

灰树花水上清液中不同极性提取物的功能成分及其抗氧化活性

熊雯宇¹, 何君强¹, 刘斌^{1,2*}

(¹福建农林大学食品科学学院 福州 350002

²国家菌草工程技术研究中心 福州 350002)

摘要 分别采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水不同极性溶剂提取灰树花水提上清液,比较不同极性提取物的主要功能成分及利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS⁺)、羟基(OH)自由基 3 种方法比较抗氧化活性。结果表明,正丁醇提取物的多酚和蛋白质含量最高,分别为 0.36%和 38.75%;石油醚和乙酸乙酯提取物中黄酮含量最高,均为 0.05%;石油醚提取物的三萜、甾醇含量最高,分别为 6.32%和 15.88%;水提取物中多糖含量最高,为 30.11%。正丁醇提取物具有最强的抗氧化活性,多酚是主要起抗氧化活性的成分。通过高效液相色谱质谱联用法(LC-MS)鉴定了 13 个多酚及其衍生物。本研究为灰树花功能性食品或保健品的开发提供了理论依据。

关键词 灰树花; 水提上清液; 功能成分; 抗氧化

文章编号 1009-7848(2023)12-0302-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.031

灰树花是一种重要且具有特色的农产品,也是一种营养价值极高的食药两用真菌^[1]。根据中国古代《神农本草》记载,灰树花可改善脾胃病^[2]。研究表明,灰树花中含有丰富的功能成分,如多酚类化合物、多糖、氨基酸以及蛋白质等^[3]。此外,灰树花的抗氧化、抗肿瘤、抗病毒以及改善血脂异常、糖尿病和心血管疾病等活性作用也被广泛报道^[4-5]。自由基在氧化过程中起着重要作用,其过量生成可引发肿瘤、糖尿病、肝损伤等诸疾病以及加速机体衰老过程^[6]。近年来,越来越多的研究者关注清除自由基能力强、安全性高、无副作用的天然抗氧化剂。研究表明,灰树花水提物在超氧阴离子和羟基自由基方面表现出高效的自由基清除作用^[7]。植物中存在的天然活性成分多糖、酶、蛋白质等大分子物质,氨基酸、黄酮、多酚、酚酸类等小分子类化合物都具有较好的抗氧化作用^[8]。对灰树花中含有的抗氧化活性成分的分析以及抗氧化能力研究,为进一步开发灰树花天然抗氧化剂,发挥机体健康防护作用,具有重要意义。

为综合利用原料并提高其价值,本课题组将灰树花用乙醇提取后的残渣进行水提取,将此水

提取液用乙醇沉淀、分离,得到醇沉和上清液两个部分。此前研究显示,灰树花乙醇提取物对高脂饲料喂养大鼠的脂质代谢相关的 mRNA 表达水平有调节作用,还增加了肠道菌群中有益菌的丰度^[9]。水提取醇沉部分主要成分为多糖,有研究探讨了灰树花多糖对糖尿病小鼠具有降血糖和降血脂活性^[10]。灰树花多糖具有抗病毒活性,可能作为一种潜在的新的抗 EV71 病毒功能食品^[11]。截止目前,有关灰树花水提物中上清液的主要成分及活性未见研究报道。循环利用原料渣为食品工业亟需解决的问题。为更好地了解灰树花水提上清液中的功能成分及活性,本文研究灰树花水提上清液,使用不同极性的有机溶剂依次提取,测定其功能成分的含量,比较其抗氧化活性,旨在为后续功能成分的分离纯化、鉴定提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灰树花子实体,由福建农林大学国家菌草工程技术研究中心提供;石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、无水乙醇、硫酸、苯酚、高氯酸、香草醛等均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS⁺)、没食子酸、葡萄糖、BCA 蛋白定量试剂盒,上海阿拉丁试剂公司;福林-酚试剂、芦丁、齐墩果酸、麦角甾醇、色谱级甲

收稿日期: 2022-12-28

基金项目: 福建省科学技术厅对外合作项目(2021H0008)

第一作者: 熊雯宇,女,硕士生

通信作者: 刘斌 E-mail: liubin618@hotmail.com

醇、色谱级乙腈,上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 设备与仪器

电热恒温鼓风干燥箱,苏州德瑞普烘箱制造有限公司;FD-3 型真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;HH 型数显三用水浴锅,金坛市精达仪器制造厂;SHZ-DIII 型旋转蒸发器,德国赛多利斯集团;TGL16A 型台式高速冷冻离心机,凯特试验仪器有限公司;MK3 型酶标仪、Vanquish 液相色谱仪、QE-HF-X 质谱仪,美国 Thermo 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 灰树花水提取物上清液的制备 新鲜灰树花原料清洗去除沙尘后低温烘干,粉碎成米粒大小的粗粉状在 50℃ 下用体积分数 70% 乙醇进行超声提取。将醇提后的残渣低温烘干至恒重后加入料液比 1:15 的去离子水,在 80℃ 下超声连续提取 1 h,重复 2 次后合并滤液。进行减压浓缩后加入 95% 乙醇放置 24 h,得到灰树花水提上清液(water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*, GFWS),重复 2 次后合并进行减压浓缩备用。

