

秦巴山区猪苓多糖的提取及其脂质体生产工艺的优化

贾少杰, 陈文强, 解修超*, 邓百万, 彭浩, 王颖

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 汉中 723001)

摘要: 优化秦巴山区猪苓多糖的提取及其脂质体的生产工艺, 为其工业化生产提供理论依据。采用响应面分析和 Design-Expert 8.0.6 软件相结合的方法, 确定猪苓多糖提取最佳工艺, 并对多糖进行抑菌试验; 采用逆向蒸发法制备猪苓多糖脂质体, 并用 $L_9(3^3)$ 正交试验对脂质体制备工艺进行优化; 采用硫代巴比妥酸法, 研究维生素 E 和 C 对脂质体抗氧化的影响。猪苓多糖提取的最佳工艺为: 浸提次数 3 次、液料比 143 : 15 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)、浸提时间 1.3 h; 在此条件下, 多糖提取率达 5.19%。猪苓多糖脂质体制备的最佳工艺为: 大豆卵磷脂、胆固醇和聚乙二醇 3350 的摩尔比 7.00 : 2.00 : 0.40, 超声时间 5.50 min, 猪苓多糖添加量为 2.00 mL, 猪苓多糖脂质体包封率为 98.87%, 不同剂量的维生素 E 和 C 均可提高脂质体的抗氧化性。

关键词: 猪苓; 多糖; 响应面法; 脂质体; 生产工艺

中图分类号: Q949.95

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0715-08

Extraction of polysaccharide from *Polyporus umbellatus* and its liposomes production process optimization

JIA Shaojie, CHEN Wenqiang, XIE Xiuchao, DENG Baiwan, PENG Hao, WANG Ying

(1. School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001;

2. Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Hanzhong 723001)

Abstract: The purpose of this study was to optimize the extraction of *Polyporus umbellatus* polysaccharide in Qinba Mountains and the production process of its liposomes to provide a theoretical basis for industrialized production. Response surface analysis and Design-Expert 8.0.6 software were used to determine the optimum extraction process of *Polyporus umbellatus* polysaccharide, which antibacterial activity was further tested. *Polyporus umbellatus* liposomes were prepared by reverse evaporation method and optimized by $L_9(3^3)$ orthogonal test; the thiobarbituric acid method was used to study the effect of vitamin E and C on liposome anti-oxidation. The optimal extraction conditions were achieved and listed as follows: extraction for 3 times, liquid-to-solid ratio of 143 : 15 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$), extraction time of 1.3 h. Under these conditions, polysaccharide extraction rate was 5.19%. The process for the preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharide liposome was optimized as: soy lecithin, cholesterol and PEG 3350 at the molar ratio of 7.00 : 2.00 : 0.40; ultrasonic time, 5.50 min; the amount of polyporus polysaccharide added, 2.00 mL, and the obtained *Polyporus umbellatus* liposome encapsulation efficiency was 98.87%; different doses of vitamin E and C could improve the liposome anti-oxidation.

Key words: *Polyporus umbellatus*; polysaccharide; response surface method; liposomes; production process

猪苓 (*Polyporus umbellatus*) 又名猪灵芝, 是多孔菌科 (Polyporaceae) 珍稀的药用真菌^[1]。主要分布于陕西、云南和四川等地, 以云南的产量最大, 陕西产的质量最佳^[2-3]。其地下菌核黑色、形状多样,

含粗蛋白、可溶性糖分等, 同时还含游离及结合型生物素、麦角甾醇等成分^[4]。多糖是猪苓的主要生物活性成分之一, 现代药理证明, 猪苓多糖可提高机体的细胞免疫功能, 临床用于肺癌、肝癌、膀胱

收稿日期: 2017-11-24

基金项目: 陕西省教育厅重点项目 (13JS021)、陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2016HBGC-07) 和秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心自然科学研究项目 (QBXT-Z(P)-15-2, QBXT-17-12) 共同资助。

作者简介: 贾少杰, 硕士研究生。E-mail: 573630664@qq.com

* 通信作者: 解修超, 博士, 副教授。E-mail: xiexiuchao@126.com

癌^[5-10]等。近年来,随着猪苓多糖在保健和药理方面应用的增加,如何低成本、大规模工业化提取多糖成为关键。水提法成本低、易操作且对设备要求低,更适用规模生产。脂质体是指将药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型囊泡,是降低药物毒性的常用方法之一,可作为一种理想的药物载体^[11]。经聚乙二醇(PEG)修饰后的脂质体与吞噬细胞的亲和性降低,从而延长了多糖在血液中的滞留时间,增强靶向性,提高治疗肿瘤的疗效^[12-13]。猪苓多糖脂质体的制备可有效增强其药理作用,应用前景广泛。

目前,有关秦巴山区猪苓多糖脂质体生产工艺的研究尚鲜见报道。本研究对秦巴山区猪苓子实体多糖的水提法工艺进行优化,并对其多糖脂质体的逆向蒸发法制备工艺进行优化,旨在为猪苓多糖及其脂质体的工业化生产及开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)和猪苓菌核由陕西省食药菌工程技术研究中心提供。

