

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90067

# 桦树皮中桦木醇重结晶纯化工工艺优化

## Optimization of recrystallization purification process of betulin in birch bark

李榕基<sup>1</sup> 郑克炜<sup>2</sup> 陈海燕<sup>3</sup>LI Rong-ji<sup>1</sup> ZHENG Ke-wei<sup>2</sup> CHEN Hai-yan<sup>3</sup>

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130000; 2. 浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江 舟山 316000; 3. 长春科技学院生命科学学院, 吉林 长春 130000)

(1. School of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130000, China; 2. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000, China; 3. College of Life Sciences, Changchun Institute of Technology, Changchun, Jilin 130000, China)

**摘要:**目的:促进长白山地区白桦树皮的高值化利用。方法:以桦树皮为研究对象,通过乙醇浸提桦木醇,再经重结晶法进行纯化,并探讨其体外抗氧化活性。结果:桦木醇的最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 80%,料液比( $m_{\text{白桦树皮}}:V_{\text{乙醇}}$ )1:30(g/mL),提取温度 95℃,提取时间 1.5 h,此参数下桦木醇提取率为 66.21%。以无水乙醇为溶剂进行重结晶, $V_{\text{无水乙醇}}:m_{\text{固体}}=30:1$ (mL/g),-20℃重结晶,重结晶产率可达 80.00%,最高纯度达 99.81%。当桦木醇溶液质量浓度为 1.0 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基和羟基自由基清除率分别为 89.94% 和 27.79%。结论:桦木醇具有较好的抗氧化能力。

**关键词:**桦树皮;桦木醇;索氏提取;抗氧化活性

**Abstract:** Objective: This study aimed to promote the high-value utilization of birch bark in Changbai Mountain area. Methods: Taking birch bark as the research object, betulin was extracted by ethanol, then purified by recrystallization, and its antioxidant activity *in vitro* was investigated. Results: The optimal extraction process conditions of betulin were as follows: ethanol volume fraction 80%, solid-liquid ratio ( $m_{\text{birch bark}}:V_{\text{ethanol}}$ ) 1:30 (g/mL), extraction at 95℃ for 1.5 h. Under the control of these conditions, the alcohol extraction rate was 66.21%. Using absolute ethanol as solvent for recrystallization,  $V_{\text{absolute ethanol}}:m_{\text{solid}}=30:1$  (mL/g), recrystallization at -20℃, and the recrystallization yield reached 80.00%, with highest purity of 99.81%. When the concentration of betulin solution was

1.0 mg/mL, the scavenging rates of DPPH and hydroxyl free radical were 89.94% and 27.79% respectively. Conclusion: Betulin has good antioxidant capacity.

**Keywords:** birch bark; betulin; soxhlet extraction; antioxidant activity

白桦(*Betula pubescens.*)为耐寒落叶乔木,分布于北亚、北美、北欧的寒带、寒温带地区,在中国东北、华北、西北、西南等地均有生长<sup>[1-2]</sup>。桦树皮中含有三萜类、挥发油类、鞣质类、甾体类化合物等多种化学成分<sup>[3-4]</sup>,具有清热利湿、镇咳祛痰等功效<sup>[5-7]</sup>,可用于治疗烧烫伤、炎症、疥疮、黄疸、乳痈等疾病,且在降血脂、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等方面表现出了较强的生理活性<sup>[8-9]</sup>。桦木醇(*Betulin*)属于羽扇豆烷型的五环烯类化合物,又名白桦脂醇,是一种生物活性因子,在白桦树皮中含量尤为丰富,为白色晶体粉末,熔点 256℃,难溶于水,易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯和氯仿等有机溶剂。

李志兴等<sup>[10]</sup>研究表明,桦木醇对机体体力疲劳具有缓解作用。Chen 等<sup>[11]</sup>研究发现,桦木醇具有较高的抗氧化效果,针对 FRAP、DPPH、ABTS 等自由基均表现出清除能力。刚小青等<sup>[12]</sup>通过皮下注射宫颈癌细胞系 c4-1 建立异种移植瘤模型,经白桦脂醇治疗后发现,桦木醇可提高存活率是因为抑制了裸鼠体内 c4-1 移植瘤体积的增长。Rzeski 等<sup>[13]</sup>利用体外培养评价桦木醇在人类肿瘤细胞系和原代培养的肿瘤细胞中的抗癌活性,证明了桦木醇在肿瘤细胞培养中具有显著的抗增殖作用。

目前桦木醇的提取方法主要有超临界萃取法、溶剂回流提取法、超声提取法、连续提取法等。丁为民等<sup>[14]</sup>采用超临界 CO<sub>2</sub> 法萃取桦树皮中的桦木醇,当萃取温度为 32℃、萃取压力为 8 MPa、萃取时间为 1 h、CO<sub>2</sub> 流量为 20 kg/h 时,桦木醇得率为 16.96%,含量可达 74.88%。易

