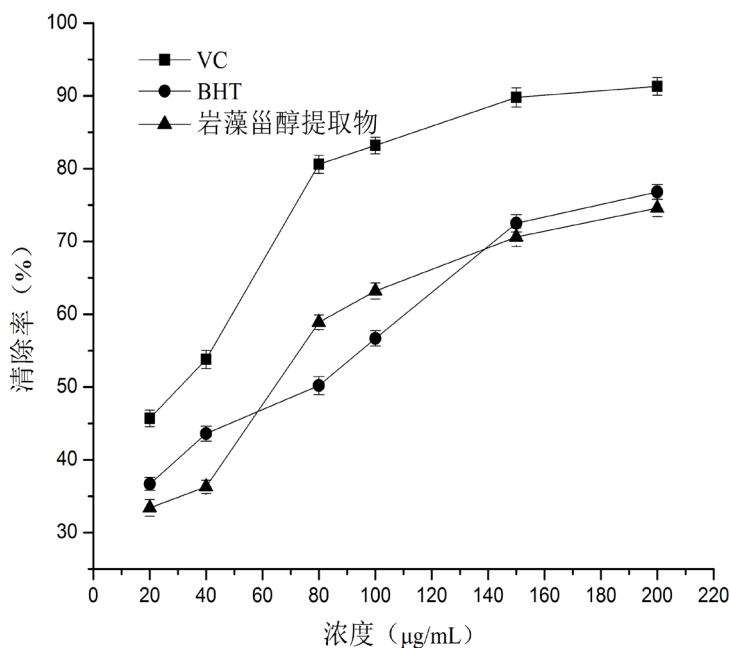


Figure 2. Scavenging activities of VC, BHT and fucosterol extract on $\cdot\text{DPPH}$
图 2. VC、BHT、岩藻甾醇提取物的 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基清除能力

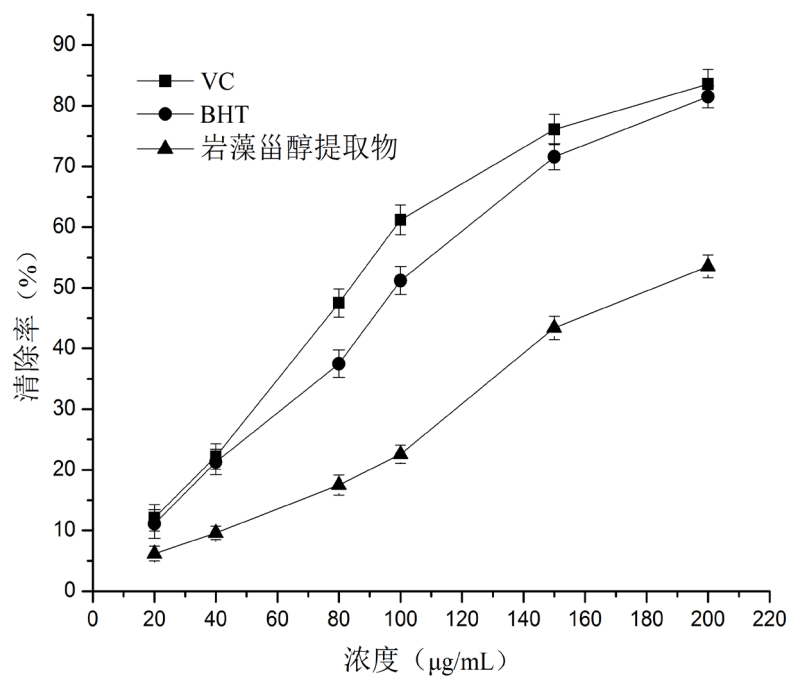


Figure 3. Scavenging activities of VC, BHT, and fucosterol extract on $\cdot\text{O}_2^-$

