

Pharm(中华中医药杂志), 2008, 23(7): 572-577.

- [7] ZHANG Y Q, WANG P, JI Y J, et al. Theory of traditional Chinese medicine medicinal material [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med(山东中医药大学学报), 2011, 35(4): 291-295.
- [8] TANG S H, YANG H J, HUANG L Q. Discussion of concept, formation and significance of traditional Chinese medicine property [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2010, 51(4):

293-296.

- [9] XIA D S. Using taboo and toxicity control of toxic medical materials in Chinese pharmacopoeia 2010 [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(7): 640-643.
- [10] WANG Z, ZHANG P J. Associated research on the traditional Chinese medicine nature [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(8): 859-863.

收稿日期: 2013-02-18

桦褐孔菌多糖的提取工艺优化

宗时春¹, 俞兆程², 赵德义², 张康健², 高锦明^{2*} (1.西安邮电大学医院, 西安 710061; 2.西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 目的 研究桦褐孔菌多糖提取工艺优化。方法 以多糖含量为指标, 在单因素研究基础上, 采用 4 因素 3 水平的响应面分析法对桦褐孔菌多糖的提取工艺进行优化研究, 并检测重金属砷的含量。结果 桦褐孔菌多糖提取的优化工艺条件为: 乙醇浓度 30%、提取温度 95 °C、提取时间 2.5 h、液料比 30 : 1。在该条件下, 粗多糖得率为 33.6%, 样品中多糖含量为 6.177%。桦褐孔菌多糖实际提取含量为 5.993%, 重金属含量降低。结论 优化工艺提取率高, 快速, 重金属含量低, 可用于桦褐孔菌的多糖提取。

关键词: 桦褐孔菌; 多糖; 提取; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)02-0167-06

Optimization of Extraction Technology for Polysaccharides in *Inonotus Obliquus*

ZONG Shichun¹, YU Zhaocheng², ZHAO Deyi², ZHANG Kangjian², GAO Jinming^{2*} (1.Division of Medical Clinic, Xi'an University of Posts and Telecommunications, Xi'an 710061, China; 2.College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction process for polysaccharides in *Inonotus obliquus*. **METHODS** The content of *Inonotus obliquus* polysaccharides was used as index based on the one-factor tests, and the method of response surface method with 4 factors and 3 levels was adopted. The content of heavy metal in the extraction was detected. **RESULTS** The optimum conditions of *Inonotus obliquus* polysaccharides extraction as follows: ethanol concentration was 30%, extraction temperature was 95 °C, time of extraction was 2.5 h and the ratio of material to solvent was 30 : 1. Response surface analysis predicted that the production of crude polysaccharide was 33.6% and the content of polysaccharide was 6.177%, respectively. By using verification test, *Inonotus obliquus* polysaccharides reached 5.993% without significant difference compared with the prediction. And the level of heavy metal significantly decreased. **CONCLUSION** The optimized extraction process can obtain high extraction rate, low level of heavy metal content, and can be used for extraction of *Inonotus obliquus* polysaccharides.

KEY WORDS: *Inonotus obliquus*; polysaccharides; extraction; response surface method

桦褐孔菌是一种寄生在落叶树上的菌, 主要寄生于白桦树、银桦、赤杨等的树干或树皮, 形成不育的木腐菌, 属于多孔菌科褐卧孔菌属^[1]。

桦褐孔菌是前苏联各共和国、波兰、日本等国的民间常用药物, 其有效成分已引起美国、日本、韩国等国研究者的广泛重视。16 世纪至今, 东欧一些国家的民间就用这种菌的菌核来防治癌

症^[2]。西伯利亚的 Khanty 人用这种菌来预防和治疗心脏病、肝病、胃病和食道病等。1955 年, 被俄罗斯医学研究院用来治疗肿瘤, 特别是胃部和肺部的肿瘤^[3]。近期研究表明, 桦褐孔菌能抑制艾滋病病毒(HIV-1)^[4]、抗辐射, 并通过抑制蛋白质生物合成、抗有丝分裂及消除自由基活性等作用来抑制或延缓肿瘤细胞的生长和防治

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0852)

