



汪雪莲,冯慧祥,薛世华,等.绿茶茶末多酚的提取、鉴定及其生物活性研究[J].轻工学报,2022,37(6):58-67.  
WANG X L, FENG H X, XUE S H, et al. Extraction, identification and bioactivities of polyphenols from green tea dust[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(6): 58-67. DOI: 10.12187/2022.06.008

# 绿茶茶末多酚的提取、鉴定及其生物活性研究

汪雪莲,冯慧祥,薛世华,谢譞,刘鹏展

华南理工大学 食品科学与工程学院,广东 广州 510641

**摘要:**以西湖龙井茶末为原料,以料液比1:20(g/mL)、提取温度85℃、乙醇体积分数60%、提取时间60 min为提取条件对茶末中的多酚进行提取,采用4种不同极性有机溶剂萃取游离多酚,并对不同极性提取物中的总酚质量浓度、自由基清除能力、胰脂肪酶抑制率、 $\alpha$ -淀粉酶抑制率等进行测定以研究其生物活性。结果表明:4种萃取相中,乙酸乙酯萃取相的总多酚质量浓度最高(15.66 mg/mL),且具有最强的生物活性,其对DPPH和ABTS自由基清除率的半抑制浓度( $IC_{50}$ )分别为0.05 mg/mL和0.15 mg/mL,对胰脂肪酶和 $\alpha$ -淀粉酶抑制率的 $IC_{50}$ 分别为0.89 mg/mL和0.39 mg/mL;液相色谱-质谱(LC-MS)定性分析共鉴定出15种多酚类化合物,且首次鉴定出根皮苷(5.44 mg/g);高效液相色谱(HPLC)对其中含量较高的化合物进行定量分析发现,表没食子儿茶素、儿茶素、绿原酸的含量较高,分别为72.03 mg/g、48.62 mg/g和41.58 mg/g。

**关键词:**绿茶茶末;多酚;生物活性;液相色谱-串联质谱

**中图分类号:**TS209 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2022)06-0058-10

## 0 引言

在茶叶生产过程中会产生约占产品总质量30%的茶末。这些茶末的化学成分组成与茶叶基本相同,富含多酚、游离氨基酸、多糖等生物活性物质,其中多酚含量甚至可达干物质的30%。此外,茶末具有的抗氧化、调节血糖、降低血脂及胆固醇含量等药用价值也已被理论和临床验证<sup>[1-2]</sup>。然而,由于形态、口感等问题,茶末只能作为加工副产物,主要用作活性成分提取、功能性食品、保健食品、吸附材料、牲畜饲料等的原料,未得到充分利用。

植物多酚是一类天然的多羟基化合物,具有良好的抗氧化作用,在植物体内普遍存在,山茶属、苹

果属植物中含量极为丰富<sup>[3-4]</sup>。茶叶来源的植物多酚又称茶多酚,是以儿茶素及其衍生物为主的混合物,可占茶叶中多酚类物质总质量的50%~60%<sup>[5]</sup>。茶多酚具有较强的生理活性和多种健康益处,可用于生产抗病毒制剂、抗肿瘤、糖尿病、肥胖症药物<sup>[6]</sup>、心血管保健药物<sup>[7-8]</sup>等。此外,茶多酚作为油脂的抗氧化剂,可抑制油脂的体内、体外氧化<sup>[9]</sup>。李元慈等<sup>[10-13]</sup>研究发现,茶多酚还具有降脂护肝的功效。其原理可能是茶多酚通过清除肝脏中自由基,提高总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、降低丙二醛(MDA)含量和肝体比等<sup>[12]</sup>,提高了肝脏的抗氧化能力,达到了护肝的作用<sup>[14]</sup>。茶末富含茶多酚等物质,对其提取物生理活性的研究多基于混合提取

收稿日期:2022-05-18

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2021A1515012504)

作者简介:汪雪莲(2000—),女,四川省达州市人,华南理工大学硕士研究生,主要研究方向为植物天然产物及食品加工。

E-mail:wxuelian1006@163.com

通信作者:刘鹏展(1976—),男,河南省洛阳市人,华南理工大学讲师,主要研究方向为植物天然产物。E-mail:lpzhan@scut.edu.cn

物,而对茶多酚等具体组分进行定性和定量分析并评价其生理活性的系统研究尚不多见。

西湖龙井是我国代表性的绿茶品种,年产量近  $3 \times 10^4$  t,每年会产生大量的茶末等副产物。此外,绿茶属于不发酵茶,加工过程中多酚等抗氧化成分保留较好。基于此,本研究拟选取西湖龙井茶末为原料,利用不同极性有机溶剂萃取得到化学成分组成差异较大的萃取相,通过体外自由基清除实验评价各萃取相的抗氧化活性,依据胰脂肪酶抑制率、 $\alpha$ -淀粉酶抑制率等筛选出具有最佳活性的萃取相,并采用液相色谱-串联质谱(LC-MS)及高效液相色谱(HPLC)对其化学成分进行定性和定量分析,以期证明茶末的潜在利用价值,为茶末的综合利用等相关产业提供科学依据和参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

西湖龙井茶末(明前春茶),浙江省绍兴市毛坪茶业有限公司产;无水乙醇,富宇精细化工有限公司产;福林酚、聚乙烯醇,国药集团化学试剂有限公司产;无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,上海穗试公司产;没食子酸、过硫酸钾,天津市大茂化学试剂厂产;正丁醇、正己烷、乙酸乙酯,天津福晨化学试剂有限公司产;橄榄油,2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯基(DPPH),上海麦克林公司产;异辛烷,广东光华科技公司产。以上试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

