

# 六堡茶中咖啡因加速溶剂萃取(ASE)的工艺研究

杨红梅<sup>1</sup>, 陈超杰<sup>1,2</sup>, 尹德明<sup>1</sup>, 卓梅芳<sup>1</sup>, 洪春苗<sup>1</sup>

(1. 梧州学院化学工程与资源再利用学院, 广西六堡茶种质创新与综合利用工程研究中心, 广西梧州 543002)

(2. 福建医科大学新药安全性评价中心, 福建福州 350108)

**摘要:** 本研究探讨了加速溶剂萃取(ASE)法提取六堡茶中咖啡因。采用快速溶剂萃取仪提取六堡茶中咖啡因, 以乙醇为萃取溶剂, 利用单因素试验考察乙醇浓度对提取率的影响, 设置仪器压力为 10 MPa, 选择萃取温度、萃取时间、循环次数等影响咖啡因得率的因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验, 以咖啡因得率为主要指标, 考察 ASE 法最佳提取条件并与微波辅助提取法进行比较。结果显示 ASE 法提取六堡茶中咖啡因的最优化条件是以无水乙醇为溶剂, 在温度 120 °C 条件下静态萃取 3 次, 每次 10 min; 经 ASE 法提取, 咖啡因的平均得率为 20.374 mg/g, 其提取物经过 C18 固相萃取小柱处理不仅能除去六堡茶提取液中的大部分杂质, 而且对咖啡因的含量几乎没有影响, 经微波辅助法提取, 咖啡因的平均得率为 17.028 mg/g。说明 ASE 法提取六堡茶中咖啡因, 其提取率高于微波辅助提取法, 且能保证提取物的质量。

**关键词:** 六堡茶; 咖啡因; 提取; 加速溶剂萃取法

文章编号: 1673-9078(2019)03-207-211

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.031

## Accelerated Solvent Extraction (ASE) of Caffeine from Liupao Tea

YANG Hong-mei<sup>1</sup>, CHEN Chao-jie<sup>1,2</sup>, YIN De-ming<sup>1</sup>, ZHUO Mei-fang<sup>1</sup>, HONG Chun-miao<sup>1</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Resource Recycling Wuzhou University, Engineering Research Center of Guangxi Liupao-tea Germplasm Innovation & Comprehensive Utilization, Wuzhou 543002, China)

(2. Center for Safety Evaluation of New Drugs, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** This study investigated the extraction of caffeine from Liupao tea by accelerated solvent extraction (ASE). The caffeine from Liupao tea was extracted with an accelerated solvent extractor and ethanol as the extraction solvent. The effect of ethanol concentration on the extraction rate by single factor experiments, with the instrument pressure set to 10 MPa. The  $L_9(3^4)$  orthogonal test was carried out by selecting the factors affecting the caffeine yield such as extraction temperature, extraction time and cycle number. Taking the caffeine yield as the main index, the optimal extraction conditions for the ASE method were investigated and compared with the microwave-assisted extraction method. The results showed that the optimal extraction conditions for extracting caffeine from Liupao tea by ASE were: anhydrous ethanol as the solvent; static extraction 3 times at 120 °C with each lasting for 10 min. The average yield of caffeine for the ASE method was 20.374 mg/g, and the treatment with a C18 solid phase extraction column could only remove most of the impurities in the obtained Liupao tea extract with little effect on the content of caffeine. The average yield of caffeine was 17.028 mg/g for the microwave-assisted extraction. These results indicated that the extraction rate of caffeine from Liupao tea by ASE was higher than that by microwave-assisted extraction, and the quality of the obtained extract could be guaranteed.

