

# 响应面优化华腺萼木总黄酮和总多糖的超声波辅助提取工艺<sup>\*</sup>

秦惠珍<sup>1</sup>, 曹其义<sup>2</sup>, 宁莞权<sup>2</sup>, 唐健民<sup>1</sup>, 邹蓉<sup>1</sup>, 朱成豪<sup>1</sup>, 韦霄<sup>1</sup>, 熊忠臣<sup>1\*\*</sup>

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006; 2. 百色学院农业与食品工程学院, 广西百色 533000)

**摘要:**为进一步开发天然甜茶资源,以华腺萼木 *Mycetia sinensis* 茎叶为原料,超声波辅助水提法提取其中的总黄酮和总多糖,在单因素试验的基础上用响应面优化华腺萼木总黄酮和总多糖的提取工艺。结果发现,对华腺萼木总黄酮提取影响最大的是乙醇浓度,影响最小的是提取时间;对总多糖提取影响最大的是提取时间,影响最小的是提取温度。最终确定华腺萼木总黄酮提取的最佳工艺为超声波功率 300 W,料液比 1:95,乙醇浓度 75%,提取时间 50 min,此工艺条件下总黄酮得率为 2.36%;总多糖的最佳提取工艺为提取时间 180 min,超声波功率 250 W,提取温度 80℃,此工艺条件下总多糖得率为 82.77%。本研究采用响应面法对华腺萼木总黄酮和总多糖提取条件进行了优化,可以为华腺萼木今后的资源开发提供依据。

**关键词:**华腺萼木 总黄酮 总多糖 响应面优化 超声波辅助提取

中图分类号: TQ461 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2020)04-0368-12

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20200924.006



微信扫一扫,与作者在线交流(OSID)

## 0 引言

华腺萼木 *Mycetia sinensis* 为茜草科多年生小灌木,是中国特有物种,为广西 9 种野生甜茶植物之一<sup>[1]</sup>。华腺萼木具有生津止渴、健身养颜的功效,可以开发成低能量、无毒、高甜度的天然甜味剂。甜茶类植物的化学成分研究表明,多糖和黄酮是甜茶类植物的主要有效成分。目前已经从其他品种的甜茶植物分离出多种糖类成分和黄酮类化合物,如从广西甜茶中分离出含有葡萄糖苷的化合物和丰富的黄酮类

化合物<sup>[2-4]</sup>,从多穗柯甜茶中分离鉴定出至少 22 种黄酮类成分和 3 种甜味成分<sup>[5-8]</sup>。许多研究表明,从甜茶类植物中分离出的黄酮类化合物具有抗衰老、抗氧化、降血压等多种药理功效<sup>[9]</sup>,而多糖类化合物具有抗肿瘤、降血糖、降血脂等功效<sup>[10-12]</sup>。华腺萼木作为甜茶植物,在天然甜味剂开发和抗氧化药理功效等方面具有巨大的发展潜力。目前,华腺萼木的相关研究仅涉及形态学和植物组织培养方面<sup>[13-14]</sup>,其他方面研究尚未展开。因此,本研究对华腺萼木总黄酮和总多糖的提取工艺进行研究,为有效开发华腺萼木这一天然甜茶资源提供理论指导。

<sup>\*</sup> 广西自然科学基金项目(2015GXNSFBAA139089,2017GXNSFBA198011),广西科技基地和人才专项(桂科 AD17129022),广西创新驱动项目(桂科-AA17204056-1)和广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 18013,桂植业 18014)资助。

### 【作者简介】

秦惠珍(1993—),女,硕士,主要从事珍稀濒危植物的保护与研究,E-mail:1192845094@qq.com。

### 【\*\*通信作者】

熊忠臣(1967—),男,研究员,主要从事园林景观设计和珍稀濒危和药用植物迁地保育等研究,E-mail:xzs@gxib.cn。

### 【引用本文】

秦惠珍,曹其义,宁莞权,等. 响应面优化华腺萼木总黄酮和总多糖的超声波辅助提取工艺[J]. 广西科学,2020,27(4):368-379.

QIN H Z, CAO Q Y, NING G Q, et al. Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Total Flavonoids and Total Polysaccharides from *Mycetia sinensis* by Response Surface Methodology [J]. Guangxi Sciences, 2020, 27(4): 368-379.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料: 华腺萼木, 于2018年10月采自广西植物研究所喀斯特药用植物园。取华腺萼木的茎和完整叶片, 经过烘干、粉碎后过60目筛备用。

溶液: 芦丁标准品、葡萄糖标准品、蒸馏水、苯酚、浓硫酸、乙醇、5% NaNO<sub>2</sub>、4% NaOH、10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 均为分析纯。

### 1.2 仪器

TU-1901型双光束紫外可见分光光度计, ESJ200-4A和AE200型电子分析天平, DL-720E智能超声波清洗器, TGL-10B型高速台式离心机, B-260型恒温水浴锅。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 华腺萼木总黄酮提取工艺优化

##### 1.3.1.1 华腺萼木总黄酮的标准曲线

加水将配制好的芦丁标准品分别稀释成浓度为0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg·mL<sup>-1</sup>的芦丁溶液, 备用。吸取不同浓度的芦丁溶液, 置于25 mL容量瓶中, 标记0-6号。加入1 mL的5% NaNO<sub>2</sub>溶液, 摇匀, 室温下放置6 min, 加入1 mL 5% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液, 摇匀。再放置6 min之后加入10 mL的4% NaOH溶液, 用30%乙醇定容, 摇匀, 静置15 min。在190-900 nm处进行光谱扫描后选用510 nm作为检测波长<sup>[15-16]</sup>。以吸光值为纵坐标(y), 总黄酮浓度为横坐标(x), 得标准曲线回归方程 $y=13.438x+0.0008$  ( $R^2=0.9908$ )。在510 nm波长下测定芦丁标准品溶液的吸光值。

