

# 桦褐孔菌多糖的分离纯化及体外抗氧化活性研究

石岁悦<sup>1,2</sup>, 曲中原<sup>1,2</sup>, 徐蓓蕾<sup>1,2</sup>, 胡 扬<sup>1,2</sup>, 李文兰<sup>1,2\*</sup>, 汲晨锋<sup>1,2\*</sup>

(1. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心, 哈尔滨 150076)

**摘要:** **目的** 分离纯化桦褐孔菌多糖(*Inonotus obliquus* polysaccharide, IOP), 分析其结构并对其抗氧化活性进行评价。**方法** 以桦褐孔菌为原材料, 采用水提醇沉工艺, 经大孔树脂吸附法除杂脱色得到 IOP; 通过 DEAE-52 纤维素柱对 IOP 进行分离纯化, 得到 4 个多糖组分: IOP-1、IOP-2、IOP-3 和 IOP-4, 通过 Sephadex G-100 凝胶柱纯化得率较高的组分 IOP-1, 得到均一多糖 IOP-1a。对 IOP-1a 进行结构鉴定, 并考察其体外抗氧化能力。**结果** IOP-1a 相对分子质量为 12040 Da; 由 7 种单糖组成: 葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖和岩藻糖(0.341:0.246:0.150:0.102:0.842:0.559:0.213), 红外光谱显示 IOP-1a 含有  $\beta$  型糖苷键、羰基、羟基等官能团。体外抗氧化实验表明, IOP 和 IOP-1a 均有较好的抗氧化能力。**结论** 从 IOP 中分离纯化得到的中性组分 IOP-1a 具有较好的抗氧化活性。

**关键词:** 桦褐孔菌; 多糖; 分离纯化; 结构鉴定; 抗氧化活性

## Isolation, purification and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from *Inonotus obliquus*

Shi Sui-Yue<sup>1,2</sup>, Qu Zhong-Yuan<sup>1,2</sup>, Xu Bei-Lei<sup>1,2</sup>, Hu Yang<sup>1,2</sup>, Li Wen-Lan<sup>1,2\*</sup>, Ji Chen-Feng<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**ABSTRACT: Objective** To isolate and purify *Inonotus obliquus* polysaccharide (IOP), and analyze its structure and evaluate its antioxidant activity. **Methods** *Inonotus obliquus* was used as raw materials, the IOP was obtained by water extraction and alcohol precipitation by removing impurity and decolorization using macroporous resin adsorption; the IOP was purified by DEAE-52 cellulose column to obtain 4 kinds of polysaccharide fractions: IOP-1, IOP-2, IOP-3 and IOP-4. IOP-1 with higher yield was purified by Sephadex G-100 gel column to obtain homogeneous polysaccharide IOP-1a. The structure of IOP-1a was identified and its antioxidant capacity *in vitro* was investigated. **Results** The relative molecular weight of IOP-1a was 12040 Da; it was composed of 7 kinds of monosaccharides: Glucose, galactose, xylose, mannose, rhamnose, arabinose and fucose (0.341:0.246:0.150:0.102:0.842:0.559:0.213), and Infrared spectroscopy showed that IOP-1a contained  $\beta$ -glycosidic bond, carbonyl, hydroxyl and other functional groups. Antioxidant experiments *in vitro* showed that both IOP and IOP-1a had good

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA19C107)

Fund: Supported by the Heilongjiang Province Applied Technology Research and Development Program (GA19C107)

\*通信作者: 李文兰, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药药效物质基础。E-mail: lwldzdzd@163.com

汲晨锋, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为中药多糖的化学和药理。E-mail: smilejcf001@sina.com

\*Corresponding author: LI Wen-Lan, Ph.D, Professor, Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China. E-mail: lwldzdzd@163.com

Ji Chen-Feng, Ph.D, Professor, Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China. E-mail: smilejcf001@sina.com

antioxidant capacity. **Conclusion** The neutral component IOP-1a isolated and purified from *Inonotus obliquus* polysaccharide has good antioxidant activity.

**KEY WORDS:** *Inonotus obliquus*; polysaccharide; isolation and purification; structure identification; antioxidant activity

## 0 引言

桦褐孔菌 [*Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat]<sup>[1]</sup>, 又名纤孔菌、桦树泪、白桦茸, 是天然真菌的一种, 发育良好的白桦茸通常出现在 40 年以上的白桦树或黑桦树上, 其生长条件十分恶劣, 主要分布在北半球高纬度地带, 因具有极强的耐寒性, 在零下 45 °C 的低温下仍可以生长 15 年之久, 所以又被称为“森林钻石”“梦幻菇蕈”。近年来, 大量动物及临床实验表明桦褐孔菌具有调节血糖<sup>[2]</sup>、治疗高尿酸血症<sup>[3]</sup>、维持肠道菌群平衡<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、缓解疲劳<sup>[6]</sup>、防止血管衰老相关疾病<sup>[7]</sup>及消灭肿瘤细胞<sup>[8-12]</sup>等多种功能。在其丰富的药用价值基础上, 诸多研究学者也将目光聚焦于其良好的食用价值上。美国把桦褐孔菌列入“天然的馈赠”, 作为宇宙人的未来饮品。孙嵘<sup>[13]</sup>通过小鼠的经口毒性和遗传毒性实验发现, 桦褐孔菌是一种无毒级别, 且具有食用安全性的真菌。陈晓平<sup>[14]</sup>在完成食用安全性评价的基础上, 进行了 10 种桦褐孔菌系列保健品研发, 表明桦褐孔菌具有良好的研究价值。