**基金项目:**省部共建食品营养与安全国家重点实验室开放课题(编号:TJKD20200812);长春科技学院科研启动基金(编号:ckj2020002)

**作者简介:**李榕基,男,吉林农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**陈海燕(1980—),女,长春科技学院教授,硕士。

E-mail:42220320@qq.com

**收稿日期:**2021-08-08

金娥等<sup>[15]</sup>采用甲醇作为溶剂,通过加热回流法,并用碱溶液处理提取物体系,再经减压蒸干,乙醇溶解,过滤后留上层液体,最后经减压浓缩制取样品。殷涌光等<sup>[16]</sup>采用超声波技术对桦褐孔菌中的桦木醇进行优化提取,当采用丙酮作溶剂时,桦木醇的提取质量比最高为 9.868 g/kg。马博玉等<sup>[17]</sup>采用液泛提取设备对白桦树皮中的桦木醇进行连续提取,从而优化了液泛连续提取桦木醇的工艺条件。肖涵<sup>[18]</sup>曾采用超声提取法提取桦木醇,提取率为 92.6%,而采用索氏提取法可以显著提高桦木醇提取率。

研究拟以长白山地区的白桦树皮为原料,经不同体积分数的乙醇浸提后采用索式提取及无水乙醇重结晶法联合纯化桦木醇,并分析其体外抗氧化活性,旨在为后期桦木醇的研究及相关产品的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

白桦树皮:经长春科技学院生药教研室鉴定为桦木科桦木属白桦种落叶乔木(*Betula pubescens.*)的干燥树皮,市售;

大孔吸附树脂:AB-8 型,山东东鸿化工有限公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,天津市富宇精细化工有限公司;

桦木醇标准品、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍、乙醇、香草醛、冰乙酸、抗坏血酸、硫酸亚铁、铁氰化钾:分析纯,上海源叶生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

电子天平:JJ50 型,常熟市双杰测试仪器厂;

循环水真空泵:SHZ-D(III)型,邦西仪器科技(上海)有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:GZX-9140MBE 型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;

数显恒温水浴锅:HHS-21-6 型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;

紫外可见分光光度计:UVmini-1280 型,岛津仪器(苏州)有限公司;

超高效液相色谱—电喷雾四级杆串联质谱连用仪:Waters UPLC-Quattro Premier XE 型,美国 AquityTM Waters 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 桦木醇粗品得率、纯度及综合收率计算 分别按式(1)~式(3)进行计算。

$$P = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$P$ ——桦木醇得率, %;

$m_0$ ——桦树皮粉末重量, g;

$m_1$ ——容器重量, g;

$m_2$ ——干燥后桦木醇和容器的重量, g。

$$S = \frac{S_q - b}{K \times C} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$S$ ——桦木醇纯度;

$S_q$ ——桦木醇峰面积;

$b$ ——标准曲线截距;

$K$ ——标准曲线斜率;

$C$ ——配液浓度。

$$Y = P \times 50\% + S \times 50\%, \quad (3)$$

式中:

$Y$ ——综合收率, %。

#### 1.2.2 桦木醇提取单因素试验

(1) 乙醇体积分数:固定料液比( $m_{\text{白桦树皮}} : V_{\text{乙醇}}$ ) 1 : 30 (g/mL)、提取时间 1.5 h、提取温度 95 °C,考察乙醇体积分数(70%, 75%, 80%, 85%)对桦木醇提取率的影响。

(2) 料液比:固定提取时间 1.5 h、乙醇体积分数 80%、提取温度 95 °C,考察料液比[ $m_{\text{白桦树皮}} : V_{\text{乙醇}}$  分别为 1 : 25, 1 : 30, 1 : 35, 1 : 40 (g/mL)]对桦木醇提取率的影响。

(3) 提取温度:固定料液比( $m_{\text{白桦树皮}} : V_{\text{乙醇}}$ ) 1 : 30 (g/mL)、乙醇体积分数 80%、提取时间 1.5 h、考察提取温度(90, 95, 100 °C)对桦木醇提取率的影响。

(4) 提取时间:固定料液比( $m_{\text{白桦树皮}} : V_{\text{乙醇}}$ ) 1 : 30 (g/mL)、乙醇体积分数 80%、提取温度 95 °C,考察提取时间(1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h)对桦木醇提取率的影响。

1.2.3 桦木醇提取工艺响应面法优化试验设计 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理<sup>[19-21]</sup>,以桦木醇提取率为响应值,以乙醇体积分数、料液比、提取温度和提取时间为响应因素,进行四因素三水平响应面分析试验。

