

茶黄素的理化性质·提取分离及生物活性研究进展

丁其欢, 字成庭, 周增志, 吕才有* (云南农业大学龙润普洱茶学院, 云南昆明 650201)

摘要 茶黄素是茶多酚类物质的氧化物, 在食品、医药等领域有着广阔的应用前景。但是, 目前对茶黄素的研究还不够深入, 缺乏系统的文献参考。综合国内外有关茶黄素的最新研究报告, 对茶黄素的理化性质、形成机理、提取分离与测定以及药理活性进行了综述, 为茶黄素的进一步研究开发提供参考依据。

关键词 茶黄素; 理化性质; 提取分离; 生物活性; 研究进展

中图分类号 S272 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)11-0085-03

Research Progress in the Physico-chemical Properties, Extraction Separation and Biological Activities of Theaflavins

DING Qi-huan, ZI Cheng-ting, ZHOU Zeng-zhi, LÜ Cai-you* (Pu-er Tea Academy, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract Theaflavins are oxides of tea polyphenols, which have broad application prospects in food, medicine and other fields. However, the study of theaflavins is not deep enough at present, and lacks of literature references. In this review, the latest research reports of theaflavins were integrated, the physico-chemical properties, formation mechanism, extraction separation and biological activities of theaflavins were elaborated, which will provide some scientific basis for the exploitation of theaflavins.

Key words Theaflavins; Physico-chemical property; Extraction separation; Biological activity; Research progress

茶黄素是一类具有苯骈卓酚酮结构的酚性色素, 最早由 Roberts 从红茶中分离得到, 是影响红茶品质的重要物质, 对红茶的汤色、滋味起着决定性的作用。茶黄素的含量占红茶固形物的 0.3% ~ 1.5%^[1]。到目前为止, 从红茶中分离纯化或利用体外模拟氧化体系制备的茶黄素类已有 28 种之多^[2], 其中最主要的 4 种是茶黄素(TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(TF-3'-G)和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(TFDG)。近年来的大量研究表明, 茶黄素具有明显的抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、降脂和治疗心脑血管疾病等多种生理功效。茶黄素作为一种天然的活性成分, 在食品、医药保健等领域有着广阔的应用前景。

1 茶黄素的理化性质

茶黄素单体呈橙黄色针状结晶, 熔点在 237 ~ 240 °C, 易溶于水并且也易溶解在部分有机溶剂中, 难溶于乙醚, 不溶于氯仿和苯。茶黄素的水溶液呈鲜亮的橙黄色, 呈弱酸性, pH 约为 5.7, 在酸性条件下相对稳定, 味苦涩, 在波长 280、380 和 460 nm 处有吸收, 其中在 280 nm 处有最大吸收峰^[3]。

1.1 茶黄素的化学结构 儿茶素类化合物(C、EC、GC、ECG、EGC 和 ECGC 等)在多酚氧化酶的催化下, 通过与空气中氧气进行氧化缩合形成茶黄素。在前期的研究中, 已报道 28 种茶黄素的化学结构, 如图 1 所示。

1.2 茶黄素的稳定性 茶黄素类物质因其具有苯骈卓酚酮结构和含有多个酚羟基, 性质活泼, 易被氧化, 热稳定性较差, 随着水温、pH 的升高, 茶黄素的稳定性均会降低。Su 等^[4]对儿茶素和茶黄素混合物稳定性的研究表明, 水溶液温度为 24 °C, 茶黄素总量在 3 h 内几乎没有变化; 水温为

70 °C 时, 3 h 后茶黄素总量保留 44%; 水温为 100 °C 时, 3 h 后茶黄素几乎全部氧化降解。Lee 等^[5]研究表明, 茶黄素在 pH 为 6.5 时非常稳定, 当 pH 为 7.0 时发生缓慢降解, 当 pH 为 9.0 时降解迅速。张颖^[6]研究表明, 光照可以降低茶黄素的稳定性, 在避光条件下, 茶黄素比较稳定; 在光照条件下, 6 h 后茶黄素降解 20% 左右, 说明茶黄素应避光保存。

