

# 黄精茶饮的制备工艺及其免疫调节作用研究

杨迎<sup>1,2</sup>, 侯婷婷<sup>1,2</sup>, 王成<sup>3</sup>, 高雷雷<sup>2,4</sup>, 陈存武<sup>2,4</sup>, 韩邦兴<sup>2,4</sup>,  
王威<sup>2,4</sup>, 刘东<sup>2,4\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽省中药资源保护与持续利用工程实验室, 六安 237012;  
3. 霍山天下泽雨生物科技有限公司, 六安 237200; 4. 皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012)

**摘要:** **目的** 优化祁门红茶和多花黄精的提取工艺, 并评估黄精茶饮的免疫调节作用。**方法** 选用多花黄精和祁门红茶为原料, 以茶多酚和黄精多糖含量为指标, 通过单因素实验和正交实验分别对多花黄精和祁门红茶提取的工艺参数进行优化; 通过感官评分确定多花黄精与祁门红茶的配比。在此基础上, 通过体外细胞实验和动物实验评估黄精茶饮的免疫调节能力。**结果** 祁门红茶的最佳提取工艺参数为: 茶水比 1:80 (g/mL)、浸提时间 30 min、浸提温度 100°C, 茶多酚提取率为(6.79±0.10)%。多花黄精的最佳提取工艺参数为: 料液比 1:20 (g/mL)、浸提时间 120 min、浸提温度 90°C, 黄精多糖提取率为(56.94±1.56)%。黄精茶饮的最佳配比为: 祁门红茶与多花黄精的体积比为 1:3, 黄精茶饮中多酚含量为(1.59±0.04)%, 多糖含量为(46.07±2.91)%。体外细胞实验表明, 黄精茶饮(500 μg/mL)能显著促进 RAW264.7 巨噬细胞的增殖( $P<0.01$ ), 并能刺激 RAW264.7 巨噬细胞吞噬中性红( $P<0.01$ )。动物实验发现, 与模型组相比, 黄精茶饮能够显著促进免疫抑制小鼠脾脏和胸腺指数的恢复( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论** 黄精茶饮口感香甜清冽, 颜色澄清透亮, 在体内外具有一定的免疫增强作用, 研究结果可为茶和药食同源产品的开发提供新思路。

**关键词:** 多花黄精; 祁门红茶; 工艺优化; 黄精茶饮; 免疫调节作用

## Study on preparation technology and immunomodulatory effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink

YANG Ying<sup>1,2</sup>, HOU Ting-Ting<sup>1,2</sup>, WANG Cheng<sup>3</sup>, GAO Lei-Lei<sup>2,4</sup>, CHEN Cun-Wu<sup>2,4</sup>,  
HAN Bang-Xing<sup>2,4</sup>, WANG Wei<sup>2,4</sup>, LIU Dong<sup>2,4\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Engineering Laboratory for Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Lu'an 237012, China;  
3. Huoshantianxiazeyu Biological Technology Co., Ltd., Lu'an 237200, China; 4. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize the extraction process of Keemum black tea and *Polygonatum cyrtonema* Hua, and evaluate the immunomodulatory effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink.

**Methods** *Polygonatum cyrtonema* Hua and Keemum black tea were used as raw materials, and the extraction rate

基金项目: 安徽省高校协同创新项目(GXXT-2019-049)、安徽省科技重大专项项目(202003c08020004)、西山药库研究院建设发展项目(0045021006)

**Fund:** Supported by the Collaborative Innovation Project of Universities in Anhui Province (GXXT-2019-049), the Major Science and Technology Special Project of Anhui Province (202003c08020004), and the Construction and Development Project of Xishan Pharmaceutical Storehouse Research Institute (0045021006)

\*通信作者: 刘东, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药和天然产物及其纳米药物的制备及质量控制。E-mail: liudong3000@126.com

\*Corresponding author: LIU Dong, Ph.D, Associate Professor, College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Gulou street, Yu'an District, Lu'an 237012, China. E-mail: liudong3000@126.com

of tea polyphenols and *Polygonatum polysaccharide* were used as indexes, the process parameters of *Polygonatum cyrtonema* Hua as well as Keemum black tea were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. The ratio of *Polygonatum cyrtonema* Hua and Keemum black tea was determined by sensory score. On this basis, the immunomodulatory effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink was evaluated by *in vitro* cell experiment and animal experiment. **Results** The optimal process parameters of Keemum black tea were as follows: Solid-liquid ratio was 1:80 (g/mL), extraction time was 30 min, and the extraction temperature was 100°C, the extraction rate of tea polyphenols was (6.79±0.10)%. The optimal process parameters of *Polygonatum cyrtonema* Hua were as follows: Solid-liquid ratio was 1:20 (g/mL), extraction time was 120 min, and the extraction temperature was 90°C, the extraction rate of *Polygonatum polysaccharide* was (56.94±1.56)%. The volume ratio of Keemum black tea and *Polygonatum cyrtonema* Hua was 1:3. The content of polyphenols and polysaccharide content in *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink were (1.59±0.04)% and (46.07±2.91)%, respectively. The results of *in vitro* experiments showed that *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink (500 µg/mL) could significantly promote the proliferation of RAW264.7 cells ( $P<0.01$ ), and stimulated RAW264.7 cells to phagocytose neutral red ( $P<0.01$ ). Animal studies had found that compared with model group, *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink could significantly promote the recovery of spleen and thymus index in immunosuppressed mice ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion** The prepared *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink tastes sweet and clear, and the color is clear and bright, and has a certain immune enhancement effect *in vivo* and *in vitro*, which provides new ideas for the development of tea and edible products.

