

二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱工艺参数的优化

崔丽¹, 李敏¹, 龚志华¹, 肖文军^{1,2*}

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家植物功能成分工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为探寻从绿茶中提取咖啡碱的工艺, 以二氯甲烷为萃取剂, 以咖啡碱得率与纯度为考察指标, 采用单因素试验得出较佳茶汤质量分数、料液比(茶汤与二氯甲烷的体积比)、摇匀时间、静置萃取时间、萃取温度、萃取次数和茶汤 pH 值, 选取料液比、摇匀时间、静置萃取时间、萃取温度等 4 个主要影响因素设计正交试验, 并对正交试验结果进行验证。结果表明, 以咖啡碱得率为主要考虑因素时, 最优工艺参数为茶汤质量分数 10%、萃取温度 45 ℃、摇匀时间 40 min、静置萃取时间 80 min、料液比 1 : 2.5、萃取 2 次, 此条件下的咖啡碱得率、纯度分别为 92.93%、39.58%; 以咖啡碱纯度为主要考虑因素时, 最优工艺参数为茶汤质量分数 10%、萃取温度 45 ℃、摇匀时间 35 min、静置萃取时间 100 min、料液比为 1 : 2.5、萃取 2 次, 此条件下咖啡碱的纯度和得率分别为 43.37% 和 85.13%。

关 键 词: 绿茶; 咖啡碱; 二氯甲烷; 萃取工艺

中图分类号: S126 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)05-0562-05

Optimized extraction of tea caffeine from green tea leaves using dichloromethane

CUI Li¹, LI Min¹, GONG Zhi-hua¹, XIAO Wen-jun^{1,2*}

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to optimize the best technical parameters in extracting tea caffeine by dichloromethane, the concentration of tea infusion, ratio of tea infusion and CH₂Cl₂, extracting standing time, shaking time, extracting temperature, pH value of tea infusion and extracting times were screened, then the main factors including ratio of tea infusion and CH₂Cl₂, shaking time, extracting standing time and extracting temperature were selected for orthogonal test, the results of which were checked again. The results showed that when mainly considering the yield rate of caffeine, the best parameters were as follows: tea infusion concentration of 10%, extracting temperature of 45 ℃, shaking time of 40 min, standing time of 80 min, ratio of tea infusion and CH₂Cl₂ of 1 : 2.5, 2 times for extraction. Under this parameter condition, the yield rate of caffeine is 92.93%, the purity of caffeine is 39.58%; when mainly considering the purity of caffeine, the best parameters were as follows: tea infusion concentration of 10%, extracting temperature of 45 ℃, shaking time of 35 min, standing time of 100 min, ratio of tea infusion and CH₂Cl₂ of 1 : 2.5, 2 times for extraction. Under this parameter condition, purity of caffeine is 43.37%, and the yield rate of caffeine is 85.13%.

Key words: tea; caffeine; dichloromethane; extraction

收稿日期: 2011-06-15

基金项目: 国家 APEC 基金资助项目(200847); 中国博士后基金资助项目(20070410985); 湖南省博士后基金资助项目(2006FJ4263)

作者简介: 崔丽(1988—), 女, 四川广元人, 硕士研究生, 主要从事茶叶化学工程与植物功能成分分离提取理论与技术研究; 381410922@qq.com; *通信作者, xiaowenjungong@163.com

茶叶中含有咖啡碱、茶碱、可可碱等生物碱类化合物,其中咖啡碱约占茶叶干物质的 2%~5%^[1]。由于茶叶咖啡碱具有促兴奋、利尿、强心解痉、松弛平滑肌和助消化等作用而被广泛用于饮料及药物中,但高剂量摄入咖啡碱会刺激中枢神经、影响睡眠、升高血压、提高类风湿关节炎的患病率、致突变以及引起胎儿早产等^[2-5],所以,低咖啡碱或脱咖啡碱茶叶产品倍受消费者欢迎。目前,关于茶叶脱除咖啡碱的方法主要有溶剂萃取法、离子沉淀法、膜分离法、柱层析法、超临界 CO₂ 萃取法和培育低咖啡碱茶树品种等^[6-11],工业生产中最常用的方法是有机溶液萃取法。咖啡碱易溶于二氯甲烷、三氯甲烷等卤代烃。三氯甲烷萃取咖啡碱的效果优于二氯甲烷,但由于其毒性高于二氯甲烷而不被采用^[12]。目前,侧重于从工艺的角度研究咖啡碱的萃取过程,而关于影响萃取效果的研究尚少。笔者以二氯甲烷为萃取剂,以咖啡碱得率与纯度为考察指标,对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的最佳工艺参数进行优化,旨在为工业生产中用二氯甲烷萃取茶叶咖啡碱提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