1.1.2 主要试剂 葡萄糖、苯酚、98.0%浓硫酸、无水乙醇、氯仿、维生素E、维生素C、1%硫代巴比妥酸(TBA)、20%三氯乙酸(TCA)、盐酸等均为分析纯,大豆卵磷脂、PEG3350、胆固醇、葡聚

糖凝胶G-50、PBS缓冲液,试验用水为纯化水。

1.1.3 主要仪器与设备 YQ-PJ-5型盘式粉碎机为轻工业部西安轻机所光电公司产品, DGX-9143BC型电热恒温鼓风干燥箱为上海福玛实验设备有限公司产品, DL-5000B型低速冷冻台式离心机为上海安亭离心机有限公司产品, UV1240型紫外可见分光光度计为日本岛津公司产品, YP2002N型电子天平为上海菁海仪器有限公司产品, pH SJ-4型精密酸度计为杭州雄发仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 猪苓多糖浸提方法 将除杂后的猪苓菌核于60℃烘干,粉碎(40目过筛2次)→称量猪苓(粉末)15.00g→加水煎煮后冷却至室温→加10%Ca(OH)₂溶液调节pH至12→放置过夜,抽滤上清液→加3 mol·L⁻¹ H₂SO₄调节pH至5→浓缩至200.00 mL→趁热抽滤→4℃冰箱过夜→抽滤。

1.2.2 猪苓多糖测定方法 (1)标准曲线的制备。以葡萄糖为标准品制作标准曲线,得回归方程为: $Y=3.3780X-0.1625$, $R^2=0.9808$ (Y :吸光度, X :葡萄糖浓度 mg·mL⁻¹)

(2)多糖含量的测定。苯酚-硫酸法^[14]多糖提取率及浸提液中的多糖含量计算方法如下:

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{提取液中多糖含量}}{\text{猪苓粉末质量}} \times 100\%$$

$$\text{提取液中多糖含量} = \frac{(A+0.1625) \times 11 \times 100}{3.3780}$$

公式中 A 为吸光度。

表 1 多糖提取工艺响应面优化的试验设计

Table 1 Experimental design of response surface optimization of polysaccharide extraction process

水平 Level	因素 Factor		
	浸提次数/次 Leaching times	液料比 /mL·g ⁻¹ Ratio of liquid to solid	浸提时间/h Leaching time
	X_1	X_2	X_3
-1	2	120.00 : 15.00	1.00
0	3	140.00 : 15.00	1.25
1	4	160.00 : 15.00	1.50

表 2 脂质体制备工艺优化的正交试验设计

Table 2 Orthogonal experimental design of liposome preparation process optimization

水平 Level	因素 Factor		
	大豆卵磷脂:胆固醇:PEG3350 soy lecithin: cholesterol: PEG3350	猪苓多糖添加量/mL <i>Polyporus umbellatus</i> polysaccharide addition	超声时间/min Ultrasound time
	A	B	C
1	6.75 : 2.50:0.30	1.50	4.50
2	7.00 : 2.00:0.40	1.75	5.00
3	7.25 : 1.50:0.50	2.00	5.50

1.2.3 猪苓多糖提取单因素试验 在固定浸提温度为 70℃, 液料比为 140:15 (mL:g), 浸提次数为 2 次的条件下, 准确称量猪苓粉末 15.00 g, 分别比较不同浸提次数 (1、2、3、4、5 次)、不同液料比 (100.00:15.00、120.00:15.00、140.00:15.00、160.00:15.00、180.00:15.00 mL:g)、不同浸提时间 (0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 h) 对猪苓多糖提取率的影响。

1.2.4 猪苓多糖提取工艺的响应面优化 在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合试验原理, 选取浸提次数 (X_1)、液料比 (X_2) 和浸提时间 (X_3) 为考察对象, 以猪苓多糖提取率 (Y) 为响应值, 采用 3 因素 3 水平响应面分析法确定其最佳提取工艺条件。试验因素水平编码见表 1。

1.2.5 猪苓多糖抑菌试验 分别吸取 200 μL 稀释至 $10^6 \sim 10^8$ CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 5 种菌悬液涂布于固体平板上, 用经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤的猪苓多糖母液浸湿 10 mm 无菌滤纸片, 将无菌纸片贴于平板上, 以无菌水为对照组, 设置 3 个重复, 倒置培养 24 h, 测量抑菌圈直径。

1.2.6 猪苓多糖脂质体的制备工艺 (1) 葡聚糖凝胶柱的制备^[15]。Sephadex G-50 在蒸馏水中浸泡过夜, 充分溶胀, 载入 1.00 mL 注射器中 (注射器底部填充脱脂棉以防葡聚糖凝胶泄漏)。将装有 Sephadex G-50 的注射器装入塑料试管中, 组成微柱离心组件。将微柱离心组件移至离心机中, 于 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 4.00 min, 使凝胶柱失水紧缩, 备用。

