

冠突散囊菌不同溶剂提取物体外抗氧化活性研究

李莹^{1,2}, 邹先伟², 张小娜^{1,2}, 王莹^{1,2}, 唐劲天^{2*}, 张阳德^{1,3*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102;

2. 清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084;

3. 卫生部肝胆肠外科研究中心, 长沙 410008)

[摘要] 目的: 研究冠突散囊菌体外抗氧化活性。方法: 采用萃取法对冠突散囊菌甲醇提取物萃取获得石油醚, 乙酸乙酯和正丁醇3种提取物, 并以维生素C(VC)为阳性对照, 用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基和[2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS)自由基测定法, 对冠突散囊菌3种提取物抗氧化活性进行测定。结果: 冠突散囊菌石油醚提取物清除DPPH和ABTS⁺自由基半数清除浓度(IC₅₀)分别为0.078, 0.083 g·L⁻¹, 乙酸乙酯提取物IC₅₀分别为0.21, 0.13 g·L⁻¹; 正丁醇提取物对DPPH和ABTS⁺自由基几乎没有清除作用; 3种提取物清除DPPH和ABTS⁺自由基的能力均比阳性对照VC(IC₅₀分别为0.032, 0.024 g·L⁻¹)弱。结论: 冠突散囊菌石油醚和乙酸乙酯提取物均具有抗氧化活性, 且石油醚提取物活性较强。

[关键词] 冠突散囊菌; 石油醚提取物; 抗氧化活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0143-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014070143

[收稿日期] 20131206(004)

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(2013M530603)

[第一作者] 李莹, 在读硕士, 从事天然产物化学研究, E-mail: 524350850@qq.com

[通讯作者] *张阳德, 博士, 教授, 博士生导师, 从事外科学基础与临床, E-mail: zyd0731@yahoo.com.cn

- [3] 洗寒梅, 邓家刚. 广西临床常用中草药[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2007: 167.
- [4] Hayashi T, Smith FT, Lee KH. Antitumor agents. 89. Psychorubrin, a new cytotoxic naphthoquinone from *Psychotria rubra* and its structure-activity relationships [J]. J Med Chem, 1987, 30(11): 2005
- [5] Corrêa L R, Soares G L G, Fett-Neto A G. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understory species of subtropical forests [J]. South Afr J Bot, 2008, 74: 583.
- [6] Leal M B, Elisabetsky E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) [J]. J Ethnopharmacol, 1996, 54: 37.
- [7] Amélia T Henriques, Sílvia O Lopes, Juçara T Paranhos, et al. N, b-d-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa* [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 449.
- [8] 张金花, 卢海啸, 李家洲. 山大颜抗老年痴呆作用的实验研究[J]. 中国药师, 2011, 14(3): 365.
- [9] 吴馥梅, 萧信生. 学习记忆及其脑内突触机制[J]. 自然杂志, 1991, 14(10): 746.
- [10] 张战波, 王力军, 孟凡军, 等. 盐酸氯丙嗪在急性重型大鼠脑损伤中的保护作用[J]. 临床误诊误治, 2007, 20(3): 82.
- [11] 黄厚才, 胡春萍, 彭蕴茹, 等. 钩藤散浸膏对小鼠记忆障碍模型的影响[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(1): 59.
- [12] 胡海燕, 孟琼, 蒋哲, 等. 清心开窍方对AD小鼠学习记忆能力及海马CA1区神经细胞形态的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10): 1186.
- [13] Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2010, 34(8): 1307.

[责任编辑] 聂淑琴

Antioxidant Activity of Different Extracts from *Eurotium cristatum* in vitro

LI Ying^{1,2}, ZOU Xian-wei², ZHANG Xiao-na^{1,2}, WANG Ying^{1,2}, TANG Jin-tian^{2*}, ZHANG Yang-de^{1,3*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Institute of Nuclear Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3. National Hepatobiliary Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of different extracts from *Eurotium cristatum* in vitro. **Method:** The petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol extracts from *E. cristatum* were attained by the extraction method of the methanol extract of the *E. cristatum*. The antioxidant activity of *E. cristatum* was evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and [2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid diammonium salt] (ABTS) radical scavenging assay with vitamin C (VC) as the positive control. **Result:** The petroleum ether extract from *E. cristatum* showed significant DPPH and ABTS radical scavenging activity, with 50% inhibition concentration (IC₅₀) values of 0.078, 0.083 g·L⁻¹, respectively, the positive control VC showed IC₅₀ values of 0.032, 0.024 g·L⁻¹, respectively. The ethyl acetate extract exhibited modest radical scavenging activity against DPPH and ABTS radicals, with IC₅₀ values of 0.21, 0.13 g·L⁻¹, whereas the n-butanol extract did not display noticeable in vitro activity against above-mentioned radicals. **Conclusion:** The petroleum ether and ethyl acetate extracts from *E. cristatum* showed significant antioxidant activity.

