

桦褐孔菌子实体多酚的抗氧化活性

燕兰亭,徐向群

(浙江理工大学理学院,杭州 310018)

摘 要:桦褐孔菌在生长过程中,子实体产生大量的生物活性多酚。为了对桦褐孔菌子实体多酚的抗氧化活性进行研究,采用有机溶剂甲醇提取桦褐孔菌子实体中的多酚,通过萃取将子实体多酚分为乙酸乙酯层和正丁醇层,并利用 Sephadex LH-20 柱色谱对乙酸乙酯层和正丁醇层多酚进行分离得到不同的分段组分,测定每一组分的多酚、黄酮含量及抗氧化活性。结果表明:在桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层分段组分中,SF3 有着最高的多酚与黄酮含量;在子实体多酚正丁醇层柱色谱分段组分中,SF2 有着最高的多酚含量,SF3 有着最高黄酮含量。桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分都是 SF3 呈现最高的抗氧化活性,黄酮含量与抗氧化活性之间存在很强的正相关性。研究桦褐孔菌子实体多酚的抗氧化活性可为后续多酚组分的分离鉴定奠定基础。

关键词:桦褐孔菌;多酚;黄酮;抗氧化活性

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2018) 09-0599-06

0 引言

桦褐孔菌 [*Inontus obliquus* (Fr.) Pilat] 是一种药用真菌,属于白腐真菌,广泛分布在北美、欧洲和亚洲的北纬 45°~50°地区^[1]。在俄罗斯和西伯利亚西部,该真菌主要生长在桦树的树干上,能够引起木材的白化腐朽,被称作是白腐真菌^[1-3]。桦褐孔菌用于民间医学达四个多世纪,用来预防和治疗心、肝、胃的疾病以及各种疑难杂症^[4-5]。

桦褐孔菌子实体提取物具有很强的抗氧化性,能够清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH[·])、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐自由基(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate, ABTS^{·+})、超氧阴离子自由基([·]O₂⁻)和羟自由基([·]OH)等自由基。对桦褐孔菌子实体提取物中的成分进行结构鉴定,发现活性物质属于多酚类化合物^[6-7]。多酚常有较强的抗氧化作用,能够清除各种

活性氧化自由基,有助于减少人体的氧化损伤^[8]。在人体营养中,多酚抗氧化剂已经被长期使用来预防和治疗不同的疾病^[9-11]。目前对于桦褐孔菌子实体多糖的生物活性研究较多^[12-13],而对子实体多酚的研究很少,特别是对子实体多酚分离纯化后抗氧化活性的研究更是鲜有报道。甲醇能够有效地从桦褐孔菌子实体中提取多酚,而超声破碎是一种较好的提取生物细胞内物质的方法^[14],本文采用甲醇作为提取溶剂和超声破碎相结合的方法来提取子实体多酚,并采用萃取的方法将子实体多酚粗分为乙酸乙酯层多酚和正丁醇层多酚;结合使用柱色谱分离方法对乙酸乙酯层多酚和正丁醇层多酚初步分离,分析柱色谱分段组分的多酚、黄酮含量以及各分段组分的 DPPH[·] 清除活性、ABTS^{·+} 清除活性(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)、铁离子还原能力(Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)。桦褐孔菌子实体多酚的分离纯化及其抗氧化活性的研究对于后续的多酚组分的分离鉴定奠定基础。

收稿日期: 2018-04-07 网络出版日期: 2018-05-30

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY16B020013)

作者简介: 燕兰亭(1990-),男,山东潍坊人,硕士研究生,主要从事生物分析化学方面研究。

通信作者: 徐向群, E-mail: xuxiangqun@zstu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料

用于实验研究的桦褐孔菌子实体购于杭州市胡庆余堂。

1.1.2 实验试剂

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)、水溶性维生素E(Trolox)、三吡啶基三嗪(TPTZ)、没食子酸、芦丁和福林酚等实验试剂均购于杭州米克试剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桦褐孔菌子实体多酚的提取