(2) 猪苓多糖脂质体的制备。逆向蒸发法^[16]大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 按摩尔比 7.50:1.00:0.60 精密称量, 装入圆底烧瓶, 加适量氯仿溶解, 再加 0.30%猪苓多糖溶液 1.50 mL, 超声处理 5.00 min, 得 W/O 乳液。W/O 乳液在 35℃恒温水浴条件下减压旋转蒸发, 除去氯仿, 得稠厚胶状物。室温条件下, 将稠厚胶状物真空干燥 4.00 h, 加入适量 PBS 缓冲液, 超声得乳白色脂质体混悬液, 即猪苓多糖脂质体。

(3) 微柱离心法操作过程。取制备的猪苓多糖脂质体 100.00 μL , 用乙醇破坏脂质体结构, 用双蒸水定容至 10.00 mL, 在 490 nm 下测量吸光度, 计算过柱前的药物质量浓度 (ρ 前)。另取制备的猪苓多糖脂质体 100.00 μL , 加至葡聚糖凝胶柱顶端, 于 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 4.00 min, 用重蒸水连续洗脱 3 次; 将洗脱液合并至 10.00 mL 量筒中, 用乙醇破坏脂质体结构并定容, 在 490 nm 下测量吸光度, 计算过柱后的药物质量浓度 (ρ 后)。

1.2.7 猪苓多糖脂质体制备单因素试验 在固定猪苓多糖溶液添加量 1.50 mL、超声时间 5.00 min 的条件下, 分别比较不同大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 的摩尔比 (7.50:1.00:0.60、7.25:1.50:0.50、7.00:2.00:0.40、6.75:2.50:0.30 及 6.50:3.00:0.20)、不同猪苓多糖溶液添加量 (1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 mL)、不同超声时间 (4.00、4.50、5.00、5.50、6.00 min) 对包封率的影响。

1.2.8 猪苓多糖脂质体制备的正交试验设计 在单因素试验基础上, 选取大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG 3350 的摩尔比 (A), 猪苓多糖添加量 (B), 超声时间 (C) 3 个因素作为影响猪苓多糖脂质体包封率的工艺条件, 设计 3 因素 3 水平的正交试验见表 2。

1.2.9 抗氧化剂对猪苓多糖脂质体的影响 在大豆磷脂中分别添加不同比例的维生素 C 和 E, 以最佳工艺制备猪苓多糖脂质体, 采用硫代巴比妥酸法, 分别在第 0、20、40、60、80 和 100 h 时, 530 nm 处测定吸光度, 研究维生素 C 和 E 对猪苓多糖脂质体的抗氧化性。

2 结果与分析

2.1 猪苓多糖提取的单因素试验结果

2.1.1 浸提次数对多糖提取率的影响 不同浸提次数对猪苓提取率的影响结果 (见图 1) 表明, 液料比 140:15 (mL:g)、浸提时间 2 h 的条件下, 随着浸提次数的增加, 多糖提取率呈现先增大后平缓的趋势。浸提次数为 1、2 和 3 次时, 多糖提取率逐渐升高, 当浸提次数为 3 次时, 多糖提取率达到最大值 4.60%, 浸提次数超过 3 次时, 多糖提取率无明显增长。因此, 猪苓多糖提取的最佳浸提次数为 3 次。

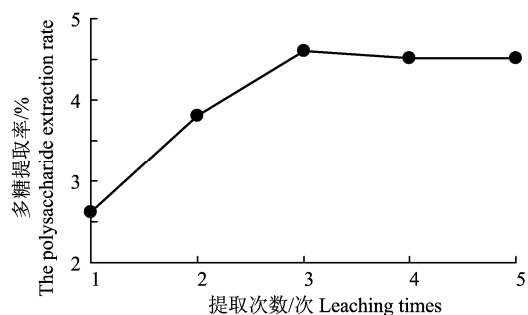


图 1 浸提次数对猪苓多糖浸提率的影响

Figure 1 The effect of leaching times on extraction rate of polysaccharide

2.1.2 液料比对多糖提取率的影响 不同液料比对猪苓提取率的影响结果 (见图 2) 表明, 在浸提时间 2 h、浸提 3 次的条件下, 随着液料比的增大,

多糖提取率呈现先增长后下降的趋势。液料比在 100.00:15.00~140.00:15.00 (mL:g) 之间时, 多糖提取率快速上升, 当液料比为 140.00:15.00 (mL:g) 时, 多糖提取率达到最大值 4.32%, 此后多糖提取率开始下降并逐渐平缓。因此, 猪苓多糖提取的最佳液料比为 140.00:15.00 (mL:g)。

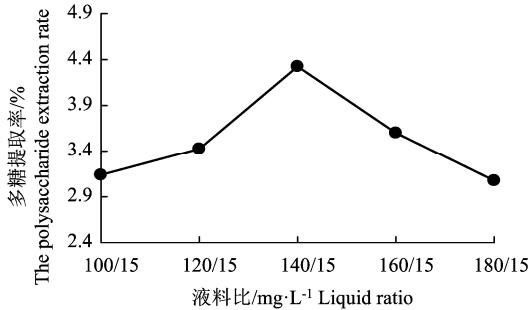


图 2 液料比对猪苓多糖提取率的影响

Figure 2 The effect of the liquid to solid on extraction rate of polysaccharide

2.1.3 浸提时间对多糖提取率的影响 不同浸提时间对猪苓提取率的影响结果 (图 3) 表明, 在液料比 140:15 (mL:g)、浸提次数 3 次的条件下, 随着浸提时间的延长, 多糖提取率呈现先增大后减小的趋势。当浸提时间为 1.25 h 时, 多糖提取率达到最大为 4.54%, 超过 1.25 h 多糖提取率开始下降。因此, 猪苓多糖提取的最佳浸提时间为 1.25 h。

