

茶葉中兒茶素類萃取及純化之研究

阮逸明¹ 陳英玲²

摘 要

兒茶素類是茶葉中對人體具有生理活性的物質之一。本試驗利用 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 吸附法、極性吸附法及親和性吸著法等三種方法，分別嘗試分離茶葉中的粗兒茶素類。結果顯示親和性吸著法能成功地分離出粗兒茶素類，尤其對酯型兒茶素類具有較高之專一性。萃取出之兒茶素類經脫鹽及冷凍乾燥後，可得粗兒茶素粉末。由於酯型兒茶素類具較高之抗氧化活性，故在抽取時宜選擇酯型兒茶素含量多之茶葉原料以得到較多之產物。

關鍵字：茶、兒茶素類、萃取、純化

前 言

茶在我國早期是作為藥材使用，至西漢初期（西元前 200 年）才漸轉為日常飲料。因此飲茶在中國已有數千年歷史，亦形成一種獨特的文化。更由於茶中含有多種機能性保健成分，所以茶又稱為「保健飲料」。

茶湯中的一般營養成分包括維生素及礦物質。這些物質雖很珍貴，但以我們今日食品多樣化的生活水準，不難從其他食物中充分攝取。所以現今研究者對茶葉成分的探討焦點集中於茶葉中具生理功效的物質。

咖啡因（佔乾重 2~4%）及兒茶素類（俗稱茶單寧，佔乾重 10~30%）是茶中重要的兩種生理活性成分。有些研究報告甚且認為它們具有藥效的功能。其中以兒茶素類為茶中特有成分，且為茶湯中的主要成分（佔可溶分 40~50%），其對人體的功效頗受研究人員的重視。

兒茶素類為多元酚類之一種，具有苦澀味。在茶湯中對滋味的影響頗大。茶中之兒茶素類主要由 EC (Epicatechin)，ECG (Epicatechin gallate)，EGC (Epigallocatechin) 及 EGCG (Epigallocatechin gallate) 四種所組成。其中 EC, EGC 為游離型兒茶素而 ECG 及 EGCG 為酯型兒茶素。在茶湯中之兒茶素可與咖啡因結合而減緩咖啡因對人體之刺激作用。根據國內外學術刊物歸納兒茶素類對人體的生理效應有下列數點：

1 台灣省茶業改良場 場長

2 台灣省茶業改良場 副研究員

- (一)抑制油脂氧化及減緩衰老^(1,11,12)。
- (二)除臭⁽²⁾。
- (三)抑制血壓上昇與降低血糖^(4,7)。
- (四)降低血液中膽固醇及低密度脂蛋白的含量^(3,9)。
- (五)抗菌及改變人體腸內微生物之分佈相⁽⁵⁾。
- (六)抗癌及抗突變^(6,8)。
- (七)抗輻射及紫外線照射⁽⁵⁾。

由於兒茶素類功能廣泛，本試驗利用熱水及可使用於食品工業之有機溶劑抽取及純化茶中之兒茶素類，以供食品加工業之用。

試驗材料與方法

一、茶湯之製備

茶葉經粉碎(20目)，以3克加100ml沸水萃取半小時，經過濾及離心，取上層液加水至150ml備用。

二、粗兒茶素類與咖啡因之分離

(一)以PVPP(polyvinylpolypyrrolidone)吸附法分離：

150ml茶湯以5克PVPP吸附兒茶素類，經水清洗後以0.1N KOH溶離出兒茶素類，並快速中和至pH6.5。溶離液加入適量之Amberlite XAD-4以吸附兒茶素類，以水清洗過濾以除去未被吸附之鹽類，再以酒精溶離出兒茶素類，經冷凍乾燥即為成品。

(二)以固相萃取法(Solid phase extraction)管柱分離：

1.以極性之Aminopropyl管柱分離：

茶湯以等體積之醋酸乙酯萃取，取9ml有機層萃取液分三次通入已經醋酸乙酯平衡之Amino-propyl管柱(Supelco出品；3ml/500mg)，再以醋酸乙酯洗去未被吸附之雜質，最後分別以3ml之水、0.5N NaCl及1N NaCl溶離出兒茶素類。