**Key words:** Liupao tea; caffeine; extraction; accelerated solvent extraction

六堡茶原产于广西梧州六堡镇, 具有降血糖、降血脂、减肥和抗氧化等多种功效<sup>[1]</sup>。其主要成分有茶多酚、咖啡因、茶褐素和多糖等, 其中咖啡因是一种重要的医药原料, 具有调节新陈代谢、改善脑功能和

收稿日期: 2018-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860736); 广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198060); 福建省自然科学基金项目(2017J01443); 广西科学研究与技术开发项目(桂科攻15980159); 广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目(2017KY0637); 梧州学院重点科研项目(2017B014)

作者简介: 杨红梅(1971-), 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向: 临床药学

防癌抗癌等功效<sup>[2,3]</sup>。目前有关六堡茶中咖啡因的提取研究鲜有报道, 而茶叶中咖啡因的提取方法则有较多研究, 包括有机溶剂提取法、微波辅助提取法、超声波提取法和超临界  $\text{CO}_2$  萃取法等, 其中微波辅助提取法具有操作简单、提取时间短、提取率较高等优点而被广泛应用<sup>[4]</sup>。加速溶剂萃取(ASE)法是在高温高压下采用有机溶剂提取的一种方法, 具有自动化程度高、萃取范围广、萃取效率高和可循环萃取等优点, 从而被广泛用于植物中非热敏性天然产物的萃取<sup>[5]</sup>。在 ASE 萃取中, 各个萃取池的温度和压力是可以独立

控制的, 并且与萃取溶剂、湿度、样品的矿物成分及互溶萃取基体无关, 而在微波萃取中, 其萃取压力和温度明显受上述参数的影响。

在 ASE 萃取过程中溶剂的选择比较重要, 既要考虑溶剂和分析物的极性, 还要考虑溶剂的沸点、密度和毒性等特性, 经综合分析本研究采用乙醇做提取溶剂, 通过单因素试验考察乙醇浓度对提取率的影响, 发现采用无水乙醇为提取溶剂时咖啡因得率最高。因此, 本文研究加速溶剂萃取法从六堡茶中提取咖啡因, 以无水乙醇为萃取溶剂, 压力设置为 10 MPa, 考察萃取时间、温度和循环次数等对提取结果的影响, 确定最佳的提取条件并与微波辅助提取法进行比较。考虑到(ASE)法获得的提取物中含有茶褐素、茶多酚等杂质, 采用 C18 固相萃取小柱进行除杂处理。结果显示 ASE 法提取六堡茶中咖啡因, 其提取率高于微波辅助提取法, 且提取物经过除杂处理不仅能除去六堡茶提取液中的大部分杂质, 而且对咖啡因的含量几乎没有影响。另外, 对于不同基体, ASE 法可采用相同的萃取条件, 避免其他因素的影响, 提高了结果的准确性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

咖啡因对照品(Toronto Research Chemicals, 批号 T343800); 六堡茶, 广西梧州金益六堡茶业有限公司(批号 20165338); 乙醇; 二氯甲烷; 甲醇(色谱纯); 超纯水。

#### 1.1.2 仪器与设备

Thermo Fisher Scientific 快速溶剂萃取仪(型号: ASE350); C18 固相萃取小柱: SUPELCO ENVI-18 SPE(规格: 6 mL, 0.5 g); 天平: YB-502N 电子天平、CPA225D 电子分析天平; 高液相色谱仪 LC-20AT 型, 日本岛津(1200 series 型紫外检测器、TC-C18 型色谱柱); 上海亚荣 RE-2000B 型旋转蒸发器; 高速万能粉碎机, 潍坊市精华粉碎设备有限公司; CJ-010S 超洁型数控超声清洗器, 深圳市超洁科技有限公司; 微孔滤膜(滤膜直径为 0.45  $\mu\text{m}$ )。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 咖啡因分析方法的建立

##### 1.2.1.1 色谱条件<sup>[6]</sup>

参照食品安全国家标准 GB5009: 139-2014。高效液相紫外检测器, 色谱柱: C18 柱(粒径 5  $\mu\text{m}$ , 柱长 150 mm $\times$ 直径 3.9 mm), 流动相: 甲醇和水(24:76), 流

速: 1.0 mL/min, 检测波长: 272 nm, 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

##### 1.2.1.2 标准曲线的测定

分别精密称取咖啡因标准品(0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 mg/mL) 10  $\mu\text{L}$ , 按“1.2.1.1”色谱条件进样, 以咖啡因标准品质量为横坐标  $X(\mu\text{g})$ , 峰面积为纵坐标  $Y(\text{mAU})$ , 得到线性方程为  $Y=1745.7X-3.6427$ ,  $R^2=0.9992$ , 并在 0.10~0.60  $\mu\text{g}$  进样范围内呈良好的线性关系。线性关系如图 1。

