

*Marcin Szymański, Justyna Staniszevska

Badania jakościowe i ilościowe wyciągów z *Inonotus obliquus*

Qualitative and quantitative studies of *Inonotus obliquus* extracts

Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Dyrektor Centrum: prof. dr hab. n. chem. Bronisław Marciniak

SUMMARY

Introduction. *Inonotus obliquus* (Ach. Ex Pers.) Pilát is a fungus found in North America, Finland, Poland, Russia, China, Japan and Korea on the bark of trees, most often *Betula pendula*, *B. pubescens*, *B. carpatica* and *Fagus sylvatica*. Mushroom extracts show a number of biological activities, due to the presence of: polysaccharides, phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids), triterpenes, ergosterol and its peroxide.

Aim. Determination of the content of the sum of polyphenolic compounds, including the sum of phenolic acids, flavonoids and flavonols in water, methanol and methanol-water extracts, determination of antioxidant activity and qualitative determination of the composition of the chloroform extract from the fruiting body of *Inonotus obliquus*, collected from a natural site.

Material and methods. The raw material for research was collected in the Noteć Forest in the Sieraków Landscape Park. The fruiting body was dried and then ground into a fine powder. Using spectroscopic methods, the sum of polyphenols with the Folin-Ciocalteu reagent, the sum of phenolic acids using the Arnov method, the sum of flavonols with aluminum chloride, the sum of flavonoids according to the method described in FP X, antioxidant activity with the DPPH radical and the composition of the chloroform extract using GC-MS were determined.

Results. The methanol extract was characterized by the highest content of the sum of phenolic acids per coffee acid (0.127%), and the lowest content of water-methanol extract (0.047%).

The highest content of the sum of polyphenols in terms of caffeic acid was determined in the aqueous extract (1.85%), and the lowest in the methanol extract (1.01%). The methanol extract was characterized by the highest content of the sum of phenolic acids expressed as coffee acid (0.127%), and the lowest content of water-methanol extract (0.047%). The content of total flavonoids and total flavonols was determined only in methanol extracts, because the precipitation made it impossible to perform the determinations in the remaining extracts. The lowest IC_{50} value was determined for the water-methanol extract. GC-MS analysis allowed to identify, among others: isovanillin, santalene, α -selinene, syringaldehyde, linoleic acid, thymol, α -bergamotene and lanosterol.

Conclusions. The highest content of the sum of polyphenols was determined in the water extract of *Inonotus obliquus*, the sum of phenolic acids in the methanol extract; the water-methanol extract was characterized by the strongest antioxidant properties. GC-MS analysis revealed the presence of numerous compounds with confirmed biological activity.

Keywords: *Inonotus obliquus*, polyphenols, antioxidant activity, GC-MS

STRESZCZENIE

Wstęp. *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát jest grzybem spotykanym na terenach Ameryki Północnej, Finlandii, Polski, Rosji, Chin, Japonii i Korei na korze drzew, najczęściej *Betula pendula*, *B. pubescens*, *B. carpatica* i *Fagus sylvatica*. Wyciągi z grzyba wykazują szereg aktywności biologicznych, uwarunkowanych obecnością: polisacharydów, związków fenolowych (kwasy fenolowe i flawonoidy), triterpenów, ergosterolu i jego nadtlenku.

Cel pracy. Oznaczenie zawartości sumy związków polifenolowych, w tym sumy kwasów fenolowych, flawonoidów i flawonoli w wyciągu wodnym, metanolowym i metanolowo-wodnym, oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej oraz jakościowe oznaczenie składu wyciągu chloroformowego z owocnika *Inonotus obliquus*, zebranego ze stanowiska naturalnego.

