

生物分离

实验技术

◎ 吴疆 童应凯 杨红澎 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

生物分离

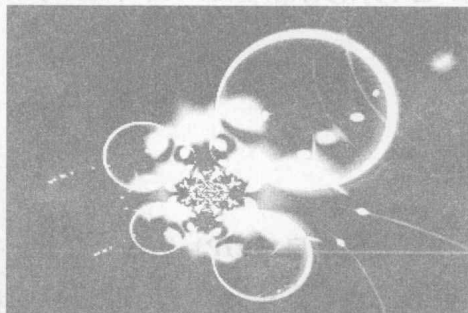
实验技术

◎ 原理 实验 案例 问答 应用

◎ 17316644

SHENGWU FENLI
SHIYAN JISHU

生物分离



实验技术

吴疆 童应凯 杨红澎 主编



化学工业出版社
生物·医药出版社

·北京·

利用生物技术,从植物、动物和微生物的细胞中提取重要的活性成分,已经成为目前生物技术发展的重要方向。本书以实验为单元,按植物、动物、微生物的顺序对生物活性物质分离的实验技术进行了说明,共分五个部分介绍:第一是植物部分,有二十一个实验;第二是动物部分,有十八个实验;第三是微生物部分,有十四四个实验;第四部分是常用分离技术的应用,有七个实验;第五部分是附录。目的是使学生能够通过实际操作,从实践中进一步学习、掌握和运用基本理论。

本书实用性强,重点突出,可供从事天然药物和现代中药研究的技术人员阅读、参考使用;也可供有关科研单位、大中专院校的研究人员和师生阅读、参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物分离实验技术/吴疆,童应凯,杨红澎主编. —北京:
化学工业出版社, 2009. 7

ISBN 978-7-122-05248-3

I. 生… II. ①吴…②童…③杨… III. 生物工程-分
离-实验 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 052304 号

责任编辑: 杨燕玲

文字编辑: 张春娥

责任校对: 蒋 宇

装帧设计: 韩 飞

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

720mm×1000mm 1/16 印张 15¼ 字数 316 千字 2009 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 39.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编	吴 疆	童应凯	杨红澎	
编写人员	吴 疆	童应凯	杨红澎	黄 亮
	韦东胜	张乃楠	杨永涛	

前 言

利用生物技术，从植物、动物和微生物的细胞中提取重要的活性成分，已经成为目前生物技术发展的重要方向。然而，目前还没有一本综合介绍应用生物技术提取生物活性成分的教材。笔者通过教学实践和观察，发现学生往往不能将所学的理论知识运用到实际之中去解决问题，深感编写一本实验指导教材对帮助学生更好地理解 and 运用所学知识的重要性。因此，在汇集了众多材料之后，我们编写了这本实验指导书。目的是使读者能够通过实际操作，从实践中进一步学习、掌握和运用学过的基本理论。

本书共分 5 个部分：第 1 部分是植物部分，有 21 个实验；第 2 部分是动物部分，有 18 个实验；第 3 部分是微生物部分，有 14 个实验；第 4 部分是常用分离技术的应用，有 7 个实验；第 5 部分是附录。

我们希望这本教材能够通过所列举实验，帮助学生巩固和加深对生物化学和微生物学基本理论知识的理解，运用已学过的知识验证一些结论、结果和现象，并可综合运用已学过的理论知识设计实验或进行综合性的实验，以提高学生理论知识的运用能力，训练其实验操作技能以及对各种仪器的使用能力，提高他们的实验数据处理和分析能力。

本书编写过程中，得到了天津农学院生物技术教研室老师的大力配合。其中童应凯老师编写了实验 39 及微生物部分（实验 40 到 53）；吴疆老师编写了植物部分（实验 1 到 20）和实验 21、22、23、24、27、常用分离技术的应用和附录部分；杨红澎老师编写了实验 21、26、28、29、30、31、37、38；黄亮老师编写了实验 25、32、33、34；杨永涛、韦东胜、张乃楠老师编写了实验 35 和 36。

