

# BBD设计-效应面法优选灵芝多糖提取工艺<sup>Δ</sup>

阚永军<sup>1\*</sup>, 吴建国<sup>2</sup>, 陈体强<sup>3</sup>, 吴岩斌<sup>2</sup>, 吴锦忠<sup>1,2#</sup>(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122; 3. 福建省农业科学院食用菌研究所, 福州 350013)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2523-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.09

**摘要** 目的: 优选灵芝多糖的提取工艺。方法: 采用单因素试验考察料液比、浸提温度、浸提时间对灵芝多糖抗氧化活性的影响。以液料比、浸提温度、浸提时间为自变量, 以灵芝多糖对1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的半数清除率的倒数(1/EC<sub>50</sub>)为因变量, 通过对自变量各水平进行多元线性回归及二项式拟合, 采用BBD设计-效应面法优选灵芝多糖提取工艺。结果: 优选提取工艺为浸提温度63℃、浸提时间2h、料液比1:33(g/ml), 在此条件下, 灵芝多糖的1/EC<sub>50</sub>为0.732 2 ml/mg, 与响应面拟合方程的预测值0.733 7 ml/mg相当。结论: 优选的提取工艺合理、可行, 可用于灵芝多糖的提取。

**关键词** 灵芝; 多糖; 效应面法; 抗氧化; 提取工艺

## Optimization of Extraction Technology of Polysaccharides from Ganoderma by Bax-Behnken Design and Response Surface Method

KAN Yong-jun<sup>1</sup>, WU Jian-guo<sup>2</sup>, CHEN Ti-qiang<sup>3</sup>, WU Yan-bin<sup>2</sup>, WU Jin-zhong<sup>1,2</sup>(1. Pharmacy College, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 2. Academy of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 3. Institute of Edible Fungi, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of polysaccharide from Ganoderma. METHODS: The effects of ratio of material to liquid, extraction temperature and extraction time on antioxidant activity of polysaccharide from Ganoderma were investigated. The extraction technology was optimized with central composite design-response surface methodology with extraction temperature, extraction time and ratio of liquid to solid as independent variable using reciprocal (1/EC<sub>50</sub>) of free radical scavenging rate of polysaccharide from Ganoderma to DPPH as dependent variable. Multiple linear regression and binomial expression was fitted with independent variable. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: extraction temperature 63℃, extraction time 2 h, and ratio of liquid to solid 1:33(g/ml). In this condition, 1/EC<sub>50</sub> of polysaccharide from Ganoderma to DPPH was 0.732 2 ml/mg, which was consistent with the predicted value 0.733 7 ml/mg. CONCLUSIONS: The optimized technology is reasonable and feasible, and can be used for the extraction of polysaccharide from Ganoderma.

**KEYWORDS** Ganoderma; Polysaccharides; Response surface methodology; Antioxidant activity; Extraction technology

灵芝为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang 干燥子实体<sup>[1]</sup>。《神农本草经》中记载, 灵芝具有扶正固本、滋补强壮、延年益寿等功效<sup>[2]</sup>。近年来, 中外学者对灵芝的子实体、孢子粉等进行了广泛、深入的研究。研究表明, 灵芝的化学成分包括多糖、三萜、甾醇、腺苷、氨基酸多肽类及各种微量元素<sup>[3]</sup>, 而灵芝多糖是灵芝中的活性成分之一<sup>[4]</sup>, 灵芝多糖具有提高免疫力、抗氧化、抗菌、保肝、调节血糖、改善睡眠等药理作用<sup>[5-9]</sup>。因此, 如何有效地提取活性灵芝多糖成为科研工作者的研究热点。

超微粉碎技术可以将固体物料粉碎成平均粒径在2~3

μm水平, 对于脆性较大的物料粉碎粒度可达亚微米级, 增加物料与溶剂的接触面积, 促进有效成分的溶出, 降低能耗, 提高效率, 易于工业生产。效应面法(Response surface methodology)是一种优化生物过程的统计学试验设计, 采用该法可以建立连续变量曲面模型, 对影响生物过程的因素及各因素间的交互作用进行评价, 确定其最佳水平范围, 并且所需要的试验组数相对较少, 可节省人力物力财力, 因此该方法已经广泛应用于各种生物过程的优化中<sup>[10-11]</sup>。

本试验结合工业需求, 对灵芝进行超微粉碎, 以灵芝多糖对1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的半数清除率的倒数(1/EC<sub>50</sub>)为因变量, 采用效应曲面分析法优选提取工艺, 得到抗氧化活性较高的灵芝多糖最优提取工艺, 以为灵芝多糖的资源开发、利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);

