

樟树叶木脂素和多酚超声辅助同步提取工艺优化

Optimization of extraction process of lignans and polyphenols by ultrasonic wave assisted extraction from *Cinnamomum camphora*

周海旭¹ 谢美玉¹ 高 晗¹ 李 波¹ 苏同超¹ 李忠海²

ZHOU Hai-xu¹ XIE Mei-yu¹ GAO Han¹ LI Bo¹ SU Tong-chao¹ LI Zhong-hai²

(1. 河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003; 2. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004)

(1. School of Food Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China; 2. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:利用 Box-Behnken Design (BBD) 分析提取时间、超声时间、料液比和乙醇浓度对樟树叶中木脂素及多酚得率的影响。结果表明:最优的提取条件为提取时间 78 min, 超声时间 3 min, 料液比 ($m_{\text{樟树叶}} : V_{\text{乙醇}}$) 1 : 22 (g/mL), 乙醇体积分数 80%。此条件下樟树叶木脂素和多酚得率分别为 44.89, 48.17 mg/g。

关键词:樟树; 木脂素; 多酚; 超声波; 同步提取

Abstract: Response surface methodology (RSM) based on Box Behnken Design (BBD) was employed to optimize the extraction conditions including the liquid-to-solid ratio, ultrasonic time, ethanol concentration and extraction time. The optimized conditions were as follows: liquid-to-solid ratio 1 : 22 (g/mL), ultrasonic time 3 min, ethanol concentration 80% and extraction time 78 min. Under these conditions, the experimental yield of lignans and polyphenol were 44.89 mg/g, 48.17 mg/g, respectively.

Keywords: *Cinnamomum camphora* (Presl); lignans; polyphenols; ultrasonic wave; response surface methodology

樟树系樟科樟属植物, 主要分布于中国的长江流域及南部区域^[1]。樟树是中国经济价值较高的、优良的绿

化树种, 具有四季常青、滞留烟尘、净化空气、美化环境等优点, 可用于园林绿化建设^[2]。除了作为绿化树种, 樟树还是极为珍贵的药用材料和军用工业材料^[3]。现代医学研究^[1]表明, 樟树具有抑菌、杀虫、抗癌等多种功效。根据现有的文献^[4-6]报道, 樟树中含有多种活性小分子物质。目前学者们^[7-8]已经成功从樟树叶中获得多酚类物质和木脂素类物质。其中多酚类物质主要指类黄酮、酚酸、木酚素; 木脂素类物质主要是指芝麻素、细辛脂素等。它们具有多种生物活性, 例如抗癌、抗氧化和抑菌等^[9-11], 但是目前樟树落叶一般归为垃圾处理, 不仅污染环境, 还造成了资源的浪费^[12]。

对于木脂素和多酚的提取方法主要有溶剂提取法、微波辅助技术、超声波辅助技术、超临界技术、亚临界技术。姜少娟等^[13]利用超声波辅助技术从香樟叶中提取总黄酮, 最优条件下黄酮提取率为 42.35%; 张峰^[14]采用响应面法优化超声波辅助酶解提取樟树去油枝叶中总多酚, 最优条件下总多酚提取率均值为 22.08 mg/g; 袁列江等^[15]利用热回流工艺从樟树叶中提取木脂素类物质, 最优提取条件下, 樟树叶木脂素的提取率最大为 (43.39 ± 4.91) mg/g。

目前国内外研究^[16-19]主要集中于对樟树叶木脂素和多酚单独的提取方面, 未见对两者同步提取的相关研究。研究拟将超声波技术的提取时间短、提取率高的优点应用于同步提取樟树叶中木脂素及多酚类物质, 利用超声波技术造成的“空洞”现象^[20-22]破坏樟树叶细胞壁, 改善木脂素及多酚的选择性从而增加两者的得率。旨在

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAC01B07-2); 河南省科技攻关项目 (编号: 202102310143); 高层次人才科研项目 (编号: 2017020); 大学生“百农英才”创新项目 (编号: BNYC2018-2-36); 河南科技学院大学生创新创业训练计划项目 (编号: 2019CX025)

