

王芳, 刘洪存, 陆淑雯, 等. HPLC 法测定云芝菌发酵茶中 9 种活性成分及抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(18): 258–264. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110148

WANG Fang, LIU Hongcun, LU Shuwen, et al. Determination of 9 Active Components in *Trametes versicolor* Fermented Tea by High Performance Liquid Chromatography and Their Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(18): 258–264. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110148

· 分析检测 ·

HPLC 法测定云芝菌发酵茶中 9 种活性成分 及抗氧化活性研究

王芳¹, 刘洪存¹, 陆淑雯¹, 杨立芳², 黄盈¹, 姜明国^{1,*}, 孟娟³

(1. 广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西南宁 530006;

2. 广西民族大学化学化工学院, 广西林产化学与工程重点实验室, 广西南宁 530006;

3. 广西民族大学预科教育学院, 广西南宁 530006)

摘要:目的: 建立同时测定云芝菌发酵茶中 9 种活性成分含量的高效液相色谱法, 并对发酵前后茶叶中 9 种活性成分含量和抗氧化活性的变化进行研究。方法: 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% 磷酸溶液和乙腈, 梯度洗脱, 检测波长为 280 nm、流速 1.0 mL/min、柱温 30 ℃。结果: 与未发酵的对照组绿茶相比, 云芝菌发酵茶中咖啡碱的含量无明显变化, 没食子酸、可可碱和没食子儿茶素没食子酸酯的含量分别增加了 0.4613%、0.3118% 和 0.5770%, 没食子儿茶素、茶碱、表没食子儿茶素、表儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯含量分别减少了 0.0156%、0.0178%、1.2938%、1.1062% 和 4.0241%。体外抗氧化活性试验结果表明, 发酵后茶叶对 DPPH· 和 ·OH 的清除率均有显著性 ($P<0.05$) 降低。当浓度为 2.0 mg/mL 时, 云芝菌发酵茶提取液对 DPPH· 和 ·OH 的清除率分别为 7.79% 和 9.65%。结论: 云芝菌的固体发酵可改变茶叶中活性成分的含量和抗氧化活性, 研究为云芝菌发酵茶的开发提供了实验依据。

关键词: 高效液相色谱法, 云芝菌, 发酵茶, 绿茶, 活性成分, 抗氧化

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)18-0258-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110148

本文网刊:



Determination of 9 Active Components in *Trametes versicolor* Fermented Tea by High Performance Liquid Chromatography and Their Antioxidant Activity

WANG Fang¹, LIU Hongcun¹, LU Shuwen¹, YANG Lifang², HUANG Ying¹, JIANG Mingguo^{1,*}, MENG Juan³

(1. Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China;

3. College of Preparatory Education, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China)

Abstract: Objective: To establish a method for simultaneous determination of nine active components in the fermented tea of *Trametes versicolor*, and analyze the changes of nine active components and antioxidant activities fermentation before and after. Methods: Using gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min, an Agilent C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile of 0.05% phosphoric acid solution (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase. The detection

收稿日期: 2023-11-15

基金项目: 广西科技重大专项 (桂科 AA18242026); 广西民族大学科研基金资助项目 (2020KJYB005); 广西民族大学实验技术创新与实验室管理研究项目 (2023MDSY008)。

作者简介: 王芳 (1992-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 食品分析, E-mail: 453227574@qq.com。

* 通信作者: 姜明国 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: mzyjiang@163.com。

wavelength was 280 nm and the column temperature was 30 °C. Results: Compared with the control group unfermented green tea, there was no significant change in the caffeine content of fermented tea. The increasing rates of gallic acid, theobromine and gallatechin gallate content in fermented tea were 0.4613%, 0.3118% and 0.5770%, respectively. The decreasing rates of egallatechin, theophylline, epigallocatechin, epicatechin and epigallocatechin gallate content in fermented tea were 0.0156%, 0.0178%, 1.2938%, 1.1062% and 4.0241%, respectively. *In vitro* antioxidant activity studies revealed that DPPH· scavenging capacity and ·OH scavenging capacity were significantly ($P<0.05$) decreased after fermentation. When the concentration of *Trametes versicolor* fermented tea extract was 2.0 mg/mL, the scavenging capacity of DPPH· and ·OH was 7.79% and 9.65% respectively. Conclusion: The solid fermentation of *Trametes versicolor* can change the tea content of active ingredients and antioxidant activity, which provides experimental basis for the development of *Trametes versicolor* fermented tea.

