

# 响应曲面法优化超声波提取红缘拟层孔菌总三萜工艺

陈先晖, 袁博, 鞠秀云, 蒋继宏\*

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

**摘要:** 采用响应面法对超声提取红缘拟层孔菌总三萜的工艺进行优化, 在对温度、液料比、超声时间和超声功率单因素试验的基础之上, 根据中心组合设计原理采用四因素三水平的响应曲面分析法, 通过建立数学模型对各因素显著性和交互性的作用分析, 得到了超声提取红缘拟层孔菌总三萜的最佳工艺条件为提取溶剂 95% 乙醇、提取温度 70℃、液料比 26:1(mL/g)、超声时间 39min、超声功率 450W, 此时总三萜的实际提取率为 9.79%。

**关键词:** 红缘拟层孔菌; 响应曲面; 超声波提取; 总三萜

Using Response Surface Methodology to Optimize the Ultrasonic-aided Extraction of Total Triterpenoids from Fruit Bodies of *Fomitopsis pinicola* (Swartz.: Fr.) Karst.

CHEN Xian-hui, YUAN Bo, JU Xiu-yun, JIANG Ji-hong\*

(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** For the optimization of the ultrasonic-aided extraction of total triterpenoids from the fruit bodies of *Fomitopsis pinicola* (Swartz.: Fr.) Karst., a series of single factor experiments were carried out to explore the effects of temperature, material/liquid ratio, ultrasonic treatment time and ultrasonic power on the yield of total triterpenoids and four-variable, three-level response surface methodology based on the principle of central composite design was employed to analyze the significance and interactions of the above four factors affecting the yield of total triterpenoids by mathematical modeling. The optimal extraction conditions were determined as follows: extraction solvent, 95% ethanol; extraction temperature, 70 °C; material/liquid ratio, 26:1; ultrasonic treatment time, 39 min; and ultrasonic power, 450 W. The actual yield of total triterpenoids was 9.79% under such conditions.

**Key words:** *Fomitopsis pinicola*; response surface methodology; ultrasonic-aided extraction; total triterpenoids

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)20-0006-05

红缘拟层孔菌(*Fomitopsis pinicola* (Swartz.: Fr.) Karst.) 属担子菌纲, 多孔菌目, 生于松、云杉、铁杉及落叶松立木和腐木上。偶尔生阔叶树上, 为木材褐色腐朽菌, 在北半球林区是一种最显著、广泛分布而又极待开发的野生资源<sup>[1-2]</sup>。该菌具祛风除湿之功效, 民间用来治疗风寒湿痹, 关节疼痛等疾病<sup>[3]</sup>现已有保健品在市场上销售。研究表明其具降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎及抗肿瘤等作用<sup>[4-8]</sup>。红缘拟层孔菌子实体化学成分主要包括多糖、倍半萜、麦角甾醇类衍生物、pinicolic acid 等羊毛甾烷类三萜化合物以及三萜皂苷<sup>[7-11]</sup>。其中至少有 5 种三萜类化合物具有抑菌作用<sup>[11]</sup>, 有 3 种三萜类

化合物具有选择性抑制 COX-2 的活性<sup>[8]</sup>。可见三萜类化合物是红缘拟层孔菌的主要活性成分之一, 其含量的多少也会影响到红缘拟层孔菌的药用价值。到目前为止, 尽管已有关于红缘拟层孔菌三萜成分分离纯化、鉴定及其生物活性的文献, 但对红缘拟层孔菌总三萜的提取工艺研究还未见报道。

超声技术是利用超声波产生的强烈振动、空化作用和粉碎作用, 可以有效地将植物中的活性成分提取到溶剂中<sup>[12]</sup>。该法简单、提取效率高、副产物少, 能达到比常规提取更理想的效果, 近年来被广泛应用于植物等的活性成分提取。

收稿日期: 2009-12-31

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA021506); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(08KJA350001)

作者简介: 陈先晖(1973—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: chxianhui@163.com

\*通信作者: 蒋继宏(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物资源生物技术。E-mail: jhjiang@xznu.edu.cn