国内外医学研究表明, 桦褐孔菌含有植物纤维类多糖体<sup>[15]</sup>、超氧化物歧化酶<sup>[16]</sup>、低分子多酚类<sup>[17]</sup>等超过 215 种活性成分, 其中多糖是桦褐孔菌发挥主要药效的重要物质基础, 徐县焯等<sup>[18]</sup>通过响应曲面法筛选出吉林所产桦褐孔菌多糖 (*Inonotus obliquus* polysaccharide, IOP) 提取的最佳条件, 桦褐孔菌多糖得率为 3.81%, 且具有较好的 1,1-二苯基-2-苦基胍 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除活性。王梦雅等<sup>[19]</sup>通过对人工培育的桦褐孔菌进行发酵提取, 得到的桦褐孔菌多糖经 DEAE-52 纤维素纯化后得到两个组分 (EIOP1、EIOP2), 相对分子质量分别为 20.24 和 202.869 kDa, 且桦褐孔菌粗多糖的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果不如精多糖 EIOP1 和 EIOP2。陈义勇<sup>[20]</sup>经过 DEAE-Sepharose CL-6B 柱分离纯化黑龙江所产桦褐孔菌多糖得到了 4 个多糖组分, 其中 IOP-1b 和 IOP-3a 为均一性多糖, 相对分子质量分别为 153.172 和 44.265 kDa。目前, 国内学者通常选用传统的水提法及柱层析法对黑龙江、吉林等产地的桦褐孔菌进行多糖的制备, 在对其进行结构和活性研究时, 多集中于初级结构与粗多糖的抗肿瘤和降血糖等活性考察<sup>[21-22]</sup>, 对其他产地结构和活性的系统研究较少, 而多糖的活性与其结构具有紧密相关性, 不同来源和制备工艺的桦褐孔菌多糖的结构和活性存在差异<sup>[23]</sup>。

因此, 本研究采用水提醇沉工艺提取俄罗斯所产桦褐孔菌粗多糖, 利用 AB-8 大孔树脂对粗提物进行初步的脱色

除杂, 通过 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 凝胶柱分离纯化粗提物, 并采用紫外光谱法、高效凝胶渗透色谱法、气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 和红外光谱法对凝胶柱层析后的主要组分进行结构鉴定, 利用 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate, ABTS) 正离子自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力、铁还原抗氧化能力这 3 个指标考察桦褐孔菌多糖纯化前和纯化后组分的活性, 为后续桦褐孔菌多糖结构与抗氧化活性的关系研究提供理论基础和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

桦褐孔菌, 产自俄罗斯东西伯利亚南部地区。

乙醇、苯酚 (分析纯, 天津市天力化学试剂有限公司); AB-8 大孔树脂、葡聚糖标准品 (纯度  $\geq 99\%$ )、单糖标准品鼠李糖 (rhamnose, Rha)、岩藻糖 (fucose, Fuc)、阿拉伯糖 (arabinose, Ara)、木糖 (xylose, Xyl)、甘露糖 (mannose, Man)、葡萄糖 (glucose, Glc)、半乳糖 (galactose, Gal) (纯度  $\geq 99\%$ )、Sephadex G-100 凝胶 (上海源叶生物科技有限公司); MD34 透析袋 (美国韦斯卡斯公司); DEAE-52 纤维素 (北京索莱宝科技有限公司); 玻璃层析柱 (上海厦美层析柱有限公司); ABTS 自由基清除能力试剂盒、DPPH 自由基清除能力试剂盒、铁还原抗氧化能力试剂盒、三吡啶三嗪 [2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ] (分析纯) (江苏科特生物科技有限公司); 氯化钠 (分析纯, 天津市东丽区天大化学试剂厂); 硫酸、浓盐酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三氟乙酸、硼氢化钠、维生素 C (vitamin C, VC) (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 无水硫酸钠 (分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲苯、乙酸酐、二氯甲烷 (dichloromethane, DCM) (分析纯, 天津市风船化学试剂有限公司); 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜 (上海必泰生物科技有限公司); 实验室用水为超纯水。

TSK Gel 3000 SWXL 凝胶色谱柱 (300 mm $\times$ 7.8 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 瑞士梅特勒-托利多公司); RXI-5SIL MS 色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ )、津 GCMS-QP 2010 气相色谱-质谱联用仪、LC-10A 高效液相色谱仪、RID-10A 示差检测器 (日本 Shimadzu 公司); Multiskan MK3 全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); FREEZONE-12 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); IR-50 傅里叶变换红外光谱分析仪

(美国 Thorlabs 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 桦褐孔菌多糖的提取

参照邓蕾<sup>[24]</sup>的方法稍做修改,将块状桦褐孔菌通过粉碎机粉碎,以水为溶剂,称取适量桦褐孔菌粉末,将蒸馏水与桦褐孔菌粉末按液料比 20:1 (mL:g)混合后,在温度为 95 °C、提取时间为 2.25 h 的条件下进行提取,提取后抽滤,过滤掉残渣,留下滤液,将滤液浓缩至原体积溶液的 1/5,80%乙醇沉淀,放置避光阴凉处 24 h,2500 r/min 离心 5min 后收集沉淀部分,45 °C烘箱烘干,得桦褐孔菌粗多糖。

### 1.2.2 桦褐孔菌多糖的含量测定

参照邓蕾<sup>[24]</sup>的方法,利用苯酚硫酸法测定多糖含量,以葡萄糖为标准品,以葡萄糖标准品质量浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度值为纵坐标,制作标准曲线,测定桦褐孔菌多糖的含量。

### 1.2.3 桦褐孔菌多糖的分离纯化

将干燥后的粗多糖用双蒸水复溶,采用邓蕾<sup>[24]</sup>的方法,加入通过乙醇、酸碱预处理好的 AB-8 大孔树脂进行纯化除杂,最终除去溶液中杂质,同时吸附色素,冻干,即得 IOP。初步纯化后 IOP 经 DEAE-52 层析柱(50 cm×2.6 cm)分离,依次用双蒸水、0.2、0.5、1.0 mol/L 的 NaCl 溶液进行洗脱,洗脱流速为 1 mL/min,每 10 mL 的洗脱液收集于一个离心管中,采用苯酚硫酸法<sup>[25]</sup>在 490 nm 波长下测定吸光度,做洗脱曲线图,收集洗脱液,进行透析及冻干。

称取上述得率较高的多糖配制成为 5 mg/mL 的溶液,通过 Sephadex G-100 凝胶层析柱纯化,流速为 0.2 mL/min,每 2 mL 的洗脱液收集于离心管中。采用苯酚硫酸法<sup>[25]</sup>,在 490 nm 波长下追踪各离心管吸光度值,做洗脱曲线图,收集同峰离心管的洗脱液,进行透析及冻干,即得纯化后的桦褐孔菌精多糖。