**KEY WORDS:** *Polygonatum cyrtonema* Hua; Keemum black tea; process optimization; *Polygonatum cyrtonema* Hua-Keemum black tea drink; immunomodulatory effect

## 0 引言

黄精(*Polygonati rhizoma*)为百合科黄精属植物颠黄精(*Polygonatum kingianum* Coll.et Hemsl.)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)或多花黄精(*Polygonatum cyrtonema* Hua)的干燥根茎,多生长于海拔 800~2800 m 的林下、灌丛或山坡阴处,春秋二季采挖,为《中国药典》2020 年版一部收载品种,是中国传统的药食两用植物,具有抗氧化、调节免疫、延缓衰老等多种生物活性<sup>[1-3]</sup>。体内外研究表明,黄精提取物能够增强免疫抑制小鼠的免疫功能,并且对正常小鼠也具有一定的免疫调节作用<sup>[4-6]</sup>。目前,市场上黄精产品的开发及加工技术仍处于初级阶段,主要有黄精饮片、黄精酒、黄精茶等常见的产品<sup>[7]</sup>,而这些产品大多以单一形式出现,仍需要进一步开发,以实现黄精产品的多样化。祁门红茶(Keemum black tea)简称“祁红”,是世界三大高香红茶之一,主产于安徽祁门、东至、贵池等地,产品以祁门的历口、闪里、平里一带最优,故称为“祁红”<sup>[8]</sup>。祁红属于发酵茶,成品条索紧细苗秀、色泽乌润、汤色红艳透明,具有独特的玫瑰香或苹果香,香气清新持久<sup>[9]</sup>。茶叶具有免疫调节<sup>[10-11]</sup>、抗氧化<sup>[12]</sup>、抗炎<sup>[13]</sup>、抗癌<sup>[14]</sup>、抗糖尿病<sup>[15]</sup>等多种保健作用,同时这些功能也被认为是最有前景的茶资源高效高质利用的方向。近几年来,随着我国茶园种植面积的扩大和茶产量的提升,茶产业存在着供大于求的情况,而功能性复配茶饮

的开发是解决茶叶产能过剩的有效途径之一<sup>[16]</sup>。有研究证实,茶可以与药食同源本草桑叶<sup>[17]</sup>复配制备成复合茶饮,并且在一定程度上提升了药理活性。茶与黄精复配可以充分结合茶叶和药食同源黄精的健康功效,拓宽黄精和茶叶的产品开发,提高茶和黄精的综合利用价值。

本研究以祁门红茶和多花黄精为原料制作复合饮料,对其工艺参数进行优化,基于上述多花黄精与茶叶的免疫调节功效,确证复配后的黄精茶饮的体内外免疫活性,以期研制一种风味独特且具有免疫调节活性的复合茶饮料,为祁红和黄精产品的深入开发应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

多花黄精(金寨润元生物科技有限公司);祁门红茶(安徽祁门县祁雅茶业有限责任公司);RAW264.7 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司);70 只清洁级昆明种雄性小鼠[体重为 18~22 g,安徽医科大学,实验动物生产许可证号 SCXK(豫)2020-0005,该动物实验由皖西学院动物伦理委员会审批通过,伦理审批号:202103001]。

注射用环磷酰胺(德国 Baxter Oncology GmbH 公司);中性红检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) (0.01 mol/L, 北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司);四甲基偶氮唑蓝(methyl

thiazolyl tetrazolium, MTT)(纯度≥97%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(纯度≥99%, 上海生工生物工程股份有限公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(纯度≥99%, 美国 Sigma 公司); 焦性没食子酸(分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 左旋咪唑(纯度≥99%)、福林酚试剂(分析纯)(上海麦克林生化科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

Synergy H1 型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); W200IR 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国西盟国际集团); IM1200 型自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司); CKX53SF 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司); UV-5200 型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司); WB-6-15 型电热恒温水浴锅(上海实贝仪器设备厂); FA2204 型万分之一电子天平(常州市幸运电子设备有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 工艺流程

祁门红茶与多花黄精提供工艺流程见图 1。

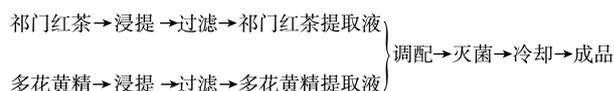


图 1 工艺流程

Fig.1 Technological process

#### 1.3.2 单因素实验

准确称取祁门红茶 1.0 g, 放入 100 mL 烧杯中, 以茶多酚提取率为指标, 考察不同茶水比(1:20、1:40、1:50、1:60、1:80, g/m)、浸提时间(10 s 和 3、10、20、30 min)、浸提温度(80、85、90、95、100°C)对祁红浸提效果的影响<sup>[18-19]</sup>。准确称取多花黄精粉末 1.0 g, 放入 100 mL 烧杯中, 以黄精多糖提取率为指标, 考察不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50, g/mL)、浸提时间(40、60、80、100、120 min)、浸提温度(60、70、80、90、100°C)对多花黄精浸提效果的影响<sup>[20-21]</sup>。

#### 1.3.3 正交实验

根据单因素实验结果, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验设计, 分别对祁门红茶和多花黄精的提取工艺参数进行优化, 因素水平如表 1~2 所示。

