

## 桦褐孔菌活性组分提取分析方法研究进展

郑静茹<sup>1</sup>, 曲中原<sup>2</sup>, 陈大忠<sup>1\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150001

**摘要:** 桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 属于多孔菌科褐卧孔菌属, 是珍贵的药用真菌, 分布于中国、芬兰、波兰、俄罗斯及日本等国家。桦褐孔菌具有抗衰老和抑制病毒的药理作用, 主要用于治疗各种癌症、糖尿病及心脏病, 主要成分为多糖、三萜类化合物、木质素及黑色素, 其提取分离方法主要涉及水提法、超声法、微波辅助提取法、酶诱导结合负压空气化提取法, 分析方法主要为薄层色谱法、高效液相法和紫外-分光光度法。天然产物在新药研发及新药先导化合物发现中起重要作用, 综述了桦褐孔菌活性成分的提取及分析方法研究进展, 以期为其深入研究及新药研发提供参考。

**关键词:** 桦褐孔菌; 多糖; 三萜; 黑色素; 木质素; 提取分离

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 02-0382-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.026

## Research progress on extraction methods of *Inonotus obliquus* constituents

ZHENG Jingru<sup>1</sup>, QU Zhongyuan<sup>2</sup>, CHEN Dazhong<sup>1</sup>

1. Heilongjiang University of Traditional Chinese medicine, Harbin 150040, China

2. Harbin University of Commerce, Harbin 150001, China

**Abstract:** *Inonotus obliquus* is a valuable medicinal fungus belonging to the genus *Obliquus* of the family poraceae. It is distributed in China, Finland, Poland, Russia and Japan. It is mainly used worldwide to treat various cancers, diabetes and heart disease. In addition, it has anti-aging and anti-virus effects. The main ingredient of fo to the polysaccharides of fo, triterpene compounds, melanin and lignin, the extraction and separation methods mainly involves water, ultrasonic method, microwave assisted extraction, enzyme induction combined with negative pressure air extraction, analysis method for thin layer chromatography (TLC), high performance liquid (HPLC) and ultraviolet spectrophotometer method. Natural products play an important role in the discovery of new drugs and new drug lead compounds. In this paper, the extraction methods and analysis methods of active substances in *Inonotus obliquus* were reviewed, in order to provide reference for the further study of active substances in *Inonotus obliquus* e and the development of natural fungi as precursor compounds for new drug research and development.

**Key words:** *Inonotus obliquus*; polysaccharide; triterpenoids; melanin; lignin; extraction and separation

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat, 又称斜管纤孔菌或白桦茸等, 俄语名为 Chaga<sup>[1]</sup>, 属于多孔菌科、褐卧孔菌属真菌。桦褐孔菌大多分布于北纬 40°~50° 区域内, 如北美洲北部、芬兰、俄罗斯的西伯利亚、日本的北海道以及我国的黑龙江和吉林长白山地区。在中国, 桦褐孔菌资源主要集中在黑龙江省、吉林省和内蒙古等地, 除了天然来源, 已取得高产稳定的人工栽培技术, 还开发成系列功能食

品, 实现药用资源的开发利用<sup>[2]</sup>。桦褐孔菌是俄罗斯民间的一种药用真菌, 1955年前苏联卫生部认识到桦褐孔菌汤剂的治疗价值, 并以 Befunginum 的名称记录在苏联药典里<sup>[3]</sup>。俄罗斯、波兰等民间广泛利用桦褐孔菌来防治多种疑难杂症, 如各种癌症(胃癌、肝癌、肠癌等各种消化器官的癌症)、心脏病、糖尿病等<sup>[4]</sup>。

近年来, 随着对桦褐孔菌研究的深入, 应用现

收稿日期: 2021-10-13

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划资助项目(GA19C107); 黑龙江省应用技术与开发计划(GA19C009)

第一作者: 郑静茹(1996—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药物质基础和制剂学。Tel: 18846926227 E-mail: zheng361147993@163.com

\*通信作者: 陈大忠, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为中药物质基础和制剂学。Tel: 18646089027 E-mail: cdz89@163.com

代分离提取与纯化技术从桦褐孔菌中共分离约215个化合物<sup>[5]</sup>,并且不断有新的化合物被发现,包括多糖、萜类化合物、甾体、芳香化合物、叶酸衍生物、黑色素、木质素类等。桦褐孔菌中的三萜化合物对癌细胞具有很强的体内抗肿瘤活性,桦褐孔菌多糖对单纯疱疹病毒(HSV-1)有一定的抑制作用,与抗病毒药物联用可延缓耐药菌株的出现<sup>[6]</sup>。此外,有实验证实,桦褐孔菌的提取物对人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)有体外抑制作用<sup>[7]</sup>。

