

微波辅助高压法提取金针菇黄酮的纯化及活性测定

王广慧, 于德涵, 黎 莉

(绥化学院 食品与制药工程学院, 黑龙江 绥化 152061)

摘 要: 为了确定微波辅助高压法所制备的金针菇黄酮的生物活性, 及其经 H103 型大孔树脂纯化的最优工艺条件, 对此纯化工艺进行了优化, 并检测了黄酮的抗菌性, 以及它清除 2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基 (ABTS $\cdot$)、1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH $\cdot$) 和羟基自由基 (OH $\cdot$) 的活性。结果显示, 此纯化工艺的最优条件是吸附时, 样品液 pH 值为 5, 浓度为 $1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 流速为 $0.30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 洗脱时, 溶剂乙醇的浓度为 70%, 流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 用量为 60 mL, 纯化后黄酮纯度可达纯化前的 3.27 倍。金针菇黄酮对四种菌株皆表现出抗菌性, 其中对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的抗菌活性最强, 其次是沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 第三, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 最弱。该黄酮可清除三种自由基, 但清除率都低于 VC。可见微波辅助高压法所制备的金针菇黄酮兼具抗菌和抗氧化能力, H103 型大孔树脂可以用作纯化金针菇黄酮的介质。

关键词: 微波辅助高压法; 金针菇黄酮; 大孔树脂; 抗菌性; 抗氧化性

中图分类号: TS 201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0488-5368(2021)07-0075-05

Purification and Activity Determination of Flavonoids Extracted from *Flammulina velutipes* by Microwave Assisted High Pressure Method

WANG Guanghui, YU Dehan, LI Li

(College of Food and Pharmaceutical Engineering, Suihua University, Suihua, Heilongjiang 152061, China)

Abstract: In order to determine the biological activity of flavonoids from *Flammulina velutipes* by microwave-assisted high-pressure method and to find its optimal process conditions for purification by H103 macroporous resin, the purification process was optimized and the purified flavonoids were tested for their antibacterial ability and removal activity of 2, 2-diazo-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid) diammonium salt free radicals (ABTS $\cdot$), 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radicals (DPPH $\cdot$) and hydroxyl free radicals (OH $\cdot$) in this paper. The optimal conditions for this purification process were that the pH of the sample solution was 5, the concentration was $1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the flow rate was $0.30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ during adsorption; the concentration of the solvent ethanol was 70%, the flow rate was $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, the dosage was 60 mL during eluting. The purity of flavonoids was 3.27 times higher than that before purification. Flavonoids of *Flammulina velutipes* showed antibacterial activity against all the four strains, of which the antibacterial activity against *Escherichia coli* was the strongest, followed by *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* was in the third place, and *Bacillus subtilis* was the weakest. *Flammulina* flavonoids could scavenge three free radicals, but the scavenging rate was lower than VC. So *Flammulina* flavonoids prepared by microwave

收稿日期: 2020-09-24 **修回日期:** 2020-10-15

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费基础研究项目 (YWK10236200203); 国家自然科学基金项目 (21201128)。

第一作者简介: 王广慧 (1973-), 女, 黑龙江绥化人, 教授, 硕士, 研究方向为食用菌中生物活性物质的分离及应用。

—assisted high — pressure method has both antibacterial and antioxidative capabilities. H103 macroporous resin can be used as a medium for purifying *Flammulina* flavonoids.

Key words: Microwave — assisted high — pressure method; *Flammulina* flavonoids; Macroporous resin; Antibacterial; Antioxidan

金针菇(*Flammulina velutipes* (Fr.) Sing)是我们非常熟悉的一种食用菌。它具有很高的营养价值,富含蛋白质、多糖、黄酮、维生素、矿物质及各种人体所必需的氨基酸等营养成分,尤其是金针菇中的黄酮类物质具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用,可开发为保健食品或动物饲料添加剂^[1-5]。大孔树脂常被用于黄酮类物质的纯化,因其具有良好的稳定性、强吸附性以及可以在温和的条件下重复使用等优点^[6],但目前关于将大孔树脂用作金针菇黄酮纯化介质的研究甚少。本项目组曾在文献^[7]中探讨了微波辅助高压法制备金针菇黄酮的最佳条件,笔者将在此基础上继续研究以 H103 型大孔树脂作为金针菇黄酮纯化介质的工艺条件,并通过抑菌和抗氧化实验检测金针菇黄酮的活性,以期为其未来的开发利用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

H103 型大孔吸附树脂(天津浩聚树脂科技有限公司);实验所用各种化学试剂都为国产分析纯,购自常州市旭宏化工有限公司;金针菇及所用四种细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌)均为绥化学院发酵实验室培养所得。

