

超声法提取灵芝菌糠中总黄酮的工艺研究

张旭辉¹,赵瑞华^{1,2*},李丹阳¹,朱单洁¹,查磊¹,李键¹

(1. 延安大学生命科学学院;2. 延安市食用菌产业技术创新战略联盟,陕西 延安 716000)

摘要:以灵芝菌糠为原料,利用超声辅助提取技术对灵芝菌糠中黄酮类化合物的提取条件进行优化。以黄酮类化合物的提取率作为指标,通过单因素和 $L_9(3^4)$ 正交试验探讨乙醇浓度、超声温度、超声时间及料液比这四个因素对灵芝菌糠中黄酮类化合物提取率的影响。结果表明:影响黄酮得率因素的影响力大小为乙醇浓度>超声温度>料液比>超声时间,确定最佳提取条件为乙醇体积分数为70%,提取温度为60℃,超声时间为55 min,料液比为1:40;提取率为2.972%。超声辅助提取技术对灵芝菌糠中总黄酮的提取和开发利用具有指导意义和现实意义。

关键词:灵芝菌糠;总黄酮;超声提取;提取率

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-602X(2017)04-0063-04

灵芝(*Ganoderma lucidum* Karst)是担子菌门担子菌纲多孔菌科灵芝属药用真菌,是一种很宝贵的中药材,从古至今就有“仙草”的美誉,具备止咳宣肺、养气安神、延年增寿的成效^[1-3]。近年来,灵芝生产技术日趋成熟,基本实现了大棚生产和工厂化栽培。为了保证出菇效率和成本,大棚和工厂化生产在灵芝成熟收获后,将不再具备生产能力的废弃菌糠舍弃,这种现状造成了灵芝菌糠资源的无故浪费^[4-5]。目前,对灵芝菌糠二次利用的研究相对较少,因此这方面的工作有待进一步开展。

黄酮类化合物是一种普遍存在于植物中的天然化合物,属于植物次生代谢产物,以与糖结合为苷或游离态的方式存在,是以黄酮(2-苯基色原酮)为母核而衍生的一类黄色色素,其中包括黄酮的同分异构体及其氢化和还原产物,也即以C6—C3—C6为基本碳架的一系列化合物。根据三碳键(C3)结构的氧化程度和B环的连接位置等特点,黄酮类化合物可分为下列几类:黄酮和黄酮醇;黄烷酮(又称

二氢黄酮)和黄烷酮醇(又称二氢黄酮醇);异黄酮;异黄烷酮(又称二氢异黄酮);查耳酮;二氢查耳酮;橙酮(又称澳味);黄烷和黄烷醇;黄烷二醇(3,4)(又称白花色苷元),黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、抑菌性、降血糖、降血脂、提高免疫力等作用^[6-10]。黄酮类化合物的方法有水浸提法、酶解法、醇提法与超声波辅助提取法等^[11-17],目前还没有学者采用超声波辅助提取法提取灵芝菌糠中的黄酮类化合物。本试验拟从灵芝菌糠中提取黄酮类化合物,采用超声波辅助提取法研究对灵芝菌糠中黄酮类化合物提取含量的影响,为使灵芝菌糠得到充分合理的利用提供技术支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料、药品与试剂

灵芝菌糠(由延安大学生命科学学院食用菌实验室提供);

芦丁标准品,国药集团化学试剂有限公司;无水

收稿日期:2017-07-25

基金项目:延安市科学技术研究发展计划项目(2014CGZH-09);延安大学博士科研计划项目(YDBK2013-3)

作者简介:张旭辉(1992—),男,陕西丹凤人,延安大学硕士研究生。

* 通讯作者

乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等,均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

FW100 型高速万能粉碎机天津市泰斯特仪器有限公司;SCIENZ-ⅡD 超声波细胞粉碎机上海菁华科技仪器有限公司;DK-98-1 型电热恒温水浴锅义市予华仪器有限责任公司;SHZ-D(HD)循环水式真空泵义市予华仪器有限责任公司;RE-52 型旋转蒸发仪上海亚荣生化仪器厂;UV-2600 紫外可见分光光度计上海菁华科技仪器有限公司