速溶绿茶购于长沙远航生物制品有限公司,其中咖啡碱含量为 7.39%。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂 N,N-二甲基甲酰胺、冰乙酸和甲醇均为色谱纯,购于恒兴试剂有限公司。

主要仪器与设备:电子天平 FA2104S(上海精科天平);HH 数显恒温水浴锅(金坛市金城国胜实验仪器厂);超声波清洗器 3300H(上海科岛超声仪器有限公司);全温摇瓶柜 SKY-211B(上海苏坤实业有限公司);Thermo Savant 冻干机(长沙麓丰仪器有限公司);岛津-10A 高效液相色谱仪(日本)。

1.3 二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱试验

1) 单因素试验。在茶汤质量分数 2.5%,料液

比(茶汤与二氯甲烷的体积比)1:2,温度 18℃,摇匀时间 15 min,静置萃取时间 60 min,萃取次数 1 次,茶汤 pH 值初始值 5.73 的初始条件下,依次改变茶汤质量分数、料液比、静置萃取时间、摇匀时间、萃取次数及茶汤 pH 值,分析各因子对二氯甲烷萃取咖啡碱的影响,并筛选出较优参数。用盐酸和氢氧化钠调节茶汤 pH 值。

2) 正交试验。分别以咖啡碱得率和纯度作为参考指标,根据单因素试验结果,选取主要影响因素及相应水平进行正交实验,以优化二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的工艺参数。

3) 验证试验。对正交试验中所得的最优组合进行放大性验证试验。

1.4 指标测定及数据处理

咖啡碱含量用高效液相色谱法^[13]测定;固形物含量用差量法^[14]测定。

数据统计与分析采用正交设计助手 II 3.1.1 软件进行。

2 结果与分析

2.1 二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的单因素试验结果

2.1.1 茶汤质量分数对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的影响

由表 1 可见,随着茶汤质量分数由 2.5%增加到 40%,咖啡碱得率由 59.71%下降至 27.10%,综合考虑咖啡碱得率、纯度等因素,茶汤质量分数为 10%较佳。

2.1.2 料液比对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的影响

由表 1 可见,料液比由 1:10 变为 1:30 时,咖啡碱的得率由 32.42%增加至 52.93%,但当料液比为 1:2.0 后咖啡碱得率增加较为缓慢。当料液比由 1:2.5 变为 1:3.0 时,咖啡碱的纯度由 33.37%降为 29.21%,推测是二氯甲烷对其他物质的吸收影响了咖啡碱的纯度。综合考虑,料液比以 1:2.0 为宜。

表1 不同萃取工艺参数下二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的得率和纯度

Table 1 Influence of different factors on the dichloromethane extraction of tea caffeine

