

低值单枞茶中茶多酚提取的比较研究

江东文¹, 江绮晴¹, 黄佳佳², 杨公明³, 杜冰³

(1. 广东省生产许可证审查服务中心, 广东广州 510220) (2. 广东产品质量监督检验研究院, 广东佛山 528300)
(3. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本文对低值单枞茶中茶多酚的提取进行了比较研究。采用热水浸提法、复合酶法、超高压法、复合酶结合乙醇提取法及复合酶辅助超高压提取法对低值单枞茶叶中的茶多酚进行提取, 分析比较各提取液的茶多酚含量、儿茶素组分和抗氧化性能评价。结果表明, 复合酶辅助超高压提取法提取茶多酚的得率最高达 31.07%, 其粗提液中抗氧化活性成分明显高于其它提取液, 且清除·OH 自由基的能力最强。

关键词: 单枞茶; 茶多酚; 提取

文章编号: 1673-9078(2012)9-1161-1165

The Comparison Study of Different Methods to Extract Tea Polyphenols from Low Value Dancong Tea

JIANG Dong-wen¹, JIANG Qi-qing¹, HUANG Jia-jia², YANG Gong-ming³, DU Bing³

(1. Guangdong Inspection Service Center of Production Licence, Guangzhou 510220, China)

(2. Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

(3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 528231, China)

Abstract: The research aimed to comparison study the extraction processes of tea polyphenol like hot water extraction, enzyme extraction, ultra-high pressure extraction, enzyme extraction combined with ethanol and enzyme extraction assisted with high pressure. Taking low value Dancong Tea as raw material and the yield of tea polyphenols as index, and comparing the the components of Catechin and antioxidant capacity of crude extracts by the five extraction methods. The results showed that the method of combined-enzyme extraction assisted with UHP get the highest extraction rate of 31.07%. Moreover, the antioxidation of the extra by this way was significantly higher than other methods and had the strongest ability to eliminate ·OH.

Key words: dancong tea; tea polyphenol; extraction

单枞茶是广东省乌龙茶的特色品种, 产量高、且产区集中, 香气成分、生物活性物质含量高, 是极具市场潜力的茶叶资源。但近年来市场上却出现单枞茶滞销的现象, 且价格持续下跌。据调查, 单枞茶在汕头茶市的占有率却不到二成。究其原因主要是单枞茶作为一种地方特色茶, 其口味不易被外界接受, 在很大程度上就限制了单枞茶的潜在市场; 另外, 当前大量单枞茶在乌龙茶工艺制作过程普遍存在发酵不足的问题, 这样的茶泡起来带青味, 稍微浸泡就会苦涩, 以致存在“喝单枞茶伤胃”之说, 这更是让单枞茶的销售陷入低迷, 严重影响了茶农的收益, 沉重打击茶农的生产积极性, 制约山区农业经济的发展。由于单枞

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 广东省教育部产学研项目(2009B090300138)、(2011B090400071)

作者简介: 江东文(1984-), 硕士研究生, 研究方向食品科学

通讯作者: 杜冰, 博士, 副教授, 主要从事食品加工新技术方面研究

茶揉捻程度较重, 尤其是夏暑茶, 在正常冲泡条件下茶汤较浓, 若在做青工艺后, 再增加发酵工艺, 不仅可以降低夏暑茶的苦涩味, 还可形成具蜜香型红茶的特征, 有利于提高单枞茶的经济效益^[1]。郑挺盛等研究表明重发酵单枞茶比传统单枞乌龙茶香气成分种类多, 且芳樟醇氧化物要远高于传统乌龙茶。且秋茶、春茶单枞香气品质得分比夏茶、暑茶高, 即秋茶、春茶香气品质要比夏、暑茶好^[1]。

我国茶树栽培面积及茶叶产量均为世界第一。目前中低档茶叶的深加工以提取茶多酚^[2-3]、多糖和水浸出物为主^[4]。目前国内外茶多酚粗品的提取的方法主要有: 溶剂提取法^[5-7]、超声波浸提方法^[8]、微波浸提法^[9]、离子沉淀法^[10]、树脂吸附分离法^[11]、超临界流体萃取法^[12]等。此外, 也有利用低温纯化酶提取法^[13]、超高压提取法^[14]和膜分离法^[15]等进行茶多酚的提取。纵观目前国内外对茶多酚提取方法的报道, 大多数工