作者简介: 宗时春, 女, 副教授 Tel: (029)8770689 E-mail: zongsc@tel.edu.cn
(029)87092515 E-mail: jinminggao@nwsuaf.edu.cn

*通信作者: 高锦明, 男, 博士, 博导, 教授 Tel:

O-157 大肠杆菌中毒。相关文献载, 俄罗斯堪索莫乐斯基制药公司生产的桦褐孔菌精粉对高血压的有效率达 93%^[5]。随着对桦褐孔菌化学成分研究的不断深入, 大量的活性物质被分离出来, 已报道的成分除真菌多糖外还含有桦褐孔菌醇、栓菌酸、桦褐孔菌素、木质素、黑色素和三萜类等 200 多种化学成分^[6]。国外桦褐孔菌的降血糖作用研究已成为热点^[7-10], 国内的研究报道较少^[8]。本试验通过溶剂提取法对桦褐孔菌中多糖类物质提取率进行了研究。

响应面优化法(response surface methodology, RSM)对工艺优化和处方筛选是一种高效的方法, 通过合理的试验设计拟合因素与响应值之间的函数关系, 以寻求最优工艺参数^[11], 已被广泛地应用于农业、生物、食品、化学、制造、药学^[12-13]等领域。

目前, 对桦褐孔菌多糖的提取主要采用纯水提取工艺^[14-15]。但是, 这种方法提取多糖耗时长、且对溶剂的使用量也较大, 而且多糖得率较低^[16], 重金属含量较高, 特别是砷含量大多超标, 其产品往往达不到国家标准。为此, 本研究对桦褐孔菌多糖提取工艺的优化进行了系统研究, 旨在为桦褐孔菌多糖的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

桦褐孔菌产自黑龙江大兴安岭地区, 经西北农林科技大学植物分类专家杜双田教授鉴定为 *Inonotus obliquus*, 粉碎过 30 目筛备用。

1.2 试剂与仪器

无水乙醇(西安三普化学试剂厂)、苯酚(天津博迪化学试剂厂)、浓硫酸(西安化学试剂厂)、葡萄糖(天津博迪化学试剂厂, 批号: 120605)均为分析纯。

FA2004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); DK-S22 电热恒温水浴锅(上海精密实验设备有限公司); B2F-30 电热真空干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); BX-0.5 型旋转式真空泵(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); UV-1200 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 桦褐孔菌多糖提取工艺流程

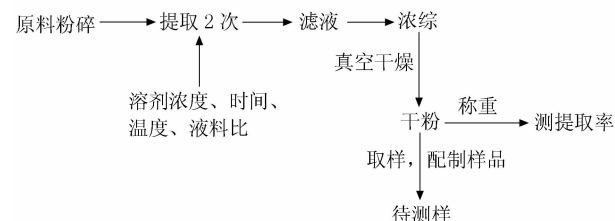


图 1 桦褐孔菌多糖提取工艺

Fig 1 The extraction process of *Inonotus obliquus* polysaccharides

1.3.2 桦褐孔菌多糖测定 取提取物 10 mg 加蒸馏水定容至 100 mL, 配制成 0.1 mg·mL⁻¹ 溶液待测。样品多糖含量测定使用紫外可见分光光度计, 采用苯酚硫酸法测定。以葡萄糖为标准品制作标准曲线, 得回归方程为: $Y=11.79X+0.013$, $r=0.9997$, 线性范围为 0.02~0.1 mg·mL⁻¹。以下式计算多糖得率: 多糖得率(%)=多糖质量/原料质量×100%。

2 结果与分析

2.1 单因素分析

影响桦褐孔菌多糖提取的因素很多, 在进行 RSM 分析前应先通过单因素试验选取试验因素与水平, 本试验通过一系列单因素试验研究不同溶剂浓度、提取温度、提取时间和料液比对桦褐孔菌多糖提取率的影响。

以下实验均以控制其中 3 个提取因素, 对另一因素进行变化试验。控制条件为乙醇浓度 30%, 提取温度 80 °C, 浸提时间 2 h, 液料比 30:1, 连续提取 2 次。不同提取工艺参数下的单因素试验结果见图 2~5。