目前桦褐孔菌大多作为保健饮料、粉状物或饼干等食品形式出现在市场上,尚未有成品药物制剂上市,但桦褐孔菌中的白桦酯醇是一种重要的药物合成中间体,以白桦酯醇作原料可以合成白桦酯酸,白桦酯醇和白桦酯酸作为天然药物在抗艾滋病及抗肿瘤等方面作用机制新颖,且靶向作用更强,不良反应轻微,将其开发为新型药物制剂,具有广阔的应用前景。桦褐孔菌中的多糖及三萜类成分在防治肿瘤等方面具有明显的生物活性<sup>[8-9]</sup>。黑色素具有强抗氧化性和基因保护等特点,可以通过发酵制备,具有一定的研究价值<sup>[10-12]</sup>。有研究表明木质素和某些多糖结合而具有抗HIV活性<sup>[13]</sup>。本文对桦褐孔菌中的多糖、三萜类化合物、黑色素及木质素的提取方法以及分析方法进行综述,以期对桦褐孔菌的开发利用及新药研发提供依据。

## 1 多糖

桦褐孔菌多糖是从桦褐孔菌子实体中提取的,也是其主要生物活性成分。大量临床研究证实真菌多糖具有提高免疫力、抗凝、抗老化等多种药理作用。桦褐孔菌多糖是至少由10个小分子单糖构成的高相对分子质量的糖类化合物,其结构复杂,且结构特征与生物活性的关系紧密<sup>[14]</sup>。

### 1.1 多糖的提取

对多糖结构的研究主要集中在一级结构上,如多糖的组成、相对分子质量和联系状态等<sup>[15]</sup>。玄光善等<sup>[16]</sup>对桦褐孔菌多糖进行脱色处理至其保留率为91.7%时,分析发现桦褐孔菌多糖由6种单糖(甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和木糖)按2.13:1.26:7.01:2.98:1.78:1比例组成。关于桦褐孔菌的提取方法,国内外文献报道较多,综合国内外文献,目前研究多采用热水浸提、碱液浸提、酶解提取以及以水提为基础的新的提取工艺,如超声波提取和高压电场方法。

热水提取法为常用方法。朱晓丽<sup>[17]</sup>采用热水提取法提取桦褐孔菌多糖并使用正交实验优化提

取方法,得到的最优提取条件为浸提温度95℃、提取时间2.5 h、料液比1:30,粗多糖的提取率为17.53%。在蒸馏水作为溶剂的基础上,加入酸或碱也可提升多糖的提取量。但由于酸、碱的浓度过高会破坏多糖的结构及活性,所以在酸法或碱法提取桦褐孔菌多糖时需控制酸碱的浓度。常用1%醋酸或苯酚作为酸提取法的溶剂,碱提取法的溶剂常使用0.1~1.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH作为溶剂<sup>[18]</sup>。

热水浸提法提取桦褐孔菌多糖的方法也十分常用,虽然安全、方便操作,但是多糖的提取率低、所得产物的储存时间也相对较短,所以采用超声波或微波等辅助提取法进行提取。利用超声波的空化作用对细胞进行破壁,能提高桦褐孔菌多糖的得率<sup>[19]</sup>。张丽霞等<sup>[18]</sup>采用超声温度60℃、超声时间20 min的条件提取桦褐孔菌,与空白组比较桦褐孔菌多糖的得率显著提升。胡涛等<sup>[20]</sup>采用超声波提取法提取桦褐孔菌多糖,获得多糖得率为11.62%。通过实验结果的对比,可以直观地得出超声辅助对于桦褐孔菌多糖提取量有提升的效果。除此之外,还可采用微波辅助提取,通过微波使细胞内部加热,从而促进物质的释放溶出,提高提取率。Chen等<sup>[21]</sup>采用超声-微波提取法提取桦褐孔菌多糖,提取时间19 min、料液比1:20(g:mL)、微波功率90 W、超声功率50 W、超声频率40 kHz,多糖得率为3.25%、质量分数为73.16%。

虽然使用超声和微波辅助提取桦褐孔菌多糖的提取效果显著,但是也有不足之处,超声的设备较为昂贵,可能会导致提取成本过高,且过长时间超声可能对多糖的结构产生破坏使其分解。微波提取法的耗能较大,仅适合提取热稳定物质的提取,且微波会对人体造成伤害。

酶解法利用生物酶对细胞壁进行水解,破坏细胞壁结构,缩短提取时间从而增加多糖提取量。王艳波<sup>[22]</sup>采用纤维素酶提取桦褐孔菌多糖,当酶解时间60 min、酶解温度50℃、料液比1:40、加酶量3%、pH=5.0时,多糖提取率为2.57%。热水浸提、酸碱液浸提、有机溶剂提取等都是利用浓度差使得有效物质被萃取出来,萃取过程会耗费大量时间,生物酶能对细胞壁的通透性产生影响,使细胞内的有效物质更容易地被提取,大大提高了提取率,也能保证原有物质的性质不被破坏,同时降低了对温度的要求,根据酶高效性的特点,缩短了提取的时间,节约人力和物力。

殷涌光等<sup>[23]</sup>应用高压脉冲电场法提取桦褐孔

菌多糖,当电场强度为  $30 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 、脉冲数为6、液料比为  $25 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 、pH值为10时,桦褐孔菌多糖的提取率达到49.8%,与热碱法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法相比,该法提取率是热碱提取法的1.67倍、微波辅助提取法的1.12倍,多糖的纯度是超声辅助提取法的1.40倍。在高压脉冲电场的作用下,溶剂在细胞内运动,使细胞内的有效成分更好地溶解于溶剂中,细胞膜会被外加电场形成的差异所破坏,因此提取有效成分的效率增高。但是当电场强度高于  $30 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时,会破坏多糖的结构,所以在提取过程中需要控制电场的强度。与其他提取法相比,高压脉冲电场提取法具有耗时短、提取率高、杂质少等优点,但是耗能较大,对操作环境要求高。

