

声磁发生器结合响应曲面优化平盖灵芝提取工艺的研究

马捷琼^{1,2*}, 袁博², 刘缠民³, 秦志宏¹, 蒋继宏²

(1. 中国矿业大学化工学院, 江苏 徐州 221008; 2. 徐州师范大学省药用植物生物技术实验室, 江苏 徐州 221116; 3. 徐州师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116)

[摘要] 目的:用中药快速声磁发生器对平盖灵芝进行提取。方法及结果:通过正交实验设计结合响应面方程分析了声磁发生器的超声功率、磁化强度、提取时间和提取剂乙醇体积分数对响应值(浸膏得率)的影响,得到的优化工艺参数为声磁发生器的超声强度 26.6 KHz、磁场强度为 1 252.50 GS、提取时间 40 min 和乙醇体积分数 70%。在此提取条件下浸膏得率可以达到 11.86%。结论:研究表明中药快速声磁发生器是非常有效的中药快速提取实验装置。

[关键词] 平盖灵芝;声磁发生器;响应面分析

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0006-05

Extraction Methods of *Ganoderma applanatum*: Fast Magnetic Sound Generator and Response Surface Analysis

MA Jie-qiong^{1,2*}, YUAN Bo², LIU Chan-min², QIN Zhi-hong¹, JIANG Ji-hong²

(1. Chemical and Engineering School of China University of Mining and Technology;

2. the Key Laboratory of Drug of Xuzhou Normal University Xuzhou 221116, China;

3. The School of Life Sciences, Xuzhou 221116, China)

[Abstract] *Ganoderma applanatum* was extracted with fast magnetic sound generator. Response surface analysis(RSA) with orthogonal experimental design was successfully applied to determine the optimal conditions where the maximum extraction of the *G. applanatum* with fast magnetic sound generator occurred, which was at ultrasonic intensity 26.6 KHz, magnetic strength 1 252.5 GS, extraction time 40 min and the concentration of ethanol 70%. In this extraction conditions, the yield of extract can reach 11.86%. This study shows that traditional Chinese medicine fast magnetic sound generator is a very effective experimental device for rapid extraction of Chinese medicine.

[Key words] *Ganoderma applanatum*; sound and magnetic generator; RSA

平盖灵芝为担子菌类多孔菌科灵芝属 *Ganoderma applanatum* 的子实体,又称为扁木灵芝、扁芝、树舌等,具有调节免疫、保肝、抗衰老、提高机体耐缺氧能力等活性^[1],是中国开发应用较早和比

较悠久的一种传统中药。灵芝化学成分复杂,目前已知含有糖类、氨基酸、蛋白质、多肽、甾类、挥发油、香豆精苷、生物碱、树脂、油脂、多种酶类和微量元素等多种物质^[2]。目前灵芝的提取工艺一般采用传统的水煎煮或者索氏萃取等方法,水煎煮容易使热敏感成分丧失活性,而索氏萃取则费时较多。把超声和磁化提取技术适用于天然产物,特别是我国传统中草药有效成分的提取,是中药制药提取工艺的新方法、新工艺。中药快速声磁发生器把超声和磁化技术用于天然产物提取,特别是我国传统中草药有效成分的提取,是中药制药提取工艺的新方法、新

[收稿日期] 20100125(002)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金重大基础研究项目(08KJA350001); 国家 863 计划项目(2007AA021506)

[通讯作者] * 马捷琼,在读博士,研究方向:中药提取和分离的化学工艺, Tel: 15150089501, E-mail: a1032042419@126.com

工艺。超声产生的强烈冲击使细胞壁及整个生物体破裂,加速细胞内物质的释放、扩散及溶解^[3];磁化^[4]利用磁场改变提取剂本身的物理化学性质,使得水的 pH 值增大,减少水的缔合度,使较大的水分子团转变为较小的水分子团,甚至为单一的水分子;在一定范围内扩散系数、溶解度和渗透压均提高^[5-7]。然而,迄今为止,把超声和磁化两种技术相结合应用于提取平盖灵芝有效成分的研究尚无文献报道。为了在最短的时间内进行有效的提取试验,本研究应用中药快速声磁发生器采用正交实验结合 RSM 法(忽略回归方程中的二次项交叉相),以平盖灵芝浸膏初得率为考察指标,对影响浸膏得率的超声强度、磁化功率等关键因素进行研究,同时初步探讨了超声和磁化技术对获取浸膏所含化合物的种类和含量的影响。期望为灵芝在超声和磁化状态下的最佳提取工艺提供理论和实践依据。