表 1 祁门红茶提取工艺正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment for the extraction process of Keemum black tea

| 水平 | 因素          |          |         |
|----|-------------|----------|---------|
|    | A 茶水比(g/mL) | B 时间/min | C 温度/°C |
| 1  | 1:50        | 10       | 90      |
| 2  | 1:60        | 20       | 95      |
| 3  | 1:80        | 30       | 100     |

表 2 多花黄精提取工艺正交实验因素水平表

Table 2 Factors and levels of the orthogonal experiment for the extraction process of Polygonatum cyrtonema Hua

| 水平 | 因素          |          |         |
|----|-------------|----------|---------|
|    | D 料液比(g/mL) | E 时间/min | F 温度/°C |
| 1  | 1:20        | 100      | 60      |
| 2  | 1:40        | 80       | 100     |
| 3  | 1:50        | 120      | 90      |

#### 1.3.4 黄精茶饮配方的筛选

按最优工艺参数分别提取祁红和多花黄精, 取原浓度祁红和多花黄精提取液, 分别按 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 的体积比配制多花黄精祁红复合饮料(以下简称“黄精茶饮”, PK), 参考刘文静<sup>[22]</sup>的方法制定感官评分标准, 从色、香、味、形 4 个角度进行标准设定和赋值, 具体参见表 3。邀请 10 名具有相关品评经验的评审员组成评分小组, 分别对饮料样品进行感官评价。评审员每品尝一个样品后根据感官评分标准评分, 为了避免味觉迟钝, 漱口并停顿 60 s 后品尝下一个样品, 分值越高表示品质越好。筛选出祁红与多花黄精提取液的最佳配比。按照最佳配方制得的黄精茶饮用于后续实验。

表 3 感官评分标准

Table 3 Sensory rating criteria

| 项目   | 评分标准               | 分值    |
|------|--------------------|-------|
| 色泽   | 呈酒红色、黄褐色或淡黄色, 色泽均一 | 16~20 |
|      | 颜色偏暗、色泽均一          | 6~15  |
|      | 颜色偏暗, 色泽不均         | 0~5   |
| 气味   | 香气明显, 无不良气味        | 15~30 |
|      | 香气过淡, 无不良气味        | 8~14  |
| 口感   | 有异味                | 0~7   |
|      | 口感柔和, 清甜、微涩或不涩     | 21~30 |
|      | 口感较涩               | 10~20 |
| 组织形态 | 口感苦涩               | 0~9   |
|      | 颜色均匀且澄清            | 16~20 |
|      | 颜色较均匀、静置稍有沉淀       | 6~15  |
|      | 溶液较浑浊、静置有沉淀        | 0~5   |

#### 1.3.5 理化指标

多酚含量采用福林酚法<sup>[23]</sup>进行测定。以没食子酸标准工作液质量为横坐标(X, mg), 反应液吸光度为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。标准曲线线性方程为:  $Y=4.2252X+0.0096$  ( $r^2=0.9977$ )。

多糖含量采用硫酸-苯酚法<sup>[24]</sup>进行测定。以葡萄糖标准工作液质量浓度为横坐标(X, mg/mL), 反应液吸光度为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。标准曲线线性方程为:  $Y=9.9485X+0.016$  ( $r^2=0.9964$ )。

### 1.3.6 黄精茶饮对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响

参考 YANG 等<sup>[25]</sup>方法并稍做修改,将生长期密度为  $1 \times 10^5$  的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱培养 24 h。细胞贴壁后,将细胞分为对照组、250、500、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (多花黄精生药量,下同)黄精茶饮组。对照组加入 10  $\mu\text{L}$  PBS,其他组分别加入 10  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的黄精茶饮,每孔 6 个复孔,继续培养 24 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT,4 h 后弃去上清液,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,摇床上轻摇 10 min,于酶标仪 490 nm 处测定吸光度,按照公式(1)计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{给药组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.3.7 黄精茶饮对 RAW264.7 巨噬细胞对中性红吞噬率的影响

参考热西代姆·阿卜力孜等<sup>[26]</sup>方法并稍做修改,将生长期密度为  $1 \times 10^5$  的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱培养 24 h。细胞贴壁后,将细胞分为对照组、LPS 组及 250、500、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黄精茶饮组。对照组加入 10  $\mu\text{L}$  PBS,LPS 组加入 10  $\mu\text{L}$  终质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS,黄精茶饮组分别加入 10  $\mu\text{L}$  不同浓度黄精茶饮,每孔 6 个复孔。继续培养 24 h,弃上清,每孔加入 5% 中性红溶液 100  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,弃中性红溶液,PBS 每孔冲洗 2 次,加 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液,静置 10 min,于 540 nm 处测吸光度,按照公式(2)计算吞噬率。

$$\text{吞噬率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{给药组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.3.8 黄精茶饮对免疫抑制小鼠的免疫调节作用