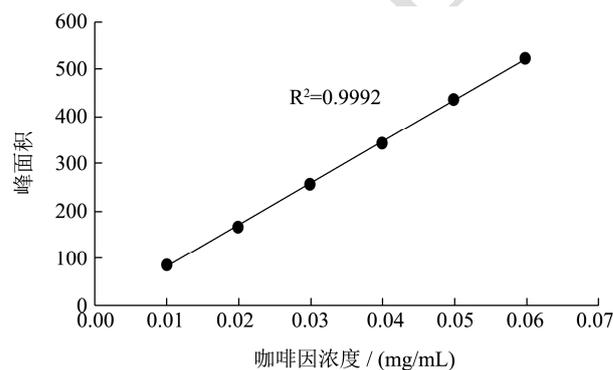


图 1 HPLC 法咖啡因线性关系图

Fig.1 The diagram of linear relation of caffeine by HPLC

##### 1.2.1.3 分析误差校验

精密度实验 RSD 为 0.19% (n=6); 待测液稳定性实验 RSD 为 0.30% (24 h 内, n=6); 重复性实验 RSD 为 1.58% (n=6); 加样回收实验平均回收率为 99.22% (RSD=1.31%) (n=6)。

### 1.2.2 加速溶剂萃取(ASE)法提取六堡茶中咖啡因

#### 1.2.2.1 ASE 法工作原理和流程

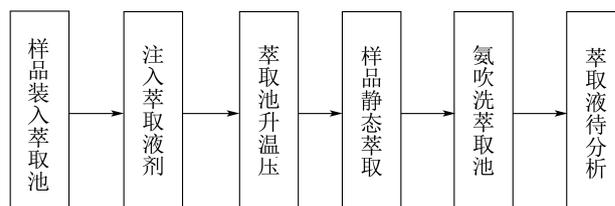


图 2 加速溶剂萃取流程图

Fig.2 The flow charts of accelerated solvent extraction

ASE 法是一种在高温高压下对固体、半固体进行萃取的方法。由于萃取体系温度升高, 加速了溶质分子的解析, 减小了溶剂进入样品的阻滞, 使溶剂更好的溶解样品, 有利于被萃取物与溶剂的接触。由于液体的沸点随着压力的增加而升高, 升高压力可有效保持物质的液体状态, 而液体的溶解能力又远大于气体, 所以高压可增加物质的溶解度。综合分析, 无论提高温度还是增加压力都可加速萃取过程<sup>[7]</sup>。ASE 具体流

程如图 2。

### 1.2.2.2 ASE 法提取溶剂的选择

茶叶中的咖啡因是一种黄嘌呤类的生物碱，溶于水也溶于乙醇、丙酮和氯仿等有机溶剂，丙酮、氯仿等有机溶剂的毒性大、易挥发，不宜做提取溶剂，现阶段咖啡因的提取多采用水提和醇提，考虑到 ASE 是一种利用有机溶剂在高温高压下进行萃取的过程，又根据参考文献<sup>[8]</sup>选择乙醇为萃取剂，萃取剂与样品的比例为 3:2（乙醇:六堡茶）。

准确称取粉碎、筛分（3 号和 5 号筛）后的六堡茶 1.0 g，置于萃取池，分别注入 50%、60%、70%、80%、90%、的乙醇和无水乙醇 1.5 mL，在 100 °C 下快速萃取 8 min，提取 1 次，考察不同浓度乙醇对咖啡因提取率的影响。

### 1.2.2.3 ASE 法提取温度效应考察

采用 ASE 法提取时，温度的设置应在低于目标分析物降解温度 20 °C 以下开始，就咖啡因而言，理论上应从 80 °C 为起始温度开始提取。考虑采用 ASE 提取时温度是最重要的参数，所以采用回收率试验考察 ASE 法从六堡茶中提取咖啡因的温度效应。即在其他条件不变时，温度分别设置为 30、55、80、105 °C。

