

豆浸泡时由细菌作用的发酵。在这一发酵过程中,主要是由乳酸菌发酵产酸使大豆酸化, pH 值降至 4.5~5.3, 从而抑制其它杂菌的生长, 而有利于霉菌的生长, 细菌发酵的另一作用是可以分解某些低聚糖。

第二步发酵过程是由霉菌完成的, 主要是根霉属(*Rhizopus*), 其主要的种为 *R. oligosporus*, *R. stolonifer*, *R. oryzae* 和 *R. arrhizus*。其中以少孢根霉(*R. oligosporus*) 发酵为最好, 它能发酵蔗糖, 具有很强的分解蛋白质和脂肪的能力, 能产生某些抗氧化物质, 并能产生诱人的风味。此外, 研究表明, 克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) 与丹贝中  $V_{B_{12}}$  的合成有关<sup>[6]</sup>。

**主要参考文献**

[1] Shurtleff. W. and Aoyagi. A. "The Book of Tempeh" 2nd ed. Harper and Row, New York, 1985  
 [2] 江汉湖等 新型高蛋白食品——丹贝的研究. 首届海峡两岸畜产品加工学术研讨会交流论文. 1992.10. 南京.  
 [3] K.H.Steinkraus, et.al. in "Proceedings of the Conference on soybean products for Protein in Human Foods". IL. USDA. 1961.  
 [4] Tanaka. N. et al. J. Food Prot. 48,438(1985)

**表3 鲜丹贝中的维生素和矿物质含量**

成分	每100g 中含量	推荐每日 膳食量 (RDA)	每100g含量 占RDA的 百分率
Vit.A(IU)	42	5000	1
$V_{B_1}$ (mg)	0.28	1.5	19
$V_{B_2}$ (mg)	0.65	1.7	28
烟酸(mg)	2.52	20	13
泛酸(mg)	0.52	10	7
吡哆醇( $\mu$ g)	8.30	2000	42
叶酸( $\mu$ g)	100	400	25
$V_{B_{12}}$ ( $\mu$ g)	3.9	3.0	130
生物素( $\mu$ g)	53	300	18
钙 (mg)	142	1000	14
磷 (mg)	240	1000	24
铁 (mg)	5	18	28

[5] Martinelli. A. et al Food Technol.18,167(1964)  
 [6] Curtis, P.R. et al. in "Symposium on Indigenous Fermented Foods", Bangkok, Thailand, 1977



**茶叶中儿茶素、咖啡因和叶绿素的制取和分析鉴定研究**

厦门大学化学系 (361005) 吴明光 王金茂 吴 兵

**摘 要**

采用多阶式分离提取技术从茶叶中提取分离出三种有应用价值的成分。根据其理化性质和高压液相色谱、红外光谱的测定结果, 确定这三种成分为儿茶素、咖啡因和叶绿素。同时进一步分析鉴定了儿茶素中主要的四种成分为(—)表没食子儿茶素(EGC)、(—)表儿茶素(EC)、(—)表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和(—)表儿茶素没食子酸酯(ECG)。

**前 言**

茶叶中的儿茶素咖啡因和叶绿素无论作为保健食品或医药品, 化妆品中的添加剂都具有不可忽视的应用前景。因而引起国内外有关专家的关注, 已有不少研究结果发表。但已有的研究工作多侧重于儿茶素类或多酚类化合物等的抗氧活性及药理方面的研究。本文则是着重于茶叶的深加工综合利用的角度, 研究了适于工业化的溶剂分步萃取法(多阶式分步提取)相继地从茶中分离制取了较高纯度的咖啡因儿茶素和叶绿素, 并对分离产物进行了相应的测试分析。

**1. 实验部分**

**1.1 仪器设备与材料:**

日本 Waters 公司的高压液相色谱仪; 日本岛津公司

的 IR-435 型红外光谱仪; 日本 MP-500 型显微熔点测定仪。

茶叶: 市售天坛牌绿茶;

标样: 儿茶素(—)-EC, 购自 Fluka Chemical Co. 叶绿素购自 E. Merck Chemical Co.

