

超声辅助低共熔溶剂提取桑黄多糖及其抗氧化活性

于秋菊, 孙科, 耿凤英

(徐州生物工程职业技术学院 药品食品学院, 江苏 徐州 221006)

摘要:以桑黄多糖提取率为指标,以低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DES)摩尔比、DES含水量、液固比、超声功率、超声时间、提取温度为考察因素,进行单因素和 Box-Behnken 响应面实验,优化超声波辅助 DES 提取桑黄多糖工艺;通过测定纯化后的桑黄多糖对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除率以及对肿瘤细胞的抑制率考察其体外活性。结果表明,桑黄多糖的最佳提取工艺为氯化胆碱与丙三醇摩尔比 1:2、DES 含水量 30%、超声时间 30 min、液固比为 39:1(mL/g)、提取温度 58℃、超声功率 90 W,在该条件下桑黄多糖提取率为 $(13.11\pm 0.16)\%$,与预测值相对误差为 0.91%;体外活性结果显示纯化后的桑黄多糖具有良好的抗氧化活性和抑制肿瘤细胞增殖的能力,且与药物浓度呈量效关系。因此超声波辅助 DES 提取桑黄多糖不仅提取率较高且提取物具有较强的抗氧化及抗肿瘤活性。

关键词:桑黄多糖;超声辅助;低共熔溶剂;Box-Behnken 响应面;抗氧化;抗肿瘤

Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent-Based Extraction of Polysaccharides from *Phellinus igniarius* and Its Antioxidant Activities

YU Qiu-ju, SUN Ke, GENG Feng-ying

(College of Medicine and Food, Xuzhou Vocational College of Bioengineering, Xuzhou 221006, Jiangsu, China)

Abstract: The ultrasound-assisted deep eutectic solvents (DES)-based extraction of polysaccharides from *Phellinus igniarius* was optimized with the yield of polysaccharides as the indicator. Single factor test and Box-Behnken design were employed to investigate the effect of the molar ratio of DES, water content of DES, liquid-to-solid ratio, ultrasonic power, ultrasonic time, and extraction temperature on the yield of polysaccharides and optimize the extraction process. The DPPH and hydroxyl free radical scavenging rates and the inhibition rate on tumor cells *in vitro* were explored. The extraction process was optimized as choline chloride and glycerol at the molar ratio of 1:2, water content of 30% in DES, ultrasonic time of 30 min, liquid-to-solid ratio of 39:1 (mL/g), extraction temperature of 58℃, and ultrasonic power of 90 W. Under these conditions, the yield of polysaccharides was $(13.11\pm 0.16)\%$, which showed the relative error of 0.91% compared with the predicted value. The purified polysaccharides exerted the antioxidant activity and tumor cell proliferation-inhibiting ability in a dose-dependent manner. Ultrasound-assisted DES-based extraction of polysaccharides from *P. igniarius* has high yield of polysaccharides. Moreover, the extracted polysaccharides have strong antioxidant and antitumor activities.

Key words: polysaccharides from *Phellinus igniarius*; ultrasound-assisted; deep eutectic solvents; Box-Behnken design; antioxidant; antitumor

引文格式:

于秋菊,孙科,耿凤英. 超声辅助低共熔溶剂提取桑黄多糖及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2023,44(5):81-88,105.

YU Qiu-ju, SUN Ke, GENG Feng-ying. Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent-Based Extraction of Polysaccharides from *Phellinus igniarius* and Its Antioxidant Activities[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 81-88, 105.

桑黄(*Phellinus igniarius*)为我国珍贵的药用真菌^[1],主要寄生于桑树、杨树等树干上^[2],因其子实体颜色鲜黄而称桑黄,其味微苦、性寒,药用历史悠久,主要用于止泻、崩漏带下、脾虚泄泻,主要活性成分包括多糖(8%~12%)、黄酮、香豆素、麦角甾醇、三萜类、生物碱及多酚等^[3],现代药理学研究表明,桑黄菌丝体胞外多糖和菌丝体内多糖混合物具有一定的抗肿瘤^[4]、提高免疫力、抗炎^[5]、抗突变、清除自由基^[6]、抑制黄嘌呤氧化酶活性以及肝纤维化抑制作用^[7],因此桑黄多糖成为真菌研究领域的一大热点。目前桑黄多糖主要是采用溶剂提取、酶解、超声和微波辅助等方法提取^[8],桑黄多糖因极性较强,因此多采用水、乙醇等溶剂提取^[9],史玉宝等^[10]对木瓜蛋白酶辅助提取桑黄多糖的提取工艺进行优化,结果显示酶解法可以通过减少纤维素等成分的干扰从而提高多糖提取效率,超声可以破坏细胞壁结构产生空化效应,程伟等^[11]根据中心组合设计原理优化超声波协同纤维素酶法提取桑黄多糖工艺,可在一定程度上提高桑黄多糖的提取率。

低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DES)是一种新型提取溶剂^[12],相对于传统溶剂和离子液体,具有无毒性、低挥发性、高热稳定性、能耗低、合成简单等优点^[13-14],目前 DES 在天然植物提取和分离方面具有独特优势^[15-16],作为经济且新型的绿色溶剂,广泛应用于医药化工和食品领域的分离、提取和合成,如已用于从薯蓣皂苷中提取多糖,试验结果表明 DES 作为溶剂的超声波破碎法要优于水的超声提取和典型的热回流提取方法^[17]。但到目前为止,未见其应用于桑黄子实体多糖的提取报道。因此为了进一步提高桑黄子实体多糖的提取效率,提高资源利用率,本试验以产自西藏的桑黄为研究对象,超声波辅助 DES 萃取,通过星点-响应面法优化提取工艺,并通过对其实体外抗氧化和抗癌活性进行评价,为桑黄多糖产品的进一步开发和利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

