

# 基于低共熔溶剂法 超声辅助蒸馏提取胡椒叶精油的 工艺优化及其 GC-MS 分析

陈长锴<sup>1</sup>, 樊志国<sup>2</sup>, 赵凤祥<sup>2</sup>, 吴颖颖<sup>2</sup>, 施瑞城<sup>2,\*</sup>

(1. 三沙南海美源岛生物科技有限公司, 海南三沙 573199;

2. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570100)

**摘要:**以胡椒叶为提取原料,探究低共熔溶剂对胡椒叶精油提取效果的影响。在单因素实验结果的基础上,以液料比、超声功率与蒸馏时间为影响因素,以精油得率为响应值,应用 Box-Behnken 试验设计建立数学模型,进行响应面分析。结果表明,氯化胆碱-尿素组成的低共熔溶剂提取效果最好,响应面优化的最佳提取工艺条件为液料比为 14:1 mL/g、超声功率 300 W、蒸馏时间 53 min。在此条件下,胡椒叶精油得率为 1.380% ± 0.018%,优于水蒸气蒸馏法和超声辅助水蒸气蒸馏法,胡椒叶精油得率分别提升了 14.33%、5.18%。通过 GC-MS 对胡椒叶精油进行分析,共鉴定出 34 种化合物,其主要成分为 δ-榄香烯(19.75%)、α-萜澄茄油烯(9.17%)、石竹烯(8.97%)、α-古芸烯(6.12%)、β-榄香烯(5.13%)。结果表明,以氯化胆碱-尿素作为低共熔溶剂提取胡椒叶精油的方法是可行的。

**关键词:**胡椒叶,低共熔溶剂,精油,超声,水蒸气蒸馏,气相色谱-质谱法(GC-MS),成分分析

## Optimization and GC-MS Analysis of Extracting Pepper Leaves Essential Oil by Ultrasonic Assisted Distillation Based on Deep Eutectic Solvents

CHEN Chang-kai<sup>1</sup>, FAN Zhi-guo<sup>2</sup>, ZHAO Feng-xiang<sup>2</sup>, WU Ying-ying<sup>2</sup>, SHI Rui-cheng<sup>2,\*</sup>

(1. Sansha Nanhai Meiyuan Island Biotechnology Co., Ltd., Sansha 573199, China;

2. College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570100, China)

**Abstract:** The optimization of the essential oil extracted from pepper leaves by deep eutectic solvents was carried out using one-factor-at-a-time method and response surface methodology. Using a Box-Behnken design, a mathematical model was established to investigate the effects of solvent-solid ratio, ultrasonic power and extraction time on the yield of essential oil, respectively. The results showed that the most suitable deep eutectic solvent was choline chloride/urea. The optimum conditions of pepper leaves essential oil were as follows: The solvent-solid ratio was 14:1 mL/g, the ultrasonic power was 300 W, the extraction time was 53 min. Under the optimal conditions, the yield of essential oil of pepper leaves was 1.380% ± 0.018%, which was better than steam distillation and ultrasonic-assisted steam distillation. The yield of pepper essential oil increased by 14.33% and 5.18%, respectively. A total of 34 compounds were identified by GC-MS. The main components of essential oil were δ-elemene(19.75%), α-cubebene(9.17%), caryophyllene(8.97%), α-gurjunene(6.12%), β-elemene(5.13%). The method for extracting pepper leaves essential oil by using choline chloride-urea as deep eutectic solvent is feasible.

**Key words:** pepper leaves; deep eutectic solvents; essential oil; ultrasonic; steam distillation; gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS); complexity analysis

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)20-0135-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.022

引文格式: 陈长锴, 樊志国, 赵凤祥, 等. 基于低共熔溶剂法超声辅助蒸馏提取胡椒叶精油的工艺优化及其 GC-MS 分析 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 135-141.

收稿日期: 2019-11-19

作者简介: 陈长锴(1988-), 男, 本科, 研究方向: 生物技术, E-mail: 791030384@qq.com。

\* 通讯作者: 施瑞城(1962-), 男, 本科, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: src1139@163.com。

基金项目: 海南省重点研发项目(ZDYF2019058)。

胡椒(*Piper nigrum* L.)是胡椒科胡椒属多年生常绿开花藤本植物,是海南的一项特色农产品,占全国胡椒总产量的90%以上。在传统医学领域,胡椒是应用的非常广泛的药物<sup>[1]</sup>。泰国的当地人在市场购买胡椒的叶和茎用来治疗某些疾病<sup>[2]</sup>。由于精油具有抗氧化<sup>[3]</sup>、抑菌<sup>[4]</sup>等活性,可用于食品的保鲜<sup>[5]</sup>和化妆品工业中<sup>[6]</sup>。此外精油的化学成分非常丰富,具有一定的保健功效,如抗炎<sup>[7]</sup>、活血化瘀等。