1.2 仪器

752 型分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);YM50FG 型立式高压蒸汽灭菌器(山东博科生物产业有限公司);WBFY-205 型微波化学反应器(上海一科仪器有限公司)。

2 方法

2.1 金针菇黄酮的提取

金针菇黄酮的提取方法及含量测定方法(硝酸铝—亚硝酸钠法)均按照文献^[7]中所述步骤进行操作。

2.2 H103 型大孔树脂的预处理

用 95% 乙醇先将 H103 型大孔树脂浸泡 24 h,然后反复清洗至液体澄清,再用蒸馏水洗至乙醇味消失。再先后用 5%(g·g⁻¹)的盐酸溶液和 4%(g·g⁻¹)的氢氧化钠溶液各浸泡处理 4 h,每次处理后都要用蒸馏水清洗至 pH 值为中性。

吸附率和解析率的计算公式:

$$\text{吸附率} = \frac{C_1 V_1 - C_2 V_2}{C_1 V_1} \times 100\%$$

$$\text{解析率} = \frac{C_3 V_3}{C_1 V_1 - C_2 V_2} \times 100\%$$

式中: C_1 代表上样液中金针菇黄酮的质量浓度(mg·mL⁻¹), C_2 代表吸附饱和时流出液中金针菇黄酮的质量浓度, C_3 代表洗脱液中金针菇黄酮的质量浓度; V_1 代表吸附饱和时所消耗的上样液体积(mL), V_2 代表吸附饱和时流出的液体体积, V_3 代表洗脱液体积。

2.3 纯化工艺优化^[8]

将预处理过的 H103 型大孔树脂装入普通玻璃层析柱(16 mm×240 mm)中,树脂高度为 12 cm,分别考察样品液的 pH、浓度、上样速度对金针菇黄酮吸附率的影响,以及乙醇的浓度、洗脱速度、用量对黄酮解析率的影响。每组实验重复三次。

2.4 纯化效果检测

按优化后的最佳条件用 H103 型大孔树脂对金针菇黄酮进行纯化,然后通过计算金针菇黄酮在解析液及样品液烘干后物质中所占的比例,求得纯化倍数。

2.5 抗菌活性测定^[9-12]

采用抑菌圈法进行检测。

2.5.1 菌悬液的制备 在 37℃ 下,用气浴恒温振荡器以 120 r·min⁻¹ 的转速连续培养四种活化菌株,并持续关注菌悬液在波长 600 nm 处的 OD 值,当其为 0.1 时停止培养。菌体浓度此时约为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU(Colony-Forming Units,菌落形成单位)·mL⁻¹。

2.5.2 抑菌活性检测实验 将四种菌悬液各 0.1 mL 涂布在 LB 固体培养基平板上,插入牛津杯(内径 6 mm),取 0.1 mL 质量浓度分别为 0.10、0.25、0.40、0.55、0.70 mg·mL⁻¹ 的金针菇黄酮样品液加入杯中,37℃ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

2.6 抗氧化实验^[11-14]

2.6.1 清除 ABTS·能力检测 在 250 mL 容量瓶中加入 40.00 mg 的 ABTS、10 mL 的蒸馏水以及 8.00 mL 的过硫酸钾(浓度为 1.0 mg·mL⁻¹),室温避光反应 16 h。加蒸馏水 32 mL,以

无水乙醇定容后静置 10 h 备用。

取浓度分别为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金针菇黄酮溶液各 0.5 mL,加入 1.5 mL 95%乙醇及 2 mL 配制好的 ABTS 溶液,反应 30 min 后测其在 734 nm 处的光吸收值 A_1 。

将 ABTS 溶液换成蒸馏水,重复上述步骤,所测吸光值为 A_2 。保留 ABTS 溶液,以 95%乙醇代替黄酮提取物,重复上述步骤,所测吸光值为 A_0 。同时以 VC 为对照。

$$\text{ABTS} \cdot \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

2.6.2 清除 DPPH · 能力检测 取 3.5 mL 的 DPPH 溶液(浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以无水乙醇配制而成)与 0.5 mL 无水乙醇混合,闭光反应 30 min,测其在 517 nm 处的吸光值 A_0 ;

以 0.5 mL 纯化后的金针菇黄酮提取液替代 0.5 mL 无水乙醇,按上述方法进行操作,测得其吸光值 A_1 ;

以 3.5 mL 无水乙醇替代 DPPH 溶液,同样加入 0.5 mL 黄酮提取液,测得其吸光值 A_2 。所用对照品为 VC。

$$\text{DPPH} \cdot \text{的清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

