

文章编号:1001-6880(2018)6-1037-09

龙脑樟去油枝叶中总多酚的酶解-超声辅助提取及抗氧化活性

张 峰^{1,2*}, 赵振东^{1,2}, 王 鹏³¹中国林业科学研究院林产化学工业研究所 生物质化学利用国家工程实验室 国家林业局
林产化学工程重点开放性实验室 江苏省生物质能源与材料重点实验室,南京 210042;²中国林业科学研究院林业新技术研究所,北京 100091;³江西农业大学江西特色林木资源培育与利用 2011 协同创新中心,南昌 330045

摘要:为探讨龙脑樟去油枝叶中总多酚的酶解-超声辅助提取工艺,在单因素实验的基础上,通过 Box-Behnken 设计-响应面法研究纤维素酶用量(X_1)、乙醇浓度(X_2)、液料比(X_3)对龙脑樟去油枝叶中总多酚提取率的影响;同时,以清除 DPPH 自由基和羟基自由基的能力为评价指标,对总多酚提取物的抗氧化活性进行测定。结果表明,各因素对总多酚提取率的影响顺序为液料比(X_3)>乙醇浓度(X_2)>酶用量(X_1);酶解-超声辅助提取龙脑樟去油枝叶中总多酚的最优工艺条件为:酶用量 1.9%,乙醇浓度 54%,液料比 34 mL/g,酶解温度 50 °C,酶解时间 1.5 h,超声时间 30 min,超声频率 45 kHz,超声功率 360 W,超声温度 70 °C;在此条件下,总多酚提取率的平均值为 22.08 mg/g,与预测值相近,二次回归模型预测性良好。总多酚提取物对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除作用均呈现量效关系,半数抑制浓度(IC_{50})值分别为 0.36 和 0.15 mg/mL,表明总多酚提取物具有较强的抗氧化能力。

关键词:响应面法;龙脑樟去油枝叶;酶解-超声辅助提取;总多酚;抗氧化活性

中图分类号:R284.2;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.020

Enzymolysis-ultrasonic-assisted Extraction and Antioxidant Activity of Total Polyphenols from Degreasing *Cinnamomum caraphora* Leaves

ZHANG Feng¹, BI Liang-wu^{1,2*}, ZHAO Zhen-dong^{1,2}, WANG Peng³¹Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass

Chemical Utilization; Key and Open Lab. of Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab.
of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China; ²Institute of New Technology
of Forestry, CAF, Beijing 100091, China; ³2011 Collaborative Innovation Center of Jiangxi Typical Trees
Cultivation and Utilization in Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: In order to investigate enzymolysis-ultrasonic-assisted extraction of total polyphenols from degreasing *Cinnamomum caraphora* (L.) Presl leaves, Box-Behnken design coupled with response surface analysis based on the single factor experiments was adopted to study the effects of influencing factors including cellulase dosage (X_1), ethanol concentration (X_2) and liquid-solid ratio (X_3) on the extraction rate of total polyphenols. Antioxidant activity of extract of total polyphenols was estimated by testing DPPH radical and hydroxyl radical scavenging ability. The results showed that the effects of above factors on the extraction rate of total polyphenols from degreasing *C. caraphora* leaves were in the following order: liquid-solid ratio (X_3) > ethanol concentration (X_2) > cellulase dosage (X_1), and the optimal extraction conditions were as follows: 1% as cellulase dosage, 55% ethanol solution as extraction solution, 30 mL/g as ratio of liquid to solid, 50 °C as enzymolysis temperature, 1.5 h as enzymolysis time, 30 min as ultrasonic time, 45 kHz as ultrasonic frequency, 360 W as ultrasonic power, 70 °C as ultrasonic temperature. Under the optimal conditions, the mean value

收稿日期:2017-07-19 接受日期:2017-09-01

基金项目:江西农业大学江西特色林木资源培育与利用 2011 协同创新中心项目(2013-038);中国林科院林产化学工业研究所研究团队建设
创新工程项目(LHSXKQ2)

*通信作者 Tel:86-25-85482534; E-mail:biliangwu@126.com

of extraction rate of total polyphenols reached 22.08 mg/g, which was close to the predicted response value. Therefore, the quadratic regression model can be used to predict the enzymolysis-ultrasonic-assisted extraction conditions of total polyphenols from degreasing *C. caraphora* leaves. Extract of total polyphenols exhibited a dose-dependent scavenging activity against DPPH radical and hydroxyl radical. Its half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) were 0.36 and 0.15 mg/mL, respectively, which suggested extract of total polyphenols had high antioxidant activity.

