

茶绿色素的提取及体外清除自由基活性研究

郭凌云¹, 舒阳^{2*}

(1. 华中师范大学第一附属中学, 武汉 430223; 2. 华中农业大学园林学院茶学系, 武汉 430070)

摘要: **目的** 研究几种不同提取方法提取的茶绿色素的得率、化学组成、色相及体外清除自由基活性。**方法** 分别用 95%乙醇经常温浸泡、热水提取、超声波提取及微波提取茶绿色素, 采用常规方法分析该色素化学组成及色相, 试剂盒检查其清除自由基活性。**结果** 与其他几种提取方法相比, 微波提取茶绿色素的得率、色素中叶绿素含量均最高, 分别为 37.02%、8.92%; 该色素所含茶多酚、总黄酮、氨基酸含量也相对较高; 微波提取色素的绿色度最高, 为-27.63, 亮度(40.21)仅略低于常温提取色素的亮度(40.29); 该色素清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的活性也较高, 分别仅略低于热水提取色素的清除活性, 但没有显著性差异。**结论** 微波提取茶绿色素不仅得率高、色相好, 且该色素清除自由基活性高, 是茶绿色素提取的最佳方法。

关键词: 茶绿色素; 提取; 清除自由基

Study on the extraction and *in vitro* free radical scavenging activity of tea green pigment

GUO Ling-Yun¹, SHU Yang²

(1. No. 1 Middle School Attached to Central China Normal University, Wuhan 430223, China;
2. College of Horticulture & Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the yield, chemical components, color appearance and *in vitro* free radical scavenging activity of tea green pigment extracted with different methods. **Methods** Tea green pigment was extracted with 95% ethanol through the methods of room-temperature immersion, hot water extraction, ultrasonic extraction and microwave extraction, respectively. Its chemical components and color appearance were studied with conventional methods, and the free radical scavenging activity was measured with commercially assay kits. **Results** Compared to other extraction methods, the yield of the pigment extracted with microwave and the chlorophyll content in the pigment were the highest, 37.02% and 8.92%, respectively. The content of tea polyphenols, total flavonoids and amino acids in the pigment was also relatively high. The greenness of the pigment was the highest, -27.63, and the brightness (40.21) was only lower than that of tea green pigment extracted with room-temperature immersion (40.29). The scavenging activities against hydroxyl radical and superoxide anion radical were high, and slightly lower than that of tea green pigment extracted with room-temperature immersion. **Conclusion** The yield and color appearance of the tea green pigment extracted with microwave is excellent, and the free radical scavenging activity is high. The microwave extraction method is the best method for the extraction of tea green pigment.

KEY WORDS: tea green pigment; extract; scavenging free radicals

*通讯作者: 舒阳, 硕士研究生, 主要研究方向为茶叶深加工。E-mail: 835090366@qq.com

*Corresponding author: SHUYang, Postgraduate Student, College of Horticulture & Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China. E-mail: 835090366@qq.com

1 引言

茶绿色素(tea green pigment)是从茶鲜叶或绿茶中提取制备的一种天然色素,可分为脂溶性茶绿色素和水溶性茶绿色素两种^[1]。脂溶性茶绿色素除主要成分叶绿素外,还含有丰富的黄酮醇及其甙、儿茶素聚合、缩合产物和酚酸及缩酚酸等物质^[2],以及一定的氨基酸、维生素和微量元素等^[3],具有茶叶所具有的营养及抗氧化、抗癌、预防心脑血管疾病等多种保健功能^[4],为一种天然、优质、营养、保健色素。

茶绿色素的主要成分叶绿素为脂溶性化合物,不溶于水,且其稳定性相对较低,易受热等外界条件的影响而发生变化,导致变色;茶绿色素所含的其他成分儿茶素、黄酮醇及其甙等化合物也相对不稳定,易发生分解、氧化等变化,导致其抗氧化、清除自由基活性降低。因此,有必要对其提取方法展开研究。目前关于茶绿色素提取制备等方面研究较少,仅肖伟祥等^[2,3]对茶绿色素的热提取及组成展开了相应研究,杨晓萍等^[1,5]对茶绿色素的热提取、制备及稳定性展开了相应研究,朱荣莉等^[6]研究了茶绿色素的微波提取工艺,陈文伟等^[7]研究了茶绿色素的微胶囊化等。茶绿色素清除自由基活性方面的研究还未见报道。