图 3. VC、BHT、岩藻甾醇提取物的 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基清除能力

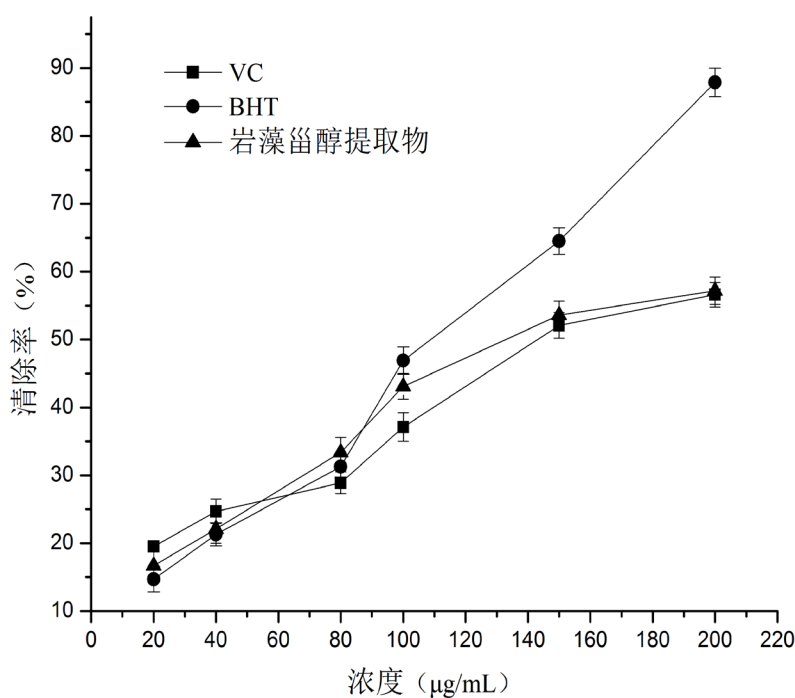


Figure 4. Scavenging activities of VC, BHT and fucosterol extract on $\cdot\text{OH}$

图 4. VC、BHT、岩藻甾醇提取物的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力

取物在所测浓度范围内据具有清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的作用，且清除能力与各自的浓度均呈正相关。当浓度低于 $40 \mu\text{g/mL}$ 时，三者的清除能力相差不大，均在 30% 以内；当浓度在 $40\sim 80 \mu\text{g/mL}$ 范围内，随着浓度的

增加, BHT 和岩藻甾醇提取物的清除能力增幅快于 VC; 当浓度超过 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, BHT 的清除能力上升越来越快, 而岩藻甾醇提取物和 VC 的清除率增幅相对逐渐趋于平缓; 当浓度达到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, BHT 的·OH 自由基清除率达到 87.96%, 岩藻甾醇提取物与 VC 的·OH 自由基清除率分别为 57.85% 和 56.33%。

4. 结论

本文对羊栖菜岩藻甾醇提取物进行系列的体外抗氧化生物活性试验。在 20~200 $\mu\text{g/mL}$ 的实验所测浓度范围内, 分别对总还原力、·DPPH 自由基清除率、·O₂ 自由基清除率以及·OH 自由基清除率进行测定, 并与 VC、BHT 两种抗氧化剂进行对比。结果表明: VC 的总还原力最强、BHT 次之, 而岩藻甾醇提取物相对较弱; 岩藻甾醇提取物的·DPPH 自由基清除率较强, 在浓度为 60~140 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 其清除率甚至超过了 BHT; 岩藻甾醇提取物的·O₂ 自由基清除能力虽弱于 VC 和 BHT, 但当浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其清除率亦达到 53.5%; 与 VC 相比, 岩藻甾醇提取物的·OH 自由基清除能力较强。综上所述, 羊栖菜中岩藻甾醇提取物具有较好的抗氧化活性。

基金项目

浙江省自然科学基金项目(LY15C200004)。

参考文献 (References)

- [1] 李波, 许时婴. 羊栖菜的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2003(3): 23-25.
- [2] 许忠能, 王朝晖, 孙立. 羊栖菜药用价值的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(11): 876-878.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版, 一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [4] 谢何杰, 叶慧娴, 沈婷, 等. 羊栖菜化学成分和药理成分的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2014(3): 487-491.
- [5] 周静. 天然抗氧化物质的提取、分离及活性研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学理学院, 2008.
- [6] 秦卫东. 天然抗氧化剂研究进展[J]. 中国食品添加剂, 1998(4): 15-19.
- [7] Oyaizu, M. (1986) Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307-315.
- [8] 严建树, 冯彤, 黄小丹, 等. 芹菜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究[J], 西北农业科技大学学报, 2005, 33(1): 32-36.
- [9] 焦杨, 段小群, 黄仁彬. 玉郎伞提取物对超氧阴离子自由基和羟自由基的抑制和清除作用[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(1): 22-23.
- [10] 王永宁, 石玉平, 郭珍, 等. 沙枣花中黄酮类化合物对羟基自由基的清除研究[J]. 青海医学院学报, 2003, 24(4): 281-283.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org