艺的茶多酚提取率都不到 15%，而且目前应用较多的溶剂萃取法和离子沉淀法所得的产品具有潜在危害，还需要进一步改进。本研究通过比较五种提取制备茶多酚的方法，以选择最有效的提取方法，在保证茶多酚提取效率的同时，最大程度上维持茶多酚的功效。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

单枞茶，兴宁市南华现代农业有限公司；复合植物水解酶，活力：1000 U/mL；福林酚，广州市齐云试剂公司；无水乙醇磷酸氢二钠、磷酸二氢钾等均为分析醇；乙酸、甲醇等均为色谱醇；实验用水为蒸馏水和高纯水。

儿茶素，中国药品生物制品检定所。标准溶液的配制：精确称取 0.0750 mg 儿茶素标品于 500 mL 的容量瓶中，用高纯水溶解定容。用移液器精确移取 10、20、40、60、80、100 mL 母液于 100 mL 的容量瓶中，用高纯水定容至 100 mL，配制成 15、30、60、90、120、150 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

流动 A、B 液：A 相为含 0.1% 乙酸的水，B 相为甲醇。

高效液相色谱，美国 water 公司；UHP900-2 * 2 (II) 超高压处理机，中国兵器科学研究所和华南农业大学食品学院联合研制；752N 型紫外线可见光光度计，上海精密科学仪器有限公司；HH-4 型数显恒温水浴锅，金坛市富华仪器有限公司；PL203 电子分析天平，梅特勒-托利多；SHZ-III 型循环水真空抽滤机，上海亚荣生化仪器厂；玻璃仪器等。

1.2 试验方法

1.2.1 茶叶前处理

利用液氮粉碎机快速将茶叶破碎^[6]，过 60 目筛后，放冰箱备用。

1.2.2 茶多酚提取

1.2.2.1 热水浸提法

称取 3.0 g (准确至 0.001 g) 茶粉于 500 mL 锥形瓶中，加沸蒸馏水 450 mL，立即移入沸水浴中，浸提 45 min (每隔 10 min 摇动一次)。浸提完毕后立即趁热减压过滤。滤液移入 500 mL 容量瓶中，残渣用少量热蒸馏水洗涤 2~3 次，并将滤液滤入上述容量瓶中，冷却后用蒸馏水稀释至刻度。得粗提液，备用。

1.2.2.2 复合酶解法

称取 1.000 g 单枞茶叶粉末于三角瓶中，依次添加 pH 为 4.8 柠檬酸缓冲溶液 100 mL 和 3.0 μL 复合水解酶，在酶解温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件进行酶解处理 120 min。浸提完毕后立即趁热减压过滤，滤液移入 250 mL

容量瓶中，残渣用少量热蒸馏水洗涤 2~3 次，并将滤液滤入上述容量瓶中，冷却后用蒸馏水稀释至刻度。得粗提液，备用。

1.2.2.3 超高压提取法

称取 1.000 g 单枞茶叶粉，加入浓度为 60% 的乙醇溶液 50 mL，在作用压力为 300 MPa 条件下，保压处理为 1.5 min。浸提完毕后立即趁热减压过滤。滤液移入 250 mL 容量瓶中，残渣用少量热蒸馏水洗涤 2~3 次，并将滤液滤入上述容量瓶中，冷却后用蒸馏水稀释至刻度。得粗提液，备用。

1.2.2.4 酶处理乙醇浸提法

称取 1.000 g 茶粉末于三角瓶中，依次添加适量的 pH 为 4.8 的柠檬酸缓冲溶液和 3.0 μL 复合水解酶，在酶解温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行预处理 120 min，然后往其中加入浓度为 70% 的乙醇溶液 50 mL，在提取温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 的条件提取 60 min。浸提完毕后立即趁热减压过滤。滤液移入 250 mL 容量瓶中，残渣用少量热蒸馏水洗涤 2~3 次，并将滤液滤入上述容量瓶中，冷却后用蒸馏水稀释至刻度。得粗提液，备用。

