

正交设计法优化桦褐孔菌总三萜超声提取工艺

田明月¹, 俞力超³, 徐秀泉^{2*}

(1. 江苏大学临床医学院, 江苏 镇江 212001; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013;
3. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212001)

[摘要] 目的: 在单因素试验的基础上, 通过正交试验优化桦褐孔菌总三萜的超声提取工艺。方法: 采用单因素试验和正交试验法考察提取溶剂、超声温度、时间及料液比对桦褐孔菌总三萜得率的影响, 优化出最佳提取工艺条件。结果: 各因素的影响依次为超声提取时间 > 提取温度 > 料液比, 提取的最佳工艺条件为采用异丙醇做提取溶剂, 料液比为 1:10, 在 50℃ 下, 超声提取 30 min。在此最佳条件下, 总三萜得率为 5.06%。结论: 优化得到的桦褐孔菌总三萜超声提取工艺稳定, 可行。

[关键词] 桦褐孔菌; 总三萜; 超声提取; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0031-03

Optimization of Ultrasound Extraction of Total Triterpenoids from *Inonotus obliquus* by Orthogonal Test

TIAN Ming-yue¹, YU Li-chao³, XU Xiu-quan^{2*}

(1. School of clinic medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China;
2. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;
3. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction technology of total triterpenoids from *Inonotus obliquus* by orthogonal test based on single-factor experiments. **Method:** The factors such as extraction solvent, extraction temperature, extraction time and material to solvent ratio were optimized by orthogonal test. **Result:** The factor of extraction time was the most significant parameter for the process, and then extraction temperature, sample to solvent ratio was the last one. The highest extraction rate of total triterpenoids by ultrasound-assisted extraction could arrive at 5.06% using isopropanol as solvent and the sample to solvent ratio was 1:10 at 50℃ extracted for 30 min. **Conclusion:** The optimum extraction process for total triterpenoids was stable and feasible.

[Key words] *Inonotus obliquus*; total triterpenoids; ultrasound-assisted extraction; orthogonal test

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus*, 又称 chaga, 从 16 世纪以来就是俄罗斯、东欧、波兰、芬兰等国家民间广泛应用的药用真菌, 用于防治各种疑难杂症, 日本研究人员高度评价这种民间药用真菌为“万

能药”^[1]。桦褐孔菌中主要含有多糖、酚类及三萜类化合物, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等多种药理活性, 其中三萜类化合物是其中主要的活性成分^[2-3]。对桦褐孔菌三萜类化合物分离鉴定等方面报道较多^[4-6]。近年来也有采用高压脉冲电场, 超声等方法提取桦褐孔菌三萜的报道^[7-9], 其中超声提取技术因其强大的空化效应、机械传质作用用于天然活性成分的提取具有明显的优势^[10-11]。为深入开发该药用真菌, 本研究在单因素试验基础上采用正交试验设计方法, 对桦褐孔菌三萜的超声提取工艺进行优化。

[收稿日期] 20110120(001)

[基金项目] 镇江市社会发展项目(SH2010033)

[第一作者] 田明月, 硕士研究生, 研究方向: 天然抗肿瘤活性成分分离及分析

[通讯作者] *徐秀泉, 博士生, 讲师, 研究方向: 天然活性成分提取分离及活性分析, Tel: 0511-85038403, E-mail: xxq781026@sohu.com

1 材料

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), DHG-9145 鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), KQ-250DB 型超声波仪(昆山市超声仪器有限公司), BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

实验用桦褐孔菌购自吉林省千百汇土特产有限公司, 经江苏大学药学院沈绛英副主任药师鉴定为桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 干燥的菌核, 粉碎过 16 目筛备用, 齐墩果酸对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 10709-200806), 高氯酸、香草醛、冰醋酸等均为分析纯。

2 试验方法

2.1 标准曲线的绘制^[8] 准确称取干燥恒质量的齐墩果酸标准品 20.2 mg 置于 100 mL 的量瓶中, 加入甲醇超声溶解, 稀释至刻度摇匀, 即为质量浓度 $202 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准品溶液, 分别精确吸取该标准品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 水浴挥尽溶剂, 加 0.3 mL 新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 1 mL 的高氯酸, 75 °C 反应 15 min, 冰水冷却, 加冰醋酸至刻度, 摇匀, 在 550 nm 波长下测定吸光度。并以齐墩果酸质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得吸光度与质量浓度的回归方程 $A = 0.036C - 0.0094$ ($r = 0.9993$), 结果表明齐墩果酸在 $4.04 \sim 20.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度 A 呈现良好的线性关系。