试剂: 所用的甲醇、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、丙酮等溶剂均为分析纯。

**1.2 提取分离方法和步骤:**

采用多阶式分离技术从茶叶中相继制取出咖啡因、儿茶素和叶绿素。

**1.2.1 咖啡因的制取:**

把 350g 茶叶研磨成粉末, 用 80% 甲醇水溶液 1.5L 浸泡并在 50~55℃ 充分搅拌 3h, 冷却过滤, 提取液在旋转蒸发浓缩器中减压浓缩, 蒸去甲醇, 残留液用 300ml 二氯甲烷萃取 3 次, 浓缩萃取液成糖浆状, 然后经硅胶柱层析并用丙酮—二氯甲烷混合液洗脱, 洗脱液减压浓缩至干, 得灰白色固体物质, 再用升华法精制, 得到白色长针状结晶物质, 此物质为咖啡因。

**1.2.2 儿茶素的制取**

上述经二氯甲烷萃取后的水溶液用 300ml 乙酸乙酯萃取 3 次, 浓缩萃取液至干, 加适量水加热溶解后, 用

50g Sephadex LH-20吸附,然后用70%的丙酮水溶液洗脱Sephadex LH-20上的吸附物,洗脱液减压浓缩,除去大部分溶剂,(回收)。冷却后析出固体物质,经过滤,真空减压干燥,得到灰白色物质,此物质为含有多钟不同成分的儿茶素混合物。

### 1.2.3 叶绿素的制取:

上述经甲醇水溶液提取后的茶叶残渣,在室温下把溶剂挥发干净。加1.5L氯仿浸泡提取,滤去茶渣。滤液加入50%甲醇水溶液500ml,充分搅拌,静置分层,分离甲醇水溶液,氯仿层溶液浓缩至干,然后加入200ml乙醚-石油醚充分搅拌提取3次,提取液浓缩至适当体积后冷却过滤,干燥后即得墨绿色的物质叶绿素。

### 1.3 提取物的测试分析:

**1.3.1** 用Waters高压液相色谱仪分析从茶叶中提取出的儿茶素混合物中的四种已知组分。测试的色谱条件为:  $C_{18}$ 柱,流动相采用冰醋酸:二甲基甲酰胺:水(3:1:15:81体积比),流速为1.5ml/min,紫外检测器选择的波长为280nm,纸速为0.2cm/min,进样量为10 $\mu$ l(浓度为1.1mg/ml)标样:(-)-EC(97%)浓度为1.1mg/l。测定标样的保留时间 $t_r$ (标)和试样的液相色谱峰保留时间 $t_r$ 值,参照有关文献<sup>[1]</sup>进行定性定量分析。根据液相色谱分离的四个峰,分取各峰位流出液,浓缩干燥,以备进行红外光谱测定分析。

**1.3.2** 用日本岛津公司的IR-435型红外光谱仪进行红外光谱测定、制样:采用KBr混合压片法。扫描波数范围:4000~400 $cm^{-1}$ ,扫描速度:中速。

**1.3.3** 用日本MP-500型显微熔点测定仪测定有关提取物的熔点。

## 2. 结果与讨论

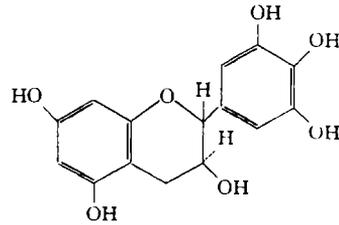
**2.1** 从绿茶中提取的儿茶素混合物液相色谱测得四个色谱峰的保留时间 $t_R$ 依次为5.26、6.02、7.86、13.82(分),标样儿茶素(-)-EC的保留时间 $t_R$ 为6.03(min)。比较试样的保留时间值并对照有关文献的测定结果(1,2)可确定所提取的儿茶素混合物中的四种主要成分分别是(-)-表没食子儿茶素(EGC)、(-)-表儿茶素(EC)、(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和(-)-表儿茶素没食子酸酯(ECG)。