本书虽已经过认真编辑和审定，但限于作者的学识和水平，书中不当甚至错漏之处仍恐难免，望广大学生和同行随时指正。

吴疆 童应凯 杨红澎

2009 年 5 月于天津

目 录

第 1 部分 植物中活性成分的分离提取	1
实验 1 有机溶剂法浸提番茄红素	1
实验 2 萃取法提取大蒜素	3
实验 3 微波法提取茶多酚	6
实验 4 重结晶法制备甘草酸	10
实验 5 DEAE 纤维素 (OH^-) 柱精制枸杞多糖	12
实验 6 乙醇提取苦瓜皂苷	15
实验 7 超声波浸提香菇多糖	17
实验 8 大孔树脂吸附法提取银杏叶黄酮	18
实验 9 粉浆蛋白的提取	21
实验 10 木瓜蛋白酶的提取	23
实验 11 海藻酸钠的提取	28
实验 12 胡萝卜素的提取	34
实验 13 葛根黄酮和葛根淀粉的提取	40
实验 14 葡萄色素的提取	42
实验 15 姜黄色素的提取	45
实验 16 辣椒红色素的提取	48
实验 17 木糖的制备	53
实验 18 甘露醇的提取	57
实验 19 豆磷脂的制备	61
实验 20 高粱红色素的制备	71
实验 21 生物碱盐酸小檗碱的提取	73
第 2 部分 动物中活性成分的分离提取	76
实验 22 表皮生长因子的提取	76
实验 23 促皮质素的提取	79
实验 24 人生长激素的提取	83
实验 25 杀菌肽的制备	85

实验 26	溶菌酶的提取	87
实验 27	肝素的提取	99
实验 28	前列腺素的提取	112
实验 29	辅酶 Q10 的制备	116
实验 30	水蛭素的提取	121
实验 31	降钙素的提取	126
实验 32	促黑色素细胞素的提取	129
实验 33	蚯蚓纤溶酶的制备	132
实验 34	降纤酶的制备	136
实验 35	人尿激肽释放酶的提取	140
实验 36	硫酸软骨素的提取	147
实验 37	EPA、DHA 的制备	153
实验 38	羊毛脂的提取	161
实验 39	催产素的提取	167
第 3 部分	微生物发酵产品的分离提取	171
实验 40	阿维菌素的分离提取	171
实验 41	多杀菌素的生产与分离检测	174
实验 42	辅酶 Q10 的提取及检测	181
实验 43	谷胱甘肽的生产与提取检测	184
实验 44	ϵ -聚赖氨酸的分离提取与测定	187
实验 45	虾青素的微生物制备与提取	191
实验 46	乳酸链球菌素的提取及活性测定	195
实验 47	黄霉素的生产及检测	200
实验 48	纳他霉素的分离提取及测定	205
实验 49	γ -聚谷氨酸的生产及分离纯化	208
实验 50	伊维菌素的检测	211
实验 51	莫能菌素的分离纯化及检测	213
实验 52	泰乐菌素的分离纯化及检测	215
实验 53	井冈霉素的分离纯化及检测	217
第 4 部分	常用分离技术的应用	219
实验 54	青霉素的萃取与萃取率的计算	219
实验 55	双水相萃取分离酿酒酵母中延胡索酸酶	221
实验 56	胰凝乳蛋白酶的制备	223

实验 57	离子交换法提取精氨酸	225
实验 58	薄层色谱法鉴定果汁中的糖	228
实验 59	凝胶色谱法分离纯化蛋白质	229
实验 60	蛋白质的透析	231
第 5 部分	附录	232
参考文献		240

第1部分 植物中活性成分的分离提取

实验1 有机溶剂法浸提番茄红素

番茄红素 (lycopene) 是番茄及番茄制品中的主要类胡萝卜素, 同时也是人体血浆和组织中的主要类胡萝卜素。它是一种天然色素, 而且具有优越的生理功能和保健作用。通过以番茄原浆、市售番茄酱及市售新鲜番茄为原料, 经预处理后, 采用正己烷、石油醚、石油醚-丙酮等有机溶剂浸提, 将番茄红素提取出来。经过对比实验, 确定以番茄原浆为原料的最佳萃取工艺条件, 通过紫外及可见光谱分析确定所提取产品为番茄红素。

