

何策, 王超, 陈纯, 等. 桑树桑黄总三萜提取工艺优化及其降血脂、抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 208–215. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060237

HE Ce, WANG Chao, CHEN Chun, et al. Optimization of Extraction Technology of Total Triterpenoids from *Inonotus sanghuang* and Their Hypolipidemic and Antioxidant Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 208–215. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060237

· 工艺技术 ·

# 桑树桑黄总三萜提取工艺优化及其降血脂、 抗氧化活性研究

何 策, 王 超\*, 陈 纯, 王婷婷

(浙江农林大学农业与食品科学学院, 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室,  
浙江杭州 311300)

**摘 要:** 选用超声波法提取桑树桑黄子实体中的三萜类化合物, 在单因素试验的基础上采用响应面法优选最佳方案, 并对其体外降血脂和抗氧化活性进行了测定。结果表明, 超声波法提取桑树桑黄总三萜的最优条件为: 提取时间 49 min、乙醇浓度为 80%、提取温度为 61 ℃, 料液比为 1:22 (g/mL), 总三萜得率可达 12.32%±0.17%。质量浓度为 80 mg/mL 的总三萜体外结合甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠、胆酸钠的能力为同剂量考来烯胺的 50.93%、52.14% 和 43.06%, 说明其具有较好的体外降血脂活性。总三萜具有较好的还原能力, 并能有效清除 DPPH 和 ABTS 自由基, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.304 和 0.520 mg/mL, 表明其具有较好的体外抗氧化活性。

**关键词:** 桑树桑黄, 总三萜, 提取, 降血脂, 抗氧化性

中图分类号: S646

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)07-0208-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060237

## Optimization of Extraction Technology of Total Triterpenoids from *Inonotus sanghuang* and Their Hypolipidemic and Antioxidant Activities

HE Ce, WANG Chao\*, CHEN Chun, WANG Tingting

(School of Agriculture & Food Science, Zhejiang A & F University, The Key Laboratory for Quality Improvement of  
Agricultural Products of Zhejiang Province, Hangzhou 311300, China)

**Abstract:** The ultrasonic-assisted extraction process of total triterpenoids from *Inonotus sanghuang* was employed in this paper. Based on the single factor experiments, the response surface methodology (RSM) was used to determine the optimal extraction condition, and its hypolipidemic and antioxidant activities were primarily evaluated. The results of optimum extraction conditions were as follow: Extraction time 49 min, ethanol concentration 80%, ultrasonic temperature 61 ℃, ratio of solid to liquid 1:22 (g/mL). Under these conditions, the yield of total triterpenoids was 12.32%±0.17%. The binding ability of 80 mg/mL triterpenoids to sodium glycylocholate, sodium taurocholate and sodium cholate *in vitro* was 50.93%, 52.14% and 43.06% of that of colenamine in the same dose, which indicated that the total triterpenoids of *Inonotus sanghuang* had the activity of lowering blood lipids *in vitro*. The iron ions reduction results showed that the total triterpenoids had certain reducing power. The IC<sub>50</sub> values of scavenging capacities of DPPH and ABTS free radical was 0.304 and 0.520 mg/mL, respectively, which showed it possessed good antioxidants *in vitro*.

**Key words:** *Inonotus sanghuang*; total triterpenoids; extraction; hypolipidemic; antioxidant activity

收稿日期: 2020-06-22

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LZ20C160004); 浙江农林大学学生科研训练项目资助 (2019-3, 2019-7)。

作者简介: 何策 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食药两用活性物质提取与分析, E-mail: 947033608@qq.com。

\* 通信作者: 王超 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品与发酵工程, E-mail: tianshan@zafu.edu.cn。

桑黄是一种珍贵的食药食用菌,这一名称最早在唐朝的《药性论》中出现,但这些时期的“桑黄”与现在所称的有所不同,学者现今将桑黄归类为一个新属,且证实正宗的桑树桑黄生长在桑属的树干上,是一种多年生、木栓质的纤孔菌,名为桑黄纤孔菌(*Inonotus sanghuang*)<sup>[1-2]</sup>。早期对桑黄的研究主要集中在火木针层孔菌(*P.igniarius*)、裂蹄针层孔菌(*P.linteus*)和鲍氏针层孔菌(*P.baumii*)上<sup>[3]</sup>。这些研究表明桑黄具有降血脂、抗氧化、调节免疫和保肝护肝<sup>[4]</sup>等多种重要生理功能。桑黄含有多种活性成分,熟知的有多糖、黄酮、三萜类、吡喃酮和多酚类等物质,除此之外还有多种酶类<sup>[5]</sup>。其中三萜类物质的研究是目前非常热门的研究方向<sup>[6]</sup>,其具有抗肿瘤<sup>[7]</sup>、抗病毒<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9]</sup>以及消炎镇痛<sup>[10]</sup>等生物学特性,可以用于多种疾病的研究和临床治疗。

目前三萜类化合物的提取工艺有超声提取、高剪切提取、微波提取和双水相提取等。梁佳等<sup>[11]</sup>研究了微波法提取桑黄(*P.igniarius*)总三萜的工艺,得到了微波提取总三萜的最佳条件,但提取率较低,仅有 1.48 mg/g。谢江宁等<sup>[12]</sup>采用正交试验设计优化超声提取桑黄(*P.igniarius*)总三萜的工艺,得到了一种用时少、提取率高的方法,最终获得了 9.40 mg/g 的提取率,但由于正交试验的局限性不能很好地反映整个区域上因素的最佳组合。而于小凤等<sup>[13]</sup>的研究虽然完善了这一点,但是用到的桑黄同为火木针层孔菌(*P.igniarius*),并非桑黄纤孔菌。研究表明桑树桑黄中总三萜的含量比其他种的桑黄要高出许多<sup>[14]</sup>,可见其相较其他种的桑黄具有更好的研究价值,但目前对桑树桑黄提取总三萜的工艺及其体外活性的研究还少有报道。