Key words: high-performance liquid chromatography (HPLC); *Trametes versicolor*; fermented tea; green tea; active substances; antioxidant activity

茶叶中含有上百种对人体有益的活性成分,如茶多酚^[1]、茶多糖^[2]、蛋白质^[3]、生物碱^[4]、儿茶素^[5]等生物活性物质,具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂等多种生物活性和保健功效^[6-8],是世界上最受欢迎的健康饮品之一^[9]。随着人们生活水平的提高,越来越多消费者开始追求口感更佳、品质更高且具有多重保健功效的茶饮品^[10]。有效提升茶叶品质、改善茶叶口感、开发具有新型功效的茶饮品已成食品行业研究热点之一。云芝菌是一种食药兼用菌株^[11],在发酵过程中产生糖肽类、甾体类、三萜类等活性物质^[12-13],被广泛应用于癌症、肿瘤及免疫治疗^[14-16],也常用于食品发酵,但将云芝菌用于茶叶发酵的研究鲜有报道。因此,利用云芝菌对茶叶进行发酵,可形成微生物菌体与茶叶其他代谢物混合物为主体的云芝菌发酵茶^[17],兼具茶和云芝菌双重功效,能较好满足消费者对新型茶饮品的需求。

发酵茶的独特风味和功效,都与活性成分含量相关,其中表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、没食子酸、表没食子儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、咖啡碱、可可碱和茶碱是决定茶叶风味和品质的重要因子^[18],其含量高低直接影响着茶叶品质的优劣。研究显示,微生物的发酵作用可改变茶叶中活性物质的含量^[19],使得茶叶呈现出更多的风味和更高的营养价值^[20-22]。因此,准确测定茶叶中活性成分和抗氧化活性对茶叶品质评价、茶叶发酵、茶叶加工等方面具有重要意义^[23]。目前,国内外测定茶叶中活性成分常用方法有分光光度法^[24]、化学分析方法^[25-26]、红外光谱法^[27]、气相色谱-质谱联用^[28]、高效液相色谱法^[29]、液相色谱-质谱联用^[30-31]等,其中高效液相色谱法是一种常见的快速检测方法,对样品的限制因素少,适用于同时检测茶叶样品中的多元混合物。

基于上述,本研究通过建立高效液相色谱分析方法,同时对茶叶发酵前后 9 种活性成分含量变化进行研究,结合清除 DPPH· 和 ·OH 的方法综合评价茶叶发酵前后的抗氧化活性变化,为云芝菌发酵茶的质量评价提供参考依据,有助于完善云芝菌发酵茶的

质量控制,为新型功能菌茶的研制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

绿茶 广西梧州圣源茶叶有限公司;云芝菌种 武汉益林菌业有限公司(由生工生物工程(上海)股份有限公司进行 18 ITS 测序鉴定为 *Trametes versicolor*);茶碱(theophylline, TY)、表儿茶素((-)-epicatechin, EC)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)、没食子酸(gallic acid, GA)、表没食子儿茶素((-)-epigallocatechin, EGC)、没食子儿茶素(gallocatechin, GC)、表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin gallate, EGCG)(HPLC $\geq$ 98%) 上海源叶生物科技有限公司;咖啡碱(caffeine, C)(HPLC $\geq$ 98%) 江苏泰普瑞生物技术有限公司;可可碱(theobromine, TB)(HPLC $\geq$ 99.5%) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈、甲醇 色谱纯,美国 Fisher 公司;磷酸 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;2,2-联苯基-1-苦肟基(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 上海麦克林生化科技有限公司;羟自由基清除能力试剂盒 北京索莱宝科技有限公司。

1260 型高效液相色谱仪(配 DAD 检测器) 美国 Agilent 公司;LS220A SCS 电子天平 上海天美天平仪器有限公司;G154D 高压灭菌锅 致微(厦门)仪器有限公司;GenLee16K 台式高速离心机 湖南湘立科学仪器有限公司;ZHJH-1109B 超净工作台 苏净集团安泰公司;DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;BSP-150 生化培养箱 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;Epoch 酶标仪 美国 BioTek 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 云芝菌的驯化 在无菌超净工作台中将云芝菌丝接种到马铃薯 PDA 培养基平板上,置于 30 °C 生化培养箱中培养,待菌丝体长满平板时,于 4 °C 冰箱保存备用。挑取活化的菌丝逐步接种于葡萄糖含量不断降低的茶叶水培养基上,至菌丝接种在含 1% 葡萄糖的茶水培养基上能够快速生长,铺满平

板,再以茶叶作为培养基质,继续驯化菌种,并逐步降低培养基中的葡萄糖含量,直至菌种可在含1%葡萄糖的茶叶培养基上能够快速生长,将驯化好的云芝菌种保存于4℃冰箱,备用。

1.2.2 云芝菌发酵茶的制备 称取40.00 g绿茶于培养瓶中,加入1%葡萄糖溶液使绿茶含水量达到80%,在无菌环境下,将驯化好的云芝菌种接种在绿茶培养基上,封口后充分摇晃置于30℃下培养4个月后,至云芝菌丝长满整个茶叶培养基时,于30℃下低温烘干至恒重,密封干燥,得云芝菌发酵茶。

1.2.3 样品中9种活性物质的提取 样品处理:将茶叶粉碎,过40目筛,于阴凉处密封保存备用。准确称取茶叶粉末1.00 g于50 mL离心管中,参考GB/T 8313-2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》加入10 mL 70%甲醇作提取溶剂,充分振荡混匀,超声提取9种目标物20 min,在6000 r/min转速下离心10 min,转移上清液至25 mL容量瓶,重复上述操作1次。合并2次提取液,用70%甲醇定容。提取液用0.45 μm有机滤膜过滤后,4℃下贮存备用。

