

桦褐孔菌多糖脱色方法及其成分分析

玄光善, 李 青, 王艳波
(青岛科技大学, 山东 青岛 266042)

摘 要: 对桦褐孔菌多糖的脱色方法和单糖的组成进行研究。首先考察活性炭粉、过氧化氢、壳聚糖、聚酰胺层析柱的脱色效果。经脱蛋白、脱色后的多糖进行1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮衍生化, 采用高效液相色谱法分析单糖组成。4种脱色方法对桦褐孔菌多糖均有效果, 活性炭和聚酰胺层析柱脱色效果明显优于过氧化氢和壳聚糖脱色法, 聚酰胺层析柱脱色是较好的方法, 其脱色率为89.3%、多糖保留率为91.7%。结果表明: 桦褐孔菌多糖粗品主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖组成, 其物质的量比为2.13:1.36:7.01:2.98:1:1.78。

关键词: 桦褐孔菌; 多糖; 脱色; 柱前衍生化; 成分分析

Decolorization and Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharides from *Inonotus obliquus*

XUAN Guang-shan, LI Qing, WANG Yan-bo
(Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: In the present work, activated carbon powder, H_2O_2 , chitosan, and polyamide column chromatography were compared for their effects in decolorizing *Inonotus obliquus* polysaccharides, and the decolorized polysaccharides were analyzed for monosaccharide composition by high performance liquid chromatography (HPLC) after derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. All decolorants were able to decolorize *Inonotus obliquus* polysaccharides, with activated carbon powder and polyamide column chromatography being more significantly effective than the other decolorants. The decolorization efficiency of polyamide column chromatography was 89.3% while retaining 91.7% of polysaccharides. The decolorized polysaccharides were mainly composed of mannose, rhamnose, glucose, galactose, xylose, and arabinose with a molar ratio of 2.13:1.36:7.01:2.98:1:1.78.

Key words: *Inonotus obliquus*; polysaccharides; decolorization; precolumn derivatization; component analysis

中图分类号: R931.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)10-0207-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201410039

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)属桦褐孔菌属担子菌亚门、层菌纲、非褐菌目、多孔菌科, 是一种传统的药用真菌^[1]。主产于俄罗斯、北欧、波兰、日本北海道以及中国黑龙江大小兴安岭和吉林长白山地区^[2]。其具有抗肿瘤^[3]、降血糖^[4]、调节免疫功能^[5]、抗氧化^[6]、抗血脂^[7]、抗哮喘^[8]等作用。

桦褐孔菌中含有多糖、三萜类、桦褐孔菌醇、栓菌酸、桦褐孔菌素、木质素、黑色素等200多种化合物^[9]。桦褐孔菌多糖提取液中混有的色素对其外观品质有一定的影响, 并且影响多糖的分离纯化、定性定量分析与结构鉴定, 因此在提取、分析前需要去除色素^[10]。传统的脱色方法有活性炭法, 过氧化氢氧化法等, 但这些方法均存在缺陷: 活性炭脱色时间长、多糖损失量大, 且多糖提取液中混杂的活性炭难以去除; 过氧化氢脱色有可能破坏多糖的生物活性。因此, 亟需寻找一种有效的脱色方法。郭巧玲等^[11]研究了壳聚糖对菠萝粗多糖脱色的影响, 脱色率能达到74.3%。陈义勇等^[12]采用聚酰胺层析

柱对茶多糖进行脱色纯化研究, 脱色率能达到82.3%。但桦褐孔菌多糖脱色的研究则较少。本研究选用活性炭、过氧化氢、壳聚糖和聚酰胺层析柱4种脱色方法, 对桦褐孔菌多糖进行脱色, 并测定多糖保留率和脱色率, 评价脱色效果并筛选桦褐孔菌多糖的最佳脱色方法。

常用的单糖组成分析方法有气相色谱法和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法^[13]。范柳萍等^[14]采用糖腈乙酸酯衍生物气相色谱法定量桦褐孔菌多糖糖基组成。张丽霞^[15]采用糖醇甲基醚衍生物气相色谱法分析了桦褐孔菌多糖中单糖组成。马定远等^[16]建立了单糖组成分析的1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)柱前衍生化-HPLC新方法, 该法简便、快速、准确、重复性好。本实验亦采用PMP柱前衍生化HPLC法对桦褐孔菌多糖的单糖组成进行分析, 为其结构和功能的进一步研究及开发提供了基础资料。