本研究选用超声波法提取桑树桑黄子实体中的三萜类化合物,并在单因素实验的基础上采用响应面法优选最佳方案,并对总三萜进行体外降血脂和抗氧化实验,以期为开发天然有效的降血脂和抗氧化产品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑树桑黄子实体 由浙江省农业科学研究院提供;甘氨酸钠(批号: Y28F10C81486)、牛磺胆酸钠(批号: L1715127)、胆酸钠(批号: L24F11F108900)、胃蛋白酶(批号: Y27M10J84202)、胰蛋白酶(批号: R11J10D92532)、齐墩果酸(批号: H04J9Z62784)、维生素 C(批号: W12J11S115700) 上海源叶生物科技有限公司;考来烯胺散(20141108) 南京厚生药业有限公司; 1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)(D9132)、2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)(SLBF4684V)、TPTZ(K1319026) Sigma 公司;其余试剂 均为分析纯。

UV-5500 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;RE-52 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器公

司;SC-04 离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;HH-4 数显恒温振荡器 常州恒德仪器制造有限公司;DS-7510DTH 超声清洗机 小美超声仪器有限公司;Nicolet6700 傅立叶红外光谱仪 美国 ThermoElectron 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桑树桑黄总三萜的提取工艺 先将桑树桑黄子实体置于鼓风干燥箱中烘干至恒重,取出后将其粉碎,过 40 目筛,密封保存于玻璃罐中。称取适量桑黄于锥形瓶中,加入 75% 的乙醇溶解,振荡均匀后于 55 ℃ 的温度下进行超声辅助提取,固定提取功率为 300 W,频率为 40 kHz。45 min 后取出,在 4000 r/min 的条件下离心 18 min,收集上层清液于旋转蒸发器中挥去溶剂<sup>[15]</sup>,最后得到桑树桑黄总三萜提取物。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 料液比对总三萜得率的影响 按照提取温度 55 ℃,提取时间 45 min,乙醇浓度为 75%,分别考察料液比为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25(g/mL)时对总三萜得率的影响。

1.2.2.2 提取温度对总三萜得率的影响 按照料液比为 1:20 (g/mL),提取时间 45 min,乙醇浓度为 75%,分别考察提取温度为 25、35、45、55、65 ℃ 时对总三萜得率的影响。

1.2.2.3 提取时间对总三萜得率的影响 按照料液比为 1:20 (g/mL),提取温度 55 ℃,乙醇浓度为 75%,分别考察提取时间为 25、35、45、55、65 min 时对总三萜得率的影响。

1.2.2.4 乙醇浓度对总三萜得率的影响 按照料液比为 1:20 (g/mL),提取时间 45 min,提取温度 55 ℃,分别考察乙醇浓度为 55%、65%、75%、85%、95% 时对总三萜得率的影响。

1.2.3 响应面法优化提取工艺 基于单因素实验的结果,分别选择提取时间(A)、乙醇浓度(B)、提取温度(C)和料液比(D)为自变量,以总三萜的得率作为响应值,优化总三萜的提取工艺,试验设计见表 1。

表 1 响应面试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels table of the response surface experiment

水平	因素			
	A提取时间 (min)	B乙醇浓度 (%)	C提取温度 (℃)	D料液比 (g/mL)
-1	35	65	45	1:15
0	45	75	55	1:20
1	55	85	65	1:25

1.2.4 总三萜含量的测定

1.2.4.1 齐墩果酸标准曲线的建立 准确称取 20 mg 的齐墩果酸样品溶解于乙醇中,定容至刻度线得到 0.2 mg/mL 的标准溶液。吸取标准液 0、0.1、0.2、

0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于 7 支试管中,水浴蒸干溶剂。向其中加入 0.2 mL 5% 的香草醛-冰醋酸溶液(需新鲜配制),再加入 0.8 mL 高氯酸,振荡均匀,在 75 °C 恒温水浴加热 18 min 后取出快速冷却,加入乙酸乙酯定容至 5 mL,在 552 nm 处测定吸光值<sup>[16]</sup>。以吸光值为纵坐标,齐墩果酸的含量为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程为:  $y=10.161x+0.061$ ,  $R^2=0.9986$ 。

**1.2.4.2 总三萜含量的测定** 选取 20 mg 的总三萜提取物于试管中,按照 1.2.4.1 的方法(香草醛-冰醋酸-高氯酸)测定出吸光值,再根据标准曲线法计算出总三萜的含量。总三萜的得率按下式计算。

$$W(\%) = \frac{c \times V \times D}{1000 \times m} \times 100$$

式中:  $W$  表示总三萜得率,%;  $c$  表示根据吸光值计算出的溶液质量浓度, mg/mL;  $D$  表示溶液稀释倍数;  $V$  表示定容的体积, mL;  $m$  表示桑黄的质量, mg。

## 1.2.5 桑树桑黄总三萜体外降血脂活性试验

**1.2.5.1 胆酸盐标准曲线的建立** 分别选取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{mol/mL}$  的甘氨酸胆酸钠 2 mL 于试管中,加入 5 mL 质量分数为 60% 的浓硫酸溶液,在 70 °C 的恒温水浴锅中反应 20 min,取出后用冰水冷却 5 min,在 387 nm 处测定吸光值<sup>[17]</sup>。以甘氨酸胆酸钠含量为横坐标,吸光值为纵坐标建立标准曲线,求得标准曲线线性方程为:  $y=1.312x+0.1244$ ,  $R^2=0.9969$ 。

牛磺胆酸钠和胆酸钠建立标准曲线的方法同上,求得牛磺胆酸钠的标准曲线线性方程为:  $y=2.677x-0.0702$ ,  $R^2=0.9954$ 。胆酸钠的标准曲线线性方程为:  $y=4.013x+0.1287$ ,  $R^2=0.9984$ 。

