

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110321. 1133. 006

DPPH 法测定九州虫草不同极性部位抗氧化活性

董秀英^{1,2}, 吕青涛², 张国英^{1,2}, 凌建亚^{1*}, 张长铠¹

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究九州虫草体外不同极性部位的抗氧化作用。方法: 采用 DPPH 法测定九州虫草石油醚(EVP)、乙酸乙酯(EVE)、正丁醇(EVB)和水(EVW)不同提取部位的抗氧化活性。结果: EVP, EVE, EVB, EVW 均有 DPPH 自由基的清除能力, 测得 EVP, EVE, EVB 和 EVW 清除 DPPH 的 EC₅₀ 值分别为 190.2, 141.4, 151.6, 195.4 mg·L⁻¹。结论: 九州虫草具有很强的抗氧化性, 为进一步研究其抗氧化活性成分提供了科学依据。

[关键词] 九州虫草; 1,1-二苯基-2-苦基苯肼自由基法; 体外抗氧化作用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0070-04

Determination of the Antioxidant Capacity of *Cordyceps Kyushuensis* with DPPH Assay *in vitro*

DONG Xiu-ying^{1,2}, LV Qing-tao², ZHANG Guo-ying^{1,2}, LING Jian-ya^{1*}, ZHANG Chang-kai¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology of Shandong University, Jinan 250100, China;

2. College of Pharmacology of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antioxidant effect *in vitro* of *Cordyceps kyushuensis*. **Method:** Antioxidant capacity of the petroleum ether fraction (EVP); acetic ether fraction (EVE); n-butanol fraction (EVB) and water fraction (EVW) were determined using the DPPH assay *in vitro*. **Result:** EVP, EVE, EVB and EVW showed antioxidant capacity of eliminating DPPH free radicals, and the scavenging efficiency increase with the concentration increase. EC₅₀ values of the EVP, EVE, EVB and EVW are 190.2, 141.4, 151.6, 195.4 mg·L⁻¹ respectively. **Conclusion:** *C. kyushuensis* shows great oxidation resistance, and the results of the antioxidant effect of the EVP, EVE, EVB, EVW provide a scientific basis to the research of active constituent and the exploitation of *C. kyushuensis*.

[Key words] *Cordyceps kyushuensis*; DPPH; antioxidant capacity

[收稿日期] 20110112(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970012, 30770041), 山东省优秀中青年科学家奖励基金(2006BS02015)

[第一作者] 董秀英, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学及化学分析, Tel: 13537310806, E-mail: dongxiuying1984@163.com

[通讯作者] * 凌建亚, 副教授, 硕导, 从事药用真菌分子系统学、种质资源及其组合生物学研究, E-mail: lingjian-ya@sdu.edu.cn

[网络出版时间] 2011-03-21 11:33

- [4] 张保国, 程铁锋, 郝锦锦. 黄连解毒汤药效学研究概况 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(16): 1204.
- [5] 杨彬, 马景, 俞恒桑, 等. 凉膈散与黄连解毒汤对 2 型糖尿病小鼠血糖、血脂及胰岛素水平的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(6): 337.
- [6] 沈嘉, 曹现峰, 刘九飞. 几种黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2003, 25(6): 433.
- [7] 吴晓霞, 彭娟, 范斌, 等. LC-MS-MS 测定黄连解毒汤中 3 种生物碱在大鼠血清的含量及其药代动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1276.
- [8] 孙健等. 黄连解毒汤各成分的 HPLC-UV-MS 定性及定量的测定方法研究 [J]. 药学学报, 2006, 41(4): 380.

