

双水相与超声耦合提取安吉白茶茶多酚的工艺研究

林海燕^{1,2}, 曾超珍^{1,2,3}, 刘仲华^{1,2*}

¹湖南农业大学茶学教育部重点实验室; ²国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128;

³中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004

摘要:以安吉白茶叶片为实验材料, 探讨双水相与超声耦合法提取茶多酚的工艺条件, 考察料液比、超声波时间、硫酸铵质量浓度、醇水比对安吉白茶茶多酚提取效果的影响, 并在单因素试验的基础上, 采用正交试验方法优化茶多酚提取工艺参数。结果表明: 安吉白茶茶多酚的最佳提取工艺条件为: 醇水比为 0.7、硫酸铵质量浓度为 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、超声波时间为 35 min、料液比为 1:30, 在此条件下茶多酚的提取率达 25.40%, 显著高于常规超声波提取法。通过比较安吉白茶 4 个不同叶色时期的茶多酚提取率, 复绿期叶片的茶多酚含量最高。

关键词: 超声提取; 双水相; 安吉白茶; 茶多酚

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.025

Extraction of Tea Polyphenols from 'AnjiBaicha' (*Camellia sinensis*) by Aqueous Two-phase System Coupling with Ultrasonic

LIN Hai-an^{1,2}, ZENG Chao-zhen^{1,2,3}, LIU Zhong-hua^{1,2*}

¹Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Hunan Agricultural University;

²National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients,

Changsha 410128, China; ³College of Life Science and Technology, Central

South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

Abstract: In this paper, tea polyphenols was extracted from 'AnjiBaicha' (*Camellia sinensis*) by Aqueous two-phase system coupling with ultrasonic. The effects of factors, including solid-to-liquid ratio, ultrasonic time, ammonium sulfate concentration, propanol and water ratio on the extraction rates of tea polyphenols, were explored by single-factor and orthogonal test. The results showed that the optimal extraction conditions were solid-to-liquid ratio 1:30, ultrasonic time 35min, ammonium sulfate concentration $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, propanol and water ratio 0.7. Under such conditions, tea polyphenols extraction rates from 'AnjiBaicha' was up to 25.40%. Aqueous two-phase system coupling with ultrasonic obtain the maximum tea polyphenols extraction yield and obviously higher than the conventional ultrasonic extraction. By comparing tea polyphenols extraction yield of the four different leaf color periods from 'AnjiBaicha', fully green period is highest.

Key words: Ultrasonic extraction; two water phase; 'AnjiBaicha' (*Camellia sinensis*); tea polyphenols

安吉白茶(*Camellia sinensis* cv. 'Anjibaicha')属于一种低温敏感型的珍稀茶树变异品种, 属于绿茶类, 它含有一定量的茶多酚。茶多酚(Tea polyphenols, TP)是茶叶中多酚类物质的总称, 又称茶单宁或茶鞣质, 主要包括儿茶素类、黄酮及黄酮醇类、花青素类、酚酸类等四大物质^[1], 是一种天然的食品

添加剂和抗氧化剂, 其含量占茶叶干重的 20% ~ 30%^[2]。研究表明, 茶多酚具有抗癌、抗衰老、预防心脑血管疾病、消除自由基、抗辐射、降血糖等药理作用, 广泛应用于医药保健、食品、日用化工以及饮料等领域^[3,4]。因此将茶多酚安全有效的从茶叶中提取出来成了研究的热点。目前, 提取茶多酚的技术主要有: 有机溶剂提取法、超临界萃取法、超声波辅助提取法、离子沉淀法、树脂分离法、膜渗透分离法等^[5]。

双水相萃取技术(aqueous two phase extraction, ATPE)是指利用生物大分子在两种互不相溶的水相

收稿日期: 2017-05-23 接受日期: 2017-07-06

基金项目: 湖南省自然科学基金(2017JJ3104); 湖南省教育厅优秀青年项目(15B116); 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室开放研究项目(15KFXM14, 16KFXM05); 湖南省植物功能成分利用协同创新中心项目