响应曲面法(response surface methodology, RSM)通过数学设计方法设计实验、建立模型、评估试验因素效果并寻求最优化工艺参数,是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法<sup>[13]</sup>,通过对函数响应面和等高线的分析,能够精确的研究各因子与响应值的关系,从而减少单一的数理统计中的误差<sup>[14]</sup>。运用响应面法可以以最经济的方式对所设计的实验参数进行全面的分析和研究。本研究在前期单因素试验基础上,采用RSM进一步综合分析比较影响超声波提取红缘拟层孔菌总三萜的关键因素,确定最佳提取条件,为进一步开发利用红缘拟层孔菌中三萜类活性物质提供一定参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

红缘拟层孔菌子实体 徐州师范大学药用植物生物技术江苏省重点实验室。

熊果酸对照品 中国药品生物制品检定所;乙醇、冰乙酸、乙酸乙酯、高氯酸、香草醛均为分析纯。

SpectraMax M2 酶标仪 Molecular Devices 公司;旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司;KQ-500 型高频数控超声波清洗器(80kHz, 500W) 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品的提取

红缘拟层孔菌干燥子实体 5g,经粉碎混匀后,置于圆底烧瓶中,乙醇作为提取溶剂,按一定温度、液料比、浸提时间和超声功率进行超声提取,抽滤后取滤液检测三萜含量。

#### 1.2.2 标准曲线的绘制

采用分光光度法检测三萜含量<sup>[15]</sup>。精确称取熊果酸标准品 5.0mg,溶于 50.0mL 乙酸乙酯,混合均匀得标准溶液(100 μg/mL)。吸取标准溶液 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mL,分别置于具塞试管中,加热挥去溶剂,然后加入 0.20mL 新配制的 5% 香草醛-冰乙酸溶液和 1.2mL 高氯酸,在 70℃ 恒温水浴中加热 15min 后冷却至室温,并加入乙酸乙酯至总体积为 5.0mL,摇匀后置于室温,15min 后在 550nm 处测定其吸光度。以熊果酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。标准曲线线性回归方程为:

$$A=0.0041C - 0.0189, R^2=0.9990$$

式中: A 为吸光度; C 为熊果酸溶液质量浓度/(μg/mL)。结果表明,熊果酸在 10~100 μg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

#### 1.2.3 单因素试验

以 95% 乙醇提取液、温度 70℃、液料比 20:1(mL/g)、

超声时间 30min 和超声功率 500W 为基本条件,在其他条件不变的情况下,分别选取乙醇体积分数、提取温度、液料比、超声时间和超声功率做单因素试验,按照 1.2.1 节方法提取,并计算提取率。

$$Y/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

式中:  $m_1$  为提取液中三萜化合物总量/g;  $m_2$  为红缘拟层孔菌样品称样量/g。

### 1.2.4 响应曲面法试验设计

综合单因素试验结果,采用响应面法建立数学模型对红缘拟层孔菌总三萜超声提取工艺进行优化,分别用  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  表示提取温度、液料比、超声时间和超声功率。利用 Box-Behnken 中心组合设计(CCD)原理设计正交试验,见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平表  
Table 1 Factors and levels in the response surface design

水平	因素			
	$x_1$ 提取温度/℃	$x_2$ 料液比/(mL/g)	$x_3$ 超声时间/min	$x_4$ 超声功率/W
-1	30	10	20	300
0	50	20	30	400
1	70	30	40	500

注:  $X_1=(x_1 - 50)/20$ ;  $X_2=(x_2 - 20)/10$ ;  $X_3=(x_3 - 30)/10$ ;  $X_4=(x_4 - 400)/100$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

从图 1 可以看出,5 种单因素变量对红缘拟层孔菌子实体总三萜的提取率都有较大影响。由图 1(a)可知,95% 乙醇提取率最高,无水乙醇提取率反而有所下降,可能是 95% 乙醇更有利于三萜皂苷的提取,因此,后继试验均使用 95% 乙醇作为提取溶剂。

