

食用菌中麦角硫因提取分离和检测方法研究进展

冯路路¹, 鄂恒超², 张艳梅², 李晓贝², 周昌艳², 赵晓燕^{2*}, 任佳丽¹

(¹中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004;

²上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403)

摘要: 麦角硫因是一种天然抗氧化剂, 具有较强的抗氧化和抗炎作用, 已在食品、化妆品、医药等领域得到了不同程度的应用。一些食用菌含有丰富的麦角硫因, 笔者综述了食用菌中麦角硫因提取分离、检测方法的研究进展, 为后续相关产品的深加工及利用提供参考。

关键词: 食用菌; 麦角硫因; 分离纯化; 检测方法

食用菌是可供人类食用的大型真菌。据中国食用菌协会统计, 2018 年我国食用菌总产量 3.842×10^7 t(以鲜品计), 我国主要栽培的食用菌包括香菇(*Lentinula edodes*)、黑木耳(*Auricularia auricula*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、银耳(*Tremella fuciformis*)及糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)等^[1]。食用菌在生长过程中会积累多种次生代谢物, 包括酚类、黄酮类、萜类和甾醇类等, 这些物质具有不同程度的免疫调节、降血脂、抗肿瘤等功效^[2-3]。

麦角硫因(ergothioneine, EGT)学名 2-巯基-组氨酸-三甲基内盐, 摩尔质量 $229.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, 纯品为白色晶体, 易溶于水, 不易分解, 对热不敏感^[4]。在溶液中, 麦角硫因以硫醇和硫酮互变异构体的形式存在。由于硫酮的稳定性高于烯硫醇, 故中性水溶液中麦角硫因主要以硫酮形式存在, 此特性使得麦角硫因在生理 pH 下有更大的稳定性, 不易氧化产生自由基, 可作为一种良好的天然抗氧化剂^[5-6]。麦角硫因具有抗氧化^[7]、抗炎的生物活性^[8-9], 且具备安全性^[10-11], 在食品^[12-15]、化妆品^[16-19]、医药^[19-22]等领域得到了不同程度的应用。研究表明, 刺芹侧耳(*P. eryngii*)、金针菇等常见食用菌及其下脚料中麦角硫因的含量高, 且具有天然安全性, 是制备麦角硫因的良好资源^[23-25]。因此, 笔者对食用菌及其下脚料中麦角硫因提取分离、检测方法的研究进展进行综述, 为后续相关产品深加工及综合利用提供参考。

1 麦角硫因提取分离

1.1 麦角硫因提取

麦角硫因极易溶于水, 碱性溶液中较稳定, 因此提取溶剂一般选择去离子水、低浓度甲醇、乙腈或稀碱性溶液(如 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$)^[23-24]。回流提取法^[23]是提取麦角硫因经典的方法。近年来酶解提取^[26]、超声微波联合法^[27]也被广泛应用于麦角硫因的提取。

1.1.1 回流提取法

回流提取法是以乙醇、水作为溶剂, 通过加热来回流浸提原料中的麦角硫因。薛天凯等^[23]以蒸馏水为溶剂, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 回流提取糙皮侧耳下脚料中的麦角硫因, 并用正交法对提取条件进行优化, 得到最佳提取条件: pH 8、料液比 1:6 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、提取时间 2 h、提取 2 次, 在此条件下提取率达 87.45%。回流提取法的优点是针对性强、收率高, 缺点是相对耗时。

收稿日期: 2020-06-15 原稿; 2020-11-27 修改稿

基金项目: 黔科合支撑项目[(2019)2451 号-8-10]和上海市农业科学院学科领域科技支撑项目(KJZC202009)

作者简介: 冯路路(1993-), 女, 在读硕士, 主要研究方向为食品安全检测与控制技术。

* 本文通信作者 E-mail: cindy8119@163.com

1.1.2 酶解提取法

酶解提取法是利用酶反应的高度专一性,破坏原料的细胞壁、细胞间质等成分,使得麦角硫因充分释放到提取液中。CREMADES等^[27]用 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柠檬酸水溶液洗涤双孢蘑菇子实体,按照2:1(W:V)的料液比加水,用搅拌机打碎成糊状,加入葡聚糖酶-几丁质酶-纤维素酶混合物,在pH 5、24℃水解24 h后加热至60℃,将pH调至8.5后,用蛋白酶水解,离心后上清液即为麦角硫因提取液,提取率为85.31%。酶解提取法具有提取速度快、条件温和的特点,但同时存在一定的缺陷,提取过程中维持酶活性的最适温度(25~40℃)和最佳pH(5~8)范围均较窄,提取条件相对苛刻。