Material i metody. Surowiec do badań zebrano w Puszczy Noteckiej w Sierakowskim Parku Krajobrazowym. Owocnik został wysuszony, a następnie zmielony na drobny proszek. Wykorzystując metody spektroskopowe, oznaczono sumę polifenoli z odczynnikiem

Folina-Ciocalteu, sumę kwasów fenolowych metodą Arnova, sumę flawonoli z chlorkiem glinu, sumę flawonoidów według metody opisanej w FP X, aktywność antyoksydacyjną za pomocą rodnika DPPH oraz skład wyciągu chloroformowego za pomocą GC-MS. **Wyniki.** Najwyższą zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas kawowy oznaczono w wyciągu wodnym (1,85%), a najniższą w wyciągu metanolowym (1,01%). Wyciąg metanolowy charakteryzował się najwyższą zawartością sumy kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy (0,127%), a najniższą wyciąg wodno-metanolowy (0,047%). Zawartość sumy flawonoidów i sumy flawonoli oznaczono wyłącznie w wyciągach metanolowych, gdyż wytrącający się osad uniemożliwił przeprowadzenie oznaczeń w pozostałych wyciągach. Najniższą wartość parametru IC_{50} wyznaczono dla wyciągu wodno-metanolowego. Analiza GC-MS pozwoliła zidentyfikować m.in.: izowanilinę, santalen, α -selinen, aldehyd syringowy, kwas linolowy, tymol, α -bergamoten i lanosterol.

Wnioski. Najwyższą zawartość sumy polifenoli oznaczono w wyciągu wodnym z *Inonotus obliquus*, sumy kwasów fenolowych w wyciągu metanolowym; wyciąg wodno-metanolowy charakteryzował się najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Analiza GC-MS wykazała obecność licznych związków o potwierdzonej aktywności biologicznej.

Słowa kluczowe: *Inonotus obliquus*, polifenole, aktywność antyoksydacyjna, GC-MS

Wstęp

Inonotus obliquus (Ach. ex Pers.) Pilát występuje na terenach: Ameryki Północnej, Finlandii, Polski, Rosji (Wschodnia Syberia, częściowe regiony półwyspu Kamczatka), Chin – Prowincja Heilongjiang, obszar gór Changbai z prowincji Jilin, Japonii – Hokkaido i Korei (1).

Inonotus obliquus rośnie najczęściej na korze drzew, takich jak: *Betula pendula*, *B. pubescens*, *B. carpatica*, *Fagus sylvatica*, rzadziej na: *Acer campestre*, *A. pseudo-platanus*, *Alnus glutinosa*, *A. incana*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus cerris*, *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. delachampii*, *Ulmus* sp. (2).

Najwięcej doniesień na temat aktywności farmakologicznej owocników tego grzyba pochodzi z Niemiec, Japonii, Korei i Chińskiej Republiki Ludowej. Wyciągi z *Inonotus obliquus* wykazują działanie przeciwzapalne (3), immunomodulujące i stymulujące (4-6), przeciwnowotworowe (6-10), przeciwwirusowe (11, 12), przeciwbólowe (3), antyagregacyjne (13), przeciwuczuleniowe (14), hipoglikemiczne i hipolipemiczne (15) oraz antyoksydacyjne (16). Owocniki tego grzyba są bogatym źródłem różnych związków biologicznie czynnych, takich jak: polisacharydy (15), związki fenolowe, w tym kwasy fenolowe i flawonoidy (17), triterpeny (18), ergosterol i nadtlenek ergosterolu (19) oraz melanina (20).

Cel pracy

Celem pracy było oznaczenie zawartości sumy związków polifenolowych, w tym sumy kwasów fenolowych, flawonoidów i flawonoli w wyciągu wodnym, metanolowym i metanolowo-wodnym, oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej oraz jakościowe oznaczenie składu wyciągu chloroformowego z owocnika *Inonotus obliquus*, zebranego ze stanowiska naturalnego.

Materiał i metody

Materiał badawczy

Owocnik *Inonotus obliquus*, który wykorzystano do badań (ryc. 1a-c), zebrano z pnia żywej brzozy (*Betula pendula* Rorh.) w Puszczy Noteckiej (Sierakowski Park Krajobrazowy). Po wysuszeniu w cieniu i przewiewie w temp. pokojowej owocnik zmielono na drobny proszek.

