

不同提取条件 对显齿蛇葡萄总黄酮浸提率的影响

李忠海, 张晓晓, 孙昌波, 钟海雁

中南林业科技大学绿色食品研究所, 湖南长沙 410004)

摘要 以水溶性活性成分总黄酮和水浸提率作为衡量浸提效果的评价指标, 分别采用单因素和正交实验 $L_9(3^4)$ 确定了茶水比、浸提温度、浸提时间和样叶粒度对显齿蛇葡萄总黄酮和水浸提率的影响, 得出了影响的主次顺序为茶水比、浸提温度、样叶粒度和浸提时间。并结合生产实际提出了茶汤浸提的最佳提取条件为: 茶水比为 1:20、浸提时间为 20min、浸提温度为 90℃。最优浸提条件下的浸提次数实验表明, 该茶易冲泡, 总黄酮和水浸提率的第一次浸出率达 75.87% 和 80.56%。

关键词 显齿蛇葡萄, 黄酮类, 浸提, 水浸提率

Abstract: The effects of the ratio of water and the sample (A), extracting temperature (B), extracting time (C), and the sample particle size (D) on water-soluble active ingredients of *Ampelopsis grossedentata* were investigated with single factor and orthogonal experiments as a measure of total flavones and water extraction ratio. The orthogonal experiments revealed that the influences of four factors on total flavones and water extraction ratio were in the order of A, B, D, and C. According to the practical processing, the excellent method for extraction was modified to $A_2B_2C_1D_1$, that is to say, water and the sample is 1:20, the extracting time is 20min, the extracting temperature is 90℃. The extracting times indicated that *Ampelopsis grossedentata* was perdurable to dunk and the water extraction ratio was very high under the optimum extracting conditions. The total flavones and water extraction ratio attained to 75.87% and 80.56% at the first time, respectively.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; flavone; extraction; water extraction ratio

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306 (2006)12-0107-04

收稿日期: 2006-05-15

作者简介: 李忠海 (1960-), 男, 教授, 博士, 主要从事森林食物资源的开发利用研究。

基金项目: 湖南省科技计划重点项目 (5NK2009)。

茅岩莓又称野藤茶、白茶、白茶饼, 属葡萄科, 蛇葡萄属, 学名为显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*), 属多年生藤本植物, 是一种名贵珍稀的类茶植物^[1,2]。经茶史药典多方专家追史溯源考证, 茶圣陆羽在其第一部茶经里就将茅岩莓归为新梢枝性状的藤茶类。它是茶叶王国里的瑰宝, 药效性能很强的茶之奇葩。自古以来, 产地群众将其嫩叶制成保健茶, 属于民间代用茶, 用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、黄疸型肝炎、疮疖等疾病, 已有数百年应用历史^[3,4]。近年医学实验表明, 其中粗提物具抗血小板聚集和血栓的形成、降血脂和抗氧化、杀菌等作用^[5-7]。其味甘淡、性凉, 夏天泡茶多日不馊, 有神茶之称, 既可深加工为抗心律失常、抗心肌缺血、抗高血压的新型药物, 又可粗加工为食品抗菌防腐添加剂、新型类茶风味饮料等。茶汤制备与水的质量、茶叶的选择、冲泡的方法以及抽提的形式都有关系, 直接影响到茶汁的浸出率, 如何有效的保持其应有的色、香、味, 同时减少其有效成分在茶汤制备过程中的损失, 是茶汤制备的关键。而显齿蛇葡萄茶是一种水热溶性的代用茶, 其中含有丰富的可溶性生物活性成分。本文旨在讨论茶水比、浸提温度、浸提时间、样品粒度、浸提次数等因素对总黄酮和水浸提率的影响, 从而筛选出显齿蛇葡萄茶汤的最佳浸提条件, 为更有效的利用这种野生植物资源和工业浸提提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验所用显齿蛇葡萄 采自湖南省张家界, 样品粉碎研磨后, 贮存于塑料袋中备用; 三氯化铝 分析纯。