收稿日期: 2013-09-17

作者简介: 玄光善(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为药物分析。E-mail: xuan@qust.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桦褐孔菌采自大兴安岭；粉末活性炭（分析纯）天津市标准科技有限公司；30%过氧化氢（分析纯）天津市博迪化工有限公司；壳聚糖（脱乙酰度80.0%~95.0%）、葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖（均为分析纯）国药集团化学试剂有限公司；聚酰胺（80~100目）上海一基生物试剂有限公司；PMP实验室自制^[17]；乙腈（色谱纯）天津市永大化学试剂有限公司；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV762型紫外-可见分光光度计 北京莱伯泰科仪器有限公司；U3000高效液相色谱仪 戴安（中国）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 桦褐孔菌多糖的提取

桦褐孔菌粉碎过40目筛，称取100 g菌粉，用40倍水于90℃条件下提取2.5 h，抽滤得滤液，减压浓缩，加4倍体积的95%乙醇，4℃静置过夜，离心收集沉淀，沉淀用无水乙醇洗涤3次，真空干燥得多糖粗品。取桦褐孔菌粗多糖10 g，加1 L蒸馏水溶解，用三氯乙酸-正丁醇法去除游离蛋白：将等体积的三氯乙酸-正丁醇溶液（1:10, V/V）加入多糖溶液中，磁力搅拌30 min，在分液漏斗中静置3 h，取下清液，于4℃冰箱中保存，备用。

1.3.2 多糖保留率的测定

1.3.2.1 标准曲线的建立

本实验采用苯酚-硫酸法测定多糖含量。

精确称取105℃干燥至恒质量的葡萄糖标准品50.0 mg，置于50 mL棕色容量瓶中，加蒸馏水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得质量浓度为1.0 mg/mL葡萄糖标准液。吸取1.0 mg/mL的葡萄糖标准液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL，分别置于10 mL容量瓶中，定容。再分别量取2.0 mL置干燥具塞试管中，加6%苯酚1.0 mL，摇匀，迅速滴加浓硫酸5.0 mL，置沸水浴加热30 min后取出，冷水冷却至室温；另取蒸馏水2.0 mL，同上操作，做空白对照，于486 nm波长处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标，作标准曲线，得标准曲线回归方程。

1.3.2.2 换算因子的测定

准确称取已干燥至恒质量的桦褐孔菌多糖10 mg，定容于100 mL容量瓶中，备用。精密量取该溶液2.0 mL，按照上述苯酚-硫酸法测定吸光度，重复3次，计算出桦褐孔菌多糖中葡萄糖的质量浓度，按式（1）计算换算因子^[18]：

$$F=A/B \quad (1)$$

式（1）中：A为所配液体中多糖质量浓度/（mg/mL）；B为标准曲线计算所得葡萄糖质量浓度/（mg/mL）。

1.3.2.3 苯酚-硫酸法测定多糖含量

按上述苯酚-硫酸法，分别测定桦褐孔菌多糖原液及不同脱色方法脱色后溶液的吸光度。通过标准曲线和式（2）计算样品中多糖含量、式（3）计算多糖保留率^[9]：

$$\text{多糖含量}/\% = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100 \quad (2)$$

式（2）中：C为糖的质量浓度/（mg/mL）；V为体积/mL；D为稀释倍数；W为样品糖的质量/mg。

$$\text{多糖保留率}/\% = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (3)$$

式（3）中：C₁为脱色前得多糖含量/%；C₂为脱色后的多糖含量/%。

1.3.3 多糖脱色

采用活性炭粉、过氧化氢、壳聚糖和聚酰胺对桦褐孔菌多糖进行脱色。利用分光光度计在359 nm波长处测定多糖溶液脱色前后的吸光度^[20]，并按式（4）计算脱色率，比较各种方法的脱色效果。

$$\text{脱色率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (4)$$

式（4）中：A₁为脱色前的吸光度；A₂为脱色后的吸光度。

1.3.3.1 活性炭粉末脱色

分别取脱蛋白溶液20 mL，加入0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 g活性炭粉，摇匀后于40℃水浴静置5 h，抽滤，滤液定容至100 mL容量瓶中，测脱色率和多糖保留率。

1.3.3.2 过氧化氢脱色

分别取脱蛋白溶液20 mL，加入30%过氧化氢4、8、12、16、20 mL，55℃恒温水浴搅拌3 h，调节pH值至8.8~9之间，最终定容至100 mL，测脱色率和多糖保留率。