1.3.2 不同极性溶剂分级提取制备 按照溶剂极性从低到高将 GFWS 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行分级提取,分别重复 3 次,具体制备流程见图 1。减压浓缩后分别得到石油醚提取物(petroleum ether extracts, PE)、乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extracts, EAE)、正丁醇提取物(n-butanol extracts, NBE)以及水提取物(water extracts, WE)。

1.3.3 多酚含量的测定 参照文献[12]方法并略有改动。采用福林酚法测定,分别取 0.5 mL 不同浓度没食子酸(10, 20, 30, 40, 50 μg/mL)置于试管中,加入 2.5 mL 10% 福林酚进行反应 5 min。再加入 2 mL 7.5% 碳酸钠避光进行反应 1 h。在 765 nm 处测得吸光值制作标准曲线 $y=7.247x+0.0309$, $R^2=0.9945$ 。分别取 0.5 mL 不同极性样品(1 mg/mL)在同样条件下测得吸光值,代入标准曲线方程后根据式(1)计算多酚含量。

$$\text{多酚含量}(\%) = \frac{X \times N \times V}{M} \times 100 \quad (1)$$

式中: X ——没食子酸质量浓度,mg/mL; N ——稀释倍数; V ——溶液体积,mL; M ——样品

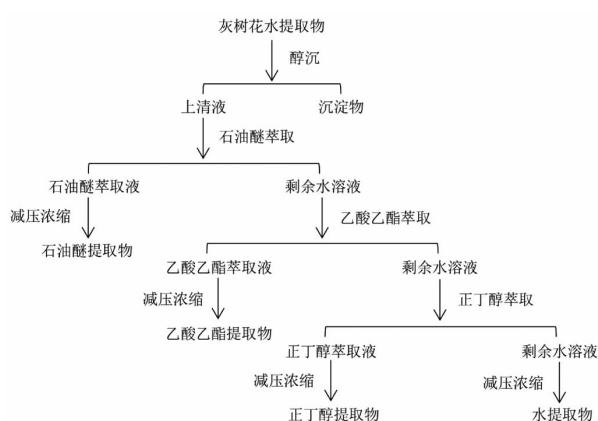


图 1 灰树花水提上清液不同极性溶剂提取物制备流程图

Fig.1 Flow chart of preparation of different polar solvent extracts from the water extraction supernatant of *Grifola frondosa*

质量,mg。

1.3.4 黄酮含量的测定 参照文献[13]方法并稍有调整。芦丁标准品用 30% 乙醇溶解配制质量浓度为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 的溶液,取 50 μL 芦丁溶液再加入 15 μL 5% NaNO₂ 溶液,充分混匀后静置 6 min 后加入 30 μL 5% Al(NO₃)₃ 溶液和 105 μL 4% NaOH 溶液,混合均匀后反应 15 min,于 510 nm 波长下测定吸光度,绘制标准曲线 $y=1.3384x-0.0046$, $R^2=0.9996$ 。分别取 50 μL 不同极性的样品(50 mg/mL),在同样的条件下测定不同极性样品的吸光度,代入标准曲线方程计算各样品中的黄酮含量。

1.3.5 三萜含量的测定 参照文献[14]方法并稍有调整。取齐墩果酸标准品 2 mg,溶于 10 mL 的无水乙醇中,分别从中取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 置试管中,将无水乙醇挥干再加入 0.1 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸,在 60℃ 下反应 20 min,冷却后加入 5 mL 冰醋酸进行混合均匀反应 10 min,于 550 nm 波长下测定吸光度绘制标准曲线 $y=0.0035x-0.0198$, $R^2=0.9994$ 。分别取 0.1 g 不同极性的样品溶于 10 mL 无水乙醇中,超声溶解后备用,在同样的条件下测定不同极性样品的吸光度,代入标准曲线方程计算各样品中的三萜含量。

1.3.6 甾醇含量的测定 参照文献[15]方法并稍有调整。准确称取麦角甾醇标准品 10 mg,溶于 10

mL 的无水乙醇中,分别从中取 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 置试管中,将无水乙醇挥干再加入 0.2 mL 5%香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸,在 60 °C 下反应 15 min,冷却后加入 5 mL 冰醋酸混合均匀,于 546 nm 波长下测定吸光度绘制标准曲线为 $y=2.5004x+0.0599$, $R^2=0.9984$ 。分别取 10 mg 不同极性的样品溶于 10 mL 无水乙醇中,超声溶解后备用,在同样的条件下测定不同极性样品的吸光度,代入标准曲线方程计算各样品中的甾醇含量。