作者简介: 周海旭, 女, 河南科技学院讲师, 博士。

通信作者: 李忠海 (1960—), 男, 中南林业科技大学教授, 博士。
E-mail: 674733961@qq.com

收稿日期: 2020-07-12

为樟树叶的进一步开发利用提供相关的试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

樟树叶:2018 年 9 月采自中南林业科技大学校内,清洗晒干后粉碎以备用;

无水乙醇、变色酸、浓硫酸、焦性没食子酸:分析级,中国医药集团总公司;

五味子酯甲标准品:质量分数 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司;

电子天平:GR-202 型,上海浦春计量仪器有限公司;

摇摆式中药粉碎机:DFY-500 型,温岭市大机械有限公司;

循环水式旋转蒸发仪:SHB-III 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

电热恒温水浴锅:HWS26 型,上海一恒科学仪器有限公司;

超声波细胞粉碎机:JY92-11 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外分光光度仪:UV1800 型,日本岛津公司。

1.2 试验方法

1.2.1 焦性没食子酸标准曲线的绘制 参照文献[23]。

1.2.2 五味子酯甲标准曲线的绘制 参照文献[24]。

1.2.3 多酚及木脂素得率的计算

(1) 多酚得率:按式(1)计算。

$$Y_1 = \frac{m_{11}}{m_{12}}, \quad (1)$$

式中:

Y_1 ——多酚得率,mg/g;

m_{11} ——多酚粗品中多酚的质量,mg;

m_{12} ——样品质量,g。

(2) 木脂素得率:按式(2)计算。

$$Y_2 = \frac{m_{21}}{m_{22}}, \quad (2)$$

式中:

Y_2 ——木脂素得率,mg/g;

m_{21} ——粗品中木脂素的质量,mg;

m_{22} ——样品质量,g。

(3) 总得率:按式(3)计算。

$$Y = Y_1 + Y_2, \quad (3)$$

式中:

Y ——总得率,mg/g;

Y_1 ——多酚得率,mg/g;

Y_2 ——木脂素得率,mg/g。

1.2.4 单因素试验设计

(1) 料液比对樟树叶多酚及木脂素得率的影响:准确称取一定质量干燥的樟树叶粉末。以超声波功率 300 W,

超声时间 20 min,乙醇体积分数 90%为固定条件,考察料液比($m_{\text{樟树叶}} : V_{\text{乙醇}}$)分别为 1:5,1:10,1:15,1:20,1:25 (g/mL)时对多酚和木脂素得率的影响。

(2) 超声时间对樟树叶多酚及木脂素得率的影响:准确称取一定质量干燥的樟树叶粉末。分别以超声波功率 300 W,乙醇体积分数 90%,最优料液比为固定条件,考察超声时间分别为 2,3,4,6,8,10 min 时对樟树叶多酚和木脂素得率的影响。

(3) 乙醇体积分数对樟树叶多酚及木脂素得率的影响:准确称取一定质量干燥的樟树叶粉末。超声波功率 300 W,最优料液比和超声提取时间为固定条件,考察乙醇体积分数分别为 50%,60%,70%,80%,90%,100%时对多酚和木脂素得率的影响。

(4) 提取时间对樟树叶多酚及木脂素得率的影响:准确称取一定质量干燥的樟树叶粉末。以超声波功率 300 W,最优料液比、超声提取时间和乙醇体积分数为固定条件,考察提取时间分别为 40,60,80,100,120 min 时对多酚和木脂素得率的影响。

1.2.5 响应面分析设计 根据单因素试验结果,采用 Design-Expert 8.0.5 软件中的中心组合试验设计原理进行响应面设计,确定超声波辅助提取樟树叶木脂素、多酚的最佳工艺条件。

1.3 数据统计分析

所有试验均进行 3 次。试验数据以 Excel 进行统计分析,并通过 Origin 8.0 作图;响应面设计通过 Design expert 8 进行试验设计和数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

各因素对樟树叶中木脂素和多酚得率的影响如图 1 所示。由图 1 可知,最佳的料液比($m_{\text{樟树叶}} : V_{\text{乙醇}}$)为 1:20 (g/mL);最佳的超声时间为 4.0 min;最佳的乙醇体积分数为 80%;最佳的提取时间为 80 min。