Key words: Box-Behnken design; degreasing *Cinnamomum caraphora* leaves; enzymolysis-ultrasonic-assisted extraction; total polyphenols; antioxidant activity

龙脑樟 [*Cinnamomum caraphora* (L.) Presl] 为樟科 (*Lauraceae*) 樟属 (*Cinnamomum*) 常绿性乔木,于 1987 年在江西吉安首次被发现^[1]。龙脑樟叶富含天然右旋龙脑(简称天然冰片),气清香、味苦、辛凉,具有通诸窍、散郁火、消肿止痛的功效^[2]。目前,从龙脑樟叶提取天然冰片的主要方法是采用水蒸汽蒸馏法,而同时会产生大量剩余物:龙脑樟去油枝叶^[3]。蒸馏后的去油枝叶,要么晾干后作为烧锅炉的部分燃料,要么还田作肥料,资源利用率不高。近年来对各种天然产物剩余物的进一步开发利用,越来越受到学术界的广泛关注。不少学者对去油广藿香、迷迭香去油枝叶、油樟叶去油提取物等众多天然产物的剩余物进行过一定的研究^[4-6]。基于大量文献与报道,我们尝试建立一种高效提取方法探究龙脑樟去油枝叶中总多酚的含量。

总多酚 (Total Polyphenols),不是某一种物质的名称,而是某一类化学物质的总称^[7]。其主要活性成分为多酚类化合物,是含若干个酚性羟基结构的次生代谢物,包括黄酮类、单宁类、酚酸类以及花色苷类等,广泛分布于植物根、枝、叶、果实,具有抑菌、抗癌、抗氧化等多种生物活性^[8-10]。

目前,国内外对植物总多酚的提取主要采用溶剂萃取法^[11,12]和超声提取法^[13],高文秀等^[14]通过正交试验设计将超声提取法与酶解法相结合用于山楂中总黄酮的提取,所构建的新型提取方法比单独超声提取,获得了更高的提取率。但正交试验法用于提取工艺的优化,各因素的水平设计有限,优化精确度低,不能有效阐明各因素交互作用对提取率的影响^[15]。

Box-Behnken 设计 (Box-Behnken Design, 简称 BBD),具有位于试验空间边缘中点处的处理组合,并要求至少有三个因子,可根据设计所建立的数学模型描绘响应面,从其较优区域直接读取最优化工艺条件,能有效研究多变量系统。该方法的设计点通常较少,尤其三因子的 BBD 设计是十分经济的,实验次数少,所以它们的运行成本低。BBB 设计没

有轴点,可以确保所有因子不会同时设置在高水平,因此所有设计点都在安全操作区域内。通过 BBD 设计能够研究变量间交互作用对响应值的影响,得到较准确的描述研究对象的关联式,具有良好的预测性^[16]。本研究采用 BBD 设计-响应面法 (Response Surface Methodology, RSM) 对酶解-超声辅助提取龙脑樟去油枝叶中总多酚的工艺进行优化,以使总多酚提取率最大化;以清除 DPPH 自由基和羟基自由基的能力为评价指标,对总多酚提取物的抗氧化活性进行测定,为进一步开发利用废弃的龙脑樟去油枝叶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

RE-1102-VN 型旋转蒸发仪,南京科尔仪器设备有限公司;UV9100 型紫外可见分光光度计,北京莱伯泰科技仪器有限公司;KQ-600VDB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;SHB-III 型循环水式多用真空泵,河南太康科教器材厂;Scientz-10N 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

没食子酸标准品购于上海麦克林生化科技有限公司;甲醇(色谱纯)购于南京化学试剂有限公司;磷酸(色谱纯)购于美国 Aladdin 公司。龙脑樟叶采自湖北省当阳市香炉山林场,湖北羽壹生态农业科技有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 龙脑樟叶的预处理

取适量自然阴干的龙脑樟叶,经粉碎机粉碎过 20 目筛,称重 200.0 g,按料液比 1:10 (g/mL) 加入蒸馏水,浸泡 12 h,并辅以机械搅拌,而后水蒸气蒸馏 4 h 除去精油。过滤,65 ℃烘干,冷却。最终得到干燥的龙脑樟去油枝叶,待用。

1.2.2 总多酚的提取

准确称取干燥的龙脑樟去油枝叶 1.0 g,按液料比 20:1 (mL/g) 加入 60% 乙醇,在恒定条件(超声时间 30 min, 超声频率 28 kHz, 超声温度 40 ℃)下超

声提取,提取结束后,将提取液 8800 rpm 离心 5 min,除杂。上层清液转移至 50 mL 比色管中,并用无水乙醇定容得样品试液,测定总多酚提取率,考察不同超声功率(240、300、360、420 W)对总多酚提取率的影响;按照上述方法固定其他实验因素的优化条件,分别选择超声频率(28、45、100 kHz,所用超声设备只有三个固定的超声频率),超声时间(10、20、30、40、50 min),超声温度(40、50、60、70、80 °C),依次设计单因素实验考察超声频率、超声时间、超声温度对总多酚提取率的影响,获得超声提取总多酚的优化工艺条件。