### 1.2.2.4 ASE 法提取工艺正交优化

除了溶剂之外，ASE 法萃取时影响其提取率的因素有萃取温度、萃取压力、萃取时间和循环次数等，由于快速萃取仪的压力在一定范围内对萃取结果影响不大，故设置压力为固定值 10 MPa，所以本研究选择萃取温度、时间和循环次数等影响咖啡因得率的因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验。ASE 法萃取时在保证液体状态条件下，高温高压都可加速萃取过程，考虑到咖啡因在 100 °C 时开始升华，120 °C 时升华明显，而乙醇在 10 MPa 条件下沸点大于 120 °C，综合分析设计正交试验因素水平。如表 1 所示。具体操作如下：

表 1 ASE 法提取咖啡因工艺  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表

Table 1 The factor-level table of  $L_9(3^4)$  orthogonal test of the process of extracting caffeine by ASE

因素		
萃取温度/°C (A)	萃取时间/min (B)	循环次数 (C)
80	5	2
100	8	3
120	10	4

准确称取粉碎、筛分（3 号和 5 号筛）后的六堡茶 1.0 g，置于萃取池，注入无水乙醇 1.5 mL，同一条件同时完成 6 个样品的萃取，按“1.2.1.1”色谱条件进样，以咖啡因的平均得率为指标，考察 ASE 法提取咖啡因的最佳工艺条件。

### 1.2.2.5 ASE 法提取物除杂

由于 ASE 法提取液中含有色素、茶多酚等杂质，直接进样会影响色谱柱和检测器的寿命，对检测结果也有干扰。本实验采用 C18 固相萃取小柱进行除杂，首先将 C18 固相萃取小柱用 3 mL 甲醇和 3 mL 水进行活化，然后将萃取液注入 C18 固相萃取小柱中，滤过，用 6 mL 水分 3 次洗去滤液中杂质，每次 2 mL，甲醇洗脱两次，每次 1 mL，收集洗脱液，微孔膜过滤，滤液加甲醇至 4 mL，摇匀。

### 1.2.3 微波辅助法提取六堡茶中咖啡因<sup>[9]</sup>

准确称取粉碎、筛分（3 号和 5 号筛）后的六堡茶 10.00 g，置于 250 mL 锥形瓶中，加入 100 mL 70% 的乙醇溶液，封口，放入微波炉中，调节功率 280 W，每 20 s 间歇提取 4 min。提取液加活性炭脱色，微孔滤膜过滤，冷却，吸取滤液加入 40 mL 二氯甲烷萃取，萃取液蒸干，残渣加甲醇稀释至 40 mL。

### 1.2.4 ASE 法和微波辅助法提取咖啡因得率比较

精密称取六堡茶（批号 20165338）粉（经 3 号和 5 号筛筛分）12 份。其中 6 份，每份 1.00 g，采用 ASE 法最佳提取工艺条件进行提取；另外 6 份，每份 10.0 g，采用“1.2.3”中微波辅助法提取，比较咖啡因提取率。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙醇浓度对咖啡因提取率的影响

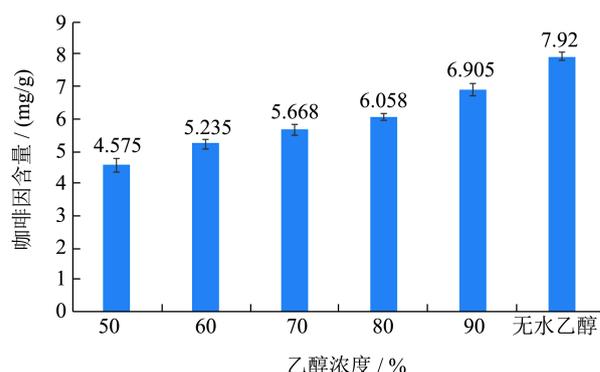


图 3 不同浓度乙醇对咖啡因提取率的影响

Fig.3 The effect of different concentrations of ethanol on caffeine extraction rate

按实验步骤“1.2.2.2”考察不同浓度乙醇对咖啡因提取率的影响，将得到的样品按照“1.2.1.1”色谱条件分析，结果如图 3 所示。咖啡因的含量随着乙醇浓度的增大而增加，在无水乙醇时，咖啡因含量最高，故选择无水乙醇进行提取。