2.2 响应面法优化分析

2.2.1 试验因素及水平 根据单因素试验结果,以樟树叶木脂素、多酚的总得率为响应值,分别考察料液比、超声时间、乙醇体积分数、提取时间 4 个因素对总得率的影响。采用 Box-Behnken Design 中心组合试验设计原理进行响应面设计,试验因素及水平取值见表 1,结果见表 2、3。

2.2.2 回归模型的建立及显著性检验 通过 Design-Expert 8.0.5 软件对表 3 中的试验结果进行多项拟合回归,得到二次多项回归方程:

$$Y = 44.48 + 1.52A - 1.02B + 0.036C - 1.60D + 1.37AB - 0.87AC - 3.18AD + 1.05BC - 0.73BD - 2.30CD - 2.97A^2 - 4.94B^2 - 5.01C^2 - 3.26D^2. \quad (4)$$

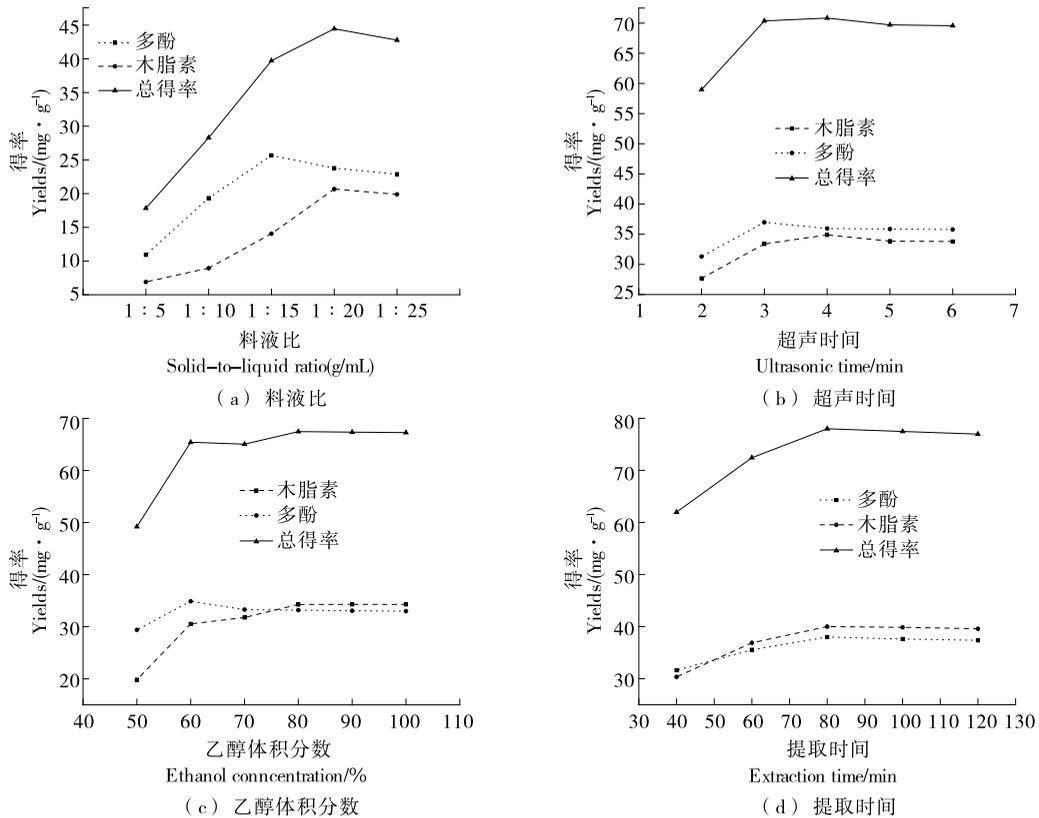


图 1 单因素试验结果

Figure 1 Results of individual factor experiment

表 1 樟树叶木脂素试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiment design of lignans

水平	A 料液比 (g/mL)	B 超声时间/min	C 乙醇体积分数/%	D 提取时间/min
-1	1 : 15	3.5	75	75
0	1 : 20	4.0	80	80
1	1 : 25	4.5	85	85

