

野生桑树桑黄和杨树桑黄化学成分及抗氧化活性比较

吕国英 宋婷婷 蔡为明 张作法[✉]

浙江省农业科学院园艺研究所 浙江 杭州 310021

摘要: 比较了野生桑树桑黄和杨树桑黄子实体乙醇提取物抗氧化活性和化学成分的差异, 探讨其高抗氧化能力的来源。以二苯基三硝基苯肼自由基 (DPPH) 清除率、超氧阴离子清除率和 β -胡萝卜素漂白实验作为抗氧化的指标比较其抗氧化活性差异。结果表明, 桑树桑黄和杨树桑黄均具有很强的抗氧化活性, 杨树桑黄的抗氧化活性显著强于桑树桑黄; 杨树桑黄醇提物的总黄酮和总多酚含量均高于桑树桑黄醇提物。通过超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法 (UPLC-Triple-TOF-MS) 比较了桑树桑黄和杨树桑黄乙醇提取物成分差异, 桑树桑黄中共鉴定出 19 种多酚类物质, 杨树桑黄中除了与桑树桑黄中相同的 19 种物质, 还另外分析出 3 种多酚类物质。

关键词: 桑黄, 抗氧化, 化学成分, 超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法

[引用本文] 吕国英, 宋婷婷, 蔡为明, 张作法, 2021. 野生桑树桑黄和杨树桑黄化学成分及抗氧化活性比较. 菌物学报, 40(7): 1833-1843

Lv GY, Song TT, Cai WM, Zhang ZF, 2021. Comparative study of chemical components and antioxidant activities of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *Sanghuangporus vaninii*. Mycosystema, 40(7): 1833-1843

Comparative study of chemical components and antioxidant activities of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *Sanghuangporus vaninii*

LV Guo-Ying SONG Ting-Ting CAI Wei-Ming ZHANG Zuo-Fa[✉]

Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China

Abstract: Antioxidant activities and chemical components of ethanol extracts of fruit bodies of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii* were compared. DPPH scavenging activity, superoxide anion scavenging activity and β -carotene bleaching assay were used to compare the antioxidant activity. The results showed that both *S. sanghuang* and *S. vaninii* had strong

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQY20C150001); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02057-8)

Supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LQY20C150001), and the Special Foundation of the Breeding of New Agricultural Varieties in Zhejiang Province (2016C02057-8).

✉ Corresponding author. E-mail: zzf2050@163.com

Received: 2020-12-15, accepted: 2021-01-07

antioxidant activity, and the antioxidant activity of *S. vaninii* was significantly stronger than that of *S. sanghuang*. The content of total flavonoid and total polyphenol in the ethanol extract of *S. vaninii* were higher than that of *S. sanghuang*. Ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF-MS) was used to compare the differences of chemical components in the ethanol extracts. Nineteen phenolic compounds were common to *S. sanghuang* and *S. vaninii*, and additional three phenolic compounds were identified from *S. vaninii*.

Key words: *Sanghuangporus*, antioxidant, chemical components, ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry

机体受到应激入侵或在特殊生理情况下,产生大量过剩的活性氧自由基,造成机体组织细胞中生物大分子发生变形、交联、断裂等现象,从而造成氧化损伤,引起各种疾病(Durazzo *et al.* 2019)。为了预防和缓解各类疾病,生物体需要补充一些有效的抗氧化剂,使机体的抗氧化水平达到平衡。人工合成的许多抗氧化剂副作用明显,所以开发天然的植物源抗氧化剂意义深远(Hu *et al.* 2009)。

桑黄是一类桑黄孔菌属大型珍稀药用木腐真菌的总称。桑黄在我国已有 2 000 年的应用历史,最早以“桑耳”之名出现在《神农本草经》上。桑黄这一名称最早出现在唐初的《药性论》,在明代的《本草纲目》及其他医书也有记载,并一直沿用至今。除中国古籍记载外,朝鲜医书《乡药集成方》和《东医宝鉴》皆称桑黄如灵丹妙药。多处古籍记载说明了桑黄作用之大,被世人所认可。

桑黄名称及其药用在中国流传千年以上,在日、韩使用也达数百年,但真正的桑黄种类及学名长久以来并没有定论(吴声华等 2016)。有鉴于前期真正的桑黄种类未理清,不同桑黄之间的比较研究更没法开展。直到 2012 年吴声华博士等通过研究发现真正的桑黄是未曾发表过的新种,分布于中国

大陆、日本、韩国以及台湾地区,野外仅生长在桑属植物树干(Wu *et al.* 2012)。Zhou *et al.* (2016)通过序列分析及形态特征将桑黄类群重新进行归类,建立桑黄孔菌新属,并命名为 *Sanghuangporus* Sheng H. Wu W. Zhou & Y.C. Dai。目前,桑黄类群包括了 13 个种,我国发现 8 个种,广泛分布于寒温带至热带地区,部分种类仅分布于特定区域,具有明显的地域特色,部分种仅寄生在特定宿主植物上(朱琳和崔宝凯 2016)。吴长生(2011)对天然野生桑黄和人工培养桑黄 95%乙醇提取物进行了化学成分研究,共分离得到 57 个化合物,包括 4 个新苄基二氢黄酮。张俊峰等(2020)比较了桑黄菌丝体和子实体 4 个萃取相在抗氧化、抗肿瘤与化学成分上存在的差异,提出发酵菌丝体在抗氧化活性方面具有替代子实体的可行性。