## 1.2 多糖的分析

目前食用菌多糖的分析方法包括单糖的组成分析、分子质量分析、低级和高级结构表征。其中单糖的组分分析分为衍生化法和非衍生化法。衍生化法常用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用法、高效液相(HPLC)-紫外检测器(ultraviolet detector, UV)法和高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)法等。非衍生化法多为蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)法和电喷雾检测器(charged aerosol detection, CAD)法。GC-MS法和HPLC-UV法在单糖分析领域应用广泛且灵敏度高,仪器的普及率高。GC-MS法常用DB-5和HP-5色谱柱,流动相为氦气或氮气。HPLC-UV法常用Eclipse XDB-C<sub>18</sub>色谱柱,流动相为磷酸盐缓冲液-乙腈、醋酸盐缓冲液-乙腈。HPCE法需要1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生,使单糖带电荷被紫外检测器识别。由于单糖种类繁多结构复杂,虽然MS作为一种通用检测器可以不经衍生化直接检测,但还是需要结合HPLC进行检测,检测时常用PMP柱前衍生化。示差折光检测器(refractive index detector, RID)与HPLC联用可直接检测单糖。蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)相较于其他通用型检测器来说,灵敏度较弱,也因单糖的分离比较困难,所以在单糖组分分析时不经常被采用。CAD和前者类似,与ELSD相比,CAD的灵敏度和准确度更高;和RID相比,其受温度影响较小。高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器(highperformance anion exchange chromato-

graphy-pulse ampere detector, HPAEC-PAD)通过测量单糖在适当电位下的工作电极表面发生氧化还原反应时所产生的电流变化而对其进行测定。

目前食用菌多糖结构的分析方法还是以化学分析法为主,仪器分析法为辅。采用完全水解或衍生化等方法获取其单糖的组成和比例,再采用红外光谱分析法、气相色谱和液相色谱法等进行辅助分析。

核磁共振氢谱(H nuclear magnetic resonance, HNMR)、核磁共振碳谱(C nuclear magnetic resonance, CNMR)和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrum, FT-IR)<sup>[24-25]</sup>多被用于表示多糖的低级结构。HNMR和CNMR主要检测吡喃环和呋喃环、糖苷键构型、糖残基连接方式,而FI-IR较前者而言对糖残基连接方式没有检测能力。甲基化反应通过将多糖水解部分甲基化来判断糖苷键的位置以及所占比例。醛和甲酸是高碘酸和多糖反应的产物,糖苷键的类型和比例可以通过原料的消耗量来确定。Smith降解是高碘酸氧化的还原反应,使用气相色谱进行产物的分析。原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)都可以观察多糖表面形态特征。圆二色谱(circular dichroism, CD)可在固定条件下检测产生的异常峰来检测多糖的立体构象。虽然目前还没有文献报道桦褐孔菌多糖的分析方法,但是上述方法可供研究者尝试。

## 2 三萜类化合物

三萜类化合物为桦褐孔菌中有效成分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、降糖等作用<sup>[26]</sup>。作为一种不良反应少的重要的抗癌成分,桦褐孔菌中的三萜类化合物除通过抑制蛋白质的生物合成外,还通过抗有丝分裂的方式来影响肿瘤细胞的分裂及生长,从而达到抗肿瘤的作用效果。此外,桦褐孔菌还可抗HIV病毒,且作用显著,桦褐孔菌的子实体,特别是其所含的三萜化合物在体外均可抑制HIV病毒的增殖。

### 2.1 三萜类化合物的提取

三萜类物质的提取可分为两部分,一部分为游离态三萜类物质的提取,另一部分为苷类物质提取。其中游离三萜类化合物的提取方法还可分为超临界CO<sub>2</sub>提取、超声提取、微波提取、溶剂提取法等方法。苷类化合物一般采用有机溶剂进行提取,

将提取液浓缩后转溶于水,过滤后用石油醚或乙醚提取,除杂,水液继用正丁醇提取,正丁醇经减压回收后得到粗总苷。

目前最常用的提取方式为采用甲醇、乙醇等有机溶剂对有效成分进行提取。潘春丽等<sup>[27]</sup>采用7倍量的异丙醇,在80℃提取2h,所得桦褐孔菌三萜提取率达9%以上。和乙醇与丙醇相比,异丙醇的提取效果较好。Wold等<sup>[28]</sup>采用二氯甲烷回流提取以及索氏提取器浸泡48h的方法提取桦褐孔菌中的三萜类。檀琪<sup>[29]</sup>采用热回流提取法并用响应面法对提取条件进行优化,即以异丙醇为溶剂、料液比1:22、在80℃下回流2.5h,所得总三萜平均含量为 $(13.150 \pm 0.023) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