据表 3 中模型概率可知:同步提取得到关于总得率的模型极显著;模型确定系数 R^2 为 0.989 9,表明仅有 1.01% 的变量无法用该模型进行预测。失拟项不显著表明方程模拟得较好,可以很好地分析以后的数据。调整系数 R^2_{Adj} 为 0.972 3,也表明模型显著^[25]。由表 3 及图 2 可知,料液比、超声时间、提取时间对总得率的影响均大于乙醇体积分数。

对所得的回归拟合方程(4)中的变量分别求一阶偏导数,得到一组二元一次方程组,以得到提取樟树叶木脂素、樟树叶多酚的最佳料液比、超声时间、乙醇体积分数和提取时间^[26]。在此基础上对方程组进行求解,最终得

到提取樟树叶木脂素和多酚总得率的最优条件为料液比 ($m_{樟树叶} : V_{乙醇}$) 1 : 22 (g/mL),超声时间 3 min,乙醇体积分数 80%,提取时间 78 min,在该条件下总得率的理论最大值达到 93.14 mg/g。

为了检验试验结果的可靠性和稳定性,在此最优条件下进行 5 次平行实验分别测定樟树叶木脂素得率、多酚得率、总得率。经测定木脂素得率为 44.89 mg/g;多酚得率为 48.17 mg/g;总得率为 93.06 mg/g,相对误差为 0.09%。结果表明超声波辅助同步提取樟树叶木脂素和多酚工艺条件可行。

2.3 超声波辅助法与微波辅助法提取效果比较

目前已有研究进行了微波法辅助提取樟树叶中木脂素^[16]和多酚类物质^[17],现将其与超声波辅助法进行比较,结果如表 4 所示。

由表 4 可知,超声波辅助提取技术比微波辅助提取技术效果好。这是因为两者的作用机理不同:超声波辅助法主要是利用超声的空化效应、热效应以及机械效应来破坏樟树叶的细胞结构进行提取;微波主要利用分子间的氢键断裂和分子间的碰撞以及破坏细胞膜进行提取^[27]。

表 2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 2 The program and result of Box-Behnken experiment design

序号	A	B	C	D	木脂素得率/ (mg · g ⁻¹)	多酚得率/ (mg · g ⁻¹)	总得率 Y/ (mg · g ⁻¹)	序号	A	B	C	D	木脂素得率/ (mg · g ⁻¹)	多酚得率/ (mg · g ⁻¹)	总得率 Y/ (mg · g ⁻¹)
1	-1	-1	0	0	38.96	43.26	82.22	16	0	1	1	0	35.15	41.64	76.79
2	-1	1	0	0	34.80	40.17	74.97	17	-1	0	-1	0	37.00	42.30	79.30
3	1	-1	0	0	36.77	42.90	79.67	18	-1	0	1	0	36.65	41.67	78.32
4	1	1	0	0	37.76	42.30	80.06	19	1	0	-1	0	38.12	44.03	82.15
5	0	0	-1	-1	34.04	41.28	75.32	20	1	0	1	0	34.33	41.03	75.36
6	0	0	-1	1	37.77	42.44	80.21	21	0	-1	0	-1	35.35	39.43	74.78
7	0	0	1	-1	39.22	42.95	82.17	22	0	-1	0	1	36.56	44.15	80.71
8	0	0	1	1	33.94	42.82	76.76	23	0	1	0	-1	37.46	44.30	81.76
9	-1	0	0	-1	35.76	43.16	78.92	24	0	1	0	1	35.15	41.30	76.45
10	-1	0	0	1	40.03	44.55	84.58	25	0	0	0	0	44.87	46.90	91.77
11	1	0	0	-1	42.26	47.36	89.62	26	0	0	0	0	44.38	46.91	91.29
12	1	0	0	1	34.59	42.34	76.93	27	0	0	0	0	44.68	46.92	91.60
13	0	-1	-1	0	35.94	40.25	76.19	28	0	0	0	0	44.79	46.91	91.70
14	0	-1	1	0	33.47	39.60	73.07	29	0	0	0	0	44.70	46.91	91.61
15	0	1	-1	0	33.42	39.26	72.68								

