

HPLC-DPPH 在线法检测黑脉羊肚菌抗氧化活性部位

游金坤*, 吴素蕊, 高观世, 严明, 桂明英

中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所, 昆明 650221

摘要:应用 HPLC-DPPH 在线检测法, 对黑脉羊肚菌抗氧化活性部位进行检测。主要考察了水提、50% 乙醇提、95% 乙醇提 SPE 分段后甲醇洗脱部位和氯仿提取部位的抗氧化活性进行检测。通过检测获得可能抗氧化成分 17 个, 其中水提物获得的抗氧化活性成分 11 种, 50% 乙醇提取物获得抗氧化活性成分 2 种, 均具有较好的抗氧化活性; 而 95% 乙醇及三氯甲烷提取部位含有的抗氧化活性小分子物质种类均不繁多、抗氧化活性较弱。黑脉羊肚菌具有良好的抗氧化活性, 主要成分为水溶性小分子极性化合物, 以水提取部位含量最为丰富。

关键词: HPLC-DPPH; 在线法; 黑脉羊肚菌; 抗氧化活性

中图分类号: S-3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.020

Determination of Antioxidant Active Site of *Morchella angusticeps* by HPLC-DPPH

YOU Jin-kun*, WU Su-rui, GAO Guan-shi, YAN Ming, GUI Ming-ying

Kunming Edible Fungi Institute of All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming 650221, China

Abstract: On-line HPLC-DPPH was used for determination of antioxidant active site from *M. angusticeps*. It mainly investigates the antioxidant activity of the aqueous extract, 50% ethyl alcohol extract, 95% ethyl alcohol extract was extracted by SPE, eluted with methanol, and chloroform extract. Based on this method, 17 antioxidants have been found in *M. angusticeps*, among them, 11 antioxidants have been found in aqueous extract, 2 antioxidants have been found in 50% ethyl alcohol extract, and both of them showed high antioxidant activity. However, the results showed a minor constituent and not significant antioxidant activity in 95% ethyl alcohol extract and chloroform extract. *M. angusticeps* showed high antioxidant activity, the main components are polarity small molecular compounds, and are rich in aqueous extract. The antioxidants in *M. angusticeps* is well worth researching into.

Key words: HPLC-DPPH; on-line detection; *Morchella angusticeps*; antioxidant activity

黑脉羊肚菌 (*Morchella angusticeps*) 又称小尖羊肚菌, 是野生名贵食药菌^[1]。羊肚菌营养丰富, 富含蛋白质、氨基酸、多种矿物质及丰富的脂肪酸^[2]; 现代研究发现, 羊肚菌有降血脂、调节免疫、抗疲劳、抗辐射、抗肿瘤等作用^[3-7]。羊肚菌研究多见于多糖, 菌丝及无机元素等^[8-10]。然而, 目前针对黑脉羊肚菌抗氧化活性成分研究鲜有报道。

HPLC-DPPH 在线筛选法利用色谱柱将复杂混合物分离后直接与 DPPH 作用, 具有抗氧化活性化合物与 DPPH 单电子配对使其吸收减弱, 表现为倒峰, 其倒峰的面积与清除作用的强弱成一定的关系, 此法不但避免了自由基法在对成分复杂的提取物的

抗氧化评价时, 无法准确的知道该复杂混合物中何种化合物具有抗氧化活性的缺陷, 而且快速、直观、准确、简单易行、重现性好。

本实验通过 HPLC-DPPH 在线检测法, 对黑脉羊肚菌不同提取部位的抗氧化活性情况进行检测, 以期获得黑脉羊肚菌的抗氧化活性部位, 并为其抗氧化成分的筛选确定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑脉羊肚菌由昆明食用菌研究所提供; SPE 柱 (Agilent AccuBond ODS-C18); DPPH (上海楷洋生物科技有限公司); 甲醇 (色谱纯, SIGMA-ALDRICH, 美国); 乙酸、三氯甲烷、无水乙醇 (分析纯, 北京化工厂), 去离子水 (自制)。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(Agilent 1200 Series, 美国), 配有二元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱及二极管阵列检测器(DAD), Empower 2 色谱工作站; 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 × 4.6 mm i. d., 5 μm); 中压恒流泵(同田生物科技有限公司); 反应圈: PEEK 管(5 m × 0.25 mm i. d.); 岛津 UV/VIS; 电子分析天平(先行者 CP214, OHAUS); 旋转蒸发器(OIL BATH OSB-2000, EYELA); 冷冻干燥机(LGJ-18A, 上海比朗仪器有限公司); 标准通用型超纯水机(OKP-S0, 上海涑科仪器有限公司)等。

2 实验方法

2.1 实验装置流程图

HPLC-DPPH 在线检测黑脉羊肚菌抗氧化活性部位实验装置流程图如图 1:

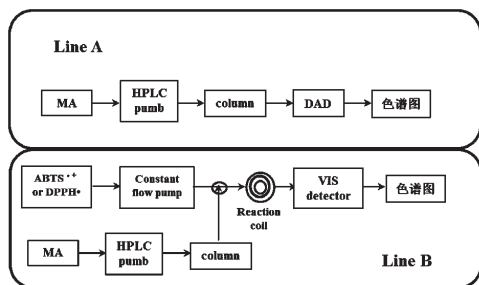


图 1 在线快速检测 MA 抗氧化成分方法示意图 [HPLC-DAD-MS (路径 A) 和 HPLC-DPPH/ABTS (路径 B)]

Fig. 1 Schematics of HPLC-DAD (Line A) and ONLA/ONLD (Line B) for screening and identification of antioxidants in MA

图 1 的实验流程图根据文献^[11]作了适当调整。该体系分为两条路径, A 路径为 HPLC-DAD 分析系统。包括自动进样器、高压二元泵、色谱柱、二极管阵列检测器(DAD)。待测样品由路径 A 进入色谱系统, 经 DAD 检测得到原样品的色谱图。B 路径为 DPPH 自由基清除情况检测系统, 包括自动进样器、色谱柱、高压二元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)和一台恒流泵。在路径 B 中, 色谱柱中的流出液与经由中压恒流泵进入的溶液, 经 T 形连接管进入自制的反应线圈 PEEK 管中(5 m × 0.25 mm i. d.), 反应产物进入 DAD 检测器, 得到样品反应后的色谱图。如此, 即可对比原色谱图与反应色谱图, 具有抗氧化活性的化合物与 DPPH 单电子配

对其吸收减弱而出现倒峰, 其倒峰面积与清除作用的强弱成一定的关系。

2.2 样品处理

取黑脉羊肚菌约 40 g, 分别用 400 mL 的水、50% 乙醇、95% 乙醇分三次超声提取, 每次 1 h, 合并三次的滤液, 50 °C 旋蒸, 冷冻干燥得冻干提取物, 备用。另取样品约 50 g, 用 600 mL 的氯仿分三次超声提取, 每次 1 h, 合并滤液, 45 °C 旋蒸, 得浓缩浸膏备用。

分别称取水提总提物、50% 乙醇提物 0.05 g, 95% 乙醇提物 0.10 g, 于少量水中溶解, 上 SPE 柱, 先用 100 mL 水进行洗脱, 再用 75 mL 的甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 45 °C 旋蒸浓缩, 以色谱纯甲醇溶解、定容至 2 mL 容量瓶, 0.45 μm 滤膜过滤备用。另取 0.10 g 氯仿总提物, 以色谱纯甲醇溶解、定容至 2 mL 容量瓶中, 0.45 μm 滤膜过滤备用。

DPPH 溶液配制: 精密称定 DPPH 标准品 1.00 mg, 以无水乙醇溶解、定容于 100 mL 棕色容量瓶中, 即得浓度为 10 μg/mL DPPH · 自由基溶液, -20 °C 保存备用。

2.3 色谱条件

色谱 A 条件: 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 × 4.6 mm i. d., 5 μm); 流速为 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 检测波长及流动相条件分列如下:

水提物过 SPE 甲醇部位: 检测波长 280 nm; 甲醇(A)-0.01% (V/V) 乙酸(B): 10 ~ 30% A/0 ~ 20 min, 30 ~ 55% A/20 ~ 30 min, 55 ~ 60% A/30 ~ 60 min, 60 ~ 80% A/60 ~ 80 min, 80 ~ 90% A/80 ~ 90 min;

50% 乙醇提物过 SPE 甲醇部位: 检测波长 280 nm; 甲醇(A) ~ 0.01% (V/V) 乙酸(B): 10 ~ 100% A/0 ~ 60 min, 100% A/60 ~ 70 min;

95% 乙醇提物过 SPE 甲醇部位: 检测波长 280 nm; 甲醇(A) ~ 水(B): 10 ~ 40% A/0 ~ 40 min, 40 ~ 100% A/40 ~ 80 min;

氯仿提物: 检测波长 230 nm; 甲醇(A) ~ 水(B): 10 ~ 100% A/0 ~ 60 min, 100% A/60 ~ 80 min。

色谱 B 条件: 色谱柱的分离条件同上, DPPH · 自由基流速 0.4 mL/min, DAD 检测波长 490 nm。

2.4 倒峰的归属

由于路径 B 比路径 A 多了一段长 5 米的反应

线圈,所以样品原色谱图与反应色谱图时间不能完全对应,需整体做调整。反应色谱图需延后的时间的理论计算式为:

$$T = V_{\text{反应线圈}} / v_{\text{反应液流速}}$$

内径为 0.25 mm,长度为 5 m 的反应线圈的容积为 0.245 mL,HPLC 流出液的速度是 1.0 mL/

min,DPPH 泵入的速度为 0.4 mL/min,所以总的反应液的速度是 1.4 mL/min, $T(\text{DPPH}) = 0.175 \text{ min}$ 。

