响应面法优化提取羊肚菌多酚及其 HPLC 鉴定分析

芦慧敏[1]，李咏富[1,2*]，邱菊[1]

（1.贵阳学院食品与制药工程学院，贵州贵阳 550005）

（2.贵州省农业科学院现代农业发展研究所，贵州贵阳 550006）

摘要：该研究采用响应面法对羊肚菌多酚的提取工艺进行了优化，对溶剂类型、乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度、超声功率等提取条件进行了单因素优化，并对影响较为显著的三个因素进行 Box-Behnken 设计，得出了最佳工艺参数：乙醇体积分数 10%，料液比 1:67（g/mL），超声时间 90 min，超声温度 33 ℃，超声功率 300 W，此工艺条件下提取羊肚菌多酚含量为 22.39 mg/g。根据响应面实验数据分析，模型较为显著（P<0.000 1），失拟项不显著（P>0.05），拟合程度高（96.2%），三因素对得率影响顺序为：超声温度>料液比>超声功率。同时对各提取条件下的羊肚菌多酚进行了 HPLC 检测，共检测出 10 种酚类物质，且各单因素条件下提取的 10 种酚类物质的含量曲线也与福林酚比色法测定数据基本一致。

关键词：羊肚菌；多酚；响应面；提取；超声波

文章编号：1673-9078(2023)09-261-269 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1255

Extraction, Identification, and Analysis of *Morchella* Polyphenols *via* Response Surface Methodology and HPLC

LU Huimin[1], LI Yongfu[1,2*], QIU Ju[1]

(1.School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang College, Guiyang 550005, China)

(2.Institute of Integrated Agricultural Development, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: The extraction process of *Morchella* polyphenols was optimized via response surface methodology. In addition, single-factor optimization of solvent type, ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic time, ultrasonic temperature, and ultrasonic power were optimized. A three-factor and three-level Box-Behnken design was then implemented based on the factors of greater influence. The optimal process was verified as follows: ethanol concentration of 10%, liquid-to-material ratio of 1:67 (g/mL), ultrasonic extraction time of 90 min, ultrasonic extraction temperature of 33 ℃, and ultrasonic power of 300 W. The polyphenol content extracted from morels under these process conditions was 22.39 mg/g. According to the analysis of response surface experimental data, the model was significant (P<0.000 1), the lack of fit was not significant (P>0.05), and the fitting degree was high (96.2%). The order of the three major factors affecting extraction rate was as follows: ultrasonic temperature > material-to-liquid ratio > ultrasonic power. The polyphenol contents in *Morchella esculenta* obtained through various extraction conditions were analyzed via HPLC. Ten phenolic compounds were detected. The content curves of these ten phenolic compounds extracted under various single-factor conditions were basically consistent with the data determined via Folin-Ciocalteu colorimetry.

Key words: *Morchella*; polyphenols; response surface; extraction; ultrasound

引文格式：

芦慧敏,李咏富,邱菊.响应面法优化提取羊肚菌多酚及其 HPLC 鉴定分析[J].现代食品科技,2023,39(9):261-269

LU Huimin, LI Yongfu, QIU Ju. Extraction, identification, and analysis of *Morchella* polyphenols *via* response surface methodology and HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 261-269

收稿日期：2022-09-30

基金项目：贵州省基础研究计划（重点项目）（黔科合基础[2020]1Z029）；贵阳学院硕士研究生科研创新计划项目（GYU-YJS[2021]-46）

作者简介：芦慧敏（1999-），女，硕士研究生，研究方向：食品工程，E-mail：luhuimin1222@qq.com

通讯作者：李咏富（1985-），男，博士，副研究员，研究方向：食品科学，E-mail：Liyongfu1985@163.com

羊肚菌（*Morchella*），又名羊雀菌、羊肚菜或草笠竹，属于子囊菌门、盘菌纲、盘菌目、羊肚菌科大型真菌，因形似羊肚而得名[1,2]。羊肚菌含多糖、优质蛋白、多酚、矿物质和纤维素等营养要素[3-5]，具有抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤等作用[6,7]，是一类低热量、高营养的食用真菌。另外，羊肚菌中含有的脯氨酸类化合物，使其具有独特的香气，这种香气在调味品中得

到了广泛的应用[8]。近几年羊肚菌产业大幅度增长，根据行业调查，羊肚菌产量从 2018 年的 3×10^4 t 左右增长到 2020 年的 1.5×10^5 t 左右，增长了 500%左右[9,10]。

