

猴头菌提取物抗氧化活性研究

潘伟^{1,2}, 刘瑞娜^{1,2}, 章炉军¹, 俞康莹¹, 尚晓冬¹, 赵国屏³, 谭琦¹

¹ 上海市农业科学院食用菌研究所, 农业部南方食用菌资源利用重点实验室, 国家食用菌工程技术研究中心, 国家食用菌加工技术研发分中心, 上海市农业遗传育种重点开放实验室; 上海 201403

² 南京农业大学生命科学院; 江苏南京 210095

³ 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

人体持续暴露在活性氧与促氧化剂中时, 很容易引起机体组织产生氧化应激, 导致代谢性功能紊乱及一系列的慢性疾病^[1]。食用一些富含具有抗氧化活性物质的功能性食品可以减轻机体组织氧化应激或预防损伤。一些合成抗氧化剂与天然抗氧化剂相比, 尽管具有很强的清除自由基活性, 但同时也具有强的毒副作用, 因此人们倾向于从自然界中寻求更安全的抗氧化剂。LEE 等^[2]从桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)中分离到一些具有较强活性的抗氧化成分(多酚类化合物)。MAU 等^[3]研究表明, 灵芝(*Ganoderma lucidum*)是很好的天然抗氧化剂。同为食用菌的猴头菌(*Hericium erinaceus*)是著名的药膳两用真菌, 具有抗溃疡、抗炎症、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、提高机体耐缺氧能力、增加心肌血液输出量、加速机体血液循环、降血糖、保肝护肝和降血脂、降血压等作用^[4]。笔者通过对猴头菌子实体的水提物和醇提物总还原力、清除·OH、2,2-二苯基-1-苦肼基自由基(DPPH·)及 O₂·自由基的研究, 旨在为其在医药保健方面的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

猴头菌(*H. erinaceus*)子实体由上海市农业科学院食用菌研究所提供。

1.2 主要试剂与仪器

柠檬酸、Na₂HP0₄、NaH₂PO₄、六氰合铁酸钾(铁氰化钾)、醋酸、三氯化铁、维生素 C、FeSO₄·7H₂O、30% H₂O₂ 溶液、水杨酸、无水乙醇、95%乙醇等(国药集团化学试剂有限公司), DPPH (美国 Sigma 公司), 实验用水(娃哈哈

纯净水); infinite M200 PRO 酶标仪(瑞士 TECAN 公司); UVmini-1240 分光光度计(日本 SHIMADZU 公司)。

1.3 提取物的制备

1.3.1 水提物: 干燥猴头菌子实体, 用粉碎机粉碎, 称取 50g 粉末, 加 1L 蒸馏水超声 20min, 过滤, 滤液减压浓缩, 反复 3 次, 合并浓缩液, 转至蒸发皿中, 60°C 水浴蒸干, 备用。

1.3.2 醇提物: 同样称取 50g 猴头菌子实体粉末, 加 1L 95% 乙醇超声 20min, 过滤, 其它操作步骤同 1.3.1。

1.4 母液制备

将猴头菌醇提物和水提物配制成 20mg/mL, 作为供试母液。

维生素 C 作为阳性对照, 称取一定量的维生素 C 定容到浓度为 1mg/mL, 作为对照母液, 避光 4°C 保存。

1.5 DPPH 溶液的配制

精密称取 19.7mg DPPH, 用无水乙醇溶解并定容于 250mL 容量瓶中, DPPH 浓度为 2 × 10⁻⁴ mol/L, 避光 4°C 保存。

1.6 总还原力测定

按照参考文献^[5]操作进行总还原力测定。

1.7 OH 自由基清除活性测定

以 SMIRONFF 等^[6]的 Fenton 法为基础加以改进, 向试管中分别加入 2、4、6、8、10、12、14、18mg/mL 不同浓度样品 2mL, 然后依次加 6mmol/L 的 FeSO₄ 溶液 2mL, 2.4mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 2mL, 摇匀, 静置 10min, 再加入 6mmol/L 的水杨酸溶液 2mL 摇匀, 37°C 水浴 30min, 1016g 离心 10min, 取上清液于 510 nm

处测吸光度(A)值,以维生素C作为阳性对照。

$$\text{清除率 } S = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$$

A_0 : 以纯水替代样品的空白对照; A_i : 反应液的A值; A_j : 以纯水替代水杨酸时提取液自身的A值。

1.8 DPPH 自由基清除活性测定

采用DPPH分析法,根据参考文献^[7,8]研究方法加以改良,测定了提取物抗氧化活性。将加入1mL的 2×10^{-4} mol/L DPPH无水乙醇溶液,摇匀,避光放置30min,于517nm处测定其A值,以维生素C作为阳性对照。

$$\text{清除率 } S = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$$

A_0 : 以纯水替代抗氧化剂的DPPH溶液的A值; A_i : 加了抗氧化剂后DPPH溶液的A值; A_j : 以无水乙醇替代DPPH溶液的抗氧化剂溶液的A值。

1.9 $O_2^{\cdot-}$ 自由基清除能力测定

采用改良的邻苯三酚自氧化法^[9]。首先根据下列公式计算邻苯三酚自氧化率。

$$\text{邻苯三酚自氧化率} = (A_{4\text{min}} - A_{1\text{min}})/3$$

$A_{4\text{min}}$ 为第4分钟的A值, $A_{1\text{min}}$ 为第1分钟的A值。

然后测定加样后邻苯三酚自氧化率: 操作方法同上,加入邻苯三酚前分别加入2、4、6、8、10、12、14、18mg/mL不同浓度猴头菌水提取物、醇提取物。计算加样后邻苯三酚自氧化速率,得出对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率。

$$\text{抑制率} = [(A_0 - A_i)/A_0] \times 100\%$$

A_0 : 邻苯三酚自氧化率, A_i : 加样后的邻苯三酚自氧化率。

2 结果与分析

2.1 总还原力大小

在2~18mg/mL范围内,水提取物总还原力很低,不随着浓度的增加而增加;醇提取物总还原力随浓度的增加而升高,浓度为18mg/mL时相当于0.09mg/mL维生素C的总还原力(图1)。

