

均匀设计优化桦褐孔菌多糖提取工艺的研究*

□孙海峰** 孙慧峰 郭冷秋 郭雪莹 曹玲 李建武

(黑龙江中医药大学药学院 哈尔滨 150040)

摘要:目的:优化桦褐孔菌多糖的提取工艺。方法:采用均匀设计分别对影响提取和醇沉的因素进行优化。结果:最佳提取工艺为固液比 1:15,提取时间 90min,提取次数 2 次。最佳醇沉工艺为生药浓度 $1.0\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乙醇终浓度 65%。结论:优化的桦褐孔菌多糖提取工艺和醇沉工艺经济、稳定、合理可行。

关键词:桦褐孔菌 多糖 工艺 水提醇沉 均匀设计法

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.024

桦褐孔菌 *Fuscclporia obliqa*(Pers:Fr.)Aoshi 或 *I-nonotus obliquus*(petspilat)为多孔菌科褐卧孔菌属药用真菌,以子实体药用。生于白桦、银桦、榆树、赤杨等活立木的树皮或砍伐后树木的枯干上。主要分布于北半球北纬 $45^{\circ}\sim 50^{\circ}$ 的地区,包括北美(北部)、芬兰、波兰、俄罗斯(西西伯利亚远东部分、堪察加半岛)、中国黑龙江、吉林省(长白山)、日本(北海道)。16~17 世纪以来,东欧、俄罗斯等民间广泛利用这种真菌来防治各种疑难杂症,如各种癌病(胃癌、肝癌、食道癌、肠癌等各种消化器官的癌症)、心脏病、白血病、糖尿病,效果显著^[1]。现代药理研究表明,桦褐孔菌具有显著的降血糖作用,并且几乎无毒副作用^[2]。但是目前对桦褐孔菌多糖的提取工艺研究并不多,而且仅采用正交试验的方法,只能对工艺条件做较粗的优选^[3]。而均匀设计法能对工艺条件进行更好的优化,因此本实验采用均匀设计试验法,以桦褐孔菌

多糖提取率为指标,分别优化了桦褐孔菌多糖的提取工艺和醇沉工艺,以得到最佳的多糖提取条件,为桦褐孔菌多糖开发利用奠定基础。

一、仪器与材料

1. 仪器

SP-722E 型可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;FA1004N 型电子天平,上海精密科学仪器有限公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;电热套,天津市泰斯特仪器有限公司;电炉子,天津市泰斯特仪器有限公司;圆底烧瓶,冷凝管,烧杯,玻璃棒,量筒,布氏漏斗。

2. 试剂

无水乙醇,分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;丙酮、乙醚,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;95%乙醇,分析纯,天津市津东天正精细化工试剂厂;苯酚,分析纯,天津市华东试剂厂;葡萄糖对照品,分析纯,天津市石英钟厂霸州市化工分厂。

收稿日期:2010-03-31

修回日期:2010-09-07

* 黑龙江省教育厅科技攻关项目(11513103):桦褐孔菌降糖作用药效物质基础及其药效学的研究,负责人:孙海峰。

** 通讯作者:孙海峰,教授,中药学博士,主要研究方向:中药资源与开发,糖尿病及中药化妆品研究,Tel:0451-82195748,E-mail:shf120@sina.com。

5%苯酚溶液：称取 50g 苯酚 (AR)，加蒸馏水 100mL 溶解，配成母液。取 10mL 50%苯酚溶液，加蒸馏水至 100mL，配成 5%苯酚溶液，现配现用。

葡萄糖标准液的配制^[4]：精确称取经 105℃干燥至恒重的葡萄糖标准品 100.0mg，置于 100mL 棕色容量瓶中，加适量水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得浓度为 1.0mg·mL⁻¹ 葡萄糖标准贮备液。用时取 10mL 稀释至 100mL，即得 0.1mg·mL⁻¹ 的葡萄糖标准品溶液。

3. 材 料

桦褐孔菌子实体采自黑龙江省尚志市。

二、方法与结果

1. 桦褐孔菌多糖含量测定

(1) 实验条件的确定。

①最大吸收波长的确定 分别取经苯酚硫酸显色后的无水葡萄糖对照品液和桦褐孔菌供试品液，于 474~500nm 范围内测吸光度，以确定最大吸收波长，结果表明两者在 486nm 处有最大吸收波长。