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的测定与总黄酮含量的测定

(1) 标准曲线的测定

芦丁标准品烘干至恒重,称取 10 mg,用 70% 的乙醇配制浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁标准溶液,再将 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的芦丁标准品溶液用 70% 乙醇溶液分别稀释至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后各取 1 mL 于 10 mL 具塞比色管中,分别加入 1 mL 70% 乙醇溶液,0.3 mL 5% NaNO_2 溶液,摇匀,静置 6 min,再加入 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,静置 6 min,再加入 2 mL 4% NaOH 溶液,最后用超纯水将溶液定容至 5 mL,摇匀,静置 15 min,然后用紫外分光光度计在 510 nm 测出吸光度 A,用未加芦丁标准液的比色管做对照,横坐标为芦丁标准品溶液的浓度,纵坐标为吸光值 A,绘制出标准曲线。得出回归方程是: $y = 0.000253x + 0.07287$,相关系数 $R^2 = 0.99946$ 。

(2) 灵芝菌糠总黄酮含量的测定

选择 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 体系络合化学吸光法,用紫外分光光度计在 510 nm 处测量提取液中的吸光度,从而得到总黄酮的含量。

灵芝黄酮类化合物提取率 (%) = $\frac{c \cdot v}{m} \cdot n \cdot 100\%$

注:式中 c :线性计算出灵芝菌糠中黄酮类化合物的浓度(mg/mL); v :提取液定容量(mL); n :稀释倍数; m :取样的质量(g)。

1.3.2 单因素实验

乙醇浓度依次为 40%、50%、60%、70%、80%、90% 共 6 个水平;超声温度依次为:30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 共 6 个水平;超声时间依次为:10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 共 6 个水平;料液比依次为:1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 共 6 个水平,以灵芝菌糠为原料,进行单

因素试验,每个试验 3 次重复。

1.3.3 正交试验设计

在单因素试验的基础上,选择乙醇体积分数、超声温度、超声时间、料液比设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,对灵芝菌糠中黄酮类化合物的提取工艺条件进行优化。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

准确称量灵芝菌糠粉末 6 份,每份 1.00 g,固定超声时间 50 min,料液比 1:40,超声温度 60 $^{\circ}\text{C}$,乙醇浓度依次为 40%、50%、60%、70%、80%、90% 进行试验。由图 1 可知,当乙醇浓度小于 70% 时,黄酮类化合物的提取率随着乙醇浓度的增加而呈现上升的趋势,当乙醇浓度大于 70% 时,黄酮类化合物的提取率随着乙醇浓度的增加而呈现下降的趋势。原因可能是因为乙醇浓度不同,其极性也不相同,而黄酮类化合物有很大的极性范围,可以推断出当乙醇浓度为 70% 时,它的极性可能与灵芝菌糠中黄酮类化合物的极性最为相似,所以在 70% 的乙醇浓度下,总黄酮的提取率是最大的。

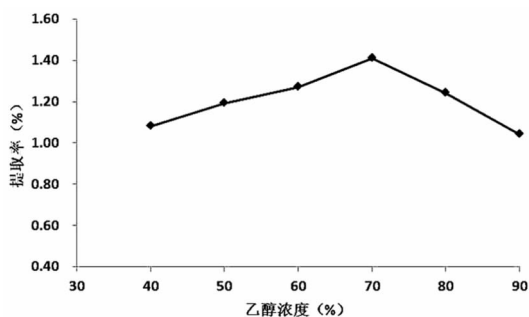


图 1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

2.1.2 超声温度对总黄酮提取率的影响

称量灵芝菌糠粉末 6 份,每份 1.00 g,固定超声时间 50 min,料液比 1:40,乙醇浓度 70%,超声温度依次为:30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 进行试验。由图 2 可知,当超声温度小于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,黄酮类化合物的提取率随着超声温度增大而增大,但当超声温度大于 60 $^{\circ}\text{C}$,黄酮类化合物的提取率随着超声温度增大而有下降的趋向。原因可能是在一定温度范围内,温度的升高使得分子运动的速度加快、渗透扩散的能力加强,这样有利于黄酮类化合物的析出,但是温度过高,可能会损坏黄酮类化合物的构造。因此,黄酮类化合物超声提取的合适温度是 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

