

# 角石蕊中松萝酸的提取及生物活性研究

热衣木·马木提, 阿地里江·阿不都拉, 阿不都拉·阿巴斯\*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘 要:** 以采自新疆天山后峡地区角石蕊为实验材料, 从角石蕊中提取松萝酸, 并对其抗氧化活性和抑菌活性进行测定, 以松萝酸标准品和 VC 为参照物。结果表明: 样品具有较强的还原力和清除羟自由基、超氧阴离子自由基的能力; 松萝酸对细菌的生长均有明显的抑制作用, 其中对变形杆菌的抑制作用最强, 对大肠杆菌的抑制作用次之, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用较弱, 对枯草芽孢杆菌的抑制作用最弱。

**关键词:** 角石蕊; 松萝酸; 抗氧化; 抑菌

## Extraction and Bioactivity of Usnic Acid from *Cladonia cornuta* (L.) Hoffm.

Reyim MAMUT, Adilijiang ABDULLA, Abdulla ABBAS\*

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

**Abstract:** *Cladonia cornuta* (L.) Hoffm harvested from Xinjiang's Tianshan No.1 glacier was used as the experimental material to extract usnic acid and determine its antioxidant activity and antibacterial activity. Results indicated that the usnic acid extracted from *Cladonia cornuta* (L.) had higher reducing power and antioxidant capacity. Meanwhile, usnic acid exhibited a significant inhibition on the growth of bacteria such as *Proteus bacillus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

**Key words:** *Cladonia cornuta* (L.); usnic acid; antioxidant; antibacterial

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0057-04

地衣是一类多年生独特的生物类群, 地衣类早已被人类用于医药方面。地衣主要成分松萝酸已经成为研究最广泛的地衣物质之一。松萝酸在树发属、石蕊属、茶渍衣属、松萝属、树花属及扁枝衣地衣属中较为丰富。角石蕊是地衣植物石蕊属的一种类型, 松萝酸也是其主要成分之一。对于松萝酸的抗菌功能、化学性质及其在医药、环境监控等各个领域的应用研究, 可见于各种外文文献的报道<sup>[1-2]</sup>。美国、日本及德国的应用研究较多; 而中国、智利、南斯拉夫、印度尼西亚等国仍然在致力于松萝酸的提取、抗菌、抗病毒等基础方面的研究<sup>[3-5]</sup>。本研究从角石蕊中提取松萝酸并对松萝酸的抗氧化活性和抑菌活性进行测定, 旨在为松萝酸的进一步开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

角石蕊于 2009 年 10 月采自新疆天山后峡地区英雄桥附近海拔 1800~2200m 之间的阴坡。

丙酮、苯、乙醇、0.2mol/L pH6.8 磷酸缓冲液、铁氰化钾溶液(质量浓度为 0.01g/mL)、三氯乙酸溶液(质量浓度为 0.1g/mL)、三氯化铁溶液(质量浓度为 0.001g/mL)、9mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液、9mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、8.8mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)、3mmol/L 邻苯三酚溶液、松萝酸对照品、VC、蛋白胨、氯化钠、酵母浸粉、琼脂等均为分析纯。

DHG-9141A 型电热恒温干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; SHZ-D 循环水式真空泵、HH-S 电热恒温水浴锅 巩义市英峪予华仪器厂; RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; Spectrumlab 53 紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; 超净工作台 苏州自动化仪器仪表研究所有限公司; YXO-SG46-280S 手提式灭菌锅 杭州中拓仪器有限公司; MGC-400B 光照培养箱 上海楚柏实验室设备有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 角石蕊中松萝酸的提取及抗氧化性能测定

##### 1.2.1.1 角石蕊中松萝酸的提取

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960003; 30750012); 新疆大学校院联合资助项目(XY080122)

作者简介: 热衣木·马木提(1978—), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为地衣资源。E-mail: reym\_mamut@xju.edu.cn

\* 通信作者: 阿不都拉·阿巴斯(1951—), 男, 教授, 博士, 研究方向为地衣资源。E-mail: abdulla@xju.edu.cn

称取剪碎的角石蕊地衣 10g 置于 500mL 烧瓶中用丙酮 200mL 回流提取 3 次, 每次 3h, 合并提取液, 浓缩至原体积的 1/6~1/8, 自然冷却, 析出结晶, 即得松萝酸粗品。向粗品中加入 60 倍量苯-乙醇(体积比为 1:1)混合溶剂, 回流 2h, 趁热过滤, 将滤液浓缩至原体积的 1/5, 冷却析出结晶, 用丙酮重结晶一次, 所得淡黄色针晶即为松萝酸纯品<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.1.2 松萝酸标准溶液的制备