2.以親和性之PBA(phenyl-boronic acid)管柱分離：

茶湯9ml加入1ml pH6.5 1N之磷酸緩衝液混合後通入已經pH6.5 0.1N磷酸緩衝液平衡之PBA管柱。以10ml平衡緩衝液洗去未被吸附之雜質；再以9ml pH3 0.1N之檸檬酸緩衝液溶離出兒茶素類。溶離液快速與1ml pH6.5 2N磷酸緩衝液混合並通入已經水平衡過之C-18管柱(Supelco出品；12ml/2000mg)，以水洗管柱數次，最後用酒精溶離出兒茶素類經冷凍乾燥成產物。

三、個別兒茶素之分離

經PBA管柱純化之粗兒茶素溶液，通入Sephadex-LH20管柱，並以水清洗未吸附之物質。再分別以55,65,75%之酒精溶液溶離出兒茶素類，並以分液接收器定時收集。收集液以HPLC定性分析。

四、個別兒茶素類及咖啡因含量之測定

個別兒茶素標準品計有五種：(C)、(EC)、(ECG)、(EGC)、(EGCG)等五種。C與EC之標準品購自Sigma公司。ECG、EGC及EGCG標準品為日本茶葉試驗場所贈。

1克茶樣加85ml沸水煮1小時，以Whatman No.41濾紙過濾後定量為100ml。取50ml稀

釋為 150ml，再以 0.45um 濾紙過濾後以 HPLC 分析。

粗兒茶素樣品以熱水溶解後，稀釋成適當濃度並經 0.45um 濾紙過濾後以 HPLC 分析。

分離條件：

HPLC 儀器：Perkin Elmer Series 200

分離管：Merck100 RP-18 column (4mm×250mm)

注射體積：20ul 分離溫度：35℃

偵測器：UV280nm，Range 0.2

時間：25 分鐘

動相：0.05% phosphoric acid: acetonitrile:ethyl acetate
=88:9.6:2.4

pump 壓力：2070 psi，流速 1.0ml/min

結果與討論

一、以不同萃取方式分離茶湯中之兒茶素類

(一)以 PVPP 吸附法分離粗兒茶素類

以 PVPP 吸附茶湯中之兒茶素類，再以 0.1N KOH 洗出兒茶素類並中和，回收率約 40% (表一)，此法能成功的除去茶湯中的咖啡因 (圖一)。由於使用強鹼溶離，產品有氧化物或分解物產生，產物顏色偏紅。

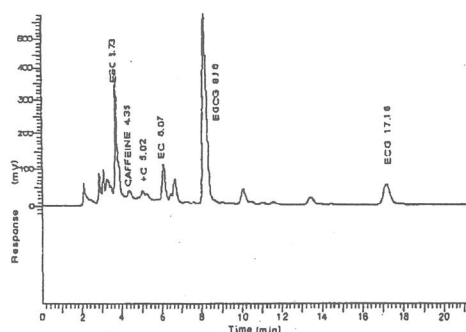
表一 以 PVPP 吸附法分離兒茶素類之回收率

Table 1: The yield of catechins isolated by PVPP adsorption

	Components (mg)					Total catechins	Caffeine
	EGC	EC	C	EGCG	ECG		
Tea liquor	670.56	182.53	48.71	708.54	105.88	1716.22	450.80
Product	185.47	163.46	21.58	284.17	82.59	737.27	1.21
Yield (%)	27.65	89.55	44.30	40.10	78.00	42.95	0.26