1.2.2.5 酶辅助超高压乙醇浸提法

称取 1.000 g 茶粉末于三角瓶中，依次添加适量的 pH 4.8 的柠檬酸缓冲溶液和 3.0 μL 复合水解酶，在酶解温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行预处理 120 min，然后往其中加入浓度为 60% 的乙醇溶液 50 mL，在作用压力为 300 MPa 条件下，保压处理为 1.5 min。浸提完毕后立即趁热减压过滤。滤液移入 250 mL 容量瓶中，残渣用少量热蒸馏水洗涤 2~3 次，并将滤液滤入上述容量瓶中，冷却后用蒸馏水稀释至刻度。得粗提液，备用。

1.3 茶多酚含量测定

茶多酚含量测定：GBT 8313-2008 茶多酚和儿茶素类含量的检测方法。

水分含量测定：GB/T 8304-2002 茶水分测定。

1.4 儿茶素组分含量测定：高效液相色谱法

样液制备：用移液器各取 10.0 mL 粗提液，用含有 26.1% 甲醇的水溶液稀释至 100 mL，稀释液经 0.2 μm 微孔滤膜过滤，备用。

色谱条件：色谱柱为 Sun Fire C18 (5 μm)；紫外检测器：检测波长 280 nm；流动相由 A、B 两相组成，A 相为含 0.1% 乙酸的水，B 相为甲醇，A:B=76.5:23.5，流速为 1.0 mL/min；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：20 μL 。

1.5 抗氧化性能评价

抗氧化性能测定：参照 Fenton 反应性能评价法^[7]。

2 结果与分析

2.1 儿茶素检测波长的选择

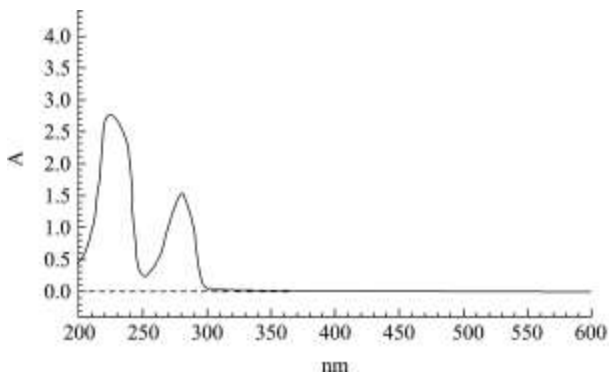


图1 儿茶素对照品的紫外吸收光谱图

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrogram of catechin

由紫外光谱扫描得儿茶素对照品混合溶液的最大吸收波长在 270~285 nm 之间,紫外扫描见图1。由于在 215~235 nm 波长处也有较大吸收,所以同时将 220 nm 和 280 nm 作为检测波长进行了比较。试验结果:检测波长为 220 nm 时,色谱基线相当不稳定,毛刺较多。而检测波长为 280 nm 时,不仅色谱峰形较好,基线平稳,并且各组分能很好地分离(见图2)。固选择 280 nm 作为检测波长。

2.2 儿茶素混合对照品色谱图

试验以甲醇-水-乙酸作为流动相,在 280 nm 的检测波长下,分离得到儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素没食子酸酯(CG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),具体出峰情况见图2。

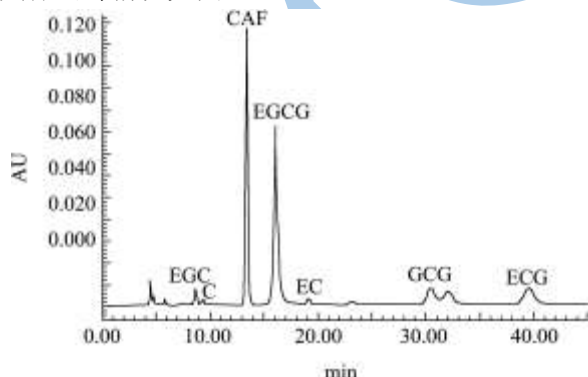


图2 儿茶素对照品的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of catechin reference substance reference substance

