

# 响应面设计法优化软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取工艺

杜彦影,刘长江\*,刘旸旸

(沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110866)

**摘要:**以软枣猕猴桃茎为原料,采用乙醇超声波提取法提取软枣猕猴桃茎中总生物碱并测定其含量。以乙醇体积分数、超声波时间、料液比3个单因素为自变量,以软枣猕猴桃总生物碱提取量为响应值,进行响应面实验。用酸性染料比色法测定软枣猕猴桃中总生物碱的含量,优化出软枣猕猴桃茎中总生物碱的最佳提取工艺。结果表明:软枣猕猴桃茎总生物碱的最佳提取工艺为:乙醇体积分数72%、超声时间30min、液料比为43倍。在此条件下,用紫外分光光度法测得软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取量为0.542mg/g。

**关键词:**软枣猕猴桃,总生物碱,响应面,提取工艺

## Optimization of total alkaloids extraction from *Actinidia arguta* stems using response surface methodology

DU Yan-ying, LIU Chang-jiang\*, LIU Yang-yang

(College Food Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** The total alkaloids from *Actinidia arguta* stems were extracted and measured using the method of ultrasonic extraction with ethanol as extraction solvent. Response surface methodology was taken to optimize the extraction of total alkaloids in *Actinidia arguta* stems. Three elements including ethanol concentration, ultrasonic time and solid-liquid ratio were selected to maximize the yield of total alkaloids. Furthermore, the optimal extraction conditions of total alkaloids from *Actinidia arguta* stems were 72% ethanol, ultrasonic treatment time 30min, liquid-solid ratio 43. Under these conditions, the content of total alkaloids was 0.542mg/g from *Actinidia arguta* stems by ultraviolet spectrophotometer.

**Key words:** *Actinidia arguta* stem; total alkaloids; response surface methodology; extraction

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)13-0220-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.038

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta* Sieb.et Zucc.)别名软枣子,为猕猴桃科、猕猴桃属多年生落叶藤本植物<sup>[1]</sup>。软枣猕猴桃喜凉爽、湿润而肥沃的土壤,多攀缘在阔叶树上。主要分布在东北、华北、山东、西北及长江流域,其中,我国东北三省的资源最为丰富。国内外研究表明,软枣猕猴桃茎中含有丰富的黄酮、多糖、三萜类化合物等多种活性成分<sup>[2-4]</sup>。据文献记载,软枣猕猴桃是一种药食两用的资源,全株均含猕猴桃碱和肉苁蓉碱<sup>[5-8]</sup>。生物碱是一类天然的除氨基酸、蛋白质、核苷酸等以外含有氮碱基的有机环状化合物,大多数生物碱都具有抗肿瘤、抗癌、抗病毒、抗炎、抗心律失常和高血压等心血管疾病的作用<sup>[9-11]</sup>。

为减少因修剪枝条造成的大量损失,从软枣猕猴桃茎中提取总生物碱是一个值得研究的课题。近

年来,尚未发现有关软枣猕猴桃茎中生物碱提取工艺的报道,本实验首次研究从软枣猕猴桃茎中提取生物碱。由于生物碱易溶于有机溶剂,而超声波产生的振动作用加强了生物碱等物质的释放、扩散及溶解<sup>[12-13]</sup>。利用乙醇超声波辅助提取法进行软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取,采用酸性染料比色法测定总碱含量<sup>[14]</sup>,并采用响应面法对其提取工艺进行优化<sup>[15-16]</sup>,这对软枣猕猴桃的综合利用和功能性食品的开发提供了理论依据<sup>[17]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

软枣猕猴桃茎 沈阳农业大学野生软枣猕猴桃基地,该品种经辽宁省种子管理局鉴定并进行新品种备案,命名为长江1号;标准品乌头碱 中国药品

收稿日期:2014-09-22

作者简介:杜彦影(1989-),女,硕士,研究方向:食品生物技术。

\*通讯作者:刘长江(1955-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项(200903013)。