2.6.3 清除 $\text{OH} \cdot$ 能力检测 在 2.0 mL FeSO_4 溶液($1.8 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)中各加入 1.0 mL 浓度分别为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金针菇黄酮溶液,再加入 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水杨酸—乙醇溶液 1.5 mL 和 0.3%($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的过氧化氢溶液 0.1 mL,混合均匀。在 37 °C 水浴中静置 30 min 后测其在 510 nm 下的吸光值 A_1 。

将过氧化氢溶液换成蒸馏水,重复上述实验操作,所测吸光度值为 A_2 。

将黄酮提取液换成蒸馏水,重复上述实验操作,所测吸光度值为 A_0 。所用对照品依然为 VC。

$$\text{OH} \cdot \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 线性回归方程

实验所得测定黄酮含量的线性回归方程为 $y = 10.273x + 0.0012$, $R^2 = 0.9959$ 。其中 y 为吸光值, x 为黄酮浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

3.2 纯化工艺优化结果

3.2.1 上样液 pH 对吸附率的影响 用 5%盐酸

溶液和 2%的氢氧化钠溶液将浓度为 $1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金针菇黄酮样品液 pH 调为 3、4、5、6、7,以 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进行吸附,然后计算饱和和吸附率(饱和和吸附点的判定标准为:流出液中黄酮浓度约为其上样液中初始浓度的十分之一)。

实验结果见图 1。

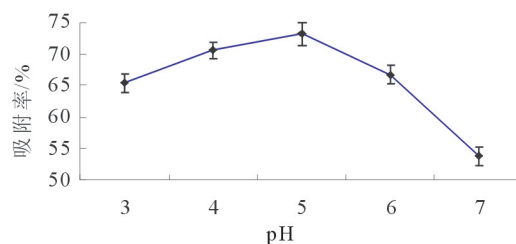


图 1 上样液 pH 对吸附率的影响

由图 1 可知,在所测定的样品液 pH 范围内,当样品液的 pH 大于 5.0 时,黄酮吸附率随样品液 pH 的增大而减小;当样品液的 pH 在 3.0~5.0 范围内,吸附率呈上升趋势;当样品液 pH 为 5.0 时,黄酮吸附率达到最大值。分析原因可能是金针菇黄酮属于多羟基酚类化合物,只有在适当酸性条件下能够形成氢键,利于大孔吸附树脂吸附。当酸性太强时,黄酮分子内的氧原子易质子化,不易被吸附;而在碱性条件下黄酮分子中形成酚氧负离子,影响氢键的形成,也会导致吸附率下降。

3.2.2 上样液浓度对吸附率的影响 考察时所设定的吸附条件是:pH5 的样品液,吸附速率为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,样品液浓度分别为 0.85、1.15、1.45、1.75、2.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验结果见图 2。

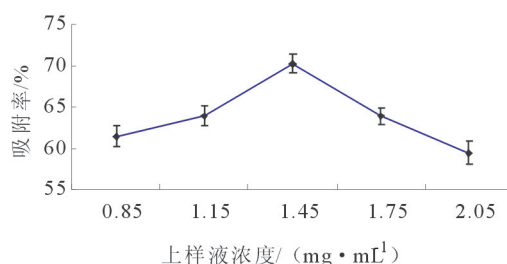


图 2 上样液浓度对吸附率的影响

由图 2 可知,在所测量的上样液浓度范围内,在 $0.85 \sim 1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,吸附率逐渐增加;当浓度大于 $1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,吸附率随浓度的增加而降低。因此选择 $1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为上样液最适浓度。

3.2.3 上样液流速对吸附率的影响 考察时所设定的吸附条件是:样品液 pH 为 5,上样液浓度为 $1.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,流速分别为 0.30、0.55、0.80、1.05、1.30 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

实验结果见图 3。

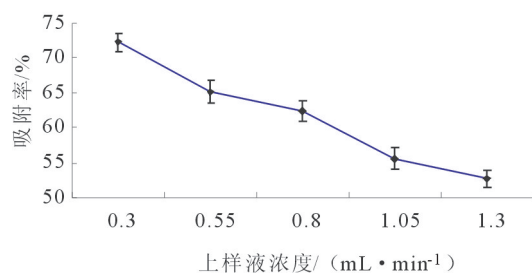


图 3 上样液流速对吸附率的影响

由图 3 可知,吸附率随上样液流速逐渐加快而逐渐降低,说明较慢的上样速度利于树脂对黄酮的吸附,但流速太慢势必会使吸附时间过长,综合考虑工作效率问题,选择 $0.30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 为最佳流速。