番茄红素是类胡萝卜素的一种, 分子式为 $C_{40}H_{56}$ 。番茄红素在自然界中分布较少, 主要存在于番茄、西瓜、红色葡萄柚、木瓜、苦瓜籽、番石榴等中, 其中在番茄中含量最高, 且随成熟度升高而增加, 在成熟番茄果实中含量可达 $3 \sim 14\text{mg}/100\text{g}$, 我国新疆番茄酱中番茄红素含量多达 $40\text{mg}/100\text{g}$ 以上。番茄红素是由 11 个共轭及两个非共轭碳-碳双键组成的直链型碳氢化合物, 它是许多类胡萝卜素生物合成的中间体, 由于番茄红素没有 β -胡萝卜素那样的 β -苎香酮环结构, 不具有维生素 A 原活性, 所以前些年人们对它的研究较少。然而, 最近的研究表明, 番茄红素具有优越的生理功能, 有抗癌、防癌的作用, 并具有活化免疫细胞的功能。

活性氧类物质和自由基是诱发癌症和心血管疾病的重要原因之一。活性氧类物质是由细胞正常新陈代谢以及不同的生活方式和饮食产生的, 它们和细胞内物质反应, 导致细胞内脂类、蛋白质、DNA 等生物大分子损伤。

番茄红素具有高效猝灭单线态氧和清除自由基的作用。单线态氧是具有很强活性的氧自由基, 具有细胞毒性作用, 以细胞膜、线粒体等部位对其最为敏感, 能与细胞中多种生物大分子发生作用, 通过与分子结合造成细胞膜系统的损伤。晶状体中产生的单线态氧可导致白内障。与类胡萝卜素及其他抗氧化剂相比, 番茄红素猝灭单线态氧的活性最强。表 1-1 所列为常见抗氧化剂猝灭单线态氧的速率常数。

表 1-1 常见抗氧化剂猝灭单线态氧的速率常数

抗氧化剂	猝灭单线态氧的速率常数/ $[10^9 \times (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
番茄红素	31
α -胡萝卜素	19
β -胡萝卜素	14
γ -胡萝卜素	25
玉米黄质	10
叶黄素	8
虾青素	24
红木素	14
番红花苷	1.1
胆红素	3.2
胆绿素	2.3
维生素 E	0.3

此外,研究发现,当紫外线照射皮肤时,皮肤中的番茄红素优先被破坏,从而保护皮肤中的组织及细胞避免因氧化而损伤。经过多年大量的免疫学调查和研究,已证明 β -胡萝卜素可有效地预防肺癌和皮肤癌,其防癌、抗癌功能已被公认。关于番茄红素的生理功能的研究,起步较晚。由于番茄红素不是维生素 A 原,以前认为其不具有生理活性。Morris (1989) 等研究发现番茄红素含量低与胰腺癌、膀胱癌的发生相关。Campbell (1991) 等发现肝硬化患者番茄红素的含量较低。同样,Franceschi (1994) 等对三千多名患消化道癌病人进行了为期七年的研究,发现患癌率与番茄的摄取量有关。美国哈佛大学专家对 47000 名医务界的男子经过六年研究证实,常吃番茄的人比不常吃番茄的人,患前列腺癌的概率减少了 45%,研究者推论与番茄中的番茄红素有关。

近年的研究表明,番茄红素与 β -胡萝卜素一样,是防病治病的重要功能因子。而且,番茄红素的许多具体的生理功能还有待进一步研究。人体中番茄红素的含量与胡萝卜素相当,在体内分布很广,特别是在肝脏、肾上腺、睾丸和卵巢中含量较高。番茄红素在这些组织中具体的生理功能如何,还有待于以后进一步研究。