多酚类物质是一种天然的抗氧化剂，它含有大量的酚羟基，可以有效地清除自由基[11]，因而国内外研究者对其进行了大量的研究。目前多酚的提取方法主要采用溶剂萃取的方式，此外超声辅助提取技术也越来越多地应用于多酚的提取上，并取得了不错的提取效果。Ivana 等[12]利用溶剂提取龙葵果多酚，并在乙醇体积分数 74.7%、60 ℃下提取 40.3 min，提取的多酚含量较高；杨文娟等[13]利用超声辅助溶剂提取花生根多酚，并在体积分数 70%乙醇、料液比 1:30（g/mL）、45 ℃下提取 50 min，提取的多酚中含有较多的儿茶素，且咖啡酸、*p*-香豆酸、白藜芦醇等也有较不错的吸收；翟飞红等[14]对羊肚菌、香菇、真姬菇进行多酚提取，70%乙醇相同提取条件下，羊肚菌多酚的含量最高，且羊肚菌的抗氧化能力最佳，由此可见羊肚菌中多酚具有较香菇、真姬菇更佳的抗氧化能力；廖霞等[15]对黑脉羊肚菌进行了 3 种溶剂的提取，对不同溶剂提取的 6 种多酚组分进行分析，发现甲醇相提取了 6 种多酚，水相提取了 5 种，而乙酸乙酯相提取了 4 种，由此可见溶剂对不同酚类物质的溶出起着关键的作用；卢可可等[16]对三个产地的羊肚菌多酚提取后进行组分测定，没食子酸、原儿茶酸等含量均在 500~1 000 μg/g 之间，由此可见羊肚菌中含有较为丰富的酚类物质。

近年来，国内外学者对常见食用菌多酚的提取方法进行了研究，但关于羊肚菌多酚提取工艺优化的文献报道很少，而且不同萃取条件下的酚类物质也不清楚，制约了其开发与应用。本研究通过响应面法优化羊肚菌超声辅助溶剂提取多酚类化合物，并对不同提取条件下的羊肚菌多酚进行高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）鉴定，分析不同提取条件下酚类物质提取的差异，以期为羊肚菌后续的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验材料：六妹羊肚菌，贵州森之源农业科技有限公司；没食子酸，北京索莱宝科技有限公司；福林酚试剂，北京索莱宝科技有限公司；丙酮，天津市科密欧化学试剂有限公司；无水碳酸钠，天津市致远化学试剂有限公司；乙腈，美国 Sigma 公司；无水乙醇、甲醇、2-(3,4-二羟基苯基)乙胺、4-羟基苯乙胺、没食子酸、焦性没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、咖啡酸、绿原酸、莊草苷、芦丁、金丝桃苷、白藜芦醇、木犀草素、槲皮素、阿魏酸，均购于上海麦克林生化科技有限公司。

实验仪器：粉碎机 IKA A11 basic，广州艾卡；超声波清洗机，昆山市超声仪器；离心机，湖南湘仪；酶标仪，赛默飞；Agilent HPLC 1260，安捷伦。

1.2 实验方法

1.2.1 羊肚菌多酚的提取工艺流程

将购买的新鲜羊肚菌进行冻干处理后放入密封袋内，干燥器保存。将羊肚菌干品进行粉碎处理，过 50 目筛备用。称取一定量的羊肚菌粉末，加入不同溶剂，在不同料液比、温度、时间、功率条件下进行提取，超声提取完成后以 5 000 r/min 离心 20 min，从离心管中取出上清液，并用 0.45 μm 滤头过滤，得到羊肚菌多酚提取液备用。

1.2.2 单因素实验

称取（0.100±0.005）g 羊肚菌粉末，以料液比 1:60（g/mL）、超声温度 45 ℃、超声时间 30 min、超声功率 300 W 为固定因素，分别考察溶剂类型（体积分数为 60%的乙醇溶液、体积分数为 60%的甲醇溶液、体积分数为 60%的丙酮溶液、水）、乙醇体积分数 0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%）、料液比（1:40、1:50、1:60、1:70、1:80）（g/mL）、超声温度 25、35、45、55、65 ℃、超声时间 30、60、90、120、150、180 min、超声功率 240、300、360、420、480 W 对羊肚菌多酚含量的影响。以上实验每组三个平行。

1.2.3 响应面实验

基于单因素实验结果，利用 Box-Behnken 设计实验，以多酚含量为响应值，对实验结果进行回归优化，设计因素水平编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验因素水平设计

Table 1 Box-Behnken experiment factor-level design

编码值	因素		
	A 液料比/(mL/g)	B 超声温度/℃	C 超声功率/W
-1	50	25	240
0	60	35	300
1	70	45	360

1.2.4 多酚测定

多酚的测定以没食子酸作为标准曲线，将没食子酸溶液稀释成 0.5、0.25、0.125、0.06、0.03 mg/mL。分别吸取 200 μL 不同浓度的没食子酸溶液至离心管中，向离心管中加入 200 μL 福林酚试剂，摇匀，静置

10 min，再加入 1 mL 75 g/L 的 Na_2CO_3，再加入 1.6 mL 水，避光反应 2 h，于 765 nm 处测定吸光值，平行三次取平均值。以没食子酸浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程：y=3.90x+0.1，R^2=0.994。以同样的方法测定羊肚菌样品的多酚含量。

$$A=\frac{C\times V\times N}{M\times 1000} \quad (1)$$

式中:

A——羊肚菌多酚含量，mg/g;

C——羊肚菌多酚的质量浓度，mg/mL;

V——提取液体积，mL;

N——稀释倍数;