生物制品鉴定所;无水乙醇、盐酸、氯仿、氨水、溴麝香草酚蓝、磷酸二氢钠、氢氧化钠 均为分析纯。

JY92-IIN 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;RE-52 旋转蒸发器、SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司;U-2910型紫外可见分光光度计 日立先端科技股份有限公司;中草药粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司;PH计 德国赛多利斯股份公司;电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 软枣猕猴桃茎总生物碱的制备** 将软枣猕猴桃茎烘干、粉碎至粉末状,过 60 目筛子,准确称取软枣猕猴桃茎粉末 5.0g 置于烧杯中,加入 95% 乙醇浸泡 24h,在超声波功率为 200W 的条件下提取 30min,减压浓缩提取液至浸膏状,向浸膏中加入 2% 盐酸 20mL 酸化,静置,过滤,滤渣用 2% 的 10mL 盐酸清洗两次,滤液用 30mL 氯仿萃取 3 次,去除杂质,向滤液中加入浓氨水调节 pH 至 10 左右,再用等体积氯仿萃取 3 次,合并滤液,浓缩,用氯仿定容至 25mL 容量瓶中备用。

**1.2.2 最大吸收波长的确定** 采用酸性染料比色法,精密吸取样品溶液 1mL,将其置于分液漏斗中,加入溴麝香草酚蓝缓冲液 6mL,再加入氯仿 6mL,充分振摇 1min,静置 30min,使氯仿和样品溶液充分分层,分取氯仿层,用脱脂棉除去水分,在 200~600nm 波长范围内进行紫外扫描<sup>[18]</sup>。取乌头碱标准品溶液 1mL,方法同上进行测定;另取氯仿 1mL,同法操作,所得氯仿溶液为空白溶液。结果表明,乌头碱标准品溶液和生物碱样品溶液的最大吸收峰均出现在 415nm 处,本实验选取 415nm 为最大吸收波长。

**1.2.3 标准曲线的绘制** 乌头碱标准品溶液的配制:精密称量乌头碱标准品 3.5mg,置于 50mL 容量瓶中,用氯仿溶解并定容至刻度,即得质量浓度为 0.07mg/mL 的标准品溶液。

精密吸取配制好的标准品溶液 0.0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mL,按 1.2.2 所述显色后,以 1 号为空白溶液,用紫外分光光度计分别在 415nm 处测定吸光度,纵坐标为吸光度(Y)、横坐标为乌头碱标准品质量浓度(X/(mg/mL)),绘制标准曲线,回归方程为:  $Y = 5.7436x + 0.0255$ ,  $R^2 = 0.9996$ 。

**1.2.4 软枣猕猴桃茎总生物碱的测定** 精密吸取制备好的生物碱样品溶液 1mL,测定吸光度,重复进行 3 次,取其平均值为吸光度。通过测得的吸光度,计算出对应的质量浓度,软枣猕猴桃茎总生物碱的计算公式为:

$$\text{软枣猕猴桃茎总生物碱的提取量 (mg/g)} = C \times V/M$$

方程式中:C 为软枣猕猴桃茎总生物碱提取液的质量浓度(mg/mL);V 为提取液定容的体积(mL);M 为软枣猕猴桃粉末样品的质量(g)。

**1.2.5 单因素实验** 准确称取软枣猕猴桃茎粉末 5g 分别加入无水乙醇 200mL 浸泡,超声波提取 30min,以总生物碱提取量为考察指标评价提取效果,分别

考察乙醇体积分数、超声波时间、料液比、提取次数对总生物碱提取量的影响<sup>[19]</sup>。重复单因素实验 3 次,利用 SPSS 软件对数据进行分析。

**1.2.6 响应面实验的设计** 根据 BOX- Behnken 实验设计原理<sup>[20]</sup>,选取对软枣猕猴桃茎中总生物碱提取率有显著影响的单因素乙醇体积分数、超声波时间、料液比为自变量设计响应面实验,考察提取总生物碱的最佳工艺条件。表 1 为实验因素水平编码。

