

文章编号:1673-1689(2005)04-0026-05

## 灰树花多酚的提取和活性研究

陈向东, 刘晓雯, 吴梧桐\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏南京 210009)

**摘要:**从灰树花菌丝体中提取多酚类物质,并研究其性质和活性。采用弱极性的大孔吸附树脂从灰树花菌丝体粗提物中吸附多酚类物质,吸附量大,解吸容易,获得褐色粉末状产物,应用红外、紫外扫描和鉴别试验证明其主要为多酚类物质,用F-D法以间苯三酚为标准测得酚类物质质量分数为9.3%。平板系列稀释法测定体外抗菌活性,灰树花多酚对金黄色葡萄球菌等具有一定的抑制作用。红细胞氧化溶血和MDA试验测定其抗氧化活性,实验显示:对于红细胞的自氧化和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致的氧化均具有一定的抑制活性,可显著抑制小鼠肝匀浆自发生成MDA。碘呈色法和DNS比色法试验结果显示灰树花多酚可抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性,减少酶对淀粉的水解。树脂法适合从灰树花菌丝体中提取多酚类物质,灰树花多酚具有抗氧化、抗菌及抑制 $\alpha$ -淀粉酶等活性。

**关键词:**灰树花菌丝体;多酚;大孔树脂;活性

**中图分类号:**S 567.3

**文献标识码:**A

## Extraction and Activities of Polyphenol from *Grifola frondosa* Mycelium

CHEN Xiang-dong, LIU Xiao-wen, WU Wu-tong\*

(The School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:**GF polyphenol was extracted from *Grifola frondosa* mycelium and its pharmacological functions were determined in this paper. Brown powder was extracted using low-polar macroporous adsorption resin and its main ingredient was identified as polyphenol, by ultraviolet, IR spectrometer and phenol identify test. GF polyphenol showed inhibitory activities to bacteria such as *S. aureus* in vitro using plates serial dilution method. Hemolysis of red blood cell oxidation and lipid peroxidation of mice liver homogenate methods were used to determine its antioxidation activities. GF polyphenol inhibited oxidation of red blood cell and MDA production of mice liver homogenate. GF polyphenol reduced hydrolysis of starch by alpha amylase using I<sub>2</sub> and DNS method. It is suitable to use resin to extract GF polyphenol. GF polyphenol showed antioxidation, antibacteria and alpha-amylase inhibition activities.

**Key words:** *Grifola frondosa* mycelium; polyphenol; resin; activities

灰树花是一种药、食兼用的珍稀真菌,具有广泛的药理活性<sup>[1]</sup>,如抗肿瘤<sup>[2]</sup>,抗糖尿病<sup>[3]</sup>,抗氧

化<sup>[4]</sup>,以及抗辐射<sup>[5]</sup>,调节免疫功能<sup>[6]</sup>及抗菌<sup>[7]</sup>等。灰树花发酵菌丝体粗提物呈黄褐色,含有大量有色

收稿日期:2005-01-21; 修回日期:2005-03-18.

基金项目:教育部高等学校科技创新工程重大项目(130105)资助课题。

作者简介:陈向东(1969-),女,江苏靖江人,副教授,微生物与生化药学博士研究生; \* 通讯作者。

物质,作者应用大孔树脂从灰树花菌丝体粗提物中提取分离有色部分,经鉴别为多酚类物质,并对活性进行了初步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

灰树花菌丝体粗提物,山东京博生物科技公司提供;大孔树脂:天津南开大学化工厂产品; $\alpha$ -淀粉酶:50 u/mg,中国医药集团上海化学试剂公司产品;MDA试剂盒,南京建成生物工程公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等临床分离株:中国药科大学微生物学教研室保存。