超声波作为一种高频机械波主要通过超声空化向体系提供能量,在提取天然产物有效物质中得到应用。细胞膜由于超声产生的空化作用而被破坏,使有效物质的提取变得更容易,同时水温由于超声基本维持在57℃,也对提取有所帮助。超声波提取法相较于其他提取方法具有提取时间短、提取率高、无需再加热等特点,在天然产物的分析中被应用。田明月等<sup>[30]</sup>采用超声提取法提取桦褐孔菌总三萜并用正交试验对提取条件进行优化,即以丙乙醇为溶剂,料液比1:10,在50℃下超声提取30min,最终总三萜得率为5.06%。殷涌光等<sup>[31]</sup>采用超声波辅助提取法,丙酮为溶剂、料液比20mL·g<sup>-1</sup>,在40℃下提取20min,所得桦褐孔菌三萜类化合物的质量比为9.868g·kg<sup>-1</sup>。并且在相同条件下与传统浸提相比,产物得率有显著性增加。

高压脉冲电场提取法的处理时间不到1s,并且大大减少了在提取过程中对被提取物质的损坏。王婷<sup>[32]</sup>采用条件场强为60kV·cm<sup>-1</sup>、脉冲数为10、料液比为1:16的方法提取桦褐孔菌,所得三萜类化合物的提取率为57.21%。

王隋鑫<sup>[33]</sup>采用酶诱导结合负压空化提取法对酶诱导和提取条件进行了优化,使用纤维素酶浓度1mg·mL<sup>-1</sup>、诱导温度40℃、诱导时间24h,采用75%乙醇为提取溶剂、液固比16mL·g<sup>-1</sup>、提取压力为-0.08MPa,在43℃下提取30min。经过酶诱导后,所得提取率为17.41mg·g<sup>-1</sup>,桦褐孔菌三萜化合物含量提高了28.13%。

微波提取法作为一种高效率提取技术,具有重现性好、污染小、设备简单的优点,也被广泛应用于三萜类化合物的提取。刘琳等<sup>[34]</sup>采用微波辅助乙醇-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>双水相提取法,K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和乙醇的质量分数

分别为25%和24%、固液比为1:50、微波功率为540W、微波120s,所得桦褐孔菌三萜化合物的提取率为 $(99.22 \pm 0.68)\%$ ,多糖的提取率为 $(98.34 \pm 0.83)\%$ 。

超临界CO<sub>2</sub>(SFE-CO<sub>2</sub>)萃取技术能避免细胞内的有效物质因受热而被破坏,很大程度上保存了物质的活性,是一种安全、无毒,流程简单,耗时短、效率高的生物活性物质提取技术。并且此法只对溶质起作用,经此方法提取后的残渣还可二次利用,具有节约且环保、耗时少、提取率高等特点,以后可以尝试用于桦褐孔菌三萜类化合物的提取。

## 2.2 三萜化合物的分析

目前三萜类化合物尚未被完全开发,三萜类化合物大多为天然产物且很少可以人工合成,因此分析三萜类化合物必要且具有重要意义。在热酸性条件下,三萜类化合物可以与香草醛和高氯酸发生反应并生成有色物质,其含量可用紫外分光光度法根据成分的吸收度来计算。此法虽受到干扰物质较大的影响,但方便、相对准确,且成本低。张昕<sup>[35]</sup>采用冰醋酸-香草醛法测定桦褐孔菌菌丝体胞内总三萜含量,在摇瓶中培养至第9天时总三萜质量分数达峰值,为64.93mg·g<sup>-1</sup>。

HPLC法因其效能高效、准确的优点在桦褐孔菌三萜类化合物的分析中被广泛应用<sup>[36]</sup>。由于较多三萜化合物检测波长设置在200~210nm,且仅限于此区间的末端吸收,限制了溶剂和梯度的选择,所以多选择水和乙腈组成流动相。GC法具有灵敏度高、重现性好、仪器普及广泛等特点,但是需要被检测物质有一定的挥发性,所以在检测前需要对三萜类物质进行衍生化处理。薄层色谱法(TLC)属于吸附色谱法,其兼备了柱色谱和纸色谱的优点,具有速度快、操作方便、灵敏度高、成本低等特点<sup>[36]</sup>。刘晓庆等<sup>[37]</sup>、李广林李<sup>[38]</sup>采用薄层色谱法对从桦褐孔菌中分离出的2个三萜类单体化合物进行纯度测定。液质联用色谱法可以克服三萜类化合物吸收性强,成分复杂等困难,具有特异性强、低耗样量、时间短、低流速、分析范围广等优点,张勇<sup>[39]</sup>建议可以用于桦褐孔菌三萜类化合物的分析。

## 3 木质素

木质素是3种单木素香豆醇、松柏醇、芥子醇脱氢聚合而成的主要细胞壁组成成分<sup>[40]</sup>,是由许多碳-碳和醚键组成的网状聚合物<sup>[41]</sup>。一些多糖可与木质素形成木质素-碳水化合物复合物(lccs)。这些复合物具有优异的抗艾滋病毒、抗病毒和促炎或抗炎

活性<sup>[42]</sup>。

### 3.1 木质素的提取

Niu等<sup>[43]</sup>将桦褐孔菌研磨成粉,采用热水浸提法提取木质素,溶剂为蒸馏水,提取温度60℃、提取4h、提取3次,过滤,干燥残渣,再用0.5 mol·mL<sup>-1</sup> NaOH在4℃下溶解12h,过滤后用3倍体积95%乙醇在4℃下静置12h,收集沉淀物,用无水丙酮洗涤,风干,得到桦褐孔菌木质素。

