王得成, 倪秀珍, 缪森杰, 等. 灵芝总酚的提取工艺优化及其体外抗氧化、神经保护作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 265−276. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060300

WANG Decheng, NI Xiuzhen, MIAO Senjie, et al. Optimization of Extraction Process of Phenols from *Ganoderma lucidum* and Its *in Vitro* Antioxidant and Neuroprotection Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 265−276. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060300

·工艺技术·

# 灵芝总酚的提取工艺优化及其体外抗氧化、神经保护作用

王得成[1], 倪秀珍[1,*], 缪森杰[1], 陈浩喆[1], 刘洋格格[1], 程昱博[1], 崔　婧[1,2,*]

（1.长春师范大学生命科学学院, 中心实验室, 吉林省寒地经济植物及食药用菌研究与开发技术创新实验室, 吉林长春 130032;
2.艾美诚信生物制药有限公司, 辽宁大连 116600）

**摘　要:** 为探究灵芝总酚（*Ganoderma lucidum* total phenols，GLTP）的提取工艺，通过响应面法对超声辅助提取灵芝总酚的工艺进行优化，采用超高效液相色谱-质谱/质谱（Ultra performance liquid chromatograph mass spectrometer，UPLC-QTOF-MS/MS）分析 GLTP 的酚类物质，并评价 GLTP 体外抗氧化活性及对神经细胞氧化损伤的保护作用。结果表明：最佳提取工艺为超声功率 280 W、乙醇浓度 78%、液料比 60∶1（mL/g）、超声时间 62 min，GLTP 的提取含量为 4.52±0.09 mg/g；GLTP 中检测出 8 种酚类物质，有 7 种酚类物质首次在灵芝提取物中检测到。GLTP 清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基（1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical，DPPH）、2,2'-联氮-双（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）二胺盐阳离子自由基（2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt anion radical，$ABTS^{+}$）和羟基自由基（Hydroxyl radical，·OH）的半抑制浓度（$IC_{50}$）分别为 0.6536、1.087 和 0.3734 mg/mL；铁离子还原能力（Ferric reducing antioxidant power，FRAP）值为 9.04±0.25 mmol/L。细胞实验显示，当 GLTP 为 100 μg/mL 时，与损伤组相比，细胞存活率从 50.73% 提升至 81.11%，乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase，LDH）释放量从 224.48% 下降至 158.10%，活性氧（Reactive oxygen species，ROS）含量从 158.79% 下降至 103.63%，$[Ca^{2+}]_i$ 从 157.94% 下降至 118.62%。丙二醛（Malondialdehyde，MDA）含量从 10.28 降至 6.91 nmol/mg protein；超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（Catalase，CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase，GSH-Px）酶活性分别从 2.67、1.68、536.12 U/mg protein 提升至 6.59、3.20、757.03 U/mg protein；GLTP 可显著改善过氧化氢（Hydrogen peroxide，$H_2O_2$）诱导的神经细胞氧化损伤。综上，在该工艺条件下，灵芝总酚提取物具有较好的抗氧化及神经保护作用，为灵芝资源的开发及其在功能食品领域的应用提供理论基础。

**关键词:** 灵芝, 总酚, 提取工艺, 响应面法, 成分分析, 抗氧化活性, 神经保护

**中图分类号:** R285.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0265−12

**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2025060300

本文网刊:

# Optimization of Extraction Process of Phenols from *Ganoderma lucidum* and Its *in Vitro* Antioxidant and Neuroprotection Activities

**WANG Decheng[1], NI Xiuzhen[1,*], MIAO Senjie[1], CHEN Haozhe[1], LIU Yanggege[1], CHENG Yubo[1], CUI Jing[1,2,*]**

（1.Technical Innovation Laboratory for Research and Development of Economic Plants and Edible and Medicinal Fungi in Cold Regions of Jilin Province, Central Laboratory, School of Life Sciences, Changchun Normal University,

**收稿日期:** 2025−06−25

**基金项目:** 吉林省自然科学基金项目（20230101194JC）; 吉林省教育科学“十四五”规划项目（SZ2479）; 长春师范大学自然科学基金项目（CSJJ2024002ZK）; 长春师范大学研究生创新项目（YJSCX2025115）。

**作者简介:** 王得成（2001−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性物质提取及功能研究, E-mail: qx202310008@stu.ccsfu.edu.cn。

*** 通信作者:** 倪秀珍（1967−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物活性物质提取及功能研究, E-mail: Nixiuzhen216@126.com。

崔婧（1986−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物活性物质提取及功能研究, E-mail: cuijing@ccsfu.edu.cn。

Changchun 130032, China;
2.Aim Honesty Biopharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116600, China)

**Abstract**: To investigate the extraction process of *Ganoderma lucidum* total phenols (GLTP), response surface methodology was employed to optimize ultrasound-assisted extraction parameters. The phenolic composition of GLTP was analyzed using ultra performance liquid chromatograph mass spectrometer (UPLC-QTOF-MS/MS), and its *in vitro* antioxidant activity along with protective effects against oxidative damage in neural cells were evaluated. The results revealed that the optimal extraction process, comprising an ultrasonic power of 280 W, ethanol concentration of 78%, liquid-solid ratio of 60∶1 (mL/g), and ultrasonic time for 62 min, resulted in a GLTP content of 4.52±0.09 mg/g. Eight phenolic substances were detected in the GLTP, seven of which were identified in *G. lucidum* extracts for the first time. The half-maximal inhibitory concentrations of GLTP for scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt anion radicals ($ABTS^+$), and hydroxyl radicals (·OH) were 0.6536, 1.087, and 0.3734 mg/mL, respectively, and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay value was 9.04±0.25 mmol/L. Cellular experiments revealed that, compared with an model group, when treated with 100 μg/mL GLTP, cell survival increased from 50.73% to 81.11%, lactate dehydrogenase (LDH) release decreased from 224.48% to 158.10%, the contents of reactive oxygen species (ROS) decreased from 158.79% to 103.63%, and the concentration of $Ca^{2+}$ was reduced from 157.94% to 118.62%. Furthermore, this study detected a reduction in malondialdehyde (MDA) content from 10.28 to 6.91 nmol/mg protein, whereas the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) increased from 2.67, 1.68, and 536.12 U/mg protein to 6.59, 3.20, and 757.03 U/mg protein, respectively. These results indicated that GLTP significantly mitigated $H_2O_2$-induced oxidative damage in neuronal cells. In conclusion, under these optimized conditions, *G. lucidum* total phenol extract demonstrates excellent antioxidant and neuroprotective effects, providing a theoretical foundation for the development of *G. lucidum* resources and their potential applications in functional foods.

**Key words**: *Ganoderma lucidum*; total phenols; extraction process; response surface methodology; component identification; antioxidant activity; neuroprotection

灵芝(*Ganoderma lucidum*)又称“仙草”,为担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌;在《神农本草经》中记载,其性温、味甘,有补中益气、滋外强壮、扶正固本之功效[1−2]。灵芝化学成分复杂,具有多种生物活性物质如:三萜、酚类、多糖等[3−5]。灵芝三萜具有抗氧化、抑肿瘤、降血糖、保肝及神经保护等多种功效[6−7];灵芝多糖具有抗炎、治疗神经衰弱、提高人体免疫功能、清除机体内自由基等多种功效[8−9]。酚类物质具有多种生物活性,与灵芝三萜和多糖相比,关于灵芝酚类的研究较少,限制了其开发与应用。因此,对灵芝总酚的提取工艺及其活性进行研究,为灵芝酚类在功能食品及保健品领域的开发提供科学依据。

酚类物质因结构中酚羟基的独特化学性质,被称为天然的抗氧化剂,抗氧化性是酚类的主要生物活性[10]。Dong 等[11] 和 Kolniak-Ostek 等[5] 研究发现,灵芝总酚对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)和 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐阳离子自由基(2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt anion radical, $ABTS^+$)均具有显著的清除作用,同时具有一定的铁离子还原能力。神经退行性疾病与氧化应激密不可分,活性氧(ROS)可能通过脂质过氧化、蛋白质氧化和线粒体 DNA 损伤等途径导致神经退行性疾病发生[12−13]。酚类物质在神经保护方面具有良好的应用前景,Jia 等[14] 的研究发现,柑橘叶总酚可能通过介导 PI3K/AKT 信号通路发挥神经保护作用,以抵消氧化应激损伤;Gao 等[15] 研究证实,越桔总酚可通过提升 PC12 细胞内抗氧化酶活性、减少 ROS 生成,并介导 Nrf2/HO-1 信号通路缓解氧化应激损伤,发挥神经保护作用。灵芝酚类物质已证实具有较好的抗氧化活性,但其对神经系统的氧化损伤是否具有保护作用尚未见报道。因此,开展灵芝酚类物质对神经系统氧化损伤的保护作用研究。

酚类物质的传统提取方法主要有浸渍法和热回流提取法等,具有提取周期长,能源消耗量大的缺点[16]。超声波辅助萃取技术利用高频声波产生的空化效应,通过气泡塌陷时的高剪切力实现目标成分的高效提取,同时能够破坏细胞壁以显著增强传质效率,且不会对酚类结构造成影响,还具备操作流程简单、处理时间短、有机溶剂使用量少等优点[17−19]。Gueffai 等[20] 利用超声波辅助技术提取脱脂黑孜然种子中总酚,比浸渍法含量高 14.7 mg/g;Hou 等[21] 采用超声波辅助提取技术从木瓜叶中提取总酚,提取量较热回流提取法提高 13.23 mg/g。