### 1.2 灰树花多酚的提取分离

**1.2.1 热水提取** 灰树花菌丝体粗提物粉末,10倍质量的水浸提,离心取上清即水提液。

**1.2.2 树脂的预处理** 新树脂以体积分数为95%的乙醇及稀酸、稀碱等处理,水洗至中性,离子交换树脂转为Cl型备用。

**1.2.3 静态吸附与洗脱实验** 量取一定体积已处理的树脂,精确加入适当稀释的水提液,25℃摇床震荡24 h后,滤出液体,树脂再加入一定体积的体积分数为95%乙醇,于25℃震荡解吸。分别测定树脂吸附前后和乙醇解吸后的水提液280 nm的吸光度,按下式计算吸附率 $Q$ 及解吸率 $R$ 。 $Q = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$ , $R = A_j / A_0 \times 100\%$ 。其中, $A_0$ 为吸附前初始吸光度, $A_s$ 为吸附后吸光度, $A_j$ 为解吸后吸光度。

**1.2.4 吸附动力学实验** 根据树脂的静态吸附量对时间作出吸附动力学曲线,分析树脂的吸附特性及吸附速率。

**1.2.5 灰树花多酚的分离** 乙醇解吸液旋转蒸发浓缩至干,加水溶解,用乙酸乙酯萃取,萃取液旋转蒸发挥去乙酸乙酯,得到固体提取物,作为理化性质和活性研究的样品。回收乙醇和乙酸乙酯。

### 1.3 灰树花多酚的理化性质测定

**1.3.1 紫外扫描** 样品0.2 mg/mL水溶液在200~400 nm进行紫外扫描。

**1.3.2 红外扫描** 样品2 mg以溴化钾压片,于4000~400  $\text{cm}^{-1}$ 进行扫描。

**1.3.3 鉴别试验** 样品分别用茚三酮、三氯化铁、溴水、明胶和香草醛-盐酸等试剂进行鉴别反应。

### 1.4 酚类定量测定

将间苯三酚配成标准溶液(125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。取0.00、0.05、0.15、0.25、0.35、0.45 mL置于15 mL试管

管中,加水稀释至7 mL,混合均匀,加入0.5 mL Folin-Denis试剂摇匀,3 min后加入2 mL饱和碳酸钠溶液定容至10 mL,混合充分。测定波长680 nm处的吸光度。灰树花样品的测定操作同标准曲线<sup>[8]</sup>。

### 1.5 体外抗菌活性试验

**1.5.1 平板打孔法** 将培养好的试验菌用无菌水稀释至所需浓度,加入恒温于55℃左右的灭菌培养基,制成含菌平板。打孔,注入不同浓度的灰树花样品溶液,37℃培养24 h。

**1.5.2 平板倍比稀释法** 吸取适量不同浓度的灰树花样品溶液置无菌平皿中,加入恒温于55℃左右的灭菌培养基,混合铺平板。将培养好的试验菌适当稀释,用多点接种仪接至各平板,37℃培养24 h观察记录MIC值<sup>[9]</sup>。

### 1.6 抗氧化活性试验

**1.6.1 对红细胞自氧化溶血的影响** 红细胞取自小鼠眼眶静脉丛,用生理盐水洗3次,然后配成1%红细胞悬液。取红细胞悬液1 mL,加入含不同质量浓度样品的生理盐水溶液20  $\mu\text{L}$ (终质量浓度分别为0.075、0.15、0.30、0.60 mg/mL),以不加药组为对照组,加入生理盐水20  $\mu\text{L}$ 。以维生素C为阳性对照,终质量浓度为0.1 mg/mL。37℃温育24 h后,2500 r/min离心10 min,540 nm处测定吸光度。以对照组为100%溶血,计算溶血度。

**1.6.2 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 所致红细胞氧化溶血的影响** 取上述红细胞悬液1 mL,加入不同质量浓度样品(终质量浓度分别为0.075、0.15、0.30、0.60 mg/mL)及 $\text{H}_2\text{O}_2$ (体积分数为1%)。以维生素C为阳性对照,终质量浓度为0.1 mg/mL。37℃温育1 h后,2500 r/min离心10 min,415 nm处测定吸光度。以 $\text{H}_2\text{O}_2$ +红细胞为对照组,同时设正常红细胞组。

