

南极地衣提取物抗氧化能力的初步研究

韩乐琳¹ 魏江春^{2*}

¹河北大学生命科学学院 保定 071002

²中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学重点实验室 北京 100101

摘要: 本文讨论 4 种南极地衣簇花石萝 *Usnea aurantiacoatra*, 南极石萝 *Usnea antarctica*, 粉球衣 *Sphaerophorus globosus* 及一种石蕊 *Cladonia* sp. 甲醇提取物的体外抗氧化能力; 采用亚油酸氧化体系、二苯代苦味酰自由基体系、还原力实验对其抗氧化活性进行测定, 并同维生素 C、丁基甲氧基苯酚进行比较。结果显示供试南极地衣均具有较高的抗氧化活性, 且呈剂量依赖关系; 其中, 簇花石萝的脂质过氧化抑制率最高, 还原力最大; 石蕊的二苯代苦味酰自由基清除能力最大。此外, 从簇花石萝中提取的松萝酸具有一定的抗氧化活性, 但明显低于簇花石萝粗提物。

关键词: 抗氧化活性, 地衣, 南极

A preliminary study on antioxidant ability of Antarctic lichen extract

HAN Le-Lin¹ WEI Jiang-Chun^{2*}

¹College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

²Systematic Mycology and Lichenology Laboratory, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: This paper deals with antioxidant ability of methanol extract from 4 Antarctic lichens, i.e. *Usnea aurantiacoatra*, *Usnea antarctica*, *Sphaerophorus globosus* and *Cladonia* sp. The antioxidant ability was detected by the linoleic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and reducing power systems, and compared with that of commercial antioxidant Vitamin C and butylated hydroxyanisole (BHA). The results showed that the lichens collected from Antarctica exhibited high antioxidant activities, and the antioxidant activity was concentration-dependent. Among 4 lichens, *Usnea aurantiacoatra* had the maximum inhibitory ratio of lipid peroxidation and reducing power, *Cladonia* sp. showed the maximum scavenging activity on DPPH free radical. Besides, usnic acid from *Usnea aurantiacoatra* also exhibited antioxidant activity, however, its activity was lower than that of the crude extract from *Usnea aurantiacoatra*.

Key words: antioxidant activity, lichen, Antarctica

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) (No. 2007AA021405)

*Corresponding author. E-mail: weijc2004@126.com

收稿日期: 2009-05-07, 接受日期: 2009-05-27

地衣是由真菌和藻类或蓝细菌结合在一起而构成的共生复合体,共生的真菌大多数为子囊菌类,少数为担子菌类。藻类和蓝细菌含有光合色素,能进行光合作用为整个地衣体制造养分;真菌则吸收外界水分和无机盐供给光合生物体,使之保持一定的湿度和得到光合作用所需原料。地衣体虽无根茎叶等分化,但环境适应力极强,能耐高温,低温,干旱等。

南极的气候酷寒、干燥、风大、日照不均、营养缺乏和生长季节很短等因素严重制约了高等植物的生长和发育,致使南极群岛仅有两种高等植物。但地衣因其极强的环境适应力,广泛分布于南极大陆的沿海地带及其附近岛屿的岩石上。

生物体代谢过程中发生一系列氧化还原反应,产生超氧阴离子,羟基自由基等代谢中产物(Sies 1993)。这些物质易引起膜脂过氧化反应,导致脂质过氧化物的堆积,引起膜结构和功能的紊乱。它们自身的过氧化产物及其次级氧化产物,具有很高的反应活性,能与生物酶底物,如蛋白质、氨基酸、脱氧核糖核酸发生反应(Kehrer 1993),引起蛋白质交联,酶活性改变,损伤DNA,引起突变等(方允中和李国杰 1989)。

适当补充外源性抗氧化剂可清除自由基,阻断脂质过氧化反应,保持食物品质,治疗或缓解病症。因此,抗氧化剂在食品和医药工业中作用很重要。合成抗氧化剂,如丁基甲氧基苯酚(butylated hydroxyanisole: BHA)、丁基甲基苯酚(butylated hydroxytoluene: BHT)和叔丁基对苯二酚(tertiary butylated hydroquinone: TBHQ)广泛应用于食品工业,但是, BHA, BHT曾被怀疑会引起肝损伤和癌症(Grice 1986; Wich 1988),其安全性已引起人们的质疑。所以,发展和应用更多有效的天然来源抗氧化剂正日益受到人们的关注。