UV-700 紫外分光光度计 上海; 电热恒温水浴锅 北京。

1.2 实验方法

1.2.1 总黄酮的测定 采用三氯化铝比色法测定样品浸出液的总黄酮^[8]。

1.2.2 水浸提率的测定 水浸提率是指显齿蛇葡萄样液中可溶性固形物浸出百分率,主要是水溶性黄酮、水溶性蛋白质、氨基酸、果胶、有机酸、糖和水溶性矿质元素等。本研究采用重量法测定水浸提率。取滤液 2.00mL 于 5mL 称量瓶中,置烘箱中,在 105℃干燥至恒重,按下式计算水浸提率:

$$\text{水浸提率}(\%) = \frac{W_1 \times \frac{V_{\text{总}}}{V}}{W} \times 100\%$$

式中 W_1 : 干燥后的可溶性固形物重量, $V_{\text{总}}$: 样品溶液的总体积, V : 吸取样品溶液量, W : 样品重量。

1.2.3 浸提条件实验 称取一定量的显齿蛇葡萄样品,根据实验因素选用不同茶水比、不同样品粒度、不同浸提温度及不同浸提时间在水浴锅上进行浸提,浸提完毕后趁热过滤。取其滤液按上述方法分别测定总黄酮和水浸提率。本研究以总黄酮和水浸提率来评价有效成分的浸提效果。

1.2.4 正交实验 根据单因素实验的结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交表。正交实验设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因子、水平表

水平	因素			
	A 茶水比	B 浸提温度(℃)	C 浸提时间(min)	D 粒度(目)
1	1:15	80	20	未粉碎
2	1:20	90	25	60
3	1:25	100	30	120

2 结果与讨论

2.1 茶水比对总黄酮量及水浸提率的影响

取显齿蛇葡萄样品 10.0g 于 500mL 烧杯中,分别加入 80、100、150、200、250mL 蒸馏水,即为 1:8, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 的茶水比,在 90℃水浴下浸提 20min,取其滤液分别测定总黄酮和水浸提率,其结果见图 1。

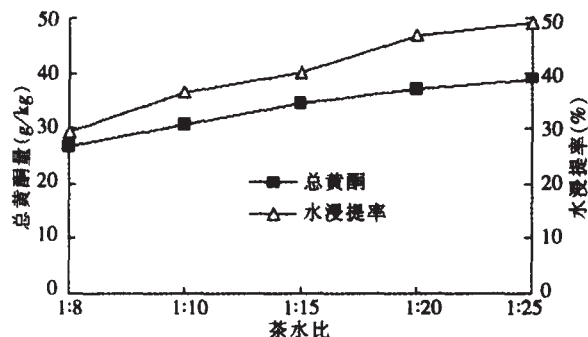


图 1 水浸提率及总黄酮随茶水比的变化曲线

由图 1 可知,随着茶水比的增加,总黄酮的提取量亦增加,但是其增幅随着茶水比的增大而慢慢变小,这就说明总黄酮提取量已逐步接近平衡。显然,随着水溶剂的增加,提取物浓度被稀释,溶质的扩散速度加快,所以总黄酮提取量随茶水比的增加而增

加。从图 1 还可以看出,水浸提率的变化规律与总黄酮的变化规律相似,当茶水比达 1:20 时,水浸提率无明显增加。尽管总黄酮和水浸提率在茶水比超过 1:20 时仍有增加的趋势,但考虑能源消耗和浸提液的保存等因素,本实验中茶水比选用 1:20。

2.2 温度对总黄酮量及水浸提率的影响

取显齿蛇葡萄样品 10.0g 于 500mL 烧杯中,其茶水比为 1:20,分别采用 25、40、60、80、90、100℃进行浸提,浸提 20min 后,趁热过滤。取其滤液分别测定总黄酮量及水浸提率,其结果见图 2。由图 2 可知,总黄酮随着温度的升高而增加,当温度在 60℃以下时,总黄酮提取量增长缓慢,之后其增长速率迅速增加,当温度达 100℃时,总黄酮的提取率达 97.35%。而且,水浸提率的变化规律与总黄酮的变化规律基本相同。根据分子运动理论,温度升高使物质分子运动速度加快,从而促进可溶性物质的溶出。另外,显齿蛇葡萄所含的有效成分分布在叶肉组织深层,热稳定性较高,要在较高的温度下才能浸出^[9]。然而,温度的升高对茶汤的品质会产生不良影响,温度升高使茶汤的煮熟味加重,一些口感不好的物质亦被溶出。当温度超过 90℃时,茶汤的苦涩味明显加重,所以其后实验采用 90℃作为浸提温度。