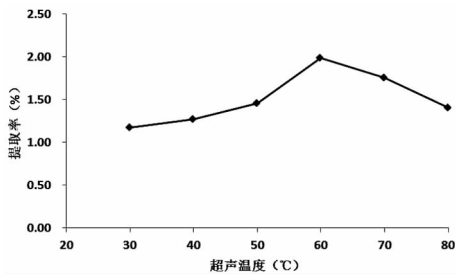


图2 超声温度对总黄酮提取率的影响

2.1.3 超声时间对总黄酮提取率的影响

称量灵芝菌糠粉末 6 份, 每份 1.00 g, 分别放入 100 mL 的锥形瓶中, 固定超声温度 60°C, 料液比 1:40, 乙醇浓度 70%, 超声时间依次为: 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 进行试验。由图 3 可知, 超声时间少于 50 min 时, 黄酮类化合物的提取率随着超声时间的增加而呈现上升的趋势, 而超声时间大于 50 min 时, 黄酮类化合物的提取率越来越小。原因可能是提取时间过长, 乙醇溶液已经部分挥发, 从而导致黄酮类化合物不易析出。

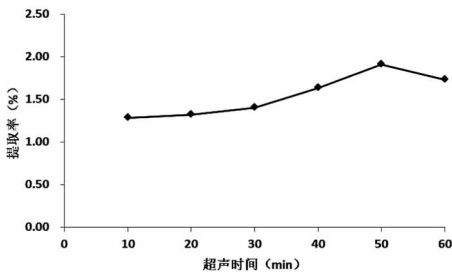


图3 超声时间对总黄酮提取率的影响

2.1.4 料液比对总黄酮提取率的影响

称量灵芝菌糠粉末 6 份, 每份 1.00 g, 分别放入 100 mL 的锥形瓶中, 设定超声温度 60°C, 乙醇浓度 70%, 超声时间 60 min 的条件下, 料液比依次为: 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 进行试验。由结果可知, 料液比在 1:10~1:40 之间时, 灵芝菌糠中黄酮类化合物的提取率随着溶剂量的增加而增大, 而料液比大于 1:40 时, 总黄酮的提取率越来越少。分析其中的原因可能是因为提取剂量过大, 而样品中总黄酮的含量有限, 从而导致溶剂溶解的杂质的量增加, 进而影响黄酮类化合物的析出, 使其含量减少。

2.2 正交试验结果及分析

由表 1 可知, 正交条件为 $A_2B_2C_3D_2$ 时, 即在乙醇浓度为 70%、超声温度为 60°C、超声时间为 55 min、料液比为 1:40 时, 黄酮类化合物的提取率是最大的, 为 2.96 mg/g。由表 2 可知, 因素 C 的 F 比 (1.000) 小于 F 临界值 (19.000), 所以因素 C 无显著差异。而其他三个因素 F 比均大于 19.000, 因此

这 A、B、D 这三个因素具有显著性差异。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验编号	A 乙醇浓度 (%)	B 超声温度 (°C)	C 超声时间 (min)	D 料液比 (g/mL)	提取率 (%)
1	1(65)	1(55)	1(45)	1(1:35)	2.69
2	1	2(60)	2(50)	2(1:40)	2.86
3	1	3(65)	3(55)	3(1:45)	2.35
4	2(70)	1	2	3	2.76
5	2	2	3	1	2.96
6	2	3	1	2	2.77
7	3(75)	1	3	2	2.37
8	3	2	1	3	2.19
9	3	3	2	1	1.90
k1	2.633	2.607	2.550	2.520	
k2	2.830	2.670	2.510	2.667	
k3	2.157	2.343	2.560	2.433	
极差 R	0.673	0.327	0.050	0.234	

表 2 正交试验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	0.719	2	179.750	19.000	*
B	0.180	2	45.000	19.000	*
C	0.004	2	1.000	19.000	
D	0.083	2	20.750	19.000	*
误差	0.004	2			

从正交试验结果表和正交试验方差分析表的结果可以得出, 在这四个因素中, 对灵芝菌糠中黄酮类化合物的提取率的影响程度的大小为: $A > B > D > C$, 所以可以得出最佳提取工艺条件为 $A_2B_2C_3D_2$, 即乙醇浓度为 70%、超声温度为 60°C、超声时间为 55 min、料液比为 1:40。

3 小结与讨论

本实验以灵芝菌糠中黄酮类化合物的提取率为指标, 利用单因素试验探讨了乙醇浓度、超声时间、超声温度和料液比这四个因素对灵芝菌糠中黄酮类化合物提取率的影响, 并在单因素试验的基础上, 设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验对提取工艺进行优化, 实验结果可以得到, 在乙醇浓度 70%、超声温度 60°C、超声时间 55 min、料液比 1:40 的条件下, 灵芝菌糠中黄酮类化合物的提取率最高。