3 结果与分析

HPLC-DPPH 在线抗氧化活性检测结果如图 2-5:

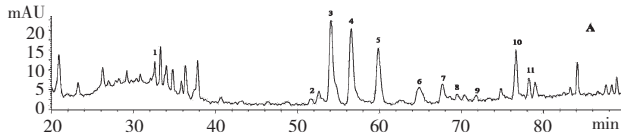


图 2 水提取物过 SPE 甲醇部位在线抗氧化结果图

Fig. 2 On-line HPLC-DPPH analysis of water extracted fraction

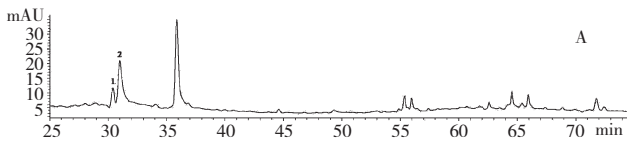
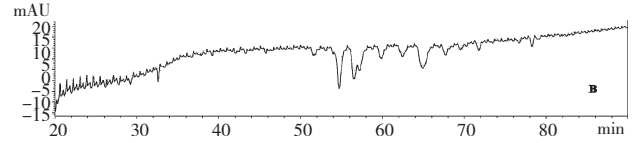


图 3 50% 乙醇提取物过 SPE 甲醇部位在线抗氧化结果图

Fig. 3 On-line HPLC-DPPH analysis of 50% ethyl alcohol extracted fraction

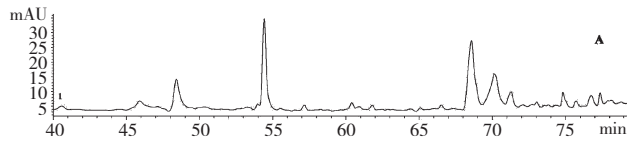
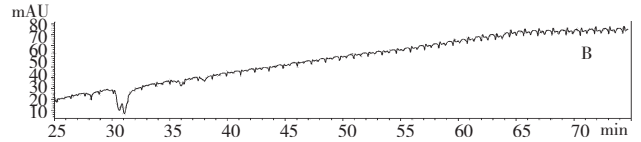


图 4 95% 乙醇提取物过 SPE 甲醇部位在线抗氧化结果图

Fig. 4 On-line HPLC-DPPH analysis of 95% ethyl alcohol extracted fraction

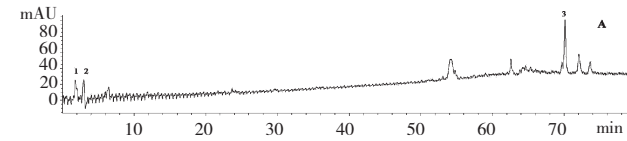
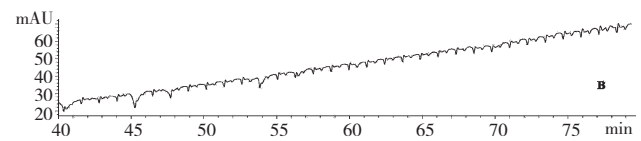
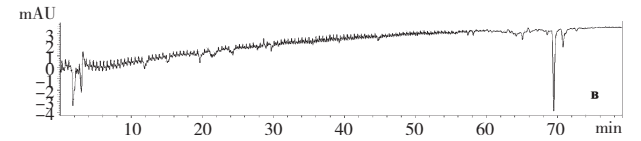


图 5 三氯甲烷提取物在线抗氧化 HPLC 结果图

Fig. 5 On-line HPLC-DPPH analysis of CHCl_3 extracted fraction



对比原色谱图与反应色谱图,结果表明:水提取物过 SPE 甲醇部位得到的抗氧化成分最多,为 11 个,50% 乙醇、95% 乙醇提取物过 SPE 甲醇部位得到的抗氧化成分分别为 2 个、1 个,三氯甲烷提取物抗氧化成分有 3 个,各提取部位共得到可能抗氧化成分 17 个。因倒峰面积与清除作用的强弱成一定的关系,水提取物分离得到的几种抗氧化成分中 3、4、5、6、11 均具有较好、较明显的抗氧化活性;50% 乙醇提取物中抗氧化成分 1、2 抗氧化活性较明显;而 95% 乙醇、三氯甲烷提取物中 4 种抗氧化成分活性均较