**1.2.5.2 总三萜结合胆酸盐能力的测定** 向锥形瓶中分别加入 20、40、60、80、100 mg/mL 的桑树桑黄总三萜 3 mL,接着依次加入 10 mg/mL 的胃蛋白酶 1 mL 和 10  $\mu\text{mol/mL}$  的盐酸溶液 3 mL,在 37 °C 的条件下恒温振荡培养 1 h。再用 10  $\mu\text{mol/mL}$  的氢氧化钠溶液将 pH 调节至 6.4,然后加入配制好的 10 mg/mL 胰蛋白酶 4 mL,在 37 °C 的条件下恒温振荡培养 1 h。加入 1  $\mu\text{mol/mL}$  的胆酸盐 4 mL,在 37 °C 的条件下恒温振荡培养 1 h,将消化物转入离心管,4000 r/min 离心 18 min,取上清液测定吸光度,根据标准曲线法计算胆酸盐结合量<sup>[18]</sup>。以 80 mg/mL 考来烯胺作为阳性对照,评价总三萜对胆酸盐的结合能力。

## 1.2.6 桑树桑黄总三萜体外抗氧化活性试验

**1.2.6.1 对 DPPH 自由基清除能力的测定** 参考 Heleno 等<sup>[19]</sup>的方法,首先制备 0.02 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,分别吸取 2 mL 于不同的试管中,向其中加入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、1、1.5 mg/mL 的总三萜梯度溶液 2 mL,混匀,在暗室内常温反应 0.5 h,然后在 517 nm 处测定其吸光值。以总三萜的乙醇溶液

作为空白组, DPPH 的乙醇溶液作为对照组,以  $V_C$  作为阳性对照品,根据下式计算 DPPH 自由基清除率:

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

式中:  $A_0$  表示对照组的吸光值;  $A_s$  表示总三萜与 DPPH 溶液的吸光值;  $A_1$  表示空白组的吸光值。

**1.2.6.2 对 ABTS 自由基清除能力的测定** 参考 Singh 等<sup>[20]</sup>的方法制备 ABTS 工作液:取 7 mmol/L 的 ABTS 水溶液 0.5 mL 和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液 0.5 mL,混匀,在暗室内反应 15 h,得到 ABTS 母液。将 ABTS 母液用磷酸缓冲液稀释至其在 734 nm 处的吸光值为  $0.7 \pm 0.1$ ,即得 ABTS 工作液。

配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、1、1.5 mg/mL 的总三萜梯度溶液加入到 ABTS 工作液中,混匀后在 734 nm 处测定吸光值。以磷酸缓冲液与总三萜的吸光值作为空白组吸光值,蒸馏水与 ABTS 的吸光值作为对照组吸光值。以  $V_C$  作为阳性对照品,根据下式计算 ABTS 自由基清除率:

$$\text{ABTS自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_s - A_1)}{A_0} \times 100$$

式中:  $A_0$  表示对照组的吸光值;  $A_s$  表示总三萜与 ABTS 溶液的吸光值;  $A_1$  表示空白组的吸光值。

**1.2.6.3 铁离子还原法测定** 参考 Benzie 等<sup>[21]</sup>的方法用 10 mmol/L 的 TPTZ、0.3 mol/L 的乙酸和 20 mmol/L 的三氯化铁溶液以 1:10:1 的体积比制备 FRAP 溶液。

建立硫酸亚铁标准曲线<sup>[22]</sup>:分别选取 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mmol/L 的硫酸亚铁标准溶液 0.08 mL 于试管中,加入 4 mL 的 FRAP 溶液,混合均匀后置于 37 °C 的恒温水浴中反应 10 min,在 593 nm 处测定其吸光值,以硫酸亚铁的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,得到的标准曲线方程为:  $y=0.267x-0.0266$ ,  $R^2=0.9919$ 。

精确吸取 0.5、1、2、3、4 mg/mL 的总三萜溶液于试管中,加入 2.5 mL 的 FRAP 溶液,振荡均匀后在 37 °C 的水浴锅中反应 10 min,于 593 nm 处测定吸光度值。分别以 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的  $V_C$  作为阳性对照品,各物质的抗氧化值以 FRAP 值表示:以标准曲线法计算出硫酸亚铁的浓度即为 FRAP 值<sup>[23]</sup>。

## 1.3 数据处理

试验数据使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,试验图表均采用 Origin 2017 软件进行绘制,响应面试验使用 Design-Expert 8.0.6 进行实验设计和数据分析,每组试验均重复 3 次,试验结果以平均值 $\pm$ 标准差来表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

**2.1.1 料液比对总三萜得率的影响** 由图 1 可知,在



料液比为 1:5~1:20(g/mL)时,总三萜的得率随着料液比的增大而增大,这是因为适当高浓度的料液比加快了传质过程<sup>[24]</sup>。但当料液比超过 1:20 (g/mL)时,总三萜的得率反而下降,由于乙醇的体积过少使得与溶剂的接触面积减小,受到的超声波作用也减少,使得总三萜得率下降,所以选择料液比为 1:20 (g/mL)。

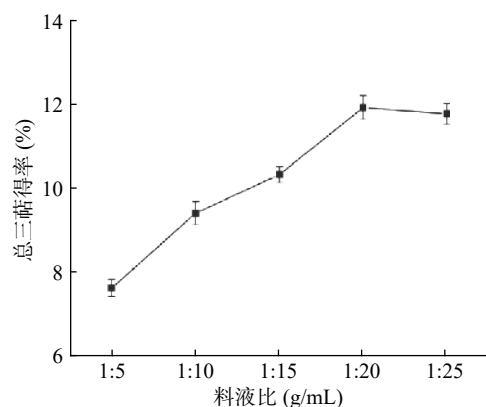


图 1 料液比对总三萜得率的影响

Fig.1 Effect of solvent-to-solid ratio on extraction of total triterpenoids

2.1.2 提取时间对总三萜得率的影响 如图 2 所示,总三萜的得率随超声时间的延长呈现先升高再降低的趋势,当时间为 45 min 时达到最大值。分析其原因,超声波形成大量空化气泡,增加了溶剂与溶质之间的传质和相互作用<sup>[15]</sup>。但当超声时间逐渐延长时,长时间的加热会使三萜物质的结构遭到破坏,影响了提取效率<sup>[25]</sup>。因此 45 min 的提取时间为最佳选择。

