

微波辅助提取樟树叶木脂素工艺优化

Optimization of microwave assisted extraction process of lignans in
Cinnamomum camphora leaf

周海旭^{1,2} 李忠海^{1,2} 张 慧^{1,2} 赖永娇^{1,2}

ZHOU Hai-xu^{1,2} LI Zhong-hai^{1,2} ZHANG hui^{1,2} LAI Yong-jiao^{1,2}

(1. 中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004; 2. 稻谷及副产物深加工国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

(1. Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China;

2. Rice and By-products Processing National Engineering Laboratory, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:通过单因素试验考察料液比、微波时间、微波温度、乙醇浓度对木脂素得率的影响,利用 Box-Behnken Design 响应面法优化提取工艺。结果表明:微波辅助提取樟树叶木脂素的最佳条件为微波时间 5 min、料液比 1:26(g/mL)、乙醇浓度 80%、微波温度 60℃,在此条件下实际测得樟叶中木脂素得率为 42.69 mg/g,回归模型预测得率理论值达 42.95 mg/g,实际值比理论值低 0.61%,说明了该模型的有效性。

关键词:樟树叶;木脂素;微波

Abstract: An efficient microwave assisted extraction procedure for the lignans from the leaves of *Cinnamomum camphora* was investigated and optimized. Response surface methodology (RSM) based on a three-level four-factor Box Behnken Design (BBD) was employed to optimize the extraction conditions. The best extraction conditions were as follows: microwave time 5 min, ratio of material to ethanol 1:26 (g/mL), ethanol concentration 80%, microwave temperature 60℃. Under the optimization conditions, the experimental yield of lignans was 42.69%, which was well matched with the predictive yield of 42.95%.

Keywords: *Cinnamomum camphora*; lignans; microwave

樟树属四季常青的樟科属,生长于中国长江以南地区。樟树是传统中药,可用于治疗风湿病、扭伤、支气管炎等疾病,其叶具有止痛、止痉挛的功效^[1]。目前已有研究表明樟树中含有木脂素类物质,如 Hsieh 等^[2]从樟树茎中分离出细

辛脂素、芝麻素和(+)-dienesamin;Takaoka 等^[3]从樟树木芯中分离出(-)-反式-2-(3,4-二甲氧苄基)-3-(3,4,5-三甲氧苄基)丁内酯;廖茅川等^[4]从樟树叶中分离出 maculation;王智慧等^[5]从樟树叶中分离出新芝麻脂素。木脂素是一类由两分子苯丙素衍生物聚合而成的天然化合物,多数呈游离状态,少数与糖结合成苷而存在。木脂素一般产于植物的根、茎、皮、果实和种子中^[6]。研究^[7-9]表明木脂素具有保护肝脏、抗凝血、抗炎、抗肿瘤、抗癌、抗氧化、抗菌抑菌等功效。

目前对木脂素的提取方法主要有溶剂提取法^[10]、微波辅助提取法^[11]、超声波辅助提取法^[12]、超临界 CO₂ 提取法^[13],但是溶剂提取法具有提取时间长,效率低,耗能大;超声波提取法则噪音大,耗时长;超临界 CO₂ 提取法其装置比较复杂,设备昂贵。微波利用分子极化或离子导电效应直接对物质加热,而空气和容器对微波不吸收,因此热效率高,升温快速均匀,大大缩短了提取时间,提高了提取效率^[14]。目前中国未见樟树叶木脂素微波提取工艺的报道。

本研究拟用微波辅助法提取樟树叶中的木脂素,研究微波时间、料液比、乙醇浓度和微波温度对木脂素得率的影响,并通过响应面法优化提取条件获得最高的提取率,旨在为樟树资源的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

樟树叶:小叶樟,于 2014 年 5 月采自中南林业科技大学;

无水乙醇:分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;

变色酸:分析级,上海恒远生化试剂有限公司;

浓硫酸:分析级,国药集团;

五味子酯甲标准品:纯度≥98%,上海金穗生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

微波萃取仪:PyNN130745 型,美国培安公司;

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAC01B07-2);国家林业公益行业科研专项(编号:201104044);中南林业科技大学研究生创新项目(编号:CX2014A06);湖南省研究生创新项目(编号:CX2015B284)

