

# 普洱茶多酚的提取及提取工艺响应面分析

刘佳, 丁青霞, 高菊\* (昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

**摘要** [目的] 优化普洱茶中茶多酚的提取工艺条件。[方法] 以购自云南省临沧市的普洱茶为原料, 以总多酚提取率为优化目标, 在单因素试验基础上, 通过响应面分析法分析乙醇浓度、浸提时间、浸提温度和料液比对普洱茶总多酚提取的影响。[结果] 确认普洱茶中茶多酚提取最佳工艺为浸提时间 1 h、浸提温度 90 °C、料液比 1:25 g/mL、乙醇浓度 75%。实际测得的多酚得率为 17.048 7%, 和模型预测值相符。[结论] 研究可为普洱茶中茶多酚的工业化提取生产提供参考依据。

**关键词** 普洱茶多酚; 响应面分析; 提取工艺

**中图分类号** S571.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)24-088-03

## Extraction of Polyphenols from Pu'er Tea and Analysis of Extraction Process Response Surface

LIU Jia, DING Qing-xia, GAO Ju\* (Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500)

**Abstract** [Objective] The aim was to optimize conditions for extracting polyphenols from Pu'er tea. [Method] With Pu'er tea from Lincang City, Yunnan Province as raw materials, total polyphenol extraction rate as the optimization objective, on the basis of single factor experiment, effects of ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and ratio of material to liquid on extraction of total polyphenols from Pu'er tea were analyzed by response surface analysis. [Result] The optimal conditions were as following: extraction time 1 h, extraction temperature 90 °C, solid-liquid ratio 1:25 g/mL, ethanol concentration 75%. The actual yield of polyphenol was 17.048 7%, which was in agreement with the predicted values. [Conclusion] The study can provide reference basis for industrial extraction and production of polyphenol in Pu'er tea.

**Key words** Pu'er tea polyphenol; Response surface analysis; Extraction process

茶多酚 (Tea Polyphenols, TP) 是茶内多酚类化合物的统称, 有很多成分是茶叶所特有的, 这些物质共同组成了茶叶独特的风味和功效。茶多酚大部分为黄酮类化合物, 最主要的是以儿茶素及其衍生物为主体的黄烷醇类, 其含量约占茶多酚类的 70%~80%, 主要有 4 种儿茶素组分, 分别是表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、表没食子儿茶素 (EGC)、表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、表儿茶素 (EC)<sup>[1]</sup>。

茶多酚的提取方法有很多种, 一是利用茶多酚在不同有机溶液中溶解度不同的性质采用溶剂提取工艺<sup>[3]</sup>。二是金属离子盐沉淀茶多酚工艺, 即把茶叶水溶液或乙醇溶液在碱性环境下和沉淀剂生成沉淀, 从而固定住茶多酚。多数中性盐能够利用静电作用减弱多酚水中的溶解, 让多酚沉淀下来; 同时中性盐能够因本身的电解质性质使多酚胶体去电去溶剂化, 使得多酚盐溶液盐析<sup>[4]</sup>。络合后的多酚由于电子轨道跃迁导致光吸收区出现变化, 从而发生颜色变化, 因此多酚类的金属络合物都有较鲜艳的颜色<sup>[5]</sup>。三是过柱层析分离提取茶多酚<sup>[6]</sup>, 包括吸附柱层析、凝胶柱层析、离子交换柱层析等方法, 而且过柱层析法提取茶多酚用料少, 获得的茶多酚纯度较高, 缺点是试验成本高。四是超临界流体萃取法提取茶多酚<sup>[7]</sup>, 和以上其他方法对比, 超临界流体萃取法提取茶多酚具有高速高效、溶剂消耗少、无残留等特点, 一般超临界流体提取茶多酚使用的萃取剂是二氧化碳。

笔者综合考虑茶多酚的物理化学性质, 为了能够从原料中得到更多的茶多酚, 采用的是溶剂提取茶多酚工艺和金属离子盐沉淀茶多酚工艺相结合的方法。该方法利用碳酸钠盐的电解质属性, 增强茶多酚的析出; 同时, 利用茶多酚易溶