EGC:Epigallocatechin, C:Catechin, ECG:Epicatechin gallate

EC:Epicatechin, EGCG:Epigallocatechin gallate

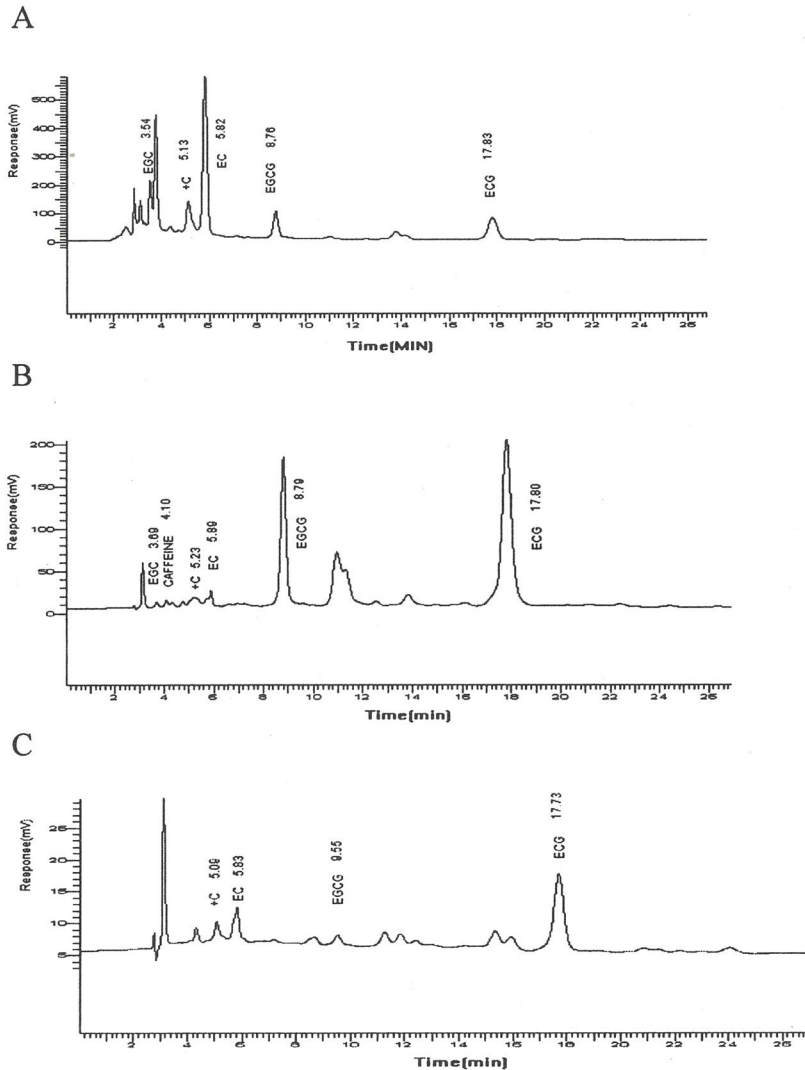


圖一：以 PVPP 吸附法分離兒茶素類之 HPLC 分析圖譜

Fig1: The HPLC chromatogram of tea catechins isolated by PVPP adsorption

(二)以 Amino-propyl 管柱分離茶湯中之兒茶素類

以 Amino-propyl 管柱分離茶湯中之兒茶素類，雖然亦能成功的去除茶湯中的咖啡因，但因 Amino-propyl 管柱分離原理為吸附茶湯中比醋酸乙酯極性大的物質，所以溶離出的產物含有多量其他非兒茶素類物質（圖二）。



圖二：以 Amino-propyl 管柱分離兒茶素類之 HPLC 圖譜

A:水溶離之粗兒茶素類產物

B:0.5N NaCl 溶離之粗兒茶素類產物

C:1N NaCl 溶離之粗兒茶素類產物

Fig2:The HPLC chromatograms of tea catechins isolated by amino-propyl column.

A: crude catechins eluted with water.