参照 LIU 等<sup>[27]</sup>方法并稍做修改,将 70 只昆明种雄性小鼠随机分为 7 组( $n=10$ ),即空白组、模型组、黄精茶饮低、中、高剂量组(PK-L、PK-M、PK-H,多花黄精生药量分别为 200、1000、2000  $\text{mg}/\text{kg}$ )、多花黄精组(PC,1000  $\text{mg}/\text{kg}$ )、阳性组(Positive,20  $\text{mg}/\text{kg}$ )。空白组和模型组小鼠每天灌胃给予适量超纯水,黄精茶饮低、中、高剂量组小鼠每天灌胃给予不同剂量黄精茶饮,多花黄精组小鼠每天灌胃给予多花黄精提取液,阳性组小鼠每天灌胃给予左旋咪唑。每组小鼠灌胃给药 14 d,每天 1 次。第 15 d 开始,空白组小鼠每天腹腔注射生理盐水(0.01  $\text{mL}/\text{g}$ ),其他组小鼠腹腔注射环磷酰胺(30  $\text{mg}/\text{kg}$ ),每天 1 次,连续 3 d,实验期间小鼠自由进食饮水。末次给药后,小鼠禁食 12 h,称重后颈椎脱臼处死,立即摘取小鼠胸腺、脾脏,用 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷生理盐水冲尽胸腺、脾脏表面浮血,滤纸拭干,称重,按照公式(3)计算胸腺指数及脾脏指数。

$$\text{胸腺(脾脏)指数}/\% = \frac{\text{胸腺(脾脏)质量}(\text{g})}{\text{小鼠体重}(\text{g})} \times 100\% \quad (3)$$

## 1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,用 Origin 2018 作图,所有检测结果以均值 $\pm$ 标准偏差表示,

采用单因素方差分析比较各组间的均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 祁红提取工艺单因素实验结果

当茶水比 $\leq 1:80$  ( $\text{g}/\text{mL}$ )时,茶叶质量占比越小,茶多酚提取率越高,当茶水比为 1:80 ( $\text{g}/\text{mL}$ )时,茶多酚提取率达到最大值(4.82 $\pm$ 0.06)%。当茶水比 $\geq 1:60$  ( $\text{g}/\text{mL}$ ),茶多酚的提取率趋于平稳,虽与 1:80 ( $\text{g}/\text{mL}$ )无显著性差异,但为了减少成本,选择茶叶质量占比较小的 1:80 ( $\text{g}/\text{mL}$ )。随着浸提时间延长,茶多酚的提取率越高。在浸提时间为 30 min 时,茶多酚提取率达到最大为(6.00 $\pm$ 0.15)%。浸提时间较短时,祁红茶汤香味淡,颜色呈透明的黄棕色,随着浸提时间的延长,茶汤香味逐渐浓烈。当浸提时间不小于 20 min 时,茶多酚的提取率逐渐趋于平稳,但 30 min 时茶香味更加浓郁,因此,选择茶多酚提取率较高且香味较浓郁的的条件,即 30 min。温度升高,分子运动增强,溶剂与物料充分接触,导致多酚溶出增加<sup>[28]</sup>,当浸提温度在 80~100 $^{\circ}\text{C}$ 之间,随着温度的升高,茶多酚提取率随之增加,在浸提时间为 100 $^{\circ}\text{C}$ 时,茶多酚含量最高,为(6.79 $\pm$ 0.10)%,而用水浸提最高温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ ,无法升高温度,因此选择浸提温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.2 多花黄精提取工艺单因素实验结果

在料液比为 1:20 ( $\text{g}/\text{mL}$ )时,多糖含量达到一个峰值为(44.23 $\pm$ 1.03)%,之后稍有降低,随着料液比的增加,多花黄精多糖提取率随之增加,并逐渐趋于平稳,在 1:50 ( $\text{g}/\text{mL}$ )时达到最大值,为(51.85 $\pm$ 1.59)%,同样,为了减少成本,选择黄精质量占比较小且浓度较适宜的 1:50 ( $\text{g}/\text{mL}$ )。浸提时间在 60~120 min 时,随着浸提时间的增加,黄精多糖的提取率逐渐增加,在 120 min 时多糖含量达到最大,为(52.27 $\pm$ 0.89)%。考虑到成本问题,本研究未继续增加提取时间,选择 120 min。浸提温度在 60~80 $^{\circ}\text{C}$ 时,随着温度的升高,多花黄精多糖提取率较稳定,但在 80~100 $^{\circ}\text{C}$ 时,多糖提取率逐渐增加,并在 100 $^{\circ}\text{C}$ 时提取含量达到最大值,为(50.49 $\pm$ 0.40)%,由于无法继续升高水温,因此选择较优条件 100 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.3 正交实验结果

祁红提取工艺正交实验结果见表 4,由极差分析可知,影响祁红茶多酚提取率的各因素的主次顺序为  $A > C > B$ ,即茶水比 $>$ 浸提温度 $>$ 浸提时间。在综合评价中,茶水比对祁门红茶多酚的溶出影响最大。由表 4 可知,祁门红茶的正交实验最优组为  $A_3B_3C_3$ 。经过单因素实验与正交实验发现, $K$  值最优组与单因素实验最优组是同一组,即  $A_3B_3C_3$ ,为祁门红茶的最佳浸提条件,即茶水比为 1:80 ( $\text{g}/\text{mL}$ )、浸提时间为 30 min、浸提温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 。按照此条件浸提的祁门红茶呈透明的黄棕色,口感较醇厚,有祁门红茶特有的清香,颜色均匀澄清。