紫外-可见分光光度计(UV-1800PC-DS2):上海美谱达仪器有限公司;冷冻干燥机(FD-1A-50):江苏天翎仪器有限公司;高速离心机(TG18G-II):上海冰都电器有限公司;中药粉碎机(F-1000):上海新诺仪器集团有限公司;电子天平(LE204E):上海右一仪器有限公司;超声波提取器(DSDZ1440):无锡鼎实电子科技有限公司;电热鼓风干燥箱(DHG9030A):上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 材料

桑黄(浅肝褐色至暗灰色,干燥粉碎过 60 目筛):沈阳源生堂药业有限公司;人源宫颈癌 HepG2215、肝

癌 SMMC-7721:上海雅吉生物科技有限公司;乳腺癌 MDAMB415、肺癌 AE1201、胃癌 BGC823 细胞:无锡博慧斯生物医药科技有限公司;比色噻唑蓝(colorimetric thiazoyl blue, MTT)试剂盒:上海歌凡生物科技有限公司;1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH):合肥博美生物科技有限责任公司;氯化胆碱、葡萄糖、无水乙醇、浓硫酸、苯酚、乙醇、乙二醇、1,2 丙二醇、丙三醇、1,3-丁二醇、1,6-己二醇、山梨醇、木糖醇、硫酸亚铁、水杨酸、H₂O₂(均为分析纯):徐州市科翔化学试剂有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 多糖含量测定方法

选用硫酸-苯酚法测定多糖含量。精密称取 110 ℃干燥至恒重的葡萄糖 2.000 g,用水溶解定容于 100 mL 量瓶中,得葡萄糖标准溶液(20.00 mg/mL)。分别精密量取 1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 标准溶液至 20 mL 量瓶中,加入 4 mL 5%苯酚溶液、10 mL 浓硫酸,立即摇匀,置 40 ℃水浴锅中保温 30 min 放冷,定容。同法配制空白作为参比,于 490 nm 波长处测定各溶液吸光度 A,绘制 A-C(mg/mL)曲线。得到的标准曲线为 $A = 0.089C + 0.00227$, $R^2 = 0.9744$,线性范围为 0~10 mg/mL。

1.3.2 多糖提取率的计算

精密称取 2.000 g 桑黄粉末加入 100 mL 的具塞试管中,加入含水量为 30%、摩尔比为 1:2 的 DES 溶剂 80 mL,放入超声仪中,设定超声功率为 90 W、超声时间为 30 min,超声结束后置于 50 ℃水浴锅内,提取 60 min,经纱布过滤后再经滤纸过滤,滤液经 80%乙醇沉 12 h,4 000 r/min 离心 20 min,沉淀复溶,冷冻干燥得粗多糖,用水溶解定容于 100 mL 量瓶,精密移取 1.0 mL 供试液,按 1.3.1 方法测定供试液 A,平行测定 3 次,得到多糖浓度 C(mg/mL),按下列公式计算多糖提取率。

$$\text{多糖提取率}/\% = \frac{C \times 1 \times 100}{m \times 1000} \times 100$$

式中:1 为供试液移取体积, mL;100 为供试液稀释倍数;1 000 为换算倍数;m 为样品质量 2.000 g。

1.3.3 DES 的制备与筛选

DES 的制备见表 1。

表 1 低共熔溶剂的制备
Table 1 Preparation of eutectic solvent

试验号	氢键受体	氢键供体	摩尔比
I	氯化胆碱	乙醇	1:2
II	氯化胆碱	乙二醇	1:4
III	氯化胆碱	1,2 丙二醇	1:3
IV	氯化胆碱	丙三醇	1:3
V	氯化胆碱	1,3-丁二醇	1:2
VI	氯化胆碱	1,6-己二醇	1:1
VII	氯化胆碱	山梨醇	1:1
VIII	氯化胆碱	木糖醇	1:1

在 25 ℃条件下将氢键受体和氢键供体按表 1 中的摩尔比置于密封具塞锥形瓶内,90 ℃恒温加热搅拌,直至形成清澈透明的液体。精密称取 8 份 2.000 g 桑黄粉末于 100 mL 具塞锥形瓶中,各加入 60 mL 8 种含水量 30% 的 DES,置于超声波中,超声功率 90 W,超声时间 30 min,超声结束后置于 50 ℃水浴锅内,提取 60 min,按照 1.3.2 方法测定桑黄多糖的提取率。

1.3.4 单因素试验设计

精密称取 2.000 g 桑黄粉末置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入含水量 0%~80%、摩尔比为 2:1~1:4 的 DES(氯化胆碱:丙三醇),使液固比为 10:1 (mL/g)~50:1 (mL/g),超声功率设定为 30 W~150 W,超声时间设定为 20 min~50 min,超声结束后,样品于 20 ℃~60 ℃水浴加热 60 min。分别考察摩尔比(2:1、1:1、1:2、1:3、1:4)、含水量(0%、15%、30%、45%、60%)、液固比[10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 (mL/g)]、超声功率(30、60、90、120、150 W)、超声时间(20、30、40、50、60 min)、提取温度(20、30、40、50、60 ℃)对桑黄多糖提取率的影响。

1.3.5 Box-Behnken 试验设计

在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 设计原理,选择对多糖提取率 Y 影响较大的液固比 A 、提取温度 B 、超声功率 C 作为自变量进行提取工艺优化。设计因素与水平见表 2。

表 2 Box-Behnken 设计因素与水平

Table 2 Box-Behnken design factors and levels

水平	因素		
	A 液固比(mL/g)	B 提取温度/℃	C 超声功率/W
-1	30:1	40	60
0	40:1	50	90
1	50:1	60	120

1.3.6 桑黄多糖活性研究

将试验制得的桑黄多糖经核酸沉淀溶液(nucleic acid precipitation solution, TCA)法去蛋白、 H_2O_2 去除色素、透析袋除小分子后配成 20 mg/mL 的溶液^[18],备用。

