

藤茶水溶性多糖及总黄酮的提取工艺研究

罗祖友^{1,2}, 杨晓萍¹, 吴谋成¹

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070

2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘 要: 研究了从藤茶中提取水溶性多糖以及综合提取多糖与总黄酮的工艺。中心组合设计及响应面分析得到较优的水溶性多糖提取工艺参数为温度 95℃, 水料比 25:1, 时间 4h; 以 3 倍体积的 95% 工业乙醇沉淀该水溶性多糖并静置 2h 的效果较好。初步确定了可行的水溶性多糖与总黄酮综合提取工艺路线。

关键词: 藤茶; 水溶性多糖; 总黄酮; 提取; 响应面分析

Studies on the Extraction of Water-soluble Polysaccharides and Total Flavone from *Ampelopsis grossedentata*

LUO Zu-you^{1,2}, YANG Xiao-ping¹, WU Mou-cheng¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Department of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: This paper studied the extraction technique of water-soluble polysaccharides and total flavone from *Ampelopsis grossedentata*. The optimal technical conditions of extraction of the polysaccharides were obtained by central composite design and response surface analysis as follows: extraction temperature 95℃, ratio of solid-liquid 1:25 and extraction time 4h. The polysaccharides were precipitated with 3 times volume of 95% ethanol for 2h. The synthetic extracting technique of water-soluble polysaccharides and total flavone from *Ampelopsis grossedentata* has been fixed tentatively.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; polysaccharides; total flavone; extraction; RSA

中图分类号 TS272

文献标识码 B

文章编号 1002-6630(2005)05-0156-05

藤茶, 又称山甜茶, 系葡萄科蛇葡萄属植物, 学名显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang, 多呈野生状态分布于我国湖南、湖北西部、贵州、广西等地^[1]。藤茶可全株药用, 其味甘淡, 性凉, 具有清热解毒、抗菌消炎祛风湿、降血压、保肝等功效, 我国民间常采集其嫩茎叶, 经加工揉制、干燥, 制成保健茶饮用, 至今已有数百年的历史。藤茶中主要含有二氢杨梅素、杨梅素等黄酮类成分以及碳水化合物、蛋白质、矿物质等成分^[2]。近年来, 关于藤茶中黄酮类成分特别是二氢杨梅素的分离鉴定及其功能作用的研究报道较多^[3~6], 而对藤茶多糖的研究尚未见报道。为探讨藤茶多糖的理化性质及生物活性, 本文首先对藤茶水溶性多糖的提取以及多糖与总黄酮的综

合提取工艺进行研究, 旨在为藤茶的综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 原料

鄂西产藤茶(保健茶成品), 由鄂西藤茶公司藤茶研究所鉴定为 *Ampelopsis grossedentata*。经粉碎并过 20 目筛得藤茶粗粉, 密封备用。

1.2 主要试剂与设备

工业乙醇(95%以上), 浓硫酸、葡萄糖、苯酚、氯仿、正丁醇等均为 A R 级。

植物组织粉碎机、电热恒温水浴锅、离心机、真空浓缩器, UV-VIS 分光光度计等。

收稿日期: 2004-05-08

基金项目: 湖北省“十五”重点科技攻关项目(2001AA204A03)

作者简介: 罗祖友(1963-), 女, 副教授, 博士生, 研究方向为天然产物与功能食品化学。

1.3 方法

1.3.1 多糖的基本提取步骤

准确称取适量藤茶粗粉(取样少,略去石油醚回流脱脂脱色一步),按一定水料比加入蒸馏水,在一定温度的水浴中热浸提一定时间,稍加冷却后过滤,滤液定容至250ml,从中吸取10ml,加入3倍体积的工业乙醇混匀后静置2h,离心(5000r/min, 20min),倾出上清液,用适量乙醇洗涤沉淀2次,挥干乙醇,用蒸馏水溶解沉淀并定容至100ml,即为多糖粗提液。