**1.6.3 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的影响** 迅速取小鼠肝置于4℃生理盐水中,洗去表面残血,制成5%的肝匀浆。取肝匀浆0.5 mL,加入灰树花多酚0.5 mL(终质量浓度分别为0.25、0.5、1.0 mg/mL),以不加药组作为对照管,加入生理盐水0.5 mL。每管加入50  $\mu\text{L}$ 体积分数3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,混匀,37℃温育2.5 h。按试剂盒说明书操作,721型分光光度计532 nm处比色测定。蒸馏水调零,以四乙氧基丙烷为标准,计算每毫升溶液中丙二醛(MDA)的生成量。

### 1.7 对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制试验

$\alpha$ -淀粉酶用磷酸缓冲液配制成1 mg/mL溶液,取0.25 mL分别加入100、200  $\mu\text{g}$ 灰树花多酚样

品,37℃结合10 min,加入1 mL 1%可溶性淀粉溶液,37℃恒温反应5 min. 碘呈色法:反应液加碘显色,测定660 nm处的吸收值. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法:反应液加入1 mL DNS试剂,在沸水浴上加热10 min,冷却后稀释至适当的倍数,在520 nm测定吸收值.

## 2 实验结果

### 2.1 树脂的吸附和解吸

稀释的水提液初始 $A_{280}$ 为0.570,树脂吸附24 h后测定吸附率,7种树脂的静态吸附动力学曲线见图1. 解吸率为乙醇解吸2 h后测定,吸附量及解吸率结果见表1. 吸附30 min后,除D201外的其余6种树脂吸附量均达平衡吸附量的90%以上. AB-8和D3520用乙醇解吸2 h后解吸率可达38.1%和49.6%,5种离子交换型树脂虽然吸附量大,但用乙醇解吸困难,后换用1 mol/L的NaOH继续解吸仍难解吸下来. 而AB-8及D3520对多酚吸附量大,解吸容易,所以选用效果最好的AB-8进行多酚的提取分离.

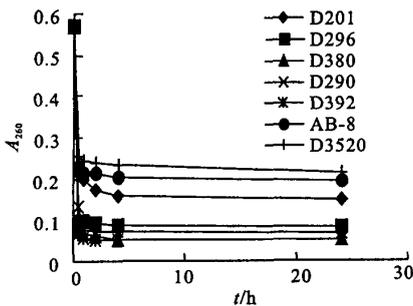


图1 静态吸附动力学曲线

Fig. 1 The kinetics curves of static adsorption

表1 灰树花多酚的吸附率和解吸率

Tab. 1 The adsorption and desorption of GF polyphenol

树脂	$A_s$	吸附率/%	$A_d$	解吸率/%
D3520	0.216	62	0.217	38.1
AB-8	0.194	66	0.283	49.6
D392	0.051	91	0.05	8.8
D380	0.062	89	0.028	4.9
D296	0.082	86	0.024	4.2
RD290	0.066	88	0.027	4.7
D201	0.146	74	0.027	4.7

### 2.2 理化性质和含量测定

2.2.1 光谱分析 灰树花提取物为褐色粉末,易溶于水和乙醇,紫外扫描图谱(图2)显示在273 nm 万方数据

处有最大吸收峰,在200 nm处有强吸收. 红外扫描图谱(图3)3 400  $\text{cm}^{-1}$ 左右强宽峰为羟基的伸缩振动吸收,3 000  $\text{cm}^{-1}$ 左右为苯环的不饱和C—H键的伸缩振动,1 600~1 400  $\text{cm}^{-1}$ 具有苯环的特征吸收. 紫外和红外光谱均显示有羟基和苯环的特征吸收. 初步判断为酚类物质. 紫外区仅出现一个单峰,与黄烷醇类多酚如儿茶素等紫外吸收图极为相似,说明灰树花多酚主要成分可能为黄烷醇类多酚.