* 通信作者 E-mail: larkin-lin@163.com

之间分配系数的不相同,从而分离纯化生物大分子^[6,7]。该技术萃取环境和条件温和,生物相容性好,萃取率高,分配系数可控,易于放大和操作,能耗低且易与其它技术集成,目前广泛应用于生物提取、制药、天然产物分离、金属与煤矿分析、食品化工等领域^[8-12]。近年来,研究人员将双水相萃取技术与超声波、微波相、溶剂浮选法等方法联用对化合物进行分离提取,结果表明,两种技术相耦合后提取率明显提高^[13-18]。本文采用丙醇-硫酸铵双水相超声波辅助的方法提取安吉白茶茶多酚,探讨其最佳提取工艺,为安吉白茶茶多酚提供一种新的提取方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

主要材料与试剂:安吉白茶(湖南省茶叶研究所高桥基地),2016年3月~5月根据茶叶叶片的颜色采4个不同发育时期(黄绿期、白化前期、白化后期、复绿期)的新梢(1,2叶)。茶多酚标准品($\geq 95\%$),购于上海安谱实验科技股份有限公司。其余试剂均为国产分析纯试剂。

安吉白茶的预处理:将茶叶样品杀青后放于鼓风干燥箱中,在40℃条件下干燥至恒重,粉碎,过

40目筛,置于密封的干燥玻璃瓶备用。

仪器与设备:KQ-5013型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司),UV-2201紫外-可见分光光度计(日本岛津),DZF-6030A型真空干燥箱(上海雷韵试验仪器制造有限公司),S2型电热恒温水浴锅(上海精密科学仪器有限公司),RE-52B型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器责任有限公司),FW177型粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 茶多酚的提取

称取2.0g茶叶粉末,加入一定比例的丙醇-硫酸铵双水相溶液,用超声波提取。收集滤液,对其进行茶多酚含量的测定。

1.2.2 茶多酚含量的测定

茶多酚含量测定方法见参考文献^[19]。

1.2.3 单因素试验

分别选择料液比、超声波时间、硫酸铵浓度、醇水比为因素,探讨其对安吉白茶(复绿期)茶多酚提取效果的影响。因素及水平的设计如表1。各单因素试验所选择的基本条件为醇水比0.6、硫酸铵质量浓度为 $0.35\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、料液比1:30、超声时间30min。

表1 单因素试验的各因素及水平
Table 1 Factors and levels of single-factor test.

因素 Factors	水平 Levels					
	1	2	3	4	5	6
料液比 Solid/liquid ratio ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70
超声时间 Ultrasonic time (min)	20	25	30	35	40	45
硫酸铵质量浓度 Ammonium sulfate concentration ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45
醇水比 Propanol/water ratio (V/V)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8

1.2.4 正交试验

选用醇水比、硫酸铵质量浓度、料液比,超声时间为因素,在单因素试验结果的基础上,设计四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验,利用正交试验的结果,确定安吉白茶茶多酚最优提取工艺,并对其进行验证试验。

2 结果与分析

2.1 安吉白茶茶多酚提取条件的优化

2.1.1 单因素试验

2.1.1.1 料液比对茶多酚提取率的影响

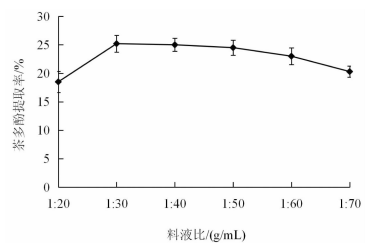


图1 料液比对茶多酚提取率的影响

Fig. 1 Effect of solid-to-liquid ratio on extraction rate of tea polyphenols

由图1可知,当料液比在1:20~1:30范围时,随着料液比增大,茶多酚提取率也增大;当料液比为

1:30,茶多酚提取率达最大值。当料液比在1:30~1:70范围时,由于料液比增大,密集度减小,致使茶多酚提取率降低。分析其原因可能是料液比小于1:30时,溶液对茶多酚的萃取不充分,导致其提取率较低;当料液比达到1:30时,茶多酚的提取率也达到了最高值,再继续增大料液比,对茶多酚的提取率影响较小,当料液比超过1:30,溶剂用量较大,影响双水相体系的稳定性,导致茶多酚提取率有所降低。