在超声提取的优化工艺条件下,采用“先酶解后超声”的酶解-超声辅助法提取总多酚,采用单因素实验和 Box-Behnken 设计-响应面法(BBD-RSM)优化该提取工艺。操作步骤如下:准确称取干燥的龙脑樟去油枝叶 1.0 g,按液料比 20:1 (mL/g)加入 60 % 乙醇,在超声提取的优化条件(超声时间 30 min,超声功率 360 W,超声频率 45 kHz,超声温度 70 °C)下进行酶解-超声辅助提取(酶解时间 1.5 h,酶解温度 60 °C),考察不同酶用量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,其中酶用量是相对于龙脑樟去油枝叶的量)对总多酚提取率的影响;同时按照该方法固定其他实验因素的优化条件,依次设计单因素实验考察酶用量、酶解时间、料液比、酶解温度、乙醇浓度对总多酚提取率的影响。在以上单因素实验基础上,选取三个对总多酚提取率影响较大的因素:酶用量(X_1 ,%)、乙醇浓度(X_2 ,%)、液料比(X_3 ,mL/g),采用 BBD-RSM 设计对龙脑樟去油枝叶中总多酚的酶解-超声辅助提取工艺进行优化。

1.2.3 抗氧化能力的测定

将 50 mL 样品试液全部移至旋蒸瓶中,70 °C 水浴下旋蒸至无醇味。冷冻干燥,称量。最终得到干燥的总多酚提取物,待用。通过 DPPH 自由基清除能力和羟基自由基清除能力评价总多酚提取物的抗氧化能力。

1.3 分析方法

1.3.1 标准曲线的绘制

以没食子酸作为标准样品,配制 0.1 mg/mL 的没食子酸标准母液。取 6 只 10 mL 容量瓶,精密吸取 0(空白)、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的没食子酸标准母液于 10 mL 容量瓶中,分别加入 20 % 福林酚试剂 1.0 mL,混匀,加入 15 % Na₂CO₃ 溶液 2.0 mL,

混匀,加水定容,摇匀。反应静置 60 min 后测定 760 nm 处吸光度值。以标准溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。得线性回归方程为: $Y = 0.08148X + 0.01291 (R = 0.9957)$ 。没食子酸在 0 ~ 10 mg/mL 范围内与吸光度有良好的线性关系。

1.3.2 样品中总多酚提取率测定^[17]

取 0.2 mL 样品试液于 10 mL 容量瓶中,加入 20% 福林酚试剂 1.0 mL,加 5 mL 蒸馏水,混匀;加入 15% Na₂CO₃ 溶液 2.0 mL,混匀,加水定容,摇匀。反应静置 60 min 后测定 760 nm 处吸光度值。结合回归方程计算样品试液中总多酚浓度,乘以稀释倍数计算出乙醇粗提液中总多酚质量,按下式计算去油枝叶中总多酚提取率。

$$\text{总多酚提取率}(\text{mg/g}) = \frac{\text{乙醇粗提液中总多酚的质量}}{\text{去油枝叶的质量}} \times 100\%$$

1.3.3 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力测定参考 Ali^[18] 的方法加以调整,用无水乙醇配置质量浓度分别为 0.02、0.06、0.10、0.14、0.18 mg/mL 的总多酚提取物溶液,0.1 mg/mL 的 DPPH 溶液;准确移取 2 mL DPPH 溶液于具塞试管中,分别各加入等体积不同浓度的总多酚提取物溶液,混合均匀后于黑暗处室温下反应 30 min,于 517 nm 处测定各样品的吸光度值,平行测定三次,取平均值,以 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)和 Vc 作为对照。

$$\text{清除率}(\%) = \{ [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \} \times 100\%$$

注: A_0 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 无水乙醇; A_1 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 总多酚提取物溶液; A_2 为 2 mL 无水乙醇 + 2 mL 总多酚提取物溶液。

1.3.4 羟基自由基清除能力的测定^[19]

参照 Fenton 反应的方法建立反应体系。反应体系及所需溶液及试剂:PBS 缓冲液(pH = 7.4)、0.75 mmol/L 邻菲罗啉无水乙醇、0.75 mmol/L FeSO₄ 溶液、双氧水(0.01%),不同质量浓度的总多酚提取物溶液(样液)。不同组别各溶液加入反应体系的体积见表 1,同时以 Vc 作为参照。

反应体系置于 37 °C 恒温水浴中反应 1 h 以后,迅速测定其在 536 nm 处的吸光值,平行测定 3 次,取平均值。

$$\text{清除率}(\%) = (A_s - A_p) / (A_b - A_p) \times 100\%$$

表1 各溶液加入反应体系的体积(mL)

Table 1 The volume of solution added into the reaction system

组别 Group	PBS	邻菲罗啉 Phenanthroline	蒸馏水 H_2O	$FeSO_4$	样液 Sample solution	双氧水 H_2O_2
A_b	2	1	2	1	0	0
A_p	2	1	1	1	0	1
A_s	2	1	0	1	1	1

2 结果与分析

2.1 超声提取工艺的单因素实验

2.1.1 超声功率对总多酚提取率的影响

实验结果如图1A所示,随着超声功率增大,总多酚提取率也不断增加,但当超声功率达到360 W时,继续增大超声功率,总多酚提取率呈下降趋势。这是因为超声功率的增大能有效破坏原料的细胞壁,使得酚类物质得以溶出;而过大的超声功率引发反应体系内部紊乱,细胞内其他杂质可能溶出造成总多酚提取率的下降。所以,选择超声功率360 W较为合适。