本文采用几种不同提取方法提取茶绿色素,并对不同提取方法提取茶绿色素的得率、组成及其色相、清除自由基活性展开比较研究,为茶绿色素的开发利用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 鲜叶

鲜叶采自华中农业大学茶学系教学茶园福鼎大白一芽四、五叶成熟叶片。

2.2 仪器与试剂

恒温水浴锅(HH,江苏金坛中大仪器厂);紫外可见分光光度计(MS2000,上海菁华科);旋转蒸发器(MODEL-3型,上海亚荣科学仪器厂);真空冷冻干燥机(ALpHAL-2型,German);色差计(WSC-S,上海精密科学仪器有限公司)。

酒石酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、茛三酮、蒽酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);浓硫酸(分析纯,信阳市化学试剂厂)。

2.3 茶绿色素的提取

茶鲜叶经蒸汽杀青后,按1:10的体积比加入95%的乙醇,用组织捣碎机捣碎后,分别采用室温浸提120 min(25℃)、60℃热水浸提60 min、超声波浸提60 min、微波提取2 min等几种不同方法提取茶绿色素,浸提液经离心、真空浓缩、冷冻干燥得脂溶性茶绿色素墨绿色粉末,称重,按公式(茶绿色素的得率%=茶绿色素的重量/茶鲜叶干重*100)计算茶绿色素的得率。

2.4 茶绿色素的主要化学组成

茶多酚、总黄酮、游离氨基酸、可溶性糖含量测定分别采用酒石酸铁比色法、三氯化铝比色法、茛三酮显色法、硫酸-蒽酮比色法^[8],叶绿素含量测定采用分光光度法,按Arnon公式计算含量^[9]。

2.5 茶绿色素的色度

将几种茶绿色素分别配成1%的浓度,用色差计法测定其色差,选用 L^*a^*b 表色系统^[10]。

2.6 茶绿色素体外清除·OH和 $O_2\cdot^-$ 活性分析

分别用南京建成试剂盒,采用邻苯三酚自氧化法测定样品清除 $O_2\cdot^-$ 活性^[11],采用2-脱氧核糖法测定样品清除·OH活性^[12],按试剂盒说明书进行操作。

2.7 数据分析

所有试验结果均为3次重复的平均值,表示为 $\bar{x} \pm s$,实验结果用SPSS11.5软件中的one-way ANOVA进行统计分析,采用LSD进行显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果与分析

3.1 提取方法对茶绿色素得率的影响

由图1可知,几种提取方法显著影响茶绿色素的得率。常温提取茶绿色素的得率最低,显著低于其他3种提取方法;微波提取茶绿色素的得率最高,与热水提取的得率无显著差异,但显著高于超声波提取茶绿色素的得率。微波提取技术具有快速、溶剂用量少、提取率高等优点。郑琴等^[13]对制川乌和白芍中有效成分提取研究表明微波提取率要高于传统热提取工艺;黄子琪等^[14]对蛹虫草菌丝体中虫草素的研究结果表明微波提取要好于超声波提取,这些与本研究结果微波提取茶绿色素2 min的得率比其他方法

提取 60~120 min 的得率高的结果一致。

3.2 提取方法对茶绿色素主要化学组成的影响

提取方法不仅显著影响茶绿色素的得率, 也显著影响了茶绿色素的组成(见表 1); 除可溶性糖含量外, 不同提取方法对茶绿色素中茶多酚、总黄酮、叶绿素、氨基酸的含量均达到显著性差异。常温提取茶绿色素所含的叶绿素、总黄酮、氨基酸含量最低, 但茶多酚含量最高; 热水提取茶绿色素所含的氨基酸含量最高, 但茶多酚含量最低; 微波提取茶绿色素所含的叶绿素含量较高, 茶多酚、总黄酮、氨基酸的含量也相对较高。总体来说, 微波提取茶绿色素化学组成最佳。

