

普洱茶多酚的提取鉴定及其护手霜制备应用创新综合实验教学

杨涛, 段开娇*, 李思玉, 魏静, 杨清迪, 王倩

云南民族大学化学与环境学院, 昆明 650500

摘要: 介绍一个大学化学综合创新实验。从普洱茶中提取茶多酚并用于制备护手霜。主要内容包括茶多酚提取、鉴定、抗氧化性评价和护手霜制备。该实验涉及天然产物提取、鉴定、性能评价的操作以及天然产物的应用, 满足高校化学类本科生的专业实验教学需求, 有利于提高实验操作技能, 培养创新能力, 激发探索热情。

关键词: 茶多酚; 天然产物; 提取和鉴定; 抗氧化性; 综合创新实验

中图分类号: G64; O6

A Comprehensive and Innovative Chemical Experimental Teaching: Extraction and Identification of Tea Polyphenols from Pu'er Tea and the Application in Hand Cream Making

Tao Yang, Kaijiao Duan*, Siyu Li, Jing Wei, Qingdi Yang, Qian Wang

College of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China.

Abstract: This article presents a comprehensive innovative chemical experiment at the university level. It focuses on the extraction of tea polyphenols from Pu'er tea and their application in hand cream making. The experiment covers the processes of extraction, identification, antioxidation property evaluation, and hand cream formulation. By involving the extraction, identification, and performance evaluation of natural products, as well as their practical application, this experiment caters to the needs of undergraduate students majoring in chemistry. It aims to enhance their practical skills, foster innovation, and ignite their passion for exploration.

Key Words: Tea polyphenols; Natural products; Extraction and identification; Antioxidation; Comprehensive and innovative experiment

普洱茶含有茶多酚、茶多糖、总黄酮、茶氨酸等药理成分, 其中含量最高的是茶多酚^[1-3], 其占茶叶总重的15%–35%, 是评价普洱茶品质和药理功能的重要指标。茶多酚是茶叶中多羟基酚类化合物的总称, 具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、降血脂、降血糖以及抗病毒等多种生物活性^[4,5], 可抑制人体新陈代谢产生的自由基, 它的抗氧化能力约是维生素E的18倍, 维生素C的3–10倍^[6]。茶多酚也可以抑制皮肤透明质酸酶的降解能力, 起到良好的保湿作用。目前我国高等学校实验教材中已有关于酚的结构、性质、鉴定等教学内容^[7,8], 但是以具体形象的酚类天然产物为实验对象的教学内容较少^[9], 这其中缺乏酚类天然产物提取、鉴定、性能评价、产品制备等综合实验。而开展这方面的实验, 有助于化学类本科生在学习和掌握酚的构效关系理论后, 能够联系实际生活和生产实践, 生动系统地学习和掌握酚类化合物的提取、鉴定、性能评价、产品制备等实验操作技能, 认识和感受酚

收稿: 2023-12-10; 录用: 2024-03-26; 网络发表: 2024-03-28

*通讯作者, Email: duankj1986@126.com

基金资助: 国家自然科学基金(22266036); 云南省教育厅科研基金(2023J0597); 云南省科技厅创新创业项目(2022T09)

类化合物的特性和应用, 从而提升学生学习化学的兴趣, 获得专业满足感和自豪感, 促进化学实验教学的发展。

基于上述原因, 立足普洱茶的药理作用, 围绕普洱茶多酚的结构和性质关系, 我们设计了一个普洱茶多酚提取、鉴定、性能评价、产品制备的综合实验, 该实验是一个内容新颖和应用性强的创新实验。