因此,本研究通过单因素实验和响应面法优化超声辅助提取灵芝总酚(*Ganoderma lucidum* total phenols, GLTP)的工艺条件,采用超高效液相色谱-质谱/质谱(Ultra performance liquid chromatograph mass spectrometer, UPLC-QTOF-MS/MS)对 GLTP 进行酚类组成分析;依据 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基、羟基自由基(Hydroxyl radical, ·OH)清除率及铁

离子还原能力（Ferric reducing antioxidant power, FRAP）综合评价 GLTP 抗氧化活性；采用细胞实验，研究 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型的保护作用，为灵芝酚类物质在食品、保健品和医药等领域的进一步深入研究与利用提供理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与仪器

灵芝子实体　采自长春师范大学应用生态学研究所食药用菌栽培基地；PC12 细胞　购自中国科学院上海细胞生物研究所；福林酚、DPPH、ABTS、2,4,6-三吡啶基三嗪（TPTZ）、没食子酸（纯度≥98%）上海源叶生物科技有限公司；噻唑蓝溴化四唑（Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT）Biosharp 兰杰柯科技有限公司；乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase, LDH）试剂盒、活性氧（Reactive oxygen species, ROS）试剂盒、钙离子浓度试剂盒　上海碧云天生物技术股份有限公司；丙二醛（Malondialdehyde, MDA）含量试剂盒、超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）试剂盒、过氧化氢酶（Catalase, CAT）试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase, GSH-Px）试剂盒　南京建成生物工程研究所；无水乙醇　分析纯，天津市富宇精细化工有限公司；抗坏血酸（Vitamin C, $V_C$）　分析纯，天津天泰化学品有限公司。

Flex Station 3 型多功能读板器　美国 Molecular Devices 公司；N-1300V-WB 旋转蒸发仪　上海爱朗仪器有限公司；KQ-400DE 超声清洗仪　昆山市超声仪器有限公司；Excella ECO-170 细胞培养箱　美国 New Brunswick Scientific 公司；S40-SLIDER 倒置显微镜　德国 Leica 公司。

### 1.2　实验方法

1.2.1　GLTP 的制备　参照王战伟等[22] 的方法，稍作修改。灵芝子实体切片，50 ℃ 烘干至恒重，粉碎过 100 目筛，得到灵芝粉末，在 4 ℃ 密封保存。称取 1.0 g 灵芝粉末，按一定比例加入乙醇溶液，进行超声提取；12000 r/min 离心 5 min，取上清；残渣重提 1次，合并 2 次滤液；旋转蒸发浓缩，定容至 10 mL，4 ℃ 保存备用。

1.2.2　单因素实验　称取 1.0 g 灵芝粉末，分别考察不同超声功率（240、280、320、360、400 W）、乙醇浓度（50%、60%、70%、80%、90%）、液料比（30∶1、40∶1、50∶1、60∶1、70∶1 mL/g）和超声时间（30、60、90、120、150 min）对 GLTP 含量的影响。考察某一因素时，其他因素条件固定为：超声功率 280 W，乙醇浓度 80%，液料比 60∶1（mL/g），超声时间 60 min。

1.2.3　响应面试验　在单因素实验基础上，利用 Design-Expert 软件（13.01 版）设计 Box-Behnken 试验，以超声功率 A、乙醇浓度 B、液料比 C 及超声时间 D 为自变量，以 GLTP 含量为响应值，设计 4 因素 3 水平试验，见表 1。

表 1　响应面试验因素和水平

Table 1　Factors and levels of response surface test

| 水平 | 因素 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | A: 超声功率（W） | B: 乙醇浓度（%） | C: 液料比（mL/g） | D: 超声时间（min） |
| −1 | 240 | 70 | 50∶1 | 30 |
| 0 | 280 | 80 | 60∶1 | 60 |
| 1 | 320 | 90 | 70∶1 | 90 |

1.2.4　总酚含量的测定　采用福林酚法测定灵芝中总酚含量[23]。向 1.5 mL 离心管中依次加入 100 μL 浓缩液和 400 μL 福林酚试剂，再加入 1000 μL 质量分数 10% $Na_2CO_3$ 溶液，充分混匀后避光反应 30 min，于波长 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸为标准品绘制标准曲线，曲线方程为：y=0.9411x+0.0092，$R^2$=0.9993。总酚含量按公式（1）计算：

$$Y = \frac{c \times v \times n}{m} \qquad 式（1）$$

式中：Y 为总酚含量，mg/g；c 为提取液总酚浓度，mg/mL；v 为提取液总体积，mL；n 为稀释倍数；m 为灵芝粉末质量，g。

1.2.5　UPLC-QTOF-MS/MS 定性分析 GLTP 中酚类成分　运用 UPLC-QTOF-MS/MS 检测 GLTP 中的酚类物质[24]。将 1 mg GLTP 溶解于 1 mL 80% 甲醇溶液中，超声 30 min，常温 10000 r/min 离心 2 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜后上机测定。色谱条件：色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱（2.1×50 mm, 1.7 μm），进样量 2 μL，柱温为 35 ℃；流动相由溶剂 A（0.1% 甲酸水）和溶剂 B（0.1% 甲酸乙腈溶液）组成；流动相流速为 0.3 mL/min；流动相梯度洗脱设置：0~0.5 min, 95% A; 0.5~8 min, 60% A; 8~17 min, 100% B; 17~20 min, 95% A。质谱条件：ESI 离子源，正负离子模式扫描，质量扫描范围 m/z 100~3000；毛细管电压 3.5 kV；鞘气流速 8 L/min；离子传输管温度 320 ℃；雾化气体压力 35 psig；碰撞能量 10、20、40 eV。

1.2.6　GLTP 抗氧化活性的测定

1.2.6.1　DPPH 自由基的清除能力　参考杨观兰等[25] 的方法并稍加修改。配制 0.3 mmol/L DPPH 甲醇溶液及 0.1~5 mg/mL 样品溶液。设置反应孔（40 μL 样品+160 μL DPPH 溶液）、对照孔（40 μL 样品+160 μL 甲醇）、空白孔（40 μL 78% 乙醇+160 μL DPPH 溶液），设 $V_C$ 阳性对照。各孔混匀后避光反应 30 min，于 517 nm 测定吸光度，按公式（2）计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{反应} - A_{对照}}{A_{空白}}\right) \times 100 \qquad 式（2）$$

1.2.6.2　$ABTS^+$ 自由基的清除能力　参考范智义

等[26]方法并稍作修改。取 50 μL 不同浓度(0.1~5 mg/mL)的样品溶液,与 500 μL ABTS 工作液于避光条件下孵育 30 min,作为实验组($A_{反应}$);以等体积超纯水替代 $ABTS^+$工作液($A_{对照}$),以 50 μL 78% 乙醇溶液替代样品溶液($A_{空白}$),以 $V_C$ 作为阳性对照,在 734 nm 波长处测定吸光度,按公式(3)计算 $ABTS^+$自由基清除率。

$$ABTS^+自由基清除率(\%)=\left(1-\frac{A_{反应}-A_{对照}}{A_{空白}}\right)\times 100 \quad 式(3)$$

1.2.6.3 OH 自由基的清除能力 参考高建德等[27]的方法并稍作修改。配制 0.1~5 mg/mL 样品溶液,设置反应孔($A_{反应}$):50 μL 样品+100 μL $FeSO_4$(9 mmol/L)+100 μL $H_2O_2$(8.8 mmol/L)+100 μL 水杨酸(9 mmol/L);设 $A_{对照}$(等量超纯水代 $H_2O_2$)、$A_{空白}$(50 μL 78% 乙醇代样品);以 $V_C$ 作为阳性对照。各体系 37 ℃ 反应 30 min 后,于 510 nm 测定吸光度,依公式(4)计算·OH 清除率。

$$OH自由基清除率(\%)=\left(1-\frac{A_{反应}-A_{对照}}{A_{空白}}\right)\times 100 \quad 式(4)$$

1.2.6.4 铁离子还原能力(FRAP)测定 参考张鹤等[28]的方法并稍作修改。在 50 μL 样品溶液中加入 500 μL FRAP 工作液,以 $V_C$ 作为阳性对照,充分混匀,置于 37 ℃ 恒温水浴锅中孵育 10 min,在 593 nm 波长处测定吸光度。将所得吸光度数据代入 $Fe^{2+}$标准曲线方程(y=0.208x+0.113,$R^2$=0.9966)中计算对应 $Fe^{2+}$浓度,绘制出总还原力曲线。

1.2.7 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

1.2.7.1 GLTP 对 PC12 细胞氧化损伤形态学和活性的影响 将 PC12 细胞以 $1\times10^5$ 个/mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL,$CO_2$ 培养箱 37 ℃ 培养 24 h。实验分组:对照组(DMEM 培养基)、$H_2O_2$ 模型组(250 μmol/L $H_2O_2$)及不同剂量样品组(250 μmol/L $H_2O_2$+25、50、100 μg/mL GLTP)。其中,$H_2O_2$ 的浓度及 GLTP 的给药浓度均基于前期预实验筛选确定,能够有效诱导氧化损伤并反映 GLTP 的保护效应。每组 6 个平行,培养 24 h,在倒置显微镜下观察细胞形态并拍照,并采用 MTT 法检测细胞活性。