②苯酚添加量的考察 量取 0.1mg·mL⁻¹ 的葡萄糖溶液和桦褐孔菌供试品溶液 1.0mL 各 6 份，分别置于具塞试管中，各加入 5%苯酚溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL，经显色后测得吸光度最大时苯酚用量为 1.0mL，因此苯酚最佳用量为 1.0mL^[5]。

③硫酸添加量的考察 量取 0.1mg·mL⁻¹ 的葡萄糖溶液和桦褐孔菌供试品 1.0mL 各 8 份，分别置于具塞试管中，加 5%苯酚溶液 1.0mL，振摇混匀，分别加 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0mL 的硫酸，显色后吸光度最大时硫酸用量为 8.0mL，因此硫酸最佳用量为 8.0mL。

④水浴时间的考察 取质量浓度为 0.1mg·mL⁻¹ 的葡萄糖标准溶液和蒸馏水 1.0mL 各 7 份，分别置于具塞试管中，苯酚硫酸法显色，沸水浴中分别反应 10、30、60、90、120、150、180min，表明反应 30min 时吸光度最大，因此实验选择反应 30min 时进行测定。

⑤反应温度的确定 取质量浓度为 0.1mg·mL⁻¹ 的葡萄糖标准溶液和蒸馏水 1.0mL 各 4 份，分别置于具塞试管中，苯酚硫酸法显色，分别置温度为 25℃、50℃、75℃、100℃水浴，测得吸光度，在 100℃时吸光度最大，因此显色温度选择 100℃。

(2) 方法学考察。

①标准曲线的绘制 吸取 0.1mg·mL⁻¹ 的葡萄

糖标准液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9mL，分别置于具塞试管中，各加蒸馏水，使体积至 1.0mL，再加 5%苯酚液 1.0mL，摇匀，迅速滴加浓硫酸 8.0mL，置沸水浴加热 30min，取出冷水冷却至室温；另以蒸馏水 1.0mL，同上操作，做空白对照，于 486nm 处测定吸收度 (Abs)。以标准品葡萄糖量 m (μg) 为纵坐标，吸光度 Abs 为横坐标。得标准曲线回归方程为：Y=185.96X+5.6085，R²=0.9982，说明标准品葡萄糖量在 20~80μg 范围内，与 Abs 呈良好的线性关系 (见表 1)。

②样品中多糖含量测定 吸取 0.3mg·mL⁻¹ 的桦褐孔菌多糖供试品溶液 0.5mL，加蒸馏水至 1.0mL，按标准曲线制备项下测定吸光度并计算多糖含量。测得吸光度为 0.2037，则含糖量为 43.4885μg。

③仪器精密度的考察 取标准品溶液 0.9mL，加蒸馏水至 1.0mL，按标准曲线制备项下测定 Abs 值 6 次，测得数据见表 2，吸光度 RSD=0.09%，表明仪器精密度良好。

表 1 标曲数据表

序号	含糖质量(μg)	吸光度(A)
1	10	0.049
2	20	0.086
3	30	0.127
4	40	0.180
5	50	0.235
6	60	0.292
7	70	0.350
8	80	0.401
9	90	0.424

表 2 标准品溶液吸光度记录表

序号	吸光度	RSD (%)
1	0.441	0.0924
2	0.442	
3	0.442	
4	0.442	
5	0.442	
6	0.442	

表 3 重现性吸光度数据

序号	吸光度	RSD (%)
1	0.167	2.68
2	0.170	
3	0.177	
4	0.170	
5	0.165	

④重现性 吸取 $0.3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液 0.5mL 各 5 份,加蒸馏水至 1.0mL ,分别按标准曲线项下方法制备样品,测定吸光度,见表 3,吸光度 $\text{RSD}=2.68\%$,表明重现性良好。

⑤稳定性 取④重现性项下 3 份供试品分别于显色后 0、15、30、60、120min 测定吸光度,见表 4。吸光度的 RSD 值均小于 0.4% ,表明在 120min 内样品溶液稳定。