1.1.3 超声微波联合法提取

超声提取法可利用超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速胞内麦角硫因的释放、扩散和溶解,从而提高提取效率。微波法可利用电磁场的作用,加快食用菌中麦角硫因向溶剂界面的扩散速率,进而提升提取效率。莫宇丽等^[25]以乙醇为溶剂,利用超声微波联合法对刺芹侧耳子实体中的麦角硫因进行提取,采用响应面法对提取工艺进行优化,得到最佳提取工艺条件:溶剂为53%乙醇,料液比1:48(W:V),微波和超声功率分别为500 W、450 W,提取时间均为5 min。在此工艺条件下麦角硫因的得率为 $3.79\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重。超声微波联合提取可减少提取溶剂和能量的消耗,提高提取效率。

1.2 麦角硫因分离纯化

经粗提得到的麦角硫因提取液中还含有可溶性多糖、蛋白质、肽、氨基酸等物质^[28-30],这些物质和麦角硫因性质相似,都易溶于水、难溶于高浓度有机溶剂,为得到高纯度的麦角硫因,需对粗提液进一步分离纯化。

1.2.1 离子交换柱色谱法

离子交换柱色谱法是利用离子交换剂将麦角硫因与杂质分离的方法。麦角硫因是两性化合物,可通过调节溶液pH的方法选择阳离子或阴离子交换树脂进行纯化。TEPWONG等^[31]利用70%乙醇以料液比1:50(W:V)提取滑菇(*Pholiota microspora*)、糙皮侧耳、灰树花(*Grifola frondosa*)、香菇、黑木耳等菌丝体中的麦角硫因,离心后取上清液于40℃减压浓缩真空干燥,用去离子水复溶,经Amberlite IR 120B离子交换柱(4.6 cm×30 cm)层析,使用吡啶-水(1:10, V:V, 1.5 L)洗脱,收集吡啶-水馏分,减压浓缩,真空干燥,用去离子水溶解,经二氧化硅柱(2.6 cm×33 cm)层析,85%~95%乙醇溶液(500 mL)梯度洗脱后用HPLC-Q-TOF/MS进行定性分析。

1.2.2 大孔吸附树脂色谱法

大孔吸附树脂色谱法是根据麦角硫因和杂质在树脂上的吸附力不同而使其与杂质分离的方法。洗脱剂一般采用甲醇、乙醇和水等。陆国胜^[24]以水为溶剂,采用超声辅助法对金针菇下脚料中麦角硫因进行提取、离心分离后,浓缩的上清液用HPD-100大孔吸附树脂吸附,待吸附完全后,将吸附提取液的HPD-100大孔树脂先用去离子水洗脱至中性,再用 $0.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水洗脱,收集滤液,减压浓缩,喷雾干燥获得麦角硫因含量为59.1%的粉末。张怡馨^[32]用乙醇浸提金针菇子实体中的麦角硫因,料液比为1:58(W:V),53℃水浴15 min,离心后取上清液浓缩至原体积的1/5,在搅拌状态下加入4倍体积95%乙醇,4℃静置24 h,离心收集上清液。上清液分别用大孔树脂S-8、AB-8、D101、HP20、NKA-9吸附,用60%乙醇解吸12 h。五种大孔树脂对麦角硫因的吸附率均不足60%,其中AB-8吸附率最高,为58.86%;S-8解吸率最高,为5.42%。刘成航^[33]以水为溶剂提取蜜环菌(*Arimillaria mellea*)下脚料的麦角硫因,下脚料100 g,料液比1:5(W:V),95℃提取3 h,过滤收集上清液,将上清液依次用大孔树脂HP-20、聚酰胺树脂、ODS中低压柱、Sephadex LH-20柱纯化,洗脱液经旋蒸浓缩后,冷冻干燥得到127 mg麦角硫因。大孔树脂吸附法具有成本低,洗脱速度快,对设备要求低的优点。

1.2.3 葡聚糖凝胶层析

葡聚糖凝胶层析是利用凝胶分子筛分离麦角硫因与杂质的方法。混合物流过柱子时,比凝胶孔径大的分子不能进入凝胶孔隙,从颗粒间隙向下流动,路径短,最先流出;比凝胶孔径小的分子进入凝胶

孔穴,路径长,最后流出。葡聚糖凝胶层析能够实现麦角硫因与多糖、蛋白质等相对分子质量较大的物质的分离。张怡馨^[32]用 62%乙醇提取金针菇子实体中麦角硫因,离心后取上清液减压浓缩、醇沉除杂后将所得上清液用 Sephadex G-10 凝胶柱进行纯化,并用正交实验优化上样量、柱高和洗脱速度,优化的条件为上样量 2 mL、柱高 20 cm、洗脱速度 0.5 mL·min⁻¹,在此条件下,麦角硫因的回收率、纯度分别为 95.31% 和 55.01%。