### 1.2.4 桦褐孔菌多糖的分子量测定

向精密称取后的桦褐孔菌多糖样品和标准品中加入适量超纯水,溶解配制为 5 mg/mL 溶液,离心 10 min,上清液通过 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后转移至 1.8 mL 进样小瓶中。用不同相对分子质量的葡萄糖作为标准品,以保留时间为横坐标,分子对数  $\lg M_w$  为纵坐标,制作标准曲线,计算桦褐孔菌多糖纯化组分的相对分子质量。

TSK Gel 3000 SWXL 凝胶色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L NaCl 溶液; 流速: 0.6 mL/min, 进样量: 20 μL; 柱温: 35 °C。

### 1.2.5 桦褐孔菌多糖的单糖组成分析

标准品及样品处理: 参照李美凤等<sup>[26]</sup>的方法稍加修改,精密称量 2 mg 单糖标准品,加入 2 mL 超纯水及 60 mg 硼氢化钠还原 8 h,由醋酸中和后,旋蒸掉有机溶剂,置于 101 °C烘箱内将其烘干。在 100 °C时,与 1 mL 乙酸酐反应 1 h,发生乙酰化反应,温度降至室温后,加入 3 mL 甲苯溶

液,为除去过多醋酐,要重复进行不少于 4 次的减压浓缩蒸干等操作。用 3 mL DCM 把上述产物溶解、转移至分液漏斗,加入少量双蒸水、振荡、静置、除去上层水溶液,上述操作步骤循环 4 次。取定量的无水硫酸钠将 DCM 层进行干燥,定容 10 mL 后放入液相小瓶。称取样品 30 mg 后,加入 1 mL 2 mol/L 的三氟乙酸水解 90 min,蒸干,此时多糖水解为单糖。后续各步操作详见标准品操作。

分析采用岛津 GCMS-QP 2010 气相色谱-质谱联用仪; GC-MS 条件: RXI-5SIL MS 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 程序升温: 初始温度 100 °C,以 10 °C/min 升温至 200 °C/min; 保持 5 min; 进样口温度为 200 °C,离子源温度为 200 °C/min,载气为氦气,色谱柱留样为 1 mL/min。

### 1.2.6 桦褐孔菌多糖的红外光谱分析

精密称取样品 2 mg 和溴化钾 200 mg,压制成片<sup>[27]</sup>,置于傅里叶变换红外光谱仪 IR-50 进行测量。

### 1.2.7 桦褐孔菌精多糖的抗氧化活性研究

#### (1) ABTS 正离子自由基清除能力测定

参照郑恒光等<sup>[28]</sup>的方法稍加修改,取不同质量浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL)的待测样液,加入去离子水使总体积为 2.00 mL,再加入 ABTS 工作液至终体积 10 mL,混匀后,室温(25 °C)静置 6 min,于 734 nm 处读取吸光度。按照公式(1)计算:

$$\text{ABTS 正离子自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $A_0$  为空白组吸光度,  $A_1$  为样品吸光度,  $A_2$  为对照组吸光度。

#### (2) DPPH 自由基的清除能力测定

参照冯焱等<sup>[29]</sup>的方法稍加修改,取不同质量浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL)的待测样液 0.1 mL 及 DPPH-乙醇溶液(0.1 mmol/L) 3.9 mL,混匀,室温(25 °C)避光条件下静置 30 min,于 517 nm 处读取吸光度。按照公式(2)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}) \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $B_0$  为空白组吸光度,  $B_1$  为样品吸光度,  $B_2$  为对照组吸光度。

#### (3) 铁还原抗氧化能力测定

参照黎云龙等<sup>[30]</sup>的方法稍加修改,取不同质量浓度适当稀释(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL)的待测样液各 0.1 mL,分别加入 3.9 mL 铁离子还原能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)工作液(0.1 mol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液、10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L  $\text{FeCl}_3$  溶液),混匀后,室温 25 °C,准确反应 10 min,于 590 nm 处读取吸光度。以  $\text{FeSO}_4$  为标准物绘制标准曲线,以 FRAP 值来表示样本的总抗氧化能力。

### 1.3 数据处理

采用 Origin 2018 及 SPSS 17.0 软件处理实验结果, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 桦褐孔菌多糖的提取和含量测定

采用水提醇沉工艺, 从 950 g 桦褐孔菌粉末提取得到桦褐孔菌 115 g 粗多糖, 得率为 12.1%。

采用苯酚浓硫酸法测定多糖含量, 线性回归方程为  $Y = 0.7796X - 0.048$ ,  $r^2 = 0.999$ , 由此测得桦褐孔菌粗多糖含量为 27.96%。於雨碟等<sup>[31]</sup>通过响应面优化法得到的桦褐孔菌多糖组分最高含量为  $(26.52 \pm 0.20)\%$ , 高愿军等<sup>[32]</sup>通过热水浸提得到的桦褐孔菌多糖含量仅为 16.79%, 推测多糖含量的高低, 可能与桦褐孔菌的来源与提取方法有关。

### 2.2 桦褐孔菌多糖的紫外可见光谱分析

图 1 为 IOP 在紫外分光光度计下的全波长扫描图。由图 1 所示, 经过 AB-8 大孔树脂初步纯化脱色处理过的桦褐孔菌粗多糖 IOP 在 260~280 nm 处无特殊紫外吸收峰, 说明桦褐孔菌粗多糖 IOP 中不含有蛋白质和核酸等杂质。

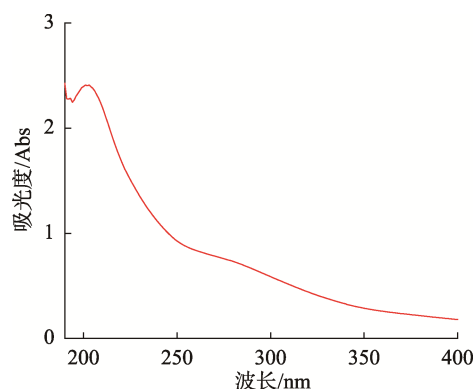


图 1 桦褐孔菌粗多糖紫外图谱

Fig.1 Ultraviolet spectrogram of *Inonotus obliquus* crude polysaccharides

### 2.3 DEAE-52 纤维素柱层析分析结果

通过水提醇沉和 AB-8 大孔树脂洗脱后的桦褐孔菌粗多糖中还存在其他杂质, 需要进行更进一步的纯化。如图 2 所示, 桦褐孔菌粗多糖经过 0、0.2、0.5、1.0 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱后, 得到 4 种组分, 命名为: IOP-1、IOP-2、IOP-3、IOP-4, 其得率分别为 30%、6.4%、3.7%、2.3%。由于组分 IOP-1 的峰值较其他 3 个组分高出许多, 推测其中离子型物质及色素杂质被 DEAE-52 纤维素所吸附。而 IOP-2、IOP-3 和 IOP-4 峰值过小, 若后续对这几个组分进行结构测定, 过柱纯化所需周期较长且较难收集, 故本研究将针对桦褐孔菌粗多糖 IOP-1 进一步地纯化, 对其结构进行研究。