2 茶黄素的形成机理

儿茶素在多酚氧化酶的催化作用下, 被空气中的氧气氧化成邻醌, 邻醌极易产生聚合反应, 形成中间产物联苯酚醌类, 具有不稳定性的联苯酚醌, 极易进行自身歧化作用, 一部分还原形成黄烷醇, 另一部分氧化缩合形成茶黄素。目前研究茶黄素类的形成途径大概可分为以下 5 种^[7]: ①儿茶素(B 环上 3,4 位存在 2 个酚羟基)B 环上的 3,4-二羟基与没食子儿茶素(B 环上 3,4,5 位存在 3 个酚羟基)在多酚氧化酶(PPO)的催化作用下, 各自被氧化成邻醌, 生成的邻醌间配对, 进行聚合反应形成茶黄素及其没食子酸酯。②儿茶素或没食子儿茶素都可以与邻苯二酚、邻苯三酚、没食子酸等物质氧化发生邻醌反应, 从而生成茶黄烷醇或茶黄酸。③儿茶素 B 环上的 3,4-二羟基与儿茶素 D 环上的没食子酰基氧化形成具有苯骈卓酚酮结构的茶鞣烷酸酯类物质。④茶黄素没食子酸酯可继续与表儿茶素进行苯骈环化反应而生成具有 2 个和 3 个苯骈卓酚酮环的茶黄素类物质 Theadibenzotropolone 和 Theatribenzotropolone。⑤茶黄素自身可继续发生聚合反应生成具有 2 个苯骈卓酚酮环的双茶黄素。

3 茶黄素的提取分离

从发现茶黄素以来, 研究者对茶黄素的提取分离纯化进行了很多研究, 包括凝胶(Sephadex LH-20)柱层析法、二醇基键合硅胶制备色谱法、聚酰胺柱层析法和高速逆流色谱法等。

3.1 Sephadex LH-20 柱层析 1968 年, Crispin^[8]运用

基金项目 昌宁红茶工艺创新及品质提升技术研究(KX141393)。
作者简介 丁其欢(1990—), 男, 河南范县人, 硕士研究生, 研究方向: 茶叶加工与质量控制。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事茶叶加工与质量控制研究。
收稿日期 2017-02-22