桑树桑黄 *Sanghuangporus sanghuang* 和杨树桑黄 *S. vaninii* 是目前研究和开发最好的两种桑黄。然而外观似桑黄的种类很多,真正的野生桑树桑黄的数量很少,如外观类似的杨树桑黄,在野外的数量约为桑树桑黄的百倍(吴声华等 2016),且市场价格比桑树桑黄低很多。但是到目前为止,野生桑树桑黄和杨树桑黄在抗氧化活性及活性成分的差异方面鲜有系统的研究。本研究对野生桑树桑黄和杨树桑黄提取物抗氧化活性进行比

较, 并对其活性成分进行系统鉴定, 为其后续的开发和研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 桑黄子实体: 桑树桑黄和杨树桑黄子实体选用千岛湖野生桑树桑黄和杨树桑黄。并利用 ITS 序列信息对桑树桑黄和杨树桑黄进行过分子生物学鉴定。经 60℃ 干燥、粉碎后, 过 120 目备用。

1.1.2 主要试剂: 福林-酚试剂(Folin-Ciocalteu)、芦丁、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、丁基羟基茴香醚(BHA)、邻苯三酚、亚油酸、β-胡萝卜素购自 Sigma, 其余化学试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 提取物的制备

取粉碎好的桑树桑黄和杨树桑黄各 50g, 加入 1 500mL 70%乙醇, 超声提取 30min, 提取结束后, 过滤, 残渣再加入 1 500mL 70%乙醇超声提取一次, 合并滤液, 真空旋转蒸发浓缩, 进一步冷冻干燥, 得到提取物。

1.3 活性成分含量测定

1.3.1 多酚含量: 根据张梅梅等(2011)的 Folin-Ciocalteu 方法略加改动, 测定多酚含量。以没食子酸浓度为横坐标, 波长 750nm 下吸光值为纵坐标, 标准曲线的回归方程为: $y=7.7925x+0.0115$, 相关系数 $R^2=0.9982$ 。

1.3.2 总黄酮含量: 根据 Zhuang *et al.* (2018) 的方法测定黄酮含量。以芦丁浓度为横坐标, 波长 510nm 下吸光值为纵坐标, 标准曲线的回归方程为: $y=1.927x+0.117$, 相关系数 $R^2=0.9935$ 。

1.4 抗氧化活性分析

1.4.1 DPPH 自由基清除能力: 取 2mL (不同浓度) 样品液置于 10mL 离心管中, 加入 2mL 现配的 0.1mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液, 混合均匀后, 在室温下置于暗处静置 30min, 于

517nm 处测定吸光度 (Locatelli *et al.* 2009)。

1.4.2 超氧自由基清除能力: 取 4.5mL 的缓冲液于 10mL 具塞试管中, 20℃ 水浴中预热 20min 后, 分别加入不同浓度的提取液 1mL 和 25mmol/L 邻苯三酚溶液 0.4mL, 摇匀后用蒸馏水稀释至刻度。置于 25℃ 水浴中反应 5min, 取出后加入 8mol/L HCL 溶液 1mL, 终止反应。于 299nm 处测定吸光度 (Li 2012)。

1.4.3 β-胡萝卜素漂白实验: 向烧瓶中加入 20mg 亚油酸, 20mg 吐温-40, 然后加入 1mL β-胡萝卜素的氯仿溶液 (0.1mg/mL), 45℃ 下旋转真空蒸发器中蒸发掉氯仿液, 然后缓慢向半固残渣中加入 50mL 去离子水, 边加边剧烈振摇烧瓶, 形成乳浊液, 备用。试管中加入 0.2mL 样品溶液 (提取物, BHA), 加入 5mL 乳浊液, 摇匀后在 470nm 下测定吸光度, 以不含 β-胡萝卜素的乳浊液作为空白对照, 试管在 50℃ 水浴中放置, 吸光度每 15min 测定一次, 记录至 180min (Yuan *et al.* 2017)。

1.5 UPLC-Triple-TOF/MS 定性分析

1.5.1 测定液的制备: 桑树桑黄和杨树桑黄提取物各 1g 溶于 30mL 70%甲醇溶液, 旋转蒸发除去甲醇后, 用等量的乙酸乙酯进行萃取, 乙酸乙酯萃取液蒸干后, 加入 5mL 甲醇溶解, 进行 UPLC-Triple-TOF/MS 定性分析。

1.5.2 色谱条件: 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150mm×2.1mm i.d., 1.7μm); 流动相 A 为 0.1%甲酸溶液, 流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈, 线性梯度洗脱, 0min 10% B; 2min 20% B; 25min 35% B; 35min 95% B; 37min 95% B; 流速为 0.3mL/min; 进样量: 2μL。

1.5.3 质谱条件: UPLC-Triple-TOF 5600+ 飞行时间液质联用仪: 负离子扫描模式; 扫描范围: m/z 100–1 500; 雾化气 (GS1): 55psi; 雾化气 (GS2): 55psi; 气帘气 (CUR): 35 psi; 离子源温度 (TEM): 550V (负); 离子源电压 (IS): -4 500V (负); 一级扫描: 去簇电压 (DP):

100V; 聚焦电压 (CE): 10V; 二级扫描: 使用 TOF MS-Product Ion-IDA 模式采集质谱数据, CID 能量为-20、-40 和-60V。