1.2.7.2 LDH 含量测定 细胞培养结束后,收集各孔培养液,400×g 离心 5 min,取上清液,按试剂盒说明书测定 LDH 含量。

1.2.7.3 ROS 含量和细胞内钙离子浓度测定 细胞培养结束后,弃掉上层培养基,按照试剂盒说明书测定 ROS 含量和细胞内钙离子浓度。

1.2.7.4 MDA 含量和抗氧化酶活性测定 细胞培养结束后,去掉各组培养液,用无菌 PBS 清洗 3 次,每孔加入裂解液,4 ℃ 摇床孵育 15 min。刮取细胞至离心管,超声破碎,12000 r/min 离心 5 min,取上清,按试剂盒说明测定 MDA 含量和 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性。

### 1.3 数据处理

每组实验重复 3 次,实验数据以平均值±标准差形式表示。采用 Design Expert 13.01 软件构建响应面回归模型并进行工艺参数优化分析,通过 Origin 2018 软件绘图,采用 SPSS 23.0 软件进行 $IC_{50}$ 值计算及单因素差异分析(ANOVA),$P$<0.05 表示具有统计学显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声功率对灵芝总酚含量的影响 由图 1A 可知,随着超声功率的增大,GLTP 含量增加;超声功率为 280 W 时,GLTP 含量达到最大值 3.44±0.01 mg/g($P$<0.05);后随着超声功率的增大,GLTP 含量下降。这可能是由于超声的空化效应改善溶剂与样品的接触,提高超声波功率可提高萃取效率和产率;然而,超声波功率过大会导致高温,进而降解热敏性酚类化合物,影响酚类物质萃取率[29]。根据结果,后续优化试验中超声功率的选取范围为 240~320 W。

2.1.2 乙醇浓度对灵芝总酚含量的影响 由图 1B 可知,随着乙醇浓度的增加,GLTP 含量先上升后下降($P$<0.05),当乙醇浓度为 80% 时,GLTP 含量最大,为 3.48±0.07 mg/g($P$<0.05)。这是由于低浓度乙醇难以破坏酚类物质与细胞壁成分的氢键及疏水作用,阻碍其释放;而高浓度乙醇虽渗透性增强,但杂质竞争性溶出,导致灵芝总酚相对含量下降,且可能引发酚类物质结构异构化或氧化降解,造成双重效率损失[30]。根据结果,后续优化试验中乙醇浓度的选取范围为 70%~90%。

2.1.3 液料比对灵芝总酚含量的影响 由图 1C 可知,随着液料比的增加,GLTP 的含量先升后降($P$<0.05);在 60∶1(mL/g)时 GLTP 含量最大,为 3.14±0.06 mg/g($P$<0.05)。这可能是因为在液料比为 60∶1(mL/g)时,酚类物质全部溶出;随着溶液比例的增大,提取量逐渐降低,并伴随着其他物质的溶出,阻碍了酚类物质的提取[31]。根据结果,后续优化试验中液料比的选取范围为 50∶1~70∶1 mL/g。

2.1.4 超声时间对灵芝总酚含量的影响 由图 1D 可知,随着提取时间延长,GLTP 含量先增加后下降($P$<0.05),超声时间为 60 min 时,含量最大为 3.25±0.05 mg/g($P$<0.05)。这是因为适宜的超声时间,空化效应促使细胞破裂和溶质扩散,溶质释放量随时间延长而增加;但超声时间过长,热效应使体系温度升高,引发热敏性酚类成分氧化降解及结构破坏,同时长时间超声作用可能产生过量自由基,进一步加剧功能成分的损失[32]。根据结果,后续优化试验中超声时间的选取范围为 50~70 min。

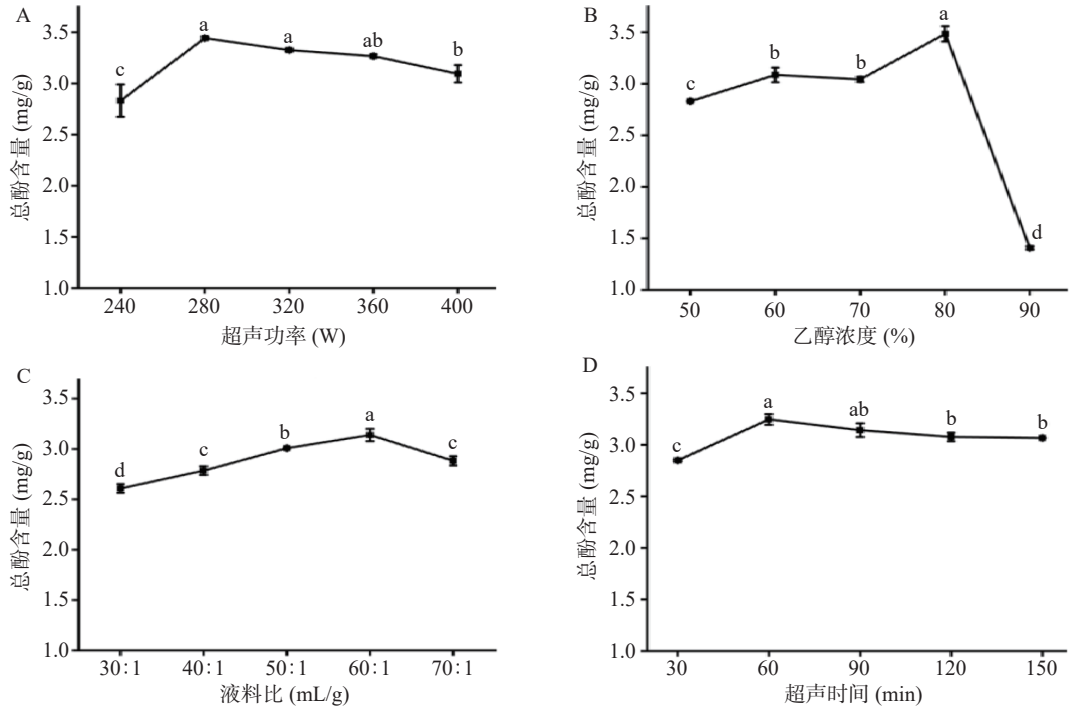



图 1　超声功率(A)、乙醇浓度(B)、液料比(C)、超声时间(D)对 GLTP 含量的影响

Fig.1　Effects of ultrasonic power (A), ethanol concentration (B), liquid-solid ratio (C), and ultrasonic time (D) on the content of GLTP

注：不同字母表示差异显著($P$<0.05)，图 4、图 6~图 7 同。

## 2.2　响应面优化试验结果

2.2.1　响应面试验设计与结果分析　以超声功率 A、乙醇浓度 B、液料比 C 和超声时间 D 为考察因素，采用 4 因素 3 水平试验设计对 GLTP 提取工艺进行了优化，响应面试验设计及结果见表 2。

采用 Box-Behnken 对总酚含量进行二次回归分析，建立多元二次响应面模型：$Y=4.426+0.0508A-0.7225B-0.0667C+0.2117D+0.0775AB-0.0225AC+0.0325AD-0.0675BC+0.2025BD+0.0000CD-0.2047A^2-0.7972B^2-0.3059C^2-0.4484D^2$。

灵芝总酚提取响应面试验方差分析结果如表 3 所示，总模型 $P$<0.0001，表明该统计模型极显著，具有统计学意义。失拟项检验结果 $P$=0.3534($P$>0.05)，表明预测值与实际值拟合度良好，模型误差小，适用于该体系分析[33−34]。$R^2$=0.9796，$R^2_{Adj}$=0.9592，表明实验方法有较高可信度，可用该模型来分析和预测 GLTP 的提取条件。通过各因素的 $F$ 值，可确定四因素对 GLTP 含量的影响程度依次为：B>D>C>A。

2.2.2　响应面交互作用分析　由表 3 可知，两两交互项中 BD 项显著($P$<0.05)，表明乙醇浓度与超声时间交互作用对灵芝多酚提取含量影响显著。响应曲面的曲率变化表征了不同实验变量对灵芝总酚提取效率的调控强度，响应曲面曲率越大，因素对结果的影响越大，反之则对结果影响越小[35]。图 2 中乙醇浓度-超声时间交互作用形成的曲面呈现显著曲率特征，该现象直观表明乙醇浓度-超声时间存在较为强烈的交互效应，与回归模型的方差分析结果一致。

