

四周用胶带封好,进行扫描测定。

熊果酸薄层展开剂受温度和湿度影响较大,本

实验摸索出较为理想的展开剂系统为氯仿-丙酮-醋酸乙酯(20:2:5)。

正交试验-人工神经网络模型优化龙眼多糖的超声提取工艺

王统一^{1,2}, 赵兵^{1*}, 王玉春¹

(1. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室,北京 100080; 2. 中国科学院研究生院,北京 100049)

龙眼为无患子科植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的果实,药用价值很高,自古以来被视为珍贵补品。龙眼甘、平、无毒,主治思虑过度,劳伤心脾,健忘怔忡,虚烦不眠,自汗惊悸,具有开胃健脾,补虚益智的作用,可作为治疗病后虚弱、贫血痿黄、神经衰弱、产后血亏等症的佳品。在清除活性氧自由基、抑制脂质过氧化以及提高免疫方面,龙眼果肉提取液均具有很高的活性^[1],并且其对宫颈癌细胞的抑制率可达 90%^[2]。目前龙眼深加工仍以龙眼干为主,产品附加值较低。超声波对植物中各种成份的提取分离的强化作用主要源于其空化作用,其提取的效果与物料及体系的性质、超声波强度、作用时间等多种因素有关,因而选择适宜的提取条件有助于提高提取率和降低提取成本。

本实验利用正交试验和人工神经网络模型优化了超声强化提取龙眼多糖的条件,与传统加热提取相比显著提高了龙眼多糖的提取得率和效率,可为龙眼深加工提供参考。

1 仪器与材料

JY99—2D 超声波细胞破碎机(宁波新芝); DGG—9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海森信); QN—999 粉碎机(韩国日进精工有限公司); 08—2B 离心机(上海安亭科学仪器厂); 752 紫外光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); HF—5.0B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司)。龙眼干产于广东高州,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 超声提取工艺流程: 将一定量龙眼果肉与水混合粉碎,调节合适液固比,置于超声提取装置中进行超声强化提取。提取后将提取液进行液固分离、蒸发浓缩、加入适当体积分数乙醇沉降 24 h,液固分离,得到龙眼多糖粗品。

2.2 多糖的测定^[3]: 采用苯酚—硫酸法,取葡萄糖对照品配成 200 μg/mL 的溶液,取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 溶液,各加水补至 2 mL,然后加入 6% 苯酚试液 1 mL 和 5 mL 浓硫酸,静置 10 min 后摇匀,20 min 后于 490 nm 处测定吸光度值,以质量浓度(C)对吸光度(A)进行线性回归得到回归方程为 $C=0.125\ 455\ A-0.003\ 62$, $r=0.998\ 77$ 。待测多糖粗品溶于 100 mL 水,取 0.5 mL 稀释至 50 mL,取此稀释液 1 mL,按上法测定吸光度,根据标准曲线换算糖的质量浓度。计算多糖提取率(多糖提取率=多糖质量浓度×体积/龙眼果肉质量×100%)。

2.3 正交试验及其结果: 选用 pH 值(A)、超声功率(B)、超声作用时间(C)、占空比(D)、粒度(E)、液固比(F)、提取温度(G) 7 个因素,每个因素 3 个水平,采用 $L_{18}(3^7 \times 2^1)$ 正交表进行试验。因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素						
	A	B/W	C/min	D	E/目	F	G/C
1	2	400	10	10%	40	10	20
2	6	700	20	30%	60	20	30
3	10	1000	30	50%	80	30	40

每次称取 10 g 龙眼果肉,按液固比 10:1 加水粉碎,过 40、60、80 目筛并调节合适 pH 值,正交试验结果见表 2。

由极差 R 的大小可知因素重要性:液固比>pH 温度>占空比>时间>功率>粒度。试验 12 号条件的得率最高,条件为 pH 10,功率 300 W,30 min,占空比 30%,粒度 40 目,液固比 30,温度 20 °C。