M——羊肚菌粉末质量，g。

1.2.5 HPLC 测定羊肚菌单酚

以 2-(3,4-二羟基苯基)乙胺、4-羟基苯乙胺、焦性没食子酸、木犀草素、芦丁、对羟基苯甲酸、金丝桃苷、没食子酸、儿茶素、咖啡酸、槲皮素、绿原酸、原儿茶酸、荭草苷、白藜芦醇、阿魏酸为标准品，用甲醇溶解配置成 5、25、50、125、250 μg/mL 的标准溶液，根据峰面积绘制标准曲线，10 种酚类物质的线性关系良好（R^2＞0.99）。利用 HPLC 对单因素以及响应面实验的羊肚菌多酚进行稀释、测定，计算样品中单类酚的含量。

HPLC 分析条件：色谱柱为 YMC-Pack ODS-AQ（250 mm×4.6 mm，3 μm）。流动相 A 为 0.1%甲酸，B 为乙腈；梯度洗脱：0~25 min，2% B；25~45 min，12% B；45~55 min，25% B；55~60 min，35% B；60~65 min，40% B；65~70 min，2%B。流速 1 mL/min；进样量 10 μL；柱温 20 ℃；检测波长 220、280、320、360 nm。

1.2.6 统计分析

每组实验平行三次，采用 Origin 2021 对单因素实验结果进行绘图；采用 Design-Expert.8 软件对各因素进行回归拟合，构建模型，绘制响应曲面图，评估分析统计显著性。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 不同溶剂对羊肚菌多酚含量的影响

当使用水作为提取溶剂时，羊肚菌多酚的得率最高，其次是体积分数为 60%的乙醇溶液、体积分数为 60%的甲醇溶液、体积分数为 60%丙酮溶液，这可能是由于羊肚菌多酚极性较大，与水的极性更为接近。水可以提取更多的食用菌多酚，这与一些研究者[17-19]提出的鹿茸菇及秀珍菇等其他食用菌中水相提取高于其他相的结论一致。但纯水不一定与羊肚菌多酚的极性完全接近，因此可以向水中加入不同体积的有机溶剂中和极性，从而找到更接近羊肚菌多酚极性的提取液，设计不同有机溶剂体积分数对羊肚菌多酚得率的实验。又因为 60%乙醇的得率在体积分数为 60%的甲醇溶液、体积分数为 60%的乙醇溶液、体积分数为 60%丙酮溶液中最高，且乙醇作为溶剂比甲醇、丙酮更加安全可靠，因而在后续实验中将设计不同乙醇浓度的溶剂提取羊肚菌多酚（图 1a 所示）。

2.1.2 不同乙醇体积分数对羊肚菌多酚含量的影响

乙醇体积分数对羊肚菌多酚的得率影响较大，乙醇体积分数在 10%~100%范围内，羊肚菌的多酚含量随着乙醇浓度的增大而降低，这可能是由于乙醇浓度的升高，溶剂的极性与羊肚菌多酚的极性差异变大，抑制了某些酚类物质的充分溶解[20]，故而羊肚菌多酚的得率下降。当乙醇体积分数为 10%时，羊肚菌的得率最高。因此，最终选定乙醇体积分数 10%的溶液为最优提取溶剂（图 1b 所示）。

2.1.3 不同料液比对羊肚菌多酚含量的影响

液料比为 1:40~1:60（g/mL）时，羊肚菌多酚会随料液比的增加而增加，其原因在于随料液比的增加，试样与溶剂的接触面积增大，从而避免了介质饱和[21]，故而提高了提取效率；到 1:60（g/mL）时，多酚的溶出达到平衡；继续增加料液比，多酚含量逐渐下降，这可能是由于杂质的增多抑制了多酚浓度[22]。因此，选定最优料液比为 1:60（g/mL）（图 1c 所示）。

2.1.4 不同超声时间对羊肚菌多酚含量的影响

在 180 min 内，随着时间的延长，羊肚菌多酚的含量逐渐增多，这可能是由于超声时间的增加，胞内多酚溶出的浓度逐渐增加，在 90 min 后，溶出的效率相较于前 90 min 更低，因此，为减少提取成本和提高提取效率，选定最优超声时间为 90 min（图 1d 所示）。

