

裂盖马鞍菌甲醇提取物清除自由基活性的研究

周忠波,胡建伟,杜红梅,徐卿棚

(塔里木大学 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

摘要:采用 DPPH 法、水杨酸法、邻苯三酚自氧化法分别测定裂盖马鞍菌甲醇提取物清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧自由基的能力。结果表明,在实验条件下,裂盖马鞍菌甲醇提取物对超氧阴离子、羟自由基、DPPH 自由基均有不同程度的抑制作用,最高清除活性分别达 72.72%、54.90%、92.08%。因此裂盖马鞍菌甲醇提取物具有一定的体外抗氧化活性。

关键词:裂盖马鞍菌;自由基;抗氧化作用

中图分类号:S646.7

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2007)06-0282-03

Study on Free Radical Scavenging Activity of Methanol Extract from *Helvella leucopus* Pers.

ZHOU Zhong-bo, HU Jian-wei, DU Hong-mei and XU Qing-peng

(Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological
Resources in Tarim Basin, Tarim University, Alar Xinjiang 843300, China)

Abstract: The methods of DPPH, salicylic acid and pyrogallol auto-oxidation were used to assay the scavenging quality of DPPH free radical, hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide free radical ($\cdot\text{O}_2^-$) in the methanol extract of *Helvella leucopus* Pers. in this article. The extract showed good scavenging effect on DPPH $\cdot$, $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$ under the condition of experiment, and the highest free radical scavenging rate of different free radical is 72.72%, 54.90%, 92.08%. So the methanol extract of *H. leucopus* Pers. showed a certain extent antioxidant effect *in vitro*.

Key words: *Helvella leucopus* Pers.; Free radical; Antioxidation

裂盖马鞍菌 (*Helvella leucopus* Pers., *Helvella abipes* Peck.) 俗名巴楚蘑菇、木耳蘑菇^[1], 分布于河北、甘肃、新疆等地, 新疆产区每年都有人大量采集和食用^[2]。裂盖马鞍菌子实体中的蛋白质、多糖及人体必需氨基酸含量高于平菇、香菇及黑木耳等, 表现出较好的开发前景^[3]。近年来, 关于裂盖马鞍菌的营养成分及生物学特性的研究有零星报道, 但对其抗氧化活性的研究尚未见到。因此, 本文就其抗氧化活性作了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 材料 裂盖马鞍菌子实体于 2004 年 4 月 20 日~5 月 10 日采自新疆阿拉尔地区。经鉴定为裂盖马鞍菌 (*Helvella leucopus* Pers.)。

1.1.2 仪器 SartoriusBS210S 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司); 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); DHG-9101-2SA 型电热恒温鼓风干燥箱(北京凯维丰科技发展有限责任公司); ZP-200 振荡器(江苏太仓市实验设备厂); 超纯水仪(美国 Millipore 公司); T6-紫外可见分光光度计(北京普析通用有限公司); centrifuge5415D 型离

收稿日期:2007-05-14 修回日期:2007-06-15

基金项目:新疆维吾尔自治区教委资助项目(2005-14); 新疆生产建设兵团项目(2006GG27); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题基金资助项目(BR0705)。

作者简介:周忠波(1978-), 男, 讲师, 硕士。从事真菌化学成分与药理学研究。Tel:0997-4788328, E-mail:zzb7855@sohu.com

心机(德国艾本德股份公司(Eppendorf AG))。植物组织粉碎机。

1.1.3 试剂 二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)(Sigma公司);维生素C、维生素E;0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.2,内含2 mmol/L EDTA)、邻苯三酚(60 mmol/L)、甲醇、乙醇、盐酸、 H_2O_2 、 $FeSO_4$ 、水杨酸等均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 将裂盖马鞍菌阴干,用植物组织粉碎机粉碎,置索氏提取器于70℃下甲醇回流提取8 h,浓缩提取液,挥干溶剂,置4℃冰箱备用。

1.2.2 抗氧化性实验 以下各组实验各做3次平行,取均值。

(1)样品对DPPH自由基的清除实验 DPPH溶液的配制:准确称取7.88 mg DPPH,用无水乙醇溶解并定容于100 mL容量瓶中,DPPH浓度为 2×10^{-4} mol/L,避光保存(0~4℃)。

将样品粉末用甲醇配成10 mg/mL溶液,倍比稀释为5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL溶液。分别取样品溶液2 mL与 2×10^{-4} mol/L DPPH溶液2 mL均匀混合,在黑暗中放置30 min,以甲醇为空白在525 nm处测定其吸光度A,并以下式计算其清除率:

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中, A_c :2 mL甲醇加2 mL DPPH溶液的吸光度; A_i :2 mL待测液加2 mL DPPH溶液的吸光度; A_j :2 mL待测液加2 mL甲醇的吸光度。

按照上面公式计算清除率,清除率越大抗氧化能力越强。

(2)样品对羟自由基的清除实验 参照陈留勇^[4]等改动的Smirnoff(1989)的水杨酸法,并略作改动。利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生羟自由基,即: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + H_2O + Fe^{3+}$ 。再在体系中加入水杨酸捕捉羟自由基并产生有色物质,该物质在510 nm处有最大吸收。用该吸光度值来表示羟自由基的含量。反应体系中含有8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL,9 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL,9 mmol/L水杨酸-乙醇1 mL,待测溶液1 mL,其中 H_2O_2 是最后加入并启动整个反应。37℃反应0.5 h后,12 000 r/min离心6 min,然后以甲醇作参比,在510 nm下测定吸光度。考虑待测溶液本身吸光度的不同,以9 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL,9 mmol/L水杨酸-乙醇1 mL,待测溶液1 mL和

甲醇1 mL作为待测溶液的本底吸收值。清除率计算公式为:

$$\text{清除率} = (A_0 - (A_x - A_{x_0})) / A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 为空白对照液的吸光度, A_x 为加入待测溶液后的吸光度, A_{x_0} 为待测溶液的本底吸收值。

(3)样品对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除实验 采用邻苯三酚自氧化法测定。在试管中按表加入缓冲液和双氧水,于25℃恒温20 min后加入25℃预热过的邻苯三酚(对照管用10 mmol/L盐酸代替),迅速摇匀,立即倾入比色杯中,在波长325 nm下每30 s测定一次吸光度值 A_0 。并计算抑制率。抑制率(I%)计算公式为:

$$I\% = [1 - (A_3 - A_1) / (A_1 - A_2)] \times 100$$

式中, A_1 :不含样品的吸光度值; A_2 :不含样品和邻苯三酚的吸光度值; A_3 :含有样品的吸光度值; A_4 :含样品,但不含邻苯三酚的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 样品对DPPH·的清除作用及 IC_{50} 的计算

计算其清除率,结果见表1。

表1 样品对DPPH自由基的清除作用

Table 1 The scavenging quality of DPPH free radical

编号 Number	浓度/(mg/mL) Consistency	清除率/% Scavenging rate	相对标准偏差 RSD
1	10	88.29	1.13
2	5	89.64	1.14
3	2.5	73.61	2.23
4	1.25	41.65	3.52
5	0.625	20.15	3.23

由表1可见,裂盖马鞍菌甲醇提取物对DPPH自由基有较强的清除能力,且在一定浓度范围内,清除能力与样品浓度呈正相关。在浓度为5 mg/mL时清除能力最强,达89.64%。

IC_{50} 的计算根据半数效量概率单位法^[5]进行。以浓度的对数为横坐标,相应浓度抑制率的概率单位(probit)为纵坐标,求出直线回归方程为: $P = 5.16 + 0.45[\log_{10}(\text{Dose})]$,根据方程计算 IC_{50} 值为1.53 mg/mL。 IC_{50} 范围为0.73~2.50 mg/mL。

将样品在同浓度下与维生素C和维生素E清除DPPH自由基能力做比较,结果见表2。

由表2可见,相同浓度下(0.10 mg/mL),裂盖马鞍菌甲醇提取物对DPPH自由基的清除能力强于维生素E,但比维生素C弱。

表 2 不同抗氧化剂清除 DPPH 自由基作用的比较

Table 2 The scavenging quality of different antioxidant on DPPH free radical

样品 Sample	浓度 /(mg/mL) Consistency	清除率/% Scavenging rate	相对标准偏差 RSD
裂盖马鞍菌甲醇提取物 Methanol extract of <i>H. leucopus</i> Pers.	0.10	6.23	1.23
维生素 C vC	0.10	93.33	0.91
维生素 E vE	0.10	1.95	1.73

表 3 样品对羟自由基的清除作用

Table 3 The scavenging quality of hydroxyl free radical

编号 Number	浓度/(mg/mL) Consistency	清除率/% Scavenging rate	相对标准偏差 RSD
1	10	27.36	1.51
2	5	20.26	2.23
3	2.5	33.90	1.42
4	1.25	32.61	0.97
5	0.625	12.91	1.19