1.6 统计方法

所有计量数据均表示为 $\bar{X} \pm SD$, 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析及 q 检验法进行检验, 以 $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果与分析

2.1 多酚与黄酮含量

多酚是一类芳香族衍生物的总称, 广泛存在于植物和真菌中。它是一种很好的电子供体, 通过与自由基或金属离子等发生反应, 可以阻断脂质的过氧化作用 (Martini *et al.* 2017)。黄酮作为稳定的自由基清除剂是在自然界中普遍存在的一类化合物 (Chen *et al.* 2016)。

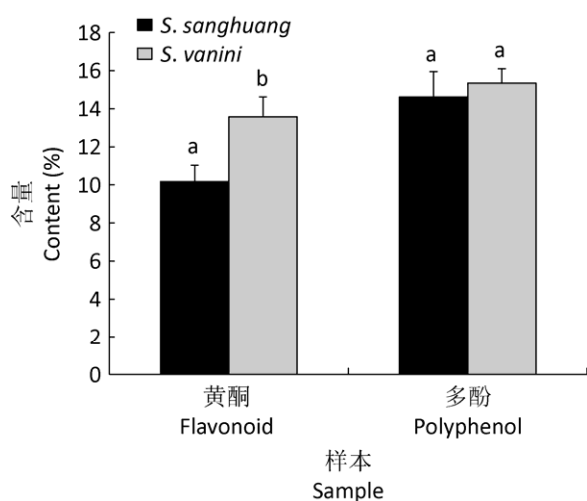


图 1 野生桑树桑黄和杨树桑黄提取物中黄酮和多酚的含量 数据均为测定 3 次的结果, 表示为“平均值±标准差”, 同一列不同字母代表数值间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Content of flavonoid and polyphenol in extracts of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii*. All the data were determined for three times. Means $\pm$ standard deviation ($n=2$) with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

野生桑树桑黄和杨树桑黄子实体经 70% 乙醇提取, 分析可知, 桑树桑黄和杨树桑黄提取物中黄酮类含量分别达到了 $(10.18 \pm 0.85)\%$ 和 $(13.58 \pm 1.33)\%$, 多酚含量分别达到了 $(14.62 \pm 1.05)\%$ 和 $(15.38 \pm 0.76)\%$ 。杨树桑黄中多酚含量略高于桑树桑黄, 黄酮含量显著高于桑树桑黄。

2.2 DPPH 自由基清除活性

桑树桑黄和杨树桑黄提取液的 DPPH 自由基清除活性见图 2。随着浓度的增加, 桑树桑黄和杨树桑黄提取物和抗氧化剂 BHA 的 DPPH 自由基清除率先不断增加再趋于平缓。其中杨树桑黄提取物对 DPPH 自由基的清除率要显著高于桑树桑黄提取物。在浓度达到 1.6mg/mL 时, 杨树桑黄提取物与 BHA 清除效果相当。抗氧化剂主要通过两种机制发挥作用: 作为氢原子供体和作为电子供体。已知酚类物质是优良的氢原子和电子供体, 并能

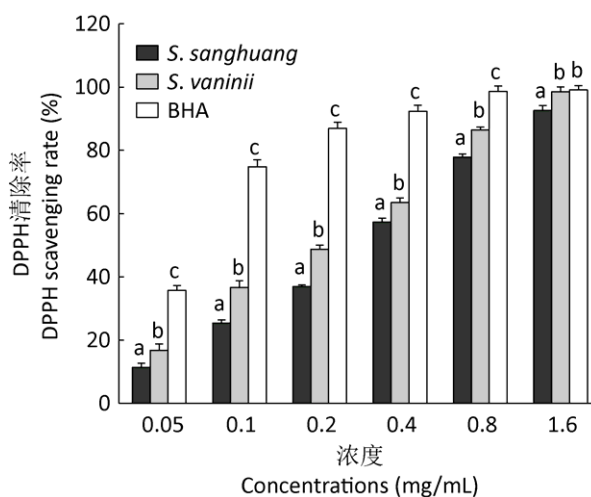


图 2 野生桑树桑黄和杨树桑黄提取物 DPPH 自由基清除活性比较 数据均为测定 3 次的结果, 表示为“平均值±标准差”, 同一列不同字母代表数值间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 DPPH scavenging activity of extracts of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii*. All the data were determined for three times. Means $\pm$ standard deviation ($n=2$) with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

形成稳定的自由基中间物，因此酚类物质在抗氧化活性中发挥重要作用。

2.3 超氧阴离子清除能力

不同浓度的桑树桑黄提取物、杨树桑黄提取物和 BHA 都具有一定的清除超氧阴离子的能力(图 3)。在浓度为 0.1 和 0.2mg/mL 时，杨树桑黄提取物与桑树桑黄提取物超氧自由基的清除能力不显著。当浓度达到 0.4mg/mL 时，桑树桑黄提取物、杨树桑黄提取物和 BHA 对超氧阴离子清除能力差别显著，分别为 78.4%、84.1%和 99.0%。