2.1.2 超声频率对总多酚提取率的影响

实验结果如图1B所示,随着超声频率增大,总多酚提取率也不断增加,但当超声频率达到45 kHz时,继续增大超声频率,总多酚提取率骤降。这是由于超声频率的增大使得“空化效应”逐渐增强,能加速溶剂穿透细胞壁,使得酚类物质得以溶出;但是过大的超声频率引发体系内部急速升温,高温会使多酚类物质氧化造成总多酚提取率的下降。因此,超

声频率选择45 kHz较为合适。

2.1.3 超声时间对总多酚提取率的影响

实验结果如图1C所示,随着超声时间增大,总多酚提取率也不断增加,但当超声时间达到30 min时,继续增加超声时间,总多酚提取率开始下降。这是因为随着超声时间的增加,酚类物质逐渐溶出,故总多酚提取率逐渐增大;但是随着超声时间的延长,多酚类物质氧化、溶剂挥发或者发生其他化学反应会使得总多酚提取率下降。综合分析,超声时间选择30 min较为合适。

2.1.4 超声温度对总多酚提取率的影响

实验结果如图1D所示,随着超声温度升高,总多酚提取率一直呈上升趋势,但当超声温度达到70 ℃时,继续升高温度,总多酚提取率几乎不再增加。这是由于超声温度的升高,会促进分子热运动,从而加速溶剂穿透细胞壁,使得酚类物质得以溶出;但是超声温度过高,可能会改变多酚类物质的结构,发生分解造成总多酚提取率的下降。基于以上分析,超声温度70 ℃较为合适。

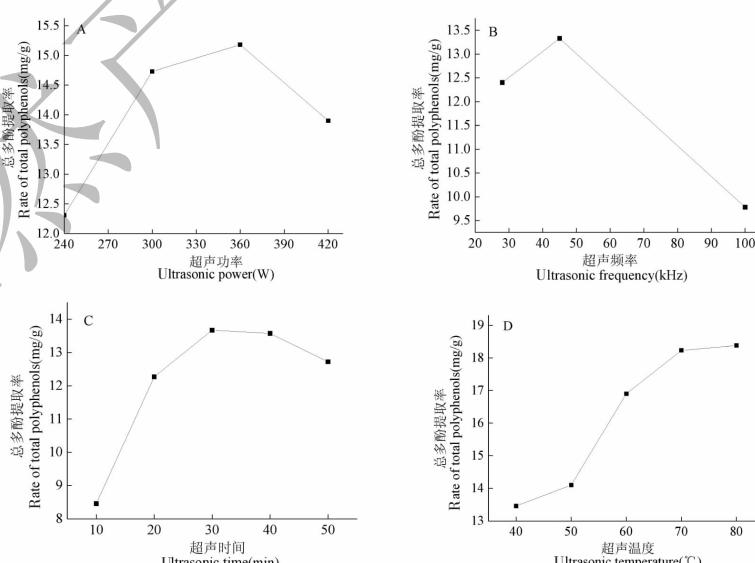


图1 超声功率(A)、超声频率(B)、超声时间(C)、超声温度(D)对总多酚提取率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power (A), ultrasonic frequency (B), ultrasonic time (C), ultrasonic temperature (D) on extraction rate of total polyphenols

2.2 酶解-超声辅助提取工艺的单因素实验

2.2.1 酶用量对总多酚提取率的影响

实验结果如图 2A 所示,随着酶用量的增加,总多酚提取率也增加,但当超酶用量达到 2.0% 时,继续增大酶用量,总多酚提取率开始下降。这是因为酶用量的增加,会促进酶解反应的进行,总多酚提取率逐渐增大;但过量的酶会包裹原料颗粒,不利于多酚类物质的溶出,造成总多酚提取率的下降。因此,选择酶用量 2.0% 较为合适。

2.2.2 酶解时间对总多酚提取率的影响

实验结果如图 2B 所示,随着酶解时间的增加,总多酚提取率增大,但当超酶解时间达到 1.5 h 时,继续延长酶解时间,总多酚提取率开始下降。这是因为时间延长使得杂质更多的溶出,从而造成总多酚提取率的下降。考虑到成本和能耗等各方面因素,选择酶解时间 1.5 h 较为合适。

2.2.3 料液比对总多酚提取率的影响

实验结果如图 2C 所示,随着液料比的增大,总多酚提取率呈上升趋势,但当液料比达到 30:1 时,继续加大液料比,总多酚提取率并没有明显增长。这是因为随着液料比的增大多酚类物质逐渐溶出,

但是过大的液料比不仅会增加溶剂成本、能耗,而且会使多酚氧化造成总多酚提取率的下降。综合各方面因素,选择液料比 30:1 较为合适。

2.2.4 酶解温度对总多酚提取率的影响

实验结果如图 2D 所示,随着液料比的增大,总多酚提取率呈上升趋势,但当酶解温度达到 50 ℃ 时,继续升高温度,总多酚提取率出现下降趋势。这是因为随着酶解温度的升高多酚类物质逐渐溶出,使得总多酚提取率逐渐增大;但是过高的酶解温度会降低酶活性,影响酶解反应的进行,造成总多酚提取率的下降。综合能耗等各方面因素,选择酶解温度 50 ℃ 较为合适。

