

文章编号:1673-1689(2008)04-0053-05

## 猪苓多糖超声提取工艺条件优化

陈文强, 邓百万, 刘开辉, 彭浩, 丁小维, 张威威

(陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

**摘要:** 采用超声提取方法研究了猪苓菌核多糖提取的优化工艺条件。结果表明,在超声功率为 100W 时,其最佳提取条件为 60 ℃,料液比为 1 g : 30 mL, pH 值为 7.0,提取时间为 40 min, *P. umbellatus* LBZ 多糖的量为 20.3 mg/g。与常规的沸水浴提取法比较,超声提取能显著提高猪苓多糖含量、缩短提取时间、减小料液比和降低提取温度。

**关键词:** 猪苓;多糖;超声提取

中图分类号:Q 53

文献标识码:A

### Study on the Optimization of Ultrasonic Extracting Technique of Polysaccharide from *Polyporus umbellatus*

CHEN Wen-qiang, DENG Bai-wan, LIU Kai-hui,

PENG Hao, DING Xiao-wei, ZHANG Wei-wei

(College of Biological Science and Engineering, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

**Abstract:** The optimization process of polysaccharide extraction from *Polyporus umbellatus* was studied in this manuscript. The results were as follows: the ultrasonic power 100W, the extraction temperature 60 ℃, the ratio of material to liquid 1 g : 30 mL, pH 7.0, and the extracting time 50 min. By combinational these optimum conditions, the extracting-yield of polysaccharide was achieved at 20.3 mg/g. Compared with that of the water-boiling extraction process, ultrasonic extraction can significantly improve the polysaccharide content, and offers many advantages including shorting extraction time, reducing the ratio of material to liquid and lowering the operating temperature.

**Key words:** *Polyporus umbellatus*; polysaccharide; supersonic extraction

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. 俗称猪屎苓、野猪粪。属真菌门、担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、猪苓(地花)属。猪苓菌核生于地下,常寄生于枫、槭、桦、柳等阔叶树根上,呈不规则块状,半木质化,个体大小不等,表面凹凸不平,皱缩呈疣状物,外被一层黑褐色表皮,有油漆光泽,切面为白

色或淡黄色<sup>[1-3]</sup>。我国猪苓主要分布在河北、陕西、四川、湖北、云南等地<sup>[2]</sup>。猪苓菌核在我国已有 2000 多年的用药历史,其性平味甘,具有利尿渗湿、祛痰解毒的功能,主治胃炎水肿、小便不利、急性尿路感染、暑热水泻、淋浊等症。菌核含麦角甾醇、粗蛋白、可溶性糖分、多糖及 X-羟基二十四碳酸等成

收稿日期:2007-05-26.

基金项目:陕西省教育厅重点实验室重点科研资助项目(04JS32).

作者简介:陈文强(1957-),男,陕西洋县人,教授,主要从事微生物学方面的研究. Email: wenqiangc@126.com

分<sup>[4]</sup>。近代药理和临床实验证明,其提取物猪苓多糖成分,具有抑制肿瘤生长和增强荷瘤动物及肿瘤人机体免疫功能的作用,在治疗病毒性肝炎和抗放射方面也有良好的效果。自猪苓多糖的重要作用自发现以来,随着研究工艺的深入,现已有少量的生产。但因其工艺复杂,浸提溶剂使用量大,收率低,成本高,价格昂贵,严重制约了临床上的应用。

超声波提取技术在真菌多糖方面的应用已有报道,其技术具有设备简单、操作方便、提取时间短、效率高、提取率高、节能、节约药材和无需加热等特点;同时可以防止提取物在长时间、高温条件下发生降解和褪色<sup>[5]</sup>。因此,在中药有效成分提取方面受到了重视。超声提取的机制包括机械机制、热学机制及空化机制。由于超声波振动的空化、机械粉碎、搅拌以及热学等作用,在振荡过程中,空化泡周围的微流对溶液中的药材产生切向力以加速溶剂向细胞中的渗透<sup>[6-9]</sup>,据 Sinisterra J V 等人研究,低频超声不仅可使细胞周围形成微流,还可使细胞被击破,使细胞壁不完整,有利于溶剂浸入细胞中,加速药材中有效成分进入溶剂,以便有效成分的提取,从而提高了有效成分的提出率。