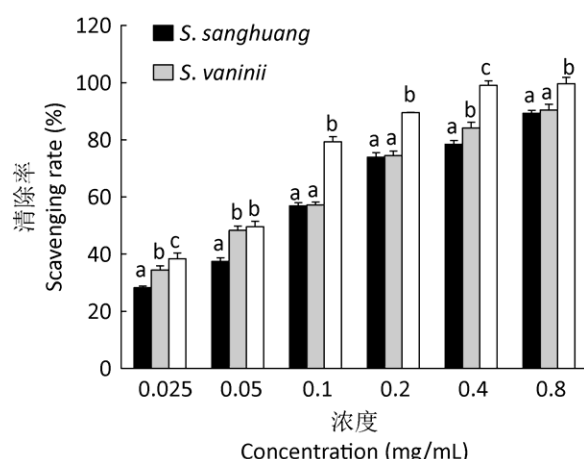


图 3 野生桑树桑黄和杨树桑黄提取物超氧阴离子自由基清除活性比较 数据均为测定 3 次的结果，表示为“平均值±标准差”，同一列不同字母代表数值间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Superoxide anion scavenging activity of extracts of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii*. All the data were determined for three times. Means $\pm$ standard deviation ($n=2$) with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

2.4 β -胡萝卜素漂白实验

β -胡萝卜素、亚油酸共氧化试验中各样品的抑制活性见图 4。各样品的吸光度显著下降并最后趋于平缓。在反应的 120min 内，桑树桑黄提取物、杨树桑黄提取物和 BHA 的吸光度分别从 0.36、0.37 和 0.39 下降到 0.15、

0.19 和 0.27。实验结果与其他抗氧化活性评价的结果相似，杨树桑黄提取物的抗氧化活性显著高于桑树桑黄提取物。

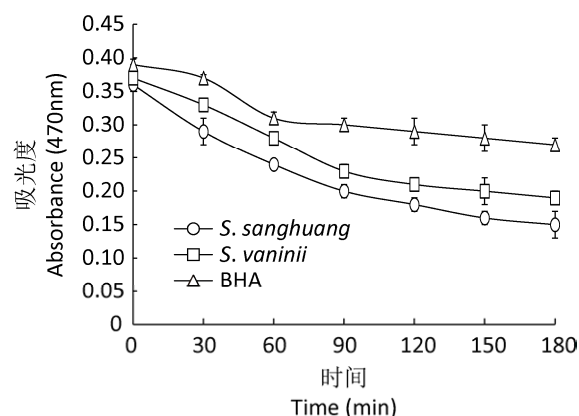


图 4 桑树桑黄和杨树桑黄提取物 β -胡萝卜素漂白活性比较

Fig. 4 β -carotene bleaching assay of extracts of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii*.

2.5 桑树桑黄和杨树桑黄醇提物的化学组成比较

主要依据质谱分子离子峰及离子碎片数据，并结合 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索和文献检索等信息，采用 UPLC-Triple-TOF/MS 对桑树桑黄和杨树桑黄乙醇提取物进行定性分析。桑树桑黄和杨树桑黄醇提物液相色谱图见图 5，主要化合物结构见图 6。

成分 1: 出峰时间为 2.51, $[M-H]$ 为 m/z 153.0215, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_7H_6O_4$, 根据二级质谱, 109 等碎片离子, 推测结构中存在羧基, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为原儿茶酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid)。

成分 2: 出峰时间为 3.24, $[M-H]$ 为 m/z 137.0265, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_7H_6O_3$, 根据二级质谱, 119、108 等碎片离子, 推测结构中存在羟基和醛基, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为原儿茶醛 (3,4-dihydroxybenzaldehyde)。

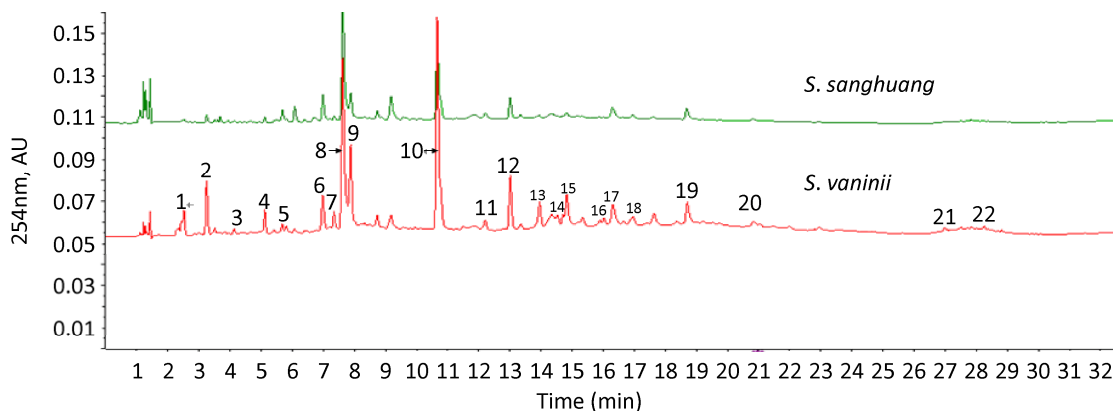


图5 桑树桑黄和杨树桑黄提取物的液相色谱图

Fig. 5 UPLC of extracts of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii*.