【实验材料】

市售番茄、95%乙醇、二氯甲烷、NaOH。

【主要仪器设备】

752 型紫外-可见分光光度计、电子分析天平 (岛津)、组织破碎机、减压抽滤装置、旋转蒸发仪。

【实验方法】

(1) 番茄的皂化 新鲜番茄洗净、破碎、打浆。分离水分,称取 1kg 番茄浆,加 1L 0.5mol/L 的 NaOH 溶液,在 40℃ 条件下加热搅拌皂化 45min 后,用蒸馏水洗至中性,离心分离出水备用。

(2) 乙醇脱水处理 工业乙醇加入番茄皂化物搅拌均匀,浸泡后离心脱去乙醇

溶液。本实验中采用 25min 作为乙醇脱水处理时间，料液比为 1 : 5，温度为 40℃，反复处理 3 次。

(3) 番茄红素的提取 乙醇处理后的番茄皂化物加入二氯甲烷，振荡恒温避光提取，温度为 30℃，振荡提取 45min。

(4) 番茄红素含量的检测

① 原理。样品经乙醇除去糖及蛋白质等物质后，番茄红素用甲醇抽提、苯洗涤，洗脱液在 487nm 波长处与合成标准色素比色定量。

② 仪器。分光光度计，50mL 容量瓶。

③ 试剂。乙醇（无水），甲醇，苯，标准溶液（用精制苏丹 I 代替番茄红素）。

配制标准溶液具体方法为：准确称取 25mg 苏丹 I 色素，用无水乙醇溶解并定容至 50mL，摇匀，吸取 0.24mL、0.485mL、1.02mL、1.34mL 和 1.70mL，分别移入 50mL 容量瓶中，加水至刻度，摇匀后，各溶液依次为每毫升含有 0.5μg、1.0μg、1.5μg、2.0μg 和 2.5μg 番茄红素的苏丹 I 色素。

④ 操作。标准曲线的绘制为：将上述苏丹 I 标准色素溶液在分光光度计 487nm 波长处，以蒸馏水为空白，测定光密度，并绘制标准曲线。

⑤ 计算

$$\text{番茄红素}(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{20 \times c}{W \times \frac{5}{50} \times 1000} \times 100 = \frac{20 \times c}{W} \quad (1-1)$$

式中 c ——从标准曲线上查得番茄红素的量，μg/mL；

W ——样品质量，g。

⑥ 说明。由于纯番茄红素不易获得，且不稳定，故常用合成色素代替以制作标准曲线。合成色素虽然较稳定，但存放一年以上仍会有轻微的褪色，应以标准番茄红素对照加以校正。

实验 2 萃取法提取大蒜素

大蒜为百合科葱属植物蒜的鳞茎。大蒜中的有效成分有大蒜辣素、大蒜新素及多种烯丙基硫醚化合物，总称为大蒜素或大蒜精油。大蒜营养十分丰富，每 100g 新鲜大蒜鳞茎中含水分 70g、蛋白质 4.4g、脂肪 0.2g、碳水化合物 23g、粗纤维 0.7g、灰分 1.3g、钙 5mg、尼克酸 0.9mg、抗坏血酸 0.3mg、铁 0.4mg、硫胺素 0.24mg、核黄酸 0.03mg 以及人体必需的微量元素硒、锌、锗等。大蒜含有达到其自身 0.4% 重量的蒜氨酸 (alliin)，其化学名称为硫丙烯基半胱氨酸 (S-allyl

cysteine sulfoxide), 这是一种无臭的、不稳定的含硫氨基酸衍生物。当大蒜的细胞结构受到破坏时, 即被切碎或压碎时, 蒜氨酸则很快被蒜酶 (alliinase) 转化成大蒜素 (allicin)。大蒜素发出大蒜特有的气味, 它是非常活泼而不稳定的。在 25℃ 的室温下, 纯大蒜素的化学半衰期大约是 2.4h。这表示在室温 25℃ 下, 一天之后只有 0.1% 的大蒜素剩下。