1.3.2 多糖含量的测定与提取效果的两种表示方法

苯酚-硫酸法测定多糖含量^[7]。

多糖得率表示方法1:以葡萄糖制作标准曲线,回归方程为 $A_{490}=0.0235X+0.0039$, $r=0.9995$ 。测定多糖粗提液中多糖含量后,换算成原料多糖得率,用以表示少量原料的多糖提取效果。计算公式为

$$\text{多糖得率}(\%)=(X \times a \times 0.9 \times 10^{-4})/W$$

X—由粗提液吸光度据标准曲线回归方程求得的糖含量(μg);

a—取样体积倍数;

W—原料重(g);

0.9—葡萄糖对多糖的换算系数;

10^{-4} —重量单位换算系数。

多糖得率表示方法2:在确定水溶性多糖的基本提取条件后,扩大提取原料用量进行其它相关因素试验时,直接以干燥的粗多糖重量换算成粗多糖得率表示多糖提取效果。

1.3.3 浸提多糖的单因素试验

分别以不同的温度、料液比、浸提时间及提取次数作单因素,考察各单因素对多糖得率的影响。

1.3.4 浸提多糖的中心组合试验

在单因素试验基础上,确定中心组合设计(central composite design, CCD)的自变量,以多糖得率为响应值通过响应曲面分析(response surface analysis, RSA)进行提取条件的优化。

1.3.5 沉淀多糖的乙醇用量及沉淀时间对粗多糖得率的试验

经以上试验确定基本提取条件后,以较大量的原料粗粉热水浸提2次,合并提取滤液并浓缩到小体积后,平均分成若干份,分别加入不同体积倍数的工业乙醇,沉淀24h,离心收集沉淀并干燥称重得粗多糖,考察乙醇用量对粗多糖得率的影响。

同样以较大量的原料粗粉热水浸提2次,合并提取滤液并浓缩到小体积后,平均分成若干份,各加入3倍体积的工业乙醇,分别沉淀不同的时间,离心收集沉淀并干燥称重得粗多糖,考察沉淀时间对粗多糖得率的影响。

$$\text{粗多糖得率}(\%)=(M \times b \times 100)/W$$

M—粗多糖干重(g);

b—平均分成的总份数;

W—原料重(g)。

1.3.6 藤茶多糖与总黄酮的综合提取

单独提取藤茶总黄酮可用水煎煮浸提或用醇提法并弃除残渣^{[2,3][8]},分离黄酮后,前者的溶液部分以及后者的残渣均可继续提取多糖。根据藤茶总黄酮的溶解特性,本文通过以下工艺比较醇提黄酮再水提多糖(路线1)和同时热水浸提黄酮与多糖(路线2)两条工艺路线的总黄酮、粗多糖得率,以比较两条综合提取工艺路线的优劣。

路线1:藤茶粗粉按1:3料液比加入石油醚回流2次,1h/次,残渣以1:3料液比加95%乙醇回流提取2次,1h/次,合并醇提液,除去乙醇,加适量蒸馏水加热溶解并趁热过滤,滤液冷却析出晶体,离心,收集沉淀,再复溶析晶一次,干燥得总黄酮粗粉,按原料重计算得率。

收集醇提后的残渣,挥干乙醇后,按1:30料液比加入蒸馏水于95℃水浴提取多糖2次,1h/次,收集滤液并浓缩为小体积,加入3倍体积的工业乙醇混匀后静置24h,离心收集沉淀并以无水乙醇洗涤沉淀2次,干燥得粗多糖,按原料重计算得率。

路线2:藤茶粗粉按1:3料液比加入石油醚加回流2次,1h/次。残渣按1:30料液比加入蒸馏水于95℃水浴浸提2次,1h/次。趁热过滤,浓缩滤液为小体积后、冷却低温放置2~3d,充分析出晶体。离心并收集沉淀(同路线1),得到总黄酮粗粉。