作者简介:周海旭,女,中南林业科技大学在读博士研究生。

通讯作者:李忠海(1960-),男,中南林业科技大学教授。

E-mail:47157875@qq.com

收稿日期:2016-03-27

紫外分光光度仪:UV1800 型,岛津公司;
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;
电子天平:GR-202 型,上海浦春计量仪器有限公司;
循环水式多用真空泵:SHB-Ⅲ型,郑州长城科工贸有限公司;
电热恒温水浴锅:HWS26 型,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制 参照文献[15]。测定标准液的浓度(x mg/L)与吸光度(y)的标准曲线回归方程为: $y = 0.008\ 8x + 0.132\ 8, R^2 = 0.999\ 2$ 。

1.3.2 工艺流程

樟树叶→自然干燥→粉碎、过筛→微波辅助提取 3 次→过滤合并滤液→测定总木脂素

1.3.3 单因素试验设计 以料液比、微波时间、微波温度、乙醇浓度为因素,考察各因素对木脂素得率的影响。

(1) 料液比对樟树叶总木脂素提取率的影响:以微波时间 15 min,乙醇浓度 90%,微波温度 60 ℃为固定条件,考察液料比分别为 1:10,1:15,1:20,1:25,1:30(g/mL)对总木脂素提取率的影响。

(2) 微波时间对樟树叶总木脂素提取率的影响:以料液比 1:20(g/mL),乙醇浓度 90%,微波温度 60 ℃为固定条件,考察微波时间为 1,3,5,10,15,20,25 min 时对樟树叶中木脂素得率的影响。

(3) 乙醇浓度对樟树叶总木脂素提取率的影响:以料液比 1:20(g/mL),微波时间 15 min,微波温度 60℃为固定条件,考察乙醇浓度为 60%,70%,80%,90%,100%时对樟树叶中木脂素得率的影响。

(4) 微波温度对木脂素得率的影响:以料液比 1:20(g/mL)、微波时间 15 min、乙醇浓度 90%为固定条件,分别考察微波温度为 40,50,60,70 ℃时对樟树叶中木脂素得率的影响。

1.3.4 响应面优化 根据单因素试验结果,选取微波时间、料液比、乙醇浓度、浸提时间 4 个对木脂素得率影响显著的因素。根据中心组合试验设计原理,以总木脂素得率为响应值,进行响应面试验并对其数据进行回归分析,优化樟叶木脂素最优的提取条件。

1.4 木脂素得率测定

根据 1.3.1 的方法检测各样品吸光度,根据标准曲线计算样品中木脂素浓度。按式(1)计算样品中木脂素得率:

$$Y = \frac{C \times V}{M \times 1\ 000}, \tag{1}$$

式中:
Y——木脂素得率,mg/g;
C——木脂素浓度,mg/L;
V——样品体积,mL;
M——樟树叶质量,g。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对木脂素得率的影响 由图 1 可知,当料液比为 1:10~1:30(g/mL)时,随着溶剂与原料比值的增加木脂素得率由 25.9 mg/g 增加到 39.45 mg/g,这是因为溶剂量的增加会与物料的接触面积增加,木脂素从细胞中释放的量也多。但料液比超过 1:25(g/mL)后,木脂素得率增加缓慢。溶剂含量大不仅会降低木脂素的浓度还会造成资源的浪费,因此从节约能源和成本出发应选择料液比为 1:25(g/mL)。

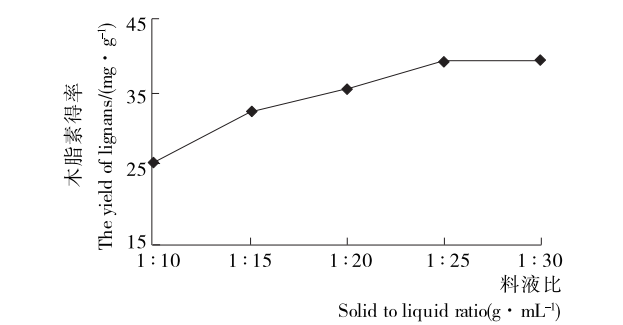


图 1 料液比对木脂素得率的影响
Figure 1 Effect of solid-to-liquid ratio on the extraction of lignans ($n=3$)

2.1.2 微波时间对木脂素得率的影响 由图 2 可知,当微波时间小于 5 min 时,随着微波时间的增加,木脂素得率由 13.74 mg/g 增加到 41.89 mg/g;当微波时间大于 5 min 时,随着微波时间的增加,木脂素得率增加的幅度变缓。这是因为随着时间的增加溶质与溶剂的接触时间随之增加,木脂素融入溶剂的量增多,从而木脂素的得率增大^[16]。若微波时间过长将导致木脂素被氧化。因此选择最适宜的微波时间为 5 min。

