

茶色素的超声辅助提取及其稳定性研究

陈丽如, 张娜*, 杨更亮, 王利娟

(河北大学 药学院 河北省质量分析控制重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要:采用正交试验设计, 探讨超声辅助法提取红茶中茶色素的条件。通过紫外-可见分光光度法, 对红茶色素水溶液稳定性进行研究。结果表明: 茶色素对时间的稳定性良好, 提取和存放温度不宜超过 60℃, 在较低 pH 值下稳定, 有较好的耐光性, 但对金属离子不稳定。

关键词:茶色素; 红茶; 正交实验; 超声波辅助提取; 稳定性

中图分类号: S122 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)03-0608-05

A Study on the Ultrasound-associated Extraction of Tea Pigment and Its Stability

CHEN Li-ru, ZHANG Nai*, YANG Geng-liang, WANG Li-juan

(Hebei Province Key Laboratory of Quality Analysis and Control College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The ultrasound-associated extraction condition for tea pigment from black tea was optimized with orthogonal array design. The stability of tea pigment aqueous solution was studied by uv-vis spectrophotometry. The results showed that tea pigment has stabilization to time and light, the temperature should not be higher than 60℃, it is stable in low pH circumstance, but it is not stable to some metal ions.

Key words: tea pigment; black tea; orthogonal array design; ultrasound-associated extraction; stability

茶叶是世界三大传统饮料之一, 具有营养、保健等多种功能。茶色素是从茶叶中提取出来的一类水溶性酚性色素, 主要包括茶黄素、茶红素和茶褐素。茶色素作为一种天然色素可以应用于食品, 现代研究表明, 茶色素具有抗氧化、增强免疫力、降血脂、降血压、抗动脉粥样硬化、降低血粘度、改善微循环、抑制实验性肿瘤等药理作用^[1-3]。随着人们对茶叶保健功能的深度开发研究, 如何高效地提取茶色素逐渐成为研究者十分关注的问题, 到目前为止这方面的研究还不多。最早人们采用沸水煎煮的方法^[4-5]提取茶色素, 该法加热温度高, 导致茶色素中多酚聚合, 颜色加深。后来, 采用不同比例的乙醇水溶液提取茶色素^[6-8], 提取率得到提高, 但是生产成本比较高, 且得出的优化条件各异, 产物中脂溶性杂质比较多。目前, 多种新技术被应用于茶色素的提取, 如: 超声波辅助提取^[8]、微波辅助提取^[9]、恒温连续逆流多级浸提^[10]。谢笑天等^[8]以 (乙醇) = 80% 的溶液为提取溶剂, 采用超声波辅助提取的方法, 分别考察了提取温度和超声时间等单一因素对茶色素提取效率的影响。本文在参考上述文献资料的基础上, 从综合利用茶叶资源、降低成本、提高收率的角度出发, 采用超声波辅助纯水溶液提取红茶中的茶色素, 利用正交试验设计方法优化提取工艺, 确定了最佳的提取条件, 并且对茶色素的理化性质和稳定性进行了初步的研究, 为其在食品和医药领域的进一步应用奠定了基础。

收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-05-04

基金项目: 河北省教育厅自然科学基金项目 (Z2007225)

作者简介: 陈丽如 (1985-), 女, 硕士生, 主要从事亲水凝胶药物释放研究, E-mail: bclmjm@126.com; *通讯作者: 张娜, 博士, E-mail: nzhang@hbu.edu.cn.

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KQ - 250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE - 2000A 型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);DZF - 6050 型真空干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司);80 - 2 离心沉淀机(上海荣泰生化工程有限公司);PHS - 25 型数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);30 目标准检验筛(孔径 0.613 mm,浙江上虞市华丰五金仪器有限公司)。

1.2 药品和试剂

红茶(产自安徽,粉碎,过 30 目筛备用);(乙醇) = 95% (天津市华东试剂厂);氯仿(天津市华东试剂厂);NaOH(天津北方天医化学试剂厂);FeCl₃(天津市北方天医化学试剂厂);乙酸乙酯(天津市北方天医化学试剂厂);甘油(天津市美琳工贸有限公司);PEG400(天津市华东试剂厂);冰乙酸(天津市华东试剂厂)。