对离心后的上清液加入3倍体积的工业乙醇,混匀后静置24h(同路线1),得粗多糖。

2 结果与分析

2.1 浸提单因素对水溶性多糖得率的影响

2.1.1 浸提时间的影响

设定提取温度90℃,水料比20:1,提取1次,不同浸提时间的水溶性多糖得率如图1所示。随提取时间的延长而得率增加,但总的来看增加幅度不大。

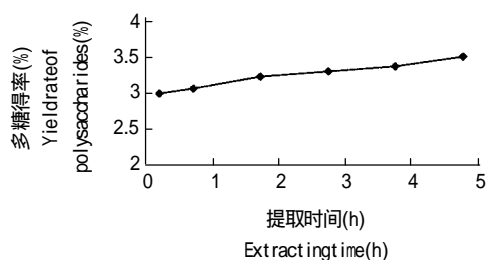


图1 浸提时间对水溶性多糖得率的影响

Fig.1 Effect of extracting time on the yield rate of water-soluble polysaccharides

2.1.2 水料比的影响

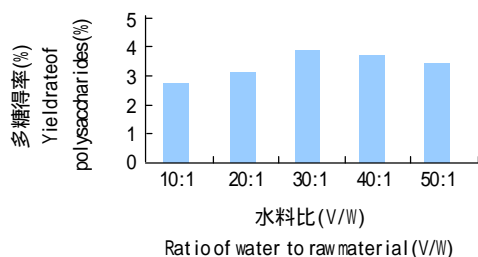


图2 水料比对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of the ratio of water to raw material on the yield rate of water-soluble polysaccharides

图2所示,固定提取温度90℃,浸提时间为2h,提取1次,水溶性多糖得率最初随水料比的增加而提高,30:1时达到最高,而后有所下降,可能与同一水浴加热时水料比大者升温慢有关。

2.1.3 温度的影响

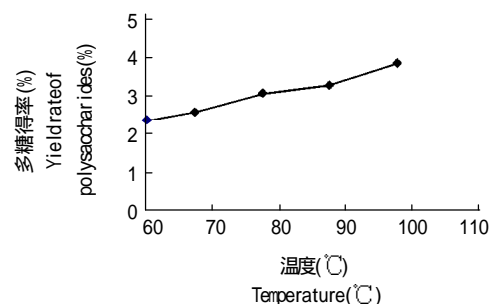


图3 温度对水溶性多糖得率的影响

Fig.3 Effect of extracting temperature on the yield rate of water-soluble polysaccharides

固定水料比30:1,浸提时间为2h,提取1次,不同温度下的多糖得率如图3所示。水溶性多糖得率随温度的上升而逐渐增加,并且在设定的温度范围内,相邻两温度间的得率相差不大,但间隔20~30℃的处理间多糖得率差异明显。出于对常规提取时温度的可控性考虑,未对100℃以上的温度进行实验。

2.1.4 提取次数对多糖提取率的影响

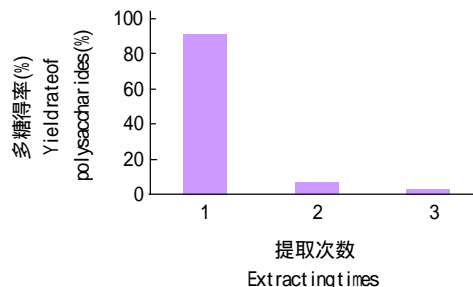


图4 提取次数对水溶性多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of extracting times on the extracting rate of water-soluble polysaccharides

设定提取温度90℃,水料比30:1,提取时间2h,少量原料提取3次,分别测定每次提取的多糖含量。如图4所示,若以3次提取总量合为100%提取率,第1次提取率为91.04%,第1、2次提取率之和达到97%以上。所以在优化其它因素以后,选择提取2次为宜,既减少后期浓缩的困难,又节省能耗。