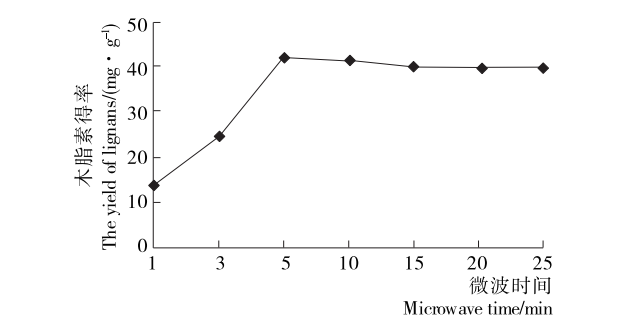


图 2 微波时间对木脂素得率的影响
Figure 2 Effect of microwave time on the yield of lignans ($n=3$)

2.1.3 乙醇浓度对木脂素得率的影响 由图 3 可知,乙醇浓度在 60%~80%时,随着乙醇浓度的增加,木脂素得率由 30.74 mg/g 增加到 41.28 mg/g,振幅为 34.29%;当乙醇浓度大于 80%时,木脂素得率增加得比较缓慢甚至呈现下降趋势。这是因为木脂素类物质是中等极性,乙醇浓度从 60%提高至 100%时,溶剂的极性逐渐降低,使得木脂素得溶出量逐渐增加,但是在 100%的乙醇时溶剂的极性最低,木脂素的溶出量也下降。因此选择乙醇浓度 80%。

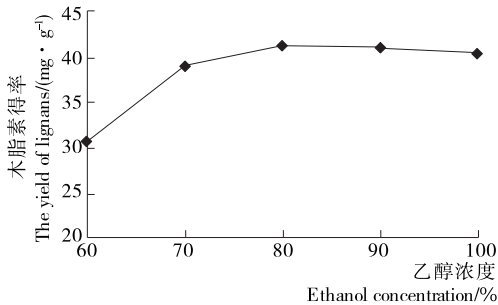


图 3 乙醇浓度对木脂素得率的影响

Figure 3 Effect of ethanol concentration on the yield of lignans ($n=3$)

2.1.4 微波温度对木脂素得率的影响 由图 4 可知,温度小于 50 ℃时,随着温度的提高,木脂素得率由 33.35 mg/g 增加到 40.63 mg/g;温度达到 50 ℃时,木脂素得率达到最高值,之后有所下降。这是因为在一定范围内温度的增加使得植物细胞内分子运动剧烈,破坏了细胞结构,有利于木脂素的溶出^[17]。但是随着温度逐渐增加,木脂素活性受到影响并且杂质的溶出量增加,不利于后续操作^[18]。因此适宜的微波温度为 50 ℃。

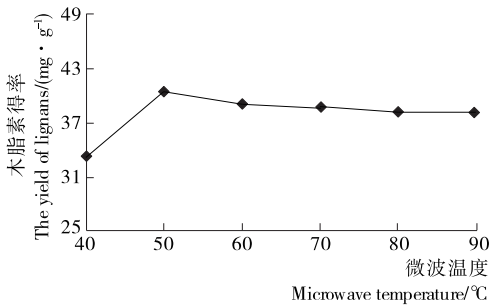


图 4 微波温度对木脂素得率的影响

Figure 4 Effect of microwave temperature on the yield of lignans ($n=3$)

2.2 响应面优化分析

2.2.1 响应面分析结果 采用 Design-expert 软件中 Box-Benhknen 试验设计,在单因素试验的基础上采用 4 因素 3 水平的响应面分析方法。各因素及水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

通过 Design-expert 软件进行响应面回归分析,得到多元二次响应面回归方程:

$$Y=42.59+0.64A+0.72B+0.59C+0.97D-0.95A^2-0.33AB-0.41AC-0.095AD-0.90B^2-0.20BC-0.40BD-1.12C^2-0.025CD-0.97D^2。(2)$$

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	A 微波时间/min	B 料液比(g · mL ⁻¹)	C 乙醇浓度/%	D 微波温度/℃
-1	3	1 : 22	75	45
0	5	1 : 25	80	55
1	7	1 : 28	85	65