1.2.4 桦木醇结晶得率计算 将抽滤所得桦木醇结晶于 50 °C 干燥 5 h,按式(4)计算桦木醇结晶得率。

$$P = \frac{m_1}{m_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

$P$ ——桦木醇结晶得率, %;

$m_0$ ——结晶前桦木醇质量, g;

$m_1$ ——结晶出的桦木醇质量, g。

1.2.5 桦木醇纯化试验方案 根据 1.2.3 所得优化提取方案,选择将 15 g 干燥的白桦树皮剪成近似 1 cm<sup>2</sup> 的方形碎片,用 95%乙醇溶液,液固比为 50 : 1 (mL/g) 浸泡 120 h,过滤,50 °C 加热回流 5 h,减压蒸馏,将液体转移到坩锅中继续蒸干,得初提物,待重结晶备用。

(1) 甲醇—氯仿重结晶法:参照文献<sup>[22]</sup>的方法并修

改。取 0.50 g 初提物,将提取液减压蒸馏后用乙醇重结晶 3 次,再用甲醇/氯仿 ( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{氯仿}}$  为 1 : 1),按  $V_{\text{甲醇-氯仿溶液}} : m_{\text{固体}} = 40 : 1$  (mL/g) 进行重结晶,静置过夜,抽滤,得白色针状的桦木醇固体。

(2) 无水乙醇重结晶法:参照文献[23]的方法并修改。取 0.50 g 初提物,以 70 mL 乙酸乙酯为溶剂,加热回流 90 min,趁热过滤。于坩埚中 50 °C 浓缩至干。以无水乙醇为溶剂进行重结晶,  $V_{\text{无水乙醇}} : m_{\text{固体}} = 30 : 1$  (mL/g), -20 °C 重结晶,室温过滤,50 °C 烘干。

(3) 吸附层析法:参照文献[23]的方法并修改。取 0.50 g 初提物,用 AB-8 型大孔吸附树脂吸附层析,使用乙酸乙酯洗脱,洗脱液回收乙酸乙酯至干,加入 15 倍无水乙醇加热溶解,0 °C 以下冷沉,过滤,干燥。

1.2.6 桦木醇含量测定 采用香草醛-冰乙酸显色法<sup>[18]</sup>。

1.2.7 桦木醇 LC-MS 检测

(1) 液相条件:色谱柱为 Acquity BEH  $C_{18}$ , 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 50 mm;流动相 A 为 0.01% 甲酸溶液,流动相 B 为甲醇;柱温 45 °C;流速 0.25 mL/min。

(2) 质谱条件:Quattro Premier XE;ESI 正离子检测方式;离子对 443.7/191.1;脱溶剂温度 380 °C、源温 110 °C、毛细管电压 3.00 kV、锥气孔大小 80 L/Hr、脱溶剂气大小 600 L/Hr。

1.2.8 桦木醇的抗氧化试验

(1) DPPH 自由基清除能力:参照金建等<sup>[24]</sup>的方法。

(2) 羟基自由基清除能力:参照杨艳等<sup>[25]</sup>的方法。

(3) 总还原力:参照毛跟年等<sup>[26]</sup>的方法。

1.2.9 数据处理 采用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行分析,采用 Origin 8.0 软件对分析后的试验数据进行作图。

2 结果与分析

2.1 桦木醇提取单因素试验

由图 1(a)可知,当乙醇体积分数为 80% 时,桦木醇提取率最高,继续增大乙醇体积分数,桦木醇提取率降低,故选择 80% 为乙醇最佳体积分数。由图 1(b)可知,当料液比为 1 : 30 (g/mL) 时,桦木醇提取率最高,继续增大料液比,桦木醇提取率降低,故选择 1 : 30 (g/mL) 为最佳提取料液比。由图 1(c)可知,在试验范围内提取温度对提取率的影响不明显,可能是由于 90~100 °C 皆高于乙醇的沸点,乙醇溶液的蒸发速率相差不大,考虑节约能源成本和提取效果,选择 95 °C 为最佳提取温度。由图 1(d)可知,当索氏提取时间为 1.5 h 时,桦木醇的提取率最高,时间过长可能会导致除目标物以外的其他成分也会被提取出来,因此最佳提取时间设定为 1.5 h。

2.2 响应面法优化桦木醇提取工艺

2.2.1 试验设计与结果 在单因素试验基础上,以乙醇体积分数、料液比、提取温度和提取时间为影响因素,以桦木醇提取率为响应值,利用 Design-Expert 10 软件进行响应面回归分析,优化桦木醇提取工艺。试验因素水平