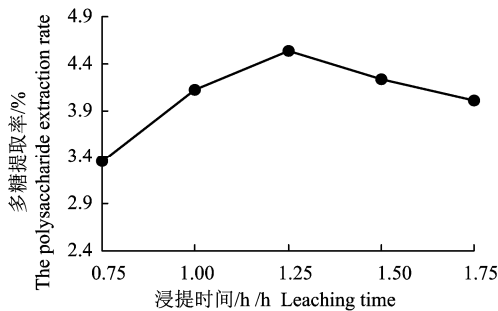


图 3 浸提时间对猪苓多糖提取率的影响

Figure 3 The effect of leaching time on extraction rate of polysaccharide

2.2 Box-Behnken 设计优化主要影响因素水平

以浸提次数、液料比、浸提时间为影响因素, 采用 3 因素 3 水平响应面分析法进行研究, 试验结果见表 3。

经 Design-Expert 8.0.6 软件对 17 个试验点的猪苓多糖浸提率进行回归统计分析, 猪苓多糖浸提率的回归方程如下:

$$Y = -16.65466 - 0.49931X_1 + 3.10578X_2 + 12.39593X_3 + 0.051852X_1X_2 + 0.62000X_1X_3 + 0.059259X_2X_3 - 0.17700$$

$X_1^2 - 0.17668X_2^2 - 5.55200X_3^2$ 。对该模型进行方差分析结果 (见表 4) 显示: X_2^2 、 X_3^2 项差异极显著; X_1X_3 、 X_1^2 项差异显著; 其他 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_2X_3 项差异不显著。该模型 $F=16.49$, $P<0.001$, 可信度水平大于 99%, 说明该模型是显著的。该模型失拟项 P 值为 $0.4580 > 0.0500$, 失拟项差异不显著, 说明试验操作可信且拟合度好, 模型具有统计学意义, 适用于猪苓多糖提取工艺的优化。从 F 值可看出这 3 个因素对多糖浸提率的影响顺序: 浸提时间 > 浸提次数 > 液料比。

表 3 部分 Box-Behnken 设计和试验结果

Table 3 Partial Box-Behnken design and test results

编号 Number	水平 Level			多糖提取率/% Polysaccharide extraction rate
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	4.85±0.12
2	1	-1	0	4.73±0.33
3	1	1	0	4.66±0.05
4	1	1	0	4.82±0.01
5	-1	0	-1	4.68±0.12
6	1	0	-1	4.56±0.22
7	-1	0	1	4.61±0.03
8	1	0	1	5.11±0.09
9	0	-1	-1	4.61±0.15
10	0	1	-1	4.51±0.18
11	0	-1	1	4.64±0.06
12	0	1	1	4.62±0.08

2.3 响应面及最佳优化条件验证

浸提次数、浸提时间和液料比 3 个因素对多糖提取率的影响结果见图 4—图 6。

图 4 结果显示, 在液料比较低条件下, 随着浸提次数的增加, 猪苓多糖产量呈现出先上升后下降的趋势; 在液料比较高条件下, 随着浸提次数的增加, 猪苓多糖产量呈缓慢上升的趋势; 在浸提次数较少条件下, 随着液料比的增大, 猪苓多糖产量呈先上升后减小的趋势; 在浸提次数较多的条件下, 随着液料比的增大, 猪苓多糖产量呈先缓慢上升再缓慢下降趋势。

图 5 结果显示, 在浸提次数较少条件下, 随着浸提时间的增加, 猪苓多糖产量呈现出先上升后下降的趋势; 在浸提次数较多条件下, 随着浸提时间的增加, 猪苓多糖产量呈先迅速上升后缓慢下降的趋势; 在浸提时间较短的条件下, 随着浸提次数的增多, 对猪苓多糖产量影响不明显; 在浸提时间较长的条件下, 随着浸提次数的增大, 猪苓多糖产量呈缓慢上升趋势。

表 4 回归分析结果

Table 4 Result of regression analysis

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值>F 值 P value>F value	显著性 Significance
Model	1.380 0	9	0.150 0	16.49	0.000 6	**
X_1	0.022 0	1	0.022 0	2.36	0.168 0	
X_2	0.006 1	1	0.006 1	0.65	0.447 0	
X_3	0.048 0	1	0.048 0	5.15	0.057 5	
X_1X_2	0.020 0	1	0.020 0	2.10	0.190 4	
X_1X_3	0.096 0	1	0.096 0	10.31	0.014 9	*
X_2X_3	0.001 6	1	0.001 6	0.17	0.691 1	
X_1^2	0.130 0	1	0.130 0	14.15	0.007 1	*
X_2^2	0.440 0	1	0.440 0	46.82	0.000 2	**
X_3^2	0.510 0	1	0.510 0	54.37	0.000 2	**
残差 Residual	0.065 0	7	0.009 0			
失拟项 Lack of fit	0.029 0	3	0.100 0	1.06	0.458 0	
纯误差 Pure error	0.036 0	4	0.009 0			
总离差 Total deviation	1.450 0	16				

$R^2=0.989 1$ $R^2_{Adj}=0.977 0$

注: “**”差异极显著 ($P<0.001$); “*”差异显著 ($P<0.05$)。

Note: “**” means extremely significance of difference ($P<0.001$); “*” means significant difference ($P<0.05$).

