

响应面法优化超声波辅助提取苦豆子生物碱的工艺研究

相炎红¹,王浩云²,杨明俊¹,王永刚¹,刘晓风^{1,*}

(1.兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730050; 2.兰州一中,甘肃兰州 730000)

摘要:采用响应面法优化超声波辅助提取苦豆子生物碱的工艺。在单因素实验的基础上,选择液料比、超声功率和提取时间作为实验因素,进行Box-Behnken中心组合实验设计,采用响应面法(RSM)评估了这些因素对生物碱得率的影响。结果表明:超声波法辅助提取苦豆子生物碱的最佳工艺条件为料液比1:16g/mL,超声功率为300W,提取时间为33min。在最优的条件下,生物碱得率为3.72%。

关键词:苦豆子,生物碱,超声波提取,响应面法

Study on optimization of ultrasonic-assisted extraction of alkaloids from *Sophora alopecuroides* by response surface analysis

XIANG Yan-hong¹, WANG Hao-yun², YANG Ming-jun¹, WANG Yong-gang¹, LIU Xiao-feng^{1,*}

(1.School of Life Science and Engineering Lanzhou University of Technology Lanzhou 730050, China ;

2.Lanzhou No.1 Middle School Lanzhou 730000, China)

Abstract Response surface methodology (RSM) was applied to optimize ultrasonic-assisted extraction process of alkaloids from *Sophora alopecuroides*. Based on single experiments, ratio of solid to liquid, ultrasonic power and extraction time were selected for Box-Behnken central composite designing. RSM was employed to study the effect of these factors on the yield of alkaloids. The results indicated that the optimal process conditions were ratio of solid to liquid 1:16g/mL, ultrasonic power 300W, extraction time 33min. Under these optimized conditions, the extraction yield of alkaloids was up to 3.72%.

Key words: *Sophora alopecuroides*; alkaloids; ultrasonic extraction; response surface methodology

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2012)07-0275-04

苦豆子为槐属植物,主要分布于我国西北各省区及中亚细亚一带^[1]。苦豆草全株味极苦、性寒、有毒,具有清热解毒、抗菌消炎的作用^[2]。目前对其化学成分的研究主要在生物碱上,其生物碱主要是喹诺里西啶类的苦参碱系列、槐定碱系列和苦豆碱系列衍生物。近年来的研究表明,苦豆子生物碱有良好的生物活性,被广泛用于临床,不仅具有抗癌、抑癌、抑制和杀灭各种微生物的药理活性^[3],而且对免疫系统、神经系统、心血管系统有广泛的药理作用^[4]。超声波提取法与传统的浸取法相比,能提高有效成分的溶出速度、缩短提取时间,提高提出率^[5]。本实验以苦豆子为主要原料,采用超声波辅助提取法,在单因素实验的基础上,使用响应面法优化苦豆子生物碱提取工艺,以确定苦豆子生物碱最佳提取工艺条件,为苦豆子的开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦豆子 花期地上部分,采于民勤县收成乡,自然风干,粉碎;盐酸、溴麝香草酚蓝、三氯甲烷、磷酸二氢钾、氢氧化钠、槐定碱标准品 购于上海时代生物科技有限公司。

超声波仪JY-92型,紫外-可见分光光度计Cary50型,电热恒温干燥箱GZX-9030MBE型,电子天平AB104-S,电热恒温水槽HH-4,高速万能粉碎机QE-500型。

1.2 实验方法

1.2.1 超声提取 苦豆草粉碎后称取苦豆子粗粉2g,加0.6%盐酸15mL,浸泡30min后,用超声波仪500W超声30min,待样品温度冷却到室温再进行下一次处理,共处理3次。将每次提取液过滤,合并滤液,定容于50mL容量瓶中备用。实验分别考察了盐酸溶液浓度、料液比、超声功率、超声提取时间等因素对苦豆子生物碱得率的影响。在单因素实验的基础上,选取

