

正交试验优化猴头菌菌丝体中猴头菌素 A 的超声提取工艺

刘若曦¹, 何晋浙², 王 平^{1*},

(1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江工业大学海洋学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 目的 通过正交试验优化猴头菌 *Hericium erinaceus* 菌丝体中猴头菌素 A 的超声提取工艺。方法 HPLC 法测定猴头菌素 A 含量。以超声时间、甲醇体积分数、超声功率、超声温度为影响因素, 猴头菌素 A 提取率为评价指标, 正交试验法优化提取工艺, 并比较了超声提取与甲醇浸提的提取效果。**结果** 最佳条件为超声时间 45 min, 甲醇体积分数 80%, 超声功率 18 kHz, 超声温度 50 °C。超声提取下猴头菌素 A 提取率为 1.144 0 mg/g, 明显高于甲醇浸提下 (0.459 4 mg/g)。**结论** 该方法简便节能, 溶剂消耗少, 提取效率高, 可用于超声提取猴头菌菌丝体中猴头菌素 A。

关键词: 猴头菌; 菌丝; 猴头菌素 A; 超声提取; 正交试验; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)02-0305-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.014

Optimization of ultrasonic extraction for erinacine A in mycelia of *Hericium erinaceus* by orthogonal test

LIU Ruo-xi¹, HE Jing-zhe², WANG Ping^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Ocean College, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

KEY WORDS: *Hericium erinaceus*; mycelia; erinacine A; ultrasonic extraction; orthogonal test; HPLC

猴头菌 *Hericium erinaceus* 属于担子菌门猴头菌科猴头菌属, 是著名的药食兼用真菌^[1]。据《中国药用真菌》记载, 其性平、味甘, 能利五脏、助消化、滋补、抗癌、治疗神经衰弱^[2]。猴头菌素是一类具有 Cyathane^[3] 骨架类型的二萜化合物, 主要存在于猴头菌菌丝体中, 目前共有 24 种被分离鉴定^[4-12], 其能有效促进体外培养星形胶质细胞神经生长因子 (NGF) 的合成, 是治疗神经功能障碍疾病 (如阿尔茨海默症) 的潜在药物^[13]。目前, 对该成分的提取大多采用传统浸提法, 耗时费力, 原料利用率低, 有机溶剂消耗量大, 易造成环境污染。

近年来, 超声提取在天然产物提取中显示出了巨大优势, 超声波所产生的强烈振动、空化效应、搅拌作用等可以加速植物有效成分进入溶剂, 提高提取率, 缩短提取时间, 简化操作步骤^[14]。本实

验采用该方法提取猴头菌菌丝体中猴头菌素 A, 并通过正交试验进行优化, 最后与传统浸提法进行了比较, 以期为该成分的开发利用提供依据。

1 实验材料

1.1 试剂 猴头菌素 A 对照品 (自制, HPLC 法测定其含量在 99% 以上)。甲醇为分析纯 (上海凌峰化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯 (韩国 SK Chemicals 公司); 水为超纯水。猴头菌菌丝体冻干粉 (40~60 目) 购自杭州雪域生物科技有限公司, 经浙江工业大学海洋学院何晋浙副教授鉴定为红菇目猴头菌科猴头菌 *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. 的菌丝体。

1.2 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent Technologies 公司); NANOpure Diamond 超纯水系统 (美国 Thermo Barnstead 公司); TJS-3000 智能数控超声波发生器 v6.0 (杭州成功超声设备

收稿日期: 2016-06-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2014AA022205)

作者简介: 刘若曦 (1990—), 女, 硕士生, 从事天然药物化学研究。Tel: (0571) 88320867, E-mail: 252619105@qq.com

* 通信作者: 王 平 (1969—), 女, 博士, 教授, 研究方向为天然药物化学、中药及天然药物活性成分。Tel: (0571) 88320867, E-mail: wangping45@zjut.edu.cn

有限公司); BSA423S 分析天平 (德国 Sartorius 公司); MS-H-Pro + 数控加热型磁力搅拌器 (北京欣维尔玻璃仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm × 5 μm); 体积流量 1.5 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 340 nm; 进样量 20 μL; 梯度洗脱, 程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	乙腈/%	水/%
0	20	80
10	30	70
20	50	50
30	60	40