### 2.2 温度效应考察

以无水乙醇为萃取溶剂, 压力为 10 MPa, 萃取时间 8 min, 循环次数 1 次, 按步骤 1.2.2.3 的温度条件提取, 进行回收率试验, 结果如表 2 所示。随着温度的升高不仅增加了萃取率和回收率, 重复性也得到了提高, 在 80 °C 和 105 °C 时回收率和 RSD 值均符合规定, 故本实验的提取起始温度设置为 80 °C。

表 2 ASE 法提取咖啡因的温度效应结果

Table 2 The results of temperature effect of extracting caffeine by ASE

萃取温度/°C	咖啡因含量/(mg/g)	回收率/%	RSD/%
30	3.083	82.3	6.1
55	4.376	90.9	5.3
80	8.467	99.3	1.9
105	13.119	101.7	1.6

### 2.3 正交试验

以无水乙醇为萃取溶剂, 压力为 10 MPa, 按照表

表 3 ASE 法提取咖啡因工艺 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果

Table 3 The results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test of the process of extracting caffeine by ASE

试验号	萃取温度/°C (A)	萃取时间/min (B)	循环次数 (C)	峰面积	咖啡因平均含量/(mg/g)
1	80	5	2	162.417	9.513
2	80	8	3	162.322	9.507
3	80	10	4	189.765	11.079
4	100	5	3	283.546	16.451
5	100	8	4	279.143	16.199
6	100	10	2	170.050	9.950
7	120	5	4	250.660	14.567
8	120	8	2	269.412	15.642
9	120	10	3	350.893	20.309
K <sub>1</sub>	30.099	40.531	35.104		
K <sub>2</sub>	42.600	41.348	46.267		
K <sub>3</sub>	50.518	41.338	41.845		
k <sub>1</sub>	10.033	13.510	11.701		
k <sub>2</sub>	14.200	13.783	15.422		
k <sub>3</sub>	16.839	13.779	13.948		
R	6.806	0.272	3.721		

表 4 提取物除杂前后对比

Table 4 The comparison of extracts before and after removing impurity

样品	色谱图特点	平均峰面积	咖啡因平均含量/(mg/g)
样品 1	样品的主成分峰与对照品峰一致, 峰型较差; 色谱图基线不稳; 杂质峰较多, 峰面积较大。	350.91	20.376
样品 2	样品的主成分峰与对照品峰一致, 峰型较好; 色谱图基线平稳; 杂质峰少, 峰面积小。	350.75	20.373

1 正交试验因素水平进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验, 结果如表 3 所示。

根据极差值 K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub> 及 R 值分析, 萃取温度、萃取时间和循环次数对咖啡因的提取率均有影响, 各个因素对结果的影响程度为: 萃取温度(A)>循环次数(C)>萃取时间(B), 其中温度对提取率影响最大。结合咖啡因得率分析, 可以得到各因素较优的水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>。而 A<sub>3</sub>、B<sub>3</sub> 均为该因素考察范围的最高值, 所以对最优条件组合还需进一步考察, 即采用萃取温度 140 °C、萃取时间 12 min、循环 3 次进行 ASE 提取(同时完成 6 个样品), 咖啡因平均含量为 19.618 mg/g。结果说明, 在其他条件不变的情况下, 萃取温度升高, 萃取时间延长, 咖啡因得率并没有增大, 分析可能是萃取温度和时间对咖啡因的降解有一定的影响。综合分析得到, ASE 法提取六堡茶中咖啡因的最优化条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 即以无水乙醇为萃取溶剂, 在温度 120 °C 的条件下静态循环提取 3 次, 每次 10 min。

表5 样品测定数据

Table 5 The data of measurements

样品	1	2	3	4	5	6	咖啡因平均含量/(mg/g)
ASE 法提取	20.377	20.402	20.427	20.401	20.297	20.340	20.374
微波辅助法提取	17.301	16.789	17.291	16.980	16.789	17.021	17.028

## 2.4 提取物除杂

根据正交试验优化的提取工艺提取咖啡因,得到“样品 1”,将“样品 1”按照实验步骤“1.2.2.5”进行除杂得到“样品 2”,将得到的“样品 1”和“样品 2”分别按照“1.2.1.1”的色谱条件分析。重复 6 次,结果如表 4 所示。