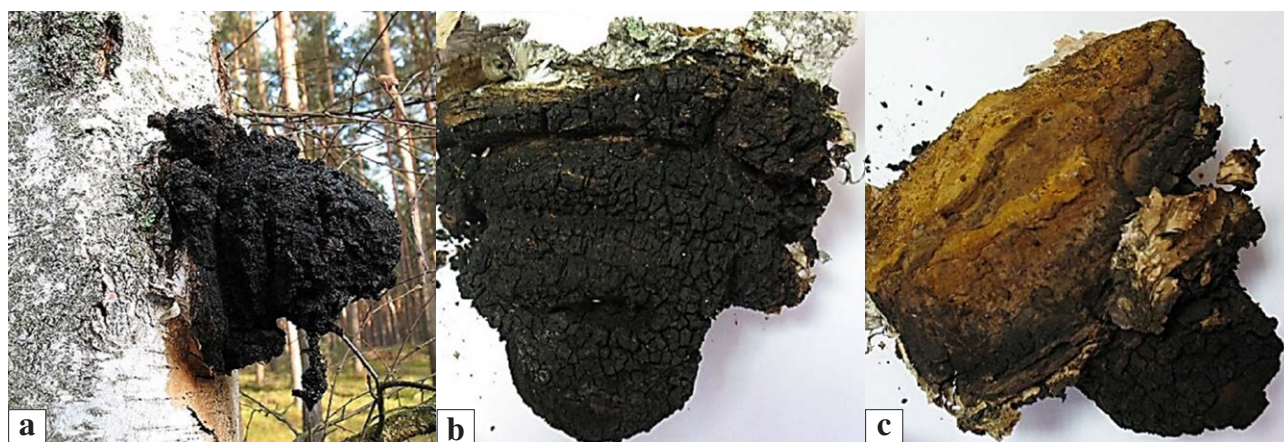
Sporządzono trzy rodzaje wyciągów: wodny, metanolowo-wodny i metanolowy. W tym celu odważano po 2,50 g sproszkowanego surowca. Wyciągi wykonywano w następujący sposób:

- wodny – sproszkowany surowiec zalano wodą destylowaną i ogrzewano 20 min na łaźni wodnej w temp. 94°C. Ekstrakcję w tych samych warunkach powtórzono czterokrotnie, łącząc otrzymane wyciągi,
- wodno-metanolowy: sproszkowany surowiec ekstrahowano 50% roztworem metanolu 20 min na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną, w temp. 90°C. Ekstrakcję w tych samych warunkach powtórzono czterokrotnie, łącząc otrzymane wyciągi,
- metanolowy – sproszkowany surowiec ekstrahowano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temp. 74°C. Ekstrakcję w tych samych warunkach powtórzono czterokrotnie, łącząc otrzymane wyciągi.

Metody badawcze

Oznaczenie straty masy po suszeniu

Odważono na szalkę wagosuszarki 1000 ± 1 mg surowca i przeprowadzono proces suszenia w temp. 104°C. Na podstawie różnicy mas przed i po suszeniu obliczono % suchej masy. Czynność powtórzono trzykrotnie. Średnia z trzech pomiarów stanowiła wynik pomiaru.



Ryc. 1a-c. Błyskoporek podkorowy (*Inonotus obliquus*) (autor zdjęć: dr Marcin Szymański)

Oznaczenie sumy polifenoli z odczynnikami Folina-Ciocalteu (FC)

Odczynnik FC jest heteropolifosforowolframianem molibdenu (powstaje z wolframianu sodu $[\text{Na}_2\text{WO}_3]$ zmieszanego z molibdenianem sodu $[\text{Na}_2\text{MoO}_4]$ i siarczanem litu $[\text{Li}_2\text{SO}_4]$, wodą bromową oraz kwasami: fosforowym i solnym).

Jest to metoda kolorymetryczna oparta na proporcjonalnym wzroście natężenia barwy roztworu w stosunku do zawartości w próbie różnych związków fenolowych, reagujących z odczynnikami FC w mieszaninie z 20% roztworem węgla sodu. Pomiar wykonuje się przy długości fali $\lambda = 760 \text{ nm}$.

Do 9 owiniętych w folię aluminiową próbek miarowych o pojemności 2 ml dodano 1,48 ml wody, destylowanej, 0,02 ml roztworu podstawowego, 0,1 ml FC, a po minucie 0,4 ml 20% roztworu węgla sodu. Pomiar absorbancji przeprowadzono po 30 min przy długości fali $\lambda = 760 \text{ nm}$ wobec próby odniesienia, zawierającej powyższe odczynniki z pominięciem roztworu podstawowego.

Do obliczeń sumy polifenoli wykorzystano równanie krzywej $y = ax + b$ (w przeliczeniu na kwas kawowy). W obliczeniach uwzględniono straty masy po suszeniu.