收稿日期:2011-10-10 * 通讯联系人

作者简介:相炎红(1966-),女,本科,讲师,研究方向:食品科学与工程。

料液比(x_1)、超声功率(x_2)、超声提取时间(x_3)三个对苦豆子生物碱得率影响较大的因素,对提取条件进行响应面分析,优化提取工艺条件。

1.2.2 苦豆草生物碱含量的测定

1.2.2.1 标准曲线的制作 苦豆草生物碱以槐定碱的含量最高,本实验采用溴麝香草酚蓝比色法,以槐定碱为指标成分,测定苦豆草生物碱含量。精密称取槐定碱标准品5.12mg,置5mL容量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得槐定碱标准液。取上述溶液0、10、20、30、40、50、60、70 μ L,分别置于50mL的磨口锥形瓶中,待乙醇挥发后,加溴麝香草酚蓝pH7.6缓冲液6mL,氯仿6mL,密塞剧烈振摇2min,静置2h后分出氯仿层,以同法处理无槐定碱液为空白,于420nm处测定提取液的吸光度^[6],以吸光度(A)为纵坐标,氯仿层浓度(C)为横坐标得回归方程: $A=0.076426C+0.01232$, $r=0.9906$ 。

1.2.2.2 含量测定 各吸取1mL滤液,用酸水稀释至5倍,分别吸取1mL稀释液至锥形瓶中,加入溴麝香草酚蓝pH7.6缓冲液6mL,氯仿6mL,密塞振摇2min,注入酸式滴定管中,静置2h,分取氯仿层,以0.4%的酸水1mL,6mL溴麝香草酚蓝pH7.6缓冲液和氯仿6mL同比操作为空白进行测定,用回归方程算出含量^[7]。

计算测定液中生物碱的含量,再根据下式计算生物碱得率:

生物碱得率=提取液中生物碱的含量/苦豆粉的质量 $\times 100\%$

1.2.3 单因素实验 以稀盐酸溶液为提取剂,主要考察盐酸溶液浓度、料液比、超声功率、提取时间等因素对苦豆子生物碱得率的影响。

1.2.4 苦豆子中生物碱的提取工艺优化 根据Box-Behnken中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,以0.6%的盐酸溶液为提取剂,选取对苦豆子生物碱得率影响较大的因素料液比、超声功率、超声时间进行中心组合实验,并结合单因素实验条件选取合理水平。以苦豆子生物碱得率为响应值,通过响应面分析,得出超声波提取苦豆子生物碱的最佳提取工艺条件和方法。实验设计因素编码及水平见表1。

表1 中心组合设计因素与水平表

Table 1 Factors and levels in the central composite design

因素	水平		
	-1	0	1
x_1 料液比(g/mL)	1:10	1:15	1:20
x_2 超声功率(W)	260	300	340
x_3 提取时间(min)	20	30	40

2 结果与分析

2.1 单因素对苦豆子生物碱得率的影响

2.1.1 盐酸溶液浓度对苦豆子生物碱得率的影响 称取5份2g苦豆草粗粉,分别置于100mL三角瓶中,分别加入50mL 0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%的盐酸,浸泡30min,以300W功率超声波处理20min后,过滤,定容作为提取液,测定生物碱含量。

由图1可知,盐酸溶液浓度对生物碱得率的影响较大,在0.6%以下,因酸性提取剂易与生物碱中和而

增大了其在提取剂中的溶解度,因而随着酸度的增加,提取效果较明显。在0.6%以上,随盐酸溶液浓度的增加,提取剂结合生物碱的能力不断减弱,盐酸溶液浓度的增加对生物碱提取率的影响不大。因此盐酸溶液浓度以0.6%为宜。

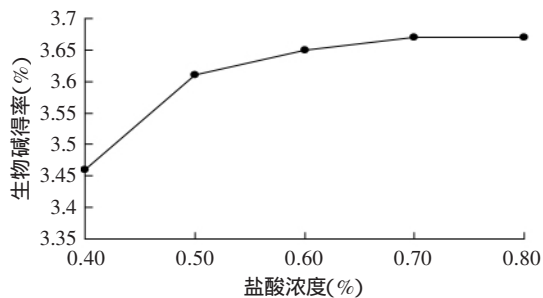


图1 盐酸溶液浓度对苦豆子生物碱得率的影响

Fig.1 Effect of hydrochloric acid concentration on extraction yield of alkaloids

2.1.2 料液比对苦豆子生物碱得率的影响 称取5份2g苦豆草粗粉,分别置于100mL三角瓶中,加入10、20、30、40、50mL 0.6%的盐酸溶液,浸泡30min,以300W功率超声波处理20min后,过滤,定容作为提取液,测定生物碱含量。