##### 1.3.1.2 华腺萼木总黄酮的提取工艺

称取华腺萼木粉末0.2 g, 加入乙醇, 水浴条件下超声波萃取, 萃取结束后静置10 min, 用高速冷冻离

离心机进行固液分离, 取上清液定容至50 mL后取1 mL移至25 mL容量瓶中二次定容, 按照1.3.1.1节的方法测定吸光值。根据1.3.1.1节的标准曲线方程求得样品的总黄酮含量, 再根据下列方程计算总黄酮得率。公式中C为提取液中总黄酮的含量(mg/mL), V为提取液体积(mL), M为样品粉末质量(g)。

$$\text{总黄酮得率}(\%) = C \times (V/M) \times 100\%$$

##### 1.3.1.3 单因素试验设计

在超声波频率为低频(53 kHz)状态下, 分别研究不同因素对华腺萼木总黄酮得率的影响。除提取条件不同外, 试验过程均与1.3.1.2节的提取工艺相同。具体提取条件设置如下:

(1)不同超声波功率: 60, 180, 300, 420, 540 W; 提取时间30 min, 水浴温度60℃, 料液比1:70, 乙醇浓度40%。(2)不同料液比: 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100 (g:mL); 提取时间30 min, 水浴温度60℃, 乙醇浓度40%, 超声波功率300 W。(3)不同乙醇浓度: 20%、40%、60%、80%、100%, 提取时间30 min, 水浴温度60℃, 料液比1:70, 超声波功率300 W。(4)不同提取温度(水浴温度): 40, 50, 60, 70, 80℃, 提取时间30 min, 料液比1:70, 乙醇浓度40%, 超声波功率300 W。(5)不同提取时间: 10, 30, 50, 70, 90 min, 水浴温度60℃, 料液比1:70, 乙醇浓度40%, 超声波功率300 W。

##### 1.3.1.4 响应面试验设计

参考其他甜茶类植物总黄酮提取的响应面优化试验设计<sup>[4, 11-12]</sup>, 结合华腺萼木总黄酮的单因素试验结果, 选取功率(A)、料液比(B)、乙醇浓度(C)及提取时间(D)为因素, 采用Box-Behnken试验设计, 通过Design-Expert 8.0.6软件分析试验结果, 因素及水平见表1。

表1 总黄酮提取因素水平表

Table 1 Table of total flavonoids extraction factors and levels

水平 Levels	因素 Factors			
	A: 超声波功率 A: Ultrasonic power (W)	B: 料液比 B: Ratio of material and liquid (g:mL)	C: 乙醇浓度 C: Ethanol concentration (%)	D: 提取时间 D: Extraction time (min)
-1	180	1:80	60	30
0	300	1:90	80	50
1	420	1:100	100	70

### 1.3.2 华腺萼木总多糖提取工艺优化

#### 1.3.2.1 华腺萼木总多糖标准曲线的绘制

精密称量无水葡萄糖标准品 0.1 g, 加蒸馏水定容, 配成 1.0 mg/mL 的标准品溶液, 再分别取 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mL, 置于棕色瓶定容至 100 mL, 摇匀, 即为葡萄糖标准品溶液。采用苯酚-硫酸法测定吸光值, 以吸光值为纵坐标 ( $y$ ), 总多糖浓度为横坐标 ( $x$ ), 得到标准曲线的线性回归方程  $y = 8.778x - 0.0195$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。

#### 1.3.2.2 华腺萼木总多糖提取工艺及其含量测定

总多糖提取工艺与总黄酮提取工艺相似, 包括以下步骤: 称取烘干后的华腺萼木粉末 0.2 g, 进行单因素试验, 然后利用响应面试验优化提取工艺, 得到多糖粗提液, 将其用乙醇进行沉淀, 测定总多糖含量。总多糖含量测定采用苯酚-硫酸法, 步骤如下: 取总多糖提取液 1 mL 于试管中, 加入 1 mL 5% 苯酚溶液, 摇匀, 快速加入 5 mL 浓硫酸, 振荡 4 min 后室温下放置 30 min, 然后于 490 nm 波长下测其吸光值。将吸光值代入 1.3.2.1 节的总多糖浓度标准曲线方程, 计算得总多糖浓度<sup>[17]</sup>。再根据以下方程, 计算总多糖得率:

$$\text{总多糖得率}(\%) = C \times V \times (\text{稀释倍数}/M) \times 100\%$$

其中,  $C$  为测得的总多糖浓度 (mg/mL),  $V$  为提取液体积 (mL),  $M$  是原料的干重 (g)。

#### 1.3.2.3 总多糖单因素试验设计

在超声波频率为低频 (53 kHz) 状态下, 分别研究不同因素对华腺萼木总多糖得率的影响。(1) 不同超声功率: 120, 240, 360, 480, 600 W, 提取时间 30 min, 提取温度 60℃; (2) 不同提取温度: 40, 50, 60, 70, 80℃, 超声功率 240 W, 提取时间 30 min; (3) 不同提取时间: 90, 120, 150, 180, 210 min, 超声功率 240 W, 提取温度 70℃。因为不同料液比进行多次试验均呈显著性差异, 所以本研究不对料液比进行单因素试验。

#### 1.3.2.4 华腺萼木多糖响应面试验设计

参考两种茶总多糖的响应面设计试验<sup>[18-19]</sup>, 结合本研究的单因素试验结果, 利用 Box-Behnken 设计, 选择超声波功率、提取温度、提取时间作为响应因子, 以华腺萼木总多糖提取量为响应值, 设计 3 因素 3 水平的响应面分析。试验因素水平设计见表 2。

表 2 总多糖提取因素水平表

Table 2 Table of total polysaccharides factors and levels

水平 Levels	因素 Factors		
	A: 提取时间 A: Extraction time (min)	B: 超声波功率 B: Ultrasonic power (W)	C: 提取温度 C: Extraction temperature (°C)
-1	150	120	60
0	180	240	70
1	210	360	80

## 2 结果与分析

### 2.1 华腺萼木总黄酮提取工艺优化

#### 2.1.1 单因素试验结果

超声波功率对华腺萼木总黄酮提取的影响 (图 1a): 当超声波功率小于 300 W 时, 总黄酮得率随着超声波功率的增加而逐渐增大, 超声波功率为 300 W 时达到最大值 2.24%, 随后逐渐降低。原因可能是超声波功率较小时体系中溶解的总黄酮量较小, 加大超声波功率能使更多的总黄酮溶出, 但是当总黄酮溶出达到体系饱和值时, 加大超声波的功率则会使更多杂质溶出, 从而影响黄酮得率, 所以选取超声波功率为 300 W。

