

荷叶黄酮的乙醇提取工艺优化研究

蒋益虹

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310029)

摘要: 研究了荷叶中主要生理活性物质黄酮的乙醇提取工艺。将传统的正交试验和人工神经网络方法相结合, 提出了一种新的试验数据分析、处理和优化方法, 可以充分挖掘试验信息, 定量分析因素变化规律和寻找参数最优组合。该方法应用于荷叶黄酮的提取工艺优化中, 获得了乙醇提取的优化工艺条件, 即固液比 1:30、提取温度 75℃、提取时间 1 h 和乙醇浓度 50%。该优化工艺条件, 在实际生产中应用, 不仅减少了生产成本, 降低了能耗, 而且提高了黄酮的浸提率, 取得了较好的成效。

关键词: 荷叶; 黄酮; 提取工艺; 神经网络

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)04-0168-04

0 引言

荷叶(Nelumbo Lotus)是睡莲科植物莲的叶片和叶柄,我国有十分丰富的资源,具有很好的药、食用价值。《本草纲目》视荷叶为无毒良药,其性味苦、涩、平,因含多种活性成分而具显著的药、食疗功效^[1]。因此,在1991年11月中华人民共和国卫生部的卫监发(1991)第45号文件中,荷叶被列入第二批“既是食品又是药品”的名单之中^[2]。

据研究报告,荷叶含有的丰富的黄酮类化合物,是荷叶具有生物抗氧化性、抗衰老、治疗心脑血管疾病、降血脂等多种保健功能的主要生理活性物质^[3-5]。目前,对于荷叶黄酮的提取工艺,主要采用热水浸提^[6],黄酮类化合物中黄酮甙能溶于水、乙醇、甲醇等极性溶剂,而黄酮体的甙元不溶于水,只溶于乙醇等有机溶剂,因此,采用水提法不能将荷叶中的黄酮类化合物全部提取出来,而用乙醇可以大大提高浸提率^[7]。

本文对荷叶黄酮的乙醇提取工艺进行研究,荷叶黄酮的乙醇提取工艺受到许多因素的影响,各因素间还存在着交互作用,因此,为了考虑各因素对荷叶黄酮提取影响的变化规律及交互作用,得出最大的黄酮浸提率,我们采用4因素3水平正交试验设计,得到了9组试验提取液的不同黄酮含量,并从中获取了较优的提取工艺条件。然而传统的正交试验是多因素试验的部分实施,对因素水平的要求和交互作用的考虑有一定的限制,不可避免地要混杂一些效应或者损失一些信息,不能真正获得多因素连续区域中的最优试验方案,只能获得较优的参数组合。因此,本文在正交试验基础上,提出了应用人工神经网络技术,充分挖掘试验信息,并进行仿真优化,以期获得荷叶黄酮乙醇提取的优化工艺,分析各因

素的变化规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料及设备

试验用材料取自2003年7月浙江省建德产新鲜荷叶;芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所;乙醇、磷酸、NaOH、HCl、NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaCl均为分析纯。

试验仪器和设备有:江苏省常熟市梅苑生化仪器厂生产的DDHZ-300型多用途台式恒温振荡器;上海第三分析仪器厂生产的722型分光光度计;上海第三分析仪器厂生产的精密电子天平;国华电器有限公司生产的HH-4型数显恒温水浴锅;上海雷磁仪器厂生产的pHS-25型pH计;上海海菱电器有限公司生产的HL-18型多功能食品粉碎机。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理

新鲜荷叶5 kg用含0.1% NaCl的磷酸水溶液(pH=3.0)常温浸没浸泡3 min,淋洗沥干后70℃鼓风烘干至含水率8%以下,粉碎过18目筛,用聚氯乙烯和聚乙烯的复合膜袋包装,密封于干燥泡沫箱,置于4℃冷库中贮藏备用。

1.2.2 荷叶中黄酮含量的测定

芦丁标准法。

1) 黄酮测定标准曲线的制备

取浓度为1.9 mg/mL的芦丁标准液0.05、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL分装于7支具塞试管,分别用30%的乙醇补至5 mL后混匀,各加0.3 mL 5% NaNO₂,混匀静置5 min,各加入0.3 mL 10% Al(NO₃)₃,混匀后静置6 min,各加4 mL 1 mol/L的NaOH和0.4 mL 30%的乙醇,混匀静置10 min,用722型分光光度计于波长510 nm处测定吸光度值,绘制标准曲线。所取标准液的浓度和吸光度值数据经回归处理,计算得回归方程为 $x = (y + 0.0003)/1.1056$, $r = 0.9992$,其中 x ——芦丁含量,mg/L; y ——波长510 nm处测定吸光度值。结果表明芦丁含量在0.19~0.60 mg/mL范围内与吸光度值线性关系良好。