1.3.7 多糖含量的测定 由于多糖种类多、结构复杂、不具备还原性,故本研究的多糖含量测定为苯酚-硫酸法测总糖含量减去 DNS 法测还原糖含量^[16]。

苯酚硫酸法测总糖含量:配制葡萄糖溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1 mg/mL;粗多糖样品配制 1 mg/mL;各取 500 μ L 至玻璃试管中,加入 500 μ L 5%苯酚、2.5 mL 浓硫酸,沸水浴 15 min。待冷却后于 490 nm 波长下测吸光度绘制标准曲线 $y=4.4524x+0.1773$, $R^2=0.9960$,计算样品中的总糖含量。

DNS 法测还原糖含量:称取葡萄糖配制质量浓度 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL 的标准液。样品配制为 2 mg/mL;各取 100 μ L 至试管中,加入 100 μ L DNS 试剂充分混匀。沸水浴 5 min,流水冷却后分别向各试管中加入 800 μ L 蒸馏水,混匀定容。于 540 nm 波长下测吸光度绘制标准曲线为 $y=0.9064x+0.0528$, $R^2=0.9951$,计算样品中的还原糖含量。

1.3.8 蛋白质含量的测定 根据 BCA 蛋白定量试剂盒测得的蛋白质浓度标准曲线是 $y=0.001x-0.0013$, $R^2=0.9985$,计算样品中的蛋白质含量。

1.3.9 DPPH 自由基清除率的测定 参考文献[17]方法并稍作调整。样品溶液配制为质量浓度 0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mg/mL 的溶液。将 100 μ L 样品溶液加入到 100 μ L 0.4 mmol/L DPPH。取 100 μ L 的样品溶液和 100 μ L 的无水乙醇,充分混匀后在室温下避光保存 30 min;在 517 nm 下测量其吸光度。VC 为阳性对照组,DPPH 自由基的清除率按式(2)计算。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%)=1-\frac{A_1-A_2}{A_3}\times 100 \quad (2)$$

式中: $A_1=100 \mu\text{L}$ 样品+100 μL DPPH; $A_2=100$

μL 样品+100 μL 无水乙醇; $A_3=100 \mu\text{L}$ 无水乙醇+100 μL DPPH。

1.3.10 ABTS⁺自由基清除率的测定 参考文献[18]方法并稍作调整。将 ABTS 溶液用 PBS 稀释至在 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 。取 50 μL 样品和 VC 溶液(质量浓度为 0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mg/mL)至 96 孔板中,30 °C 下静置反应 3 min。迅速加入 150 μL 稀释后的 ABTS⁺工作液,振荡充分混匀后在 30 °C 反应 6 min,于 734 nm 处测量其吸光度。PBS 为空白组,VC 为阳性对照组对 ABTS⁺清除率计算见式(3)。

$$\text{ABTS}^+\cdot\text{清除率}(\%)=(1-\frac{A_1-A_2}{A_3})\times 100 \quad (3)$$

式中: $A_1=50 \mu\text{L}$ 样品+150 μL ABTS; $A_2=50 \mu\text{L}$ 样品+150 μL PBS; $A_3=50 \mu\text{L}$ PBS+150 μL ABTS。

1.3.11 羟自由基清除率的测定 参照文献[19]方法稍有改动。取 1 mL 不同浓度的样品和 VC(质量浓度为 0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mg/mL),加入 0.5 mL FeSO₄ 溶液和 0.35 mL H₂O₂ 溶液混匀后在 37 °C 中反应 10 min,再加入 0.15 mL 20 mmol/L 水杨酸充分混匀后 37 °C 中反应 0.5 h,在 562 nm 处测定吸光度。超纯水为空白组,VC 为阳性对照组,羟自由基清除率计算见式(4)。

$$\text{羟自由基清除率}(\%)=(1-\frac{A_1-A_2}{A_3})\times 100 \quad (4)$$

式中: $A_1=1 \text{ mL}$ 样品+0.5 mL FeSO₄+0.35 mL H₂O₂+0.15 mL 水杨酸; $A_2=1 \text{ mL}$ 样品+0.5 mL FeSO₄+0.35 mL H₂O₂+0.15 mL 超纯水; $A_3=1 \text{ mL}$ 超纯水+0.5 mL FeSO₄+0.35 mL H₂O₂+0.15 mL 水杨酸。

1.3.12 NBE 中多酚物质的 LC-MS 鉴定 将 NBE 用甲醇溶解后离心取上清液,经 0.22 μm 膜过滤后待高效液相色谱质谱联用法 (high performance liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) 检测。

色谱条件:采用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 1.8 μm (2.1 mm \times 150 mm) 色谱柱,流速 0.25 mL/min,柱温 40 °C;流动相为正离子 0.1%甲酸乙腈(A);负离子乙腈(B);梯度洗脱,0~1 min,2% B/A;1~9 min,2%~50% B/A;9~12 min,50%~98% B/A;12~13.5 min,98% B/A;13.5~14 min,98%~2% B/A^[20]。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子喷雾电压为 3.50 kV,负离子喷雾电压为 2.50 kV,鞘气 30 arb,辅助气 10 arb。毛细管温度 325 °C,扫描范围 81~1 000,并采用 HCD 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV^[21]。