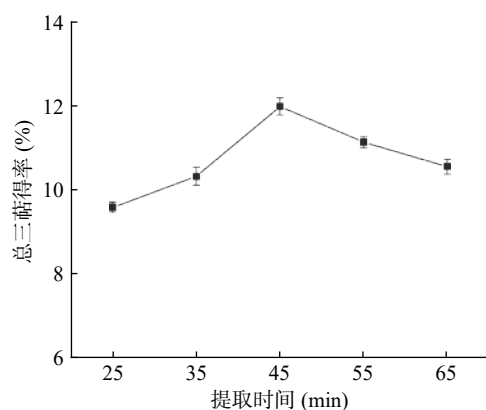


图 2 提取时间对总三萜得率的影响

Fig.2 Effect of reaction time on extraction of total triterpenoids

2.1.3 提取温度对总三萜得率的影响 图 3 表明,温度为 25~55 ℃ 时总三萜的得率在逐渐递增,但温度在 55~65 ℃ 区间时,总三萜得率反而下降。其原因是当温度适当升高时,可以加快物质分子之间的运动速度,使总三萜化合物之间传导性增加,溶质可以充分溶解在其中。但当温度过高时可能会使桑黄总三萜的结构遭到破坏、氧化、分解<sup>[26-27]</sup>,因此选择 55 ℃ 为最佳提取温度。

2.1.4 乙醇浓度对总三萜得率的影响 乙醇浓度为

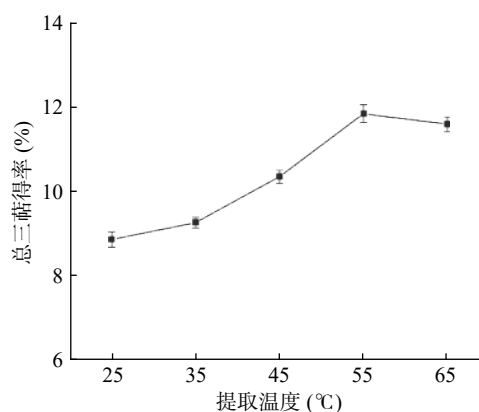


图 3 提取温度对总三萜得率的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on extraction of total triterpenoids

55%~75% 时,总三萜的得率虽然没有大幅度的增加,但当浓度超过 75% 时,总三萜的得率开始下降。可能是因为当乙醇浓度过大时,其他醇溶性杂质溶出,导致三萜类组分的溶出量相对减少<sup>[28]</sup>,因此选择乙醇浓度 75% 为最佳提取浓度。

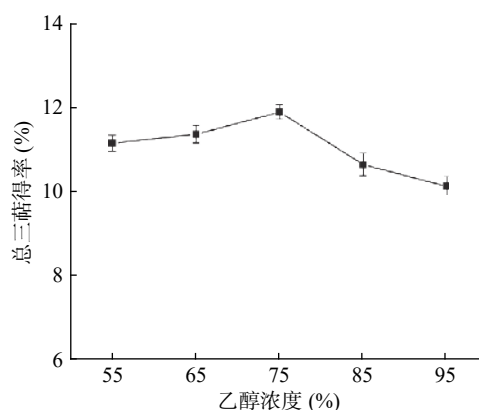


图 4 乙醇浓度对总三萜得率的影响

Fig.4 Effect of reaction ethanol concentration on extraction of total triterpenoids

## 2.2 响应面法优化

2.2.1 响应面模型建立与结果 应用 Design-Expert 软件对实验结果进行多元回归拟合分析,试验结果见表 2,得到桑树桑黄总三萜得率与超声提取各因素变量间的二次方程模型为  $Y=11.94+0.45A+0.28B+0.5C+0.37D+0.24AB+0.18AC+0.28AD+0.38BC-0.13BD+0.33CD-0.94A^2-0.6B^2-0.74C^2-0.68D^2$ 。

由表 3 可知,此模型  $P<0.0001$ ,说明该回归模型的差异性极显著,配合失拟项的值  $0.1771>0.05$ ,这表明在上述区间内整个模型拟合度佳;该模型的  $R^2=0.9686$ ,表面该模型的线性关系显著,调整后的  $R_{adj}^2=0.9372$ ,表明模型可以解释 93.72% 的响应变异性。

从试验的方差分析中得出方程中的 A、B、C、D 项对总三萜的得率影响均极显著 ( $P<0.01$ ),其中 C 项 F 值最大,说明对总三萜得率影响较大的因素是提取温度,即各因素对试验结果的影响程度分别是:提取温度>提取时间>料液比>乙醇浓度,因此在

表 2 响应面设计与试验结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

试验号	A	B	C	D	Y总三萜得率(%)
1	35	65	55	1:20	9.89±0.26
2	55	65	55	1:20	10.18±0.17
3	35	85	55	1:20	9.93±0.18
4	55	85	55	1:20	11.16±0.21
5	45	75	45	1:15	9.77±0.15
6	45	75	65	1:15	10.24±0.23
7	45	75	45	1:25	9.92±0.14
8	45	75	65	1:25	11.71±0.27
9	35	75	55	1:15	9.65±0.25
10	55	75	55	1:15	10.14±0.17
11	35	75	55	1:25	9.96±0.15
12	55	75	55	1:25	11.59±0.22
13	45	65	45	1:20	10.03±0.19
14	45	85	45	1:20	9.98±0.13
15	45	65	65	1:20	10.48±0.25
16	45	85	65	1:20	11.97±0.14
17	35	75	45	1:20	9.79±0.20
18	55	75	45	1:20	10.32±0.13
19	35	75	65	1:20	10.07±0.24
20	55	75	65	1:20	11.34±0.19
21	45	65	55	1:15	10.15±0.11
22	45	85	55	1:15	10.86±0.13
23	45	65	55	1:25	10.94±0.09
24	45	85	55	1:25	11.13±0.18
25	45	75	55	1:20	11.92±0.11
26	45	75	55	1:20	11.86±0.13
27	45	75	55	1:20	12.18±0.15
28	45	75	55	1:20	11.94±0.07
29	45	75	55	1:20	11.81±0.11