Δ 基金项目: 福州市科技项目(No.2013-G-105)

\* 硕士研究生。研究方向: 天然产物化学与利用。电话: 0591-22861180。E-mail: kanyongjun@126.com

# 通信作者: 教授, 博士。研究方向: 天然产物化学与利用。E-mail: jinzhongfj@126.com

AB204-N型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);DZF-6051型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);LXJ型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂);HH-S型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);RE-2000A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

## 1.2 药材

灵芝子实体由福建省农业科学院食用菌研究所陈体强副研究员提供,经过超微粉碎成超细粉(300目)后备用。

## 1.3 试剂

DPPH(美国Sigma公司);石油醚、甲醇、无水乙醇(分析纯,西陇化工股份有限公司);水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 灵芝多糖的制备工艺流程

灵芝超细粉→石油醚脱脂→60℃下干燥→以不同条件(提取温度、提取时间、料液比)进行回流提取→趁热抽滤→减压浓缩→加无水乙醇使含醇体积分数达80%(V/V)→4℃静置过夜、离心→灵芝粗多糖<sup>[12]</sup>。

### 2.2 灵芝多糖清除DPPH自由基活性的测定

取“2.1”项下灵芝粗多糖以超纯水溶解,制成一系列不同质量浓度(0.80、1.6、2.4、3.2、4.0 mg/ml)的样品溶液。每种样品溶液取2 ml与2 ml 0.2 mmol/L DPPH溶液混合,避光室温反应30 min,在517 nm波长处测定其吸光度(A),由下式计算DPPH清除率,并计算1/EC<sub>50</sub><sup>[13]</sup>。DPPH清除率(%)=[1-(A-A<sub>0</sub>)/A<sub>0</sub>]×100%。式中,A为样品与DPPH反应后的吸光度,A<sub>0</sub>为样品溶剂与DPPH反应后的吸光度,A<sub>0</sub>为未加样品的DPPH的吸光度。每一样品平行测3次,取其平均值。

### 2.3 单因素试验

**2.3.1 料液比对灵芝多糖抗氧化活性的影响** 准确称取10.00 g灵芝超细粉,共5份,分别加入超纯水100、200、300、400、500 ml,料液比分别为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g/ml),在60℃水浴中浸提2 h,按“2.2”项下方法测定多糖清除DPPH自由基的能力。结果,物料与提取溶剂的充分接触可以加速目标成分的提取效率。在料液比较低时随着料液比的增加,1/EC<sub>50</sub>也在增加,料液比为1:30(g/ml)时灵芝多糖的1/EC<sub>50</sub>已达到较高水平,料液比超过1:40(g/ml)时,反而略有下降。这是由于增加料液比可以增加物料与溶剂的接触面积,促进多糖成分的溶出,但料液比过大,也使得其他成分被过多溶出。考虑到能耗及多糖的纯度,料液比选为1:30(g/ml)时较为适宜。液料比对灵芝多糖抗氧化活性的影响见图1。

**2.3.2 浸提温度对灵芝多糖抗氧化活性的影响** 准确称取10.00 g灵芝超细粉,共5份,用300 ml的超纯水在40、50、60、70、80℃水浴中浸提2 h,按“2.2”项下方法测定多糖清除DPPH自由基的能力。结果,适宜的提取温度可以加速目标成分的提取并保持其活性的稳定,在40~60℃温度范围内,随着提取温度的升高,灵芝多糖1/EC<sub>50</sub>明显增加,提取温度在60℃

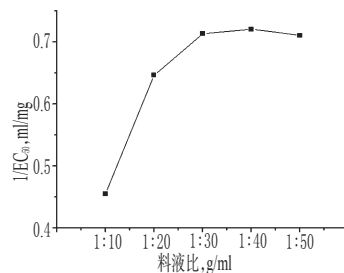


图1 料液比对灵芝多糖抗氧化活性的影响

Fig 1 Effects of ratio of liquid to solid on antioxidant activity of polysaccharides

时1/EC<sub>50</sub>达到最高水平,温度超过60℃时反而下降。这是由于增加温度可以加快分子扩散,促进多糖成分的溶出,但温度过高使得多糖成分被降解,抗氧化活性相应降低。因此,选择60℃较为适宜。浸提温度对灵芝多糖抗氧化活性的影响见图2。