2.2 线性关系考察 精密称取猴头菌素 A 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 10 mg/mL 对照品贮备液。精密移取 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 在“2.1”项色谱条件下进样 20 μL, 测定峰面积。以溶液质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 1\,024.3X - 9.168$ ($r = 0.999\,8$), 在 20 ~ 400 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3 精密度试验 精密量取对照品溶液 (100 μg/mL) 20 μL, 重复进样 6 次, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得猴头菌素 A 峰面积 RSD ($n = 6$) 为 0.83%, 表明精密度良好。

2.4 稳定性试验 精密量取对照品溶液 (100 μg/mL) 20 μL, 于 0、4、8、12、24、48 h 进样, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得猴头菌素 A 峰面积 RSD ($n = 6$) 为 1.66%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验 精密称取菌丝体冻干粉 6 份, 每份 10 g, 加入 80% 甲醇 100 mL, 于 50 °C、18 kHz 下超声提取 45 min, 提取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。精密量取 20 μL, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得猴头菌素 A 含量 RSD 猴头菌素 A 为 1.57%, 表明该方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验 取菌丝体冻干粉 6 份, 每份约 5 g, 加入猴头菌素 A 对照品 5.7 mg, 按“2.5”项下方法制备供试品溶液。精密量取 20 μL, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得其平

均加样回收率为 102.1%, RSD ($n = 6$) 为 1.51%。
2.7 正交试验 以超声时间 (A)、甲醇体积分数 (B)、超声功率 (C)、超声温度 (D) 为影响因素, 每个因素 3 个水平, 具体见表 2。再采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 以猴头菌素 A 提取率为评价指标优化工艺。

表 2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

水平	A 超声时间/ min	B 甲醇/ %	C 超声功率/ kHz	D 超声温度/ °C
1	15	70	16	30
2	30	80	18	40
3	45	90	20	50

2.8 提取方法 精密称取菌丝体冻干粉 10 g, 加入 100 mL 不同体积分数的甲醇, 按表 2 条件进行提取, 提取液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 在“2.1”项色谱条件下进样 20 μL, 测定含量, 计算提取率, 公式为提取率 (mg/g) = 猴头菌素 A 含量 (mg, 20 μL 进样量) × 提取液总体积 (100 mL) / 菌丝体质量 (10 g)。

2.9 结果

2.9.1 正交试验 结果见表 3 和表 4。由表可知, 各因素对猴头菌素 A 提取率都有极显著影响 ($P < 0.01$)。程度依次为 A > D > C > B, 最优工艺为 A₃B₂C₂D₃, 即超声时间 45 min, 甲醇体积分数 80%, 超声功率 18 kHz, 超声温度 50 °C。

表 3 试验设计及结果

Tab. 3 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	猴头菌素 A 提取率/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	0.455 8
2	1	2	2	2	0.481 8
3	1	3	3	3	0.504 6
4	2	1	2	3	0.603 1
5	2	2	3	1	0.551 6
6	2	3	1	2	0.503 9
7	3	1	3	2	0.580 3
8	3	2	1	3	0.995 6
9	3	3	2	1	0.964 7
K ₁	0.480 7	0.546 4	0.651 8	0.657 4	
K ₂	0.552 9	0.676 3	0.683 2	0.522 0	
K ₃	0.849 4	0.657 7	0.545 5	0.701 1	
R	0.368 7	0.129 9	0.137 7	0.179 1	

2.9.2 比较试验 按照优化工艺, 比较了超声提取法和甲醇浸提法 (除未用超声处理外, 其他操作方法和条件均同超声提取法) 的提取效果, 平行 3 次。结果, 超声提取下猴头菌素 A 提取率分别为 1.143 5、1.144 4、1.144 1 mg/g, 平均

1.144 0 mg/g, RSD ($n = 3$) 0.04% ; 甲醇浸提下分别为 0.459 1、0.459 2、0.459 9 mg/g, 平均 0.459 4 mg/g, RSD ($n = 3$) 0.095% , 前者显著高于后者。