试验中应严格控制提取温度。在交互项中, AC 与 BD 的交互作用不显著( $P>0.05$ ), AB 与 AD 的交互作用显著( $P<0.05$ ), BC 与 CD 的交互作用极显著( $P<0.01$ )。由此可得, 乙醇浓度与提取温度、提取温度与料液比两两因素之间的交互作用对总三萜得率的影响较大。二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  影响均极显著( $P<0.01$ )。

响应面图能较为直观地反映出各因素间交互作用对响应值的影响, 曲面越陡峭、倾斜程度越高说明影响越大<sup>[29]</sup>。由图 5 可知, AB、AD、BC、CD 的曲面较为陡峭, 说明这些因素之间的交互作用显著, 而 AC 与 BD 的曲面弯曲程度较小, 表明交互作用不显著, 这与方差分析的结果基本一致。

**2.2.2 最优提取条件** 对模型进行最优工艺的分析, 得到最佳提取条件为: 提取时间 49.35 min、乙醇浓度 79.66%、提取温度 61.22 °C, 料液比为 1:22.35 (g/mL), 预测桑树桑黄总三萜的最高得率可达到 12.35%。为了便于操作, 将此四因素的水平分别调整为提取时间 49 min、乙醇浓度为 80%、提取温度为 61 °C, 料液比为 1:22 (g/mL)。调整后的验证试

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variances

差异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	19.32	14	1.38	30.86	<0.0001	**
A	2.47	1	2.47	55.13	<0.0001	**
B	0.94	1	0.94	21.03	0.0004	**
C	3.00	1	3	67.06	<0.0001	**
D	1.64	1	1.64	36.72	<0.0001	**
AB	0.22	1	0.22	4.94	0.0433	*
AC	0.14	1	0.14	3.06	0.1021	
AD	0.32	1	0.32	7.26	0.0174	*
BC	0.59	1	0.59	13.25	0.0027	**
BD	0.068	1	0.068	1.51	0.2392	
CD	0.44	1	0.44	9.74	0.0075	**
$A^2$	5.67	1	5.67	126.81	<0.0001	**
$B^2$	2.34	1	2.34	52.23	<0.0001	**
$C^2$	3.51	1	3.51	78.37	<0.0001	**
$D^2$	3.00	1	3	67.08	<0.0001	**
残差	0.63	14	0.045			
失拟项	0.55	10	0.055	2.68	0.1771	
纯误差	0.081	4	0.02			
总和	19.95	28				

注: “\*”表示差异显著,  $P<0.05$ , “\*\*”表示差异极显著,  $P<0.01$ 。

验表明, 总三萜得率可达  $12.32\%\pm 0.17\%$ , 非常接近预测值, 表明此模型可以用于分析桑树桑黄总三萜提取工艺的优化。

## 2.3 桑树桑黄总三萜体外结合胆酸盐研究结果

**2.3.1 桑树桑黄总三萜对胆酸盐的结合量** 桑树桑黄总三萜与胆酸盐的结合能力如图 6 所示, 在特定范围内, 总三萜的质量浓度与胆酸盐的结合量呈正相关, 当质量浓度为 20~60 mg/mL 时, 总三萜对甘氨酸钠、牛磺胆酸钠和胆酸钠的结合量均显著性升高( $P<0.05$ ), 在质量浓度为 80~100 mg/mL 时, 总三萜与胆酸盐的结合接近饱和状态, 其与牛磺胆酸钠、胆酸钠的结合量无显著性变化( $P>0.05$ ), 对甘氨酸钠的结合量显著下降( $P<0.05$ )。在质量浓度为 80 mg/mL 时对胆酸盐的结合量最大。

**2.3.2 桑树桑黄总三萜的体外降血脂活性** 考来烯胺(Colestyramine)是一种常见的降血脂药物, 主要作用于体内的胆酸或胆固醇, 能有效改善高血脂症患者的血脂水平, 具有较好的临床疗效<sup>[30]</sup>。实验以 80 mg/mL 考来烯胺结合胆酸盐的能力作为对照<sup>[31]</sup>, 测定同质量浓度下桑树桑黄总三萜与胆酸盐的结合量, 并将结果作为数值比率进行比较。结果如图 4 所示, 总三萜对甘氨酸钠、牛磺胆酸钠和胆酸钠的结合能力相当于同剂量考来烯胺的 50.93%、52.14% 和 43.06%, 说明桑树桑黄总三萜具有较好的结合胆酸盐的能力。胆酸盐被结合后含量减少, 会促使肝脏中的胆固醇降解生成胆酸盐以维持动态平衡, 从而使胆固醇降低达到降血脂的目的<sup>[17]</sup>。因此可以表明桑树桑黄总三萜具有良好的体外降血脂活性。