本实验的目的在于更加充分合理的利用灵芝菌糠, 使其变废为宝, 灵芝菌糠不仅含有黄酮类化合

物,还含有多种其他成分,因此,可以在本实验的基础上进一步探究灵芝菌糠中其他成分的提取率及它们的性质特征,从而能够更加充分合理的利用灵芝菌糠资源。

参考文献:

- [1] Lin Z B. Modern Research on Ganoderma (Lingzhi) [M]. 4th ed. Beijing: Peking University Medical Press, 2015.
- [2] 林志彬. 灵芝抗肿瘤作用的免疫学机制及其临床应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015(6): 865-882.
- [3] Lin Z B, Zhang H N. Anti-tumor and immunoregulatory activities of Ganoderma lucidum and its possible mechanisms [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25 (11): 1387-1395.
- [4] 陈世通, 李梦杰, 李荣春. 食用菌菌糠综合利用的研究现状[J]. 北方园艺, 2011, 19: 152-154.
- [5] 赵晓丽, 陈智毅, 刘学铭. 菌糠的高效利用研究进展[J]. 中国食用菌, 2012(2): 1-3.
- [6] 贾贵华, 任雪峰, 吴冬青, 等. 响应面分析法优化党参总黄酮提取工艺研究[J]. 中兽医医药杂志, 2013(1): 12-16.
- [7] 张路, 于慧敏, 杜凤沛, 等. 金花葵中总黄酮的分离提取及含量测定[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2015(4): 104-108.
- [8] 李楠, 刘元, 侯滨滨. 黄酮类化合物的功能特性[J]. 食品研究发, 2005(6): 139-141.
- [9] 吴迪, 王刚. 金花葵花总黄酮提取工艺研究[J]. 辽宁中

医药大学学报, 2013(5): 48-49.

- [10] 刘伟新, 邓继华, 徐鸿. 一种金鸡菊花的生药学研究[J]. 中国民族医药杂志, 2009(1): 24-25.
- [11] 丁楠. 牛血制备亚硝基血红蛋白发色剂极其应用的研究[D]. 辽宁医学院, 2011.
- [12] 刘振荣, 王君, 张向东, 等. 超声波法提取氯化血红素的初步研究[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2003(4): 373-377.
- [13] 李林强, 李建科, 刘迎利. 超声波处理提取华山松籽油的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003(5): 115-117.
- [14] 刘野, 邹婷婷, 宋焕禄. 响应曲面法优化西瓜籽蛋白提取工艺[J]. 食品工业科技, 2013(3): 250-254.
- [15] Ali A W, Devinder K, Idrees A, et al. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology [J]. Journal of Food Science and Technology, 2007(10): 1-7.
- [16] Moke, Dickw. Response of starch of different wheat classes to ball milling [J]. Cereal Chemistry, 1991, 6(8): 409-412.
- [17] 孙琼, 张直峰, 李月梅. 响应面法优化超声辅助提取杏鲍菇黄酮类化合物工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015(10): 264-268.

[责任编辑 李晓霞]

Study on Ultrasonic Extraction Process of Total Flavonoids from *Ganoderma Lucidum* Fungus Chaff

ZHANG Xu-hui¹, ZHAO Rui-hua^{1,2*}, LI Dan-yang¹
ZHU Dan-jie¹, CHA LEI¹, LI JIAN¹

(1. College of Life Science, Yan'an University; 2. Strategic Alliance of Technological Innovation of Edible Fungi Industry in Yan'an, Yan'an 716000, China)

Abstract: Take *Ganoderma lucidum* fungus chaff as raw material, the extraction conditions of flavonoids from it were optimized by ultrasonic assisted extraction. With the extraction rate of flavonoids as an index, the effects of four factors about ethanol concentration, ultrasonic temperature, ultrasonic time and ratio of material to liquid on the extraction rate of flavonoids in *Ganoderma lucidum* fungus chaff were studied by single factor and $L_9(3^4)$ orthogonal test. The order of different influence factors about the yield of flavonoids were as follows: ethanol concentration > ultrasonic temperature > material liquid ratio > ultrasonic time, and the optimal extraction conditions were as follows: volume fraction of ethanol 70%, extraction temperature 60 °C, ultrasonic time 55 min, ratio of material to liquid 1:40, and extraction rate was 2.972%. Ultrasonic assisted extraction technology has the guiding significance and practical significance for the extraction, development and utilization of total flavonoids in *Ganoderma lucidum* fungus chaff.

Key words: *Ganoderma lucidum* fungus chaff; total flavonoids; ultrasonic extraction; extraction rate