成分 3: 出峰时间为 4.13, $[M-H]^-$ 为 m/z 423.0704, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{22}H_{16}O_9$, 根据二级质谱, 379、335 等碎片离子, 推测结构中存在羧基, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 phellibaumin B。该化合物是从暴马丁桑黄中发现的由 hispidin 衍生的一种多酚类化合物。

成分 4: 出峰时间为 5.11, $[M-H]^-$ 为 m/z 177.0571, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$, 根据二级质谱, 159、135 等碎片离子, 推测结构中存在羰基和羟基, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为桑黄素 C (4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one)。该化合物同样拥有邻二酚的母核结构, 也具有很强的抗氧化活性。

成分 5: 出峰时间为 5.67, $[M-H]^-$ 为 m/z 245.0455, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{13}H_{10}O_5$, 根据二级质谱, 201、159 等碎片离子, 推测结构中存在羰基、羟基等结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 hispidin。

成分 6: 出峰时间为 6.98, $[M-H]^-$ 为 m/z 975.1397, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{52}H_{32}O_{20}$, 根据二级质谱, 931 等碎片

离子, 推测结构中存在羧基, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 phelligrider A 或其异构体。phelligrider A 是 hispidin 衍生物, 其有很强的抗氧化作用 (Wang *et al.* 2005)

成分 7: 出峰时间为 7.34, $[M-H]^-$ 为 m/z 463.1016, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{25}H_{20}O_9$, 根据二级质谱, 405、379、335、135 等碎片离子, 推测结构中存在苯并乙烯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为骨碎补内酯 (davallialactone)。此化合物也是也是 hispidin 衍生物, 其有很强的抗氧化作用 (Yang *et al.* 2013)。

成分 8: 出峰时间为 7.62, $[M-H]^-$ 为 m/z 975.1406, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{52}H_{32}O_{20}$, 根据二级质谱, 931 等碎片离子, 推测结构中存在羧基, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 相对含量判断, 推测该化合物为 phelligrider A。

成分 9: 出峰时间为 7.87, $[M-H]^-$ 为 m/z 463.1014, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{25}H_{20}O_9$, 根据二级质谱, 405、379、335、135 等碎片离子, 推测结构中存在苯并乙烯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 davallialactone 异构体。