1.2.4 标准溶液的制备 精密称取GA 3.50 mg、GC 2.50 mg、TB 3.50 mg、TY 3.50 mg、EGC 2.50 mg、C 12.50 mg、EC 2.50 mg、EGCG 12.50 mg、GCG 2.50 mg于5 mL容量瓶中,用70%甲醇水溶解并定容,配制成标准品的混合溶液。逐级稀释,用70%甲醇水定容,得混合标准品质量浓度为GA(43.75~700 μg/mL)、GC(31.25~500 μg/mL)、TB(43.75~700 μg/mL)、TY(43.75~700 μg/mL)、EGC(31.25~500 μg/mL)、C(156.25~2500 μg/mL)、EC(31.25~500 μg/mL)、EGCG(156.25~2500 μg/mL)、GCG(31.25~500 μg/mL)。混合标准品溶液过0.45 μm有机滤膜过滤后,4℃下贮存备用。

1.2.5 液相色谱检测条件优化 由于茶叶中多酚类成分性质相似,各成分出峰时间易重合,难以实现完全分离,因此色谱条件的优化十分重要。实验分别以0.05%甲酸(A)-甲醇(B)、0.05%甲酸(A)-乙腈(B)、0.05%磷酸(A)-乙腈(B)为流动相进行探究,根据9种标准品的分离效果,选取最优流动相。确定色谱条件为:Agilent 1260高效液相色谱仪(配DAD检测器),色谱柱:Agilent C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温:30℃,进样量:10 μL,检测波长280 nm,流动相为:0.05%磷酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱条件:0~15 min, 5%→10% B; 15~40 min, 10%→20% B; 40~50 min, 20%→35% B,平衡10 min。

1.2.6 方法学考察及验证 标准曲线的绘制:分别取1.2.4节中不同浓度的混合标准品溶液,在1.2.5节最优色谱条件下进行测定,计算峰面积,重复测定5次。以标准品的质量浓度(X, μg/mL)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。

重复性实验:按照1.2.3节方法平行制备绿茶和云芝菌发酵茶提取液各5份,在1.2.5节最优色谱条件下进行测定,根据测得结果计算绿茶和云芝菌发酵茶样品中各组分的含量,并计算相对标准偏差(RSD)。

稳定性实验:按照1.2.3节方法制得绿茶和云芝菌发酵茶样品待测液,将其放置于4℃冰箱中,分别取放置0、2、4、6、8、12、24 h样品溶液进行测定,根据测得结果计算绿茶和云芝菌发酵茶样品中各组分的含量,并计算RSD值。

精密密度实验:按照1.2.3节方法制备绿茶和云芝菌发酵茶提取液各1份,在1.2.5节最优色谱条件下进行测定,重复进样6次,根据测得结果计算绿茶和云芝菌发酵茶样品中各组分的含量,并计算RSD值。

加标回收实验:取同一批次绿茶和云芝菌发酵茶各3份,每份1.00 g,分别加入加标水平为20、50、100 μg/g的3个浓度水平的标准品溶液,按照1.2.3节方法分别制备加标后的绿茶和云芝菌发酵茶样品溶液,在1.2.5节最优色谱条件下进行检测,根据测得结果进行平均加标回收率检测,并计算RSD值。

1.2.7 抗氧化活性测定

1.2.7.1 DPPH·自由基(DPPH·)清除能力的测定 参照文献[31],稍作修改。精确称取DPPH 10.00 mg,用无水乙醇溶解,转移至100 mL棕色容量瓶并定容,得到浓度为0.10 mg/mL的DPPH溶液。移取DPPH溶液2.0 mL于玻璃试管中,分别加入不同浓度的绿茶提取液、云芝菌发酵茶提取液和V_C溶液各2.0 mL,振荡混匀,室温避光反应30 min,用无水乙醇作空白参比,在517 nm处测定其吸光值,并计算DPPH·清除率,计算公式如下:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中:A₀为空白对照管的吸光度;A₁为待测样品溶液与DPPH反应后的吸光度;A₂为以等量无水乙醇取代DPPH测得的吸光度。

1.2.7.2 羟自由基(·OH)清除能力测定 按照羟自由基清除能力试剂盒加样表加入不同浓度的绿茶提取液、云芝菌发酵茶提取液和V_C溶液。在536 nm处测定吸光值,并计算·OH清除率。

1.3 数据处理

用WPS Office计算数据平均值、精密密度、回收率及相对标准偏差,并以列表法进行表示;Origin 8.0软件进行绘图;SPSS 20.0软件对数据进行差异性分析,P<0.01为统计学上有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

实验分别以0.05%甲酸-甲醇、0.05%甲酸-乙腈、0.05%磷酸-乙腈为流动相,比较三种流动相对9种标准品的分离效果。结果表明,0.05%甲酸-甲

醇流动相体系(图 1a)中色谱图峰型差,拖尾严重,且出峰慢,检测时间较长。0.05% 甲酸-乙腈流动相体系(图 1b)中 EC 和 EGCG 峰型较差,且无法分开,即使优化洗脱条件仍无法实现两峰的有效分离;而采用 0.05% 磷酸-乙腈(图 1c)的混合液为流动相时,化合物峰型较窄、分离度好、灵敏度高,在 50 min 之