萃取工艺参数	咖啡碱得率/%	咖啡碱纯度/%
茶汤质量分数 2.5%	59.71	30.49
茶汤质量分数 10%	50.39	31.19
茶汤质量分数 20%	36.11	23.66
茶汤质量分数 30%	26.91	19.01
茶汤质量分数 40%	27.10	6.12
料液比 1 1.0	32.42	19.81
料液比 1 1.5	44.62	26.54
料液比 1 2.0	50.22	31.07
料液比 1 2.5	51.52	33.37
料液比 1 3.0	52.93	29.21
静置萃取时间 40 min	48.43	21.19
静置萃取时间 60 min	50.24	31.90
静置萃取时间 80 min	51.89	35.07
静置萃取时间 100 min	53.03	35.57
静置萃取时间 120 min	52.95	27.31
摇匀时间 5 min	48.47	34.21
摇匀时间 15 min	53.50	35.94
摇匀时间 25 min	54.09	37.74
摇匀时间 35 min	56.69	38.94
摇匀时间 45 min	59.91	34.65
萃取温度 18 ℃	56.69	38.11
萃取温度 25 ℃	57.55	41.88
萃取温度 35 ℃	68.43	44.59
萃取温度 45 ℃	70.87	48.56
萃取温度 50 ℃	74.19	52.44
pH 1	70.04	35.22
pH 3	65.55	37.53
pH 5	68.58	44.01
pH 7	69.28	46.53
pH 9	79.40	74.04
萃取 1 次	68.63	44.05
萃取 2 次	89.54	43.14
萃取 3 次	96.20	41.19
萃取 4 次	97.18	35.22

2.1.3 静置萃取时间对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的影响

由表1可见,随着静置时间的增加,咖啡碱的得率和纯度不断上升,到100 min时,咖啡碱得率趋于稳定,而纯度急剧下降,由100 min时的35.57%降至120 min时的27.31%;因此,以静置萃取100 min为宜。

2.1.4 摇匀时间对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的影响

由表1可见,随着摇匀时间的增加,咖啡碱的得率增加,但纯度由35 min时的38.94%下降到45 min时的34.65%;因此,摇匀时间以35 min为宜。

2.1.5 萃取温度对萃取绿茶咖啡碱效果的影响

由表1可见,随着萃取温度的升高,咖啡碱的得率和纯度逐渐增加,35 ℃时的咖啡碱得率和纯度与25 ℃时的差异明显,但35 ℃时的咖啡碱得率和纯度与45 ℃和50 ℃时的差异不明显。考虑到二氯甲烷的沸点较低以及生产的安全性,萃取温度以35 ℃为宜。

2.1.6 茶汤 pH 值对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的影响

由表1可见,咖啡碱的得率在pH值3~9呈逐渐上升趋势,在碱性环境下咖啡碱得率上升较快;纯度随着pH值的增加逐渐增加,pH值为9较为适宜,其纯度为74.04%。

2.1.7 萃取次数对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的影响

由表1可见,随着萃取次数的增多,咖啡碱的得率逐渐增加,而纯度逐渐下降,在实际操作过程中,可根据生产产品的要求有针对性地选择萃取次数。

2.2 二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的正交试验结果

根据单因素试验结果,设计表2正交试验。

表2 二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱正交试验的因素和水平

水 平	因 素			
	A(料液比)	B(静置萃取时间/min)	C(萃取温度/℃)	D(摇匀时间/min)
1	1 1.5	80	25	20
2	1 2.0	100	35	35
3	1 2.5	120	45	40

正交试验结果及其极差分析(表3)表明,当主要考虑咖啡碱得率时,4个因素对萃取绿茶咖啡碱效果的影响从大到小依次为萃取温度、料液比、静置萃取时间、摇匀时间。各处理间差异较明显,最优组合为 $A_3B_1C_3D_3$,即茶汤质量分数为10%,萃取温度为45 ℃,摇匀时间为40 min,静置萃取时间为80 min,料液比为1 2.5。

由表 3 可见，当主要考虑咖啡碱纯度时，4 个因素对萃取绿茶咖啡碱效果的影响从大到小依次为萃取温度、静置萃取时间、料液比、摇匀时间，最优组合为 A₃B₂C₃D₂，即茶汤质量分数为 10%，萃取温度为 45 ℃，摇匀时间为 35 min，静置萃取时间为 100 min，料液比为 1 2.5。

表 3 二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的正交试验结果及极差分析

Table 3 The results of range analysis for the yield rate and purity of caffeine by dichloromethane