2.1.1.2 超声波时间对茶多酚提取率的影响

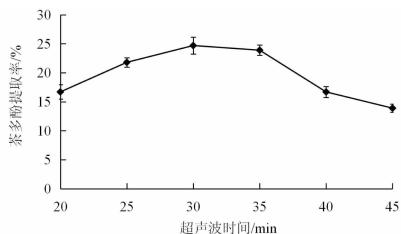


图2 超声波时间对茶多酚提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic time on extraction rate of tea polyphenols

由图2可知,当超声波时间为20~30 min,随着超声波时间的不断增加,就拥有充足的提取时间,安吉白茶茶多酚提取率随之增大;当超声时间达到30 min的时候,茶多酚的提取率达到最大值,当超声波时间为30~45 min,随着超声时间的增加,提取的时间过久,被提取出来的茶多酚易氧化了,其结构被破坏,使得安吉白茶茶多酚提取率降低。

2.1.1.3 硫酸铵质量浓度对茶多酚提取率的影响

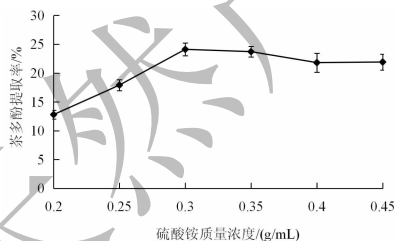


图3 硫酸铵质量浓度对茶多酚提取率的影响

Fig. 3 Effect of ammonium sulfate concentration on extraction rate of tea polyphenols

由图3可知,硫酸铵质量浓度的改变会影响双水相体系的相能力,形成稳定的双水相体系时,物质在醇相中的溶解能力达到最佳。在丙醇-硫酸铵双水相体系中,茶多酚在上相(丙醇)中具有较大的分配系数,当硫酸铵质量浓度为 $0.30 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,多

酚提取率达到最大值(24.1%),之后,当硫酸铵质量浓度继续增加,茶多酚的提取率出现逐渐下降的趋势,其主要原因有可能是硫酸铵的质量浓度太高,当其超过在水中的饱和溶解量后,少量的硫酸铵会析出,无机盐相增大,有机相减小,导致茶多酚的提取率减少。

2.1.1.4 醇水比对茶多酚提取率的影响

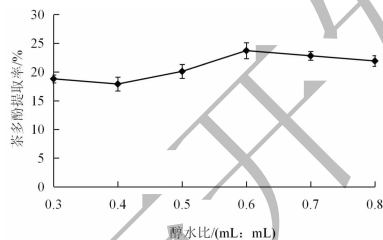


图4 醇水比对茶多酚提取率的影响

Fig. 4 Effect of propanol and water ratio on extraction rate of tea polyphenols

由图4可看出,当醇水比在0.3~0.7范围内,茶多酚的提取率逐渐升高,当醇水比达到0.6时,安吉白茶茶多酚提取率达到最大值,再继续增加醇水比,茶多酚提取率反而有所下降,其原因可能丙醇的浓度太大,影响了双水相体系的相能力和茶多酚的稳定性,使得在上相中的茶多酚含量有所降低。而醇水比太小(小于0.6),就无法形成很好的双水相体系,茶多酚的萃取就不完全,大大的影响其提取效果。

2.2 正交试验

由表2、表3综合分析可以得出,超声波与丙醇-硫酸铵双水相体系耦合提取安吉白茶茶多酚的影响因素排序为: $D > C > B > A$,即醇水比>硫酸铵质量浓度>超声时间>料液比,醇水比和硫酸铵质量浓度对茶多酚提取率的影响差异显著。茶多酚最佳工艺条件为 $A_1B_3C_2D_2$,即料液比为1:30、超声波时间为35 min、硫酸铵质量浓度为 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、醇水比为0.7,在此优化工艺下,进行3次重复验证试验,茶多酚提取率为25.40%。