于乙醇溶液和乙酸乙酯, 而不溶于氯仿的性质来分离提纯茶多酚。茶叶中的咖啡碱易溶于氯仿, 也能通过这个方法使茶多酚和咖啡碱分离, 得到纯度较高的茶多酚。

## 1 材料与方法

**1.1 方法原理** 茶叶粉末中蛋白质等化合物不易溶于乙醇溶液, 茶多酚和咖啡碱等都易溶于乙醇溶液, 利用这一特性可以从茶叶粉末乙醇浸提液中分离大量茶多酚和咖啡碱, 并将蛋白质等去除。茶叶乙醇浸提液中的茶多酚易溶于乙酸乙酯, 咖啡碱易溶于氯仿, 根据这一个特性来分离茶多酚和咖啡碱。

**1.2 材料** 主要仪器: 三口烧瓶、分液漏斗, 蜀牛公司; HWS-24 型电热恒温水浴锅, 上海齐欣科技仪器有限公司; 冷凝管、胶管、电动水泵等冷凝设备; 真空抽滤机; 恒温水浴旋转蒸发仪; 电动打粉机; 紫外分光光度计。

主要原料及试剂: 普洱茶, 购自云南省临沧市茶叶市场; 碳酸钠 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 各浓度乙醇溶液, 氯仿, 乙酸乙酯, 酒石酸亚铁溶液, 磷酸盐缓冲液。

## 1.3 普洱茶多酚提取工艺

**1.3.1 茶叶粉碎** 取茶叶若干, 稍微捣碎后放入电动打粉机, 粉碎时间不宜过长以免打粉机刀片温度过高使茶叶粉末烧焦, 应该短时间打粉 (1 min 左右), 关机后摇动, 再开机打粉。以上步骤重复数次直至茶叶粉末足够细。

**1.3.2 普洱茶多酚浸提** 取乙醇溶液加入三口烧瓶内, 称取一定质量粉碎的茶叶, 加入 20% 的碳酸钠粉末后放入装有不同浓度的乙醇溶液中, 充分摇匀, 加上冷凝管放入恒温水浴锅中冷凝回流水浴浸提一段时间。

**1.3.3 普洱茶多酚浓缩** 浸提后的提取液倾出, 使用真空抽滤抽干残留的提取液, 提取过的茶叶渣使用少量的酒精溶液冲洗, 清洗液和之前的提取液一起倒入圆底烧瓶, 使用旋

**作者简介** 刘佳 (1991-), 男, 江西赣州人, 硕士研究生, 研究方向: 茶次级代谢产物。\* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事茶次级代谢产物研究。

**收稿日期** 2016-05-31

转蒸发仪 50 ℃ 旋转蒸发浓缩提取液体积到原来体积的 1/3 左右,这时候大部分乙醇溶液被蒸发出来,提取液中剩下主要成分为水,方便下一步氯仿的萃取分离。

**1.3.4 普洱茶多酚的萃取分离。**将上一步的浓缩提取液冷却至室温,倒入分液漏斗中,加入等量的氯仿溶液萃取 3 次。此步骤中浓缩的提取液必须降温后再分液,否则会导致氯仿容易乳化,影响分离效果。上层为水层和茶多酚层,萃取时间 30 min。将水层加入等体积的乙酸乙酯萃取 2 次,每次 20 min。合并萃取液,旋蒸仪蒸干,回收乙酸乙酯。用药匙刮下圆底烧瓶内的茶多酚结晶,称量重量,计算得率,收集在密封袋中避光保存。

**1.3.5 茶多酚的测定。**准确称取所制得的干燥粉末 0.1 g,定容至 100 mL 水溶液备用。准确吸取 1 mL 上述备用溶液置于 25 mL 的容量瓶中,加水 4 mL,酒石酸亚铁溶液 5 mL,然后加 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,用蒸馏水做空白对照,在波长 540 nm 的条件下,用分光光度计测出其吸光度,计算出茶多酚的含量<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 影响普洱茶多酚提取的单因素分析

**2.1.1 浸提时间对普洱茶多酚提取率的影响。**精确称取普洱茶粉末 5 g,固定乙醇浓度为 60%,料液比为 1:30 g/mL,提取温度为 70 ℃,考察不同的浸提时间 0.75、1.00、1.25、1.50、2.00 h 对提取普洱茶茶叶总多酚的影响。试验发现,在浸提时间 1.25 h 时茶多酚得率最高,初步认定浸提时间 1.25 h 可以作为合适的提取时间。

