

吴映捷,吕新美,闫兵兵,胡 鲲,杨先乐\*

上海海洋大学 水产与生命学院, 国家水生动物病原库, 上海 201306

为了从废弃烟叶高效提取烟碱, 本文利用响应面法对在废弃烟叶中烟碱的提取条件进行优化。以烟碱的得率为评价指标, 设计酶解时间、酶解温度, pH 值及提取时间 4 因素 3 水平的实验模型, 采用 Design Expert 8.0.6 分析软件对烟碱的提取条件进行优化研究。优选出最佳提取工艺为: 酶解时间 2.0 h, 酶解温度 48.50 °C, 酶用量 2.10%, pH4.00。测定烟碱的得率为 3.320%, 与预测值 3.32836%偏差较小, 为废弃烟叶的烟碱提取提供理论依据。

烟碱; 废弃烟叶; 响应面法

S572

A

1000-2324(2017)02-0203-07

## Optimization of Nicotine Extracted from Abandoned Tobacco with Response Surface Method

WU Ying-jie, LV Xin-mei, YAN Bing-bing, HU Kun, YANG Xian-le\*

College of Fisheries and Life Science/Shanghai Ocean University, National Aquatic Animal Pathogens, Shanghai 201306, China

**Abstract:** To optimize the conditions for purification of Nicotine in abandoned Tobacco. Response surface method was used to design the test models with four factors including enzyme time, enzyme temperature, enzyme dosage, ultrasonic time at three levels based on the single factor experiment and the yield of Nicotine was used as the evaluation index to optimize purification process of Nicotine. The optimum extraction condition were as follows: enzymolysis time was 2.00 h, enzymolysis temperature was 48.50 °C, cellulose enzyme amount was 2.10%, pH was 4.00. Under this condition, the yield was up to 3.320%, the relative error was smaller compared to the predicted value 3.32836%. The optimum extraction conditions were simple and stable and they were served as a reference for industrial large scale production.

**Keywords:** Nicotine; abandoned tobacco; response surface method

烟草(*Nicotiana tabacum* L)是最广泛种植的经济作物之一。我国有世界最大的烟草生产和消费国量, 烟草年产量占到世界总产量的 40%左右, 烟碱(Nicotine, Nic)是烟草中最主要的生物碱<sup>[1]</sup>。临床医学上有重要使用价值, 严家川的研究发现其可以激活 $\alpha 7$  烟碱型胆碱能受体及减少促炎症细胞因子合成及释放, 减轻炎症反应, 改善疾病预后。给 Alzheimer's 症患者使用烟碱透皮贴剂可以使患者认知功能得到改善<sup>[2]</sup>。凌丽研究表明烟碱具有强抗炎作用, 可以不依赖迷走神经完整性独立发挥作用<sup>[3]</sup>。张敏恒等经过研究表明烟碱也是农用杀虫剂的重要成分, 对昆虫具有拒食、忌避、细胞凋亡和生殖毒性等作用可用于鱼类寄生虫防治, 还能改善水质, 清塘、疗效彻底的特点, 无耐药性且残留低, 且原料广, 成本低, 使用方便<sup>[4]</sup>。

现有的烟碱提取方法有溶剂萃取法<sup>[5]</sup>、蒸馏法<sup>[6]</sup>、离子交换法及超临界 CO<sub>2</sub> 提取法等<sup>[7-9]</sup>。对于生物碱类化合物, 一般根据极性和水溶性选择提取方法, 烟碱可溶于水, 一般选择水作为提取溶剂。陈小东等采用单宁酸作沉淀剂, 超声提取法来提取废次烟叶中烟碱。用水做为提取溶剂, 用单宁酸来行沉淀反应, 烟碱的提取率达 1.06%<sup>[10]</sup>。曾淼洋等用减压内部沸腾法提取, 实验乙醇浓度为 70%, 提取温度为 50 °C 及操作压强为 0.019 MPa 时, 内部沸腾过程 4 min 完成, 烟碱提取率 1.15%<sup>[11]</sup>。黄飞也以微波辅助的方法提取烟碱, 观察了浸泡时间、微波功率、固液比、微波时间等条件对烟碱提取率的影响。微波辅助提取法提取烟碱最佳条件是: 功率为 800 W, 辐射时间是 7 min, 浸泡时间为 4 h, 固液比 1:7, 该优化条件下, 烟碱提取率能达到 98.68%<sup>[12]</sup>。陈丽金用微波辅助的方法提取烟碱, 发现微波对烟碱的提取有促进的作用。微波辅助提取的最佳工艺条件是微波功率为 300 W, 波时间为 1 min, 液固比为 25:1, 此工艺比未经微波处理的提法的提取率增加约 11 倍<sup>[13]</sup>。现在用于工业生