1 实验部分

1.1 实验目的

- (1) 掌握微波辅助浸提茶多酚的原理和方法;
- (2) 掌握茶多酚的鉴定和抗氧化性评价原理和操作方法;
- (3) 了解茶多酚护手霜产品的初步制备方法。

1.2 实验原理

1.2.1 茶多酚提取原理

茶叶中的茶多酚主要分成五大类, 分别是酚酸类、黄烷醇类(主要是儿茶素类)、黄烷酮类、花色苷类和黄酮醇类, 它们的结构式如图1所示, 其中儿茶素占比60%–80%。儿茶素的多羟基结构使其易溶于乙醇, 因此通常使用乙醇溶液浸提茶多酚。但是该方法温度高、速度慢、耗时长, 导致大部分茶多酚被氧化, 降低了提取物的品质。微波辅助浸提^[10–12]是一种高效快速的茶多酚提取方法, 其原理是茶叶细胞吸收微波能量后, 细胞内温度迅速上升, 使细胞内压力超过细胞壁膨胀承受能力, 导致细胞破裂(简称“破壁”)有效成分自由流出。常用的微波系统主要有密闭式和开放式两种。密闭式微波仪主要用于微波消解, 但是存在高温高压的风险和目标物质易降解的缺陷, 故通常使用开放式微波仪提取茶多酚。然而在开放式微波仪中乙醇的高挥发性存在潜在危险, 所以本实验通过在家用微波炉顶上打孔, 然后安装冷凝装置, 使浸提过程中挥发的乙醇全部以冷凝的方式回收, 规避微波辅助乙醇浸提茶多酚的乙醇挥发逸散风险。本实验用微波仪见图2。