### 3.2 木质素的分析

将木质素放入碱液中,碳水化合物与其之间的醚键断裂,使木质素小分子化,在碱液中的溶解形态为酚盐,此法为碱法测定木质素。利用浓硫酸水解纤维素和半纤维素,经过滤后获得的固体物质为木质素,也称酸不溶木质素。以上两种方法为称质量法。色谱法是比较传统的分析方法,利用木质素在酸性和碱性的条件中容易降解的特性。可在降解后使用GC、GC-MS、HPLC等进行分析。HPLC-MC技术可以进行木质素和其分解产物的大量分析,在此领域,此法具有极高的发展前景。在不改变木质素的结构及形态的条件下,可以使用光谱法对桦褐孔菌木质素进行分析,核磁共振光谱(nuclear magnetic resonance, NMR)在对其进行分析时多选用HNMR<sup>[44]</sup>和CNMR,计算各质子的相对含量可通过图谱中氢或碳的峰面积与氢的数目之比来获得,具有分析时间短、所需检测物质量小等优点。红外光谱法是表征化合物结构的一种有效手段。此外,通过测定乙酰化木质素溶液在特定波长处的最大紫外吸光值可判断木质素的含量,此法较为传统,但简单、易操作。相对而言,NMR设备昂贵,且操作较复杂。

## 4 黑色素

黑色素是由形状和大小各异的聚集体而成的纳米粒子,具有高抗氧化活性。桦褐孔菌黑色素有抗氧化、基因保护和膜稳定特性,可以开发有相关功效的治疗药物。

### 4.1 黑色素的提取

Wold等<sup>[28]</sup>用蒸馏水在100℃下,提取桦褐孔菌2h,共提取3次,经酶处理去除蛋白质,加乙醇沉淀和透析,加入稀HCl使黑色素沉淀,再加入NaOH调节pH=7,得到其黑色素提取物。Parfenov等<sup>[45]</sup>采用微波辅助提取法以HCl为溶剂提取桦褐孔菌黑色素。也可以采用微波-加热混合提取法,在很大程度上能缩短提取时间<sup>[46]</sup>。Lee等<sup>[47]</sup>将桦褐孔菌和蒸馏水混合静置过夜滤液经旋转蒸发后于达尔伯克改

良伊格尔(DEME)培养基中保存。Olennikov等<sup>[48]</sup>用95%和50%的乙醇、水和KOH(5%、10%、15%)进行萃取,得到桦褐孔菌黑色素。

### 4.2 黑色素的分析

在水、有机溶剂和酸溶液中,黑色素大多不溶或少量溶解,当黑色素与脂类、蛋白质等结合,或形成黑色素盐时,可溶于水。紫外-分光光度法<sup>[49]</sup>经常用于黑色素的分析,黑色素常在波长200~600 nm段进行紫外-可见光谱扫描。与合成黑色素相比,提取的黑色素可能会因为氧化产生的基团光吸收导致出现不同的峰。使用溴化钾压片法采用傅里叶红外光谱扫描技术对黑色素进行分析,此法操作简单、且仪器普及率高,为常用的分析方法。FT-IR色谱法<sup>[50]</sup>分析黑色素的报道近年来在逐渐增加,用于广泛研究来源不同的黑色素的化学键或官能团,发展前景较好,但此法在分析桦褐孔菌中的黑色素,目前尚无文献报道。

黑色素属高分子化合物,为非均质的类多酚聚合体,可以通过显微镜观察黑色素的结构表征。Burmsova等<sup>[51]</sup>采用顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)对桦褐孔菌中的黑色素进行分析,微波功率为20、5、0.02 mW,频率为9.5 GHz。

## 5 结语

桦褐孔菌作为俄罗斯民间预防、治疗疾病的药用真菌已经有很长的应用历史,21世纪还被开发为保健功能食品。大量临床试验证明桦褐孔菌对人体没有不良反应。目前已知桦褐孔菌有效成分对糖尿病、肾炎、肝炎、癌症等有明显的治疗作用。除了多糖、三萜类、木质素和黑色素,还从桦褐孔菌中提取到酚酸类成分。

笔者对桦褐孔菌中的多糖、三萜类化合物、木质素和黑色素的提取方法和分析方法进行了综述。目前桦褐孔菌中的多糖和三萜类化合物大多仍以热水浸提法为主要提取方法,两者都可使用高压脉冲电场法、且提取率较高,但耗能较大、且对仪器要求较高未能普及,利用酶处理法后两种物质的提取率比较理想、耗费时间少,并且对温度和环境等因素要求较小,值得推广。木质素和黑色素的主要提取法也是热水浸提法,目前对这两种物质的研究较少,还望今后对这两类成分进行深入研究。

桦褐孔菌中的多糖分析主要为结构分析,经过化学法处理后经仪器分析多糖的官能团或结构对多糖进行判断。桦褐孔菌中的三萜类化合物的分析方法因紫外分光光度法便捷简单等特点而被广