1.2.4 膜分离法

膜分离法是根据麦角硫因与蛋白质、多糖物质通过半透膜的透过率不同,将麦角硫因从混合物中分离出来的方法。CREMADES 等^[27]采用酶解法提取双孢蘑菇子实体中的麦角硫因后,用截留相对分子质量为 5000 的超滤膜进行分离,将所得滤液旋蒸浓缩、冻干后得到麦角硫因含量为 11.86% 的粉末。姜文侠^[34]以 70 °C 水搅拌浸提糙皮侧耳菌丝体后,用截留相对分子质量为 4000~6000 的中空纤维超滤膜去除提取液中的杂质,得到麦角硫因含量为 25.2%~34.7% 的粉末。在用膜分离法去除杂质时,上述两个实验都没有对比膜分离前后麦角硫因提取液中蛋白质、多糖含量的变化,如果将多糖、蛋白质的膜透过率纳入到对纯化效果的评价中,所得结果会更加全面。周子振^[35]发明了一种生物发酵合成制备麦角硫因用陶瓷膜过滤系统,其优势是将陶瓷膜过滤系统用于菌丝体发酵合成麦角硫因系统的后端,能够快速有效去除发酵液中相对分子质量大于 4000 的杂质,该系统与传统的醇沉工艺相比,节省有机溶剂,缩短提取周期,节约热能,自动化程度高。与其他方法相比,膜分离法操作简单,但所得提取物的麦角硫因含量仅为 10%~50%。

1.2.5 分子印迹法

分子印迹技术是指用于获得在空间和结合位点处与分子(模板分子或印迹分子)精确匹配的聚合物的合成技术^[36]。模板分子与功能单体在特定溶剂中反应后得到预聚物,加入交联剂和引发剂,经聚合反应获得固体产物,再用物理或化学方法去除印迹分子,从而获得在空间结构、形状和大小上与靶分子具有特异性结合功能的孔穴,其工作原理可被形象地描述为“锁钥原理”^[37]。赵蕊丽^[38]以组氨酸为模板,使用甲基丙烯酸、4-乙烯基吡啶为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸为交联剂,甲醇-乙酸为洗脱溶剂,制备了麦角硫因分子印迹聚合物,然后利用分子印迹固相萃取技术对刺芹侧耳子实体中麦角硫因进行萃取,结果显示,该分子印迹聚合物对麦角硫因具有特异性识别并富集作用,经高效液相色谱法测定,分子印迹固相萃取后浓缩液中麦角硫因含量是非印迹固相萃取粗品的 3.07 倍。分子印迹法因其特异性高在麦角硫因纯化中具有独特优势,但由于分子印迹聚合物的合成比较困难,限制了其在麦角硫因纯化中的应用。

1.2.6 制备型高效液相色谱法

制备型高效液相色谱是通过高分离度的制备柱来制备高纯度物质,是目前最普遍、最有效的分离纯化方法。姜文侠^[34]利用 HILIC 制备柱(亲水作用填料)对糙皮侧耳菌丝体麦角硫因粗提液进一步纯化。麦角硫因粗品进样量为 0.01~0.323 g(优选 0.113~0.225 g),流动相为乙腈-水(80:20~88:12, V:V),洗脱液经冷冻干燥后,利用高效液相色谱法(检测波长 254 nm)进行定量分析,其中麦角硫因含量为 96.6%~99.0%。

2 麦角硫因检测

目前麦角硫因的检测方法有分光光度法^[39]、高效液相色谱法^[40-47]、液相色谱质谱联用法^[47]、高效毛细管电泳法^[48]和薄层色谱法^[49]等。

2.1 高效液相色谱法

麦角硫因易溶于水,在 254 nm 处有最大紫外吸收,此性质使得高效液相色谱在麦角硫因的检测中得到广泛应用^[47]。利用高效液相色谱法对不同食用菌中麦角硫因含量检测的结果见表 1。色谱柱选择是高效液相色谱法的关键因素,目前 C₁₈、HILIC、AQ、氨基柱均已被用于食用菌中麦角硫因的分析测定(表 2)。C₁₈ 柱是利用麦角硫因与杂质疏水性不同使两者与固定相硅胶的亲合力不同而实现分离。麦角硫因的强极性水溶性使得利用 HILIC 柱分离成为可能,HILIC 柱采用极性固定相,使用水溶性有

表 1 采用高效液相色谱法测定的食用菌中麦角硫因含量
Table 1 Quantification of ergothioneine in different edible fungi by HPLC