SQP 型电子天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司产;DK-S26 型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司产;5424R 型台式高速离心机,德国 Eppendorf 公司产;Waters Xevo G2-S 型液相色谱-质谱(LC-MS)联用仪(配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur1.2 数据处理系统),美国 Waters 公司产;BIOTEK 型多功能酶标仪,美国 Bio Tek 公司产;Thermo U3000 型高效液相色谱(HPLC)仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 茶多酚提取** 参考李原等<sup>[15]</sup>的方法。称取

一定量茶末,105 ℃ 条件下烘干 24 h,粉碎后过 30 目筛;准确称取 10.00 g 粉末,经 200 mL 60% (如无特指,文中百分数均指体积分数)的乙醇溶液于 85 ℃ 条件下浸提 60 min 后,抽滤(浸提 2 次),将滤液减压蒸馏得到膏状液,用蒸馏水稀释至 250 mL。分别用 250 mL 正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、蒸馏水于室温下振荡萃取 2 h,各萃取 3 次后合并萃取液,减压蒸馏并定容至 250 mL,得到不同极性萃取相,即样品待测液。

**1.3.2 总酚质量浓度测定** 分别吸取 1 mL 没食子酸标准液、蒸馏水(空白)及样品待测液于 10 mL 离心管中,添加 5.0 mL 10% 的福林酚试剂,8 min 后,加入 4.0 mL 质量分数为 7.5% 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,摇匀<sup>[16]</sup>;置于室温下反应 60 min,于 765 nm 波长处测定吸光度。没食子酸质量浓度与吸光度的线性回归方程为  $y = 5.9943x + 0.0012$ ,  $R^2 = 0.9993$ ,线性关系良好。总酚质量浓度按下式计算。

$$\text{总酚质量浓度} = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{空}}}{\text{SLOPE}_{\text{std}}}$$

式中: $A_{\text{空}}$  为空白对照组的吸光度; $A_{\text{样}}$  为样品组的吸光度; $\text{SLOPE}_{\text{std}}$  为没食子酸标准曲线斜率。

**1.3.3 抗氧化活性测定** 参考 Z. G. Zhao 等<sup>[17-18]</sup>的方法测定 DPPH 自由基清除率。将样品待测液稀释至 0.01~0.20 mg/mL,取 1 mL VC 溶液或样品待测液,与等量 DPPH 工作液在黑暗条件下反应 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度。DPPH 自由基清除率按下式计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{样}}} \times 100\%$$

参考文献[19-20]的方法测定 ABTS 自由基清除率。ABTS 溶液的配制:准确称取 0.3840 g ABTS 和 0.0660 g 过硫酸钾,混溶并定容至 1000 mL,避光静置 16 h。使用 ABTS 溶液前,用无水乙醇稀释至一定倍数,以在 734 nm 波长处吸光度为  $0.700 \pm 0.02$  时的 ABTS 溶液作为 ABTS 工作液。同时,使用无水乙醇将样品待测液稀释至不同质量浓度,取 20  $\mu\text{L}$  稀释后的样品溶液,加入 2 mL ABTS 工作液,于 714 nm 波长处测定吸光度。ABTS 自由基清除率按下式计算。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{样}}} \times 100\%$$

**1.3.4 胰脂肪酶抑制率测定** 参考张忠<sup>[21]</sup>的方法,并稍作修改。将 150 mL 2% 的聚乙烯醇及 50 mL 橄榄油均质处理 6 min,得到乳化液;取 2.0 mL 乳化液,加入 2.5 mL PBS 缓冲液(pH 值为 7.5),40 ℃ 水浴 5 min;加入 1.0 mL 样品待测液和 0.5 mL 胰脂肪酶溶液,混匀,再加入 6 mL 无水乙醇和 1 mL HCl 溶液(6 mol/L)终止反应;加入 3 mL 异辛烷,于 60 ℃ 条件下反应 10 min 后,取上层液体,加入 4 mL 异辛烷和 1 mL 新制乙酸铜显色剂,于 714 nm 波长处测定吸光度。胰脂肪酶抑制率按下式计算。

$$\text{胰脂肪酶抑制率} = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{样}}} \times 100\%$$

**1.3.5  $\alpha$ -淀粉酶抑制率测定** 参考王文君等<sup>[22]</sup>的方法,并稍作修改。按照表 1 进行  $\alpha$ -淀粉酶抑制实验, $\alpha$ -淀粉酶抑制率按下式计算。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率} = 1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

式中: $A_1$  为空白组吸光度; $A_2$  为空白对照组吸光度; $A_3$  为抑制组吸光度; $A_4$  为抑制对照组吸光度。

表 1 各组中样品待测液与酶液的加入情况

Table 1 Addition of sample and enzyme solution in each control group mL

项目	酶液	样品待测液	PBS 缓冲液	可溶性淀粉	DNS	去离子水
空白组	0.25	—	0.5	0.5	1	5
空白对照组	—	—	0.5	0.5	1	5
抑制组	0.25	0.25	0.5	0.5	1	5
抑制对照组	—	0.25	0.5	0.5	1	5

注:—表示不添加。

**1.3.6 LC-MS 成分鉴定** 取适量茶末乙酸乙酯萃取相,减压蒸馏,加入等体积无水乙醇溶解,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜。LC-MS 联用仪配备 CQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(1.7  $\mu\text{m}$   $\times$  2.1 mm  $\times$  100 mm),进样量为 10  $\mu\text{L}$ ,流速为 0.4 mL/min。使用流动相 A(0.1% 的甲酸水溶液)和流动相 B(乙腈)洗脱,洗脱程序如下:0~1.5 min,5% B;1.5~11 min,5%~40% B;11~14 min,40%~95% B;14~16.5 min,95% B;16.5~16.8 min,95%~5% B;16.8~20 min,5% B。