**2.1.2 浸提温度对普洱茶多酚提取率的影响。**精确称取普洱茶粉末 5 g,固定乙醇浓度为 60%,料液比为 1:30 g/mL,提取时间为 1.25 h,考察不同的浸提温度 50、60、70、80、90 ℃ 对提取普洱茶茶叶总多酚的影响。试验发现,在浸提温度为 80

℃ 时普洱茶多酚得率最高,初步认定最佳浸提温度为 80 ℃。

**2.1.3 料液比对普洱茶多酚提取率的影响。**精确称取普洱茶粉末 5 g,固定乙醇浓度为 60%,浸提温度为 80 ℃,提取时间为 1.25 h,考察不同的料液比 1:5、1:10、1:20、1:30 和 1:40 g/mL 对提取普洱茶茶叶总多酚的影响。试验发现,在料液比为 1:30 g/mL 时普洱茶多酚得率最高,初步认定最佳浸提料液比为 1:30 g/mL。

**2.1.4 乙醇浓度对普洱茶多酚提取率的影响。**精确称取普洱茶粉末 5 g,固定浸提时间为 1.25 h,料液比为 1:30 g/mL,提取温度为 70 ℃,考察不同的乙醇浓度 15%、30%、45%、60%、75% 对提取普洱茶茶叶总多酚的影响。试验发现,茶多酚在乙醇浓度 60% 得率最高,初步认定浸提乙醇浓度 60% 可以作为合适的提取浓度。

**2.2 影响普洱茶多酚提取的响应面试验设计** 根据以上单因素试验获得最佳的提取条件为基础,选取浸提时间(A)、浸提温度(B)、料液比(C)、乙醇浓度(D)几个工艺因素,通过应用 Box-Behnken 中心组合进行 4 因素 3 水平的试验设计。其中,响应面的因素水平编码见表 1,Box-Behnken 试验设计及结果见表 2。

表 1 响应面因素水平编码

Table 1 The factor level encoding of response surface

编码水平 Encoding level	因素 Factor			
	浸提时间 Extraction time(A) h	浸提温度 Extraction temperature (B)//℃	料液比 Solid-liquid ratio(C) g/mL	乙醇浓度 Ethanol concentration (D)//%
-1	0.50	60	1:60	45
0	1.25	75	1:30	60
1	2.00	90	1:20	75

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken test design and results

试验号 Test No.	因素 Factor				多酚得率 Polyphenol yield %
	浸提时间(A) Extraction time//h	浸提温度(B) Extraction temperature//℃	料液比(C) Solid-liquid ratio//g/mL	乙醇浓度(D) Ethanol concentration //%	
1	1.25	75	1:20	75	15.94
2	1.25	75	1:30	60	7.16
3	0.50	75	1:20	60	4.52
4	1.25	60	1:20	60	8.47
5	2.00	75	1:20	60	10.68
6	1.25	90	1:20	60	9.11
7	2.00	75	1:30	75	14.13
8	1.25	75	1:30	60	9.05
9	1.25	75	1:60	75	15.99
10	2.00	60	1:30	60	4.97
11	1.25	75	1:30	60	6.39
12	1.25	60	1:30	45	8.78
13	1.25	90	1:30	45	8.63
14	1.25	60	1:60	60	4.64
15	0.50	90	1:30	60	9.26
16	0.50	75	1:60	60	3.87