2016-10-12

2016-11-05

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2011AA10A216);公益性行业(农业)科研专项经费(201203085)

吴映捷(1992-),女,在读硕士生,研究方向为中草药杀灭寄生虫作用. E-mail:wuyingjie0615@sina.com

\* Author for correspondence. E-mail:xlyang@shou.edu.cn

产的主要为溶剂萃取法和蒸馏法,但是这些方法效率低下,而离子交换法和超临界 CO<sub>2</sub> 提取法虽然得率较高但是成本又难以控制,现有技术提取效率和生产成本上难以达到平衡。酶解辅助提取法是指在传统溶剂法的基础上,利用生物酶降解细胞间质中的成分,破坏植物细胞壁结构,通过降低细胞的渗透阻力促进有效成分的溶出<sup>[14]</sup>。具有工艺简单、得率高的优点,可以用于工业大量生产。依据单因素提取实验结果,选取对提取有影响的酶解温度、酶解时间、酶用量和 pH 值四个因素,以烟碱得率为指标,采用中心组合设计—响应面法确定最佳提取工艺,并且具有试验次数少、精度高的优点,以期废弃烟叶提取工业化提取提供依据。

## 1

### 1.1

废弃烟叶由江西省赣州市渔业局提供,去掉老化病变部分,洗净,烘干,粉碎,过筛备用。实验中所用试剂均为分析纯。烟碱标准品购于美国 Sigma 公司(纯度≥98%),纤维素酶,诺维信公司,酶活力为 20000 U/g。

HH-4S 数显恒温水浴锅(上海贝凯生物化工设备有限公司);UV751 型紫外—可见光分光光度计(瑞利仪器分析有限公司产品)、AB104-S 电子分析天平

### 1.2

1.2.1 烟碱含量的测定 将烟碱标准液 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 注入 60 mL 分液漏斗中,加柠檬酸磷酸氢二钠缓冲液 2 mL 于分液漏斗、再加入 2 mL 甲基橙溶液,将分液漏斗中的溶液混合均匀,加入三氯甲烷 5 mL,萃取时间 2 min,静置分层,取三氯甲烷的分层加入比色皿中,测波长在 420 nm 处吸光度。烟碱溶液吸光度作纵坐标,烟碱量为横坐标绘标准曲线。烟叶中总烟碱含量按照《YC/T160-2002 烟草及烟草制品总植物碱的测定连续流动法》测其中总烟碱含量<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 最佳酶解时间的筛选 称取过筛后的烟叶 10.00 g,以 1:10 的料液比加入 100 mL 水,选择了酶解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 作为考察因素,固定酶解温度选定为 50 °C,酶用量 1.5%,pH 值 5,所得提取液过滤,放冷,得供试品溶液,测定,计算烟碱提取量;

1.2.2.2 最佳酶解温度的筛选 称取过筛后的烟叶 10.00 g,以 1:10 的料液比加入 100 mL 水,选择了酶解温度 40、45、50、55、60、65 °C 作为考察因素,固定酶解时间 1.0 h,酶用量 1.5%,pH 值 5,所得提取液过滤,放冷,得供试品溶液,测定,计算烟碱提取量;

1.2.2.3 最佳酶用量的筛选 称取过筛后的烟叶 10.00 g,以 1:10 的料液比加入 100 mL 水,选择了酶用量 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3% 作为考察因素,固定酶解时间 1.0 h,酶解温度 50 °C, pH 值 5,所得提取液过滤,放冷,得供试品溶液,测定,计算烟碱提取量;

