

苦菜中单宁提取工艺及其抗便秘作用研究

朱加进¹, 吴向阳², 邹淑君¹, 吴 洁¹

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院; 2 浙江大学医院)

摘 要: 对单宁的提取工艺做了研究, 对料液比、温度、提取时间分别进行了单因素试验和 $L_9(3^3)$ 正交试验, 并且对单宁的抗便秘防腹泻功能进行了研究。结果显示最佳工艺为料液比 1:60、温度 45℃、提取时间 6 h, 提取率(相对于被提取的苦菜质量)为 3.60%。经动物试验显示: 苦菜单宁能够较强地促进小鼠小肠的蠕动, 明显减少排便次数, 说明苦菜单宁对便秘和腹泻有双向治疗作用, 且抗便秘作用优于苦菜果胶和苦菜多糖。

关键词: 苦菜(败酱草); 单宁; 提取工艺; F-D (Folir-Denis) 单宁测定法; 便秘; 肠蠕动

中图分类号: O 658.2; S647

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2003)02-0186-04

1 引 言

单宁, 也称单宁酸、鞣酸, 是一种存在于植物中的水溶性多酚类物质, 其分子量大约在 500~3 000 道尔顿。由于其自身的多酚羟基结构, 因而具有较强的生理活性。国外对单宁生理活性的研究很多, Zdunczyk 等 2002 年对黄芩、绿茶、豆(faba bean)中单宁的降胆固醇功能进行了研究^[1], Panizzi 等 2002 年报道悬钩子属植物(*Rubus ulmifolius*)的单宁和多酚提取物有很高的抗菌活性^[2], EB I 等 1999 年也有类似的报道^[3], Hatano 等 2002 年对可可豆单宁的抗氧化性进行了研究^[4], Yokozawa 等 1998 年报道了“51 种草药中单宁的抗氧化性明显强于黄酮”的研究^[5], Schmitt, Chung, Wang, Das, Shi 等分别对单宁抗病毒^[6]、抗突变、抗肿瘤活性和抗衰老等^[7~10]进行了研究, Au 等 2001 年报道了单宁对免疫缺陷病毒(HIV-1)整合酶活性具有强烈的抑制作用^[11], 即有抗爱滋病活性。然而对于单宁抗便秘作用方面的研究报道很少。

苦菜, 学名败酱草(*Patrinia villosa*), 为败酱科植物, 有抗便秘又防腹泻的作用, 经朱加进等研究, 功能因子可能是苦菜多糖和膳食纤维^[12~14]。据报道: 鞣花单宁不但可以治疗人的腹泻, 同时还可以有效地防止便秘^[15]。为了进一步研究苦菜抗便秘防腹泻机理, 本文对苦菜单宁的提取工艺及作用机理进行了研究, 此方面研究目前还未见报道。

2 材料与方 法

2.1 材 料

新鲜苦菜, 采摘自杭州郊县; NIH 品系小鼠(体重 16~18 g, 雌雄各半), 浙江大学实验动物中心。

灌胃液^[13, 16]: 按 5% 样品(包括苦菜单宁、果胶、多

糖; 柑皮果胶, 柑桔果胶), 10% 的阿拉伯胶, 5% 的墨汁与水混合而成; 空白对照为 10% 的阿拉伯胶, 5% 的墨汁与生理盐水混合而成。

丙酮(AR)、磷酸(AR), 浙江巨化集团公司试剂厂; 无水碳酸钠(AR), 上海虹光化工厂; 鞣酸(AR), 洪声化工厂; 钨酸钠(AR)、磷钼酸(AR)医药上海化学试剂站。

752 紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), 水浴锅(上海医疗器械五厂), 离心机(北京医用离心机厂), 抽滤器, 旋转蒸发仪, 真空干燥器, 天平, 小鼠灌胃针头, 1 mL 注射器, 手术剪, 眼科镊, 直尺, 搪瓷盘, 计时钟。

2.2 方 法

2.2.1 苦菜单宁提取方法

新鲜苦菜 去除杂物 称质量 移入三角瓶 按一定比例加入提取剂 在热水浴中热浸提数小时 冷却后过滤 待测的样液。

2.2.2 单宁含量的测定方法^[17]