样品 Type of sample	种类 Species	麦角硫因含量 Ergothioneine content/%	参考文献 Reference
	猴头菌 <i>Heircium crinaceus</i>	0.0530	
	斑玉蕈 <i>Hypsizigus marmoreus</i>	0.1140	
	松口蘑 <i>Tricholoma matsutake</i>	0.1730	[40]
	毛头鬼伞(菌盖) <i>Coprinus comatus</i> (pileus)	0.1610	
	毛头鬼伞(菌柄) <i>C. comatus</i> (stipe)	0.0760	
	灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	0.0641	
	薄皮纤孔菌 <i>Inonotus cuticularis</i>	0.0085	
	硫磺菌 <i>Laetiporus sulphureus</i>	0.0174	[41]
	桦褐孔菌 <i>Inonotus obliquus</i>	0.0005	
	云芝 <i>Coriolus versicolor</i>	0.0004	
	松针层孔菌 <i>Phellinus pini</i>	0.0002	
子实体 Fruiting body	美味牛肝菌 <i>Boletus edulis</i>	0.7270	
	双孢蘑菇 <i>A. bisporus</i>	0.3940	
	柱状田头菇 <i>Agrocybe aegerita</i>	0.2560	[29]
	香菇 <i>L. edodes</i>	0.0920	
	灰树花 <i>G. frondosa</i>	0.1110	
	金针菇 <i>F. velutipes</i>	0.3530	[42]
	双孢蘑菇 <i>A. bisporus</i>	0.0930	
	金顶侧耳 <i>P. citrinopileatus</i>	0.2850	
	阿魏侧耳 <i>P. ferulae</i>	0.0460	[31]
	糙皮侧耳 <i>P. ostreatus</i> (日本)(Japan)	0.0940	
	糙皮侧耳 <i>P. ostreatus</i> (韩国)(South Korea)	0.1830	
	糙皮侧耳(中国) <i>P. ostreatus</i> (China)	0.1460	
	滑菇 <i>P. microspora</i>	0.0460	[7]
	黑木耳 <i>A. auricula</i>	0.0090	[43]
	银耳 <i>T. fuciformis</i>	0.0006	
	柱状田头菇 <i>A. aegerita</i>	0.0280	
	蜜环菌 <i>A. mellea</i>	0.0220	
	毛头鬼伞 <i>C. comatus</i>	0.0400	
	蛹虫草(菌株 cm1) <i>Cordyceps militaris</i> (strain cm1)	0.0220	
	蛹虫草(菌株 cm5) <i>C. militaris</i> (strain cm5)	0.0790	
	蛹虫草(菌株 419) <i>C. militaris</i> (strain 419)	0.0120	[30]
	灰树花 <i>G. frondosa</i>	0.0300	
	猴头菌 <i>H. crinaceus</i>	0.0380	
	桦褐孔菌 <i>I. obliquus</i>	0.0250	
菌丝体 Mycelium	裂蹄木层孔菌 <i>Phellinus linteus</i>	0.0180	
	糙皮侧耳 <i>P. ostreatus</i>	0.0830	
	粗柄侧耳 <i>P. platypus</i>	0.0360	
	毛木耳 <i>Auricularia polytricha</i>	0.0180	
	多脂鳞伞 <i>Pholiota adiposa</i>	0.0050	[31]
	香菇 607 <i>L. edodes</i> 607	0.2370	
	香菇 601 <i>L. edodes</i> 601	0.3450	
	金顶侧耳 <i>P. citrinopileatus</i>	0.0460	
	黑木耳 <i>A. auricula</i>	0.0040	
下脚料 Waste	糙皮侧耳 <i>P. ostreatus</i>	0.5300	[23]

机溶剂作为流动相,亲水性的固定相表面会固着一层富水层,此富水层与低含水的流动相形成一个液/液萃取系统,麦角硫因与杂质在此萃取系统中分配系数不同,可实现两者有效分离。AQ 柱是为使用高含水流动相(包括纯水)分析极性化合物设计的。AQ 柱是具有一定极性的反相柱,高含水有机相中 AQ 柱上的 C₁₈ 基团提高了流动相从表面向硅胶孔的渗透作用,强极性物质麦角硫因与极性流动相的排斥使 C₁₈ 链上的缠绕减少,形成比普通 C₁₈ 柱更多相互作用的配基,增加了麦角硫因的保留时间,从而实现了其与杂质的分离。氨基柱是由极性基团氨丙硅烷基键合在硅胶上制成极性键合相色谱柱。在含水有机相中,麦角硫因上的羟基与固定相上的氨丙硅烷基中的 N 形成氢键,增加麦角硫因保留时间,实现其与杂质的分离。

传统的 C₁₈ 柱固定相稳定、柱效高、疏水性强,在天然产物分析中有着广泛的应用,但由于麦角硫因水溶性强,利用 C₁₈ 柱进行分离检测时,存在非极性流动相中麦角硫因溶解性差、保留时间较短,以及色谱柱损耗大等问题。HILIC 柱、AQ 柱、氨基柱有效弥补了 C₁₈ 柱在麦角硫因检测上的不足。HILIC 柱适用于强极性化合物麦角硫因的分离,但同时存在样品不易溶于无水有机溶剂的特点。AQ 柱表面是为使烷基相在高含水流动相中保持完全打开的状态而设计的,可防止固定相塌陷,因此用全水 AQ 柱分析麦角硫因可以保持良好的重复性和峰形。氨基柱既可以正相使用,也可以反相使用,适用于强极性化合物麦角硫因的分离。氨基柱的键合官能团氨基在酸性条件下容易水解,因而柱子的使用寿命相对较短。