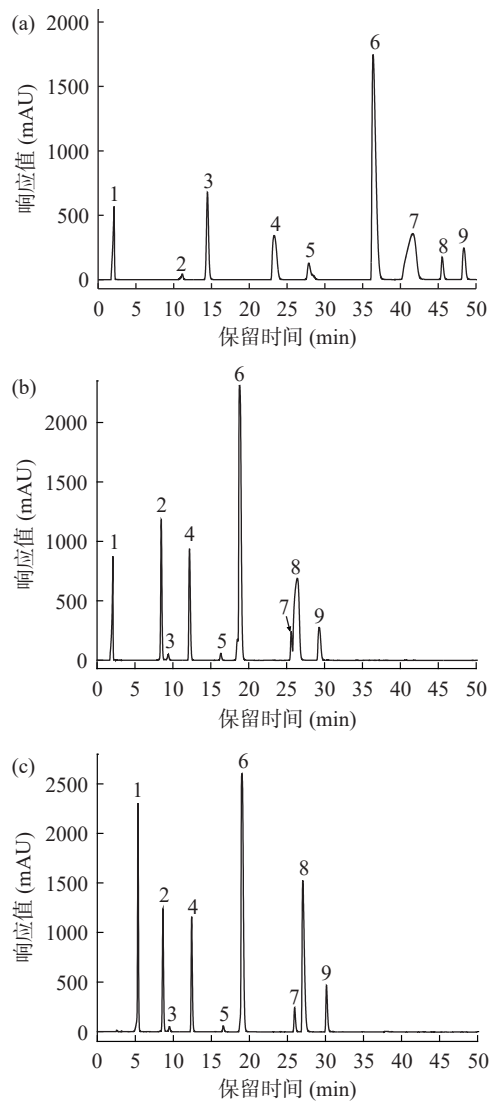


图 1 采用不同流动相时混合标准溶液的色谱图

Fig.1 Chromatograms of mixed standard solution with different mobile phases

注: a: 流动相为甲醇-0.05% 甲酸; b: 流动相为乙腈-0.05% 甲酸; c: 流动相为乙腈-0.05% 磷酸。

内, 9 种化合物能够完全分离。因此, 实验选择最优流动相为 0.05% 磷酸-乙腈。

2.2 方法学验证结果

2.2.1 方法线性范围、检出限与定量限 9 种标准品的标准曲线如表 1 所示。由表 1 可知, 9 种标准品在质量浓度范围在 31.25~2500 $\mu\text{g/mL}$ 之间具有较强的线性关系, 决定系数均大于 0.9996。9 种标准品的检出限 $\text{LOD}(\text{S/N}=3)$ 为 0.1116~1.0417 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 $\text{LOQ}(\text{S/N}=10)$ 为 0.3906~3.1250 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2 重复性、稳定性和精密度 重复性实验结果如表 2 所示, 绿茶中 9 种活性成分 RSD 值在 0.99%~3.66% 之间, 云芝菌发酵茶中 9 种活性成分 RSD 值在 0.53%~2.36% 之间, 说明此方法具有良好的重复性。

稳定性实验结果如表 3 所示, 按照在 1.2.5 节最优色谱条件下, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 对样品溶液进行测定, 绿茶中 9 种活性成分 RSD 值在 0.43%~2.42% 之间, 云芝菌发酵茶中 9 种活性成分 RSD 值在 0.72%~4.35% 之间, 说明绿茶和云芝菌发酵茶提取液中的 9 种活性成分在 24 h 内稳定性良好。

精密度实验结果如表 4 所示, 绿茶中 9 种活性成分 RSD 值在 0.16%~1.87% 之间, 云芝菌发酵茶中 9 种活性成分 RSD 值在 0.16%~1.59% 之间, 说明此方法精密度良好。

2.2.3 加标回收率试验 绿茶和云芝菌发酵茶的加标水平分别为 20、50 和 100 $\mu\text{g/g}$, 每个水平重复 6 次, 加标回收率结果如表 5 所示。在不同加标水平下, 绿茶中 9 种活性成分的平均回收率在 83.01%~111.65% 之间, 相对标准偏差 $\text{RSD}(n=6)$ 在 0.02%~2.83% 之间; 云芝菌发酵茶中 9 种活性成分的平均回收率在 95.81%~114.05% 之间, 相对标准偏差 $\text{RSD}(n=6)$ 在 0.18%~2.60% 之间, 由此可见, 回收率能够满足定量分析的需求。

2.3 绿茶、云芝菌发酵茶和云芝菌样品中 9 种活性物质的含量

按照 1.2.3 节方法对样品进行处理, 获得供试品溶液, 按 1.2.5 节条件进行测定, 绿茶、云芝菌发酵茶和云芝菌样品的色谱图如图 2 所示, 在此色谱条件下云芝菌提取液中并未检测到 9 种活性物质。如

表 1 9 种不同浓度混合标准品的线性关系、检出限和定量限

Table 1 Linear relativity, LOD and LOQ of nine mixed standard substances with different concentrations