地衣由于其独特的生理生化特性,正日益受到学者的关注。许多地衣,如岛衣*Cetraria islandica* (L) Ach等具有较强的抗氧化能力,*C. islandica*的还原力,超氧阴离子和自由基清除能力均较强(Ilhami 2002)。目前,南极生物特别是地衣的抗氧化活性的报道比较少(Babita *et al.* 2007),迄今尚无来自簇花石萝*Usnea aurantiaco-atra*, 南极石萝*Usnea*

antarctica, 球粉衣*Sphaerophorus globosus*, 以及石蕊*Cladonia* sp.等地衣抗氧化相关报道。本研究旨在与BHA、VC比较中阐明上述南极地衣的抗氧化能力,为南极地衣物种资源及其基因资源的研究与开发提供科学依据,评估其应用价值和开发前景。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用地衣采自西南极设特兰群岛中乔治王岛附近企鹅岛的球粉衣*Sphaerophorus globosus* (Huds.) Vain.和一种石蕊*Cladonia* sp., 以及长城站附近的簇花石萝*Usnea aurantiacoatra* (Jacq.) Bory和南极石萝*Usnea antarctica* Du Rietz。

1.2 试剂药品

亚油酸(linoleic acid), 二苯代苦味酰自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl: DPPH), NH_4SCN , Tween-20, NADH(还原型辅酶I二钠盐), VC(抗坏血酸), BHA(丁基甲氧基苯酚), TCA(三氯乙酸)均购自Sigma公司; 95%甲醇, FeCl_3 , FeCl_2 为国产分析纯。

1.3 主要仪器

采用UNICO UV-2800紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

1.4 抗氧化活性测定

1.4.1 样品提取与制备: 地衣体粗体物的提取与制备: 0.5g干燥地衣体粉碎后浸于40mL甲醇溶液中24h, Whatman No.1定性滤纸过滤, 滤液旋转蒸干, -20°C 保藏待用。

地衣体甲醇浸提物溶于95%甲醇, 配成浓度为1、0.5mg/mL反应液, 并配制相同浓度的VC、BHA溶液, 备用。

松萝酸提取与制备: 1.5g簇花石萝干燥地衣体粉碎后浸于120mL甲醇溶液中24h, Whatman No.1定性滤纸过滤。用TLC法分离并鉴定该甲醇浸提液中的不同组分, 发现2个化学物质。其中, 松萝酸(usnic acid)为主要成分。将TLC板上松萝酸区域取出溶于一定体积的95%甲醇, 浸泡24h, Whatman No.1定性滤纸过滤, 滤液旋转蒸干, -20°C 保藏待用。

反应液的制备: 上述甲醇浸提物溶于95%甲醇, 配成浓度为1、0.5mg/mL反应液, 并配制相同浓度

的VC、BHA溶液，备用。

1.4.2 亚油酸体系 (Linoleic Acid System): 采用硫氰酸氨法 (Mitsuda *et al.* 1996)。

1.4.3 DPPH 自由基体系 (DPPH Free Radical System): 采用Blois的方法 (Blois 1958)。

1.4.4 还原力测定: 采用Oyaizu的方法 (Oyaizu 1986)。

2 结果与讨论

2.1 亚油酸体系

本试验采用硫氰酸氨法测定地衣体粗提取物对亚油酸脂质过氧化的抑制作用。亚油酸易在空气中发生自氧化，变为氧化剂，和 FeCl_2 反应使其生成 FeCl_3 ，而 FeCl_3 可与 NH_4SCN 反应生成 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ ，此物质颜色为血红色。若地衣提取物具有抗氧化活性，则加入后会减弱亚油酸的自氧化效应，从而减弱 FeCl_2 的氧化反应，生成 FeCl_3 的量相应减少，最终 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 的生成量减少，颜色变淡。通过比色测定 (紫外分光光度计， $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 在 500nm 处具有最大光吸收)，吸光值大小即可检测抗氧化活性的高低，吸光值大，表明溶液颜色深，抗氧化活性低。