料液比对华腺萼木总黄酮提取的影响 (图 1b): 在料液比为 1:90 时, 总黄酮得率达到最大值 2.52%, 但料液比继续增大后, 总黄酮得率开始下降, 原因可能是料液比小于 1:90 时, 体系内少量溶剂无法将华腺萼木粉末完全浸湿导致其中的总黄酮溶出不完全, 而当料液比达到 1:90 后, 体系中的总黄酮溶出完全, 之后总黄酮得率降低原因是体系中含有的过量乙醇会导致总黄酮损失, 导致总黄酮得率下降, 所以选取料液比为 1:90。

提取时间对华腺萼木总黄酮提取的影响 (图 1c): 提取时间在 10—50 min 时, 华腺萼木的总黄酮得率随提取时间增加而增大, 在 50 min 时达到最大值 2.24%, 随后总黄酮得率逐渐降低。原因可能是时间过长超声波的空化效应和热效应<sup>[20]</sup>破坏了华腺萼木总黄酮结构的稳定性, 导致总黄酮得率降低, 所以选取提取时间为 50 min。

乙醇浓度对华腺萼木总黄酮提取率的影响 (图 1d): 乙醇浓度为 20%—80% 时, 总黄酮得率随着乙醇浓度的增加而增大, 在乙醇浓度达到 80% 时达到最大值 2.23%, 随后总黄酮得率开始降低。原因可能是在 60%—80% 乙醇浓度条件下, 华腺萼木总黄

酮已经大部分溶出, 如果乙醇体积分数过高, 过量乙醇会将华腺萼木中的其他杂质成分溶出, 导致总黄酮得率下降<sup>[21]</sup>, 所以选取乙醇浓度为 70%。

提取温度对华腺萼木总黄酮提取的影响(图 1e); 在 40—60℃ 时, 总黄酮得率随着提取温度增加逐渐增大, 在 60℃ 时达到最大值 1.97%, 随后温度升

高, 总黄酮得率逐渐下降。原因可能是前期随着温度升高, 分子运动加速, 细胞破裂加快有利于总黄酮的溶出, 而 60℃ 后继续升高温度, 过高温会破坏总黄酮的结构<sup>[22]</sup>, 造成提取率下降, 所以选取提取温度为 60℃。

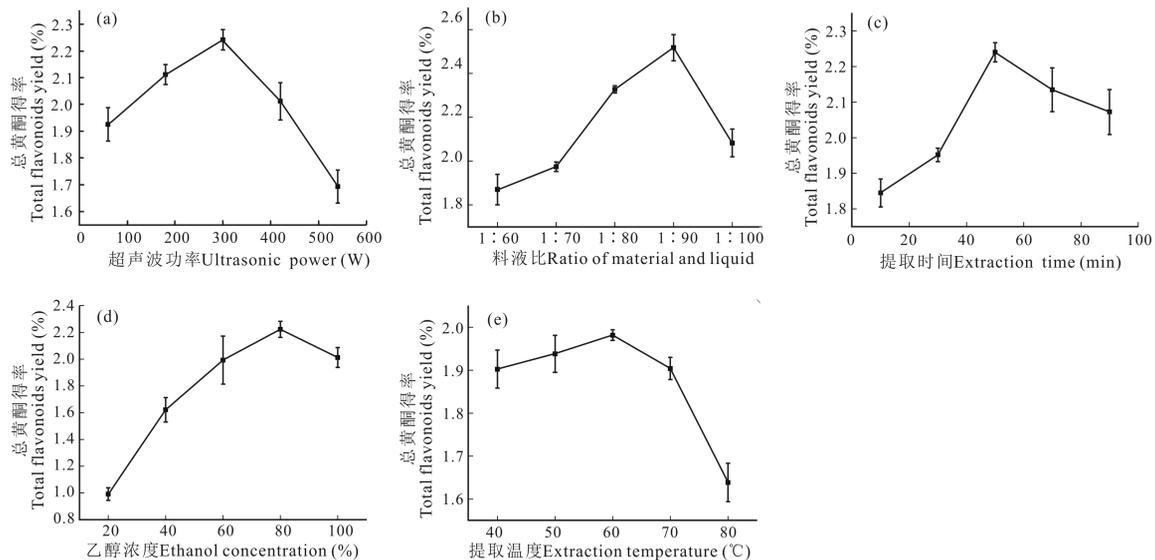


图 1 超声波功率(a)、料液比(b)、提取时间(c)、乙醇浓度(d)和提取温度(e)对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic power (a), ratio of material and liquid (b), extraction time (c), ethanol concentration (d) and temperature (e) on total flavonoids yield

## 2.1.2 响应面优化总黄酮提取工艺

### 2.1.2.1 响应面试验设计及响应值

根据单因素试验结果, 选取超声波功率、料液比、

乙醇浓度和提取时间作为响应面设计的因变量, 设计 4 因素 3 水平响应面试验, 共计 29 个试验点(其中有 5 个零点), 计算 29 个试验点的总黄酮得率(表 3)。

表 3 总黄酮提取响应面设计及响应值

Table 3 Response surface design and response value of total flavonoids extraction

试验号 Test number	因素 Factors				总黄酮得率 Total flavonoids yield (%)
	A: 超声波功率 A: Ultrasonic power	B: 料液比 B: Ratio of material and liquid	C: 乙醇浓度 C: Ethanol concentration	D: 提取时间 D: Extraction time	
1	0	0	0	0	2.09
2	-1	-1	0	0	1.67
3	0	1	-1	0	1.51
4	0	1	0	-1	1.75
5	0	-1	-1	0	1.37
6	0	0	1	-1	1.07
7	1	1	0	0	1.53
8	1	0	-1	0	1.45
9	-1	0	0	1	1.53

续表 3

Continued table 3

试验号 Test number	因素 Factors				总黄酮得率 Total flavonoids yield (%)
	A: 超声波功率 A: Ultrasonic power	B: 料液比 B: Ratio of material and liquid	C: 乙醇浓度 C: Ethanol concentration	D: 提取时间 D: Extraction time	
10	0	-1	0	1	1.72
11	0	1	1	0	1.14
12	0	0	1	1	1.07
13	0	0	0	0	2.01
14	-1	0	0	-1	1.52
15	0	1	0	1	1.94
16	1	0	1	0	1.00
17	-1	0	1	0	1.09
18	1	0	0	1	1.80
19	-1	1	0	0	1.94
20	-1	0	-1	0	1.38
21	0	0	-1	1	1.39
22	0	-1	1	0	1.06
23	0	0	0	0	2.06
24	0	0	0	0	2.05
25	0	-1	0	-1	1.54
26	0	0	-1	-1	1.54
27	1	-1	0	0	1.67
28	0	0	0	0	1.97
29	1	0	0	-1	1.59