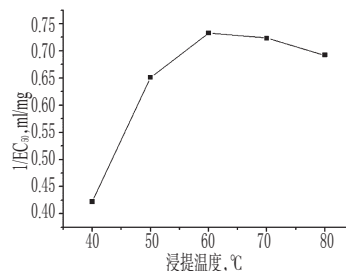


图2 浸提温度对灵芝多糖抗氧化活性的影响

Fig 2 Effects of extraction temperature on antioxidant activity of polysaccharides

**2.3.3 浸提时间对灵芝多糖抗氧化活性的影响** 准确称取10.00 g灵芝超细粉,共5份,用300 ml超纯水分别在60℃水浴中浸提1、1.5、2、2.5、3 h,按“2.2”项下方法测定多糖清除DPPH自由基的能力。结果,适宜的提取时间可以使目标成分充分的提取出来,如果提取时间过长反而使得非目标成分被过多的提取出来,影响多糖的纯度及活性。在提取时间较短时,随着提取时间的增加,灵芝多糖的活性也在不断增加,提取时间在2~2.5 h时灵芝多糖活性相对较高,提取时间超过2.5 h时,灵芝多糖的1/EC<sub>50</sub>则略有下降。考虑到提取效率及能耗,因此提取时间选为2 h较为适宜。浸提时间对灵芝多糖抗氧化活性的影响见图3。

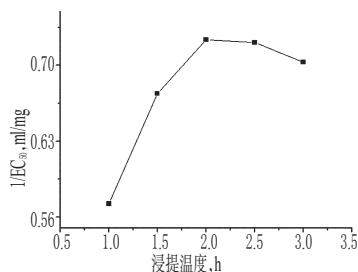


图3 浸提时间对灵芝多糖抗氧化活性的影响

Fig 3 Effects of extraction time on antioxidant activity of polysaccharides

### 2.4 Box-Behnken Design (BBD)设计-效应面实验

2.4.1 试验设计与结果 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,以液料比( $X_1$ )、浸提温度( $X_2$ )、浸提时间( $X_3$ )为自变量,以  $1/EC_{50}$  为响应值进行试验。因素与水平见表 1;BBD 设计效应面试验安排与结果见表 2。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	$X_1$	$X_2, ^\circ\text{C}$	$X_3, \text{h}$
-1	1:20	50	1.5
0	1:30	60	2
1	1:40	70	2.5

表 2 BBD 设计效应面试验安排与结果

Tab 2 Box-behnken design of extraction technology and results

序号	$X_1$	$X_2, ^\circ\text{C}$	$X_3, \text{h}$	$1/EC_{50}, \text{ml/mg}$
1	-1	-1	0	0.550 5
2	1	-1	0	0.571 3
3	-1	1	0	0.622 3
4	1	1	0	0.671 9
5	-1	0	-1	0.570 2
6	1	0	-1	0.621 9
7	-1	0	1	0.621 0
8	1	0	1	0.672 1
9	0	-1	-1	0.569 6
10	0	1	-1	0.611 7
11	0	-1	1	0.619 3
12	0	1	1	0.661 8
13	0	0	0	0.723 7
14	0	0	0	0.723 6
15	0	0	0	0.733 6
16	0	0	0	0.733 7
17	0	0	0	0.723 8

2.4.2 模型拟合 应用 Design-Expert.8.05b 软件对表 2 中的试验数据进行多元回归拟合,得到灵芝多糖的抗氧化活性( $y$ )对料液比( $X_1$ )、提取温度( $X_2$ )、提取时间( $X_3$ )的二次多元回归方程模型为: $y=0.73+0.022X_1+0.032X_2+0.025X_3+0.007 2X_1 X_2-0.000 15X_1 X_3+0.000 1X_2 X_3-0.059X_1^2-0.065X_2^2-0.047X_3^2$ 。对得出的回归模型进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,整体回归模型是有统计学意义的( $P<0.000 1$ );校正决定系数  $R^2$  (adj) 为 0.957 3 (大于 0.80),说明该模型只有 4.27% 的变异。信噪比为 16.858,表示该模型有足够的信号。并且该模型的总回归系数  $R^2$  为 0.981 3,说明该模型与实际试验拟合较好,试验误差较小,因此可用该模型对灵芝多糖的提取效果进行分析和预测。

2.4.3 三维效应面分析 效应模型的效应面及等高线可直观反映各试验因素间的两两交互作用对灵芝多糖抗氧化活性的影响。根据回归模型方程,将浸提温度、浸提时间、液料比对灵芝多糖抗氧化活性的影响绘制成三维效应面图见图 4。由图 4 可知,其中各个因素在试验范围内对灵芝多糖抗氧化活性影响的大小顺序为:浸提温度( $X_2$ )>浸提时间( $X_3$ )>料液比

