第37卷　第6期　　浙　江　林　业　科　技　　Vol. 37　No. 6
2017年11月　　JOUR.　OF　ZHEJIANG　FOR.　SCI.　&　TECH.　　Nov., 2017

doi:10.3969/j.issn.1001-3776.2017.06.006

超声波辅助提取桑黄黄酮工艺优化

程俊文[1]，贺　亮[1]，魏海龙[1]，宋吉玲[2]，胡传久[1]，邹景泉[1]，李海波[1]，蒋云鹤[1]

（1. 浙江省林业科学研究院 浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室，浙江　杭州　310023；
2. 杭州市农业科学研究院，浙江　杭州　310024 ）

摘要：选择乙醇体积分数、超声时间、超声温度3个因素，通过Box-Benhnken组合设计和响应曲面分析法优化桑黄纤孔菌 *Inonotus sanghuang* 子实体中总黄酮的超声波辅助提取工艺条件。结果表明，桑黄子实体中总黄酮的最佳提取条件为：乙醇体积分数70.9%，超声时间47.8 min，超声温度55.2℃，总黄酮的得率理论值达2.63%。验证试验表明，总黄酮得率平均为2.51%，与理论值基本吻合。

关键词：桑黄；总黄酮；超声波；响应面

中图分类号：TQ461　　**分献标识码：**A　　**文章编号：**1001-3776（2017）06-0035-05

Optimizing Technology for Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from *Inonotus sanghuang*

CHENG Jun-wen[1]，HE Liang[1]，WEI Hai-long[1]，SONG Ji-ling[2]，HU Chuan-jiu[1]，ZOU Jing-quan[1]，LI Hai-bo[1]，JIANG Yun-he[1]

（1. Zhejiang Academy of Forestry, Key Laboratory of Biological and Chemical Utilization of Forest Resources, Hangzhou 310023, China;
2. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China）

Abstract：Extraction technology of flavonoids from *Inonotus sanghuang* was optimized by ultrasonic-assisted method. Based on the results of one-factor-at-a-time-technique method, a three-level Box-Behnken factorial design was implemented combining with response surface methodologyto optimize the extraction conditions of total flavonoids. The result demonstrated that theoretical yield of flvonoids could reach 2.63% underultrasonic temperature of 55.2℃, ethanol concentration of 70.9% and ultrasound treatment time of 47.8minutes. Verification test resulted the average yield of 2.51%, similar to theoretical value.

Key words: *Inonotus sanghuang*; total flavonoids; ultrasonic; response surface methodology

桑黄，中药名，为桑黄纤孔菌 *Inonotus sanghuang* 的子实体，属担子菌亚门 Basidiomycotina[1]锈革孔菌科 Hymenochaetaceae 纤孔菌属 *Inonotus*，是中国传统的名贵药材。桑黄最早记载于《本草纲目》，具有抗肿瘤、抗氧化、抗肝纤维化、增强免疫等药理活性[2-4]。桑黄子实体中富含多糖、黄酮等多种活性成分。黄酮天然存在于植物中的多酚类化合物，大量研究表明黄酮类物质可以有效清除人体内的各种氧自由基，减少身体各组分的器官损伤和病变，从而延缓衰老。桑黄是少有的富含黄酮类化合物的药用真菌，是天然、高效的抗衰老制品的

收稿日期：2017-04-09；**修回日期：**2017-08-15
基金项目：国家自然科学基金项目（31501815）；浙江省科技厅院所专项（2014F50018）；浙江省食用菌新品种选育项目（2016C02057-8）和杭州市科委种子种苗专项（20150932H07）的部分研究内容
作者简介：程俊文，副研究员，从事食药用菌活性成分加工研究；E-mail：jwchengzj@163.com。通信作者：邹景泉，工程师；E-mail：422046791@qq.com。

重要来源。目前对桑黄的研究较多集中在深层发酵条件优化、多糖分子结构、生物活性等方面，而对桑黄黄酮的研究较少[5]。

黄酮类化合物提取主要有溶剂提取法、大孔吸附树脂法、微波辅助提取法、超界流体提取法等[6-7]。本试验通过超声波辅助提取，利用响应面法分析对桑黄子实体中黄酮提取工艺进行优化，以期为桑黄中黄酮类功能成分的分析和深加工提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　材料与试剂