Oznaczenie sumy kwasów fenolowych metodą Arnova

Do ilościowego oznaczenia kwasów fenolowych w *Inonotus obliquus* zastosowano metodę kolorymetryczną Arnova. Polega ona na pomiarze absorbancji roztworu badanego po dodaniu odczynników: kwasu solnego, odczynnika Arnova i wodorotlenku sodu. Wartości absorbancji i intensywności zabarwienia badanej próby są proporcjonalne do zawartości kwasów fenolowych. Pomiaru dokonano przy długości fali $\lambda = 490 \text{ nm}$, w kuwetach plastikowych

o grubości 10 mm, przy użyciu spektrofotometru UV/VIS Lambda 35.

Do 7 próbek miarowych o pojemności 10 ml odmierzone po 5 ml wody. Przeniesiono kolejno podane objętości roztworu podstawowego kwasu kawowego: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 ml, co odpowiada 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 μg kwasu kawowego. Zawartość próbek wymieszano. Do każdej próbki dodano w następującej kolejności odczynniki: 1 ml kwasu solnego 18 g/l, 1 ml odczynnika Arnova i 1 ml roztworu wodorotlenku sodu 40 g/l. Probówki uzupełniono wodą do współmierności i dokładnie wymieszano. Absorbancję mierzono natychmiast wobec próby odniesienia (przygotowana jak próba badana, ale z pominięciem roztworu podstawowego kwasu kawowego). Dla każdego stężenia roztworu wzorcowego przygotowano po 5 powtórzeń.

Do 10 próbek miarowych o pojemności 2 ml odmierzone po 1,2 ml wody i po 0,2 ml uzyskanego wyciągu. Po wymieszanu do każdej próbki dodano kolejno: 0,2 ml kwasu solnego 18 g/l; 0,2 ml odczynnika Arnova; 0,2 ml roztworu wodorotlenku sodu 40 g/l. Probówki uzupełniono wodą do 2,0 ml, dokładnie wymieszano i natychmiast mierzono absorbancję wobec próby odniesienia (mieszanina odczynników bez wyciągu).

Z uwagi na intensywną barwę wyciągu zmierzono absorbancje tła. W dalszych obliczeniach odejmowano średnią wartość absorbancji tła od zmierzonej absorbancji określonej próbki.

Oznaczenie sumy flawonoli

Oznaczenie zawartości flawonoli przeprowadzono metodą spektrofotometryczną, która opiera się na pomiarze absorbancji badanych próbek po uprzednim dodaniu roztworów chlorku glinu i octanu sodu. Pomiaru zabarwionych roztworów

przeprowadzono przy długości fali $\lambda = 440$ nm i długości drogi optycznej 1 cm; próbką odniesienia był metanol. Uzyskane wyniki przeliczono na rutynę na podstawie przygotowanej uprzednio krzywej wzorcowej.

Do próbek miarowych o pojemności 5 ml dodano roztwór podstawowy wzorcowej rutyny (o stężeniu $C = 0,5$ mg/ml) kolejno w ilościach: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml. Probówki uzupełniono metanolem do objętości 5 ml. Uzyskano rozcieńczenia roztworu podstawowego wzorcowej rutyny o stężeniach odpowiednio 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 mg/ml. Następnie do próbek o pojemności 10 ml dodano kolejno: 2 ml każdego z rozcieńczeń podstawowego roztworu rutyny, 2 ml roztworu chlorku glinu, 3 ml roztworu octanu sodu. Probki dokładnie wymieszano i pozostawiono na 1 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dokonano pomiaru absorbancji, przy długości fali $\lambda = 440$ nm o długości drogi optycznej $l = 1$ cm, wobec próbki odniesienia – metanolu. Sporządzono wykres krzywej wzorcowej $A = aC + b$ dla rutyny (A – absorbancja; C – stężenie).

Do analizy pobrano 2 ml badanego roztworu¹ i dodano: 2 ml roztworu chlorku glinu, 3 ml roztworu octanu sodu. Dalsza część analizy przebiegała analogicznie jak przy pomiarze absorbancji dla roztworu wzorcowego. Przy pomocy równania krzywej wzorcowej, obliczono zawartość flawonoli w badanej próbce.

