

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.007

山东北虫草不同极性部位体外抗氧化活性研究

李万芳¹,余登升¹,刘敬民^{2△}

(1. 山东英才学院学前教育学院, 山东 济南 250104; 2. 山东省农药科学研究院, 山东 济南 250033)

摘要:目的 探讨山东北虫草不同极性部位体外抗氧化活性。方法 采用邻苯三酚自氧化法和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH 自由基)清除能力测定法检测北虫草不同极性部位的体外抗氧化活性。结果 北虫草水提取部位、乙酸乙酯部位清除超氧阴离子和 DPPH 自由基的作用与维生素 C 相比,差异无统计学意义($P>0.05$);北虫草不同极性部位清除超氧阴离子和 DPPH 自由基的能力与浓度呈正相关;北虫草不同极性部位清除超氧阴离子能力的大小为水提取部位>乙酸乙酯部位>石油醚部位>正丁醇部位,清除 DPPH 自由基能力的大小为水提取部位>乙酸乙酯部位>正丁醇部位>石油醚部位。结论 北虫草水提取部位和乙酸乙酯部位有较强的体外抗氧化活性作用。

关键词:北虫草;极性部位;抗氧化活性;邻苯三酚自氧化法;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0023-03

The Antioxidant Activity *in Vitro* in Different Polar Parts of *Cordyceps Militaris* in Shandong

LI Wanfang¹, YU Dengsheng¹, LIU Jingmin²

(1. School of Preschool Education, Shandong Yingcai University, Jinan, Shandong, China 250104; 2. Shandong Academy of Pesticide Sciences, Jinan, Shandong, China 250033)

Abstract: Objective To examine the antioxidant activities *in vitro* in different polar parts of Shandong *Cordyceps militaris*. **Methods** Pyrogallol self-oxidation and DPPH free radical scavenging were used to examine the antioxidant activities *in vitro*. **Results** The effects of scavenging superoxide anion and DPPH free radical in the water extracting fraction and ethyl acetate fraction of *Cordyceps militaris* were similar to those of Vc($P>0.05$). The different polar parts of *Cordyceps militaris* had certain ability to scavenge superoxide anion and DPPH free radicals at different concentrations, and the clearance rate was positively correlated with the concentration. The ability of removing the superoxide anion from different polar parts of *Cordyceps militaris* was water extraction site > ethyl acetate site > petroleum ether site > n-butanol site; the ability to remove DPPH free radicals was water extraction site > ethyl acetate site > n-butanol site > petroleum ether site. **Conclusion** The water extracting part and ethyl acetate part of *Cordyceps militaris* have strong antioxidant activity *in vitro*.

Key words: *Cordyceps militaris*; polar parts; antioxidant activity; pyrogallol self-oxidation; DPPH

目前已知,很多疾病的发生与自由基反应有关,失控和异常的自由基反应可由生理条件下产生的自由基引发,也可由外源性化学试剂或由物理性的电离辐射所致的自由基引起^[1-2]。由于生物体内不存在清除过量自由基的酶系或抗氧化剂,故适当补充外源性自由基清除剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物,可使各种损伤得以改善。由于担心合成抗氧化剂会给机体带来不良反应,国内外学者越来越关注从中草药资源中提取天然抗氧化剂^[3-6]。现代药物化学研究表明,北虫草含有腺苷、虫草素、虫草酸、蛋白质、多糖、超氧化物歧化酶等活性成分^[7-10],具有较强的抗氧化活性^[11-14]。本研究中探讨了山东栽培北虫草的抗氧化活性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:FZ102型微型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);RE-52型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪

器厂);UV-9100B型紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司);FA-1104型电子天平(上海天平仪器厂);KQ-2200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

试剂:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH 自由基,梯希爱公司);邻苯三酚(天津科密欧化学试剂有限公司);盐酸;三羟甲基氨基甲烷(北京益利精细化学品有限公司);石油醚(60~90℃,天津广成化学试剂有限公司);乙酸乙酯(分析纯,天津天大化工实验厂);正丁醇(天津广成化学试剂有限公司);蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