表 4 祁门红茶提取工艺正交实验结果表  
Table 4 Results of the orthogonal test for the extraction process of Keemun black tea

| 序号    | A           | B     | C     | 多酚提取率/% |
|-------|-------------|-------|-------|---------|
| 1     | 1           | 1     | 1     | 4.18    |
| 2     | 1           | 2     | 2     | 5.54    |
| 3     | 1           | 3     | 3     | 5.59    |
| 4     | 2           | 1     | 2     | 5.13    |
| 5     | 2           | 2     | 3     | 5.70    |
| 6     | 2           | 3     | 1     | 5.24    |
| 7     | 3           | 1     | 3     | 6.88    |
| 8     | 3           | 2     | 1     | 5.86    |
| 9     | 3           | 3     | 2     | 6.34    |
| $K_1$ | 15.32       | 16.19 | 15.28 |         |
| $K_2$ | 16.07       | 17.11 | 17.01 |         |
| $K_3$ | 19.08       | 17.17 | 18.18 |         |
| R     | 3.76        | 0.98  | 2.90  |         |
| 最优方案  | $A_3B_3C_3$ |       |       |         |

多花黄精浸提条件正交实验结果见表 5, 由极差分析可知, 影响多花黄精多糖含量的各因素的主次顺序为  $E>D>F$ , 即浸提时间>料液比>浸提温度。在综合评价中, 浸提时间对多花黄精多糖提取的影响最大。由表 5 可知, 多花黄精的正交实验最优组为  $D_1E_3F_3$ 。对单因素实验最优组  $D_3E_3F_2$  与正交实验最优组  $D_1E_3F_3$  进行验证实验。经验证, 按照  $D_1E_3F_3$  浸提条件提取的多花黄精多糖提取率为  $(56.94\pm 1.56)\%$ , 而单因素最优组  $D_3E_3F_2$  提取的多糖含量为  $(50.49\pm 0.40)\%$ 。最终得出多花黄精的最佳浸提条件为  $D_1E_3F_3$ , 即料液比为 1:20 (g/mL)、浸提时间为 120 min、浸提温度为 90°C。按照此条件浸提的多花黄精呈淡黄色, 口感香甜清冽, 颜色澄清透亮。

表 5 多花黄精提取工艺正交实验结果  
Table 5 Results of the orthogonal test for the extraction process of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua

| 序号    | D           | E      | F      | 多糖提取率/% |
|-------|-------------|--------|--------|---------|
| 1     | 1           | 1      | 1      | 48.89   |
| 2     | 1           | 2      | 2      | 44.03   |
| 3     | 1           | 3      | 3      | 56.94   |
| 4     | 2           | 1      | 2      | 46.36   |
| 5     | 2           | 2      | 3      | 51.06   |
| 6     | 2           | 3      | 1      | 49.59   |
| 7     | 3           | 1      | 3      | 43.93   |
| 8     | 3           | 2      | 1      | 48.92   |
| 9     | 3           | 3      | 2      | 51.97   |
| $K_1$ | 149.86      | 132.39 | 140.61 |         |
| $K_2$ | 147.01      | 144.01 | 142.36 |         |
| $K_3$ | 138.03      | 158.50 | 151.93 |         |
| R     | 11.83       | 26.11  | 11.32  |         |
| 最优方案  | $D_1E_3F_3$ |        |        |         |

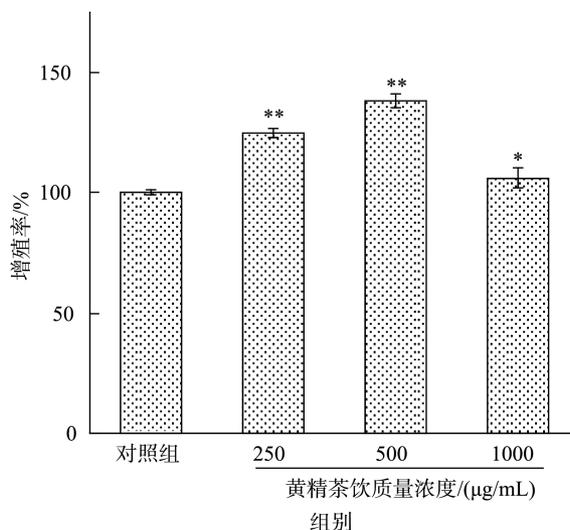
## 2.4 黄精茶饮配比筛选

当祁红与多花黄精提取液 1:1 (V:V) 复配时, 祁门红茶的苦涩味较重, 影响复合饮料的口感, 感官评分较低。随着多花黄精提取液占比增加, 复合饮料感官评分逐渐升高, 当祁红与多花黄精提取液的比例为 1:3 (V:V) 时, 复合饮料感官评分最高, 为 94 分。此时, 复合饮料中黄精多糖含量为  $(46.07\pm 2.91)\%$ , 茶多酚含量为  $(1.59\pm 0.04)\%$ , 浓度为  $(199.04\pm 4.61)$  mg/kg, 符合 GB/T 21733—2008《茶饮料》规定的茶多酚含量不小于 150 mg/kg。继续增加多花黄精提取液的比例, 复合饮料的整体品质逐渐下降, 香气不明显, 味道较清淡, 无特殊风味。因此, 祁红与多花黄精提取液的最佳配比为 1:3。

## 2.5 黄精茶饮对 RAW264.7 细胞的增殖影响

免疫应答是机体重要的生理过程, 巨噬细胞通过其吞噬、细胞毒性和细胞内杀伤活动发挥重要作用<sup>[29]</sup>。巨噬细胞一旦被激活, 可通过吞噬作用直接杀死病原体, 也可以通过产生 NO 等信号因子间接杀死病原体<sup>[30]</sup>。RAW264.7 细胞是小鼠单核巨噬细胞, 在体外对抗原表现出较强的吸附和吞噬作用, 并能对抗原的刺激做出反应, 释放相关的免疫调节介质, 能在体外模拟巨噬细胞的免疫调节<sup>[31]</sup>。