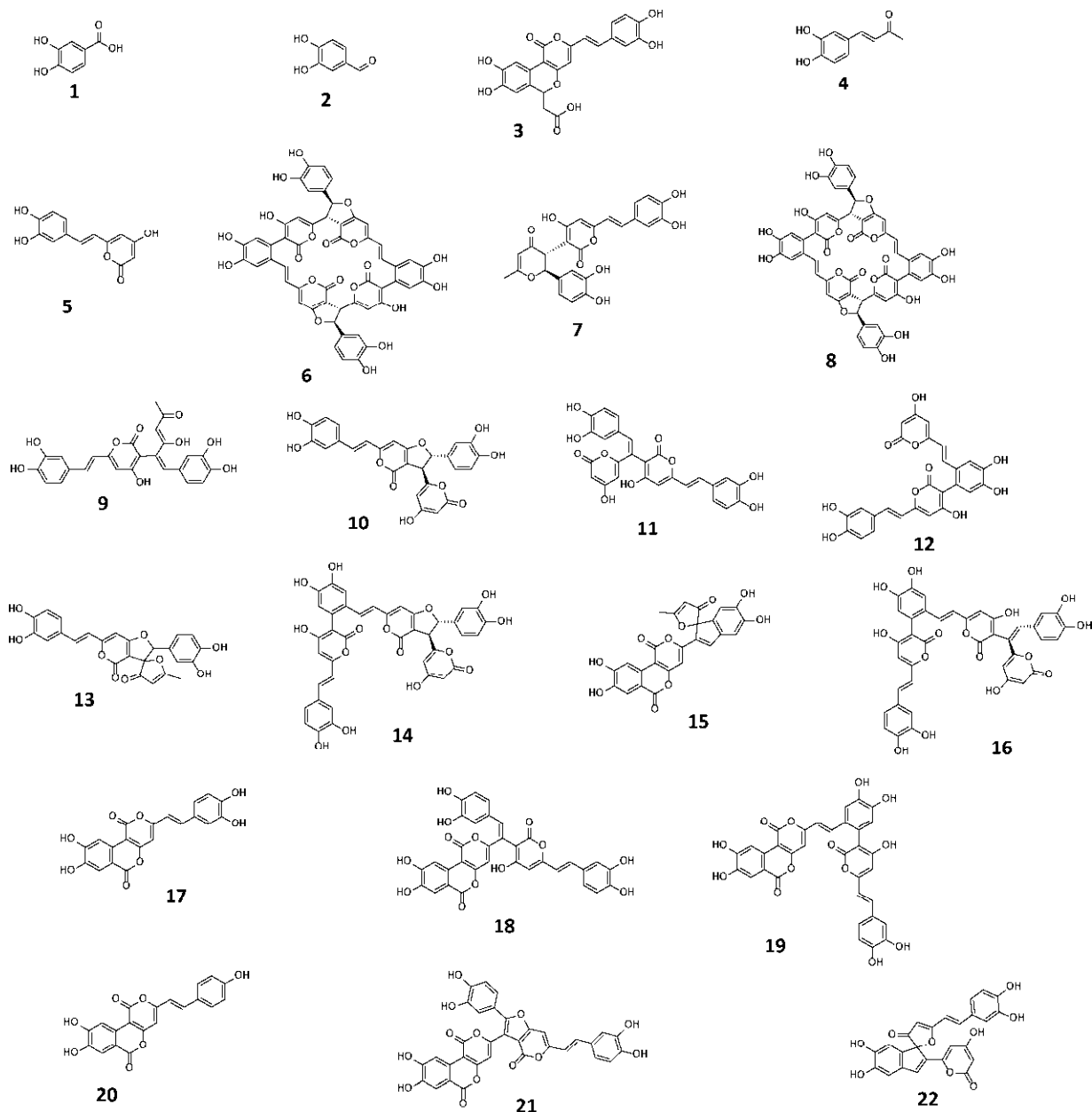


图 6 桑树桑黄和杨树桑黄化合物的化学结构 1: 原儿茶酸; 2: 原儿茶醛; 3: Phellbaumin B; 4: 桑黄素 C; 5: Hispidin; 6: Phelligridimer A isomer; 7: 骨碎补内酯; 8: Phelligrimer A; 9: Davallialactone isomer; 10: Hypholomine B; 11: Hypholomine bisomer; 12: 桑黄素 L; 13: 纤孔菌素 A; 14: Phellinstatin; 15: 桑黄素 E; 16: Phellinstatin isomer; 17: 桑黄素 D; 18: Phelligridin isomer; 19: Inonebulin A; 20: Meshimakobonl B; 21: 桑黄素 H; 22: 桑黄素 L

Fig. 6 Chemical structures of compounds in the extracts of wild *Sanghuangporus sanghuang* and *S. vaninii*. 1: 3,4-dihydroxybenzoic acid; 2: 3,4-dihydroxybenzaldehyde; 3: Phellbaumin B; 4: 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one; 5: Hispidin; 6: Phelligridimer A isomer; 7: Davallialactone; 8: Phelligrimer A; 9: Davallialactone isomer; 10: Hypholomine B; 11: Hypholomine bisomer; 12: 3,14'-bihispidinyl; 13: Inoscavin A; 14: Phellinstatin; 15: Phelligridin E; 16: Phellinstatin isomer; 17: Phelligridin D; 18: Phelligridin isomer; 19: Inonebulin A; 20: Meshimakobonl B; 21: Phelligridin H; 22: Phelligridin L.

成分 10: 出峰时间为 10.66, $[M-H]^-$ 为 m/z 489.0807, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{26}H_{18}O_{10}$, 根据二级质谱, 445、403、135 等碎片离子, 推测结构中存在苯并乙烯和羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 hypholomine B。hypholomine B 作为一种多酚类化合物, 具有很强的抗氧化活性 (Jun *et al.* 2008)。

成分 11: 出峰时间为 12.20, $[M-H]^-$ 为 m/z 489.0811, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{26}H_{18}O_{10}$, 根据二级质谱, 445、403、135 等碎片离子, 推测结构中存在苯并乙烯和羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 hypholomine B 异构体。

成分 12: 出峰时间为 13.01, $[M-H]^-$ 为 m/z 489.0808, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{26}H_{18}O_{10}$, 根据二级质谱, 445、403、135 等碎片离子, 推测结构中存在苯并乙烯和羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为桑黄素 L (3,14'-bihispidinyl)。3,14'-bihispidinyl 作为一种 hispid 的衍生物, 具有很强的抗氧化活性 (Jun *et al.* 2008)。

成分 13: 出峰时间为 13.95, $[M-H]^-$ 为 m/z 461.0866, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{25}H_{18}O_9$, 根据二级质谱, 417 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为纤孔菌素 A (inoscavin A)。

成分 14: 出峰时间为 14.83, $[M-H]^-$ 为 m/z 733.1187, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{39}H_{26}O_{15}$, 根据二级质谱, 689、645 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 phellinstatin。Phellinstatin

是拥有多个酚羟基的多酚化合物, 具有很强的抗氧化活性 (Jun *et al.* 2008)。

成分 15: 出峰时间为 14.9, $[M-H]^-$ 为 m/z 473.0502, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{25}H_{14}O_{10}$, 根据二级质谱, 458、445 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为桑黄素 E (phelligradin E)。

成分 16: 出峰时间为 16.02, $[M-H]^-$ 为 m/z 733.1187, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{39}H_{26}O_{15}$, 根据二级质谱, 689、645 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 phellinstatin 异构体。

成分 17: 出峰时间为 16.31, $[M-H]^-$ 为 m/z 379.0447, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{20}H_{12}O_8$, 根据二级质谱, 335、307 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为桑黄素 D (phelligradin D)。

成分 18: 出峰时间为 16.95, $[M-H]^-$ 为 m/z 379.0450, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{20}H_{12}O_8$, 根据二级质谱, 335、307 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测该化合物为 phelligradin D 的异构体。

成分 19: 出峰时间为 18.71, $[M-H]^-$ 为 m/z 623.0814, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{33}H_{20}O_{13}$, 根据二级质谱, 579 等碎片离子, 推测结构中存在羧基或者内酯结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 根据相对保留时间, 推测该化合物为 inonobulin A。Inonobulin A 是一种拥有多个酚羟基的多酚类化合物。

成分 20: 出峰时间为 20.83, $[M-H]^-$ 为 m/z 363.0502, 根据高分辨质谱结果拟合的分

子式为 $C_{20}H_{12}O_7$ ，根据二级质谱，335 等碎片离子，推测结构中存在羧基或者内酯结构，根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索，根据相对保留时间，推测该化合物为 meshimakobnol B (Nagatsu *et al.* 2004)。