弱。

4 讨论

目前,针对黑脉羊肚菌抗氧化活性成分研究报道仅见对其多糖、多酚氧化酶研究各一篇^[12,13],且仅应用传统离线抗氧化分析测定方法分析其总提物的抗氧化情况。本文应用 HPLC-DPPH 在线分析方法,对水提、50% 乙醇提、95% 乙醇提 SPE 分段后甲醇洗脱部位和氯仿提取部位的抗氧化活性进行检测,主要考察黑脉羊肚菌中极性小分子物质的抗氧

化活性。

通过实验,获得可能抗氧化成分 17 个,其中水提物获得的抗氧化活性成分最多,为 11 种,且具有较好的抗氧化活性;50% 乙醇提取物获得抗氧化活性成分仅 2 种,但其仍具有较好的抗氧化活性;而 95% 乙醇及三氯甲烷提取部位含有的抗氧化活性小分子物质种类均不繁多,抗氧化活性均较弱。黑脉羊肚菌具有良好的抗氧化活性,主要成分为水溶性小分子极性化合物,以水提取部位含量最为丰富。

黑脉羊肚菌具有良好的抗氧化活性,且其抗氧化活性的主要成分为水溶性小分子极性化合物,以水提取部位含量最为丰富。这与针对其它种类羊肚菌体内外抗氧化活性的研究结果相符:羊肚菌酚类物质能够很好地清除反应体系中的羟基自由基、超氧阴离子且具有一定抗油脂自动氧化能力^[14];其甲醇提取物在体外具有明显的抗氧化作用^[15];羊肚菌多糖使羊肚菌具有良好的清除自由基和抗氧化效果^[17];且羊肚菌有助于提高机体抗氧化能力^[16]。但黑脉羊肚菌抗氧化活性成分还需要进一步深入研究确定。

参考文献

- Zhu L(朱林),Cheng XH(程显好),Tian JT(田吉腾). Research progress on morchella. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学),2008,36:4054-4057.
- Ma DM(马冬梅),Li JX(李冀新),Sun XJ(孙新纪). The present status and solution of the study on Xinjiang wild Morchella. *Edible Fungi China* (中国食用菌),2010,29(6):8-10.
- Chen Y(陈彦),Pan J(潘见),Zhou LW(周丽伟),et al. Antitumor activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta*. *Food Sci* (食品科学),2008,29:553-556.
- Zhang LP(张利平),Chen Y(陈彦),Wang ZR(王子尧),et al. Immunological activities of polysaccharide from *Morchella esculenta* (L.) Pers.. *Edible Fungi China* (中国食用菌),2009,28(3):47-49.
- Elmastas M, Turkecul I, Oztürk L, et al. Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculenta*) from North Turkey. *Combin Chem High Throughput Screening*,2006,9:443-448.
- Ming J(明建),Zeng KF(曾凯芳),Zhao GH(赵国华),et

- al. Hypolipidemic activity of water soluble polysaccharide PMEP-1 from *Morchella esculenta* (L.) Pers. *Food Sci* (食品科学),2009,30:285-288.
- Turkoglu A, Kivrak I, Mercan N, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *Afr J Biotechnol*,2006,11:1146-1150.
- Cavazzoni V, Adami A, Aragonzini F, et al. Meddpharm Scientific Publishers,1994. 119-127.
- Kamal S, Singh SK, Tiwari M. Role of enzymes in initiating sexual cycle in different species of Morchella. *Indian Phytopathol*,2004,57:18-23.
- Bisakowski B, Atwal AS, Kermasha S. Characterization of lipoxygenase activity from a partially purified enzymic extract from *Morchella esculenta*. *Process Biochem.*,2000,36(1-2):1-7.
- He W, Liu X, Xu H, et al. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. *Food Chem*,2010,123:521-528.
- Zhang Q(张琦),Wu SR(吴素蕊),Fan J(樊建),et al. Study on PPO characteristics of *M. angusticeps*. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技),2013,34:124-126.
- Shangguan RL(上官端琳),Wu SR(吴素蕊),Zhao TR(赵天瑞),et al. Effects of NAA on biomass and mycelia polysaccharide content and the antioxidant activity of mycelia polysaccharide of *Morchella angusticeps* Peck. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业),2013,39:159-162.
- Kang ZL(康宗利),Xu P(徐萍),Yang YH(杨玉红). The extraction and antioxidant activity of phenolics in Morchella mycelium fermentation. *Food Sci Technol* (食品科技),2014,39:219-224.
- Mau JL, Chang CN, Huang SJ, et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chem*,2004,87:111-118.
- Zhang HX(张海信),Ge SS(葛士顺). The influence of *Morchella esculenta* on the skeletal muscle free radical metabolism of rats in high-intensity endurance training. *Sci Education Article Collects* (科教文汇,中旬刊),2014,9:68-69.
- Luo X(罗霞),Wei W(魏巍),Yu MY(余梦瑶),et al. The gastric protective effects of *Morchella conica* on the ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Mycosystema* (菌物学报),2011,30:319-324.