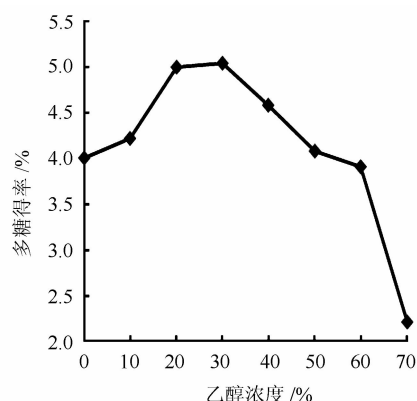


图 2 溶剂浓度对桦褐孔菌多糖提取率的影响

Fig 2 Effects of different concentrations on the extraction yields of polysaccharides

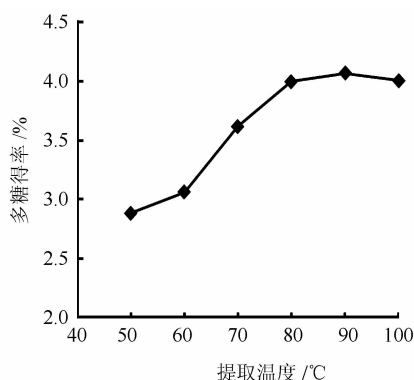


图3 提取温度对桦褐孔菌多糖提取率的影响
Fig 3 Effects of different temperatures on the extraction yields of polysaccharides

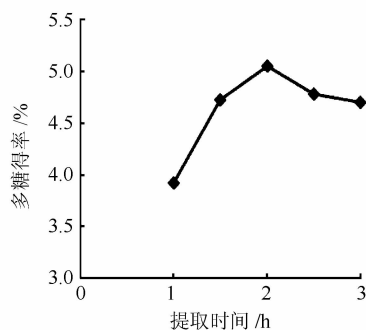


图4 提取时间对桦褐孔菌提取率的影响
Fig 4 Effects of different time on the extraction yields of polysaccharides

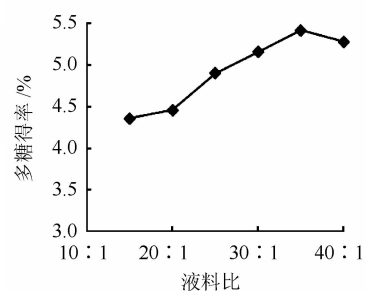


图5 液料比对桦褐孔菌多糖提取率的影响
Fig 5 Effects of different ratio of material to solvent on the extraction yields of polysaccharides

由图2可见,乙醇浓度在0%~30%内,多糖提取率随溶剂浓度的升高而升高,而从30%之后开始,随着溶剂浓度的升高反而呈下降趋势。其原因可能是多糖不溶于高浓度乙醇溶液,但在低浓度乙醇中溶解度高,特别是30%乙醇高于纯水溶剂。

由图3可见,提取温度在50~80℃内,多糖提取率随着温度升高而显著增加,而80~90℃内温度的变化对多糖提取率几乎没有影响,90℃后开始出现下降的趋势,可能与提取温度较高致使其他物质有较多的溶解或多糖在高温下降解有关。

由图4可见,随着提取时间的增加,桦褐孔

菌多糖提取率先增后降,渐渐平缓。这可能与提取时间较长致使其他物质有较多的溶解有关。在2h时达到最大值,因此提取时间以2h为宜。

由图5可见,随着液料比的增加,多糖提取率不断增加,提取率在35:1之前增加较为明显,以后趋于平缓,故液料比以35:1为宜。

2.2 响应面分析及回归方程的建立

通过以上的单因素试验后,对桦褐孔菌多糖提取工艺中的乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比有了初步的研究。但需要更细化,得到更精确的桦褐孔菌多糖的优化提取工艺。故以多糖提取率为响应值,乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比为自变量进行分析,根据单因素试验结果,采用中心组合设计优化桦褐孔菌多糖的提取工艺,自变量因素编码及水平见表1,试验方案和结果见表2。

表1 因素水平编码表

水平	A 乙醇浓度/%	B 提取温度/°C	C 提取时间/h	D 液料比
-1	25	75	1.5	30:1
0	30	85	2.0	35:1
1	35	95	2.5	40:1