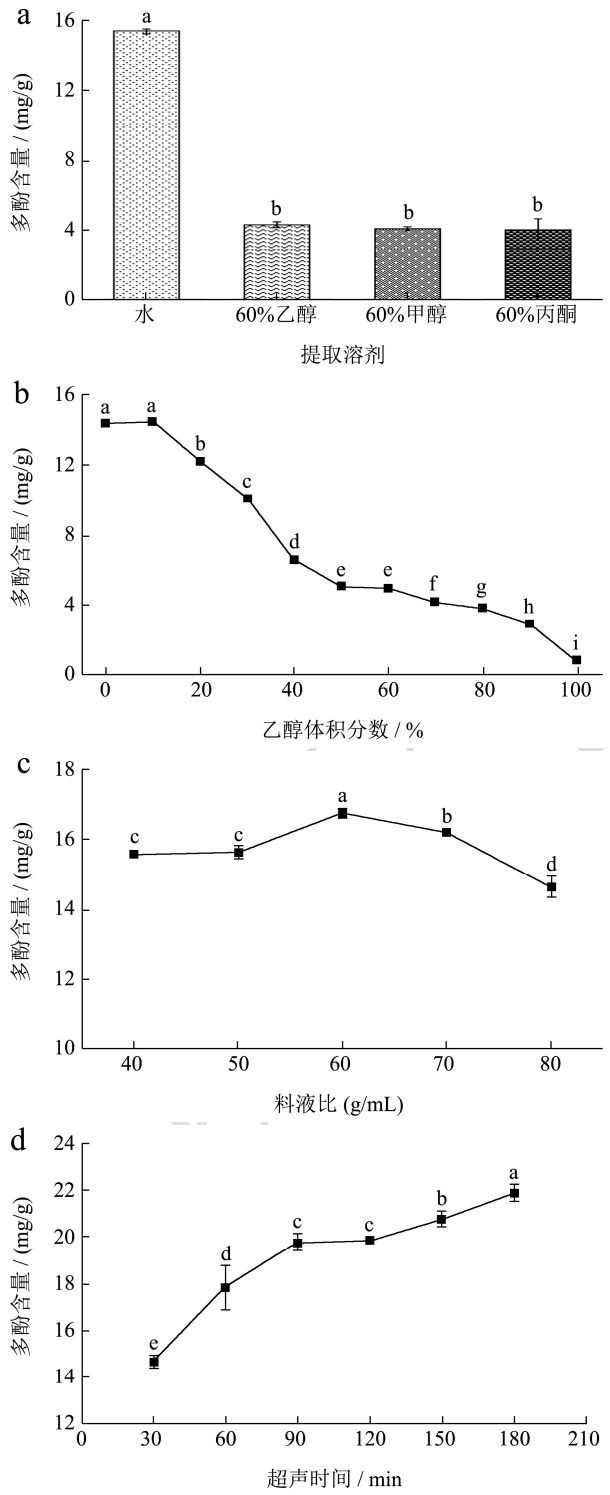
2.1.5 不同超声温度对羊肚菌多酚含量的影响

在 25~35 ℃时，羊肚菌多酚的含量随温度的升高而增加，其原因可能是 35 ℃时容易软化羊肚菌的细胞壁，进而影响其细胞膜的透过率，从而加速多酚物质的溶出[17]；在 35~65 ℃范围内，羊肚菌多酚含量随着温度的升高逐渐降低，这可能是由于多酚不耐高温，在更高的温度下极易分解、氧化，导致其多酚结构被破坏，从而降低了多酚的提取[20]。因此，选定最优提取温度为 35 ℃（图 1e 所示）。

2.1.6 不同超声功率对羊肚菌多酚含量的影响

在 240~300 W 范围内，羊肚菌多酚含量随着功

率的增加而增加，这可能是由于超声波产生的空化和振动效应有效地改善了羊肚菌的传质，促进了结构的改变，比如微通道的形成加速了多酚物质的溶出，这大大缩短了羊肚菌多酚的提取时间，并保持了样品的质量[23-25]。在 300~480 W 范围内，羊肚菌多酚含量随着功率的增加而逐渐降低，这可能是由于过高的功率对羊肚菌的破坏能力更强，导致羊肚菌多酚的结构被破坏[20]。因此，选定最优提取功率为 300 W（图 1f 所示）。