表 2 响应面试验方案与结果

Table 2 Experimental design and responses values for response surface analysis

试验号	A	B	C	D	木脂素得率/(mg · g ⁻¹)
1	-1	-1	0	0	38.86
2	-1	1	0	0	40.96
3	1	-1	0	0	40.81
4	1	1	0	0	41.61
5	0	0	-1	-1	38.60
6	0	0	-1	1	41.03
7	0	0	1	-1	39.65
8	0	0	1	1	41.98
9	-1	0	0	-1	39.28
10	-1	0	0	1	41.13
11	1	0	0	-1	40.66
12	1	0	0	1	42.13
13	0	-1	-1	0	39.18
14	0	-1	1	0	40.97
15	0	1	-1	0	40.81
16	0	1	1	0	41.82
17	-1	0	-1	0	38.91
18	-1	0	1	0	40.87
19	1	0	-1	0	41.08
20	1	0	1	0	41.40
21	0	-1	0	-1	38.65
22	0	-1	0	1	41.24
23	0	1	0	-1	41.08
24	0	1	0	1	42.08
25	0	0	0	0	42.51
26	0	0	0	0	42.54
27	0	0	0	0	42.45
28	0	0	0	0	42.49
29	0	0	0	0	42.97

F 检验判定回归方程中各变量对响应值影响的显著性,概率 $P(F>F_{\alpha})$ 的值越小,则相应变量的显著性越明显^[19]。回归方程是高度显著的,相关系数 $R^2=97.75\%$,说明该模型拟合较好。表 3 中所失拟项 ($P>0.05$) 不显著,表明方程模拟得比较好,可以很好地分析以后的数据。 $R^2=0.976\ 9$,说明响应值与预测值之间具有良好的拟合关系; $R^2_{adj}=0.953\ 9$,说明该模型能够解释 95.39% 响应值的变化^[20]。回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的关系,所以将利用该回归方程确定最佳工艺条件。一次项系数大小表示各自变量对响应值的影响顺序,由方程(2)可知, $D(\text{微波温度})>B(\text{微波时间})>A(\text{料液比})>C(\text{乙醇浓度})$ 。

2.2.2 响应面曲面分析 由表 3 可知,料液比与微波时间,料液比与微波温度,乙醇浓度与微波时间之间的交互作用对木脂素得率的影响具有差异性。图5~7表示因素交互作用

表 3 方差分析表[†]
Table 3 Analysis of variance table

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14	44.970	3.210	42.370	0.000 1	* *
A	1	4.920	4.920	64.840	0.000 1	* *
B	1	6.240	6.240	82.260	0.000 1	* *
C	1	4.180	4.180	55.110	0.000 1	* *
D	1	11.350	11.350	149.720	0.000 1	* *
A ²	1	5.850	5.850	77.190	0.000 1	* *
AB	1	0.420	0.420	5.570	0.033 3	*
AC	1	0.670	0.670	8.870	0.010 6	*
AD	1	0.036	0.036	0.480	0.508 3	
B ²	1	5.290	5.290	69.850	0.000 1	* *
BC	1	0.150	0.150	2.010	0.178 5	
BD	1	0.630	0.630	8.340	0.011 9	*
C ³	1	8.210	8.210	108.250	0.000 1	* *
CD	1	2.500E-003	2.500E-003	0.033	0.858 5	
D ²	1	6.150	6.150	81.100	0.000 1	* *
残差	14	1.060	0.076			
失拟项	10	0.880	0.088	1.920	0.276 9	
纯误差	4	0.760	0.190			
总变异	28	48.280				

[†] *.显著性差异(P<0.05),* *.极显著性差异(P<0.01),R²
=0.976 9,R_{adj}²=0.953 9。

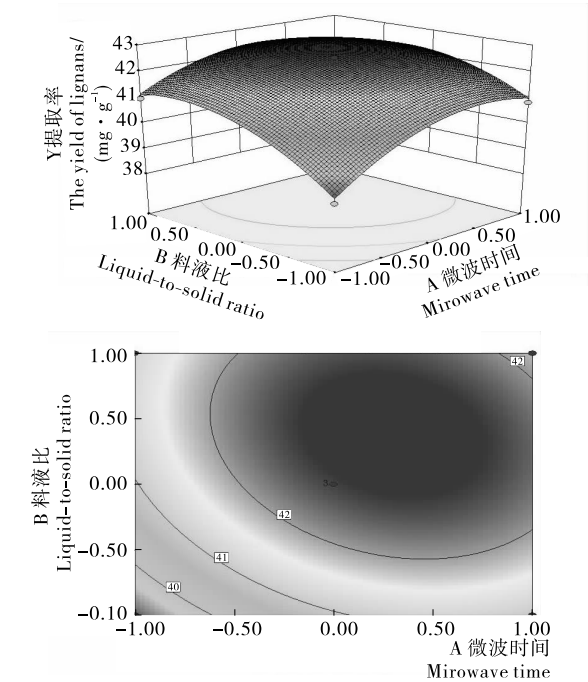


图 5 微波时间和料液比对樟叶木脂素得率的影响的曲面图和等高线图
Figure 5 Response surface and contours showing the effect of the microwave time, liquid-to-solid ratio on the response yield