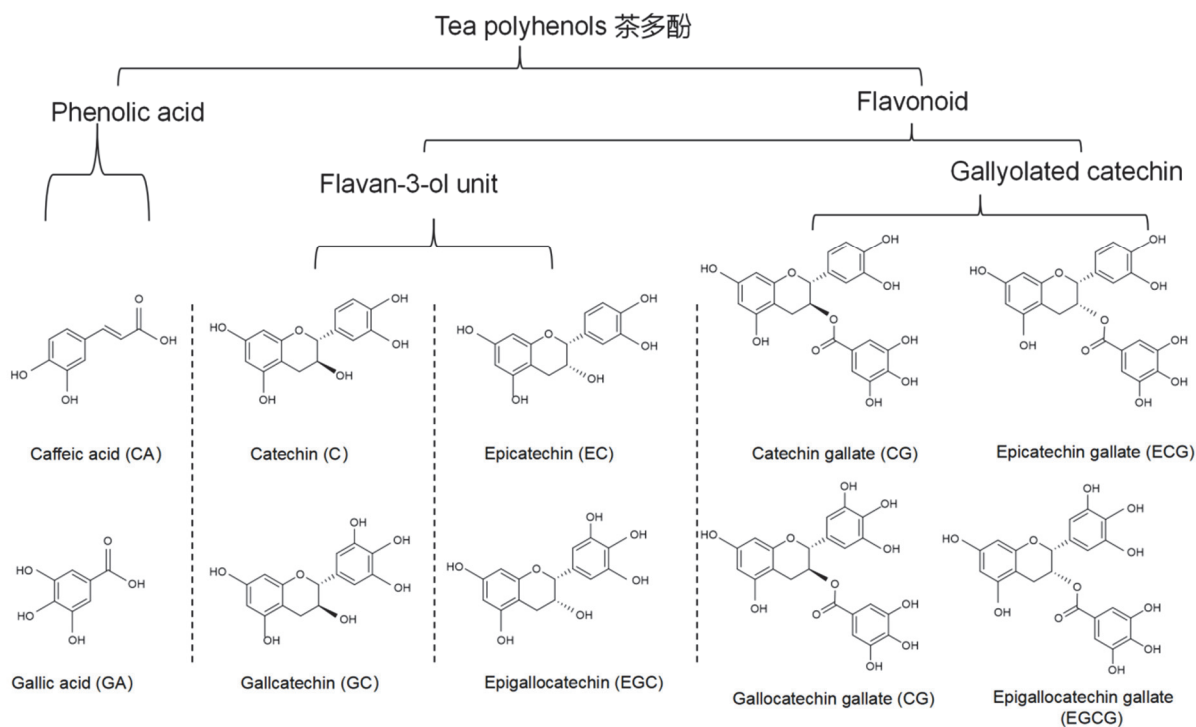


图1 茶多酚含有的主要化学物质结构式



图2 实验用微波炉

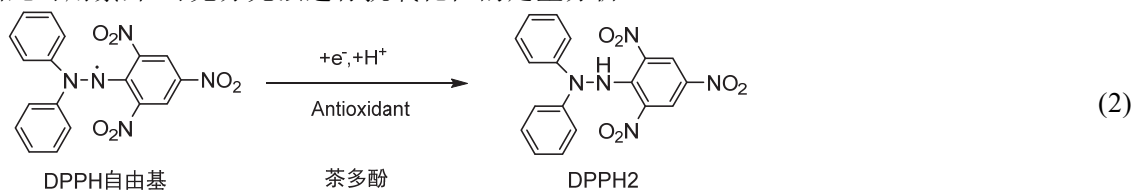
1.2.2 茶多酚鉴定原理

目前茶多酚的测定方法主要有福林酚法(GB/T8313-2008)和酒石酸亚铁法(GB/T8313-2002), 由于某些还原性的氨基酸和植物中的非酚类物质(如抗坏血酸)会与福林酚试剂反应变蓝, 出现假阳性现象^[13], 所以本实验采用酒石酸亚铁法。该方法的原理是酚与亚铁离子反应生成电离度很大的络合物, 该络合物呈紫蓝色, 并在540 nm范围有最大吸收峰, 反应原理见式(1)。因此, 通过使用紫外-可见分光光度仪测定吸光度可以鉴定茶多酚, 并通过绘制儿茶素吸光度标准曲线计算提取物中茶多酚的含量。



1.2.3 茶多酚抗氧化性评价原理

由图1可知, 茶多酚的五类物质中, 除含量较少的酚酸类外均具有相同的2-苯基苯并吡喃母核, 称为基本核。基本核与多羟基结合产生共轭效应, 导致结构上的氢容易脱去, 产生抗氧化作用^[14]。目前用于评价天然产物抗氧化作用的方法主要有DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基清除法、ABTS (2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)自由基清除法、羟基自由基清除法和PTIO (2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧代-1-氧)自由基清除法。其中, DPPH自由基清除法是一种快速简单测定物质总抗氧化作用的方法。茶多酚对DPPH自由基的清除原理如式(2)所示, DPPH·的单电子在517 nm处呈现深紫色强吸收特性, 由于向DPPH溶液中加入茶多酚时, 茶多酚把氢质子传递给DPPH·的单电子, 生成了稳定的分子态DPPH2新物质, 使溶液的深紫色褪色, 褪色程度与接受的电子数成定量关系, 因此可用紫外-可见分光法进行抗氧化性的定量分析。



1.3 仪器与试剂

仪器: 电子分析天平(FA1004, 上海恒平精密电子分析天平)、微波炉(改装开放式, G70F20N2L-DG(WO)、广东格兰仕微波生活电器制造有限公司)、移液枪(0.1-2 μL, 瑞士梅特勒托利多公司)、循环水式真空泵(SH-III, 上海亚荣生化仪器厂)、旋转蒸发仪(RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂旋转蒸发器)、电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9146A, 上海精宏实验设备有限公司)、紫外分光光度仪(WFJ-7200, 上海尤尼柯仪器有限公司)、恒温水浴锅(DF-101S, 力辰科技集热式磁力搅拌器); 烧杯、量筒、研钵、抽滤瓶、布氏漏斗、玻璃棒等均从上海任科生物科技有限公司购买。

材料/试剂：普洱茶生饼、熟饼、生茶散茶(未知纯度，云南勐海茶厂2018年产)、茶多酚标准品、无水乙醇、硫酸亚铁、酒石酸钾钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、DPPH、白油、丙三醇、凡士林、单甘脂、吐温(T-60)、蒸馏水。以上试剂均为分析纯，均购于阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.4 实验操作步骤

实验前期以乙醇为浸提溶剂，通过设计单因素实验，获得了普洱茶多酚的最佳提取的条件为乙醇/水(体积比)=50%，料/液(体积比)=1:9，微波功率=300 W，微波时间=5 min，提取级数=2-3。

1.4.1 茶多酚提取

(1) 取适量普洱茶样品研磨成粉，准确称取3 g茶粉置于烧杯中；

(2) 向3 g茶粉中倒入27 mL 50%乙醇溶液混合均匀，然后放入开放式微波仪中在300 W微波功率下浸提5 min获得滤液，再次将滤渣置于烧杯中并加入27 mL 50%乙醇后微波浸提2-3次，将全部滤液在旋转蒸发仪中分离茶多酚和乙醇，1 h后得到金黄色粘稠状提取物，将其放入恒温鼓风干燥箱中80 °C干燥4 h，取出研磨成粉末备用。注意，旋转蒸馏时初始蒸馏温度先设定为30 °C以防暴沸，并随时观察和调整温度和压强参数。