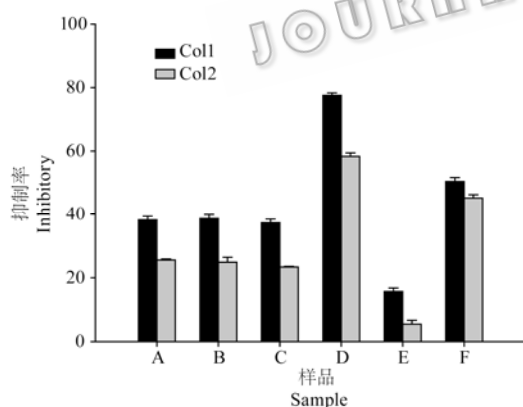


图1 脂质过氧化抑制率

Fig. 1 Inhibitory ratio of lipid peroxidation.

亚油酸过氧化抑制率 (I%) 计算公式如下: $I\% = (1 - A\text{-sample}/A\text{-blank}) \times 100$ ，其中，A-blank为阴性对照吸光值，A-sample为被测样品吸光值。图1中，Col1表示高浓度组 (1mg/mL) 亚油酸过氧化抑制率，Col2表示低浓度组 (0.5mg/mL) 亚油酸过氧化抑制率，A-D分别表示石蕊 *Cladonia* sp.、球粉衣 *Sphaerophorus globosus*、南极石萝 *Usnea antarctica*、簇花石萝 *Usnea aurantiaco-atra* 甲醇提取物的脂质

过氧化抑制率，E表示松萝酸的脂质过氧化抑制率，F表示VC的脂质过氧化抑制率。

地衣体粗提取物对亚油酸的脂质过氧化反应有阻断作用，其阻断作用随提取物浓度增加而增加，呈量效关系 (图1)。其中，簇花石萝氧化抑制率最高，石蕊、球粉衣和南极石萝氧化抑制水平相当，均低于阳性对照VC。较之VC，簇花石萝提取物在抑制脂质过氧化方面能力很强。

由图1可知，松萝酸的脂质过氧化抑制能力远低于其来源的簇花石萝提取物。由此可知，松萝酸并非该种地衣抑制脂质过氧化的主要有效成分。

2.2 DPPH 自由基体系

DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基，呈紫色，在 517nm 处有最大光吸收。当自由基清除剂存在时，DPPH 的孤电子被配对，使其颜色变浅，在最大吸收波长处的吸光度变小，且这种颜色的变浅程度与配对电子数成化学计量关系。因此，通过测定 517nm 处吸光度可评价自由基的清除情况。

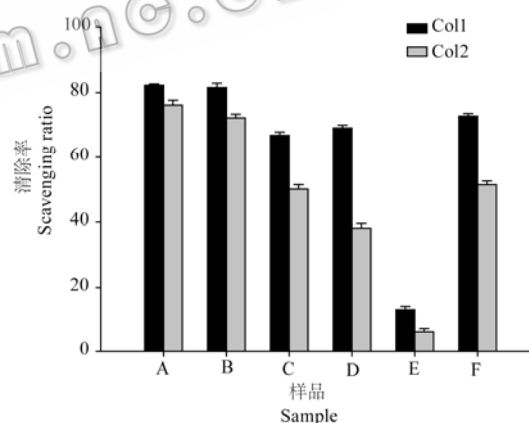


图2 DPPH 自由基清除率

Fig. 2 Scavenging ratio on DPPH free radical.

DPPH 清除率 (I%) 计算公式如下: $I\% = (1 - A\text{-sample}/A\text{-blank}) \times 100$ ，其中，A-blank为阴性对照吸光值，A-sample为被测样品吸光值。图2中，Col1表示高浓度组 (1mg/mL) DPPH清除率，Col2表示低浓度组 (0.5mg/mL) DPPH清除率，A-D分别表示石蕊 *Cladonia* sp.、球粉衣 *Sphaerophorus globosus*、南极石萝 *Usnea antarctica*、簇花石萝 *Usnea aurantiaco-atra* 甲醇提取物的DPPH自由基清除率，E表示松萝酸的DPPH自由基清除率，F表示VC的DPPH自由基清除率。