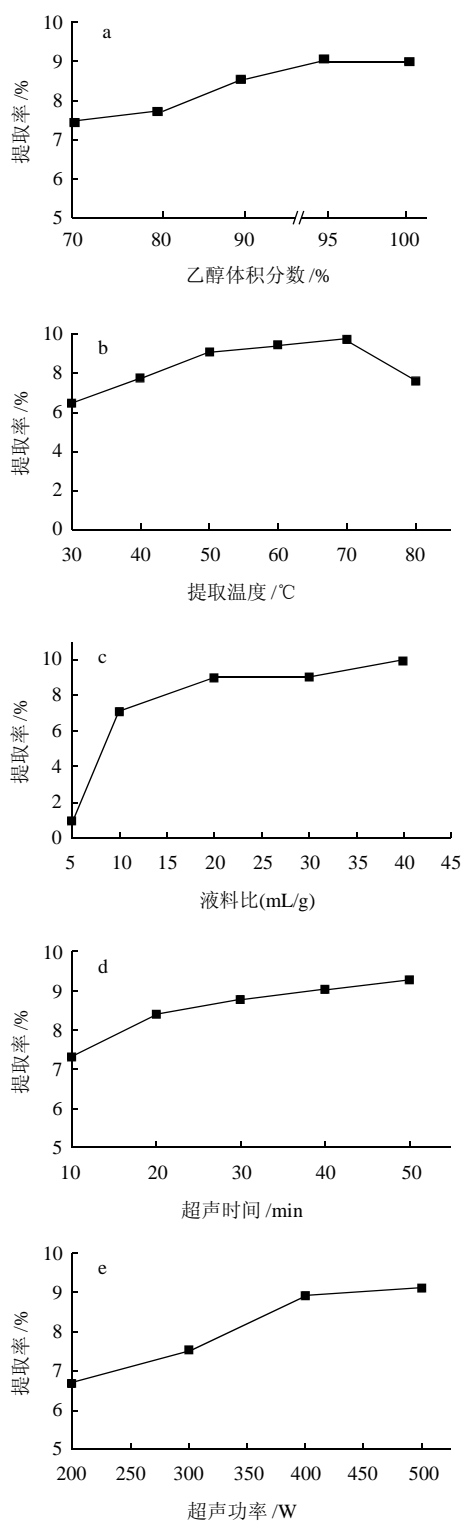
由图 1(b)可知,随着提取温度的不断升高,三萜提取率亦随之增加,70℃ 时三萜提取率最高,但在 80℃ 时反而明显下降,其原因可能是由于 80℃ 下杂质溶出较多并对三萜的提取产生影响,也可能是由于溶剂散失较多从而导致提取率下降。

由图 1(c)可知,当所加溶剂用量为 5 倍量时,溶剂未能将材料充分覆盖,故提取率很低;当所加溶剂用量增至 20、30、40 倍量时,提取率较高且相近。考虑到液料比太高对后续的浓缩以及纯化工作带来不便,因此,本实验采用 20:1 为合适的液料比。

由图 1(d)可知,提取率随超声时间的延长而增大,但超声时间分别为 30、40、50min 时,提取率增长并不大。考虑到时间成本,故选择超声时间为 30min。

从图 1(e)可知,随着超声功率的提高,提取率也随之增大,但在 500W 左右变化不大。这是由于增大超

声功率强化传质同时使细胞的破碎程度增加,从而有利于三萜类化合物的提取。



a. 乙醇体积分数; b. 提取温度; c. 液料比; d. 超声时间; e. 超声功率。

图1 各因素对红缘拟层孔菌总三萜提取率的影响

Fig.1 Results of single factor investigations on the effects of temperature, material/liquid ratio, ultrasonic treatment time and ultrasonic power on the yield of total triterpenoids

## 2.2 响应曲面试验结果

### 2.2.1 试验结果及方差分析

响应面试验结果见表2,模型方差分析结果见表3,当 $P < 0.05$ 时,即表示该项指标显著。

表2 Box-Behnken 试验结果

Table 2 Arrangement and results of the four-variable/three-level response surface central composite design

