

# 两类破壁灵芝孢子粉三萜的提取工艺优化及其含量测定

温艳艳<sup>1,2,3</sup>, 张静<sup>1,2,3,4</sup>, 朱雅琴<sup>1,2,3</sup>, 周俊<sup>5</sup>, 方玲<sup>6</sup>, 彭灿<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽合肥 230012; 2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽合肥 230012; 3. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽合肥 230012; 4. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽合肥 230012; 5. 安徽黄山云乐灵芝有限公司, 安徽宣城 242600; 6. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 安徽合肥 230022)

**摘要** [目的]优化CO<sub>2</sub>超临界萃取孢子油后的破壁灵芝孢子粉残渣和破壁灵芝孢子粉中三萜类成分提取工艺以及CO<sub>2</sub>超临界萃取孢子油前后三萜类成分的含量差异。[方法]通过设计正交试验,采用紫外-可见分光光度法测量提取液的吸光度,计算提取率,根据正交数据分析,确定最佳提取方案以及含量差异。[结果]对于CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉来说,最佳提取工艺为以无水乙醇作为提取溶剂,料液比为1:30(g:mL),提取时间为2 h,提取温度为70℃,提取次数为4次时提取率最高;对于破壁灵芝孢子粉来说,最佳提取工艺为以无水乙醇为提取溶剂,料液比为1:20,提取时间为1.5 h,提取温度为50℃,提取次数2次时提取率最高;且二者三萜类成分含量存在明显差异。[结论]该研究为进一步分析破壁灵芝孢子粉在CO<sub>2</sub>超临界萃取孢子油前后三萜类成分含量差异提供理论依据和参考。

**关键词** 破壁灵芝孢子粉;提取工艺优化;含量测定;方法学考察;正交试验设计;紫外-可见分光光度法

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)19-0182-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.19.048



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Optimum Extraction Technology and Content Determination of Triterpenoids from Two Kinds of Wall-broken *Ganoderma lucidum* Spore Powder by Orthogonal Test

WEN Yan-yan<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2,3,4</sup>, ZHU Ya-qin<sup>1,2,3</sup> et al (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compounds, Hefei, Anhui 230012; 3. Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Traditional Chinese Medicine in Anhui Province, Hefei, Anhui 230012; 4. Institute of Pharmaceutical Preparations, Anhui Academy of Chinese Medical Sciences, Hefei, Anhui 230012)

**Abstract** [Objective] To optimize the extraction process of triterpenoids from the residues of spore powder of *Ganoderma lucidum* and spores of *Ganoderma lucidum* after CO<sub>2</sub> supercritical extraction of spore oil and the difference of triterpenoids content before and after CO<sub>2</sub> supercritical extraction of spore oil. [Method] By designing an orthogonal experiment, the absorbance of the extract was measured by UV-vis spectrophotometry, the extraction rate was calculated, and the optimal extraction scheme and content difference were determined based on the orthogonal data analysis. [Result] The best extraction process for the broken *Ganoderma lucidum* spore powder after CO<sub>2</sub> supercritical extraction of *Ganoderma lucidum* spore oil: absolute ethanol as the extraction solvent, the solid-liquid ratio was 1:30, and the extraction rate was highest when the temperature was 70℃ for 2 h and the number of times was 4 times. For *Ganoderma lucidum* spore powder, the best extraction process was: using absolute ethanol as the extraction solvent, the solid-liquid ratio was 1:20, the extraction time was 1.5 h, the extraction temperature was 50℃, and the extraction rate is the highest; and the content of triterpenoids in the two was significantly different. [Conclusion] The study provides a theoretical basis and reference for further analysis of the content difference of triterpenes in the broken *Ganoderma lucidum* spore powder before and after CO<sub>2</sub> supercritical extraction of spore oil.