序号	标准品	出峰时间(min)	标准曲线	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	决定系数(R^2)	检出限 $\text{LOD}(\mu\text{g/mL})$	定量限 $\text{LOQ}(\mu\text{g/mL})$
1	GA	5.349	$y=24.55x+19.444$	43.75~700	0.9999	0.1250	0.4375
2	GC	8.629	$y=26.056x+8.9902$	31.25~500	0.9999	0.1789	0.6250
3	TB	9.487	$y=0.9071x-4.9908$	43.75~700	0.9998	0.7916	2.3750
4	TY	12.199	$y=17.769x+37.413$	43.75~700	0.9998	0.1458	0.4375
5	EGC	16.566	$y=1.5929x-5.9039$	31.25~500	0.9996	1.0417	3.1250
6	C	19.002	$y=23.98x+250.44$	156.25~2500	0.9996	0.1116	0.3906
7	EC	25.946	$y=6.6879x+11.209$	31.25~500	0.9998	0.7292	2.1875
8	EGCG	27.016	$y=12.452x+94.5$	156.25~2500	0.9998	0.2232	0.7813
9	GCG	30.135	$y=9.6945x+7.3125$	31.25~500	0.9999	0.2912	0.8750

表 2 各活性物质重复性试验结果

Table 2 Results of the repetitive tests for active substances

序号	活性物质	绿茶		云芝菌发酵茶	
		活性物质含量的 平均值(mg/g)	RSD (%)	活性物质含量 平均值(mg/g)	RSD (%)
1	GA	4.51	3.31	9.28	1.82
2	GC	0.45	1.55	0.29	2.40
3	TB	4.30	2.09	7.42	2.36
4	TY	0.40	3.14	0.22	1.63
5	EGC	17.19	2.69	3.57	1.98
6	C	32.31	3.19	31.76	1.54
7	EC	16.71	0.99	5.50	1.50
8	EGCG	46.73	1.56	5.58	2.23
9	GCG	3.03	3.66	8.80	0.53

表 3 绿茶和云芝菌发酵茶中各活性物质稳定性试验结果

Table 3 Results of the repetitive tests for active substances in green tea and *Trametes versicolor* fermented tea

序号	活性物质	绿茶		云芝菌发酵茶	
		活性物质含量的 平均值(mg/g)	RSD (%)	活性物质含量的 平均值(mg/g)	RSD (%)
1	GA	4.57	0.52	9.29	1.80
2	GC	0.45	1.42	0.29	4.35
3	TB	4.26	1.33	7.33	2.85
4	TY	0.40	1.05	0.22	1.93
5	EGC	16.46	0.84	3.63	3.56
6	C	32.39	2.42	31.75	1.08
7	EC	16.52	0.43	5.48	0.72
8	EGCG	45.53	0.55	5.54	0.77
9	GCG	2.99	1.23	8.64	2.68

表 4 各活性物质精密度试验结果

Table 4 Results of the precision tests for active substances

序号	活性物质	绿茶		云芝菌发酵茶	
		活性物质含量的 平均值(mg/g)	RSD (%)	活性物质含量 平均值(mg/g)	RSD (%)
1	GA	4.66	0.57	9.15	0.51
2	GC	0.44	0.75	0.28	0.21
3	TB	4.19	0.58	7.20	0.46
4	TY	0.39	0.19	0.22	0.27
5	EGC	16.65	0.60	3.45	1.59
6	C	33.06	1.35	31.51	0.39
7	EC	16.40	1.50	5.46	0.16
8	EGCG	45.77	1.87	5.55	0.70
9	GCG	2.93	0.16	8.83	0.45

表 5 绿茶和云芝菌发酵茶加标回收率(n=6)

Table 5 Results of recovery tests of green tea and *Trametes versicolor* fermented tea (n=6)

序号	活性物质	绿茶						云芝菌发酵茶					
		加标量20 $\mu\text{g/g}$		加标量50 $\mu\text{g/g}$		加标量100 $\mu\text{g/g}$		加标量20 $\mu\text{g/g}$		加标量50 $\mu\text{g/g}$		加标量100 $\mu\text{g/g}$	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
1	GA	91.33	0.43	111.65	1.09	106.43	0.46	102.06	1.33	105.75	1.14	106.39	1.82
2	GC	98.16	1.02	110.86	0.85	108.63	0.84	97.80	2.16	108.36	0.78	108.49	0.46
3	TB	98.96	0.87	101.57	1.04	102.33	2.83	96.22	1.79	109.83	1.26	107.16	2.45
4	TY	85.43	2.33	94.28	0.77	106.09	0.10	108.35	0.19	112.54	1.42	111.30	2.60
5	EGC	90.10	2.02	110.42	0.02	111.48	0.21	110.52	0.79	107.58	1.35	99.96	1.65
6	C	87.15	0.11	108.57	0.86	109.01	1.80	106.54	1.89	114.05	2.31	109.08	1.53
7	EC	85.51	0.05	98.52	0.18	97.04	0.16	106.52	0.33	107.51	0.69	104.75	0.62
8	EGCG	83.01	0.40	95.67	0.38	96.85	0.32	100.96	0.18	98.74	0.61	103.55	1.72
9	GCG	89.42	1.49	95.31	1.60	97.90	0.68	97.06	0.26	95.81	0.72	100.02	0.33