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	提取率/%
1	1	-1	0	0	7.83
2	1	1	0	0	9.80
3	0	1	1	0	8.78
4	0	1	-1	0	8.34
5	0	0	0	0	8.35
6	-1	0	0	-1	6.31
7	0	-1	0	-1	6.09
8	-1	0	-1	0	7.08
9	-1	-1	0	0	5.77
10	0	-1	0	1	7.32
11	-1	0	0	1	8.87
12	0	0	1	-1	8.31
13	1	0	-1	0	8.10
14	1	0	0	1	9.50
15	1	0	1	0	9.67
16	0	0	-1	-1	7.32
17	1	0	0	-1	7.74
18	0	-1	1	0	6.83
19	0	-1	-1	0	6.23
20	0	1	0	-1	8.27
21	0	0	0	0	8.87
22	0	1	0	1	9.23
23	0	0	-1	1	8.46
24	0	0	0	0	8.35
25	0	0	1	1	8.87
26	0	0	0	0	8.72
27	-1	1	0	0	8.33
28	0	0	0	0	8.63
29	-1	0	1	0	8.42

表3 回归模型方差分析表

Table 3 Variance analysis of the developed regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方和	F值	P值
回归模型	29.95	14.00	2.14	12.93	< 0.0001
残差	2.32	14	0.17		
失拟	2.11	10	0.21	4.04	0.0951
纯误差	0.21	4	0.052		
总误差	32.27	28			

结果表明,对总三萜提取率所建立的二次多项模型具有高度显著性( $P < 0.0001$ )。失拟项 $P=0.0951$ ,不显著;模型的调整确定系数 $R^2=0.8564$ ,说明该模型能解释85.64%响应值的变化,由图2可知,残差点几乎分布在同一条直线上。因而该模型拟合程度较好,试验

误差小, 可以用此模型对超声波提取红缘拟层孔菌总三萜进行分析 and 预测。

2.2.3 响应面分析

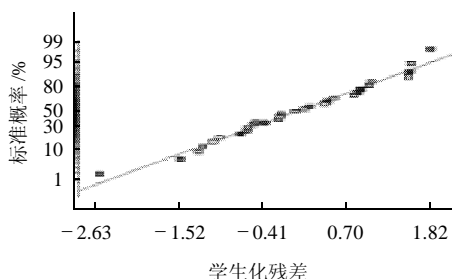


图2 总三萜提取率的残差分布图

Fig.2 Distribution of internally studentized residuals of the yield of total triterpenoids

表4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Significance test for the regression coefficients of the developed regression equation

模型项	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
X <sub>1</sub>	5.17	1	5.17	31.25	< 0.0001
X <sub>2</sub>	13.41	1	13.41	81.00	< 0.0001
X <sub>3</sub>	2.38	1	2.38	14.40	0.0020
X <sub>4</sub>	5.60	1	5.60	33.83	< 0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.085	1	0.085	0.51	0.4849
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.012	1	0.012	0.074	0.7898
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0.16	1	0.16	0.94	0.3494
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	6.743 × 10 <sup>-3</sup>	1	6.743 × 10 <sup>-3</sup>	0.041	0.8429
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.017	1	0.017	0.100	0.7569
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0.084	1	0.084	0.51	0.4867
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.055	1	0.055	0.33	0.5733
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	2.89	1	2.89	17.44	0.0009
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.31	1	0.31	1.87	0.1932
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0.35	1	0.35	2.13	0.1663

注: R<sup>2</sup>=0.9282, 调整 R<sup>2</sup>=0.8564。

模型方程回归系数及其显著性检验见表4, 结果表明一次项和二次项都有显著性因素, 各试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系, 因素间的交互作用影响较小。由此推断, 可以利用该回归方程来确定红缘拟层孔菌子实体总三萜最佳提取工艺条件。