对结果进行方差分析,粒度偏差平方(219.376)和与误差偏差平方和=195.603 相近,故把其并入误差项,分析精度提高。对结果进行方差分析,见表 3。

收稿日期:2006-04-29

作者简介:王统一(1980—),男,山东临沂人,硕士,研究方向为生物化学工程。

* 通讯作者 赵兵 Tel:(010)82627059 E-mail:bzhao@home.ipe.ac.cn

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验	A	B	C	D	E	F	G	龙眼多糖/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	3	2	2	1	2	77.907
2	2	1	1	1	1	2	1	51.562
3	3	1	2	3	3	3	3	101.744
4	1	2	2	1	2	3	1	65.111
5	2	2	3	3	1	1	3	49.304
6	3	2	1	2	3	2	2	88.697
7	1	3	1	3	1	3	2	62.226
8	2	3	2	2	3	1	1	53.448
9	3	3	3	1	2	2	3	48.300
10	1	1	1	1	3	1	3	13.800
11	2	1	2	3	2	2	2	66.491
12	3	1	3	2	1	3	1	158.951
13	1	2	3	3	3	2	1	26.847
14	2	2	1	2	2	3	3	86.689
15	3	2	2	1	1	1	2	84.180
16	1	3	2	2	1	2	3	33.496
17	2	3	3	1	3	3	2	116.798
18	3	3	1	3	2	1	1	46.544
k ₁	93.129	156.818	116.506	126.584	146.573	108.394	134.154	
k ₂	141.431	133.609	134.823	166.396	130.347	105.131	165.433	
k ₃	176.139	120.271	159.369	117.719	133.778	197.173	111.111	
R	249.029	109.643	128.589	146.032	48.677	276.126	162.966	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

离差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	5 214.137	2	2 607.069	31.412	**
B	1 026.154	2	513.077	6.182	
C	1 387.632	2	693.816	8.360	
D	2 016.541	2	1 008.270	12.148	*
E	219.376	2			
F	8 182.006	2	4 091.003	49.292	**
G	2 230.114	2	1 115.057	13.435	*
误差	414.979	5	82.996		
总平方和	20 471.564				

* P<0.05, ** P<0.01

由方差分析可以得出 pH 值和液固比对结果具有高度显著性影响, 占空比和温度对结果有显著性影响, 其他因素影响相对较小。虽然正交试验中 12 号条件的提取率最高, 但根据各因素的 k 值理想的提取条件为 pH 10, 功率 300 W, 提取时间 30 min, 占空比 30%, 粒度 40 目, 液固比 30, 温度 30℃。但這些条件需重新试验或再次安排正交试验进行验证。而人工神经网络模型只需要利用已获得的试验数据即可预测出随意条件的试验结果。

2.4 神经网络模型优化: 神经网络模型是由生物学的大脑和神经系统的启示而建立的一种信息处理的计算模型。它由接受信息的输入层、输出信息的输出层以及中间隐含层构成。其中, 后传递神经网络模型(back propagation, BP)应用最为广泛。BP 模型是指导学习下的模拟结构, 便于充分挖掘实验数据信

息, 在不用增加实验数据的基础上对结果进行预测和优化^[4]。

2.4.1 训练样本: 以表 2 正交试验数据作为样本, 将提取工艺中 7 个因素的试验条件作为样本输入(记为 In, n∈N≤7), 多糖提取率作为输出样本记为 O^[5]。

2.4.2 训练参数: 使用 BrainCom 软件(BP 结构模型), 采用 7×12×8×1 的网络结构, 即 7 个输入神经元分别代表 7 个正交试验因素, 中间隐含层分两层, 第一层 12 个节点, 第二层 8 个节点, 1 个输出神经元代表多糖提取率。

训练参数(training parameters) Momentum 0.5, learning rate 0.3, 停止条件(stopping condition) 步数(iterations) 10⁶, 公差 Tolerance% 97, “% Correct” 100。

2.4.3 网络训练结果: 步数(iterations) 174 270, Total error 0.051 6, “% Correct” 100。利用训练好的网络, 在正交试验最优的 12 号条件基础上, 按影响因素大小, 固定其他因素研究每个因素的变化对结果的影响。预测结果为: 选择 pH 10, 液固比为 40:1, 占空比 30%, 温度 40℃, 功率 400 W, 提取 30 min, 粒度 60 目, 多糖提取率为 158.698 mg/g。