**Key words** Broken *Ganoderma lucidum* spore powder; Optimization of extraction process; Content determination; Methodological investigation; Orthogonal experimental design; Ultraviolet-visible spectrophotometry

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属于担子菌纲多孔菌科真菌,是我国名贵的传统中药材,在中国有上千年的药用历史,又名“琼珍”,被历代医学家视为滋补强壮、扶正固本的神奇珍品<sup>[1]</sup>。灵芝孢子粉是在灵芝成熟后从菌褶中弹射出来的微小的生殖细胞,也是灵芝的种子,具有灵芝的全部遗传物质,其形态极其微小(4~6 μm),一般条件下想要自然收集很困难。近年来经证实灵芝孢子粉主要具有抗癌抗肿瘤活性<sup>[2-4]</sup>、保护神经系统<sup>[5-6]</sup>、保肝护肝<sup>[7-8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>、降血糖<sup>[10]</sup>、调节机体免疫力<sup>[11-12]</sup>等作用。此外,灵芝孢子粉类药物被广泛应用于临床方面,且安全无毒。

灵芝三萜一般可以从不同种类的灵芝中分离提纯获得,且灵芝三萜在灵芝中的含量多少常被作为评判灵芝质量的

标准之一<sup>[13]</sup>。1982年, Kubota等<sup>[14]</sup>首次从灵芝中分离出2种灵芝酸成分,即灵芝酸A、B,目前为止已鉴定出的灵芝三萜的种类达300多种<sup>[15]</sup>。灵芝三萜类成分结构复杂,具有高度氧化性的羊毛甾烷衍生物,分子量一般在400~600 Da,脂溶性较高,难溶于水。三萜多数具有苦味,苦味越强则三萜含量越高,从灵芝子实体、孢子粉、菌丝体等的提取物中分离出多种三萜类成分,大多数以灵芝酸为主<sup>[16]</sup>。

破壁灵芝孢子粉价格昂贵,且对于考察灵芝孢子粉的质量目前没有一个确切的科学评价体系,对于其药理作用、临床应用以及相关药物研发领域研究等都发现与其活性成分密切相关。有研究表明,破壁灵芝孢子粉CO<sub>2</sub>超临界萃取孢子油后,其中三萜类成分也会相应地被提取出来<sup>[17]</sup>,为避免资源浪费,对其中剩余三萜类成分进行提取,可以实现资源利用最大化。应要求采用有机溶剂回流提取法对两类破壁灵芝孢子粉中三萜类成分进行提取,在提取过程中,提取溶剂、提取温度、提取时间、提取次数、料液比等都会对提取率有一定的影响,因此采用正交法对提取方案进行优化,正交

基金项目 安徽省科技重大专项(17030801015)。

作者简介 温艳艳(1995—),女,安徽濉溪人,硕士研究生,研究方向:药学。\*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事药物制剂新技术与药物体内外分析研究。

收稿日期 2020-01-03;修回日期 2020-03-06

设计作为一种高效经济且可以同时多种影响因素进行考察的试验设计方法<sup>[18]</sup>,可以有效选取对灵芝孢子粉中三萜类成分提取的最优影响因素,获得最佳提取工艺,近年来被广泛应用于中药领域,尤其是中药中有效成分的提取分离。笔者通过紫外-可见分光光度法进行含量测定,比较萃取灵芝孢子油前后三萜类成分含量差异,从而更客观地评价灵芝孢子粉质量。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 药材。**CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉残渣、破壁灵芝孢子粉,由黄山云乐灵芝有限公司提供。

**1.1.2 试剂。**无水甲醇、无水乙醇、冰醋酸、香草醛、乙酸乙酯,上海润捷化学试剂有限公司,均为分析纯;高氯酸,国药集团化学试剂有限公司,优级纯;齐墩果酸标准品,纯度:HPLC≥98%,批号 CHB171229,成都克洛玛生物科技有限公司。

**1.1.3 仪器。**十万分之一分析天平、千分之一分析天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;旋转蒸发器,德国 heidolph;恒温水浴锅,上海越众仪器设备有限公司;紫外-可见分光光度计,UV-8000,上海元析分析仪器有限公司;SHZ-D(Ⅲ)循环水式多用真空泵,河南省予华仪器有限公司;抽滤装置,北京欣维尔玻璃仪器有限公司;全波长扫描仪,德国耶拿分析仪器股份有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 对照品溶液的配制。**精密称取齐墩果酸对照品 10.00 mg,用无水甲醇溶解,配制成 0.2 mg/mL 的溶液,待用。

**1.2.2 供试品溶液的制备。**精密称量 2 g 破壁灵芝孢子粉、CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉残渣,分别置于 500 mL 容量瓶中,通过设计正交试验,在不同试验条件下对破壁灵芝孢子粉、CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉残渣分别进行有机溶剂回流提取三萜类成分,将提取液经减压抽滤,合并滤液,对获得的澄清滤液用旋转蒸发器于 70 °C 水浴浓缩至少于 25 mL,采用 25 mL 容量瓶用相应的提取溶剂进行定容至 25 mL 混匀,制得供试品溶液。