2.3 各种方法提取效果对比

由图3分析可知,五种提取方法均能对茶多酚进行有效提取,但效果不一。五种方法的提取效果依次

是:酶辅助超高压乙醇浸提法>酶处理乙醇浸提法>超高压法>热水浸提法>复合酶解法。说明经酶预处理后的茶粉,更有利于提取,且酶辅助超高压乙醇浸提法效果更优。

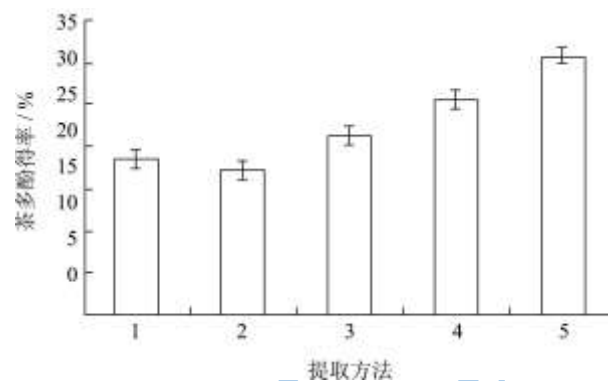


图3 茶多酚提取得率比较

Fig.3 Comparison of the extracting ratio of tea polyphenol

注:1-热水浸提法;2-复合酶解法;3-超高压法;4-酶处理乙醇浸提法;5-酶辅助超高压乙醇浸提法。

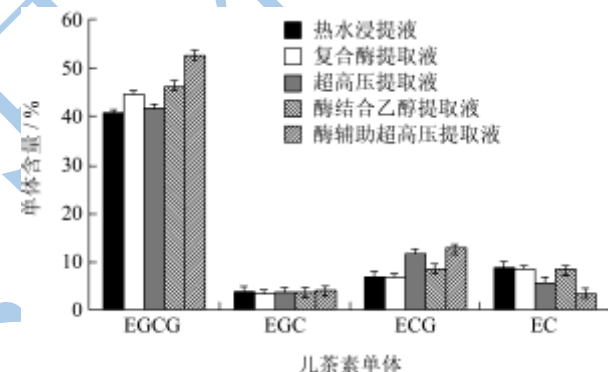


图4 儿茶素组分含量比较

Fig.4 Comparison of the components of Catechin

分析各粗提液中儿茶素含量(图4)可知,茶多酚含量相同的五种提取液中,EGCG 含量的高低顺序为酶辅助超高压提取液>复合酶提取液>酶结合乙醇提取液>超高压提取液>热水浸提液,ECG 含量以超高压提取液和酶结合乙醇提取液中较高,EC 含量以热水浸提液、复合酶提取液、酶结合乙醇提取液中为高,各种粗提液中 EGC 含量相差不大。此外,EGCG 因素结构中的两个基团-β 环和-OR' 在 C 环平面的同侧,分子较不稳定,易发生异构化作用,转化为反式儿茶素 GCG。由图5与图8比较可知,热水浸提液和酶结合乙醇提取液中还存在一部分 GCG,这很可能是因高温长时间提取所致。研究表明,这四种主要儿茶素抗脂质过氧化效果的大小依次为 EGCG > ECG > EGC > EC。说明单独的复合酶提取法、超高压提取法或酶辅助超高压提取法比较有利于茶多酚性质的保持。