### 2.4 多糖组分 IOP-1 的 Sephadex G-100 凝胶柱纯化

为了得到桦褐孔菌纯品多糖从而探析其结构, 通过 Sephadex G-100 凝胶柱对桦褐孔菌中性糖组分 IOP-1 进一步纯化, 得到的洗脱曲线, 如图 3 所示。由图 3 观察到经过 Sephadex G-100 凝胶柱纯化后的多糖为单一峰, 证明其为均一组分。收集洗脱液, 通过旋转蒸发仪浓缩、透析、冷冻干燥, 得到 Sephadex G-100 凝胶柱分离纯化过的精多糖, 命名为 IOP-1a。

### 2.5 桦褐孔菌多糖纯化组分 IOP-1a 的分子量测定

本研究采用高效凝胶渗透色谱法对桦褐孔菌精多糖 IOP-1a 进行分析, 记录保留时间, 并结合  $\lg M_w$ -RT (重均分子量) 校正曲线计算相对分子量大,  $\lg M_w$ -RT 校正曲线方程为:  $\lg M_w = -0.1985M + 12.509$ ,  $r^2 = 0.9964$ 。图 4 为 IOP-1a 的高效液相凝胶渗透色谱图, 桦褐孔菌精多糖 IOP-1a 存在一个明显的单峰, 纯度较好, 结合方程进而计算出其分子量大小为 12040 Da。LIU 等<sup>[33]</sup>通过分离纯化研究得到的桦褐孔菌纯化多糖 HIOP1-S 和 HIOP2-S 平均分子量分别为 13.6 和 15.2 kDa, 与本研究结果较为相近。

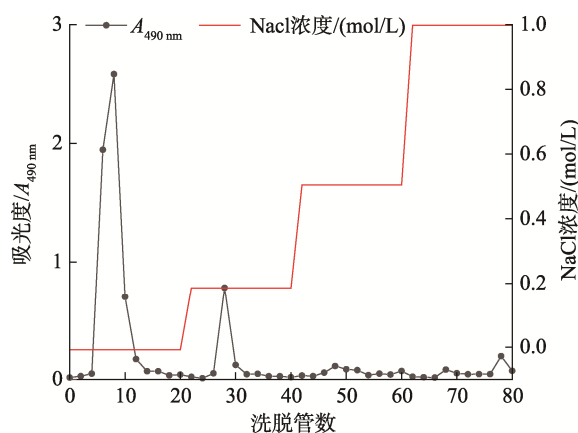


图 2 桦褐孔菌多糖 DEAE-52 纤维素柱洗脱曲线

Fig.2 Spectrum elution curve of IOP on DEAE-52

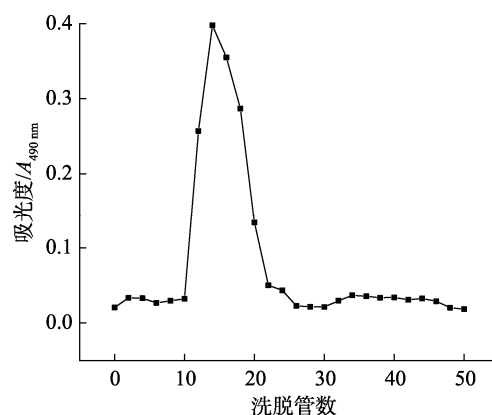


图 3 IOP-1 的 Sephadex G-100 凝胶柱纯化洗脱曲线

Fig.3 Purification elution curve of IOP-1 on Sephadex G-100 gel column



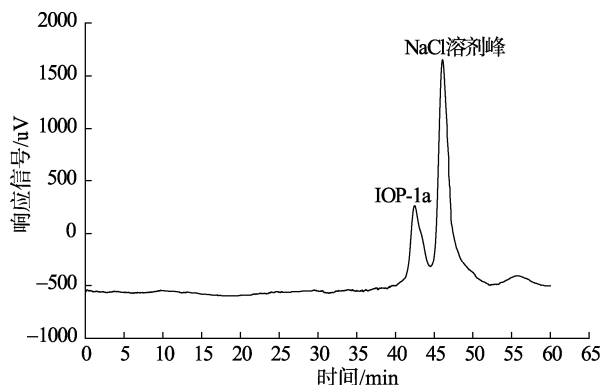


图 4 IOP-1a 高效凝胶渗透色谱图

Fig.4 High performance gel permeation chromatogram of IOP-1a

## 2.6 桦褐孔菌多糖纯化组分 IOP-1a 的单糖组成

通过 GC-MS 分析, 如图 5, 可知 7 种单糖标准品在各自范围内线性关系良好, 依据表 1 中各个单糖标准品保留时间分析桦褐孔菌精多糖 IOP-1a 的单糖组成。

结合图 6 和表 2 可知, 葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖和岩藻糖这几种单糖组成 IOP-1a, 主要单糖为葡萄糖, 占 34.08%, 其次是占 24.58% 和 14.99% 的半乳糖和木糖, 之后是占 10.22% 和 8.42% 的甘露糖和鼠李糖, 阿拉伯糖和岩藻糖含量最低, 为 5.59% 和 2.13%。综上, 本研究所得 IOP-1a 由 7 种单糖组成: 葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖和岩藻糖(0.341:0.246:0.150:0.102:0.842:0.559:0.213)。李青<sup>[34]</sup>使用 PMP 柱前衍生化对初步纯化的黑龙江产地桦褐孔菌多糖进行单糖组成分析, 发现其由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖这 6 种单糖构成, 许泓瑜等<sup>[35]</sup>等通过气相色谱法分析, 发现桦褐孔菌多糖的主要单糖组成为阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。