2 实验方法

2.1 工艺流程

称取粉碎过的红茶 5.0 g,按照料液比加入蒸馏水,在一定温度下超声提取,提取完毕后将提取物于 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液抽滤得滤液。将滤液在 50 ℃ 减压浓缩至 15 mL,加入 3~4 倍体积的 (乙醇) = 95% 沉淀除去多糖、蛋白质等杂质,并用 1 mol/L 的 HCl 调节溶液 pH 为 3.2,静置 30 min,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液抽滤得滤液。将滤液加入 200 g/L NaOH 调 pH 7.0~7.5,抽滤得滤液。将滤液 50 ℃ 旋转蒸发至干,60 ℃ 真空干燥。将所得结晶经氯仿萃取除去生物碱和叶绿素,60 ℃ 真空干燥,得精制的茶色素。红茶色素的提取工艺流程图见图 1。

2.2 正交试验设计

经预实验研究发现,对茶色素的提取有影响的主要因素有料液比、超声时间、超声温度和提取次数。因此采用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验设计(正交试验的因素和水平见表 1),并以茶色素的产率为评价指标。计算得到最优化工艺条件,并在该条件下重复试验 3 次。

2.3 鉴别反应^[11]

取茶色素配制成 0.05% 水溶液,加入 10 g/L FeCl₃ 溶液 1 至 2 滴;另取 0.05% 茶色素水溶液,加入饱和石灰水 1 至 2 滴。观察试验现象。

2.4 溶解性试验

分别称取 8 份 50 mg 茶色素,于室温下分别加入蒸馏水、(乙醇) = 50%、(乙酸) = 1% 溶液、5 g/L NaOH 溶液、甘油、PEG400、乙酸乙酯和氯仿各 5 mL 进行溶解性试验,并观察其溶液的颜色。

2.5 稳定性试验^[12-13]

2.5.1 时间对茶色素稳定性的影响 将一定浓度的茶色素水溶液于冰箱内放置,于不同时间测定溶液在 363 nm 吸光度^[14],考察时间对茶色素水溶液稳定性的影响。

2.5.2 温度对茶色素稳定性的影响 将相同浓度的茶色素水溶液分别置于 25, 37, 60, 80, 100 ℃ 水浴中加热,测定溶液吸光度,考察温度对茶色素水溶液稳定性的影响。

2.5.3 pH 值对茶色素稳定性的影响 将茶色素配制成不同 pH 值的水溶液,测定溶液吸光度,考察茶色素在不同 pH 溶液中的稳定性。

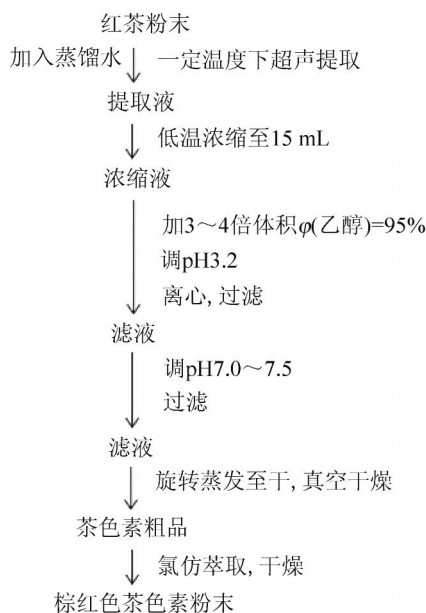


图 1 红茶色素的提取流程

Fig 1 The extraction method of tea pigment from black tea

2.5.4 光照对茶色素稳定性的影响 将相同浓度的茶色素水溶液分别于自然光和避光下放置 5 h,测定溶液吸光度,考察光照对茶色素水溶液稳定性的影响。

2.5.5 金属离子对茶色素稳定性的影响 将一定浓度的茶色素水溶液分为 7 份,每份 5 mL,其中 1 份为空白样,其余 6 份分别加入 5 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的金属离子^[15] (Al^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+}),摇匀,冰箱内放置 24 h,测定溶液吸光度,考察金属离子对茶色素水溶液稳定性的影响。

3 结果与讨论

3.1 茶色素提取条件的优化

由表 2 可知,影响茶色素提取率的因素大小依次为 A、D、B、C,即料液比、提取次数、提取时间、提取温度。各因素的最优组合为: $A_2D_3B_3C_2$,即料液比 1:20、提取次数 3 次、提取时间 30 min、提取温度 60。按照最优化试验条件 $A_2D_3B_3C_2$ 进行 3 次平行实验,结果提取率分别为: 23.5%, 23.1%, 22.0% (22.9% \pm 0.8%)。实验结果证明条件 $A_2D_3B_3C_2$ 确为最佳实验条件。