F-D (Folir-Denis) 单宁测定法试剂的配制: 750 mL 水中加入 Na_2WO_4 100 g, 磷钼酸及磷酸 50 mL, 回流 2 h, 放冷, 并稀释为 1 L。

单宁酸标准曲线的绘制: 称取单宁酸 50 mg 于 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并定容至刻度, 混匀。再用蒸馏水稀释 10 倍即为 0.1 mg/mL 标准溶液。吸取单宁标准液 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3, 3.5 mL, 分别置于盛有 30 mL 蒸馏水的 50 mL 容量瓶中, 加 F-D 试剂 2.5 mL 及饱和 Na_2CO_3 溶液 5 mL, 加水稀释至 50 mL。充分混合, 并于 30 min 后在 650 nm 处测定光密度值。

样品测定: 吸取待测的样品液, 与标准溶液同法测吸光度, 以标准曲线计算单宁的含量。

2.2.3 单因素实验

料液比采用 1:4, 1:10, 1:30, 1:60 和 1:80 五个水平, 浸提温度采用 30℃、45℃、60℃、70℃四个水平, 浸提时间采用 0.5 h、4 h、6 h、8 h 五个水平分别进行单因素试验。

2.2.4 正交试验

选 $L_9(3^3)$ 做正交试验, 选定提取苦菜单宁的最佳工艺参数。用 F-D 法测定单宁含量, 统计试验结果。

收稿日期: 2002-08-15

基金项目: 浙江省教育厅科学基金资助项目(No. 97052); 浙江省科技厅重点科研资助项目

作者简介: 朱加进, 浙江省地方工业食品质量监督检测站常务副站长、博士, 中国营养学会会员。杭州市 浙江大学生物系统工程与食品科学学院食品科学与营养系, 310029。Email: jjzhu@zju.edu.cn

2 2 5 抗便秘防腹泻功能试验^[16]

1) 单宁灌胃液制备: 最优法提取苦菜单宁 抽滤 常压浓缩 减压浓缩 冷冻干燥 配成灌胃液。

2) 排便时间和排便频度实验: 取禁食 20 h 的体重相近的小鼠 10 只(腹泻者剔除), 苦味酸标记。各只分别灌服上述墨汁混悬液(0.2 mL/10 g), 置于鼠笼内进行观察, 记录小鼠开始排黑便的时间、粪便性状和数目。连续观察 6 h, 每组取平均值进行比较。

3) 小鼠小肠推进实验: 取禁食 24 h 的体重相近的小鼠 10 只, 用苦味酸标记。分别用上述墨汁混悬液 0.2 mL/10 g 体质量灌胃。给药后 30 min 脱颈椎处死, 打开腹腔分离肠系膜, 剪取上端至幽门, 下端至回盲部的肠管, 置于托盘上。轻轻地将小肠拉成直线, 测量肠管长度作为“小肠总长度”。从幽门至墨汁前沿的距离作为“墨汁在肠内推进的距离”。用公式计算墨汁的推进百分率。墨汁推进率(%) = 墨汁在肠内的推进距离(cm)/小肠全长(cm) × 100%

3 结果与讨论

3 1 单宁的测定^[17]

测得单宁标准曲线的回归方程和苦菜中单宁的提取率(%)分别为:

$$Y = 1124.8X, R = 0.9997$$

$$\text{单宁}(\%) = \frac{p \times 50 \times 100}{V \times W}$$

式中 Y——单宁在 650 nm 波长处测定的吸光度;
X——相当于 0.1 mg/mL 单宁标准溶液的 mL 数;
W——苦菜样品的质量,mg; V——比色时所吸提取液体积,mL; 50——提取液总体积,mL; p——从标准曲线查得的提取液所含单宁,mg; 100——换算为百分含量。

3 2 热浸提工艺参数对苦菜中单宁提取率的影响

在热浸提工艺研究前, 必须对提取的溶剂进行选择, 单宁溶于水、甲醇、乙醇和丙酮, 丙酮水溶液对单宁的溶解能力最强, 所以是单宁的首选提取剂^[18], Chavan 等 2001 年对豌豆单宁的提取采用 70% 的丙酮^[19], 而 Mupangwa 等 2000 年对草料单宁的提取采用 30% 的丙酮^[20], 对于单宁的提取样品越新鲜提取率越高^[18], 由于鲜苦菜含水率很高^[14], 因此丙酮浓度高的提取剂提取率较高, 经研究纯丙酮比 50% 的丙酮提取率稍高。综合考虑成本等因素, 本研究采用 50% 的丙酮作为苦菜单宁的提取剂。