收稿日期:2003-12-11 修订日期:2004-04-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170659);杭州市科技局资助项目(2002122A06)

作者简介:蒋益虹(1972-),女,浙江慈溪人,博士,讲师,从事食品科学与发酵工程研究。浙江杭州 浙江大学生物系统工程与食品科学学院,310029

2) 荷叶中黄酮含量的测定^[9]

称取 5 g 荷叶粉末, 放入圆底烧瓶中加入一定量一定浓度的乙醇溶液(乙醇数量和浓度由正交试验安排而定), 圆底烧瓶上接 40 cm 冷凝管, 在一定温度下, 冷凝回流浸提后过滤, 用测定标准曲线的方法处理样品, 在 722 型分光光度计上于波长 510 nm 处测定吸光度值, 对照标准曲线或代入回归方程, 得到黄酮的含量。

1.2.3 提取工艺设计

采用 L₉(4³) 正交试验设计, 考察固液比、提取温度、提取时间和乙醇浓度对提取液中黄酮含量的影响, 以确定较优黄酮提取工艺。在参考相关文献和前期试验的基础上确定了试验因素的水平, 考察因素和水平如表 1 所示。在正交试验所得较优工艺的基础上, 应用神经网络模型对试验数据进行模拟、仿真和优化, 得到优化的黄酮提取工艺条件。

表 1 荷叶黄酮提取因素及水平

Table 1 Extraction factors and levels of flavonoid in lotus leaves

水平	固液比	提取温度/°C	提取时间/h	乙醇浓度/%
1	1:20	70	1.0	50
2	1:30	80	1.5	70
3	1:40	90	2.0	90

2 结果与分析

2.1 正交试验结果与分析

以提取液中的黄酮含量为指标, 分析黄酮提取工艺的正交试验结果(见表 2)。

表 2 荷叶黄酮提取正交试验及仿真结果

Table 2 Orthogonal design and simulation results of flavonoid extraction in lotus leaves

序号	A (固液比)	B (提取温度/°C)	C (提取时间/h)	D (乙醇浓度/%)	黄酮含量实测值/%	黄酮含量仿真值/%
1	1(1:20)	1(70)	1(1.0)	1(50)	1.4033	1.4031
2	1(1:20)	2(80)	2(1.5)	2(70)	1.3988	1.3979
3	1(1:20)	3(90)	3(2.0)	3(90)	1.3762	1.3765
4	2(1:30)	1(70)	2(1.5)	3(90)	1.3038	1.3092
5	2(1:30)	2(80)	3(2.0)	1(50)	1.4169	1.4170
6	2(1:30)	3(90)	1(1.0)	2(70)	1.5073	1.5081
7	3(1:40)	1(70)	3(2.0)	2(70)	1.4078	1.4078
8	3(1:40)	2(80)	1(1.0)	3(90)	1.4124	1.4123
9	3(1:40)	3(90)	2(1.5)	1(50)	1.5526	1.5466
K ₁	1.3928	1.3716	1.441	1.4576		
K ₂	1.4093	1.4094	1.4184	1.438		
K ₃	1.4576	1.4787	1.4003	1.3641		
R	0.0648	0.1071	0.0407	0.0935		
因素主次	B	D	A	C		

注: K₁、K₂和 K₃ 分别指各因素在 1、2 和 3 水平的黄酮含量之和; R 指各因素的极差。

从表 2 的极差分析结果可以得出: 影响荷叶黄酮提取效果各因素的主次顺序为 B (提取温度)、D (乙醇浓度)、A (固液比) 和 C (提取时间)。本试验以提取液中黄酮含量越高越好, 故同时可得出较优试验组合为

B₃D₁A₃C₁, 即固液比为 1:40, 提取温度为 90 °C, 提取时间为 1 h, 乙醇浓度为 50%。

2.2 最优黄酮提取工艺的确定

2.2.1 人工神经网络模型的应用

人工神经网络与传统正交试验方法相结合, 通过对正交试验结果进行建模和分析, 可以充分挖掘试验信息, 变离散数据为连续数据, 方便地进行仿真、评估和优化, 并能对各主要因素的变化进行敏感性仿真分析, 模拟仿真各因素的变化规律和趋势, 获得多因素连续区域中的最优组合, 同时也为分析各因素的变化规律和因素间的交互作用提供定量化的分析方法。因而, 该方法的特点是既不需要增加试验次数(采用正交回归设计和正交旋转设计需要做大量的试验), 又能定量分析因素变化规律和寻找参数最优组合。