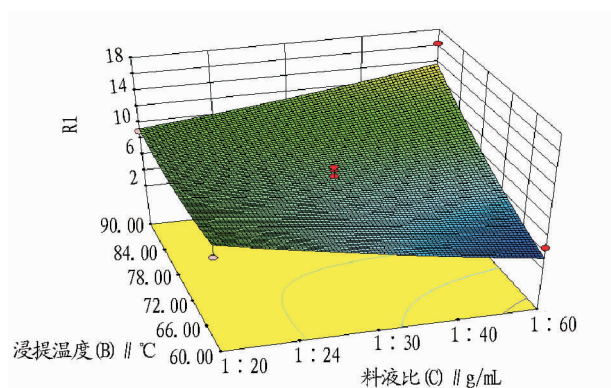
续表 2

试验号 Test No.	因素 Factor					多酚得率 Polyphenol yield %
	浸提时间(A) Extraction time//h	浸提温度(B) Extraction temperature//°C	料液比(C) Solid-liquid ratio//g/mL	乙醇浓度(D) Ethanol concentration//%		
17	0.50	75	1:30	75	13.64	
18	2.00	90	1:30	60	10.44	
19	0.50	60	1:30	60	4.51	
20	0.50	75	1:30	45	3.36	
21	1.25	75	1:60	45	3.68	
22	1.25	90	1:60	60	16.25	
23	1.25	90	1:30	75	16.87	
24	1.25	75	1:20	45	7.99	
25	1.25	75	1:30	60	9.35	
26	2.00	75	1:60	60	5.69	
27	1.25	60	1:30	75	9.44	
28	2.00	75	1:30	45	6.69	
29	1.25	75	1:30	60	8.23	

**2.3 回归统计分析** 利用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 2 中的试验数据进行多元回归拟合,其中回归统计分析的结果如下: $F_{模型} = 8.516478, P_{模型} = 0.0001^{***}; F_A = 4.40987, P_A = 0.0543; F_B = 21.60733, P_B = 0.0004^{***}; F_C = 1.060225, P_C = 0.3206; F_D = 53.65404, P_D < 0.0001^{***}; F_{AB} = 0.037968, P_{AB} = 0.8483; F_{AC} = 1.37952, P_{AC} = 0.2598; F_{AD} = 0.590725, P_{AD} = 0.4549; F_{BC} = 8.81377, P_{BC} = 0.0102^*; F_{BD} = 4.208108, P_{BD} = 0.0594; F_{CD} = 1.392264, P_{CD} = 0.2577; F_{A^2} = 4.94154, P_{A^2} = 0.0432^*; F_{B^2} = 1.336586, P_{B^2} = 0.2670; F_{C^2} = 0.13973, P_{C^2} = 0.7141; F_{D^2} = 12.45288, P_{D^2} = 0.0033^{***}; F_{失拟} = 2.649109, P_{失拟} = 0.1803$ 。由此得出, $R^2 = 0.8949, P < 0.0001$ ,说明回归方程的拟合程度好并且非常显著。拟合检验为 0.3760,没有显著意义,说明该模型的数据不存在异常点。此外,一次项 B、D 有极其显著的影响,二次项  $A^2$ 、 $D^2$  有较显著影响,二次项 BD、AC 有显著影响,而  $R_{adj}^2 = 0.7898, R_{pred}^2 = 0.4526$ 。该模型可用于提取茶多酚试验的理论预测。由表 2 可得出,浸提时间、浸提温度、料液比、乙醇浓度对响应值(茶多酚得率, Y)的影响如下面回归方程所示: $Y = 8.04 + 1.12A + 2.48B + 0.55C + 3.91D + 0.18AB + 1.09AC - 0.71AD - 2.74BC + 1.90BD - 1.09CD - 1.61A^2 + 0.84B^2 + 0.27C^2 + 2.56D^2$ 。

**2.4 最优工艺条件的确定** 根据回归模型绘制响应曲面图,并分析各提取因素对茶多酚提取率的影响,见图 1。研究发现, B、D、BC、 $A^2$ 、 $D^2$  之间存在相互影响。

通过回归方程分析可知,茶多酚得率达到最高时的最优工艺条件如图 2 所示:浸提时间 0.97 h、浸提温度 89.42 °C、料液比 1:25.44 g/mL、乙醇浓度 74.52%,预测茶多酚的得率为 17.4633%。为了进一步检验回归模型的可靠性,采用接近上述茶多酚得率最优工艺条件进行 6 次试验,并取其平均值。实际试验条件为浸提时间 1.00 h、浸提温度 90 °C、料液比 1:25 g/mL、乙醇浓度 75%,实际测得的茶多酚得率为  $(17.0487 \pm 1.12)\%$ ,和预测得率十分接近。

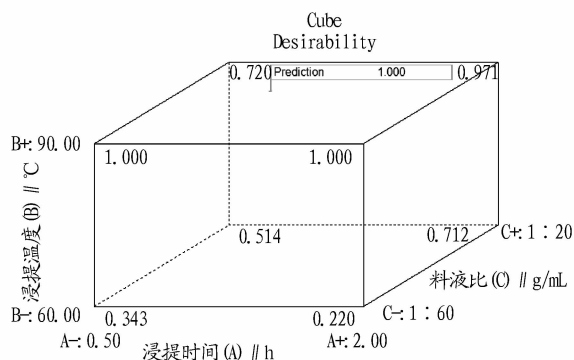


注:浸提时间 1.25 h,乙醇浓度 60%。

Note: Extraction time is 1.25 h, ethanol concentration 60%.