编号	因素				咖啡碱得率/%	咖啡碱纯度/%
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	37.59	28.54
2	1	2	2	2	47.99	36.80
3	1	3	3	3	58.42	29.73
4	2	1	2	3	58.32	33.61
5	2	2	3	1	62.01	41.45
6	2	3	1	2	42.97	24.04
7	3	1	3	2	67.47	42.20
8	3	2	1	3	46.96	31.78
9	3	3	2	1	59.86	30.70
K ₁ (得率)	48.000	54.460	42.507	53.153		
K ₂ (得率)	54.433	52.320	55.390	52.810		
K ₃ (得率)	58.097	53.750	62.633	54.567		
R(得率)	10.097	2.140	20.126	1.757		
K ₁ (纯度)	31.690	34.783	28.120	33.563		
K ₂ (纯度)	33.033	36.677	33.703	34.347		
K ₃ (纯度)	34.893	28.157	33.793	31.707		
R(纯度)	3.203	8.520	9.673	2.640		

2.3 二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的验证试验结果

对由正交试验所得的主要考虑绿茶咖啡碱得率时的最优组合 A₃B₁C₃D₃ 和主要考虑咖啡碱纯度时的最优组合 A₃B₂C₃D₂ 分别进行验证，茶汤质量分数均为 10%，每种组合分别萃取 1、2、3 次。结果表明，A₃B₁C₃D₃ 组合的咖啡碱得率和纯度，萃取 1 次分别为 72.15%、49.31%；萃取 2 次分别为 92.93%、39.58%；萃取 3 次分别为 96.24%、35.64%。A₃B₂C₃D₂ 组合的咖啡碱得率和纯度，萃取 1 次分别为 62.22%、52.61%；萃取 2 次分别为 85.13%、43.37%；萃取 3 次分别为 93.81%、38.34%。在工业化生产过程中，可针对不同的生产要求采取相应的工艺组合，以达到降低成本、提高效益的目标。

3 结论与讨论

用二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱，在不考虑酸碱度对萃取效果影响的条件下，主要考虑咖啡碱得率时的最优参数为茶汤质量分数 10%、萃取温度 45 ℃、

摇匀时间 40 min、静置萃取时间 80 min、料液比 1 2.5、萃取 2 次，此条件下的咖啡碱得率、纯度分别为 92.93%、39.58%；主要考虑咖啡碱纯度时的最优参数为茶汤质量分数 10%、萃取温度 45 ℃、摇匀时间 35 min、静置萃取时间 100 min、料液比 1 2.5、萃取 2 次，此条件下的咖啡碱得率、纯度分别为 85.13%、43.37%。

本试验中，针对咖啡碱的得率和纯度，较全面地考虑了影响咖啡碱萃取效果的各因素。在试验中发现，酸碱度对二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的得率和纯度有较大影响，其原因可能与咖啡碱的理化性质及茶汤中各种物质(如茶多酚、色素等)相互作用有关。首先，咖啡碱(1,3,7-三甲基黄嘌呤，C₈H₁₀N₄O₂)属于甲基黄嘌呤的生物碱，表现为弱酸性，在碱性条件下萃取的咖啡碱得率提高；其次，在碱性条件下，茶多酚、色素等物质络合，使得单位二氯甲烷中萃取咖啡碱的量增加，咖啡碱得率和纯度相应提高，其具体作用机制有待研究。在碱性条件下，Na⁺是否影响咖啡碱的结构和生理活性，以及是否是在

咖啡碱结构变化的情况下促进了咖啡碱得率和纯度的提高等还有待研究。此外,在 pH1 时二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱的得率高于 pH3 的,其原因之一可能是在强酸条件下,单位二氯甲烷中茶多酚的含量减少提高了二氯甲烷对咖啡碱的萃取率。

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: 35-39.
- [2] Smith A. Effects of caffeine on human behavior[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002(9): 1243-1255.
- [3] Shilo L, Sabbah H, Hadari R. The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion[J]. Sleep Med, 2002(3): 271-273.
- [4] Lane J D, Pieper C F, Phillips-Bute B G, et al. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home[J]. Psychosomatic Medicine, 2002, 64(4): 595-603.
- [5] Wen W Q, Shu X O, Jacobs D R. The associations of maternal caffeine consumption and nausea with spontaneous abortion[J]. Epidemiology, 2001(1): 38-42.