表 1 正交试验的因素与水平

Tab 1 The factors and levels of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors			
	A 料液比 / ($g \cdot mL^{-1}$)	B 提取时间 t/min	C 提取温度 $T/$	D 提取次数 / 次
	Ratio of material to liquid	Extraction time	Extraction temperature	Extraction times
1	1:10	10	25	1
2	1:20	20	60	2
3	1:30	30	85	3

表 2 正交试验的结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号 Test number	A	B	C	D	产率 / % Yield
1	1	1	1	1	9.54
2	1	2	2	2	16.4
3	1	3	3	3	16.1
4	2	1	2	3	19.3
5	2	2	3	1	16.1
6	2	3	1	2	21.8
7	3	1	3	2	15.0
8	3	2	1	3	19.3
9	3	3	2	1	16.1
					149.6
K_1	42.0	43.8	50.6	41.7	
K_2	57.2	51.8	51.8	53.2	
K_3	50.4	54.0	47.2	54.7	
R	15.2	10.2	4.6	13.0	

3.2 鉴别反应

茶色素 0.05% 水溶液加入 10 g/L $FeCl_3$ 溶液后反应变成蓝黑色溶液,放置一段时间后生成蓝黑色沉淀,证明其中含有酚类成份。0.05% 茶色素水溶液,加入饱和石灰水后,生成红棕色沉淀。这两个结果都表明提取物中含有缩合鞣质。

3.3 茶色素的溶解性

表 3 为茶色素溶解性试验结果。从表中可以看出,茶色素易溶于水、(乙醇) = 50% 及 5 g/L

NaOH,且在 5 g/L NaOH中溶解性比水好,在 (乙酸) = 1%中部分溶解,不溶于甘油、PEG400、乙酸乙酯和氯仿。其溶解性顺序由大到小为: 5 g/L NaOH、(乙醇) = 50%、水、(乙酸) = 1.0%、乙酸乙酯、PEG400 氯仿、甘油。茶色素在 (乙酸) = 1.0%溶液中溶解度较纯水中小,在 5 g/L NaOH溶液中溶解度比纯水中大,这与其组成中含酚类物质有关。此外,在提取过程中采用了水提-醇沉法,所以茶色素易溶于水和 (乙醇) = 50%。由于所得产物极性比较大,所以在其它低极性溶剂中难溶。

表 3 茶色素溶解性试验结果

Tab 3 The solubility of tea pigment in different medium

溶剂 Solvent	溶解性 Dissolubility	颜色 Color
蒸馏水 Distilled water	易溶	棕黄色
体积分数为 50%乙醇 50% ethanol	易溶	黄棕色
体积分数为 1% 乙酸 1% acetic acid	微溶	黄色
5 g/L 氢氧化钠 5 g/L Sodium hydroxide	易溶	红棕色
甘油 Glycerol	不溶	无色澄清
PEG400 Polyethylene glycol 400	不溶	浅黄色澄清
氯仿 Chloroform	不溶	浅黄色澄清
乙酸乙酯 Ethyl acetate	不溶	浅棕色混悬

3.4 茶色素水溶液的稳定性

3.4.1 时间对茶色素稳定性的影响 由表 4可以看出,随着时间的延长,茶色素水溶液的吸光度值基本保持不变,说明该色素对时间的稳定性良好。

表 4 时间对茶色素稳定性的影响

Tab 4 The effect of time on the stability of tea pigment

时间 t/h Time	5	12	24	48	72	96
吸光度 Absorption	0.144	0.144	0.145	0.144	0.144	0.144

3.4.2 温度对茶色素稳定性的影响 由表 5可以看出,温度低于 60 时茶色素比较稳定,加热 150 min内吸光度变化不大;60 加热 150 min以内茶色素也基本是稳定的;但是温度 80 加热 120 min后吸光度迅速上升,表明茶色素发生了结构的变化。

表 5 温度对茶色素稳定性的影响

Tab 5 The effect of temperature on the stability of tea pigment

温度 T/ Temperature	吸光度 Absorption				
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
25	0.128	0.122	0.129	0.139	0.121
37	0.125	0.125	0.123	0.124	0.129
60	0.173	0.184	0.168	0.172	0.179
80	0.208	0.221	0.218	0.224	0.256
100	0.233	0.252	0.252	0.248	0.265

3.4.3 pH值对茶色素稳定性的影响 由表 6可以看出,pH < 6时,茶色素的吸光度变化不大;pH 7~9 时,吸光度迅速上升,说明在此 pH区间茶色素是不稳定的。