⑥加样回收率 取已知多糖含量的供试样品($0.3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 0.5mL ,分别按照样品含糖量的 80%、100%、120% 添加葡萄糖标准品,按上述测定条件测定,计算得回收率为 98.91%, RSD 值为 2.84%。见表 5。

2. 桦褐孔菌降糖有效部位提取工艺优化

(1) 多糖的提取工艺流程。

干燥子实体 20g ,粉碎,用 95%乙醇 200mL 回流提取 3h,过滤,滤渣自然晾干后加水煎煮,过滤,滤液浓缩至 50mL ,搅拌下加入 95%乙醇,醇沉,静置 24h,过滤;将沉淀物加水 30mL 复溶,滤除不溶物,再次醇沉,将沉淀物依次用无水乙醇、丙酮、醚洗涤后, 35°C 干燥得桦褐孔菌多糖浸膏。

多糖提取率 (%)=(提取液中的多糖含量/原料质量) $\times 100\%$

(2) 多糖的纯化。

用 Sevage 法^[6]进行脱蛋白,取桦褐孔菌多糖适量,加水溶解,加入 1/5 体积的氯仿,再加入氯仿体积 1/5 体积的正丁醇,剧烈震荡 30min 后离心,除去液面间变性蛋白质,重复 7 次。

(3) 含量测定。

①供试品溶液的制备 精密称取桦褐孔菌多糖浸膏适量,配制成 $0.3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

②供试品含量的测定 量取供试品溶液 0.5mL ,按标准曲线项下测定吸光度,根据标准曲线换算成供试品溶液中含有多糖的质量。

多糖提取率=(多糖含量/药材质量) $\times 100\%$

(4) 提取工艺的优化。

采用均匀设计法,按 $U_6(6^3)$ 选用固液比(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)3 个因素,每个因素 6 个水平,共进行 6 个处理,每个处理重复 3 次,每份 30g 。见表 6。

(5) 结果。

均匀试验结果见表 7。实验数据经软件进行二次

表 4 显色后不同时间测得吸光度记录

序号	不同时间吸光度值					RSD (%)
	0	15	30	60	120	
1	0.204	0.203	0.203	0.202	0.203	0.3483
2	0.212	0.212	0.211	0.211	0.210	0.3963
3	0.195	0.195	0.195	0.194	0.194	0.2816

表 5 样品回收率试验结果(μg)

序号	样品中总多糖的量 A	加入葡萄糖的量 B	实测总糖量 C	回收率 (C-A)/B	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	43.4885	24	66.4174	95.54		
2	43.4885	24	67.7191	100.96		
3	43.4885	24	66.7893	97.09		
4	43.4885	30	73.4839	99.98		
5	43.4885	30	72.3681	96.27	98.91	2.8360
6	43.4885	30	74.0418	101.84		
7	43.4885	36	80.5504	102.95		
8	43.4885	36	77.9469	95.72		
9	43.4885	36	79.4346	99.85		

表 6 因素水平表(n=3)

水平	提取次数(A)	固液比(B)	提取时间(C)min
1	1	1:5	90
2	1	1:7	120
3	2	1:9	150
4	2	1:11	180
5	3	1:13	210
6	3	1:15	240

表 7 均匀试验结果(n=3)

试验号	提取次数 (X_1)	固液比 (X_2)	提取时间 (X_3)min	粗多糖提取率 %	多糖提取率 (Y)%
1	1	1:7	150	5.526	2.62
2	1	1:11	240	7.985	3.96
3	2	1:15	120	22.719	12.69
4	2	1:5	210	15.951	9.06
5	3	1:9	90	15.990	9.01
6	3	1:13	180	18.447	10.39

回归分析, 得回归方程: $Y = -15.788 + 20.338X_1 + 0.3564X_2 - 4.378X_1^2 - 2.186 \times 10^{-6}X_3^2$ 。

经检验, 复相关系数 $R=0.998$;

$F=72384.0$, $F_{0.05}(4.1)=56.25$ 。 $F > F_{0.1}(4.1)$, 表明方程显著, 多糖提取率和各因素间有很好的线性关系。

