

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.017

黄纪国,余雄涛,谢意珍,等. 桦褐孔菌提取物抗氧化活性研究[J]. 广西植物,2014,34(4):515-519

Huang JG, Yu XT, Xie YZ, et al. Study on antioxidant activity from *Inonotus obliquus*[J]. *Guihaia*, 2014, 34(4):515-519

桦褐孔菌提取物抗氧化活性研究

黄纪国^{1,2}, 余雄涛^{1,2}, 谢意珍^{1,2}, 潘鸿辉^{1,2*}, 蓝宇虹¹, 吕静²

(1. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广州 510070;

2. 广东粤微食用菌技术有限公司, 广州 510663)

摘要: 以乙酸乙酯和甲醇为提取剂, 采用索氏提取法, 剩余残渣采用热水浸提, 最终得到桦褐孔菌不同极性提取物, 对其 DPPH 自由基、羟基自由基及超氧阴离子自由基清除活性作用进行了研究, 确定桦褐孔菌的抗氧化能力, 为深入研究和开发桦褐孔菌功能性食品奠定理论基础。实验结果表明桦褐孔菌具有较好的抗氧化活性, 其中乙酸乙酯提取物的 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率均高于其他两组分及 BHT, 桦褐孔菌提取物有望成为功能性食品组分中合成抗氧化剂的天然替代品。

关键词: 桦褐孔菌; 抗氧化; DPPH

中图分类号: S646 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)04-0515-05

Study on antioxidant activity from *Inonotus obliquus*

HUANG Ji-Guo^{1,2}, YU Xiong-Tao^{1,2}, XIE Yi-Zhen^{1,2},
PAN Hong-Hui^{1,2*}, LAN Yu-Hong¹, LÜ Jing²(1. *Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry Province Joint Development), Guangzhou 510070, China;* 2. *Guangdong Yuewei Edible Fungi Technology Co. Ltd., Guangzhou 510663, China*)

Abstract: *Inonotus obliquus* belongs to the family Hymenochaetaceae of Basidiomycetes, is mainly distributed in Russia, North America, Europe, Japan and northeastern China. It has been used traditionally as a folk medicine and with other herbs to reduce inflammation in the nasopharynx and facilitate breathing. Different extracts were based on ethyl acetate(EA), methanol and water as extraction solvent and using Soxhlet extraction method to *Inonotus obliquus*, respectively. Reducing and radical scavenging abilities against DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide radical and reducing power of ethyl acetate(EA), methanol extracts and water extracts were measured by means of photometric method, then compared with BHT. The results showed that ethyl acetate(EA) extract from the fruit of *Inonotus obliquus* had the highest antioxidant activity, and its antioxidant activity was better than that of BHT. It was correspond with the contents of various kinds of triterpenes, lignins and polyphenols in the different extracts. EA extracts would be good natural antioxidant, and have good development value.

Key words: *Inonotus obliquus*; antioxidant; DPPH

桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus*) 属于真菌门、担子菌亚门、层菌纲、非褐菌目(无褐菌目)、多孔菌科、褐卧孔菌属(纤孔菌属)。主要生长在俄罗斯北部、

中国吉林省长白山及日本北海道等寒冷地区, 其广泛用于防治消化道疾病、肿瘤、糖尿病等(黄年来, 2002; Mizuo *et al.*, 1996; 梁青乐等, 2005; Wasser *et*