表 2 液相色谱在食用菌麦角硫因分析检测中的应用
Table 2 Application of HPLC in analytical detection of ergothioneine in edible fungi

样品 Sample	色谱柱 Chromatographic column	流速 Flow rate/ (mL·min ⁻¹)	柱温 Column temperature/°C	保留时间 Retention time/min	流动相 ¹⁾ Mobile phase ¹⁾	参考文献 Reference
糙皮侧耳 发酵液 <i>P. ostreatus</i> mycelium fermentation broth	C ₁₈ 双柱串联 C ₁₈ double column series	0.7	25	7.580	1% 硼酸甲醇 1% methanol borate	[44]
	HILIC	1.0	40	15.452	A(乙腈), B (20 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵) A (acetonitrile), B (20 mmol·L ⁻¹ ammonium acetate)	[45]
	Zorbax SB-aq 柱 Zorbax SB-aq	0.7	25	6.387	A(1% 甲醇), B(甲醇) A (1% methanol, B (methanol)	[46]
九种食药菌 子实体 ²⁾ Fruiting bodies of nine fungi ²⁾	Kromasil 100-5NH ₂	1.0	30	15.0	A(乙腈), B (5 mmol·L ⁻¹ 醋酸铵) A (acetonitrile), B (5 mmol·L ⁻¹ ammonium acetate)	[41]
五种食用菌 子实体 ³⁾ Fruiting bodies of <i>A. bisporus</i> and five other fungi ³⁾	C ₁₈ 双柱串联 C ₁₈ double column series	1.0	25	7.97	50 mmol·L ⁻¹ 的磷酸钠 (含 3% 乙腈和 0.1% 三乙胺) 50 mmol·L ⁻¹ sodium phosphate (with 3% acetonitrile and 0.1% triethylamine)	[47]

¹⁾: 均采用等度洗脱; ²⁾: 木蹄层孔菌、树舌灵芝、松针层孔菌、云芝、灵芝、桦褐孔菌、硫磺菌、粗毛褐孔菌、薄皮纤孔菌; ³⁾: 双孢蘑菇、香菇、灰树花、糙皮侧耳、刺芹侧耳

¹⁾: Equal degree elution was used; ²⁾: *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, *P. pini*, *C. versicolor*, *G. lucidum*, *I. obliquus*, *L. sulphureus*, *Xanthochrous hispidus*, *I. cuticularis*; ³⁾: *A. bisporus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *P. osteratus*, *P. eryngii*

2.2 液相色谱质谱联用法

液相色谱质谱联用技术(HPLC-MS)是将色谱的高效分离能力和质谱的高灵敏度特点相结合的分 离分析技术。DUBOST 等^[47]利用 HPLC-MS 对双孢蘑菇、香菇、刺芹侧耳和灰树花子实体中的麦角硫 因进行了定性和定量分析。高效液相色谱条件:进样体积 10 μL 、柱温 24 $^{\circ}\text{C}$ 、等度洗脱(3%乙腈和 0.1%乙酸水)、流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱条件:电喷雾正离子模式电离、毛细管电压 3.0 kV、扫描范 围 105~500、离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$ 、探头温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。HPLC-MS 方法具有分离能力强、检测限低等优 点;但由于麦角硫因的强亲水性,导致利用质谱检测时 ESI 效率偏低。此外,麦角硫因分子的盐化或者 钾化加合物会使麦角硫因定量不准确。

2.3 柱前/柱后衍生-高效液相色谱法

近年来,柱前/柱后衍生-高效液相色谱法在麦角硫因检测中的应用越来越多,所用衍生试剂的特 点见表 3。衍生化技术在麦角硫因检测中的应用主要有柱前衍生法和柱后衍生法。柱前衍生法检测麦 角硫因具有衍生试剂种类多、衍生时间短、操作简单、灵敏度高等优点,但衍生副产物会对色谱分离造 成干扰。柱后衍生法有效避免了其他物质的干扰,适合于复杂样品中麦角硫因的分析检测,具有重复 性好,衍生产物稳定等优点;但检测灵敏度较低。NGUYEN 等^[50]以 2-Py-S-S-2-Py 为衍生试剂,建立