热浸提工艺涉及 3 个关键条件: 热浸提的料液比、热浸提的温度和热浸提的时间。下面就这三个方面进行单因素试验。

3 2 1 料液比的影响

表 1 是在浸提温度为 30℃, 浸提时间为 4 h 时, 单宁提取率随料液比变化的试验结果, 料液比的上升会增加单宁的溶出量, 到达一定比例后, 上升的幅度明显下降。1:60 和 1:80 为最佳, 但 1:30 和前者很接近, 故选择 1:30。

表 1 料液比对单宁提取率的影响

Table 1 Effect of solid-liquid ratio on the extraction percentage of tannins

料液比	单宁提取率/%	料液比	单宁提取率/%
1:4	3.014	1:60	3.487
1:10	3.186	1:80	3.487
1:30	3.486		

3 2 2 温度的影响

表 2 是料液比为 1:30, 浸提时间为 4 h 时的温度单因素试验, 结果表明: 温度的上升伴随着单宁提取率略有下降, 45℃ 为最佳。

表 2 温度对单宁提取率的影响

Table 2 Effect of temperature on the extraction percentage of tannins

温度/℃	单宁提取率/%	温度/℃	单宁提取率/%
30	3.49	60	3.51
45	3.57	70	3.51

3 2 3 时间的影响

表 3 表明, 是料液比为 1:30, 浸提温度为 45℃ 的时间的单因素试验, 随着热浸提时间的增加苦菜单宁提取率也有所增加, 但增加趋势逐渐趋缓, 4 h 和 6 h 提取率最高。

表 3 时间对单宁提取率的影响

Table 3 Effect of period on the extraction percentage of tannins

时间/h	单宁的提取率/%	时间/h	单宁的提取率/%
0.5	2.623	6	3.416
2	3.188	8	3.408
4	3.415		

3 2 4 热浸提苦菜中单宁提取率的正交试验

表 4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal experiment

试验	因 素			单宁的提取率/%
	A 料液比	B 温度/℃	C 时间/h	
1	1:10	30	2	2.75
2	1:10	45	4	3.19
3	1:10	60	6	3.25
4	1:30	30	4	3.48
5	1:30	45	6	3.19
6	1:30	60	2	3.39
7	1:60	30	6	3.49
8	1:60	45	2	3.57
9	1:60	60	4	3.25
K ₁	9.19	9.72	9.71	
K ₂	10.06	9.95	9.92	
K ₃	10.31	9.89	9.93	
优水平	A ₃	B ₂	C ₃	
R _j	0.373	0.077	0.0733	
主次顺序	A	B	C	

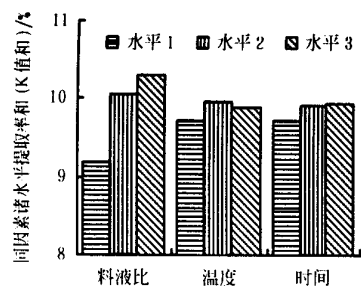


图1 正交试验的极差(K)图

Fig 1 Range of orthogonal experiment

在上述单因素试验的基础上,选定3因素3水平作正交试验,因素水平、试验结果计算见表4。经唐启义DPS统计软件^[21]正交试验极差分析显示,影响苦菜单宁提取率的最主要因素是料液比(A)。从图1可以直观地辨别各因素的最佳组合为A₃B₂C₃,经验证试验:最佳组合时(1 60,45 ,6 h)时,提取率为3 60%(相对于被提取的苦菜质量)。

3.3 苦菜单宁抗便秘作用

表5和表6的结果表明:苦菜单宁开始排黑便时间仅次于苦菜果胶,但两者无显著差异($P>0.05$);苦菜单宁开始排黑便时间比对照组(生理盐水)、苦菜多糖时间长,但无显著差异($P>0.05$);比 柑果胶时间长,且存在显著差异($P<0.05$);与柑桔果胶存在极显著差异($P<0.01$),说明苦菜单宁有一定的抗腹泻作用,但效果不如苦菜果胶。