收稿日期: 2013-09-22 修回日期: 2013-10-23

基金项目: 广东省教育部科技部产学研结合项目(2012B090600050); 广东省科技计划项目(2010B080100068)。

作者简介: 黄纪国(1986-), 男, 湖南浏阳人, 助理研究员, 从事食药真菌研究及开发工作, (E-mail) huangjiugu@126.com。

*通讯作者: 潘鸿辉, 博士, 副研究员, 从事食药真菌研究及开发工作, (E-mail) phheys@Yahoo.com。

al., 2002)。目前,国内外研究人员对其抗肿瘤、抗炎症、增强机体免疫力、降血糖等功效已经进行了研究,并从有效成分中提取分离出大量的萜类,黄酮类和多酚类化合物(Leea *et al.*, 2007; Hyun *et al.*, 2010),其中绝大多数为含有羊毛脂烷型四环三萜类化合物,并且绝大多数都具有 3 OH· 和 Δ^8 或 $\Delta^{8,24}$ 的结构(刘迎秋等, 2008)。据 Lee *et al.* (2005) 和 Park *et al.* (2004) 报道,桦褐孔菌子实体的水提物能防止细胞间核酸的氧化,并且桦褐孔菌可保护内源性 DNA 不被 H_2O_2 破坏,因此有很强的抗氧化活性。对于桦褐孔菌多糖,三萜类和类固醇等提取物也有相关的强氧化性(Cui *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2012)。另外 Song *et al.* (2004) 等证实了桦褐孔菌的菌丝体提取物是一种能有效清除氧化剂的因子,对人体皮肤有 NF- κ B 抑制作用。目前对于桦褐孔菌提取物的抗氧化性能研究主要是桦褐孔菌粗多糖上,提取方式为热水浸提与萃取相结合的方法,而索氏提取具有提取效果高等优点。本试验以桦褐孔菌各个组分为研究对象,对桦褐孔菌不同极性溶剂萃取物的抗氧化活性与 BHT 进行比较研究,为深入研究和开发桦褐孔菌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

材料:桦褐孔菌购自广东粤微食用菌技术有限公司,并经广东省微生物研究所食用菌研究发展中心鉴定。

试剂:二苯代苦味酰自由基(DPPH)(Sigma 公司);过氧化氢叔丁基(BHT)(上海盈元化工有限公司);邻二氮菲,连苯三酚(上海国药集团化学试剂有限公司);磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸亚铁氨、双氧水、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、三羟甲基氨基甲烷、浓盐酸、95%乙醇等(广州化学试剂二厂)。所有溶剂均为分析纯;实验用水均为蒸馏水。

仪器:DZF-150 型数显小型真空干燥箱;SHBIII-循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);TGL-168 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);AR-1140/C 型电子分析天平(上海金鹏分析仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);ZKW 型电子恒温水浴锅(国华电器有

限公司);UV-1700 紫外可见分光光度计(岛津国际贸易有限公司);超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);微量连续可调移液器(上海江岳电子科技有限公司)等。

1.2 桦褐孔菌提取物的制备

取自然风干的桦褐孔菌子实体(300 g),经粉碎机粉碎后,用滤纸包扎,置于索氏提取器中,分别加入乙酸乙酯(EA)(600 mL)、甲醇(MeOH)(600 mL)置于 1 000 mL 的圆底烧瓶中,进行回流提取,每种溶剂提取 6 h,剩余残渣用水进行浸提 24 h,得到水提部分。经真空浓缩干燥,得到乙酸乙酯提取物 9.6 g、甲醇提取物 4.1 g 和水提取物部分 13.7 g。

1.3 实验步骤

1.3.1 对 DPPH 自由基清除活性的测定 参考鲁传华等(2011)中 DPPH 法,做出部分的修改,取 0.008 mg/mL 的 DPPH 溶液 4 mL,分别加入不同质量浓度的桦褐孔菌提取物溶液(0.20~2.00 mg/mL,编号为 $1^{\#}$ ~ $10^{\#}$)0.5 mL,摇匀后在 28 °C 水浴中恒温 30 min,然后迅速测其 517 nm 处的吸光度 A。同时测定空白样的吸光度 A_0 ,空白样品即用 0.5 mL 无水乙醇代替样液。以 BHT 作为人工对照,同时每份样品均测 3 次。按下式计算其清除率:

$$\text{清除率 } SC(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_0) \times 100\%$$

式中, A 样品为提取物试样的吸光度, A_0 为空白样品的吸光度。

1.3.2 对羟基自由基(OH·)清除活性的测定 羟基自由基(OH·)清除活性的测定参考金鸣等(1996)的方法:向 10 mL 比色管中依次加入 0.4 mL 0.75 mmol/L 的邻二氮菲无水乙醇溶液, 1.0 mL pH=7.4 的磷酸缓冲溶液, 0.3 mL 0.75 mmol/L 硫酸亚铁氨溶液和 0.2 mL 桦褐孔菌提取物溶液(或 BHT)(浓度梯度为 0.20~2.00 mg/mL,编号为 $1^{\#}$ ~ $10^{\#}$),加入 1.0 mL 0.01% 的 H_2O_2 溶液,以蒸馏水定容至刻度。在 37 °C 水浴中恒温 60 min,于 536 nm 下测吸光度 A。每加 1 次试剂均需混合摇匀,同时测定不含提取物的空白样品及人工合成对照样品(BHT),并且每个样品重复 3 次。按下式计算样品对 OH· 的清除率:

$$SC(\%) = (A_{\text{样}} - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}) \times 100\%$$