1.3.3.3 壳聚糖脱色

1%壳聚糖的配制：精确称取壳聚糖1 g，溶于50 mL水中，再加入1 mL冰乙酸，放入80~90℃的恒温水浴锅中，搅拌至溶解，再用蒸馏水定容至100 mL，于85℃保温45 min即可使用^[21]。

取脱蛋白溶液20 mL 6份，加入适量1%壳聚糖溶液，使其体积分数分别为5%、6%、7%、8%、9%、10%，用0.2 mol/L NaOH溶液调pH值至5，于45℃恒温水浴锅中搅拌20 min，静置保温40 min，离心，测脱色率和多糖保留率。

1.3.3.4 聚酰胺层析柱脱色

聚酰胺预处理：取适量聚酰胺用90%~95%乙醇浸泡，不断搅拌，去除气泡后装入柱中。用3~4倍柱体积

的90%~95%乙醇洗脱,至洗脱液透明并在蒸干后无残渣。再依次用2~2.5倍柱体积的5% NaOH溶液、1倍柱体积的蒸馏水、2~2.5倍柱体积的10%醋酸溶液洗脱,最后用蒸馏水洗脱至中性,备用^[22]。

称取2、4、6、8、10 g聚酰胺,倒入一定量的蒸馏水中加热15 min,使之分散均匀,装层析柱,用蒸馏水洗脱完全。分别量取20 mL脱蛋白溶液,装入聚酰胺层析柱中进行吸附,用1倍柱体积的蒸馏水以1.0 mL/min的流速进行洗脱,测脱色率和多糖保留率。

1.3.4 单糖组成分析

1.3.4.1 单糖标样的衍生化

由文献[20]知,桦褐孔菌粗多糖主要由葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和木糖组成。精密称取对照品甘露糖0.018 4 g、鼠李糖0.013 7 g、葡萄糖0.019 7 g、半乳糖0.017 3 g、木糖0.014 2 g、阿拉伯糖0.010 9 g,用蒸馏水溶解定容于10 mL容量瓶中,摇匀。取单糖对照品混合溶液400 μ L与250 μ L 0.3 mol/L NaOH溶液混匀,再加250 μ L 0.5 mol/L的PMP-甲醇溶液,涡旋混匀;70℃烘箱中反应100 min,冷却,加500 μ L 0.3 mol/L HCl溶液中和,涡旋2 min后,再加等体积的氯仿,振荡,静置,弃去氯仿层,重复萃取3次。水相用0.45 μ m微孔膜过滤后供HPLC进样分析。

1.3.4.2 多糖的水解及衍生化

吸取1 mL质量浓度为4~5 g/L的多糖样品溶液于安瓿瓶中,加入1 mL 4 mol/L三氟乙酸溶液,充N₂封管,110℃烘箱中水解3 h;冷却后打开盖,取600 μ L水解液加600 μ L甲醇后用N₂吹干,如此重复加甲醇并用N₂吹3次,去除三氟乙酸;加入蒸馏水400 μ L充分溶解残渣,加入250 μ L 0.3 mol/L NaOH溶液,混匀,再加250 μ L 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液,漩涡混匀,在70℃的烘箱中反应100 min,冷却后按上述方法中和、萃取,并用微孔膜过滤。

1.3.4.3 色谱条件

色谱柱: Globalsil™ C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流速1.0 mL/min; 流动相: 溶剂A为50 mmol/L磷酸缓冲液(KH₂PO₄-NaOH, pH 6.9), 溶剂B为乙腈; 梯度洗脱: 0~12 min, 15% B; 12~20 min, 15%~20% B; 20~35 min, 20% B; 35~45 min, 20%~15% B; 45~50 min, 15% B。检测波长250 nm; 进样体积20 μ L。

1.3.4.4 标准曲线绘制及单糖组成分析

分别称取葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和木糖对照品配制一系列不同质量浓度的标准溶液,按上述方法进行衍生化,并在上述色谱条件下进样分析,记录峰面积,以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标,作标准曲线。

2 结果与分析

2.1 多糖保留率

2.1.1 葡萄糖含量测定标准曲线

按上述方法配制一系列质量浓度的葡萄糖标准液,用苯酚-硫酸法显色,在486 nm波长处测定吸光度,绘制标准曲线,计算得到标准曲线回归方程: $y=0.058\ 71x+0.001\ 37$, $R^2=0.999\ 0$, 线性关系良好,线性范围为0.01~0.12 mg/mL。