2.2.5 乙醇浓度对总多酚提取率的影响

实验结果如图 2E 所示,随着乙醇浓度的增大,总多酚提取率呈上升趋势,但当乙醇浓度达到 50% 时,继续增大乙醇浓度,总多酚提取率下降。这是因为随着乙醇浓度的升高多酚类物质溶解度增大,使得总多酚提取率增加;但是多酚溶出终究会达到饱和,另一方面过高的乙醇浓度也会降低多酚的溶解度,造成总多酚提取率的下降。综合各种因素,选择乙醇浓度 50% 较为合适。

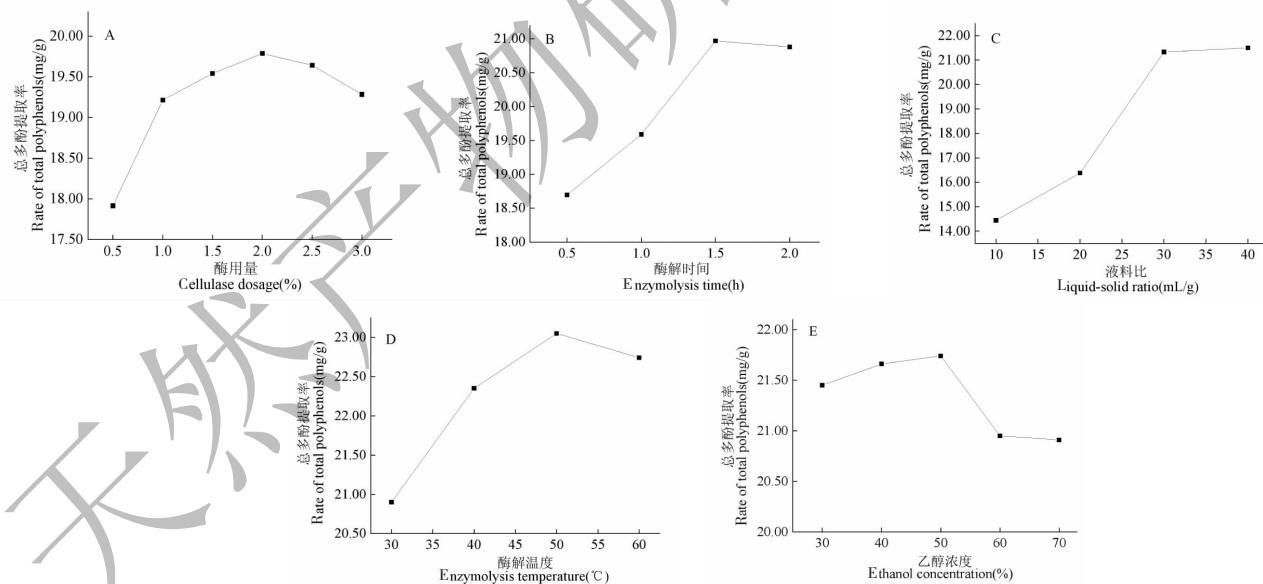


图 2 酶用量(A)、酶解时间(B)、料液比(C)、酶解温度(D)、乙醇浓度(E)对总多酚提取率的影响

Fig. 2 of cellulase dosage (A), enzymolysis time (B), liquid-solid ratio (C), enzymolysis temperature (D), ethanol concentration (E) on extraction rate of total polyphenols

2.3 酶解-超声辅助提取工艺的响应面优化实验

采用 BBD-RSM 设计对龙脑樟去油枝叶中总多酚的酶解-超声辅助提取工艺进行优化。在单因素实验基础上,选取三个对总多酚提取率影响较大的

因素:酶用量(X_1 ,%)、乙醇浓度(X_2 ,%)、液料比(X_3 ,mL/g),以总多酚提取率[Y, mg/g]为评价指标,进行 BBD-RSM 设计,其因素水平设计见表 2,实验设计方案及实验结果见表 3。

表 2 响应面法的各因素和水平

Table 2 Factors and levels of RSM

水平 Level	酶用量 X_1 Cellulase dosage (%)	乙醇浓度 X_2 Ethanol concentration (%)	液料比 X_3 Liquid-solid ratio (mL/g)
-1	1	40	20
0	2	50	30
1	3	60	40

表 3 响应面法实验设计方案及实验结果

Table 3 The experimental design and results of RSM

No.	X_1	X_2	X_3	Y (mg/g)
1	0	1	1	21.06
2	1	0	1	20.60
3	0	0	0	21.19
4	-1	1	0	22.20
5	1	1	0	20.67
6	0	0	0	22.28
7	0	0	0	22.14
8	-1	-1	0	20.16
9	-1	0	1	22.12
10	1	-1	0	19.50
11	0	-1	1	20.18
12	1	0	-1	18.83
13	0	1	-1	18.34
14	0	-1	-1	18.05
15	-1	0	-1	18.79
16	0	0	0	21.03
17	0	0	0	21.32