1.3.6.1 DPPH 自由基清除率的测定

参照谢焱林^[19]的方法,将 200 μ L 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液与 3 mL 不同浓度(1、2、4、8、16、32 mg/mL)样品溶液混匀,避光反应 30 min,517 nm 波长测定其吸光度 A_1 ,不加样品的 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液与乙醇溶液分别测定其吸光度为 A_2 和 A_0 ,以同等浓度的 V_c 做阳性对照。DPPH 自由基清除率按下式计算^[20]。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}) \times 100$$

1.3.6.2 羟基自由基清除能力测定

参照李国峰等^[21]的方法测定羟基自由基清除能力,

在试管中依次加入 500 μ L 9.0 mmol/mL 硫酸亚铁溶液、0.025% H_2O_2 溶液、2 mL 不同浓度(1、2、4、8、16、32 mg/mL)的样品溶液以及 500 μ L 9.0 mmol/mL 水杨酸溶液,混匀后在 37 ℃水浴中避光反应 30 min,510 nm 处测定器吸光度 A ,平行测定 3 次,取平均值,以同等浓度的 V_c 做阳性对照。羟基自由基清除率按下式计算。

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}) \times 100$$

式中: A_1 为加入样品溶液的吸光度; A_2 为不加样品溶液的吸光度; A_0 为加入同体积乙醇溶液的吸光度。

1.3.6.3 MTT 法测定多糖对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用

分别将人源宫颈癌 HepG2215、肝癌 SMMC-7721、乳腺癌 MDAMB415、肺癌 AE1201 和胃癌 BGC823 细胞,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。取对数生长期的肿瘤细胞,于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育 24 h 后,分别加入不同浓度(1、8、16、32、64、128、256 μ g/mL)的样品溶液 30 μ L,继续培养 24 h,小心吸取上清液,加入 90 μ L 新鲜培养液和 10 μ L MTT (500 μ g/mL)继续培养 4 h,每孔加入 150 μ L 甲瓚溶解液,完全溶解后,测量 490 nm 处各孔的吸光度 A 。平行测定 3 次,同时进行空白组和对照组测定。按下式计算细胞生长抑制率(%),并经 GraphPad Prism 8.2.1 计算半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{细胞生长抑制率}/\% = (1 - \frac{A_{\text{实}} - A_{\text{空}}}{A_{\text{对}} - A_{\text{空}}}) \times 100$$

1.4 数据处理

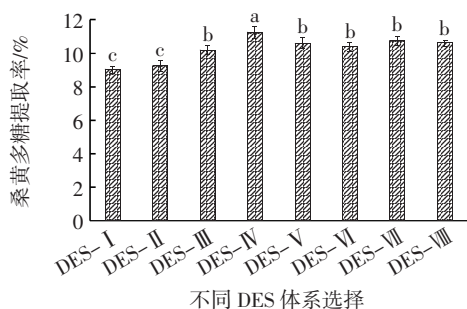
采用 Excel 2016 进行数据整理及作图,所有试验均重复 3 次,数据结果用平均值 $\pm$ 标准差表示;采用 Design-expert 11.0.3 软件进行响应面试验设计并进行数据分析,采用 IBM SPSS 22 进行显著性分析和方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 低共熔溶剂的体系优化

低共熔溶剂具有极性和黏度的可调节性,在一定极性和黏度条件下,可以对目标物质起到增溶作用,直接影响目标物质的提取效率,因此,选择适合的低共熔溶剂在提升提取效率方面效果明显。本研究筛选 DES-I~DES-VIII 对桑黄多糖提取率的影响,结果见图 1。

由图 1 可知,8 种低共熔溶剂对桑黄多糖的提取率依次为 DES-IV>DES-VII>DES-VIII>DES-V>DES-VI>DES-III>DES-II>DES-I。DES-IV 的提取率最高,达到 11.26%,而 DES-I 的提取率最低,仅有 9.02%。DES-IV 能够提高桑黄多糖提取率的原因可能是由于该组合的扩散力、极性与桑黄多糖较接近,有利于多糖的溶解和扩散,后续将选择 DES-IV 作为低共熔溶



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图1 不同低共熔溶剂对桑黄多糖提取率的影响

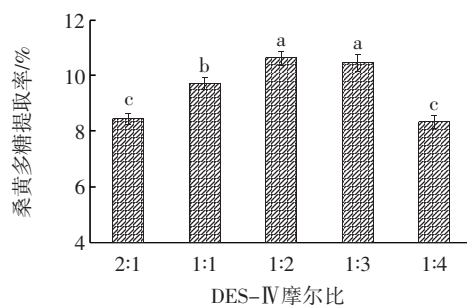
Fig.1 Effects of different eutectic solvents on the extraction rate of polysaccharides

剂考察其对桑黄多糖提取率的影响。

2.2 提取工艺的单因素结果

2.2.1 DES 摩尔比对桑黄多糖提取率的影响

DES 摩尔比对桑黄多糖提取率的影响见图 2。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图2 DES 摩尔比对桑黄多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of DES molar ratio on extraction rate of polysaccharides

由图 2 可知,当 DES-IV 摩尔比由 2:1 到 1:4 时,多糖提取率先增大后减小,可能是由于随着丙三醇的增加,使 DES 体系的黏度降低,扩散力增强,更利于多糖的溶出。而随着丙三醇加入比例的进一步增大,使 DES 体系极性减小,其与多糖之间的极性差距增大,降低了多糖的溶解度,使提取率逐渐减小。因此,选择 DES-IV 摩尔比为 1:2 进行后续试验。