**1.2.3 最大吸收波长的确定。**精密量取 0.6 mL 对照品溶液于 10 mL 试管中,于 50 °C 烘箱中挥干,放冷,精密加入 0.2 mL 香草醛冰醋酸溶液(精密称量香草醛粉末 500 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用冰醋酸配制成 50 mg/mL 的香草醛冰醋酸溶液)、0.8 mL 高氯酸溶液,混匀,于 70 °C 水浴加热 15 min,取出,冰浴 5 min,精密加入乙酸乙酯 4 mL,混匀,制得待测标准品溶液;并用相应试剂制备空白溶液,作为参比溶液,利用紫外全波长扫描仪于 200~800 nm 进行全波长扫描,绘制吸光度-波长曲线,确定最大吸收波长。

**1.2.4 方法学考察。**

**1.2.4.1 线性关系考察。**分别精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 试管中,自挥干起,按“1.2.3”中同法操作,于最大吸收波长处测定吸光度,绘制吸光度( $y$ )与浓度( $x$ )曲线,计算线性回归方程。

**1.2.4.2 精密度。**精密量取对照品溶液 0.6 mL,于 10 mL 试管中,自挥干起,按“1.2.3”中同法操作,于最大吸收波长处测定吸光度,重复测定 6 次,计算 RSD。

**1.2.4.3 重复性。**精密量取 100  $\mu$ L CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉的供试品溶液、25  $\mu$ L 破壁灵芝孢子粉的供试品溶液,各 6 份于 10 mL 试管中,自挥干起,按“1.2.3”中同法操作,于最大吸收波长处测定吸光度,计算 RSD。

**1.2.4.4 稳定性。**精密量取 100  $\mu$ L CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉的供试品溶液、25  $\mu$ L 破壁灵芝孢子粉的供试品溶液于 10 mL 试管中,自挥干起,按“1.2.3”中同法操作,于最大吸收波长处测定吸光度,每隔 10 min 测定一次吸光度,测定 1 h,自第 2 小时起,每隔 1 h 测定一次吸光度,计算 RSD。

**1.2.4.5 加样回收率。**分别精确吸取已知三萜含量的 CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉供试品溶液 50  $\mu$ L 于 9 支 10 mL 试管中,分成 3 份,分别加入 1:0.8、1:1.0、1:1.2 对照品溶液,自挥干起,按“1.2.3”中同法操作,于最大吸收波长处测定吸光度,计算回收率和 RSD。

分别精确吸取破壁灵芝孢子粉供试品溶液 5  $\mu$ L 于 9 支 10 mL 试管中,分成 3 份,按上述方法加入对照品溶液,并同法操作。

**1.2.5 灵芝三萜含量测定。**精密量取 100  $\mu$ L CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉的供试品溶液、25  $\mu$ L 破壁灵芝孢子粉的供试品溶液于 10 mL 试管中,自挥干起,按“1.2.3”中同法操作,于最大吸收波长处测定吸光度,根据线性回归方程,计算灵芝三萜的含量。

**1.3 正交试验设计** 该试验主要采用有机溶剂回流提取,考察提取溶剂(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)、提取次数(E)5个因素对 CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉和破壁灵芝孢子粉中三萜类成分提取率的影响,设计 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验,见表 1。

表 1 正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor				
	A(提取 溶剂 (Extraction solvent))	B(料 液比 Solid- liquid ratio)	C(提 取时 间 Extraction time h)	D(提 取 温 度 Extraction temperature °C)	E(提 取 次 数 Extraction times)
1	75%乙醇	1:20	1.0	50	1
2	85%乙醇	1:30	1.5	60	2
3	无水乙醇	1:40	2.0	70	3
4	无水甲醇	1:50	3.0	80	4

**1.4 验证试验** 对正交试验结果进行分析,获得最佳试验方案,在最佳试验方案条件下提取破壁灵芝孢子粉、CO<sub>2</sub>超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉中的三萜类成分,并测定三萜类成分含量。