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.064	9	7.087E-003	40.87	<0.000 1
$X_1$	3.750E-003	1	3.750E-003	21.62	0.002 3
$X_2$	8.256E-003	1	8.256E-003	47.61	0.000 2
$X_3$	5.040E-003	1	5.040E-003	29.07	0.001 0
$X_1 X_2$	2.074E-004	1	2.074E-004	1.20	0.310 4
$X_1 X_3$	9.000E-009	1	9.000E-009	5.190E-004	0.982 5
$X_2 X_3$	4.000E-008	1	4.000E-008	2.307E-004	0.988 3
$X_1^2$	0.015	1	0.015	84.50	<0.000 1
$X_2^2$	0.018	1	0.018	101.61	<0.000 1
$X_3^2$	9.456E-003	1	9.456E-003	54.53	0.000 2
残差	1.214E-003	7	1.734E-004		
失拟	1.095E-003	3	3.650E-004	12.29	0.017 4
净误差	1.188E-004	4	2.971E-005		
总离差	0.065	16			

( $X_1$ )。浸提温度和浸提时间、浸提温度和料液比之间的交互关系较为显著,当浸提温度在小于  $63 ^\circ\text{C}$  时,灵芝多糖的抗氧化活性随温度的升高而增大,而随着浸提温度继续增加灵芝多糖的活性略微下降。浸提温度与料液比之间的交互关系不显著,表现为曲面较为平缓。

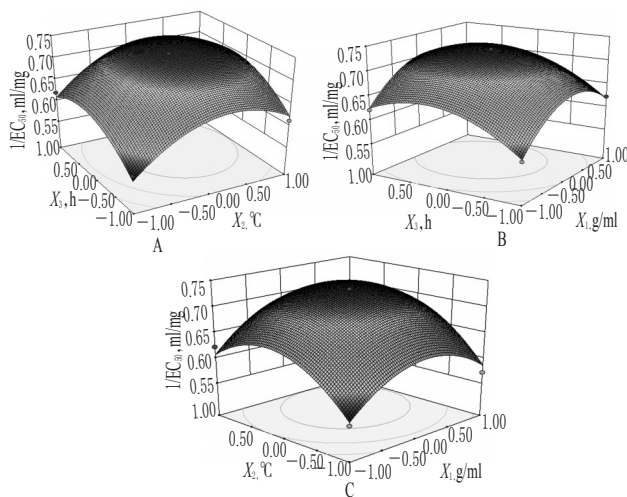


图 4 三维效应面图

A. 浸提温度与浸提时间对灵芝多糖抗氧化活性的影响; B. 浸提时间与液料比对灵芝多糖抗氧化活性的影响; C. 浸提温度与液料比对灵芝多糖抗氧化活性的影响

Fig 4 Three-dimensional response surface

A. effects of extraction temperature and time on antioxidant of polysaccharides; B. effects of extraction time and ratio of liquid to solid on antioxidant of polysaccharides; C. effects of extraction temperature and ratio of liquid to solid on antioxidant of polysaccharides

## 2.5 灵芝多糖的最优工艺条件与验证

利用 Design-Expert.8.05b 软件对试验进行分析处理,获得灵芝多糖提取的最优条件为料液比  $1:33.38$  (g/ml),浸提温度  $63.65 ^\circ\text{C}$ ,浸提时间  $2.17$  h。考虑到实际操作条件,将灵芝多糖提取的最优工艺调整为料液比  $1:33$  (g/ml),提取温度  $63 ^\circ\text{C}$ ,提取时间  $2$  h,理论预测  $1/EC_{50}$  为  $0.733 7$  ml/mg。依据调整后的条件进行验证试验,重复 3 次,得灵芝多糖  $1/EC_{50}$  为  $0.732 2$  ml/

mg。实际测定值与理论值接近,说明该方程模型与实际情况拟合良好。

### 3 讨论

现有文献多以灵芝多糖的提取率为评价指标对其提取工艺进行优化,为了能更多的得到多糖成分,使得多糖的提取多在比较剧烈苛刻的条件下进行。但是,剧烈的提取环境往往使得多糖结构发生不同程度的破坏,而多糖的结构与其生物活性有着密切的联系。如何从灵芝中提取得到抗氧化活性较高的灵芝多糖?笔者通过单因素试验考察了浸提温度、浸提时间、液料比对灵芝多糖抗氧化活性的影响,根据BBD-效应面试验原理建立了灵芝多糖抗氧化活性与浸提温度、浸提时间、液料比之间关系的二次多项式回归模型,该模型拟合程度高,准确有效。综上,该提取工艺合理、可行,可用于灵芝多糖的提取,并为灵芝药材的深加工提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:174.
- [2] Lakshmi B, Ajith TA, Jose N, *et al.* Antimutagenic activity of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(2):297.
- [3] 鲍蕾蕾,苏羽,陈海飞,等.复方灵芝孢子精油软胶囊对S180荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J].中国药房,2013,24