式中, A 样为加样液的吸光度, A 损为不加样液、样液用溶剂代替的吸光度, A 未损为不加样液

表 1 桦褐孔菌的提取物和 BHT 对 DPPH 自由基的清除率

Table 1 Scavenging ability of different extracts from *Inonotus obliquus* and BHT on DPPH

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rates			
	水提取物 Water extracts	甲醇提取物 Methanol extracts	乙酸乙酯提取物 EA extracts	BHT 对照 Contract
0	—	—	—	—
0.2	6.61±0.03h	11.16±0.01h	25.59±0.01i	18.23±0.02i
0.4	11.36±0.03g	19.78±0.01g	38.76±0.02h	28.54±0h
0.6	13.51±0.01f	29.36±0.02f	48.04±0.02g	38.26±0.02g
0.8	16.32±0.02e	39.19±0.04e	59.92±0.02f	46.45±0.57f
1	17.80±0.00d	49.28±0.02d	66.64±0.01e	53.44±0.02e
1.2	18.17±0.03c	57.27±0.01c	75.48±0.08d	62.63±0.01d
1.4	20.66±0.02a	62.34±0b	80.37±0.07c	67.39±0c
1.6	20.17±0.02b	65.29±0.73b	81.21±0.00b	68.44±0.02b
1.8	20.13±0.00b	69.35±0.03a	82.31±0.01a	70.51±0a

注: 表中不同字母表示 Tukey 法下 5% 水平的差异显著。下同。

Note: The different alphabetical letters indicated significant differences under the Tukey test following ANOVA ($P < 0.05$). The same below.

表 2 桦褐孔菌提取物及 BHT 对羟基自由基的清除率

Table 2 Scavenging ability of different extracts from *Inonotus obliquus* and BHT on OH·

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rates			
	水提取物 Water extracts	甲醇提取物 Methanol extracts	乙酸乙酯提取物 EA extracts	BHT 对照 Contract
0	—	—	—	—
0.2	6.37±0.04i	8.34±0.01i	21.46±0i	12.66±0.02i
0.4	12.27±0.03h	18.68±0.02h	34.22±0.02h	23.68±0.04h
0.6	18.49±0g	30.99±0.01g	49.57±0.02g	35.68±0g
0.8	22.24±0.01f	44.35±0.01f	59.64±0.02f	48.25±0.05f
1	26.76±0.01e	50.10±0e	68.25±0.01e	60.46±0.02e
1.2	30.36±0.02d	61.20±0.01d	75.52±0.01d	69.54±0.01d
1.4	37.78±0.02c	71.27±0.02c	85.36±0.00c	75.43±0.00c
1.6	44.35±0b	79.23±0.03b	88.44±0.00b	78.41±0.01b
1.8	45.35±0.01a	81.30±0.01a	90.49±0.02a	80.00±0a

和 H_2O_2 的吸光度(三者均以蒸馏水空白为参比)。

1.3.3 超氧阴离子自由基清除活性测定 $O_2^{\cdot-}$ 的清除活性测定参照孟庆繁等(2005)的方法,采用改良的邻苯三酚自氧化速率的测定,向 10 mL 比色管中依次加入 4 mL pH = 8.0 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L), 4.2 mL 蒸馏水,混匀后在 25 °C 水浴中恒温 20 min。取出后立即加入温度为 25 °C, 0.3 mL 3 mmol/L 邻苯三酚溶液中(以 10 mmol/L HCl 配制),立刻计时并迅速摇匀,然后在波长 325 nm 下测定其光值,1 min 后开始读数,每隔 30 s 记录 1 次,直至读满 8 min,计算线性范围内整分钟吸光值的 ΔA_0 。空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液。