[责任编辑 蔡仲德]

自由基又称游离基,具有高度活泼性与极强的氧化能力。研究表明:自由基与糖尿病、心血管病、癌症等多种疾病的发生有着潜在的联系^[1-2]。在人类生长进化过程中,随着年龄增大,生存环境的日益恶劣,大多数人的机体内产生自由基清除剂的能力逐渐下降,从而削弱对自由基损害的防御能力,引发一系列病变。因此,筛选一种能够有效清除自由基的天然产物以及研究自由基的检测方法具有重要意义。

九州虫草 *Cordyceps kyushuensis* 作为一个国内新记录品种^[3],近年来对其化学成分、生物药效等研究报道表明九州虫草具有较高的药用价值^[4-6],本研究采用 DPPH 法对其不同极性萃取部位进行了抗氧化能力的测定,探索其抗氧化活性成分在不同极性部位的分布,为进一步研究其抗氧化活性及其开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 原料 药材由山东大学生命科学院重点实验室提供,经中科院北京微生物研究所郭英兰先生鉴定为真菌界的子囊菌纲(Ascomycetes)麦角菌目(Clavicipitales)麦角菌科(Clavicipitaceae)虫草属(*cordyceps*)蒙山九州虫草。

1.2 试剂及仪器 DPPH(1,1-二苯基-2-苦基苯肼自由基)由日本和光纯药工业株式会社生产;其他试剂均为分析纯。

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-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),BS-124S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 九州虫草不同极性萃取部位的制备 取九州虫草 50 g,粉碎,过 60 目筛,加入 10 倍量甲醇重复超声提取 3 次(1,1,0.5 h),超声功率 200 W,合并 3 次提取液减压浓缩成不含醇味的流浸膏,用水打散,按极性由小到大的顺序依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,分别回收溶剂得石油醚(EVP)、乙酸乙酯(EVE)、正丁醇(EVB)和水(EVW)4 个化学部位。取各部位适量置于蒸发皿中,真空干燥皿中减压干燥,密闭保藏,备用。

2.2 DPPH 溶液的配制及标准曲线的绘制 精密

称取 DPPH 0.020 2 g,加甲醇溶解,定容至 50 mL,作为储备液。精密移取上述储备液 10 mL 至 100 mL 量瓶中,定容得 40.4 mg·L⁻¹ 的储备液,备用。

分别精密移取 DPPH 储备液 1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 mL 于 5 个 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,以甲醇溶剂为参比,在一定波长处测定各溶液的吸光度。以 DPPH 的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2.3 样品溶液配制 分别精密称取 EVP,EVE,EVB 及 EVW 0.050 1 g,用甲醇溶解,定容至 50 mL,作为样品溶液,备用。

2.4 DPPH 自由基清除率的测定 测定方法见参考文献[7-8],稍作修改。分别在 2.8 mL DPPH 储备液中加入 200 μL 不同极性部位的样品溶液,用甲醇稀释至总体积为 3.00 mL,混匀放置 40 min 后,用 1 cm 比色皿于 517 nm 处测定吸光度,根据 DPPH 标准曲线回归方程计算 DPPH 质量浓度,按下列公式计算 DPPH 清除率(Y)。

$$Y = (1 - Ct/C_0) \times 100\%$$

式中: C_0 为 0 时刻反应体系中 DPPH 的起始质量浓度(mg·L⁻¹); C_t 为 t 时刻反应体系中 DPPH 的质量浓度(mg·L⁻¹)。

3 结果

3.1 测定波长的选择 每个 DPPH 分子在溶液中可生成一个稳定的含氮自由基,具有典型紫色,当它与提供 1 个电子的自由基清除剂作用时,生成无色产物,使溶液的典型紫色变浅。观察 DPPH 溶液在 300~700 nm 的扫描光谱,发现 DPPH 在 328,517 nm 处有强吸收峰,加入 EVE 样品后,517 nm 处的峰值降低较显著,如图 1 所示,因此选取 517 nm 作为测定波长,以提高测定灵敏度。

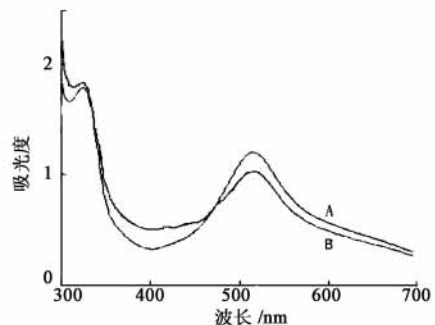


图 1 DPPH 溶液的吸收光谱

A. DPPH 甲醇溶液的吸收光谱;
B. 加入 EVE 后 DPPH 溶液吸收光谱

3.2 DPPH 标准工作曲线 按照 2.2 节的试验方法配制 DPPH 标准溶液系列,并于 516 nm 测定其吸光度,根据吸光度(A)和质量浓度(C)绘制标准曲线,得线性回归方程为 $A = 0.0109C + 0.0506 (r = 1)$,在 DPPH 质量浓度为 $4.04 \sim 32.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