表4 方差分析

Tab.4 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	0.677 1	2	0.338 6	7 526	<0.01
B	0.088 86	2	0.044 43	987.7	<0.01
C	0.093 71	2	0.046 86	1042	<0.01
D	0.156 9	2	0.078 45	1744	<0.01
误差	0.000 809 7	18	4.499×10^{-5}	—	—

3 讨论和结论

本实验通过正交试验,对猴头菌菌丝体中猴头菌素 A 超声提取工艺进行优化,发现最佳条件为 50 ℃ 下 80% 甲醇超声 45 min, 超声功率为 18 kHz。结果表明,在一定范围内,在超声时间延长、甲醇体积分数提高、超声功率加大或超声温度升高时,都能使猴头菌素 A 提取率增加,其中超声时间、功率、温度的上升均能显著促进猴头菌菌丝体细胞破裂,加速胞内物质释放、扩散、溶解,但超声功率过高时会使菌丝体组织过度破裂,导致胞内大量不溶物、多糖、较多黏液质等成分进入提取液中,溶液黏度增大,传质阻力增加,影响了该成分的溶出;甲醇体积分数对猴头菌素 A 提取率的影响则主要与其理化性质有关。

然后,在相同条件下比较了超声提取法和甲醇浸提法的提取效果,发现前一方法下猴头菌素 A 提取率约为后者的 2.5 倍,表明超声提取法提取效率高、溶剂消耗少、节约能源、操作简便,容易实现产业化,具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] 黄年来,林志彬,陈国良.中国食药菌学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2010:206-216.
[2] 麻兵继,徐俊蕾,文春南,等.猴头菌子实体化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(9):1165-1168.

[3] Ayer W A, Carstens L L. Diterpenoid metabolites of *Cyathus helenae*. Cyathin B3 and Cyathin C3[J]. *Can J Chem*, 2011, 51(19): 3157-3160.
[4] Kawagishi H, Shimada A, Shirai R, et al. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factors (NGF) -synthesis, from mycelia of *Hericium erinaceum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35(10): 1569-1572.
[5] Kawagishi H, Shimada A, Shizuki K, et al. Erinacine D, a stimulator of nerve growth factor NGF-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum* [J]. *Heterocycl Commun*, 1996, 2(1): 51-54.
[6] Kawagishi H, Shimada A, Hosokawa S, et al. Erinacines E, F and G, stimulators of nerve growth factor (NGF) -synthesis from the mycelia of *Hericium erinaceum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37(41): 7399-7402.
[7] Lee E W, Shizuki K, Hosokawa S, et al. Two novel diterpenoides, erinacines H and I from the mycelia of *Hericium erinaceum* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2402-2405.
[8] Kawagishi H, Masui A, Tokuyama S, et al. Erinacines J and K from the mycelia of *Hericium erinaceum* [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(36): 8463-8466.
[9] Kenmoku H, Sassa T, Kato N, et al. Isolation of erinacine P a new parental metabolite of cyathane-xylosides from *Hericium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B [J]. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41(22): 4389-4393.
[10] Kenmoku H, Shimai T, Toyomasu T, et al. Erinacine Q, a new erinacine from *Hericium erinaceum*, and its biosynthetic route to erinacine C in the basidiomycete [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(3): 571-575.
[11] Kenmoku H, Tanaka K, Okada K, et al. Erinacol (cyatha-3, 12-dien-14β-ol) and 11-O-acetylcathin A3, new cyathane metabolites from an erinacine Q-producing *Hericium erinaceum* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(8): 1786-1789.
[12] Ma B J, Zhou Y, Li L Z, et al. A new cyathane-xyloside from the mycelia of *Hericium erinaceum* [J]. *Z Naturforsch B*, 2008, 63(10): 1241-1242.
[13] Shimbo M, Kawagishi H, Yokogoshi H, et al. Erinacine A increases catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of rats [J]. *Nutr Res*, 2005, 25(6): 617-623.
[14] 周晶,冯淑华,等.中药提取分离新技术[M].北京:科学出版社,2010:77-79.