2.1.2 换算因子

准确称取已干燥至恒质量的桦褐孔菌多糖10 mg,定容于100 mL容量瓶中。精密量取0.1 mg/mL桦褐孔菌多糖溶液2.0 mL,按照上述苯酚-硫酸法测定吸光度,重复3次测得的换算因子 $F=1.17$ 。

2.2 不同脱色剂的脱色效果

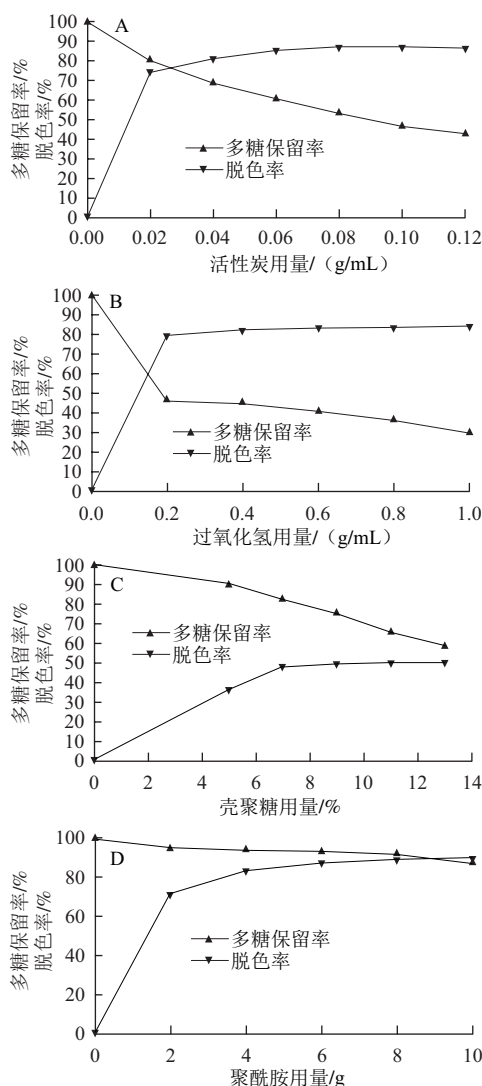


图1 不同脱色剂对桦褐孔菌多糖的脱色效果

Fig.1 Effects of different decolorants on decolorization of *Inonotus obliquus* polysaccharides

由图1A可知,随着活性炭用量的增加,多糖脱色率增加,而多糖保留率逐渐降低。而当活性炭含量大于0.06 g/mL时,多糖脱色率无明显增加,脱色率达到85.7%。因此,利用活性炭对桦褐孔菌多糖进行脱色的条件为活性炭用量0.06 g/mL、脱色温度40℃、脱色时间5 h。

由图1B可知,过氧化氢对桦褐孔菌多糖的脱色效果明显,但多糖保留率较低。当过氧化氢含量大于0.4 mL/mL时,脱色效果无明显提高,脱色率达到82.8%,而多糖保留率明显降低。因此过氧化氢对桦褐孔菌多糖进行脱色条件选为加入过氧化氢含量0.4 mL/mL、脱色温度50℃、脱色时间3 h、pH 8.8~9。

由图1C可知,壳聚糖对桦褐孔菌多糖的脱色效果不明显,多糖脱色率随壳聚糖用量增大而增大,当1%壳聚糖添加量大于7%时,脱色率达到48.3%,脱色率增大幅度变小,而多糖保留率明显下降。因此,壳聚糖对桦褐孔菌多糖进行脱色条件选为1%壳聚糖加入量7%、脱色温度45℃、脱色时间1 h、pH 5。

从图1D可知,随着聚酰胺用量的增加,脱色率逐渐增大,多糖的保留率逐渐下降。当聚酰胺用量超过8 g/20 mL脱蛋白溶液时,多糖脱色率变化幅度不大,脱色率达到89.3%,但多糖的保留率明显下降。为了尽可能多地保留多糖、节省实验成本,确定聚酰胺对桦褐孔菌多糖进行脱色条件选为聚酰胺用量为8 g/20 mL脱蛋白溶液,采用1.5倍柱体积的去离子水以1.0 mL/min的流速进行洗脱。