Sephadex LH-20, 用丙酮梯度淋洗从红茶中分离出 3 个茶黄素单体的峰, 达到一定的分离纯化效果。后来此方法在茶黄

素的分离上得到广泛运用, Collier 等^[9]、竹尾忠一^[10]、Bajai 等^[11]、吴雪源等^[12]都对红茶中的茶黄素进行了分离。

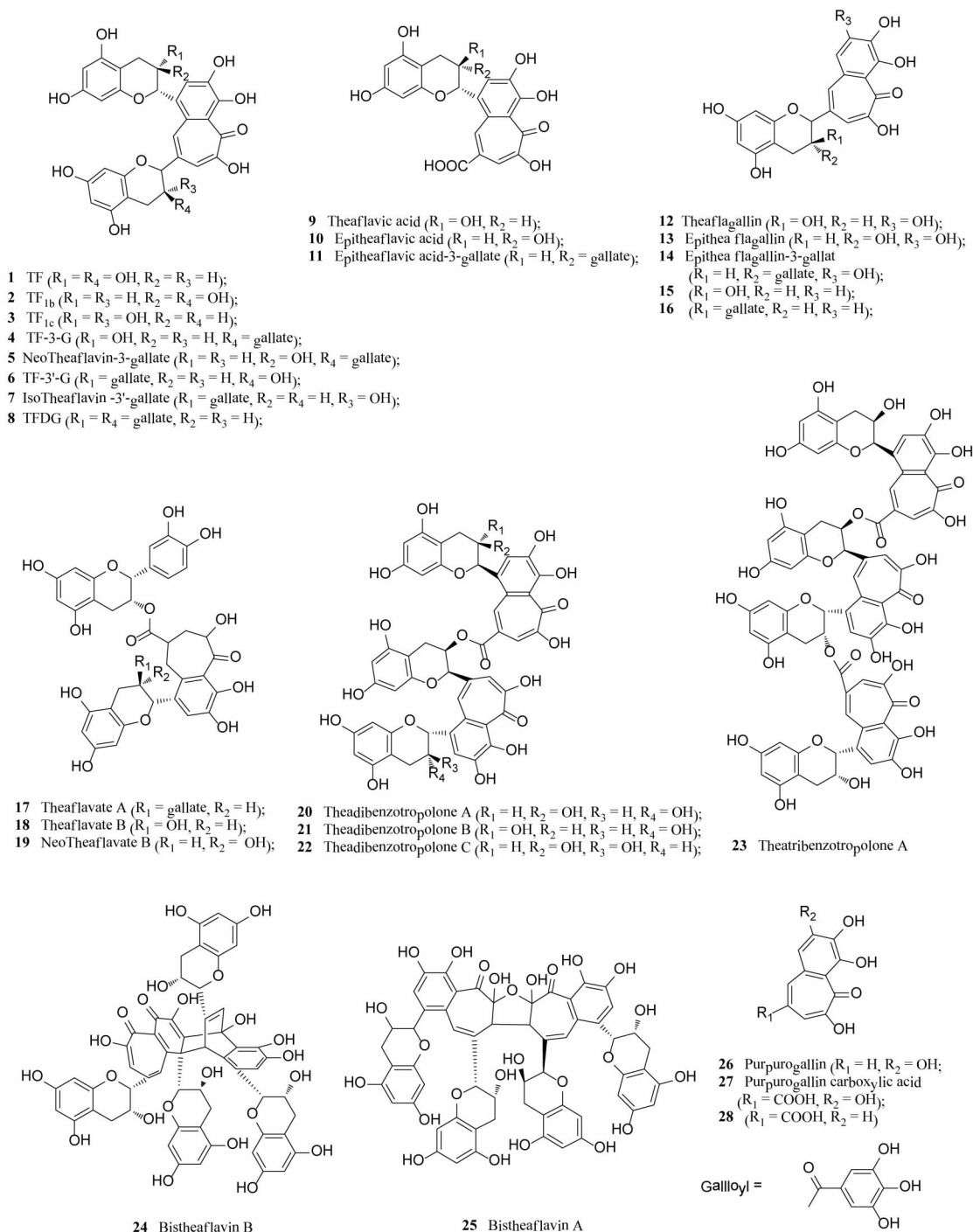


图1 茶黄素的化学结构

Fig. 1 Structures of theaflavins

3.2 二醇基键合硅胶制备色谱法 谢练武等^[13]通过比较反相 C₁₈ 制备色谱、正相硅胶制备色谱和正相二醇基键合 (Diol) 硅胶制备色谱, 得出 Diol 硅胶分离茶黄素具有较大优势, 可分离出 TF (纯度 95.6%)、TF-3-G (95.2%)、TF-3'-G (99.8%)、TF-3,3'-DG (96.3%) 茶黄素单体。

3.3 聚酰胺层析柱法 丁阳平等^[14]利用聚酰胺层析柱分离茶黄素类, 通过比较得到: 最佳洗脱剂为甲醇: 氯仿: 丙酮: 冰醋酸 = 3.0: 5.0: 8.0: 0.5, 上样量 250 mg/50 mL 聚酰胺, 最大

不能超过 300 mg/50 mL 聚酰胺, 最佳流速 0.6 BV/h, 最终得到 TF 和 TF-3'-G 的含量分别为 93%、85%。王坤波等^[15]用聚酰胺薄板实现了儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯、茶黄素、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素双没食子酸酯的有效分离。

3.4 高速逆流色谱法 江和源等^[16]首次应用高速逆流色谱法分离出茶黄素单体成分, 经比较, 选择溶剂系统为乙酸乙

酯-正己烷-甲醇-水(其比例为3:1:1:6),在进样量为250 mg时,6 h内就可有效分离TF、TFMG(包括TF-3-G和TF-3'-G)、TFDG。杨子银等^[17]通过高速逆流色谱(HSC-CC)比较茶黄素粗品有无用NaHCO₃前处理、不同溶剂系统和HSCCC系统参数的优化选择,得到经过NaHCO₃前处理的茶黄素粗品,可以很好地分离。

4 茶黄素的测定

有关茶黄素含量的测定,目前主要采用系统分析法和高效液相色谱法。

4.1 系统分析法 系统分析法(即分光光度计法)主要是利用茶黄素、茶红素和茶褐素不同的溶解特性,可以同时测定出红茶中茶黄素、茶红素和茶褐素的总量^[18]。但实践表明,此法存在重复性相对较差,测定结果偏低,并局限于红茶茶黄素的测定,而对其他茶类的茶黄素测定是否适宜还有待于进一步探讨。