### 2.1.2.2 响应面模型的建立及分析

用 Design-Expert 8.0.6 软件拟响应面优化分析试验数据,得到华蓼腺木总黄酮提取物的回归方程为  $Y = 2.04 - 0.0075A + 0.065B - 0.18C + 0.037D - 0.1AB - 0.04AC + 0.05AD - 0.015BC + 0.0025BD + 0.038371CD - 0.22A^2 - 0.13B^2 - 0.61C^2 - 0.18D^2$ 。

响应面回归方程不同系数的绝对值代表不同响应因子对响应值的影响程度<sup>[23-24]</sup>。对响应模型进行显著性分析可知(表 4),回归模型极显著( $P < 0.01$ ),失拟项不显著( $P > 0.05$ ),修正系数  $R^2_{adj} = 0.9109$ ,相关系数  $R^2 = 0.9555$ ,说明模型拟合效果较好,试验值与拟合值具有高度相关性,可见该模型可以用于对华蓼腺木总黄酮得率的准确预测和分析。

一次项 B、C 和二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  具有显著性,交互项不具显著性。

### 2.1.2.3 响应面交互因素分析

利用 Design-Expert 8.0.6 软件做出相应因素之间的交互作用分析图(图 2-6)。交互作用响应曲面图的坡度反应各交互因素对总黄酮得率的影响程度,坡度越大,说明交互作用的影响越大。AB、AC、BC、BD 和 AD 交互项间的等高线均为椭圆形,说明其交互作用不具显著性,与表 4 相符。分析图 2-6 交互项间的陡峭程度可知,各影响因素的影响程度大小分别为  $B > A$ 、 $C > A$ 、 $C > B$ 、 $A > D$ 。因此这 4 个影响因素对总黄酮得率的影响大小分别为  $C > B > A > D$ ,即乙醇浓度 > 料液比 > 超声波功率 > 提取时间。

表 4 总黄酮回归模型显著性分析

Table 4 Significance analysis of total flavonoids regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	2.99	14	0.21	21.56	< 0.000 1	**
A: 超声波功率 A: Ultrasonic power	0.000 675	1	0.000 675	0.068	0.742 1	
B: 料液比 B: Ratio of material and liquid	0.051	1	0.051	5.12	0.040 6	*
C: 乙醇浓度 C: Ethanol concentration	0.41	1	0.41	41.06	< 0.000 1	**
D: 提取时间 D: Extraction time	0.016	1	0.016	1.63	0.222 8	
AB	0.042	1	0.042	4.24	0.058 6	
AC	0.007	1	0.007	0.65	0.435 1	
AD	0.009	1	0.009	1.01	0.332 2	
BC	0.008	1	0.008	0.091	0.767 6	
BD	0.009	1	0.009	0.002 52	0.960 7	
CD	0.006	1	0.006	0.57	0.436 7	
A <sup>2</sup>	0.30	1	0.31	30.63	< 0.000 1	**
B <sup>2</sup>	0.11	1	0.11	11.50	0.004 4	**
C <sup>2</sup>	2.38	1	2.38	238.62	< 0.000 1	**
D <sup>2</sup>	0.21	1	0.21	21.22	0.000 4	
残项 Residual	0.14	14	0.01			
失拟项 Lack of fit	0.13	10	0.013	5.97	0.054 9	
纯误差 Pure error	0.009	4	0.002			
总差 Total deviation	3.13	28				

注: \* 表示具有显著性,  $P < 0.05$ ; \*\* 表示具有极显著性,  $P < 0.01$

Note: \* means significant,  $P < 0.05$ ; \*\* means very significant,  $P < 0.01$

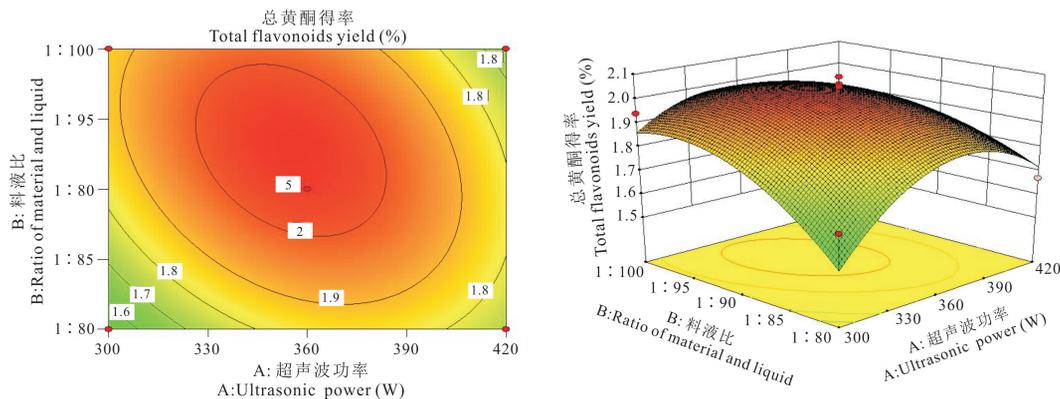


图 2 交互作用 AB 对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of interactive AB on total flavonoids yield

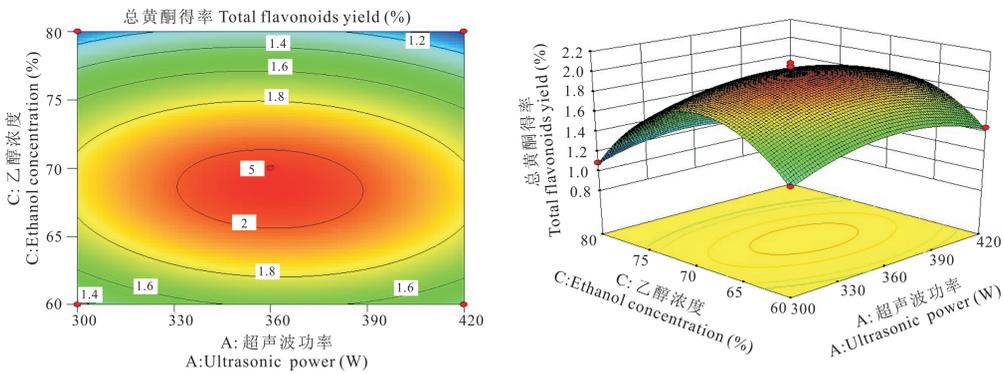


图3 交互作用 AC 对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of interactive AC on total flavonoids yield