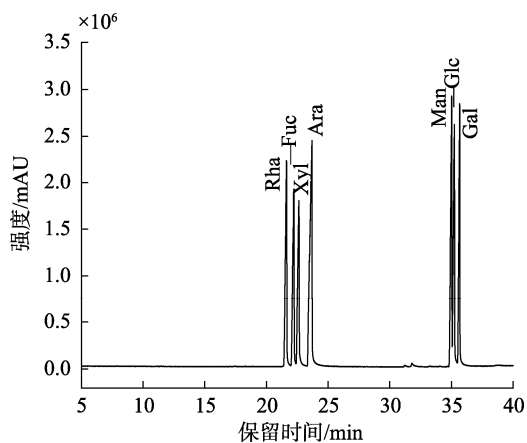


图 5 单糖标准品 GC-MS 色谱图

Fig.5 GC-MS chromatogram of monosaccharide standard

表 1 混合单糖标准品的组成  
Table 1 Composition of mixed monosaccharide standards

保留时间/min	组分名称	峰面积	峰面积/%
21.633	Rha	18509315	13.83
22.228	Fuc	15477219	11.56
22.632	Ara	15097105	11.28
23.691	Xyl	31151603	23.26
35.022	Man	20435364	15.27
35.246	Glc	17355787	12.97
35.667	Gal	15833409	11.83

## 2.7 桦褐孔菌多糖纯化组分 IOP-1a 的红外光谱分析

如图 7 所示, IOP-1a 吸收峰在红外光谱图中有显著的表现, 具体包括: 3407、2927、1633、1469、1427、1382、1145、865  $\text{cm}^{-1}$ 。3407  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰表明存在 O-H 的伸缩振动<sup>[36]</sup>, 在 2927  $\text{cm}^{-1}$  处有一个吸收峰, 处于 3000~2800  $\text{cm}^{-1}$  范围内, 证明存在 C-H 的伸缩振动峰<sup>[37]</sup>, 这是糖类的特征峰。在 1633  $\text{cm}^{-1}$  处有一个吸收峰, 是结晶水。在 1469  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C-H 的变角振动。在 1427 和 1145  $\text{cm}^{-1}$  范围内的吸收峰, 是 C-O 的伸缩振动。在 1382  $\text{cm}^{-1}$  处有吸收峰, 可能归属于 C=O 的对称伸缩振动。在 865  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰, 推测其属于  $\beta$  吡喃环<sup>[38]</sup>环上次甲基的横摇振动。

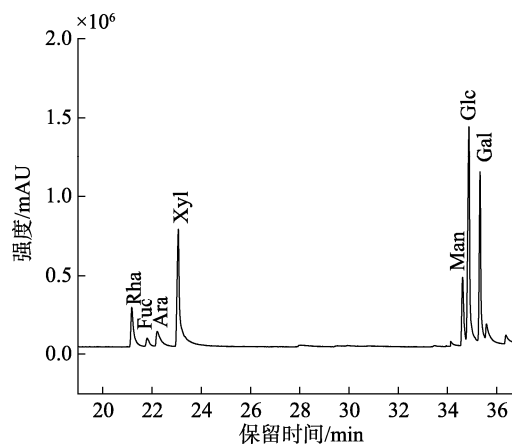


图 6 IOP-1a GC-MS 色谱图

Fig.6 GC-MS chromatogram of IOP-1a

表 2 桦褐孔菌精多糖 IOP-1a 单糖组成  
Table 2 Composition of IOP-1a monosaccharides

保留时间/min	组分名称	峰面积	峰面积比/%	质量百分比/%
21.178	Rha	1968521	8.07	8.42
21.806	Fuc	416865	1.71	2.13
22.216	Ara	1066723	4.37	5.59
23.070	Xyl	5899706	24.19	14.99
34.619	Man	3639017	10.82	10.22
34.876	Glc	7475989	30.66	34.08
35.325	Gal	4918040	20.17	24.58

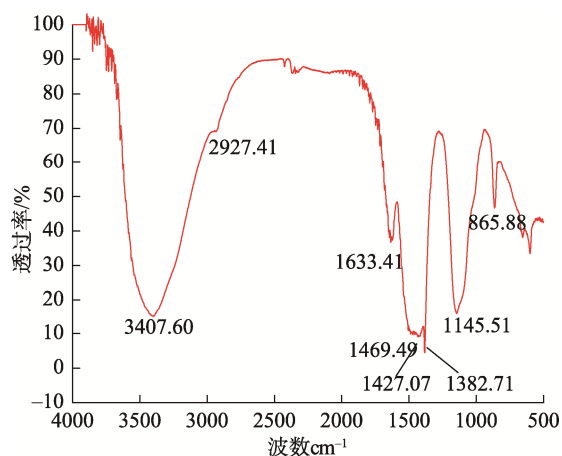


图 7 IOP-1a 的红外光谱图  
Fig.7 Infrared spectrum of IOP-1a

## 2.8 桦褐孔菌多糖纯化组分 IOP-1a 的抗氧化活性结果

### 2.8.1 ABTS 自由基清除能力

如图 8 所示, 随着质量浓度的增加, IOP 和 IOP-1a 的 ABTS 正离子自由基清除能力增强, 各个质量浓度均有组间差异( $P < 0.01$ ), 表现出一定的浓度依赖性, 在本研究所设置的最高质量浓度 2.5 mg/mL 时, IOP 和 IOP-1a 对 ABTS 正离子自由基分别达到了最大清除率 63.77% 和 91.92%, 与 IOP 相比, IOP-1a 清除 ABTS 正离子自由基的效果更显著( $P < 0.05$ ), 但较桦褐孔菌黄酮类化合物<sup>[39]</sup>的 ABTS 正离子自由基清除能力弱一些, 推测这可能与黄酮类的特殊结构有关。