从脱色率及多糖保留率两方面进行考察,4种方法对桦褐孔菌多糖均有脱色效果。壳聚糖是较新的脱色方法,虽然多糖保留率较高,但是多糖颜色还是很深、脱色率低。过氧化氢脱色效果良,但易对多糖造成破坏,并且色素物质只是被氧化为无色,仍存在于多糖中,并不是真正意义上的去除。聚酰胺层析柱和活性炭的脱色效果优,但活性炭法的多糖损失严重,并且残留在多糖溶液中的活性炭难以完全去除,所以聚酰胺层析柱脱色是较好的方法。

2.3 单糖组成分析

2.3.1 单糖标样的衍生化分析

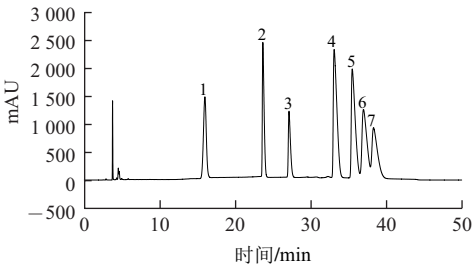
分别称取葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和木糖对照品配制成一系列不同质量浓度的标准溶液,按上述方法进行衍生化,并在上述色谱条件下进样分析,记录峰面积,以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标,作标准曲线,结果见表1。根据测得各种糖的峰面积得到对应的质量浓度,各单糖的质量浓度比即为物质的量比。

表1 单糖的标准曲线

Table 1 Calibration curves for different monosaccharides

单糖	保留时间/min	标准曲线	线性范围/(mmol/L)	相关系数
甘露糖	23.6	$y=81.244x+10.008$	0.009 41~5.16	0.999 2
鼠李糖	27.1	$y=107.37x+0.618 9$	0.012 8~9.07	0.998 7
葡萄糖	33.1	$y=127.88x-13.94$	0.011 7~8.27	0.999 5
半乳糖	35.3	$y=143.86x+1.715 4$	0.010 5~8.10	0.999 5
木糖	36.7	$y=144.35x+3.805 2$	0.001 07~9.99	0.998 7
阿拉伯糖	38.1	$y=156.59x-12.295$	0.012 7~9.99	0.999 8

6种单糖对照品按上述方法衍生化,并在上述色谱条件下进样检测,结果见图2,这些单糖组分得到了良好地分离。



1.衍生化试剂PMP; 2.甘露糖; 3.鼠李糖; 4.葡萄糖; 5.半乳糖; 6.木糖; 7.阿拉伯糖。下同。

图2 标准单糖PMP衍生物的HPLC图
Fig.2 HPLC chromatogram of the PMP derivatives of monosaccharide standards

2.3.2 桦褐孔菌多糖的PMP衍生化分析

桦褐孔菌多糖按上述方法衍生化后,进行HPLC分析,结果见图3。

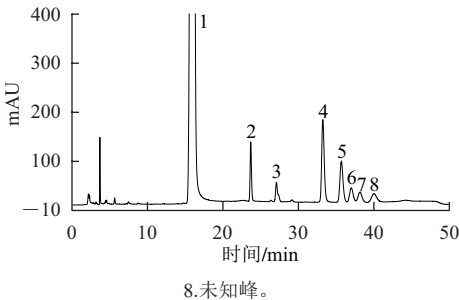


图3 桦褐孔菌多糖水解样品PMP衍生物的HPLC图
Fig.3 HPLC chromatogram of the PMP derivatives of hydrolyzed *Inonotus obliquus* polysaccharides

根据混合单糖标样PMP衍生物的色谱图(图2)中色谱峰保留时间,来判断多糖水解产物中单糖的种类。由图3可知,桦褐孔菌多糖水解产物衍生生物色谱图出现8个峰。在桦褐孔菌多糖的PMP衍生化色谱图中在40.1 min处出现了未知的峰,经HPLC-MS分析未知物的m/z为164,具体结构有待进一步确认。

由峰面积及各单糖标准曲线回归方程计算得各单糖质量浓度,各单糖物质的量比(甘露糖:鼠李糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖)为2.13:1.36:7.01:2.98:1:1.78。

3 结 论

癌症是危害人类健康的最主要的疾病之一,而桦褐孔菌含有大量抗癌、降血压、降血糖、复活免疫作用的植物纤维类多糖,因此桦褐孔菌的分离、纯化以及药效学研究很有意义^[23-25]。