## 2 结果与分析

**2.1 最大吸收波长** 从灵芝三萜类成分在 200~800 nm 的

吸光度-波长曲线(图1)可以看出,灵芝三萜类成分在波长为548 nm处获得最大吸光度,因此选择548 nm作为最大吸收波长进行后续试验。

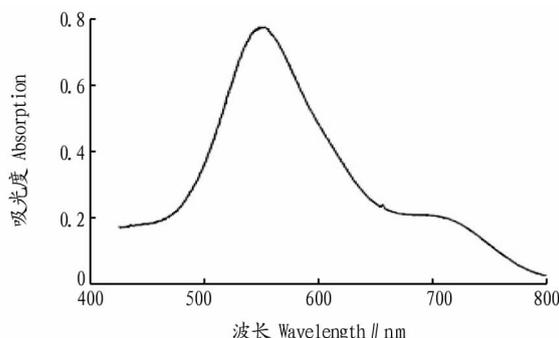


图1 齐墩果酸标准溶液吸光度随波长变化曲线

Fig. 1 Absorption curve of oleanolic acid standard solution with wavelength

## 2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察。按“1.2.4.1”操作,计算得出线性回

归方程  $y = 2.2902x - 0.0866$ ,  $R^2 = 0.9991$  ( $n = 6$ ), 结果表明三萜浓度在  $8.00 \sim 41.00 \mu\text{g/mL}$  稳定。

2.2.2 精密度。按“1.2.4.2”操作,计算出吸光度的RSD为0.077% ( $n = 6$ ),表明仪器具有较好的精密度。

2.2.3 重复性。按“1.2.4.3”操作,计算出  $\text{CO}_2$  超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉、破壁灵芝孢子粉三萜提取液吸光度的RSD分别为0.253%、1.254% ( $n = 6$ ),表明该方法重复性较好。

2.2.4 稳定性。按“1.2.4.4”操作,计算出  $\text{CO}_2$  超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉的三萜提取液2 h内吸光度的RSD为1.650%,表明在2 h内具有较好的稳定性;破壁灵芝孢子粉三萜提取液在1 h内吸光度的RSD为1.157%,表明该方法在1 h内具有较好的稳定性。

2.2.5 加样回收率。按“1.2.4.5”操作,破壁灵芝孢子粉和  $\text{CO}_2$  超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉三萜提取液加样回收率结果见表2、3,表明该方法准确、可靠,适用于三萜类成分的测定。

表2  $\text{CO}_2$  超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉加样回收率 ( $n = 3$ )

Table 2 Sampling recovery rate of wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder after  $\text{CO}_2$  supercritical extraction of *Ganoderma lucidum* spore oil

倍数 Multiple	样品量 Sample volume// $\mu\text{g}$	加入标准品的量 Amount added to standard product// $\mu\text{g}$	实测值 Measured value// $\mu\text{g}$	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
0.8	74.70	59.76	146.28	119.78	115.88	4.45
	74.70	59.76	145.12	117.83		
	74.70	59.76	140.45	110.03		
1.0	74.70	74.70	163.90	119.41	113.17	4.79
	74.70	74.70	156.65	109.70		
	74.70	74.70	157.16	110.39		
1.2	74.70	89.64	174.52	111.36	110.68	0.55
	74.70	89.64	173.48	110.20		
	74.70	89.64	173.74	110.49		

表3 破壁灵芝孢子粉加样回收率 ( $n = 3$ )

Table 3 Sampling recovery rate of spore powder of broken *Ganoderma lucidum*

倍数 Multiple	样品量 Sample volume// $\mu\text{g}$	加入标准品的量 Amount added to standard product// $\mu\text{g}$	实测值 Measured value// $\mu\text{g}$	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
0.8	71.15	56.92	129.31	102.18	102.33	0.68
	71.15	56.92	129.05	101.73		
	71.15	56.92	129.83	103.09		
1.0	71.15	71.15	144.34	102.87	101.66	1.37
	71.15	71.15	142.40	100.14		
	71.15	71.15	143.69	101.96		
1.2	71.15	85.38	166.75	111.97	111.82	0.76
	71.15	85.38	167.27	112.58		
	71.15	85.38	165.84	110.91		

2.3 正交试验 由表4可知,对于破壁灵芝孢子粉来说,各提取因素对其三萜提取率的影响从大到小依次为A、D、B、E、C,破壁孢子粉三萜最佳提取工艺为  $A_3B_1C_2D_1E_2$ ,即无水乙醇为提取溶剂,料液比为1:20(g:mL),提取时间1.5 h,提