将桦褐孔菌子实体用烘箱烘干至恒重,用研钵将其颗粒充分研碎,取1.0 g将其盛入离心管中,加入7.0 mL体积的甲醇溶剂,并利用超声波细胞粉碎机来进行破壁提取,将破碎后的匀浆液在恒温水浴锅中60℃下静置6 h,萃取3次,通过高速离心机离心得到含有多酚的上清液;将所得的上清液旋干,加入去离子水得到水溶液,先采用有机溶剂氯仿来进行萃取,之后再依次用乙酸乙酯和正丁醇对水层进行萃取,最后将萃取得到的乙酸乙酯层和正丁醇层萃取液真空旋干,获得桦褐孔菌子实体的乙酸乙酯层多酚和正丁醇层多酚。

1.2.2 子实体多酚的柱色谱分离

称取25.0 g葡聚糖凝胶Sephadex LH-20干粉粉末,并溶解于蒸馏水中,间隔30 min就搅拌一次使其溶胀,充分过夜溶胀之后将其填充在柱色谱玻璃柱中,蒸馏水冲洗2~3个柱体积使柱子压实。湿法上样后,通过不同比例的甲醇水溶液按照极性由大到小的顺序以1滴/s的速度洗脱,每个试管接5.0 mL洗脱液,并且按顺序将试管标号。在280 nm波长下,用紫外分光光度计测定每个试管中洗脱液的吸光度值,根据测得的每个小试管中洗脱液的吸光度值,绘制吸光度值与小试管编号的变化曲线。根据曲线,将同一个峰的小试管洗脱液合并成一个组分,将每一个组分旋干后定容到10.0 mL,分析每一个组分的多酚、黄酮含量及抗氧化活性具体方法见文献[15]。

1.2.3 子实体多酚、黄酮含量的测定

a) 多酚含量的测定

采用福林-酚法来测定各个组分的多酚含量,具体方法见文献[16]。将经过提取纯化后的桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分

定容到10.0 mL,用福林-酚法测定波长为765 nm下的OD值,根据福林-酚法测得的多酚标准曲线计算出每个组分多酚的含量。

b) 黄酮含量的测定

黄酮含量的测定采用氯化铝显色法,具体方法见文献[17]。将经过提取纯化后的桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分定容到10.0 mL,吸取1.0 mL,加入2.0 mL浓度为0.1 mol/L氯化铝试剂,加入3.0 mL浓度为1.0 mol/L的醋酸钠试剂,以溶剂($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}=3:2$)将体积补至10.0 mL,摇匀。在420 nm处测OD值。根据黄酮标准曲线,计算出每个组分的黄酮含量。

1.2.4 子实体多酚 DPPH 的 IC_{50} 值的测定

首先配置(0.4 mmol/L)的DPPH甲醇溶液,然后在10.0 mL试管中加入0.8 mL DPPH甲醇溶液,在加入2.4 mL的多酚样品,将两者充分混合后放置在暗室中,在室温下保持30 min。在波长为517 nm下,测得 A_1 值,具体方法见文献[18]。将多酚样品换成蒸馏水作为对照组,在相同的波长下测得 A_0 值。将DPPH甲醇溶液换成甲醇溶液,其它条件与前面相同,在同样的波长下测其 A_2 值。DPPH自由基清除率X计算公式如下:

$$X/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100,$$

式中: A_0 为0.8 mL DPPH甲醇和2.4 mL蒸馏水混合溶液的吸光度; A_1 为0.8 mL DPPH甲醇和2.4 mL多酚混合样品的吸光度; A_2 为0.8 mL甲醇和2.4 mL多酚混合样品的吸光度。

将桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分离的每一个组分分别测量五个浓度梯度(2.0~10.0 mg),求得每一个组分的DPPH的 IC_{50} 值,并经过SPSS软件分析所得数据,计算出桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层和正丁醇层不同组分多酚的 IC_{50} 值。

1.2.5 子实体多酚 TEAC 法抗氧化活性的测定

TEAC抗氧化活性实验是参考参考文献[19],具体方法为:将5.0 mL的7.0 mmol/L ABTS(2,2-联氨-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸二铵盐))和88 μ L的140.0 mmol/L过硫酸钾混匀,在避光条件下将其置于恒温水浴锅中,在30℃下静置过夜,获得 $ABTS^{\cdot+}$ 储备液。配制20.0 mmol/L pH值为4.5的醋酸钠缓冲液,通过醋酸钠缓冲液将 $ABTS^{\cdot+}$ 储备液进行稀释,直到将储备液稀释到在734 nm波长下的吸光度在 0.70 ± 0.02 这个范围里时为止,