作者采用正交试验设计,研究了猪苓多糖超声提取的工艺条件,为工业化生产和降低生产成本提供一定的理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

猪苓(*P. umbellatus* LBZ、*P. umbellates* LBJ、*P. umbellates* LBT)菌核由陕西省留坝真菌研究所提供。

### 1.2 仪器设备和试剂

超声提取仪 CQ250 型:上海电波超声公司生产;紫外可见分光光度计 TU-1221 型:北京市通用仪器设备公司生产;高速中药粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司生产;旋转蒸发器 R201BL 型:上海申生科技有限公司生产;循环水式多用真空泵 SHZ-95B 型:河南巩义市英峪予华仪器厂生产;2.0R 大容量低速冷冻离心机:德国产;恒温水浴锅;苯酚(分析纯)、98.0%浓硫酸(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、无水葡萄糖(分析纯 105℃干燥恒重)、乙醚(分析纯)、丙酮(分析纯)及其它分析纯试剂。

### 1.3 方 法

**1.3.1 材料预处理** 将猪苓菌核除杂、55.0℃烘干、粉碎(过 60 目筛),烘干至恒重后备用。

**1.3.2 猪苓多糖的超声提取方法** 精确称取猪苓

粉末 10.0 g,加水超声提取 2 次,合并提取液真空浓缩,用 3 倍体积 95% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 醇沉 24 h,得乳白色纤维状沉淀,离心烘干至恒重,得到结合蛋白多糖提取物。采用 Sevage 的方法除去蛋白质,即用氯仿和正丁醇按体积比 5:1 的比例混合后,加入粗多糖溶液中,剧烈震动后,离心除去蛋白质。

**1.3.3 猪苓多糖的常规提取方法** 精确称取猪苓粉末 10.0 g,加水 400 mL,沸水浴提取 2 次,每次 1.5 h,合并提取液真空浓缩,用 3 倍体积 95% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 醇沉 24 h,得乳白色纤维状沉淀,离心烘干至恒重,得到结合蛋白多糖提取物。采用 Sevage 的方法除去蛋白质,即用氯仿和正丁醇按体积比 5:1 的比例混合后,加入粗多糖溶液中,剧烈震动后,离心除去蛋白质。

**1.3.4 多糖的测定方法** 苯酚-硫酸法<sup>[10]</sup>。

**1.3.5 猪苓多糖超声提取条件的单因素试验**

1) 精确称取猪苓粉末 10.0 g,在超声功率为 100 W 条件下,分别选择不同提取温度 30、40、50、60、70℃,其它条件不变,进行单因素试验。

2) 精确称猪苓粉末 10.0 g,在超声功率为 100 W 条件下,分别选择不同提取时间 20、30、40、50、60 min,其它条件不变,进行单因素试验。

3) 精确称猪苓粉末 10.0 g,在超声功率为 100 W 条件下,分别选择不同 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,其它条件不变,进行单因素试验。

4) 精确称猪苓粉末 10.0g,在超声功率为 100 W 条件下,分别选择不同料液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,其它条件不变,进行单因素试验<sup>[13]</sup>。

**1.3.6 猪苓多糖的超声提取最佳工艺条件的确定**

影响猪苓多糖超声提取的主要因素有提取温度、提取时间、pH、料液比。根据猪苓多糖超声提取条件的单因素试验结果,本试验采用四因素三水平(表 1)正交试验法确定其最佳提取工艺条件<sup>[13-16]</sup>。

表 1 因子水平表

Tab. 1 The different levels and factors

水平	因子			
	A 温度/ ℃	B 时间/ min	C pH	D 料液比 (g : mL)
1	40	20	6	1 : 10
2	50	40	7	1 : 20
3	60	60	8	1 : 30