采用 ESI 正离子扫描模式,扫描范围( $m/z$ )为 50~1200 amu。离子源温度为 120 ℃,毛细管电压为 0.5 kV,采用高纯度  $\text{N}_2$  作为雾化气和干燥气,脱气气体和锥形气体流速分别为 800 L/h 和 50 L/h。采用 Xcalibur 软件分析原始数据并绘制质谱图。

**1.3.7 茶末乙酸乙酯萃取相多酚含量测定** 取适量茶末乙酸乙酯相,减压蒸馏,加入等体积无水乙醇溶解,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜。HPLC 仪配备 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(5  $\mu\text{m}$   $\times$  2.1 mm  $\times$  100 mm),进样量为 10  $\mu\text{L}$ ,流速为 0.4 mL/min。使用流动相 A(乙腈)和流动相 B(0.1% 的甲酸水溶液)洗脱,洗脱程序如下:0~25 min,5%~20% A;25~40 min,20%~50% A;40~45 min,50%~90% B;45~50 min,90%~5% B。与标准品对比,确定出峰时间,检测波长为 280 nm,采用外标法进行定量分析。

## 1.4 数据处理

所有实验均重复测定 3 次,数据结果以(平均值 $\pm$ 标准差)表示。采用 IBM spss 21.0 对数据进行统计分析,使用 Duncan's 检测对各变量进行 ANOVA 分析, $P < 0.05$  表明存在显著性差异。使用 GraphPad prism 9.2.0 拟合半抑制浓度( $IC_{50}$ ),利用 Origin 2021 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 茶末各萃取相的总酚质量浓度分析

依次利用极性不同的溶剂对茶末的乙醇提取物进行萃取分级,不同萃取相中总酚质量浓度如图 1

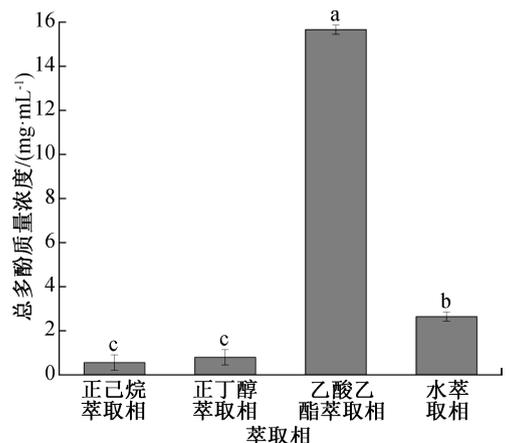


图 1 不同萃取相中总多酚质量浓度  
Fig. 1 Concentration of total polyphenols in different extraction phases

所示,其中不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。由图 1 可知,各萃取相总酚质量浓度大小依次为乙酸乙酯萃取相、水萃取相、正丁醇萃取相、正己烷萃取相,分别是 15.66 mg/mL、2.64 mg/mL、0.80 mg/mL 和 0.56 mg/mL。根据相似相溶原理,茶多酚以中等极性(乙酸乙酯萃取相)和强极性(水萃取相)为主,而正丁醇萃取相和非极性(正己烷萃取相)组分较少,其中乙酸乙酯萃取相中总酚质量浓度显著高于其他 3 种萃取相。其原因可能是茶多酚中中等极性的类黄酮物质较多,这类物质与乙酸乙酯极性最为相近,能够在其中最大程度地溶出,而偏极性的花青素类和极性较弱的苷元类组分则较少。与之类似,李原等<sup>[15]</sup>在对凤眼果壳多酚的研究中同样发现,乙酸乙酯萃取相中多酚含量高于正己烷萃取相和正丁醇萃取相;R. Zheng 等<sup>[23]</sup>在研究甘蔗渣多酚时也发现,甘蔗渣中提取得到的乙酸乙酯萃取相中多酚含量高于石油醚萃取相、正丁醇萃取相和水萃取相。

## 2.2 茶末各萃取相的抗氧化活性分析

人体内过量自由基的存在会引发氧化应激,导致炎症发生,天然抗氧化剂可以通过清除多余自由基,从多个方面起到维护人体健康的作用<sup>[24]</sup>。因此,自由基清除能力是评价活性物质体内抗氧化活性的重要指标。不同萃取相的自由基清除率如图 2 所示。由图 2 可知,不同萃取相的自由基清除能力均随总酚质量浓度的增加而逐步增强;相同总酚质量浓度下,乙酸乙酯萃取相的自由基清除能力最强,其 DPPH 和 ABTS 自由基清除率的  $IC_{50}$  分别为 0.05 mg/mL 和 0.15 mg/mL。水萃取相对 DPPH 和 ABTS 自由基清除率的  $IC_{50}$  分别为 0.41 mg/mL 和 0.35 mg/mL。正丁醇萃取相对 DPPH 和 ABTS 自由基清除率的  $IC_{50}$  为 0.61 mg/mL 和 0.27 mg/mL。正己烷萃取相的自由基清除能力最弱,其 DPPH 和 ABTS 自由基清除率的  $IC_{50}$  分别为 9.05 mg/mL 和 1.03 mg/mL。如前所述,茶末乙酸乙酯萃取相中主要成分为中等极性的类黄酮物质,在相同总酚质量浓度下,其抗氧化活性强于水萃取相、正丁醇萃取相和正己烷萃取相,适用于后续相关产品的开发。