取温度  $50^\circ\text{C}$ ,提取次数2次。对于  $\text{CO}_2$  超临界萃取灵芝孢子油后的破壁孢子粉来说,各因素对三萜提取率的影响从大到小依次为B、E、A、D、C,  $\text{CO}_2$  超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉三萜最佳提取工艺为  $A_3B_2C_3D_3E_4$ ,即无水

乙醇为提取溶剂,料液比为 1:30,提取时间 2.0 h,提取温度 70 ℃,提取次数 4 次。

为分析不同影响因素对两类破壁灵芝孢子粉中三萜类成分提取率影响的显著性,对正交试验结果进行方差分析,结果发现,提取溶剂、料液比、提取时间、提取温度、提取次数对灵芝三萜类成分提取率均具有显著影响( $P < 0.05$ )。对于破壁灵芝孢子粉,提取溶剂对其提取率影响较大;对于 CO<sub>2</sub>

超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉,料液比是影响其提取率的主要因素。

**2.4 验证试验** 对经正交试验得到的最佳提取工艺进行验证,得 CO<sub>2</sub> 超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉三萜提取率为 1.69%,破壁灵芝孢子粉三萜提取率为 12.29%,故证明所确定的 2 种提取工艺为最佳提取工艺。

表 4 正交试验方案及结果

Table 4 Orthogonal test scheme and results

试验序号 Test No.	A	B	C	D	E	三萜提取率 Triterpene extraction rate//%	
						F	G
1	1	1	1	1	1	0.808	5.169
2	1	2	2	2	2	1.409	5.858
3	1	3	3	3	3	1.231	4.252
4	1	4	4	4	4	1.336	4.269
5	2	1	2	3	4	1.211	5.431
6	2	2	1	4	3	1.406	5.186
7	2	3	4	1	2	0.831	5.124
8	2	4	3	2	1	0.556	4.987
9	3	1	3	4	2	1.190	9.537
10	3	2	4	3	1	1.652	6.240
11	3	3	1	2	4	1.553	6.080
12	3	4	2	1	3	1.217	10.249
13	4	1	4	2	3	0.696	6.769
14	4	2	3	1	4	1.641	7.698
15	4	3	2	4	1	0.617	5.306
16	4	4	1	3	2	0.818	6.154
$k_{F1}$	1.196	0.976	1.146	1.124	0.908		
$k_{F2}$	1.001	1.527	1.114	1.053	1.062		
$k_{F3}$	1.403	1.058	1.155	1.228	1.137		
$k_{F4}$	0.943	0.982	1.129	1.137	1.435		
$R_F$	0.460	0.551	0.041	0.175	0.527		
$k_{G1}$	4.887	6.726	5.647	7.060	5.426		
$k_{G2}$	5.182	6.245	6.711	5.923	6.668		
$k_{G3}$	8.027	5.191	6.619	5.519	6.614		
$k_{G4}$	6.482	6.415	5.601	6.075	5.870		
$R_G$	3.140	1.535	1.110	1.541	1.242		

注:F 为 CO<sub>2</sub> 超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉三萜提取率;G 为破壁灵芝孢子粉三萜提取率

Note:F is the extraction rate of triterpenoids in broken *Ganoderma lucidum* spore powder after supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Ganoderma lucidum* spore oil;G is the extraction rate of triterpenes in broken *Ganoderma lucidum* spore powder

### 3 结论与讨论

由方法学考察结果可知,采用紫外-可见分光光度法测定灵芝孢子粉中三萜类成分的可行性良好。通过正交试验考察提取溶剂、料液比、提取温度、提取时间、提取次数对两类破壁孢子粉三萜提取率的影响,发现在一定程度下不同因素对两类破壁灵芝孢子粉提取率的影响不尽相同,对于破壁灵芝孢子粉,提取溶剂对其提取率影响较大,且其最佳提取工艺为无水乙醇作为提取溶剂,料液比为 1:20,提取时间为 1.5 h,提取温度为 50 ℃,提取次数 2 次;对于 CO<sub>2</sub> 超临界萃取灵芝孢子油后的破壁灵芝孢子粉,料液比是影响其提取率的主要因素,且最佳提取工艺为无水乙醇为提取溶剂,料液比为 1:30,提取时间为 2.0 h,提取温度为 70 ℃,提取次数 4 次。