2.2 样品对羟自由基的清除能力

由表 3 可见,裂盖马鞍菌甲醇提取物对羟自由基有一定的清除能力,在浓度为 2.5 mg/mL 时清除能力最强,达 33.90%。

表 4 样品对超氧阴离子自由基的清除作用

Table 4 The scavenging quality of superoxide free radical

编号 Number	浓度/(mg/mL) Consistency	清除率/% Scavenging rate	相对标准偏差 RSD
1	10	69.18	0.98
2	5	82.64	0.86
3	2.5	48.05	1.15
4	1.25	38.49	2.17
5	0.625	9.69	1.81

2.3 样品对超氧阴离子自由基的清除能力

由表 4 可见,裂盖马鞍菌甲醇提取物对超氧阴离子自由基有较强的清除能力,在一定浓度下清除效果与样品浓度呈正相关,且在样品浓度为 5 mg/mL 时清除能力最强,达 82.64%。

3 讨论

3.1 裂盖马鞍菌甲醇提取物对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基都有一定清除能

力。在一定浓度范围内,裂盖马鞍菌甲醇提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除效果与浓度呈正相关,而对羟自由基的清除效果与浓度无线性关系,且在浓度为 2.5 mg/mL 时清除能力最强,达 33.90%。

3.2 现有的研究报道认为,糖类、活性肽、活性蛋白质、维生素 C、黄酮类化合物等都是优良的抗氧化剂^[6],而根据本文的试验结果,裂盖马鞍菌甲醇提取物具有一定的清除自由基能力,且对羟自由基的清除效果与浓度无线性关系,而对超氧自由基和 DPPH 自由基的清除效果在一定浓度范围内呈正相关,因而可初步推断对不同自由基起作用的可能为不同成分,或是多种成分综合作用的结果,具体原因尚需进一步研究。

3.3 塔里木盆地环境条件独特,裂盖马鞍菌资源丰富易得,但对其开发力度不够,技术水平低下,没有产生其应有的经济效益。以往对裂盖马鞍菌活性成分的研究仅限于多糖方面,对其他化学成分的相关研究未见报道。本文的试验结果表明,裂盖马鞍菌甲醇提取物具有一定的体外抗氧化能力,但是何种成分起到抗氧化作用尚在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 1999. 604.
- [2] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京:科学出版社,1998. 670.
- [3] 朱铭菱,薛泉宏,和文祥,等. 巴楚蘑菇研究(I)营养成分[J]. 西北农业学报,1999,8(3):77~80.
- [4] 陈留勇,孟宪军,贾薇,等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基提高免疫活性研究[J]. 食品科学,2004, 25(2):167~170.
- [5] 杨树勤主编. 中国医学百科全书—医学统计学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985. 197~202.
- [6] 侯至孝. 自由基相关疾病及抗氧化中药研究[J]. 天津药学,1996,8(1):18~21.

作者：[周忠波](#)，[胡建伟](#)，[杜红梅](#)，[徐卿棚](#)，[ZHOU Zhong-bo](#)，[HU Jian-wei](#)，[DU Hong-mei](#)，[XU Qing-peng](#)

作者单位：[塔里木大学, 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室, 新疆阿拉尔, 843300](#)

刊名：[西北农业学报](#) 

英文刊名：[ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)

年，卷(期)：2007, 16(6)

被引用次数：7次

参考文献(6条)

1. [卵晓岚](#) [中国大型真菌](#) 1999
2. [卵晓岚](#) [中国经济真菌](#) 1998
3. [朱铭莪](#), [薛泉宏](#), 和文祥 [巴楚蘑菇研究 I. 营养成分](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 1999(3)
4. [陈留勇](#), [孟宪军](#), [贾薇](#), [孔秋莲](#), [郑玉生](#), [章丽丽](#) [黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究](#)[期刊论文]-[食品科学](#) 2004(2)
5. [杨树勤](#) [中国医学百科全书-医学统计学](#) 1985
6. [侯至孝](#) [自由基相关疾病及抗氧化中药研究](#) 1996(01)

本文读者也读过(10条)