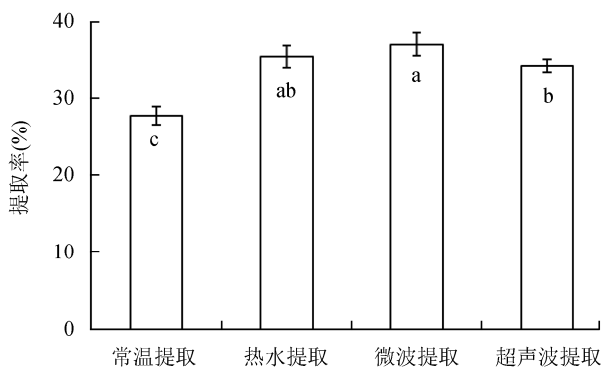


图 1 不同提取方法提取茶绿色素的得率

Fig. 1 Extracting rate of tea green pigment extracted with different extraction methods

注: 不同字母表示在 0.05 水平下达显著性差异。

叶绿素是脂溶性色素, 极性小, 易溶于有机溶剂, 尤其是丙酮, 在乙醇中的溶解度相对较小; 且叶绿素在叶绿体中与蛋白质结合很紧, 因此, 叶绿素的提取多用 80% 的含水丙酮或丙酮/乙醇的混合溶液^[15]。由于茶绿色素为一种营养保健天然食用色素^[3], 以含水乙醇提取, 为增强叶绿素的溶出多采取热提取等方式。本研究结果也表明热、微波、超声波提取

可有效提高叶绿素的溶出; 但是, 长时间的热处理尽管可提高茶绿色素的得率, 增加茶绿色素中叶绿素、氨基酸含量, 但也易导致茶绿色素所含酚类物质的氧化。微波提取具有穿透能力强、微波热量由里及表、时间短等优势。微波提取不仅可增强叶绿素的溶出, 也减少了茶多酚的氧化、叶绿素结果的破坏。

3.3 茶绿色素的色度

在 L^* 、 a^* 、 b^* 表色系统中, L^* 表示物体的亮度, 值越大表示物体越明亮。 a^* 表示红绿色调, a^* 为负值表示物体颜色偏绿, 且绝对值越大, 表明绿的程度越深; a^* 为正值表示物体颜色偏红, 且 a^* 值越大, 红色调越强。 b^* 表示黄蓝色调, b^* 为负值表示物体颜色偏蓝, 且绝对值越大, 蓝色越深; b^* 为正值表示物体颜色偏黄, 值越大, 黄色越深^[10]。

由表 2 可知, 几种提取方法提取茶绿色素的亮度均较高, 常温提取、微波提取茶绿色素的亮度要好于超声波提取、热水提取; 就绿色度而言, 微波提取 > 常温提取 > 超声波提取 > 热水提取; 就黄色度而言, 热水提取 > 超声波提取 > 微波提取 > 常温提取。由此可见, 常温提取、微波提取茶绿色素质量要好于超声波提取、热水提取茶绿色素的质量。

3.4 茶绿色素体外清除自由基活性分析

图 2 结果表明茶绿色素有较好清除 $\cdot\text{OH}$ 活性, 且不同提取方法提取的茶绿色素清除 $\cdot\text{OH}$ 活性不同; 除常温提取、微波提取的茶绿色素清除 $\cdot\text{OH}$ 活性无显著差异外, 常温提取、微波提取的茶绿色素清除 $\cdot\text{OH}$ 活性均显著高于超声波提取茶绿色素, 超声波提取茶绿色素清除 $\cdot\text{OH}$ 活性显著高于热水提取。图 3 结果也表明茶绿色素有一定清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性, 除常温提取的茶绿色素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性显著高于超声波提取、热水提取, 微波提取的茶绿色素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性显著高于热水提取外, 其他均无显著性差异。 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 是造成组织细胞损伤的主要活性氧, 能引起膜脂质过氧化, 蛋

表 1 茶绿色素的主要化学组成(%)

Table 1 Main chemical components of tea green pigment (%)

	茶多酚	总黄酮	叶绿素	氨基酸	可溶性糖
常温提取	52.33±1.70a	10.09±0.36b	7.80±0.20b	4.13±0.17b	2.15±0.14
热水提取	46.64±1.32c	11.38±0.47a	8.38±0.47ab	5.02±0.34a	2.57±0.19
微波提取	49.51±1.42b	10.86±0.39ab	8.92±0.36a	4.66±0.27a	2.22±0.22
超声波提取	48.32±1.17bc	10.51±0.46b	8.52±0.29a	4.64±0.22a	2.38±0.15