[Key words] *Eurotium cristatum*; petroleum ether extract; antioxidant activity

冠突散囊菌是茯砖茶在“发花”过程中自然形成的一种具有益生性能的优势菌^[1-3],其产生的黄色闭囊壳,均匀地附着在茯砖茶中,形似“米兰”,俗称“金花”^[4],是边疆少数民族评价茯砖茶品质优劣的重要依据之一。冠突散囊菌不仅可以改善茶叶的品质,还可以合成动物机体必需的氨基酸、分泌水溶性色素和调节维持肠道菌群的平衡^[5],且具有抗氧化^[6]、促消化^[7]、降脂减肥^[8]、抑菌^[9-12]、抗癌^[15-16]等保健功效,使人们日益重视冠突散囊菌的功能研究。尽管冠突散囊菌发酵提取物细胞毒、抗菌活性^[17]及其黄色素抗氧化活性已有报道^[18],但未见其固体发酵提取物抗氧化活性的相关报道。作者用3种不同极性有机溶剂对冠突散囊菌固体发酵培养物进行提取,采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基和[2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS)自由基测定法,研究冠突散囊菌不同极性溶剂提取物的体外抗氧化活性,为研发新型抗氧化剂和科学利用冠突散囊菌提供依据。

1 材料

1.1 药材与试剂 冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)由清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室分离获得并鉴定^[19]。2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐

(ABTS, Amresco 公司,批号 3110C075);二苯代苦味酰基(DPPH, AlfaAesar 公司,批号 G10Z016);抗坏血酸(广州化学试剂厂,批号 20111001-1);大米(超市购买);马铃薯葡萄糖琼脂(不含抗生素)(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 20121018);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 BIO-RAD 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),KQ5200DE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司),EYEL4 旋蒸仪(日本 EYELA 公司),Venticell 烘箱(德国 MMM 公司),DZF-6050 型真空干燥箱(北京神泰伟业仪器设备有限公司),SVE-4A1 型垂直直流超净工作台(新加坡 ESCO 公司),AL204-IC 型电子天平、pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],THZ-D 型台式恒温振荡器(苏州培英实验设备有限公司),SHZ-CB 型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂),恒温培养箱(德国 MMM 公司),NANOpure 超纯水系统(美国 Barnstead 公司)。

2 方法

2.1 培养基的配制

2.1.1 大米培养基的配制 每个 500 mL 的三角瓶中放入 80 g 大米及 120 mL 蒸馏水,封口,121 °C 灭菌 30 min。

2.1.2 马铃薯葡萄糖琼脂培养基的配制 马铃薯

葡萄糖琼脂(不含抗生素) $38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,分装, $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min 高压蒸气灭菌,取适当体积到无菌平皿中冷却备用。

2.2 菌种活化 无菌操作下将保存的冠突散囊菌菌种接种于已制好灭菌的马铃薯葡萄糖琼脂培养基上数支,于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 96 h ,连续活化 2 次。

2.3 冠突散囊菌的培养 挑取活化的菌种菌丝,用无菌水配成 10^6 个/mL 孢子菌悬液,取 3 mL 接种于大米培养基,室温培养 40 d 。

2.4 冠突散囊菌发酵提取物的制备 发酵结束后,将大米和菌体机械粉碎,甲醇浸泡,超声提取 3 次,合并提取液后浓缩,得甲醇总浸膏 368 g 。将总浸膏溶解于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压浓缩得冠突散囊菌石油醚提取物 (ECPE) 4 g ,乙酸乙酯提取物 (ECEA) 12 g ,正丁醇提取物 (ECBU) 9 g ,得率分别为 1.09% , 3.26% , 2.45% 。

准确称取各提取物,配成质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,倍比稀释法,配成质量浓度为 $1 \sim 0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液备用。

2.5 抗氧化活性筛选方法

2.5.1 DPPH 方法 参照文献[20],于 510 nm 处测定吸光度 (A),每份供试样品平行操作 3 次。计算公式为:

$$\text{清除率} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100\%$$

式中 A_{Control} 为 $150 \text{ } \mu\text{L}$ DPPH 溶液与 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 乙醇或水混合后的 A , A_{Sample} 为 $150 \text{ } \mu\text{L}$ DPPH 溶液与 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 供试品溶液混合后的 A 。