1.4 数据处理

所有试验数据至少 3 次平行重复,表示为平均值。采用 Microsoft Office Excel 2010、Graph-Pad Prism 7.00 等软件进行数据处理工作和作图。

2 结果与分析

2.1 不同极性溶剂提取物中功能成分含量的比较

对灰树花水提上清液及其不同极性溶剂提取物中的多酚、黄酮、三萜、甾醇、多糖和蛋白质含量进行了测定,结果如表 1 所示。灰树花水提上清液中多酚类化合物含量范围在 0.05%~0.36%,主要集中在 NBE 中,含量为 0.36%,是 PE 中多酚含量的 7.2 倍。表明灰树花水提上清液中多酚类物质

以极性酚为主,研究表明玉米须、红枣中也均以极性酚为主^[22-23],这与本研究的结果相一致。黄酮类物质总体含量较少,其主要集中在 PE 和 EAE 中,含量均为 0.05%。PE 和 EAE 中三萜类化合物含量较高分别为 6.32%和 4.36%,甾醇类化合物含量分别为 15.88%和 10.3%。说明灰树花水提上清液中所含有的黄酮、三萜、甾醇类功能成分可被低中性(石油醚、乙酸乙酯)溶剂富集,推测这些成分属于低中性物质。不同溶剂对于多糖的提取,含量差异性较大,多糖常是溶于水的大分子物质,赵玉红等^[24]研究中发现水提取物中多糖含量最高。本研究中 WE 的多糖含量最高,与文献结果一致。综上所述,灰树花水提上清液中不同溶剂提取物中 NBE 富集的多酚和蛋白质含量最高,PE 和 EAE 中富集的黄酮含量最高,PE 富集了三萜、甾醇含量最高,WE 中富集的多糖含量最高。可见不同极性溶剂对灰树花水提上清液中的多酚、黄酮、三萜、甾醇、多糖和蛋白质具有初步分离效果。

表 1 灰树花水提上清液及其不同极性溶剂提取物中的功能成分含量(n=3)

Table 1 Contents of functional components in the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa* and their different polar solvent extracts (n=3)

样品	多酚/%	黄酮/%	三萜/%	甾醇/%	多糖/%	蛋白质/%
GFWES	0.16 ^b	0.06 ^a	1.06 ^c	1.95 ^c	18.50 ^b	36.80 ^b
PE	0.05 ^d	0.05 ^{ab}	6.32 ^a	15.88 ^a	4.61 ^d	28.08 ^c
EAE	0.14 ^{bc}	0.05 ^{ab}	4.36 ^b	10.30 ^b	5.67 ^d	27.72 ^{cd}
NBE	0.36 ^a	0.03 ^b	0.31 ^d	0.89 ^d	10.90 ^c	38.75 ^a
WE	0.11 ^c	0.04 ^{ab}	0.17 ^d	0.34 ^d	30.11 ^a	27.80 ^d

注:同行肩标小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.2 不同极性溶剂提取物中抗氧化活性

2.2.1 不同极性溶剂提取物 DPPH 自由基清除能力 DPPH 自由基具有重复性好、稳定的特性,其清除率越高表示抗氧化活性越强^[25]。由图 2 可知,灰树花水提上清液不同极性溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除率随着样品浓度的增加呈显著的一次线性或二次曲线上升。样品质量浓度为 0.125~1 mg/mL 时,NBE 和 EAE 的清除率显著高于其它样品。当样品质量浓度为 2 mg/mL 时,各样品的清除率分别是 NBE 72.24%、EAE 66.74%、WE 54.10%、PE 51.43%、GFWES 46.03%。此外,IC₅₀

值越低表明自由基清除能力越强,因此由表 2 的 IC₅₀ 值可知,各样品的 DPPH 自由基清除能力由强到弱为:NBE>EAE>PE>GFWES>WE。

2.2.2 不同极性溶剂提取物 ABTS⁺自由基清除能力 ABTS⁺自由基清除率因适应性广也常被用于评价天然产物的抗氧化能力的指标之一^[26]。由图 3 可以看出,灰树花水提上清液不同极性溶剂的提取物对 ABTS⁺自由基的清除能力呈线性量效关系,但显著低于同质量浓度范围的 VC 组。在 0~2 mg/mL 质量浓度范围内,随着样品质量浓度的上升其清除能力均随之增强。其中,NBE 的自由基清

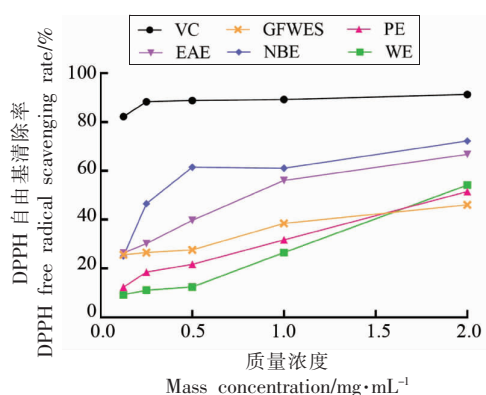


图2 灰树花水提上清液不同极性溶剂提取物的 DPPH 清除率

Fig.2 DPPH clearance rate of different polar solvent extracts from the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*