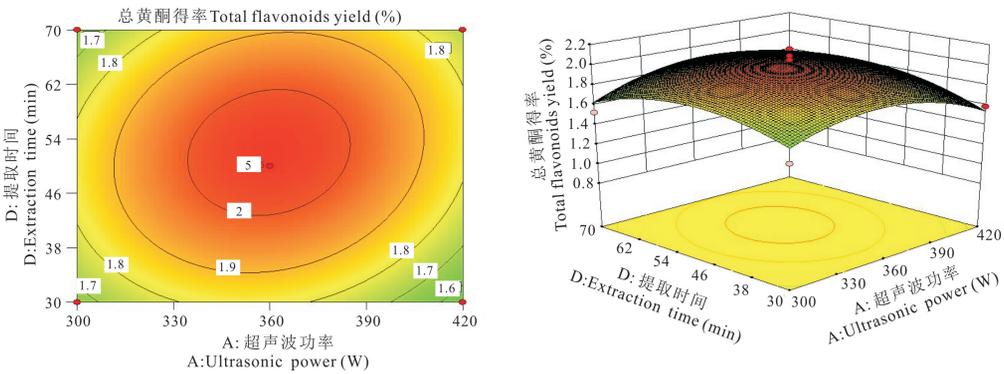


图4 交互作用 AD 对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of interactive AD on total flavonoids yield

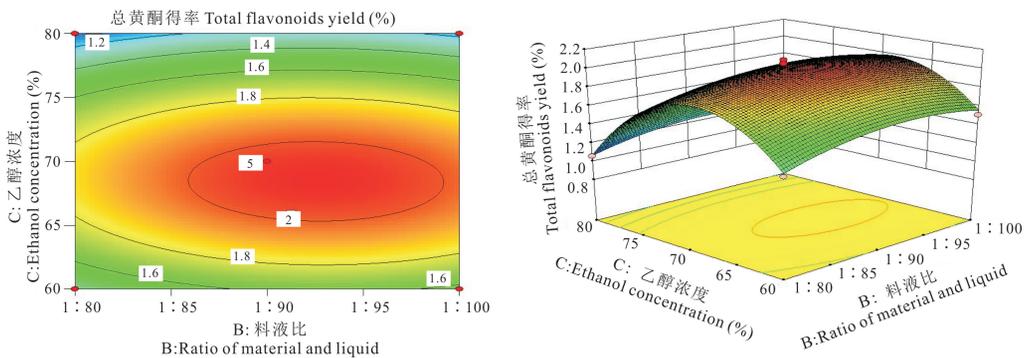


图5 交互作用 BC 对总黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of interactive BC on total flavonoids yield

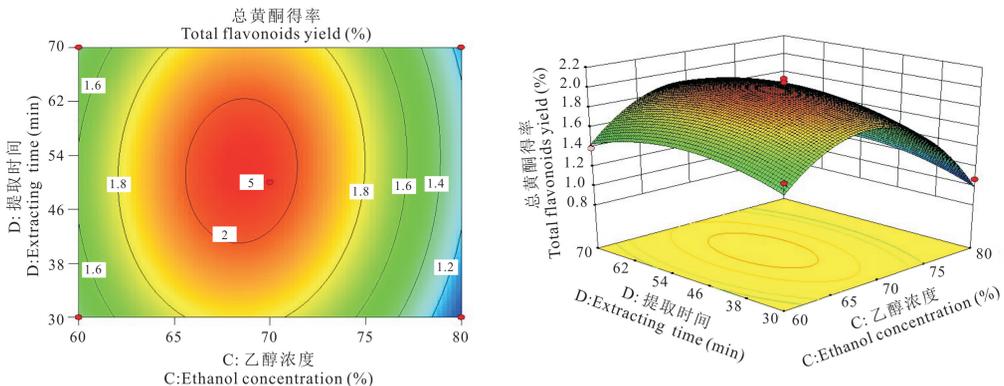


图6 交互作用 CD 对总黄酮得率的影响

Fig. 6 Effect of interactive CD on total flavonoids yield

2.1.2.4 优化工艺验证试验结果

为获得最佳的提取工艺,继续采用 Design-Expert 8.0.6 对上述模型进行进一步分析,得到华腺萆木总黄酮提取工艺条件为超声功率 291.6 W,料液比 1:95.6,乙醇浓度 77%,提取时间 51.2 min,预测黄酮提取率为 2.48%。根据实际操作的可行性将工艺条件调整为超声波功率为 300 W,料液比 1:95,乙醇浓度 75%,提取时间 50 min,在该工艺条件下进行 5 次重复性验证试验,得到修改后工艺的总黄酮得率为 2.36%,可见,响应面拟合模型预测结果与试验结果较为接近,说明华腺萆木总黄酮提取工艺可以通过响应面法进行优化。

2.2 华腺萆木总多糖提取工艺优化

2.2.1 单因素试验结果

超声波功率、提取温度和提取时间对华腺萆木总多糖提取的影响如图 7 所示。在试验范围内,华腺萆木总多糖得率随超声波功率增大呈现先升高—降低—升高的趋势,在超声波功率为 240 W 时,总多糖得率达到最大值 71.19%,随后降低(图 7a)。先升后降的原因可能是超声波功率增大有利于总多糖从溶液

中溶出,但超声波功率过大时会导致其他的物质溶出,从而影响体系中的总多糖含量。

华腺萆木总多糖得率在提取温度试验范围内呈现降低—升高—降低的趋势(图 7b),提取温度为 70℃时总多糖得率达到最大值 56.77%。在温度为 40—50℃时,总多糖得率降低,原因可能是一开始体系中能溶解出较多的总多糖类物质,其他物质溶解得较少,当温度升高到 50℃时其他物质溶解量增加,导致总多糖含量减少。随后温度上升,总多糖溶解增加,体系中总多糖含量增加。提取温度大于 70℃后,温度过高导致体系中的多糖分子结构受损,总多糖含量降低。