图 3 所示,云芝菌对绿茶进行发酵后,C 的含量几乎没有变化,GA、TB 和 GCG 的含量显著性增大($P<0.01$),GC、TY、EGC、EC 和 EGCG 的含量显著性降低($P<0.01$),且茶叶中儿茶素类物质的含量整体呈减少趋势,与文献报道的一致^[18,32]。发酵后,GA、TB 和 GCG 的含量分别增加了 0.4613%、0.3118% 和 0.5770%,GC、TY、EGC、EC 和 EGCG 的含量分别减少了 0.0156%、0.0178%、1.2938%、1.1062%

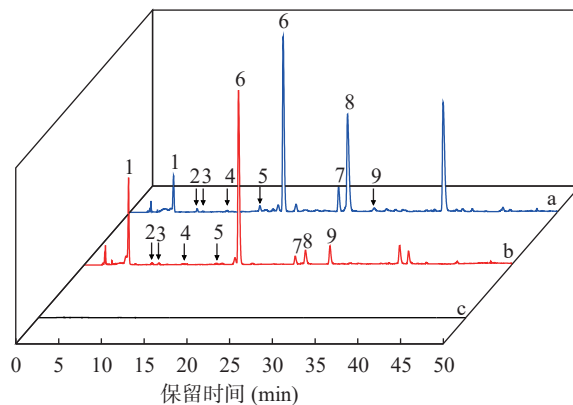


图 2 绿茶(a)、云芝菌发酵茶(b)和云芝菌(c)高效液相色谱图

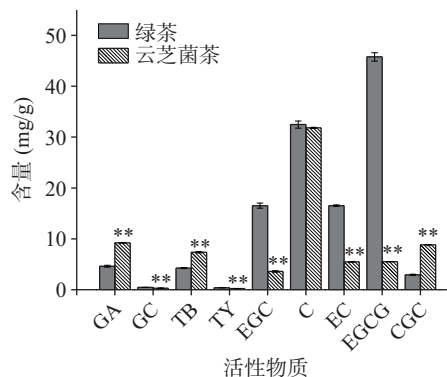
Fig.2 HPLC chromatograms of green tea (a), *Trametes versicolor* fermented tea (b) and *Trametes versicolor* (c)

图 3 云芝菌发酵对茶叶中 9 种活性成分含量的影响

Fig.3 Effects of 9 active substances in tea leaves before and after fermentation with *Trametes versicolor*

注: **表示与发酵前样品相比,在 t 检验中具有显著性差异($P<0.01$)。

和 4.0241%。这一变化可能是由于茶叶在发酵过程中部分酯型儿茶素(EGCG、EGC 等)被酶水解转化形成非酯型儿茶素和 GA^[33];或者部分酯型儿茶素经酶促氧化形成醌类物质。

2.4 绿茶和云芝菌发酵茶的抗氧化活性分析

以 V_C 作为对照组,考察发酵前后不同浓度的茶叶提取液对 DPPH· 和 ·OH 的清除率。结果如图 4 和图 5 所示,在 0.4~2.0 mg/mL 浓度范围内,随着浓度的增加,绿茶和云芝菌发酵茶对 DPPH· 和 ·OH 的清除率也逐渐增大,但云芝菌发酵茶的清除能力较弱。当绿茶和云芝菌发酵茶浓度为 2.0 mg/mL 时,与发酵前相比,DPPH· 和 ·OH 的清除率分别减少了 7.79% 和 9.65%。此结果与 2.3 节中测得的云芝菌对绿茶进行发酵后,茶叶中具有抗氧化活性的儿茶素类物质的含量整体呈减少趋势的结果一致。

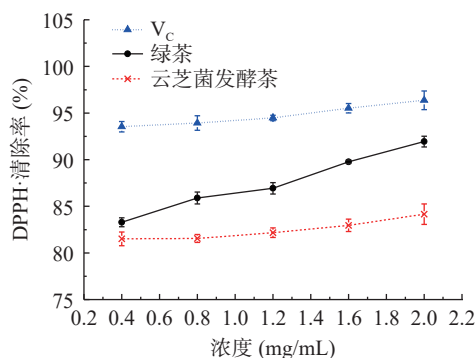


图 4 不同浓度的绿茶和云芝菌茶对 DPPH· 的清除效果
Fig.4 Scavenging effects of DPPH· of green tea and *Trametes versicolor* fermented tea with different concentrations

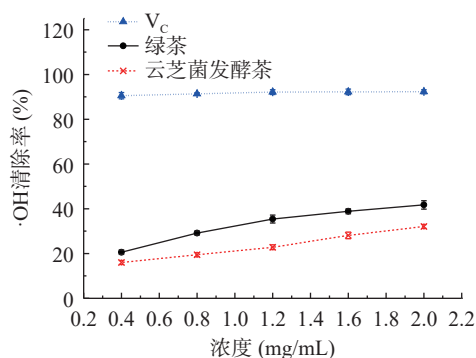


图 5 不同浓度的绿茶和云芝菌茶对 ·OH 的清除效果
Fig.5 Scavenging effects of ·OH of green tea and *Trametes versicolor* fermented tea with different concentrations