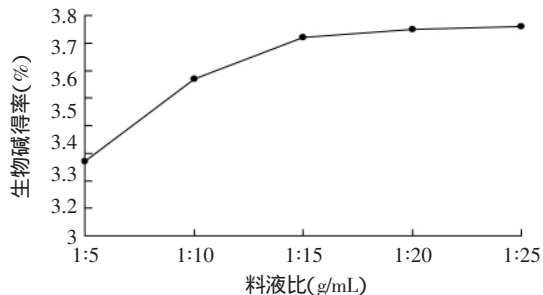


图2 料液比对苦豆子生物碱得率的影响

Fig.2 Effect of ratio of solid to liquid on extraction yield of alkaloids

由图2可知,当料液比达到1:15左右时,苦豆子中生物碱基本溶出,再增加提取剂用量,提取率变化不大。因而,料液比1:15左右为宜。

2.1.3 超声功率对苦豆子生物碱得率的影响 称取5份2g苦豆草粗粉,分别置于100mL三角瓶中,加入50mL 0.6%盐酸溶液,浸泡30min,分别以240、260、300、320、340W功率超声波处理20min后,过滤,定容作为提取液,测定生物碱含量。

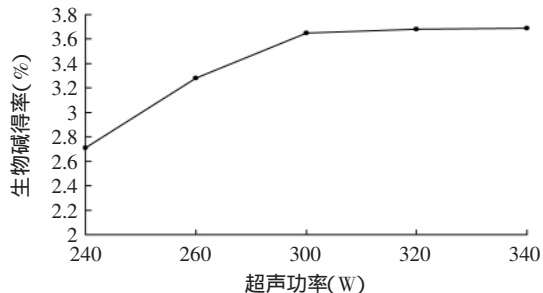


图3 超声功率对苦豆子生物碱得率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on extraction yield of alkaloids
一般来说,超声波的功率越高,越容易获得较大

的声强。超声强度对得率的影响却不能一概而论,要考虑超声波与介质相互作用的程度和提取物的性质。从图3可知,超声功率在300W以下时,随着超声功率的增大,生物碱提取率明显增加,但超声功率在300W以上时,随着超声功率增加,提取率变化不大。出于提取成本等因素考虑,超声功率在300W左右为宜。

2.1.4 超声时间对苦豆子生物碱得率的影响 称取5份2g苦豆草粗粉,分别置于100mL三角瓶中,加入50mL0.6%盐酸溶液,浸泡30min,以300W功率超声波分别处理10、20、30、40、50min后,过滤,定容作为提取液,测定生物碱含量。

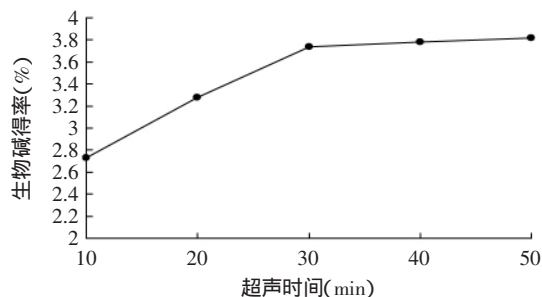


图4 超声时间对苦豆子生物碱得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction yield of alkaloids

由图4可知,在10~30min内,苦豆子生物碱提取率随着时间的延长而显著增加,30min以后,苦豆子生物碱得率变化不大。因此,超声处理时间在30min左右为宜。

2.2 响应面分析法优化苦豆子生物碱提取工艺实验结果与数据分析

2.2.1 模型方程的建立与显著性检验 利用Design Expert软件,通过表2中苦豆子生物碱得率实验数据进行多元回归拟合,获得苦豆子生物碱得率对编码自变量料液比、超声功率和超声时间的二次多项回归方程:

$$Y=3.78+0.1x_1+0.089x_2+0.25x_3-0.26x_1x_2+0.095x_1x_3-0.052x_2x_3-0.3x_1^2-0.15x_2^2-0.41x_3^2 \quad \text{式(1)}$$