目前,对胡椒精油的研究主要集中在胡椒叶和胡椒果上。张水平等<sup>[8]</sup>采用水蒸气蒸馏法提取胡椒叶精油,其精油得率为1.25%。杜丽君等<sup>[9]</sup>采用溶剂萃取法提取胡椒木叶片精油,其精油得率为0.405%。谢敏华<sup>[10]</sup>采用超临界CO<sub>2</sub>萃取黑胡椒精油得率为7.02%。王颖等<sup>[11]</sup>采用超声微波协同技术提取白胡椒精油,发现白胡椒精油得率相对较高为3.80%。然而水蒸气蒸馏法<sup>[12-13]</sup>、溶剂浸提法<sup>[14-15]</sup>、超临界CO<sub>2</sub>萃取法<sup>[16]</sup>等传统方法的成本效益高和过长的提取时间,因此,寻找一种成本低、提取时间短、绿色环保的提取方法很有必要。

Abbott等<sup>[17]</sup>发现了一种由一定摩尔比的氢键受体(hydrogen bond acceptor, HBA)(如季铵盐)和氢键供体(hydrogen bond donor, HBD)(如羧酸、多元醇)组成的新型、绿色和低熔点的离子溶剂<sup>[18-20]</sup>。低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DES)具有良好的热稳定性和低挥发性,特别是具有易降解性、制备简单、成本廉价等优点。本文以低共熔溶剂作为提取剂,采用超声辅助水蒸气蒸馏的方法提取胡椒叶精油,并用响应面法对胡椒叶精油提取工艺影响较大的三个因素即液料比、超声功率和蒸馏时间进行优化,以便获取最佳的提取条件,并采用气相色谱-质谱法分析精油成分,以期对精油的提取方法提供一条新思路,拓展DES的应用范围。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

胡椒叶 海南省定安县黄竹镇;正己烷 色谱纯,购自美国Mreda公司;氯化胆碱、乙二醇、乳酸、尿素、葡萄糖、甘油、正己烷、无水硫酸钠 均购自美国阿拉丁试剂有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

KH-1500DB型单槽式数控超声波清洗器 昆山禾创超声仪器有限公司;DFY-200C高速万能粉碎机 上海皓庄仪器有限公司;YHG-9050A台式电热恒温鼓风干燥箱 上海姚氏仪器设备有限公司;AL-1C系列分析天平 上海精密仪器仪表有限公司;JB挥发油测定器 常州普天仪器制造有限公司;AMD10气相色谱质谱联用仪 常州磐诺仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 新鲜胡椒叶清洗干净,在60℃的电热鼓风干燥箱中烘干至恒定重量,粉碎并过筛(50目)置于干燥器中干燥备用。

根据文献报道,制备DES、HBA(氯化胆碱)和HBD在80℃的恒温水浴锅中混合加热搅拌0.5~2.0h,

直至形成均匀无色透明的液体。按照表1制备不同类型的DES。

表1 不同类型DES

Table 1 Reagents for preparation of DES

编号	HBA	HBD	HBA与HBD的摩尔比
DES-1	氯化胆碱	甘油	1:2
DES-2	氯化胆碱	乙二醇	1:4
DES-3	氯化胆碱	乳酸	1:2
DES-4	氯化胆碱	尿素	1:2
DES-5	氯化胆碱	葡萄糖	2:1

1.2.2 胡椒叶精油提取工艺 准确称取30g的胡椒叶粉末,加入一定量的DES置于500mL圆底烧瓶中,按液料比加入蒸馏水进行超声辅助处理30min,然后利用挥发油提取器水蒸气蒸馏提取胡椒叶精油,分液之后加无水硫酸钠干燥,称量并计算胡椒叶精油得率。

胡椒叶精油得率(%)=(提取精油的重量/干胡椒叶粉末重量)×100

1.2.3 不同类型DES对精油得率的影响 按照表1所示,胡椒叶粉末经过DES-1、DES-2、DES-3、DES-4、DES-5进行提取,根据胡椒叶精油得率来分析5种DES对精油的提取效果,选择提取效果最好的DES进行后续的单因素实验。

1.2.4 单因素实验 采用1.2.2的方法提取胡椒叶精油,提取条件为:保持超声功率300W、蒸馏时间50min的因素不变,比较不同液料比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1 mL/g)对胡椒叶精油得率的影响;保持液料比10:1 mL/g,蒸馏时间50min的因素不变,比较不同超声功率(100、200、300、400、500W)对胡椒叶精油得率的影响;保持液料比10:1 mL/g,超声功率300W的因素不变,比较不同蒸馏时间(30、40、50、60、70min)对胡椒叶精油得率的影响。根据单因素实验来探究各因素变量对胡椒叶精油得率的影响。

1.2.5 BBD优化胡椒叶精油提取条件 由1.2.4单因素实验的结果,以液料比(A)、超声功率(B)、蒸馏时间(C)为自变量,以胡椒叶精油得率(Y)为响应值,根据BBD设计实验原理,设计三因素三水平的响应面进行分析实验与统计分析。试验设计因素与水平如见表2所示。

表2 响应面设计实验因素与水平

Table 2 Design factor and levels of response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
A 液料比(mL/g)	5:1	10:1	15:1
B 超声功率(W)	200	300	400
C 蒸馏时间(min)	40	50	60