成分 21: 出峰时间为 27.0, $[M-H]^-$ 为 m/z 621.0665, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{33}H_{18}O_{13}$ ，根据二级质谱，577 等碎片离子，推测结构中存在羧基或者内酯结构，根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索，根据相对保留时间，推测该化合物为桑黄素 H (phelligradin H) (Zheng *et al.* 2011)。

成分 22: 出峰时间为 28.28, $[M-H]^-$ 为 m/z 459.0711, 根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{25}H_{16}O_9$ ，根据二级质谱，415、373 等碎片离子，推测结构中存在羧基或者内酯结构，根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索，根据相对保留时间，推测该化合物为桑黄素 L (phelligradin L) (Zheng *et al.* 2011)。

3 讨论

桑树桑黄只生活在活体桑树上，目前还很难栽培，野生数量也很有限；杨树桑黄野生较多，人工栽培也已经比较成熟，市面上所谓的栽培桑黄子实体，大都是杨树桑黄(吴声华和戴玉成 2020)。

本研究中，桑树桑黄和杨树桑黄子实体选用千岛湖采集的野生桑树桑黄和杨树桑黄，并经过形态学和分子生物学确定。采用 DPPH 方法，超氧阴离子清除实验和 β -胡萝卜素漂白实验对桑树桑黄和杨树桑黄提取物的抗氧化活性进行研究，研究发现桑树桑黄和杨树桑黄均具有很强的抗氧化活性，杨树桑黄的抗氧化活性显著强于桑树桑黄。

桑树桑黄和杨树桑黄提取物的抗氧化活性与其活性成分是分不开的，本研究采用

UPLC-Triple-TOF/MS 对桑树桑黄和杨树桑黄提取物中的活性成分进行了定性分析。桑树桑黄中共鉴定出 19 种活性物质，大多数是 hispidin 的衍生物；而在杨树桑黄提取物中，除了发现的这 19 种活性物质外，还发现了 meshimakobnol B，桑黄素 H 和桑黄素 L。这些化合物均为多酚类物质，其中大部分活性物质的抗氧化活性都有报道(Kim *et al.* 1999; Ei-Sonbaty *et al.* 2019)。研究发现这些化合物中很多都含有邻苯二酚的母核结构，这些基团是其显著抗氧化活性的物质基础(Jeong *et al.* 2009)。Hispidin 是真菌中常见的具有抗氧化作用的多酚类化合物。以 hispidin 为关键前体物质合成的衍生物在大型药用真菌中普遍存在，大部分具有较强的抗氧化、抗炎以及抗肿瘤等活性(Park *et al.* 2004)。

在桑树桑黄和杨树桑黄提取物中鉴定的化合物有多个是 hispidin 及其衍生物。因此，这些物质在桑黄提取液的抗氧化活性中起到很重要的作用。黄酮是桑黄的标志性成分之一，已有报道桑黄中的黄酮类化合物有樱花亭、柚皮素、7-甲基圣草素、芫花素和甲基桑黄黄酮等(莫顺燕等 2003; 史帧婷和包海鹰 2016)，但在本研究中并没有鉴定出。陈万超等(2020)对近 5 年从桑黄类真菌中分离得到的多酚类化合物及其活性进行了综述，没有典型黄酮类物质被分离鉴定出来。造成这些差异的原因一方面可能在于以前桑黄菌属分类比较混乱，不同菌种次生代谢产物的合成基因簇不同，另一方面也可能是桑树桑黄和杨树桑黄自身生长状态和寄生树种存在差异。

[REFERENCES]

- Chen L, Teng H, Xie Z, Cao H, Cheaung WS, Skalicka-Woniak K, Georgiev MI, Xiao J, 2016.

- Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity; an update on structure-activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4): 513-527
- Chen WC, Yang Y, Zhang JS, Li ZP, Lu BK, Wang K, 2020. Recent advance in bioactive metabolites from “sanghuang” mushroom. *Acta Edulis Fungi*, 27(4): 188-201 (in Chinese)
- Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Santini A, 2019. Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9): 2221-2243
- Ei-Sonbaty YA, Suddek GM, Megahed N, Gameil NM, 2019. Protocatechuic acid exhibits hepatoprotective, vasculoprotective, antioxidant and insulin-like effects in dexamethasone-induced insulin-resistant rats. *Biochimie*, 167: 119-134
- Hu W, Shen W, Wang MH, 2009. Free radical scavenging activity and protective ability of methanolic extract from *Duchenea indica* against protein oxidation and DNA damage. *Journal of Food Science and Nutrition*, 14: 227-282
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, 2009. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (*Hordeum vulgare*) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *Phytomedicine*, 16: 85-94
- Jun JY, Lee IK, Seok SJ, Lee HJ, Kim YH, Yun BS, 2008. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6): 1824-1832
- Kim JP, Yun BS, Shim Y, Yoo ID, 1999. Cheminform abstract: inoscavin A, a new free radical scavenger from the mushroom *Inonotus xeranticus*. *Tetrahedron Letters*, 40(36): 6643-6644
- Li XC, 2012. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25): 6418-6424
- Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coiesson JD, Rinaldi M, Arlorio M, 2009. Study of the DPPH scavenging activity: development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 114(3): 889-897
- Martini D, Bo DC, Porrini M, Ciappellano S, Riso P, 2017. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 48: 1-8
- Mo SY, Yang YC, Shi JG, 2003. Isolation and synthesis of phelligrins A and B. *Acta Chimica Sinica*, 61(7): 1161-1163 (in Chinese)
- Nagatsu A, Itoh S, Tanaka R, Kato S, Haruna M, Kishimoto K, Hirayama H, Goda Y, Mizukami H, Ogiwara Y, 2004. Identification of novel substituted fused aromatic compounds, meshimakohnol A and B, from natural *Phellinus linteus* fruit body. *Tetrahedron Letters*, 45(30): 5931-5933
- Park IH, Chung SK, Lee KB, Yoo YU, Kim SK, Kim GS, Song KS, 2004. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Archives of Pharmacal Research*, 27: 615-618
- Shi ZT, Bao HY, 2016. Research progress on effective components and efficacy of *Phellinus igniarius*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 22(22): 197-202
- Wang Y, Wang SJ, Mo SY, Li S, Yang YC, Shi JG, 2005. Phelligradimer A, a highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with antioxidant activity from the fungus *Phellinus igniarius*. *Organic Letters*, 21: 4733-4736
- Wu CS, 2011. Chemical constituents of the medicinal fungus *Phellinus baumaii*. Master Thesis, Shandong University, Jinan. 1-100 (in Chinese)
- Wu SH, Dai YC, 2020. Species clarification of the medicinal fungus *Sanghuang*. *Mycosystema*, 39(5): 781-794 (in Chinese)
- Wu SH, Dai YC, Hattori T, 2012. Species clarification for the medicinally valuable *Sanghuang* mushroom. *Botanical Studies*, 53: 135-149