2.2 中心组合试验结果与回归方程的拟合

参考单因素试验结果,以温度、料液比和浸提时间作主要因素,中心组合设计(CCD)参照文献方法^[9],因素与水平配制如表1。为避开二次提取时残渣转移的损失所带来的影响,每个组合仍以提取1次的多糖得率计算。

表1 中心组合设计的因素与水平表

Table 1 Factors and levels table of central composite design (CCD)

因素与水平	温度 X_1 (°C)	水料比 X_2	浸提时间 X_3 (h)
-1	65	15:1	1.0
0	80	25:1	2.5
+1	95	35:1	4.0

中心组合试验方案及结果如表2所示。以水溶性多糖得率为响应值(Y),通过SAS软件的RSREG程序对实验资料进行响应面分析(RSA),经二次回归拟合后求得响应函数,即回归方程为

$$Y = 3.40667 + 0.41750X_1 + 0.01750X_2 + 0.38000X_3 - 0.18083X_1^2 - 0.26583X_2^2 + 0.10417X_3^2 - 0.09000X_1X_2 + 0.07500X_1X_3 - 0.22000X_2X_3$$

其决定系数 R^2 为0.9322,试验值与预测值非常接近。

方差分析(表3)表明,以上回归方程较好地拟合了试验数据。

回归方程中二次项 X_1^2 、 X_2^2 的系数为负值,而 X_3^2 的系数为正,说明响应曲面为鞍型反应面,极值点可

表2 中心组合试验方案与结果
Table 2 Experimental design and results of the CCD

试验号	X_1	X_2	X_3	多糖得率Y(%)	Y 预测值(%)
1	-1	-1	0	2.53	2.62
2	-1	0	-1	2.57	2.60
3	-1	0	1	3.02	3.21
4	-1	1	0	2.79	2.65
5	0	-1	-1	2.57	2.63
6	0	-1	1	3.93	3.83
7	0	1	-1	3.00	3.10
8	0	1	1	3.48	3.42
9	1	-1	0	3.31	3.27
10	1	0	-1	3.49	3.29
11	1	0	1	4.24	4.20
12	1	1	0	3.21	3.31
13	0	0	0	3.39	3.41
14	0	0	0	3.60	3.41
15	0	0	0	3.23	3.41

注: $X_1=(X_1-80)/15$; $X_2=(X_2-25)/10$; $X_3=(X_3-2.5)/1.5$ 。

表3 回归方程的方差分析
Table 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	自由度	平方和	F 值	显著水平
总回归	9	3.2262	7.64	0.0187
一次项	3	2.5521	18.13	0.0041
二次项	3	0.4256	3.02	0.1323
交互项	3	0.2485	1.77	0.2697
失拟项	3	0.1657	1.60	0.4063
误差项	2	0.0689		
总误差	5			

能不只一个^[10]; SAS 程序分析也表明其稳定点为鞍点(saddle point), 预测值为3.27%, 该点并非极值点。为求得方程模型的极值点, 进一步进行岭脊分析(ridge analysis)可知提取时间越长、温度越高, 则多糖得率愈高。当确定时间 X_3 为1时, 对方程模型求偏导得温度(X_1)为1.5206, 水料比(X_2)为-0.6383, 转换为实际水平组合为102.8℃、18.6:1水料比、提取4h, 水溶性多糖得率计算值为4.33%。但由于该温度超出本试验取值范围, 并考虑到常规提取中温度的可控性, 放弃此点而确定本试验中的第11组合(X_1 为1, X_2 为0, X_3 为1)作