1.2.6 GC-MS分析胡椒叶精油成分 GC条件:BR-5ms毛细管柱(30m×0.25mm×0.25μm);升温程序:初始温度为60℃,以1.5℃/min的速度升至185℃,保持1min,然后以9℃/min的速度升至

275 °C, 保持 2 min; 进样量 0.5 μL; 压力 2.4 kPa, 载气为 He, 流速 1 mL/min, 分流比 40:1。

MS 条件: EI 电离源, 能量 70 eV; 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 接口温度 250 °C, 质量扫描范围 m/z 35~500。

### 1.3 数据处理

所有实验重复 3 次。使用 SPSS 16.0 统计软件对单因素实验数据进行单因素方差统计分析与显著性检验, Design-Expert 响应面软件对胡椒叶精油提取的相关因素数据进行分析与响应面优化, 采用 Origin 8.5 软件作响应面图。

## 2 结果与分析

### 2.1 DES 类型的筛选

根据图 1 可以看出 5 种低共熔溶剂对精油得率的影响中, DES-4(氯化胆碱-尿素)对胡椒叶精油提取效果最佳, 其精油得率为 1.312% ± 0.018%。Kumar 等<sup>[21]</sup>研究表明, 一些 DES 可以溶解纤维素, 用于植物组织的预处理能增强细胞内化合物的释放。根据实验结果可知, 氢键供体为酰胺类的低共熔溶剂(DES-4)对精油的提取得率优于氢键供体为多元醇类(DES-1、DES-2)、羧酸类(DES-3、DES-5)的低共熔溶剂。季铵盐类(氯化胆碱)低共熔溶剂对纤维素的溶解机理是季铵盐阳离子与纤维素羟基上的氧原子发生反应从而形成新的氢键, 这符合纤维素羟基基团上的氢、氧原子参与电子接受和提供机理<sup>[22-23]</sup>, 乙酸根阴离子与己内酰胺的作用能为半纤维素的溶解提供更多活性位点, 而季铵盐与酰胺类物质间的氢键结构使纤维素由致密有序结构向毛糙无序结构转变<sup>[24]</sup>, 对木质素有着较强的溶解能力。故选择氯化胆碱-尿素(DES-4)低共熔溶剂进行后续实验。

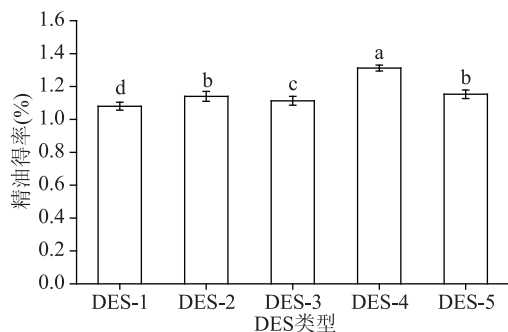


图 1 不同类型 DES 对精油得率的影响

Fig.1 Effect of different DES on extraction rate of essential oils  
注: a~d 不同字母代表差异性显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 单因素实验

2.2.1 液料比对精油得率的影响 根据图 2 可以分析出, 胡椒叶精油得率在液料比 10:1 mL/g 之前时是随液料比的增加而提高, 胡椒叶精油得率在液料比为 10:1 mL/g 时达到最大值, 之后胡椒叶精油得率随液料比的增加而区域缓慢, 稍有降低。原因是当液料比过小即胡椒叶粉末中蒸馏水过少时, 由于蒸馏水不能充分渗入胡椒叶粉末中, 导致精油不易溢出, 也有可能蒸馏水过少致使胡椒叶粉末局部受

热而降低了胡椒叶精油得率; 当液料比过大即胡椒叶粉末中蒸馏水过多时, 由于少部分胡椒叶精油溶解在水中从而降低其得率, 同时考虑时间成本和能耗<sup>[25-26]</sup>。所以, 液料比应控制在 10:1 mL/g 左右较为合适。

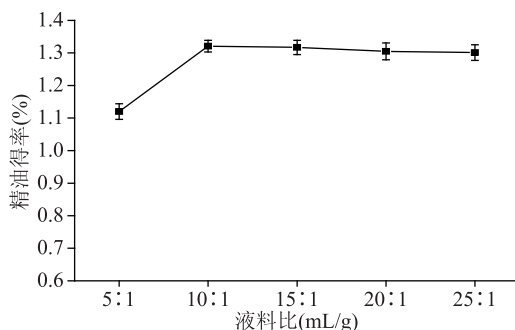


图 2 液料比对精油得率的影响

Fig.2 Effect of solvent-solid ratio on the extraction rate of essential oils

2.2.2 超声功率对精油得率的影响 根据图 3 可以分析出, 胡椒叶精油得率在超声功率为 300 W 之前时是随着超声功率的增加而随之提高, 这是由于超声功率过低时, 空化作用较弱, 使得液体内部局部的拉应力不够, 精油不易溢出, 当超声功率增大时, 空化作用会随超声功率的增大而增强, 加快分子扩散速度, 致使精油的溢出, 从而提高精油得率; 胡椒叶精油得率在超声功率为 300 W 之后, 随着超声功率的增加而降低, 原因在于超声功率过大时, 空化作用大幅度增强, 减少了物料停留在超声场中的时间, 降低了水分向植物组织内渗透的几率, 这与李雪<sup>[27]</sup>在用超声辅助提取紫苏精油的研究结果类似。因此, 超声功率应控制在 300 W 左右较为合理。