表2 响应面试验方案及结果

试验号	A 乙醇浓度/%	B 提取温度/°C	C 提取时间/h	D 液料比	多糖提取率/%
1	-1	0	0	1	4.562
2	0	-1	-1	0	4.028
3	0	-1	0	-1	4.206
4	1	0	-1	0	4.756
5	1	0	1	0	5.014
6	-1	0	0	-1	4.247
7	0	1	-1	0	4.757
8	-1	0	1	0	4.618
9	-1	0	-1	0	4.034
10	0	1	0	-1	6.036
11	0	0	1	-1	5.665
12	0	0	-1	-1	4.657
13	-1	-1	0	0	3.918
14	1	1	0	0	5.169
15	0	-1	0	1	4.415
16	0	0	0	0	5.237
17	0	0	1	1	5.233
18	-1	1	0	0	4.960
19	0	-1	1	0	4.062
20	0	0	-1	1	5.162
21	1	-1	0	0	4.224
22	0	0	0	0	4.998
23	0	1	0	1	4.774
24	0	0	0	0	4.861
25	1	0	0	1	4.589
26	0	0	0	0	4.949
27	0	1	1	0	5.048
28	1	0	0	-1	4.683
29	0	0	0	0	5.017

2.2.1 回归方程 根据试验设计,运用 Design expert 8.0 进行数据分析,得到桦褐孔菌多糖提取率的二次多元回归模拟方程为:

$$\text{多糖提取率} = 5.01 + 0.17A + 0.49B + 0.19C - 0.063D - 0.024AB - 0.082AC - 0.10AD + 0.064BC - 0.37BD - 0.23CD - 0.36A^2 - 0.26B^2 - 0.078C^2 + 0.072D^2$$

2.2.2 方差分析 方差分析结果表明,该二次响应面模型 P 值为 0.0015,达到极显著水平($P < 0.01$)。失拟项 $P = 0.0651$,表明其相对于纯误差而言为不显著($P > 0.05$)。该回归模型决定系数 $r = 0.9197$,说明模型拟合程度较好。结果见表 3。

从表 3 中还可以看出,温度($P = 0.0001 < 0.01$)对多糖提取率影响极显著。不同因素对多糖提取率的影响程度为:提取温度 > 提取时间 > 乙醇浓度 > 料液比。

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance of the extraction yields of polysaccharides

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5.86	14	0.42	5.48	0.0015	¹⁾
A-乙醇浓度	0.37	1	0.37	4.80	0.0459	²⁾
B-温度	2.89	1	2.89	37.92	<0.0001	¹⁾
C-时间	0.42	1	0.42	5.51	0.0341	²⁾
D-料液比	0.048	1	0.048	0.63	0.4408	
AB	2.352E-003	1	2.352E-003	0.031	0.8631	
AC	0.027	1	0.027	0.35	0.5644	
AD	0.042	1	0.042	0.55	0.4712	
BC	0.017	1	0.017	0.22	0.6489	
BD	0.54	1	0.54	7.09	0.0185	²⁾
CD	0.22	1	0.22	2.88	0.1119	
A ²	0.84	1	0.84	11.03	0.0050	¹⁾
B ²	0.43	1	0.43	5.63	0.0325	²⁾
C ²	0.039	1	0.039	0.51	0.4857	
D ²	0.033	1	0.033	0.44	0.5191	
残差	1.07	14	0.076			
失拟项	0.99	10	0.099	5.10	0.0651	
纯误差	0.078	4	0.019			
总差	6.92	28				
R ²	0.8458					

注: ¹⁾ $P < 0.01$; ²⁾ $P < 0.05$

Note: ¹⁾ $P < 0.01$; ²⁾ $P < 0.05$

2.2.3 响应面分析 各提取因素的交互作用对多糖提取率的影响见图 6~11。

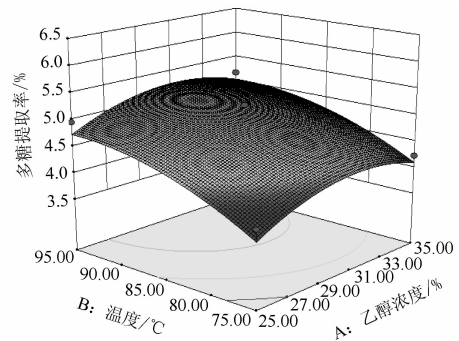


图 6 温度和乙醇浓度对多糖提取率的影响

Fig 6 Effects of different temperatures and concentrations of ethanol on extraction yields of polysaccharides