大蒜具有消炎、杀菌、降低血胆固醇, 预防脑血栓、冠心病等多种效能, 特别是在防治癌症方面有明显的疗效, 这是由于大蒜能从多方面阻断亚硝酸胺的合成。此外, 大蒜也是人们日常生活中喜爱的调味佳品, 能在烹调菜肴、鱼、肉、禽类时去掉腥臭味, 增加香味。但大蒜有特异蒜臭, 食用后嘴里留下强烈的异臭味, 使人不快。其储藏易发芽、霉变造成损失。我国大蒜资源丰富, 品种多样, 质地优良, 出口总量占世界第四位。为充分发挥这一资源优势, 开拓大蒜销路, 增值创汇, 对于开发大蒜深加工方法十分必要。本实验介绍一种易行的无臭大蒜素液提取技术, 它既脱去了大蒜臭味, 又保持了大蒜的有效成分大蒜素和各种氨基酸, 便于储藏、运输和应用。

大蒜的保健作用主要在于它所含有的含硫化合物以及在烹饪与处理过程中形成的硫化丙烯基的多种衍生物。在代谢中, 这些硫化物会形成硫原子, 它们在分子水平上、细胞水平上有很高的生物活性作用。大蒜的硫化丙烯基化合物及其衍生物可以改变含硫酶和辅酶的活性, 保护机体的组织不受自由基与非生理的氧化作用的损害。在不同的浓度剂量下, 大蒜可以促进或抑制细胞分裂与增生。由于上述的生物活性, 大蒜具有以下保健与医疗作用。

① 降低血液中的胆固醇及甘油三酯。大蒜中的硫化物可以抑制合成脂肪酸与胆固醇的酶系统, 特别是抑制含硫的辅酶的作用。

② 降低血小板的凝聚能力, 从而防止血液凝固, 并能降低血管收缩的能力。

③ 调节由花生四烯酸 (arachidonic acid) 转变成类花生酸 (eicosanoid) 的代谢过程, 从而 (大蒜) 能广泛地影响免疫功能、细胞分裂与增生、正常的及非正常的肿瘤组织的生长、炎症反应、神经内分泌功能, 以及血小板与血管的生理功能等。

④ 通过抑制硝酸铵 (nitrosamine) 的形成以及调节多种致癌剂 (polgdrene catcinogens) 的代谢, 而可用作抗癌剂。这一作用的可能机制是大蒜作用于调节酶系以及 DNA 的复制酶和促使 RNA 和蛋白质的合成。

⑤ 消除由非无机化合物 (例如: xenobiotics, 外源化学物) 的毒性作用及由之引起的肝脏的损害。

⑥ 作为肠道中的杀虫剂及杀菌剂。

⑦ 作为防放射损害的防治剂。

⑧ 作为抗过氧化剂。大蒜中所含的硫化丙烯基化合物及其衍生物, 它们的溶解度介于水溶性的维生素 C 与油溶性的维生素 E 之间。所以大蒜补充了这些维生

素抗氧化作用之不足之处。

【实验材料】

实验采用市场上购买的多瓣大蒜，萃取剂无水乙醇为分析纯试剂。

【主要仪器设备】

实验仪器为捣碎机、箱式电阻炉、恒温水浴锅及旋转蒸发仪等。

【实验方法】

(1) 工艺流程 原料大蒜→去皮→组织捣碎机破碎→捣成蒜泥→前期处理→浸提分离→含量测定。

(2) 前期处理 取捣碎的蒜泥 20g，加少许蒸馏水后，分别经不同的 pH 值、放置温度、时间及离子激活剂等条件处理后，用 60mL 无水乙醇萃取，测定萃取液中的大蒜素含量，每项处理 3 次，取其平均值作为最终结果。

(3) 萃取条件 使用体积分数为 95% 的乙醇或无水乙醇为提取剂，浸提大蒜素 40min。

(4) 大蒜素含量检测

① 原理。先加入过量的 BaCl_2 使样品中原有的硫酸根离子全部沉淀除去。加入浓硝酸将蒜氨酸的亚磺酸酯和蒜辣素的硫代亚磺酸酯氧化成硫酸根，再与氯化钡作用生成硫酸钡沉淀，然后用重量法测定，根据硫酸钡测得值换算出样品中蒜辣素的含量。