2.4 各种粗提液中儿茶素组分对比

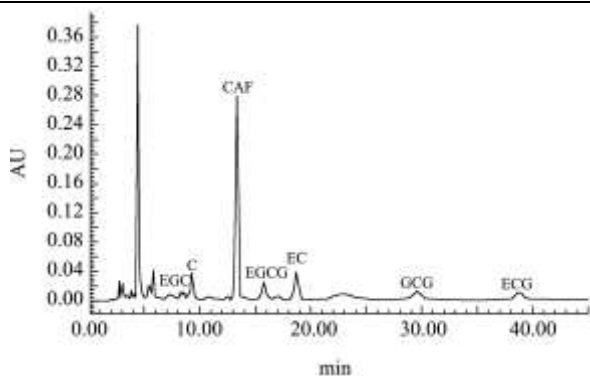


图5 热水浸提液色谱图

Fig.5 Spectrogram of hot water extract

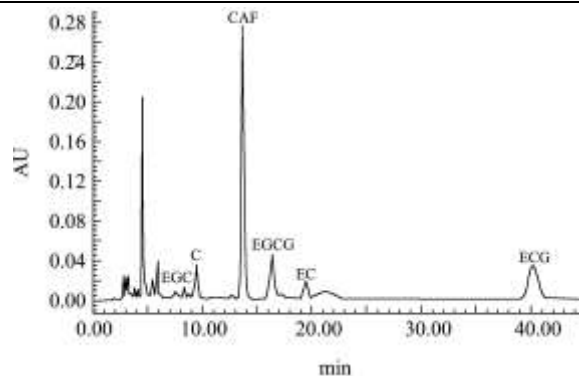


图9 酶辅助超高压提取液色谱图

Fig.9 Spectrogram of assisted with high pressure

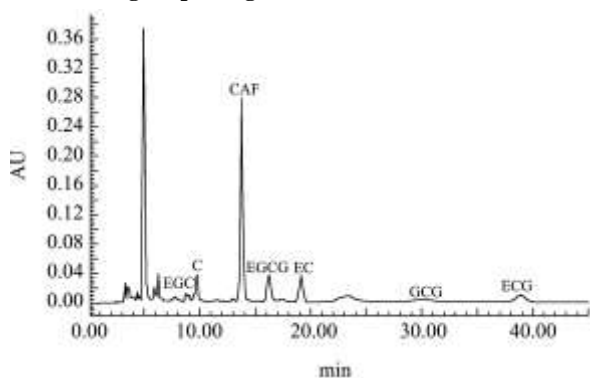


图6 复合酶提取液色谱图

Fig.6 Spectrogram of compound enzyme extract

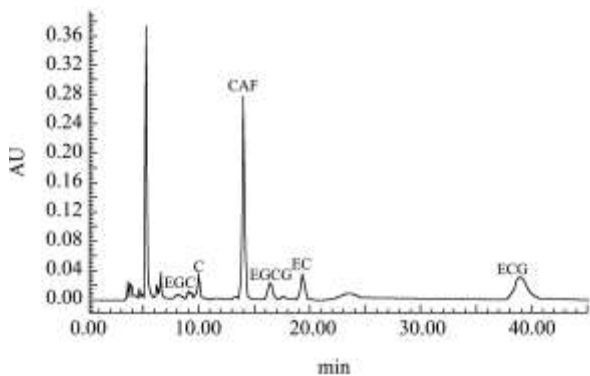


图7 超高压提取液色谱图

Fig.7 Spectrogram of High hydrostatic pressure extract

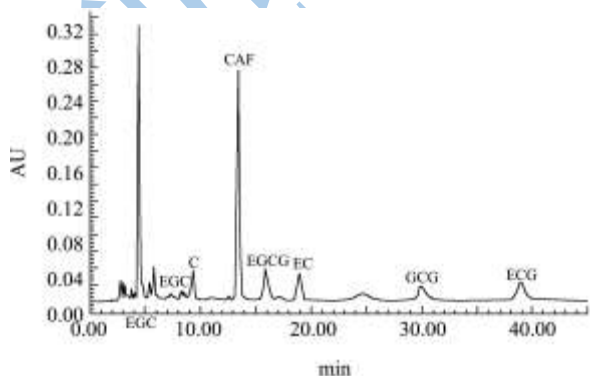


图8 酶结合乙醇提取液色谱图

Fig.8 S spectrogram of compound enzyme extraction combined with ethanol

2.5 各提取液抗氧化能力比较

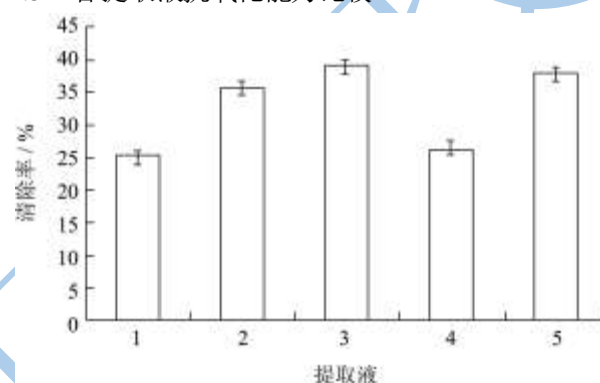


图10 抗氧化能力比较

Fig.10 Comparison of antioxidant capacity

注: 1-热水浸提液; 2-复合酶解提取液; 3-超高压提取液;

4-酶处理乙醇提取液; 5-酶辅助超高压乙醇提取液。

儿茶素单体的种类及含量决定着茶多酚的抗氧化性能。图10为茶多酚含量相同的五种提取液清除·OH自由基性能的比较图,由图可知,复合酶提取液、超高压提取液及酶辅助超高压提取液清除·OH自由基的性能明显优于热水浸提液和酶结合乙醇提取液。说明在茶多酚含量相同的提取液中,各提取液中儿茶素单体的种类及含量也有所差异,而热水浸提液和酶结合乙醇提取液抗氧化性能稍差,也很可能是由于高温提取或长时间的加热所致。这与上述热水浸提液和酶结合乙醇提取液中抗氧化单体较少的结论相符。