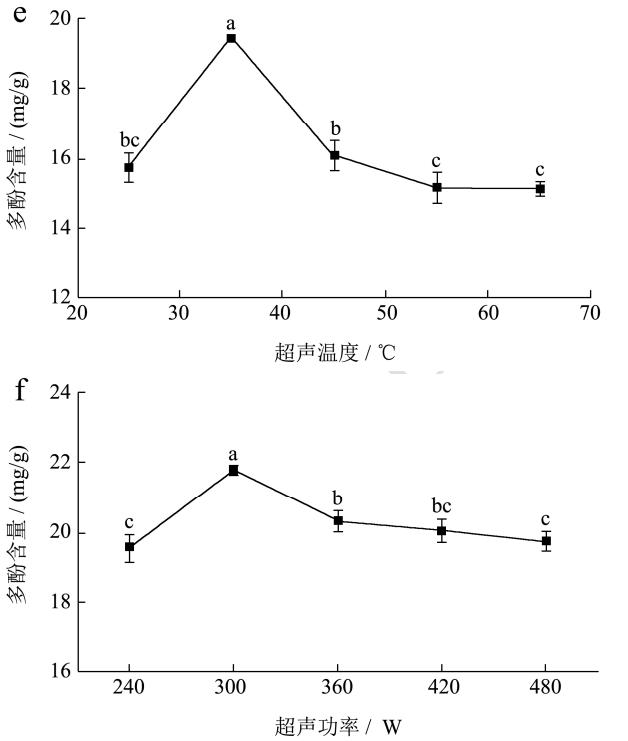


图 1 各因素对多酚含量的影响

Fig.1 Effect of various factors on the content of polyphenols

2.2 响应面实验结果分析

2.2.1 响应面模型设计与分析

根据单因素实验，对影响得率较显著的三个因素进行响应面法优化多酚提取工艺，选取料液比、超声温度、超声功率三个因素，共 17 个试验点进行响应面分析，结果见表 2。

通过对实验数据进行多元非线性回归分析，建立了预测羊肚菌多酚得率的二阶多项式模型：

$$Y=22.23-0.46A-0.46B+0.078C-0.81AB+0.011AC-0.35BC-2.31A^2-3.35B^2-1.00C^2$$

高 F 值（45.96）和低于 0.05 的 P 值（$P<0.000\,1$）表明建议模型具有统计学显著性，而 R^2 值（0.983 4）和 R^2_{adj}（0.962 0）进一步验证了该模型，模型可解释 96.20% 响应值变化。相关系数 R^2 接近 1，表明模型与实验数据拟合良好。且二次项系数均为负数，有极大值，这也证明了模型的可靠性。根据方差分析结果，料液比和超声温度是影响羊肚菌多酚含量较为重要的因素，独立因素的积极影响意味着他们的积极变化，从而导致响应值的增加；料液比-超声温度对羊肚菌多酚的产率具有较为显著的影响（$P<0.01$），其他两个的交互作用并不十分明显。由 F 值大小可知，各因素对羊肚菌多酚含量的影响大致为：超声温度（B）＞料液比（A）＞超声功率（C）。除了超声功率及其二次效应外，所有统计学上显著的因素和交互作用对羊肚菌多酚的含量都有积极的影响。

表 2 Box-Behnken 实验设计及实验结果

Table 2 Box-Behnken experiment design and result

编号	A 液料比/(mL/g)	B 超声温度/℃	超声功率/W	多酚含量/(mg/g)
1	0	0	0	22.6±0.01
2	1	0	1	18.6±0.07
3	0	-1	-1	18.09±0.11
4	0	1	1	16.98±0.22
5	0	0	0	22.37±0.01
6	-1	0	1	19.11±0.17
7	0	0	0	22.03±0.01
8	-1	1	0	16.88±0.20
9	0	1	-1	17.23±0.20
10	-1	0	-1	19.26±0.38
11	0	0	0	22.04±0.05
12	0	0	0	22.12±0.07
13	1	-1	0	16.88±0.05
14	1	1	0	14.95±0.12
15	1	0	-1	18.71±0.08
16	-1	-1	0	16.56±0.02
17	0	-1	1	19.22±0.05

表 3 超声提取回归方程方差分析结果

Table 3 Analysis of variance of the constructed regreesion model by ultrasonic-assisted extraction

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	*P* 值	显著性
模型	87.30	9	9.7	45.96	<0.000 1	**
A-料液比	1.67	1	1.67	7.90	0.03	*
B-超声温度	1.72	1	1.72	8.15	0.03	*
C-超声功率	0.049	1	0.049	0.23	0.65	
AB	2.64	1	2.64	12.53	0.01	**
AC	0.00	1	0.00	0.00	0.96	
BC	0.48	1	0.48	2.28	0.17	
A^2	22.51	1	22.51	106.67	<0.000 1	**
B^2	47.27	1	47.27	223.94	<0.000 1	**
C^2	4.21	1	4.21	19.95	0.00	**
残差	1.48	7	0.21			
失拟项	1.23	3	0.41	6.57	0.05	
净误差	0.25	4	0.06			
总离差	88.78	16				
R^2=0.983 4 R^2_{adj}=0.962 0 C.V./%=2.41						

注：“*”表示显著，*P*<0.05；“**”表示极显著，*P*<0.01。

2.2.2 响应面分析

各因素间对羊肚菌多酚含量的交互作用影响的响应曲面如图 2 所示，通过料液比、超声温度、超声功率之间交互关系的直观表现表明，响应曲面均为开口向下的凸型曲面，多酚含量存在最大值。模型响应面 3D 图清楚地显示了所有分析变化对羊肚菌多酚含量的积极影响。

结合 *P* 值并结合图 2 分析可见，图表与上述的方差分析结果一致，液料比-超声温度两者间存在更显著的交互作用。

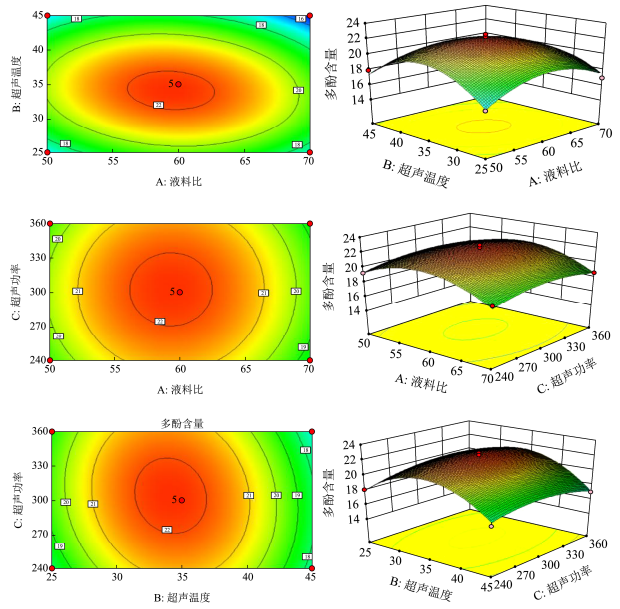


图 2 料液比、超声温度、超声功率之间的交互作用对多酚含量的等高线及响应面图

Fig.2 Contour diagram and response surface of the interaction of liquid ratio, ultrasonic temperature and ultrasonic power on polyphenol content