图 1 不同因素对茶多酚得率的响应面

Fig. 1 Response surface of different factors on the yield of tea polyphenols



注:乙醇浓度 74.52%。

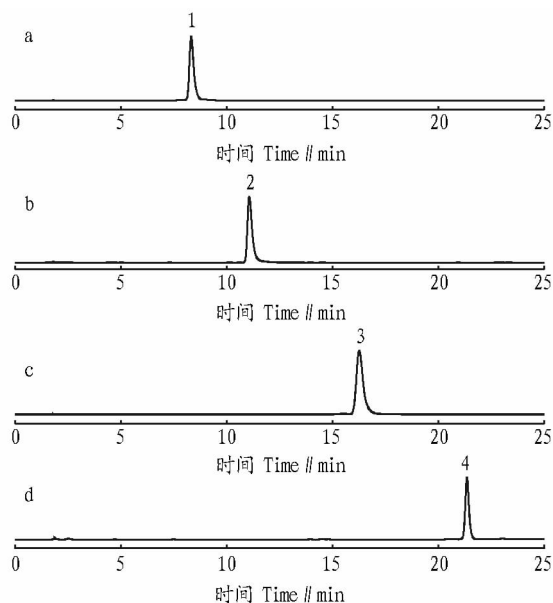
Note: Ethanol concentration is 74.52%.

图 2 最佳工艺条件立方图

Fig. 2 Cube of the optimal technological conditions

### 3 结论与讨论

茶多酚具有高效抗氧化能力,对人体有明显的保健作用,也是一种比较常见的食品添加剂。茶多酚能够抑制络氨  
(下转第 130 页)



注:a. 化合物1;b. 化合物2;c. 化合物3;d. 化合物4。1. 山姜素;  
2. 松属素;3. 小豆蔻明;4. 桉木酮。

Note:a. Compound 1; b. Compound 2; c. Compound 3; d. Compound 4. 1. Alpinetin; 2. Pinocebrin; 3. Cardamonin; 4. Alnustone.

图5 4种化合物的HPLC图

Fig.5 HPLC chromatograms of four compounds

5), 141.0 (C-1'), 140.9 (C-7), 135.7 (C-1'), 129.2 (C-6), 128.9 (C-4), 128.5 (C-2', 6'), 128.2 (C-3', 5'), 128.0 (C-3'', 5''), 126.9 (C-4''), 126.3 (C-2'', 6''), 125.8 (C-4'), 42.0 (C-2), 29.9 (C-1)。以上数据和文献[4]报道基本一致,故确定化合物4为桉木酮。

(上接第90页)

酸酶活性,减少黑色素生成<sup>[9]</sup>,还能对骨质疏松症有一定的预防和辅助治疗的效果<sup>[10]</sup>,更具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗辐射、抗高血脂等功效<sup>[11]</sup>。该研究利用茶叶乙醇浸提液中的茶多酚易溶于乙酸乙酯,咖啡碱易溶于氯仿的原理,通过试验确认普洱茶多酚提取实际条件下最佳工艺为浸提时间1.00 h、浸提温度90℃、料液比1:25 g/mL、乙醇浓度75%。实际测得的茶多酚得率为17.048%,和模型预测值相符。该试验中茶多酚得率比谢贞建等使用微波辅助提取茶多酚的方法要高<sup>[12]</sup>。该研究第一次得到临沧茶区普洱茶茶多酚提取不同因素的响应面分析图,根据分析图得到茶多酚优化提取方案,对工业生产具有一定的指导意义。

#### 参考文献

[1] 朱斌,卢涛,兰先秋,等.不同工艺对茶多酚提取效率和质量的影响研究[J].四川职业技术学院学报,2008,18(1):126-128.