Oznaczanie sumy flawonoidów

Umieszczono 5,0 ml roztworu podstawowego w kolbie okrągłodennej i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość przeniesiono, używając 8 ml mieszaniny 10 objętości metanolu i 100 objętości bezwodnego kwasu octowego do kolby miarowej o objętości 25 ml. Przemycano kolbę okrągłodenną 3 ml mieszaniny: 10 objętości metanolu i 100 objętości bezwodnego kwasu octowego i przeniesiono do tej samej kolby miarowej pojemności 25 ml. Dodano 10 ml roztworu zawierającego 25 g/l kwasu borowego i 20,0 g/l kwasu szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym i uzupełniono bezwodnym kwasem octowym do 25,0 ml.

Odnośnik otrzymano przez umieszczenie 5,0 ml roztworu podstawowego w kolbie okrągłodennej i odparowanie do sucha, pod zmniejszonym ciśnieniem (badano tylko roztwory metanolowe). Następnie przeniesiono pozostałość, używając 8 ml mieszaniny: 10 objętości metanolu i 100 objętości bezwodnego

kwasu octowego do kolby miarowej pojemności 25 ml. Przemycano kolbę 3 ml mieszaniny 10 objętości metanolu i 100 objętości bezwodnego kwasu octowego, przeniesiono do tej samej kolby miarowej pojemności 25 ml. Dodano 10 ml bezwodnego kwasu mrówkowego i uzupełniono bezwodnym kwasem octowym do 25 ml. Po 30 min zmierzono absorbancję roztworu, przy długości fali $\lambda = 410$ nm.

Wyznaczanie aktywności antyoksydacyjnej za pomocą rodnika DPPH

Do interpretacji wyników pomiaru użyto parametru IC_{50} – określa on stężenie przeciwutleniacza, które powoduje spadek wyjściowego stężenia rodnika DPPH o 50%.

Odczynnik DPPH [2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl] sporządzono przez rozpuszczenie 0,0060 g DPPH w metanolu w kolbie miarowej o pojemności 100 ml owiniętej folią aluminiową. Uzupełniono do współmierności metanolem, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu 0,1 mM, który inkubowano przez 24 godz. w ciemnym miejscu, w temp. pokojowej. Następnie roztwór rozcieńczano metanolem tak, by jego absorbancja, mierzona przy długości fali $\lambda = 515$ nm, wynosiła ok. 1,0.

Wykonano po 10 powtórzeń dla każdego z podanych w tabelach stężeń. Wybrano 5 wyników. Do próbek typu Eppendorf o pojemności 2,0 ml (chronionych od światła) odpipetowano po 0,1 ml badanego wyciągu o danym stężeniu i następnie 1,9 ml odczynnika DPPH. Probówki dokładnie zmieszano. Po 30 min od dodania DPPH zmierzono absorbancję otrzymanych roztworów przy długości fali $\lambda = 515$ nm. Próbę odniesienia stanowiły roztwór DPPH w ilości 1,9 z 0,1 ml wody destylowanej, metanolu lub 50% roztworu metanolu w wodzie destylowanej. Przed pomiarem absorbancji próbek zmierzono w 5 powtórzeniach absorbancję własną roztworu DPPH.

Analiza GC-MS

Przygotowanie próbki do analizy GC-MS

Odważono 1 g sproszkowanego owocnika i ekstrahowano pod chłodnicą zwrotną chloroformem. Otrzymany ekstrakt przefiltrowano przez filtr 0,45 μ m, zatężono na wyparce, przeniesiono do fiolek i poddano analizie GC-MS.

Zastosowano następujące warunki chromatograficzne:

- chromatograf gazowy Varian 4000 GC z detekcją masową, energia elektronów 70 eV, źródło jonów w temperaturze 220°C,

¹ Z uwagi na wytrącanie się osadów podczas analizy wyciągów wodnych i wodno-metanolowych badano tylko roztwory metanolowe.

- chromatograf był wyposażony w kolumnę krzemionkową VF-5 ms (30 mx 0,25 mm x 0,39), $df = 0,25 \mu m$,
- jako gaz nośny został użyty hel,
- szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min,
- temperaturę pieca zaprogramowano na 60°C (utrzymywano przez 5 min), a następnie stopniowo zwiększano do 280°C z szybkością 15°C/min,
- identyfikacja związków została oparta na porównaniu ich czasu retencji, a także widm masowych z normami z NIST.