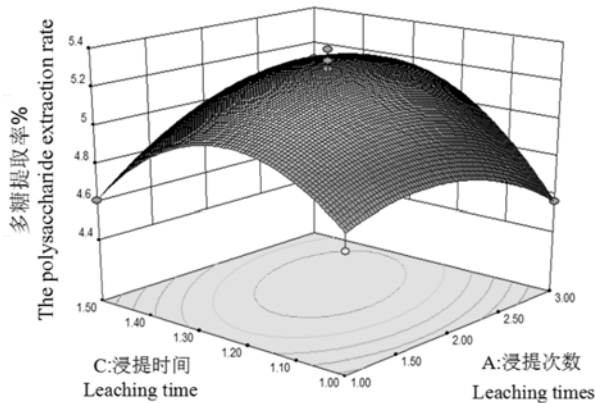


图 4 $Y=f(X_1, X_2)$ 响应曲面

Figure 4 Response surface $Y=f(X_1, X_2)$

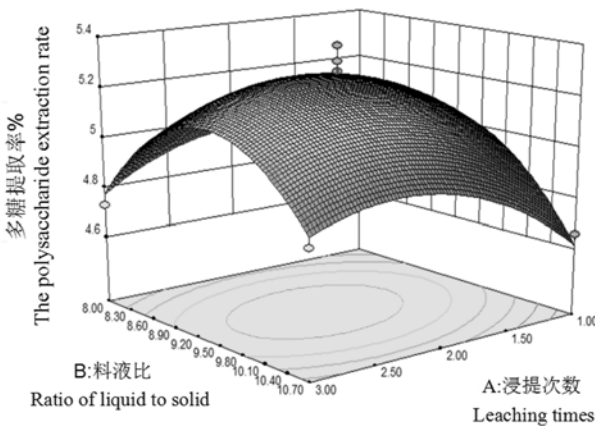


图 5 $Y=f(X_1, X_3)$ 响应曲面

Figure 5 Response surface $Y=f(X_1, X_3)$

后迅速下降的趋势; 在液料比较大的条件下, 随着浸提时间的增加, 猪苓多糖产量呈先迅速上升后缓慢下降的趋势; 在浸提时间较短的条件下, 随着液料比的增加, 猪苓多糖产量呈先上升后下降的趋势; 在浸提时间较长的条件下, 随着液料比的增加, 猪苓多糖产量呈先上升后下降的趋势。

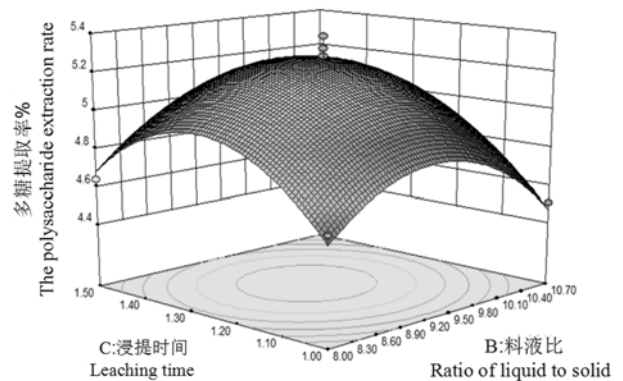


图 6 $Y=f(X_2, X_3)$ 响应曲面

Figure 6 Response surface $Y=f(X_2, X_3)$

通过 Design-Expert 8.0.6 软件各因素的最优值为浸提次数 3 次, 浸提时间 1.3 h, 液料比为 143.00:15.00 (mL:g), 此时猪苓多糖提取率的预测值为 5.28%。为了检验该提取工艺的可靠性, 采用上述最优提取条件进行验证性试验, 得到猪苓多糖提取率为 5.19%。猪苓多糖提取率的验证值与最大预测值的相对误差为 1.7%。因此, 利用 Box-Behnken 响应面法优化猪苓多糖提取工艺是高效可行的。

图 6 结果显示, 在液料比较小的条件下, 随着浸提时间的增加, 猪苓多糖产量呈现出先迅速上升

2.4 猪苓多糖抑菌试验结果

猪苓多糖对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的抑菌试验结果见表5。

表5结果表明，猪苓多糖对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌均有一定的抑制作用，其中对金黄色葡萄球菌、白

色念珠菌及沙门氏菌的抑制作用较弱，抑制率分别为： $(17.4 \pm 2.20)\%$ 和 $(25.9 \pm 0.94)\%$ ；对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制率较强，抑制率分别为： $(45.7 \pm 0.41)\%$ 和 $(50.5 \pm 0.67)\%$ 。抑菌强弱顺序为：枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>沙门氏菌>白色念珠菌>金黄色葡萄球菌。