样品对超氧阴离子自由基的清除能力测定:操作方法同上,在加入邻苯三酚前,先加入 0.4 mL 不同浓度的桦褐孔菌提取物样品溶液和人工对照 BHT 溶液(浓度梯度为 0.20~2.00 mg/mL,编号为

1[#]~10[#]),然后按上述方法每个样品重复操作 3 次,计算线性范围内整分钟吸光值的 ΔA ,并计算抑制率。

超氧阴离子自由基清除率按下列式子计算:

邻苯三酚自氧化速率 $D_0 = (\text{第 8 分钟的 } \Delta A_0 - \text{第 1 分钟的 } \Delta A_0) / 7$

抑制率 $SC(\%) = (D_0 - D) / D_0 \times 100\%$

式中, D_0 为未加样品时邻苯三酚的自氧化速率; D 为加入样品溶液后邻苯三酚的自氧化速率(计算方法同 D_0)。

2 结果与分析

2.1 桦褐孔菌各极性部位的提取产量

为评价桦褐孔菌的抗氧化活性,依据图流程制备桦褐孔菌各极性部位提取物,桦褐孔菌 3 个不同极性部位的得率分别为水 4.57%,乙酸乙酯 3.20%,

表 3 桦褐孔菌提取物和 BHT 对超氧阴离子的清除率

Table 3 Scavenging ability of different extracts from *Inonotus Obliquus* and BHT on $O_2^- \cdot$

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rates			
	水提取物 Water extracts	甲醇提取物 Methanol extracts	乙酸乙酯提取物 EA extracts	BHT 对照 Contract
0	—	—	—	—
0.2	8.24±0.02i	13.45±0.02i	21.86±0.09i	9.60±0i
0.4	15.48±0.02h	20.40±0h	32.34±0.04h	21.37±0.02h
0.6	22.45±0.01g	28.38±0.01g	40.44±0.01g	33.46±0.05g
0.8	30.20±0.02f	35.26±0.01f	50.99±0.0f	43.29±0f
1	34.47±0.01e	43.39±0.02e	58.33±0.06e	50.29±0.01e
1.2	38.38±0.02d	50.87±0d	67.26±0.06d	58.35±0.01d
1.4	42.11±0.01c	55.79±0.01c	76.35±0.05c	65.20±0c
1.6	46.78±0.01b	56.90±0.01b	80.34±0.05b	70.36±0.01b
1.8	47.29±0.01a	58.29±0.09a	85.61±0.01a	75.4±40.04a

甲醇 1.37%，其中水相得率最高，这可能与多糖等大分子主要存在于水相部位，弱极性、中极性小分子物质主要存在于乙酸乙酯和甲醇部位有关。

2.2 桦褐孔菌各极性部位的 DPPH 自由基清除率

根据表 1 数据得桦褐孔菌提取物清除 DPPH 自由基的浓度-清除率关系(图 1, 表 4)。从表 4 中的相关系数 R^2 值, 说明各种样品所建立的方程非常可靠, 解释了桦褐孔菌提取物浓度-清除率之间一一对应关系。

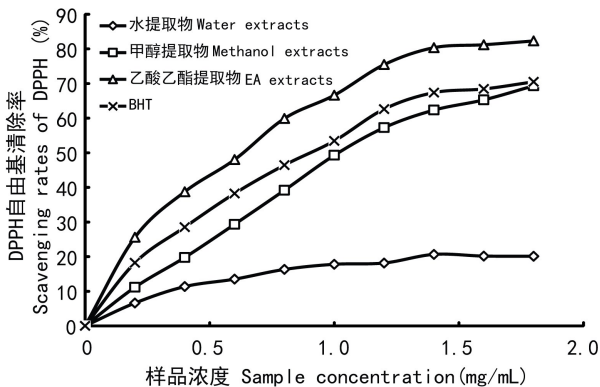


图 1 桦褐孔菌各提取物和 BHT 对 DPPH 自由基的清除率
Fig. 1 Scavenging ability of different extracts from *Inonotus obliquus* and BHT on DPPH