1.4.2 茶多酚含量测定

分别配制酒石酸亚铁溶液、磷酸氢二钠溶液、磷酸二氢钾和缓冲液、标准液、待测液、空白参比液。

(1) 酒石酸亚铁溶液：准确称取0.1 g硫酸亚铁和0.5 g酒石酸钾钠，蒸馏水溶解后移入100 mL容量瓶定容；

(2) 磷酸氢二钠溶液：准确称取2.9695 g磷酸氢二钠，蒸馏水溶解后移入250 mL容量瓶定容，记为A液；

(3) 磷酸二氢钾：准确称取2.2695 g磷酸二氢钾，蒸馏水溶解后移入250 mL容量瓶定容，记为B液；

(4) 缓冲液：取A液85 mL和B液15 mL混匀，即为pH 7.5的缓冲液；

(5) 标准液：分别取0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 g茶多酚标准样于8个烧杯中，分别用蒸馏水溶解后移入8个50 mL容量瓶定容。取定容后的溶液1 mL、蒸馏水4 mL和酒石酸亚铁溶液5 mL置于8个25 mL容量瓶中，用上述缓冲液定容。

(6) 待测液：取0.05 g茶多酚提取物用蒸馏水溶解后移入50 mL容量瓶定容。取定容后的溶液1 mL、蒸馏水4 mL和酒石酸亚铁溶液5 mL置于25 mL容量瓶中，用上述缓冲液定容。

(7) 空白参比液：取蒸馏水5 mL和酒石酸亚铁溶液5 mL置于25 mL容量瓶中，用上述缓冲液定容。

(8) 标准曲线绘制：用紫外-可见分光光度计在540 nm波长下，用1 cm比色皿装入空白参比液，校零吸光度，然后用同样1 cm比色皿装入标准液测得茶多酚标准品的吸光度，画出茶多酚的吸光度与浓度标准曲线。

(9) 含量测定：用紫外-可见分光光度计在540 nm波长下，用1 cm比色皿装入空白参比液，校零吸光度，然后用同样1 cm比色皿装入待测液测得提取物中茶多酚标准的吸光度，参照标准曲线计算提取物中茶多酚的含量。

1.4.3 抗氧化性评价

(1) 配制起始吸光度为0.704的DPPH溶液并置于4 °C的冰箱中保存；

(2) 配制提取物水溶液：取0.05 g茶多酚提取于烧杯中加入蒸馏水搅拌，移入50 mL容量瓶中用蒸馏水定容。

(3) 抗氧化性测定：在517 nm波长下以蒸馏水作为参比校零。取1 mL上述提取物水溶液于离心管中，移取5 mL DPPH溶液混合振荡反应10 min，取3 cm的比色皿将反应好的待测液加至3/4处用滤纸擦清外壁，放入样品室内测定吸光度。重复上述操作三次，得到三个吸光度。取三个吸光度的平

均值作为茶多酚提取物对DDPH的清除率，即抗氧化性评价指标。

1.4.4 制作护手霜

取0.3 g茶多酚提取物、2 mL丙三醇和15 mL蒸馏水放入50 mL烧杯中，记为烧杯A。取2 g凡士林、1 g T1-60、1 g单甘脂、1 mL白油置于另一50 mL烧杯中，记为烧杯B。将烧杯A和烧杯B放入75 °C恒温水浴锅中搅拌，待两个烧杯中的混合物完全融化后，将烧杯A中的物质倒入烧杯B中再次剧烈搅拌，当烧杯B中形成乳浊液后，从恒温水浴锅中取出继续搅拌至室温，陈化后得到茶多酚护手霜。

2 结果与讨论

2.1 普洱茶多酚含量A

茶多酚的含量以干态质量分数表示，按下式计算：

$$\text{茶多酚}(\%) = \frac{A \times 1.957 \times 2}{1000} \times \frac{L_1}{L_2 \times M_0 \times m} \times 100$$

式中： L_1 为试液的总量，mL； L_2 为测定时的用量，mL（1 cm比色皿测量容积一般为2–3 mL，加满为4–5 mL）； M_0 为试样的质量，g； m 为试样干物质的含量，%（20%–25%）； A 为试样的吸光度；1.957为用10 mm比色杯，当吸光度等于0.50时，每毫升茶汤中含茶多酚相当于1.957 mg。

同一样品的两次测定值之差，每100 g试样不得超过0.5 g，否则取两次测定的算术平均值作为结果保留小数点后一位。

本实验测得普洱茶熟饼(1#)、生饼(2#)和生茶散茶(3#)的茶多酚含量如表1所示，可以发现普洱生茶的茶多酚含量高于熟茶，云南勐海茶厂产出的普洱茶多酚均值为23.9%，含量较高。