## 2.3 茶末各萃取相的胰脂肪酶抑制率分析

胰脂肪酶是人体消化吸收膳食脂肪过程中的主要酶,抑制其活性可以减缓、减少脂肪的吸收,从而达到预防肥胖、降低血脂等功效<sup>[25]</sup>。不同萃取相的胰脂肪酶抑制率如图 3 所示。由图 3 可知,4 种萃取相均表现出质量浓度依赖性的胰脂肪酶抑制率,

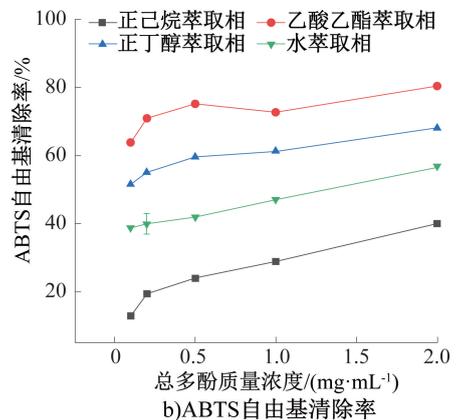
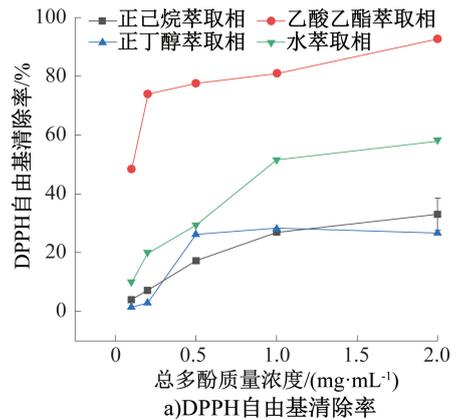


图 2 不同萃取相的自由基清除率  
Fig. 2 Free radical scavenging rates for different extraction phases

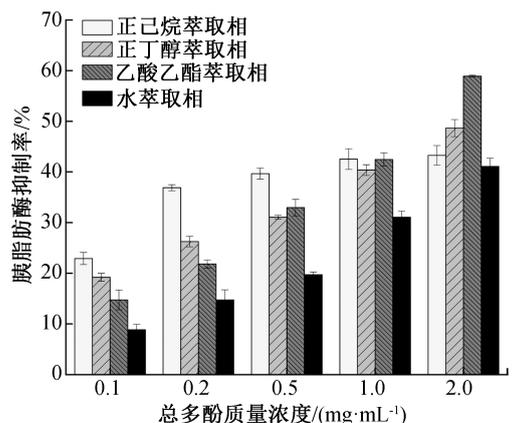


图 3 不同萃取相的胰脂肪酶抑制率  
Fig. 3 Pancreatic lipase inhibition rate of total polyphenols in different extraction phases

且胰脂肪酶抑制率与总酚质量浓度存在一定的正相关性。在较低总酚质量浓度下,正己烷萃取相的胰脂肪酶抑制率显著高于其他3种萃取相,原因可能是正己烷萃取相中含有较多的低极性物质,能够与胰脂肪酶产生竞争性结合<sup>[26]</sup>;正丁醇萃取相也有类似的胰脂肪酶抑制活性。随着总酚质量浓度的增加,乙酸乙酯萃取相对胰脂肪酶的抑制率快速升高,当总酚质量浓度达到2 mg/mL时,乙酸乙酯萃取相对胰脂肪酶的抑制率超过其他萃取相,且达到最高值,此时的 $IC_{50}$ 为0.89 mg/mL。刘天因等<sup>[27]</sup>研究发现,茯砖茶多酚类物质能够抑制胰脂肪酶,抑制类型为可逆非竞争性抑制,抑制常数( $K_i$ )为2.56 mg/mL。S. Soares等<sup>[28]</sup>通过荧光猝灭实验发现,茶多酚类物质能够改变酶蛋白所处的微环境,从而使酶活性降低。而多酚可通过“手-手套”模型与胰脂肪酶结合,改变酶分子原来的构象<sup>[21]</sup>。综上所述,茶末乙酸乙酯萃取相具有较高的胰脂肪酶抑制能力,此外,其他各萃取相同样具有一定的胰脂肪酶抑制能力,也可根据适用的环境(如极性),选择不同萃取相用于相关产品的开发。

## 2.4 茶末各萃取相的 $\alpha$ -淀粉酶抑制率分析

$\alpha$ -淀粉酶可水解淀粉分子链中的 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键,生成短链糊精、寡糖、麦芽糖和葡萄糖,抑制消化道中 $\alpha$ -淀粉酶的活性,减缓淀粉的水解速度,控制餐后血糖浓度的快速升高,降低胰岛素抵抗的风险<sup>[29]</sup>。不同萃取相的 $\alpha$ -淀粉酶抑制率如图4所示。由图4可知,不同总酚质量浓度下,正己烷萃取相、正丁醇萃取相和水萃取相的 $\alpha$ -淀粉酶抑制率的

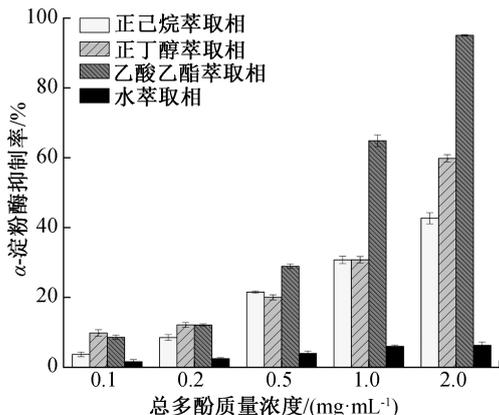


图4 不同萃取相的 $\alpha$ -淀粉酶抑制率

Fig. 4  $\alpha$ -amylase inhibition rate of total polyphenol in different extraction phrases