药物:本研究所用北虫草 *Cordyceps militaris* 样品为临沂费县栽培北虫草,经山东中医药大学药学院石俊英教授鉴定为正品,低温烘干,粉碎,过60目筛,密封备用。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

取北虫草粉末200g,置烧瓶中,加入6倍量的石油

第一作者:李万芳,女,博士研究生,副教授,研究方向为中药活性成分分析,(电子信箱)lwfang10150410@sina.com。

△通信作者:刘敬民,男,大学本科,研究员,研究方向为药物分析,(电子信箱)liujingmin@shandong.cn。

醚(60~90℃)浸泡过夜,超声提取2次,每次1h,滤过,合并滤液,减压(60℃,0.1MPa),回收溶剂,真空干燥(60℃,0.1MPa),得黄色黏稠油状物石油醚提取部位,备用;滤渣挥干溶剂,依次用乙酸乙酯、正丁醇、蒸馏水等溶剂替换石油醚,重复上述工艺步骤,制备北虫草不同极性部位,其中乙酸乙酯部位为棕黄色黏稠状,正丁醇和水提取部位均为棕褐色。

北虫草成人推荐用量为3.0g/d,根据前期试验,各部位提取率折合成原药材计算,分别精确称取北虫草石油醚提取部位、乙酸乙酯提取部位、正丁醇提取部位、水提取部位、维生素C适量(对照组),配制质量浓度分别为3.000,1.500,0.750,0.375,0.1875g/L的样品溶液。

1.2.2 超氧阴离子清除能力测定

试液配制:精密称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)0.6057g与乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2Na)37.2mg,溶于62.4mL 0.1mol/L 盐酸溶液中,用蒸馏水定容至100mL,得0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl缓冲液(pH=8.20)。精密称取邻苯三酚0.63g,用10mmol/L的盐酸溶液溶解,并定容至100mL,避光保存,得50mmol/L 邻苯三酚溶液。

抗氧化活性:利用数显恒温水浴锅控制温度在25℃,将Tris-HCl缓冲液和邻苯三酚溶液混匀,再加入北虫草不同浓度不同极性提取部位,迅速摇匀,以10mmol/L HCl溶液作为参比,于325nm波长处,每隔30s测定吸光度(A)值。通过比较抑制邻苯三酚自氧化速率的程度,分析北虫草不同极性部位抗氧化活性强弱。结果以清除率(S)表示, $S(\%) = (1 - \Delta A / \Delta A_0) \times 100\%$ 。其中, ΔA_0 为邻苯三酚自氧化速率, ΔA 为加入样品后邻苯三酚自氧化速率。

1.2.3 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 溶液配制及标准曲线绘制:精密称取 DPPH 0.0216g,加无水乙醇溶解,定容,置50mL棕色容量瓶中,作为贮备液。精密移取上述贮备液10mL,置100mL棕色容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,得质量浓度为43.2mg/L的贮备液,备用。分别精密移取DPPH贮备液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0mL置7个10mL棕色容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度。以无水乙醇溶剂为空白对照,用UV-9100B紫外-可见分光光度计在517nm波长处测定各溶液的吸光度。以DPPH的质量浓度(mg/L)为横坐标(X)、吸光度(A)为纵坐标(Y)进行线性回归。得回归方程 $Y = 0.0238X - 0.0036$, $R^2 = 0.9995$ ($n=6$)。结果表明,DPPH质量浓度在4.32~30.24mg/L内与峰面积线性关系良好,可用于DPPH

自由基清除率的测定。

DPPH 自由基清除能力测定:精密移取无水乙醇、DPPH溶液各2mL,置10mL具塞试管中,混合后充分振摇,室温下暗处静置30min,于517nm波长处测定吸光度(A_c);精密移取供试品溶液、无水乙醇各2mL,置10mL具塞试管中,混合后充分振摇,室温下暗处静置30min,于517nm波长处测定吸光度(A_j);精密移取供试品溶液、DPPH溶液各2mL,置10mL具塞试管中,混合后充分振摇,室温下暗处静置30min,于517nm波长处测定吸光度(A_i)。