表 3 不同衍生试剂的特点
Table 3 Characteristics of different HPLC derivatization reagents

类型 Type	衍生试剂 Derivatization reagent	衍生条件 Derivatization condition	衍生产物稳定性 Derivative stability	检测器 Detector	衍生反应特点 Derivatization reaction characteristics	参考文献 Reference
柱后 Post -column	2-Py-S-S-2-Py	25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 1	不稳定 Unstable	紫外 UV	2-Py-S-S-2-Py 在强酸性和金属离子存 在条件下不稳定 2-Py-S-S-2-Py is unstable with the presence of strong acidity and metal ions	[50]
	IQA	60 $^{\circ}\text{C}$ 、 碱性、 Alkaline	稳定 Stable	荧光 Fluores- cence	IQA(在碱性条件下,IAA 与 8-氨基喹 啉缩合反应的生成物)与 EGT 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热条件下反应生成 EGT-IQA,反应 在 5 min 内完成 IQA (the product of the condensation reaction of IAA with 8-aminoquinoline with the presence of DCC) reacts with EGT at 60 $^{\circ}\text{C}$ to produce EGT-IQA within 5 min	[51]
柱前 Pre- column	DCIA	90 $^{\circ}\text{C}$	稳定 Stable	荧光 Fluores- cence	90 $^{\circ}\text{C}$ 避光 10 min 衍生反应完成,与 5-IAF 不同,未反应的 DCIA 荧光微弱, 背景信号可用于色谱分析 Derivatization reaction at 90 $^{\circ}\text{C}$ in darkness for 10 min. Unlike 5-IAF, unreacted DCIA has weak fluores- cence, making the background signal available for chromatographic analysis	[52]
	5-IAF	室温、避光 Room temperature, protect from light	稳定 Stable	荧光 Fluores- cence	室温避光条件下,麦角硫因与 5-IAF 反 应生成硫醚共轭物 5-IAF-EGT,反应在 30 min 内完成 Under room temperature and dark con- ditions, EGT reacts with 5-IAF to form the thioether conjugate 5-IAF-EGT	[48]

IQA: 2-碘-氮-(8-^L喹啉基)乙酰胺; IAA: 碘乙酸; EGT: 麦角硫因; 5-IAF: 5-碘乙酰氨基荧光素; DCIA: 7-二乙氨基-3-[4-(碘乙酰胺基)苯基]-4-甲基香豆素

IQA: 2-iodine-nitrogen-(8-^Lquinoline) acetamide; IAA: iodoacetic acid; EGT: ergothioneine; 5-IAF: 5-iodoacetylaminofluorescein; DCIA: 7-diethylamino-3-[4-(iodoacetamide) phenyl]-4-methyl coumarin

了适用于松口蘑、双孢蘑菇、黑木耳、灰树花、斑玉蕈、香菇、滑菇、刺芹侧耳子实体中麦角硫因定量测定的柱后衍生-高效液相色谱法,流动相为 10% 甲醇,流速 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱后最适反应温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 2-Py-S-S-2-Py 溶液质量浓度 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,衍生反应的最佳 pH 为 1。

3 问题与展望

食用菌及其下脚料作为高纯度麦角硫因制备的原料来源具有一定的可行性,但在分离提取过程中还存在步骤繁琐耗时、提取效率较低、大规模制备困难等问题。后续食用菌麦角硫因提取分离方面的研究建议从以下两方面展开:一是麦角硫因提取技术优化,利用水或者含水甲醇、乙腈作为提取溶剂,联合多种提取方法,以提高食用菌中麦角硫因的提取率;二是高纯度麦角硫因高效制备技术研究,通过筛选高含量麦角硫因的食用菌品种和原料,研究新型的柱层析填料和膜分离材料,或将多种纯化方式结合使用从而提高纯化效率。

食用菌中麦角硫因检测的主要问题是检测方法适用性有待完善。虽然已有一些麦角硫因检测方法被报道,但每种检测方法只考量了食用菌子实体、菌丝体或下脚料中的一种或一类基质条件下色谱柱、流动相比例、洗脱方式对于分离效果的影响,未见对食用菌子实体、菌丝体、下脚料普遍适用的方法。在后续麦角硫因检测技术研究中,可通过考察不同基质效应,优化前处理条件和仪器条件,构建适用性更广的麦角硫因含量检测技术,并形成检测技术标准,为后续食用菌深加工、产品质量控制等提供有效技术手段。