**2.2** 液相色谱分离的四个峰位流出液中的儿茶素红外光谱如图(略)所示。经与有关的标准红外光谱比较,结果相一致。从而进一步验证了从茶叶中提取的儿茶素混合物的四种主要成分EGC、EC、EGCG和ECG。

**2.3** 从液相色谱峰面积测算可以看出,提取出的四种主要儿茶素成分中,以EGCG含量最高,约占四种儿茶素总量的38.0%左右,EC含量最低,约占5.0%左右。不同种类的茶叶和提取的方法不同,分析的结果存在着明显的差异。

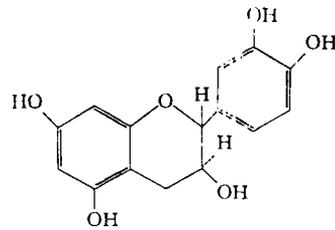
茶叶中儿茶素类化合物成分有10种之多。影响茶叶儿茶素及其成分含量的因素比较复杂。茶树品种、采

EGC、EC、EGCG和ECG的分子结构式如下:



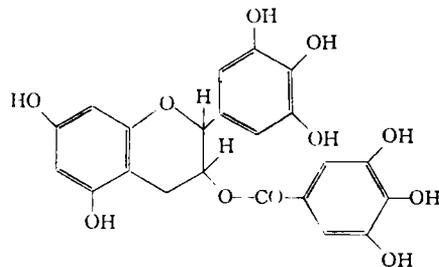
L-EGC(epigallocatechin)

(-)-表没食子儿茶素



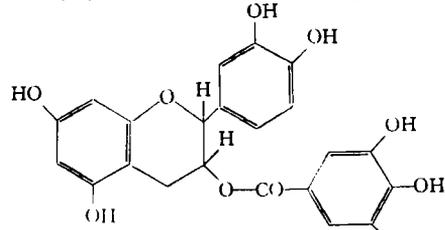
L-EC(epicatechin)

(-)-表儿茶素



L-EGCG(epigallocatechin gallate)

(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯



L-ECG(epicatechin gallate)

(-)-表儿茶素没食子酸酯

摘季节、采摘部位,尤其是茶叶加工条件和工艺的不同,引起茶叶中儿茶素类化合物发生的生物化学的变化就会有很大的差别。实验已经证明<sup>[3]</sup>,绿茶中儿茶素类化合物的含量比其他品种的茶叶高一些。这是因为绿茶是一种“不发酵茶”,所以在绿茶加工过程中,儿茶素由于非酶性自动氧化和由酶促氧化引起的生物化学和化学变化比其他品种的茶叶小一些,儿茶素的损失就少一些,相对含量就会高一些。此外,提取的方法和所采用的溶剂不同,也是影响儿茶素成分及其含量

的重要因素。我们曾经对提取的儿茶素粗品水溶液用 Sephadex LH-20 吸附后,分别用 60% 丙酮水溶液洗脱和精制,液相色谱的测定结果有显著的不同。

采用本文前述的提取方法获得的儿茶素类化合物,其纯度较高,得率为茶叶干重的 8~9%。

**2.4** 从茶叶中制取的白色长针状结晶物质,溶于乙醇,丙酮氯仿,味苦,熔点为 235℃~236℃,升华温度为 178℃~179℃,UV<sub>260nm</sub>227(sh)272,测定的红外光谱与咖啡因标样的红外光谱图相一致,因此,可以推定该物质为咖啡因,用 0.1N 高氯酸非水电位滴定法测定含量为 98% 以上。

**2.5** 从茶叶中制取的墨绿色固体物质 mp 115-117℃,溶于乙醇,丙酮和氯仿,其乙醇溶液呈兰绿色。红外光谱与叶绿素标样的红外光谱相一致。因此,可以推定该物质为叶绿素。

### 3. 儿茶素咖啡因叶绿素用途

#### 3.1 儿茶素

**3.1.1** 儿茶素具有抑制致突变致畸降低胆固醇和抗菌作用,可用于配制保健饮料。原征彦<sup>[4]</sup>用含有 30μg/ml EGCG 的培养基对 Bacillus Subtilis NIG 1125 抗致突变研究结果显示 EGCG 具有显著的抗致突变作用。用含有 1% EGCG 的高脂肪(15%)高胆固醇(1%)饲料饲养 Wister 系大白鼠,四周后,试验组大白鼠肝脂和胆固醇分别为 23.9mg/g<sub>肝组织</sub>和 71mg/g<sub>肝组织</sub>,而对照组大白鼠肝脂和胆固醇分别为 32.9mg/g<sub>肝组织</sub>、106mg/g<sub>肝组织</sub>,表明 EGCG 显著抑制肝脂和胆固醇的增长。许多研究结果证明 EGCG 具有抑制痢疾、伤寒、霍乱和金色葡萄球菌的作用,其抑菌的最低浓度为 300PPM 左右,为乙醇抗菌力的 100 倍。所以近年来以儿茶素为主要成分的各种凉茶饮料获得迅速发展。