② 仪器。马福炉，1/10000g 分析天平。

③ 试剂。浓硝酸，0.1% 的甲基橙水溶液，5% 的 BaCl_2 溶液，10% NaOH 溶液，1:1 的 HCl 溶液。

④ 操作。取 15~20mL 样品，置于 50mL 容量瓶中，加入 5% 的 BaCl_2 溶液 10mL，摇动 1~2min，加水至刻度，摇匀，放置片刻，用干滤纸过滤。吸取滤液 20mL，移入 100mL 容量瓶中，加浓 HNO_3 2mL，摇匀，放置 20min，加水至刻度，摇匀，过滤，弃去最初滤液 5~10mL，取滤液 60~80mL，置于 150mL 烧杯中，加 0.1% 的甲基橙指示剂 5 滴，滴加 10% NaOH 溶液至黄色，再用 1:1 的 HCl 液滴至红色，再多加 1mL。置沙浴上浓缩至 50mL，取下放电炉上加热至沸。加 10mL 5% 的 BaCl_2 溶液，搅拌均匀，在 90℃ 水浴上保温 2h。用致密无灰滤纸过滤，用热水洗至无 Cl^- （滤液加 AgNO_3 不浑浊）为止。将沉淀连同滤纸置于已知质量的坩埚内，在低温电炉上烤干并使滤纸炭化，再放入马福炉中于 600℃ 灼烧 30min（至灰分变白），取出，于干燥器内冷却称重。

⑤ 计算

$$\text{蒜辣素(g/100mL)} = \frac{\frac{32.06}{233.29} \times W \times \frac{162.26}{32.06 \times 2}}{\frac{V}{50} \times \frac{80}{20}} \times 100 \quad (2-1)$$

式中 W ——硫酸钡的质量，g；

V——样品量, mL;

32.06——硫(S)相对分子质量;

233.29——硫酸钡相对分子质量;

162.26——蒜辣素相对分子质量。

⑥ 说明。若要测定新鲜大蒜中的蒜辣素, 将蒜去皮后, 用组织捣碎机或研钵捣成浆后, 准确称取 5g, 加浓硝酸 2mL, 用玻棒搅拌压磨至呈黄色, 放 20min, 用水洗入 100mL 容量瓶中, 定容后, 按上述方法进行操作。

实验 3 微波法提取茶多酚

茶多酚(tea-polyphenol, TP)又名茶单宁、儿茶酸, 属多酚类物质, 是一种新型的天然抗氧化剂, 是从茶叶中提取的多羟基酚类衍生物混合物, 占茶叶干重的 13%~30%、鲜叶 2%~5%。茶多酚以儿茶素为主体成分, 占总酚含量的 60%~80%; 主要由表儿茶素(EC)、没食子儿茶素(GC)、表没食子儿茶素(EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)组成。自 20 世纪 60 年代初发现茶多酚具有抗氧化活性激素后, 茶多酚的提取、分离、检测及应用就引起了国内外广大学者的关注。经研究表明它是一种高效、天然安全的抗氧化剂。目前它在油脂、食品、医药、化妆品、保健品等诸多方面已有广泛应用, 并被专家誉为 21 世纪将对人类健康产生巨大影响的化合物。1991 年茶多酚被我国食品添加剂标准化技术委员会正式批准为食品抗氧化剂和保鲜剂。我国是茶叶生产大国, 从茶叶中有效提取茶多酚, 并研发成保健食品、药品, 不仅能增强人类身体健康, 而且能创造出良好的社会效益。此外它还具有清除自由基、防癌治癌、抗疲劳、抗辐射等功能。