## 2 结果与分析

**2.1 超声波提取猪苓多糖的单因素试验研究**

**2.1.1 温度对猪苓多糖提取的影响** 图 1 表明,

温度对多糖含量和多糖提取率的影响显著。随温度的升高,液体介质的表面张力和黏度降低,而液体的蒸汽压则增加,这样在液体介质之间很容易拉开而形成空化气泡,从而在较低超声波强度下即可产生空化作用。空化作用使得细胞破坏程度增大,促进细胞内部的多糖物质向外扩散,此时多糖含量和多糖提取率都有所提高<sup>[17]</sup>。在其它条件不变时,多糖含量随提取温度升高而增大,在 50℃ 时多糖含量达较大值(图 1),当提取温度继续升高时,多糖含量升高趋势渐缓。因此,猪苓多糖提取温度在 50℃ 左右较适宜。

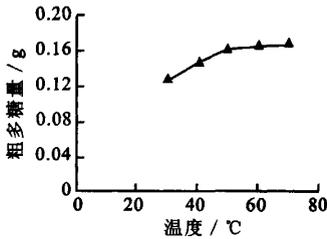


图 1 温度对多糖提取的影响

Fig. 1 Effects of temperature on polysaccharide extraction

2.1.2 时间对猪苓多糖提取的影响 图 2 表明,其它条件不变时,多糖含量随提取时间延长而增高,在 40~50 min 时,多糖含量达较大值(图 2),当提取时间继续延长时,多糖含量升高的趋势减缓。这表明随超声时间的延长,空化效应的作用力减小,使得猪苓颗粒表面对提取的物质吸附力增强,从而使得多糖提取率和多糖含量有所下降<sup>[17]</sup>。另外,超声处理时间延长对多糖结构的破坏可能也是造成多糖含量下降的原因。因此,猪苓多糖提取时间在 40~50 min 时较适宜。

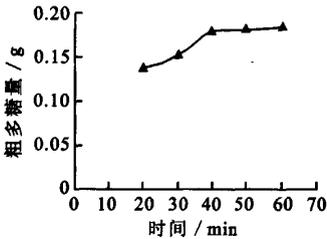


图 2 时间对多糖提取的影响

Fig. 2 Effects of time on polysaccharide extraction

2.1.3 pH 对猪苓多糖提取的影响 图 3 表明,其它条件不变时,多糖含量随 pH 增大而增大,pH 在 7.0 左右时,多糖含量达较大值(见图 3),当 pH 继续增大时,多糖含量迅速下降。因此,猪苓多糖提取的最佳 pH 为 7.0 较适宜。

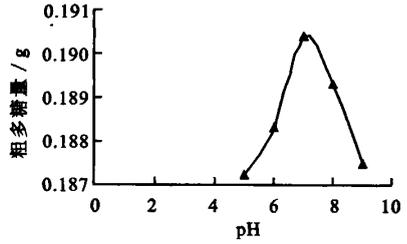


图 3 pH 对多糖提取的影响

Fig. 3 Effects of pH on polysaccharide extraction

2.1.4 料液比对猪苓多糖提取的影响 图 4 表明,其它条件不变时,多糖含量随料液比的增大而提高(见图 4)。多糖含量在料液比 1:10 与 1:20 之间变化不大,料液比在 1:30 时,多糖含量达最大值。这是因为如果加入溶剂量太少,材料本身吸收一定量后,作为超声波介质的液体就会很少,而超声波在液相中的吸收大于在固相中的吸收,随料液比的增大,细胞内的多糖物质开始向外扩散<sup>[17]</sup>。此时多糖的含量随之增大。当料液比继续增大时,含量升高趋势渐缓。因此,猪苓多糖提取料液比在 1:30 时较适宜。