泛使用。虽然桦褐孔菌中的多糖和三萜类化合物越来越引人注目,但都缺少对人体的作用研究和动物实验,各种成分的药理作用机制以及功能活性与物质之间的关系尚不明确,还需将生物活性与结构特征结合起来进行深入研究,探明各种成分是否对人体有不良反应。桦褐孔菌的食品安全性评价及评价标准等相关法规目前还处于空白,将影响桦褐孔菌的食用、药用开发,期望通过以后的研究制定评价体系及有关标准,推动桦褐孔菌药物制剂的研究与开发。

人类对 HIV 病毒感染所致艾滋病的治疗手段相对较少,即使市面上存在抑制 HIV 进一步恶化的药物,但是仍未能从根源上解决问题,并且患者需要长期服药,而桦褐孔菌中的木质素类及多糖的组合物具有抗 HIV 的活性,随着人工种植和发酵技术的不断进步,桦褐孔菌及其提取物将更容易获得,期望今后在治疗 HIV 方面进行深入研究。

桦褐孔菌提取物已经出现在化妆品、饮品和食品中,随着科技的不断进步,仪器精密度不断提升,对桦褐孔菌中有效成分的提取和鉴定方法也会不断更新。桦褐孔菌及其有效成分产品将会更广泛地出现在日常生活中,为人类健康服务。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 杜文婧,王琦.桦褐孔菌资源分布及药理活性研究进展[J].菌物研究,2013,11(1):49-56.  
Du W J, Wang Q. A review of the distribution and pharmacological activity of *Inonotus obliquus* [J]. J Fung Res, 2013, 11(1): 49-56.
- [2] 药用桦褐孔菌人工栽培推广及功能食品开发[R]. Harbin: 黑龙江省科学院微生物研究所,2013.  
Artificial cultivation of medicinal *Inonotus obliquus* and development of functional food [R]. Harbin: Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, 2013.
- [3] Géry A, Dubreule C, André V, et al. Chaga (*Inonotus obliquus*), a future potential medicinal fungus in oncology? A chemical study and a comparison of the cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cells (A549) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) [J]. Integrative Cancer Ther, 2018,17 (3):832-843.
- [4] 刘迎秋,包海鹰.桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 化学成分及药理作用[J].中国食用菌,2008,27(4):34-39.  
Liu Y Q, Bao H Y. Chemical components and pharmacological actions of *Inonotus obliquus* [J]. Edible Fung China, 2008, 27(4): 34-39.
- [5] 齐亭娟,周玉柏,曾毅.桦褐孔菌活性成分及药理作用的研究进展[J].智慧健康,2018,4(24):50-53.  
Qi T J, Zhou Y B, Zeng Y. Research progress on active constituents and pharmacological action of betula brown-hole bacteria [J]. Smart Healthcare, 2018, 4(24): 50-53.
- [6] 黄纪国,吕静,余雄涛,等.桦褐孔菌抗病毒活性成分的分离及结构鉴定[J].现代食品科技,2015,31(4):175-180.  
Huang J G, Lü J, Yu X T, et al. Isolation and Identification of the antiviral active ingredients of *Inonotus obliquus* [J]. Mod Food Sci Technol, 2015, 31 (4): 175-180.
- [7] 郭婷婷,齐亭娟,岳成,等.桦褐孔菌水提物体外抗 HIV-1 研究[J].生物技术通讯,2019,30(5):630-635.  
Guo T T, Qi T J, Yue C, et al. Study on anti-HIV-1 activity of aqueous extract of *Inonotus obliquus* [J]. Lett Biotechnol, 2019, 30(5): 630-635.
- [8] 刘启尊.桦褐孔菌胞外多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究[D].长春:吉林农业大学,2014.  
Liu Q Z. Research on Anti-tumor and immunity function of extracellular polysaccharides from *Inonotus obliquus* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [9] 王飞雪,陈正爱.发酵桦褐孔菌的制备方法及药理作用研究进展[J].延边大学医学学报,2017,40(1):74-76.  
Wang F X, Chen Z A. Research progress on preparation and pharmacological action of fermented *Inonotus obliquus* [J]. J Med Sci Yanbian Univ, 2017, 40(1): 74-76.
- [10] Babitskaia V G, Shcherba V V, Ikonnikova N V. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus* [J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2000, 36(4): 439-44.
- [11] 傅俊生,戚梦,李佳欢,等.一种通过发酵制备桦褐孔菌黑色素的方法:中国, CN107058395A [P]. 2017-08-18.  
Fu J S, Qi M, Li J H, et al. A method for preparing *Inonotus obliquus* melanin by fermentation: China, CN107058395A [P]. 2017-08-18.
- [12] Burmasova M A, Utebaeva A A, Sysoeva EV, et al. Melanins of *Inonotus obliquus*: bifidogenic and antioxidant properties [J]. Biomolecules, 2019, 9(6): 248.
- [13] Sakagami H, Kushida T, Oizumi T, et al. Distribution of lignin - carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine [J]. Pharmacol Therap, 2010,128: 91-105.
- [14] 朱建华,杨晓泉.真菌多糖研究进展——结构、特性及制备方法[J].中国食品添加剂,2005(6):75-80.  
Zhu J H, Yang X Q. Recent advances in fungus polysaccharomyces-survey on bioactive structure, functional properties and prepared methods [J]. China Food Add, 2005(6): 75-80.