Fig. 1 Total reducing power of aqueous and ethanolic extracts from *H. erinaceus* fruit bodies

2.2 $\cdot OH$ 自由基清除活性

猴头菌水提取物在2~10mg/mL范围内对 $\cdot OH$ 自由基的清除率随浓度的升高而增加,当浓度达到10mg/mL时,清除率为99.03%。而醇提取物在一定浓度(2~18mg/mL)对 $\cdot OH$ 的清除率随浓度的增加几乎不变(图2)。

图2 猴头菌提取物清除 $\cdot OH$ 自由基活性
Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activity of aqueous and ethanolic extracts of *H. erinaceus* fruit bodies

2.3 DPPH·自由基清除活性

随着维生素C浓度的增加,对DPPH·清除率增强。在试验浓度范围内,维生素C浓度与DPPH·清除率呈现出良好的量效关系。猴头菌水提取物和醇提取物对DPPH·清除率在一定浓度范围内具有很好的量效关系。水提取物对DPPH·清除效果要明显高于醇提取物,2mg/mL的水提取物清除率高达93.33%,而2mg/mL的醇提取物清除率只有36.85%(图3)。

图3 猴头菌提取物对DPPH·自由基的清除活性
Fig. 3 DPPH· scavenging activity of aqueous and ethanolic extracts of *H. erinaceus*

2.4 $O_2^{\cdot-}$ 自由基清除活性

在试验浓度2~18mg/mL范围内,猴头菌水提取物和醇提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率随着提取物浓

度的增加而增加。水提物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果明显要高于醇提物 (图 4)。

图 4 猴头菌提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基活性
Fig. 4 $O_2^{\cdot-}$ scavenging activity of aqueous and ethanolic extracts of *H. erinaceus*

3 讨论

1956年 DENHAM HARMAN 提出衰老的自由基学说,认为衰老过程中的退行性变化是由于细胞正常代谢过程中产生的自由基的有害作用造成的;机体中适量的自由基对细胞分裂、分化、生长、消炎解毒等生理过程起积极作用,但过量的自由基则会引起蛋白质变性、酶失活、多糖降解、DNA 链断裂、生物膜结构损伤、细胞解体乃至机体病变和死亡^[10]。已有许多研究指出,自由基和活性氧是细胞癌变的原始引发机制^[11,12]。在本研究中,笔者发现猴头菌子实体具有清除自由基的功能,这与早期中医的研究结果相吻合,具有抗衰老、抗氧化等功效。当机体内的自由基过量,食用猴头菌具有清除一些自由基功能,降低其负面影响,从而使我们机体更加健康。本实验中发现,猴头菌醇提物显示出良好的总还原力,且总还原力大小与浓度成正比;而水提物则显示出很低的总还原力且不随浓度的增加而增加。水提物具有很好的清除 $\cdot OH$ 、 $DPPH\cdot$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 的活性,并且在一定浓度范围内,清除率与其浓度成正比;在相同的浓度下 (2mg/mL),清除 $DPPH\cdot$ 的能力最强, $\cdot OH$ 次之, $O_2^{\cdot-}$ 最弱。醇提物具有很好的清除 $DPPH\cdot$ 的能力,且清除率与其浓度成正比;其次为清除 $\cdot OH$; 最差的为清除 $O_2^{\cdot-}$ 。从还原力和清除自由基两个方面,猴头菌提取物在不同方面表现出各自的活性,这可能与其所含不同的化学成

分有关,而猴头菌具体哪些成分与其总还原力及对自由基的清除作用有关还有待进一步研究。

参考文献

- [1] DIPLOCK AT, CHARLEUX JL, CROZIER WILLY GK, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species[J]. Br J Nut, 1998, 80: 77-112.
- [2] LEE IK, KIM YS, JANG YW, et al. New anti-oxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17: 6678 - 6681.
- [3] MAU JL, LIN HC, CHEN CC. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 6072-6077.
- [4] 刘梅森, 陈海晏, 孙红斌. 猴头菌的药用价值概述[J]. 中国食用菌, 1999, 18(1): 24-25.
- [5] SHON MY, CHOI SD, KAHNG GG, et al. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions [J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42: 659-666.
- [6] SMIRNOFF N, CUMBES OJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057-1060.
- [7] CAVIN A, HOSTETTMANN K, DYATMYKO W, et al. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa* [J]. Planta Med, 1998, 64: 393-396.
- [8] TAKASHI Y, KAZUKO M, TSUTOMU H, et al. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(7): 1919-1921.
- [9] 陈美珍, 余杰, 龙梓洁, 等. 龙须菜多糖抗突变和清除自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 219-222.
- [10] 钱传光, 周军, 赵文, 等. 泥鳅多糖清除活性氧和保护 DNA 链的作用[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(2): 215-218.
- [11] MARX JL. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. Science, 1987, 235: 529-531.
- [12] 庞战军, 陈瑗, 周玫. 云芝多糖对巨噬细胞 GPx 基因表达的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(3): 284-288.