茶多酚中的主体成分儿茶素的含量因地理位置、气候、所属种类和采摘期不同而不同。地理位置北移, 纬度升高, 含量下降, 南方温暖地区, 累积时间长, 含量就多。在所属种类中, 大叶种中 ECG、EC 的含量比小叶中的含量要高, 而 EGC、EGCG 却相反。儿茶素的含量高低与鲜叶原料的老嫩度有密切的关系, 一般呈嫩高老低趋势, 其多酚中儿茶素的成分随着叶子的老化有所变化(ECG、EGCG 含量减少, EGC 含量有增高趋势)。据资料显示, 老叶和嫩叶中儿茶素的含量相差一倍之多; 但也有资料报道, 茶树老叶与新叶相比儿茶素总含量仅降低 5.07mg/g, 茶叶采摘期一般呈春茶低于夏茶而高于秋茶的趋势, 即三四月份较低(头茶采摘期), 7 月份(二茶采摘期)含量最高。日本滋贺县茶业指导所报道, 在各季茶叶中以春茶的儿茶素含量最高, 提出二茶采摘时间(初夏)以二茶期开始后 14 天左右

右最适宜,此时鲜叶儿茶素含量约为16%,秋茶在10月中旬采摘,此时儿茶素含量在10%左右。EGCG在二茶期含量最高,与陆锦时所做的报道中提出的EGCG的仲夏期反应最为激烈相吻合,所以提取茶多酚用茶叶一般采用鲜叶(两叶一芽),以二茶采摘期为宜。

作为提取茶多酚的茶叶,因加工、杀青等过程会影响茶多酚的提取效果。有资料报道,在10℃以下才能较好地抑制茶叶褐变(氧化或形成高聚合物),在-20℃的条件中冷冻,几乎能完全防止茶叶变质;其次,茶叶含水量在3%可防止茶叶发生化学变化;再者,茶叶受光线影响较大,受光后能免使一些辛烯醇、戊醇等未知成分增加。所以,提取时应采用新鲜茶叶作为原料,经冷冻干燥后粉碎,过筛备用。

茶多酚的生物学功能如下所述。

① 消除自由基。茶多酚是一类氧化还原电位很低的还原剂,具有供氢能力, H^+ 与自由基结合,使之还原为惰性化合物或较稳定的自由基,从而清除机体内过多的有害自由基。沈生荣等(1992)研究表明,TP复合体及L-EGCG对负二价氧离子的清除能力强于维生素E和维生素C,且随着浓度增加而增强(在一定浓度范围内),至 $6 \times 10^{-3} \text{ mol/mL}$ 时清除率达到最高值($>97\%$);对于Fenton反应产生的 $\cdot OH$,在最适浓度范围(0.043~0.100mg/mL)内清除率可达99%。贾之慎等(1993)认为,TP对负二价氧离子有较强的清除作用,对 $\cdot OH$ 的清除作用较弱,在水溶液中TP对负二价氧离子的清除作用比维生素E、维生素C强。但是,TP只在一定浓度范围内对活性大的自由基有清除作用,超出一定浓度后,清除率下降,助氧化作用逐渐增大,甚至超出清除作用。沈生荣等(1992)研究表明,TP在碱性溶液中,受空气氧的作用可以产生自由基;pH 10.1时产生负二价氧离子,pH 12.0时L-EGCG产生连苯三酚类半醌阴离子自由基;高浓度的TP和L-EGCG在负二价氧离子的诱导下,能够产生自由基,而发生助氧化作用。

② 抗氧化。茶多酚具有很强的抗氧化作用。梁燕等(1999)从化学、仿生物、细胞3个层次,以及水溶、脂溶两种体系研究了脂溶性茶多酚(LTP)的抗氧化特性,并与维生素E、绿茶多酚(GTP)进行了比较,结果表明,对水溶体系的 $\cdot OH$ 以及巨噬细胞呼吸暴发产生的负二价氧离子的清除效果为 $GTP > LTP > \text{维生素E}$;对大分子稳定的1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基,LTP与GTP效果接近且均优于维生素E;在膜体系中,GTP对亚铁离子诱导的脂质过氧化的抑制作用优于LTP和维生素E。秦春圃(1994)认为,TP的抗氧化能力和效果相当于人工合成抗氧化剂2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)的3~6倍,且有较高的安全性。TP类物质的抗氧化能力与其化学结构有关,如 β -环上的羟基愈多,其抗氧化能力愈强,且对其空间位阻也有一定的影响。张红雨等(1998)比较了L-EGCG、L-EGC、L-ECG和L-EC的抗氧化活性,结果表明,按等摩尔浓度的抗氧化活性顺序是 $L-EGCG > L-ECG > L-EGC > L-EC$,按等重量的抗氧化活性