如图 2 所示, 分别用不同质量浓度黄精茶饮处理 RAW264.7 细胞。结果表明, 与对照组相比, 在黄精茶饮质量浓度为 250、500、1000  $\mu\text{g/mL}$  时, 对 RAW264.7 巨噬细胞的生长具有一定促进作用, 并在 500  $\mu\text{g/mL}$  时达到峰值, 增殖率为  $(138.06\pm 3.06)\%$ 。相对于 250、500  $\mu\text{g/mL}$ , 当黄精茶饮质量浓度增加到 1000  $\mu\text{g/mL}$  时, RAW264.7 细胞的增殖率稍有降低, 可能高浓度的黄精茶饮对 RAW264.7 细胞具有一定抑制作用<sup>[32]</sup>。综上, 在一定质量浓度范围内, 黄精茶饮具有促进 RAW264.7 巨噬细胞增殖的活性。



注: 与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 下同。

图 2 黄精茶饮对 RAW264.7 细胞增殖的影响( $n=6$ )

Fig.2 Proliferation effects of PK on RAW264.7 cells ( $n=6$ )

## 2.6 黄精茶饮对 RAW264.7 细胞吞噬率的影响

如图 3 所示,用 RAW264.7 巨噬细胞对中性红的吞噬率来评估黄精茶饮的免疫活性。结果显示,与对照组相比,阳性药 LPS 组吞噬率增加并具有极显著差异性( $P<0.01$ ),表明实验操作可靠。与对照组相比,黄精茶饮 500、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组细胞吞噬率增加并具有极显著差异性( $P<0.01$ ),而在 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时无显著差异性,表明黄精茶饮在一定浓度下才能够促进 RAW264.7 巨噬细胞吞噬,具有一定的免疫增强作用。

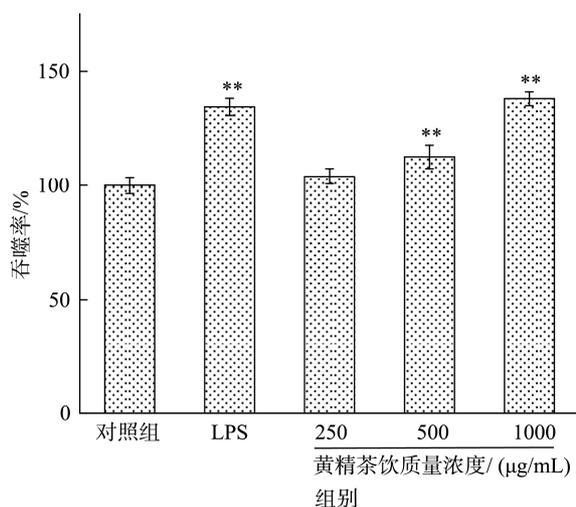
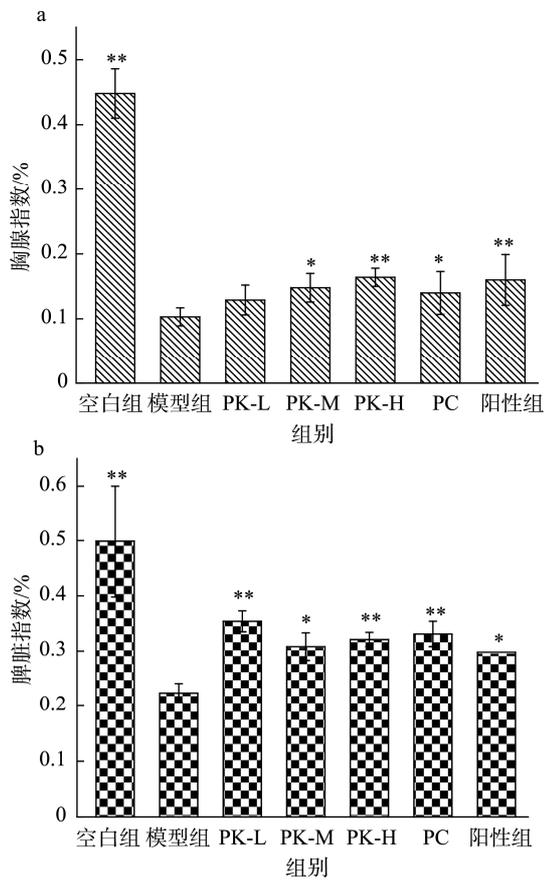


图 3 黄精茶饮对 RAW264.7 细胞吞噬率的影响( $n=6$ )

Fig.3 Effects of PK on phagocytic rates of RAW264.7 cells ( $n=6$ )

## 2.7 黄精茶饮对免疫抑制小鼠脏器指数的影响

胸腺和脾脏是重要的免疫器官,可以直接反映机体的免疫功能。当免疫系统受损时,胸腺和脾脏会变小且其质量会减轻<sup>[33]</sup>。由图 4 可知,与对照组相比,模型组小鼠用环磷酸胺处理后,胸腺、脾脏指数明显降低,表明环磷酸胺成功诱导了小鼠免疫抑制。与模型组相比,PK-L 组脾脏指数极显著升高( $P<0.01$ ),PK-M 组胸腺和脾脏指数显著升高( $P<0.05$ ),PK-H 组胸腺和脾脏指数极显著升高( $P<0.01$ )。黄精茶饮组胸腺、脾脏指数较模型组高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),表明黄精茶饮具有免疫增强作用。与模型组相比,PC 组小鼠胸腺和脾脏指数均具有显著差异性,表明黄精多糖可能是免疫增强作用的药效成分,与已有研究结果一致<sup>[4-6]</sup>。研究表明,茶多酚也具有免疫增强作用<sup>[10-11,34]</sup>。据此推测,黄精茶饮发挥免疫增强作用可能是由于黄精多糖和茶多酚共同作用的结果。因此,黄精茶饮在增强免疫力方面具有很大的潜力,可以发展成为日常生活中提高免疫力的功能饮料。此外,根据本研究结果和动物与人剂量等效换算<sup>[35]</sup>,建议黄精茶饮的成人日饮用量为 40~280 mL。