(15):1351.

- [4] 叶鹏飞,张美萍,王康宇,等.灵芝主要成分及其药理作用的研究进展综述[J].食药用菌,2013(03):158.
- [5] Xu Z, Chen X, Zhong Z, *et al.* *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities[J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1):15.
- [6] 连瑞丽,李宇伟,李存法,等.灵芝菌丝体多糖体外抗氧化活性研究[J].广东农业科学,2012(19):93.
- [7] 鄢嫣,张汇,聂少平,等.黑灵芝子实体水溶性多糖的理化性质及抗氧化活性的研究[J].食品科学,2009(19):55.
- [8] 赵成萍,冯翠萍,常晓敏.灵芝多糖抑菌作用的研究[J].食药用菌,2012(2):60.
- [9] 钟瑜瑜,张振平,彭小军,等.灵芝孢子粉的药用价值及灵芝栽培技术[J].广东农业科学,2007(6):83.
- [10] 向智男,宁正祥.超微粉碎技术及其在食品工业中的应用[J].食品研究与开发,2006,27(2):88.
- [11] 杨晓丽,地里热巴·沙它尔,李翔,等.灵芝超微粉理化特性研究[J].食品与生物技术学报,2013(1):69.
- [12] 于洪涛,吴茂玉,赵岩,等.灵芝多糖提取及生理活性的研究进展[J].食品研究与开发,2011,32(5):159.
- [13] Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited [J]. *Food Chem*, 2009, 113(4):1202.

(收稿日期:2014-03-10 修回日期:2014-05-07)

## 国家卫生和计划生育委员会等六部门多措并举、统筹推进,切实做好保障儿童用药工作

**本刊讯** 党中央、国务院高度重视保障儿童用药工作。国家卫生计生委、国家发展改革委、工业和信息化部、人力资源社会保障部、食品药品监管总局、国家中医药局日前联合召开媒体通气会,宣传解读经国务院同意联合印发的《关于保障儿童用药的若干意见》(以下简称《意见》)。

当前,我国医药卫生事业快速发展,儿童健康和用药水平逐步提高,儿童基本用药状况显著改善。但是,我们也清醒地看到,目前儿童用药适宜品种、剂型和规格不足,企业缺乏研发动力和生产积极性,不合理用药问题仍然存在,儿童用药安全面临挑战。

《意见》从鼓励研发创制、加快申报审评、确保生产供应、强化质量监管、推动合理用药、完善体系建设、提升综合能力等环节,对保障儿童用药提出了具体要求。这是近十年来我国关于儿童用药的第一个综合性指导文件。

在申报审评和研发创制方面:对于部分临床急需的儿童适宜品种、剂型、规格,建立申报审评专门通道,加快进度,并逐步建立鼓励研发的儿童药品目录,引导和鼓励企业优先研

发生产。探索建立新药申请时提供相关儿童临床试验数据及用药信息的制度。对已上市品种,要求药品生产企业及时补充完善儿童临床试验数据。

在保障生产供应方面:对国产儿童用药通过单列代表品、规定宽松的剂型比价系数等方式,在定价时给予政策扶持。按规定及时将儿童适宜剂型、规格纳入基本医疗保险支付范畴。优先支持儿童用药生产企业开展产品升级、生产线技术改造。建立短缺预警机制,对临床必需、易短缺、用量小的药品综合采取价格、采购扶持及定点生产、储备等方式确保供应。

在提高临床合理用药及综合评价能力方面:发挥专业协会的学术优势,总结临床用药经验及安全用药数据,形成行业共识,制定儿童用药指南。同时,对部分已在临床使用多年但药品说明书缺乏儿童用药数据的药品,完善相关数据,以引导企业研发申报和生产,合理修订药品说明书。建立儿童临床用药综合评价体系和临床数据库,整理分析儿童用药数据并定期开展综合评价。