称取 40mg 松萝酸标准品, 用丙酮稀释定容至 100mL, 然后取 20mL 用丙酮定容至 150mL, 配成质量浓度为 0.0533mg/mL 松萝酸标准溶液。

#### 1.2.1.3 样品溶液的制备

取 1.2.1.1 节法提取的松萝酸纯品用丙酮稀释定容至 100mL, 然后取 1.17mL 用丙酮定容至 150mL, 配成质量浓度为 0.0533mg/mL 样品溶液。

#### 1.2.1.4 VC 溶液的制备

准确称取 0.1g VC 用 20mL 水稀释, 然后取 1.60mL 定容于 150mL, 配成质量浓度为 0.0533mg/mL VC 溶液。

#### 1.2.1.5 还原力的测定<sup>[7]</sup>

分别准确吸取 2.0mL 不同质量浓度的样品液、VC 溶液、松萝酸标准溶液, 加入 0.2mol/L pH6.8 磷酸缓冲液 2.0mL, 铁氰化钾溶液 2.0mL, 50℃水浴 20min 后急速冷却, 加入三氯乙酸溶液 2.0mL、加蒸馏水 4.0mL、三氯化铁溶液 1.0mL, 混合后 10min 以蒸馏水作参比于 700nm 波长处测定吸光度, 吸光度越大则还原力越强。

#### 1.2.1.6 羟自由基清除率的测定<sup>[8]</sup>

反应体系为: 9mmol/L FeSO<sub>4</sub> 1.0mL, 9mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1.0mL, 不同质量浓度的样品液(或 VC 溶液, 松萝酸标准溶液)2.0mL, 最后加 8.8mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0mL 启动反应, 37℃反应 0.5h, 以蒸馏水为参比, 在 510nm 波长处测定各溶液的吸光度, 考虑到本身的吸光度, 以 1.0mL 9mmol/L FeSO<sub>4</sub>、1.0mL、9mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、不同质量浓度的样品液(或 VC 溶液, 松萝酸标准溶液)2.0mL 加蒸馏 1.0mL 混合液, 作为样品液的本底吸收。其清除率按公式(1)计算。

$$\cdot\text{OH 清除率}/\% = (1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}) \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_0$  为空白对照溶液吸光度;  $A_x$  为样品反应液吸光度;  $A_{x0}$  为不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 样品反应液的本底吸光度。

#### 1.2.1.7 超氧阴离子自由基清除率的测定<sup>[9]</sup>

采用邻苯三酚自氧化法。取 4.5mL、pH8.2、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 4.2mL 蒸馏水, 混合后在 25℃水浴保温 20min 后急速冷却, 立即加入 25℃预热过的 3mmol/L 邻苯三酚 0.3mL, 总体积 9.0mL, 作为空白对照。在加

入邻苯三酚前先加入 2.0mL 不同质量浓度的样品液(VC 溶液或松萝酸标准溶液), 蒸馏水相应减为 2.2mL, 作为样品反应液。测定反应启动后 10min 时的  $A_{325\text{nm}}$  值, 清除率按公式(2)计算。

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率}/\% = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空}}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_{\text{空}}$  为空白管吸光度;  $A_{\text{样}}$  为样品反应液吸光度。

#### 1.2.2 角石蕊中松萝酸抑菌活性的测定

##### 1.2.2.1 松萝酸抑菌活性的测定<sup>[10-14]</sup>

抑菌活性测定采用滤纸片法。将 102 型滤纸制成直径为 6mm 的圆纸片, 放入干燥的小烧杯中, 121℃高压蒸汽灭菌 30min 后备用, 用无菌吸管吸取已制备好的菌悬液 0.1mL, 加入已制好的平面培养基中涂布均匀, 然后将经过灭菌并饱和吸入质量浓度为 6.824mg/mL 松萝酸丙酮溶液的滤纸放入含菌皿上, 对照用滤纸饱和吸入蒸馏水, 放置于接种菌种的皿中。实验设 3 次重复, 在恒温培养箱(37℃)中培养 24h。然后用游标卡尺测定培养 24h 的抑菌圈直径大小, 以此判断松萝酸的抑菌力。