表 2　响应面试验设计与结果

Table 2　Design and results of the response surface

| 实验号 | A 超声功率 (W) | B 乙醇浓度 (%) | C 液料比 (mL/g) | D 超声时间 (min) | 总酚含量 (mg/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 240 | 70 | 60:1 | 60 | 4.31±0.07 |
| 2 | 320 | 70 | 60:1 | 60 | 4.15±0.07 |
| 3 | 240 | 90 | 60:1 | 60 | 2.64±0.05 |
| 4 | 320 | 90 | 60:1 | 60 | 2.79±0.10 |
| 5 | 280 | 80 | 50:1 | 30 | 3.59±0.04 |
| 6 | 280 | 80 | 70:1 | 30 | 3.52±0.05 |
| 7 | 280 | 80 | 50:1 | 90 | 3.92±0.05 |
| 8 | 280 | 80 | 70:1 | 90 | 3.85±0.05 |
| 9 | 240 | 80 | 60:1 | 30 | 3.54±0.02 |
| 10 | 320 | 80 | 60:1 | 30 | 3.67±0.05 |
| 11 | 240 | 80 | 60:1 | 90 | 3.94±0.05 |
| 12 | 320 | 80 | 60:1 | 90 | 4.20±0.07 |
| 13 | 280 | 70 | 50:1 | 60 | 4.04±0.07 |
| 14 | 280 | 90 | 50:1 | 60 | 2.91±0.04 |
| 15 | 280 | 70 | 70:1 | 60 | 4.00±0.02 |
| 16 | 280 | 90 | 70:1 | 60 | 2.60±0.03 |
| 17 | 240 | 80 | 50:1 | 60 | 3.80±0.06 |
| 18 | 320 | 80 | 50:1 | 60 | 3.96±0.02 |
| 19 | 240 | 80 | 70:1 | 60 | 3.69±0.01 |
| 20 | 320 | 80 | 70:1 | 60 | 3.76±0.03 |
| 21 | 280 | 70 | 60:1 | 30 | 3.81±0.01 |
| 22 | 280 | 90 | 60:1 | 30 | 1.85±0.05 |
| 23 | 280 | 70 | 60:1 | 90 | 3.88±0.02 |
| 24 | 280 | 90 | 60:1 | 90 | 2.73±0.02 |
| 25 | 280 | 80 | 60:1 | 60 | 4.52±0.09 |
| 26 | 280 | 80 | 60:1 | 60 | 4.50±0.07 |
| 27 | 280 | 80 | 60:1 | 60 | 4.21±0.02 |
| 28 | 280 | 80 | 60:1 | 60 | 4.45±0.08 |
| 29 | 280 | 80 | 60:1 | 60 | 4.45±0.04 |

表 3 响应面试验方差分析

Table 3 Analysis of variance of response surface experiment

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | $F$值 | $P$值 | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | 11.90 | 14 | 0.8498 | 39.98 | <0.0001 | ** |
| A | 0.0310 | 1 | 0.0310 | 1.42 | 0.2528 | |
| B | 6.26 | 1 | 6.26 | 287.36 | <0.0001 | ** |
| C | 0.0533 | 1 | 0.0533 | 2.45 | 0.1401 | |
| D | 0.5376 | 1 | 0.5376 | 24.66 | 0.0002 | ** |
| AB | 0.0240 | 1 | 0.0240 | 1.10 | 0.3116 | |
| AC | 0.0020 | 1 | 0.0020 | 0.0929 | 0.7650 | |
| AD | 0.0042 | 1 | 0.0042 | 0.1938 | 0.6665 | |
| BC | 0.0182 | 1 | 0.0182 | 0.8361 | 0.3760 | |
| BD | 0.1640 | 1 | 0.1640 | 7.52 | 0.0159 | * |
| CD | 0.0000 | 1 | 0.0000 | 0.0000 | 1.0000 | |
| $A^2$ | 0.2717 | 1 | 0.2717 | 12.46 | 0.0033 | ** |
| $B^2$ | 4.12 | 1 | 4.12 | 189.10 | <0.0001 | ** |
| $C^2$ | 0.6070 | 1 | 0.6070 | 27.85 | 0.0001 | ** |
| $D^2$ | 1.30 | 1 | 1.30 | 59.83 | <0.0001 | ** |
| 残差 | 0.3050 | 14 | 0.0218 | | | |
| 失拟项 | 0.2431 | 10 | 0.0243 | 1.57 | 0.3534 | |
| 纯误差 | 0.0621 | 4 | 0.0155 | | | |
| 总差 | 12.20 | 28 | | | | |
| $R^2$=0.9796 | $R^2_{adj}$=0.9592 | | | | | |

注: *表示差异显著($P$<0.05); **表示差异极显著($P$<0.01)。

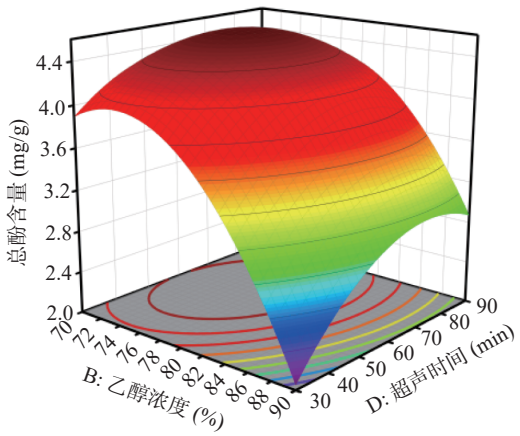



图 2 乙醇浓度-超声时间交互作用的三维响应面图

Fig.2 Three-dimensional response surface of the interaction between ethanol concentration and ultrasonic time

2.2.3 最佳提取条件及验证实验 通过分析软件, 获得的理论最优参数为: 超声功率 287.262 W、乙醇浓度 77.826%、液料比 59.985∶1 mL/g、超声时间 61.555 min; 在此条件下, 灵芝总酚含量为 4.55 mg/g。为便于实际操作, 将参数调整为: 超声功率 280 W、乙醇浓度 78%、液料比 60∶1 mL/g、超声时间 62 min; 在此条件下进行三次平行实验验证, 测得灵芝总酚含量为 4.52±0.09 mg/g, 相对误差为 0.66%。检测灵芝提取物中总酚含量, 为 100.42±0.60 mg/g, 显著高于 Mousavi 等[36] 研究中灵芝提取物的总酚含量(36.6989 mg/g)。实验结果表明, 该优化条件具有显著的可靠性和重现性, 可作为灵芝总酚提取工艺的最佳参数组合。

## 2.3 灵芝总酚组分成分分析

通过 UPLC-QTOF-MS/MS 对灵芝总酚提取物进行分析, 总离子色谱图如图 3 所示。根据搜库结果共鉴定出 8 种物质, 以多酚类为主, 含 6 种多酚类和 2 种非多酚类。6 种多酚类分别为 3,5-二羟基苯基 1-O-(6-O-没食子酰基-$\beta$-D-吡喃葡萄糖苷)、龙胆酸、2,6-双(1,1-二甲基乙基)-4-((4-氯-6-(3,5-双(1,1-二甲基乙基)-4-羟基苯胺基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)苯酚、2',4',6',3,4-五羟基-3'-香叶酰-5-异戊二氢查尔酮、包山油柑酚和 1,2,3,4-四氢-1-[1-羟基-3-(4-羟基苯基)-2-丙烯基 ]-7-甲氧基-2,6-萘二醇(图 3); 各酚类化合物的名称、分子式、质荷比及保留时间等见表 4。目前, 灵芝中的主要酚类物质有龙胆酸、槲皮素、原儿茶酸和丁香酸等[5,11,37]; 来自塞尔维亚北部的灵芝中检测到了龙胆酸等酚类物质, 在抗氧化应激和乙酰胆碱缺乏症方面具有潜在治疗用途[38]; 除了龙胆酸, 本研究还检测出另外 7 种酚类物质存在于灵芝中, 这可能是由于提取方法差异、灵芝品种不同及检测方法不同等原因[39]。

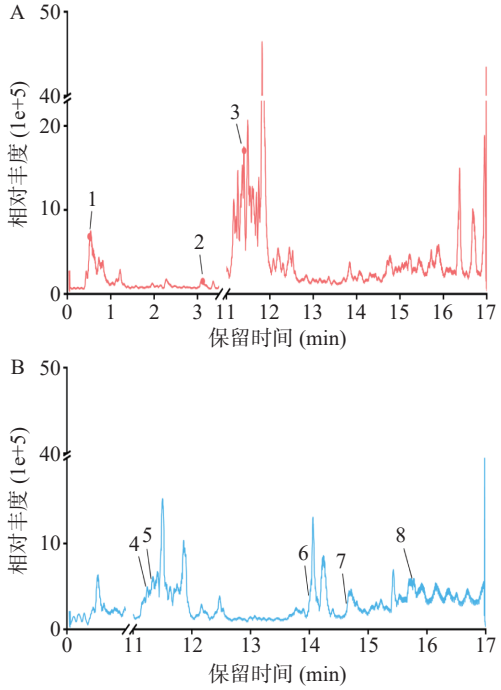



图 3 灵芝总酚样品的总离子流图

Fig.3 Total ion flow plot of total phenol sample from *Ganoderma lucidum*

注: A: 正离子模式下的总离子流图; B: 负离子模式下的总离子流图; 1.3,5-二羟基苯基 1-O-(6-O-没食子酰基-$\beta$-D-吡喃葡萄糖苷); 2.龙胆酸; 3.2,6-双(1,1-二甲基乙基)-4-((4-氯-6-(3,5-双(1,1-二甲基乙基)-4-羟基苯胺基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)苯酚; 4.2', 4', 6', 3,4-五羟基-3'-香叶酰-5-异戊二氢查尔酮; 5.包山油柑酚; 6.1,2,3,4-四氢-1-[1-羟基-3-(4-羟基苯基)-2-丙烯基 ]-7-甲氧基-2,6-萘二醇; 7.[7]-帕拉多尔; 8.桉醇厚朴酚。