ABTS^{•+}工作液。吸取柱色谱分段组分 30.0 μL 和 3.0 mL 的 ABTS^{•+}工作液充分混合 10 s, 将其在 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下静置 6 min, 以醋酸钠缓冲液作为对照, 在 734 nm 波长下测量吸光度值。采用同样的方法测定 Trolox 不同浓度下吸光度值变化的标准曲线。将子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分都稀释成五个不同的浓度(与 DPPH 实验浓度梯度相同), 在各个多酚浓度下按照上述方法进行实验, 得到每一个组分不同多酚浓度下的吸光值, 绘制每一个组分多酚浓度-吸光度标准曲线, 根据 TEAC 法 Trolox 标准曲线计算得到每一个组分的 TEAC 值。

1.2.6 子实体多酚 FRAP 法抗氧化活性的测定

铁还原/总抗氧化能力测定(FRAP 法)按照参考文献[19]。首先制备 20.0 mmol/L 三氯化铁溶液、10.0 mmol/L 三吡啶基三嗪(TPTZ)盐酸溶液和 300.0 mmol/L pH 值为 3.6 的醋酸盐缓冲液。吸取上述制备好的三氯化铁溶液和三吡啶基三嗪(TPTZ)盐酸溶液各 2.5 mL 与 25.0 mL 醋酸盐缓冲液充分混合, 然后再取该混合溶液 1.8 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下, 分别加入 180.0 μL 蒸馏水和 60.0 μL 柱色谱分段提取液, 待其反应 30 min 后, 以 60.0 μL 的甲醇作为对照, 在 593 nm 的波长下测量其紫外吸光值。采用同样的方法测定 Trolox 不同浓度下

吸光度值变化的标准曲线, 提取液抗氧化活性结果表示成 FRAP 值的形式, 即每克多酚的含量相当于 Trolox 物质的摩尔数。将子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分都稀释成五个不同的浓度(与 DPPH 实验浓度梯度相同), 在各个多酚浓度下按照上述方法进行实验, 得到每一个组分不同多酚浓度下的吸光值, 进而建立每一个组分多酚浓度与吸光度之间的标准曲线, 根据所建立的 FRAP 法 Trolox 标准曲线计算得到每一个组分的 FRAP 值。

2 结果与讨论

2.1 子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱流出曲线分析

用葡聚糖凝胶柱色谱分离的方法, 不同比例的水和甲醇为洗脱剂对桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层组分进行分离, 根据洗脱液在 280 nm 下吸光度不同, 将洗脱物合并为不同的分段组分, 所制得乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱流出曲线如图 1 所示。桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层根据流出曲线均是获得 5 个组分, 由于乙酸乙酯层多酚和正丁醇层多酚的极性不同, 所以柱色谱流出曲线也是不同的, 在乙酸乙酯层多酚柱色谱分段组分中 SF3 中有着最高的吸光度, 而在正丁醇层多酚柱色谱分段组分中 SF1 有着最高的吸光度。