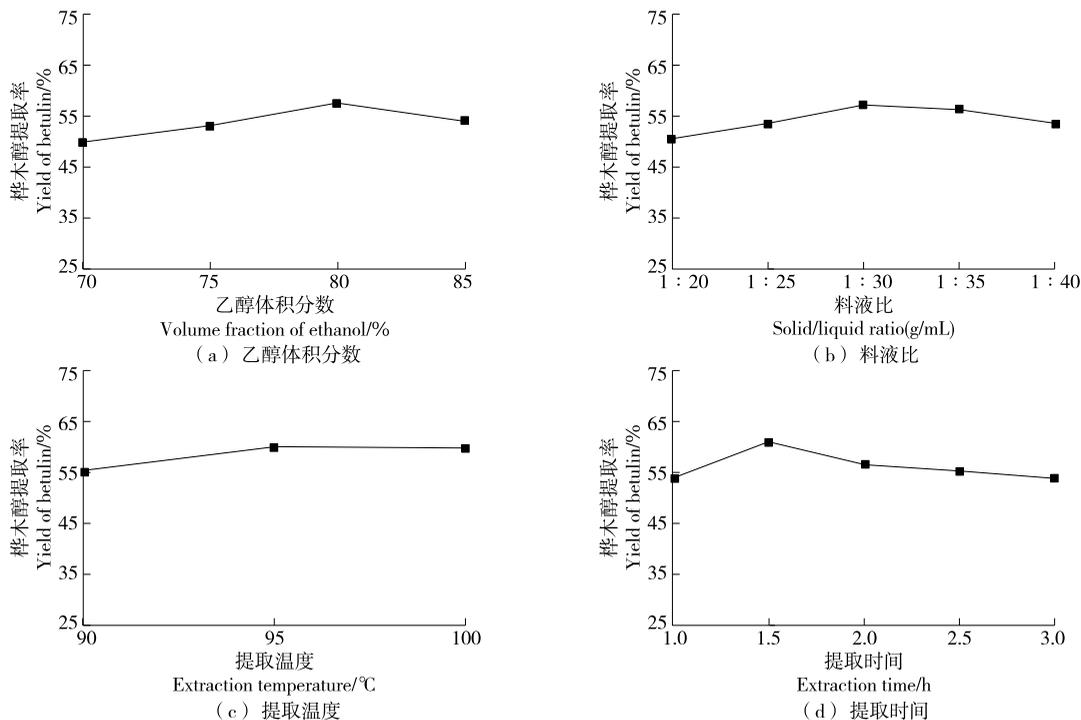


图 1 各因素对桦木醇提取率的影响

Figure 1 The influence of various factors on the extraction rate of betulin

设计见表 1, 试验设计与结果见表 2, 方差分析见表 3。

应用 Box-Behnken 试验设计原理对表 2 数据进行处理, 得二次多元回归方程:

$$Y = 66.02 + 1.38A - 0.061B + 2.14C + 1.04D + 2.50E - 0.03AB - 0.90AC + 0.83AD - 1.53BC + 0.024BD - 0.40CD - 3.37A^2 - 2.81B^2 - 4.27C^2 - 5.40D^2。$$

(5)

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Response surface test factor level table

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 料液比 (g/mL)	C 提取 温度/°C	D 提取 时间/h
-1	75	1:25	90	1.0
0	80	1:30	95	1.5
1	85	1:35	100	2.0

表 2 桦木醇提取响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results of betulin extraction scheme

试验号	A	B	C	D	提取率/%	试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	0	0	0	0	66.81	16	0	-1	0	-1	55.41
2	0	0	1	-1	57.95	17	0	0	0	0	65.97
3	0	0	0	0	65.03	18	0	1	0	-1	56.09
4	0	-1	1	0	66.11	19	0	1	1	0	59.78
5	0	-1	0	1	58.88	20	-1	0	1	0	59.19
6	0	-1	-1	0	55.04	21	0	0	1	1	58.96
7	0	0	0	0	66.25	22	-1	0	0	-1	56.49
8	0	1	0	1	59.33	23	1	0	0	-1	56.73
9	-1	-1	0	0	58.34	24	0	0	-1	-1	53.88
10	1	-1	0	0	62.01	25	-1	1	0	0	58.60
11	1	0	-1	0	58.47	26	0	1	-1	0	56.70
12	1	1	0	0	62.28	27	0	-1	1	0	60.77
13	1	0	0	1	59.63	28	0	-1	0	1	58.55
14	0	0	-1	1	56.48	29	0	-1	-1	0	55.27
15	1	0	1	0	60.09						