$IC_{50}$ 分别为1.03 mg/mL、1.29 mg/mL和0.61 mg/mL。乙酸乙酯萃取相的 $\alpha$ -淀粉酶抑制率显著高于其他3种萃取相,其 $IC_{50}$ 为0.39 mg/mL。这是因为乙酸乙酯萃取相中含有较多儿茶素,而X射线晶体学检测数据显示,儿茶素单体的羟基能与氨基酸活性中心的裂隙结合<sup>[30]</sup>;没食子酸中的芳香环能够分别为位于(-3)/(-2)、(-1)/(+1)、(-1)/(+2)的Trp59、Tyr62、Tyr151残基提供堆积反应的条件<sup>[31]</sup>;儿茶素的没食子酰基具有疏水性,能够与淀粉酶肽链上的疏水性氨基酸发生反应,使淀粉酶内部的疏水腔结构瓦解,从而降低 $\alpha$ -淀粉酶的生物活性<sup>[32]</sup>。张丽娜<sup>[33]</sup>研究发现,多酚类物质对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用属于竞争性抑制。竞争性抑制可导致酶-底物反应的表现常数( $K_m$ )增加,但不影响酶的最大反应速率( $V_{max}$ )。茶末乙酸乙酯萃取相对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用较好,可用于开发控制血糖、降低糖尿病风险的产品。茶末的正丁醇萃取相和正己烷萃取相对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制率也较高,表明茶末提取物中的相对弱极性组分也有较好的 $\alpha$ -淀粉酶抑制能力。而强极性组分(水萃取相)对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制能力较差,这可能是由于茶末中水溶性多酚不能与 $\alpha$ -淀粉酶的活性位点结合。

综上所述,4种萃取相中,乙酸乙酯萃取相具有最高的总酚质量浓度、最强的抗氧化活性、最高的胰脂肪酶抑制率和 $\alpha$ -淀粉酶抑制率。因此,选择乙酸乙酯萃取相作为优选组分,进一步研究其多酚类物质的组成。

## 2.5 茶末乙酸乙酯萃取相中多酚类物质组成分析

乙酸乙酯萃取相LC-MS总离子流图和多酚类物质鉴定结果分别如图5和表2所示。由图5和表2可知,在正离子模式下,化合物1的分子离子峰 $m/z$ 为307 $[M+H]^+$ ,根据子离子碎片,鉴定其为表没食子儿茶素/没食子儿茶素。化合物2和4在 $m/z$ 355 $[M+H]^+$ 处有母离子峰,且在 $m/z$ 163 $[M+H-191]^+$ (奎宁酸丢失)处有特征吸收峰,初步鉴定化合物2和4为绿原酸异构体。绿原酸是由咖啡酸与奎宁酸酯化形成的,参考N. B. Fang等<sup>[34]</sup>报道的绿原酸裂解形式和 $m/z$ 145处的基峰离子,鉴定化合物2和4分别为绿原酸和新绿原酸。化合物3在

$m/z$  179  $[M+H-161]^+$  (己糖苷丢失) 处有特征吸收峰, 而  $m/z$  179 是 6,7-二羟香豆素的特征峰, 初步鉴定化合物 3 为 6,7-二羟香豆素-3-O-己糖苷。化合物 5 在  $m/z$  291  $[M+H]^+$  处有母离子峰, 而  $m/z$  291 是儿茶素的特征吸收峰, 鉴定化合物 5 为儿茶素/表儿茶素。化合物 6 在  $m/z$  459  $[M+H]^+$  处有母离子峰, 初步鉴定其为没食子儿茶素没食子酸酯。化合物 7 在  $m/z$  443  $[M+H]^+$  处有母离子峰, 推测其为表儿茶素没食子酸酯。化合物 8 和 9 在  $m/z$  303  $[M+H-162]^+$  (己糖苷丢失) 处有特征吸收峰, 而  $m/z$  303 是槲皮素的特征吸收峰<sup>[35]</sup>, 表明化合物 8 和 9 是槲皮素-己糖苷衍生物。根据洗脱时间, 初步鉴定化合物 8 为槲皮素-3-O-金丝桃苷, 化合物 9 为槲皮素-3-O-芸香苷。化合物 10 在  $m/z$  611 处具有分子离子峰, 在  $m/z$  303 处产生特殊的 MS2 片段, 是槲皮素衍生物。该物质在  $m/z$  275  $[M+H-308-28]^+$  处断裂后, 在  $m/z$  183 处裂解二糖基单元和 CO 母离子, 进一步产生  $m/z$  153 碎片离子。基于类似裂解模式, 初步鉴定化合物 10 为槲皮素-3-O-半乳糖苷<sup>[36]</sup>。化合物 11 和 14 在  $m/z$  287  $[M+H-162]^+$  (己糖苷丢失) 处有特征吸收峰, 而  $m/z$  287 是山柰酚的特征吸收峰<sup>[35]</sup>, 鉴定化合物 11 和 14 为山柰酚-己糖苷衍生物。根据洗脱时间, 鉴定化合物 11 为山柰酚-3-O-半乳糖苷, 化合物 14 为山柰酚-3-O-葡萄糖苷。化合物 12 和 13 在  $m/z$  303  $[M+H-132]^+$  (戊糖苷丢失) 处有特征吸收

峰<sup>[35]</sup>, 鉴定化合物 12 和 13 是槲皮素-五碳糖苷衍生物。根据洗脱时间, 鉴定化合物 12 为槲皮素-3-O-木糖苷, 化合物 14 为槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷。化合物 15 在  $m/z$  275  $[M+H-162]^+$  处有分子离子吸收峰, 而  $m/z$  275 是根皮素的特征峰, 初步鉴定化合物 15 为根皮苷。