除能力一直最强,EAE次之。但PE的清除率较其它样品清除率变化不显著。当样品质量浓度为2 mg/mL时,对ABTS⁺自由基清除率分别是NBE 74.05%、EAE 65.19%、WE 59.98%、GFWES 59.46%、PE 52.63%。此外,由表2的IC₅₀值可知,各样品的ABTS⁺自由基清除能力由高到低为:NBE>EAE>PE>WE>GFWES。

2.2.3 不同极性溶剂提取物羟自由基清除能力

机体在新陈代谢过程中会产生毒性大、危害强、非常活泼的氧化性羟自由基,因此用来评价氧化能力^[27]。由图4可以看出,灰树花水提上清液不同

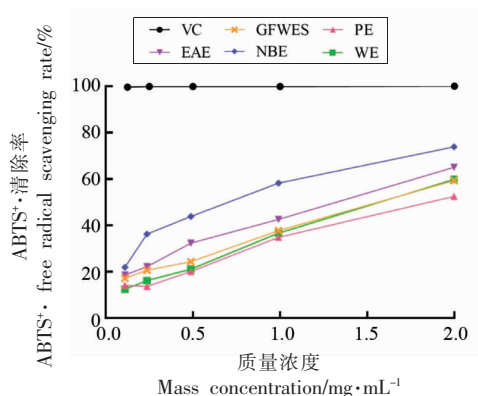


图3 灰树花水提上清液不同极性溶剂提取物的 ABTS⁺清除率

Fig.3 ABTS⁺ clearance rate of different polar solvent extracts from the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*

表2 灰树花水提上清液不同极性溶剂提取物 抗氧化活性 IC₅₀

Table 2 Antioxidant activity IC₅₀ of different polar solvent extracts from the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*

样品名称	DPPH· / mg·mL ⁻¹	ABTS ⁺ · / mg·mL ⁻¹	OH· 自由基 / mg·mL ⁻¹
VC	0.2641	0.3519	0.3166
GFWES	0.8702	0.9446	0.6564
PE	0.8617	0.9077	0.8725
EAE	0.6534	0.8220	0.5257
NBE	0.3130	0.5540	0.3255
WE	1.079	0.9157	1.086

极性溶剂提取物显示出较强的羟自由基清除能力。在0~2 mg/mL质量浓度范围内,随着样品浓度的上升其清除能力而增强,呈现良好的剂量效应关系。整体而言,NBE的自由基清除能力高于其它样品。当质量浓度为2 mg/mL时清除率达到最大92.49%,其它样品的清除率分别是GFWES 88.30%、WE 79.95%、EAE 79.15%、PE 70.41%。此外,由表2的IC₅₀值可知,各样品的羟基自由基清除能力由强到弱为:NBE>EAE>GFWES>PE>WE。

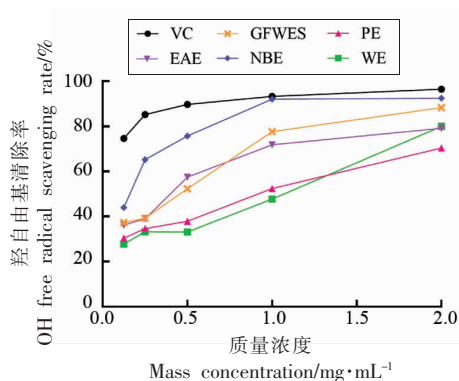


图4 灰树花水提上清液不同极性溶剂提取物的 羟自由基清除率

Fig.4 OH clearance rate of different polar solvent extracts from the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*

2.3 功能成分与抗氧化能力相关性分析

图 5 表示灰树花水提上清液中主要功能成分多酚、蛋白质、三萜、甾醇、黄酮、多糖含量与 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基清除率 IC₅₀ 值的相关性分析。其中,多酚含量与 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基清除率的 IC₅₀ 值呈显著负相关性,说明灰树花水提上清液中多酚含量对抗氧化活性作用影响极其显著。结果表明,灰树花水提上清液中功能成分对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率作用的大小顺序依次为多酚、蛋白质、多糖、黄酮、三萜、甾醇,对 OH 自由基清除率作用的大小顺序依次为多酚、蛋白质、多糖、黄酮、甾醇、三萜。由此可见,灰树花水提上清液中功能成分含量的不同决定了抗氧化能力的差异,起抗氧化活性的主要功能成分是多酚和蛋白质。

2.4 NBE 中多酚物质的 LC-MS 鉴定

首先根据精确分子质量(误差 $\leq 30 \times 10^{-6}$)进行确认,后续根据 MS/MS 碎片模式对 Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>) 数据库确定灰树花活性多酚组分。由表 3 可知,NBE 中的多酚及其衍生物包括去甲肾上腺素(Norepinephrine)、香草扁桃酸(Vanillylmandelic acid)