Indeks retencji Kovatsa

W celu obliczenia indeksu retencji Kovatsa dla poszczególnych związków nastrzyknięto wzorzec, składający się z alkanów C7-C37. Dla dowolnej substancji X indeks retencji Kovatsa wyznacza się w stosunku do retencji n-alkanów, jednego o (z) atomach węgla w cząsteczce, eluowanego z kolumny przed substancją i drugiego o (z + 1) atomach węgla w cząsteczce, eluowanego z kolumny po substancji, czyli $t'Rz < t'Rx < t'Rz + 1$.

Dyskusja i wnioski

Stratę masy po suszeniu oznaczono jako średnią (10,87%) z trzech niezależnych pomiarów (11,26; 10,69; 10,65).

W tabeli 1 przedstawiono wyniki oznaczeń sumy polifenoli (wyrażone w % w przeliczeniu na kwas kawowy), sumy kwasów fenolowych (% w przeliczeniu na kwas kawowy), sumy flawonoidów (% w przeliczeniu na hiperozyd) oraz sumy flawonoli (% w przeliczeniu na rutozyd).

Najwyższą zawartość sumy polifenoli oznaczono w wyciągu wodnym (1,85%), a najniższą w wyciągu metanolowym (1,01%).

Wyciąg metanolowy charakteryzował się najwyższą zawartością sumy kwasów fenolowych (0,127%). Najniższą ilość zaobserwowano w wyciągach wodno-metanolowych (0,047%).

Z uwagi na wytrącający się osad, który przeszkadzał w dalszych oznaczeniach, pomiar zawartości sumy flawonoidów i sumy flawonoli przeprowadzono wyłącznie dla wyciągów metanolowych. Najprawdopodobniej duża zawartość polisacharydów odpowiadała za pojawienie się osadu po dodaniu odczynników reakcyjnych.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z błyskoporka podkorowego wyrażonej współczynnikiem IC_{50} .

Najniższą wartość parametru IC_{50} wyznaczono dla wyciągu wodno-metanolowego, następnie wodnego i metanolowego.

Wykonano analizę jakościową chloroformowego wyciągu z *Inonotus obliquus* metodą GC-MS. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie czasów retencji oraz porównania widm masowych z normami z NIST. Obliczono także indeks retencji Kovatsa, który charakteryzuje związek dla tej samej kolumny i eluentu.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy jakościowej chloroformowego wyciągu z błyskoporka podkorowego metodą GC-MS oraz obliczenia

Tab. 2. Aktywność antyoksydacyjna wyciągów z błyskoporka podkorowego oznaczona przy użyciu DPPH

Rodzaj wyciągu	Współczynnik IC_{50} (mg/ml)
wodny	0,011
metanolowo-wodny	0,008
metanolowy	0,018

Tab. 1. Zawartość sumy związków polifenolowych w badanych wyciągach (w %)

Rodzaj wyciągu	Suma polifenoli*	SD	Suma kwasów fenolowych**	SD	Suma flawonoidów***	SD	Suma flawonoli****	SD
wodny	1,85	0,11	0,063	0,002	n.o.		n.o.	
metanolowo-wodny	1,46	0,21	0,047	0,009	n.o.		n.o.	
metanolowy	1,01	0,03	0,127	0,008	0,193	0,019	0,351	0,012

*w przeliczeniu na kwas kawowy

**w przeliczeniu na kwas kawowy

***w przeliczeniu na hiperozyd

****w przeliczeniu na rutozyd

n.o. – nie oznaczano

SD – odchylenie standardowe

Tab. 3. Wyniki analizy GC-MS wyciągu chloroformowego z *Inonotus obliquus* oraz obliczony indeks retencji Kovatsa