3 结论

3.1 提取茶多酚是目前低值茶较好的加工处理,其得率、品质与提取方法关系极大。本文以茶多酚含量为指标,通过比较分析五种方法对低值茶叶中茶多酚的提取效果,得知复合酶辅助超高压提取法最适合于低值茶叶中茶多酚的提取,茶叶中茶多酚得率达31.07%。分析五种方法制备的粗提液中儿茶素组分,得知复合酶辅助超高压提取法制备的粗提液中抗氧化活性成分明显高于其它提取方法,证明酶解辅助超高压

压提取法更有利于保持茶多酚的性质。

3.2 茶多酚中的主要成分是儿茶素类,其中占主要成分的是 EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯)、ECG(表儿茶素没食子酸酯)、EGC(表没食子儿茶素)、EC(表儿茶素)。目前国内外茶多酚粗品的提取的方法主要有:溶剂提取法、离子沉淀法、树脂吸附分离法、超临界流体萃取法、超声波浸提方法、微波浸提法等,但这些方法普遍存在大提取温度过高或难以产业化等缺点。近年来,低温酶解和超高压提取技术因其作用条件温和,在天然产物提取中得很大程度的推崇。目前,已有单独利用超高压和生物酶进行茶多酚提取的报道,但茶叶经生物酶解预处理后进行超高压提取茶多酚的报道未见相关报道。本文初步证明酶解辅助超高压提取法适合于茶多酚的提取,但该方法在提取茶多酚的同时,对茶叶中其它功效成分的浸提效果如何以及在后续茶多酚的分离纯化方面的影响有多大还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 郑挺盛,张凌云.不同采摘季节对重发酵单枞茶香气品质影响研究[J].现代食品科技,2007,23(2):11-15
- [2] 陈明艳.茶渣分离茶多酚咖啡碱的研究[J].现代食品科技,2010,26(12):1358-1360
- [3] 戴群晶.用茶末及废茶枝叶提取高纯茶多酚的研究[J].现代食品科技,2007,23(1):45-53
- [4] 李振武.茶叶活性成分综合提取过程研究[J].化学工程,2006,34(10):46-50
- [5] 董文宾,胡英,周玲.有机溶剂法制备茶多酚的工艺研究[J].工艺技术,2002,23(9):44-47
- [6] 李思睿,董慧茹.溶剂浮选法分离富集茶叶中茶多酚的研究[J].分析科学学报,2007,23(5):571-574
- [7] 杨爱萍,王清吉,锁守丽,等.茶多酚提取、分离工艺研究[J].莱阳农学院学报,2002,19(2):106-107
- [8] Tao Xia, Siqian Shi, Xiaochun Wan. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 74: 557-560
- [9] PAN Xue-jun, NIU Guo-guang, LIU Hui-zhou. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves [J]. Chemical Engineering and Processing, 2003, 2: 129-133
- [10] 韦星船,陈小宏.微波-离子沉淀法提取茶叶中茶多酚的工艺研究[J].食品科技,2007,32(8):132-138
- [11] 吕远平,姚开,何强,等.树脂法纯化茶多酚的研究[J].中国油脂,2003,28(10):64-66
- [12] 黄明,张松波.茶多酚的提取方法[P].中国专利.03135467.X, 2004,3:7
- [13] 刘军海,杨海涛,刁宇清.复合酶法提取茶多酚工艺条件研究[J].食品与机械,2008,24(3):47-87
- [14] 李素云,纵伟,彭雪萍,等.碎茶末中超高压提取茶多酚在鱼肉保鲜中的应用[J].食品工业科技,2009,30(12):287-289
- [15] Nwuha V. Novel studies on membrane extraction of bioactive components of green tea in organic solvents [J]. Journal of Food Engineering, 2000, 44: 233-238
- [16] 杜冰,焦艳丽,江东文.低温液氮粉碎对绿茶粉品质影响[J].农业工程学报,2012,28(2):256-261
- [17] 蒋丽,王雪梅,全学军.不同提取方法对茶多酚理化性质的影响[J].食品科学,2010,31(14):136-139