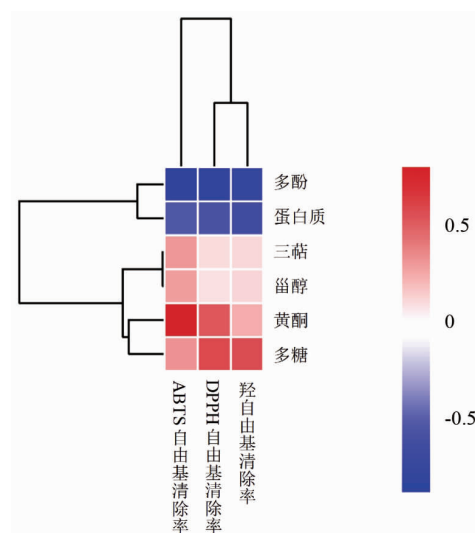


图 5 灰树花水提上清液中主要功能成分与抗氧化能力的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis of main functional components and antioxidant capacity in the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*

acid)、对苯二酚(Hydroquinone)、焦性没食子酸(1,2,3-Trihydroxybenzene)、4-乙炔基愈创木酚(2-Methoxy-4-vinylphenol)、多巴胺(Dopamine)、间苯三酚(Phloroglucinol)等 13 个物质。

表 3 NBE 中多酚及其衍生物的 LC-MS 鉴定

Table 3 LC-MS identification of polyphenols and their derivatives in NBE

序号	RT/min	化合物	分子式	MS 碎片	扫描模式
1	0.618	去甲肾上腺素(Norepinephrine)	C ₈ H ₁₁ NO ₃	170.09, 146.96, 128.95	[M+H] ⁺
2	0.624	香草扁桃酸(Vanillylmandelic acid)	C ₉ H ₁₀ O ₅	158.96, 154.06, 146.96, 135.95, 128.95, 125.00	[M+H] ⁺
3	1.218	对苯二酚(Hydroquinone)	C ₆ H ₆ O ₂	111.07, 97.01, 95.06, 88.00, 87.00, 79.01, 56.97, 55.06	[M+H] ⁺
4	1.560	焦性没食子酸(1,2,3-Trihydroxybenzene)	C ₆ H ₆ O ₃	127.04, 109.03, 81.04, 53.04	[M+H] ⁺
5	2.303	4-乙炔基愈创木酚(2-Methoxy-4-vinylphenol)	C ₉ H ₁₀ O ₂	133.05, 105.06, 87.05, 86.06, 61.01	[M+H-H ₂ O] ⁺
6	4.774	多巴胺(Dopamine)	C ₈ H ₁₁ NO ₂	137.08, 136.08, 119.05, 91.05	[M+H-H ₂ O] ⁺
7	5.575	间苯三酚(Phloroglucinol)	C ₆ H ₆ O ₃	125.06, 97.07, 57.03	[M-H] ⁻
8	5.719	异丙肾上腺素(Isoproterenol)	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	192.08, 149.04, 147.04, 122.03, 91.05	[M-H ₂ O-H] ⁻
9	6.342	对辛弗林(p-Synephrine)	C ₉ H ₁₃ NO ₂	168.10, 136.08, 112.04, 80.05	[M+H] ⁺
10	7.521	p-酚乙醇胺(p-Octopamine)	C ₈ H ₁₁ NO ₂	136.08, 119.05, 91.05	[M+H-H ₂ O] ⁺
11	9.458	特布他林(Terbutaline)	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	226.15	[M+H] ⁺
12	9.489	间羟异丙肾上腺素(Orciprenaline)	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	212.15	[M+H] ⁺
13	13.823	辣椒素(Capsaicin)	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	304.19	[M-H] ⁻