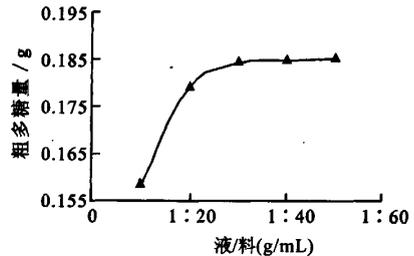


图 4 料液比对多糖提取的影响

Fig. 4 Effects of the ratio of material to liquid on polysaccharide extraction

## 2.2 超声波最佳工艺条件的确定

精确称取猪苓切片粉末 10.0 g,按正交试验因子水平所列条件,超声提取 2 次,过滤,合并提取液,3 800 r/min 高速离心 15 min。取上清液减压浓缩至 100 mL,合并提取液真空浓缩,用 3 倍体积 95% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 醇沉 24 h,得乳白色纤维状沉淀。采用 seavage 的方法除去蛋白质。按标准曲线项的方法测定吸光度,计算出提取液中葡萄糖的含量,并计算出多糖质量分数(%) = cV/m,式中 c 为提取液中葡萄糖质量浓度(μg/mL),V 提取液稀释后体积,m 为猪苓粉末质量(μg)。试验结果见表 2。

表 2 极差分析表明,提取温度、提取时间、pH 及料液比对猪苓多糖的量均有不同程度的影响,各因子对猪苓多糖提取量影响的大小顺序为 A>D>C>B。超声提取的最优条件为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即提取温度 60

℃、提取时间 40 min、pH 7.0 及料液比 1:30。

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验结果分析

Tab. 2 Results of orthogonal test  $L_9(3^4)$

编号	A 温度/ ℃	B 时间/ min	C pH	D 料液比 (g:mL)	猪苓多糖 质量 分数/%
1	40	20	6	1:10	0.605
2	40	40	7	1:20	1.435
3	40	60	8	1:30	1.494
4	50	20	7	1:30	1.261
5	50	40	8	1:10	1.270
6	50	60	6	1:20	0.876
7	60	20	8	1:20	1.881
8	60	40	6	1:30	1.552
9	60	60	7	1:10	1.250
$K_1$	3.534	3.747	4.033	3.125	
$K_2$	3.407	4.257	4.946	4.192	
$K_3$	4.683	3.620	4.645	4.307	
$k_1$	1.178	1.249	1.344	1.042	
$k_2$	1.136	1.419	1.649	1.397	
$k_3$	1.561	1.307	1.548	1.436	
R	0.425	0.170	0.305	0.394	

### 2.3 超声提取与常规提取猪苓多糖含量的比较

精取 *P. umbellatus* LBZ、*P. umbellates* LBJ、*P. umbellates* LBT 菌核粉末各 10.0 g,按常规方法和超声方法分别提取并测定多糖质量分数(表 3)。

表 3 猪苓菌核不同方法提取的多糖含量

Tab. 1 The Polysaccharide content from three kinds of *Polyporus umbellatus* by different extracting methods

猪苓样品	超声 提取方法	常规 提取方法
<i>P. umbellatus</i> LBZ	20.3	19.4
<i>P. umbellates</i> LBJ	18.5	11.3
<i>P. umbellates</i> LBT	17.4	16.0

表 3 结果表明,猪苓多糖的提取量,常规方法提取以 *P. umbellatus* LBZ 最高,*P. umbellates* LBT 次之,*P. umbellates* LBJ 最低;超声方法提取以 *P. umbellatus* LBZ 最高,*P. umbellates* LBJ 次

之,*P. umbellates* LBT 最低。比较 *P. umbellatus* LBZ、*P. umbellates* LBJ 和 *P. umbellates* LBT 多糖的提取率,超声方法较常规方法分别提高 4.64%、63.72%、8.75%,其中超声提取以 *P. umbellates* LBJ 多糖提取率最高。

### 3 结 语

来自真菌多糖的葡聚糖的抗肿瘤活性与相对分子质量大小有关,相对分子质量大于 16 000 时,才具有抗肿瘤活性,而长时间高温条件将会使其分子结构发生改变,从而丧失其生物活性<sup>[17,18]</sup>。因此,降低提取温度对保持猪苓多糖生物活性具有重要意义。研究结果显示,采用超声提取技术,不但使多糖得率明显提高,而且较常规提取大大降低了提取温度,可保持猪苓多糖活性。