**3.1.2** 儿茶素具有强力的抗氧化作用,是优良的脂类,各种食品的天然抗氧化剂和色素稳定剂。儿茶素化合物分子结构中的连苯或邻苯酚基具有高活性抗氧化作用,比目前普遍使用的人工合成抗氧化剂 BHA 和 BHT 等更有效更安全。例如对猪油的防氧化酸败的研究结果显示 10PPM 儿茶素混合物的抗氧化力与 200PPM 维生素 E, 50PPM BHA 的抗氧化力相当。又如当果汁添加 0.1% 茶叶提取物,在室内自然光照两个月后,β-胡萝卜素残留率为 33.3%,而添加 50mg% L-抗坏血酸的果汁,其β-胡萝卜素的残留率仅为 6.5%<sup>[6]</sup>。上述试验例表明儿茶素比 BHA、维生素 E、维生素 C 更强的抗氧化作用。已广泛用于动植物油脂防酸败,各种食品如糕点肉类的保鲜,防止天然色素的褪色等。

**3.1.3** 儿茶素能与某些臭气化合物如鱼类的三甲胺和口臭气味的甲硫醇等反应从而消除或减少臭味,是优良的消臭剂。例如在制作鱼干时,用含儿茶素 300~500PPM 水溶液浸渍,能防止鱼变黄,脂氧化并去除腥味,保持鱼的鲜度和风味<sup>[6]</sup>。此外,儿茶素还可

以作为消臭剂加入口香糖消除口臭,去除大豆制品的豆腥味,燕麦小麦谷物制品以及乳粉的异味。

#### 3.2 咖啡因

咖啡因具有兴奋利尿等作用,在医药上用作利尿剂强心剂和苏醒剂。与溴化物调配的合剂用于治疗神经官能症。还可作用平喘药。与阿司匹林配成的复方可以用于治疗头痛。与麦角胺合用可治疗偏头痛。

#### 3.3 叶绿素

本品是优良的天然食用着色剂,其水溶性制品叶绿素铜钠和油溶性叶绿素铜是国标指定许可使用的食品着色剂,可用于糖果糕点的彩装。果味饮料、果子露、汽水、配制酒、罐头、化妆品、医药品等的着色。在医药上用于治疗皮肤伤口,可加速溃疡和灼伤的愈合,亦可用作消臭剂去除口臭。

#### 参考文献

- (1) 陈瑞锋等译,茶叶儿茶素的抗氧化作用,食品科学,1988 NO.11.46-50.
- (2) 张可钦等,由中国茶叶中提取抗氧化剂的研究,食品与发酵工业,1991. NO1,1-10.
- (3) Collier P.B., et al., Catechics. detn, by High Pressure Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 1971, 57, 29-32
- (4) 原征彦,茶カラキン类的制造方法,日本公开特许公报,昭60-13780.
- (5) 金冈满郎,日持向上剂としての茶抽出物制剂, New Food Industry 1990, 32(7), 12-16.
- (6) 岩井好夫 et al., 品质保持剂およびの制法, 日本公开特许公报, 昭63-258568.

### 欢迎订阅《中国乡镇企业信息》

《中国乡镇企业信息》由中国农学会、农业部情报所主办,半月刊,国内外公开发行。《中国乡镇企业信息》是为适应我国乡镇企业飞速发展,在企业迫切需要实用技术信息条件下创办的。本刊的特点是报道周期短,信息量大,内容翔实,实用价值高,是推广科研成果的重要渠道,是企业寻找项目的重要信息源。本刊尤其适合乡镇企业、中小企业利用。

《中国乡镇企业信息》设有投资指南、专利技术、化工、建材、机械、电子、科技兴农、新产品等栏目,介绍新颖、实用的技术转让信息。

《中国乡镇企业信息》全年24期,每期定价2.00元,邮发代号:18-161。

邮编: 100081

地址: 北京自石桥路30号 中国农科院情报所《中国乡镇企业信息》编辑部

电话: 8314433-2698.