2.3 不同提取方法的比较

将本试验研究最佳提取方法与常规超声波提取方法比较,结果见表4,丙醇-硫酸铵双水相超声耦合提取安吉白茶茶多酚的含量明显高于常规超声波提取法。

表2 正交试验结果与分析
Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验号 No.	A 料液比 Solid/liquid ratio (g · mL ⁻¹)	B 超声时间 Ultrasonic time (min)	C 硫酸铵质量浓度 Ammonium sulfate concentration (g · mL ⁻¹)	D 醇水比 Propanol/water ratio (V/V)	茶多酚提取率 TP extraction rates(/%)
1	1:30	25	0.3	0.6	21.02
2	1:30	30	0.35	0.7	24.26
3	1:30	35	0.4	0.8	19.13
4	1:35	25	0.35	0.8	18.73
5	1:35	30	0.4	0.6	20.18
6	1:35	35	0.3	0.7	23.56
7	1:40	25	0.4	0.7	18.66
8	1:40	30	0.3	0.8	19.38
9	1:40	35	0.35	0.6	24.50
K1	21.47	19.47	21.32	21.9	
K2	20.823	21.273	22.497	22.16	
K3	20.847	22.397	19.323	19.08	
R	0.647	2.927	3.174	3.08	

表3 方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis

因素 Factors	方差平方和 SS	自由度 df	F 值 F value	显著性 P
A	0.807	2	1.000	-
B	13.079	2	16.207	-
C	15.441	2	19.134	*
D	17.506	2	21.693	*
误差 Error	0.807			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{0.01}(2,2) = 99.0$

表4 不同提取方法的比较
Table 4 Comparison of different extraction methods

方法 Methods	超声波时间 Ultrasonic time (min)	料液比 Solid/liquid ratio (g · mL ⁻¹)	醇水比 Propanol/water ratio(V/V)	硫酸铵质量浓度 Ammonium sulfate concentration (g · mL ⁻¹)	茶多酚提取率 TP extraction rates(%)
双水相超声耦合法 Aqueous two-phase system coupling with ultrasonic.	35	1:30	0.7	0.35	25.4
常规超声波法 Conventional ultrasonic extraction	35	1:30	0.7	-	17.5

2.4 安吉白茶不同叶色时期茶多酚含量的比较

用本试验的最佳提取方法对安吉白茶不同的叶色时期的叶片提取茶多酚(重复三次),从图5可以

看出,安吉白茶白化期(白化前期、白化后期)的茶多酚含量低于绿期(黄绿期、复绿期),其中以复绿期的含量最高。

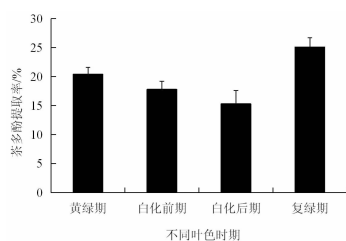


图5 不同叶色时期茶多酚提取率的影响

Fig. 5 Effect of different color times on extraction rate of tea polyphenols

3 结论与讨论

本试验探讨了超声波与丙醇/硫酸铵双水相体系耦合方法提取安吉白茶茶多酚的最佳工艺条件,得出最佳提取条件为:料液比为1:30、超声波时间为35 min、硫酸铵质量浓度为 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、醇水比为0.7,在此条件下,安吉白茶茶多酚的提取率为25.40%。与常规的超声波提取方法相比较,本方法茶多酚提取率的显著提高。

分别从不同的发育时期的安吉白茶新梢叶片中提取茶多酚,安吉白茶白化期(白化前期、白化后期)的茶多酚含量低于绿期(黄绿期、复绿期),而复绿期的含量最高。

超声波与丙醇/硫酸铵双水相体系耦合方法可缩短提取时间、提高茶多酚提取率、获得更高纯度、高活性的物质,具有良好的应用前景。本文为低成本提取安吉白茶有效成分提供了重要的理论依据和试验依据。