表 3 木脂素得率的 ANOVA 分析结果[†]

Table 3 ANOVA analysis of the yield of lignans

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>P
模型	448.95	14	32.07	142.84	<0.000 1**
A	27.78	1	27.78	123.74	<0.000 1**
B	12.42	1	12.42	55.34	<0.000 1**
C	0.01	1	0.01	0.06	0.797 6
D	30.90	1	30.90	137.62	<0.000 1**
AB	7.45	1	7.45	33.20	<0.000 1**
AC	3.05	1	3.05	13.59	0.002 4**
AD	40.56	1	40.56	180.68	<0.000 1**
BC	4.44	1	4.44	19.79	0.000 6**
BD	2.14	1	2.14	9.55	0.008 0**
CD	21.22	1	21.22	94.52	<0.000 1**
A ²	57.32	1	57.32	255.32	<0.000 1**
B ²	158.55	1	158.55	706.21	<0.000 1**
C ²	162.54	1	162.54	724.00	<0.000 1**
D ²	69.09	1	69.09	307.73	<0.000 1**
残差	3.14	14	0.22		
失拟项	2.57	10	0.26	1.80	0.301 0
误差	0.57	4	0.14		
总变异	452.10	28			

† “**”为极显著(P<0.01),“*”为显著(P<0.05);R²=0.989 9,

R_{adj}²=0.972 3。