3 结论

灰树花加工过程中的副产物残渣中,还富含膳食纤维、蛋白质、酚类等功能成分,在食品及生物医药行业中有巨大的经济与应用价值。而目前对于灰树花的研究大多数集中于醇提物和水提物醇沉的多糖部分,故本试验以灰树花醇提后的残渣为原料进行水提取,醇沉分离后的上清液部分进行研究。分别采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水不同极性溶剂对灰树花水提上清液进行提取,比较不同极性提取物主要功能成分及其 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基 3 种抗氧化能力的差异。结果表明 NBE 的多酚和蛋白质含量最高分别为 0.36% 和 38.75%,PE 和 EAE 中黄酮含量最高为 0.05%,PE 的三萜、甾醇含量最高分别为 6.32% 和 15.88%,WE 中多糖含量最高为 30.11%。GFWS、PE、EAE、NBE、WE 均显示呈现良好量效关系的抗氧化活性。但总体来说,NBE 显示了最强的抗氧化活性,其次是 EAE。经相关性分析可知,多酚可能是灰树花中主要起抗氧化活性作用的活性成分。通过 LC-MS 鉴定了去甲肾上腺素(Norepinephrine)、香草扁桃酸(Vanillylmandelic acid)、对苯二酚(Hydroquinone)、焦性没食子酸(1,2,3-Trihydroxybenzene)、4-乙烯基愈创木酚(2-Methoxy-4-vinylphenol)、多巴胺(Dopamine)、间苯三酚(Phloroglucinol)等 13 个多酚及其衍生物。目前对多酚类物质的研究报道大多集中在果蔬、茶叶及其它食药菌中,今后需要更多关注灰树花多酚类化合物的研究。因此,本结果对进一步分离纯化和鉴定灰树花水提上清液中的高抗氧化活性物质具有一定的参考价值,为灰树花的多元化高效循环利用和相关产品开发提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 雷露, 吴天祥, 王川南. 基于 UPLC-QTOF-MS 代谢组学研究灰树花发酵的代谢差异[J]. 菌物学报, 2020, 39(10): 1920-1932.
- [2] Hsieh C Y, Wang H L, Chen C C. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*[J]. Biochem Eng J, 2008, 38(2): 198-205.
- [3] 刘佳, 包海鹰, 图力古尔. 灰树花化学成分及药理活性研究进展[J]. 菌物研究, 2018, 16(3): 150-157.
- [4] Liu J, Bao H Y, Tu L G E. Chemical constituents and pharmacological activities of *Grifola frondosa*[J]. Journal of Fungal Research, 2018, 16(3): 150-157.
- [5] Ouyang Y Z, Nie J P, Gao X X, et al. *Grifola frondosa* polysaccharide ameliorates hyperglycemia and gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. Free Radical Bio Med, 2022, 180(S1): 138.
- [6] Wu J Y, Siu K C, Geng P. Bioactive ingredients and medicinal values of *Grifola frondosa* (Maitake)[J]. Foods, 2021, 10(1): 95.
- [7] 贾雨朦, 陈芹芹, 毕金峰, 等. 滁菊的功能成分及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 66-72.
- [8] Jia Y M, Chen Q Q, Bi J F, et al. Functional components and *in vitro* antioxidant activity of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) from Chuzhou[J]. Food Science, 2019, 40(23): 66-72.
- [9] 周昌艳, 唐庆九, 王军, 等. 灰树花提取物清除氧自由基的研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(3): 31-34.
- [10] Zhou C Y, Tang Q J, Wang J, et al. Scavenging effects of extracts of *Grifola frondosa* on active oxygen radicals[J]. Journal of Fungal Research, 2006, 4(3): 31-34.
- [11] 陈涛林, 陈美丽, 葛智文, 等. 茶组植物新资源-元宝山茶的主要化学成分及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 87-96.
- [12] Chen T L, Chen M L, Ge Z W, et al. Chemical components and antioxidative activities of *Camellia yunkiangensis* var. *yuanbaochanica*-a new resources of *Camellia sinensis*[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 87-96.
- [13] Pan Y Y, Zeng F, Guo W L, et al. Effect of *Grifola frondosa* 95% ethanol extract on lipid metabolism and gut microbiota composition in high-fat diet-fed rats[J]. Food Funct, 2018, 9(12): 6268-6278.
- [14] Guo W L, Deng J C, Pan Y Y, et al. Hypo-