## 2.4 GLTP 体外抗氧化活性测定

2.4.1 GLTP 对 DPPH 自由基的清除能力 DPPH 溶液在甲醇溶液中显示紫色, 最大吸收波长为 517 nm; 抗氧化剂可与其反应, 使吸光度降低, 从而

表 4　灵芝酚类提取物主要物质鉴定结果

Table 4　Identification results of main substances of *Ganoderma lucidum* phenolic extracts

| 序号 | 保留时间（min） | m/z | 误差（×10⁶） | 分子式 | 化合物 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.512 | 439.0881 | −0.71 | $C_{19}H_{20}O_{12}$ | 3,5-二羟基苯基 1-O-(6-O-没食子酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷)<br>3,5-Dihydroxyphenyl 1-O-(6-O-galloyl-beta-D-glucopyranoside) |
| 2 | 3.122 | 153.0204 | 7.12 | $C_7H_6O_4$ | 龙胆酸<br>Gentisic acid |
| 3 | 11.408 | 1145.6066 | 0.01 | $C_{31}H_{44}ClN_5O_2$ | 2,6-双(1,1-二甲基乙基)-4-((4-氯-6-(3,5-双(1,1-二甲基乙基)-4-羟基苯胺基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)苯酚<br>2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-((4-chloro-6-(3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyanilino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)phenol |
| 4 | 11.266 | 495.2747 | 0.93 | $C_{30}H_{38}O_6$ | 2',4',6',3,4-五羟基-3'-香叶酰-5-异戊二氢查尔酮<br>2',4',6',3,4-Pentahydroxy-3'-geranyl-5-prenyldihydrochalcone |
| 5 | 11.316 | 555.2953 | 0.01 | $C_{32}H_{42}O_8$ | 包山油柑酚<br>Acrovestone |
| 6 | 13.994 | 365.1369 | 2.60 | $C_{20}H_{22}O_5$ | 1,2,3,4-四氢-1-[1-羟基-3-(4-羟基苯基)-2-丙烯基]-7-甲氧基-2,6-萘二醇<br>1,2,3,4-Tetrahydro-1-[1-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenyl]-7-methoxy-2,6-naphthalenediol |
| 7 | 14.636 | 315.1936 | 2.00 | $C_{18}H_{28}O_3$ | [7]-帕拉多尔<br>[7]-Paradol |
| 8 | 15.798 | 522.3567 | -2.32 | $C_{33}H_{44}O_4$ | 桉醇厚朴酚<br>Eudesobovatol A |

用于评估抗氧化能力[40]。如图 4A 所示，GLTP 与 DPPH 自由基清除率存在剂量依赖关系，当浓度达到 5 mg/mL 时，清除效率高达 91.47%±0.68%，与 $V_C$ 对 DPPH 自由基的清除能力相当；经过线性拟合，GLTP 对 DPPH 自由基清除能力的 $IC_{50}$ 值为 0.6536 mg/mL。徐雪峰等[41]测得蒲公英叶多酚的清除 DPPH 自由基的 $IC_{50}$ 值为 0.76 mg/mL，在较低浓度时上升较快，一定浓度后趋于平缓，直至达到最强的清除能力，本文研究结果与之一致，可见灵芝总酚对 DPPH 自由基具有较好的清除能力。

2.4.2　GLTP 对 $ABTS^+$自由基的清除能力　$ABTS^+$自由基作为氧化物酶底物，氧化后生成蓝绿色产物；抗氧化剂可还原该显色基团，导致溶液褪色且吸光度下降，因此，可通过分光光度法测定吸光度衰减，精准量化抗氧化效能[42]。如图 4B 所示，GLTP 的 $ABTS^+$自由基清除能力具有明显的浓度依赖性，当 GLTP 质量浓度达 5 mg/mL 时，$ABTS^+$自由基清除率达到 99.94%±0.04%，$IC_{50}$ 值为 1.087 mg/mL，与 $V_C$ 对 $ABTS^+$自由基的清除能力相当。李国巍等[43]测得胡萝卜脯多酚清除 $ABTS^+$自由基的 $IC_{50}$ 为 11.64 mg/mL，其 $IC_{50}$ 值是灵芝总酚的 10.7 倍，表明灵芝总酚的清除能力显著更优。

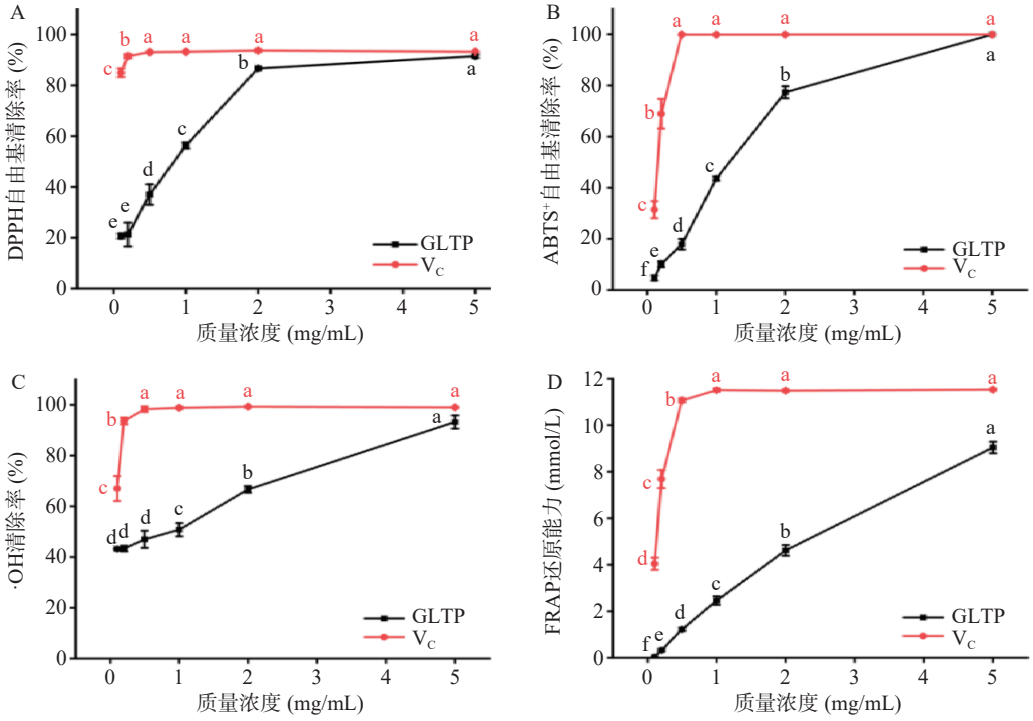



图 4　GLTP 对 DPPH(A)、$ABTS^+$(B)、OH(C)自由基的清除率和 FRAP 还原能力(D)

Fig.4　Scavenging activities of GLTP on DPPH (A), $ABTS^+$ (B), OH (C) free radical and FRAP reducing power (D)

2.4.3 GLTP 对 OH 自由基的清除能力 在 $H_2O_2$/$Fe^{2+}$诱导的芬顿反应体系中，·OH 的生成可通过邻二氮菲-$Fe^{3+}$配合物的特征吸光度变化进行监测；当体系中引入·OH 清除剂时，其能有效猝灭反应产生的·OH，导致邻二氮菲-$Fe^{3+}$配合物浓度降低，进而引起吸光度值的显著变化[40]。如图 4C 所示，GLTP 和 $V_C$ 对·OH 的清除能力均呈现浓度依赖性增强趋势，当 GLTP 浓度达到 5 mg/mL 时，其对·OH 的清除效率达到峰值 93.25%±2.62%，$IC_{50}$ 值为 0.3734 mg/mL，与 $V_C$ 对 OH 自由基的清除能力相当；张强等[44] 测得六堡茶茶多酚清除·OH 的 $IC_{50}$ 值为 1.19 mg/mL，显著高于灵芝总酚清除·OH 的 $IC_{50}$ 值，表明灵芝酚类提取物清除·OH 的能力更强。

2.4.4 GLTP 对 FRAR 的影响 酚类物质的抗氧化活性与还原力密切相关，还原力越强，其抗氧化活性越好[45]。如图 4D 所示，在 0.1~5 mg/mL 范围内，GLTP 的 FRAP 还原能力呈上升趋势。当质量浓度为 5 mg/mL 时，GLTP 和 $V_C$ 的 FRAP 值分别为 9.04±0.25 mmol/L 和 11.53±0.04 mmol/L，说明 GLTP 具有较强的还原能力，但弱于 $V_C$。

### 2.5 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

2.5.1 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞形态学和活性的影响 形态学观察结果如图 5A 所示，与对照组相比，$H_2O_2$ 损伤组细胞数量明显减少，神经元突起发生断裂；随着 GLTP 浓度递增，神经突触延伸逐渐恢复；GLTP 在 100 μg/mL 浓度时，神经元细胞形态完整，细胞数量增多，其神经保护作用最明显。细胞活力结果如图 5B 所示，与对照组相比，$H_2O_2$ 损伤组 PC12 细胞存活率降低到 50.73%±9.28%；与损伤组相比，随着 GLTP 浓度的升高，PC12 细胞活力分别为 64.11%±10.12%、76.65%±8.98%、81.11%±6.23%；GLTP 浓度为 100 μg/mL 时，PC12 细胞活力最高。表明 GLTP 可改善 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤中的活性，浓度为 100 μg/mL 时保护作用最佳。