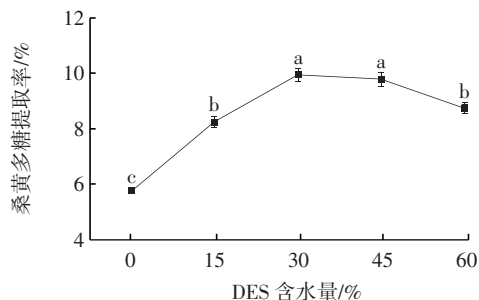
2.2.2 DES 含水量对桑黄多糖提取率的影响

DES 含水量对桑黄多糖提取率的影响见图 3。

为了调节 DES 的黏度,需要添加一定量的水降低黏度,增大溶出物质的扩散力,由图 3 可知,提取率在含水量为 30% 左右达到最大,这可能是由于随着含水量的增大,DES 与多糖之间的氢键作用力逐渐降低,减少了多糖的溶解度。因此选择低共熔溶剂的含水量为 30%。

2.2.3 液固比对桑黄多糖提取率的影响

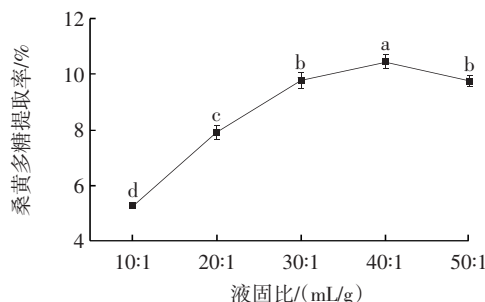
液固比对桑黄多糖提取率的影响见图 4。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图3 DES 含水量对桑黄多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of DES water content on extraction yield of polysaccharides



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

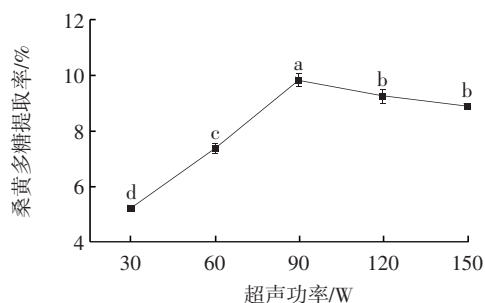
图4 液固比对桑黄多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of liquid-solid ratio on extraction yield of polysaccharides

由图 4 可知,液固比在 10:1 (mL/g)~40:1 (mL/g) 提取率逐渐增加,液固比为 50:1 (mL/g) 时桑黄多糖提取率有所下降,可能是由于溶剂量越大,在溶解时可形成较大的浓度差,利于多糖溶解。但当溶剂量继续增大时,细胞间空隙容纳量趋向饱和,提取率不再明显增加,因此,后续试验选择液固比 30:1 (mL/g)~50:1 (mL/g)。

2.2.4 超声功率对桑黄多糖提取率的影响

超声功率对桑黄多糖提取率的影响见图 5。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图5 超声功率对桑黄多糖提取率的影响

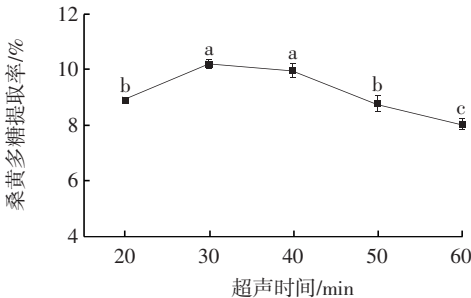
Fig.5 Effect of ultrasonic power on extraction yield of polysaccharides

由图 5 可知,提取率在 30 W~90 W 迅速增加,在

90 W~150 W 开始缓慢下降,可能是由于超声功率过低,对细胞壁的破碎作用较弱,不利于多糖溶出。而随着超声功率的增大,增大溶剂的空化效应,利于多糖溶出,但当超声功率增大到一定程度时,有可能导致桑黄多糖结构分解,降低提取率。因此后续试验选择超声功率 60 W~120 W。

2.2.5 超声时间对桑黄多糖提取率的影响

超声时间对桑黄多糖提取率的影响见图 6。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

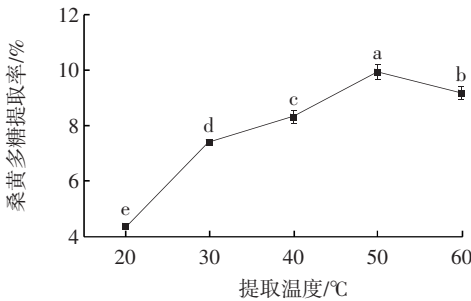
图 6 超声时间对桑黄多糖提取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic time on extraction yield of polysaccharides

由图 6 可知,超声时间在 20 min~30 min 时,桑黄多糖提取率呈上升趋势,超过 30 min 后提取率下降,可能是因为超声时间越长,形成的空化效应越明显,对桑黄细胞壁的破坏效果更强,提取率越高。但是超声时间过长,其产生的温度较高,使得部分多糖被分解,提取率下降,因此最佳超声时间为 30 min。

2.2.6 提取温度对桑黄多糖提取率的影响

提取温度对桑黄多糖提取率的影响见图 7。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 7 提取温度对桑黄多糖提取率的影响

Fig.7 Effect of extraction temperature on extraction yield of polysaccharides

由图 7 可知,提取温度对桑黄提取率的影响较大,在 20 ℃~50 ℃条件下提取率明显增加,在 60 ℃时提取率开始下降。其原因可能是随着温度的升高,溶剂分子的运动加速,促进桑黄干粉与溶剂的接触程度,有利于多糖的溶出,但当温度进一步升高时,使部分多糖成分出现降解,提取率下降,因此,后续试验选择提