2.2 桦褐孔菌总三萜的提取及含量测定 准确称取 1.0 g 桦褐孔菌粉末于 100 mL 锥形烧瓶中, 加入一定体积的提取溶剂, 用封口膜密封在规定温度下超声提取一定时间后(40 kHz, 250 W), 冷却至室温, 离心, 按照 2.1 项下测定样品吸光度, 计算总三萜得率。

采用单因素试验考察提取溶剂、超声时间、超声温度、料液比对桦褐孔菌总三萜提取率的影响, 依据单因素实验结果确定因素水平范围, 按 4 因素 3 水平表进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂对总三萜得率的影响 准确称取 1.0 g 桦褐孔菌粉末, 分别加入 95% 乙醇、甲醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、异丙醇 20 mL, 在 50 °C 下超声提取 20 min, 离心, 按标准曲线项下测定样品吸光度, 计算总三萜得率, 分别为 3.02%, 4.16%, 1.47%,

1.06%, 4.89%。异丙醇对桦褐孔菌总三萜的提取效果最好, 这与潘春丽等人的实验结果基本一致^[7], 桦褐孔菌三萜为羊毛脂烷型, 骨架中多有醇羟基和羧基, 具有一定的极性。根据相似相溶的原理, 可能异丙醇的极性最接近于桦褐孔菌三萜化合物, 做提取溶剂最佳。

3.2 超声时间对总三萜得率的影响 准确称取 1.0 g 桦褐孔菌粉末, 加入异丙醇 20 mL, 在 50 °C 下分别超声提取 5, 10, 20, 30, 40 min, 离心, 按标准曲线项下测定样品吸光度, 计算总三萜得率, 分别为 4.1%, 4.3%, 5.0%, 4.9%, 4.8%。超声波在较短时间内能够对桦褐孔菌总三萜进行充分的提取, 超声时间越长, 总三萜得率越高。但超过 20 min, 总三萜得率略有下降, 可能由于超声时间过长, 其他物质也会溶出, 在提取溶剂量不变的情况下, 会影响三萜物质的溶出。

3.3 超声温度对总三萜得率的影响 准确称取 1.0 g 桦褐孔菌粉末, 加入异丙醇 20 mL, 分别在 30, 40, 50, 60, 70 °C 下超声提取 20 min, 离心, 按标准曲线项下测定样品吸光度, 计算总三萜得率分别为 3.9%, 4.6%, 5.0%, 4.8%, 4.7%。在低于 50 °C 的范围内随着温度的逐渐升高三萜得率随之升高, 说明较高的温度对三萜类化合物的溶出是有利的。当超过 50 °C 后, 三萜得率变化不大, 略有下降的趋势, 这可能由于在较高温度下, 溶剂挥发严重加之其他物质也随之溶出的缘故。

3.4 料液比对总三萜得率的影响 准确称取 1.0 g 桦褐孔菌粉末, 分别加入异丙醇 5, 10, 15, 20, 30 mL, 在 50 °C 下超声提取 20 min, 离心, 按标准曲线项下测定样品吸光度, 计算总三萜得率分别为 2.4%, 4.7%, 4.9%, 5.0%, 4.9%。随料液比的增加, 总三萜的提取率相应增高, 料液比 1:10 时总三萜得率已经达到 4.70%, 这是由于溶剂用量增加, 可以使药材与溶剂接触面积增大, 并且能够增大固液浓度差, 有利于扩散速度的提高。当料液比大于 1:20 时, 总三萜的提取率增高趋势变缓。

3.5 最佳提取工艺考察 根据正交试验设计原理, 选择超声温度、超声时间、料液比 3 个因素, 每个因素 3 个水平, 用 $L_9(3^3)$ 正交试验表进行正交试验, 其因素水平选取见表 1, 方案与结果见表 2。