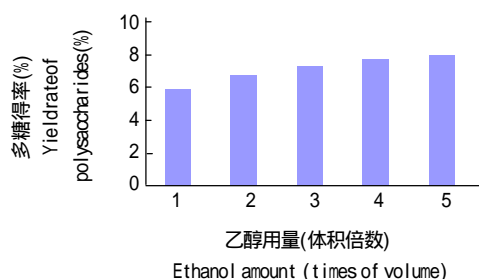


图5 乙醇用量对粗多糖得率的影响

Fig.5 Effect of ethanol amount on the yield rate of crude polysaccharides

为较优的提取条件, 即95℃、25:1水料比、提取4h, 提取一次水溶性多糖得率计算值和试验值分别为4.20%、4.24%, 与求偏导得到的极值点计算值(4.33%)接近。

2.3 乙醇用量及沉淀时间对粗多糖得率的影响

图5显示, 随乙醇用量的增加, 水溶性粗多糖得率增加。加入3倍体积的乙醇, 粗多糖得率约7.3%, 以后再增加乙醇用量, 粗多糖得率增加不多。有资料表明, 达到一定用量后再随之增加的粗多糖中实际上增加的多糖较少, 且以杂质增加居多^[11], 同时考虑成本及固液分离的工作量, 选定以3倍体积的乙醇用量为宜。

加入乙醇后, 不同静置时间对粗多糖得率的影响结果见图6。沉淀2~24h的粗多糖得率在7.2%~7.4%之间, 各处理间差异不明显, 甚至6h以后随着时间的延长, 粗多糖得率有下降的趋势。本试验选择沉淀2h, 还可提高工作效率。

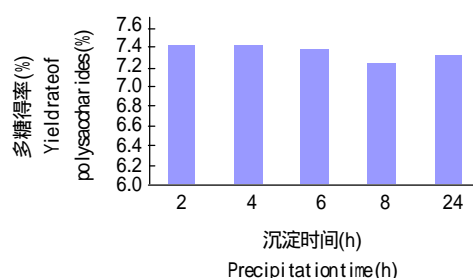


图6 沉淀时间对粗多糖得率的影响

Fig.6 Effect of precipitation time on the yield rate of crude polysaccharides

2.4 总黄酮与粗多糖综合提取得率

两条综合提取工艺路线的总黄酮与粗多糖得率如图7所示。

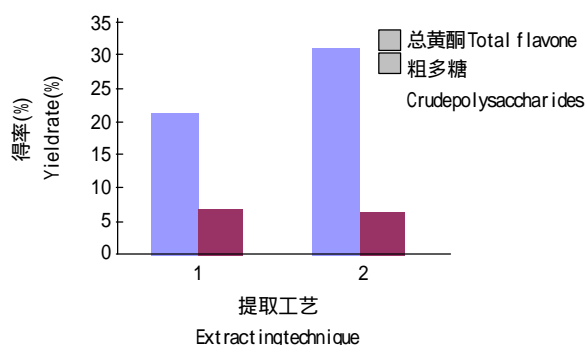


图7 提取工艺对总黄酮与粗多糖得率的影响

Fig.7 Effect of extracting techniques on the yield rate of total flavone and crude polysaccharides

本试验结果显示, 二条路线的粗多糖得率接近, 分别为6.70%和6.63%; 而总黄酮粗粉得率则以路线2

(31.10%)明显高于路线1(21.30%),可能与本试验中醇提黄酮不充分以及总黄酮在以醇为提取介质和水作提取介质的浸出效果不同有关。实际提取过程中,路线1在水提多糖的同时又获得了得率为6.05%的黄酮粗粉,加上醇提部分共计总黄酮粗粉得率为27.35%,仍明显低于路线2的得率。考虑同时水提总黄酮与粗多糖的低成本优势,以及提高工效,工艺路线2较适合藤茶总黄酮与粗多糖的综合提取,尤其适宜规模化生产。