##### 1.2.2.2 松萝酸最低抑菌质量浓度(MIC)测定

最低抑制浓度的测定采用滤纸片法, 用丙酮作溶剂, 分别配制成质量浓度为 6.824、5.459、4.094、2.729、1.365、0.682、0.341mg/mL 的松萝酸溶液。以没有抑菌圈的松萝酸质量浓度为最小抑菌质量浓度。供试菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 还原力的测定结果

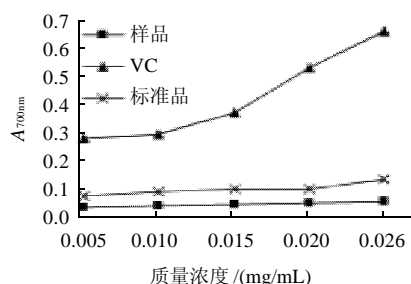


图1 不同抗氧化剂的还原力

Fig.1 Reducing power of different antioxidants

由图1可知, 三者都随质量浓度的增大还原力逐渐增大, 其增加的趋势是: VC > 松萝酸标准品 > 样品。总体来看, 样品具有一定的还原力, 但松萝酸标准品的还原力要强于样品。三者的还原力强弱顺序为 VC > 松萝酸标准品 > 样品。

## 2.2 羟自由基清除率的测定结果

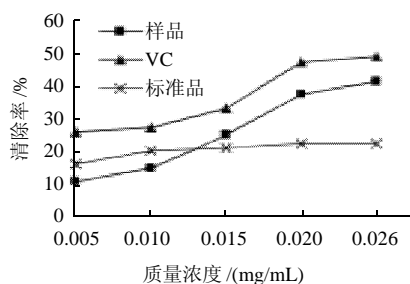
图2 不同抗氧化剂清除 $\cdot\text{OH}$ 活性的量效关系

Fig.2 Scavenging activities of different antioxidants on hydroxyl free radicals

由图2可知,三者对清除 $\cdot\text{OH}$ 均有较好的量效关系。VC对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随着质量浓度的增加而增强,标准品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率在0.005~0.015mg/mL范围内强于样品,而质量浓度0.015mg/mL时标准品和样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率很接近,质量浓度大于0.015mg/mL样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率强于标准品。

## 2.3 超氧阴离子自由基清除率的测定结果

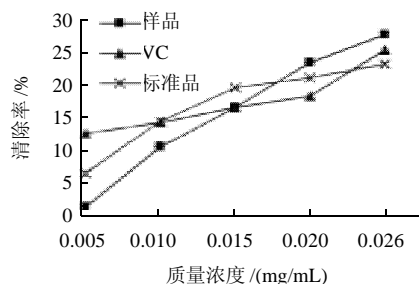
图3 不同抗氧化剂清除 $\text{O}_2^-$ 活性的量效关系

Fig.3 Scavenging activities of different antioxidants on superoxide anion free radicals

由图3可知,三者对 $\text{O}_2^-$ 的清除作用都随质量浓度的增大而增强,质量浓度在0.005~0.015mg/mL范围内三者对 $\text{O}_2^-$ 的清除率都呈增强趋势,标准品对 $\text{O}_2^-$ 的清除率强于样品。质量浓度0.015mg/mL时三者对 $\text{O}_2^-$ 的清除率都很接近,并标准品对 $\text{O}_2^-$ 的清除率强于样品。质量浓度大于0.015mg/mL时样品对 $\text{O}_2^-$ 的清除率增强,并强于VC和标准品。这表明,样品对 $\text{O}_2^-$ 有较强的清除能力。

## 2.4 松萝酸抑菌活性的测定结果

由表1可知,质量浓度为6.824mg/mL的松萝酸-丙酮溶液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌均有不同程度的抑制作用,其中对变形杆菌抑制作用最强,24h的抑菌圈直径达到了14mm;其次为对大肠杆菌的抑制作用,24h的抑菌圈直径达到了13mm;对金黄色葡萄球菌的抑制作用,24h的抑菌圈