- [15] 杜秀菊, 徐伟, 穆红梅, 等. 桦褐孔菌多糖的药理活性与化学结构研究进展 [J]. 食用菌学报, 2012, 19(1): 100-104.  
Du X J, Xu W, Mu H M, et al. Advances in research on the structure and bioactivity of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. Acta Edulis Fungi, 2012, 19(1): 100-104.
- [16] 玄光善, 李青, 王艳波. 桦褐孔菌多糖脱色方法及其成分分析 [J]. 食品科学, 2014, 3 (10): 207-211.  
Xuan G S, Li Q, Wang Y B. Decolorization and monosaccharide composition analysis of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. Food Sci, 2014, 3 (10): 207-211.
- [17] 朱晓丽. 桦褐孔菌多糖的分离纯化及抗氧化活性研究 [D]. 聊城: 聊城大学, 2015.  
Zhu X L. Separation & Purification and Antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide [D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2015.
- [18] 张丽霞, 李凌智. 超声波辅助提取桦褐孔菌多糖的工艺研究 [J]. 大庆师范学院学报, 2012(3): 122-125.  
Zhang L X, Li L Z. Study on ultrasonic assisted extraction of *Inonotus obliquus* polysaccharide [J]. J Daqing Normal Univ, 2012(3): 122-125.
- [19] 徐慧婷, 王宏伟, 王颖, 等. 发酵液多糖提取方法的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 351-356.  
Xu H T, Wang H W, Wang Y, et al. Research progress in extraction methods of polysaccharides from fermentation broth [J]. Sci Technol Food Indus, 2019, 40(1): 351-356.
- [20] 胡涛, 解洛香, 徐乐, 等. 超声波辅助提取桦褐孔菌子实体中多糖和三萜 [J]. 食品科技, 2012(2): 224-228.  
Hu T, Xie L X, Xu L, et al. Extraction the polysaccharides and triterpenes from *Inonotus obliquus* by ultrasonic wave [J]. Food Sci Technol, 2012(2): 224-228.
- [21] Chen Y, Gu X, Huang S Q, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(4): 429-435.
- [22] 王艳波. 桦褐孔菌多糖的提取, 纯化及降血糖作用研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2014.  
Wang Y B. Extraction, purification and hypoglycemic effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2014.
- [23] 殷涌光, 崔彦如, 王婷. 高压脉冲电场提取桦褐孔菌多糖的试验 [J]. 农业机械学报, 2008, 39(2): 89-92.  
Yin Y G, Cui Y R, Wang T. Study on extraction of polysaccharide from *Inonotus obliquus* by high intensity pulsed electric fields [J]. Transact Chin Soc Agric Mach, 2008, 39(2): 89-92.
- [24] 李娟. 桦褐孔菌子实体和发酵多糖的促生细胞因子作用及化学结构研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2013.  
Li J. Chemical structure and effect on cytokine secretion of polysaccharides from *Inonotus obliquus* fruiting body and submerged culture [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2013.
- [25] 许泓瑜, 孙军恩, 陆震鸣. 桦褐孔菌菌粉多糖提取工艺的优化 [J]. 食品与发酵工业, 2008(11): 175-179.  
Xu H Y, Sun J E, Lu Z M. Optimization of extraction technique of polysaccharides from fermentation powder of *Inonotus obliquus* [J]. Food Ferment Indus, 2008(11): 175-179.
- [26] 朱春玉, 郑方亮, 邵丽杰, 等. 桦褐孔菌子实体与菌丝体三萜化合物提取及活性比较研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(15): 161-165.  
Zhu C Y, Zheng F L, Shao L J, et al. Extraction and bioactivity of triterpenoids from fruit bodies and mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Food Sci, 2012, 33(15): 161-165.
- [27] 潘春丽, 查勇, 张鑫, 等. 桦褐孔菌三萜化合物提取工艺的优选 [J]. 生物加工过程, 2008(4): 36-39.  
Pan C L, Zha Y, Zhang X, et al. Extraction process of triterpenoids from *Inonotus obliquus* [J]. Chin J Bioproc Engin, 2008(4): 36-39.
- [28] Wold C W, Gerwick W H, Wangenstein H, et al. Bioactive triterpenoids and water-soluble melanin from *Inonotus obliquus* (Chaga) with immunomodulatory activity [J]. J Funct Food, 2020, 71: 104025.
- [29] 檀琪. 桦褐孔菌三萜类化合物的提取纯化及抗氧化活性研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2020.  
Tan Q. Extraction, purification and antioxidant activity of triterpenoids from *Inonotus obliquus* [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2020.
- [30] 田明月, 俞力超, 徐秀泉. 正交设计法优化桦褐孔菌总三萜超声提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 41-43.  
Tian M Y, Yu L C, Xu X Q. Optimization of ultrasound extraction of total triterpenoids from *Inonotus obliquus* by orthogonal test [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2011, 17(12): 41-43.
- [31] 殷涌光, 崔彦如, 丁宏伟. 超声波辅助提取桦褐孔菌中白桦脂醇的研究 [J]. 农业机械学报, 2008, 39(4): 204-206.  
Yin Y G, Cui Y R, Ding H W. Study on ultrasonic assisted extraction of betulin from *Inonotus obliquus* [J]. Transact Chin Soc Agric Mach, 2008, 39(4): 204-206.
- [32] 王婷. 高压脉冲电场提取桦褐孔菌三萜类化合物的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.  
Wang T. Extracting triterpenoids from *Inonotus obliquus* by high intensity pulsed electric fields [D]. Changchun: Jilin University, 2007.
- [33] 王隋鑫. 桦褐孔菌中主要三萜类成分的高效提取分离新工艺 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.  
Wang S X. High-efficiency extraction and separation