2.3.1 二次多项回归模型的建立及显著性分析

应用“Design Expert 8.0.6”实验设计与分析软件,对表 3 中实验数据进行二次多项回归拟合,结果

如表 4,总多酚提取率与各考察变量的二次回归模型如下:

$$Y = -19.971 + 2.559 X_1 + 0.877 X_2 + 0.956 X_3 - 0.022 X_1 X_2 - 0.036 X_1 X_3 + 0.002 X_2 X_3 - 0.212 X_1^2 - 0.008 X_2^2 - 0.014 X_3^2$$

所选模型的相关系数 $R^2 = 0.9747$, $P < 0.0001$ 可知模型极显著,回归方程拟合度良好;信噪比 Adeq Precision = 16.859 > 4,表明回归方程可信度较高;失拟项 $P = 0.1223 > 0.05$,不显著;模型的校正相关系数 $R_{Adj}^2 = 0.9421$,说明该模型能解释 94.21% 的响应值变化。综上,利用该模型对龙脑樟去油枝叶中总多酚的酶解-超声辅助提取工艺进行优化是可行的。由表 4 回归方程各系数显著性可知,各因素对总多酚提取率的影响顺序为: $X_3 > X_2 > X_1$,即液料比 > 乙醇浓度 > 酶用量。统计分析结果表明: X_1 (酶用量)、 X_2 (乙醇浓度) 的 P 值均小于显著性水平 $\alpha(0.01)$,说明这两个因素有高度显著影响; X_3 (液料比) 的 P 值小于显著性水平 $\alpha(0.001)$,说明该因素有极显著影响; 交互项 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 的 P 值均大于显著性水平 $\alpha(0.05)$,说明交互项均无显著影响; 二次项 X_1^2 、 X_3^2 的 P 值均小于显著性水平 $\alpha(0.01)$,说明这些二次项有高度显著影响; 二次项 X_2^2 的 P 值大于显著性水平 $\alpha(0.05)$,说明该二次项无显著影响。

表 4 回归统计分析结果

Table 4 Result of regression statistical analysis

变异来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	29.48	9	3.28	29.91	< 0.0001	* * *
X_1 -酶用量 Cellulase dosage	1.56	1	1.56	14.22	0.007	* *
X_2 -乙醇浓度 Ethanol concentration	2.51	1	2.51	22.91	0.002	* *
X_3 -液料比 Liquid-solid ratio	12.28	1	12.28	112.11	< 0.0001	* * *
$X_1 X_2$	0.19	1	0.19	1.73	0.2301	
$X_1 X_3$	0.5	1	0.5	4.6	0.0691	

续表4(Continued Tab. 4)

变异来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F-value	P值 P-value	显著性 Significance
$X_2 X_3$	0.12	1	0.12	1.09	0.3318	
X_1^2	0.19	1	0.19	1.73	0.2301	
X_2^2	2.9	1	2.9	26.46	0.0013	* *
X_3^2	8.39	1	8.39	76.66	< 0.0001	* * *
残差 Residual	0.77	7	0.11			
失拟值 Lack of fit	0.56	3	0.19	3.63	0.1223	
纯误差 Pure error	0.21	4	0.051			
总差 Cor total	30.24	16				

注: * $P < 0.05$, 显著作用; ** $P < 0.01$, 高度显著作用; *** $P < 0.001$, 极显著作用。

Note: * $P < 0.05$, significant effect; ** $P < 0.01$, very significant effect; *** $P < 0.001$, extremely significant effect.

2.3.2 响应面分析

根据“2.3.1”中的二次回归方程,绘制出总多酚提取率受各因素影响的等高线图(A、B、C)和响

应面图(D、E、F),结果如图3所示。通过等高线密集程度和响应面的陡峭程度,可以直观反映各因素对总多酚提取率的影响情况。

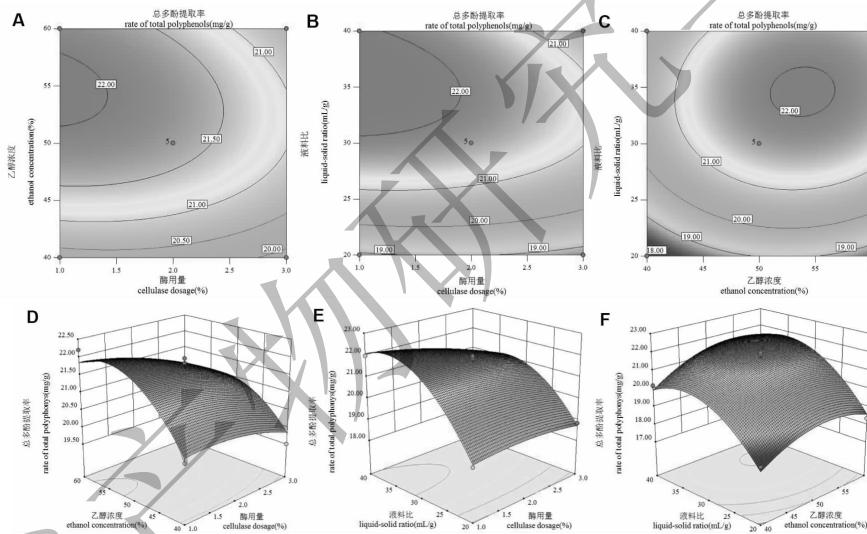


图3 各因素交互作用对总多酚提取率影响的响应面及等高线图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots of mutual influences of extraction conditions on the extraction rate of total polyphenols