表5 猪苓多糖抑菌活性
Table 5 Antibacterial activity of *Polyporus polysaccharide*

供试菌株 Tested strains	抑菌直径/mm Bacteriostasis diameter	对照直径/mm Blank control	抑菌率/% Inhibition rate
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	18.4±0.13	10.0	45.7±0.41
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	12.1±0.34	10.0	17.4±2.20
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	15.1±0.39	10.0	33.8±1.64
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	20.2±0.28	10.0	50.5±0.67
白色念珠菌 <i>Monilia albican</i>	13.5±0.17	10.0	25.9±0.94

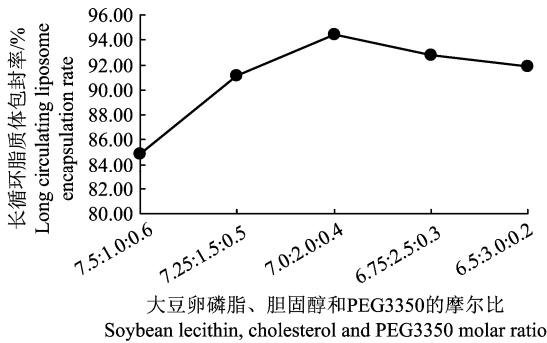


图7 大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 的摩尔比对包封率的影响

Figure 7 Effect of molar ratio of soybean lecithin, cholesterol and PEG 3350 to entrapment rate

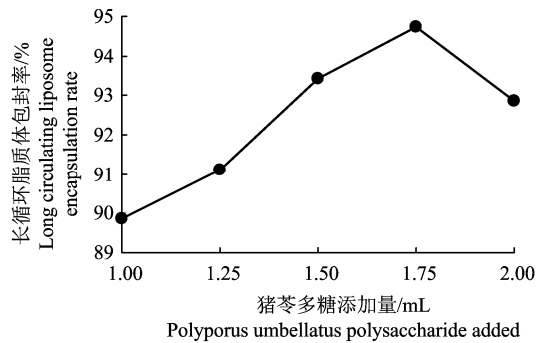


图8 多糖添加量对包封率的影响

Figure 8 Polysaccharide impact on the amount of encapsulation efficiency

2.5 脂质体制备的单因素试验结果

2.5.1 (大豆卵磷脂:胆固醇:PEG 3350) 摩尔比试验 大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 不同摩尔比对包封率的影响结果见图7。

图7结果表明，在猪苓多糖溶液添加量 1.50

mL，超声时间 5.00 min 的条件下，随着摩尔比的增大呈现先后急剧上升又下降的趋势，7.50:1.00:0.60~7.00:2.00:0.40 时急剧上升，当摩尔比为 7.00:2.00:0.40 时，包封率达到最大值 94.42%，之后包封率开始下降。因此，脂质体制备最佳大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG 3350 的摩尔比为 7.00:2.00:0.40。

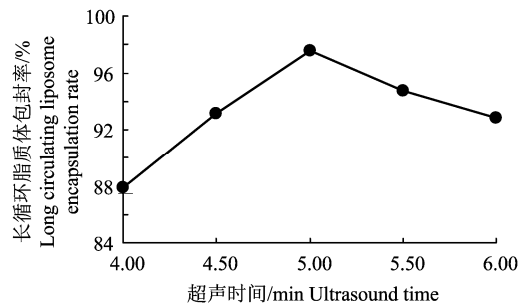


图9 超声时间对包封率的影响

Figure 9 Effect of ultrasonic time on encapsulation efficiency

2.5.2 猪苓多糖溶液添加量试验 不同猪苓多糖溶液添加量对包封率的影响结果见图8。

图8结果表明，在大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 的摩尔比为 7.00:2.00:0.40，超声时间 5.00 min 的条件下，猪苓多糖添加量对包封率的影响较大，随着猪苓多糖溶液添加量的增加，包封率呈现先上升后下降的趋势，猪苓多糖添加量为 1~1.75 mL 时，包封率逐渐升高，当猪苓多糖添加量为 1.75 mL 时，包封率达到最大值 94.72%，猪苓多糖添加量超过 1.75 mL 时，包封率开始降低。因此，脂质体制备的最佳猪苓多糖的添加量为 1.75 mL。

2.5.3 超声时间试验 不同超声时间对包封率的影

响结果见图 9。

图 9 结果表明, 在大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 的摩尔比为 7.00:2.00:0.40, 猪苓多糖添加量 1.75 mL 的条件下, 随着超声时间的延长, 包封率呈现先上升后下降的趋势, 超声时间在 4.0~5.0

min 时, 包封率逐渐升高, 当超声时间为 5.0 min 时, 包封率达到最大值 97.57%, 当超声时间超过 5.0 min 时, 包封率开始下降。因此, 脂质体制备的最佳超声时间为 5.0 min。