直径达到了12mm。对枯草芽孢杆菌的抑制作用最弱,24h的抑菌圈直径达到了11mm,表明松萝酸对供试细菌的抑制作用较强。对照蒸馏水则对上述供试菌均无明显抑制作用。

表1 松萝酸对供试菌种的抑制效果

Table 1 Bacteriostatic activity of usnic acid (inhibitory zone diameter: mm)

供试菌种	抑菌圈直径/mm	
	松萝酸	对照品(蒸馏水)
变形杆菌	14	—
大肠杆菌	13	—
金黄色葡萄球	12	—
枯草芽孢杆菌	11	—

注:—,无抑菌效果。

## 2.5 松萝酸最低抑菌质量浓度(MIC)

表2 不同质量浓度松萝酸对各供试菌的最低抑菌质量浓度(MIC)

Table 2 Minimum inhibitory concentrations of usnic acid for different bacteria

质量浓度/(g/100mL)	变形杆菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
100	—	—	—	—
80	—	—	—	—
60	—	—	—	—
40	—	—	—	+
20	—	—	+	++
10	—	+	+	++
5	+	+	++	++

注:—,无菌生长;+,菌少量生长;++,菌大量生长。

由表2可知,角石蕊松萝酸提取液对变形杆菌的最低抑菌质量浓度为10g/100mL,对大肠杆菌的最低抑菌质量浓度为20g/100mL,对金黄色葡萄球菌的最低抑菌质量浓度为40g/100mL,对枯草芽孢杆菌最低抑菌质量浓度为60g/100mL。角石蕊松萝酸提取液对变形杆菌的MIC为最小。因此以上结果表明松萝酸对变形杆菌抑制力最强,对大肠杆菌的抑制力次之,对金黄色葡萄球菌的抑制力其次,而对枯草芽孢杆菌的抑制力最弱。

## 3 结 论

从角石蕊中提取的松萝酸具有较强的还原力,但松萝酸标准品的还原力强于样品。样品清除 $\cdot\text{OH}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 为0.023mg/mL,清除 $\text{O}_2^-$ 的 $\text{IC}_{50}$ 为0.156mg/mL,松萝酸清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力强于 $\text{O}_2^-$ 。抑菌实验结果表明松萝酸对变形杆菌抑制力最强,对大肠杆菌的抑制力次之,对金黄色葡萄球菌的抑制力其次,而对枯草芽孢杆菌的抑制力最弱。松萝酸是从地衣中提取的天然防腐剂,具有用量少,安全性高等优点。

## 参考文献:

- [1] CARDARELLI M, SERINO G, CAMPANELLA L. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53: 667-672.
- [2] BJERKE J W, JOLY D, NILSEN L. Spatial trends in usnic acid concentrations of the lichen *Flavocetraria nivalis* along local climatic gradients in the Arctic[J]. Polar Biology, 2004, 27: 409-417.
- [3] 王丽, 阿地里江·阿不都拉, 阿不都拉·阿巴斯, 等. 松萝酸研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(4): 472-473.
- [4] 赵小钊. 防腐剂松萝酸的实验研究[J]. 化学工程师, 2000(1): 9; 12-13.
- [5] 阿不都拉·阿巴斯, 吴继农. 新疆地衣[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1998.
- [6] 李荣软, 苏印泉, 宋晓斌, 等. 松萝酸的防腐作用研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(5): 128-130.
- [7] 崔月花, 徐鹏, 章克昌. 灵芝液态发酵有效产物体外抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(8): 32-34.
- [8] 杨宁, 赵谋明, 刘洋. 野生仙人掌多糖抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2007(2): 147-150.
- [9] 吾春霞, 古丽巴哈尔·阿巴拜克力, 阿不都拉·阿巴斯. 两种菊科植物总黄酮的抗氧化试验[J]. 食品发酵与工业, 2008, 34(2): 108-111.
- [10] SAENZ M T, GARCIA M D, ROWE J G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain[J]. Fitoterapia, 2006, 77: 156-159.
- [11] WECKESSERA S, ENGELA K, SIMON-HAARHAUSA B, et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance[J]. Phytomedicine, 2007, 14: 508-516.
- [12] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [13] 霍光华, 高荫榆, 陈明辉. 乌柏叶抑菌活性功能成分的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 52-56.
- [14] 严赞开. 生姜提取物的抑菌试验[J]. 中国食品添加剂, 2005(1): 74-76.