2.2.2 拟合模型的建立

进行响应面分析, 对实验数据进行多项式拟合, 以提取率为因变量(Y), 建立回归方程, 因素代码形式如下:

$$Y=8.58+0.66X_1+1.06X_2+0.45X_3+0.68X_4-0.15X_1X_2+0.055X_1X_3-0.20X_1X_4-0.041X_2X_3-0.064X_2X_4-0.15X_3X_4-0.092X_1^2-0.67X_2^2-0.22X_3^2-0.23X_4^2$$

通过表1下方公式换算为因素实际值形式:

$$Y=-12.97136+0.10155x_1+0.44701x_2+0.22811x_3+0.18031x_4-7.29675 \times 10^{-4}x_1x_2+2.76423 \times 10^{-4}x_1x_3-4.92378 \times 10^{-4}x_1x_4-4.10579 \times 10^{-4}x_2x_3-3.21138 \times 10^{-4}x_2x_4-7.26626 \times 10^{-4}x_3x_4-2.30335 \times 10^{-4}x_1^2-6.67033 \times 10^{-3}x_2^2-2.18354 \times 10^{-3}x_3^2-5.83231 \times 10^{-4}x_4^2$$

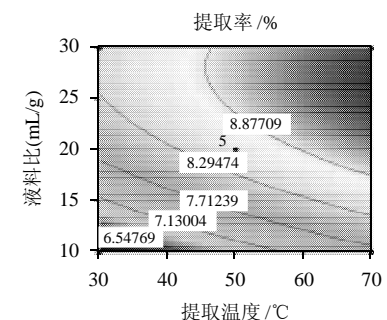
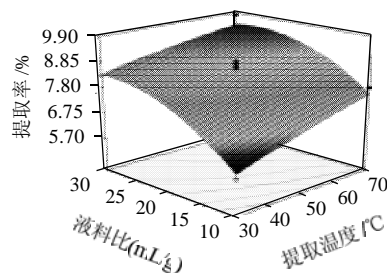


图3 提取温度和液料比对红缘拟层孔菌总三萜提取率影响的响应曲面和等高线

Fig.3 Response surface and contour plots showing the interactive effects of extraction temperature and material/liquid ratio on the yield of total triterpenoids

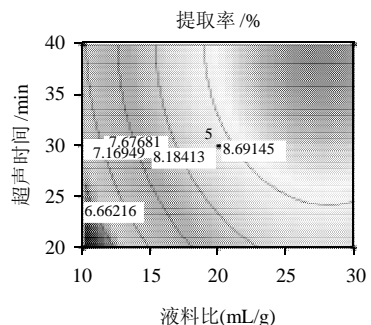
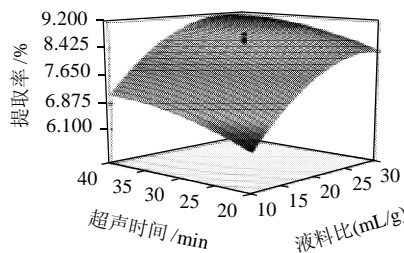


图4 液料比和超声时间对红缘拟层孔菌总三萜提取率影响的响应曲面和等高线

Fig.4 Response surface and contour plots showing the interactive effects of ultrasonic treatment time and material/liquid ratio on the yield of total triterpenoids

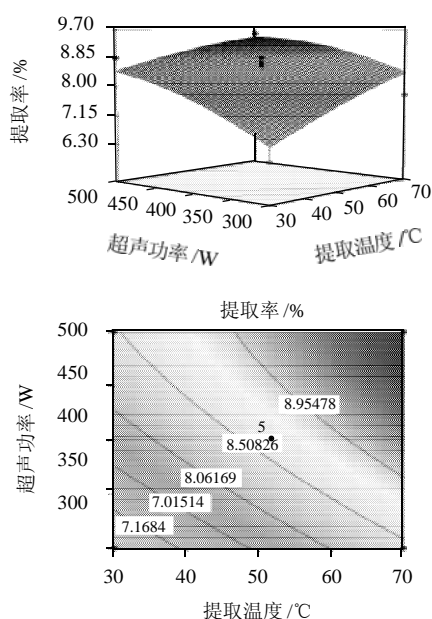


图5 提取温度和超声功率对红缘拟层孔菌总三萜提取率影响的响应曲面和等高线

Fig.5 Response surface and contour plots showing the interactive effects of extraction temperature and ultrasonic power on the yield of total triterpenoids