表 3 回归模型方差分析<sup>†</sup>

Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	340.57	14	24.33	11.59	<0.000 1	* *
A	14.63	1	14.63	6.97	0.019 4	*
B	0.05	1	0.05	0.03	0.876 9	
C	51.27	1	51.27	24.43	0.000 2	* *
D	11.50	1	11.50	5.48	0.034 6	*
AB	2.50E-005	1	2.50E-005	1.19E-005	0.997 3	
AC	1.98	1	1.98	0.95	0.347 4	
AD	1.67	1	1.67	0.80	0.387 1	
BC	13.33	1	13.33	6.35	0.024 5	*
BD	2.83E-003	1	2.83E-003	1.35E-003	0.971 2	
CD	0.63	1	0.63	0.30	0.591 8	
A <sup>2</sup>	54.04	1	54.04	25.75	0.000 2	* *
B <sup>2</sup>	47.87	1	47.87	22.81	0.000 3	* *
C <sup>2</sup>	107.97	1	107.97	51.45	<0.000 1	* *
D <sup>2</sup>	170.69	1	170.69	81.34	<0.000 1	* *
残差	29.38	14	2.10			
失拟项	13.38	8	1.67	0.63	0.735 7	
纯误差	16.00	6	2.67			
总和	369.95	28				

<sup>†</sup> \* 影响显著 (P<0.05); \* \* 影响极显著 (P<0.01)。

由表 3 可知,模型  $P$  值  $< 0.000 1$ ,极显著,失拟项  $P$  值为  $0.735 7 > 0.05$ ,无显著差异,决定系数  $R^2 = 0.920 6$ ,经调整后的决定系数  $R_{adj}^2 = 0.841 2$ ,变异系数  $CV = 2.44\%$ ,说明该模型具有良好的拟合效果,试验误差较小,可以利用该模型对桦木醇提取率进行预测和分析。

2.2.2 响应曲面分析 由图 2 可知,各因素交互作用对桦木醇提取率均有一定影响,其中以提取温度和料液比的交互作用所形成的曲面相对陡峭,表明其对试验结果的影响最为显著,与方差分析结果一致。

2.2.3 验证实验 经响应面分析优化的最佳工艺参数为乙醇体积分数 80.928%、料液比 1 : 29.621 (g/mL)、提取温度 96.199 °C、提取时间 1.551 h,此时桦木醇提取率为 66.455%。考虑实际操作的可行性,将工艺参数修正为乙

醇体积分数 80%、料液比 1 : 30 (g/mL)、提取温度 95 °C、提取时间 1.5 h,实测桦木醇提取率为 66.21%,与预测值较接近,证明此优化方案可行,在实际应用中具有可操作性。

2.3 桦木醇的重结晶方法比较

由表 4 可知,甲醇—氯仿重结晶法得到的白色针状固体为 0.04 g,重结晶率为 8%。大孔吸附树脂层析法得到的奶白色固体粉末为 0.19 g,重结晶率为 38%。无水乙醇重结晶法得到的白色粉末状固体为 0.40 g。重结晶率为 80%。