3.3 DPPH 溶液稳定性能及反应时间的确定 通过测定 517 nm 处溶液吸光度的变化可以动态监测其对 DPPH 的清除作用情况,其结果发现不同极性部位对自由基的清除速率和清除效果是不相同的。为了确定 EVP, EVE, EVB, EVW 对 DPPH 的清除速率和反应时间,分别在 2.9 mL 的 DPPH 甲醇溶液中加入 20 μL 样品溶液和 80 μL 甲醇,混合均匀,每隔 2 min 测定 A,直到 A 基本稳定。各溶液 A 值随时间的变化规律如图 2 所示。

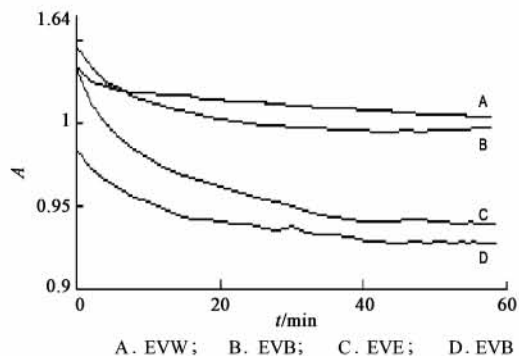


图 2 九州虫草不同极性萃取部位的 DPPH 甲醇溶液的吸光度随时间变化曲线

从图 2 可知,在加入样品液的开始 15 min 内,吸光度下降比较快,随着时间的增加,吸光度的下降趋势逐渐趋于平缓,40 min 后反应达到基本稳定。因此选择与 DPPH 反应 40 min 后测定 A。

3.4 不同部位提取物的清除率曲线 配制质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EVP, EVE, EVB, EVW 溶液,根据 2.4 节的测定方法,分别在 2.00 mL DPPH 溶液中加入 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 上述样品溶液,用甲醇补充至总体积为 3.00 mL,测定其吸光度,计算各部位不同质量浓度样品液的清除率,以清除率对各部位质量浓度作图,得到不同部位提取物的清除率曲线,如图 3 所示。

从图 3 可以看出,在一定质量浓度范围内, DPPH 的清除率(Y)与各部位的质量浓度(X)呈近似线性关系,各线性方程如表 1 所示。

一般评价抗氧化剂的抗氧化性能和自由基清除

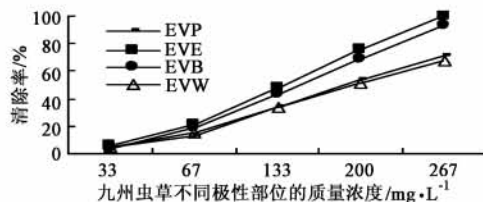


图 3 九州虫草不同极性萃取部位的清除率曲线

能力,常选择清除率为 50% 时抗氧化剂的质量浓度 (EC_{50}) 作为评价指标, EC_{50} 值越小,抗氧化剂清除自由基能力越强。根据清除率与各部位质量浓度之间的线性关系,计算出 EVP, EVE, EVB, EVW 的 EC_{50} 值分别为 190.2, 141.4, 151.6, 195.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 清除率与各部位质量浓度的线性关系

样品	线性方程	R^2	线性范围 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
EVP	$Y = 0.0029X - 0.0517$	0.9995	67 ~ 267
EVE	$Y = 0.004X - 0.0651$	0.9992	67 ~ 267
EVB	$Y = 0.0038X - 0.076$	0.9997	67 ~ 267
EVW	$Y = 0.0027X - 0.0277$	0.9992	67 ~ 267