4.2 高效液相色谱法 高效液相色谱法主要是利用茶黄素在波长280 nm处具有最强吸收,用高效液相色谱仪在280 nm处测定,用外标法定性,定量测定茶黄素的4种主要成分TF、TF-3-G、TFDG和TF-3'-G。李大祥等^[19]得出,高效液相色谱法测定的茶黄素总量比系统分析法高,鲜叶、绿茶、乌龙茶和红茶中的茶黄素总量分别是系统分析法所得数据的2.7、1.9、3.1和3.1倍。

5 茶黄素的生物活性

茶黄素的分子结构由C2-C4、C2-C6键与2个苯并二氢吡喃环相连接,形成特定的空间构象,产生特异的生理活性,主要包括抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、降脂和治疗心脑血管疾病等多种生理活性。

5.1 抗氧化性 茶黄素抗氧化作用的化学结构基础是具有多个羟基,其前体儿茶素A环上的2个酚羟基,以及2个B环形成的苯并卓酚酮结构有3个羟基,还有没食子酸酯所带的酚羟基,这些羟基保证了它具有很强的提供质子的能力,从而具有很强的抗氧化性。Yang等^[20]研究茶叶内含成分的抗氧化性表明,对羟自由基的清除能力:TF3 > TF2 > TF1 > EGCG;对DPPH自由基清除能力:TF3 > TF2 > EGCG > TF1。孙世利等^[21]研究表明,茶黄素具有较好的清除OH·、ABTS和DPPH自由基以及络合亚铁离子的能力,同时研究还表明,茶黄素在小鼠体内具有较高的抗氧化活性。

5.2 抗肿瘤活性 茶黄素抗肿瘤的主要机理是通过阻断细胞信号传导抑制肿瘤细胞转录和清除自由基抑制细胞的突变。同时,还可以促进细胞的凋亡,抑制癌细胞的增殖和扩散。Babich等^[22]研究表明,茶黄素能够显著地抑制恶性肿瘤细胞和无限增殖细胞的生长。Kalra等^[23]研究发现,茶黄素可以促使人体前列腺癌细胞程序性死亡。张建勇等^[24]对茶黄素的抗癌机理进行研究,以人体结肠癌细胞HCT-116为试验对象,说明茶黄素具有诱导癌细胞凋亡的作用,茶黄素诱导肿瘤细胞凋亡的机理是:提高具有促进凋亡作用的Bax蛋白的表达量,降低具有抑制凋亡作用的Bcl-XL蛋白的表达量。

5.3 抗炎抑菌活性 茶黄素的抑菌作用途径主要为通过阻断细胞表面的糖蛋白和葡聚糖的结合位点,降低葡聚糖诱导的集聚和黏附作用;通过抑制细菌的葡酰转移酶的活性,使不溶性葡聚糖的生物合成受阻;直接破坏细胞膜,来达到破坏细胞的结构、抑制细菌生长的作用。Lin等^[25]研究发现,茶黄素具有很好的抗炎效果。Pan等^[26]研究表明,茶黄素具有消除炎症的效果。金恩惠等^[27]研究表明,茶黄素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有良好的抑制效果。

5.4 降脂活性 茶黄素可通过多种机制降脂。①降低肠道吸收脂肪,通过干扰微粒形成来降低小肠吸收胆固醇;降低胆固醇的溶解度;通过抑制胰脂肪酶的活性来减少肠道中脂肪的分解,从而降低机体对脂肪的吸收。②通过抑制骨髓基质干细胞向前成脂肪细胞分化、抑制前成脂肪细胞向脂肪细胞分化、改变脂肪分化相关基因的表达来抑制脂肪细胞的形成。③抑制脂肪的生成,通过直接抑制脂肪生成途径中的关键酶(如脂肪酸合酶、乙酰辅酶A羧化酶等)的活性、调节脂肪代谢相关通路等来抑制脂肪生成。Lin等^[28]研究表明,茶黄素对脂肪酸超载的细胞和动物模型均具有减少脂质堆积、促进脂肪酸氧化和抑制脂肪酸合成的作用。Maron等^[29]研究表明,茶叶中提取的茶黄素具有降血脂的功效。