表 6 pH值对茶色素水溶液吸光度的影响

Tab 6 The effect of pH value on the stability of tea pigment

pH值 pH value	4	5	6	7	8	9
吸光度 Absorption	0.152	0.154	0.158	0.186	0.240	0.318

3.4.4 光照对茶色素稳定性的影响 由表 7 可以看出,5 h 内,避光时茶色素的稳定性良好,自然光下吸光值略有变化,肉眼观察溶液颜色无明显变化,说明茶色素耐光性较好。

表 7 光照对茶色素稳定性的影响

Tab 7 The effect of light on the stability of tea pigment

光照 Light	吸光度 Absorption				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
自然光 Natural light	0.157	0.156	0.155	0.154	0.154
避光 Dark	0.157	0.157	0.157	0.157	0.157

3.4.5 金属离子对茶色素稳定性的影响 由表 8 可以看出,加入 Al^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 离子后,溶液颜色均变为无色,吸光度均发生了改变,说明这些离子均能与茶色素发生反应,使其结构发生改变,其中 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 对茶色素的影响相近。

表 8 金属离子对茶色素稳定性的影响

Tab 8 The effect of metal ions on the stability of tea pigment

离子 Metal ions	空白液	Al^{3+}	Ce^{3+}	Zn^{2+}	Ca^{2+}	K^{+}	Na^{+}
吸光度 Absorption	0.144	0.093	0.099	0.107	0.078	0.080	0.079

4 结 论

超声波辅助提取茶色素优化得到条件为:料液比 1:20、提取次数 3 次、提取时间 30 min、提取温度 60 $^{\circ}C$ 。溶解性实验表明红茶中提取的茶色素易溶于碱性溶液、水和 (乙醇) = 50%,难溶于低极性有机溶剂。茶色素对时间的稳定性良好,在低 pH 值和低温环境下稳定,并有较好的耐光性,但对金属离子不稳定。因此,在提取、使用及存放过程中应考虑到茶色素的热不稳定性和金属离子不稳定性,应尽量避免与金属离子接触。以超声辅助提取茶色素,操作简单、时间快,以红茶为原料提取茶色素,成本低廉、原料丰富,为茶色素在食品和医药领域的进一步应用奠定了基础,前景比较广阔。

参考文献:

- [1] 杨晓萍,郭大勇,袁芳亭. 茶色素的研究现状与应用 [J]. 茶叶机械杂志, 2002 (4): 1 - 3
- [2] Fukuda I, Sakane I, Yabushita Y, et al Black tea extract suppresses transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin [J]. BioFactors, 2004 (21): 367 - 369.
- [3] Way T D, Lee H H, Kao M C, et al Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu - transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression [J]. European Journal of Cancer, 2004 (40): 2165 - 2174.
- [4] 孙刘根. 茶色素及其生产方法: 中国, CN1074618 [P]. 1993 - 07 - 28
- [5] 吴永方, 韩志红. 茶色素的提取方法: 中国, CN1081575 [P]. 1994 - 02 - 09.
- [6] 陈虎, 金蓓文, 周睿. 一种新的提取茶色素的方法及其在高血脂方面的应用: 中国, CN1328092 [P]. 2001 - 12 - 26
- [7] 董基. 从茶叶中提取茶色素的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (3): 1199 - 1200
- [8] 谢笑天, 刘频, 郑萍, 等. 茶灰中天然茶色素的提取 [J]. 云南师范大学学报, 2002, 20 (1): 35 - 38
- [9] 杨晓萍, 倪德, 郭大勇, 等. 微波萃取茶叶有效成份的研究 [J]. 云南师范大学学报, 2003, 22 (5): 505 - 507.
- [10] 张守政. 从茶叶中提取茶多酚、茶氨酸、茶多糖、茶色素的方法: 中国, CN1837201 [P]. 2006 - 09 - 27.
- [11] 张涛, 韩志红, 吴桂兰, 等. 茶色素胶囊的稳定性研究 [J]. 武汉市职工医学院学报, 2001, 29 (1): 42 - 44
- [12] 耿敬章. 香樟籽色素的超声波辅助提取及其稳定性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2009, 31 (1): 119 - 123
- [13] 姜莉, 李志华, 张正茂, 等. 马铃薯紫色素的提取及稳定性研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30 (6): 265 - 270
- [14] 杨耀松, 施兆鹏, 彭继光. 茶黄色素的吸收光谱及稳定性研究 [J]. 茶叶通讯, 1999 (1): 27 - 28
- [15] 汪岚岚, 朱志玲. 月季花红色素的提取及其性质研究 [J]. 江苏食品与发酵, 2007 (4): 4 - 5.