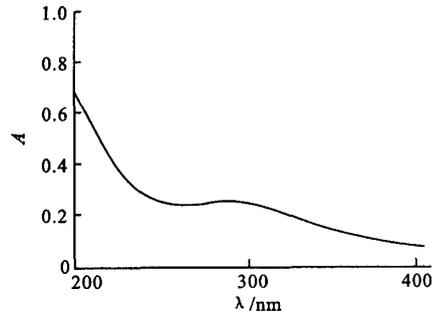


图2 灰树花多酚的紫外吸收图谱

Fig. 2 The Ultra-violet spectrum of GF polyphenol

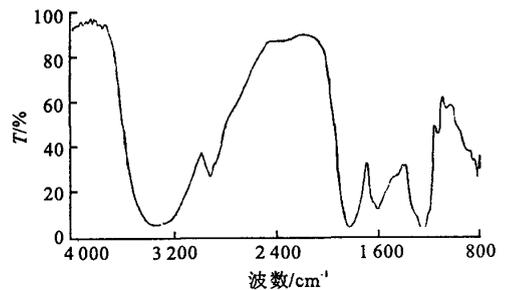


图3 灰树花多酚的红外图谱

Fig. 3 The IR spectrum of GF polyphenol

2.2.2 鉴别试验 样品与茚三酮不显色,说明不是蛋白质或氨基酸;与三氯化铁显灰绿色,与溴水生成白色沉淀,是酚类物质的特征反应,说明可能主要为酚类物质,与光谱分析结果吻合. 样品与明胶试液不生成沉淀,说明为小分子酚类物质. 样品加入香草醛-盐酸试液后由原来的黄褐色变为红褐色,而黄烷醇的香草醛-盐酸试液反应为红色,推测样品可能含黄烷醇类物质,也与紫外扫描图的推论一致.

2.2.3 灰树花多酚质量分数测定 多酚定量测定的标准曲线见图4. 采用Folin-Denis法测定灰树花提取物中酚类物质质量分数为9.3%. 该法测多酚的质量分数比较快速简便,以间苯三酚作为标准品,对于以间苯三酚为结构单元的多酚测定结果较为准确,而对于结构尚不明确的灰树花多酚可能存在一定误差.

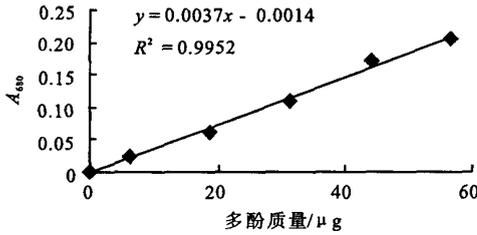


图 4 多酚定量测定的标准曲线

Fig. 4 The standard curve of phenol determination

2.3 体外抗菌活性

以平板打孔法初步确定了灰树花多酚抑菌的浓度范围,然后再通过平板倍比稀释法测定结果见表 2 数据.从中可以看出,灰树花多酚对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌、嗜麦芽杆菌和假单胞杆菌都有一定的抑制作用.但由于本实验的灰树花多酚是粗提物尚未进一步分离提纯,所以抑菌效率不高.

表 2 灰树花多酚的 MIC 结果

Tab. 2 The MIC of GF polyphenol

菌株(株数)	MIC/(mg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT	>5
<i>Escherichia coli</i> AT	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	>5
<i>Escherichia coli</i> (3)	>5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2)	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	2.5
<i>Acinetobacter</i> spp. (2)	>5
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	1.25~2.5
<i>Salmonella typhi</i> (2)	1.25~5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	>5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2)	1.25>5
<i>Citrobacter</i> spp. (2)	1.25~5
<i>Pseudomonas</i> spp. (2)	0.63~1.25

2.4 灰树花多酚的抗氧化活性

灰树花多酚对于红细胞的自氧化和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致的氧化均具有一定的抑制活性.红细胞经温育 24 h 后,可出现明显溶血,灰树花多酚各剂量组均可抑制红细胞的自氧化溶血,但均无明显量效关系,见表 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以破坏红细胞膜,导致血红蛋白逸出.灰树花多酚各剂量组均可显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的这种作用,见表 4. 灰树花多酚(1.0、0.5、0.25 mg/mL)各剂量组均可显著抑制小鼠肝匀浆自发生成 MDA;并随剂量增加而增加,具量效关系,见表 5. 以上结果表明,灰树花多酚具有抗氧化活性.