4 讨论

二苯代苦味肼基自由基(DPPH)分光测定法的原理是依据 DPPH 甲醇溶液呈深紫色,当有自由基清除剂与 DPPH 单电子配对,而使其吸收逐渐消失,褪色程度与接受的电子数成定量关系,从而进行定量分析。

本文采用该法对九州虫草的 EVP, EVE, EVB, EVW 不同极性部位进行了体外抗氧化活性研究,发现 4 个部位在低浓度和高浓度时,均有一定的清除 DPPH 自由基的能力,其中以 EVE 的清除率为最高, $EC_{50} = 0.141 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,且当质量浓度增大到 $0.267 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时清除率几乎达到 100%;清除 DPPH 自由基最弱的为 EVW 部位, $EC_{50} = 0.195 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据相关文献,李晓磊、李丹等人在蛹虫草子实体和蛹虫草根醇提物抗氧化活性的对比^[9] 研究中发现清除 DPPH 自由基方面,蛹虫草根 70% 乙醇提取液明显优于子实体,其 $EC_{50} = 8.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;曾宏彬、李泰辉等人在广州虫草的抗氧化活性的研究^[10] 中发现广州虫草水提液质量浓度达到 $14.90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 DPPH 自由基清除率可达 50%,当其质量浓度达到 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,清除率也达到峰值 67.45%。另外据文献细脚拟青霉不同菌株清除 DPPH 自由基活性研究^[11]

报道对于不同来源的10株细脚拟青霉菌株发酵液先后经氯仿、甲醇和水提取,3种提取物质量浓度均为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,测得的氯仿提取物和水提取物清除率相似不超过62%,甲醇提取物均大于83%。通过以上的数据分析发现,在清除DPPH自由基方面,较之于广州虫草、蛹虫草和细脚拟青霉菌虫草,九州虫草具有较强的抗氧化性;此外经过不同极性试剂提取的细脚拟青霉和九州虫草提取物的抗氧化活性明显增强,推测原因一是虫草素、多酚类物质和虫草酸是虫草中对自由基具有清除作用的有效组分,据张海英^[12]和孙迎节^[13]等人报道发现九州虫草中的虫草素和虫草酸的含量都高于蛹虫草;二是经过不同极性试剂提取后具有抗氧化能力的相应活性物质浓度较高,杂质较少,从而表现出较高的抗氧化活性。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:837.
- [2] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京:科学出版社,1989.
- [3] 郭英兰,李春燕. 中国一新记录种——九州虫草[J]. 菌物系统,2000,19(2):296.
- [4] Ling J Y, Sun Y J, Zhang C K. Measurement of cordycepin and adenosine in stroma of *Cordyceps* sp. by capillary zone electrophoresis (CZE) [J]. J Biosci Bioengin. (SCI). 2002,94(4):371.
- [5] 张国英,马小清,凌建亚,等. 超声提取九州虫草子座黄酮类成分的研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(15):1203.
- [6] 陈畅,李彦,张长铠,等. 蒙山九州虫草对果蝇寿命的影响[J]. 上海中医药杂志,2005,39(2):57.
- [7] Ali Bougateg, Mohamed Hajji, Rafik Balti, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases [J]. Food Chemistry,2009,114(4):1198.
- [8] 朴香兰,吴倩,田燕泽. 连翘的抗氧化成分研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(6):1307.
- [9] 李晓磊,李丹,谭克,等. 蛹虫草子实体和蛹虫草根提物抗氧化活性的对比[J]. 食品与发酵工业,2009,35(11):125.
- [10] 曾宏彬,李泰辉,宋斌,等. 广东虫草抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(B05):201.
- [11] 李春如,宗文明,杨成,等. 细脚拟青霉不同菌株清除DPPH自由基活性研究[J]. 生物学杂志,2006,23(2):28.
- [12] 张海英. 比色法测定蒙山九州虫草中甘露醇的含量[J]. 安徽农业科学,2007,35(27):8523,8537.
- [13] 孙迎节,吕鹏,凌建亚,等. 九州虫草的核苷类成分及不同部位两种活性成分含量的分布[J]. 药学学报,2003,38(9):690.

[责任编辑 蔡仲德]