菌种为桑黄纤孔菌，2015 年 5 月采自浙江省淳安县，采用液氮法保存；菌种活性后转接到 PDA 试管中，菌丝长满后在 4℃冰箱保存。桑黄子实体由浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室人工培育，于 2016 年 7 月采收；芦丁标准品由中国药品生物制品鉴定所提供；无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为国产分析醇，购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2　仪器

20B 型中药粉碎机，南京邦斯特制药设备有限公司，JY92-ⅡDN 超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；DKZ-2 型电热恒温振荡水槽，上海福玛实验设备有限公司；UV-2600 紫外分光光度计，日本岛津公司。

1.3　方法

1.3.1　桑黄总黄酮的提取　取干燥的桑黄子实体，用 20B 型中药粉碎机粉碎成 40 目，称取桑黄子实体粉 2.00 g，放入 250 mL 的烧杯中，加入 1 mL70%乙醇溶液碾磨成浆，分别加入 60%，70%和 80%体积分数的乙醇溶液，并调节料液比，置于超声萃取仪内，设定超声温度分别为 50，60，70℃，水浴时间分别为 30，45，60 min，期间进行超声波（功率 120 W）辅助提取，将提取液减压抽滤，收集滤液，所得滤渣再次用前法提取，合并 2 次滤液，定容至 100 mL，摇匀后测定黄酮的含量。

1.3.2　响应面法分析实验　选择乙醇体积分数、提取温度、超声时间 3 个因素所确定的水平范围，运用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，采用 3 因素 3 水平的响应面设计，利用 Design Expert 8.05 软件对实验数据进行回归分析。自变量的试验水平分别以－1，0，1 进行编码，试验因素及水平设计见表 1。

表 1　响应面分析因子及水平

Table 1　Factors and levels of response surface analysis

因素	水平		
	－1	0	1
乙醇体积分数 X_1/%	60	70	80
超声时间 X_2/min	30	45	60
超声温度 X_3 /℃	50	60	70

1.4　分析方法

1.4.1　桑黄总黄酮含量的测定　以芦丁为标准品，采用 $NaNO_2$-Al（NO_3）$_3$比比色法[8]。

1.4.2　总黄酮得率计算　总黄酮得率（Y）/% $= \frac{总黄酮含量\times稀释体积}{样品干质量} \times 100$。

1.4.3　数据处理　用 Design Expert 8.05 进行数据分析和处理。

2　结果与分析

2.1　响应面分析试验结果

2.1.1　响应面分析方案及结果　根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验，共有 17 个试验点，其中 12 个为析因点，5 个零点试验用以估计试验误差。以总黄酮得率为响应值，试验方案及结果见表 2。

表 2　响应面试验设计方案及试验结果

Table 2　Design and results by RSM

试验号	X_1/%	X_2/min	X_3/℃	Y/%	
				实测值	预测值
BOX-1	0	-1	-1	1.69±0.012	1.66
BOX-2	0	0	0	2.49±0.015	2.54
BOX-3	-1	-1	0	1.34±0.017	1.38
BOX-4	1	0	1	1.95±0.011	1.95
BOX-5	0	-1	1	1.56±0.013	1.44
BOX-6	0	1	-1	2.19±0.023	2.31
BOX-7	0	0	0	2.65±0.026	2.54
BOX-8	0	1	1	1.07±0.028	1.10
BOX-9	-1	0	1	0.94±0.021	1.02
BOX-10	-1	1	0	1.78±0.022	1.66
BOX-11	0	0	0	2.62±0.014	2.54
BOX-12	1	-1	0	1.78±0.016	1.66
BOX-13	-1	0	-1	2.28±0.017	2.27
BOX-14	1	0	-1	2.21±0.020	2.13
BOX-15	1	1	0	1.97±0.022	1.93
BOX-16	0	0	0	2.48±0.023	2.54
BOX-17	0	0	0	2.44±0.017	2.54