2.5.2 ABTS 方法 参照文献[20],于 740 nm 处测定吸光度,每份供试样品平行操作 3 次。计算公式同 2.5.1 项下。

式中 A_{Control} 为 $150 \text{ } \mu\text{L}$ ABTS 溶液与 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 乙醇或水混合后的 A , A_{Sample} 为 $150 \text{ } \mu\text{L}$ ABTS 溶液与 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 供试品溶液混合后的 A 。

2.5.3 半数清除浓度 (IC_{50}) 计算 依据上述公式计算得到的清除率,根据回归方程,得到样品清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 的 IC_{50} 。

3 结果

3.1 DPPH 自由基清除作用 从图 1 可以看出,冠突散囊菌 3 种溶剂提取物的 DPPH⁺ 清除能力均低于 VC,其中石油醚提取物的 DPPH⁺ 清除能力最强,而正丁醇提取物几乎没有 DPPH⁺ 清除作用。此外,冠突散囊菌 3 种溶剂提取物的 DPPH⁺ 清除能力与其质量浓度呈正线性关系,即随着提取物浓度的增加,对 DPPH⁺ 清除率也增大。

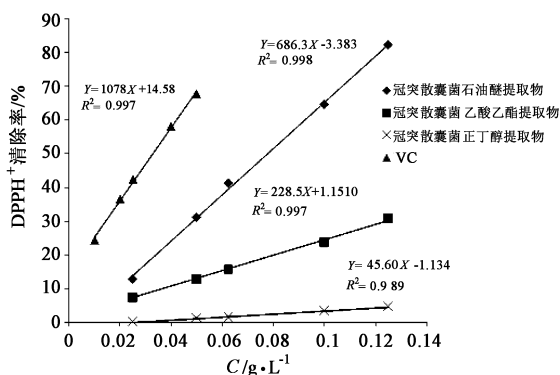


图 1 冠突散囊菌不同溶剂提取物的 DPPH⁺ 清除作用

表 1 结果显示,冠突散囊菌石油醚提取物 (ECPE) 清除 DPPH⁺ 的能力 (IC_{50} 为 $0.078 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 略低于 VC (IC_{50} 为 $0.032 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),其清除能力约为 VC 的 41% ;冠突散囊菌乙酸乙酯提取物 (ECEA) 和正丁醇提取物 (ECBU) 清除 DPPH⁺ 的 IC_{50} 分别为 $0.212, 1.121 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。冠突散囊菌不同溶剂提取物对 DPPH⁺ 清除能力的顺序为: ECPE > ECEA > ECBU,提示抗氧化成分可能存在于小极性部位。

表 1 冠突散囊菌不同溶剂提取物的抗氧化活性 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

样品	IC_{50}	
	DPPH ⁺	ABTS ⁺
石油醚提取物	0.078	0.083
乙酸乙酯提取物	0.212	0.126
正丁醇提取物	1.121	1.050
VC	0.032	0.024

3.2 对 ABTS⁺ 的清除作用 图 2 结果表明,冠突散囊菌不同极性溶剂提取物的 ABTS⁺ 清除能力均明显低于阳性对照 VC,其中石油醚提取物的 ABTS⁺ 清除能力最强,而正丁醇提取物几乎没有 ABTS⁺ 清除作用。冠突散囊菌溶剂提取物的 ABTS⁺ 清除作用的顺序为: ECPE > ECEA > ECBU,与上述 DPPH⁺ 清除能力一致。冠突散囊菌 3 个不同极性溶剂提取物的 ABTS⁺ 清除能力与其质量浓度呈正线性关系,即随着提取物浓度增加,对 ABTS⁺ 清除率也增大。

表 1 数据显示,冠突散囊菌 3 种不同极性溶剂提取物 (ECPE, ECEA 和 ECBU) 中,ECPE 对 ABTS⁺ 自由基清除作用最强 (IC_{50} 为 $0.083 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),其清除能力约为 VC 的 28.9% ,ECEA 清除能力次之,ECBU 对 ABTS⁺ 清除作用则远低于阳性对照 VC。