1.2.2.4 最佳 pH 值的筛选 称取过筛后的烟叶 10.00 g,以 1:10 的料液比加入 100 mL 水,选择了 pH 值 3.5、4、4.5、5、5.5、6 作为考察因素。固定酶解时间 1.0 h,酶解温度 50 °C,酶用量 1.5%,所得提取液过滤,放冷,得供试品溶液,测定,计算烟碱提取量。

#### 1.2.2.5 烟碱含量的测定

$$\text{烟碱的得率 (mg/g)} = C \times V \times n / m$$

$C$  为根据烟碱标准曲线公式计算出的所测样品中烟碱浓度(mg/mL), $V$  为提取液定容体积(mL), $n$  为稀释倍数, $m$  为烟叶的质量(g)。

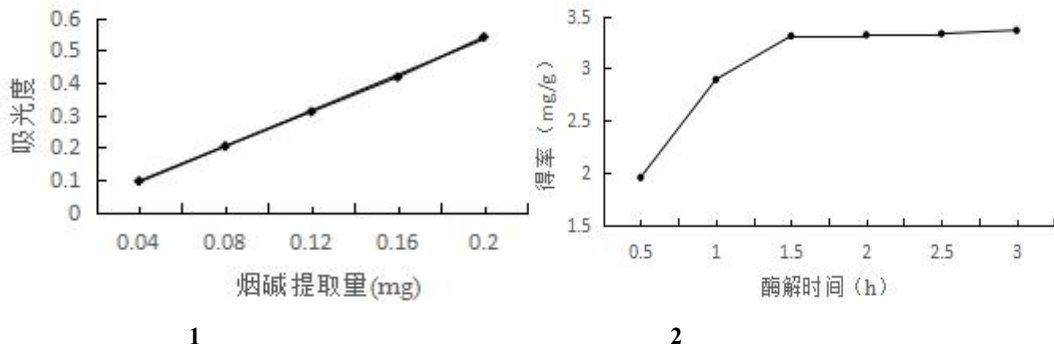
## 2

### 2.1

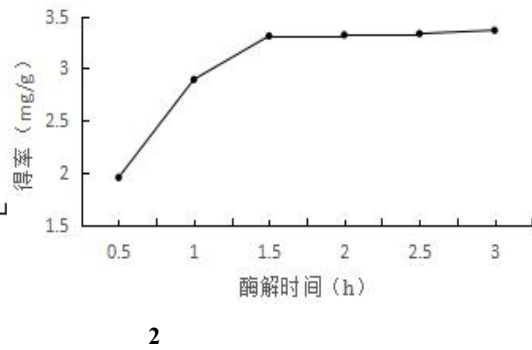
以吸光度为纵坐标,烟碱提取量为横坐标作图,作出回归方程  $y=0.117x-0.031$ ,  $R^2=0.9927$ 。

### 2.2

#### 2.2.1 酶解时间对烟碱得率的影响



1 Fig.1 Standard curve of Nicotine amount



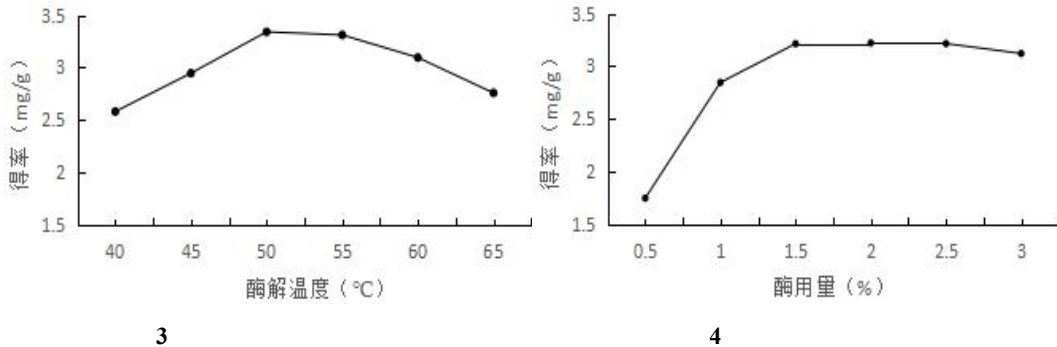
2 Fig.2 Effect of enzyme time on yield of Nicotine