2.1.2　回归模型建立及方差分析　利用 Design Expert 8.05 软件对表 2 实验数据进行分析[9]，获得总黄酮得率对乙醇体积分数、超声时间和超声温度的多元二次回归方程：

$$Y = 2.54 + 0.20X_1 + 0.08X_2 - 0.36X_3 - 0.063X_1X_2 + 0.27X_1X_3 - 0.25X_2X_3 - 0.3X_1X_1 - 0.52X_2X_2 - 0.39X_3X_3$$

由表 3 可知，以总黄酮得率为目标函数的回归方程的回归效果达到极显著水平，P 值均 $< 0.000\ 1$；模型的决定系数 R^2=0.975 2，说明模型与实际实验拟合较好；校正决定系数 AdjR^2=0.943 2，说明该模型能解释 97.52% 响应值的变化；模型的失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率，表 3 中模型失拟项的 P 值为 0.164 3，大于 0.05，表明模型的失拟项不显著；根据表 3 的显著性分析结果，各因素的二次项，X_3，X_1，X_1X_3，X_2X_3 的交互项对总黄酮得率的影响均为极显著（$P < 0.01$）。分析表明这个模型建立的回归方程能运用于超声波辅助提取桑黄子实体中总黄酮提取条件优化的理论预测。

表 3　回归模型方差分析

Table 3　ANOVA of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4.32	9	0.48	30.54	< 0.000 1**
X_1	0.31	1	0.31	19.63	0.003 0**
X_2	0.05	1	0.05	3.26	0.113 9
X_3	1.02	1	1.02	64.67	< 0.000 1**
X_1X_2	0.02	1	0.02	1.00	0.351 7
X_1X_3	0.29	1	0.29	18.57	0.003 5**
X_2X_3	0.25	1	0.25	15.61	0.005 5**
X_1X_1	0.38	1	0.38	24.22	0.001 7**
X_2X_2	1.13	1	1.13	71.96	< 0.000 1**
X_3X_3	0.64	1	0.64	40.90	0.000 4**
残差	0.11	7	0.02		
失拟项	0.08	3	0.03	2.91	0.164 3
纯误差	0.04	4	0.01		
总离差	4.43	16			
R^2=0.975 2；Adj R^2=0.943 2					

注：*表示差异显著（P<0.05）；**表示差异极显著（P<0.01）。

2.1.3　响应面图形分析　分别将模型中的乙醇体积分数、超声时间及超声温度的其中 1 个因素固定在 0 水平，得到另外 2 个因素的交互影响结果，二次回归方程的响应面及其等高线如图 1，图 2，图 3 所示，各个因素及其交互作用对响应值的影响结果通过该组图可以直观地反映出来。极值条件应该在等高线的圆心处。由几组图可

以看出，影响桑黄子实体总黄酮提取得率的最显著的因素为超声温度（X_3），其次是乙醇体积分数（X_1），表现为响应面变化弧度较大。超声时间（X_2）响应面弧度变化平缓，说明对响应值影响相对较小。此外，等高线的形状可反映出交互效应的强弱，椭圆形表示二因素交互作用显著，而圆形则与之相反[10]。从图1至图3可以看出，X_1 与 X_3，X_2 与 X_3 交互作用显著。