- glycemic and hypolipidemic activities of *Grifola frondosa* polysaccharides and their relationships with the modulation of intestinal microflora in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 153: 1231-1240.
- [11] ZHAO C, GAO L Y, WANG C Y, et al. Structural characterization and antiviral activity of a novel heteropolysaccharide isolated from *Grifola frondosa* against enterovirus 71[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144: 382-389.
- [12] KAIRUPAN C F, MANTIRI F R, RUMENDE R R H, et al. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of leilem (*Clerodendrum minahassae* Teijsm. & Binn) as an antihyperlipidemic and antiatherosclerotic agent[J]. *IOP Conference Series: Earth Env Sci*, 2019, 217(1): 012016.
- [13] 王晓军, 刘佳佳, 李霞, 等. NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色分光光度法测定萹苳藤叶总黄酮的含量[J]. *广东化工*, 2008, 35(11): 127-130.
- WANG X J, LIU J J, LI X, et al. NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ spectrophotometric determination of total flavonoids in calycopteris floribunda leaves[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2008, 35(11): 127-130.
- [14] 张倩倩, 黄青. 基于香草醛-高氯酸显色反应测定灵芝三萜的方法探讨与修正[J]. *菌物学报*, 2018, 37(12): 1792-1801.
- ZHANG Q Q, HUANG Q. Revised method determining *Ganoderma lingzhi* terpenoids by UV-Vis spectrophotometry based on colorimetric vanillin per chloric acid reaction[J]. *Mycosystema*, 2018, 37(12): 1792-1801.
- [15] 张学良, 赵德华, 张文懿, 等. 银柴胡中总甾醇含量测定的方法学研究[J]. *宁夏医学杂志*, 2012, 34(2): 126-127.
- ZHANG X L, ZHAO D H, ZHANG W Y, et al. Methodology study on qualification of total sterol in *Stellaria dichotoma* L. var. lanceolata bge by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Ningxia Medical Journal*, 2012, 34(2): 126-127.
- [16] 何红梅, 路爽爽, 赵筱斐, 等. 含蔗糖的多糖产品中多糖含量测定[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(6): 275-276, 278.
- HE H M, LU S S, ZHAO X F, et al. Determination of polysaccharide content in polysaccharide products containing sucrose[J]. *World Latest Medicine Information*, 2019, 19(6): 275-276, 278.
- [17] 樊梓鸾, 陈凯莉, 柳雅馨, 等. 红豆越橘不同溶剂萃取物组成及抗氧化相关性[J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 138-144.
- FAN Z L, CHEN K L, LIU Y X, et al. Correlation between antioxidant activity *in vitro* and active components of different solvent extracts from Lingonberry[J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 138-144.
- [18] 李婧雯, 包怡红. 不同溶剂的蒲公英根提取物的抗氧化活性及降糖能力比较分析[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(5): 64-72.
- LI J W, BAO Y H. Comparative analysis of antioxidant and hypoglycemic capabilities of *Taraxacum mongolicum* root extracts in different solvents[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(5): 64-72.
- [19] WADA L, OU B. Antioxidant activity and phenolic content of oregon caneberrries[J]. *J Agr Food Chem*, 2002, 50(12): 3495-3500.
- [20] OMNIA H A, EMAN M O, JOHN R F, et al. Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants[J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(2): 204-214.
- [21] GUSTAVO M, FERNANDO A C S, EVARISTO J A M, et al. Aging-related compensated hypogonadism: role of metabolomic analysis in physiopathological and therapeutic evaluation[J]. *J Steroid Biochem*, 2018, 183: 39-50.
- [22] 关海宁, 刁小琴, 乔秀丽, 等. 玉米须中不同极性多酚体外抗氧化活性比较研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(12): 46-50.
- GUAN H N, DIAO X Q, QIAO X L, et al. Comparison of antioxidant activity of corn silk polyphenols with different polarities[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(12): 46-50.
- [23] 王毕妮, 黄庆瑗, 高慧, 等. 不同极性红枣多酚的抗氧化活性比较[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(10): 142-145.
- WANG B N, HUANG Q Y, GAO H, et al. Comparison of antioxidant activity of jujube polyphenols with different polarities[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(10): 142-145.
- [24] 赵玉红, 马捷, 李佳启, 等. 老山芹不同溶剂提取物的活性成分及其促进细胞生长活性[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(6): 39-45.
- ZHAO Y H, MA J, LI J Q, et al. Active Ingredients and active function of extracts from *Heracleum*

- moellendorffii hance* by different solvents[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(6): 39–45.
- [25] KLARIĆ D A, MORNAR A, KOVAČIĆ J, et al. Polyphenol content and antioxidant activity of phytoestrogen containing food and dietary supplements: DPPH free radical scavenging activity by HPLC[J]. *Acta Pharmaceut*, 2022, 72(3): 375–388.
- [26] 师聪, 解春芝, 张建萍, 等. 覆盆子不同极性溶剂提取物的抗氧化活性比较[J]. *食品科技*, 2021, 46(1): 220–224.
- SHI C, XIE C Z, ZHANG J P, et al. Comparison of antioxidant activity of raspberry extracts with different polar solvents[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(1): 220–224.
- [27] 郭玉媛, 金铁岩, 张智勇. 青楷槭树皮营养成分、活性物质含量及其抗氧化、抗菌活性[J]. *食品与机械*, 2022, 38(3): 44–50.
- GUO Y Y, JIN T Y, ZHANG Z Y. Nutrition components and active substance content and antioxidant and antibacterial activity of *Acer tegmentosum* maxim bark[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(3): 44–50.

Functional Components and Antioxidant Activities of Different Polarities Extracts from the Supernatant of *Grifola frondosa*

Xiong Wenyu¹, He Junqiang¹, Liu Bin^{1,2*}

¹College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002

²National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, Fuzhou 350002

Abstract In the study, petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water with different polar solvents were used to the water-extracted supernatant of *Grifola frondosa*. The main functional components of different polar extracts were compared, and the antioxidant activities were compared by three methods: 1,1-Diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH), 2,2-diazo-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS⁺), hydroxyl (OH) free radical. The results showed that the polyphenol and protein contents of the n-butanol extract were the highest at 0.36% and 38.75%, respectively. The highest flavonoid content in petroleum ether and ethyl acetate extracts was 0.05%. The contents of triterpenoids and sterols in petroleum ether extract were 6.32% and 15.88%, respectively. The highest polysaccharide content in water extract was 30.11%. N-butanol extract showed the strongest antioxidant activity, and polyphenols may be the main component of antioxidant activity. Thirteen polyphenols and their derivatives were identified by LC-MS. This provides a theoretical basis for the development of *Grifola frondosa* functional food or health products.

Keywords *Grifola frondosa*; water-extracted supernatant; functional components; antioxidant