水提法是中药有效成分提取应用最普遍的方法之一,一般 2~3 次,提取时间视有效成分而定。在通常情况下,认为提取时间越长,有效成分提出率越高。但据李绮、邢志强等研究报道<sup>[19]</sup>,在超声提取过程中,以 0.5~1 h 时多糖含量最高,提取时间超过 1 h 后多糖含量明显下降,这是由于较高频率的超声波会引起糖结构发生改变,甚至碳链裂解,所以提取时间不宜超过 1 h。研究结果显示,提取时间为 40 min 时,猪苓多糖的含量最高。

超声提取可使猪苓菌核多糖含量显著提高。这是由于超声波物理场的作用,当超声波的频率和功率达到一定水平时,会激发悬液里的猪苓细胞剧烈振动,从而使细胞壁开裂或破碎,有利于多糖的释放。另外,*P. umbellatus* LBZ 组织结构致密而坚硬,*P. umbellates* LBT 较 *P. umbellatus* LBZ 组织结构次之,*P. umbellates* LBJ 较 *P. umbellatus* LBZ 组织结构最为疏松。所以,猪苓多糖的提取率与猪苓菌核的组织结构密切相关。

此研究工艺所采用的超声破壁功率和破壁时间对猪苓多糖的结构及活性产生的影响有待进一步研究。

### 参考文献(References):

- [1] 王凯平,张玉,张俊.猪苓多糖长循环脂质体的制备[J].中草药,2005,36(3):368-369.  
WANG Kai-ping, ZHANG Yu, ZHANG Jun. Preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005,36(3):368-369. (in Chinese)
- [2] 陈文强,邓百万.秦巴山区野生与栽培猪苓菌核主要成分的测定[J].无锡轻工大学学报(食品与生物技术),2003,22(6):96-98.  
CHEN Wen-qiang, DENG Bai-wan. Determination of main components of sclerotia of wild and cultivated *Polyporus umbellatus* in Mt. Qinling and Mt. Bashan regions[J]. *Journal of Wuxi University Light Industry(Food Science and Biotechnology)*, 2003,22(6):96-98. (in Chinese)