注: a 胸腺指数; b 脾脏指数。

图 4 黄精茶饮对免疫抑制小鼠脏器指数的影响( $n=10$ )

Fig.4 Effects of PK on viscera indexes in immunosuppressed mice ( $n=10$ )

## 3 结论

本研究通过单因素和正交实验得出多花黄精和祁红最佳浸提条件;通过感官评分,确定祁门红茶与多花黄精提取液的最佳体积比为 1:3,此时,黄精茶饮口感香甜清冽,颜色澄清透亮,茶香浓郁,尾调甘甜,茶多酚含量为(1.59±0.04)%,多糖含量为(46.07±2.91)%。细胞实验和动物实验结果表明,黄精茶饮在增强免疫力方面具有很大的潜力,可用于开发提高免疫力的功能饮料,建议成人日饮用量为 40~280 mL(其中多糖含量为 921.4~6449.8 mg,茶多酚含量为 8.0~55.7 mg)。

## 参考文献

- [1] 杨迎,侯婷婷,王威,等.黄精多糖的药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2022,37(3):659-665.
- YANG Y, HOU TT, WANG W, et al. Research progress on pharmacological effects of polysaccharides from *Polygonati rhizoma* [J]. Drugs Clin, 2022, 37(3): 659-665.
- [2] ZHAO X, PATIL S, QIAN A, et al. Bioactive compounds of *Polygonatum*

- sibiricum*-therapeutic effect and biological activity [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Tar*, 2022, 22(1): 26–37.
- [3] 任洪民, 邓亚羚, 张金莲, 等. 药用多花黄精炮制的历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4163–4182.  
REN HM, DENG YL, ZHANG JL, *et al.* Research progress on processing history evolution, chemical components and pharmacological effects of *Polygonati rhizome* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(17): 4163–4182.
- [4] SUN T, ZHANG H, LI Y, *et al.* Physicochemical properties and immunological activities of polysaccharides from both crude and wine-processed *Polygonatum sibiricum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 255–264.
- [5] CHEN Z, LIU J, KONG X, *et al.* Characterization and immunological activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(6): 959–967.
- [6] WANG Y, LIU N, XUE X, *et al.* Purification, structural characterization and *in vivo* immunoregulatory activity of a novel polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 160: 688–694.
- [7] 张从敬, 陈子怡, 牟欣尚, 等. 黄精产业发展现状与趋势[J]. *农业科技通讯*, 2021, (3): 10–12.  
ZHANG CJ, CHEN ZY, MOU XS, *et al.* Development status and trend of *Polygonati rhizoma* industry [J]. *Bull Agric Sci Technol*, 2021, (3): 10–12.
- [8] 陈宗懋. 中国茶叶大辞典•茶类部[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.  
CHEN ZM. Chinese tea dictionary•Tea part [M]. Beijing: China Light Ind Press, 2000.
- [9] 安徽省非遗保护中心. 祁门红茶[J]. *江淮文史*, 2019, (6): 2.  
Anhui Intangible Cultural Heritage Protection Center. Keemun black tea [J]. *Jiang Huai Cult Hist*, 2019, (6): 2.
- [10] WANG S, LI Z, MA Y, *et al.* Immunomodulatory effects of green tea polyphenols [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3755.
- [11] HE Y, HUANG L, JIANG P, *et al.* Immunological regulation of the active fraction from *Polygonatum sibiricum* F. Delarochae based on improvement of intestinal microflora and activation of RAW264.7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115240.
- [12] ZHAO CN, TANG GY, CAO SY, *et al.* Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(7): 215.
- [13] RAMADAN G, EL-BEIH NM, TALAAT RM, *et al.* Anti-inflammatory activity of green versus black tea aqueous extract in a rat model of human rheumatoid arthritis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2017, 20(2): 203–213.
- [14] GAN RY, LI HB, SUI ZQ, *et al.* Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(6): 924–941.
- [15] LI Y, WANG C, HUAI Q, *et al.* Effects of tea or tea extract on metabolic profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of ten randomized controlled trials [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32(1): 2–10.
- [16] 张禹佳, 牛丛丛, 吴小文. 茶叶深加工产业现状与发展态势-基于专利计量分析视角[J]. *茶叶通讯*, 2021, 48(3): 536–542.  
ZHANG YJ, NIU CC, WU XW. Current situation and development trend of tea deep processing industry-Based on the perspective of patent econometric analysis [J]. *J Tea Commun*, 2021, 48(3): 536–542.
- [17] 谢忠稳, 李梦婉, 周磊, 等. 一种复合茶及其在制备预防代谢综合征的食品和保健品中的应用: 中国, CN110558401A[P]. 2019-12-13.  
XIE ZW, LI MW, ZHOU L, *et al.* The invention relates to a compound tea and its application in the preparation of food and health care products for the prevention of metabolic syndrome: China, CN110558401A [P]. 2019-12-13.
- [18] 李脉泉, 张灿, 殷奔新, 等. 冲泡方式对祁门红茶茶汤品质的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(24): 9507–9513.  
LI MQ, ZHANG C, YIN BX, *et al.* Effects of brewing methods on the quality of Keemun black tea soup [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(24): 9507–9513.
- [19] 朱云. 祁门红茶的传承与发展[J]. *中国茶叶加工*, 2018, (4): 77–79.  
ZHU Y. Inheritance and development of Keemun black tea [J]. *China Tea Process*, 2018, (4): 77–79.
- [20] 张梓原, 徐伟, 王鑫, 等. 黄精多糖的提取工艺对比研究[J]. *包装工程*, 2020, 41(9): 51–58.  
ZHANG ZY, XU W, WANG X, *et al.* Comparative study on extraction technologies of polysaccharides from *Polygonatum rhizoma* [J]. *Packag Eng*, 2020, 41(9): 51–58.
- [21] 贾宇涵, 吴澎, 郗良卿, 等. 黄精多糖提取工艺及功能作用研究进展[J]. *中国调味品*, 2018, 43(11): 157–161.  
JIA YH, WU P, XI LQ, *et al.* Research progress on extraction technology and functions of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. *China Cond*, 2018, 43(11): 157–161.
- [22] 刘文静. 雪樱子石榴复合饮料研制及其抗运动性疲劳作用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(12): 203–208.  
LIU WJ. Preparation of *Amaranthus caudatus* L. and *Punica granatum* composite beverage and its resisting exercise fatigue effect [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(12): 203–208.
- [23] 李晓萌, 李佳惠, 王雨行, 等. 响应面优化莲藕多酚提取工艺及其生物活性研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(1): 203–211.  
LI XM, LI JH, WANG YX, *et al.* Optimization of extraction process and bioactivities of polyphenols from lotus root by response surface method [J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(1): 203–211.
- [24] 田先娇, 罗雪维, 杨新周, 等. 不同炮制方式对黄精有效成分含量的影响[J]. *化学试剂*, 2021, 43(6): 790–794.  
TIAN XJ, LUO XW, YANG XZ, *et al.* The effects of different processing methods on components in *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl [J]. *Chem Reag*, 2021, 43(6): 790–794.
- [25] YANG Y, CHEN J, LEI L, *et al.* Acetylation of polysaccharide from *Morchella angusticeps* peck enhances its immune activation and anti-inflammatory activities in macrophage RAW264.7 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 125: 38–45.
- [26] 热西代姆·阿卜力孜, 李敏, 胡君萍. 锁阳多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(21): 5694–5698.