2.2.3 最佳提取工艺确定及验证实验

通过 Design-Expert.8 软件求解回归方程，得出最优的羊肚菌提取工艺为：料液比 1:66.9（g/mL）、超声温度 33.43 ℃、超声功率 304.15 W。由于实验室实际操作的局限性，确定试验提取工艺为乙醇浓度 10%、料液比 1:67（g/mL）、超声时间 90 min、超声温度 33 ℃、超声功率 300 W。在此条件下平行测定三次，验证实验结果的多酚含量为 22.39 mg/g，与预测值接近，偏差较小，证实此模型用于羊肚菌多酚提取工艺是可行的。这比前人研究[14-16]提取羊肚菌多酚使用摇床（14.478 mg/g）以及室温放置（4.35 mg GAE/g）的提取方法的得率增加了 0.54~4.15 倍。

2.3 羊肚菌中单酚物质分析

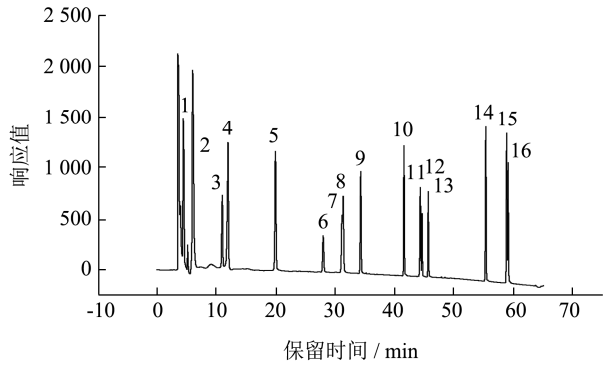


图 3 16 种酚类物质标准品的基峰色谱图

Fig.3 Base peak chromatograms of 16 phenolic standards

16 种酚类物质混标图谱如图 3 所示，对照单标图谱，确定混标中 16 种酚类物质的保留时间，图 3 中 1 为 2-(3,4-二羟基苯基)乙胺，2 为 4-羟基苯乙胺，3 为没食子酸，4 为焦性没食子酸，5 为原儿茶酸，6 为对羟基苯甲酸，7 为儿茶素，8 为咖啡酸，9 为绿原酸，10 为荭草苷，11 为芦丁，12 为金丝桃苷，13 为白藜芦醇，14 为木犀草素，15 为槲皮素，16 为阿魏酸。

2.3.1 不同乙醇浓度中酚类物质分析

对羊肚菌不同乙醇浓度提取的 10 种多酚类物质进行了检测，由表 4 中十种酚类物质的总量看出，随着乙醇浓度的升高，酚类物质的含量逐渐减小，这与福林酚比色法测定的结果基本一致，这可能是由于乙醇浓度的增大，与某些酚类物质如荭草苷、金丝桃苷等的极性差异较大有关，纯水提取的这 10 种酚类物质的种类最多，其次是 20%、30%乙醇体积分数提取，提取了 8 种酚类物质；10%、40%乙醇体积分数提取，提取了 7 种酚类物质。酪胺、没食子酸、对羟基苯甲酸在 10%乙醇浓度时得率最高，多巴胺、焦性没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、荭草苷、金丝桃苷在纯水提取时得率最高，而木犀草素在 20%乙醇体积分数提取时得率最高。

2.3.2 不同料液比中酚类物质分析

对羊肚菌不同料液比提取的 10 种多酚类物质进行了检测，由表 5 中十种酚类物质的总量看出，随着料液比的增加，酚类物质的含量逐渐减小，以 mg/g 计算得出的结果是 1:50（g/mL）时的酚类物质最高，其次是 1:60（g/mL），这可能是由于其他未知的酚类物质并未计算其中，导致结果与福林酚比色法有些许差异。使用更高的料液比提取时，检测到了更多的酚类物质，说明较高的料液比有利于这 10 种酚类物质的溶出。

2.3.3 不同超声温度下酚类物质分析

对羊肚菌不同超声温度提取的 10 种多酚类物质进行了检测，由表 6 中十种酚类物质的总量看出，在 25~45 ℃时，随着超声温度的增加，酚类物质的含量逐渐增加；在 45~65 ℃时，随着超声温度的增加，酚类物质的含量逐渐减少；且在 45 ℃时，检测到的酚类物质种类更多，这说明适当提高温度，有助于酚类物质的溶出，温度过高，酚类物质的内部结构被破坏的更多，导致多酚总量减少。多巴胺、酪胺在 35 ℃时得率最高，而焦性没食子酸、原儿茶酸在 25℃时得率最高，对羟基苯乙酸、儿茶素、金丝桃苷等在 45 ℃时得率最高。

表 4 不同乙醇体积分数中酚类物质分析

Table 4 Analysis of phenolic substances in different ethanol concentrations (μg/mL)