- Wu SH, Huang GZ, Chen YP, Dai YC, Zhou LW, 2016. Taxonomy and development prospects of *Sanghuang* (*Sanghuangporus sanghuang*). Journal of Fungal Research, 14(4): 187-200 (in Chinese)
- Yang TK, Lee YH, Paudel U, Bhattarai G, Yun BS, Hwang PH, Yi HK, 2013. Davallialactone from mushroom reduced premature senescence and inflammation on glucose oxidative stress in human diploid fibroblast cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(29): 7089-7095
- Yuan X, Zhao J, Wang H, Yu R, Wen H, Liu Z, Mei L, Wang Y, Tao Y, 2017. Antiproliferative activity of phenylpropanoids isolated from *Lagotis brevifolia* Maxim. Phytotherapy Research, 31(10): 1509-1520
- Zhang JF, Zhang Z, Wang WH, Zhang HN, Feng N, Wu D, Liu YF, Yang Y, 2020. Comparison of active secondary metabolites between mycelia and fruiting bodies of *Sanghuangporus sanghuang*. Mycosystema, 39(2): 398-408 (in Chinese)
- Zhang MM, Wei ZW, Liu YB, Zhao YX, Zheng WF, 2011. Optimization on determination of polyphenols from *Inonotus obliquus* by Folin-Ciocalteu colorimetry. Mycosystema, 30(2): 295-304 (in Chinese)
- Zheng W, Zhao Y, Zheng X, Liu Y, Pan S, Dai Y, Liu F, 2011. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 89: 157-167
- Zhou LW, Vlasák J, Decock C, Assefa A, Stenlid J, Abate D, Wu SH, Dai YC, 2016. Global diversity and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex (Hymenochaetales, Basidiomycota): *Sanghuangporus* gen. nov., *Tropicoporus excentrodendri* and *T. guanacastensis* gen. et spp. nov., and 17 new combinations. Fungal Diversity, 77(1): 335-347
- Zhu L, Cui BK, 2016. Progress on the studies of medicinal mushrooms “sanghuang” group. Journal of Fungal Research, 14(4): 201-209 (in Chinese)
- Zhuang Y, Zhang C, Ou LL, Shui PX, 2018. Determination of total flavonoids in leaves of *Paliurus ramosissimus* and orthogonal experiment optimization process. Medicinal Plant, 9(2): 40-43

[附中文参考文献]

- 陈万超, 杨焱, 张劲松, 李正鹏, 陆本坤, 王琨, 2020. 桑黄类真菌活性代谢产物的研究进展. 食用菌学报, 27(4): 188-201
- 莫顺燕, 杨永春, 石建功, 2003. 桑黄黄酮 A 和 B 的分离与合成. 化学学报, 61(7): 1161-1163
- 史帧婷, 包海鹰, 2016. 桑黄类真菌有效成分及功效研究进展. 中国实验方剂学杂志, 22(22): 197-202
- 吴长生, 2011. 药用真菌桑黄化学成分的研究. 山东大学硕士论文, 济南. 1-100
- 吴声华, 戴玉成, 2020. 药用真菌桑黄的种类解析. 菌物学报, 39(5): 781-794
- 吴声华, 黄冠中, 陈愉萍, 戴玉成, 周丽伟, 2016. 桑黄的分类及开发前景. 菌物研究, 14(4): 187-200
- 张俊峰, 张忠, 汪雯翰, 张赫男, 冯娜, 吴迪, 刘艳芳, 杨焱, 2020. 桑黄菌丝体和子实体中次级代谢产物及其活性的比较. 菌物学报, 39(2): 398-408
- 张梅梅, 魏志文, 刘玉冰, 赵艳霞, 郑维发, 2011. Folin-Ciocalteu 比色法测定桦褐孔菌多酚的条件优化. 菌物学报, 30(2): 295-304
- 朱琳, 崔宝凯, 2016. 药用真菌桑黄的研究进展. 菌物研究, 14(4): 201-209

(本文责编: 王敏)