2.4 样品中桦木醇鉴定

采用 LC-MS 方法对所提取的桦木醇样品进行检测,结果见图 3。

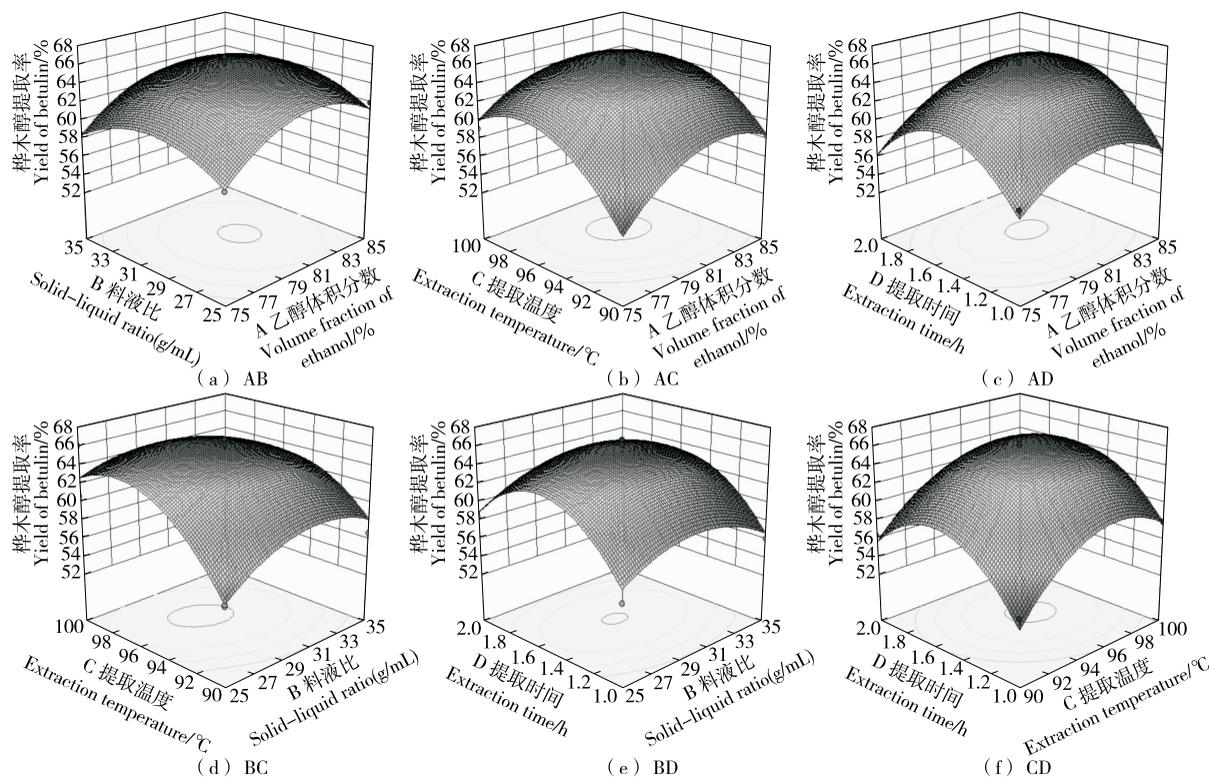


图 2 各因素相互作用对桦木醇提取率的影响

Figure 2 The influence of various factors on the extraction rate of betulin

表 4 桦木醇初提物重结晶的产量及产率

Table 4 Yield and yield of recrystallization of the initial extract of betulin

方法	桦木醇产量/g	桦木醇产率/%
甲醇—氯仿重结晶法	0.04	8
无水乙醇重结晶法	0.40	80
大孔吸附树脂层析法	0.19	38

由图 3 可知,桦木醇样品色谱出峰时间为 6.12 min,峰面积为 749,与其他成分所形成的峰完全分离,通过与桦木醇标品对比可知,样品中含有目标物桦木醇。

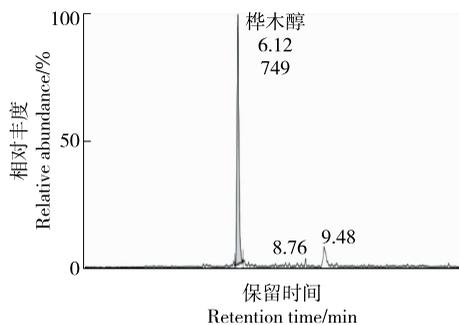


图 3 桦木醇样品 LC-MS 检测图

Figure 3 LC-MS detection of betulin samples

## 2.5 桦木醇的抗氧化活性

2.5.1 DPPH 自由基清除能力 由图 4 可知,当桦木醇溶液质量浓度为 0.2~0.6 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基的清除率逐渐增加,当桦木醇溶液质量浓度 >0.6 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基的清除效果不再显著提升。与维生素 C 对 DPPH 自由基的清除能力相比而言,桦木醇溶液同样也表现出了较强的清除效果。

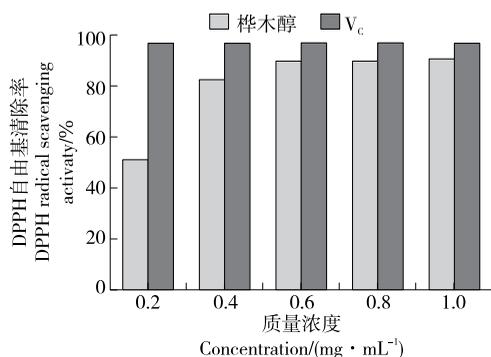


图 4 桦木醇对 DPPH 自由基的清除作用

Figure 4 DPPH radical scavenging effect of betulin

2.5.2 羟基自由基清除能力 由图 5 可知,当桦木醇溶液质量浓度为 0.2 mg/mL 时,其对羟基自由基无清除效果,但随着桦木醇质量浓度的增大,其对羟基自由基的清除作用逐渐增强。桦木醇的抗氧化性可能是桦木醇与自由基相结合,阻止了自由基的链式氧化反应。

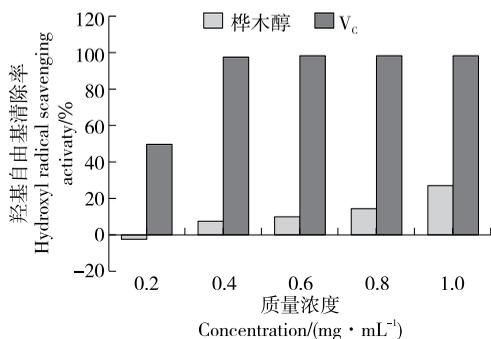


图 5 桦木醇对羟基自由基的清除作用

Figure 5 Hydroxyl radical scavenging effect of betulin

2.5.3 总还原力 由图 6 可知,随着桦木醇质量浓度的增加,溶液的吸光度值逐渐上升,但上升趋势较为缓慢。在试验质量浓度范围内,维生素 C 的总还原能力强于桦木醇。