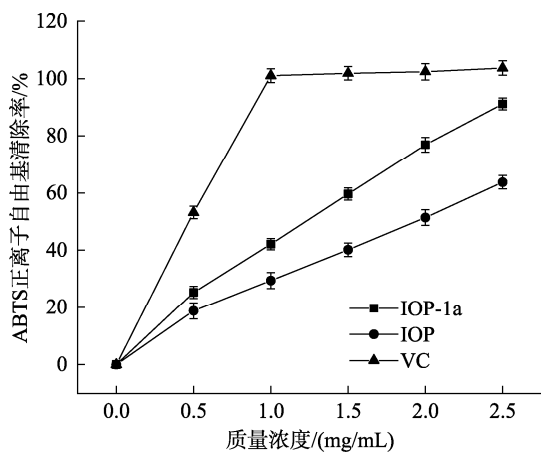


图 8 IOP 与 IOP-1a 对 ABTS 正离子自由基的清除能力( $n=3$ )  
Fig.8 ABTS cation radical scavenging capacities of IOP and IOP-1a ( $n=3$ )

### 2.8.2 DPPH 自由基清除能力

如图 9 所示, 随着质量浓度的增加, IOP 和 IOP-1a 的 DPPH 自由基清除能力逐步增强, 各个质量浓度均有组间差异( $P < 0.01$ ), 表现出一定的浓度依赖性。在本研究设置的最大质量浓度 2.5 mg/mL 时分别达到了最大清除率 60.20% 和

72.75%, 且 IOP-1a 清除 DPPH 自由基的效果较 IOP 显著( $P < 0.01$ )。据相关文献所知, 相同浓度下乙酰化桦褐孔菌多糖组分<sup>[40]</sup>最大清除率不足 60%, 米邦塔仙人掌多糖组分<sup>[41]</sup>的最大清除率不足 10%, 证明 IOP 和 IOP-1a 清除 DPPH 自由基能力虽不及 VC, 但相比于其他多糖, 对 DPPH 自由基产生的清除效果较强。这可能与多糖的纯度和分子量<sup>[41]</sup>有关, 高纯度且小分子量的多糖 DPPH 自由基清除能力更强。

### 2.8.3 铁还原抗氧化能力实验

在 590 nm 处,  $\text{FeSO}_4$  质量浓度( $B$ , mg/mL)与吸光度( $A$ )呈线性剂量关系, 其标准曲线方程为:  $A = 0.0972B + 0.0042$  ( $r^2 = 0.9997$ ), 由标准曲线计算  $\text{FeSO}_4$  当量。如图 10 所示, 随着质量浓度的增加, IOP 和 IOP-1a 与其抗氧化能力均表现出良好的量效关系, 在 2.5 mg/mL 时, FRAP 值分别达到了 1.08 和 1.65 ( $P < 0.01$ ), 明显高于王宇箭<sup>[42]</sup>的关于桦褐孔菌水提物抗氧化的研究结果, 说明桦褐孔菌纯化多糖抗氧化效果优于桦褐孔菌单纯水提物。

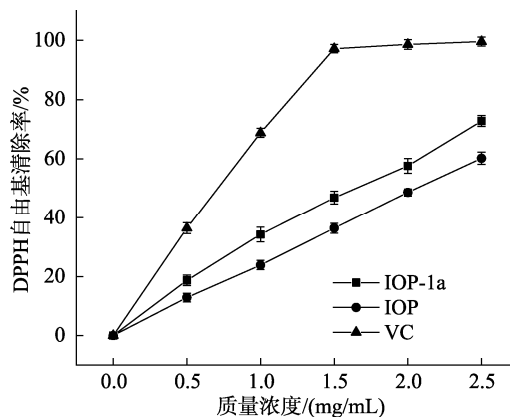


图 9 IOP 与 IOP-1a 对 DPPH 自由基的清除能力( $n=3$ )  
Fig.9 DPPH scavenging capacities of IOP and IOP-1a ( $n=3$ )

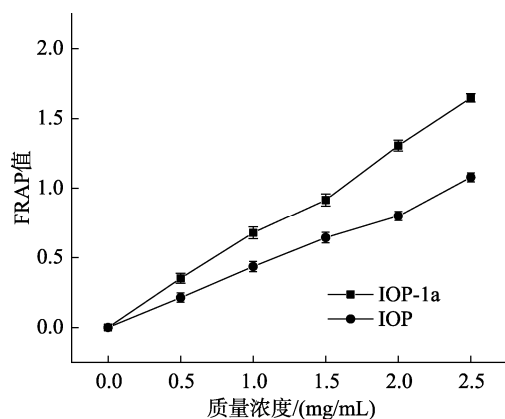


图 10 IOP 与 IOP-1a 的总抗氧化能力( $n=3$ )  
Fig.10 Total antioxidant capacities of IOP and IOP-1a ( $n=3$ )