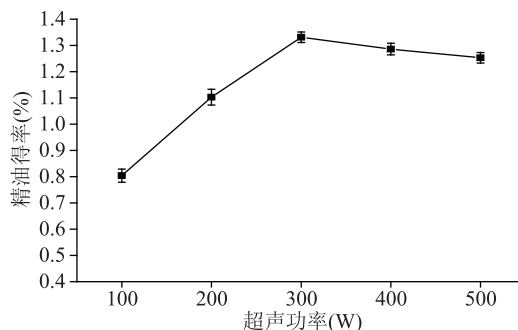


图 3 超声功率对精油得率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on the extraction rate of essential oils

2.2.3 蒸馏时间对精油得率的影响 根据图 4 的可以分析得到, 胡椒叶精油得率在蒸馏时间到达 50 min 之前时是随蒸馏时间的增加而提高, 这是由于蒸馏时间比较短, 精油溢出不彻底, 故精油得率不高; 精油得率在蒸馏时间为 50 min 时达到最大值。但蒸馏时间超过 50 min 之后, 胡椒叶精油得率反而有所降低, 可能由于部分精油的挥发损失所致, 在马玉花等<sup>[28]</sup>研究杏仁精油提取工艺中有着类似的发现, 同时考虑时间成本和能量的消耗, 所以蒸馏时间应控制在 50 min 左右比较合适。

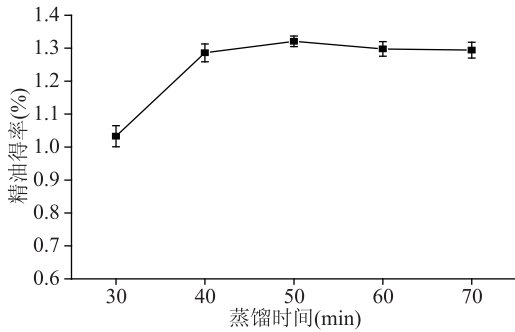


图4 蒸馏时间对精油得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the extraction rate of essential oils

## 2.3 响应面法优化胡椒叶精油提取条件试验结果

2.3.1 响应面优化实验设计结果及方差分析 根据单因素实验结果,把液料比(A)、超声功率(B)、蒸馏时间(C)作为优化参数,以胡椒叶精油得率(Y)为响应值,根据 BBD 设计原理进行响应面分析,结果如表 3 所示。

利用 Design-Expert 软件对所得数据进行回归分析与方差分析,由此可以得到 Y(精油得率)与液料比(A)、超声功率(B)、蒸馏时间(C)的二次回归方程为:

$$Y = 1.32 + 0.082A + 0.13B + 0.034C + 0.012AB + 0.044AC + 0.036BC - 0.07A^2 - 0.17B^2 - 0.12C^2$$

由表 4 可知,回归模型决定系数  $R^2 = 0.9973$ ,校正决定系数  $R_{Adj}^2 = 0.9938$ ,回归方程模型极显著 ( $P < 0.0001$ ),表明该模型与实际吻合,具有可靠性。而失拟项不显著 ( $P = 0.068 > 0.05$ ),表明非试验因素对胡椒叶精油得率影响较小,非正常误差少。单因素液料比(A)、超声功率(B)、蒸馏时间(C)影响均极显著 ( $P < 0.01$ ),液料比与蒸馏时间交互项(AC)、超声功率与蒸馏时间交互项(BC)的交互作用影响极显著 ( $P < 0.01$ ),液料比与超声功率交互项(AB)的交互作用影响不显著 ( $P > 0.05$ )。根据 F 值大小

表3 响应面实验设计与结果

Table 3 The design and results of response surface experiment

编号	A	B	C	Y 精油得率 (%)
1	-1	-1	1	0.887
2	1	0	-1	1.149
3	1	0	1	1.283
4	0	0	0	1.329
5	-1	1	0	1.122
6	1	-1	0	1.023
7	0	1	1	1.240
8	1	1	0	1.308
9	0	-1	1	0.919
10	0	0	0	1.312
11	0	-1	-1	0.902
12	0	0	0	1.331
13	0	0	0	1.325
14	0	1	-1	1.080
15	0	0	0	1.321
16	-1	0	-1	1.071
17	-1	0	1	1.031

的判断,各因素对精油得率的影响为  $B > A > C$ ,即超声功率 > 液料比 > 蒸馏时间。

2.3.2 响应面图分析 通过 Design expert 软件对胡椒叶精油进行响应面方差分析以及回归方程模型的建立,然后利用 Origin8.0 软件做出相应的响应曲面图,如图 5~图 7 所示。