6 讨论

经过近60年对茶黄素的研究,对茶黄素的结构、理化性质和生理功效已经有了较清楚的认识,茶黄素具有明显的抗氧化性,可防癌抗肿瘤、抑菌抗病毒、降脂、改善和治疗心脑血管疾病等,但是茶黄素的生物学活性研究还仅停留在试验阶段,很少有产品开发。

茶黄素还未得到广泛利用,其主要原因是茶黄素的分离纯化困难,目前通过儿茶素进行体外酶促氧化可以合成茶黄素,但是需要严格控制反应条件。关于红茶中茶黄素的测定,李大祥等^[19]对比研究系统分析法和高效液相色谱法,发现后者测得的茶黄素含量是前者的3倍左右,因此茶黄素的测定方法还需要进一步研究。虽然红茶中茶黄素的形成机理已经基本阐述清楚,可以在红茶的实际生产加工中起到一定的指导作用,但是还不能很好地通过加工工艺来提高茶黄素的含量,需要进一步构建茶黄素在红茶发酵过程中含量变化的模型。

参考文献

- [1] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 杨子银. 茶(红茶)与茶(*Camellia sinensis*)花多酚类物质的分离鉴定及其抗氧化机理研究[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [3] STODT U, ENGELHARDT U H. Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years[J]. Food research international, 2013, 53(2): 636-648.
- [4] SU Y L, LEUNG L K, HUANG Y, et al. Stability of tea theaflavins and catechins[J]. Food Chem, 2003, 83(2): 189-195.
- [5] LEE M J, LAMBERT J D, PRABHU S, et al. Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract[J]. Cancer epidemiol biomarkers prev, 2004, 13(1): 132-137.
- [6] 张颖. 酶促氧化制备茶黄素及其性质研究[D]. 天津:天津科技大学, 2010.
- [7] 李大祥, 宛晓春, 杨昌军, 等. 茶儿茶素氧化机理[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(1): 171-181.

祛痰、抗菌的作用^[2,9]。枳壳挥发油中的柠檬烯、 γ -松油烯相对含量高于麸炒枳壳挥发油中的柠檬烯、 γ -松油烯的相对含量,这可能与枳壳和麸炒枳壳药性强弱有关。但麸炒枳壳挥发油中的邻异丙基甲苯相对含量高于枳壳挥发油中邻异丙基甲苯的相对含量,由于邻异丙基甲苯具有芳香气味,可能是引起枳壳炮制前后气味变化的成分之一。

(2) 枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油均为深黄色,但枳壳挥发油的颜色较麸炒枳壳挥发油颜色深,且枳壳挥发油的提取率远高于麸炒枳壳。结合挥发油成分的 GC-MS 分析结果,麸炒枳壳挥发油中一部分化合物的相对含量低于枳壳,另一部分化合物的相对含量高于枳壳。其原因可能是枳壳经过高温炮制过程中易挥发的化合物有所损失,从而导致其相对含量减少;而高温炮制过程中可能促进另一部分成分发生结构变化,这也可能是引起枳壳挥发油与麸炒枳壳挥发油颜色差异的原因。

(3) 根据试验结果,可推测枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油对革兰氏阳性菌的抑制活性强于其对革兰氏阴性菌的抑制活性,对细菌的抑制活性强于其对真菌的抑制活性;枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油中均含有对试验菌有抑制作用的