图3中(D、E、F)分别是总多酚提取率与酶用量和乙醇浓度、总多酚提取率与酶用量和液料比、总多酚提取率与乙醇浓度和液料比的响应面图。由图3中(D)可知,随着酶用量和乙醇浓度的增加,总多酚提取率也逐渐增加,且响应面陡峭,说明酶用量和乙醇浓度二者的交互作用对总多酚提取率的影响显著。由图3中(E)可知,总多酚提取率随液料比的增加而增加,液料比对总多酚提取率影响更显著,表现为响应面陡峭;而酶用量的变化对总多酚提取率的影响相对较小,响应面较平滑。由图3中(F)可知,随着乙醇浓度和液料比的增大,总多酚提取率呈

现出先增加后减小的变化趋势,说明乙醇浓度和液料比二者的交互作用对总多酚提取率的影响较小。

等高线图能直观反映出各变量间交互作用影响的显著程度,等高线趋于圆表示变量间交互作用较小,等高线趋于椭圆表示交互作用显著。图3中(A)、(B)等高线扁平,趋于椭圆,说明对应变量间均存在显著交互作用;而图3中(C)等高线接近圆,说明乙醇浓度和液料比二者之间交互作用较小。

在节约成本和总多酚提取率尽可能高的前提下,通过响应面模型及其软件优化得总多酚提取的优化工艺条件为:酶用量 1.88 %, 乙醇浓度 54.00

% (v/v), 液料比 34.00 mL/g, 在此工艺条件下总多酚提取率的最大理论值是 22.30 mg/g(预测值)。

2.3.3 响应面优化验证

为了验证模型的可靠性, 同时考虑到实验操作和仪器的局限性, 将上述优化工艺条件修正为: 酶用量 1.9%, 乙醇浓度 54% (v/v), 液料比 34 mL/g。

表 5 优化工艺的观测值与预测值

Table 5 The observed and predicted response values for the optimized formulation

No.	总多酚提取率 Extraction rate of total polyphenols (mg/g)			
	实验值 Experimental values	平均值 Average value	预测值 Predicted value	偏差 Deviation
1	22.15	22.08	22.30	0.22
2	22.23			
3	21.87			

2.3.4 提取方法的对比实验

通过“2.1 超声提取工艺的单因素实验”, 得到超声提取的优化工艺条件为: 超声时间 30 min, 超声功率 360 W, 超声频率 45 kHz, 超声温度 70 °C。在此条件下, 进行 3 次平行实验, 得总多酚提取率分别为 18.19、18.31、18.25 mg/g, 取平均值 18.25 mg/g。而由表 5 可知, 酶解-超声辅助提取总多酚的提取率平均值为 22.08 mg/g, 比超声提取法高 3.83 mg/g, 进一步证明了酶解-超声辅助提取龙脑樟去油枝叶中总多酚具有一定的实际价值。

2.4 抗氧化能力的测定

2.4.1 DPPH 自由基清除能力

从图 4 可以看出, 在实验浓度范围内, 总多酚提取物对 DPPH 自由基具有良好的清除能力, 且其清除能力随浓度的增加而增强。将总多酚提取物清除 DPPH 自由基的能力与 BHT、Vc 进行比较, 发现在 0.02~0.10 mg/mL 浓度范围内总多酚提取物清除

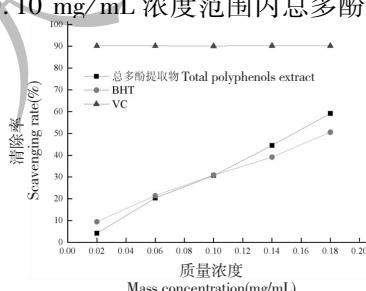


图 4 总多酚提取物对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 4 DPPH radical scavenging rate of total polyphenols extract

在此条件下进行验证实验, 平行三次。实验结果如表 5 所示, 总多酚提取率的平均值为 22.08 mg/g, 与预测值偏差 0.22 mg/g, 说明二次多项回归模型预测性良好, 响应面法优化得到的工艺参数可靠, 具有实用价值。

DPPH 自由基的能力低于 BHT, 在 0.10~0.18 mg/mL 浓度范围内高于 BHT; 而在实验浓度范围内, Vc 清除 DPPH 自由基的能力始终高于总多酚提取物。通过拟合曲线计算总多酚提取物清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 0.36 mg/mL。

2.4.2 羟基自由基清除能力

由图 5 可以看出, 在实验浓度范围内, 总多酚提取物对羟基自由基具有良好的清除能力, 且其清除能力随浓度的增加而增强, 清除羟基自由基的能力大小: 总多酚提取物 > Vc。通过拟合曲线计算总多酚提取物对清除羟基自由基的 IC_{50} 为 0.15 mg/mL。