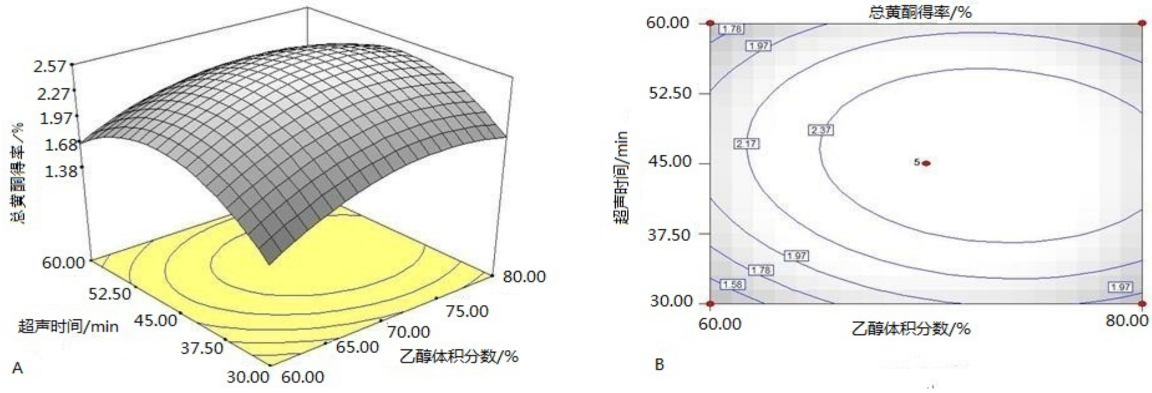

图1 乙醇体积分数和超声时间交互影响总黄酮得率的曲面图（A）和等高线图（B）

Figure 1 Surface diagram and contour of flavonoid yield under interaction ofethanol concentration andultrasonic time

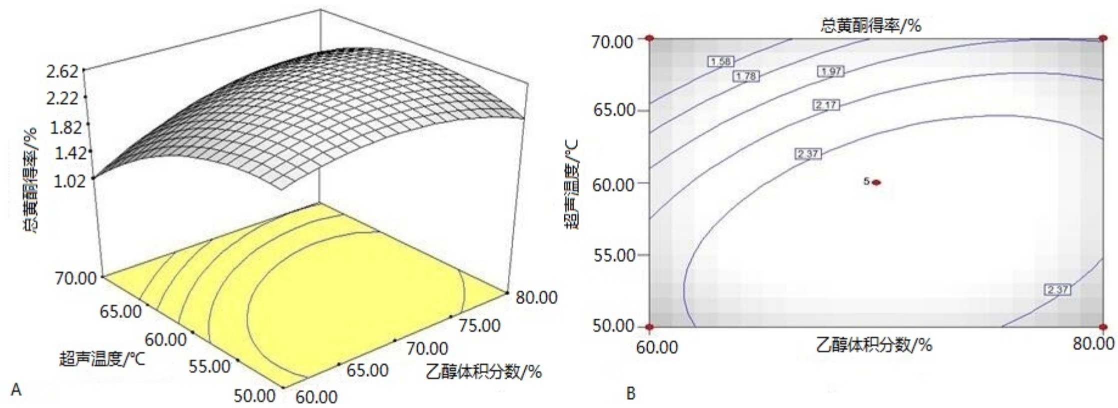

图2 乙醇体积分数和超声温度交互影响总黄酮得率的曲面图（A）和等高线图（B）

Figure 2 Surface diagram and contour of flavonoid yield under interaction ofethanol concentration andtemperature

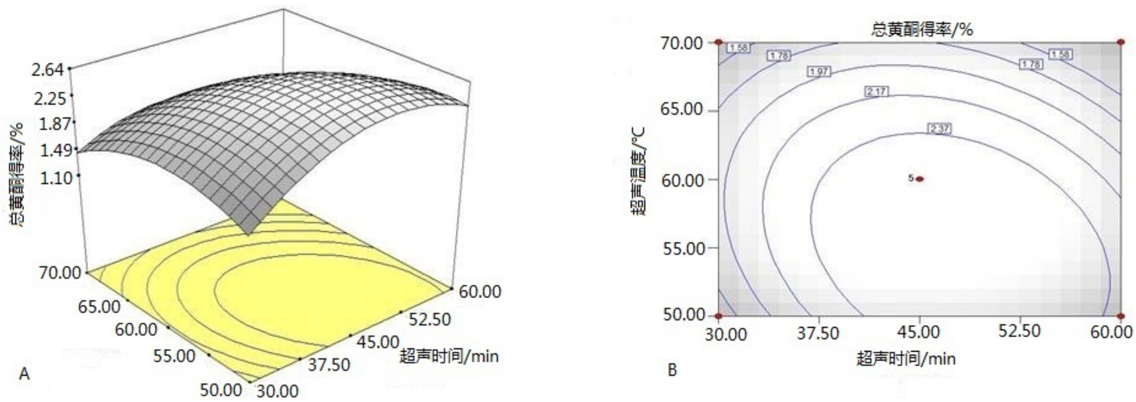

图3 超声时间和超声温度交互影响总黄酮得率的曲面图（A）和等高线图（B）

Figure 3 Surface diagram and contour of flavonoid yield under interaction ofultrasonic timeand temperature