1. [李朝阳](#), [石进校](#), [粟银](#), [唐伟](#) [箭叶淫羊藿叶醇提物对自由基的清除作用](#)[期刊论文]-[华中科技大学学报\(自然科学版\)](#) 2003, 31(9)
2. [甄攀](#), [梁惠花](#), [王治宝](#), [张万明](#), [王书华](#), [张利民](#), [ZHENG Pan](#), [LIANG Hui-hua](#), [WANG Zhi-bao](#), [ZHANG Wan-ming](#), [WANG Shu-hua](#), [ZHANG Li-min](#) [吴茱萸炮制品中总黄酮的含量及其清除羟自由基的作用研究](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2005, 27(9)
3. [张彩云](#), [李忠建](#), [曾光](#), [孙舒明](#), [胡磊朋](#) [酶解蛋白质饲料工艺参数的研究](#)[期刊论文]-[兽药与饲料添加剂](#) 2006, 11(2)
4. [贾小燕](#), [闫素清](#), [柴保臣](#), [朱明君](#), [JIA Xiao-yan](#), [YAN Su-qing](#), [CHAI Bao-chen](#), [ZHU Ming-jun](#) [槲皮素-钼配合物对超氧阴离子和羟自由基的清除作用](#)[期刊论文]-[华西药学杂志](#) 2008, 23(1)
5. [赵珊珊](#), [干信](#), [ZHAO Shan-shan](#), [GAN Xin](#) [共生菌发酵法酶解魔芋飞粉制备支链氨基酸寡肽](#)[期刊论文]-[化学与生物工程](#) 2006, 23(6)
6. [杨婷婷](#), [朱蓓薇](#), [董秀萍](#), [李跃](#), [Yang Tingting](#), [Zhu Beiwei](#), [Dong Xiuping](#), [Li Yue](#) [复合法制备河蟹蛋白水解液工艺条件的研究](#)[期刊论文]-[食品与发酵工业](#) 2006, 32(4)
7. [张一江](#), [曹文红](#), [毕春波](#), [Zhang Yijiang](#), [Cao Wenhong](#), [Bi Chunbo](#) [海湾扇贝酶解产物清除自由基活性的研究](#)[期刊论文]-[食品与发酵工业](#) 2008, 34(4)
8. [焦扬](#), [李彩霞](#), [胡丽杰](#), [李鹏](#), [张勇](#) [唐古特白刺提取物抗氧化作用的研究](#)[期刊论文]-[食品工业科技](#) 2006(5)
9. [黄凌](#), [黎继烈](#), [杨杰](#), [崔培梧](#), [文蓉](#), [HUANG Ling](#), [LI Jilie](#), [YANG Jie](#), [CUI Pei-wu](#), [WEN Rong](#) [宽叶缙草醚酯提取物体外抗氧化活性研究](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2009, 20(9)
10. [白红进](#), [周忠波](#), [杜红梅](#), [徐卿棚](#), [BAI Hong-jin](#), [ZHOU Zhong-bo](#), [Du Hong-mei](#), [XU Qing-peng](#) [黑果枸杞叶片甲醇提取物清除自由基活性的研究](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2008, 19(2)

引证文献(7条)

1. [冯涛](#), [阎婷婷](#), [阎国荣](#), [彭立新](#) [红花提取物清除自由基能力的初步研究](#)[期刊论文]-[天津农学院学报](#) 2010(01)
2. [冯涛](#), [阎婷婷](#), [阎国荣](#), [彭立新](#) [沙枣提取物清除自由基能力的研究](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2010(08)

3. [周忠波, 曾红, 付金鹏, 张利莉](#) [裂盖马鞍菌粗多糖清除自由基活性研究](#)[期刊论文]-[食用菌学报](#) 2009(04)
4. [滕立平, 曾红, 周忠波](#) [裂盖马鞍菌粗多糖体内抗氧化活性研究](#)[期刊论文]-[食用菌学报](#) 2013(03)
5. [韩冰, 李全宏](#) [花生多糖的提取工艺优化及抗氧化活性](#)[期刊论文]-[食品研究与开发](#) 2010(12)
6. [马茜, 慕家琪, 张自萍](#) [贺兰山紫蘑体氧化活性的初步研究](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2013(03)
7. [宋翼行](#) [蛹虫草醇溶蛋白分离纯化与生理活性的研究](#)[学位论文]硕士 2011

引用本文格式: [周忠波, 胡建伟, 杜红梅, 徐卿棚, ZHOU Zhong-bo, HU Jian-wei, DU Hong-mei, XU Qing-peng](#) [裂盖马鞍菌甲醇提取物清除自由基活性的研究](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(6)