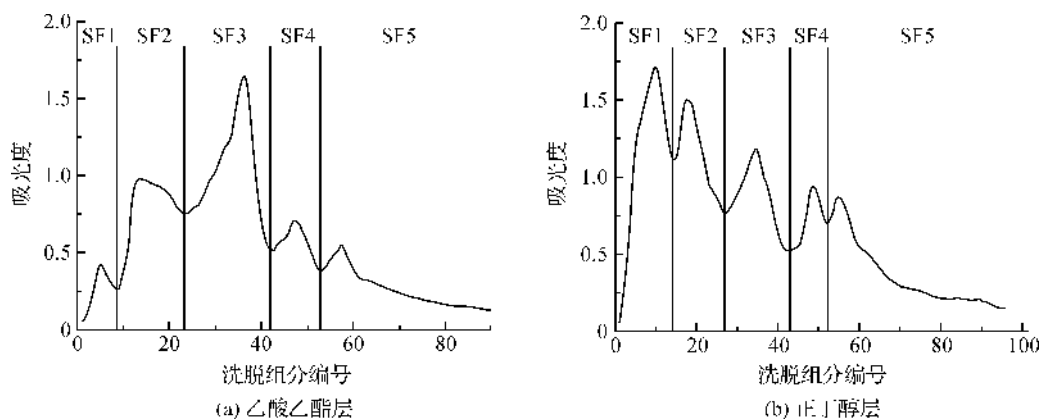


图1 桦褐孔菌子实体中的多酚柱色谱流出曲线

注: SF1~SF5 是指柱色谱分离的第一到第五组分

2.2 子实体萃取物柱色谱分段组分多酚和黄酮含量

采用葡聚糖凝胶柱色谱分离的方法, 不同比例的水和甲醇为洗脱剂对桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层组分进行分离, 根据洗脱液在 280 nm 下吸光度不同, 将洗脱物合并为不同的分段组分, 测定得到的桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分的多酚和黄酮含量如图 2 和图 3 所

示。由图 2 可以得知, 乙酸乙酯层分段洗脱物组分中 SF3 部分的多酚、黄酮含量明显高于其他组分, 分别达到 163.71 mg 和 65.82 mg, 多酚含量的由高到低依次为 163.71 mg(SF3)、136.42 mg(SF1)、54.13 mg(SF5)、43.22 mg(SF2)、21.94 mg(SF4), 而黄酮含量由高到低为 65.82 mg(SF3)、42.16 mg(SF2)、30.83 mg(SF1)、20.93 mg(SF4)、12.39 mg

(SF5)。桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层柱色谱分段组分多酚、黄酮含量由高到低的顺序呈现不一致性,其可能是因为酚酸的干扰,因为酚酸是小分子的多酚,它的存在会使得多酚含量的增加,却不会使得黄酮含量的增加,因此使得乙酸乙酯层柱色谱分段组分的多酚、黄酮含量在高低顺序上表现出了不一致性,与 Kaewseejan 等^[15]所报道结果相一致。

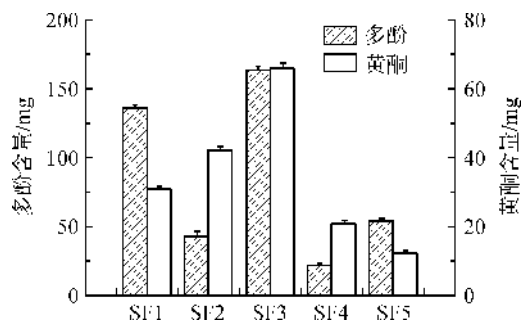


图2 子实体乙酸乙酯层柱色谱分段组分多酚和黄酮含量

桦褐孔菌子实体正丁醇层柱色谱分段洗脱物组分的多酚和黄酮含量如图3所示,结果显示:多酚的含量为74.21~261.06 mg,按多酚含量高低的顺序为261.06 mg(SF2)、231.38 mg(SF4)、139.64 mg(SF5)、103.02 mg(SF3)、74.21 mg(SF1),其中SF2和SF4这两个组分的多酚含量是比较接近的,SF2(261.06 mg)要略高于SF4(231.38 mg),其它三个组分的多酚含量与这两个组分相比差距较大,要明显少于这两个组分。黄酮含量的范围是34.13~85.12 mg,其黄酮含量的高低顺序为85.12 mg(SF3)、56.33 mg(SF1)、51.63 mg(SF4)、48.73 mg(SF2)、34.13 mg(SF5)。与多酚含量相比,从图3中可以看出,这五个组分的黄酮含量并没有表现出很大的差异性。而且多酚含量和黄酮含量的高低顺序也没有表现出一致性。在这五个组分当中,黄酮占多酚比重的最大是SF3,占比为82.6%;而占比最小的是SF2,为18.7%。