从曲线方程看出, 桦褐孔菌提取物对 DPPH 自由基的清除率随着浓度的增大而增大, 最终趋向平稳。桦褐孔菌提取物对 DPPH 自由基清除活性的 IC_{50} 值顺序为乙酸乙酯提取物 < BHT 对照物 < 甲醇提取物 < 水提取物, 因此乙酸乙酯提取物的活性高于 BHT 及其他极性提取物, 其 IC_{50} 为 0.44 mg/mL, 是其他提取物的 1/4。

表 4 各样品和 BHT 对 DPPH 自由基清除率的曲线方程及 IC_{50} 值

Table 4 Curve equation of scavenging ability and IC_{50} values of different solvent extracts from *Inonotus Obliquus* and BHT on DPPH

样品 Sample	曲线方程 Curve equation	相关系数 R^2	DPPH IC_{50} (mg/mL)
水提取物 Water extracts	$y = -6.662x^2 + 21.38x + 3.14$	0.986	1.64
甲醇提取物 Methanol extracts	$y = -13.77x^2 + 65.33x - 3.101$	0.995	1.01
乙酸乙酯提取物 EA extracts	$y = -21.66x^2 + 79.54x + 9.940$	0.997	0.44
BHT 对照 Contract	$y = -16.36x^2 + 66.33x + 4.827$	0.996	0.86

2.3 桦褐孔菌各极性部位的羟基自由基清除率

根据表 2 数据得桦褐孔菌提取物清除 DPPH 自由基的浓度-清除率关系(图 2, 表 5)。从表 5 中的相关系数 R^2 值, 说明各种样品所建立的方程可行, 且非常可靠, 能较好的解释桦褐孔菌提取物清除羟基自由基的浓度-清除率关系。

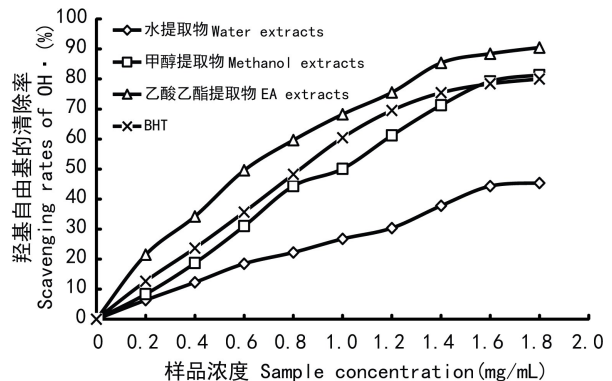


图 2 桦褐孔菌提取物及 BHT 对羟基自由基的清除率
Fig. 2 Scavenging $OH \cdot$ ability of different extracts from *Inonotus Obliquus* and BHT

表 5 各样品和 BHT 对羟基自由基清除率的曲线方程及 IC_{50} 值

Table 5 Curve equation of scavenging ability and IC_{50} values of different solvent extracts from *Inonotus Obliquus* and BHT on $OH \cdot$

样品 Sample	趋势线方程 Curve equation	相关系数 R^2	DPPH IC_{50} (mg/mL)
水提取物 Water extracts	$y = -0.948x^2 + 26.80x + 1.507$	0.990	1.94
甲醇提取物 Methanol extracts	$y = -11.34x^2 + 70.25x - 6.395$	0.995	0.95
乙酸乙酯提取物 EA extracts	$y = -20.26x^2 + 84.38x + 4.947$	0.997	0.62
BHT 对照 Contract	$y = -21.41x^2 + 87.35x - 6.440$	0.994	0.80

从曲线方程看出,桦褐孔菌提取物对羟基自由基的清除率随着浓度的增大而增大,最终趋向平稳。桦褐孔菌提取物对羟基自由基清除活性的 IC_{50} 值顺序为乙酸乙酯提取物 < BHT 对照物 < 甲醇提取物 < 水提取物,因此乙酸乙酯提取物的活性高于 BHT 及其他极性提取物,其 IC_{50} 为 0.62 mg/mL,清除率最终达 91%。