华腺萆木总多糖得率在提取时间试验范围内呈现先增加后降低的趋势(图 7c),在提取时间为 180 min 时达到最大值 78.03%,随后降低。原因可能是随着浸提时间增长,多糖分子被破坏和水解,同时也使一些水溶性杂质溶出,致使总多糖含量降低。

综上,选取超声功率 240 W、提取温度 70℃、提取时间 180 min 进行响应面优化试验。

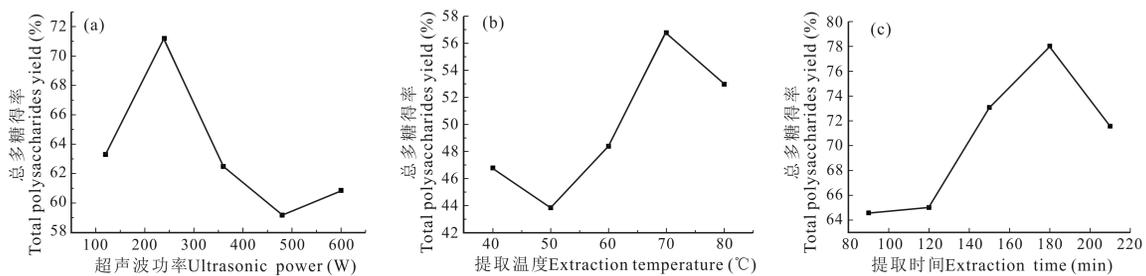


图 7 超声波功率(a)、提取温度(b)和提取时间(c)对总多糖得率的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic power (a), extraction temperature (b) and extraction time (c) on total polysaccharides yield

2.2.2 响应面优化华腺萆木总多糖提取工艺

2.2.2.1 响应面设计及响应值

根据单因素试验结果,选择提取时间、超声波功率和提取温度为自变量、华腺萆木总多糖提取率为响应值,通过 Box-Behnken 进行试验设计优化华腺萆木总多糖提取工艺。利用 Design-Expert 8.0.6 软件分析实验结果(表 5)。

表 5 总多糖响应面试验设计及响应值

Table 5 Response surface test design and response value of total polysaccharides yield

试验号 Test number	因素 Factors			总多糖得率 Total polysaccharides yield (%)
	A	B	C	
1	0	-1	-1	73.75
2	1	-1	0	60.43
3	0	0	0	79.81

续表 5

Continued table 5

试验号 Test number	因素 Factors			总多糖得率 Total polysaccharides yield (%)
	A	B	C	
4	-1	-1	0	60.19
5	1	0	-1	71.47
6	0	1	1	76.71
7	-1	0	1	72.17
8	0	0	0	80.70
9	-1	1	0	67.58
10	1	0	1	73.29
11	0	0	0	81.17
12	0	-1	1	75.02
13	0	1	-1	74.04
14	0	0	0	82.92
15	-1	0	-1	69.21
16	1	1	0	68.28
17	0	0	0	82.54

### 2.2.2.2 响应面模型的建立及分析

根据试验数据,利用 Design-Expert 8.0.6 软件拟合得到华蓼腺木总多糖提取物的回归方程为 $Y=81.43+0.54A+2.15B+1.09C+0.11AB-0.28AC+0.35BC-10.33A^2-9.68B^2+0.43C^2$ 。

对响应模型进行显著性分析(表 6),模型具极显著性( $P<0.01$ ),说明模型具有意义,失拟项不显著( $P>0.05$ ),说明模型理论值与试验值差异较小; $R^2_{adj}=0.9123$ ,说明模型能解释 91.23% 的响应值的变化;相关系数  $R^2=0.9616$ ,说明模型拟合效果较好,可以用方程代替试验结果进行预测和分析。一次项 A 达到显著水平,二次项  $A^2$  和  $B^2$  达到极显著水平,交互项未达到显著水平。

### 2.2.2.3 响应面交互因素分析

利用 Design-Expert 8.0.6 软件做出总多糖相应

因素之间的交互作用分析图(图 8-10)。由图 8 可知,当提取温度为  $70^{\circ}\text{C}$  时,总多糖得率随提取时间和超声波功率的增加呈现先增后减的趋势,从曲面的陡峭度来看,提取时间对总多糖得率的影响大于超声波功率。由图 9 可知,当超声波功率为 240 W 时,总多糖得率随提取时间和提取温度增加呈现先增后减的趋势,但坡度较小,从曲面陡峭度来看,提取时间的曲面稍微比提取温度陡峭一点,可见提取时间对总多糖得率的影响稍大于提取温度。由图 10 可知,当提取时间为 180 min 时,总多糖得率随超声波功率和提取温度呈现先增后减的趋势,但坡度较小,从曲面陡峭度来看,提取温度对总多糖得率的影响大于超声波功率。因此,各因素对华蓼腺木总多糖得率的影响强弱顺序为提取时间>超声波功率>提取温度。

表 6 总多糖回归模型显著性分析

Table 6 Significance analysis of total polysaccharides regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	739.03	9	82.11	19.49	0.004	**
A	2.33	1	2.3328	0.55	0.4810	
B	37.06	1	37.06	8.80	0.0209	*
C	9.50	1	9.50	2.26	0.1768	
AB	0.05	1	0.05	0.016	0.9139	
AC	0.32	1	0.32	0.08	0.7893	
BC	0.49	1	0.49	0.12	0.7431	
$A^2$	449.00	1	449.00	106.59	<0.0001	**
$B^2$	205.23	1	205.23	48.72	0.0002	**
$C^2$	0.79	1	0.79	0.18	0.68	
残项 Residual	29.49	1	4.21	0.55	0.48	
失拟项 Lack of fit	22.81	3	7.60	4.56	0.0887	
纯误差 Pure error	6.68	4	1.67			
总差 Total deviation	768.52	16				