## 3 结论

以往桦褐孔菌研究来源多集中于黑龙江大兴安岭、吉

林长白山等地区,本研究采用的是来自于俄罗斯西伯利亚贝加尔湖畔寒冷环境中生长的桦褐孔菌,较其他产地更绿色、安全,且其生长周期长,子实体呈黑褐色,有效成分更为充沛。本研究桦褐孔菌多糖提取率达 12.1%,高出以往徐昱焯等<sup>[18]</sup>和陈义勇<sup>[20]</sup>的研究结果,且通过进一步分离纯化得到了桦褐孔菌精多糖组分 IOP-1a。结果显示, IOP-1a 相对分子质量为 12040 Da, IOP-1a 由 7 种单糖组成,分别为葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖和岩藻糖(0.341:0.246:0.150:0.102:0.842:0.559:0.213), IOP-1a 含有  $\beta$  型糖苷键、羰基、羟基等官能团。抗氧化实验表明,在相同质量浓度条件下,两者均有较好的抗氧化能力,且具有浓度依赖性,但其抗氧化能力不及 VC,且精多糖 IOP-1a 的抗氧化能力优于粗多糖。综上,本研究明确了桦褐孔菌多糖的制备方案、初级结构及抗氧化活性,其糖苷键连接方式及高级结构有待进一步研究,以上结果为日后桦褐孔菌多糖的构效研究提供参考,并为桦褐孔菌全产业链大健康产品的开发提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] 曾小龙. 桦褐孔菌的化学成分与药理作用研究[J]. 广东第二师范学院学报, 2007, 27(3): 76–81.  
ZENG XL. A research into the medical effects and chemical components of *Inonotus obliquus* [J]. J Guangdong Univ Edu, 2007, 27(3): 76–81.
- [2] 夏晴, 王箴言, 王玉, 等. 桦褐孔菌多糖对糖尿病小鼠的干预作用及机制[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 71–78.  
XIA Q, WANG ZY, WANG Y, et al. Intervention effect and mechanism of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on diabetic mice [J]. Chin J Food Sci, 2021, 21(3): 71–78.
- [3] LUO LS, WANG Y, DAI LJ, et al. Triterpenoid acids from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Chaga) alleviate hyperuricemia and inflammation in hyperuricemic mice: Possible inhibitory effects on xanthine oxidase activity [J]. J Food Biochem, 2021. DOI: 10.1111/jfbc.13932
- [4] YU J, XIANG HY, XIE QH. The difference of regulatory effect of two *Inonotus obliquus* extracts on high-fat diet mice in relation to the fatty acid elongation function of gut microbiota [J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(1): 449–458.
- [5] JAVED S, MITCHELL K, SIDSWORTH D, et al. *Inonotus obliquus* attenuates histamine-induced microvascular inflammation [J]. PLoS One, 2019, 14(8): e220776.
- [6] ZHANG CJ, GUO JY, CHENG H, et al. Spatial structure and anti-fatigue of polysaccharide from *Inonotus obliquus* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 151: 855–860.
- [7] 任婷. 桦褐孔菌多糖的提取工艺及抗衰老作用的实验研究[D]. 吉林: 北华大学, 2019.  
REN T. Experimental study on extraction process and anti-senescence effects of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [D]. Jilin: Beihua University, 2019.
- [8] 陈晨, 李岩, 卓勤, 等. 桦褐孔菌诱导肺癌细胞周期阻滞和凋亡的研究[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(9): 79–82.  
CHEN C, LI Y, ZHUO Q, et al. Apoptosis and cycle arrest of lung cancer cells induced by *Inonotus obliquus* [J]. Chin Food Nutr, 2019, 25(9): 79–82.
- [9] LEE MG, KWON YS, NAM KS, et al. Chaga mushroom extract induces autophagy via the AMPK-mTOR signaling pathway in breast cancer cells [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274: 114081.
- [10] 王蔚, 乔羽, 周忠光, 等. 桦褐孔菌醇提物对胃癌侵袭转移的影响及分子机制探讨[J]. 中国医学装备, 2020, 17(9): 206–212.  
WANG W, QIAO Y, ZHOU ZG, et al. Effect of alcohol extract of *Inonotus obliquus* on invasion and migration of gastric carcinoma and the exploration of its molecular mechanism [J]. Chin Med Equip, 2020, 17(9): 206–212.
- [11] 李佳威, 曲超, 陈一方, 等. 桦褐孔菌多糖通过 NLRP3/NF- $\kappa$ B 信号通路对结肠炎相关结直肠癌小鼠的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(4): 437–442.  
LI JW, QU C, CHEN YF, et al. Effect of *Inonotus obliquus* polysaccharides on mice with colitis-associated colorectal cancer through NLRP3/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(4): 437–442.
- [12] 钟秀宏, 赵丽微, 赵芬琴, 等. 桦褐孔菌醇诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞株凋亡及其分子机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(3): 191–194.  
ZHONG XH, ZHAO LW, ZHAO FQ, et al. Effect of inotodiol on cell proliferation and apoptosis of human ovary cancer cell line SKOV3 and its molecular mechanism [J]. Chin J Pharm, 2014, 49(3): 191–194.
- [13] 孙嵘. 桦褐孔菌的食用安全性评价[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.  
SUN R. Food safety evaluation of *Inonotus obliquus* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.
- [14] 陈晓平. 桦褐孔菌功效成分研究与系列保健产品开发[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.  
CHEN XP. Research on the functional components of *Inonotus obliquus* and development of series of health products [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020.
- [15] LI ZG, MEI JJ, JIANG LP, et al. Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (agaricomycetes) polysaccharides suppress tacrine-induced apoptosis by ROS-scavenging and mitochondrial pathway in HepG2 Cells [J]. Int J Med Mushrooms, 2019. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019030857
- [16] YAN QH, SHAN JN, JIA F, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharides protect against Alzheimer's disease by regulating Nrf2 signaling and exerting antioxidative and antiapoptotic effects [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 131: 769–778.
- [17] WANG Y, OUYANG F, TENG C, et al. Optimization for the extraction of polyphenols from *Inonotus obliquus* and its antioxidation activity [J]. Prep Biochem Biotechnol, 2021, 51(9): 852–859.
- [18] 徐昱焯, 吕重宁, 王晓波, 等. 响应面法优化桦褐孔菌多糖提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 143–148.  
XU TY, LV CN, WANG XB, et al. Optimization of extraction of polysaccharides from *Inonotus obliquus* by response surface methodology and antioxidant activity [J]. Food Res Dev, 2021, 42(4): 143–148.
- [19] 王梦雅, 赵喆祺, 薛娇, 等. 桦褐孔菌纯化多糖体外降血糖活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 316–320.  
WANG MY, ZHAO ZZ, XUE J, et al. Hypoglycemic activity of purified polysaccharides from *Inonotus obliquus* in vitro [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(10): 316–320.
- [20] 陈义勇. 桦褐孔菌多糖纯化、结构及其抗肿瘤机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.  
CHEN YY. Purification, structure and anti-tumor mechanism of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.
- [21] 田建霞, 朱长俊, 许越, 等. 桦褐孔菌多糖对前列腺癌细胞增殖的抑制作用[J]. 山东化工, 2021, 50(20): 25–26.  
TIAN JX, ZHU CJ, XU Y, et al. Inhibitory effect of *Inonotus obliquus* polysaccharide on the proliferation of prostate cancer cells [J]. Shandong Chem Ind, 2021, 50(20): 25–26.
- [22] 荣芳悦. 桦褐孔菌多糖降糖成分筛选及结构鉴定[D]. 佳木斯: 佳木斯