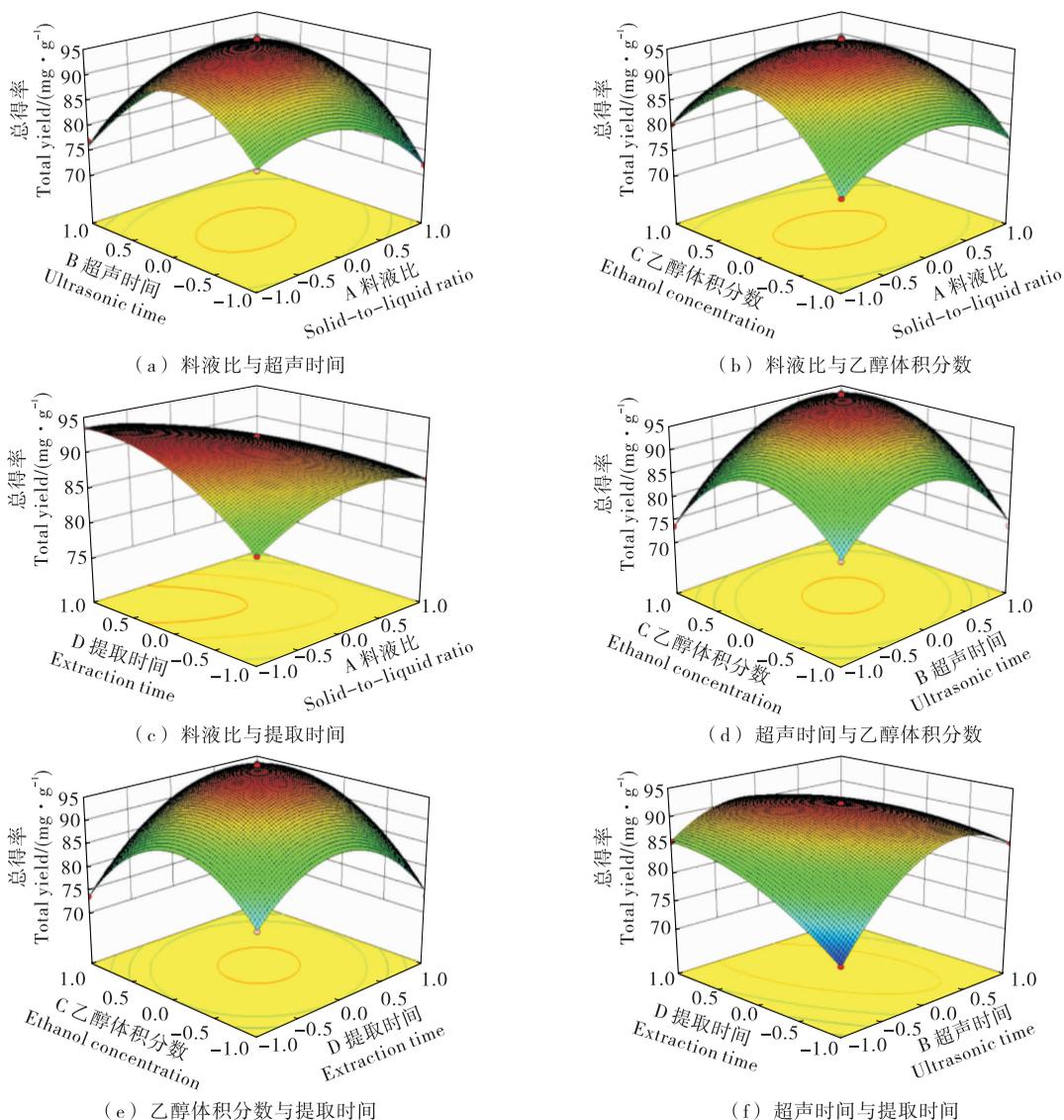


图2 各因素间交互作用对总得率影响的曲面图

Figure 2 Effects of interaction among various factors on total yield from ultrasonic extraction

表4 超声波辅助同步提取和微波辅助提取樟树叶木脂素和多酚的比较[†]

Table 4 Ultrasonic assist extraction of lignans, polyphenols and comparison of microwave assist extraction

方法	微波时 间/min	超声时 间/min	提取时 间/min	乙醇体 积百分 数/%	料液比 (g/mL)	微波温 度/℃	木脂素得率/ (mg·g ⁻¹)	多酚得率/ (mg·g ⁻¹)
微波辅助	5	—	—	80	1:26	60	42.69	—
	6	—	—	70	1:50	60	—	35.04
超声波辅助	—	3	78	80	1:22	—	44.89	48.17

[†] “—”为试验未涉及。

3 结论

研究利用超声波辅助同步提取樟树叶中的木脂素及多酚,使用响应面法优化及分析,最终确定最佳值为料液比($m_{\text{樟树叶}} : V_{\text{乙醇}}$) 1 : 22 (g/mL),超声时间 3 min,乙醇体积分数 80%,提取时间 78 min,在此条件下木脂素和多酚得率预测值分别为 44.89,48.17 mg/g。超声波辅助

同步提取樟树叶木脂素和多酚法具有提取溶剂少,提取效率高、可以有效降低单个活性的提取成本的特点;同时木脂素、多酚的提取使得樟树叶变废为宝,利于环境的保护,降低环境污染。