4 讨论

自由基可引起人体组织衰老,诱发心血管疾病、癌症等^[21],众多研究表明自由基的清除是抗氧化剂

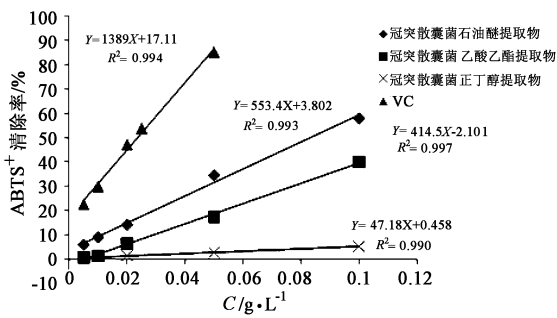


图 2 冠突散囊菌不同溶剂提取物的 ABTS⁺清除作用

发挥抗氧化作用的主要机制^[22]。在测定样品的抗氧化活性时,需要采用多种方法来综合评价分析样品的抗氧化活性^[23]。因此,本实验通过研究冠突散囊菌 3 种不同极性溶剂提取物对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的清除作用来评价其抗氧化活性,结果表明冠突散囊菌 3 种提取物均对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基具有不同程度的清除作用,其中石油醚提取物对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力最强,其次为乙酸乙酯提取物,而正丁醇提取物清除自由基能力较弱。

同时,冠突散囊菌 3 种不同极性溶剂提取物对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的清除作用在试验浓度范围内呈明显的量效关系,为筛选天然抗氧化剂和理清茯茶与金花菌的活性关系提供科学依据。

[参考文献]

[1] 温琼英,刘素纯. 茯砖茶发花中优势菌的演变规律[J]. 茶叶科学,1991,11(增刊):56.
 [2] Xu A, Wang Y, Wen J, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea[J]. Int J Food Microbiol,2011,146(1):14.
 [3] 陈云兰. 茯砖茶“冠突散囊菌”的分类鉴定及其对茯砖茶品质的影响[D]. 南京:南京农业大学,2004.
 [4] 王志刚,童哲,程苏云. 茯砖茶中霉菌含量和散囊菌鉴定及利弊分析[J]. 食品科学,1992(5):6.
 [5] 王冰,张凯,方热军. 冠突散囊菌的营养作用研究进展[J]. 饲料博览,2012(12):26.
 [6] 欧阳梅,熊昌云,屠幼英,等. 冠突散囊菌对茶叶品质成分及其抗氧化活性影响[J]. 菌物学报,2011,30(2):343.
 [7] 屠幼英,梁慧玲,陈暄. 紧压茶儿茶素和有机酸的组成分析[J]. 茶叶,2002,28(1):22.

[8] 袁勇,黄建安,徐小江,等. 茯茶中“金花”孢子粉提取物对体外诱导的非酒精性脂肪肝细胞内甘油三酯代谢的影响[J]. 茶叶科学,2011,31(2):129.
 [9] 李佳莲,胡博涵,赵勇彪,等. 冠突散囊菌发酵液的抑菌作用[J]. 食品科学,2011,32(11):157.
 [10] 肖文军,傅冬和,任国谱. 茯茶毒理学试验报告[J]. 茶叶科学,2007,27(4):307.
 [11] 王志刚,程苏云,童哲. 茯砖茶中散囊菌的产毒性研究 I:散囊菌培养液的毒性[J]. 茶叶科学,1992,12(1):65.
 [12] 王志刚,程苏云,童哲. 茯砖茶中散囊菌的产毒性研究 II:散囊菌培养液的毒性[J]. 茶叶科学,1994,14(1):69.
 [13] 郭敏,张宝善,金晓辉. 微生物发酵生产多糖的研究发展[J]. 微生物学通报,2008,35(7):1084.
 [14] 龚淑俐,邓放明,周向荣. 冠突散囊菌胞外多糖提取工艺研究[J]. 现代食品科技,2007,23(2):48.
 [15] 邓放明,龚淑俐,赵荣,等. 冠突散囊菌胞外多糖的分离纯化[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(6):662.
 [16] 邓放明,龚淑俐,杨伟丽. 冠突散囊菌胞外多糖生物活性高通量筛选试验[J]. 食品与机械,2007,23(6):48.
 [17] 彭晓赞,梁亮亮,李冬利,等. 茯砖茶中冠突散囊菌的次级代谢产物及其生物活性研究[J]. 中草药,2013,44(14):1881.
 [18] 李玉婷,吕嘉彬. 金花菌黄色素的稳定性及其抗氧化活性研究[J]. 微生物学通报,2013,40(11):2030.
 [19] 郝鹏飞. 辣椒叶“金花”菌发酵产物及活性研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
 [20] Pellegrini N, Ke R, Yang M, et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay[J]. Methods Enzymol, 1999, 29(9):379.
 [21] 何华,李先宽,丁璞,等. 五味子红色素抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):133.
 [22] 刘志东,郭本恒,王荫榆. 抗氧化活性检测方法的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(3):563.
 [23] 尹震花,顾雪竹,张一冰,等. 三白草体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):99.

[责任编辑 聂淑琴]