表 6 脂质体制备工艺优化的正交试验

Table 6 Orthogonal experiment for liposome preparation optimization

编号 Number	因素 Factor			包封率/% Encapsulation efficiency D
	大豆卵磷脂:胆固醇:PEG3350 Soy lecithin: cholesterol:PEG3350	猪苓多糖添加量/mL <i>Polyporus umbellatus</i> polysaccharide addition	超声时间/min Ultrasonic time	
	A	B	C	
1	1	1	1	89.45±0.01
2	1	2	2	90.12±0.09
3	1	3	3	96.34±0.12
4	2	1	3	94.62±0.04
5	2	2	1	98.15±0.21
6	2	3	2	97.69±0.07
7	3	1	2	95.11±0.13
8	3	2	3	92.88±0.11
9	3	3	1	94.72±0.05
K_1	275.91	279.18	280.02	
K_2	290.46	281.15	282.92	
K_3	282.71	288.75	283.84	
R	14.55	9.57	3.82	

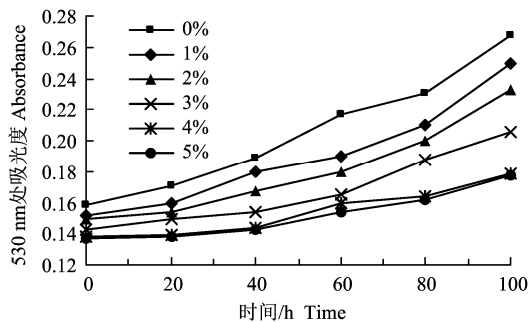


图 10 维生素 E 对猪苓多糖脂质体的抗氧化影响

Figure 10 Antioxidant effects of vitamin E on *Polyporus umbellatus* liposomes

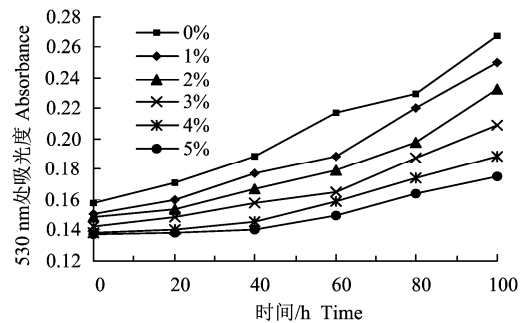


图 11 维生素 C 对猪苓多糖脂质体的抗氧化影响

Figure 11 Antioxidant effects of vitamin C on *Polyporus umbellatus* liposomes

2.6 脂质体制备工艺优化的正交试验

采用 3 因素 3 水平正交试验, 研究猪苓多糖脂质体制备的最佳工艺参数。试验结果见表 6。

表 6 结果表明, 大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 摩尔比在 2 水平, 猪苓多糖添加量在 3 水平, 超声时间在 3 水平时, 猪苓多糖脂质体包封率最高, 包封率为 98.87%。因此, 各因子的最佳水平组合为 $A_2B_3C_3$ 。极差结果分析表明: 各因子对猪苓多糖脂质体包封率影响的大小顺序为 $A > B > C$ 。所以猪苓多糖脂质体制备的最佳工艺为: 大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 的摩尔比为 7.00:2.00:0.40, 猪苓多糖添加量 2.00 mL, 超声时间为 5.50 min。

2.7 抗氧化剂对猪苓多糖脂质体的影响

采用硫代巴比妥酸法, 抗氧化剂维生素 E 和 C 对猪苓多糖脂质体的影响结果见图 10 和图 11。

图 10 和图 11 结果表明, 在 100 h 内, 添加不同剂量的 VE 和 VC 均对猪苓多糖脂质体有抗氧化的作用。随着时间的增加, 脂质体吸光度逐渐增加, 添加不同剂量的 VE 后, 有效抑制脂质体吸光度的上升, 添加量越高, 抑制效果越明显。当添加量为 4% 和 5% 时, 抑制效果没有明显变化, 说明 VE 对脂质体的最佳抗氧化量为 4%。添加不同剂量的 VC, 抑制了脂质体吸光度的上升, 添加量越高, 抑制效果越好。说明 VE 和 VC 可提高脂质体抗氧化性。

3 结论

本研究对秦巴山区猪苓多糖的提取及其脂质体生产工艺进行了优化。通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面分析法得到猪苓多糖最佳提取工艺条件是浸提次数 3 次, 浸提时间 1.3 h、液料比为 143.00:15.00 (mL:g)。在此工艺条件下, 得到猪苓多糖提取率为 5.19%。通过单因素和正交试验得到猪苓多糖脂质体制备的最佳工艺是大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG3350 的摩尔比 7.00:2.00:0.40, 猪苓多糖添加量 2.00 mL, 超声时间为 5.00 min。在此工艺条件下, 得到猪苓多糖脂质体的包封率为 98.87%。

近年来, 对猪苓的有效成分以及药用价值研究较多, 并取得很大进展^[17-18]。张元等^[19]利用复合酶解法正交优化猪苓多糖的浸提工艺, 浸提率为 4.31%。苏德龙等^[20]利用正交试验法研究猪苓多糖浸提工艺, 浸提率为 2.05%。孙纓等^[21]采用微波辅助优化猪苓多糖提取工艺, 浸提率为 3.66%。与上述研究相比, 本研究采用水提法结合 Box-Behnken 响应面法优化得到秦巴山区猪苓多糖提取工艺, 多糖提取率显著高于现有文献报道; 且提取工艺简单、效率高、稳定性强、参数准确可靠, 为其工业化生产提供一定的技术支持。抑菌试验结果表明, 猪苓多糖对 5 种致病菌均有抑制作用。