万方数据

表 3 对红细胞自氧化溶血的影响

Tab. 3 The hemolysis results of red blood cell self-oxidation

实验组	质量浓度/(mg/mL)	A <sub>415</sub>	溶血率/%
阴性对照*		0.029	100
维生素 C	0.1	0.010	34.5
	0.6	0.014	48.3
灰树花多酚	0.30	0.015	51.7
	0.15	0.015	51.7
	0.075	0.023	79.3

表 4 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致红细胞氧化溶血的影响

Tab. 4 The hemolysis results of red blood cell oxidation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

实验组	质量浓度/(mg/mL)	A <sub>415</sub>	溶血率/%
阴性对照*		0.139	100
维生素 C	0.1	0.043	30.9
	0.6	0.037	26.6
灰树花多酚	0.30	0.064	46.0
	0.15	0.106	76.3
	0.075	0.100	71.9

表 5 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的影响

Tab. 5 The effect on lipid peroxidation of mice liver homogenate

实验组	质量浓度/(mg/mL)	MDA/(nmol/mg)
阴性对照		14.28
灰树花多酚	1.00	2.04
	0.50	2.19
	0.25	3.79

2.5 灰树花多酚对 α-淀粉酶的抑制作用

表 6 显示灰树花多酚抑制 α-淀粉酶,减少酶对淀粉的水解,使其降解产物还原糖减少.在碘呈色法测定时随多酚量的增加蓝色变深,而在 DNS 比色法测定时随多酚量的增加还原糖量减少,具有一定的量效关系.说明灰树花多酚具有 α-淀粉酶抑制活性.

表 6 灰树花多酚对 α-淀粉酶的抑制作用

Tab. 6 The inhibition of GF polyphenol to alpha-amylase

α-淀粉酶体积/mL	灰树花多酚质量/μg	A <sub>660</sub>	A <sub>520</sub>
0	0	14.69	0.060
0.1	0	0.084	0.285
0.1	100	0.120	0.240
0.1	200	0.288	0.228

### 3 讨论

作者首次提取分离了灰树花多酚,并对其抗氧化、抗菌及 $\alpha$ -淀粉酶抑制等活性做了初步研究。

对灰树花中活性物质的研究相对集中在多糖组分<sup>[10]</sup>,多酚和其他有色物质常作为杂质而被除去,方法有活性炭吸附、DEAE-纤维素层析及双氧水氧化等<sup>[11]</sup>。活性炭吸附量大,分离效率高,但含酚型化合物的有色物质多呈负离子,较难用活性炭脱色,而且活性炭对多糖也有吸附。离子交换纤维素是开放性的长链骨架,亲水性强,吸附容量大,可有效吸附水溶液中的酸、碱成分和无机离子,留下中性组分。但灰树花有色物质与离子交换纤维素结合后洗脱困难,其原因可能是层析介质被毒化,逆转困难,难以重新获得交换能力<sup>[12]</sup>。而双氧水氧化耗时长,脱色不完全,且其中成分遭到破坏。本研究首次应用大孔树脂从发酵来源的灰树花菌丝体中提取多酚类物质。根据酚类物质特点,先选择了极性、弱极性和非极性的7种树脂进行分离研究<sup>[13]</sup>,然后选用AB-8树脂吸附、乙醇解吸,浓缩解吸液以获得多酚类物质。极性树脂与多酚形成离子键,结合牢固不易洗脱,而非极性树脂对多酚吸附不完全。AB-8是弱极性吸附型大孔树脂,主要依靠范德华力吸附,吸附量大,解吸容易,操作条件温和,无酸、盐等无机离子干扰,利于对提取物的进一步研究,适合灰树花多酚的提取。同时可得到无色灰树花菌丝体