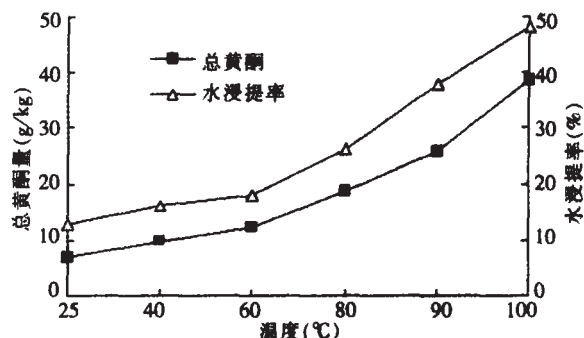


图 2 水浸提率及总黄酮随温度的变化曲线

2.3 时间对总黄酮量及水浸提率的影响

取显齿蛇葡萄样品 10.0g 于 500mL 烧杯中,以 1:20 的茶水比在 95℃分别浸提 10、15、20、25、30min。取其滤液分别测定总黄酮及水浸提率,其结果见图 3。由图 3 可知,总黄酮随着时间的延长,浸出率增加,其增长幅度渐渐变小,特别是到了 20min 之后,总黄酮的浸出基本处于一条直线上了,这就表明总黄酮的提取已基本完全。水浸提也有相似的变化趋势。时间是影响可溶性物质提取的重要因素,时间增加,必然使显齿蛇葡萄叶中的可溶性物质充分溶出,但时间过长,会导致一些不可口的多酚和一些植物色素等组分被溶出,同时也会使黄酮类物质氧化,而影响茶汤的色泽、口感和香气。

2.4 粒度对总黄酮量及水浸提率的影响

将显齿蛇葡萄叶样品用植物组织捣碎机粉碎,分别通过 20、40、60、120 目筛。分别取不同粒度的样

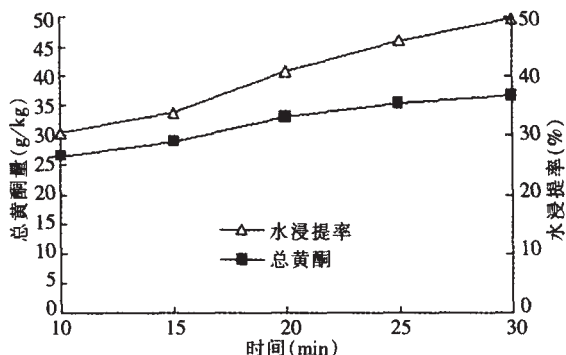


图3 水浸提率及总黄酮随时间的变化曲线

品各 10.0g 于 500mL 烧杯中,按 1:20 的茶水加水,在 90℃浸提 20min。取其滤液分别测定其总黄酮及水浸提率,其结果见图 4。

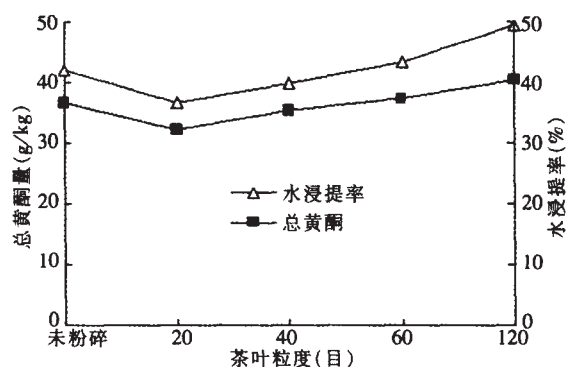


图4 水浸提率及总黄酮随粒度的变化曲线

由图 4 可知,总黄酮在粒度为 20 目时,其浸出率减小,当为 40 目时又开始增长,但是增长的比较缓慢。随着样品粒度的减小,样品的总表面积增加,在浸提过程中与水的接触面积亦随之加大,样品中可溶性成分更易于溶出。在粒度为 20 目时,其样品基本上是显齿蛇葡萄的茎,而有效成分在该样品的叶中含量较高,茎部含量相对较低,因此,茶汤中可溶性物质的浓度有一个突然下降的过程,而当粒度达 40 目时,其样品中叶子的含量开始增加,因此总黄酮也随着增加。而水浸提率亦是如此。在粒度达 40 目后,可溶性物质的浸出率随着粉碎粒度的增加而增加。