1 材料

平盖灵芝 *Ganoderma applanatum*;产于吉林长白山,经徐州师范大学省药用植物生物技术实验室蒋继宏教授鉴定;95%乙醇(汕头市西陇化工有限公司)。

中药快速声磁发生器(山东济宁超声电子仪器厂);旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);电子天平(BS224S,德国赛多利斯);家用万能粉碎机(河南荥阳市农机实验厂);电子天平(BS224S,德国赛多利斯);加热索氏萃取器:山东鄄城华鲁电热仪器有限公司;Clarus 600 型气质联动分析仪(珀金埃尔默仪器有限公司)。

2 方法

2.1 浸膏提取工艺

2.1.1 原料处理 平盖灵芝小块恒温鼓风干燥箱中 50℃烘干 24 h,粉碎后过 100 目筛。称取灵芝粉末 170 g 放入声磁发生器的药篮内。

2.1.2 索氏萃取 原料处理同上,平盖灵芝粉末 170 g 放入索氏萃取的放置篮内。自来水冷凝,95%乙醇为提取试剂,加热温度为保持索氏萃取圆底烧瓶内提取液体不沸腾但很快有冷凝提取液回流的温度,不间断提取 24 h。提取液经过旋转蒸发器浓缩后在通风厨中挥发干燥,用分析天平称量得到的浸膏,计算浸膏得率。

2.1.3 声磁发生器萃取 称取相同质量的平盖灵芝按照质量和体积比为 17:2 500 的比例配置萃取液,添加好后浸泡 2 d 进行试验。提取液处理同上。

2.2 浸膏气质联动分析 索氏萃取和声磁发生器得到的浸膏中选取得率最大的浸膏分别进行石油醚和乙酸乙酯两相硅胶过柱淋洗。两相萃取物进行气质联动检测。

气相色谱分析条件:石英毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm);进样口温度 200℃,检测器温度 250℃;程序升温:初始温度 60℃,以 4℃·min⁻¹的速率升温至 150℃保持 3 min,以 25℃·min⁻¹的速率升温至 200℃保持 1 min,分流比 40:1,进样量 1 μL;载气为氦气(纯度 >99.99%),流速为 1.0 mL·min⁻¹。电子轰击(EI)离子源,电离电压 70 eV,离子源温度 220℃,加速电压 200 eV;扫描质量 m/z 35 ~ 550^[9-17]。

2.3 正交实验结合响应面方程优化实验方法要点

采取正交实验设计,以超声强度、磁化功率、提取时间和乙醇浓度 4 个因子为自变量,分别以 X_1, X_2, X_3, X_4 表示,按方程 $x_i = (X_i - X_0)/\Delta x$ 自变量进行编码, x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为实验中心点处自变量的真实值, Δx 为自变量的变化步长。瓶盖灵芝的浸膏提取率 $Y^{[8]}$ 。试验因素的水平编码见表 1。

表 1 平盖灵芝提取试验的因素与水平

因素	代码		水平		
	编码	非编码	-1	0	1
超声波功率	x_1	X_1	0	20	40
磁场强度	x_2	X_2	0	1 500	3 000
提取时间	x_3	X_3	20	40	60
乙醇体积分数	x_4	X_4	60	70	80

设该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为:

$$Y = \beta + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2$$

其中 β 为常数项, β_i 为线性系数, β_{ii} 为二次项系数。

3 结果和分析

3.1 正交试验设计和检测的结果 见表 2 ~ 4。

表 3 表明假设的回归方程决定系数(R-Square)为 0.9157,离回归标准差(MSE)为 0.4882,用该方程拟合本实验,具有较高的可靠性。由表 4 可知,声磁发生器的超声波功率和磁场强度对浸膏得率的影响是非常显著和显著,而提取时间和乙醇浓度对浸膏的得率在本试验研究的范围内没有发现显著影响。二次项也没有检测到影响显著项。

表 2 平盖灵芝提取正交试验的设计与结果

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	响应值(Y%)
1	-1	-1	-1	-1	7.56/8.01/8.07
2	-1	0	0	0	8.21/8.24/8.56
3	-1	1	1	1	9.21/9.01/9.56
4	0	-1	0	1	9.04/9.16/10.54
5	0	0	0	-1	9.88/9.36/10.98
6	0	1	1	0	10.36/10.01/9.45
7	1	-1	1	0	11.21/11.01/11.38
8	1	0	-1	1	11.36/11.46/11.68
9	1	1	0	-1	11.56/11.86/11.12