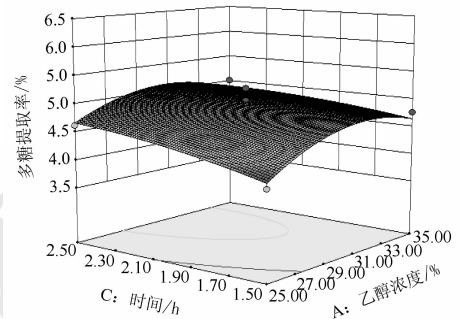


图 7 时间与乙醇浓度对多糖提取率的影响

Fig 7 Effects of different time and concentrations of ethanol on the extraction yields of polysaccharides

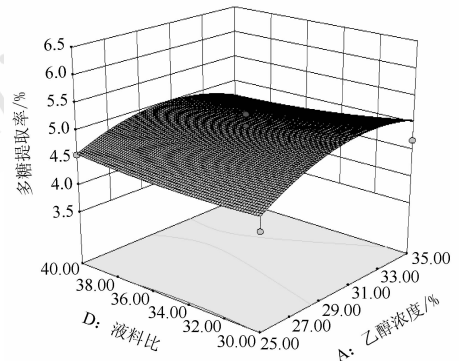


图 8 液料比与乙醇浓度对多糖提取率的影响

Fig 8 Effects of different ratio of material to solvent and temperatures on the extraction yields of polysaccharides

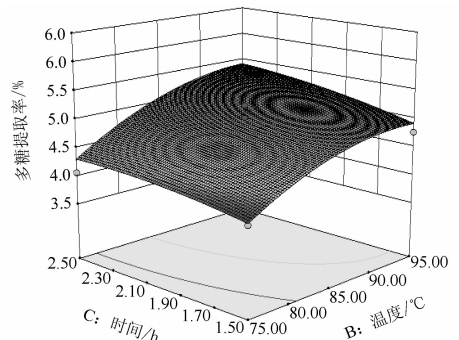


图 9 时间与温度对多糖提取率的影响

Fig 9 Effects of different time and temperatures on the extraction yields of polysaccharides

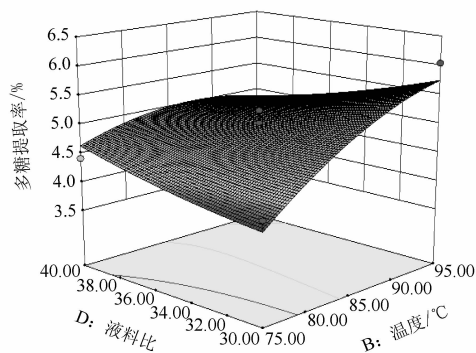


图 10 液料比与温度对多糖提取率的影响

Fig 10 Effects of different ratio of material to solvent and temperatures on the extraction yields of polysaccharides

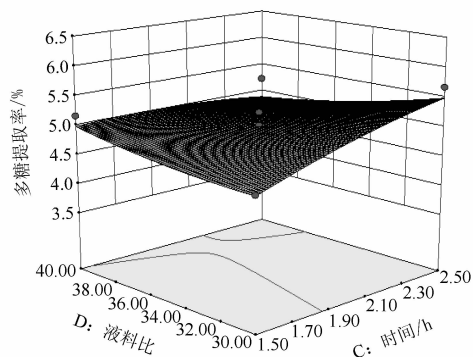


图 11 液料比与时间对多糖提取率的影响

Fig 11 Effects of different ratio of material to solvent and time on the extraction yields of polysaccharides