## 3 结论

白桦树皮中桦木醇的最佳提取工艺为乙醇体积分数 80%、料液比 1 : 30 (g/mL)、提取温度 95 °C、提取时间 1.5 h,在此条件下桦木醇提取率为 66.21%。以无水乙醇为溶剂进行重结晶,  $V_{\text{无水乙醇}} : m_{\text{固体}} = 30 : 1$  (mL/g),

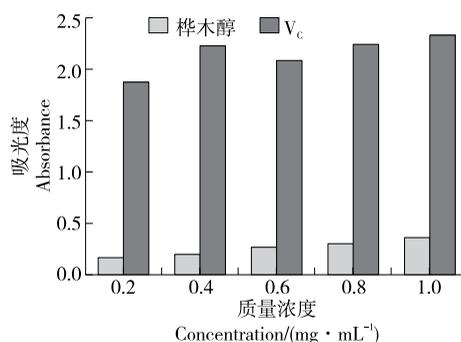


图 6 桦木醇的总还原力

Figure 6 Results of total reducing power of betulin

-20 °C 重结晶,重结晶产率可达 80.00%,最高纯度达 99.81%。抗氧化试验表明,桦木醇具有较强的总抗氧化活性,但总还原能力及对羟基自由基、DPPH 自由基清除能力均低于维生素 C。后续可进一步探究混合溶剂重结晶对桦木醇纯度的影响,同时从生物活性角度,探究其体内抗氧化活性及抗衰老能力,并对其作用机制进行深入研究。

## 参考文献

- [1] 黄若之. 水湿生木本植物景观及其应用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2012: 17.  
HUANG Ruo-zhi. Water-wet woody plant landscape and its application research[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2012: 17.
- [2] GUO Sheng-lei, ZHANG De-hui, WEI Huan-yong, et al. Climatic factors shape the spatial distribution of concentrations of triterpenoids in barks of white birch (*Betula Platyphylla* Suk.) trees in Northeast China[J]. Forests, 2017, 8(9): 4.
- [3] KIM H, LEE S, LEE J, et al. Simultaneous production of 1,6-hexanediol, furfural, and high-purity lignin from white birch: Process integration and techno-economic evaluation[J]. Bioresource Technology, 2021, 331: 8.
- [4] 赵明, 赵英楠, 李军, 等. 白桦树皮化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(16): 4 117-4 123.  
ZHAO Ming, ZHAO Ying-nan, LI Jun, et al. Study on the chemical constituents of birch bark[J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 51(16): 4 117-4 123.
- [5] 石峰, 陈雨, 张亚琴, 等. 泽泻总三萜超声辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 170-174.  
SHI Feng, CHEN Yu, ZHANG Ya-qin, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for total triterpenes of *Alisma orientale*[J]. Food & Machinery, 2018, 34(3): 170-174.
- [6] 李佳楠, 陈小华, 郝毫, 等. 罗文莎叶挥发油的化学成分及抑菌与酶抑制作用[J]. 食品与机械, 2021, 37(1): 34-39.  
LI Jia-nan, CHEN Xiao-hua, HAO Hao, et al. Chemical constituents and antibacterial and enzyme inhibitory effects of volatile oil from *Ravenshaw* leaves[J]. Food & Machinery, 2021, 37(1): 34-39.