由图 2 可知, 烟碱的得率随酶解时间的增加而升高, 酶解时间 2 h 后, 随着酶解时间的延长, 烟碱得率增势趋于平缓。原因为随着时间增长, 酶活力可以得到充分发挥, 酶解反应进行得较完全, 提取液中烟碱含量便不再明显增加。

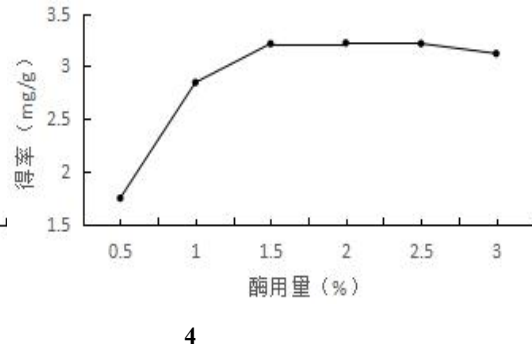
### 2.2.2 酶解温度对烟碱得率的影响

烟碱的提取率随酶解温度升高而增加, 当温度为 50 °C 时, 到达峰值, 酶解温度继续升高, 烟碱的提取率开始减少。随着温度的升高, 底物分子的热能增加, 酶解反应的速率增加, 提取率增大, 但当温度继续升高, 导致酶活性降低, 酶解反应受抑制, 因此温度升高得率降低。

### 2.2.3 酶用量对烟碱得率的影响



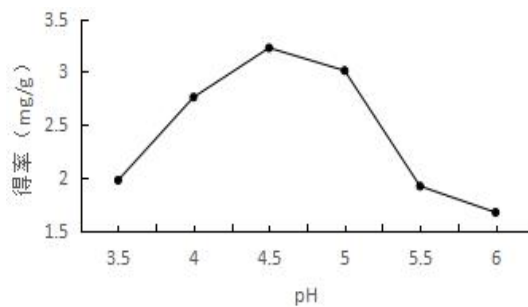
3 Fig.3 Effect of enzyme temperature on yield of Nicotine



4 Fig.4 Effect of enzyme dosage on yield of Nicotine

烟碱的提取率随酶用量的增加不断升高, 当酶用量到 2% 时, 酶量再增加, 烟碱的提取率没有明显变化。这可能是由于当酶用量低于最佳值时, 酶解进行得不完全, 烟碱释放出的量较少, 提取率低, 当达到最佳值时, 酶解反应则较彻底, 此时如再继续增加酶用量, 酶解反应进行的程度没有太大的变化。

### 2.2.4 pH 值对烟碱得率的影响



5 pH

Fig.5 Effect of pH on yield of Nicotine

试验结果表明, 烟碱得率随着酶解 pH 值的增大先增大后减小。原因可能是纤维素酶受到 pH 值的影响较大。

## 2.3

2.3.1 响应面实验因素水平的选择 在单因素实验的基础上对 A (酶解时间)、B (酶解温度)、C (酶用量) 和 D (pH 值) 为考察因素, 进行响应面试验, 使用 Design-expert 8.0.6 trial 软件, 以烟碱含量为指标, 设计 4 因素 3 水平 (共 29 个试验点、5 个中心点) 的响应面试验, 每组试验重复 3 次, 取其平均值, 其因素水平如表 1 所示。

**1 Response surface**  
**Table 1 Factors and levels in Response surface test**

水平 Levels	A 酶解时间/h Enzymolysis time	B 酶解温度/°C Enzymolysis temperature	C 酶用量/% Dosage of enzyme	D pH 值
-1	1	45	1.5	3.5
0	1.5	50	2	4
1	2	55	2.5	4.5