B: crude catechins eluted with 0.5N NaCl

C: crude catechins eluted with 1N NaCl

(三)以 PBA 管柱分離茶湯中之兒茶素類：

PBA 是利用分子結構中具有同一平面上兩個-OH 基及-NH₂ 基者即被吸附⁽¹⁰⁾。基於此一原理，PBA 可吸附兒茶素類而分離去除咖啡因，兒茶素類的回收率約為 40%（表二），而由 HPLC 分析圖譜（圖三）可知絕大部份產物（以 UV280nm 檢測）均為兒茶素類。

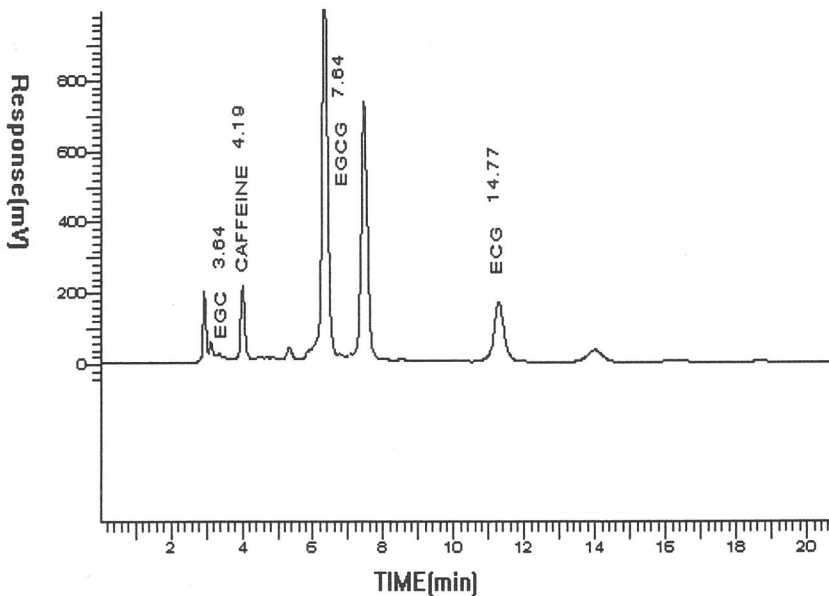
表二：由 PBA 管柱分離粗兒茶素類含量

Table2:Content of crude tea catechins isolated by PBA column

	% (dry weight)
EGC	23
C	0.5
EGCG	14.6
EC	1.5
ECG	0.5
Total catechins	39.6
caffeine	0.01

catechins:caffeine=39.60:0.01 (w/w)

=3960:1



圖三：以 PBA 管柱分離之兒茶素類的 HPLC 圖譜

Fig3:The HPLC chromatogram of tea catechins isolated by PBA column.

(四)兒茶素類分離法之評估：

由於兒茶素類為不穩定物質，在常溫下容易氧化且在鹼性溶液中發生變色而分解，故在

三種分離方法中以 Amino-propyl 吸附法沒有酸鹼改變，產品破壞最小，但是根據其產物 HPLC 分析圖譜（圖二）顯示含非兒茶素類的雜質頗多，未達到本試驗之分離目的，故予以放棄。