表5 不同处理对小鼠排便的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

Table 5 Effect of different treatments on the defecation of mice

处理	开始排黑粪时间/m in	6 h 内排黑便次数	黑便性状
生理盐水	206.5±42.3	3.8±1.8	干燥,成形
苦菜果胶	230.3±39.5	2.9±1.0	湿润,成形
苦菜多糖	195.0±35.6	3.2±1.9	湿润,成形
柑桔果胶	158.9±64.3	5.9±2.6	湿润,成形
柑果胶	191.6±55.5	3.7±2.1	湿润,成形
苦菜单宁	218.7±42.1	3.1±2.8	湿润,成形

表6 开始排便时间的方差分析

Table 6 Variance analysis of the time before initial mouse defecation among different treatments

处 理	5% 显著水平	1% 极显著水平
苦菜果胶	a	A
苦菜单宁	ab	AB
生理盐水	b	B
苦菜多糖	bc	B
柑果胶	c	B
柑桔果胶	d	C

表5和表7的结果显示,苦菜单宁在6 h内的排便次数比苦菜果胶多,两者无显著差异($P>0.05$),而比其他各组均少,其中,与苦菜多糖无显著差异($P>0.05$),但与其他各组均存在极显著差异($P<0.01$)。这与表6的结果相一致,同样说明苦菜单宁较强的防腹泻能力,但次于苦菜果胶。而从粪便的性状看苦菜单宁亦

优于对照组。

表7 6 h 内排黑便次数方差分析

Table 7 Variance analysis of the times of defecation within 6 hours among different treatments

处 理	5% 显著水平	1% 极显著水平
柑桔果胶	a	A
柑果胶	b	B
生理盐水	b	B
苦菜多糖	c	BC
苦菜单宁	c	C
苦菜果胶	c	C

表8 不同处理对小鼠小肠蠕动的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

Table 8 Effect of different treatments on small intestine peristalsis of mice

处 理	小肠总长度/cm	墨汁推进距离/cm	墨汁推进率/%
生理盐水	43.2±2.4	28.1±3.9	64.9±7.4
苦菜果胶	39.5±2.8	28.7±1.9	73.1±4.5
苦菜多糖	37.9±1.8	27.9±2.1	74.0±6.3
柑桔果胶	43.4±3.7	30.0±2.0	69.5±7.3
柑果胶	39.6±2.2	28.6±3.3	72.1±16.3
苦菜单宁	40.6±3.2	33.1±3.1	83.3±11.4

表9 小肠蠕动的的影响

Table 9 Variance analysis of small intestine peristalsis of mice among different treatments

处 理	5% 显著水平	1% 显著水平
苦菜单宁	a	A
苦菜多糖	b	AB
苦菜果胶	b	AB
柑果胶	bc	B
柑桔果胶	bc	B
生理盐水	c	B

表8和表9结果表明:苦菜单宁促进小鼠小肠蠕动的作用最强,且与其他各组均存在显著差异($P<0.05$),说明苦菜单宁的抗便秘作用最强。

4 结 论

1) 在热浸提苦菜单宁的过程中,料液比是影响苦菜单宁得率的最主要因素。单宁提取最佳工艺条件为料液比1 60、温度45 、时间6 h。此时苦菜的得率为3 60%。

2) 苦菜单宁的抗便秘作用显著强于苦菜多糖、苦菜果胶、 柑果胶、柑桔果胶和对照组生理盐水,而防腹泻能力除了比苦菜果胶差外(无显著差异),均优于其他各组。说明单宁是苦菜抗便秘防腹泻的重要功能因子。

[参 考 文 献]

[1] Zdunczyk Z, Frejnagel S, W roblewska M, et al Biological activity of polyphenol extracts from different plant sources[J]. Food Research International, 2002, 35: 183~186

[2] Panizzi L, Caponi C, Catalano, S et al In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of Rubus ulmifolius [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 79: 165~168