化学成分,但炮制后的麸炒枳壳挥发油的抑菌活性高于枳壳挥发油的活性,其原因是否与枳壳在炮制过程中高温导致挥发油化学成分结构发生变化有关,还需进一步深入研究^[10]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 陈振鹤,吴国泰,任远. 枳壳的化学成分·药理作用及临床应用[J]. 安徽农业科学,2016,44(26):95-97.
- [3] 廖凤霞,辛龙涛,陈华,等. 中药枳实与枳壳挥发油成分对比分析[J]. 重庆大学学报,2004,27(5):38-40.
- [4] 龚千锋,钟凌云,曹君,等. 不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油 GC-MS 分析[J]. 中成药,2007,29(11):1639-1644.
- [5] 曹君,王少军,龚千锋,等. 不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中草药,2005,36(2):172-177.
- [6] 蒋以号,杨先玉,张庆华,等. 枳壳樟帮法炮制前后挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中药材,2010,33(8):1233-1236.
- [7] 彭金年,程庚金生,张付远,等. 炮制后安徽枳壳挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学,2014,42(34):12071-12072.
- [8] 金振国,冀玉良,姚焕英,等. 白花曼陀罗挥发油主要化学成分和抑菌活性测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(28):17244-17245,17270.
- [9] 孙文基,绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998.
- [10] 施学骄,张杰红,樊丹青,等. 枳实、枳壳挥发油化学成分及抑菌活性的比较研究[J]. 中药与临床,2012,3(2):25-27,31.
- [21] 孙世利,苗爱清,凌彩金,等. 茶黄素体外抗氧化作用研究[C]//中国科学技术协会学会. 经济发展方式转变与自主创新——第十二届中国科学技术协会年会:第二卷. 福州:福建省人民政府,2010.
- [22] BABICH H, PINSKY S M, MUSKIN E T, et al. In vitro cytotoxicity of a theaflavin mixture from black tea to malignant, immortalized, and normal cells from the human oral cavity[J]. Toxicology in vitro, 2006, 20(5):677-688.
- [23] KALRA N, SETH K, PRASAD S, et al. Theaflavins induced apoptosis of LNCaP cells is mediated through induction of p53, down-regulation of NF- κ B and mitogen-activated protein kinases pathways[J]. Life sciences, 2007, 80(23):2137-2146.
- [24] 张建勇,江和源,王岩,等. 茶黄素提取物及茶黄素片的急性毒性[J]. 中国农学通报,2014,30(21):285-288.
- [25] LIN Y L, TSAI S H, LIN-SHIAU S Y, et al. Theaflavin-3,3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF- κ B in macrophages[J]. European journal of pharmacology, 1999, 367(2/3):379-388.
- [26] PAN M H, LAI C S, WANG H, et al. Black tea in chemo-prevention of cancer and other human diseases[J]. Food science and human wellness, 2013, 2(1):12-21.
- [27] 金恩惠,吴媛媛,屠幼英. 茶黄素抑菌作用的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(6):108-112.
- [28] LIN C L, HUANG H C, LIN J K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells[J]. J Lipid Res, 2007, 48(11):2334-2343.
- [29] MARON D J, LU G P, CAI N S, et al. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: A randomized controlled trial[J]. Archives of internal medicine, 2003, 163(12):1448-1453.

(上接第 87 页)

- [8] CRISPIN D J. The separation of theaflavins on sephadex LH-20[J]. J Chromatogr, 1971(54):133-135.
- [9] COLLIER P D, BRYCE T, MALLOWS R, et al. The theaflavins of black tea[J]. Tetrahedron, 1973, 29(1):125-142.
- [10] 竹尾忠一. 茶黄素的分离与定量[J]. 茶叶技术研究, 1973(45):46.
- [11] BAJAI K L, ANAN T, TSUSHIDA T, et al. The defects of (-)-EC on the oxidation of TF by PPO from tea leaves[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(7):1767-1772.
- [12] 吴雪源,李纯. 茶黄素组分的薄层凝胶色谱分析[J]. 茶业通报, 1988(2):11-19.
- [13] 谢练武,郭亚平,方继前,等. 二醇基键合硅胶制备色谱分离纯化茶黄素类及其稳定性[J]. 食品科学, 2012(21):96-99.
- [14] 丁阳平,刘仲华,黄建安. 聚酰胺分离纯化茶黄素类物质研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12):55-57.
- [15] 王坤波,刘仲华,黄建安,等. 高速逆流色谱法分离茶黄素条件的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(6):191-195.
- [16] 江和源,程启坤,杜琪珍. 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4):30-35.
- [17] 杨子银,屠幼英,赵勤,等. 高速逆流色谱分离茶黄素单体的初步研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10):87-90.
- [18] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京:中国农业出版社, 2009.
- [19] 李大洋,杨荣俊,方世辉,等. Roberts 法和 RP-HPLC 法测定茶黄素的比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1):87-89.
- [20] YANG Z Y, JIE G L, DONG F, et al. Radical-scavenging abilities and antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters in H_2O_2 -mediated oxidative damage system in the HPF-I cells[J]. Toxicology in vitro, 2008, 22(5):1250-1256.

科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。