自由基清除实验结果表明,样品及对照的自由基清除能力强弱与溶液浓度成正相关,即提取物浓度越大则吸光值越大,进而可知其自由基清除能力越大(图2)。其中石蕊清除能力最高,簇花石萝清除能力较低,而阳性对照BHA的清除率低于石蕊和粉球衣,略高于南极石萝和簇花石萝。

由图2可知,松萝酸的自由基清除能力远低于其来源的簇花石萝提取物。因此,松萝酸并非该种地衣清除自由基的主要成分。

2.3 还原力测定

采用 Oyaizu 法 (1986) 测定地衣体提取物还原力大小。 $K_3Fe(CN)_6$ 中的 Fe^{3+} 被样品中的有效成分还原为 Fe^{2+} , 以 $K_4Fe(CN)_6$ 形式存在, $K_4Fe(CN)_6$ 与 $FeCl_3$ 反应生成蓝色物质 $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, 样品还原力越大, 则生成的蓝色物质越多, 吸光值越大。

样品还原力大小如图3所示, 图中, Col1表示高浓度组 (1mg/mL) 样品还原力, Col2表示低浓度组 (0.5mg/mL) 样品还原力, A-D分别表示石蕊 *Cladonia* sp.、球粉衣 *Sphaerophorus globosus*、南极石萝 *Usnea antarctica*、簇花石萝 *Usnea aurantiaco-atra* 甲醇提取物的还原力, E表示松萝酸的还原力, F表示VC的还原力。

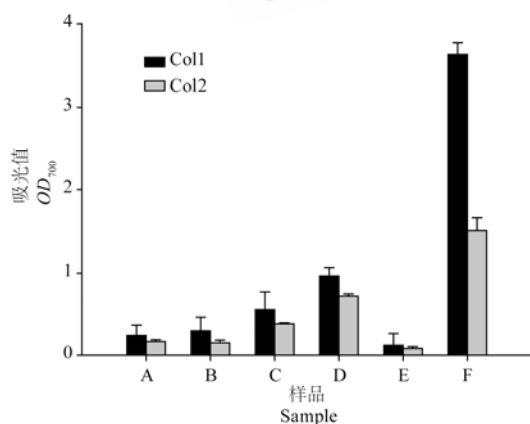


图3 还原力实验吸光值

Fig. 3 OD value of raducing power experiment.

图3表明样品及对照的还原力强弱与溶液浓度成正相关性, 即同一样品提取物浓度越大则吸光值越大进而可知其还原力越大; 四种地衣还原力较阳性对照BHA而言均较小。其中, 簇花石萝还原力最大, 并远大于从中分离的松萝酸, 由此推断, 松萝酸并非该种地衣还原力的主要成分。

3 结论

南极地衣甲醇提取物与参照物VC或BHA的比较研究显示, 4种供试南极地衣均具有较强的抗氧化能力: 簇花石萝还原力和抑制脂质过氧化能力均很强; 石蕊对DPPH自由基清除能力很高。

簇花石萝粗提物及其抗氧化活性组分的初步分析表明, 组分之一松萝酸的抗氧化活性明显低于地衣体粗提物。由此推断, 松萝酸虽具有一定的抗氧化活性, 但不是簇花石萝主要的抗氧化活性物质。有关簇花石萝抗氧化活性组分的分析及主要抗氧化活性物种的确定, 尚有待进一步研究。

[REFERENCES]

- Babita P, Hari DB, Lee JS, Hong SG, Shin HW, Yim JH, 2007. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biology*, **31**: 605-608
- Blois MS, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**: 1199-1200
- Fang YZ, Li WJ, 1989. Free radical and enzyme. Science Press, Beijing. 244 (in Chinese)
- Grice HC, 1986. Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*, **24**: 1127-1130
- Ilhami G, 2002. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**: 325-329
- Kehrer JP, 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, **23**: 21-48
- Mitsuda H, Yuasumoto K, Iwami K, 1996. Antioxidation action of indole compounds during the antioxdation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, **19**: 210-214
- Oyaizu M, 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**: 307-315
- Sies H, 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, **215**: 213-219
- Wichi HP, 1988. Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, **26**: 717-723

[附中文参考文献]

方允中, 李文杰, 1989. 自由基与酶. 北京: 科学出版社. 244