2.3.2 建立模型方程与显著性检验 对结果进行多元化回归拟合分析得到 4 个因素与烟碱得率之间二次回归模拟方程

$$\text{得率} = 3.24 + 0.050A - 0.38B - 0.025C - 0.075D - 0.021AB + 0.028AC + 0.038AD + 0.012BC + 0.16BD - 0.13CD - 0.021A^2 - 0.67B^2 - 0.044C^2 - 0.42D^2$$

二次回归模拟方程其中一次项和二次项都有显著性影响因素, 所以实验各因子对响应值的影响并不是线性关系。

**2 Response surface**  
**Table 2 Response surface central combination project and response values**

序号 No.	A	B	C	D	得率 Yield
1	1	45	2	4	2.797
2	1.5	50	2	4	3.251
3	1.5	50	2.5	4.5	2.583
4	1.5	55	1.5	4	2.103
5	1	50	2.5	4	3.108
6	1.5	45	2	4.5	2.346
7	2	50	1.5	4	3.231
8	1.5	45	2.5	4	2.946
9	1	50	2	3.5	2.803
10	1	50	2	4.5	2.724
11	1.5	50	2.5	3.5	2.846
12	1.5	50	2	4	3.165
13	2	50	2.5	4	3.229
14	1.5	45	2	3.5	2.676
15	1.5	55	2	4.5	2
16	1.5	50	2	4	3.256
17	2	55	2	4	2.203
18	1	55	2	4	2.108
19	2	50	2	4.5	2.897
20	2	50	2	3.5	2.825
21	1	50	1.5	4	3.221
22	1.5	50	2	4	3.277
23	1.5	55	2.5	4	2.103
24	1.5	50	1.5	3.5	2.648
25	1.5	50	2	4	3.253
26	2	45	2	4	2.974
27	1.5	45	1.5	4	2.994
28	1.5	55	2	3.5	1.694
29	1.5	50	1.5	4.5	2.921

3

Table 3 Variance analysis of regression equation

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	5.62	14	0.4	125.17	< 0.0001	**
A	0.03	1	0.03	9.29	0.0087	**
B	1.7	1	1.7	531.13	< 0.0001	**
C	0.007651	1	0.007651	2.38	0.1448	
D	0.00003675	1	0.00003675	0.011	0.9163	
AB	0.001681	1	0.001681	0.52	0.4811	
AC	0.00308	1	0.00308	0.96	0.3438	*
AD	0.0057	1	0.0057	1.78	0.2038	
BC	0.000576	1	0.000576	0.18	0.6782	
BD	0.1	1	0.1	31.52	< 0.0001	**
CD	0.072	1	0.072	22.39	0.0003	**
A <sup>2</sup>	0.00287	1	0.00287	0.89	0.3603	
B <sup>2</sup>	2.89	1	2.89	902.25	< 0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.013	1	0.013	3.99	0.0657	
D <sup>2</sup>	1.12	1	1.12	349.3	< 0.0001	**
残差	0.045	14	0.003208			
失拟项	0.037	10	0.003738	1.98	0.2661	
纯误差	0.007539	4	0.001885			
总离差	5.67	28				
$R^2=0.9921$		$R^2_{adj}=0.9841$		$R^2_{pred}=0.9599$		$CV=0.025$

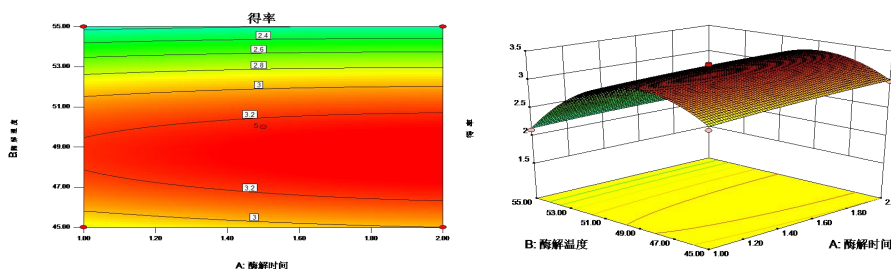
注: \*表示有显著的影响( $P<0.05$ ); \*\*表示有极显著影响( $P<0.01$ )。

Note: \* showed to have a significant impact at 0.005 level; \*\* showed to have high significant impact at 0.01 level.