参考文献

[1] 张箬晦,童永清,钱信怡,等. 香樟化学成分及药理作用研

- 究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 320-333.
- [2] 林洪双. 樟树营养袋苗培育与套种技术[J]. 南方农业, 2017, 11(8): 23-24.
- [3] 伍妮姐. 香樟树生物学特性及栽培技术要点[J]. 南方农业, 2017, 11(17): 24-25.
- [4] 廖矛川, 杨芳云, 沙光普, 等. 樟树叶化学成分研究[J]. 中国民族大学学报(自然科学版), 2012, 31(3): 52-55.
- [5] ZHOU Hai-xu, REN Jia-li, LI Zhong-hai. Antibacterial activity and mechanism of pinoselin from *Cinnamomum Camphora* leaves against food-related bacteria[J]. Food Control, 2017, 79: 192-199.
- [6] 冉晓敏, 李忠海, 付湘晋, 等. 樟树多酚提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 51-54.
- [7] LI Yan-ru, FU Chun-sheng, YANG Wen-jing, et al. Investigation of constituents from *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl and evaluation of their anti-inflammatory properties in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 221: 37-47.
- [8] 王智慧. 樟树叶化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(6): 860-863.
- [9] KATSAMPA P, VALSAMEDOU E, GRIGORAKIS S, et al. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box-Behnken experimental design and kinetics[J]. Industrial Crops and Products, 2015, 77: 535-543.
- [10] WANG Kai, HU Lin, JIN Xiao-lu, et al. Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 464-478.
- [11] DENG Yun, ZHAO Yan-yun, ZAKOUR O P, et al. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago Canadensis* L. [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 74: 803-809.
- [12] 曾柏全, 冯金儒, 朱永瑞, 等. 樟树叶纤维素液态发酵的工艺优化[J]. 环境工程学报, 2015, 9(7): 3 461-3 467.
- [13] 姜少娟, 王胜男, 刘晓莉. 响应面法优化香樟叶总黄酮的超声提取工艺[J]. 黑龙江农业科学, 2018(6): 90-97.
- [14] 张峰. 樟树枝叶制取精油的剩余物中活性成分及其生物活性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2018: 41-50.
- [15] 袁列江, 伍平香. 响应面法优化热回流提取樟树叶中木脂素工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(21): 46-51.
- [16] 李应洪, 周海旭, 李忠海. 樟树叶中木脂素化合物的分离鉴定及其抑菌活性[J]. 中国食品学报, 2018, 18(8): 267-273.
- [17] 周海旭, 李忠海, 钟海雁, 等. 微波辅助乙醇提取樟树叶多酚工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 364-366.
- [18] 周海旭, 李忠海, 张慧, 等. 微波辅助提取樟树叶木脂素工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(6): 193-197.
- [19] 付湘晋, 王挥, 冉晓敏, 等. 樟树叶多酚提取物体外清除自由基及抗油脂氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 108-110, 114.
- [20] 刘倩倩. 响应面优化绿豆皮不溶性膳食纤维超声辅助提取工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 203-207.
- [21] 陈瑞喜, 王璐璐, 陈德蓉, 等. 超声波辅助酶法提取葡萄皮渣多酚工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 198-201.
- [22] 李卓瓦, 袁晓芸, 赵鑫磊, 等. 超声波辅助提取石榴果皮多酚工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 136-142.
- [23] 陈海光, 刘朝霞, 于立梅. 山竹果皮中多酚类物质的抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 107-115.
- [24] 陈韵, 石展望, 黄晓敏. 超声波辅助提取大豆总木脂素及其含量分析[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 168-171.
- [25] ZHU Cai-ping, LIU Xiao-lin. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from pomegranate peel by surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92: 1 197-1 202.
- [26] 谷政伟, 胡铁, 贾媛, 等. 微波辅助提取缙草总黄酮工艺研究[J]. 中药材, 2014, 37(11): 2 092-2 095.
- [27] 国田, 张娜, 符群, 等. 几种辅助提取方式对蓝莓原花青素浸提效果及抗氧化活性的影响[J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(9): 139-148.

(上接第 129 页)

- [15] CAETANOC E F, LIMA A B, PAULINO J O S, et al. A conductor arrangement that overcomes the effective length issue in transmission line grounding[J]. Electric Power Systems Research, 2018, 159: 31-39.
- [16] SONG Zi-you, LI Jian-qiu, HOU Jun, et al. The optimization of a hybrid energy storage system at subzero temperatures: Energy management strategy design and battery heating requirement analysis [J]. Applied Energy, 2015, 159: 576-588.
- [17] KERESZTES J C, GOODARZI M, SAEYS W. Real-time pixel based early apple bruise detection using short wave infrared hyperspectral imaging in combination with calibration and glare correction techniques[J]. Food Control, 2016, 66(1): 215-226.
- [18] JIA Zhi-wei, WANG Li-jun, ZHANG Jin-chuan, et al. High efficiency, low power-consumption DFB quantum cascade lasers without lateral regrowth[J]. Nanoscale Research Letters, 2017, 12(1): 88-95.
- [19] AZUMAYA Caleigh M, DAYS Emily L, VINSON Paige N, et al. Screening for AMPA receptor auxiliary subunit specific modulators[J]. PLoS ONE, 2017, 12(3): 1 523-1 538.
- [20] FAN Cheng-li. Hybrid artificial bee colony algorithm with variable neighborhood search and memory mechanism[J]. Journal of Systems Engineering and Electronics, 2018, 29(2): 405-414.