注: \* 表示具有显著性,  $P<0.05$ ; \*\* 表示具有极显著性,  $P<0.01$

Note: \* means significant,  $P<0.05$ ; \*\* means very significant,  $P<0.01$

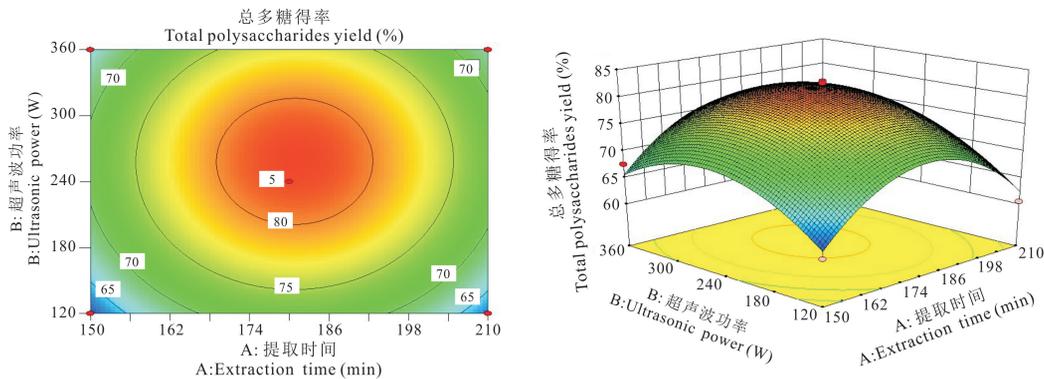


图8 交互作用AB对总多糖得率的影响

Fig. 8 Effect of interactive AB on total polysaccharides yield

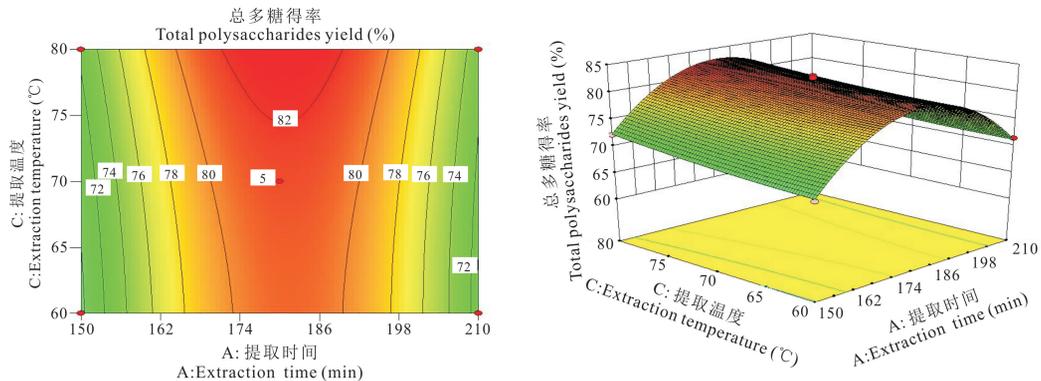


图9 交互作用AC对总多糖得率的影响

Fig. 9 Effect of interactive AC on total polysaccharides yield

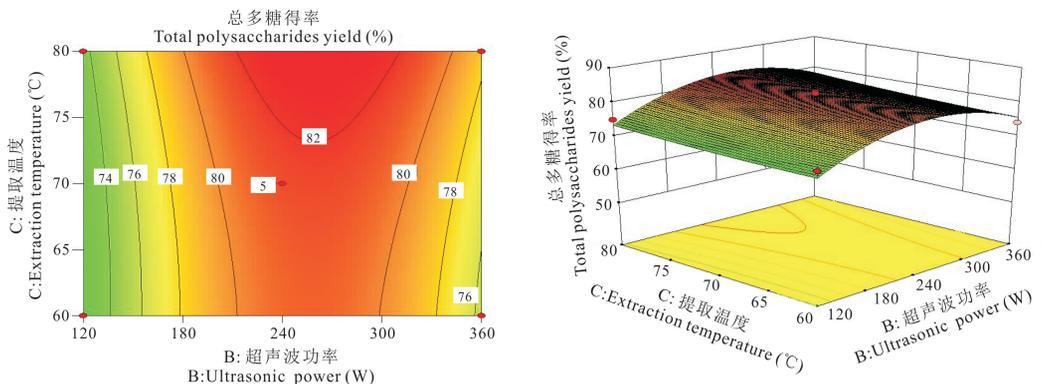


图10 交互作用BC对总多糖得率的影响

Fig. 10 Effect of interactive BC on total polysaccharides yield

#### 2.2.2.4 优化工艺验证试验结果

为获得最佳的总多糖提取工艺,继续采用 Design-Expert 8.0.6 对上述模型进行进一步分析,得到华腺萼木总多糖提取工艺条件为时间 180.1 min,功率 261.1 W,温度 80°C,此时华腺萼木总多糖提取率的理论值为 83.18%。根据实际操作的可行性将工艺条件修改为提取时间 180 min,功率 250 W,温度 80°C,此工艺条件下重复试验 5 次,结果平均提取率为 82.77%。试验表明,通过响应面优化得到最佳工艺的华腺萼木总多糖提取率,与最佳工艺条件下的

理论值相差较小,说明响应面法优化的提取工艺适用于华腺萼木总多糖提取。

### 3 结论

水提法、醇提法、酶解法和超声波法等提取方法对不同植物的总黄酮和总多糖提取效果具有显著性差异。不同种植物采用相同的提取工艺也会产生显著性差异,同种植物的总黄酮和总多糖的提取采用相同的方法进行提取,不同因素间的作用也不同。本研究采用单因素试验分析不同因素对华腺萼木总黄酮

和总多糖提取的影响,发现两种物质所需要的条件不同,总黄酮提取的最佳单因素为超声波功率 300 W,料液比 1:90,乙醇浓度 70%,提取时间 50 min,提取温度 60℃;总多糖提取的最佳单因素为超声波功率 240 W,温度 70℃,时间 180 min。总多糖提取比黄酮提取工艺需要花费更长的时间,总多糖溶解所需的温度高于总黄酮,但超声波功率低于总黄酮。根据最佳因素设计响应面优化总黄酮提取和总多糖提取工艺,总黄酮提取工艺各因素间的影响力大小依次为乙醇浓度>料液比>超声波功率>提取时间,总多糖提取工艺各因素间的影响力大小依次为提取时间>超声波功率>提取温度,同种因素如提取时间对总黄酮提取的影响较小,而对总多糖提取的影响较大。通过单因素和响应面分析及操作的可行性最终确定总黄酮提取的最佳工艺为超声波功率 300 W,料液比 1:95,乙醇浓度 75%,提取时间 50 min,此时总黄酮得率为 2.36%(理论值为 2.48%);总多糖提取的最佳工艺为提取时间 180 min,功率 250 W,温度 80℃,此时总多糖得率为 82.77%(理论值为 83.18%)。由此可见用响应面法优化华腺萼木总黄酮和总多糖的提取工艺,结果与理论值相差较小,表明利用响应面优化华腺萼木总黄酮和总多糖提取工艺的方法是可行的,可以为华腺萼木总黄酮和总多糖的进一步研究提供理论依据,为华腺萼木资源的开发提供技术支持。