Wzór sumaryczny	Związek chemiczny	Czas retencji	Indeks ret. Kovatsa	Wzór sumaryczny	Związek chemiczny	Czas retencji	Indeks ret. Kovatsa
		(min)	Ik			(min)	Ik
C ₆ H ₁₄ O ₂	2,2-Dimetoksybutan	4,147	766	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	Etyleno-pregna-5,9(11)-dien-20-ol-3-on	12,777	1508
C ₅ H ₈ O ₂	Acetyloaceton	4,524	786	C ₁₅ H ₂₄	α-Selinen	12,849	1517
C ₆ H ₁₂ O	Heksanal	4,871	804	C ₁₉ H ₄₀	Nonadekan	12,958	1531
C ₈ H ₁₈	3-Etyloheksan	5,165	826	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	4-Etoksy-ester etylowy kwasu benzoowego	13,017	1538
C ₇ H ₁₄ O	3-Metylo-2-heksanon	5,793	866	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	Dietyloftalat	13,522	1601
C ₈ H ₁₀	Etylobenzen	5,839	869	C ₉ H ₁₀ O ₄	Syringaldehyd	14,086	1675
C ₈ H ₈	Bicyklo(4.2.0)okta-1,3,5-trien	6,313	896	C ₁₅ H ₃₂	Pentadekan	14,251	1697
C ₉ H ₁₂	p-Etylotoluen	7,281	969	C ₁₇ H ₃₆	Heptadekan	14,569	1741
C ₈ H ₈ O ₃	2,2-Dihydroksy-1-fenilo-etanon	7,328	972	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	7,9-Di-tert-butyl-1-oksaspiro(4,5)deka-6,9-dien-2,8-dion	15,821	1922
C ₆ H ₁₂ O ₂	Kwas heksanowy	7,388	976	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	kwas n-Heksadekanowy	16,069	1960
C ₉ H ₂₀	2,2-Dimetyloheptan	7,619	992	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	Dibutyloftalat	16,135	1970
C ₉ H ₁₂	o-Etylotoluen	7,727	999	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Kwas linolowy	17,185	2138
C ₁₀ H ₂₀ O	Lewomentol	9,862	1189	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	9,17-Oktadekadienal	17,223	2144
C ₁₀ H ₁₄ O	Tymol	10,596	1264	C ₃₅ H ₄₆ O ₂	9(11)-Dehydroergosterol benzoat	23,628	3010
C ₁₆ H ₃₄	2,2,4,4,6,8,8-Heptametylononan	11,185	1326	C ₃₀ H ₅₀ O	Lanosterol	30,646	3360
C ₉ H ₂₀	2,2,3,3-Tetrametylopentan	11,268	1335	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	17-(2-Hydroksy-1,5-dimetylo-heksa-4-enyl)-4,4,10,13,14-pentametylo-2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahydro-1H-cyclopenta{a}fenantren	39,077	3587
C ₇ H ₁₂ O ₅	1,2-Diacetyloglicerol	11,303	1339				
C ₈ H ₈ O ₃	Izowanilina	11,997	1416				
C ₁₅ H ₂₄	Santalen	12,153	1435				
C ₁₅ H ₂₄	α-Bergamoten	12,258	1447				

indeksu retencji Kovatsa dla poszczególnych związków. Wyszczególniono związki, których zawartość w badanym wyciągu wynosiła powyżej 0,1%.

Analiza GC-MS pozwoliła zidentyfikować m.in.: izowanilinę (środek zapachowy), santalen (seskwiterpen o właściwościach antyseptycznych) (21), α-selinen (właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze) (22), aldehyd syringowy (właściwości przeciwzapalne) (23), kwas linolowy (działanie przeciwmiażdżycowe, przeciwnowotworowe) (24), tymol (działanie antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, antyseptyczne) (25),

α-bergamoten (działanie uspokajające), lanosterol (działanie przeciwnowotworowe) (26).

Wnioski

Największa zawartość sumy polifenoli została oznaczona w wyciągu wodnym z *Inonotus obliquus*, a najniższa w wyciągu metanolowym. Zawartość sumy kwasów fenolowych okazała się najwyższa dla wyciągu metanolowego, a najniższa dla metanolowo-wodnego. Wyciąg wodno-metanolowy z błyskoporka podkorowego charakteryzował się najsilniejszymi właściwościami

antyoksydacyjnymi (najniższy współczynnik IC_{50}). Wysoka zawartość związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów, jak również wysoka aktywność antyoksydacyjna potwierdzają, że *Inonotus obliquus* jest gatunkiem bogatym w związki o działaniu

antyoksydacyjnym, co uzasadnia stosowanie błyskoporka podkorowego w prewencji i pomocniczo w leczeniu chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworowych. Analiza GC-MS wykazała obecność licznych związków o znanej aktywności biologicznej.