通过模型方程所作的响应曲面图及其等高线, 结果见图3~5, 可以看出液料比、超声功率对红缘拟层孔菌总三萜提取率的影响最显著, 其次是提取温度, 这与方差分析的结果一致。通过Design Expert分析得到模型最佳数据为温度70℃、液料比26.24:1、超声时间38.57min、超声功率468.95W、模型预测总三萜提取率为9.815%。为检验上述方法的可靠性, 采用得到的最佳条件进行验证实验, 同时考虑到实际操作情况, 将最佳提取条件修正为提取温度70℃、液料比26:1、超声时间39min、超声功率450W, 3次平行试验的平均提取率为9.79%, 与理论值相差0.25%。因此采用响应曲面法优化得到的超声波提取条件参数基本准确可靠, 具有一定的实用价值。

### 3 结论

在单因素试验基础上, 建立可信的各因素和响应值的数学模型, 运用响应曲面法对超声波提取红缘拟层孔菌总三萜工艺进行优化。通过模型分析, 得到的优化

条件为提取溶剂95%乙醇, 提取温度70℃, 液料比为26:1(mL/g), 超声时间39min, 超声功率450W, 此时红缘拟层孔菌总三萜的提取率为9.79%。通过回归分析和验证实验证明了该响应面法的合理性和可行性, 为红缘拟层孔菌的开发利用提供参考。

### 参考文献:

- [1] 赵继鼎. 中国真菌志: 第三卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 148-150.
- [2] 戴玉成. 中国多孔菌名录[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 315-327.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [4] CHA W, DING J, SHIN H, et al. Effect of *Fomitopsis pinicola* extract on blood glucose and lipid metabolism in diabetic rats[J]. Korean J Chem Eng, 2009, 26(6): 1696-1699.
- [5] LEE S, KIM J, OH S, et al. Antihyperglycemic effect of *Fomitopsis pinicola* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Journal of Medicinal Food, 2008, 11(3): 518-524.
- [6] CHOI D, PARK S, DING J, et al. Effects of *Fomitopsis pinicola* extracts on antioxidant and antitumor activities[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2008, 12(5): 516-524.
- [7] MIZUNO T, IWASAKI Y, SATOH H, et al. Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. part V. chemical structure and antitumor activity of a water-soluble glucan isolated from *Tsugarunokoshikake*, the fruit body of *Fomitopsis pinicola*[J]. Bull Fac Agr Shizuoka Univ, 1982, 32: 29-40.
- [8] YOSHIKAWA K, INOUE M, MATSUMOTO Y, et al. Lanostane triterpenoids and triterpene glycosides from the fruit body of *Fomitopsis pinicola* and their inhibitory activity against COX-1 and COX-2[J]. J Nat Prod, 2005, 68(1): 69-73.
- [9] FALDT J, JONSELL M, NORDLANDER G, et al. Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fome fomentarius* and their functions as insect attractants[J]. Journal of Chemical Ecology, 1999, 25(3): 567-590.
- [10] ROSECKE J, KONIG W. Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola* [J]. Phytochemistry, 1999, 52(8): 1621-1627.
- [11] KELLER A, MAILLARD M, HOSTETTMANN K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*[J]. Phytochemistry, 1996, 41(4): 1041-1046.
- [12] 项昭保, 霍丹群, 任绍光. 超声波在中草药化学成分提取中的应用[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 289-291.
- [13] BAHADIR K. Response surface methodology (RSM) analysis of photo-induced decoloration of toluidine blue[J]. Chemical Engineering Journal, 2008, 136(1): 25-30.
- [14] 徐蓉, 陈钧, 徐骅, 等. 响应面法优化黄连黄柏中总生物碱的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 26-29.
- [15] CHEN Yi, XIE Mingyong, GONG Xiaofeng. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1): 162-170.