- [6] 沈强, 孔维婷, 于洋, 等. 国内外茶叶咖啡碱研究进展[J]. 中国茶叶, 2009(1): 15-18.
- [7] 津志田藤二郎, 村井教信. 茶叶咖啡碱在热水中的溶出特性[J]. 福建茶叶, 1986(1): 40-48.
- [8] 葛宜掌, 金红. 茶叶天然生物碱——咖啡因制备工艺: 中国, 1097757A[P]. 1995-01-25.
- [9] Takami S, Kobayashi A. Aroma components of green tea[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1990, 64(1): 34.
- [10] 大须博文, 竹尾忠一. 用柱层层析法除去乌龙茶浸出液中的咖啡碱[J]. 广东茶叶, 1991(4): 43-45.
- [11] Park H S, Choi H K, Lee S J, et al. Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2007, 42(2): 205-213.
- [12] 刘宗岸, 朱跃进, 毛志方, 等. 茶叶脱咖啡因技术发展现状与应用前景[J]. 中国茶叶加工, 2009(1): 32-34.
- [13] 陈鹤立. 高效液相色谱法测定茶叶中茶多酚及咖啡碱含量[J]. 福建医药杂志, 2006, 28(1): 81-82.
- [14] GB/T8305—87 茶水浸出物检测[S].

责任编辑: 王赛群

(上接第539页)

能,且呈一定的量效关系,中、高剂量比低剂量效果明显。本试验中成功复制了 *E. coli* O157:H7 感染的模型,被感染的模型组小鼠的非特异免疫、体液免疫和肠道局部免疫功能均比对照组低。灌服中、高剂量茯砖茶水提物能直接刺激模型小鼠胸腺的发育,提高其中枢免疫器官的质量;促进 B 细胞产生抗体,提高其体液的免疫功能;增加肠道局部 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞数目,提高 T 淋巴细胞的活性,增强细胞的免疫功能;灌服低、中、高剂量的茯砖茶水提物均能提高单核-巨噬细胞的吞噬功能,增强小鼠的非特异性免疫功能。

推测茯砖茶水提物是通过多环节、多靶点影响免疫系统的。这可能是茯砖茶防治 *E. coli* O157:H7 感染的机制之一。茶叶中的功能性成分如茶氨酸、茶多糖和茶多酚等已被证实在调节免疫方面有重要作用^[4-8]。茯砖茶中的茶多糖、茶多酚含量较高,这些活性物质有增强免疫功能的作用。在茯砖茶独有“发花”工序中产生的优势菌——冠突散囊菌,目前已被证实在降脂、减肥及抗肿瘤等方面有特殊作用,而其对免疫方面的影响尚未见报道,故茯砖茶

中哪些活性成分具有提高免疫的作用有待研究。

参考文献:

- [1] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安. 茶叶降脂减肥作用研究进展[J]. 中国茶叶, 2004(2): 8-10.
- [2] 倪晓平, 孙建荣, 查捷, 等. 大肠杆菌 O157:H7 对小鼠感染的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(3): 74-76.
- [3] 刘少勇. 灵芝孢子油软胶囊对小鼠免疫功能的影响及毒理学研究[D]. 广州: 暨南大学, 2007.
- [4] 陈睿. 茶叶功能性成分的化学组成及应用[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(5): 1031-1033, 1036.
- [5] Kamath A B, Wang I, Das H, et al. Antigens in tea-beverage prime human V γ 2V δ 2T cells *in vitro* and *in vivo* for memory and non-memory antibacterial cytokine responses[J]. PNAS, 2003, 100(10): 6609-6614.
- [6] 沈健, 陈增良, 鲍建芳, 等. 茶多糖对实验性免疫力低下小鼠免疫功能的影响[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(4): 96-97.
- [7] 杨敏, 赵文华, 王书奉, 等. 粗老茶中的茶多糖对免疫功能的影响[J]. 时珍国药研究, 1997, 8(4): 22-23.
- [8] 陈宗懋. 茶的杀菌和抗病毒功效[J]. 中国茶叶, 2009(9): 4-5.

责任编辑: 王赛群