表 3 回归方程方差分析表

回归项	f	SS	R^2	Adj R^2	MSE	P
模型	8	46.62	0.915 7	0.878 3	0.488 20	<0.000 1

表 4 方程参数估计与显著性分析

常数项	一次项				二次项			
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1^2	X_2^2	X_3^2	X_4^2
<0.000 1 **	<0.000 1 **	<0.05 *	0.117 2	0.762 9	0.224 3	0.293 5	0.948 0	0.068 1

注: **相关非常显著; * 相关显著

3.2 响应曲面方程建立 应用 SAS8.0 通过最小二乘法拟合得到正交实验结合响应面方程如下:

$$Y = 9.569 17 + 1.545 00X_1 + 0.032 08X_2 + 0.633 75X_3 + 0.024 17X_4 + 0.312 50X_1^2 - 0.509 58X_2^2 + 0.214 58X_3^2 + 0.528 33X_4^2$$

3.3 响应曲面分析 三维响应曲面可以直接反映影响因素对响应值的影响,曲面向上凸较陡说明影响显著,反之不显著。由统计分析结果可知在考察的 4 个因素中 X_1 (超声波功率) 和 X_2 (磁场强度) 检测到了和响应值的显著相关。

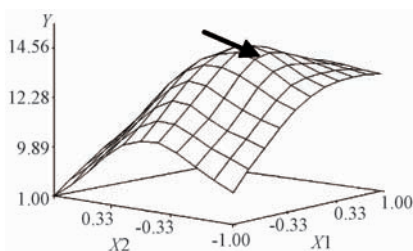


图 1 中药快速声磁发生器不同因素对平盖灵芝提取率的影响

Fixed levels: $x_3 = 0$ $x_4 = 0$ block = 1

图 1 可知响应面的最大值位于箭头所指,估计此时的 X_1 为 0.33, 而 X_2 为 -0.165, 此时的响应值为 11.86%, 即在试验条件为超声波强度 26.6 KHz,

磁场强度为 1252.5GS 的条件下对灵芝的提取率最大为 11.86%。最大值位于响应曲面上,最大值即是稳定点。进行二次回归统计分析得出的理论最大响应值的预测值(95%, 0.4) 为 12.92%。为了验证响应面预测最大值的可信性做了验证性试验,实验结果如表 5。

表 5 平盖灵芝提取验证试验中的稳定点和理论预测值

响应变量					
超声波强度 /KHz	磁场强度/GS	提取时间 /min	乙醇体积分数/%	稳定点	预测值/%
26.6	1252.5	40	70	11.86	12.92