顺序是 L-EGC> L-EC>L-ECG>L-EGCG。TP 的抗氧化功能在饲料加工业也得到了应用。丁晓菲等 (1998) 试验表明, 全价料保质 1 个月内, 用 TP 母液 500×10^{-6} 和抗氧喹 120×10^{-6} 均可, 但 TP 成本相对便宜 1.9 元/t; 保质 1 个月以上, 应用 TP 母液 1000×10^{-6} , 成本虽相对提高 1.6 元/t, 但保质期显著延长, 抗氧化效果也好, 尤其在炎夏。陈宗懋 (1998) 发现, TP 可以防止胡萝卜褪色, 保护了胡萝卜素。另外, 有研究表明 TP 能再生体内的 α -维生素 E、维生素 C、GSH、SOD 等高效抗氧化剂, 从而保护和修复抗氧化系统。

③ 参与免疫调节。茶多酚可以提高机体的免疫力。詹勇等 (1992) 用 0.25% TP 添加到饲料中喂养 14d 龄健康海佩科肉仔鸡, 发现 TP 对自然感染法氏囊病鸡有明显提高 ($P<0.05$) 血液中的红细胞 C3b 受体和免疫复合物的含量及保护脾脏正常的免疫功能, 也对母鸡法氏囊的重量有不同的影响。TP 也使荷瘤小鼠的免疫器官胸腺和脾脏的相对重量和细胞数增加, 表明其促进免疫力低下的荷瘤小鼠的免疫功能。

④ 影响脂类代谢。血脂一般包括血液中的胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG)。胆固醇是一个总称, 它包括低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 和高密度脂蛋白 (HDL) 3 类。当血清 LDL 和 VLDL 浓度高时, 动脉壁内脂质, 特别是胆固醇酯沉积增多。HDL 正好相反, 它参与 TC 的逆向运转, 有效摄取外周多余的 TC, 抑制细胞对 LDL 的摄取, 在 LCAT (卵磷脂胆固醇酰基转移酶) 的作用下转运至肝脏代谢, 从而减少 TC 在血管壁的沉积。曹明富等 (2002) 研究表明, TP 明显降低高脂血症大鼠血清 TC 和 TG 含量, 提高 HDL 值。刘波静 (2000) 试验结果与此一致, 且 200mg/kg 处理组效果最明显。另外, TP 对大鼠肝脏、心脏的脂质过氧化也具有明显的抑制作用。

茶叶能够保存较长时间而不变质, 这是其他的树叶、菜叶、花草所达不到的。在食品工业中, 茶叶的许多应用都是因为茶叶中含有茶多酚。茶多酚掺入食品或饮料中, 能够延长储存期, 防止食品褪色, 提高纤维素稳定性, 有效保护食品和饮料中各种营养成分。所以, 茶多酚可用于食品保鲜防腐, 无毒副作用, 食用安全。在食品工业中其主要用途介绍如下。

① 用于糕点及乳制品。对高脂肪糕点及乳制品, 如月饼、饼干、蛋糕、方便面、奶粉、奶酪、牛奶等, 加入茶多酚不仅可保持其原有的风味, 防腐败, 延长保鲜期, 防止食品褪色, 抑制和杀灭细菌, 提高食品卫生标准, 延长食品的销售寿命, 还可使甜味“酸尾”消失, 味感甘爽。

② 用于饮料生产。茶多酚不仅可配制果味茶、柠檬茶等饮料, 而且对食品中的色素和维生素类具有保护作用, 可防止食品褪色, 提高稳定性, 据称其效果较维生素 C 高出 20 倍。茶多酚应用到果汁饮料的加工过程中, 添加 0.02% 茶多酚能抑制蜜柑汁浓缩液异臭的产生, 添加茶多酚 0.005%~0.01% 于果汁、豆奶、汽水等饮料中, 能抑制维生素 A、维生素 B₁ 和 β -胡萝卜素的降解破坏, 保证果汁饮料的