样品对DPPH自由基的清除率计算公式:DPPH自由基清除率($\%$) = $[1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 超氧阴离子清除能力

每组试验平行6次,结果见表1。可见,北虫草不同极性部位在不同质量浓度均有一定的清除超氧阴离子能力。超氧阴离子清除率与质量浓度呈正相关,质量浓度增大,清除率也升高。水提取部位、乙酸乙酯部位清除超氧阴离子的作用与维生素C相比,无显著差异($P > 0.05$)。北虫草不同极性部位清除超氧阴离子能力的大小为水提取部位 > 乙酸乙酯部位 > 石油醚部位 > 正丁醇部位。

表1 北虫草不同极性部位的超氧阴离子清除能力($\%$)

样品质量浓度 (g/L)	石油醚部位	乙酸乙酯部位	正丁醇部位	水提取部位	维生素C
0.1875	31.78 ± 1.19 [*]	46.33 ± 0.80	11.43 ± 0.73 [*]	50.68 ± 1.13	51.36 ± 1.55
0.375	43.65 ± 0.69 [*]	56.94 ± 0.71	23.13 ± 3.17 [*]	56.87 ± 1.23	64.51 ± 0.65
0.750	56.31 ± 0.82 [*]	65.79 ± 0.43	42.43 ± 1.73 [*]	69.27 ± 0.74	77.43 ± 1.38
1.500	64.86 ± 2.26 [*]	71.87 ± 1.62	50.26 ± 2.14 [*]	78.31 ± 0.68	80.52 ± 1.69
3.000	70.65 ± 0.76	75.26 ± 1.73	57.54 ± 3.04 [*]	81.32 ± 0.98	80.17 ± 3.22

注:与对照组相比,^{*} $P < 0.05$ 。下表同。

2.2 DPPH 自由基清除能力

生物体新陈代谢过程中会生成活性氧自由基(ROS),ROS过量导致机体氧化损伤。抗氧化剂在预防活性氧引起的疾病中发挥着重要作用^[15-16]。DPPH自由基的清除率可用来评价样品的抗氧化能力。每组试验平行6次,结果见表2。可见,北虫草不同极性部位在不同浓度均有一定的清除DPPH自由基能力。DPPH自由基清除率与质量浓度呈正相关,质量浓度增大,清除率也升高。水提取部位、乙酸乙酯部位清除DPPH自由基的作用与维生素C相比,无显著差异($P > 0.05$)。北虫草不同极性部位清除DPPH自由基能力的大小为水提取

部位 > 乙酸乙酯部位 > 正丁醇部位 > 石油醚部位。

表2 北虫草不同极性部位的 DPPH 自由基清除能力 (%)

样品质量浓度 (g/L)	石油醚部位	乙酸乙酯部位	正丁醇部位	水提取部位	维生素 C
0.1875	9.53 ± 1.15 [*]	48.23 ± 1.80	13.23 ± 2.83 [*]	52.36 ± 0.87	55.26 ± 2.37
0.375	18.25 ± 0.49 [*]	60.24 ± 1.72	28.43 ± 2.47 [*]	61.65 ± 2.72	74.15 ± 2.45
0.750	26.13 ± 1.42 [*]	75.39 ± 0.97	40.13 ± 1.73 [*]	75.14 ± 1.47	80.13 ± 2.56
1.500	34.26 ± 1.46 [*]	81.27 ± 1.32	49.16 ± 1.14 [*]	88.31 ± 0.68	89.35 ± 1.89
3.000	40.1 ± 0.56 [*]	85.06 ± 0.93	55.47 ± 2.54 [*]	91.65 ± 1.98	95.25 ± 1.84