对模型(1)进行方差分析(表3),由方差分析结

果可知:模型的 $F=23.29>10.16$, $P=0.0002<0.01$,说明本实验所选用的二次多项模型具有高度的显著性。苦豆子生物碱 $F_{\text{失拟}}=4.22<8.81$,失拟项 $P=0.0989>0.05$,失拟不显著。模型的决定系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.9261$,说明该模型能够解释92.61%的响应值变化。因此,该模型拟合程度较好,可以用此模型来分析和预测超声波提取苦豆子生物碱的工艺结果。在总的作用因素中,回归方程一次项、二次项及交互项 x_1x_2 均具有较高的显著性,表明料液比、超声功率、提取时间以及料液比与超声功率的交互作用对苦豆子生物碱得率有较显著影响。

表2 Box-Behnken中心组合设计方案及实验结果

Table 2 Box-Behnken experiments design and the results of these experiments

实验号	x_1	x_2	x_3	生物碱得率(%)
1	0	0	0	3.82
2	0	0	0	3.84
3	-1	1	0	3.55
4	-1	-1	0	2.79
5	1	0	1	3.52
6	0	-1	1	3.42
7	1	1	0	3.35
8	0	0	0	3.78
9	0	1	1	3.43
10	-1	0	1	3.24
11	0	0	0	3.67
12	-1	0	-1	2.82
13	0	1	-1	3.14
14	1	-1	0	3.63
15	1	0	-1	2.72
16	0	-1	-1	2.92
17	0	0	0	3.81

2.2.2 苦豆子生物碱得率的响应面分析 利用Design Expert软件对表2数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面及其等高线图如图5~图7所示。

通过对回归方程方差分析和各响应面图分析可知,料液比、超声功率、提取时间均对苦豆子生物碱

表3 拟合二次多项式模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance(ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	2.26	9	0.25	23.29	0.0002	significant
x_1	0.084	1	0.084	7.79	0.0268	*
x_2	0.063	1	0.063	5.84	0.0463	*
x_3	0.51	1	0.51	46.83	0.0002	**
x_1x_2	0.27	1	0.27	25.07	0.0016	**
x_1x_3	0.036	1	0.036	3.35	0.11	
x_2x_3	0.011	1	0.011	1.02	0.3456	
x_1^2	0.39	1	0.39	35.9	0.0005	**
x_2^2	0.096	1	0.096	8.87	0.0206	*
x_3^2	0.69	1	0.69	64.27	<0.0001	**
残差	0.075	7	0.011			
失拟性	0.057	3	0.019	4.22	0.0989	not significant
纯误差	0.018	4	4.53E-03			
总差	2.34	16				

$$R^2=0.9677 \quad R^2_{\text{Adj}}=0.9261$$

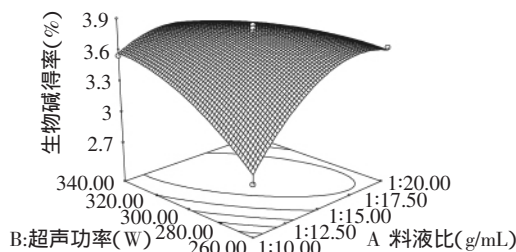


图5 料液比和超声功率对生物碱得率影响的响应面图

Fig.5 Response surface plot showing the effects of the ratio of solid to liquid and ultrasonic power on extraction rate of alkaloids

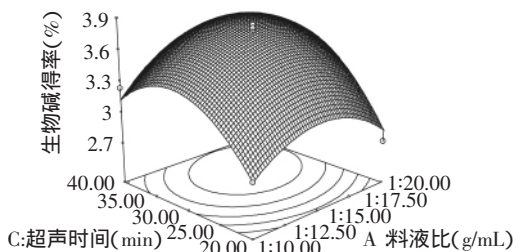


图6 料液比和超声时间对生物碱得率影响的响应面图

Fig.6 Response surface plot showing the effects of the ratio of solid to liquid and extraction time on extraction rate of alkaloids