2.5.2 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放的影响 LDH 是广泛存在于细胞质中的可溶性酶，当细胞膜受损时，LDH 会释放至细胞外，因此，通过检测培养上清液中 LDH 的活性水平，可有效评估细胞损伤程度[46−47]。结果如图 6A 所示，与对照组相比较，损伤组的 LDH 释放量升高至 224.48%±9.27%；当用 25、50、100 μg/mL GLTP 处理时，LDH 释放分别降低为 195.82%±2.52%、171.17%±2.03% 和 158.10%±5.41%，与甜菜碱苷通过降低 LDH 水平减轻 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞损伤机制相似[48]，这表明 GLTP 具有改善细胞膜受损的能力，有效抑制 LDH

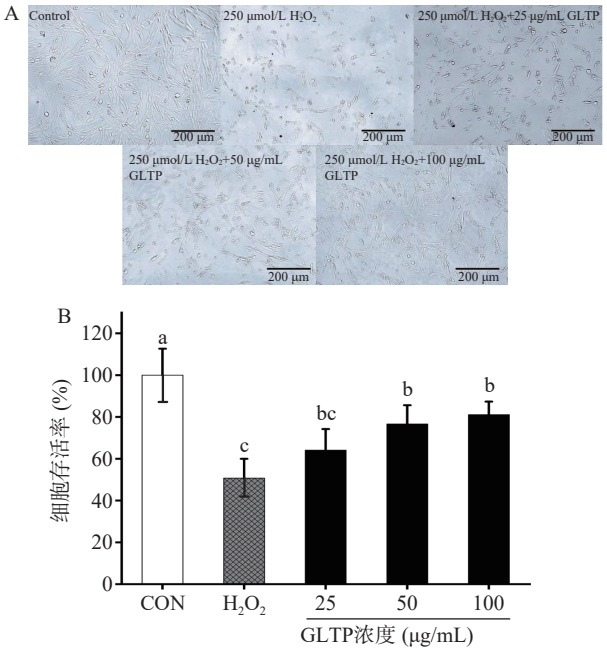



图 5 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞的形态学(A)和活性(B)的影响

Fig.5 Effects of GLTP on morphology (A) and activity (B) of PC12 cells induced by $H_2O_2$

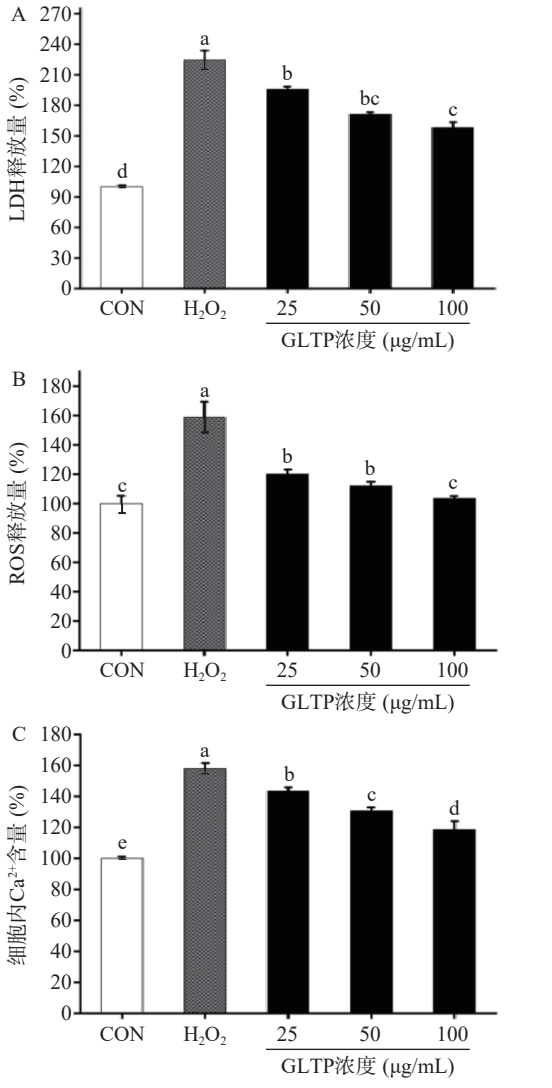



图 6 GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导 PC12 细胞的 LDH 释放量(A)、ROS 释放量(B)和 $[Ca^{2+}]_i$(C)的影响

Fig.6 Effects of GLTP on LDH release (A), ROS release (B) and $[Ca^{2+}]_i$ (C) in $H_2O_2$-induced PC12 cells

外泄，进而发挥神经保护效应。

2.5.3　GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞 ROS 释放的影响　ROS 是细胞代谢产生的高活性自由基，其过量积累可致生物大分子过氧化损伤，影响细胞存活，因此，测定 ROS 水平可反映细胞氧化损伤程度[49]。结果如图 6B 所示，$H_2O_2$ 诱导的氧化应激导致细胞 ROS 含量显著升高至 158.79%±10.60%；当用 25、50、100 μg/mL GLTP 处理时，ROS 含量降低至 120.12%±3.15%、112.13%±2.78%、103.63%±1.51%。根据 Wang 等[50] 的研究，丹参醇提物可通过调节 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型中 ROS 水平，增强细胞的抗氧化能力。本研究取得相似结果，发现灵芝总酚同样能够有效调控该模型的 ROS 水平，充分说明其在清除过量 ROS、减轻细胞氧化应激方面具有显著功效。

2.5.4　GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞内钙离子含量的影响　$Ca^{2+}$内流是细胞内 ROS 升高的主因之一，同时 ROS 可反作用于细胞 $Ca^{2+}$浓度，通过膜损伤加剧钙内流，形成正反馈循环[46]。图 6C 表明，损伤组 $[Ca^{2+}]_i$ 水平较对照组升高至 157.94%±3.62%，经 GLTP 处理后，浓度依赖性降至 143.47%±2.40%、130.74%±2.21% 和 118.62%±5.41%。Choi 等[51] 的研究已证实，在 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型中，橙皮苷能够有效调节 $[Ca^{2+}]_i$ 水平，显著减轻细胞内 $Ca^{2+}$超载情况。与之相似，本研究发现 GLTP 同样具备降低 $[Ca^{2+}]_i$ 的功效，通过调控细胞内外 $Ca^{2+}$平衡，维持细胞内环境稳定，对神经细胞具有保护作用。

2.5.5　GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞内 MDA 含量和抗氧化酶活性的影响　丙二醛（MDA）由脂质过氧化产生，可用于反映细胞的氧化损伤水平，细胞内 MDA 水平升高会加剧氧化损伤级联反应[52]。从图 7A 可知，相较于对照组，损伤组 MDA 水平攀升至 10.28±0.37 nmol/mg protein，经 100 μg/mL GLTP 处理后，浓度依赖性地降至 6.91±0.38 nmol/mg protein。酶类抗氧化剂（如 SOD、CAT、GSH-Px）是机体抗氧化系统的核心，SOD 催化超氧阴离子转化为氧气和 $H_2O_2$，抵御氧化应激；CAT 广泛分布于需氧生物中，高效分解 $H_2O_2$ 为水和氧气；GSH-Px 可分解 $H_2O_2$ 及有机氢过氧化物、清除脂质过氧化物，其活性与细胞损伤、缺氧、衰老相关，是评估抗氧化能力的重要指标[53−54]。实验结果（图 7B~图 7D）显示，$H_2O_2$ 诱导的氧化应激致使细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性显著下降至 2.67±0.99、1.68±0.16、536.11±54.53 U/mg protein；而经 100 μg/mL GLTP 处理后，三种抗氧化酶活性增加至 6.59±0.43、3.20±0.09、757.03±23.96 U/mg protein，展现出显著的抗氧化修复效果。Jing 等[55] 发现，100 μg/mL 杜鹃花总酚可显著降低 $H_2O_2$ 诱导氧化应激的 PC12 细胞模型中 MDA 含量，同时提升 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性，本研究结果与之一致。