- [7] 杨佳娣, 柯婉, 叶国栋, 等. 裹麦冬总甾体皂苷提取工艺优化及体外清除自由基活性评价[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 168-174.  
YANG Jia-di, KE Wan, YE Guo-dong, et al. Optimization of extraction technology of total steroidal saponins of *Ophiopogon japonicus* and evaluation of free radical scavenging activity in vitro[J]. Food & Machinery, 2018, 34(4): 168-174.
- [8] ZHANG Wen-dan, JIANG Hong-hong, YANG Jian-xi, et al. Safety assessment and antioxidant evaluation of betulin by LC-MS combined with free radical assays[J]. Analytical Biochemistry, 2019, 587: 19-25.
- [9] DORIAN Blondeau, ANNABELLE St-Pierre, NATHALIE Bourdeau, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of white birch (*Betula papyrifera* Marshall) bark extracts[J]. Microbiology Open, 2020, 9(1): 207-211.
- [10] 李志兴. 白桦脂醇对小鼠的抗疲劳及耐缺氧作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011: 38.  
LI Zhi-xing. Study on the anti-fatigue and hypoxia tolerance effects of betulin on mice[D]. Changchun: Jilin University, 2011: 38.
- [11] CHEN Hai-yan, XIAO Han, PANG Ji-wei. Parameter optimization and potential bioactivity evaluation of a betulin extract from white birch bark[J]. Plants, 2020, 9(3): 392-407.
- [12] 刚小青, 吴衡慧, 周文磊. 白桦脂醇通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制宫颈癌小鼠移植瘤增殖[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(10): 1 227-1 231.  
GANG Xiao-qing, WU Heng-hui, ZHOU Wen-lei. Betulin inhibits the proliferation of cervical cancer transplanted tumors in mice by inhibiting the PI3K/AKT pathway[J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(10): 1 227-1 231.
- [13] RZESKI W, STEPULAK A, SZYMANSKI M, et al. Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2009, 105(6): 859-864.
- [14] 丁为民, 王洋, 阎秀峰, 等. 均匀设计法优化桦木醇的超临界二氧化碳萃取工艺[J]. 林产化学与工业, 2007(3): 63-66.  
DING Wei-min, WANG Yang, YAN Xiu-feng, et al. Uniform design method to optimize the supercritical carbon dioxide extraction process of betulin[J]. Forest Products Chemistry and Industry, 2007(3): 63-66.
- [15] 易金娥, 文立新, 袁莉芸, 等. 白桦树中桦木醇的提取与桦木酸合成研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(5): 574-580.  
YI Jin-e, WEN Li-xin, YUAN Li-yun, et al. Study on the extraction of betulin and the synthesis of betulonic acid from white birch[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition), 2010, 36(5): 574-580.
- [16] 殷涌光, 崔彦如, 丁宏伟. 超声波辅助提取桦褐孔菌中白桦脂醇的研究[J]. 农业机械学报, 2008(4): 204-206, 199.  
YIN Yong-guang, CUI Yan-ru, DING Hong-wei. Ultrasonic-assisted extraction of betulin from *Inonotus obliquus*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2008(4): 204-206, 199.
- [17] 马博玉, 于涛. 白桦脂醇的连续提取工艺研究[J]. 科学技术创新, 2020(2): 150-153.  
MA Bo-yu, YU Tao. Study on the continuous extraction process of betulin[J]. Science and Technology Innovation, 2020(2): 150-153.
- [18] 肖涵. 白桦树皮中白桦脂醇的提取纯化及对斑马鱼致畸作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019: 22.  
XIAO H. Extraction and purification of betulin from birch bark and its teratogenic effects on zebrafish[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019: 22.
- [19] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.  
LI Li, ZHANG Sai, HE Qiang, et al. Application of response surface methodology in experimental design and optimization[J]. Laboratory Research and Exploration, 2015, 34(8): 41-45.
- [20] 钱森和, 金浩然, 魏明, 等. 响应面法优化黄精黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 安徽工程大学学报, 2017, 32(4): 8-13, 25.  
QIAN Sen-he, JIN Hao-ran, WEI Ming, et al. Optimization of extraction process of polygonatum flavonoids and antioxidant activity by response surface methodology[J]. Journal of Anhui University of Technology, 2017, 32(4): 8-13, 25.
- [21] CHEN Qi-he, FU Ming-liang, LIU Jin, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 277-284.
- [22] 胡祥正, 冯娜, 程姗姗, 等. 重结晶法纯化桦木醇的工艺研究[J]. 应用化工, 2018, 47(11): 2 415-2 418.  
HU Xiang-zheng, FENG Na, CHENG Shan-shan, et al. Study on the purification process of betulin by recrystallization[J]. Applied Chemical Industry, 2018, 47(11): 2 415-2 418.
- [23] 陈明威, 魏明, 陶良凡, 等. 大孔树脂分离纯化霍山石斛多酚及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 148-153.  
CHEN Ming-wei, WEI Ming, TAO Liang-fan, et al. Study on separation and purification of polyphenols from *Dendrobium huoshanense* by macroporous resin and its antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2020, 36(11): 148-153.
- [24] 金建, 曾威, 吴咏, 等. 短梗大参多酚的提取及体外抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 181-185.  
JIN Jian, ZENG Wei, WU Yong, et al. The extraction and in vitro antioxidant activity of polyphenols from stalk ginseng[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 181-185.
- [25] 杨艳, 祁平, 吴永妮, 等. 黑木耳花青素提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(9): 70-75.  
YANG Yan, QI Ping, WU Yong-ni, et al. Optimization of the extraction process of black fungus anthocyanin and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(9): 70-75.
- [26] 毛跟年, 胡媛, 何亚娟, 等. 裂叶荨麻根总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性评价[J]. 动物医学进展, 2020, 41(2): 47-53.  
MAO Gen-nian, HU Yuan, HE Ya-juan, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from the root of *Urtica lanceolata* and evaluation of antioxidant activity[J]. Advance in Veterinary Medicine, 2020, 41(2): 47-53.