表 1 响应面实验因素水平设计表  
Table 1 Factors and levels of response surface test

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数(%)	60	80	100
B 超声时间(min)	15	30	45
C 液料比(倍)	30	40	50

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

**2.1.1 乙醇体积分数的影响** 不同的乙醇体积分数对总生物碱提取量的影响如图 1。由图可知,当乙醇体积分数为 80% 时,生物碱的提取效果最好,当乙醇体积分数在 20%~80% 范围内,随着乙醇体积分数的增大,提取效果不断提高,而在超过 80% 后提取效果反而随乙醇体积分数增大而降低,原因可能是乙醇体积分数过大,软枣猕猴桃茎中其他有效成分溶解在提取液中,影响生物碱的提取效果。故选乙醇体积分数为 80%。

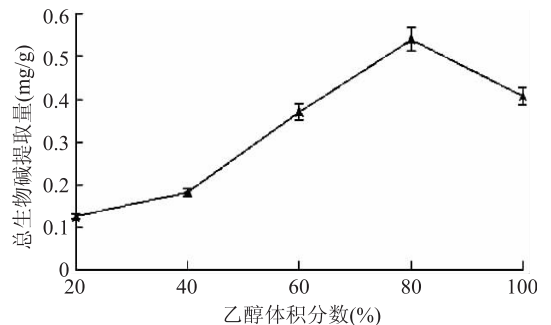


图 1 乙醇体积分数对总生物碱提取量的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on total alkaloids yield

**2.1.2 超声波时间的影响** 不同的超声波时间对总生物碱提取量的影响如图 2。由图可知,在超声波时间为 30min 时,生物碱的提取效果最好,在 30min 之前,提取效果随超声时间呈上升趋势,但随着时间的延长,软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取效果明显下降,可能是因为生物碱在超声波的空化作用下,使生物碱的结构被破坏,从而导致生物碱的提取效果下降。故选超声时间为 30min。

**2.1.3 液料比的影响** 不同的液料比对总生物碱提取量的影响如图 3。由图可知,随着溶剂量的不断增加,生物碱的提取效果呈显著增长的趋势,这可能是因为溶剂与浸提物接触充分,使溶出率增加,当液料比达到 40 倍时,生物碱的提取效果最好,随着溶剂量的继续增加,提取量略有下降,这可能是因为软枣

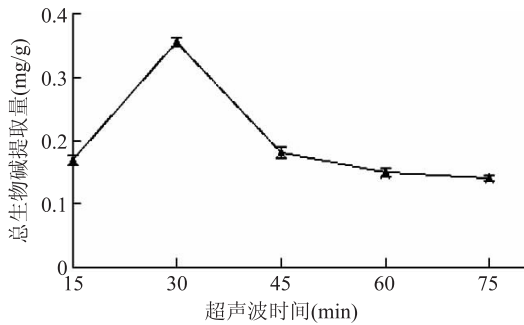


图2 超声波时间对总生物碱提取量的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic time on total alkaloids yield

猕猴桃茎中总生物碱的溶出已经达到饱和状态。为减少实验成本,故选择液料比为40倍。

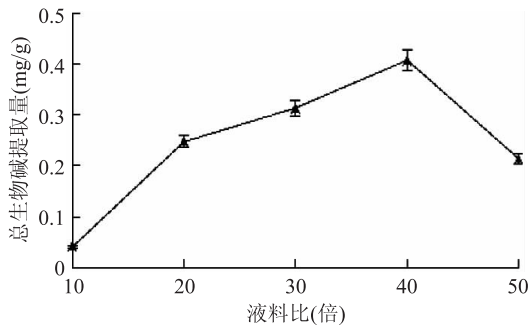


图3 料液比对总生物碱提取量的影响

Fig.3 Effects of liquid-solid ratio on total alkaloids yield

2.1.4 提取次数的影响 不同的提取次数对总生物碱提取量的影响如图4。由图可知,随着提取次数的增加,总生物碱提取量的变化并不明显。为了降低实验成本和节约时间,故选提取次数为2次。