PVPP 及 PBA 兩種吸附法均可達到本試驗之目的，但各有其優缺點（表三），可按兒茶素類的用途而決定採用何種分離方法。

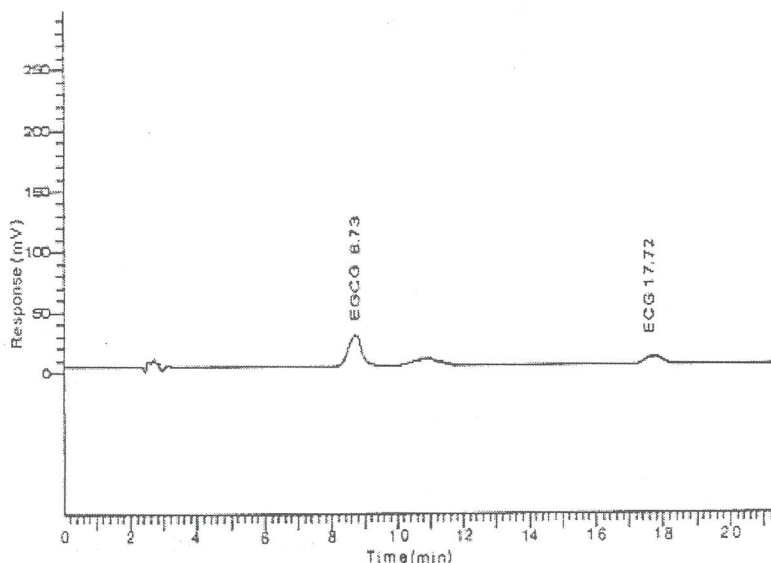
表三：PVPP 及 PBA 兩種兒茶素類分離法之比較

Table 3: The comparison of the isolation methods for catechins from tea liquor by PVPP and PBA.

抽取方法	優點	缺點	適用性
PVPP	樹脂可重複使用 價錢便宜	產物品質較低	一般食品添加物及健康食品
PBA	產物品質較高	分離管不宜重複使用多次，消耗量大。	個別兒茶素分離之前處理，作為藥用或其他高價值之用

二、個別兒茶素之分離

經 PBA 管柱分離之粗兒茶素類，再利用 Sephadex-LH20 管柱以不同濃度之酒精溶液溶離純化個別兒茶素類，結果發現 55%及 65%酒精之流洗液中，經 HPLC 定性分析，均未發現兒茶素產物，在 75%酒精流洗液中可發現 EGCG 及 ECG 兩種酯型兒茶素類並有少許雜質（圖四）。在 65%及 75%間是否可找出分離兩種酯型兒茶素的正確濃度，有待進一步的研究。



圖四：以 Sephadex-LH20 純化兒茶素之 HPLC 圖譜

Fig4 :The HPLC chromatogram of catechins purified by Sephadex-LH20.



圖五：以 PBA 管柱萃取純化之粗兒茶素類成品

Fig5 : The product of crude tea catechins obtained by PBA column.

誌 謝

本研究承農委會 86 科技-1.3-糧-22 計畫補助經費及承文山分場鄭課長正宏協助兒茶素類分析，謹此致謝。

參考文獻

1. 李敏雄等. 1984. 農業化學會誌. 22,226-231.
2. 安田英之. 1992. 食品工業.35 (18),23-28.
3. 竹尾忠一. 1992. 食品工業.35 (17),32-40.
4. Hara,Y.etal.1987. Nippon Nogeikagaku Kaishi.61,803-813.
5. Hasan,M.et al.1993. Proceed.of the International Symp. on Green tea.35-46.
6. Heiburn,L.K. et al.1986. Brit.J.Cancer. 54,677-683.
7. Isigaki,K.et al.1991.Proceed.of the International Symp.on Tea Sci.240-243.Japan
8. Kinlen,L.J.et al.1988. Brit.J.Cancer.58,397-401.
9. Lou,F.Q.et al.1989.Chin.Med.J.102,579-583.
10. Nial,S.,Van Horne, K.C.1993. Sorbent extraction technology, Varian sample preparation products.90.
11. Sparnius,V.L.et al.1989.J.Nat.Cancer Inst.61,493-496.
12. Wang,Z.Y.et al.1988.Drug Matabo.and Disp.16,98-103.

Studies on the Extraction and Purification of Catechins in Tea

I-Ming Juan¹ Ying-Ling Chen²

Summary

Catechins are the important compounds of tea that have effective physiological activities on human bodies. Three methods were used to extract and purify catechins from tea liquor. There are the adsorption of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), the polar interactions of aminopropyl group, and the covalent retention of phenyl-boronic acid group (PBA). It was shown that the PBA method was the best method. It could successfully separated the caffeine and catechins exclusively with the other polar compounds. The powder of crude catechins were obtained by freeze-drying the desalt extracts which were passed through the PVPP or PBA adsorption.

Key words: Tea, Catechins, Extraction, Purification

¹ Director, Taiwan Tea Experiment Station.

² Associate Biochemist, Taiwan Tea Experiment Station.