由图 5~图 7 可分析各因素对胡椒叶精油的率的影响以及各因素之间的相互作用,保持液料比(A)、超声功率(B)、蒸馏时间(C)任意一个因素为零水平,另外两个因素间的交互作用及对胡椒叶精油得率的影响。由图 5~图 7 结果可知,从响应面的走势及坡度来看,图 6~图 7 曲面走势陡峭,说明液料比和蒸馏时间、超声功率和蒸馏时间之间交互效应较显著,与方差分析结果一致。从等高线的形状及疏密

表4 回归模型及方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
模型	0.43	9	0.047	288.00	<0.0001	**
A	0.063	1	0.053	323.04	<0.0001	**
B	0.13	1	0.13	789.06	<0.0001	**
C	0.00918	1	0.00918	55.81	0.0001	**
AB	0.000625	1	0.000625	3.80	0.0923	
AC	0.007569	1	0.007569	46.01	0.0003	**
BC	0.005112	1	0.005112	31.08	0.0008	**
A <sup>2</sup>	0.021	1	0.021	126.05	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	0.12	1	0.12	726.11	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.061	1	0.061	368.14	<0.0001	**
残差	0.001151	7	0.0001645			
失拟项	0.0009243	3	0.0003081	5.42	0.068	
误差	0.0002272	4	0.0000568			
总和	0.43	16				

注:\*\*代表  $P < 0.01$  差异极显著。

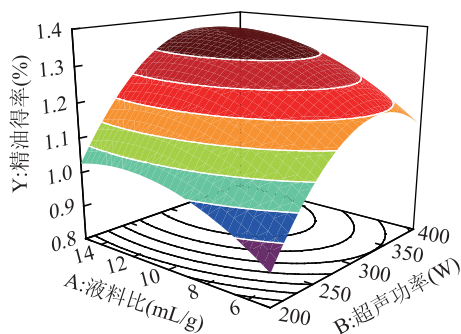


图5 液料比和超声功率对胡椒叶精油得率交互影响的响应面图

Fig.5 Response surface plot for interactive effect of the solvent-solid ratio and ultrasonic power on extraction rate of pepper leaves essential oil

程度看,图6~图7等高线形状都呈现椭圆形且曲线较密集,说明液料比和蒸馏时间、超声功率和蒸馏时间之间交互效应较强,其交互效应对响应值的影响显著。

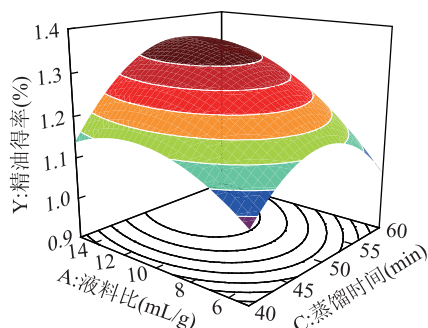


图6 液料比和蒸馏时间对胡椒叶精油得率交互影响的响应面图

Fig.6 Response surface plot for interactive effect of the solvent-solid ratio and extraction time on extraction rate of pepper leaves essential oil

## 2.4 最佳条件与验证实验

由 Design expert 软件分析得到回归方程,回归模型预测提取胡椒叶精油的最佳优化条件为:液料比 13.63:1 mL/g, 超声功率 344.11 W, 蒸馏时间 53.39 min, 精油得率最大达到 1.387%。鉴于工艺流程的可操作性和便利性,修正后的胡椒叶精油提取的工艺参数为:液料比 14:1 mL/g, 超声功率 300 W, 提取时间 53 min。根据修正后的工艺参数,重复 3 次实验来验证胡椒叶提取精油得率,由此得到胡椒叶精油实际的得率为  $1.380\% \pm 0.018\%$ ,与响应面模型

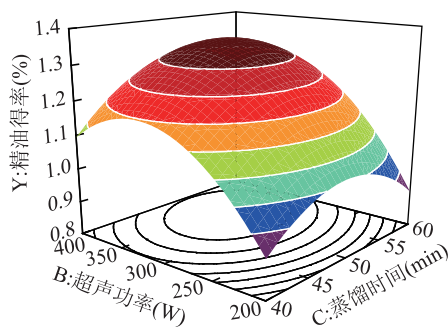


图7 超声功率和蒸馏时间对胡椒叶精油得率交互影响的响应面图

Fig.7 Response surface plot for interactive effect of the ultrasonic power and extraction time on extraction rate of pepper leaves essential oil

理论值相对误差约为 0.50% (误差在允许范围之内),说明实际情况与回归模型预测情况拟合较好。利用响应面法对基于 DES 的超声辅助水蒸气蒸馏提取胡椒叶精油的优化工艺,其结果准确可靠。

利用 DES 来提取胡椒叶精油与传统方法相比,精油的色泽、性状等外观没有明显区别,在常温下为淡蓝色透明的油状液体,伴随着浓厚的胡椒叶气味。由表 5 可知,新方法跟水蒸气蒸馏法和超声辅助水蒸气蒸馏法相比,胡椒叶精油得率分别提高了 14.33%、5.18%。其结果跟张水平等<sup>[8]</sup>研究胡椒果与胡椒叶精油化学成分分析的结果相似,说明实验结果符合预期。