参考文献

- [1] 中国食用菌协会. 2018 年度全国食用菌统计调查结果分析[EB/OL]. [2019-12-27]. <http://hz.cefa.org.cn/2019/12/27/10663.html>.
- [2] 周素娟,张晓娜. 食用菌保健功能及保健食品应用与开发[J]. 中国食用菌,2015,34(1):4-6.
- [3] 庄海宁,张劲松,冯涛,等. 我国食用菌保健食品的发展现状与政策建议[J]. 食用菌学报,2015,22(3):85-91.
- [4] BEELMAN RB, HAUSMAN MS. Use of ergothioneine as a preservative in foods and beverages; US20100076093 [P]. 2010-03-25.
- [5] 姜文侠. 一种检测麦角硫因的方法;201810023899.7[P]. 2019-07-16.
- [6] 朱本占,毛莉,范瑞梅,等. 天然抗氧化剂麦角硫因保护铜所致 DNA 和蛋白质氧化损伤的作用机理[J]. 科学通报,2011,56(27):2283-2288.
- [7] ITO T, KATO M, TSUCHIDA H, *et al.* Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms[J]. Japanese Society for Food Science and Technology,2011,17(2):103-110
- [8] ASAH I T, WU X, SHIMODA H, *et al.* A mushroom-derived amino acid, ergothioneine, is a potential inhibitor of inflammation-related DNA halogenation[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry,2016,80(2):313-317.
- [9] CHEAH IK, TANG RM, YEW TS, *et al.* Administration of pure ergothioneine to healthy human subjects: uptake, metabolism, and effects on biomarkers of oxidative damage and inflammation[J]. Antioxidants and Redox Signaling,2017,26(5):193-206.
- [10] FORSTER R, SPEZIA F, PAPINEAU D, *et al.* Reproductive safety evaluation of L-ergothioneine[J]. Food and Chemical Toxicology,2015,80:85-91.
- [11] TURCK D, BRESSON J L, BURLINGAME B, *et al.* Safety of synthetic L-Ergothioneine (Ergoneine[®]) as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97[J]. EFSA Journal,2016,14(11):1-20.
- [12] 靳祯亮,黄琦辉,周巧丽,等. 麦角硫因处理对采后双孢蘑菇品质的影响[J]. 中国食品学报,2017,17(3):194-200.
- [13] BAO HN, OSAKO K, OHSHIMA T. Value-added use of mushroom ergothioneine as a colour stabilizer in processed fish meats[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010,90(10):1634-1641.
- [14] PAHILA J, KANEDA H, NAGASAKA R, *et al.* Effects of ergothioneine-rich mushroom extracts on lipid oxidation and discoloration in salmon muscle stored at low temperatures[J]. Food Chemistry,2017,233:273-281.
- [15] 汤葆莎. 一种富含杏鲍菇麦角硫因的薏米抹酱及其制备方法;201910602087.2[P]. 2019-09-17.

- [16] 王晶晶. 燕麦和菌菇提取物的制备及其在化妆品中的应用[D]. 上海:上海应用技术大学,2019.
- [17] 陈衍玲. 一种含麦角硫因提取液、糙米发酵滤液和乙酰壳糖胺的组合物及其应用: 201911362073.4[P]. 2020-03-27.
- [18] 唐庆九. 一种提取榆黄菇中麦角硫因与多糖的方法: 201811121706.8[P]. 2019-02-01.
- [19] NAKAMICHI N, NAKAYAMA K, ISHIMOTO T, *et al.* Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice[J]. *Brain and Behavior*,2016,6(6):e00477. 10.1002/brb3.477.
- [20] CHEAH I K, FENG L, TANG R MY, *et al.* Ergothioneine levels in an elderly population decrease with age and incidence of cognitive decline; a risk factor for neurodegeneration? [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,2016,478(1):162-167.
- [21] SONG TY, LIN HC, CHEN CL, *et al.* Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57BL/6J mice treated with D-galactose[J]. *Free Radical Research*, 2014,48(9):1049-1060.
- [22] KIM E C, TOYONO T, BERLINICKE C A, *et al.* Screening and characterization of drugs that protect corneal endothelial cells against unfolded protein response and oxidative stress[J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,2017,58(2):892-900.
- [23] 薛天凯,赵艳敏,林纪伟,等. 正交设计优化平菇下脚料中麦角硫因的提取工艺[J]. *食品研究与开发*,2017,38(3):40-45.
- [24] 陆国胜. 一种利用蘑菇下脚料制备天然麦角硫因的方法:201710129462.7[P]. 2017-03-06.
- [25] 莫宇丽,李亚欢,王艳,等. 响应面法优化超声微波联合提取杏鲍菇中麦角硫因工艺[J]. *食品工业科技*,2020,41(1):143-149.
- [26] 周念波,李轶群,殷勤红. 氧化铝柱层析从双孢菇菇柄中提取麦角硫因[J]. *安徽农业科学*,2010,38(27):14842-14843.
- [27] CREMADES O, DIAZ-HERRERO MM, CARBONERO-AGUILAR P, *et al.* White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology[J]. *Food Bioscience*,2015,10:42-47.
- [28] 李亚欢. 杏鲍菇中麦角硫因的提取纯化和抗氧化活性研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [29] KALARAS MD, RICHIE JP, CALCAGNOTTO A, *et al.* Mushrooms: a rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione[J]. *Food Chemistry*,2017,233(4):429-433.
- [30] CHEN SY, HO K J, HSIEH YJ. Contents of lovastatin γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia[J]. *LWT-Food Science and Technology*,2012,47(2):270-278.
- [31] TEPWONG P,GIRI A,SASAKI F, *et al.* Mycobial enhancement of ergothioneine by submerged cultivation of edible mushroom mycelia and its application as an antioxidative compound[J]. *Food Chemistry*,2012,131(1):247-258.
- [32] 张怡馨. 金针菇中麦角硫因的提取、纯化及包埋研究[D]. 广州:华南农业大学,2017.
- [33] 刘成航. 一种制备麦角硫因的方法: 201611159974.X[P]. 2019-07-16.
- [34] 姜文侠. 麦角硫因的提取及纯化方法: 104774182[P]. 2018-06-01.
- [35] 周子振. 一种生物发酵合成制备麦角硫因用陶瓷膜过滤系统: 201821629647[P]. 2019-08-13.
- [36] 薛伟亮,张卓旻. 分子印迹固相萃取技术在食品安全分析中的应用研究进展[J]. *食品科技*,2020,45(6):337-343.
- [37] 孙晓宇,马润恬,师彦平. 分子印迹技术在蛋白质分离分析中的研究进展[J]. *色谱*,2020,38(1):50-59.
- [38] 赵蕊丽. 用分子印迹技术从杏鲍菇中分离纯化麦角硫因[D]. 天津:南开大学,2013.
- [39] CARLSSON J, KIERSTAN MPJ, BROCKLEHURST K. A convenient spectrophotometric assay for the determination of L-ergothioneine in blood[J]. *The Biochemical Journal*,1974,139(1):237-242.
- [40] 张翠,赵艳敏,白淑芳,等. HPLC 法测定不同品种蘑菇中麦角硫因的含量[J]. *食品工业科技*,2013,34(23):307-310.
- [41] 赵艳敏,雷智东,刘成航,等. 高效液相色谱法测定多种真菌中麦角硫因含量[J]. *食品研究与开发*,2016,37(2):117-119.