取温度 40 ℃~60 ℃。

2.3 响应面试验设计与结果

2.3.1 模型建立与数据拟合

响应面试验结果见表 3。

表 3 Box-Behnken 设计试验结果

Table 3 Box-Behnken design experiment schedule and results

试验号	A/(mL/g)	B/℃	C/W	Y/%
1	30:1	60	90	12.25±0.62
2	40:1	60	120	11.91±0.35
3	30:1	40	90	10.57±0.45
4	40:1	50	90	12.83±0.42
5	40:1	50	90	12.71±0.51
6	40:1	50	90	12.77±0.38
7	30:1	50	60	9.34±0.36
8	40:1	50	120	11.19±0.43
9	50:1	50	120	9.78±0.31
10	40:1	50	90	12.80±0.34
11	50:1	50	60	10.82±0.40
12	50:1	40	90	11.59±0.42
13	40:1	40	60	11.21±0.47
14	40:1	40	120	10.61±0.36
15	40:1	60	60	11.34±0.42
16	50:1	60	90	11.35±0.39
17	40:1	50	90	12.60±0.37

通过回归分析,得出桑黄多糖提取率的回归方程为 $Y=12.80+0.099\ 5A+0.358\ 7B+0.001\ 7C-0.480\ 0AB-0.571\ 1AC+0.292\ 5BC-1.24A^2-0.101\ 7B^2-1.45C^2$ 。

2.3.2 响应面分析

方差分析结果见表 4。

表 4 Box-Behnken 响应面模型方程对多糖提取率的方差分析
Table 4 Variance analysis of Box-Behnken response surface model equation for polysaccharides

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	19.27	9	2.14	80.49	<0.000 1
A 液固比	0.055 6	1	0.055 6	2.09	0.191 3
B 提取温度	1.03	1	1.03	38.70	0.000 4
C 超声功率	0.000 0	1	0.000 0	0.000 7	0.979 4
AB	0.921 6	1	0.921 6	34.64	0.000 6
AC	0.707 0	1	0.707 0	26.58	0.001 3
BC	0.342 2	1	0.342 2	12.86	0.008 9
A ²	5.11	1	5.11	192.14	<0.000 1
B ²	0.039 0	1	0.039 0	1.47	0.265 2
C ²	8.18	1	8.18	307.55	<0.000 1
残差	0.186 2	7	0.026 6		
失拟项	0.080 7	3	0.026 9	1.02	0.472 2
绝对误差	0.105 5	4	0.026 4		
总和	19.46	16			

由表4可知,模型 $P<0.0001$ 为极显著,说明该模型有效可靠。本次模型的失拟项 P 值为0.4722,说明无明显失拟因素存在,可以代替试验真实点对试验结果进行分析。决定系数(R^2)和调整系数(R_{adj}^2)分别为0.9704和0.9581,说明该模型具有良好的稳定性及准确性。 B 、 AB 、 AC 、 BC 、 A^2 、 C^2 项的 $P<0.05$,说明对多糖提