## 2.5 胡椒叶精油 GC-MS 成分分析

从胡椒叶精油中共分离检测到 34 种挥发性化学成分,利用质谱信息与标准谱库 NIST08 分别对各色谱峰进行初步检索及相关文献参考定性,确认挥发性物质名称,其分析结果见表 6。由表 6 可知,其中烯烃类 18 个,醇类 11 个,醛类 1 个,酚类 1 个,酯类 1 个,其他化合物 2 个,主要成分包括: $\delta$ -榄香烯 (19.75%)、 $\alpha$ -萜荜茄油烯 (9.17%)、石竹烯 (8.97%)、 $\alpha$ -古芸烯 (6.12%)、 $\beta$ -榄香烯 (5.13%),其中烯烃类化合物含量最为丰富,占精油成分 73.0%。张水平等<sup>[8]</sup>的研究中胡椒叶精油的主要成分为  $\delta$ -榄香烯,其含量占总物质成分的 38.54%,而在本研究中  $\delta$ -榄香烯的含量为 19.75%,这可能是跟胡椒叶的品种类型、地理环境、处理方式以及提取条件等因素差异所导致。本实验提取的胡椒叶精油中的  $\delta$ -榄香烯的相对较高,根据相关的文献记载所知, $\delta$ -榄香烯具有显著的抗肿瘤作用<sup>[29]</sup>,其中  $\beta$ -榄香烯

表 5 不同提取方法对精油得率的影响

Table 5 Effect of the different extraction methods on the extraction rate of essential oils

提取方法	水蒸气蒸馏	超声辅助水蒸气蒸馏	基于 DES 的超声辅助水蒸气蒸馏
DES 处理	-	-	氯化胆碱-尿素
液料比 (mL/g)	14:1	14:1	14:1
超声功率 (W)	-	300	300
超声时间 (min)	-	30	30
蒸馏时间 (min)	53	53	53
精油得率 (%)	$1.207 \pm 0.020$	$1.312 \pm 0.022$	$1.380 \pm 0.018$

表6 胡椒叶精油化学组成成分  
Table 6 Chemical composition of the pepper leaves essential oil

序号	名称	相对含量 (%)	保留时间 (min)	保留指数 (RI)	CAS 号
1	芳樟醇	0.28	14.952	1099	78-70-6
2	(S)-(-)香茅酸甲酯	0.27	26.831	1256	-
3	$\delta$ -榄香烯	19.75	32.385	1325	20307-84-0
4	异喇叭烯	0.80	35.340	1361	95910-36-4
5	$\alpha$ -葎澄茄油烯	9.17	35.828	1367	17699-14-8
6	$\beta$ -波旁烯	0.36	36.298	1373	5208-59-3
7	$\beta$ -榄香烯	5.13	37.017	1382	515-13-9
8	$\alpha$ -古芸烯	6.12	38.224	1397	489-40-7
9	石竹烯	8.97	39.207	1409	87-44-5
10	6,9-愈创木二烯	0.59	41.010	1432	36577-33-0
11	Z,Z,Z-1,5,9,9-四甲基-1,4,7-环十一碳三烯	4.97	41.922	1443	-
12	1,1,7,7a-四甲基-1a,2,6,7,7a,7b-六元-1H-环丙烷丙[a]萘	0.30	42.446	1450	154098-14-3
13	$\gamma$ -古芸烯	1.94	43.332	1461	22567-17-5
14	双环大根香叶烯	1.20	43.516	1463	24703-35-3
15	白菖烯	1.97	43.702	1466	17334-55-3
16	大根香叶烯 D	2.95	44.015	1470	23986-74-5
17	(+)-喇叭烯	4.73	44.883	1481	21747-46-6
18	$\delta$ -杜松烯	3.10	47.126	1509	483-76-1
19	去氢白菖烯	3.16	47.571	1515	483-77-2
20	葎澄茄油宁烯	0.55	48.119	1522	29837-12-5
21	大根香叶烯 B	1.67	49.801	1544	15423-57-1
22	喇叭茶醇	0.49	50.420	1552	5986-49-2
23	桉油烯醇	4.53	51.277	1563	6750-60-3
24	石竹烯氧化物	2.31	51.528	1566	1139-30-6
25	(-)-蓝桉醇	2.11	51.904	1571	489-41-8
26	白千层醇	1.27	52.513	1579	552-02-3
27	(1S,8 $\alpha$ )-十氢-1,4 $\alpha\beta$ -二甲基-7 $\beta$ -异丙烯基-1-萘酚	1.21	54.334	1603	5945-72-2
28	异桉油烯醇	2.24	55.600	1621	88395-46-4
29	$\alpha$ -杜松醇	0.67	57.262	1643	481-34-5
30	依兰醇	2.23	58.477	1660	41610-69-9
31	金合欢醇	0.71	62.080	1710	4602-84-0
32	金合欢醛	0.40	63.511	1730	502-67-0
33	乙酸法呢醇酯	1.46	70.378	1830	29548-30-9
34	叶绿醇	2.39	87.316	2106	150-86-7