本研究比较了活性炭粉、过氧化氢、壳聚糖、聚酰胺层析柱对桦褐孔菌多糖脱色效果。聚酰胺层析柱是较好的方法,聚酰胺用量为粗多糖的8倍、采用1.5倍柱体积的去离子水以1.0 mL/min的流速进行洗脱时,聚酰胺层析柱的脱色率为89.3%、多糖保留率为91.7%。

本研究采用PMP柱前衍生化HPLC法分析桦褐孔菌多糖的单糖组成。结果显示,桦褐孔菌多糖主要含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖6种单糖。各单糖物质的量比为(甘露糖:鼠李糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖)为2.13:1.36:7.01:2.98:1:1.78。

参考文献:

- [1] 陈艳秋,李玉.桦褐孔菌的研究进展[J].微生物学通报,2005,32(2): 124-127.
- [2] 黄年来.俄罗斯神秘的民间药用真菌:桦褐孔菌[J].中国食用菌,2002,21(4): 7-8.
- [3] 陈义勇,顾小红,汤坚.桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性研究[J].食品与生物技术学报,2011,30(1): 65-69.
- [4] 高愿军,张家泉,王娟娟,等.桦褐孔菌多糖口服液降血糖作用研究[J].食品科技,2010,35(7): 93-95.
- [5] 王伟,景少巍,张庆镐.桦褐孔菌多糖对小鼠免疫功能的影响[J].时珍国医国药,2008,19(7): 1739.
- [6] 吴艳玲,南极星.桦褐孔菌多糖对小鼠抗氧化清除自由基作用的研究[J].亚太传统医药,2009,5(12): 9-10.
- [7] 崔鹤松,金光.桦褐孔菌多糖对实验性高脂血症模型大鼠血脂的影响[J].延边大学医学学报,2007,30(3): 173-174.
- [8] 张如平,姚建南,李国立,等.桦褐孔菌多糖抗哮喘作用实验研究[J].当代医学,2012,18(35): 19-20.
- [9] 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,2012,37(2): 213-217.
- [10] 何余堂,宫照杰.玉米花丝多糖脱色方法的研究[J].食品科学,2009,30(18): 50-53.
- [11] 郭巧玲,杨学敏,谢建华,等.菠萝多糖脱色工艺的研究[J].漳州师范学院学报:自然科学版,2012,25(3): 90-93.
- [12] 陈义勇,龚祥龙,黄友如,等.常熟“沙家浜”绿茶多糖的纯化[J].食品与发酵工业,2011,37(11): 121-124.
- [13] 姜晓满,田卫,张海霞,等.糖类物质的色谱分析[J].药物分析杂志,2006,26(8): 1181-1186.
- [14] 范柳萍,张举贤.桦褐孔菌多糖的分离纯化及其组成分析[J].食品工业科技,2012,33(11): 101-103.
- [15] 张丽霞.桦褐孔菌多糖结构及生物活性研究[D].长春:东北师范大学,2011: 26.
- [16] 马定远,陈君,李萍,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成[J].分析化学,2002,30(6): 702-705.
- [17] 陶琼华,王绍杰,郝志巧.依达拉奉的合成[J].中国医药工业杂志,2004,35(11): 643-644.
- [18] 李景恩,聂少平,杨美艳,等.香薷中多糖含量的测定[J].食品科学,2008,29(9): 487-490.
- [19] 罗玺,唐庆九,张劲松,等.灵芝多糖树脂法脱色工艺优化[J].食品科学,2011,32(16): 5-10.
- [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: 38.
- [21] 郭巧玲.菠萝多糖的提取及其生物学活性的研究[D].福州:福建农林大学,2010: 32.
- [22] 汪艳群.五味子多糖的分离、结构鉴定及免疫活性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2012: 80-82.
- [23] YUAN X, SUN H Y, LIU Y, et al. Anti-cancer activity comparisons of aqueous extracts from *Inonotus obliquus*, *Cordyceps militaris* and *Uncaria tomentosa* in vitro and in vivo[J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2014, 2(6): 19-25.
- [24] SONG K C, CHOI B L, SHIN J W, et al. Effects of *Inonotus obliquus* extracts on immunomodulating activity[J]. Korean Journal of Oriental Medicine, 2007, 28(4): 27-41.
- [25] SONG F Q, LIU Y, KONG X S, et al. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus obliquus*[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013, 14(3): 1571-1578.