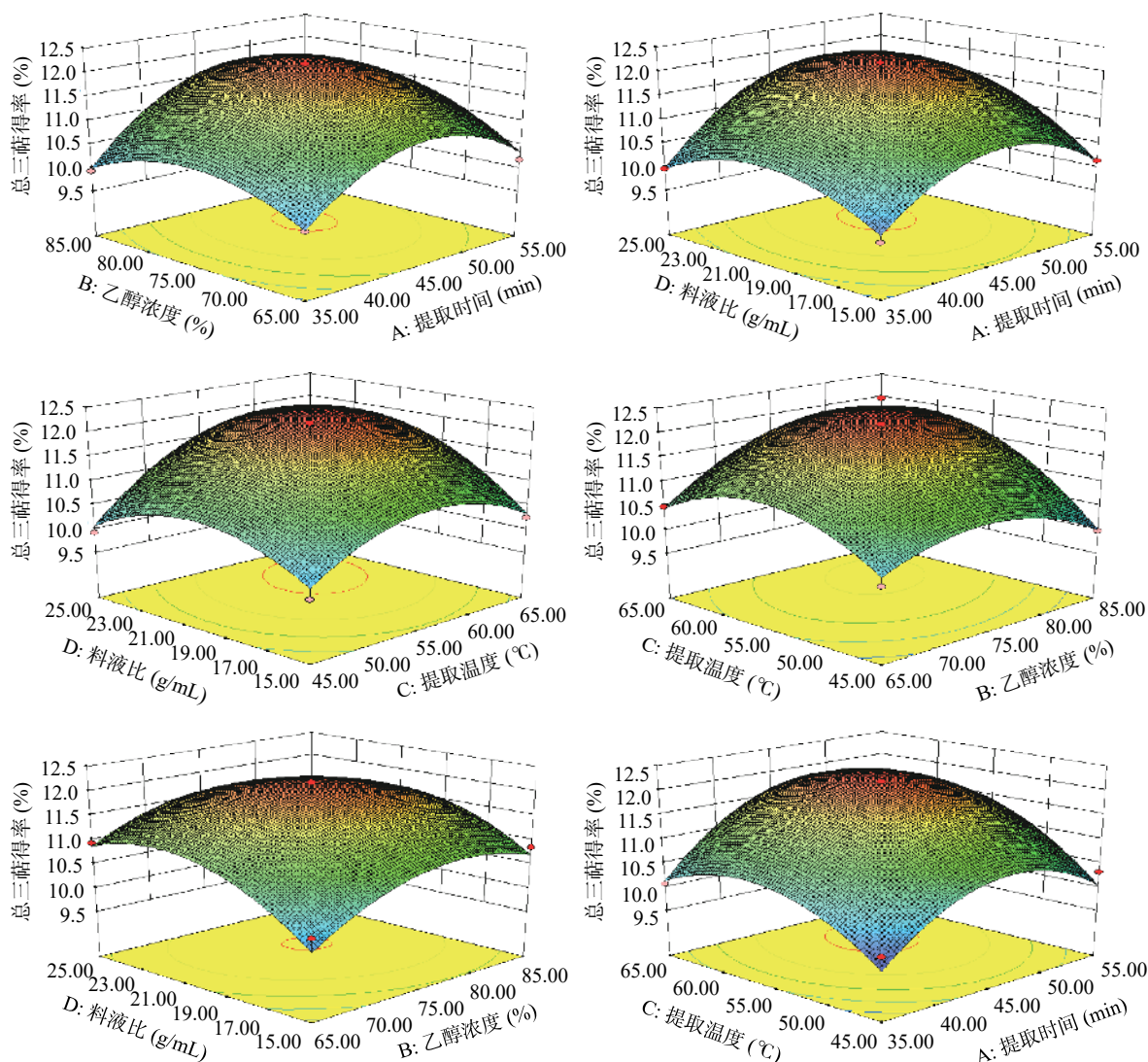


图 5 各因素交互作用的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots of the interaction of various factors

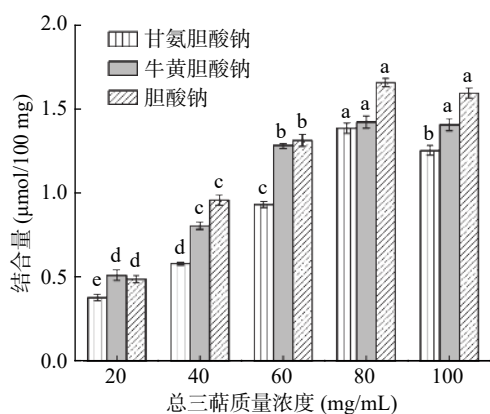


图 6 桑树桑黄总三萜对胆酸盐的结合量

Fig.6 The binding amount of total triterpenoids to cholic acid salt in *Inonotus sanghuang*

注: 图中不同的字母表示不同质量浓度的总三萜对同一种胆酸盐的结合量差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.4 桑树桑黄总三萜体外抗氧化结果

2.4.1 清除 DPPH 自由基的能力  $V_C$  和桑树桑黄总三萜对 DPPH 自由基的清除能力如图 7 所示, 在试

验范围内, 两种物质的质量浓度越大, 清除率越高。当  $V_C$  的质量浓度达到 1.0 mg/mL 时, 其清除作用逐渐平稳, 但总体的清除能力均大于桑树桑黄总三萜。在质量浓度为 0.1~1.5 mg/mL 范围内, 桑树桑黄总三萜清除 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  为 0.304 mg/mL,  $V_C$  的  $IC_{50}$  为 0.060 mg/mL。当质量浓度达到 1.5 mg/mL 时, 总三萜的清除作用达到了  $86.45\% \pm 2.16\%$ , 相当于同质量浓度  $V_C$  的 93%, 证明桑树桑黄总三萜具有良好的清除 DPPH 自由基的能力。

2.4.2 清除 ABTS 自由基的能力  $V_C$  和桑树桑黄总三萜对 ABTS 自由基的清除能力如图 8 所示, 在试验范围内, 两种物质呈现出良好的剂量-效应关系, 但  $V_C$  的清除能力总体大于总三萜。根据线性回归方程分析, 总三萜清除 ABTS 的自由基的  $IC_{50}$  值为 0.520 mg/mL,  $V_C$  的  $IC_{50}$  为 0.197 mg/mL。当质量浓度为 1.5 mg/mL 时, 总三萜的清除作用达到了  $80.34\% \pm 2.21\%$ , 相当于同质量浓度  $V_C$  的 87%, 证明桑树桑黄总三萜具有良好的清除 ABTS 自由基的能力。