多糖液,利于多糖的分离纯化和活性研究。

灰树花提取物主要为多酚类物质,对植物来源的多酚类物质<sup>[8]</sup>如茶多酚<sup>[14]</sup>、褐藻多酚<sup>[15]</sup>等研究较多,而对真菌来源的多酚类物质研究特别是灰树花多酚的研究未见报道。本实验中提取的灰树花多酚具有抗氧化、抗菌及 $\alpha$ -淀粉酶抑制等活性,与文献报道的灰树花活性一致<sup>[1~7]</sup>,说明多酚类物质也是其活性的重要组分。多酚以大量酚羟基作为氢供体,对多种活性氧具有清除作用,减少氧自由基产生的可能性,同时多酚对氧化酶的抑制和对金属离子的络合作用也使其表现抗氧化活性。对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性可能是非竞争性抑制,由于多酚与酶表面形成多点交联,一定程度上改变或抑制了酶的空间结构,使之不能发生催化反应所必须的构象变化,致使酶活性中心的催化能力降低<sup>[8]</sup>。对于多酚类物质的抗菌活性,通常认为相对分子质量大的多酚与蛋白质的结合力大,因而抑菌活性强。实验中提取的多酚不使明胶试液沉淀,说明不是鞣质,而是小分子多酚,也表现出一定的抑菌活性,其机理可能是对微生物酶的抑制而破坏微生物代谢,同时多酚还可以通过与细胞膜的结合改变微生物的代谢,多酚络合金属离子的特性也可能破坏微生物的生态系统从而破坏微生物的正常代谢。

灰树花多酚类物质具有抗氧化、抗菌及 $\alpha$ -淀粉酶抑制等活性。但目前所得的灰树花多酚是混合物,有待进一步分离提纯。

### 参考文献:

- [1] Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential [J]. *Altern Med Rev*, 2001, 6(1): 48-60.
- [2] Kodama N, Komuta K, Nanba H. Can maitake MD fraction aid cancer patients? [J]. *Altern Med Rev*, 2002, 7(3): 236-239.
- [3] Kurushima H, Kodama N, Nanba H. Actives of polysaccharides obtained from *Grifola frondosa* on insulin-dependent diabetes mellitus induced by streptozotocin in mice [J]. *Mycoscience*, 2000, 41(5): 473-480.
- [4] MAU J L, LIN HC, SONG SF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms [J]. *Food Research International*, 2001, 35(6): 519-526.
- [5] 金国虔,叶波平,奚涛. 灰树花胞内多糖抗辐射作用初步研究 [J]. *药物生物技术*, 2003, 10(1): 40-42.
- [6] Inoue A, Kodama N, Nanba H. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of T lymph node Th-1/Th-2 proportion [J]. *Bio Pharm Bull*, 2002, 25(4): 536-540.
- [7] Kodama N, Yamada M, Nanba H. Addition of Maitake D-fraction reduces the effective dosage of vancomycin for the treatment of *Listeria*-infected mice [J]. *Japanese Journal of Pharmacology*, 2001, 87(4): 327-332.
- [8] 石碧,狄莹. 植物多酚 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [9] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] 边杉,叶波平,奚涛. 灰树花多糖的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2004, 11(1): 60-63.
- [11] 盛家荣. 多糖的提取、分离及结构分析 [J]. *广西师院学报(自然科学版)*, 1999, 16(4): 49-54.
- [12] 吴梧桐. 生物制药工艺学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999.
- [13] 黄贱苟,徐满才,李海涛,等. D301树脂对酚类物质的吸附热力学研究 [J]. *离子交换与吸附*, 2003, 19(1): 37-42.
- [14] 陈继英,郭嘉林,张存彦,等. 茶多酚的研究进展 [J]. *中草药*, 2004, 35(10): 11-13.
- [15] 魏玉西,郭道森,牛锡珍,等. 褐藻中多酚化化合物的研究进展 [J]. *海洋科学*, 2002, 26(17): 18-20.

(责任编辑:朱明)