## 2.6 茶末乙酸乙酯萃取相中多酚类物质的定量分析

利用 HPLC 对茶末乙酸乙酯萃取相中含量较高的化合物进行定量分析, 结果见图 6。各化合物线性方程、线性范围和相关系数见表 3。由图 6 和表 3 可知, 在茶末乙酸乙酯萃取相中, 化合物 6 经标准品比对鉴定为咖啡因, 它是一种黄嘌呤类生物碱化合物, 是茶叶中涩味的主要来源, 在茶末中的含量较高, 为  $(23.78 \pm 3.51)$  mg/g; 表没食子儿茶素含量最高, 为  $(72.03 \pm 1.36)$  mg/g, 其次是儿茶素, 为  $(48.62 \pm 0.46)$  mg/g。金钰等<sup>[37]</sup> 研究西湖龙井在

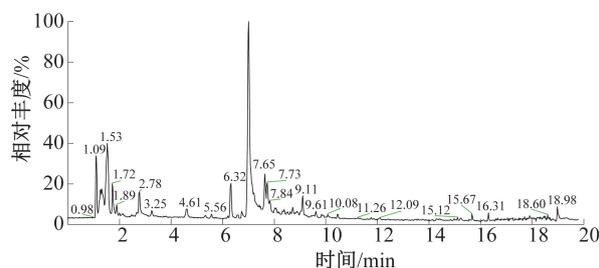


图 5 乙酸乙酯萃取相的 LC-MS 总离子流图  
Fig. 5 LC-MS total ion chromatogram of ethyl acetate phase extract

表 2 乙酸乙酯萃取相的多酚类物质鉴定结果

Table 2 Identification results of polyphenolic compounds in ethyl acetate phase extract

序号	保留时间/min	$[M+H]^+$ $m/z$	二级离子碎片 $m/z$	化合物
1	4.61	307.08	181.05、139.04	表没食子儿茶素
2	5.64	355.10	163.04、145.03、117.03、89.04	绿原酸
3	6.01	341.09	179.03、133.03、123.04	6,7-二羟香豆素-3-O-己糖苷
4	6.82	355.10	163.04、145.03、117.03	新绿原酸
5	7.65	291.09	147.04、139.04、123.04	儿茶素/表儿茶素
6	7.73	459.09	307.08、289.07、139.04、121.03	表没食子儿茶素没食子酸酯
7	9.11	443.09	273.08、139.04、123.04、95.05	表儿茶素没食子酸酯
8	9.11	465.01	303.05、229.05、183.04、153.02	槲皮素-3-O-金丝桃苷
9	9.20	465.05	303.05、201.05、153.02、137.02	槲皮素-3-O-芸香苷
10	9.55	611.04	303.05、275.04、183.04、153.02	槲皮素-3-O-半乳糖苷
11	9.61	449.11	287.05、275.04、183.06、153.02	山柰酚-3-O-半乳糖苷
12	9.61	435.09	303.05、229.05、153.02、137.02	槲皮素-3-O-木糖苷
13	9.77	435.09	303.05、229.05、153.02、137.02	槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷
14	9.84	449.11	287.05、153.02、137.02、121.03	山柰酚-3-O-葡萄糖苷
15	10.45	437.14	275.09、169.05、107.05、95.05	根皮苷

冲调过程中茶多酚的溶出行为时发现,在 100 ℃ 条件下冲调,表没食子儿茶素的最大溶出量为  $(13.48 \pm 0.13)$  mg/g。由此可知,乙酸乙酯萃取相可更大程度地富集茶末多酚类物质。茶末乙酸乙酯萃取相中类黄酮物质较多,并未发现花青素类、苷元类等物质,这是由于花青素在果蔬中含量较为丰富。P. Z. Liu 等<sup>[38]</sup>通过紫外光谱和质谱鉴定了山楂果实中的多酚类物质,包括 B 型原花青素(二聚体、三聚体、四聚体)及糖基化原花青素。本研究在茶末中发现并鉴定出根皮苷,而根皮苷在蔷薇科苹果属植物中较为常见,但在茶叶中尚未见报道。

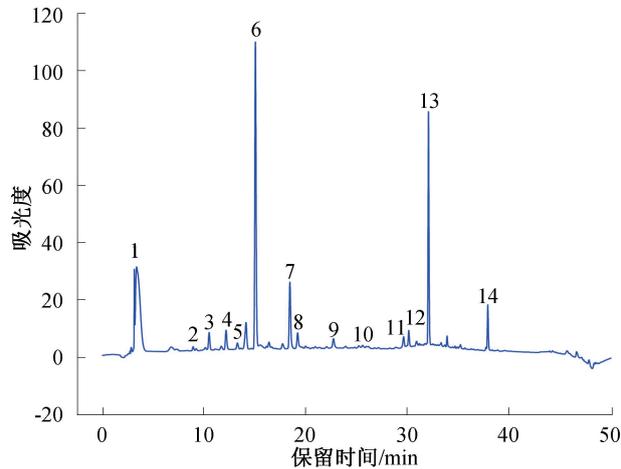


图 6 乙酸乙酯萃取相 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chart of ethyl acetate phase extract