目前多数学者多采用有机溶剂作为提取溶剂,相对于氯仿、乙酸乙酯来说不同浓度乙醇、甲醇毒性较小,价廉易得,

适用于工业化生产。回流提取具有提取量大、操作简单、适用范围广等优点,目前被广泛应用于工业化生产。设计正交试验方案,对各种因素的影响进行综合考察,进一步缩短试验时间,减少资源损耗。采用紫外-可见分光光度法进行含量测定,并进行方法学试验考察该方法的可靠性,然后根据试验中测得的吸光度计算两类孢子粉中三萜类成分的提取率,比较含量差异,并根据正交试验的结果进行数据分析,探讨各因素对结果的影响效果,综合考察得出最佳提取工艺。

### 参考文献

- [1] 杨晓青,王旭. 灵芝孢子粉最新应用研究概况[J]. 江苏中医药,2018,50(4):87-89.
- [2] ZHAO H,ZHANG Q Y,ZHAO L,et al. Spore powder of *Ganoderma lucidum* improves cancer-related fatigue in breast cancer patients undergoing endocrine therapy: A pilot clinical trial[J]. Evidence-based complementary and alternative medicine,2012,2012:1-8.

系 pH 为 5.5;反应体系固液比为 1:8。选用最佳反应条件进行 3 次平行试验,确定最佳反应条件下回收的壳下膜重量,结果如表 1 所示。由表 1 可知,在最佳反应条件下,采用木瓜蛋白酶进行壳膜分离能取得较好的效果,在蛋壳粉用量为 50 g、木瓜蛋白酶用量为蛋壳粉量的 2.5%、反应时间为 90 min、反应温度为 60 ℃、反应体系 pH 为 5.5、反应体系固液比为 1:8 的条件下回收壳下膜的平均重量为 1.65 g。

### 3 结论与讨论

研究发现,利用木瓜蛋白酶的酶解作用可使蛋壳真壳与壳下膜发生分离,其最佳反应条件如下:蛋壳粉用量为 50 g;木瓜蛋白酶用量占蛋壳粉量的 2.5%;反应时间为 90 min;反应温度为 60 ℃;反应体系 pH 为 5.5;反应体系固液比为 1:8。在此条件下回收壳下膜的平均重量为 1.65 g。经过壳膜分离可以获取更加纯净的蛋壳真壳和壳下膜,为其后续的

转化利用奠定了基础。

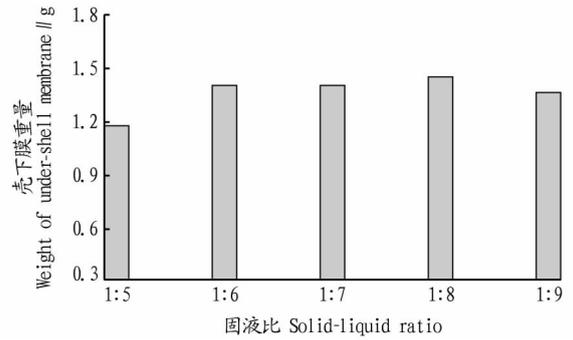


图 5 反应体系固液比对回收壳下膜重量的影响

Fig. 5 The effects of solid-liquid ratio of the reaction system on the weight of recovered under-shell membrane

表 1 最佳反应条件下回收壳下膜的重量

Table 1 The weight of the under-shell membrane recovered under the optimal reaction conditions

试验号 Test number	蛋壳粉用量 Eggshell powder dosage/g	木瓜蛋白酶用量 Papain dosage %	反应时间 Reaction time min	反应温度 Reaction temperature ℃	pH	固液比 Solid-liquid ratio	回收壳下膜重量 Weight of the under- shell membrane recovered//g
1	50	2.5	90	60	5.5	1:8	1.67
2	50	2.5	90	60	5.5	1:8	1.64
3	50	2.5	90	60	5.5	1:8	1.65