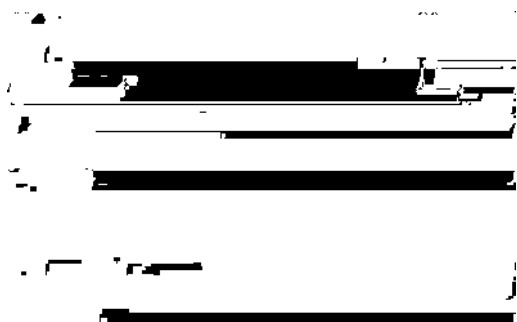


图3 子实体正丁醇层柱色谱分段组分多酚和黄酮含量

2.3 子实体萃取物柱色谱分段组分的抗氧化活性

桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层和正丁醇层柱色

谱分段组分多酚的抗氧化活性的测定结果如表1所示,结果表明:乙酸乙酯层柱色谱分段组分的DPPH IC_{50} 值由低到高的顺序依次为17.88 $\mu\text{g/mL}$ (SF3)、20.67 $\mu\text{g/mL}$ (SF2)、24.72 $\mu\text{g/mL}$ (SF1)、26.23 $\mu\text{g/mL}$ (SF4)、33.91 $\mu\text{g/mL}$ (SF5)。DPPH的 IC_{50} 值越小,表示其清除DPPH \cdot 能力越强,抗氧化能力越强^[18]。

对于TEAC法,其结果表示成TEAC值的形式,即每克多酚的含量相当于Trolox物质的摩尔数。TEAC法实际上测定的是多酚样品对于ABTS \cdot^+ 的清除能力^[20]。TEAC值越大,那么表示该组分的每1.0 g多酚样品的抗氧化活性相当于Trolox的摩尔数越大,继而表示该组分多酚的抗氧化活性越强。由表1可知桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层柱色谱分段五个组分TEAC值由大到小的顺序为3.32 mmol(SF3)、2.72 mmol(SF2)、2.25 mmol(SF1)、1.96 mmol(SF4)、1.86 mmol(SF5),以上结果表明:桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层柱色谱分段五个组分的TEAC法抗氧化活性的大小顺序与DPPH抗氧化活性的结果相一致。对于FRAP法,其结果表示成FRAP值的形式,即每克多酚的含量相当于Trolox物质的摩尔数。那么FRAP值越大代表该组分多酚的抗氧化活性越强^[20]。表1显示桦褐孔菌子实体乙酸乙酯层柱色谱分段五个组分的FRAP法抗氧化活性的大小顺序依次为3.12 mmol(SF3)、2.36 mmol(SF2)、1.89 mmol(SF1)、1.37 mmol(SF4)、1.16 mmol(SF5),与DPPH和TEAC法抗氧化活性的顺序完全一致,说明这三种抗氧化活性的结果保持高度的一致性。桦褐孔菌子实体正丁醇层柱色谱分段组分多酚的三种抗氧化活性的测定结果也呈现出一致性,其中SF3组分具有最强的抗氧化活性,其DPPH IC_{50} 值、TEAC值、FRAP值分别为15.00 $\mu\text{g/mL}$ 、4.33 mmol/g和3.36 mmol/g。桦褐孔菌子实体正丁醇层柱色谱分段五个组分DPPH抗氧化活性的强弱顺序依次为15.00 $\mu\text{g/mL}$ (SF3)、17.30 $\mu\text{g/mL}$ (SF1)、20.97 $\mu\text{g/mL}$ (SF2)、23.59 $\mu\text{g/mL}$ (SF4)、27.87 $\mu\text{g/mL}$ (SF5)。桦褐孔菌子实体正丁醇层柱色谱分段五个组分的TEAC法和FRAP法的抗氧化活性强弱顺序与DPPH法是一致的,这与乙酸乙酯层相同。与乙酸乙酯层相比,子实体正丁醇层表现出了更强的抗氧化活性。正丁醇层柱色谱分段的最强抗氧化活性组分SF3相比于乙酸乙酯层柱色谱分段的最强抗氧化活性组分SF3表现出了更强的抗氧化活性。其TEAC值和FRAP值与Du等^[20]做得植物多酚

的结果相比更高,抗氧化活性更强。桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层的最强抗氧化活性组分 DPPH IC_{50} 值分别为 17.88 $\mu\text{g/mL}$ 和 15.00 $\mu\text{g/mL}$,