取正交试验中固液比、提取温度、提取时间、乙醇浓度数据作为样本, 数据见表 2。将提取工艺中 4 个因素(即 x_1, x_2, x_3, x_4) 的 9 个试验值(记为 k) 作为样本输入, 即 $(x_{1k}, x_{2k}, x_{3k}, x_{4k})$ 为第 k 个输入样本。将第 k 次试验得到的黄酮含量作为第 k 个输入样本对应的教师, 即 $(x_{11}, x_{21}, x_{31}, x_{41})$ 为第 1 个样本; $(x_{12}, x_{22}, x_{32}, x_{42})$ 为第 2 个样本, ..., $(x_{19}, x_{29}, x_{39}, x_{49})$ 为第 9 个样本, 对应的教师为 t_1, t_2, \dots, t_9 。

取精度 $\epsilon = 0.00001$, 输入层节点数为 4, 隐含层取 4 个节点, 输出层一个节点, 建立 BP 神经网络模型^[10], 用 Visual Basic 编制程序在 586 微机上传代 50643 次后, 得到输出值。数据仿真计算值与实际值相比, 误差都小于 1% (见表 2)。

2.2.2 对主要因素进行仿真和优化分析

在正交试验所获得的较优工艺的基础上, 改变一种影响因素值, 固定其他三种影响因素值, 应用所建立的神经网络模型进行模拟^[11], 结果如图 1~4 所示。

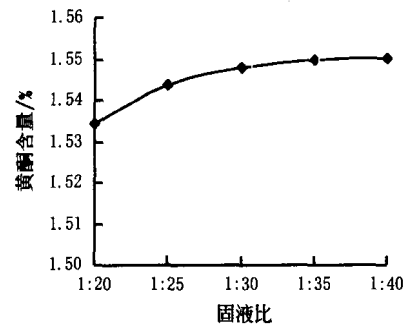


图 1 固液比变化对黄酮含量的影响

Table 1 Effects of different solid-liquid ratios on flavonoid contents

从图 1 的曲线走势可以看出, 在一定范围内, 随着固液比的提高, 荷叶黄酮的提取效果也逐步提高, 但当固液比达到 1:30 之后, 随着固液比的提高, 荷叶黄酮提取效果的提高已不是很明显, 考虑到提取工艺成本, 取 1:30 为荷叶黄酮提取的最佳固液比。从图 2 可以看出, 在一定的范围内, 提取温度越高, 黄酮提取效果就越好, 但是当温度达到 75 °C 以上时, 提取效果的变化就不