Piśmiennictwo

- Zhong X-H, Ren K, Shi-jie L. Progress of research on *Inonotus obliquus*. Chin J Integr Med 2009; 15(2):156-60.
- Lee MW, Hur H, Chang KC. Introduction to distribution and ecology of sterile conks of *Inonotus obliquus*. Mycobiol 2008; 36(4):199-202.
- Park YM, Won JH, Kim YH i wsp. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. J Ethnopharmacol 2005; 101:120-8.
- Kim YR. Immunomodulatory activity of the water extract from medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. Mycobiol 2005; 33(3):158-62.
- Kim YO, Han SB, Lee HW i wsp. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. Life Sci 2005; 77:2438-56.
- Staniszewska J, Szymański M, Ignatowicz E. Antitumor and immunomodulatory effects of *Inonotus obliquus*. Herba Pol 2017; 63(2):48-58.
- Youn MJ, Kim JK, Park SY i wsp. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. World J Gastroenterol 2008; 14(4):511-7.
- Youn MJ, Kim JK, Park SY i wsp. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells, J Ethnopharmacol 2009; 121:221-8.
- Chen C, Zheng W, Gao X i wsp. Aqueous Extract of *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat (*Hymenochaetaceae*) significantly inhibits the growth of sarcoma 180 by inducing apoptosis. Am J Pharmacol Toxicol 2007; 2(1):10-7.
- Duru KC, Kovaleva EG, Danilova IG i wsp. The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of *Inonotus obliquus* from preclinical studies. Phytother Res 2019; 33:1966-80.
- Ichimura T, Otake T, Mori H i wsp. HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble ligninlike substance. Biosci Biotechnol Biochem 1999; 63(12):2202-4.
- Brandt CR, Piraino F. Mushroom antivirals. Recent Res Dev Antimicrob Agents Chemother 2000; 4:11-26.
- Hyun KW, Jeong SC, Lee DH i wsp. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. Peptides 2006; 27:1173-8.
- Yoon TJ, Lee SJ, Kim EY i wsp. Inhibitory effect of chaga mushroom extract on compound 48/80-induced anaphylactic shock and IgE production in mice. International Immunopharmacology 2013; 15:666-70.
- Mizuno T, Zhuang C, Kuniaki A i wsp. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the Sclerotia and Mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (*Aphyllophoromycetidae*). Int J Med Mushrooms 1999; 1(4):301-16.
- Szychowski KA, Skóra B, Pomianek T i wsp. *Inonotus obliquus* – from folk medicine to clinical use. J Tradit Complement Med 2021; 11(4):293-302.
- Lee IK, Kim YS, Jang YW i wsp. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. Bioorg & Med Chem Lett 2007; 17:6678-81.
- Zhao F, Mai Q, Ma J i wsp. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. Fitoter 2015; 101:34-40.
- Kang J-H, Jang J-E, Mishra SK i wsp. Ergosterol peroxide from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the β -catenin pathway in colorectal cancer. J Ethnopharmacol 2015; 173:303-12.
- Babitskaia VG, Shcherba VV, Ikonnikova NV. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus*. Prikl Biokhim Mikrobiol 2000; 36(4):439-44.
- Tippman S, Scalcinati G, Siewers V i wsp. Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with RQ- controlled feed, Biotechnol Bioengineer 2016; 113:72-81.
- Akter K, Barnes EC, Loa Kum Cheung WL i wsp. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterization of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). J Ethnopharmacol 2016; 185:171-81.
- Zhong J, Huang CG, Yu YJ i wsp. Chemical constituents from *Perovskia atriplicifolia*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2015; 40(6):1108-13.
- Ransden CE, Zamora D, Majrzcak-Hong S i wsp. Re-evaluation of the traditional diet-heart hypothesis analysis of recovered data from Minnesota Coronary Experiment (1968-73) 2016; 353:1246.
- Coccimiglio J, Alipour M, Jiang HZ i wsp. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. Oxidative Med Cell Longev 2016; 9:1404505.
- Lishuai M, Haixia C, Peng D i wsp. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. Food Chem 2013; 139:503-8.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 07.02.2022

zaakceptowano/accepted: 14.02.2022

Adres/address:

*dr n. rol. Marcin Szymański
Centrum Zaawansowanych Technologii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10
61-614 Poznań
e-mail: marcin.szymanski@amu.edu.pl