图 6~11 直观反映了各因素对响应值的影响。从这 6 个图可知, 等高线密度随提取温度的增加而增加。随着乙醇浓度的升高表现为先增后降, 在乙醇浓度 30% 左右达到最大。随着提取时间延长, 多糖得率逐渐增加。所以, 提取温度对桦褐孔菌多糖得率的影响最为显著, 表现为等高线陡峭; 溶剂浓度和提取时间也较为显著, 表现为等高线较为陡峭, 液料比的影响最小, 表现为曲线较平缓。通过响应面分析法可知, 桦褐孔菌得率达到最高时的条件参数为: 乙醇浓度 30%、温度 95 °C、时间 2.5 h、液料比 30 : 1, 预测多糖得率为 6.177%。

3 验证试验

为检验响应面法所建立的数学模型的可靠性, 采用上述最优提取条件进行验证试验, 结果粗多糖平均提取率为 33.6%, 多糖平均提取率为 5.993%, RSD 为-0.184%。

实际测得的桦褐孔菌粗多糖提取率为 33.6%, 多糖含量的平均得率为 5.993%, 与理论预测值相近(6.177%)。表明所建的数学模型有较好的预测

性, 采用 RSM 法优化得到的提取桦褐孔菌多糖的参数准确可靠, 具有实用价值。

4 不同溶剂对提取物中重金属含量的影响

提取温度、时间、液料比以响应面得到的最佳条件为准, 分别用 0%~70% 的乙醇溶液做溶剂进行提取, 最后检测各提取物中的 As, Hg 含量。检测仪器为原子吸收仪, 检测方法: 原子荧光分光光度法, 检测条件及参数: GB/T 5009-2003。结果见图 12。

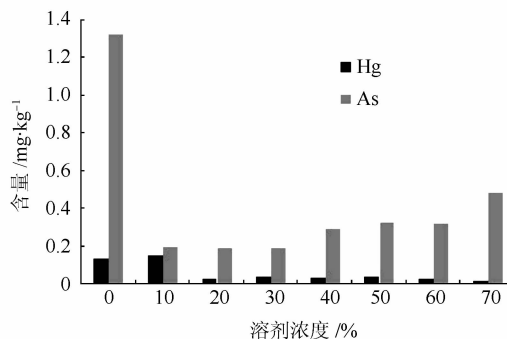


图 12 不同溶剂中提取物的重金属含量

Fig 12 The heavy metal content of the extract in different solvents

由图 12 可见, 不同提取溶剂对提取物中重金属含量影响较大, 用乙醇溶剂得到的提取物中重金属明显比纯水提取物中的含量低, 特别是对砷的含量影响差异极显著。

综合响应面试验结果, 最终确定提取溶剂为 30% 乙醇溶液。

5 讨论

在单因素试验基础上, 利用响应面分析法对试验进行优化设计, 得出桦褐孔菌多糖提取的最佳工艺条件为: 在 95 °C 提取温度下, 乙醇浓度 30%、液料比 30 : 1、提取时间 2.5 h。根据最佳工艺条件试验多糖含量为 5.993%, 与理论预测值相近(6.177%)。说明采用响应面法优化的提取条件可靠, 具有实际应用价值。

本试验用 30% 乙醇为溶剂的优化工艺提取桦褐孔菌多糖, 与传统的水提工艺相比, 明显的提高了粗多糖的提取率和提取物中多糖的含量, 使得粗多糖提取率达到了 33.6%, 多糖含量达到了 5.993%, 比水提工艺粗多糖得率提高了近 2 倍(17%), 多糖含量提高了 2.9 倍(2.068%)^[17]。并且 30% 乙醇做溶剂还大大的降低了提取物中重金属的含量。

砷在土壤中多以砷酸盐状态存在, 植物吸收的砷酸盐物质, 极易溶解于水而不易溶解于乙醇。这就是说, 在桦褐孔菌多糖提取中, 以纯水作为溶剂时, 水对砷物质起到了一种富集作用。因此, 桦褐孔菌多糖提取时以 30%乙醇作为溶剂, 可大大的降低产品中砷的含量。