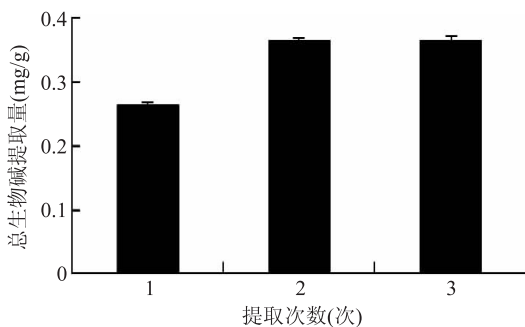


图4 提取次数对总生物碱提取量的影响

Fig.4 Effects of extract times on total alkaloids yield

## 2.2 响应面设计实验结果与分析

2.2.1 回归模型方程的建立及显著性检验 在单因素实验的基础上,利用响应面法对软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取工艺进行进一步优化。根据响应面法 Box-Behnken 设计,共对17个实验点进行实验,软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取量见表2。

利用 Design-Expert.8.05b 软件进行分析,以软枣猕猴桃总生物碱的提取量为响应值,得到软枣猕猴桃茎中总生物碱的提取量(Y)对乙醇体积分数(A)、超声波时间(B)、液料比(C)的二次多项式回归模型方程为: $Y = 0.54 - 0.030A - 0.025B + 0.025C - 2.500E -$

$0.03AB - 0.043AC + 0.052BC - 0.056A^2 - 0.061B^2 - 0.056C^2$ 。模型系数显著性结果和方差分析结果见表3。

表2 软枣猕猴桃茎总生物碱响应面分析方案及实验结果

Table 2 Test design and results of response surface analysis of *Actinidia arguta* stems

实验号	因素			总生物碱提取量 (mg/g)
	A	B	C	
1	0	0	0	0.55
2	1	1	0	0.36
3	0	1	1	0.47
4	-1	-1	0	0.48
5	1	0	1	0.39
6	1	0	-1	0.41
7	0	0	0	0.54
8	0	0	0	0.54
9	0	-1	-1	0.48
10	0	0	0	0.53
11	-1	0	-1	0.38
12	-1	0	1	0.53
13	0	0	0	0.55
14	0	-1	1	0.41
15	0	1	-1	0.33
16	1	-1	0	0.42
17	-1	1	0	0.43

由表3的数据可知,该模型极显著( $p < 0.0001$ ),模型的相关系数  $R^2 = 0.9910$ ,这说明响应值的99.10%来自于自变量,即乙醇体积分数、超声波时间、液料比,该模型与实际实验模拟合度较好,所选自变量与响应值之间关系显著。模型失拟项  $p = 0.1208$ ,不显著,模型调整确定系数  $R_{Adj}^2 = 0.9795$ ,表明该回归模型对实验结果拟合较好,可实验可以利用该回归模型对实验结果进行分析,并确定软枣猕猴桃总生物碱提取的最佳工艺。

由表3知,乙醇体积分数一次项、乙醇体积分数与液料比的交互项、超声波时间与液料比的交互项、乙醇体积分数的二次项、超声波时间的二次项和液料比的二次项达到极显著水平( $p < 0.0001$ )。超声波时间的一次项和液料比的一次项达到显著水平( $p < 0.05$ )。乙醇体积分数与超声波时间的交互项不显著( $p > 0.05$ )。结果表明,各变量因素对总生物碱提取效果的影响不是简单的线性关系。

2.2.2 响应面分析与优化 利用软件 Design-Expert 8.05b 对表2数据进行二次回归多元拟合,得到的二次回归方程的响应面,见图5~图7。

由图5可知,响应面图形表示了乙醇体积分数(A)与超声波时间(B)交互作用的3D图,从响应面的最高点可以看到,在所选范围内存在最大值。响应面的等高线可以看出各因素对响应值的影响程度,响应面曲面坡度的陡峭度可以看出各因素交互作用的强弱。当液料比固定在43倍时,当乙醇体积分数为70%左右时,超声波时间为30min附近时,总