- [3] 苏德龙,史红波,裴福成. 正交试验法研究猪苓多糖提取工艺[J]. 基层中药杂志, 2002,16(1):27-28.  
SU De-long, SHI Hong-bo, PEI Fu-cheng. Study on polysaccharide extraction process by orthogonal tests[J]. **Primary Journal of Materia Medica**, 2002,16(1):27-28. (in Chinese)
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 版[M]. 北京:化学工业出版社,2005,222.
- [5] 朱建华,杨晓泉. 真菌多糖研究进展——结构、特性及制备方法[J]. 中国食品添加剂,2005(6):75-80.  
ZHU Jian-hua, YANG Xiao-quan. Recent advances in fungus polysaccharomycetes—survey on bioactive, functional properties and prepared methods[J]. **China Food Additives**, 2005(6):75-80. (in Chinese)
- [6] 张晓东,潘国风,吕丰源. 超声提取在中药化学成分提取中的应用研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15(12):861-862.  
ZHANG Xiao-dong, PAN Guo-feng, LV Gui-yuan. Research progress on ultrasonic extraction of chemical components in Chinese medicine[J]. **Lishizhen Medicine and Maieria Medical Research**, 2004,15(12):861-862. (in Chinese)
- [7] 周斌. 用超声波提取中药材[J]. 安徽科技, 2005(4):23-24.  
ZHOU Bin. Extraction of Chinese medicinal materials by ultrasonic technology[J]. **Anhui Science & Technology**, 2005(4):23-24. (in Chinese)
- [8] 李化. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中药材,2001,24(4):299-300.  
LI Hua. Application of ultrasonic technology in extracting chemical components from chinese herbs[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2001,24(4):299-300. (in Chinese)
- [9] 严伟,李淑芬,田松江. 超声波协助提取技术[J]. 化工进展, 2002,21(9):649-651.  
YAN Wei, LI Shu-fen, TIAN Song-jiang. Ultrasound-assisted extraction technology[J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2002,21(9):649-651. (in Chinese)
- [10] 杨勇杰,姜瑞芝,陈英红. 苯酚-硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药,2005,27(6):706-708.  
YANG Yong-jie, JIANG Rui-zhi, CHEN Ying-hong. Determination of sugars in heteropolysaccharide by phenol-sulfuric acid method[J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2005,27(6):706-708. (in Chinese)
- [11] 张青,张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技,2004(7):17-18.  
ZHANG Qing, ZHANG Tian-ming. Determination of polysaccharide content by phenol-sulfuric acid method[J]. **Food and Drug**, 2004(7):17-18. (in Chinese)
- [12] 罗毅,潘细贵,刘刚,等. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(1):45-46.  
LUO Yi, PAN Xi-gui, LIU Gang, et al. Optimization of the way of coloration in the process of determining polysaccharide content phenol-sulfuric acid method[J]. **Journal of Information on Traditional Chinese Medicine**, 2005,12(1):45-46. (in Chinese)
- [13] 唐娟,马永强. 超声波技术在黑木耳多糖提取中的应用[J]. 食品与机械, 2005,21(1):28-29.  
TANG Juan, MA Yong-giang. Application of ultrasonic in the extracting of polysaccharide from auricularia[J]. **Food and Machinery**, 2005,21(1):28-29. (in Chinese)
- [14] 徐凌川,张华,许昌盛,等. 超声波提取灵芝多糖的最佳工艺探讨[J]. 中国中药杂志, 2005,30(6):471-472.  
XU Ling-chuan, ZHANG Hua, XU Chang-sheng, et al. Study on the best craft of polysaccharide extraction from ganoderma by ultrasonic technology[J]. **Journal of Chinese Materia Medica**, 2005,30(6):471-472. (in Chinese)
- [15] 蔡德华,杨立红,梁建光. 食用菌菌丝体超声波破壁提取多糖新工艺研究[J]. 中国食用菌,2004,24(1):36-38.  
CAI De-hua, YANG Li-hong, LIANG Jian-guang. The optimization polysaccharide extracting technique by ultrasonic treatment for edible fungi mycelium[J]. **Edible Fungi of China**, 2004,24(1):36-38. (in Chinese)
- [16] 杨立红,林剑,黄清荣,等. 阿魏菇深层发酵菌丝多糖提取工艺优化研究[J]. 工业微生物,2004,34(3):28-31.  
YANG Li-hong, LIN Jian, HUANG Qing-rong, et al. Optimization of polysaccharide extraction from mycelia of pleurotus ferulae lenzi prepared by liquid submerged fermentation[J]. **Industrial Microbiology**, 2004,34(3):28-31. (in Chinese)
- [17] 郑静,林英,程晖. 超声波法和超声波酶法提取灵芝多糖的条件研究[J]. 食用菌学报,2006,13(1):48-52.  
ZHENG Jin, LIN Yin, CHENG hui. Factors affecting extraction of ganoderma lucidum polysaccharide using ultrasound and ultrasound+cellulase methods[J]. **Acta Edulic Fungi**, 2006,13(1):48-52. (in Chinese)
- [18] 周小燕,顾顺明. 发酵法生产猪苓菌丝体及猪苓多糖的研究[J]. 工业微生物,2001,31(4):1-4.  
ZHOU Xiao-yan, GU Shun-ming. Fermentative production of mycelia by polyporus umbellatus(Pers) Frie[J]. **Industrial Microbiology**, 2001,31(4):1-4. (in Chinese)
- [19] 陈金生,林树钱. 药用真菌化学成分及其生物活性研究的概况[J]. 中华医药杂志,2006,6(3):34-46.  
CHEN Jin-sheng, LIN Shu-qian. The Proceeding of chemical constituents and biological activities of medicinal fungus[J]. **Journal of China Medical**, 2006,6(3):34-46. (in Chinese)
- [20] 李绮,李莹,张鹏. 超声-液氮冻融处理对灵芝孢子粉多糖提取的影响[J]. 辽宁大学学报:自然科学版,2003,19(1):475.  
LI Qi, LI Ying, ZHANG Peng. The effect on the distill of amylose in glossy ganoderma sporule powder treated with ultrasonic and thawing and freezing test of liquid nitrogen[J]. **Journal of Liaoning University University (natural Science Edition)**, 2003,19(1):475. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)