该回归模型检验极为显著,  $P<0.0001$ 。失拟项  $P=0.2661$ , 说明方程的拟合性较好。 $R^2=0.9921$  说明模型相关度好。校正决定系数  $R^2_{adj}=0.9599$  说明模型能较好地反映酶解时间, 酶解温度, 酶用量, pH 与烟碱得率之间的关系。变异系数 CV 值表达的是每个平均值偏离的状况, 本实验  $CV=0.025\%<0.1\%$ , 说明实验的重复性好。从 F 值的分析结果可以看出, 在所选择的各因素水平范围内, 对烟碱得率的影响大小的顺序为:酶解温度 ( $F=531.13$ )、酶解时间( $F=9.29$ )、酶用量( $F=2.38$ ), pH 值( $F=0.011$ )。根据表 3 中 P 值可知, 一次项 A、B 对烟碱得率的影响极显著, 交互项中 AB 对烟碱得率的影响极显著, BD、CD 对烟碱得率的有显著影响, AC 对烟碱得率的影响显著, 二次项 B<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对烟碱得率有极显著影响。响应面方程极显著地表示了 Y 与 A、B、C、D 的关系<sup>[16]</sup>

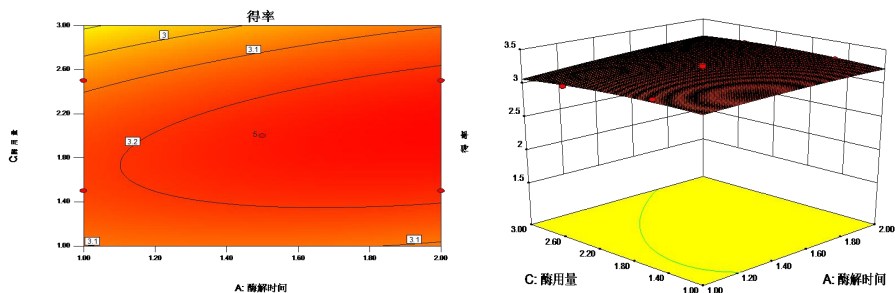
响应面是响应值对试验因子所构成三维空间曲面图, 从响应面分析图上能清楚看出最佳条件及各参数之间的交互作用。两因素交互作用对烟碱得率影响的响应曲面见图 6。A 图为等高线, B 图为其相对应的响应曲面图。利用三维图(图 6)综合反映了各变量之间的交互关系, 响应曲面图形越陡峭, 即其交互作用越显著, 图形平稳则说明交互作用比较微弱。图 6 可知, 酶用量和酶解时间交互作用最强, 酶解温度和 pH 交互作用最弱。酶解时间和酶解温度对得率的影响最为显著, 在酶解时间 1.5 h, 酶用量 2%时, 当酶解时间一定时, 烟碱得率随温度得增加先升高后降低, 当酶解温度一定时, 得率随温度的增加先快速升高再趋于平稳。