2.5 正交实验

采用 $L_9(4^4)$,做温度、茶水比、时间和粒度的四因素三水平正交实验,并对结果进行极差分析。正交实验的结果见表 2。

通过极差分析得出最优浸提方案为 $A_3B_2C_1D_1$,即茶水比为 1:25,浸提温度为 90℃,浸提时间为

表 2 正交实验结果

实验号	因素				水浸出率 (%)	总黄酮 (%)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	26.11	25.18
2	1	2	2	2	26.73	27.01
3	1	3	3	3	19.39	23.08
4	2	1	2	3	25.09	30.17
5	2	2	3	1	44.40	27.88
6	2	3	1	2	38.00	30.51
7	3	1	3	2	46.92	36.71
8	3	2	1	3	47.85	45.02
9	3	3	2	1	41.19	42.88
k_1	24.08	32.71	37.32	37.23		
k_1'	25.09	30.69	33.57	31.98		
k_2	35.83	39.66	31.00	37.22		
k_2'	29.52	33.30	33.35	31.41		
k_3	45.32	32.86	36.90	30.78		
k_3'	41.54	32.16	29.22	32.76		
R_1	21.24	6.95	6.32	6.45		
R_2	16.45	2.61	4.35	1.35		

最佳配方 $A_3B_2C_1D_1$

注 k_1 为水浸提率的平均值 k_1' 为总黄酮的平均值。

20min,茶叶不需粉碎。各因素对水浸提率及总黄酮的影响次序为:茶水比>浸提温度>粒度>浸提时间。但是,由于茶水比太大,影响后续工序浓缩的能量损耗及其有效成分的损失,适当变小茶水比,从而有利于能源的节约,同时也能较好的保存其功能成分。因此,将浸提条件适当修改,茶水比缩小为 1:20。

2.6 浸提次数对总黄酮量及水浸提率的影响

根据单因素和正交实验结果,取未粉碎样品适量,按茶水比 1:20 加水,在 90℃下浸提 20min,过滤后,重复浸提 4 次,以探讨浸提次数对总黄酮及水浸提率的影响。由表 3 可见,显齿蛇葡萄茎叶中的水溶性物质一次浸出率高,第一次浸提总黄酮和水浸出率高达 75.87%和 80.56%,二次浸提率之和二者均达 90%以上。

3 结论

3.1 作为显齿蛇葡萄叶中主要的水溶性活性成分黄酮类化合物是影响其茶饮料保健功能和品质的主要因素,其在茶汤中的提取率和保存率是该浸提工艺的关键问题。另外,其香气成分和风味物质对口感亦有重要影响。本研究中是以总黄酮和水浸提率作为衡量浸提效果的主要评价指标,结合综合感官评价确定最适浸提条件。

3.2 单因素实验表明,茶水比、浸提温度、浸提时间和样叶粒度对总黄酮和水浸提率均有显著影响,二

表 3 显齿蛇葡萄水浸出率及总黄酮浸提率

名称	第一次浸提率	第二次浸提率	第三次浸提率	第四次浸提率	合计
水浸出率 (%)	80.56	10.67	6.01	2.35	99.59
总黄酮 (%)	75.87	19.43	4.69	未检出	99.99

(下转第 111 页)

个洗脱峰(图1),峰I呈桔红色,为卵清转铁蛋白,峰II为以白蛋白为主的蛋白。收集峰I洗脱液,对水透析,浓缩冷冻干燥,可得浅红色的卵清转铁蛋白。

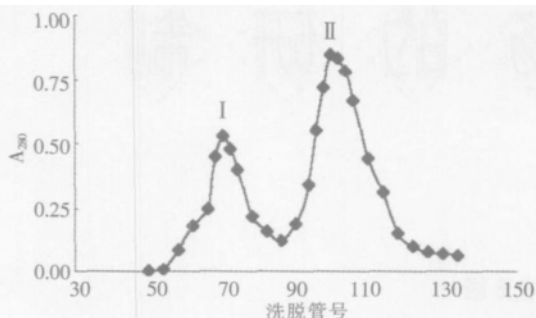


图1 DEAE层析洗脱曲线图

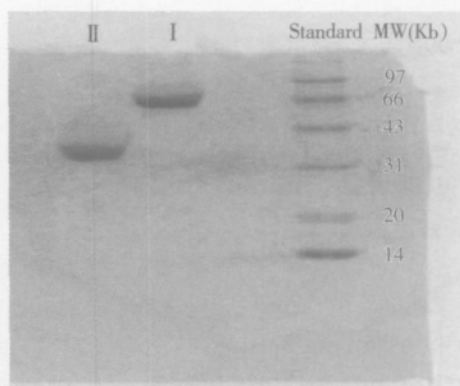


图2 SDS-PAGE 图谱

(标准蛋白分子量:兔磷酸化酶 B 97,000;牛血清蛋白 66,000;兔肌动蛋白 43,000;牛磷酸酐酶 31,000;胰蛋白酶抑制剂 20,000;溶菌酶蛋白 14,000)