取率具有显著影响。由 F 值可知,3个因素对桑黄多糖提取率影响的主次顺序为 $B>A>C$ 。

2.3.3 提取工艺的响应面分析与优化

二维等高图与三维响应面曲线图见图8。曲线延因素轴向的图形倾斜度越大,表明该因素对因变量影响越大,反之则影响越小。

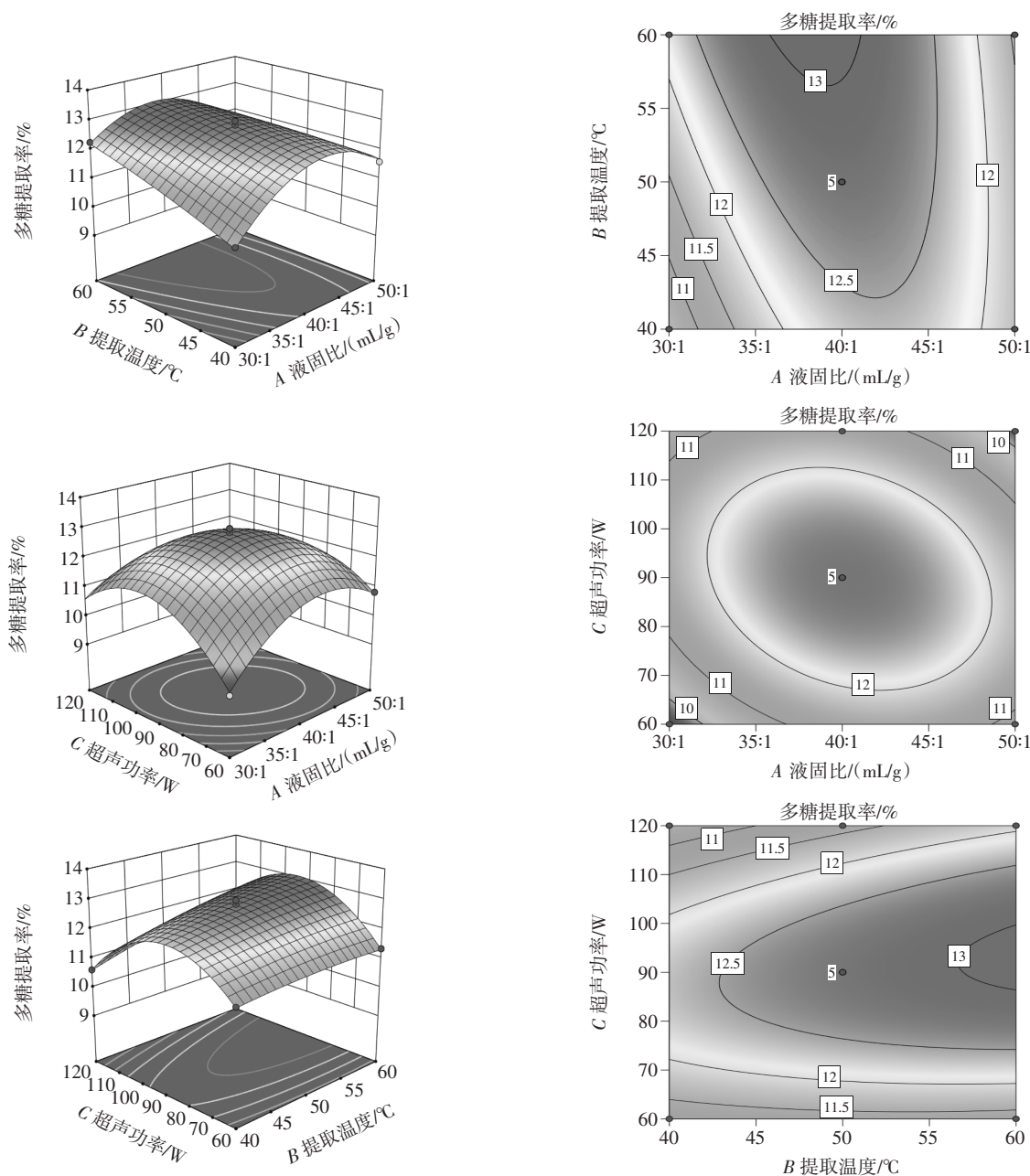


图8 各因素交互作用对多糖提取率影响的响应面

Fig.8 Response surface diagram of interaction of various factors on polysaccharides

由图8可知,桑黄多糖提取率随着液固比和提取温度的增加呈先增大后减小的趋势,说明在一定的提取温度下,桑黄多糖的溶解能力和提取液的扩散能力得到极大值。液固比与超声功率图形变化较为对称,说明液固比与超声功率对提取率的影响较为一致,即当

其中一个因素一定时,随着另一个因素的增加,提取率逐渐上升后趋于平缓,在该因素达到一定值时,提取率可达最大值。这可能由于超声功率较大时,会产生“饱和效应”,影响多糖溶出。在超声功率一定时,提取率随着提取温度的增大呈先迅速增大后缓慢减小的

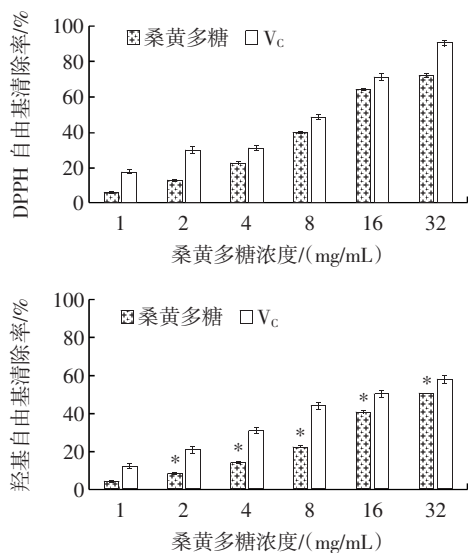
趋势,而超声功率对提取率的影响较为平缓,这与方差分析结果一致。

2.3.4 最佳工艺条件的验证试验

预测最佳提取工艺条件为液固比 39.3:1 (mL/g)、提取温度 57.6 °C、超声功率 87.44 W,预测提取率为 12.99%。按优选的提取工艺经校正后选用以下条件进行 3 次验证试验:液固比 39:1 (mL/g)、提取温度 58 °C、超声功率为 90 W,桑黄多糖的提取率分别为 13.16%、13.27%、12.90%,相对标准偏差为 1.20%,平均值为 13.11%,与预测值误差为 0.91%,说明该模型预测较好,试验优化工艺参数可靠。

2.4 桑黄多糖抗氧化活性分析

不同浓度的桑黄多糖和 V_C 对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除率见图 9。



与 1 mg/mL 浓度比较, * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

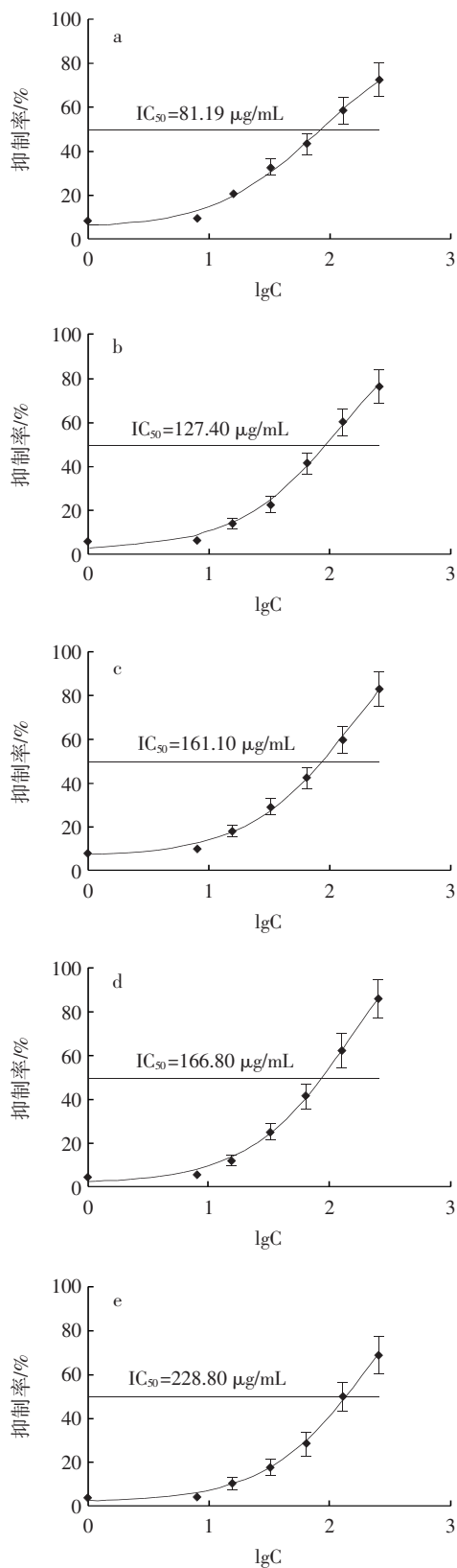
图 9 不同浓度的桑黄多糖和 V_C 对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除率