3 讨论

生物体内自由基多种多样,机体进化产生多种抗氧化系统,各物质的抗氧化机制也不尽相同,样品对一种自由基的清除能力不能完全代表对另一种自由基的清除能力,因此,以单一方法评定抗氧化物的抗氧化能力不合理。测定物质的抗氧化性能时往往采用2种或更多不同的抗氧化测定方法,来评价其抗氧化能力^[17]。目前测定抗氧化能力的方法较多,但并没有统一的标准方法,本研究结果显示,北虫草水提取部位、乙酸乙酯部位清除超氧阴离子和 DPPH 自由基的能力与维生素 C 相近,表明北虫草是一种优良的天然抗氧化剂来源,值得开发利用。

药食两用真菌是产生天然活性化合物的宝库。天然抗氧化剂作为一类重要的生物活性物质,可清除人体新陈代谢过程中产生的自由基,延缓机体衰老。本研究结果显示,北虫草4个部位对超氧阴离子和 DPPH 自由基均具有一定的清除能力。当北虫草水提取部位质量浓度为3 g/L时,对超氧阴离子的清除率达到81.32%,甚至超过了同质量浓度的维生素 C;当北虫草乙酸乙酯部位、水提取部位质量浓度为3 g/L时,对 DPPH 自由基的清除能力分别为85.06%和91.65%,表明上述部位具有良好的清除效果。可见,北虫草具有良好的体外抗氧化功效。综合各抗氧化试验结果,推测山东栽培北虫草清除自由基活性成分主要存在于水提取部位和乙酸乙酯提取部位,其活性成分主要有虫草多糖、虫草素、腺苷、超氧化物歧化酶、麦角甾醇等,但北虫草各活性物质的抗氧化活性还有待于进一步分离纯化后确定。

参考文献:

[1] 陈瑾,李荣亨.衰老的自由基机制[J].中国老年学杂志,2004,24(7):677-679.
[2] LABUSCHAGNE CF, BRENNKMAN AB. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging [J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(4): 918-930.
[3] 吴丽红,任丽英,陈志钢.紫叶李果实总黄酮抗氧化性能实

验研究[J].中国药业,2017,26(5):15-19.

[4] 朱月,李奋梅,王艳丽,等.黑果腺肋花楸原花青素的提取及抑菌性研究[J].食品工业科技,2017,38(2):302-306.
[5] 段江莲,李琴,李为琴,等.紫苏甲醇提取物的体外抗氧化及抑菌活性研究[J].实验室科学,2014,17(2):8-11.
[6] 宋忠兴,唐志书,严邑萍,等.皂角刺中总黄酮含量测定及其抗氧化活性研究[J].中国药业,2019,28(6):1-3.
[7] YUNG JTS, LIE CL, TUNG HT. Pharmacokinetics of adenosine and cordycepin, a bioactive constituent of *Cordyceps sinensis* in rat [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(8): 4638-4643.
[8] DONG FZ, LEI C, AI XR, et al. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* link and analysis on its main active components [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(5): 1215-1224.
[9] WONG JH, NG TB, WANG HX. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. Phytomedicine, 2011, 18(5): 387-392.
[10] YAN H, ZHU DJ, XU DB, et al. A study on *Cordyceps militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(22): 4004-4009.
[11] ZHAN Y, DONG CH, YAO YJ. Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L.) Link *in vitro* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 8(11): 1365-1370.
[12] YU RM, YANG W, SONG LY, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70(4): 430-436.
[13] WU FY, YAN H, MA XN, et al. Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(18): 2743-2745.
[14] WANG M, MENG YX, YANG RL, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2): 461-466.
[15] DRÖGE W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2005, 360(1464): 2355-2372.
[16] WILLCOX J, ASH K, CATIGNANO SL, et al. Antioxidants and prevention of chronic disease [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44(4): 275-295.
[17] MENG J, FEI F, QIN YL, et al. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi county (China) [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2049-2056.
(收稿日期:2019-04-19;修回日期:2019-07-25)