30%乙醇为溶剂的优化工艺, 由于采用 30%乙醇作为溶剂, 有可能从桦褐孔菌中提取出更多的天然活性物质, 这有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] LIANG Q L, WANG Q Y, FAN J H, et al. A survey of *Inonotus obliquus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(4): 623-625.
- [2] LIU Y Q, BAO H Y. Chemical constituents and pharmacological effects of *Inonotus obliquus* [J]. Edib Fungi China(中国食用菌), 2008, 27(4): 34-39.
- [3] PEGLER D N. Useful fungi of the world: Amadou and chaga [J]. Mycologist, 2001, 15(4): 153-154.
- [4] MIZUNO T, ZHUANG C, ABE K, et al. Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. Part X X VII [J]. Mushroom Sci Biotechnol, 1996, 3(2): 53-60.
- [5] HUANG N L. The mystic folk medicinal fungi of Russian [J]. Edib Fungi China(中国食用菌), 2002, 21(4): 7-8.
- [6] ZHANG X, ZHAO F Q, HAN G, et al. Chemical constituents and anti-inflammatory activities of *Inonotus obliquus* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010(22): 433-436.
- [7] ZHONG X H, REN K, LU S J, et al. Progress of research on *Inonotus obliquus* [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(2): 156-160.
- [8] SUN J E, AO Z H, LU Z M, et al. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 118(1): 7-13.
- [9] MIZUNO T, ZHUAN G C, ABE K, et al. Antitumor and hypoglycaemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Int J Med Mushrooms, 1999, 1(4): 301-316.
- [10] LU X, CHEN H, DONG P, et al. Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus* [J]. J Sci Food Agric, 2010, 90(2): 276-280.
- [11] YANG W X, GAO Y X. Response surface methodology & its application in food industry [J]. China Food Additives(中国食品添加剂), 2005(2): 68-71.
- [12] QIU K F, HUANG S H, CAI B L, et al. Optimization of triamcinolone acetonide-loaded solid lipid nanoparticles formula by central composite design and response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(10): 920-924.
- [13] CAO J, WANG F G, LIU K, et al. Study on the extraction of Dictamn Cortex with ultrasonic wave technology optimized by central composite design and response surface method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(10): 895-899.
- [14] XU H Y, SUN J E, LU Z M, et al. Optimization of extraction technique of polysaccharides from fermentation powder of *Inonotus obliquus* [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2008, 34(11): 175-178.
- [15] LU C T, ZHANG J S, XU C L, et al. Investigation of the extraction technology of polysaccharide and triterpenes from *Inonotus obliquus* fruit body [J]. J Henan Agric Univ(河南农业大学学报), 2010, 44(4): 456-46.
- [16] LI J J, JU Y L, LI Y. Study on the extraction and determination of polysaccharides in *Inonotus obliquus* [J]. Hubei Agric Sci(湖北农业科学), 2009, 48(12): 3133-3135.

收稿日期: 2013-03-10

响应面法优化 CO₂ 超临界萃取紫花地丁总黄酮的工艺研究

范晓良¹, 颜继忠², 张纯³, 阮伟峰¹(1.嘉兴市中医医院药学部, 浙江 嘉兴 314001; 2.浙江工业大学药学院, 杭州 310032; 3.嘉兴行健生物科技有限公司, 浙江 嘉兴 314006)

摘要: 目的 采用 CO₂ 超临界萃取技术, 优化从紫花地丁中萃取总黄酮的工艺条件。方法 采用紫外可见分光光度法测定总黄酮含量, 以总黄酮萃取率为指标, 通过响应面法考察工艺条件。结果 最佳工艺条件为: 萃取压力 35 MPa、萃取温度 54 ℃、夹带剂流速 0.48 mL·min⁻¹, 乙醇浓度 80%, 萃取时间 120 min, 实际总黄酮萃取率为 5.89%。对萃取率影响最大的因素是萃取压力和萃取温度。结论 CO₂ 超临界流体萃取紫花地丁总黄酮得率高, 溶剂用量少, 工序简单可行。

关键词: CO₂ 超临界萃取; 紫花地丁; 总黄酮; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)02-0172-07

Optimization of Technology for Supercritical CO₂ Extraction of Total Flavones from *Viola Yedoensis* Makino by Response Surface Method

作者简介: 范晓良, 男, 硕士, 中药师 Tel: (0573)82096578

E-mail: fanxiaoliang1022@163.com