表1 普洱茶多酚的含量测定值

组别	吸光度	含量(%)	平均(%)
1#	0.164	12.7	23.9
2#	0.189	22.5	
3#	0.173	36.4	

2.2 普洱茶多酚对DDPH自由基清除率

本实验测得普洱茶熟饼(1#)、生饼(2#)和生茶散茶(3#)提取物茶多酚对DPPH自由基的清除率如表2所示，发现普洱生茶的茶多酚对DPPH的清除率大于熟茶，这是因为普洱生茶中提取的多酚含量高于熟茶。普洱茶的平均清除率为85.8%，由于常见的DPPH清除率正常范围为60%–90%，所以本实验普洱茶多酚的抗氧化性较强。

表2 普洱茶多酚对DDPH的清除率

组别	吸光度	清除率(%)	平均(%)
1#	0.113	83.9	85.8
2#	0.09	87.2	
3#	0.096	86.4	

2.3 茶多酚护手霜产品评价

本实验取普洱生茶提取物茶多酚作为护手霜原料，按照上述操作步骤初步制备了茶多酚护手霜产品。参照中国QB/T 1857–2004标准，邀请6组(每组6人)试用者持续涂抹上述茶多酚护手霜6 h，分别从刺激性、色泽、香味、保湿效果等对该产品进行感官指标评价，评价结果如表3所示。

表3 茶多酚护手霜试用感官评价

组数	刺激性	色泽	香味	保湿效果
1	无	白色	无	良
2	无	淡黄色	淡淡的茶香	良
3	无	黄色	较浓的茶香	良
4	无	深黄	浓茶香	好
5	无	深黄	浓茶香	好
6	无	深黄	浓茶香	一般

3 结语

本文介绍了一个大学化学综合创新教学实验, 实验内容包括茶多酚提取、鉴定和含量测定、抗氧化性评价和护手霜产品制备应用。立足普洱茶多酚的抗氧化药理功能和保湿特性, 将酚的分子结构、化学理论、化学实验有机结合起来, 创新设计了普洱茶多酚天然产物提取、鉴定、性能评价、产品应用综合性实验。该实验涉及上述过程的原理、操作、仪器使用、产品评价, 补充了现有实验教学中生活化和具象化表现度低、后端化学产品体现不足、综合性有待提高的问题。有助于学生基于构效关系理论提高探索天然产物药理功能的热情, 指导学生创新性地开发新产品, 提升学生的专业认知度和学业自豪感, 全面提高学生的基础实验技能、创新能力和实践能力, 为高校综合创新实验教学提供参考。

参 考 文 献

- [1] 王蔚, 陈琳, 王伟伟, 张建勇, 江和源. 中国茶叶, **2021**, 43 (1), 20.
- [2] Yan, Z. M.; Zhong, Y. Z.; Duan Y. H.; Chen, Q. H.; Li, F. N. *Anim. Nutr.* **2020**, 2 (6), 115.
- [3] da Luz, J. R. D.; López, J. A.; Ferreira, M. P.; de Sousa, R. M.; Silva, S. V. E.; Almeida, M. D.; Araujo-Silva, G. *Processes* **2022**, 11 (1), 76.
- [4] Wan, C. P.; Ouyang, J.; Li, M. X.; Rengasamy, K. R. R.; Liu, Z. H. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2024**, 64, 5719.
- [5] 高婷, 袁芳艳, 刘泽文, 刘威, 周丹娜, 杨克礼, 段正赢, 郭锐, 梁婉, 王宁宁. 动物医学进展, **2022**, 43 (4), 5.
- [6] 周鸿. 中国食物与营养, **2005**, No. 7, 56.
- [7] 黄超, 杨丽娟, 蒋琳, 钊永明, 袁明龙. 有机化学实验. 北京: 科学出版社, 2016: 105.
- [8] 叶艳青, 郭俊明. 基础化学实验I. 杭州: 浙江大学出版社, 2014: 11.
- [9] 徐寿昌. 有机化学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2014.
- [10] 卓泽晟, 曾健, 蔡真珍, 关燕云, 石国宗, 叶丽珠, 林娇芬. 宁德师范学院学报(自然科学版), **2023**, 35 (2), 187.
- [11] 李焯, 彭海全, 张臣逸, 乔心鹏, 刘抗, 黄菊. 安徽化工, **2023**, 49 (3), 71.
- [12] 冯国栋, 宋志光, 郭玉鹏. 大学化学, **2017**, 32 (9), 41.
- [13] 邓祥, 韩伟. 南京工业大学学报(自然科学版), **2020**, 42 (5), 677.
- [14] 李庚. 安徽农学通报, **2016**, 22 (24), 26.