注: 不同字母表示同一列在 0.05 水平下达显著性差异。

白质交联变性,核酸损伤等,人体易患的癌症、衰老、动脉硬化等多种疾病也大多与自由基有关^[16]。茶绿色素具有清除·OH、O₂⁻作用,是一种非常具有前景的天然保健色素。

表2 不同茶绿色素的色相值

Table 2 The color appearance of different tea green pigments

	L*	a*	b*
常温提取	40.29	-25.69	48.41
热水提取	38.55	-24.73	55.54
微波提取	40.21	-27.63	52.27
超声波提取	39.65	-25.02	53.85

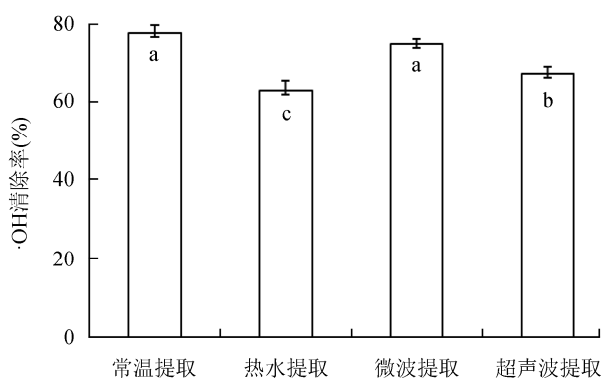


图2 不同提取方法提取茶绿色素清除·OH活性

Fig. 2 The ·OH scavenging activity of tea green pigment extracted with different extraction methods

注:不同字母表示在0.05水平下达显著性差异。

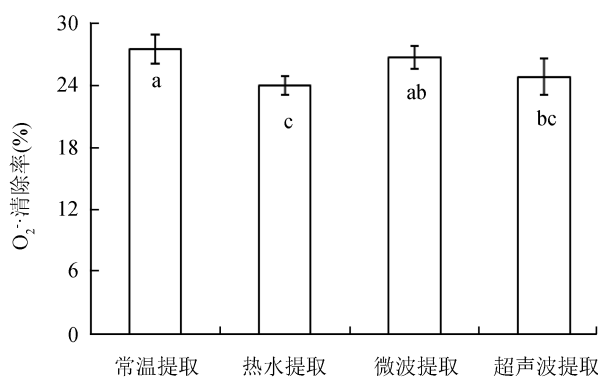


图3 不同提取方法提取茶绿色素体外清除O₂⁻活性

Fig. 3 The O₂⁻ scavenging activity of tea green pigment extracted with different extraction methods

注:不同字母表示在0.05水平下达显著性差异。

4 结论

不同提取方法提取茶绿色素对其得率、化学组

成、色相及其体外清除自由基活性均有显著影响。微波提取茶绿色素得率最高,常温提取茶绿色素得率最低;微波提取茶绿色素除茶多酚含量显著低于常温提取外,叶绿素、氨基酸含量分别显著高于常温提取,且两法提取的茶绿色素清除自由基活性无显著性差异;常温提取茶绿色素的叶绿素、氨基酸含量显著低于其他提取方法提取的茶绿色素,但其茶多酚含量显著高于其他提取方法,且清除自由基活性最高,清除·OH活性显著高于热水提取、超声波提取,清除O₂⁻活性显著高于热水提取。由此可见,茶绿色素的提取以微波提取、常温提取为佳。