表 4 桑树桑黄总三萜对胆酸盐的结合能力

Table 4 The binding capacity of total triterpenoids from *Inonotus sanghuang* to bile salts *in vitro*

指标名称	甘氨酸钠结合量 ( $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ )	相对考来烯胺的结合率 (%)	牛磺胆酸钠结合量 ( $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ )	相对考来烯胺的结合率 (%)	胆酸钠结合量 ( $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ )	相对考来烯胺的结合率 (%)
桑树桑黄总三萜	1.385 $\pm$ 0.071	50.93 $\pm$ 3.34	1.422 $\pm$ 0.067	52.14 $\pm$ 4.07	1.675 $\pm$ 0.034	43.06 $\pm$ 1.71
考来烯胺	2.726 $\pm$ 0.043	100.00 $\pm$ 1.57	2.734 $\pm$ 0.085	100.00 $\pm$ 3.11	3.893 $\pm$ 0.076	100.00 $\pm$ 2.02

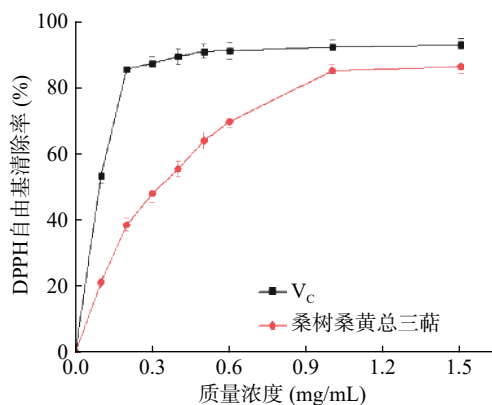


图 7 桑树桑黄总三萜的 DPPH 自由基清除能力

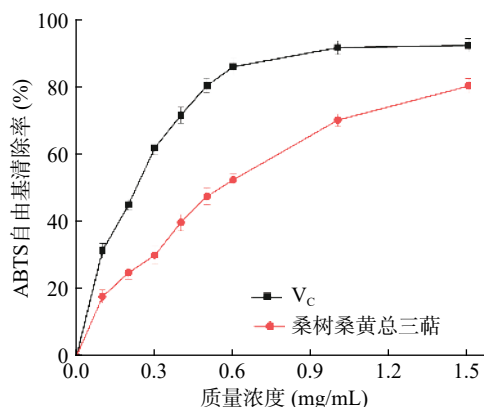
Fig.7 DPPH free radical scavenging ability of total triterpenoids from *Inonotus sanghuang*

图 8 桑树桑黄总三萜的 ABTS 自由基清除能力

Fig.8 ABTS free radical scavenging ability of total triterpenoids from *Inonotus sanghuang*

2.4.3 铁离子的还原能力  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ 在抗氧化物质的作用下时会转变成  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, 溶液的颜色也会由黄绿色变成蓝色, 在 597 nm 处有最大吸光值<sup>[32]</sup>。当质量浓度为 0.5 mg/mL 时,  $\text{V}_\text{C}$  和总三萜的 FRAP 值分别为 8.01 和 2.49 mmol/L,  $\text{V}_\text{C}$  的还原能力大于总三萜。但当总三萜的质量浓度为 4.0 mg/mL 时, 其 FRAP 值可达 7.54 mmol/L。由此可见桑树桑黄总三萜的还原能力虽小于  $\text{V}_\text{C}$ , 但当达到足够大的质量浓度时, 其还原能力也会提高。

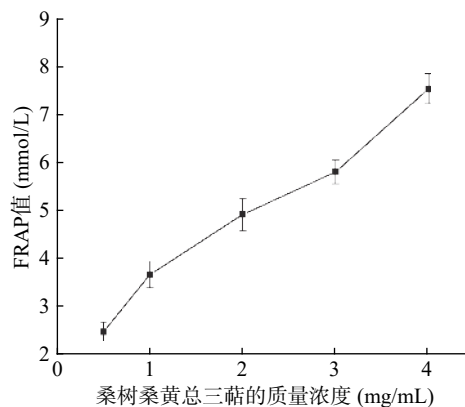
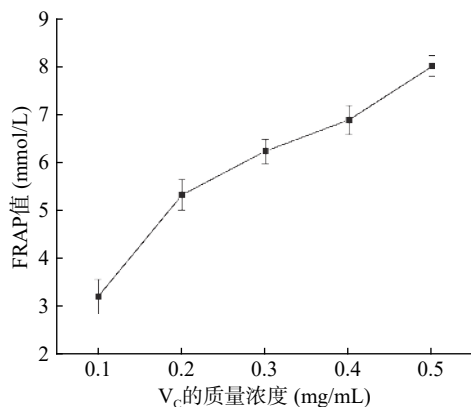
### 3 结论

选用超声波法提取桑树桑黄子实体中的三萜类化合物, 在单因素试验的基础上采用响应面法优化了提取桑树桑黄总三萜的工艺, 结果表明, 提取时间 49 min、乙醇浓度为 80%、提取温度为 61  $^{\circ}\text{C}$ 、料液比为 1:22 (g/mL), 总三萜得率可达 12.32% $\pm$ 0.17%,

与模型预测值非常接近, 说明此工艺参数可行, 且总三萜的得率高于之前的研究结果<sup>[11-13]</sup>。

桑树桑黄总三萜具有较好的体外降血脂活性, 且在一定范围内, 总三萜的质量浓度越大结合胆酸盐的能力越强, 在质量浓度为 80 mg/mL 时结合量最大。其体外结合甘氨酸钠、牛磺胆酸钠、胆酸钠的能力为同等剂量考来烯胺的 50.93%、52.14% 和 43.06%。桑树桑黄总三萜还具有较好的还原能力和抗氧化活性, 其清除 DPPH 和 ABTS 自由基的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.304 和 0.520 mg/mL, 其 FRAP 值可达 7.54 mmol/L, 虽然低于阳性对照品  $\text{V}_\text{C}$ , 但具有一定的参考价值。