### 3 结论

该研究使用C<sub>18</sub>柱,甲醇-水为流动相,通过考察流动相的组成、流速及上样量对分离效果的影响,优化了分离条件,建立了SP-HPLC分离纯化草豆蔻中有效成分的方法。在优化的试验条件下,一次分离可以得到4种高纯度化合物,经UV和NMR鉴定分别为山姜素、松属素、小豆蔻明和桉木酮。与传统的分离纯化方法相比,该法具有高效、快速、简便的优点,适合于草豆蔻中主要有效成分的快速制备。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典,2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:222-223.
- [2] 吴珍,陈永顺,王启斌.草豆蔻总黄酮抗氧化活性研究[J].医药导报,2011,30(11):1406-1409.
- [3] 唐俊,李宇,戴好富,等.草豆蔻种子化学成分及其NF-κB的激活抑制作用与抗肿瘤活性[J].中国中药杂志,2010,35(13):1710-1714.
- [4] 李元圆,杨莉,王长虹,等.草豆蔻化学成分及体外抗肿瘤作用研究[J].中国药师,2011,14(12):1740-1741.
- [5] 黄海亮.丹参的化学成分分离及其抗氧化活性研究[J].中国现代药物应用,2015,9(21):277-278.
- [6] 叶丽香,阮冠宇,李鹏.草豆蔻中总黄酮体外抗肿瘤活性研究[J].海峡药学,2012,24(6):263-264.
- [7] 季霄,吴士龙,贾天柱,等.肉豆蔻的化学成分研究[J].中草药,2014,45(23):3367-3372.
- [8] 王小兵,杨长水,华淑贞,等.草豆蔻的化学成分[J].中国天然药物,2011,8(6):419-421.
- [9] 李爱峰,李晓鹏,孙爱玲,等.高速逆流色谱分离纯化草豆蔻中山姜素和小豆蔻明[J].中草药,2011,42(4):687-690.
- [10] 陈德昌.中药化学对照品工作手册[M].北京:中国医药科技出版社,2000:47.
- [11] 安宁,杨世林,邹忠梅,等.高良姜黄酮类化学成分的研究[J].中草药,2006,37(5):663-664.
- [12] 陈德昌.中药化学对照品工作手册[M].北京:中国医药科技出版社,2000:58.
- [13] 史道华,廖琴,郭丽娇,等.草豆蔻中小豆蔻明提取工艺改进[J].医药导报,2009,28(8):1068-1069.

- [2] 董文宾,胡英,周玲.有机溶剂法制备茶多酚的工艺研究[J].中外食品加工技术,2003(5):44-47.
- [3] 邓泽元,刘娟,肖艳玉,等.金属盐沉淀法提取茶多酚影响因素的研究[J].南昌大学学报(工科版),2001,23(3):92-98.
- [4] 严明潮,罗明志.盐析对儿茶素提取的影响[J].中国茶叶,1999(4):29.
- [5] 邢其毅.基础有机化学[M].北京:高等教育出版社,1994.
- [6] 卢涛,兰先秋,朱斌,等.不同茶多酚中儿茶素的测定及柱层析法提取EGCG的比较[J].化工进展,2008,27(5):749-752.
- [7] 于基成,金莉,薄尔琳,等.超临界CO<sub>2</sub>萃取技术在茶多酚提取中的应用[J].食品科技,2007,32(1):85-87.
- [8] 王恒松,吕新勇,喻世涛,等.普洱茶中茶多酚和茶多糖的提取工艺研究[J].湖北大学学报(自然科学版),2007,29(3):277-279.
- [9] 汪建,杨长福,王和生,等.茶多酚经皮给药对小鼠皮肤中酪氨酸酶活性的影响[J].中药药理与临床,2013(4):82-83.
- [10] 车晓明,陈亮,顾勇,等.茶多酚治疗骨质疏松症的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2015(2):235-240.
- [11] 张晓梦,倪艳,李先荣.茶多酚的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2013,36(2):157-160.
- [12] 谢贞建,赵超群,邹联柱,等.普洱茶多酚的提取及抗氧化作用研究[J].食品与机械,2009,25(1):64-67.