- process of main triterpenoids from *Inonotus obliquus* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.
- [34] 刘琳, 宋丽敏. 桦褐孔菌发酵液中三萜化合物和多糖的微波辅助双水相萃取 [J]. 食品与发酵工业, 2016(5): 246-252.
- Liu L, Song L M. Microwave-assisted aqueous two-phase system extraction of triterpenoids and polysaccharides in *Inonotus obliquus* fermentation broth [J]. Food Ferment Indus, 2016(5): 246-252.
- [35] 张昕. 液体深层发酵桦褐孔菌三萜类化合物的鉴定和生物合成的促进 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2016.
- Zhang X. The identification and biosynthesis of triterpenoids by *Inonotus obliquus* under submerged culture [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2016.
- [36] 陈程, 徐向群. 桦褐孔菌子实体三萜单体的分离及鉴定 [J]. 浙江理工大学学报, 2015, 33(2): 264-268.
- Chen C, Xu X Q. Isolation and identification of triterpenoids in *Inonotus obliquus* [J]. J Zhejiang Sci-Tech Univ, 2015, 33(2): 264-268.
- [37] 刘晓庆, 李广林, 瞿亮, 等. AB-8型大孔树脂纯化桦褐孔菌三萜的工艺研究 [J]. 食药用菌, 2017(1): 40-45.
- Liu X Q, Li G L, Qu L, et al. Study on the purification of triterpenes with AB-8 macroporous resin from the fruiting body of *Inonotus obliquus* [J]. Edib Med Mushrooms, 2017(1): 40-45.
- [38] 李广林. 桦褐孔菌三萜提取分离、结构鉴定及生物活性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014.
- Li G L. study on the isolation, separation, identification and biological activity of triterpenoids from *Inonotus obliquus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2014.
- [39] 张勇. 药用真菌桑黄和桦褐孔菌中有效成分提取分离及抗痛风活性研究 [D]. 长春: 长春师范大学, 2020.
- Zhang Y. Extraction and separation of active components from medicinal fungi *Phellinus igniarius* and *Inonotus obliquus* and its anti-gout activity [D]. Changchun: Changchun Normal University, 2020.
- [40] 岳凤霞. 木质素新型模型物的合成及其在木质素结构研究中的应用 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- Yue F X. Syntheses of new lignin-related model compounds and their uses for structural characterization of lignin [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [41] Slater S, Keegstra K, Donohue T J. The US Department of Energy Great Lakes Bioenergy Research Center: Midwestern biomass as a resource for renewable fuels [J]. Bioenergy Res, 2010, 3(1): 3-5.
- [42] Sakagami H, Kushida T, Oizumi T, et al. Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine [J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(1): 91-105.
- [43] Niu H, Song D, Mu H, et al. Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus* [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 86: 587-593.
- [44] Niu H, Song D, Mu H, Zhang W, Sun F, Duan J. Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus* [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 86: 587-93.
- [45] Parfenov A, Vyshtakalyuk A, Sysoeva M, et al. Hepatoprotective effect of inonotus obliquus melanins: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Bio Nano Sci, 2019, 9(2): 528-538.
- [46] Sysoeva M, Yumaeva L, Gamayurova V, et al. Comparison of the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts from chaga (*Inonotus obliquus*) [J]. Russian J Bioorg Chem, 2010, 36(7): 947-950.
- [47] Lee J H, Hyun C K. Insulin-sensitizing and beneficial lipid-metabolic effects of the water-soluble melanin complex extracted from *Inonotus obliquus* [J]. Phytother Res, 2014, 28(9): 1320-1328.
- [48] Olennikov D N, Tankhaeva L M, Rokhin A V, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of melanin fractions from *Inonotus obliquus* sclerotia [J]. Chem Nat Comp, 2012, 48(3): 396-403.
- [49] Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, et al. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromyces macrocarpa*) [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(10): 2125-2131.
- [50] 舒文, 毛华明. 黑色素的研究进展 [J]. 国外畜牧学: 猪与禽, 2003(2): 31-34.
- Shu W, Mao H M. Research progress of melanin [J]. Animal Sci Abroad (Pigs and Poultry), 2003(2): 31-34.
- [51] Burmasova M A, Utebaeva A A, Sysoeva E V, et al. Melanins of *Inonotus obliquus*: Bifidogenic and antioxidant properties [J]. Biomolecules, 2019, 9(6): 248.
- [52] Zhao Y X, Liu Y B, Liu F, et al. Aqueous two-phase systems with ultrasonic extraction used for extracting phenolic compounds from *Inonotus obliquus* [J]. Chin Herb, 2013, 5(1): 67-72.

[责任编辑 李红珠]