PEG 修饰的脂质体的应用成为提高药物疗效及降低药物毒副作用的有效手段, 脂质体可以延长脂质体的半衰期和提高它在血液循环中的稳定性、改变脂质体的生物学分布, 并具有靶向性^[22]。目前, 有关猪苓多糖脂质体制备的研究报道甚少。相比于王凯平等^[23]的研究结果, 本研究的包封率高出 78.79%。研究表明, 脂质体在中性条件下的稳定性最好^[24]。故本研究选用 pH 为 7.0 的 PBS 缓冲液, 采用单因素和正交试验优化猪苓多糖脂质体制备工艺, 所得脂质体的包封率高, 重现性好; 此外, 对其抗氧化研究表明, 维生素 E 和 C 均可提高脂质体的抗氧化性, 可为其工业化生产提供技术参考。

参考文献:

- [1] 黄年来, 林志彬, 陈国良, 等. 中国食药菌学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010: 1776-1791.
- [2] 李雯瑞, 梁宗锁, 陈德育. 猪苓生物学特性的研究进展[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(6): 60-65.
- [3] 徐硕, 邝咏梅, 姜文清, 等. 猪苓的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(7): 746-751.
- [4] 李萍, 梁宗锁, 陈德育, 等. 猪苓菌丝菌核的显微结构及其多糖含量研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学

学版), 2007, 35(6): 218-222.

- [5] TAN X L, GUO L, WANG G H. Polyporus umbellatus-inhibited tumor cell proliferation and promoted tumor cell apoptosis by down-regulating AKT in breast cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 526-535.
- [6] 沈耿, 徐谦, 曾星, 等. 猪苓多糖通过 HuR 调节 Cyclin D1 表达抑制 A549 细胞增殖[J]. 中草药, 2012, 47(6): 944-948.
- [7] ZHANG G W, ZENG X, LI C X, et al. Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by aqueous extract of sclerotia of *Polyporus umbellatus* fries and polyporus polysaccharide [J]. Am J Chinese Med, 2011, 39 (1): 135 -144.
- [8] ZHANG G W, QIN G F, HAN B, et al. Efficacy of Zhuling polyporus polysaccharide with BCG to inhibit bladder carcinoma[J]. Carbohydr Polym, 2015, 118: 30-35.
- [9] 张皖东, 吕诚, 赵宏艳, 等. 人参多糖和猪苓多糖对 CIA 大鼠肠道黏膜免疫细胞功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(9): 867-868, 871.
- [10] LI C X, ZENG X, ZHANG G W. Polyporus polysaccharide induces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in T24 bladder cancer cell [C]// 2012 International conference on system simulation (ICUSS 2012). Hong Kong, 2012.
- [11] 时念秋, 马毅, 张大同, 等. 长循环脂质体在抗肿瘤药物中的应用进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(3): 190-194.
- [12] TARDI P, BOMAN N, CULLIS P. Liposomal doxorubicin [J]. J Drug Target, 1996, 4(3): 129.
- [13] 张俊梅, 杨红, 侯新朴. 长循环脂质体的研究[J]. 生物化学杂志, 1995, 11(5): 615-618.
- [14] 殷党跃. 猪苓多糖分离纯化及其生物活性初探[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015: 13-14.
- [15] 耿思聪, 龚昊宇, 许航, 等. 微柱离心法测定克拉霉素离子对脂质体注射液的包封率[J]. 中国药理学杂志, 2016, 14(1): 18-25.
- [16] KO Y T, BICKEL U. Liposome-encapsulated Polyethyleneimine/Oligonucleotide polyplexes prepared by reverse-phase evaporation technique[J]. AAPS PharmSciTech, 2012, 13(2): 373-378.
- [17] 王天媛, 张飞飞, 任跃英, 等. 猪苓化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(4): 109-112.
- [18] HE P F, ZHANG A Q, WANG X L, et al. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide from *Polyporus umbellatus* sclerotia[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 82: 411-417.
- [19] 张元, 冯琼, 杨晓方, 等. 酶解-超声法对猪苓多糖正交优选提取及抗氧化活性的初步实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1657-1662.
- [20] 苏德龙, 史红波, 裴福成, 等. 正交试验法研究猪苓多糖提取工艺[J]. 基层中药志, 2002, 1(5): 27-28.
- [21] 孙纓, 赵懿清, 鲍佳春, 等. 猪苓多糖微波辅助提取工艺的正交实验法优选[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2624-2625.
- [22] 马超, 匡安仁. 长循环脂质体的研究进展及其在核医学中的应用[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(4): 941-945.
- [23] 王凯平, 张玉, 张俊. 猪苓多糖长循环脂质体的制备[J]. 中草药, 2005, 36(3): 368-370.
- [24] 郭海燕, 莫穗林. 脂质体物理稳定性和包封率的影响因素[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(6): 498-501.