参考文献

- 1 Yang SM(杨申明), Wang ZJ(王振吉), Wang B(王波). Study on extraction technology of tea polyphenol from Baizhu mountain tea. *Food Ind*(食品工业), 2014, 35:4-5.
- 2 Fu XF(付晓风), Zhou YM(周瑶敏), Lv WS(吕伟生). Preliminary study on extraction process of tea polyphenols. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报), 2012, 24:127-128.
- 3 Song CK(宋传奎), Xiao B(肖斌), Wang YL(王艳丽), et al. Optimizing of ultrasonic wave-assisted extraction process of tea-polyphenols substance from green tea. *J North-west Sci-Tech Univ Agric Forest*(西北农林科技大学学报), 2011, 39:133-135.
- 4 Feng HH(冯欢欢), Chen SW(陈识文), Gao MX(高梦祥). Optimization of the extraction process of tea polyphenols from tea dust by response surface methodology and β -CD. *Food Sci Technol*(食品科技), 2014, 39:212-213.

- 5 Wang H(王慧), Jiang LF(蒋莲芬), Tang C(唐超), et al. Study on the extraction technology of tea polyphenols from mountain green tea. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 2012, 40:4007-4009.
- 6 Guo H(郭辉), Zhang ZY(张中玉), Luo YQ(罗宇倩), et al. Separation of flavonoids from bamboo leaves by aqueous two-phase extraction. *Amino Acids Biotic Res*(氨基酸和生物资源), 2012, 34:24-28.
- 7 Zhang TJ(张团结), Xiong DL(熊道陵), Chen C(陈超), et al. Separation and purification of tea saponin with propyl alcohol/ammonium sulphate aqueous two-phase system. *Fine Chem*(精细化工), 2015, 32:1010-1011.
- 8 Xavier L, Freire M S, Vidal-Tato I, et al. Aqueous two-phase systems for the extraction of phenolic compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *J Chem Technol Biot*, 2014, 89:1772-1778.
- 9 Yuzugullu Y, Duman YA. Aqueous two-phase (PEG4000/ Na_2SO_4) extraction and characterization of an acid invertase from potato tuber, *Solanum tuberosum*. *Prep Biochem Biotech*, 2015, 45:696-711.
- 10 Wu XT, Li GX, Yang HL, et al. Study on extraction and separation of butyric acid from clostridium tyrobutyricum fermentation broth in PEG/ Na_2SO_4 aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, 2015, 403:36-42.
- 11 Wang JH(汪建红), Liao LM(廖立敏), Wang B(王碧), et al. Extraction of limonin in lemon peel by ultrasonic-assisted aqueous two-phase system. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1081-1085.
- 12 Chen JZ(陈建中), Ge SL(葛水莲), Zan LF(咎立峰), et al. Optimization of aqueous two-phase extraction of total flavonoids from *Farfugium japonicum*(L. f.) kitam by response surface methodology and antibacterial activity. *Food Sci*(食品科学), 2015, 36:57-59.
- 13 Chen G(陈钢), Li DL(李栋林), Shi JX(史建鑫), et al. Optimization of ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of tea polyphenols by response surface Design. *Food Sci*(食品科学), 2016, 37:95-100.
- 14 Guo T, Su D, Huang Y, et al. Ultrasound-assisted aqueous two-phase system for extraction and enrichment of zanthoxylumarmatum lignans. *Molecules*, 2015, 20:15273-15286.
- 15 Chen S(陈帅), Wang HZ(王慧竹), Zhu L(朱琳), et al. Optimization of microwave-assisted aqueous two-phase extraction process of total flavonoids from *Moghaniaphilippinensis*. *J Henan Univ Technol. Nat Sci*(河南工业大学学报, 自科版), 2015, 36:83-88.