### 参考文献

- [1] 李逢振. 蛋壳壳膜分离技术的研究[J]. 农产品加工, 2020(4): 65-67.
- [2] 刘敏, 郭宇, 武月, 殷慧敏, 等. 食品补强剂醋酸钙的制备工艺研究[J]. 天津化工, 2017, 31(4): 19-22.
- [3] 李晓云. 基于鸡蛋壳膜的三种生物敷料的制备及其伤口愈合功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [4] 朱文婷, 吴士筠, 杨惠, 等. 酶法提取鸡蛋壳膜中透明质酸的工艺优化[J]. 食品科技, 2016, 41(1): 204-209.
- [5] 刘涛, 张铁鹏, 栾欣悦, 等. 响应面法优化蛋壳膜硫酸软骨素提取工艺[J]. 包装工程, 2019, 40(17): 48-55.
- [6] TSAI W T, YANG J M, LAI C W, et al. Characterization and adsorption properties of egg shells and eggshell membrane [J]. Bioresour Technol, 2006, 97(3): 488-493.
- [7] ZHANG G M, LIU D S, SHUANG S M, et al. A homocystein biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform [J]. Sens Actuators B: Chem, 2006, 114(2): 936-942.
- [8] DONG Q, SU H L, ZHANG D, et al. Biotemplate-directed assembly of porous SnO<sub>2</sub> nanoparticler into tubular hierarchical structures [J]. Scripta materialia, 2006, 55(9): 799-802.
- [9] INO T, HATTORI M, YOSHIDA T, et al. Improved physical and biochemical features of a collagen membrane by conjugation with soluble eggshell membrane protein [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(4): 865-873.
- [10] 赵敏, 陈访访, 潘津泳, 等. 蛋壳膜中胶原蛋白的提取分离[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(4): 17-19.
- [11] 杨德玉, 李珍, 高新, 等. 酶法提取蛋壳膜中的角蛋白[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 240-242.
- [12] 大鼠降血脂作用的实验研究[J]. 实用预防医学, 2006, 13(6): 1452-1453.
- [13] 姜余梅, 杨艳, 陈晓珊, 等. 灵芝孢子和抗性淀粉对糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的协同干预[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 288-291.
- [14] 张荣标, 陈润, 陈冠敏, 等. 破壁灵芝孢子粉对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 预防医学论坛, 2013, 19(12): 936-938, 954.
- [15] 彭亮, 赵鹏, 李彬, 等. 破壁灵芝孢子粉对小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 应用预防医学, 2011, 17(4): 241-243.
- [16] 崔月花, 章克昌. 灵芝三萜皂苷(GCTL1)的体外抗氧化作用[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 49-53.
- [17] KUBOTA T, ASAKA Y, MIURA I, et al. Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. [J]. Helvetica chimica acta, 1982, 65(2): 611-619.
- [18] XIA Q, ZHANG H Z, SUN X F, et al. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp. [J]. Molecules, 2014, 19(11): 17478-17535.
- [19] 刘维, 虎斌真, 朱莉, 等. 灵芝三萜的研究与应用进展[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 309-315.
- [20] 卢锦熙, 曾荣华, 王腾华, 等. 灵芝孢子油化学成分研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(4): 553-557.
- [21] 黑银秀, 余山红, 刘君, 等. 应用正交设计优化冰菜扦插方法[J]. 中国蔬菜, 2019(4): 51-54.

(上接第 185 页)

- [3] GAO P, HIRANO T, CHEN Z Q, et al. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom) [J]. Fitoterapia, 2012, 83(3): 490-499.
- [4] NA K, LI K, SANG T T, et al. Anticarcinogenic effects of water extract of sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. International journal of oncology, 2017, 50(5): 1541-1554.
- [5] ZHOU Y, QU Z Q, ZENG Y S, et al. Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus [J]. Experimental and toxicologic pathology, 2011, 64(7/8): 673-680.
- [6] WANG F F, WANG S Q, SHAO S, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* spore powder on expression of N-cadherin and neurotrophin-4 in the brains of epileptic rats [J]. Chinese journal of pathophysiology, 2011, 27(5): 1003-1007.
- [7] 赵燕平, 余亚平, 胡洁. 破壁灵芝孢子粉对刀豆蛋白 A 诱导免疫损伤小鼠外周血 CD4+ 和 CD8+ 细胞因子水平的影响及护肝作用[J]. 浙江中医杂志, 2017, 52(12): 877-878.
- [8] 杨丽丽, 邓志钦, 黄维渊, 等. 灵芝孢子粉对抗亚急性酒精性肝损伤的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 513-514.
- [9] 王亚东, 王海玉, 张桂霞, 等. 三七和灵芝孢子粉提取物对高血脂模型