### 3 结论

本文以西湖龙井茶末为原料,采用不同极性有机溶剂萃取游离多酚,发现乙酸乙酯萃取相的总多酚质量浓度最高、抗氧化活性最强、胰脂肪酶抑制率和  $\alpha$ -淀粉酶抑制率最高,表明茶末多酚类物质具有潜在的药用价值,可进一步精制提纯后应用于预防高血糖、肥胖等疾病药品的开发。同时采用 LC-MS 定性分析乙酸乙酯萃取相中的多酚类化合物,利用 HPLC 对其中含量较高的物质进行定量分析,发现表没食子儿茶素、儿茶素、绿原酸含量较高,分别为 72.03 mg/g、48.62 mg/g 和 41.58 mg/g。虽然多酚类物质含量丰富,但茶末乙酸乙酯萃取相仍是混合物体系,因此后期可进一步采用色谱技术对其进行分离纯化,提取出具有更高生物活性的化学组分,实现茶末的再利用进而促进茶产业资源的综合利用。

在本文研究基础上,未来仍需进一步探究茶末乙酸乙酯相中抑制胰脂肪酶和  $\alpha$ -淀粉酶的具体活性成分、体内外作用机制及构效关系,深入研究茶末乙酸乙酯萃取相有效成分与胰脂肪酶和  $\alpha$ -淀粉酶的作用靶点及抑制类型,并进一步通过体外模拟肠胃消化环境,研究不同萃取相在胃肠道环境中的消化耐受性,为茶末相关产品的开发提供科学的理论依据。

表 3 各化合物线性方程、线性范围和相关系数

Table 3 Linear equation, linear range and correlation coefficient of each component

序号	保留时间/min	化合物	回归方程	相关系数	含量/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	3.65	没食子儿茶素	$y = 140.76x + 0.7459$	0.9997	$8.65 \pm 0.42$
2	9.23	新绿原酸	$y = 113.81x - 0.4315$	0.9999	$0.46 \pm 0.02$
3	11.56	表没食子儿茶素	$y = 11.039x - 0.0142$	0.9994	$72.03 \pm 1.36$
4	13.42	儿茶素	$y = 40.491x - 0.0794$	0.9993	$48.62 \pm 0.46$
5	13.56	绿原酸	$y = 138.04x + 1.8136$	0.9967	$41.58 \pm 0.43$
6	15.03	咖啡因	$y = 485.99x - 99.5650$	0.9993	$23.78 \pm 3.51$
7	17.95	表没食子儿茶素没食子酸酯	$y = 159.73x - 0.1842$	0.9999	$25.58 \pm 0.33$
8	18.55	表儿茶素	$y = 62.609x - 0.4962$	0.9991	$23.51 \pm 0.23$
9	23.62	山柰酚-3-O-D-槐糖苷	$y = 117.93x - 0.0615$	0.9997	$0.17 \pm 0.01$
10	25.69	表儿茶素没食子酸酯	$y = 126.73x - 0.0826$	0.9993	$6.38 \pm 0.24$
11	28.02	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	$y = 117.11x - 0.1606$	0.9999	$0.13 \pm 0.02$
12	28.36	山柰酚-3-O-芸香糖苷	$y = 166.98x + 0.0943$	0.9999	$0.12 \pm 0.03$
13	31.81	根皮苷	$y = 155.78x + 0.0591$	0.9982	$5.44 \pm 0.36$
14	37.62	根皮素	$y = 529.63x + 0.9505$	0.9999	$0.15 \pm 0.06$

## 参考文献:

- [1] LIU J Q, SHAO W F, HUANG Y W, et al. Effect of fermented Pu-erh tea powder, dark tea powder and liupu tea on hepatocytic CYP2E1 expression in rats with experimental nonalcoholic fatty liver[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2013, 18(7): 411-415.
- [2] CHOU O, ALI A, SUBBIAH V, et al. LC-ESI-QTOF-MS/MS characterisation of phenolics in herbal tea infusion and their antioxidant potential[J]. Fermentation-Basel, 2021, 7(2): 73.
- [3] SAFFARI Y, SADRZDEH S M H. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro [J]. Life Sciences, 2004, 74(12): 1513-1518.
- [4] 赵雅倩. 典型酚类抗氧化剂对斑马鱼的神经毒性效应研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.
- [5] ZHANG Z C, ZHANG Y T, LI J M, et al. The neuroprotective effect of tea polyphenols on the regulation of intestinal flora [J]. Molecules, 2021, 26(12): 3692.
- [6] PRAMILA K, JULIUS A. In vitro antioxidant effect of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in protecting cardiovascular diseases[J]. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2019, 12(3): 1265-1267.
- [7] 李新. 氨基酸和酚类化合物的联合抗氧化作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [8] 郑城钦, 张正艳, 马存强, 等. 茶多酚在日用品及食品中的应用[J]. 现代食品, 2020(17): 64-67.
- [9] LORENZ M, LEHMANN S, DJORDJEVIC I, et al. Vasodilation of tea polyphenols ex vivo is mediated by hydrogen peroxide under rapid compound decay[J]. Antioxidants, 2020, 9(5): 390.
- [10] 李元慈. 茶多酚对肝脏的保护作用研究[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(9): 75-78.
- [11] 杨宽, 钱卫东, 秦蓓. 茶多酚对高脂血症大鼠血脂代谢和肝组织 MDA、T-SOD 含量的影响[J]. 中国油脂, 2019, 44(1): 70-73, 96.
- [12] 张勇, 李苗苗, 华田苗, 等. 茶多酚对慢性酒精中毒大鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(6): 481-484, 529.
- [13] 汪雪睿, 黄保嘉, 李想, 等. 茶多酚对急性镉(II)暴露小鼠红细胞及肝脏损伤的拮抗作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 66-72.
- [14] WANG D X, WANG T T, LI Z M, et al. Green tea polyphenols upregulate the Nrf2 signaling pathway and suppress oxidative stress and inflammation markers in D-Galactose-Induced liver aging in mice [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 836112.
- [15] 李原, 赵振刚. 凤眼果壳多酚的抗氧化和抗人肺癌细胞 A549 增殖活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 16-24.
- [16] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化委员会. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [17] ZHAO Z G, YAN H F, ZHENG R, et al. Anthocyanins characterization and antioxidant activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind extracts[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 113: 38-45.
- [18] 高超. 款冬叶黄酮的抗氧化活性研究[J]. 轻工学报, 2020, 35(2): 17-23.
- [19] ZHENG R, SU S, ZHOU H F, et al. Antioxidant/antihyperglycemic activity of phenolics from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and identification by UHPLC-HR-TOFMS[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 101: 104-114.
- [20] 张煜, 张晓娜, 薛桥丽, 等. 扁枝槲寄生提取物体外抗氧化效应研究[J]. 轻工学报, 2016, 31(3): 39-48.
- [21] 张忠. 茶多酚对胰脂肪酶活性的抑制作用