这和通过方程计算出来的理论最大响应值非常接近。说明拟合出的方程是适合本试验的,具有很好的预测性,对后续试验具有较高的指导意义。

3.4 色谱结果分析 得到的浸膏石油醚和乙酸乙酯两相硅胶柱淋洗物进行气质联动(GC-MS)检测分析的结果见图 2,3。

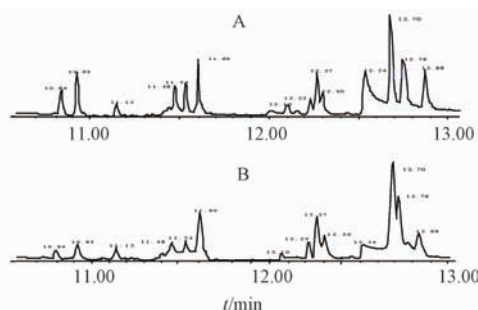


图 2 声磁发生器(A) 索氏加热萃取(B) 石油醚气相色谱检测图

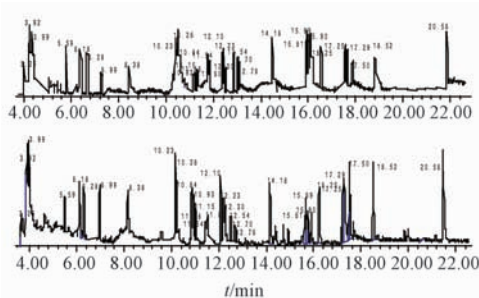


图 3 声磁发生器(A) 索氏加热萃取(B) 乙酸乙酯气相色谱检测

检测到的物质进行质谱分析,检测到的物质种类含量结果如表 6。

由表 6 可知中药快速声磁发生器提取的浸膏经过气质联动检测到的中小极性化合物的种类和百分含量和索氏萃取相比较没有显著的差别。

表 6 气相色谱和质谱匹配检测得到的物质

t_R/min	分子式	化合物名称	质量分数/%
3.25	$C_{19}H_{38}O_2$	heptadecanoic acid, ethyl ester	5.33(5.18)
3.92	$C_{16}H_{32}O_2$	tetradecanoic acid, ethyl ester	3.74(3.64)
3.99	$C_{18}H_{34}O_2$	oleic acid	3.01(3.20)
5.59	$C_{19}H_{36}O_2$	9-octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	1.81(1.85)
6.18	$C_{17}H_{34}O_2$	hexadecanoic acid, methyl ester	3.23(3.33)
6.28	$C_{18}H_{34}O_2$	ethyl 9-hexadecenoate	2.42(2.35)
6.99	$C_{19}H_{34}O_2$	8,11-octadecadienoic acid, methyl ester	11.98(11.88)
8.38	$C_{10}H_{22}O_4$	tri(1,2-propyleneglycol), monomethyl ether	1.24(1.23)
10.23	$C_{20}H_{30}O_4$	1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl-ethylhexyl ester	1.13(1.16)
10.26	$C_{17}H_{34}O_2$	pentadecanoic acid, ethyl ester	1.67(1.57)
10.84	$C_{13}H_{12}O_3$	2H-1-benzopyran-2-one,4-methyl-7-(2-propenyloxy)	2.30(2.28)
10.93	$C_{18}H_{36}O_2$	hexadecanoic acid, ethyl ester	2.677(2.66)
11.15	$C_{18}H_{34}O_2$	ethyl 9-hexadecenoate	3.60(3.50)
11.48	$C_{18}H_{32}O_2$	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)	2.30(2.25)
11.54	$C_{20}H_{36}O_2$	9,12-octadecadienoic acid, ethyl ester	2.45(2.40)
11.60	$C_{16}H_{32}O_2$	tetradecanoic acid, ethyl ester	17.78(17.80)
12.23	$C_{12}H_{22}O$	trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol	1.605(1.60)
12.25	$C_{19}H_{38}O_2$	heptadecanoic acid, ethyl ester	1.605(1.59)
12.30	$C_9H_{20}O_2$	si (mainlib) cyclohexanol, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, cis-	16.766(16.70)
12.54	$C_{12}H_{20}O$	trans-8-methyl-1 α -acetyl-hydrindane	8.382(8.20)
12.64	$C_{20}H_{36}O_2$	9,12-octadecadienoic acid, ethyl ester	4.125(4.15)
12.50	$C_{18}H_{32}O_2$	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)-	8.382(8.38)
12.70	$C_{30}H_{22}O_4$	benzene, ,3-bis(3-phenoxyphenoxy)	42.125(42.13)
12.76	C_9H_{12}	benzene, 1,3,5-trimethyl-	24.008(23.98)
12.88	$C_{16}H_{32}O_2$	tetradecanoic acid, ethyl ester	3.423(3.41)
14.16	$C_9H_{20}O_4$	2-propanol,1'-[(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis(oxy)]bis-	4.41(4.35)
15.61	$C_9H_{20}O_4$	2-propanol,1,1'-[(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis(oxy)]bis-	1.91(1.89)
15.69	$C_9H_{20}O_4$	2-propanol, 1,1'-[(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis(oxy)]bis-	4.21(4.16)
15.90	$C_9H_{20}O_4$	2-propanol, 1,1'-[(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis(oxy)]bis-	10.054(10.03)
16.25	$C_9H_{20}O_4$	2-propanol, 1,1'-[(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis(oxy)]bis-	7.273(7.04)
17.25	$C_{10}H_{22}O_4$	2-propanol, 1-[2-(2-methoxy-1-methylethoxy)-1-methylethoxy]-	5.84(5.76)
17.29	$C_{10}H_{22}O_4$	2-propanol, 1-[2-(2-methoxy-1-methylethoxy)-1-methylethoxy]-	11.347(11.32)
17.50	$C_{19}H_{25}NO_5$	ethaneperoxic acid,1-cyano-1-2-(2-phenyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]pentyl ester	9.188(9.16)
18.52	$C_9H_{18}O_3$	2-propanol,-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]	2.648(2.54)
20.56	$C_{22}H_{42}O_4$	hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0.8950.85()

注:质量分数为气相色谱检测到的该物质所占总物质的百分含量(%);括号内为声磁发生器获得浸膏两相检测百分含量(%)。

3.5 综合结果分析 试验的结果表明不同的声磁条件对平盖灵芝的萃取物浸膏得率有很大影响。超声产生的强烈冲击作用能使物料破碎,造成生物细胞壁及整个生物体破裂,从而加速细胞内物质的释