2.4 桦褐孔菌各极性部位的超氧阴离子($O_2^- \cdot$)自由基清除率

根据表 3 数据得桦褐孔菌提取物清除超氧阴离子自由基的浓度-清除率关系(图 3,表 6)。从表 6 中的相关系数 R^2 值,说明各种样品所建立的方程可行,解释了桦褐孔菌提取物清除超氧阴离子自由基的浓度-清除率之间的一一对应关系。从曲线方程看出,桦褐孔菌提取物对超氧阴离子自由基的清除率随着浓度的增大而增大,最终趋向平稳。桦褐孔菌提取物对超氧阴离子自由基清除活性的 IC_{50} 值顺序为乙酸乙酯提取物 < BHT 对照物 < 甲醇提取

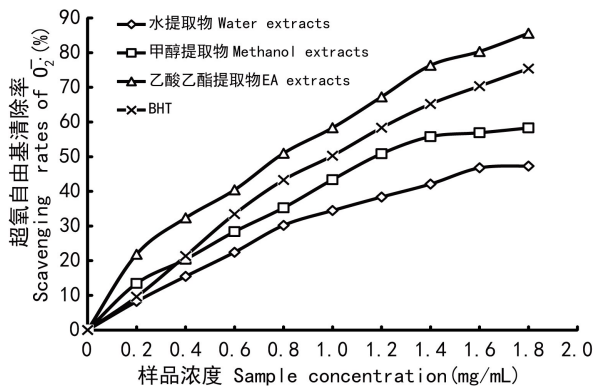


图 3 桦褐孔菌提取物和 BHT 对超氧阴离子的清除率
Fig. 3 Scavenging $O_2^- \cdot$ ability of different extracts from *Inonotus Obliquus* and BHT

表 6 各样品的趋势线方程和对超氧阴离子自由基清除活性的 IC_{50} 值

Table 6 Curve equation of scavenging ability and IC_{50} values of different solvent extracts from *Inonotus obliquus* and BHT on $O_2^- \cdot$

样品 Sample	曲线方程 Curve equation	相关系数	DPPH IC_{50} (mg/mL)
水提取物 Water extracts	$y = -10.31x^2 + 45.42x - 0.65$	0.997	—
甲醇提取物 Methanol extracts	$y = -12.32x^2 + 54.59x + 1.323$	0.991	1.23
乙酸乙酯提取物 EA extracts	$y = -8.475x^2 + 57.54x + 10.25$	0.997	0.78
BHT 对照 Contract	$y = -13.55x^2 + 67.82x - 3.183$	0.999	0.97

物 < 水提取物,因此乙酸乙酯提取物的活性高于 BHT 及其他极性提取物,其 IC_{50} 为 0.78 mg/mL。

3 结论

本研究分别测定了对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除能力。结果表明,桦褐孔菌各提取物对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基均有一定的清除能力,且随浓度的增大而逐渐增强,其中乙酸乙酯提取物的抗氧化活性最强,其对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除率都高于 85%,明显优于人工合成抗氧化剂 BHT。桦褐孔菌乙酸乙酯提取物抗氧化活性最强。本研究结果为开发利用桦褐孔菌丰富的自然资源提供理论依据,为桦褐孔菌植物更广泛的应用于药理、保健品、化妆品等行业提供科学依据。

参考文献:

- Cui Y, Kim DS, Park KC. 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* [J]. *Ethnopharmacol*, **96**(1): 79-85
- Hyun KJ, Ha WC, Soon SH, et al. 2010. Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the *Chaga mushroom (Inonotus obliquus)* [J]. *Food Chem*, **119**(2): 619-625
- Huang NL (黄年来). 2002. *Fuscoporia obliqua* - a mysterious folk medicinal mushroom in Russia (俄罗斯神秘的药用真菌—桦褐孔菌) [J]. *Edible Fungi Chin* (中国食用菌), **21**(4): 7-8
- Lee HB, Jung HS, Kang MH, et al. 2005. Composition of *Inonotus obliquus* with anti-oxidation for inhibiting DNA damage caused by inter-cellular oxidation [M]. *Korean Kongkae Taeho Kongbo*
- Leea IK, Kima YS, Janga YW, et al. 2007. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus* [J]. *Bioorganic & Med Chem Letters*, **17**(15): 6 678-6 680
- Liang QL (梁清乐), Wang QY (王秋颖), Fan JH (樊锦海), et al. 2005. A survey of *Inonotus obliquus* (桦褐孔菌的研究概况) (下转第 496 页 Continue on page 496)