3.2.4 洗脱剂浓度对解析率的影响 先用蒸馏水反复冲洗已饱和吸附有金针菇黄酮的 H103 型大孔吸附树脂层析柱,直至流出的液体无色,再用 60 mL 乙醇以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率进行洗脱,乙醇浓度分别设为 50%、60%、70%、80%、90%。计算黄酮解析率。

实验结果见图 4。

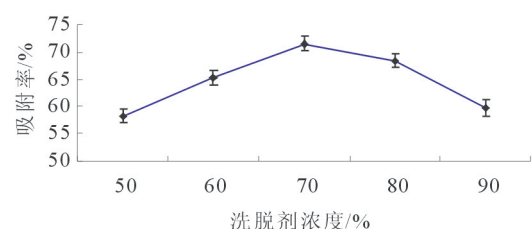


图 4 洗脱剂浓度对解析率的影响

由图 4 可知,最佳洗脱剂浓度为 70%,乙醇体积分数过大或过小都不利于黄酮的洗脱。

3.2.5 洗脱速率对解析率的影响 设定洗脱速率分别为 2、2.5、3、3.5、4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,洗脱剂乙醇

的浓度采用 70%,乙醇用量采用 60 mL,在此条件下分析黄酮解析率。

实验结果见图 5。

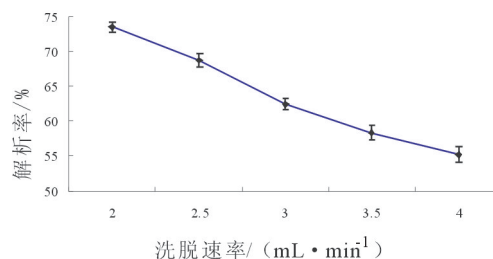


图 5 洗脱速率对解析率的影响

由图 5 可知,洗脱速率越小越有利于洗脱,原因可能是速率小时可使乙醇与树脂充分接触,宜于黄酮的洗脱,但速率过小会过分延长洗脱时间,因此综合考虑工作效率,选择 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 为最佳洗脱速率。

3.2.6 洗脱剂用量对解析率的影响 用 70%乙醇以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行洗脱,洗脱剂用量分别设为 10、20、30、40、50、60 mL,计算黄酮解析率。

实验结果见图 6。

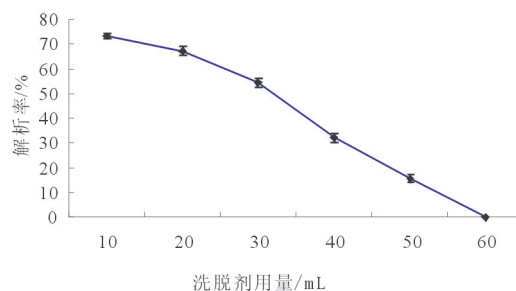


图 6 洗脱剂用量对解析率的影响

由图 6 可知,60 mL 70%乙醇可将大孔树脂上吸附的金针菇黄酮彻底洗脱。

3.3 纯化效果检测

检测结果见表 1。

表 1 纯化效果检测结果

项目	样品 1	样品 2	样品 3	平均值
纯化前黄酮纯度 / %	6.5	7.4	7.8	
纯化后黄酮纯度 / %	20.2	26.3	24.6	
纯化倍数	3.11	3.55	3.15	3.27

由此表可见,纯化倍数可达 3.27 倍,说明用此工艺纯化金针菇黄酮能取得比较好的效果。

3.4 抗菌实验

测量 3 组平行实验所获得的抑菌圈直径,取平均值后所得数据见表 2。

表 2 中数据表明,在所测量的 $0.10 \sim 0.70 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,金针菇黄酮对四种菌株都表现出一定程度的抗菌活性,且总体趋势是黄酮浓度越大,抗菌活性越强,其对四个菌种抗性顺序为:大肠杆菌最强,沙门氏菌次之,金黄色葡萄球菌

第三,枯草芽孢杆菌最弱。

表 2 黄酮浓度对菌种抑菌圈直径的影响

菌种	黄酮浓度/(mg·mL ⁻¹)					无菌生理盐水
	0.70	0.55	0.40	0.25	0.10	
大肠杆菌	8.22	7.51	7.36	6.64	6.45	0
沙门氏菌	8.03	7.46	6.78	6.51	6.37	0
金黄色葡萄球菌	7.65	7.24	6.68	6.47	6.34	0
枯草芽孢杆菌	7.18	6.92	6.56	6.38	6.23	0