- [42] 胡晶晶,张怡馨,王艳,等. 响应面法优化金针菇麦角硫因的提取工艺[J]. 食品工业科技,2019,40(9):171-177.
- [43] HALLIWELL B, CHEAH IK, RICHARD MY. Ergothioneine—a diet-derived antioxidant with therapeutic potential[J]. FEBS Letters,2018,592(20):3357-3366.
- [44] ZHOU T, LIU Q, JIANG W, *et al.* A new strategy for quantitative analysis of ergothioneine in fermentation broth by RP-HPLC:Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012) [C]. Berlin: Springer,2014.
- [45] LIU Q, ZHANG W, WANG H, *et al.* Validation of a HILIC method for the analysis of ergothioneine in fermentation broth[J]. Journal of Chromatographic Science,2016,54(6):934-938.
- [46] 许晟,刘琦,姜文侠,等. 高效液相色谱分析真菌液态发酵产物中的麦角硫因[J]. 食品工业科技. 2018,39(18):238-243.
- [47] DUBOST N J, OU BB, ELMAN R B. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity[J]. Food Chemistry,2007,105(2):727-735.
- [48] SOTGIA S, PISANU E, PINTUS G, *et al.* Plasma L-ergothioneine measurement by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis after a pre-column derivatization with 5-iodoacetamidofluorescein (5-IAF) and fluorescence detection[J]. PLoS One,2013,8(7):e70374.
- [49] KANEKO I, TAKEUCHI Y, YAMAOKA Y, *et al.* Quantitative determination of ergothioneine in plasma and tissues by TLC-densitometry[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin,1980,28(10):3093-3097.
- [50] NGUYEN TH, GIRI A, OHSHIMA T. A rapid HPLC post-column reaction analysis for the quantification of ergothioneine in edible mushrooms and in animals fed a diet supplemented with extracts from the processing waste of cultivated mushrooms[J]. Food Chemistry,2012,133(2):585-591.
- [51] HORIE Y, GOTO A, IMAMURA R, *et al.* Quantification of ergothioneine in *Aspergillus oryzae*-fermented rice bran by a newly-developed LC/ESI-MS/MS method[J]. LWT-Food Science and Technology,2020,118:108812.
- [52] SOTGIA S, PISANU E, PINTUS G, *et al.* Ultra-performance liquid chromatographic determination of L-ergothioneine in commercially available classes of cow milk[J]. Journal of Food Science,2014,79(7):1683-1687.

Research Progress on Extraction, Separation and Detection of Ergothioneine in Edible Fungi

FENG Lulu¹, E Hengchao², ZHANG Yanmei², LI Xiaobei², ZHOU Changyan²,
ZHAO Xiaoyan^{2*}, REN Jiali¹

(¹College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China; ²Institute for Agro-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: Ergothioneine, a natural antioxidant, has strong anti-oxidation and anti-inflammation effects and has been widely used in food, cosmetics, medicine and other fields. Previous reports indicated that some edible fungi are rich in ergothioneine. Research progress on extraction, separation and detection of ergothioneine in edible fungi were reviewed to provide a reference for deep processing and product development in the future.

Key words: Edible fungi; ergothioneine; separation and purification; detection method

[中文编辑] 朱丽娜
[英文编辑] 费理文