乙醇体积分数/%	2-(3,4-二羟基苯基)乙胺	4-羟基苯乙胺	没食子酸	焦性没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	儿茶素	荭草苷	金丝桃苷	木犀草素	总量
0	16.64	27.55	13.42	2.57	4.27	0.89	1.33	0.67	1.78	0.70	69.81
10	6.45	29.70	22.27	1.66	1.92	0.93	0.80	nd	nd	nd	63.74
20	2.08	23.05	17.94	1.17	0.70	1.74	nd	nd	2.02	0.93	49.64
30	12.83	19.22	2.21	0.26	0.51	1.16	1.39	nd	nd	0.17	37.74
40	2.19	8.62	nd	nd	0.47	1.02	2.53	0.32	nd	0.26	15.41
50	5.70	8.05	nd	nd	0.47	nd	0.64	0.36	nd	1.01	16.21
60	3.89	7.76	nd	nd	0.45	nd	1.26	nd	nd	0.46	13.82
70	3.04	7.49	nd	nd	0.46	nd	0.84	nd	nd	0.18	12.01
80	2.35	5.43	nd	nd	nd	nd	0.92	0.46	nd	0.39	9.55
90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.71	nd	nd	0.71
100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00

注：*nd，未检测到。下表同。

表 5 不同料液比提取酚类物质分析

Table 5 Analysis of phenolic substances extracted with different solid-liquid ratios (μg/mL)

料液比/(g/mL)	2-(3,4-二羟基苯基)乙胺	4-羟基苯乙胺	没食子酸	焦性没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	儿茶素	荭草苷	金丝桃苷	木犀草素	总量
1:30	23.46	48.26	11.52	2.77	1.14	0.71	nd	nd	nd	nd	87.85
1:40	16.37	28.77	6.84	2.48	0.89	0.54	nd	nd	1.38	nd	57.27
1:50	15.99	38.19	5.19	1.71	0.71	3.26	nd	nd	1.02	nd	66.08
1:60	7.35	38.22	4.75	1.17	0.67	1.44	nd	nd	0.97	nd	54.55
1:70	4.30	30.79	4.16	1.04	0.55	0.77	nd	nd	2.39	nd	44.00
1:80	3.84	28.26	3.43	0.69	0.55	1.01	1.97	nd	1.72	nd	41.46

表 6 不同超声温度提取酚类物质分析

Table 6 Analysis of phenolic substances extracted by different ultrasonic temperatures (μg/mL)

超声温度/℃	2-(3,4-二羟基苯基)乙胺	4-羟基苯乙胺	没食子酸	焦性没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	儿茶素	荭草苷	金丝桃苷	木犀草素	总量
25	6.27	25.16	2.71	2.67	0.76	2.52	nd	nd	1.62	nd	41.71
35	8.10	49.30	6.03	1.77	0.58	3.43	1.23	nd	nd	nd	70.44
45	6.92	49.79	7.39	0.80	0.28	5.14	1.45	nd	3.46	nd	75.23
55	4.97	42.47	4.24	nd	nd	1.36	nd	nd	nd	nd	53.04
65	1.52	20.99	1.26	nd	nd	1.06	nd	nd	nd	nd	24.83

表 7 不同超声功率提取酚类物质分析

Table 7 Analysis of phenolic substances extracted by different ultrasonic powers (μg/mL)

超声功率/W	2-(3,4-二羟基苯基)乙胺	4-羟基苯乙胺	没食子酸	焦性没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	儿茶素	荭草苷	金丝桃苷	木犀草素	总量
240	7.43	51.23	6.60	1.49	0.55	0.84	3.85	nd	nd	nd	71.97
300	7.40	50.01	6.87	1.88	0.51	nd	5.04	nd	nd	nd	71.71
360	7.49	52.45	6.59	1.75	0.56	3.83	2.07	nd	nd	nd	74.73
420	7.01	49.74	6.59	1.70	0.62	nd	nd	nd	nd	nd	65.66
480	5.50	50.87	6.79	1.46	0.53	nd	nd	nd	nd	nd	65.16

表 8 最佳工艺提取酚类物质分析

Table 8 Analysis of phenols extracted by optimal process (μg/mL)

最佳工艺提取	2-(3,4-二羟基苯基)乙胺	4-羟基苯乙胺	没食子酸	焦性没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	儿茶素	荭草苷	金丝桃苷	木犀草素	总量
	6.62	27.64	21.86	5.72	7.79	1.77	2.16	nd	2.50	nd	76.08

2.3.4 不同超声功率下酚类物质分析

对羊肚菌不同超声功率提取的 10 种多酚类物质进行了检测，由表 7 中 10 种酚类物质的总量看出，功率对这 10 种酚类物质提取的影响不大，但总体呈现下降的趋势，这可能是由于功率的增加对这 10 种酚类物质的结构有影响，导致内部结构发生改变，使其由 240 W 时提取的 7 种酚类物质减少到了 480 W 时的 5 种，这说明较低的功率有利于这 10 种酚类物质的溶出且保持它们的结构。

2.3.5 响应面优化最佳工艺酚类物质分析

响应曲面中，羊肚菌在乙醇体积分数 10%、料液比 1:60（g/mL）、35 ℃、300 W 下超声 90 min，得率最高，以此条件下的提取液进行酚类物质检测，共检测出 8 种酚类物质，8 种酚类物质的总量达到了 76.08 μg/mL，达到了较高的含量。