3.5 抗氧化实验

3.5.1 清除 ABTS·能力检测结果 金针菇黄酮和 VC 清除 ABTS·能力比较见图 7。

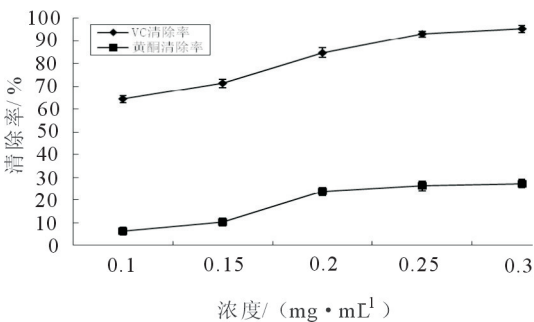


图 7 黄酮及 Vc 清除 ABTS·能力比较

图 7 表明,金针菇黄酮对 ABTS·有一定的清除能力,并且黄酮浓度越高,对 ABTS·的清除能力也越强,但与相同浓度的 VC 相比,金针菇黄酮对 ABTS·的清除率低于 VC。

3.5.2 清除 DPPH·能力检测结果 金针菇黄酮和 VC 清除 DPPH·能力比较见图 8。

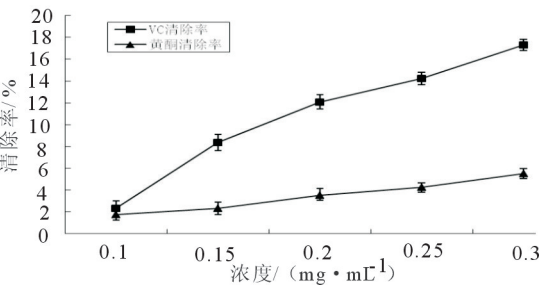


图 8 黄酮和 Vc 清除 DPPH·能力比较

图 8 表明,金针菇黄酮和 VC 对 DPPH·都有清除能力,并且随着浓度升高,二者对 DPPH·的清除作用也越强,但相对于 VC,金针菇黄酮的清除率上升幅度不是很明显,且在相同浓度时,金针菇黄酮清除 DPPH·的能力弱于 VC。

3.5.3 清除 OH·能力检测结果 金针菇黄酮和 VC 清除 OH·能力比较见图 9。

图 9 表明,金针菇黄酮和 VC 对 OH·都具有一定的清除能力,并且二者对 OH·的清除能力与

浓度呈正相关,但在相同浓度下,金针菇黄酮对 OH·的清除能力不如 VC 强。

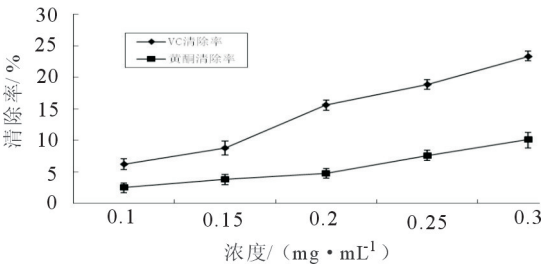


图 9 黄酮和 Vc 清除 OH·能力比较

4 结论

对利用微波辅助高压法制取的金针菇黄酮的生物活性进行了检测,并对 H103 型大孔树脂作为金针菇黄酮纯化介质的最适条件进行了探讨。由研究结果可以做出以下结论:

(1)H103 型大孔树脂纯化金针菇黄酮的效果很好,其最优纯化条件为:采用浓度为 1.45 mg·mL⁻¹、pH 值为 5 的上样液以 0.30 mL·min⁻¹ 的流速进行吸附;采用体积分数为 70% 的乙醇 60 mL 以 2 mL·min⁻¹ 的流速进行洗脱。按此纯化条件得到的黄酮纯度可达到纯化前的 3.27 倍。

(2)抗菌性研究显示:金针菇黄酮对四种实验用菌都有一定的抑制作用,抑菌效果与金针菇黄酮浓度呈正相关。对四种菌株抗菌能力由强至弱顺序为:大肠杆菌,沙门氏菌,金黄色葡萄球菌,枯草芽孢杆菌。

(3)氧化抗性实验结果表明:金针菇黄酮具有一定的氧化抗性,能有效清除 ABTS·、DPPH·和 OH·,并且随着浓度的增加,其抗氧化活性也在增强,但低于同浓度下的 VC。

由此可见,利用微波辅助高压法提取金针菇黄酮不但可获得较高的提取率^[13],且能保留黄酮的抑菌性和抗氧化性;使用 H103 型大孔树脂能对金针菇黄酮起到很好的纯化作用。这为金针菇黄酮产品的开发提供了依据。