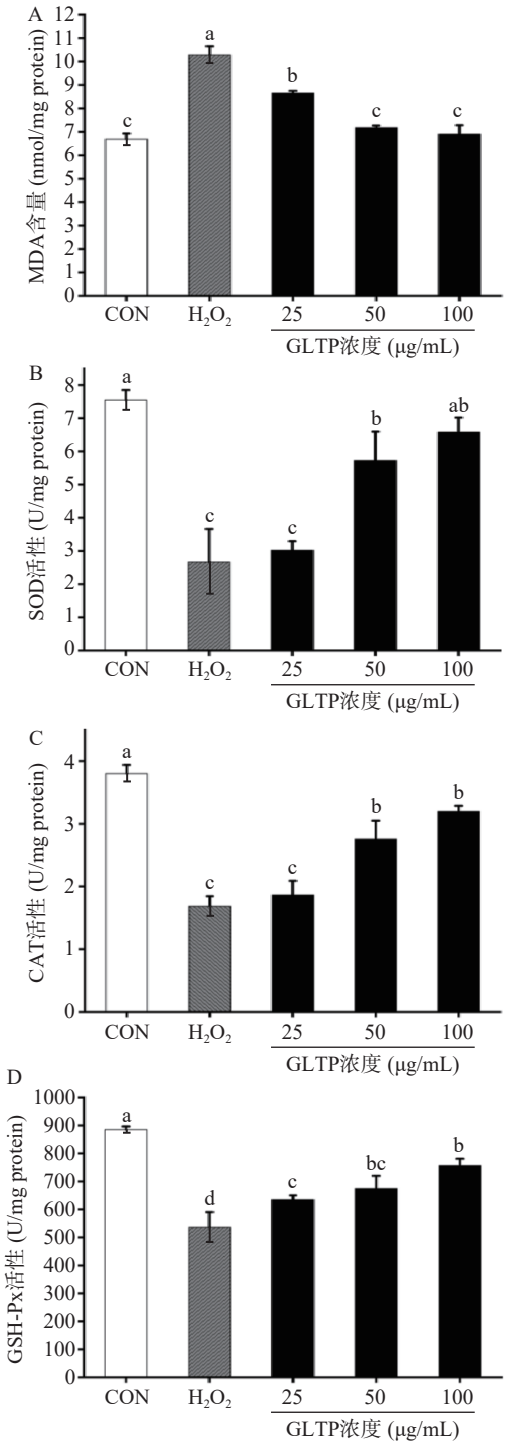



图 7　GLTP 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞内 MDA 含量（A）和 SOD（B）、CAT（C）、GSH-Px（D）活性的影响

Fig.7　Effects of GLTP on MDA content (A) and SOD (B), CAT (C), and GSH-Px (D) activities in $H_2O_2$-induced PC12 cells

## 3　结论

本研究采用响应面法对灵芝总酚提取工艺进行优化，确定最佳工艺参数：超声功率 280 W、乙醇浓度 78%、液料比 60∶1 mL/g）、超声时间 62 min。在该条件下，灵芝总酚含量达 4.52±0.09 mg/g，在提取物中总酚含量为 100.42±0.60 mg/g。经 UPLC-QTOF-

MS/MS 共鉴定出 8 种酚类物质，包括龙胆酸、包山油柑酚和桉醇厚朴酚等。体外抗氧化活性分析表明，灵芝总酚对 DPPH 自由基、$ABTS^{+}$自由基及羟基自由基均表现出有效的清除能力，同时展现出良好的铁还原能力。灵芝总酚可使 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞的活性上升，LDH 含量、ROS 水平和 $[Ca^{2+}]_i$ 下降，MDA 含量下降和抗氧化酶活性上升，对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用。本研究优化了超声辅助提取工艺，并证实了灵芝酚类物质的抗氧化能力与神经保护作用，有助于灵芝酚类物质的深入研究和在食品领域中的应用。后期研究中，需进一步对灵芝酚类物质分离、纯化，探究其单体活性及构效关系，为灵芝酚类物质的开发应用提供理论基础和数据支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献


［1］ 王美丹, 胡扬, 宋辉, 等. 灵芝孢子粉化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2023, 54(23): 7918−7933. ［WANG Meidan, HU Yang, SONG Hui, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum* spore and prediction analysis of quality marker[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(23): 7918−7933.］

［2］ SHAO Hongjie, LI Ye, WU Changhui, et al. Triterpenes from antler-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* and their hepatoprotective activities[J]. Phytochemistry, 2024, 224: 114148.

［3］ SHEN Shuangfei, ZHU Lifang, WU Zijing, et al. Extraction of triterpenoid compounds from *Ganoderma lucidum* spore powder through a dual-mode sonication process[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2020, 46(6): 963−974.

［4］ WU Sijia, ZHANG Siyuan, PENG Bo, et al. *Ganoderma lucidum*: A comprehensive review of phytochemistry, efficacy, safety and clinical study[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(2): 568−596.

［5］ KOLNIAK-OSTEK J, OSZMIAŃSKI J, SZYJKA A, et al. Anticancer and antioxidant activities in *Ganoderma lucidum* wild mushrooms in Poland, as well as their phenolic and triterpenoid compounds[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 9359.

［6］ 罗云, 陈霖, 张雪涟, 等. 灵芝三萜类成分药理活性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9): 1185−1188. ［LUO Yun, CHEN Lin, ZHANG Xuelian, et al. Research progress on pharmacological activities of triterpenes from *Ganoderma lucidum*[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2021, 37(9): 1185−1188.］

［7］ ABDELMOATY A A A, CHEN Jing, ZHANG Kun, et al. Senolytic effect of triterpenoid complex from *Ganoderma lucidum* on adriamycin-induced senescent human hepatocellular carcinoma cells model *in vitro* and *in vivo*[J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1422363.

［8］ 杜小琴, 夏炎, 张万超, 等. 不同提取方法的灵芝多糖体外抗炎活性比较[J]. 中国食品学报, 2025, 25(2): 124−133. ［DU Xiaoqin, XIA Yan, ZHANG Wanchao, et al. Comparison of anti-inflammatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides *in vitro* by different extraction methods[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(2): 124−133.］

［9］ ZHONG Yuanbo, TAN Pingping, LIN Huanglong, et al. A review of *Ganoderma lucidum* polysaccharide: Preparations, structures, physicochemical properties and application[J]. Foods, 2024, 13(17): 2665.

［10］ SHORI A B. Storage quality and antioxidant properties of yogurt fortified with polyphenol extract from nutmeg, black pepper, and white pepper[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2022, 57: 24−30.

［11］ DONG Qingying, HE Dujuan, NI Xudong, et al. Comparative study on phenolic compounds, triterpenoids, and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* affected by different drying methods[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(4): 3198−3205.

［12］ SINGH A, KUKRETI R, SASO L, et al. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1583.

［13］ SCARIAN E, VIOLA C, DRAGONI F, et al. New insights into oxidative stress and inflammatory response in neurodegenerative diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(5): 2698.

［14］ JIA Yanjun, WANG Yanping, WANG Zixia, et al. Neuroprotective effects of total phenolics from *Hemerocallis citrina* Baroni leaves through the PI3K/AKT pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1370619.

［15］ GAO Shunhua, ZHAO Tianrui, LIU Yaping, et al. Phenolic constituents, antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts of fruits, leaves and flower buds from *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131752.

［16］ ALIAÑO-GONZÁLEZ M J, BAREA-SEPÚLVEDA M, ESPADA-BELLIDO E, et al. Ultrasound-assisted extraction of total phenolic compounds and antioxidant activity in mushrooms[J]. Agronomy, 2022, 12(8): 1812.

［17］ 杨天友, 孙秋婷, 王琴, 等. 响应面超声波法提取藤茶多酚工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(6): 77−80. ［YANG Tianyou, SUN Qiuting, WANG Qin, et al. Optimization of extraction process of tea polyphenols from *Ampelopsis grossedentata* by response surface ultrasonic assisted method[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(6): 77−80.］

［18］ ZHANG Yanyan, ZHANG Siqi, YANG Xiaojuan, et al. Enhancing the fermentation performance of frozen dough by ultrasonication: Effect of starch hierarchical structures[J]. Journal of Cereal Science, 2022, 106: 103500.

［19］ ZHONG Xuanyu, ZHANG Shuyan, WANG Hong, et al. Ultrasound-alkaline combined extraction improves the release of bound polyphenols from pitahaya (*Hylocereus undatus* 'Foo-Lon') peel: Composition, antioxidant activities and enzyme inhibitory activity[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 90: 106213.

［20］ GUEFFAI A, GONZALEZ-SERRANO D J, CHRISTODOULOU M C, et al. Phenolics from defatted black cumin seeds (*Nigella sativa* L.): Ultrasound-assisted extraction optimization, comparison, and antioxidant activity[J]. Biomolecules, 2022, 12(9): 1311.