对方程进行优化求极大值, 在检验精度 $\alpha=0.05$ 条件下, 得出优化参数 $X_1=2.32$ 、 $X_2=14.95$ 、 $X_3=91.22$ 。即料液质量比为 1:15, 提取 2 次, 提取 90min, 此时提取率预测值为 13.14%。经实验测定能达到这个预测值, 表明所优化的条件为最优水平。

3. 桦褐孔菌降糖有效部位醇沉工艺优化

(1) 多糖的提取工艺流程。

干燥子实体 720g, 砸成 1cm 左右的小块, 用 95% 乙醇 4000mL 回流取 3h, 过滤。滤渣自然晾干后按“二、2.(5)”项的结论水煎煮, 合并两次滤液, 滤液浓缩至 720mL。此时药液浓度为 $1.0g \cdot mL^{-1}$ 。备用。

(2) 多糖的精制工艺流程。

同“二、2.(1)”项进行醇沉。多糖提取率(%)=(提取液中的多糖含量/原料质量)×100%。

(3) 含量测定。同“二、2.(3)”。

(4) 醇沉工艺的优化。

采用均匀设计法, 选用药液浓度(A)、乙醇终浓度(B)两个因素, 每个因素 5 个水平。见表 8。

(5) 结果。

均匀设计优化结果, 见表 9。实验结果数据经软

件进行二次回归分析。得回归方程: $Y = 37.2495 + 1.5418X_1 - 0.8509X_2 - 0.0057X_2^2$

经检验, 复相关系数 $R=0.999$; $F=115.054$, $F_{0.1}(2.1)=54.04$ 。 $F > F_{0.1}(2.1)$, 表明方程显著, 醇沉多糖收率和各因素间有很好的线性关系。

对方程进行优化求极大值, 在检验精度 $\alpha=0.05$ 条件下, 得出优化参数 $X_1=1$ 、 $X_2=65.7$

即料液浓度为 $1.0g \cdot mL^{-1}$, 醇沉时乙醇浓度调到 65.7%, 此时多糖收率预测值为 7.3%。经实验测定能达到这个预测值, 表明所优化的条件为最优水平, 虽然此条件下的多糖收率并未显著提高, 但乙醇浓度较低, 这样可以大大减少乙醇用量, 从而降低成本。

三、讨论

桦褐孔菌多糖含量的测定大多采用 Dubois 等^[7]提出的苯酚-硫酸比色法, 其原理是多糖在浓硫酸的作用下水解成单糖, 并迅速脱水成糠醛衍生物, 此糠醛衍生物与苯酚缩合生成有色化合物。样品经提取, 显色后, 采用分光光度法, 在 490nm 处测定其含量。本实验以葡萄糖为对照品, 用 5% 苯酚溶液 1.0mL 和硫酸 8.0mL 做显色剂, 于 100℃ 水浴 30min, 在 486nm 最大吸收波长处进行桦褐孔菌多糖含量测定, 所作的标准曲线线性关系好, 回收率高, 多糖含量测定效果好, 重复性高, 操作简单。因此应用苯酚-硫酸法测定桦褐孔菌多糖含量是可行的。

目前, 对桦褐孔菌多糖的提取有水煎煮法和超声提取法, 但提取率均较低。如张慧丽等^[8]采用正交实验设计研究超声水提桦褐孔菌多糖, 得出的结论为超声 60min、20kHz、95℃、15 倍水, 粗多糖产率为 8.10%, 多糖产率为 1.82%。李浩飞等^[3]采用正交实验法优化桦褐孔菌多糖的水提取工艺, 得出的最佳水提取工艺为固液比 1:10, 提取 3h, 提取 1 次, 此工艺提取效率较高, 但其提取率均在 1% 以下。而本实验采用均匀设计法对桦褐孔菌多糖水提取进行优化, 根据方程得到优化结果为料液质量比为 1:15, 提取 2 次, 提取 90min, 此时提取率预测值为 13.14%, 提取率远高于前人所做研究的结果。并且, 前人以醇沉法对桦褐孔菌多糖进行分离的优化研究未见报导, 水煎醇沉法制备多糖用乙醇终浓度通常为 80% 或 85%, 而本实验采用均匀设计法对多糖的醇沉条件进行优化研究, 其优化结果为多糖的生