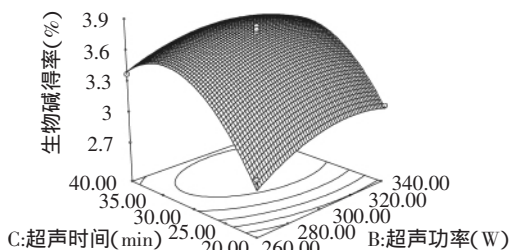


图7 超声功率和超声时间对生物碱得率影响的响应面图

Fig.7 Response surface plot showing the effects of ultrasonic power and extraction time on extraction rate of alkaloids

提取效果有较为显著的影响($P < 0.05$)。随着料液比、超声功率、提取时间的增加或减小,响应值变化较大。从各因素之间的交互作用看,料液比与超声功率的共同作用对响应值的影响较显著($P < 0.05$) (图5),而料液比和提取时间、超声功率和提取时间两因素间共同作用不显著($P > 0.05$) (图6、图7)。优化后的最

佳工艺参数为:料液比1:15.94g/mL,超声功率302.99W,超声提取时间33.27min,在此条件下,苦豆子生物碱的得率可达到3.83%。但考虑到实际操作的限制性,将苦豆子生物碱提取工艺参数修正为料液比1:16g/mL,超声功率300W,超声提取时间33min。

2.3 验证实验

在修正条件下进行3次提取实验,得到苦豆子生物碱的得率平均值为3.72%。回归方程所得预测值为3.83%,与验证实验平均值3.72%的误差为0.11%,采用响应面分析方法优化得到的提取工艺参数较可靠。

3 结论

将液料比、超声功率、超声时间作为Box-Behnken设计的变量,通过响应面分析的结果表明:料液比、超声功率、提取时间均对苦豆子生物碱提取有较显著的影响,交互项料液比与超声功率的交互作用也较显著。超声波辅助提取苦豆子生物碱的最佳工艺参数为:料液比1:16g/mL,超声功率300W,超声提取时间33min。在此条件下,苦豆子生物碱的得率可达到3.72%。因此,该研究结果可对苦豆子生物碱提取的研究提供一定的参考价值,具有一定的实际应用前景。

参考文献

- [1] 李珂璨,王小龙. 苦豆子及其利用[J]. 甘肃农业科技, 2010(2):46-47.
- [2] 艾连中. 响应面分析法优化苦豆子多糖提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(12):141-143.
- [3] 付文艳,李霞,王雪飞. 苦豆子生物碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(10):153-155.
- [4] 单晓菊,邱明磊,陶遵威. 苦豆子化学成分及药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(3):105-107.
- [5] 余永婷. 超声波提取苦豆子生物碱的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2008(3):69-72.
- [6] 李军,冷晓红,郝彩琴. 苦豆草生物碱的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(12):7068-7070.
- [7] 李永春,叶新红,舒翔. 微波法提取苦豆子生物碱的研究[J]. 中国食品添加剂, 2008(5):73-76.

(上接第274页)

- [J]. 广西工学院学报, 2005, 16(3):9-14.
- [4] 彭奇均,徐玲. 柠檬酸生产中色谱提纯分离技术的应用[J]. 中国食品添加剂, 2001(2):45-48.
- [5] 张洪勋,刘德明,薛茂杰,等. 柠檬酸提取新工艺[P]. 中国专利, 1153821A, 1997-07-09.
- [6] 韩布兴. 超临界流体科学与技术[M]. 北京:中国石化出版社, 2005.
- [7] 庞斐. 超临界流体色谱纯化青蒿素的研究[J]. 高校化学工程学报, 2010, 24(4):569-573.
- [8] 丁明玉. 现代分离方法与技术[M]. 北京:化学工业出版社,

2006:144.

- [9] Lesellier E, West C. Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1087(1):64-76.
- [10] Berger T A. Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1997, 785:3-33.
- [11] 何岩,张敏华,董秀芹. 常用夹带剂在超临界CO₂中无限稀释扩散系数的MD计算[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(1):152-156.