3 结论

本文采用响应面法对羊肚菌多酚的提取工艺进行了优化，首先对溶剂类型、乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度、超声功率等提取条件进行了单因素优化，并对影响较为显著的几个因素进行三因素三水平 Box-Behnken 设计，得出了最佳工艺参数：10%乙醇体积分数，料液比 1:67（g/mL），超声时间 90 min，超声温度 33 ℃，超声功率 300 W，此工艺条件下提取羊肚菌多酚含量为 22.39 mg/g。根据响应面实验数据分析，模型较为显著（$P<0.000\ 1$），失拟项不显著（$P>0.05$），拟合程度高（96.2%），三因素对得率影响顺序为：超声温度>料液比>超声功率。同时对各提取条件下的羊肚菌多酚进行了 HPLC 检测，共检测出 10 种酚类物质，且各单因素条件下提取的 10 种酚类物质的含量曲线也与福林酚比色法测定数据基本一致。另外，HPLC 测定出其他峰谱成分仍然未知，具体还需进一步研究。

参考文献

[1] 赵瑞华,贺晓龙.羊肚菌分子鉴定及功能基因研究进展[J].微生物学杂志,2022,42(1):112-117.

[2] 王珍珍,官月,刘洋,等.六妹羊肚菌多糖的提取工艺优化及结构表征和抗氧化活性[J].菌物学报,2019,38(9):1548-1558.

[3] Huang M, Zhang S, Zhang M L, et al. Effects of polysaccharides from *Morchella* conica on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated macrophages [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(3): 763-711.

[4] Rossbach M, Kummerle E, Schmidt S, et al. Elemental analysis of *Morchella esculenta* from Germany [J]. Journal of Radio analytical & Nuclear Chemistry, 2017, 313(1): 273-278.

[5] Tang Y, Chen J L, Li F H, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of modified polysaccharides originally isolated from *Morchella angusticepes* Peck [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(3): 448-456.

[6] Guo X F. Effect of jujube date polysaccharide in resisting sports fatigue [J]. Advance Journal of Food Science and Technology, 2015, 9(12): 939-943.

[7] 陈彦,潘见,周丽伟,等.羊肚菌胞外多糖抗肿瘤作用的研究[J].食品科学,2008,9:553-556.

[8] 袁明生,孙佩琼.四川蕈菌[M].成都:四川科学技术出版社,1995.

[9] 中国食用菌协会.2019 年度全国食用菌统计调查结果分析[J].中国食用菌,2021, 40(6):104-110.

[10] 中国食用菌协会.2020 年度全国食用菌统计调查结果分析[J].中国食用菌,2022, 41(1):85-91.

[11] Wani S M, Nusrat Jan, Touseef Ahmed Wani, et al. Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L.) using response surface methodology [J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2015, 16(2): 119-126.

[12] Ivana Karabegović, Danijela Mančić, Nada Nikolić, et al. Total polyphenols from *Solanum retroflexum* Dun. fruit: extraction and optimization by response surface methodology [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(3): 1772-1778.

[13] 杨文娟,侯旭杰,阿依古丽·吾斯曼,等.超声辅助提取花生根多酚工艺优化及组成分析[J].食品研究与开发,2021,42(1):107-111.

[14] 翟飞红,张勇,赵文婧,等.羊肚菌、香菇、真姬菇子实体体外抗氧化活性的比较[J].食用菌,2020,42(4):75-79.

[15] 廖霞,李苇舟,郑少杰,等.黑脉羊肚菌多酚分级制备及其抗氧化活性[J].食品科学,2017,38(23):26-31.

[16] 卢可可,谭玉荣,吴素蕊,等.不同产地尖顶羊肚菌多酚组成及抗氧化活性研究[J].食品科学,2015,36(7):6-12.

[17] 杨斌,宋厚辑,郑峻,等.秀珍菇多酚提取工艺优化及抗氧化活性探究[J].中国调味品,2022,47(1):183-189.

[18] 杨斌,方柄栋,郑峻,等.鹿茸菇多酚提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2021,42(24):41-49.

[19] Ana C R A, Susana S, Guillermo R, et al. Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(12): 2272-2278.

[20] 刘馥源,黄占旺,沈勇根,等.香菇多酚超声波提取工艺及抗氧化性分析[J].中国调味品,2022,47(3):14-20.

[21] Jovanović A A, Djordjević V B, Petrović P M, et al. The influence of different extraction conditions on polyphenol content, antioxidant and antimicrobial activities of wild thyme [J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2021, 25: 1-7.

[22] Vignoli J A, Bassoli D G, Benassi M T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material [J]. Food Chemistry, 2010, 124(3): 863-868.

[23] Valentina Prosapio, Ian Norton. Simultaneous application of ultrasounds and firming agents to improve the quality properties of osmotic+freeze-dried foods [J]. LWT, 2018, 96: 402-410.

[24] Maarit K, Tuulia H. On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction-liquid chromatography for the determination of phenolic acids in *Lamiaceae herbs* [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1216(6): 892-896.

[25] Qin L, Yu Jing, Zhu J, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polyphenol from the seeds of *Allium senescens L.* and its antioxidative role in Harbin dry sausage [J]. Meat Science, 2021, 172: 108351.