表3 回归统计分析表

Table 3 Analysis of variance for each term of the fitted regression equation

系统来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值	显著性
模型	9	74.61	9.211E-003	85.97	<0.0001	**
A	1	7.200E-003	7.200E-003	67.20	<0.0001	**
B	1	5.000E-003	5.000E-003	46.67	0.0002	*
C	1	5.000E-003	5.000E-003	46.67	0.0002	*
AB	1	2.500E-005	2.500E-005	0.23	0.6438	
AC	1	7.225E-003	7.225E-003	67.43	<0.0001	**
BC	1	0.011	0.011	102.90	<0.0001	**
A <sup>2</sup>	1	0.013	0.013	124.34	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	1	0.016	0.016	147.43	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	1	0.013	0.013	124.34	<0.0001	**
残差误差	7	7.500E-004	1.071E-004			
失拟项	3	5.500E-004	1.833E-004	3.67	0.1208	不显著
纯误差	4	2.000E-004	5.000E-005			
总离差	16	0.084				
相关系数 R <sup>2</sup>	0.9910					
调整复相关系数 R <sub>Adj</sub> <sup>2</sup>	0.9795					

注: \*\* :差异极显著,  $p < 0.0001$ ; \* :差异显著,  $p < 0.05$ 。

生物碱提取量达到最大值。由响应面图形可以观察到,等高线的形状偏圆形,表明乙醇体积分数(A)和超声波时间(B)交互作用不显著。

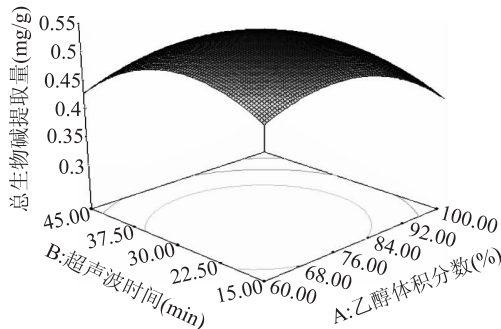


图5 乙醇体积分数与超声波时间  
对总生物碱提取量的影响

Fig.5 Effect of volume fraction of ethanol and ultrasonic time on extract yield of total alkaloids

由图6可知,响应面图形表示了乙醇体积分数(A)与液料比(C)交互作用的3D图。当超声波时间固定在30min时,乙醇体积分数为70%,料液比在40倍时,总生物碱的提取效果最佳。由响应面图形可以观察到,等高线的形状偏椭圆形,表明乙醇体积分数(A)和超声波时间(C)交互作用显著。

由图7可知,响应面图形表示了乙醇体积分数(B)与液料比(C)交互作用的3D图。当乙醇体积分数固定在72%时,当超声波时间短,液料比低时,总生物碱提取效果不好,随着超声时间的增加和液料比的增大,总生物碱的提取效果增大,当超声波时间为30min,液料比为43倍时,总生物碱的提取率达到最高。由响应面图形可以观察到,等高线呈椭圆形,超声波时间和液料比的相互作用显著。

利用 Design-Expert8.05b 软件分析可知,得到软

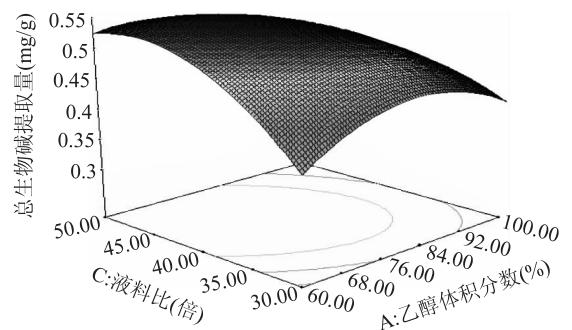


图6 乙醇体积分数与液料比对总生物碱提取量影响  
Fig.6 Effect of volume fraction of ethanol and solid-liquid ratio on extract yield of total alkaloids