- [3] EBI G C, Ifeanacho C J, Kamalu T N. Antimicrobial properties of *U varia chamae* stem bark [J]. *Fitoterapia*, 1999, 70: 621~ 624
- [4] Hatano T, Miyatake H, Natsume M, et al. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 749~ 758
- [5] Yokozawa T, Chen C P, Dong E, et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 56: 213~ 222
- [6] Schmitt A C, Ravazzolo A P, von Poser G L. Investigation of some *Hypericum* species native to southern of Brazil for antiviral activity [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 77: 239~ 245
- [7] Chung K T, Wei C L, Johnson M G. Are tannins a double-edged sword in biology and health [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1998, 9: 168~ 175
- [8] Wang C C, Chen L G, Yang L L. Cuphiin D1, the macrocyclic hydrolyzable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line [J]. *Cancer Letters*, 2000, 149: 77~ 83
- [9] Das M, Bickers D R, Mukhtar H. Protection against chemically induced skin tumorigenesis in senear mice by tannic acid [J]. *Int J Cancer*, 1989, 43: 468~ 470
- [10] Shi S T, Wang Z Y, Smiths T L, et al. Effect of green tea and black tea on 4-(Methylnitrosamine)-1-(3pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice [J]. *Cancer Research*, 1994, 54: 4641~ 4647
- [11] Au T K, et al. A comparison of HM-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs [J]. *Life Sciences*, 2001, 68: 1687~ 1694
- [12] 朱加进. 苦菜中可溶性多糖提取工艺研究 [J]. *农业工程学报*, 2002, 18(1): 138~ 141.
- [13] 朱加进, 何国庆. 苦菜中防便秘抗腹泻功能因子研究 [J]. *食品科学*, 2002, 23(2): 113~ 115.
- [14] Zhu J J, Li Z G, Chen J J, et al. Determination of the volatile compounds and nutrients analysis of wild *patrinia villosa* [J]. *Transactions of the CSAE (农业工程学报)*, 2002, 18(5): 193~ 197.
- [15] 何强, 姚开, 石碧. 植物单宁的营养学特性 [J]. *林产化学与工业*, 2001, 3(1): 80~ 85
- [16] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 331~ 335.
- [17] 何照范. 粮油籽粒品质及其分析技术 [M]. 北京: 农业出版社, 1985.
- [18] 孙达旺. 植物单宁化学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1992, 13~ 34.
- [19] Chavan U D, Shahidi F, Maczk M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents [J]. *Food Chemistry*, 2001, 75: 509~ 512
- [20] Mupangwa J F, Acamovic T, Topps J H, et al. Content of soluble and bound condensed tannins of three tropical herbaceous forage legumes [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2000, 83: 139~ 144
- [21] 唐启义. DPS 数据处理系统 [Z]. 杭州, 1999.

Extraction technology and anti-constipation function of tannins from wild *Patrinia Villosa*

Zhu Jiajin¹, Wu Xiangyang², Zou Shujun¹, Wu Jie¹

(1. College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University;

2. Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Patrinia Villosa* (P. V.) can cure diarrhea, and it can also relieve constipation. It is possible that tannins is one of the important components existing in leaves, stems and water-solution extracts of P. V. with the above functions. So the extraction technology of tannins from wild P. V. was studied, and the single factor test and orthogonal experiment design methods ($L_9(3^3)$) were applied to analyze the influence of solid-liquid ratio, temperature and time on the extraction percentage of tannins from the water solution of P. V.. The effect of tannins on preventing diarrhea and relieving constipation was also studied. The results indicated that the optimum solid-liquid ratio, temperature and extraction time were respectively 1:60, 45 °C and 6 h. Under this condition, the extraction percentage of tannins was 36.0%. Compared with P. V. polysaccharides, P. V. pectin and other samples, the animal test indicated that tannins from wild P. V. showed significantly high effect ($P < 0.05$) on small intestine peristalsis of mice. Mouse feed with tannins reduces the times of defecation within 6 hours, and prolongs the time before initial defecation, and its function is just slightly inferior to P. V. Pectin. It shows that tannins is one of the most important components of wild P. V. for preventing diarrhea and constipation.

key words: *Patrinia Villosa* (P. V.); tannins; extraction technology; F-D (Folir-Denis) method; constipation; intestine peristalsis