表 8 因素水平表(n=3)

水平	样品浓度 A (g 生药 · mL ⁻¹)	乙醇浓度 B (%)
1	0.2	65
2	0.4	70
3	0.6	75
4	0.8	80
5	1.0	85

表 9 均匀设计实验结果表(n=3)

试验	药液浓度 (X ₁)	乙醇终浓度 (X ₂)%	粗多提取率 (平均值)%	多糖收率 (Y)%
1	0.2	70	20.89	5.68
2	0.4	80	22.67	6.06
3	0.6	65	24.33	6.8
4	0.8	75	22	6.5
5	1.0	85	23	7.33

药浓度为 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乙醇终浓度为 65%。从结果可以看出,采用本实验的结果分离多糖可大大降低乙醇用量,降低生产成本,为今后桦褐孔菌多糖的生产奠定了基础。

在提取纯化工艺等涉及多因素多水平的优化试验研究中,通常都采用正交设计方法,这种方法和完全实验相比减少了实验次数,并能优化实验条件,但所优化的条件是从预先给定的因素水平中选,可以找到对结果有影响的因素,但不能得到最佳水平。而均匀设计是通过增加水平数,建立线性回归方程,并通过方程求极值方法,计算出最佳水平。因而能对因素的水平进行科学的优化,得出更科学的结果。本研究证明了这一点,本实验优化提取条件下的提取率远高于前人用正交试验优化的结果,所得桦褐孔菌多糖提取条件科学、合理,结果可靠。

参考文献

- 1 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌—桦褐孔菌. 中国食用菌, 2002, 21(4):7.
- 2 Hartwell J, L. Plants used against cancer. *Lloydia*, 1971, 34(1):103-160.
- 3 李浩飞, 邓丽颖, 杨灿宇. 正交设计优化桦褐孔菌多糖的水提取工艺. 医药论坛杂志, 2008, 29(2):55.
- 4 李坚, 刘东波, 夏志兰, 等. 分光光度法快速测定灵芝中多糖含量. 湖南农业科学, 2009, (2):34-38.
- 5 国家药典委员会组织编译. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 6 曲晓兰, 吴从平, 曹明亮. 马齿苋多糖脱蛋白工艺的研究. 泰山医学院学报, 2006, (8):718.
- 7 刘青梅, 杨性民, 邓宏谊, 等. 采用微波技术提取紫菜多糖的工艺研究. 农业工程学, 2005, 21(2):153-156.
- 8 张慧丽, 杨松, 李玉, 等. 桦褐孔菌多糖的提取及对肝癌细胞 SMMC7721 的抗增殖的研究. 中国食用菌, 2006, 25(2):32.

Optimization of Extraction Process of Polysaccharide from *Inonotus obliquus* by Uniform Design

Sun Haifeng, Sun Huifeng, Guo Lengqiu, Guo Xueying, Cao Ling, Li Jianwu

(Pharmacy College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: This study aimed to optimize the extraction techniques of polysaccharide from *Inonotus obliquus* by uniform design. The content of *I. obliquus* polysaccharides was determined by spectrometry method, which takes anhydrous glucose as standard and 5% phenol and sulfuric acid as color-developing agent, in order to investigate the extraction and alcohol-purification technologies of *I. obliquus* polysaccharides. The extraction and alcohol-purification technologies of *I. obliquus* polysaccharides were optimized by employing the uniform design method. Results showed that the best extraction technology was when the *I. obliquus* and water ratio is 1:15. And the extraction should be given twice and 90 minutes for each time. The best alcohol-purification technology was to add alcohol into the concentration of 1.0 g/mL crude herb to 65% with vigorously rabbling. The conclusion is that the extraction and alcohol-purification technologies of *I. obliquus* polysaccharides optimized by uniform design method are economical, stable and efficient.

Keywords: *Inonotus obliquus*, Polysaccharide, Technology, Extraction process, Alcohol-purification, Uniform design

(责任编辑: 李沙沙 张志华, 责任译审: 王 晶)