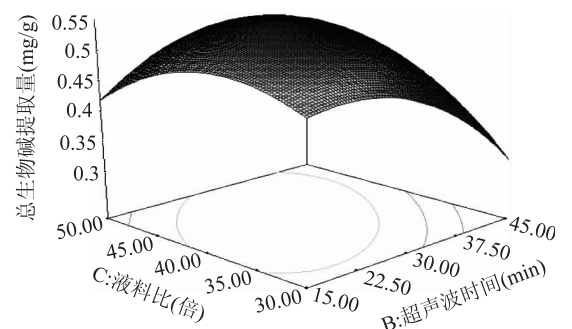


图7 超声时间与液料比对总生物碱提取量影响  
Fig.7 Effect of ultrasonic time and solid-liquid ratio on extract yield of total alkaloids

枣猕猴桃茎总生物碱的最佳工艺条件为乙醇体积分数为72.03%,超声波时间为29.32min,液料比为43.43倍。在此条件下,得到软枣猕猴桃总生物碱提取量的理想值为0.550939mg/g。为了方便实验操作,我们选择的实验条件为:乙醇体积分数为72%,超声波时间为30min,液料比为43倍,得到的总生物碱提取量的实际值为0.542mg/g。这与理论值十分

相近,因此,可以采用响应面法优化软枣猕猴桃茎总生物碱的提取工艺。

### 3 结论

在软枣猕猴桃茎总生物碱提取的工艺中,乙醇体积分数、超声波时间和液料比对总生物碱提取量都有一定的影响。通过单因素实验和响应曲面分析法,以总生物碱提取量为指标,确定了最佳提取工艺为:乙醇体积分数为72%、超声时间为30min和液料比为43倍,在此条件下测得软枣猕猴桃总生物碱的实际值为0.542mg/g。

#### 参考文献

- [1] 朴一龙,赵兰花.软枣猕猴桃研究进展[J].北方园艺,2008(3):76-78.
- [2] Takano F, Tanaka T, Tsukamoto W, et al. Isolation of (+)-catenin and (-)-epicatechin from *Actinidia arguta* as bone marrow cell proliferation promoting compounds[J]. *Planta Med*, 2003, 69(4):321-326.
- [3] 侯芳玉,陈飞,陆意,等.长白山软枣猕猴桃茎多糖抗感染和抗肿瘤作用的研究[J].白求恩医科大学学报,1995,21(5):472-474.
- [4] 侯芳玉,孙延波,陈飞,等.长白山软枣及猕猴桃茎多糖免疫药理作用的研究[J].中国中药杂志,1995,20(1):42-44.
- [5] 林志坚,阮立为,郭旭.软枣猕猴桃的化学成份及其综合利用[J].中国林副特产,1995(2):25-126.
- [6] 陈巧鸿,杨培全.猕猴桃碱类的化学研究进展[J].华西药科学杂志,2000,15(6):445-447.
- [7] 赵胤.猕猴桃属植物的化学成分及药理活性研究进展[C].环境污染和公共卫生会议(CEPPH2011).浙江:浙江树人大学生物与环境工程学院,2011,310015.

(上接第219页)

添加量0.007%,酶解温度40℃,酶解时间60min,最佳条件下芒果汁出汁率可达71.15%,制得的芒果汁可溶性固形物为16.7%±0.1%,可滴定酸为0.51%±0.08%,类胡萝卜素为(1.23±0.07)mg/100g,还原糖为7.6%±0.08%,果胶含量为(357±1.32)mg/100g,通过最佳酶解工艺研制的芒果汁保持鲜芒果的营养成分。

#### 参考文献

- [1] 李丽,盛金凤,孙健,等.芒果加工新技术及综合利用研究进展[J].食品工业,2014,35(6):223-227.
- [2] 颜梦婷,黄金城,林晓岚,等.芒果贮藏保鲜技术的研究进展[J].农产品加工(学刊),2014,(9):72-74+76.
- [3] Sreenath H K, Nanjundaswamy A M, Sreekantiah K R. Effect of various cellulases and Pectinases on viscosity reduction of mango pulp[J]. *Journal of Food Science*, 1987, 52(1):230-231.
- [4] Githaiti J K. Application of pectase in the production of mango fruit[J]. *Acta Alimentaria*, 1991, 20(2):97-102.
- [5] 吴定,孙嘉文,黄卉卉,等.固定化果胶酶提高苹果出汁率的研究[J].食品科学,2012,33(16):40-44.
- [6] 崔伟荣,逢焕明,杨静,等.果胶酶澄清哈密瓜汁工艺研究[J].新疆农业科学,2010,47(4):698-704.
- [7] 付莉,顾英,王丽颖.果胶酶提高番茄出汁率的工艺研究