3 结 论

3.1 温度、时间和水料比是影响藤茶水溶性多糖提取的主要因素。中心组合试验及响应面分析确定藤茶水溶性多糖较优的常规提取条件为温度95℃、25:1水料比、提取4h,一次提取多糖得率为4.20%左右(以多糖含量表示)。再提取一次,两次提取率可达97%。以提取液3倍体积的95%工业乙醇沉淀多糖,静置2h,粗多糖得率较高(以粗品重量表示,2次提取可达7.4%左右),工效快。

3.2 初步确定可行的藤茶水溶性多糖与总黄酮的综合提取工艺路线为:藤茶粗粉→石油醚脱脂脱色→热水浴浸提→滤液浓缩与静置→分离总黄酮→沉淀多糖→分离粗多糖。在本工艺条件下,提取两次的总黄酮粗粉和粗多糖得率分别达到31%和6.6%以上(以粗品重量表示)。本工艺路线成本低、工效快,适合规模化生产。

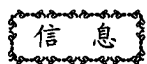
有资料表明,藤茶总黄酮的含量可达38%甚至40%^{[2][4]},本试验中总黄酮得率低于文献报道值,可能与原料来源、提取及分析方法不同有关。综合提取的

水溶性多糖与总黄酮粗品得率低于二者独立提取值,尚需对综合提取工艺参数作进一步优化。

有关藤茶水溶性多糖的分离纯化与生物活性研究正在进行中。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(二册)补编[M]. 北京: 科学出版社, 1983. 349-356.
- [2] 张友胜, 杨伟丽, 熊皓平. 显齿蛇葡萄部分营养及功能成分研究[J]. 食品科学, 2001, 22(9): 75-77.
- [3] 覃洁萍, 许学健, 董明姣. 广西藤茶中黄酮类成份的提取工艺研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(3): 196-197.
- [4] 何桂霞, 裴刚, 周天达, 等. 显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 423-425.
- [5] 何桂霞, 裴刚, 周天达, 等. 瑶族藤茶中杨梅树皮素的分离与结构鉴定[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(4): 6-7.
- [6] ZHANG You-sheng, NING Zheng-xiang, YANG Shu-zhen, et al. Antioxidation properties and mechanism of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2003, 38(4): 241-244.
- [7] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉大学出版社, 1998.
- [8] 林淑英, 张友胜, 叶洪清, 等. 二氢杨梅素在猪油体系中的抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2003, (4): 71-73.
- [9] 葛毅强, 孙爱东, 倪元颖, 等. 麦胚中天然维生素E的SFE—CO₂最佳提取工艺的研究[J]. 中国油脂, 2001, 26(5): 52-56.
- [10] 刘魁英. 食品研究与资料分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 125.
- [11] 孙培龙, 杨开, 赵培城, 等. 姬松茸子实体多糖提取方法的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 71-76.



美国正在利用菠菜制造抗炭疽和流感的疫苗

目前, 位于美国费城的整合生物制药公司的分子生物学家们正在利用菠菜来制造抗炭疽和流感的疫苗。据了解, 新的疫苗比传统用动物原料制造的疫苗价格低廉, 生产周期更快。一些生物学家认为用植物培养疫苗是不可能的。但整合生物制药公司发现了利用菠菜以及矮牵牛花等培养导致流感等疾病的普通人类病原体的方法。公司科研人员把这些切碎的、经过灭活的病原体注入哺乳动物体内, 它们便获得了免疫能力。目前, 在对老鼠进行的试验中, 研究者发现植物蛋白的作用同传统疫苗的作用一样有效。整合生物制药公司总裁、生物化学家厄恩·阿达尔斯泰因松说: “现在我们必须对这些物质进行提纯, 并将其运用到药物中。但主要目的是打算让技术达到让消费者可以吃这些菠菜的程度。”由于产生于动物的疫苗(通常在鸡蛋中培养)的制造过程非常耗时, 且容易变质, 因此, 医药公司不可能大量无限期地储备疫苗。这就使得公众有可能面临疫苗短缺的问题, 容易受到疫情突然暴发或生物恐怖袭击的危害。