- [J]. 食品工业, 2013, 34(8): 168-167.
- [22] 王文君, 姚江武, 陶涛. 红茶和绿茶多酚对猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶抑制效果的动力学研究[J]. 口腔医学研究, 2009, 25(4): 442-446.
- [23] ZHENG R, SU S, LI J B, et al. Recovery of phenolics from the ethanolic extract of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities [J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 107: 360-369.
- [24] MONIRUZZAMAN M, DUTTA S D, JIN H X, et al. Polyphenol derived bioactive carbon quantum dot-incorporated multifunctional hydrogels as an oxidative stress attenuator for antiaging and in vivo wound-healing applications[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 13(10): 3527-3539.
- [25] ISWANTINI D, HANIF N, RIZKI P D, et al. Active fraction as anti-obesity by in vitro toward pancreatic lipase activity [J]. *IOP Conference Series Materials Science and Engineering*, 2021, 1070(1): 12012.
- [26] LI S, PAN J H, HU X, et al. Kaempferol inhibits the activity of pancreatic lipase and its synergistic effect with orlistat [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 72: 104041.
- [27] 刘天因, 徐梦佳, 胡冰, 等. 茯砖茶多酚类物质对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 46-49.
- [28] SOARES S, MATEUS N, DE FREITAS V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(16): 6726-6735.
- [29] INGLET G, DAVID S. Alpha-amylase activity in various concentrations of the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [J]. *Agricultural Research Service*, 2008, 8(3): 58.
- [30] FEJERSKOV O, KIDD E. Dental caries: The disease and its clinical management [J]. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 2004, 32: 236-237.
- [31] NARAYANAN R, CHANDRAN R, PRASUNKUMAR J M. Human salivary  $\alpha$ -amylase trp58 situated at subsite-2 is critical for enzyme activity [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(12): 2517-2529.
- [32] 王文君, 姚江武, 陶涛. 红茶和绿茶多酚对猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶抑制效果的动力学研究[J]. 口腔医学研究, 2009, 25(4): 442-446.
- [33] 张丽娜. 水翁花对胰脂肪酶和  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性及作用机制初步探讨[D]. 上海: 华东理工大学, 2003.
- [34] FANG N B, YU S G, PRIOR R L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums [J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(12): 3579-3585.
- [35] SHOKO T, MAHARAJ V J, NAIDOO D, et al. Anti-aging potential of extracts from sclerocarya birrea (A. Rich.) hochst and its chemical profiling by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18: 54.
- [36] DANIIL O, CHIRIKOVA N K, KASHCHENKO N I, et al. Bioactive phenolics of the genus artemisia (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the siberian species and their inhibitory potential against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 756.
- [37] 金钰, 赵明明, 周有祥, 等. 龙井茶中主要茶多酚的溶出行为研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 6007-6011.
- [38] LIU P Z, YANG B R, KALLIO H. Characterization of phenolic compounds in chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(4): 1188-1197.

## Extraction, identification and bioactivities of polyphenols from green tea dust

WANG Xuelian, FENG Huixiang, XUE Shihua, XIE Xuan, LIU Pengzhan

*School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*

**Abstract:** Green tea dust was used as raw material in this study. The polyphenols in the green tea dust were extracted by a solid-liquid ratio of 1:20 g/mL, extraction temperature of 85 °C, ethanol concentration of 60% and extraction time of 60 min, and solvents with different polar were employed to extract and separate and the bioactive components in the green tea dust into 4 fractions. The mass concentration of total phenols contained in the different fractions was determined, and the bioactivities of different fractions were evaluated through free radical scavenging assay, and their inhibitory activities on pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase were also studied. The results showed that the ethyl acetate extracted fraction had the highest total polyphenol content (15.66 mg/mL) and the strongest bioactivities among all the fractions. Its  $IC_{50}$  for the free radical scavenging rate of DPPH and ABTS were 0.05 mg/mL and 0.15 mg/mL, respectively, and inhibitory activities on pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase were  $IC_{50}$  0.89 mg/mL and 0.39 mg/mL, respectively. The polyphenols in the ethyl acetate extracted phase were further characterized and quantified by HPLC and MS. A total of 15 polyphenolic compounds were identified by MS and was first identified of phlorizin (5.44 mg/g) in green tea dust. Quantitative analysis of the compounds with high contents by HPLC revealed that epigallocatechin, catechin and chlorogenic acid were present at high contents of 72.03 mg/g, 48.62 mg/g and 41.58 mg/g respectively.

**Key words:** green tea dust; polyphenols; bioactivity; LC-MS

(责任编辑:杨晓娟)