属于国家二类非细胞毒性肿瘤药物,使胡椒叶具有很高的开发和利用价值。

### 3 结论

本研究利用新型的低共熔溶剂来提取胡椒叶精油,通过单因素实验和响应面分析法优化了胡椒叶精油提取的工艺条件,以液料比、超声功率和蒸馏时间为自因素,以胡椒叶精油得率为响应值进行胡椒叶精油的响应面回归模型分析,修正提取胡椒叶精油工艺优化条件后为:液料比 14:1 mL/g、超声功率 300 W、提取时间 53 min,由此得到胡椒叶精油实际得率为 1.380%  $\pm$  0.018%,该回归模型预测值与实际值吻合较好,进一步验证了该模型的可靠性。通过基于 DES 超声辅助水蒸气蒸馏胡椒叶精油的工艺,精油得率比水蒸气蒸馏精油得率提高了 14.33%,比

超声辅助水蒸气蒸馏精油得率提高了 5.18%。由此说明,以氯化胆碱-尿素作为低共熔溶剂提取胡椒叶精油的方法是可行的。通过 GC-MS 分析鉴定出 34 种化合物,其主要成分为  $\delta$ -榄香烯(19.75%)、 $\alpha$ -葎澄茄油烯(9.17%)、石竹烯(8.97%)、 $\alpha$ -古芸烯(6.12%)、 $\beta$ -榄香烯(5.13%),其中  $\delta$ -榄香烯具有很好的研究价值。本文为胡椒叶精油的开发利用提供了一种新的提取方法,同时拓宽了 DES 应用领域。胡椒叶的综合利用也有利于胡椒叶精油在食品、药品及化妆品行业的普及。

### 参考文献

- [1] Bagheri H, Abdul Manap M Y B, Solati Z. Response surface methodology applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Piper nigrum* L. essential oil [J]. LWT - Food Science and

- Technology, 2014, 57(1): 149-155.
- [2] Vandana V V, Suseela Bhair, Shamina Azeez. Biochemical defense responses of black pepper (*Piper nigrum* L.) lines to *Phytophthora capsici* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2014, 88: 18-27.
- [3] Si W, Chen Y P, Zhang J, et al. Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids [J]. *Food Chemistry*, 2018, 239(15): 1117-1125.
- [4] 李巧巧, 雷激, 唐浩, 等. 商品柑橘精油的抑菌性及其应用研究[J]. *食品与机械*, 2011(6): 167-169.
- [5] 张倩, 辛力, 元雪龙, 等. 肉桂精油对甜樱桃果实品质和货架期的影响[J]. *核农学报*, 2014, 29(9): 1737-1742.
- [6] 陈坚生, 雷登凤, 高合意. 生姜在化妆品中的应用现状[J]. *香料香精化妆品*, 2018(1): 72-75, 81.
- [7] Fatih D, Nursenem K, Mehmet T, et al. Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 122: 117-121.
- [8] 张水平, 谷凤林, 吴桂苹, 等. 胡椒果与胡椒叶精油化学成分分析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(2): 387-395.
- [9] 杜丽君, 郝国华, 牛先前, 等. 溶剂萃取法提取胡椒木叶片精油影响因子的分析[J]. *福建热作科技*, 2015, 40(4): 42-44.
- [10] 谢敏华. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取黑胡椒精油的研究[J]. *中国调味品*, 2012, 37(11): 103-105.
- [11] 王颖, 李荣, 姜子涛. 超声微波协同技术提取白胡椒精油的条件优化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(17): 156-162.
- [12] 饶建平, 王文成, 张远志, 等. 水蒸气蒸馏法提取柚子花精油工艺研究及其成分分析[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(4): 278-282, 299.
- [13] 鹿浩志, 刘敏轩, 田亚亚, 等. 生姜精油的提取及 GC-MS 分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 208-213, 226.
- [14] 陈淑娟. 正交优化生姜油提取工艺及其 GC-MS 成分分析[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(11): 48-53.
- [15] 吕都, 邝春林, 姜太玲, 等. 两步法提取杭白菊精油工艺条件的优化[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(20): 293-298.
- [16] 李晓乐. 姜精油的纯化与抗炎活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.
- [17] Abbott A P, Boothby D, Capper G, et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(29): 9142-9147.
- [18] Paiva A, Craveiro R, Aroso I, et al. Natural deep eutectic solvents - solvents for the 21st century [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014, 2(5): 1063-1071.
- [19] Smith E L, Abbott A P, Ryder K S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(21): 11060-11082.
- [20] 侯玉翠, 王震, 任树行, 等. 低共熔溶剂在混合物分离中的应用[J]. *科学通报*, 2015, 60(26): 2490-2499.
- [21] Kumar A K, Parikh B S, Pravakar M. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: Bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 9265.
- [22] 陈子澍, 赵子暄, 张绍蒙, 等. 季铵盐/酰胺类低共熔溶剂的制备及其对纤维素的溶解性能[J]. *林产化学与工业*, 2018, 38(5): 93-99.
- [23] Rinaldi R. Instantaneous dissolution of cellulose in organic electrolyte solutions [J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2011, 47: 511-513.
- [24] 付时雨. 纤维素的研究进展[J]. *中国造纸*, 2019, 38(6): 54-64.
- [25] Desai M A, Parikh J, De A K. Modelling and optimization studies on extraction of lemongrass oil from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats [J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2014, 92(5): 793-803.
- [26] 马希汉, 王永红, 尉芹, 等. 玫瑰精油提取工艺研究[J]. *林产化学与工业*, 2004, 24(8): 80-84.
- [27] 李雪. 紫苏挥发油的超声辅助提取工艺及化学成分研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [28] 马玉花, 赵忠, 郭婵娟, 等. 杏仁精油提取工艺研究[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(1): 89-94.
- [29] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [30] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [31] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [32] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [33] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [34] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [35] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [36] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [37] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [38] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [39] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [40] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [41] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [42] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [43] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [44] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [45] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [46] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [47] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [48] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [49] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [50] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [51] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [52] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [53] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [54] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [55] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [56] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [57] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [58] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [59] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [60] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [61] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [62] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [63] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [64] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [65] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [66] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [67] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [68] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [69] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [70] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [71] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [72] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [73] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [74] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [75] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [76] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [77] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [78] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [79] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [80] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [81] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [82] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [83] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [84] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [85] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [86] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [87] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [88] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [89] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [90] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [91] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [92] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [93] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [94] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [95] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [96] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [97] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [98] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [99] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [100] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [101] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [102] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [103] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [104] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [105] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [106] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [107] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [108] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [109] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [110] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [111] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [112] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [113] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [114] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [115] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [116] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [117] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [118] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [119] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [120] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [121] 王苗莎. δ-榄香烯抗肿瘤作用及诱导肿瘤凋亡的机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [122] 葛焯明, 田东灿, 王志江. 络离子对罗氏沼虾碱性磷酸酶的影响研究[J]. *高校实验室工作研究*, 2017(2): 120-122.
- [123] 李红卫, 王开萍, 吴斌, 等. 猪肌肉组织中碱性磷酸酶的纯化及特性研究[J]. *合肥工业大学学报: 自然科学版*, 2016, 39(4): 560-565.
- [124] 陈定福. 南方鲇碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质的研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1994, 10(4): 420-426.
- [125] 黄毅. 黄鳝肝脏碱性磷酸酶的分离纯化及部分动力学性质研究[J]. *水产科学*, 2009, 28(6): 312-316.
- [126] Banik R M, Singh P, Pandey S K, et al. Purification and characterization of highly thermostable alkaline phosphatase produced from *B.licheniformis* MTCC 1483 [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(S): 350-351.
- [127] 戴江玉, 高光, 吴时强, 等. 水体细菌碱性磷酸酶及其编码基因研究进展[J]. *湖泊科学*, 2016, 28(6): 1153.