［21］ HOU Mengyang, LIN Chengyuan, ZHU Lin, et al. Phenolics from *Chaenomeles speciosa* leaves: Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction, adsorptive purification, UPLC-QqQ-MS/MS quantification, and bioactivity assessment[J]. Ultrasonics Sono-

chemistry, 2025, 114: 107282.
［22］ 王战伟, 陈佳慧, 庞舒月, 等. 人工栽培暴马桑黄多糖提取工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(3): 121−129. ［WANG Zhanwei, CHEN Jiahui, PANG Shuyue, et al. Optimization of extraction process of polysaccharide from artificially cultivated *Sanghuangporus baumii* and its antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2024, 35(3): 121−129.］
［23］ 刘佳怡, 黄磊磊, 王天怡, 等. 超声协同低共熔溶剂提取紫丁香花多酚工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 171−179. ［LIU Jiayi, HUANG Leilei, WANG Tianyi, et al. Optimization of *Syringa oblata* Lindl. Flower for extraction of polyphenols by ultrasound-assisted deep eutectic solvents and analysis of antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 171−179.］
［24］ CHE Haixia, ZHANG Rui, WANG Xianyao, et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Phyllanthi fructus*: Comprehensive insights from extraction optimization and antioxidant activity[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2024, 111: 107083.
［25］ 杨观兰, 钟朝玲, 张强, 等. 响应面优化南酸枣叶总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(9): 133−137. ［YANG Guanlan, ZHONG Chaoling, ZHANG Qiang, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Choerospondias axillaris* leaves by response surface methodology and analysis of antioxidant activity[J]. Cereals & Oils, 2022, 35(9): 133−137.］
［26］ 范智义, 李晓琳, 李巨秀. 桑椹提取物中酚类化合物的抗氧化及抗糖基化活性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 19−26. ［FAN Zhiyi, LI Xiaolin, LI Juxiu. Antioxidant and antiglycation activities of phenolic compounds extracted from mulberry fruits[J]. Food Science, 2016, 37(17): 19−26.］
［27］ 高建德, 宋开蓉, 朱晓玉, 等. 复方苡蓉颗粒总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(7): 1496−1500. ［GAO Jiande, SONG Kairong, ZHU Xiaoyu, et al. Extraction optimization for total flavonoids from Compound Congrong Granules and the *in vitro* antioxidant activity[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(7): 1496−1500.］
［28］ 张鹤, 张莹, 杨逢建, 等. 向日葵茎髓醇提物中不同溶剂萃取部位总酚、总黄酮含量与抗氧化活性的相关性[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 54−59. ［ZHANG He, ZHANG Ying, YANG Fengjian, et al. Correlation between total phenols and total flavonoids contents and antioxidant activity of different fractions from ethanol extract of sunflower stalk pith[J]. Food Science, 2018, 39(15): 54−59.］
［29］ ZHENG Bailiang, YUAN Yuan, XIANG Jinle, et al. Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivities[J]. Lwt, 2022, 154: 112740.
［30］ 王君, 高文彬, 陈新, 等. 响应面法优化金丝皇菊多酚提取工艺及其抗氧化活性评价[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(1): 79−84. ［WANG Jun, GAO Wenbin, CHEN Xin, et al. Optimization of extraction process of polyphenols from *Dendranthema morifolium* by response surface methodology and its antioxidant activity evaluation[J]. Cereals & Oils, 2024, 37(1): 79−84.］
［31］ BELWAL T, DHYANI P, BHATT I D, et al. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM)[J]. Food Chemistry, 2016, 207: 115−124.
［32］ 赫金凤, 吴翠平. 高良姜茎叶总黄酮超声提取工艺优化及生物活性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(12): 79−82. ［HE Jinfeng, WU Cuiping. Optimization of ultrasonic extraction process and research on biological activity of total flavonoids from the stems and leaves of *Alpinia officinarum* hance[J]. China Condiment, 2023, 48(12): 79−82.］
［33］ 李泽林, 李梦月, 赵春燕, 等. 云南小粒咖啡果皮果胶酶提取工艺的优化及其结构表征[J]. 中国调味品, 2022, 47(10): 12−17. ［LI Zelin, LI Mengyue, ZHAO Chunyan, et al. Optimization of enzymatic extraction process of pectin from Yunnan *Coffea Arabica* peel and its structural characterization[J]. China Condiment, 2022, 47(10): 12−17.］
［34］ MAHESH J S, SARANYA S, BALAKRISHNARAJA R, et al. Influence of extraction techniques on biologically enriched raw soursop fruit and comparative evaluation by response surface methodology and artificial neural network[J]. Food and Humanity, 2024, 2: 100216.
［35］ 陈颢予, 林娟, 余群力, 等. 高粱茎秆提取物对冷鲜牛肉保鲜效果的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2022, 57(1): 178−187. ［CHEN Haoyu, LIN Juan, YU Qunli, et al. Effect of sorghum stalk extract on preservation of chilled beef[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2022, 57(1): 178−187.］
［36］ MOUSAVI R S, NATEGHI L, SOLTANI M, et al. Optimization of the phenolics and antioxidants extraction from *Ganoderma lucidum* using ultrasound method[J]. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2022, 41(4): 1275−1287.
［37］ OLUDEMI T, BARROS L, PRIETO M A, et al. Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from *Ganoderma lucidum*: Optimization study using the response surface methodology[J]. Food & Function, 2018, 9(1): 209−226.
［38］ RAŠETA M, MIŠKOVIĆ J, KRSMANOVIĆ N, et al. Exploring the bioactivity potential of indigenous *Ganoderma* species from Northern Serbia: Insights into antioxidant and anti-acetylcholinesterase properties[J]. Natural Product Research, 2026, 40(5): 1149−1160.
［39］ PANG Daorui, YOU Lijun, LI Tong, et al. Phenolic profiles and chemical- or cell-based antioxidant activities of four star fruit (*Averrhoa carambola*) cultivars[J]. RSC Advances, 2016, 6(93): 90646−90653.
［40］ 王晶, 时东方, 黄琳, 等. 微孔读板法快速评价桑黄提取物抗氧化活性[J]. 中国食品添加剂, 2017, 28(8): 197−200. ［WANG Jing, SHI Dongfang, HUANG Lin, et al. Studies on the antioxidant activities of extract from *Phellinus igniarius* by Molecular Devices[J]. China Food Additives, 2017, 28(8): 197−200.］
［41］ 徐雪峰, 闫浩, 杜金凤, 等. 蒲公英叶和茎中多酚、多糖类成分解析及抗氧化、抗菌活性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(8): 182−190. ［XU Xuefeng, YAN Hao, DU Jinfeng, et al. Component analysis of dandelion leaf and stem polyphenol and polysaccharide as well as their antioxidation and antibacterial functions[J]. Food Research and Development, 2025, 46(8): 182−190.］
［42］ 马嘉洁, 赵端端, 全世航, 等. 紫苏叶黄酮、多酚提取工艺优化及不同品种抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 344−352. ［MA Jiajie, ZHAO Duanduan, QUAN Shihang, et al. Optimization of extraction process of flavonoids and polyphenols from *Perilla frutescens* (L.) britt leaves and comparison of antioxidant activities of different varieties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 344−352.］
［43］ 李国巍, 石雨, 张正海, 等. 胡萝卜脯多酚提取工艺优化、化合物分离鉴定及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(14): 287−298. ［LI Guowei, SHI Yu, ZHANG Zhenghai, et al. Optimizing the extraction, identification, and antioxidant activity analysis of polyphenols from carrot (*Daucus carota* L.) preserve

[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 287−298. ]
[ 44 ] 张强, 阳杭杏, 杨涛. 六堡茶茶多酚的低共熔溶剂提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(8): 15−23. [ ZHANG Qiang, YANG Hangxing, YANG Tao. Optimization of extraction process of tea polyphenols from Liupao tea using deep eutectic solvent method and their antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2025, 36(8): 15−23. ]
[ 45 ] 何晋浙, 徐瑶阳, 孙培龙. 不同来源猴头菌营养成分及其多糖化学组成和抗氧化活性比较[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 134−140. [ HE Jinzhe, XU Yaoyang, SUN Peilong. The comparison of nutrients, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from six *Hericium erinaceus* specimens[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(1): 134−140. ]
[ 46 ] 崔婧. 人参皂苷 Rg2 抗阿尔茨海默病的作用及其机制研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2018. [ CUI Jing. Effects of ginsenoside Rg2 on Alzheimer's disease and its mechanism[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2018. ]
[ 47 ] 王战伟. 暴马桑黄子实体多糖提取工艺优化及对神经细胞氧化损伤的保护作用[D]. 长春: 长春师范大学, 2024. [ WANG Zhanwei. Optimization of extraction process of polysaccharide from the fruit body of *Sanghuangporus baumii* and protective effect on oxidative damage of nerve cells[D]. Changchun: Changchun Normal University, 2024. ]
[ 48 ] TAYARANI-NAJARAN Z, DEHGHANPOUR FARASHAH M, AHMAD EMAMI S, et al. Protective effects of betanin, a novel acetylcholinesterase inhibitor, against $H_2O_2$-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Molecular Biology Reports, 2024, 51(1): 986.
[ 49 ] WANG Weilan, LIU Xiaoying, WANG Lixue, et al. *Ficus carica* polysaccharide extraction via ultrasound-assisted technique: Structure characterization, antioxidant, hypoglycemic and immunomodulatory activities[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 101: 106680.
[ 50 ] WANG Qiaona, ZHU Canhe, SONG Zhaoran, et al. Anti-oxidative effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge fermented with *Shiraia bambusicola* Henn. against $H_2O_2$-induced injury in PC12 cells[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2025, 25(1): 208.
[ 51 ] CHOI Y H. Hesperidin protects C2C12 myoblasts from oxidative damage by reducing ROS-mediated mitochondrial damage and endoplasmic reticulum stress[J]. Molecular & Cellular Toxicology, 2025, 21(1): 251−261.
[ 52 ] YANG Wanshuang. Evaluation of the antioxidant activity and identification of potential antioxidant peptides in commercially available probiotic Cheddar cheese[J]. Lwt, 2024, 205: 116486.
[ 53 ] WANG Ying, BRANICKY R, NOË A, et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling[J]. The Journal of Cell Biology, 2018, 217(6): 1915−1928.
[ 54 ] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 53−56. [ MA Sen. Progress on GSH-px and GST[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(10): 53−56. ]
[ 55 ] JING Linlin, MA Huiping, FAN Pengcheng, et al. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, 15(1): 287.