在神经网络模型优化的提取条件下, 即取 10 g 龙眼果肉, pH 10, 液固比为 40:1, 占空比 30%, 温度 40℃, 功率 400 W, 提取 30 min, 粒度 60 目, 实验得到的多糖提取率为 164.848 mg/g。显然, 神经网

络预测结果与实验结果一致。

2.5 与传统提取方法比较:称取 60g 龙眼果肉,按液固比 40:1 加水粉碎,过 60 目筛,并调 pH 10,混合均匀,平分 6 份,在沸水浴下加热至不同时间。将提取液进行液固分离、蒸发浓缩、加入适当体积分数乙醇沉降 24 h,液固分离,得到龙眼多糖粗品,测多糖提取率。常规提取 90 min 时多糖提取得率达到最大 93.589 mg/g,但仍远远小于超声波提取 30min 时的得率 164.848 mg/g。可见超声提取不仅可以节省大量时间,降低提取温度,而且可以显著提高多糖的提取率。

表 4 不同提取方法的比较

Table 4 Comparison of effects on different methods of extraction

提取时间/min	龙眼多糖/(mg·g ⁻¹)
30	65.236
60	84.055
90	93.589
120	73.516
150	54.196
180	51.436
超声 30	164.848

2.6 超声提取放大试验:为了考察上述超声提取工艺的放大适应性,称取 125 g 龙眼果肉,加入 5.0 L 水粉碎,过 60 目筛,调 pH 10,倒入 HF-5.0B 循环超声提取装置内,搅拌速度 1 200 r/min,超声功率 1 500 W,占空比 30%,室温下(20℃)进行循环超声提取,分别在 15、30、45、60、75 min 取样测定多糖提取率,结果见表 5。可知 5.0 L 循环超声提取 30 min 多糖提取得率达到 101.117 mg/g,显著超过常规沸水搅拌提取 90 min 的多糖最高提取率 93.589 mg/g。同超声提取小试试验相比,物料量放大到小试的 12.5 倍后,在 5.0 L 循环超声提取装置内多糖提取得率略低,这主要与温度、提取条件未作优化等有关。但是与常规提取相比,循环超声提取能显著缩短提取时间、降低提取温度和提提高多糖提取得率,而且具有较好的放大性能,这将为实现规模化生产奠

定基础。

表 5 5 L 循环超声提取试验结果

Table 5 Results of 5L circulated ultrasonic wave extraction

超声时间/min	龙眼多糖/(mg·g ⁻¹)
15	79.538
30	101.117
45	126.458
60	144.524
75	145.528

3 讨论

在超声强化提取的过程中,多种因素可以影响其提取效果。从正交试验结果分析看,液固比和 pH 有高度显著性影响。液固比在一定范围内增大有利于溶剂主体浓度的稀释,而增加液膜两侧的浓度差,从而可以推动更多的溶质分子向溶剂中扩散而提高提取得率;在碱性环境下,植物细胞壁中的酯链更容易被打断,与细胞壁多聚糖结合的酚醛酸、糖醛酸、乙酰基也比较容易溶解,从而可以增加纤维素之间的空隙度,使细胞壁膨胀疏松,利于超声波的破碎而提高多糖得率。温度升高和粒度减小可以使颗粒扩散速度加快,并能强化超声作用的湍流作用,超声功率、作用时间及占空比则主要与超声的空化效应、机械作用以及超声发生的稳定性有关。

References:

- [1] Wu H H, Li X H, Qiu L. Studies on superoxide scavenging capability on litchi and longan fruitpulp by its polysaccharide [J]. *Food Sci* (食品科学), 2004, 25(5): 166-169.
- [2] Wang H Q, Xin D, Bai J Q, et al. The research on the anti-free-radical and immunity of the extraction from longan fruit [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 1994, 14(4): 227-228.
- [3] Zhang W J. *The Biochemical Research Technology of Glycoconjugates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1994.
- [4] Zhang J X. The application of neural networking in agricultural engineering [J]. *Transactions CSAE* (农业工程学报), 1995, 11(1): 28-34.
- [5] Jiang Y H. Optimum extracting technology of flavonoids in lotus leaves with ethanol [J]. *Transactions CSAE* (农业工程学报), 2004, 20(4): 168-171.

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和 E-mail)。