六堡茶中茶褐素、茶多酚等含量较高,萃取液中杂质较多,将萃取液直接进样会影响色谱柱和检测器的寿命,由于杂质的干扰,也会影响到实验结果,所以进样前要对萃取液进行除杂处理。目前应用较多的是三氯甲烷、乙酸乙酯或其它有机溶剂进行萃取,以除去色素等杂质,这种除杂方式虽然能快速的除去杂质,但存在有机溶剂用量大,不利于环保等缺点,本文采用 C18 固相萃取小柱来除杂。由表 4 可知,经过 C18 固相萃取小柱处理不仅能除去六堡茶提取液中的大部分杂质,而且对咖啡因的含量几乎没有影响。

## 2.5 提取方法比较

按实验步骤“1.2.4”选择 ASE 法最佳提取工艺与微波辅助提取法进行比较(ASE 法提取物按实验步骤“1.2.2.5”除杂),将得到的样品按照“1.2.1.1”色谱条件分析,结果如表 5 所示。

从表 5 可知,采用 ASE 法提取六堡茶中咖啡因平均值为 20.374 mg/g,采用微波辅助提取法提取六堡茶中咖啡因平均值为 17.028 mg/g。

## 3 结论

3.1 本文通过采用加速溶剂萃取(ASE)法提取六堡茶中咖啡因的研究,结果发现 ASE 法提取六堡茶中咖啡因的最优化条件为是,在萃取压力不变的情况下,以无水乙醇为萃取溶剂,在温度 120 °C 的条件下静态循环提取 3 次,每次 10 min。

3.2 六堡茶提取液中的大部分杂质都能通过 C18 固相萃取小柱除去,且用 C18 固相萃取小柱除杂后的咖啡因含量与萃取前对比,回收率接近 100%。

3.3 在提取六堡茶咖啡因过程中,通过微波辅助提取法和 ASE 法比较发现,两种方法都具有提取速度快、

溶剂消耗少、提取率高等优点。虽然 ASE 法是在高温高压下进行的萃取,但对于非热敏性的天然产物的提取,ASE 法逐渐被广泛应用。就本实验,结合咖啡因的得率综合分析,ASE 法优于微波辅助提取法。

3.4 综上所述,加速溶剂萃取(ASE)法不仅具有自动化程度高、萃取范围广、萃取效率高、可循环萃取等优点,对于不同基体,ASE 法可采用相同的萃取条件,避免其他因素的影响,提高了结果的准确性。

## 参考文献

- [1] 滕翠琴,刘仲华,龚爱基,等.六堡茶对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响[J].茶叶科学,2014, 34(3):230-238  
TENG Cui-qin, LIU Zhong-hua, GONG Ai-ji, et al. The effect of Liupao tea on the metabolism of insulin resistance 3T3-L1 fat cells [J]. Journal of Tea Science, 2014, 34(3): 230-238
- [2] 杨巍,咖啡碱的药理作用与开发利用[J].茶叶科学技术, 2006,21(4):9-10  
YANG Wei. The pharmacological action and exploitation of caffeine [J]. Tea Science and Technology, 2006, 21(4): 9-10
- [3] 黄飞,徐慧敏,王杰,等.Box-Behnken 设计-效应面法优化离子液体提取废次茶叶中咖啡因工艺[J].天然产物研究与开发,2017,29:489-496  
HUANG Fei, XU Hui-min, WANG Jie, et al. Optimize the extraction of caffeine from ionic liquid by the Box-Behnken design-effect surface method [J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29: 489-496
- [4] 周芳,朱亚伟,位翠杰.正交试验法从茶叶中提取咖啡因的工艺研究[J].安徽农业科学,2015,43(19):274-275  
ZHOU Fang, ZHU Ya-wei, WEI Cui-jie. The process of extracting caffeine from tea leaves was studied by orthogonal test [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(19): 274-275
- [5] 刘静.ASE 快速溶剂萃取-解决固体、半固体样品前处理的新技术[J].现代科学仪器,2002,12(3):59-60  
LIU Jing. The ASE fast solvent extraction - a new technique for treating solid and semi-solid samples [J]. Modern Scientific Instruments, 2002, 12(3): 59-60

(下转第 168 页)