本文对桑树桑黄的降血脂和抗氧化活性进行了初步的探索, 为开发桑树桑黄提供了一定的理论参考。但桑树桑黄生长周期长, 数量少, 对其有效组分

图 9  $\text{V}_\text{C}$  和桑树桑黄总三萜的还原能力Fig.9 The reduction capacity of  $\text{V}_\text{C}$  and total triterpenoids from *Inonotus sanghuang*

的分离纯化亟待进一步探讨,以提高利用率;且桑树桑黄总三萜成分复杂,对其构效关系及体内降血脂抗氧化活性也需要进行深入研究。

### 参考文献

- [1] 吴声华,黄冠中,陈愉萍,等.桑黄的分类及开发前景[J].菌物研究,2016,14(4):187-200.
- [2] 朱琳,崔宝凯.药用真菌桑黄的研究进展[J].菌物研究,2016,14(4):201-209.
- [3] 圣明明,王宏媛,冯岳琴,等.药用真菌桑黄研究进展[J].轻工科技,2016,32(12):13-15.
- [4] 刘帅阳,廖宣宇,余戎镇,等.桑黄提取液抗尿酸活性的研究[J].人参研究,2019,31(4):17-20.
- [5] 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.
- [6] 李兆坤,王凤寰,陈彬,等.大型真菌萜类化合物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2017,29(2):357-369.
- [7] Zhang J L, Ai L S, Lv T, et al. Asiatic acid, a triterpene, inhibits cell proliferation through regulating the expression of focal adhesion kinase in multiple myeloma cells[J]. *Oncology Letters*, 2013, 6(6): 1762-1766.
- [8] Esimone C O, Eck G, Nworu C S, et al. Dammaranolic acid, a secodammarane triterpenoid from *Aglaia* sp. shows potent anti-retroviral activity *in vitro*[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(7): 540-547.
- [9] Park Y H, Kim Y, Mishra R C, et al. Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer): Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16221.
- [10] Kim E H, Choi Y S, Kim Y M. Antioxidative and anti-inflammatory effect of *Phellinus igniarius* on RAW 264.7 macrophage cells[J]. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 2019, 15(1): 2-7.
- [11] 梁佳,孙梦伊,张腾,等.响应曲面法优化桑黄菌丝体中三萜的微波提取工艺[J].中国农学通报,2011,27(10):235-238.
- [12] 谢江宁,宋素芬,李香,等.桑黄总三萜的提取及其体外抗脑胶质瘤 U251 活性[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):24-26.
- [13] 于小凤,秦庆玲,李峰,等.响应面法优选桑黄总三萜的超声提取工艺[J].中国药房,2012,23(47):4455-4458.
- [14] 齐欣,张峻,陈颖,等.六种不同树种桑黄有效成分的比较[J].食品科学,2010,31(6):199-201.
- [15] 杨开,徐梦婷,王玢紫,等.牛樟芝总三萜超声提取及体外活性研究[J].核农学报,2018,32(1):112-122.
- [16] 许谦.生产桑黄三萜类化合物液体发酵培养基的优化[J].中药材,2016,39(12):2836-2838.
- [17] 于美汇,赵鑫,尹红力,等.碱提醇沉黑木耳多糖体外和体内降血脂功能[J].食品科学,2017,38(1):232-237.
- [18] 刘荣,王蕾,栗淑莹,等.水溶性黑木耳多糖体外结合胆酸盐能力的分析[J].食品工业科技,2015,36(17):358-361.
- [19] Heleno S A, Barros L, Martins A, et al. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 63(1): 475-481.
- [20] Singh P, Singh R, Sati N, et al. Antioxidant and antibacterial activity of *Jurinea dolomiaea* Boiss extracts[J]. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2015, 1(2): 74-78.
- [21] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.
- [22] 孙照澄,齐欣,崔承弼.辐照红景天乙醇提取物的抗氧化作用及美白作用研究[J/OL].食品工业科技:1-15[2020-07-30].  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200514.1151.011.html>.
- [23] 曹卓松,孙飞龙,唐薇,等.绿咖啡豆绿原酸的体外抗氧化性活性测定[J].包装与食品机械,2020,38(2):28-31.
- [24] Pawelczyk A, Sowa-Kasprzak K, Olender D, et al. Microwave (MW), ultrasound (US) and combined synergic MW-US strategies for rapid functionalization of pharmaceutical use phenols[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2360.
- [25] 白新鹏,裴爱泳,方希修.改进微波装置辅助提取猕猴桃根三萜类化合物的研究[J].农业工程学报,2006,22(8):188-193.
- [26] 刘爽爽,王昀睿,李德海.粗毛纤孔菌三萜的提取及胆酸盐结合研究[J].中南林业科技大学学报,2019,39(10):132-138.
- [27] Zhou S Y, Wu X H, Huang Y X, et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of alkaloids from *Radix Sophorae Tonkinensis* with an ethanol/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> system: Process optimization, composition identification and quantification analysis[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 122: 316-328.
- [28] 段丽萍,孙炜炜,苗丽坤,等.艾叶总三萜的提取工艺优化及其抑菌活性[J].现代食品科技,2020,36(5):88-95.
- [29] 吴玉柱,崔维建,李妍.超声波辅助提取玉木耳多糖及其抗氧化活性分析[J/OL].食品工业科技:1-12[2020-06-16].  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200518.1332.012.html>.
- [30] 杜学宏,柴树人.考来烯胺在高胆固醇血症患者中的应用效果[J].中国生化药物杂志,2016,36(5):78-80.
- [31] 胡凯,黄惠华.不同茶叶对胆酸盐的结合及其降血脂机理的研究[J].食品与发酵工业,2010,36(9):42-45.
- [32] Kang S S C. Evaluation of *in vitro* free radical scavenging potential of *Streptomyces* sp. AM-S1 culture filtrate[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2013, 20(3): 227-233.