均低于 Kaewseejan 等^[15] 等对植物多酚的研究结果,因此桦褐孔菌子实体多酚进行分离纯化后具有很强的抗氧化活性。

表 1 子实体多酚柱色谱分段组分的抗氧化活性

萃取层	分段物	DPPH $IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	TEAC/ $(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1})$	FRAP/ $(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1})$
乙酸乙酯层	SF1	24.72 \pm 0.01 ^g	2.25 \pm 0.02 ^d	1.89 \pm 0.03 ^d
	SF2	20.67 \pm 0.01 ^d	2.72 \pm 0.04 ^e	2.36 \pm 0.01 ^h
	SF3	17.88 \pm 0.01 ^c	3.32 \pm 0.01 ^g	3.12 \pm 0.03 ^d
	SF4	26.23 \pm 0.02 ^h	1.96 \pm 0.04 ^c	1.37 \pm 0.03 ^b
	SF5	33.91 \pm 0.04 ⁱ	1.86 \pm 0.02 ^b	1.16 \pm 0.02 ^a
正丁醇层	SF1	17.30 \pm 0.22 ^b	3.74 \pm 0.32 ^h	2.95 \pm 0.05 ^g
	SF2	20.97 \pm 0.33 ^e	2.90 \pm 0.25 ^f	2.47 \pm 0.07 ^f
	SF3	15.00 \pm 0.14 ^a	4.33 \pm 0.36 ⁱ	3.36 \pm 0.15 ⁱ
	SF4	23.59 \pm 0.46 ^f	1.96 \pm 0.17 ^c	2.09 \pm 0.04 ^e
	SF5	27.87 \pm 0.57 ⁱ	1.22 \pm 0.12 ^a	1.76 \pm 0.08 ^c

注:表中不同字母表示有显著性差异($p < 0.05$)。

2.4 抗氧化活性与黄酮含量的相关性分析

DPPH、TEAC 和 FRAP 三种抗氧化活性与黄酮含量相关性分析的结果如表 2 所示,结果表明:DPPH 抗氧化活性相关性与黄酮含量的相关系数为 0.909,FRAP 法抗氧化活性的相关性系数为 0.957,TEAC 法抗氧化活性的系数为 0.822,因此黄酮是抗氧化活性的主导物质。黄酮是优质的抗氧化剂,作为氢和电子的供体来说具有很高的反应活性^[21]。进一步分析发现 DPPH、TEAC 和 FRAP 三种抗氧化活性之间也显示很强的相关性, r 值均高于 0.873。因此黄酮作为一种抗氧化剂,对抗氧化活性起着非常重要的作用。

表 2 黄酮含量和抗氧化活性的相关性分析

	TFC	DPPH IC_{50}	TEAC	FRAP
TFC	1	0.909**	0.822**	0.957**
DPPH IC_{50}	—	1	0.873**	0.954**
TEAC	—	—	1	0.894**
FRAP	—	—	—	1

注:DPPH IC_{50} : DPPH· 清除活性;TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, ABTS·⁺ 清除活性;FRAP: Ferric ion reducing antioxidant power,铁离子还原能力。

3 结 论

桦褐孔菌子实体含有大量的生物活性成分,在这些生物活性成分中多酚有着很强的抗氧化活性,本文采用有机溶剂提取和柱色谱分离纯化的方法对桦褐孔菌子实体多酚进行研究,主要结论如下:

a) 桦褐孔菌子实体多酚乙酸乙酯层和正丁醇层柱色谱分段组分中都是 SF3 表现出最高的抗氧化活性,其中正丁醇层的 SF3 的抗氧化活性要高于乙酸乙酯层的 SF3。

b) 子实体多酚柱色谱分段组分的 DPPH、TEAC 和 FRAP 三种抗氧化活性在强弱上呈现一致性,相关性系数都达到 0.873。

c) 黄酮含量与抗氧化活性的相关性系数也达到了 0.822,黄酮在子实体多酚的抗氧化活性中起重要作用。

本文基于葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 对子实体多酚的初步分离为进一步地研究桦褐孔菌中多酚组分的鉴定奠定基础。

参考文献:

- [1] Zheng W, Zhang M, Zhao Y, et al. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus* [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3):1327-1335.
- [2] Taji S, Yamada T, Wada S, et al. Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43(11):2373-2379.
- [3] Handa N, Yamada T, Tanaka R. An unusual lanostane-type triterpenoid, spiroinonotsuoxodiol, and other triterpenoids from *Inonotus obliquus* [J]. Phytochemistry, 2010, 71(14):1774-1779.
- [4] Ma L, Chen H, Dong P, et al. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1):503-508.
- [5] Zheng W, Miao K, Liu Y, et al. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4):1237-1254.
- [6] Hwang B S, Lee I K, Yun B S. Phenolic compounds from the fungus *Inonotus obliquus* and their antioxidant

- properties[J]. Journal of Antibiotics, 2016, 69(2): 108-110.
- [7] Nakajima Y, Sato Y, Konishi T. Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga)[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2007, 55(8): 1222-1226.
- [8] Gan C H, Nurul Amira B, Asmah R. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*) [J]. International Food Research Journal, 2013, 20(3): 1095-1102.
- [9] Pandey K B, Rizvi S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009, 2(5): 270-278.
- [10] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species [J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(3): 217-233.
- [11] Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(2): 174-181.
- [12] Xu X, Wu Y, Chen H. Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged fermentation of *Inonotus obliquus* [J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 74-79.
- [13] Xu X, Li J, Hu Y. Polysaccharides from *Inonotus obliquus* sclerotia and cultured mycelia stimulate cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells in vitro and their chemical characterization[J]. International Immunopharmacology, 2014, 21(2): 269-278.
- [14] Zhao Y X, Miao K J, Zhi-Wen Zhang M M, et al. Effects of nitric oxide on production of antioxidant phenolic compounds in *Phaeoporus obliquus* [J]. Mycosystema, 2009, 28(5): 750-754.
- [15] Kaewseejan N, Sutthikhum V, Siriamornpun S. Potential of Gynura procumbens leaves as source of flavonoid-enriched fractions with enhanced antioxidant capacity [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 120-128.
- [16] Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16(3): 144-158.
- [17] Wang Y, Gao Y, Ding H, et al. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from Moringa oleifera leaf and evaluation of antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2017(218): 152-158.
- [18] Zhu L, Xu X. Stimulatory effect of different lignocellulosic materials for phenolic compound production and antioxidant activity from *Inonotus obliquus* in submerged fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(7): 2138-2152.
- [19] Guo Y J, Deng G F, Xu X R, et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi[J]. Food & Function, 2012, 3(11): 1195-1205.
- [20] Du H, Wu J, Li H, et al. Polyphenols and triterpenes from Chaenomeles fruits: Chemical analysis and antioxidant activities assessment[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 4260-4268.
- [21] Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001, 1(6): 569-590.

Antioxidant activity of polyphenol from natural sclerotia of *Inonotus obliquus*

YAN Lanting, XU Xiangqun

(School of Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Sporocarp generates abundant bioactive polyphenols in the growing process of *Inonotus obliquus*. In order to study the antioxidant activity of the polyphenols, organic solvent methanol was used to extract polyphenols from sporocarp of *Inonotus obliquus*. The polyphenols were divided into ethyl acetate layer and n-butyl alcohol layer through extraction. Meanwhile, Sephadex LH-20 column chromatography was applied to separate the ethyl acetate layer and n-butyl alcohol layer of polyphenols to get components of different segments. The content of polyphenols and flavonoids as well as antioxidant activity of each segment was determined. The results show that SF3 has the highest content of polyphenols and flavonoids in the components of ethyl acetate layer segment. SF2 has the highest polyphenol content in column chromatography segment components of n-butyl alcohol. SF3 has the highest content of flavonoids. The SF3 both in ethyl acetate layer and n-butyl alcohol layer has the strongest antioxidant activity. There is a strong positive correlation between flavonoid content and antioxidant activity. The anti-oxidation activity of polyphenols from sporocarp of *Inonotus obliquus* can lay a foundation for separation and identification of polyphenol components.

Key words: *Inonotus obliquus*; polyphenol; flavonoid; antioxidant activity

(责任编辑:唐志荣)