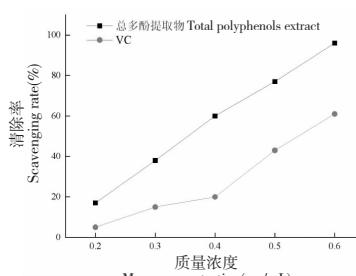


图 5 总多酚提取物对羟基自由基的清除率

Fig. 5 Hydroxyl radical scavenging rate of total polyphenols extract

3 结论

在单因素实验的基础上, 选取纤维素酶用量 (X_1)、乙醇浓度 (X_2)、液料比 (X_3) 进行响应面法的 Box-Behnken 设计, 建立起龙脑樟去油枝叶中总多

酚酶解-超声辅助提取工艺的数学模型。结果表明,各因素对总多酚提取率的影响顺序为液料比(X_3)>乙醇浓度(X_2)>酶用量(X_1);酶解-超声辅助提取龙脑樟去油枝叶中总多酚的优化工艺条件为:酶用量1.9%,乙醇浓度54% (v/v),液料比34 mL/g,酶解温度50 °C,酶解时间1.5 h,超声时间30 min,超声频率45 kHz,超声功率360 W,超声温度70 °C;在此条件下,总多酚提取率的平均值为22.08 mg/g,与预测值偏差0.22 mg/g,说明二次回归模型预测性良好,提取工艺稳定可行。酶解-超声辅助提取法的总多酚提取率比超声提取法高3.83 mg/g,进一步证明了酶解-超声辅助提取龙脑樟去油枝叶总多酚具有一定的实际价值。总多酚提取物对DPPH自由基和羟基自由基的清除作用均呈现量效关系,半数抑制浓度(IC_{50})值分别为0.36和0.15 mg/mL,表明总多酚提取物具有较强的抗氧化能力。

参考文献

- Chen HM (陈红梅), Sun LF (孙凌峰). The exploitation and utilization prospects of borneol *Cinnamomum camphora* resources in Ji'an, Jiangxi province [J]. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 2006, 42(3): 94-95.
- Li GZ (李国政). Study on the chemical constituents of the volatile oil from *Cinnamomum carapora* (L.) Presl leaves [J]. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2015, 11(18): 17-18.
- Ouyang SL (欧阳少林), Zhao XN (赵小宁), Li CW (李楚文), et al. GC-MS analysis of essential oil from fruits of *Cinnamomum camphora* chvar. borneol [J]. *Chin J Infor Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2013, 20(11): 58-60.
- He B (何冰), Chen XX (陈小夏), Luo JP (罗集鹏). Effects of five different polar extracts from Herba Pogostemonis being gotten rid of volatile oil on gastrointestinal tract [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24: 422-423.
- Waszkowiak K, Dolata W. The application of collagen preparations as carriers of rosemary extract in the production of processed meat [J]. *Meat Sci*, 2007, 75: 178-179.
- Du YH (杜永华), Ye KC (叶奎川), Zhou LJ (周黎军). Effects of the extracts of *Cinnamomum longepaniculatum* leaves on the proliferation of human hepatocarcinoma cell strain BEL-7402t [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2014, 35(17): 80-82.
- Huang Y (黄雅), Chen HG (陈华国), Zhou X (周欣), et al. Determination of total polyphenols and evaluation of antioxidant activities of *Sambucus Chinensis* Lindl. in Guizhou [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 255-256.
- Dulf FV, Vodnar DC, Dulf EH, et al. Total phenolic contents, antioxidant activities, and lipid fractions from berry pomaces obtained by solid-state fermentation of two *Sambucus* species with *Aspergillus niger* [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 3489-3490.
- Paško P, Bartoň H, Zagrodzki P, et al. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth [J]. *Food Chem*, 2009, 115: 996-998.
- Mohammedi Z, Atik F. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst [J]. *Int J Pharm Biol Sci*, 2011, 2: 609-612.
- Lu Y, Foo LY. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace [J]. *Food Chem*, 1997, 59: 187-194.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities [J]. *Food Chem*, 2005, 89: 191-198.
- Ge L (葛蕾), Li ZX (李志西), Si YY (司翔宇), et al. Study on ultrasonic extraction of polyphenols from apple pomace [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2013, 20(11): 58-60.
- Gao WX (高文秀), Yang YY (杨艳艳), Zhao WZ (赵文卓), et al. Optimization of composite enzymatic hydrolysis assisted ultrasonic for extraction of favonoids compounds from hawthorn [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2014, 35(2): 175-178.
- Xing YL (邢雅丽), Bi LW (毕良武), Zhao ZD (赵振东), et al. Optimization of ultrasonic extraction of ursolic acid from *Paulownia elongata* leaves by response surface methodology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 301-305.
- Dean A, Voss D. Design and analysis of experiments [J]. *Technometrics*, 2017, 42: 308-309.
- Silva EM, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology [J]. *Sep Purif Technol*, 2007, 55: 382-386.
- Ali I BEH, Chaouachi M, Bahri R, et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis*, Boiss. et Reut [J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 77: 631-639.
- Han ZX (韩兆轩). Research on separation, purification and reducing blood-fat of flavonoids from pineapple peels [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University (广东海洋大学), 2009.