2.4

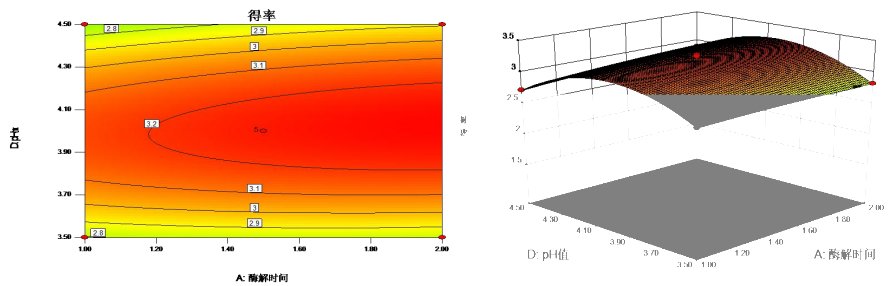


a. 酶解时间和酶解温度对烟碱得率的影响

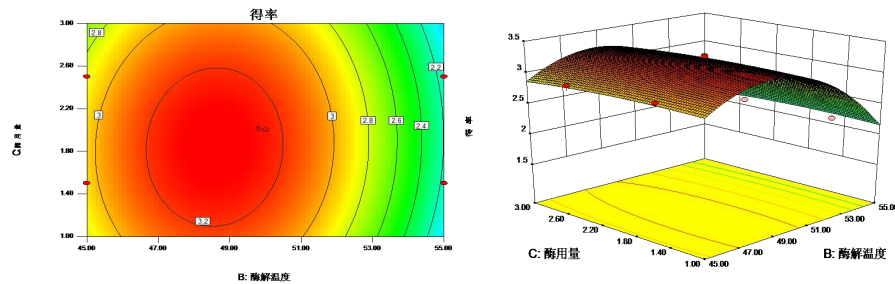
a. Effect of enzyme time and temperature on yield of Nicotine



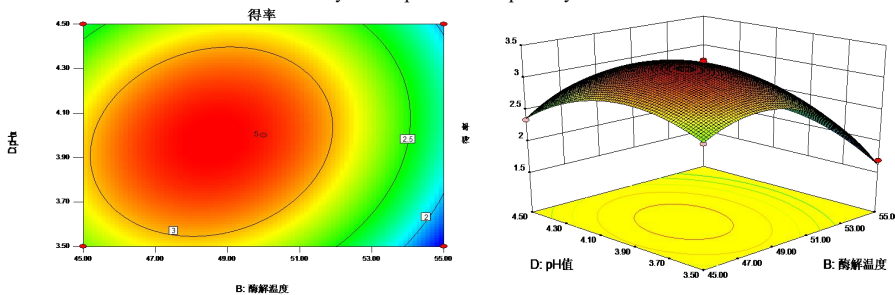
b. 酶解时间和酶用量对烟碱得率的影响  
 b. Effect of enzyme time and dosage on yield of Nicotine



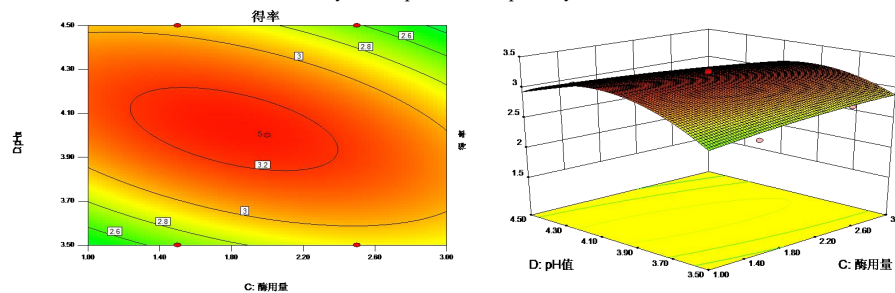
d. 酶解时间和 pH 值对烟碱得率的影响  
 d. Effect of enzyme time and pH on yield of Nicotine



e. 酶解温度和 pH 值对烟碱得率的影响  
 e. Effect of enzyme temperature and pH on yield of Nicotine



e. 酶解温度和 pH 值对烟碱得率的影响  
 e. Effect of enzyme temperature and pH on yield of Nicotine