- RAXIDAM APLM, LI M, HU JP. Effect of polysaccharide from *Cynomorium songaricum* on the immunoregulatory effect of RAW264.7 macrophages cell [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(21): 5694–5698.
- [27] LIU N, DONG Z, ZHU X, *et al.* Characterization and protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 796–802.
- [28] 高岳, 尹帅, 袁孝瑞, 等. 响应面法优化花椒叶多酚提取工艺及其抗氧化活性[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(6): 68–74.
- GAO Y, YIN S, YUAN XR, *et al.* Optimization of extraction process of polyphenols from *Zanthoxylum bungeanum* leaf by response surface methodology and its antioxidant activities [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(6): 68–74.
- [29] REN D, LIN D, ALIM A, *et al.* Chemical characterization of a novel polysaccharide ASKP-1 from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed and its macrophage activation via MAPK, PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. *Food Funct*, 2017, 8(3): 1299–1312.
- [30] MA X, MENG M, HAN L, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of *Grifola frondosa* polysaccharide via toll-like receptor 4-mitogen-activated protein kinases-nuclear factor  $\kappa$ B pathways [J]. *Food Funct*, 2016, 7(6): 2763–2772.
- [31] WANG J, WANG H, ZHANG H, *et al.* Immunomodulation of ADPs-1a and ADPs-3a on RAW264.7 cells through NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 1024–1030.
- [32] 李思媛, 崔玉顺, 李新星, 等. 黄精皂苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. *中成药*, 2021, 43(10): 2659–2665.
- LI SY, CUI YS, LI XX, *et al.* Anti-inflammatory effect and mechanism of *Polygonati rhizoma* saponins on inflammation model of LPS-induced RAW264.7 cells [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(10): 2659–2665.
- [33] LI WJ, LI L, ZHEN WY, *et al.* *Ganoderma atrum* polysaccharide ameliorates ROS generation and apoptosis in spleen and thymus of immunosuppressed mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 99: 199–208.
- [34] 于娟, 纪海玉, 白云, 等. 红茶多酚对 H22 荷瘤小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(10): 49–55.
- YU J, JI HY, BAI Y, *et al.* Immunomodulatory and antioxidant effects of black tea polyphenols on H22 tumor-bearing mice [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(10): 49–55.
- [35] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, (9): 1069–1072.
- HUANG JH, HUANG XH, CHEN ZY, *et al.* Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, (9): 1069–1072.

(责任编辑: 郑丽 韩晓红)

### 作者简介



杨迎, 硕士研究生, 主要研究方向为天然产物研究与开发。

E-mail: yangying172@foxmail.com



刘东, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药和天然产物及其纳米药物的制备及质量控制。

E-mail: liudong3000@126.com