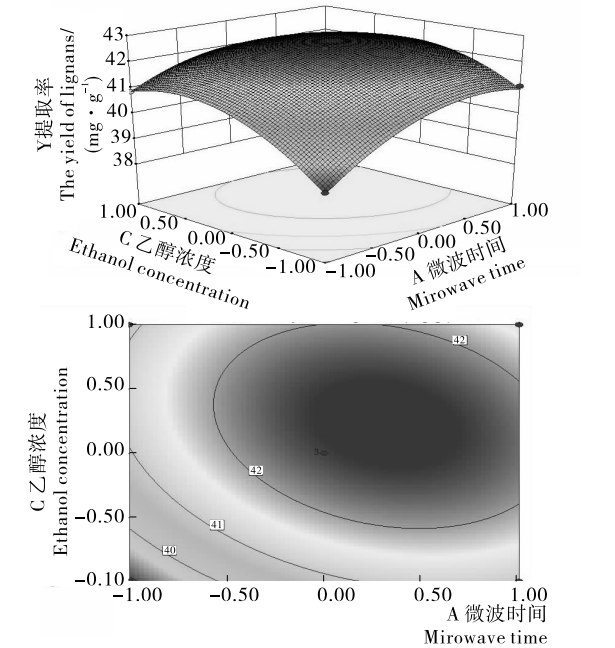


图 6 微波时间和乙醇浓度对樟叶木脂素得率影响的曲面图和等高线图
Figure 6 Response surface and contours showing the effect of the microwave time, ethanol concentration on the response yield

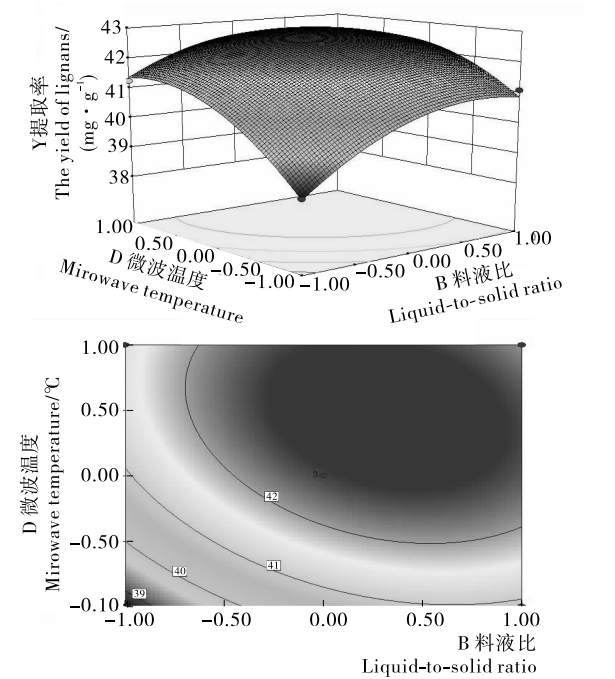


图 7 料液比和微波温度对樟叶木脂素得率的影响的曲面图和等高线图
Figure 7 Response surface and contours showing the effect of the liquid-to-solid ratio, microwave temperature on the response yield

对樟叶木脂素得率影响显著的曲面图和等高线图。从响应面的最高点和等高线可以看出,在所选的范围内存在最大

值,即响应面的最高点,同时也是等高线最小椭圆的中心点^[21]。等高线形状越扁平表明因素之间的交互作用越显著,对响应值的影响越大^[22]。由图 5~7 可知,料液比与微波时间,微波时间与乙醇浓度,料液比与微波温度之间的交互作用的等高线均呈椭圆,扁平状,表明上述因素的交互作用均对木脂素得率有显著性影响。