对桦褐孔菌总三萜超声提取结果的数据进行直观分析, 可以看出, 影响因素顺序为 $A > B > C$, 即超

表1 桦褐孔菌总三萜提取工艺因素水平

水平	A 超声时间/min	B 超声温度/℃	C 料液比/倍
1	10	40	1:10
2	20	50	1:20
3	30	60	1:30

表2 桦褐孔菌总三萜提取工艺正交设计及结果

No	A	B	C	D	三萜得率/%
1	1	1	1	1	4.57
2	1	2	2	2	4.81
3	1	3	3	3	4.88
4	2	1	2	3	4.90
5	2	2	3	1	5.18
6	2	3	1	2	5.01
7	3	1	3	2	5.02
8	3	2	1	3	5.05
9	3	3	2	1	5.12
K_1	4.753	4.830	4.877	4.957	
K_2	5.030	5.013	4.943	4.947	
K_3	5.063	5.003	5.027	4.943	
R	0.310	0.183	0.150	0.014	

声提取时间对总三萜得率影响最大,料液比对总三萜提取得率影响最小。根据分析结果得到最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3$,即超声提取时间 30 min,提取温度为 50℃,料液比为 1:30。基于单因素实验结果料液比对总三萜得率影响最小,从节约溶剂及能源的角度考虑,调整工艺条件 $A_3B_2C_1$,即超声提取时间 30 min,提取温度为 50℃,料液比为 1:10,并进行比较。见表 3。

表3 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.310	2	0.155	22.14*	<0.05
B	0.183	2	0.092	13.07	
C	0.150	2	0.075	10.71	
D	0.014	2	0.007		

3.5 验证试验 为了确保该提取工艺的可行性与合理性,按照上述提取方案,分别进行了 3 次验证试验。结果见表 4。

表4 超声提取桦褐孔菌最佳条件组合验证试验

料液比	超声时间/min	超声温度/℃	总三萜得率/%
1:30	54.75	50	5.22
1:10	52.11	50	5.06

从表 4 可以看出,按照最佳工艺进行超声提取,总三萜的平均得率 5.22%,将料液比降低为 1:10,总三萜平均得率 5.06%,总三萜得率降低较小(<3%),但大大降低了试剂的消耗,因此可选择给工艺作为最佳提取工艺。

4 讨论

将单因素试验和正交设计法结合对超声辅助提

取桦褐孔菌总三萜的工艺条件进行优化,获得最佳提取工艺条件:超声提取温度 50℃、超声提取时间 30 min,料液比 1:10,在此条件下桦褐孔菌总三萜得率为 5.06%。采用超声提取工艺,缩短了提取时间、降低了提取温度、减少了提取能耗,其原因是超声波产生的强烈振动、高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等,都可加速有效成分进入溶剂,从而提高了提出率,缩短了提取时间,并且免去了高温对提取成分的影响,不失为一种较为先进的提取手段。

[参考文献]

- [1] 梁清乐,王秋颖,樊锦燕,等. 桦褐孔菌的研究概况[J]. 中草药,2005,36(4):623.
- [2] Nakata T, Yamada T, Taji S, et al. Structure determination of inonotsuoxides A and B and in vivo anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(1):257.
- [3] Nomura M, Takahashi T, Uesugi A, et al. Inotodiol, a lanostane triterpenoid from *Inonotus obliquus*. Inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis [J]. Anticancer Res, 2008, 28(5):2691.
- [4] Taji S, Yamada T, In Y, et al. Three new lanostane triterpenoids from *Inonotus obliquus*[J]. Helv Chim Acta, 2007, 90(11):2047.
- [5] Taji S, Yamada T, Tanaka R, et al. Three new lanostane triterpenoids inonotsutriols A, B, and C, from *Inonotus obliquus*[J]. Helve Chim Acta, 2008, 91(8):1513.
- [6] Nakamura S, Iwami J, Matsuda H, et al. Absolute stereostructures of inoterpenes A-F from sclerotia of *Inonotus obliquus*[J]. Tetrahedron, 2009, 65(12):2443.
- [7] 潘春丽,查勇,张鑫,等. 桦褐孔菌三萜化合物提取工艺的优选[J]. 生物加工过程, 2008, 6(4):36.
- [8] 殷涌光,崔彦如,丁宏伟. 超声波辅助提取桦褐孔菌中白桦脂醇的研究[J]. 农业机械学报, 2008, 39(4):204.
- [9] Yin Y G, Cui Y R, Ding H W. Optimization of betulin extraction process from *Inonotus obliquus* with pulsed electric fields [J]. Innovative Food Science Emerging Technologies, 2008, 9(3):306.
- [10] Sueli Rodrigues, Gustavo A S Pinto. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder[J]. J Food Eng, 2007, 80:869.
- [11] Chen Qihe, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology [J]. Ultrason Sonochem, 2009, 16:599.

[责任编辑 全燕]