f. 酶用量和 pH 值对烟碱得率的影响  
 f. Effect of enzyme dosage and pH on yield of Nicotine

6

Fig.6 The interactive effects of two factors on yield of Nicotine

## 3

本实验采用纤维素酶法从废弃烟叶中提取烟碱,分解纤维素时能起到生物催化作用,能降低反应的活化能,使分解作用完全高效地进行。所以本实验采用纤维素酶催化提取得到烟碱提取率高,实际应用时操作简单、反应得到产物的活性成分保存好、反应安全无毒,不会有溶剂残留的问题<sup>[17]</sup>。通过单因素实验分析和响应面法可于较准确地得出了最佳提取工艺,数据较为可靠,有良好的重复性<sup>[18]</sup>。在单因素试验的基础上,通过响应曲面分析对烟碱的提取工艺进行优化,并得到回归方程。试验首先考察了酶解时间、酶解温度、酶用量、pH等4组单因素水平对烟碱的影响,进行了响应面设计,结果表明,各影响因素对烟碱得率的影响程度大小依次为酶解温度、酶解时间、酶用量、pH。三维(3d)响应面回归方程的一个重要组成部分,可以直观地阐述了两个变量之间的交互作用,并确定最优水平,酶解温度和pH交互作用最强,酶解时间和酶用量的交互作用最弱,确定其最佳提取工艺条件并结合实际确定为得出影响烟碱的最佳提取工艺条件为:酶解时间2.00 h,酶解温度48.50 °C,酶用量2.10%,pH值为4。根据优化条件进行三组平行实验,取平均值为3.320 mg/g,与预测值相差较小。得到回归方程与实际的情况拟合较好,进一步验证了该模型的可行性。实验结果说明该回归方程可以较好预测实验结果。因此,选择响应曲面法来优化烟碱的提取工艺是可行的<sup>[18-20]</sup>。

- [1] 郑程.胆碱能抗炎通路在小鼠病毒性心肌炎中保护性作用的研究[D].温州:温州医科大学,2014
- [2] 严家川,周华东,蒋晓江,等.烟碱对阿尔茨海默病大鼠海马小胶质细胞活性的影响及意义[J].重庆医学,2007,36(24):2524-2526
- [3] 凌丽,肖雪,刘安平,等.烟碱预处理对全身炎症反应综合征大鼠血浆细胞因子的影响研究[J].实用心脑血管病杂志,2011,19(11):1871-1874
- [4] Bibeovski S, Zhou Y, McIntosh JM, *et al.* Functional nicotinic acetylcholine receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathetic neurons[J]. *J Neuroscience*, 2000,20(13):5076-5082
- [5] 魏荣宝.烟草植物在有机医药和农药中的应用[J].化学教育,2009,30(7):1-4
- [6] 马俊勃.烟草生产废弃物提取天然烟碱的工艺研究[D].上海:华东理工大学,2012
- [7] 高宏建.烟草呈香物质的提取及其提取物精制过程的设计与模拟[D].浙江:浙江大学,2012
- [8] 李豪豪,李照民,王成卓,等.废弃烟叶中有效成分提取的研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(34):83-87
- [9] 黄兰芳,胡伟,谢建伟,等.加速溶剂萃取法提取烟叶挥发性成分条件的优化[J].光谱实验室,2010,27(4):1406-1410
- [10] 明宁宁,郭俊成,刘强,等.烟草中生物碱的提取和分析方法研究进展[J].中国烟草学报,2003,13(3):64-69
- [11] Alagic S, Stancic I, Palic R, *et al.* Chemical composition of the supercritical CO<sub>2</sub> extracts of the Yaka, Prilep and Otlja tobaccos[J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2006,18(2):185-188
- [12] Liu B, Li YM, Wu SB, *et al.* Pyrolysis characteristic of tobacco stem studied by Py-GC/MS, TG-FTIR, and TG-MS[J]. *Bioresources*, 2012,8(1):220-230
- [13] 陈小东,欧阳玉祝,陈志章.单宁酸沉淀法提取废弃烟叶中的烟碱[J].中国野生植物资源,2010(5):58-59,63
- [14] 曾淼洋,童张法,韦藤幼.减压内部沸腾法提取烟草中的烟碱[J].中国烟草学报,2013(5):6-9,15
- [15] 黄飞,屈飞强,李长江,等.正交法优化微波辅助提取废弃烟叶中烟碱的工艺[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2015(2):132-135
- [16] 陈丽金.微波强化提取废次烟叶中烟碱研究[J].现代农业科技,2016(10):166-167,169
- [17] 王云洁,闫治攀,白福祖.酶法在中药提取中的应用进展[J].中国中医药信息杂志,2013,20(9):110-112
- [19] Leslie D, Millen C, Raymond MW. Countercurrent extraction of nicotine from tobacco juice[J]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 1993,32(12):3056-3060
- [20] Gupta S, Manohar CS. An improved response surface method for the determination [16] Gupta S, Manohar C S, An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures[J]. *Structural Safety*, 2004(26):123-126