2.3 最佳条件预测及验证实验

通过 Design-expert 软件的数据分析,得到微波辅助提取樟树叶中木脂素的最佳工艺条件为:微波时间 5.33 min,料液比 1:25.8(g/mL),乙醇浓度 81.2%,微波温度 59.6℃。考虑到实际操作的便利,将微波辅助提取木脂素的最佳条件修正为微波时间 5 min,料液比 1:26(g/mL),乙醇浓度 80%,微波温度 60℃。在此修正条件下进行 3 次验证实验,木脂素得率分别为 42.13,42.56,43.38,其平均得率为 42.69 mg/g,回归模型预测得率理论值可达 42.95 mg/g,相对误差为 0.61%,说明该模型的可靠性。

3 结论

本试验研究了微波时间、料液比、乙醇浓度、微波温度对微波辅助提取樟树叶木脂素的影响,并在此基础上通过响应面法优化提取条件。结果表明在微波时间 5 min,料液比 1:26(g/mL),乙醇浓度 80%,微波温度 60℃的工艺条件下木脂素得率为 42.69 mg/g。传统乙醇回流法在提取时间 2 h,乙醇浓度 100%,料液比 1:4(g/mL)的条件下,樟叶中木脂素提取率为 39.21%。微波辅助提取法与其相比较具有高效、省时的优点。

本试验未对微波功率对木脂素提取率的影响方面进行研究,下一步可针对该不足之处进行深入的探索。

参考文献

[1] RICHA S, TALHA J. Cinnamomum camphora (kapur): review [J]. Pharmacognosy, 2012, 4(28): 1-5.

[2] HSIEH T J, CHERT C H, LO W L, et al. Lignans from the stem of *Cinnamomum camphora* [J]. Natural Product Communications, 2006, 1(1): 21-25.

[3] TAKAOKA D, HIROI M, IMOOKA M. Studies of lignoids in Lauraceae Ⅲ: A new lignan from the heart wood of *Cinnamomum camphora* Sieb [J]. Bulletin of the chemical Society of Japan, 1977, 50(10): 2 821-2 822.

[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] 王智慧, 凌铁军, 张梁, 等. 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.

[6] TSOPMO A, AWAH F M, KUETE V. Medicinal plant research in africa [M]. Holand: Academic Press, Elsevier, 2013, 435-478.

[7] CHEN Yu-chen, LIAW C, CHENG Yuan-bin, et al. Anti-liver fibrotic lignans from the fruits of *Schisandra arisanensis* and

Schisandra sphenanthera [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23: 880-885.

[8] JULIEN S, JACQUES A, PHILIPPE G, et al. Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) [J]. Arthropod Plant Interactions, 2013, 7: 225-233.

[9] KIM K, KIM H, CHOI S, et al. Bioactive lignans from the Rhizomes of *Acorus gramineus* [J]. Journal of natural products, 2011, 74: 2 187-2 192.

[10] FILLEUR F, POUGET C P, ALLAIS D, et al. Lignans and Neolignans from *Myristica Argentea* Warb [J]. Nat. Prod. Lett, 2002, 16(1): 1-7.

[11] 高春花, 钟海雁, 孙昌波. 五味子木脂素提取分离和含量测定研究进展 [J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 151-155.

[12] 夏云麒. 樟叶木脂素的提取及活性研究 [D]. 福建: 福建农林大学, 2011: 27-29.

[13] COMIN L M, TEMELLI F, SALDANA M A. Supercritical CO₂ extraction of flax lignans [J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 2011, 88: 707-715.

[14] 揭广川, 陈红杰, 李必金. 微波辅助复合酶法提取草菇中的风味物质 [J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 164-167.

[15] 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.

[16] TAMRESHIA S, MALLIKARJUNAN P, ZHOU Ke-quan, et al. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from *peanut shins* [J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 1 185-1 192.

[17] 谷政伟, 胡铁, 贾媛, 等. 微波辅助提取缬草叶总黄酮工艺研究 [J]. 中药材, 2014, 37(1): 2 092-2 095.

[18] 张玉香, 屈慧鸽, 杨润亚, 等. 响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(16): 33-37.

[19] 刘军海, 任惠兰, 官波, 等. 响应面分析法优化黄芪多糖提取工艺 [J]. 食品工业, 2008(3): 11-14.

[20] 李梁, 吉建邦, 康效宁, 等. 槟榔花水浸物有效成分提取工艺优化 [J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 214-219.

[21] MURALIDHAR R V, CHIRUMAMILA R R, MARCHANT R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochem. Eng. J., 2001(9): 17-23.

[22] 宋丽军, 侯旭杰, 李雅雯, 等. 核桃青皮中多酚的超高压提取工艺优化 [J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 178-182.