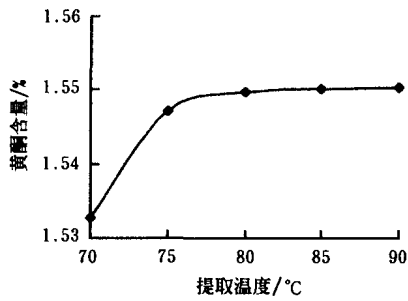


图2 提取温度变化对黄酮含量的影响

Table 2 Effects of different extracting temperatures on flavonoid contents

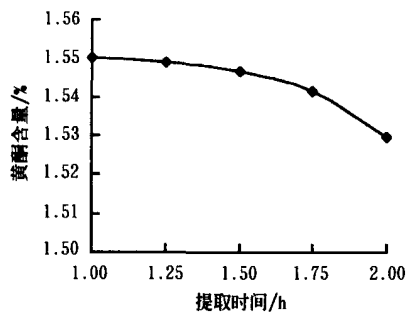


图3 提取时间变化对黄酮含量的影响

Table 3 Effects of different extracting time on flavonoid contents

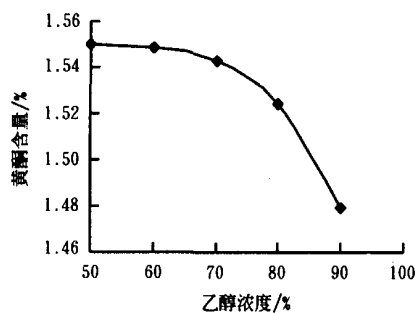


图4 乙醇浓度变化对黄酮含量的影响

Table 4 Effects of different ethanol concentrations on flavonoid contents

太明显,考虑到提取工艺成本等原因,因此最终确定提取温度为75℃。从图3可以看出,在一定时间范围内,提取时间对黄酮提取效果影响不大,总体趋势是随着时间的增加反而降低,致使这一现象的可能原因是随着时间的推移有些在乙醇溶液中对热不稳定的黄酮类物质分解或转化,引起黄酮含量反而降低。因此,最终确定提取时间为1 h。从图4可以看出,乙醇浓度在50%时达到最佳提取效果,随着浓度的增加提取效果反而降低,由于黄酮是一大类物质,部分是水溶性的,部分是醇溶性的^[7],由图可以看出在乙醇浓度达到50%的时候,提取出来的黄酮量最多,因此,最后确定最佳提取乙醇浓度为50%。从以上分析可知,荷叶黄酮提取的优化工艺条件是:固液比1:30,提取温度75℃,提取时间1 h,乙

醇浓度50%。

2.2.3 优化结果的试验验证

经试验验证,应用优化得到的最优工艺条件提取,测得的黄酮含量为1.5537%。而按正交试验得出的较优试验组合B₃D₁A₃C₁,测得的黄酮含量为1.5526%。说明采用优化工艺条件获得了黄酮含量高于正交试验各组合,且在实际生产中可以节省成本,降低能耗,取得了较好的效果。

3 结论

1) 研究了采用乙醇提取荷叶黄酮的方法和工艺,正交试验结果得出,影响荷叶黄酮提取效果各因素的主次顺序为提取温度、乙醇浓度、固液比和提取时间。

2) 人工神经网络和传统的正交试验相结合,充分挖掘试验数据的信息,建立神经网络模型,通过仿真、评估和优化,结合生产实际,获得了优化的提取工艺为:固液比1:30,提取温度75℃,提取时间1 h,乙醇浓度50%。

3) 从模型的仿真结果看,预测精度高,相对误差均小于1%,并经试验验证,应用优化工艺提取的黄酮含量高于正交试验得出的较佳组合,且节省了成本,降低了能耗。表明将人工神经网络与传统正交试验方法相结合提出的新的试验设计和数据处理方法是可行的,实现了既不需要增加试验次数,又能定量分析因素变化规律和寻找参数最优组合,为各影响因素的定量分析和植物中有效成分的提取工艺试验分析提供了一种新的途径。

[参考文献]

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 1899.
- [2] 陶波, 陈慕英, 等. 荷叶药用研究概况[J]. 中医药信息, 2001, 18(2): 4.
- [3] Cao G H, Emin Sofic. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids structure-activity relationships[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1997, 22(5): 749.
- [4] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 173-177.
- [5] 彭芳. 黄酮类化合物的生物学作用[J]. 大理医学院学报, 1998, 7(4): 52-54.
- [6] 陈海光, 余以刚, 曾庆孝, 等. 荷叶功能成分的提取研究[J]. 食品与机械, 2001, 5: 16-17.
- [7] 刘成梅, 游海. 天然产物有效成分的分离与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 170-237.
- [8] 张际先. 神经网络在农业工程中的应用[J]. 农业工程学报, 1995, 11(1): 28-34.
- [9] 丁利群, 吴振辉, 蔡创海. 槐花中黄酮类物质提取工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 141-144.
- [10] 蒋德云, 张弓. 谷物识别中对神经网络的优化[J]. 农业工程学报, 2002, 18(5): 231-234.
- [11] Lacher R C. Back-propagation learning in expert networks[J]. IEEE Transaction on Neural Networks, 1992, 3(1): 62-72.

Optimum extracting technology of flavonoids in lotus leaves with ethanol

Jiang Yihong

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The extracting technology of flavonoids in lotus leaves with ethanol was studied. Combined artificial neural network (ANN) with traditional orthogonal design, a new method of test data analyzing, processing and optimizing was put forward. With this method the test information can be fully used, the change regularity of each factor can be analysed and the optimum combination can be found. By using this new method, the optimum extraction condition was obtained as follows: extracting temperature 75 °C, ethanol concentration 50%, ratio of solid-liquid 1:30 and extracting time 1 h. Applying this extracting technology, the costs of production was reduced, the energy consuming was decreased, and the flavonoid content was increased. The results show that this new method is reasonable and practicable.

Key words: lotus leaf; flavonoids; extracting technology; artificial neural network