- [8] Baghdikian B, Olivier E, Faure R, et al. Two new pyridine monoterpene alkaloid by chemical conversion of a commercial extract of *Harpagophytum procumbens* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(2):211.
- [9] 陶上乘,王净珍.苦豆子生物碱的药理作用[J].中国药理学杂志,1992,27(4):201-204.
- [10] 吴立军主编.天然药物化学(第四版)[M].北京:人民卫生出版社,2003:352-395.
- [11] 姚仲青,朱虹,王光凤.山豆根总生物碱抗肿瘤作用的初步研究[J].南京中医药大学学报,2005,21(4):253-254.
- [12] 严伟,李淑芬,田松江.超声波协助提取技术[J].化工进展,2002,21(9):649-651.
- [13] 郭孝武,张福成,林书玉,等.超声技术在中草药成分提取中的应用[J].中草药,1993,24(10):548-550.
- [14] 李建伟.酸性染料比色法测定苦参药材中总生物碱的含量[J].长治医学院学报,2007(5):331-335.
- [15] 徐春龙,林书玉.超声提取中草药成分研究进展[J].药物分析杂志,2007,27(6):933-937.
- [16] 毛鹏,程妮,邓玉清,等.白刺花果实中总生物碱的超声波提取工艺研究[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2007,35:31-32.
- [17] 朱建华,田金河.猕猴桃生物活性物质研究进展[J].酿酒,2006,33(3):57-59.
- [18] 邱学,徐洋洋,裴世柱.响应面法优化藤梨根总生物碱提取工艺[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(7):58-61.
- [19] 刘树兴,赵芳.荷叶功能成分的研究[J].食品工业科技,2008,29(4):221-224.
- [20] 王成恩,黄章俊.基于高斯函数和信赖域更新策略的Kriling响应面法[J].计算机集成制造系统,2011,17(4):740-746.

[J].中国酿造,2009,(6):126-128.

- [8] 韩丹.果胶酶提高南果梨出汁率工艺的研究[J].吉林工商学院学报,2013,29(5):91-93+119.
- [9] 屈小媛,胡萍,周光桥,等.果胶酶与纤维素酶复合提取黑树莓果汁的工艺优化[J].贵州农业科学,2011,39(9):194-197.
- [10] 王海堂,李燕,邹盈,等.果胶酶和纤维素酶对尤力克柠檬出汁率的影响[J].农产品加工(学刊),2010,(3):56-58.
- [11] 王军,张宝善,张润光.果胶酶和纤维素酶对牛心柿出汁率的影响[J].食品工业科技,2008,29(5):139-141.
- [12] 曹辉,王振斌,马海乐.草毒澄清汁的加工技术研究.食品科学,2007,28(4):117-120.
- [13] Lee S, Umamo K, Shibamoto T, et al. Volatile antioxidants produced from heated corn oil/glycine model system[J]. *Food Chemistry*, 2005, 91(1):131-137.
- [14] 陈拓,杨瑞金,张莎.高压脉冲电场对胡萝卜汁的杀菌效果及类胡萝卜素含量的影响[J].食品与发酵工业,2010,36(7):41-44.
- [15] 杨辉,陈永康,张智锋.果胶酶提高苹果出汁率工艺条件的优化[J].食品科技,2006,31(5):76-78.
- [16] 张兴龙,王维琴,余丹丹.果胶酶提高‘宁海白’枇杷果浆出汁率的工艺优化[J].食品工业科技,2013,34(12):258-260+266.