#### 参考文献

- [1] 韦家福,黄燮才. 广西甜茶原植物的鉴定[J]. 中药材, 1996,19(1):16-17.
- [2] 王剑霞,吕华冲. 广西甜茶化学成分的研究[J]. 中药材, 2007,30(7):800-802.
- [3] 谭冬明,石相莉,罗星晔,等. 广西甜茶化学成分、提取工艺及生物活性研究进展[J]. 中成药, 2017,39(6):1252-1255.
- [4] 闫志刚,蒙淑洁,韦荣昌,等. 广西甜茶研究与应用现状[J]. 中草药, 2017,48(12):2572-2578,2588.
- [5] 何春年,彭勇,肖伟,等. 多穗柯甜茶的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2012,23(5):1253-1255.
- [6] 杨大坚,钟焯昌,肖倬殷. 甜茶化学成分研究 II. 黄酮类成分[J]. 中草药, 1991,22(5):198-201,239.
- [7] 杨大坚,钟焯昌,肖倬殷. 甜茶化学成分研究 I. 甜味成分[J]. 中草药, 1991,22(3):99-101,143.
- [8] 李胜华,伍贤进,曾军英,等. 多穗柯中黄酮类成分研究[J]. 中草药, 2010,41(12):1967-1969.
- [9] 高雅,陈新梅,赵元,等. Box-Behnken 响应面法优化昆仑雪菊总黄酮提取工艺及抗氧化研究[J]. 现代中药研究与实践, 2019,33(5):54-61.
- [10] 陈海芳,舒响,张琛,等. 中药及天然产物中酶抑制剂筛选的研究现状[J]. 中国新药杂志, 2018,27(14):1619-1624.
- [11] 张晓寒,张程慧,于文睿,等. 药食同源类植物多糖降血糖功效的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018,9(14):3699-3705.
- [12] 郭浩杰,杨严格,安乐,等. 中药多糖的分子修饰及其药理活性研究进展[J]. 中草药, 2015,46(7):1074-1080.
- [13] 陆永林,梁月群,陈正华,等. 华腺萼木形态发生研究初报[J]. 遗传, 1989,11(2):9.
- [14] 唐君海. 华腺萼木组织培养的简化[J]. 广西热作科技, 1998(1):9-11.
- [15] 袁思文,刘育辰,刘刚,等. 单因素试验结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化甘草中黄酮类成分的提取工艺[J]. 中国药房, 2019,30(3):355-359.
- [16] 唐健民,朱成豪,高丽梅,等. 响应面法优化多穗石柯总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2020,48(1):181-185.
- [17] 万阅,齐计英,曾红,等. 响应面法优化香菇多糖的超声辅助提取工艺[J]. 生物技术通报, 2015,31(1):79-85.
- [18] 曾桥,韦承伯,韩国锋,等. 桑叶茯砖茶多糖的响应面提取工艺优化及其体外抗氧化降血脂作用[J]. 食品工业科技, 2018,39(18):193-200.
- [19] 杨宇平,许良,徐春娜,等. 响应面法优化提取安吉白茶多糖工艺[J]. 山西农业科学, 2019,47(9):1653-1658.
- [20] 杜若源,谢晶,王婷,等. 超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015,31(1):167-170.
- [21] 赖红芳,黄秀香,陆俊宇. 超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J]. 食品与机械, 2014,30(1):196-198,223.
- [22] 闫蕊,赵桦. 黄花油点草总黄酮超声提取工艺的响应面优化及抗氧化性分析[J]. 食品工业科技, 2018,39(10):190-196,203.
- [23] 肖卫华,韩鲁佳,杨增玲,等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报, 2007,12(5):52-56.
- [24] 张意笠,程汝滨,黄真,等. 响应面法优化结香花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性[J/OL]. 食品工业科技. (2020-04-08). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/11.1759.TS.20200408.1638.043.html>.

# Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Total Flavonoids and Total Polysaccharides from *Mycetia sinensis* by Response Surface Methodology

QIN Huizhen<sup>1</sup>, CAO Qiyi<sup>2</sup>, NING Guanquan<sup>2</sup>, TANG Jianmin<sup>1</sup>, ZOU Rong<sup>1</sup>,  
ZHU Chenghao<sup>1</sup>, WEI Xiao<sup>1</sup>, XIONG Zhongchen<sup>1</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Agriculture and Food Engineering, Baise University, Baise, Guangxi, 533000, China)

**Abstract:** In order to further develop the natural sweet tea resources, the stems and leaves of *Mycetia sinensis* were used as the raw material to optimize the extraction technology of total flavonoids and total polysaccharides from *M. sinensis* by ultrasonic assisted water extraction. On the basis of single factor experiment, the extraction process of total flavonoids and total polysaccharides was optimized by response surface methodology. The results showed that the ethanol concentration had the greatest influence on the extraction of total flavonoids from *M. sinensis* and the extraction time had the least influence on it. Extraction time had the greatest effect on the extraction of total polysaccharides and the extraction temperature had the least effect. Finally, the optimum extraction technology of *M. sinensis* total flavonoids was determined as follows: Ultrasonic power 300 W, ratio of material and liquid 1 : 95, ethanol concentration 75%, ultrasonic time 50 min, and the yield of total flavonoids under this process condition was 2.36%. The optimum extraction technology of *M. sinensis* total polysaccharide was determined as follows: Ultrasonic time 180 min, ultrasonic power 250 W, temperature 80°C, and the yield of total flavonoids under this process condition was 82.77%. In this study, response surface methodology was used to rationally optimize the extraction conditions of the total flavonoids and total polysaccharides from *M. sinensis*, which can provide a basis for future resource development of *M. sinensis*.

**Key words:** *Mycetia sinensis*, total flavonoids, total polysaccharides, response surface optimization, ultrasonic-assisted extraction

责任编辑: 符支宏



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>