- 大学, 2016.
- RONG FY. Hypoglycemic activity and structure identification of polysaccharides from *Inonotus Obliquus*. [D]. Kiamusze: Jiamusi University, 2016.
- [23] 黄明飞, 全涛, 黄昆仑. 桦褐孔菌多糖的提取工艺、结构及功能活性研究进展[J]. 中国食用菌, 2020, 39(11): 1-8, 13.
- HUANG MF, TONG T, HUANG KL. Research progress on extraction process, structure and functional activity of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. Edible Fungi China, 2020, 39(11): 1-8, 13.
- [24] 邓蕾. 桦褐孔菌多糖缓释片的制备与质量研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2018.
- DENG L. Study on preparation and quality of polysaccharide sustained-release tables of *Inonotus obliquus* [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2018.
- [25] 刘源才, 孙细珍, 许银, 等. 枸杞多糖组成及含量测定方法的改进[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 292-295.
- LIU YC, SUN XZ, XU Y, et al. An improved method for determination of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. Food Sci, 2013, 34(12): 292-295.
- [26] 李美凤, 袁明晃, 邹仕赞, 等. 松露多糖的提取、分离纯化和结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 196-200.
- LI MF, YUAN MH, ZOU SY, et al. Extraction, separation, purification and structure identification of polysaccharides from truffles [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(16): 196-200.
- [27] 林隽丹. 中药红花红外光谱扫描对比及与对照品相关系数分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(9): 115-116.
- LIN JD. Comparison of infrared spectrum scanning of safflower and analysis of correlation coefficient with reference substance [J]. Cardiovasc J Integr Tradit Chin West Med, 2016, 4(9): 115-116.
- [28] 郑恒光, 沈恒胜, 杨道富, 等. 杏鲍菇菇头多糖的结构鉴定及生物活性评价[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 7-13.
- ZHENG HG, SHEN HS, YANG DF, et al. Structural characterization and antitumor activity of crude polysaccharide extracted from the stalk residue of *Pleurotus eryngii* [J]. Food Sci, 2019, 40(22): 7-13.
- [29] 冯忻, 李艳红, 解玉红. 发酵秸秆多糖的分离纯化及抗氧化活性测定[J]. 食品科技, 2019, 44(2): 203-208.
- FENG X, LI YH, XIE YH. Separation, purification and antioxidant activity of fermentation of straw polysaccharides [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(2): 203-208.
- [30] 黎云龙, 于震宇, 邵海燕, 等. 骏枣多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(4): 45-49.
- LI YL, YU ZY, GAO HY, et al. Optimization of extraction process and antioxidant capacity of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Junzao [J]. Food Sci, 2015, 36(4): 45-49.
- [31] 於雨霏, 张佳妍, 张酥, 等. 桦褐孔菌子实体多糖的提取及体外降血糖活性[J]. 菌物学报, 2021, 40(1): 189-202.
- YU YD, ZHANG JY, ZHANG S, et al. Molecular screening of medicinal fungus *Inonotus obliquus* and anti-breast cancer activity of its submerged fermentation broth [J]. Mycosystema, 2021, 40(1): 189-202.
- [32] 高愿军, 张家泉, 司俊娜, 等. 响应面法优化桦褐孔菌多糖提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 7-10.
- GAO YJ, ZHANG JQ, SI JN, et al. Optimization of the extraction technology of *Inonotus obliquus* (FR) pilat polysaccharide using response surface method [J]. Food Res Dev, 2009, 30(6): 7-10.
- [33] LIU P, XUE J, TONG SS, et al. Structure characterization and hypoglycaemic activities of two polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. Molecules. 2018, 23(8): 1948.
- [34] 李青. 桦褐孔菌多糖的提取、纯化及其抗肿瘤活性研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2014.
- LI Q. Study on the extraction, purification and anti-tumor activity of polysaccharide from *Inonotus obliquus* [D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2014.
- [35] 许泓瑜, 孙军恩, 陆震鸣, 等. 桦褐孔菌菌粉多糖提取工艺的优化[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 175-179.
- XU HY, SUN JEN, LU ZM, et al. Optimization of extraction technique of polysaccharides from fermentation powder of *Inonotus obliquus* [J]. Food Ferment Ind, 2008, 34(11): 175-179.
- [36] 王会敏, 何柯新, 尚陈宇, 等. 猫爪草多糖的理化性质及其对 ANA-1 细胞的免疫调节作用[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(7): 855-859.
- WANG HM, HE KX, SHANG CY, et al. Physicochemical properties of PRT and its immunoregulatory effect on ANA-1 cells [J]. Tropical Med, 2018, 18(7): 855-859.
- [37] TIAN WN, DAI LW, LU SM, et al. Effect of *Bacillus* sp. DU-106 fermentation on *Dendrobium officinale* polysaccharide: Structure and immunoregulatory activities [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 135: 1034-1042.
- [38] DUAN GL, XB Y. Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia* [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 137: 1112-1120.
- [39] 张静, 孙晶波, 盛瑜, 等. 桦褐孔菌黄酮类化合物的提取工艺优化及抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 171-176.
- ZHANG J, SUN JB, SHENG Y, et al. Optimization of extracted process of flavonoids from *Inonotus obliquus* and evaluation of antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(12): 171-176.
- [40] 邵珠领, 吴艳丽, 张宇, 等. 桦褐孔菌多糖的乙酰化修饰及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 73-77.
- SHAO ZL, WU YL, ZHANG Y, et al. Acetylated modification and antioxidant activity of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(9): 73-77.
- [41] 林款, 徐丛玥, 梁征, 等. 米邦塔仙人掌多糖的提取纯化及体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 140-144.
- LIN K, XU CY, LIANG Z, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Opuntia milpa Alta in vitro* [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(5): 140-144.
- [42] 王宇箭. 桦褐孔菌水提取物抗氧化性和斑马鱼模型降血糖降血脂活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- WANG YJ. Research on the antioxidant and hypoglycemic activities of the extract from *Inonotus obliquus* [D]. Jinan: Shandong University, 2020.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

## 作者简介



石岁悦, 硕士, 主要研究方向为中药药效物质基础。

E-mail: 345530047@qq.com

李文兰, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药药效物质基础。

E-mail: lwldzd@163.com

汲晨锋, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为中药多糖的化学与药理。

E-mail: smilejcf001@sina.com