Fig.9 Scavenging rate of DPPH and hydroxyl radical by different concentration of polysaccharides and V_C

如图 4 所示,桑黄多糖清除 DPPH 自由基和清除羟基自由基的能力与浓度呈正相关,但均低于 V_C 的清除能力,当浓度由 1 mg/mL 增大到 32 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率分别为 5.26%、12.38%、21.94%、39.46%、63.25%、71.32%,对羟基自由基的清除率分别为 3.53%、7.66%、13.24%、21.38%、39.77%、51.26%。高浓度的桑黄多糖对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除率明显高于低浓度的桑黄多糖,说明桑黄多糖的抗氧化活性均有一定的量效关系。当浓度为 32 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率为 V_C 的 79.2%,对羟基自由基的清除率为 V_C 的 89.6%。

2.5 桑黄多糖对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用

桑黄多糖对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用见图 10。



a. HepG2215 细胞; b. SMMC-7721 细胞; c. MDAMB415 细胞; d. AE1201 细胞; e. BGC823 细胞。

图 10 桑黄多糖对 5 种人源肿瘤细胞株增殖的影响及 IC₅₀ 值
Fig.10 Effects of polysaccharides on proliferation and IC₅₀ values of 5 human tumor cell lines

由图 10 可知,桑黄多糖对 5 种人源宫颈癌HepG-2215、肝癌 SMMC-7721、乳腺癌 MDAMB415、肺癌 AE1201 和胃癌 BGC823 肿瘤细胞均有一定的抑制作用,且均呈一定的量效正相关性,其中对人源宫颈癌 HepG2215、肝癌 SMMC-7721 的 IC_{50} 值最低,分别为 81.19、127.40 $\mu\text{g/mL}$,表明 HepG2215 和 SMMC-7721 对桑黄多糖的抑制作用最为敏感。

3 结论

本研究经过筛选和比较不同 DES 的组合对桑黄多糖提取的影响,以桑黄多糖提取率为指标,经过单因素试验以及 Box-Behnken 设计优化提取工艺,得到最优提取条件:DES 含水量 30%、超声时间 30 min、液固比为 39:1 (mL/g)、提取温度 58 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 90 W,在该条件下桑黄多糖提取率可达 13.11%。试验结果表明,加入 DES 可以成为天然产物提取的可持续和有效方案,且提取方法操作简单、高效环保、绿色节能,能保持多糖的原有性质,为后续桑黄多糖药理活性的进一步研究提供基础依据。同时考察纯化后的桑黄多糖的抗氧化活性,结果显示桑黄多糖具有一定的抗氧化活性且与质量浓度呈量效关系。通过考察桑黄多糖对 5 种人源细胞增殖的抑制率,结果显示桑黄多糖提取物具有较强的体外抗肿瘤能力,尤以抑制 HepG-2215 和 SMMC-7721 细胞增殖作用最强,这提示桑黄多糖在治疗宫颈癌和肝癌方面具有良好的应用前景,为桑黄健康产品的研发提供理论依据。

参考文献:

- [1] 吴声华,戴玉成.药用真菌桑黄的种类解析[J].菌物学报,2020,39(5):781-794.
WU Shenghua, DAI Yucheng. Species clarification of the medicinal fungus Sanghuang[J]. Mycosystema, 2020, 39(5): 781-794.
- [2] 曹红妹,胡桂萍,石旭平,等.药用真菌桑黄的研究进展[J].蚕业科学,2019,45(2):285-292.
CAO Hongmei, HU Guiping, SHI Xuping, et al. Research progress on medicinal fungus Sanghuang[J]. Science of Sericulture, 2019, 45(2): 285-292.
- [3] 丁云云,刘锋,施超,等.桑黄化学成分及体外抗肿瘤活性研究[J].中国中药杂志,2016,41(16):3042-3048.
DING Yunyun, LIU Feng, SHI Chao, et al. Chemical constituents from *Phellinus igniarius* and their anti-tumor activity in vitro[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(16): 3042-3048.
- [4] 史帧婷,包海鹰.桑黄类真菌有效成分及功效研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(22):197-202.
SHI Zhengting, BAO Haiying. Research progress on effective components and efficacy of *Phellinus igniarius*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(22): 197-202.
- [5] 吴怀民,钟石,霍进喜,等.桑黄水提物对小鼠急性溃疡性结肠炎的防治效果及作用机制[J].蚕业科学,2021,47(3):247-254.
WU Huaimin, ZHONG Shi, HUO Jinxi, et al. Prevention effect of Sanghuang aqueous extract on acute ulcerative colitis in mice and its underlying mechanism[J]. Acta Sericologica Sinica, 2021, 47(3): 247-254.
- [6] 王一菲,于晓丹,田雪梅,等.栎生桑黄和忍冬桑黄液体培养过程中发酵液抗氧化能力[J].菌物学报,2019,38(6):938-950.
WANG Yifei, YU Xiaodan, TIAN Xuemei, et al. Antioxidant activities of *Sanghuangporus quercicola* and *S. lonicericola* from fermentation broth in liquid cultivation[J]. Mycosystema, 2019, 38(6): 938-950.
- [7] 高雯雯,张娜,俞淑文.桑黄抗肿瘤及其作用机制的研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(21):4165-4168.
GAO Wenwen, ZHANG Na, YU Shuwen. Research progress on anti-tumor effects and mechanisms of *phellinus*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(21): 4165-4168.
- [8] 龚兰敏,刘刚,白杰,等.桑黄提取物的制备工艺及冻干粉抗氧化、抑菌活性的研究[J].食品研究与开发,2021,42(22):143-149.
GONG Lanmin, LIU Gang, BAI Jie, et al. Optimization of extraction of *Phellinus igniarius* and antioxidant and antibacterial activities of lyophilized powder[J]. Food Research and Development, 2021, 42(22): 143-149.
- [9] 张洋洋,吕国英,方立林,等.桑黄主要活性物质的提取方法及药理活性研究进展[J].食药菌,2021,29(5):404-408.
ZHANG Yangyang, LÜ Guoying, FANG Lilin, et al. Research progress on extraction methods and pharmacological activities of main active substances from *Sanghuangporus* spp[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2021, 29(5): 404-408.
- [10] 史玉宝,白卫东,赵文红,等.酶解辅助提取桑黄粗多糖的工艺优化[J].农产品加工,2019(18):29-32,35.
SHI Yubao, BAI Weidong, ZHAO Wenhong, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis-assisted extraction of polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. Farm Products Processing, 2019(18): 29-32, 35.
- [11] 程伟,秦俊哲,杜军国,等.桑黄多糖超声波协同纤维素酶法提取的工艺优化[J].现代食品科技,2012,28(6):662-666.
CHENG Wei, QIN Junzhe, DU Junguo, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Phellinus igniarius*[J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(6): 662-666.
- [12] HANSEN B B, SPITTLE S, CHEN B, et al. Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications[J]. Chemical Reviews, 2021, 121(3): 1232-1285.
- [13] 周立锦,董哲,杜会枝.低共熔溶剂在中药成分提取中的研究进展[J].中草药,2020,51(1):236-244.
ZHOU Lijin, DONG Zhe, DU Huizhi. Research progress on deep eutectic solvents in extraction of Chinese materia medica ingredients[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(1): 236-244.
- [14] 王继龙,陈方圆,刘晓霞,等.低共熔溶剂在中药领域的应用研究进展[J].中草药,2020,51(17):4559-4567.
WANG Jilong, CHEN Fangyuan, LIU Xiaoxia, et al. Application of deep eutectic solvents in Chinese materia medica[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(17): 4559-4567.
- [15] 赵泽馨,纪颖鹤,刘晓妹,等.基于低共熔溶剂的萃取分离技术及其应用研究进展[J].色谱,2021,39(2):152-161.
ZHAO Zexin, JI Yinghe, LIU Xiaomei, et al. Progress in the application of deep eutectic solvents to extraction and separation technology[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(2): 152-161.
- [16] SMITH E L, ABBOTT A P, RYDER K S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications[J]. Chemical Reviews, 2014, 114(21): 11060-11082.

- microextraction gas chromatography-mass spectrometry determination of volatile compounds in different varieties of African star apple fruit (*Chrysophyllum albidum*)[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2089-2097.
- [27] 谭馨怡, 卢云浩, 任尧, 等. 不同陈酿时间下郫县豆瓣挥发性风味化合物及标志性风味成分解析[J]. 中国调味品, 2021, 46(10): 43-46.
- TAN Xinyi, LU Yunhao, REN Yao, et al. Analysis of volatile flavor compounds and characteristic flavor components of Pixian bean paste at various aging time[J]. China Condiment, 2021, 46(10): 43-46.
- [28] 张彬彬, 涂传海, 肖愈, 等. 蛹虫草固态发酵豆渣的功能性成分与抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(24): 69-74.
- ZHANG Shanshan, TU Chuanhai, XIAO Yu, et al. Functional components and antioxidant activity of okara fermented by *Cordyceps militaris*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(24): 69-74.
- [29] 杜佳, 梁莎, 陈莉, 等. 粗壮脉纹孢菌孢子中类胡萝卜素的体外发酵特性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 70-78.
- DU Jia, LIANG Sha, CHEN Li, et al. *In vitro* fermentation characteristics of carotenoid produced by *Neurospora crassa*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 70-78.
- 加工编辑:冯娜
收稿日期:2022-02-28

(上接第 88 页)

- [17] 王慧. 低共熔溶剂在黄芩有效成分提取及制备中的应用研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- WANG Hui. Application of deep eutectic solvents in extraction and preparation of active ingredient of *Scutellaria baicalensis* Georgi[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019.
- [18] 刘紫征. 甘露低聚糖的酶法制备工艺及功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- LIU Zizheng. Preparation of manno-oligosaccharides by enzymatic hydrolysis and its function[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [19] 谢燚林. 微波辅助低共熔溶剂提取川芎中阿魏酸及其体外活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- XIE Yilin. Extraction and separation and biological activity of ferulic acid from *Ligusticum chuanxiong* hort by deep eutectic solvents and microwave[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [20] 潘瑶, 郑时莲, 邹兴平, 等. 葡萄、芒果、草莓乙醇提取物抗氧化活性组分分析及其抗氧化相互作用[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 133-140.
- PAN Yao, ZHENG Shilian, ZOU Xingping, et al. Analysis of antioxidant compounds in ethanol extracts of grape, mango and strawberry and their interactions[J]. Food Science, 2017, 38(4): 133-140.
- [21] 李国峰, 陈海芳, 郎一帆, 等. 诃子总黄酮提取工艺的优化及其体外生物活性研究[J]. 中成药, 2021, 43(11): 2945-2951.
- LI Guofeng, CHEN Haifang, LANG Yifan, et al. Extraction process optimization and *in vitro* biological activities of total flavonoids from *Terminalia chebula*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(11): 2945-2951.
- 加工编辑:冯娜
收稿日期:2022-02-23