3 结论

本文建立了一种可快速、准确对云芝菌发酵茶中活性成分进行定性定量检测的高效液相色谱方法,在此方法下,茶叶中表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、咖啡碱、可可碱、茶碱和没食子酸 9 种活性成分均可在 50 min 内得到较好地分离,同时各物质在 31.25~2500 μg/mL 的质量浓度范围内与其峰面积线性关系良好,并且该方法重现性好、精

密度高、稳定性好、加标回收率符合要求,仅利用单一液相色谱系统进行分析,有效提高了实际生产中的检测效率,可为茶叶的质量评价和营养功能评价提供了一种可靠的快速分析手段。

通过对发酵前后茶叶中 9 种活性成分进行分析和比较,相比于未发酵的对照组绿茶,云芝菌发酵茶中儿茶素类物质的含量整体呈减少趋势,推测在发酵过程中,部分儿茶素类物质被酶水解转化,导致含量降低;抗氧化实验结果表明,经云芝菌发酵后茶叶的 DPPH· 和 ·OH 的清除能力减弱。本研究为云芝菌发酵茶的活性成分分析和抗氧化能力分析提供了一定的技术数据,但还需要深入研究云芝菌对绿茶不同发酵阶段的活性成分含量对抗氧化活性的影响机理,以期新型云芝菌发酵茶的研制提供参考依据。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] LUO Y, ZHANG J N, TANG H C, et al. Management of Maillard reaction-derived reactive carbonyl species and advanced glycation end products by tea and tea polyphenols[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(3): 557-567.
- [2] 李焱, 林泳峰, 刘文美, 等. 茶多糖研究的现状与发展趋势[J]. *茶叶科学*, 2023, 43(4): 447-459. [LI Y, LIN Y F, LIU W M, et al. Present status and development trends of research on tea polysaccharides[J]. *Journal of Tea Science*, 2023, 43(4): 447-459.]
- [3] 马凤, 叶灏铎, 夏珍, 等. 英红九号茶蛋白 ACE 抑制肽的制备、氨基酸组成及不同超滤组分的活性评价[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(7): 237-245. [MA F, YE H D, XIA Z, et al. Preparation and amino acid composition of ACE-inhibitor peptides in yinghong tea proteins and the activity of their ultrafiltrated components[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2023, 39(7): 237-245.]
- [4] 胡毅, 王微, 兰吉玉, 等. 超高效液相色谱法同时测定绿茶茶汤中 12 种有效成分[J]. *理化检验(化学分册)*, 2021, 57(10): 903-907. [HU Y, WANG W, LAN J Y, et al. Simultaneous determination of 12 effective ingredients in green tea soup by ultra-high performance liquid chromatography[J]. Part B: Chemical Analysis, 2021, 57(10): 903-907.]
- [5] CLAUDIA M, ALICJA K J, MAGDALENA G P. Beneficial properties of green tea catechins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 1744.
- [6] 彭凯雄, 郑钰涵, 徐天泽, 等. 茶叶活性成分的功能及其健康食品研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2023, 36(3): 17-20. [PENG K X, ZHENG Y H, XU T Z, et al. Research progress on the function and healthy food of tea active components[J]. *Cereals & Oils*, 2023, 36(3): 17-20.]
- [7] CHENG Z, ZHANG Z F, HAN Y, et al. A review on anti-cancer effect of green tea catechins[J]. *J Funct Foods*, 2020, 74: 104172.
- [8] ZHANG H, QI R L, MINE Y. The impact of oolong and black tea polyphenols on human health[J]. *Food Bioscience*, 2019, 29: 55-61.
- [9] HUI W, HUI H Z, JIE D, et al. Metabolites and microbial characteristics of Fu brick tea after natural fermentation[J]. *LWT-*

Food Science and Technology, 2023, 18.