参考文献

- [1] 杨晓萍,李启炎,牟敦兰. 3种茶绿色素稳定性研究[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(4): 445-448.
Yang XP, Li QY, Mou DL. Stability of three tea green pigments [J]. J Huazhong Agric Univ, 2006, 25(4): 445-448.
- [2] 萧伟祥,王勇,李纯,等. 茶绿色素的制取研究[J]. 安徽农学院学报, 1992, 19(3): 182-188.
Xiao WX, Wang Y, Li C, et al. Studied on the extracting of the tea green pigment [J]. J Anhui Agric Coll, 1992, 19(3): 182-188.
- [3] 萧伟祥,王根,王勇,等. 天然食用茶黄色素与茶绿色素的研究[J]. 茶叶科学, 1994, 14(1): 49-54.
Xiao WX, Wang G, Wang Y, et al. Study on the natural yellow and green pigments in tea [J]. J Tea Sci, 1994, 14(1): 49-54.
- [4] Oba S, Nagata C, Nakamura K, et al. Consumption of coffee, green tea, oolong tea, black tea, chocolate snacks and the caffeine content in relation to risk of diabetes in Japanese men and women [J]. British J Nutr, 2010, 103(3): 453-459.
- [5] 杨晓萍,李书魁,黄远. 茶绿色素叶绿素锌钠盐锌代工艺优化研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 186-190
Yang XP, Li SK, Huang Y. Study on ironing processing of tea green pigment:sodium-zinc chlorophyllin [J]. J Tea Sci, 2006, 26(3): 186-190.
- [6] 朱荣莉,邵杰,刘军海. 残茶中绿色素的微波提取工艺及其稳定性研究[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(6): 43-46.
Zhu RL, Tai J, Liu JH. Study on microwave extraction technology and stability of green pigment from abandoned tea [J]. Food Ferment Technol, 2010, 46(6): 43-46.
- [7] 陈文伟,贾振宝,黄光荣,等. 茶绿色素微胶囊化研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(5): 42-45.
Chen WW, Jia ZB, Huang GR, Jiang JX, et al. Microencapsulation of tea green pigment [J]. Food Mach, 2009, 25(5): 42-45.
- [8] 钟萝. 茶叶品质理化分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社,

- 1989.
- Zhong L. Physical and chemical analysis of tea quality [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989.
- [9] Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts phenoloxidases in *Beta Vulgaris* [J]. Plant Phys, 1949, 24: 1–15.
- [10] 陈玉琼, 曾维超, 孟燕, 等. 藤茶新工艺加工过程品质化学成分的变化[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 441–444.
- Chen YQ, Zeng WC, Meng Y, *et al.* Changes of the main chemical components during the processing of Tengcha [J]. J Huazhong Agric Univ, 2008, 27(3): 441–444.
- [11] Sfahlan AJ, Mahmoodzadeh A, Hasanzadeh A, *et al.* Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (*Amygdalus communis* L.) as a function of genotype [J]. Food Chem, 2009, 115: 529–533.
- [12] Aruoma OI. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals [J]. Methods Enzy, 1994, 233: 57–66.
- [13] 郑琴, 郝伟伟, 乐志艳, 等. 制川乌配伍白芍微波提取与传统提取工艺的比较研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1320–1324.
- Zheng Q, Hao WW, Le ZY, *et al.* Comparison between microwave and reflux extraction of *Radix Aconitipraeparata* coupled with *Radix Paeoniae alba* [J]. Chin Tradit Patent Med, 2010, 32(8): 1320–1324.
- [14] 黄子琪, 贲松彬, 桑育黎, 等. 微波法与超声破碎法提取蛹虫草菌丝体中虫草素的比较研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 176–180.
- Huang ZQ, Ben SB, Sang YL, *et al.* Extraction of cordycepin from fermented mycelia of *Cordyceps militaris*: A comparative study of ultrasonic-assisted and microwave-assisted procedures [J]. Food Sci, 2009, 30(18): 176–180.
- [15] 徐芬芬, 叶利民, 徐卫红, 等. 小白菜叶绿素含量的测定方法比较[J]. 北方园艺, 2010, (23): 32–34.
- Xu FF, Ye LM, Xu WH, *et al.* Comparison of methods of chlorophyll extraction in *Chinese Cabbage* [J]. Northern Hortic, 2010, (23): 32–34.
- [16] 余凡, 杨恒拓, 葛亚龙, 等. 紫薯色素的微波提取及其稳定性和抗氧化活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, (4): 322–326.
- Yu F, Yang HT, Ge YL, *et al.* Microwave extraction and stability of purple sweet potato pigment and antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, (4): 322–326.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



郭凌云, 主要研究方向为茶叶深加工与综合利用。
E-mail: 476777943@qq.com



舒阳, 硕士研究生, 主要研究方向为茶叶深加工与综合利用。
E-mail: 835090366@qq.com