2.2 SDS-PAGE 结果

(上接第 109 页)

者在茶汤中的含量均随这四个因素的增加而增加,且四因素均影响茶汤品质。

3.3 显齿蛇葡萄叶中的无机和有机营养成分极为丰富,浸提次数实验表明该茶易冲泡,且水浸出率高,总黄酮和水浸提率的一次浸出率达 75.87%和 80.56%,第二次后其有效成分的浸提接近完全。

3.4 采用 $L_9(3^4)$,做温度、茶水比、时间和粒度的四因素三水平的正交实验,结果表明最优浸提方案为: $A_3B_2C_1D_1$,即茶水比为 1:25,浸提温度为 90℃,浸提时间为 20min,茶叶不需粉碎。但考虑后续工序加工的能源损耗及其有效成分的损失等因素,因此适宜的茶水比为 1:20、浸提时间为 20min、浸提温度为 90℃。其影响的主次顺序是茶水比>浸提温度>样叶粒度>浸提时间。

参考文献:

[1] 福建省科学技术委员会《福建植物志》编写组. 福建植物

分别用峰 I 和峰 II 的洗脱液透析除盐后,走 SDS-PAGE 电泳,用标准分子量蛋白做对照,经 UV 扫描分析,测得峰 I 蛋白分子量为 77kDa,与文献报道的一致^[4]。峰 II 主要以卵清白蛋白为主,蛋白分子量约为 4.2 万(图 2)。

2.3 讨论

开发转铁蛋白作为食品功能因子正成为当今功能食品的一个重点,在国外已有乳铁蛋白问世,但牛乳清的乳铁蛋白含量很低,仅为 0.05~0.1g/L,初乳的要高些,为 1.0g/L,而蛋清中转铁蛋白含量高达 1.0%,约占蛋清蛋白的 12%。我国鸡蛋资源丰富,价格低廉,开发具有我国资源优势的卵清转铁蛋白,极具社会 and 经济效益。本实验利用层析分离技术,得到了卵清转铁蛋白样品,饱和的卵清转铁蛋白液呈桔红色,经吸收光扫描确认其在 465nm 处有特征吸收峰,符合鸡蛋清卵转铁蛋白的光谱特征。由 SDS-PAGE 电泳图看出,峰 I 为 7.7kDa 的单一谱带,说明本实验获得的卵转铁蛋白基本达到电泳纯。

参考文献:

- [1] 龙华,等.转铁蛋白的研究与发展[J].生物工程进展,2001(1).
- [2] Separation of ovotransferrin, JP 6056897, 1994.
- [3] F 奥斯伯,等.精编分子生物学实验指南[M].科学出版社,1998.
- [4] Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white protein[J]. J Agric Food Chem,2001,49.

杂志 第三卷)[M]. 福州:福建科学出版社,1987.383~384.

[2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物科属检索表[M]. 北京:科学出版社,1983.349~356.

[3] 张育松,陈洪德. 功效奇特的中国藤茶[J]. 福建茶叶,1999(1):23~24.

[4] 陈科力,张秀明,张赤志. 三种蛇葡萄根抗 D-GalN 致急性肝损伤的实验研究[J]. 中药材,1999, 22(7):353~354.

[5] 宋纬文. 民间草药藤茶的初步调查[J]. 湖南中医杂志, 1996,12(5): 41~42.

[6] 张友胜,杨伟丽,熊浩平. 类茶植物显齿蛇葡萄的研究利用现状[J]. 茶叶通讯,2001(1):19~23.

[7] 熊大胜,朱金桃,刘朝阳. 显齿蛇葡萄幼嫩叶中提取物抑菌作用的研究[J]. 食品科学,2000,21(2):48~50.

[8] 邵立波,郑文德,何艳贞. 葛根中黄酮类化合物的提取[J]. 陕西粮油科技,1996,21(2):33~35.

[9] 邓力,周鸿祥,吴鑫颖. 植物提取饮料浸提理论研究[J]. 食品科学,2001,22(8):40~42.