- [10] 邓成林, 王芙苕, 周金萍, 等. 发酵绿茶饮料工艺优化、抗氧化活性及贮藏品质研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(19): 134-142. [DENG C L, WANG F Y, ZHOU J P, et al. Process optimization, antioxidant activity and storage quality of fermented green tea beverage[J]. Food Research and Development, 2022, 43(19): 134-142.]
- [11] 夏志兰, 马鑫旺, 熊昱静, 等. 一个云芝菌株的分离及栽培条件优化[J]. 食用菌学报, 2022, 29(1): 48-54. [XIA Z L, MA X W, XIONG Y J, et al. Isolation and domestication of a *Trametes versicolor* strain[J]. Acta Edulis Fungi, 2022, 29(1): 48-54.]
- [12] SUN X W, SUN Y P, ZHANG Q B, et al. Screening and comparison of antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes versicolor*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 69: 12-19.
- [13] 吕慧鹏. 毛云芝菌菌丝体化学成分在运动保健中的作用[J]. 中国食用菌, 2020, 39(3): 222-225. [LÜ H P. Effect of chemical components of mycelium of *Coriolus hirsutus* in sports and health care[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(3): 222-225.]
- [14] SOLOMON H. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy[J]. Biomedicines, 2020, 8, 135.
- [15] KEVIN K W, CHU P, SUSAN S S, et al. *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values[J]. J Clin Pharmacol, 2002, 42: 976-984.
- [16] VASILIKI K, MARIA A, HARRIS P, et al. Valorization of grape pomace for *Trametes versicolor* Mycelial mass and polysaccharides production[J]. Sustainability, 2023, 15: 15080.
- [17] 戴宇樵, 张拓, 刘亚兵, 等. 可食用茶叶微生物产品研究进展[J]. 贵茶, 2022(2): 5-12. [DAI Y Q, ZHANG T, LIU Y B, et al. Research progress of microbial products of edible tea[J]. Journal of Guizhou Tea, 2022(2): 5-12.]
- [18] 张凯新, 孔祥慧, 徐卫奇, 等. 高效液相色谱法同时测定茶叶中表儿茶素及其氧化二聚体、没食子酸和咖啡碱的含量[J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 366-373. [ZHANG K X, KONG X H, XU W Q, et al. Simultaneous determination of epicatechins and their oxidized dimers, gallic acid and caffeine in tea by HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 366-373.]
- [19] XIAO Y, ZHONG K, BAI J R, et al. Insight into effects of isolated *Eurotium cristatum* from Pingwu Fuzhuan brick tea on the fermentation process and quality characteristics of Fuzhuan brick tea[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(9): 3598-3607.
- [20] 辛董董, 李东霄, 张浩. 不同茶类制茶过程中的化学变化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(2): 216-224. [XINDD, LID X, ZHANG H. Chemical changes of different kinds of tea with the processing[J]. Food Research and Development, 2020, 41(2): 216-224.]
- [21] AN T T, CHEN M X, ZU Z Q, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal changes in the chemical constituents of instant dark tea during liquid-state fermentation by *Eurotium cristatum*[J]. Food Research International, 2021, 148: 110623.
- [22] LI Q, JIN Y L, JIANG R G, et al. Dynamic changes in the metabolite profile and taste characteristics of Fu brick tea during the manufacturing process[J]. Food Chemistry, 2021, 344(2): 128576.
- [23] 李钰茹, 梁加越. 不同茶饮咖啡碱和维生素C含量比较[J]. 中国食物与营养, 2022, 28(11): 38-41. [LI Y R, LIAN J Y, et al. Comparison of caffeine and vitamin C content in different teas[J]. Food and Nutrition in China, 2022, 28(11): 38-41.]
- [24] MUHAMMAD Z, QUAN S C, QIN O Y, et al. Prediction of amino acids, caffeine, theaflavins and water extract in black tea using FT-NIR spectroscopy coupled chemometrics algorithms[J]. Analytical Methods, 2018, 10: 3023-3031.
- [25] 余启明, 张金华, 黄泽强, 等. 12种广西地区茶叶的水提物活性成分测定及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(17): 19-24. [YU Q M, ZHANG J H, HUANG Z Q, et al. Active components and antioxidant activities of aqueous extracts of twelve types of tea in Guangxi region[J]. Food Research and Development, 2021, 42(17): 19-24.]
- [26] 马健, 徐成成, 任小盈, 等. 信阳红红茶的酚类成分及抗氧化能力分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(14): 88-96. [MA J, XU C C, REN X Y, et al. Analysis of phenols and antioxidant capacity of Xinyanghong black tea[J]. Food Research and Development, 2022, 43(14): 88-96.]
- [27] 王越, 翟佩佩, 鲍锋, 等. 基于“成分-抗氧化”关联的不同发酵程度茶及茶饮料比较评价[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(16): 159-163. [WANG Y, ZHAI P P, BAO F, et al. Comparison and evaluation of the teas and tea beverages with different degrees of fermentation based on the “component-antioxidant” correlations[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61(16): 159-163.]
- [28] 戴宇樵, 罗学尹, 刘亚兵, 等. 基于GC-MS和电子舌技术的白芽奇兰灵芝菌茶风味特征研究[J]. 食品科技, 2022, 47(8): 264-271. [DAI Y Q, LUO X Y, LIU Y B, et al. Flavor characteristics of Baiyaqilan *Ganoderma lucidum* Fungus Tea by GC-MS and electronic tongue technology[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(8): 264-271.]
- [29] 梁冬松, 王芳, 韦炎冶, 等. 高效液相色谱法同时测定发酵前后白参菌茶中六种活性成分[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 234-238. [LIANG D S, WANG F, WEI Y Y, et al. Simultaneous determination of changes in six active ingredients in *Schizophyllum commune* fermented tea by HPLC[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(8): 234-238.]
- [30] WANG L, YAN T, ZHANG K X, et al. A sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of polyphenols and theaflavins in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of Dahongpao tea[J]. Biomedical Chromatography, 2019, 33(4): e4470.
- [31] 施丽娟, 陈宁, 王丹, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法定量分析云南大叶种茶酚类成分[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 271-280. [SHI L J, CHEN N, WANG D, et al. Quantitative and comparative studies on phenolic constituents in different types of Yunnan large leaf tea based on validated ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2022, 43(8): 271-280.]
- [32] FATIHA E B, CLOTILDE N, LI L, et al. A new colorimetric DPPH radical scavenging activity method: Comparison with spectrophotometric assay in some medicinal plants used in moroccan pharmacopoeia[J]. Pharmaceutical Fronts, 2022, 4(2): 89-102.
- [33] MATSUO Y, TANAKA T, KOUNO I. A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments[J]. Tetrahedron, 2006, 62(20): 4774-4783.]