2.1.4 验证实验 根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程，利用 Design Expert 8.05 软件分析，得到最佳提取条件为：乙醇体积分数 70.9%，超声时间 47.8 min，超声温度 55.2℃，总黄酮得率理论值可达 2.63%。

为检验模型预测值与实际实验值之间的相关性，即检验响应面优化模型的可靠性，对桑黄子实体中总黄酮提取得率进行实验验证。实验中乙醇体积分数、超声时间和超声温度的优化值分别为 70.9%，47.8 min，55.2℃，三组平行实验，测得总黄酮得率分别为 2.49%，2.53%，2.50%，实际总黄酮得率平均值为 2.51%，达到了回归模型预测理论值的 95.4%，实验结果与模型符合良好，说明该模型能较好地模拟和预测桑黄子实体总黄酮得率。

3 结论

本实验对超声波辅助提取桑黄子实体总黄酮条件行了优化，结合生产实践，选择乙醇体积分数、超声时间、超声温度为 3 个主要参数，根据 Box-Benhnken 中心组合实验设计及 3 因素 3 水平的响应面分析，通过二次多项回归模型进行方差分析和回归拟合，预测了桑黄子实体总黄酮的最佳提取工艺条件为：乙醇体积分数 70.9%，超声时间 47.8 min，超声温度 55.2℃，总黄酮得率理论值可达 2.63%。验证实验中总黄酮得率平均为 2.51%，与陈晓平[11]等报道的响应面法优化微波辅助乙醇提取桑黄黄酮工艺的研究中的总黄酮得率较为接近。采用微波辅助乙醇提取及与本实验超声波辅助乙醇提取不同桑黄材料中的黄酮，对黄酮生物活性的影响有待进一步研究。

参考文献：

[1] 吴声华，黄冠中，陈愉萍，等. 桑黄的分类及开发前景[J]. 菌物研究，2016，14（4）：187－200.

[2] Zhang Z F，Lu G Y，Song T T，*et al*. Comparison of the preliminary characterizations and antioxidant properties of polysaccharides obtained from Phellinus baumii growth on different culture substrates [J]. CarbohydrPolym，2015，397－399.

[3] Kim G Y，Kim S H，Wang S Y，*et al*. Oral administration of proteoglycan isolated from Phellinus linteus in the prevention and treatment of collagen-induced arthritis in mice[J]. Biol Pharma Bull，2003，26（6）：823－83l.

[4] Wang Z B，Pei J J，Ma H L，*et al*. Effect of extraction media on preliminary characterizations andantioxidant activities of Phellinus linteus Polysaccharides Zhen[J]. Carbohydrate Polymers，2014，109，49－55..

[5] 孙培龙，徐双阳，杨开，等. 珍稀药用真菌桑黄的国内外研究进展[J]. 微生物学通报，2006，33（2）：119－123.

[6] Mohammad A，Elham K. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants[J]. J Paramed Sci，2013，4（3）：119－138.

[7] 章宏慧，刘东红，叶兴乾，等. 响应面法优化水芹黄酮提取工艺及其成分研究[J]. 中国食品学报，2014，14（11）：83－89.

[8] 刘艳芳，杨焱，贾薇，等. 药用真菌桑黄总黄酮测定方法研究[J] .食用菌学报，2006，13（2）：45－52 .

[9] 费荣昌. 实验设计与数据处理（第四版）[M]. 无锡：江南大学出版社，2001：59－63.

[10] Jin Q L，Zhang Z F，Lu G Y，*et al*. Antioxidant and DNA damage protecting potentials of polysaccharide extracted from Phellinus baumii using a delignification method[J]. Carbohydr Polym，2016，152，575－582.

[11] 陈晓平，于翠翠. 响应面法优化微波辅助乙醇提取桑黄黄酮工艺的研究[J]. 食品与发酵科技，2013，49（4）：31－35.