(上接第 126 页)

装备, 2019(8): 16-17.

[15] 陈凤娟. 碱性磷酸酶结构与活性的研究及 DNA 化学酶、MoFeco 的模拟合成[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.

[16] 唐靓婷. 牛肝碱性磷酸酶的分离纯化、部分性质和功能基因及固定化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.

[17] 程菁恒, 朱蓓薇, 吴海涛, 等. 海参肠碱性磷酸酶的提取及粗酶的特性研究[J]. *大连工业大学学报*, 2012(2): 83-87.

[18] 谢莉萍, 林静瑜. 合浦珠母贝碱性磷酸酶的分离纯化与性质研究[J]. *海洋科学*, 2000(10): 37-40.

[19] 刘晓雯, 刘克武, 杨守忠, 等. 大凉疣螬碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001(1): 135-138.

[20] Chu Y H, Yu X X, Jin X, et al. Purification and characterization of alkaline phosphatase from lactic acid bacteria [J]. *RSC Advances*, 2019, 9(1): 354-360.

[21] Homaei, A. Purification and biochemical properties of highly efficient alkaline phosphatase from *Fenneropenaeus merguensis*

brain [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 118: 16-22.

[22] 葛焯明, 田东灿, 王志江. 络离子对罗氏沼虾碱性磷酸酶的影响研究[J]. *高校实验室工作研究*, 2017(2): 120-122.

[23] 李红卫, 王开萍, 吴斌, 等. 猪肌肉组织中碱性磷酸酶的纯化及特性研究[J]. *合肥工业大学学报: 自然科学版*, 2016, 39(4): 560-565.

[24] 陈定福. 南方鲇碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质的研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1994, 10(4): 420-426.

[25] 黄毅. 黄鳝肝脏碱性磷酸酶的分离纯化及部分动力学性质研究[J]. *水产科学*, 2009, 28(6): 312-316.

[26] Banik R M, Singh P, Pandey S K, et al. Purification and characterization of highly thermostable alkaline phosphatase produced from *B.licheniformis* MTCC 1483 [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(S): 350-351.

[27] 戴江玉, 高光, 吴时强, 等. 水体细菌碱性磷酸酶及其编码基因研究进展[J]. *湖泊科学*, 2016, 28(6): 1153.