放、扩散及溶解;水经过磁化后性质发生了变化,电导率和黏度降低,表面张力系数显著提高,pH 值、渗透压、溶解氧含量、化学位移和光学性质等都发生了改变,缔合度也减少^[9]。这对于溶解植物细胞间隙

和植物细胞内溶物是非常有益的。缔合度的减少使水更加容易的进出细胞膜,而超声有助于破碎植物的细胞壁和比较坚硬的纤维组织,最大限度的把植物细胞内外的有效物质溶解和提取出来。试验的浸膏得率也证明了这一点,(见表 2)。磁化破坏了一些化学键,如氢键和一些分子之间的耦合和络合等,但是本试验的研究结果没有发现适当的超声和磁化可以大量断裂共价键和离子键等这些分子内部的化学键,从而对提取的有效成分形成破坏性的影响(图 2,3)^[18]。不同的声磁条件对平盖灵芝的浸膏得率影响是不同的,由于不同的中药所含有效化学成分不同,磁化和超声对其影响效果也可能会不同,所以不同的中药材进行提取时需要根据具体的试验条件来摸索最佳的提取条件。

4 结论

应用中药声磁发生器对平盖灵芝进行了提取,在正交实验的基础上建立了二次多项式数学模型。研究表明实验观测值和理论预测值非常接近,这证明该模型是合理可靠的。得到的优化工艺参数为超声功率 26.6 KHz、磁场强度 1252.5 GS、提取时间 40 min 和乙醇体积分数为 70%,在此条件下平盖灵芝的总提取率可以达 11.86%。因此在正交实验的基础上结合二次多项式模型,利用响应面进行分析优化可以得到最佳的工艺参数,能有效的减少工艺的盲目性,技术上是是可以实现的。

中药声磁发生器大大节省了提取所用的时间,并未对有效成分的种类和含量形成破坏性影响。中药快速声磁发生器是非常有效的中药提取装置。

[参考文献]

[1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学出版社,2001,14:680.
[2] 陈魁,等. 应用概率统计[M]. 北京:清华大学出版社,2006,4:262.
[3] 万水昌,王志祥,乐龙,等. 超声提取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 西北药学杂志,2008,2(3):60.
[4] 初兰娜,卢家炯,马森,等. 磁化技术提取地黄水苏糖的研究[J]. 现代食品科学技术,2009,25(10):1186.
[5] Anderson N J. Color and turbidity removal with reusable magnetic particles[J]. Water Res, 1983, 17(10): 1227.
[6] Broomberg J, Gelinias S, Finchet J A, et al. Review of

magnetic carrier technologies for metal ion removal[J]. Magn. Electrical Sep, 1999, (9): 169.
[7] 郑必胜,郭祀远. 利用电磁场刺激螺旋藻胞外多糖分泌[J]. 现代食品科技,2006,22(2):31.
[8] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960, 2:456.
[9] Yi Chen, Ming-Yong Xie, Shao-Ping Nie. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*[J]. Food Chemistry, 2008,107:231.
[10] Leonid M Blumberg, Matthew S Klee. Quantitative comparison of performance of isothermal and temperature-programmed gas chromatography [J]. J Chromatography A, 2001, 933: 13.
[11] Colin F Poole, Salwa K Poole. Separation characteristics of wall-coated open-tubular columns for gas chromatography[J]. J Chromatography A, 2008,1184, 254.
[12] Naijun Wu, Juan Carlos Medina, Milton L Lee. Fast gas chromatography: packed column solvating gas chromatography versus open tubular column gas chromatography[J]. J Chromatography A, 892, 2000, 3.
[13] Alexander B Fialkov, Alexander Gordin, Aviv Amirav. Extending the range of compounds amenable for gas chromatography-mass spectrometric analysis [J]. J Chromatography A, 991, 2003, 217.
[14] Jeng-Lenu Mau, Shu-Yao Tsai, Yu-Hsiu Tseng, et al. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill [J]. Food Science and Technology/LWT, 2005, 38(6): 589.
[15] K P Suja, A Jayalekshmy, C Arumughan. Antioxidant activity of sesame cake extract[J]. Food Chemistry, 2005, 91: 213.
[16] Vitaly Roginsky, Eduardo A Lissi. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food [J]. Food Chemistry, 2005,92: 235.
[17] 余细,向亚琳. 关于磁化水农业应用的综述[J]. 安徽农业通报,2008,14:6.
[18] Yi Chen, Ming-Yong Xie, Shao-Ping Nie. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*[J]. Food Chemistry,2008,107:31.

[责任编辑 全燕]