

# 响应面法制备茶黄素-铝络合物的研究

何焱,何霏,张洁婷,谢婷婷,张枫枫,郑德勇\*

福建农林大学材料工程学院 茶学福建省高校重点实验室,福州 350108

**摘要:**以茶黄素样品和氯化铝为原料,在单因素试验基础上进行响应面法优化茶黄素-铝(TFs-Al)络合物制备工艺,确定TFs-Al物质的量比、pH、反应时间及反应温度对 $Al^{3+}$ 络合TFs的影响,并对TFs-Al络合物进行热稳定分析及红外光谱结构表征。结果表明:影响 $Al^{3+}$ 络合TFs的因素依次为pH、TFs-Al物质的量比、反应温度、反应时间;优化后工艺为TFs-Al物质的量比0.8、反应温度 $41^{\circ}C$ 、反应时间51 min、pH 4.3,此工艺条件下结合率达到94.52%,实际值在模型响应值的95%预测区间(91.98%,99.20%)范围内;红外光谱分析表明 $Al^{3+}$ 与TFs形成了稳定的TFs-Al络合物,且热稳定性优于茶黄素(TFs)。

**关键词:**TFs-Al络合物;响应面法;红外光谱;液相色谱;热重

中图分类号:TS101

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0100-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.016

## Study on the preparation of theaflavin-aluminum complex by response surface methodology

HE Yan, HE Fei, ZHANG Jie-ting, XIE Ting-ting, ZHANG Feng-feng, ZHENG De-yong

College of Material Engineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Key Laboratory of Tea Science in Universities in Fujian Province, Fuzhou 350108, China

**Abstract:** Theaflavins-Aluminum complex was synthesized from theaflavins and  $AlCl_3$ . The single-factor and response surface experiments was used to optimization of preparation conditions for Theaflavins-Aluminum complex, the factor parameter including molar ratio of TFs to Al, pH value, reaction time and reaction temperature. In addition, the structure and properties were characterized by infrared spectrometry (IR) and thermogravimetric analysis (TG). The results showed that the main factors affecting  $Al^{3+}$  complexation TP are pH value, molar ratio, reaction temperature and reaction time. The optimal process were determined as 0.8, 4.3, 51 min and  $41^{\circ}C$  for TFs-Al molar ratio, pH value, reaction time and reaction temperature, respectively. Under these conditions, the combination rate was 94.52%. The actual value was within the range of 95% prediction range of the model response [91.98%, 99.20%]. Infrared spectral analysis showed that  $Al^{3+}$  and TFs formed stable TFs-Al complex, and the thermal stability was better than that of theaflavins (TFs).

**Key words:** TFs-Al complex; response surface methodology; infrared spectrometry; liquid chromatography; thermogravimetric analysis

茶黄素(theaflavins, TFs)是茶叶的重要活性成分,由儿茶素经氧化、聚合形成的一类含多个羟基或酚羟基的苯并卓酚酮类化合物<sup>[1]</sup>,在红茶中的含量为0.3%~1.5%,主要包括茶黄素(theaflavin, TF)、茶黄素-3-单没食子酸酯(theaflavin-3-gallate, TF-3-G)、茶黄素-3'-单没食子酸酯(theaflavin-3'-gallate,

TF-3'-G)和茶黄素双没食子酸酯(theaflavin-3-3'-gallate, TFDG)等,可溶于乙酸乙酯,其在抗氧化<sup>[2,3]</sup>、预防心脑血管疾病<sup>[4]</sup>、抗菌<sup>[5]</sup>、抗病毒<sup>[6-8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>等方面均有一定的功效,在保健、食品和医药具有很大的应用价值。

现已有将茶多酚用作天然染料的研究,天然染料常以金属盐为媒染剂起固色作用,此多因金属离子在溶液中可与天然染料分子通过配位作用形成稳定的络合体系,这种作用还常能改变天然染料的颜色。儿茶素经氧化形成阴离子再与锌离子形成稳定

收稿日期:2019-05-07 接受日期:2019-06-04

基金项目:福建省“2011协同创新中心”中国乌龙茶产业协同创新中心专项(闽教科[2015]75号)

\*通信作者 E-mail: ffczdy@163.com

1:2络合物<sup>[11]</sup>,而儿茶素的酚羟基直接与硒离子形成配位络合物<sup>[12]</sup>,茶多酚与铝离子则主要由表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、通过与其没食子酰基上的酚羟基络合形成了EGCG-Al配合物<sup>[13]</sup>,茶黄素先经单宁酶催化水解脱去没食子酰基、再由茶黄素分子中苯并环庚三烯酚酮环上羟基与铝离子配合形成络合物<sup>[14]</sup>。有学者通过制备合成茶多酚-锌络合物用于多种场合,较单一茶多酚的性能有显著提高<sup>[15]</sup>。茶叶中铝含量较传统浸泡的茶汤中铝含量高很多,因为铝离子与多酚类物质的作用而降低茶汤中金属离子浓度<sup>[16]</sup>。

为进一步研究茶黄素与金属离子的络合作用,制备了茶黄素与铝离子的络合物,并通过单因素试验、结合响应面法考察铝盐添加量、pH、时间和温度对铝离子络合茶黄素的影响,优化制备的工艺条件。研究了茶黄素-铝络合物的红外光谱和热分析特征,为茶黄素在染色领域的应用提供理论基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

茶黄素(食品级),黄山华绿园生物科技有限公司;TF、TF-3-G、TF-3'-G和TFDG(均为标准品),上海融禾医药科技发展有限公司;三氯化铝、碳酸氢钠、乙腈、乙酸乙酯、盐酸(均为分析纯),国药集团

化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器

SQP型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);HH-4型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);Biofuge Primo R型高速冷冻离心机(德国赛默飞世科技公司);Vertex 70红外光谱分析仪(布鲁克光谱仪器公司);G1322A-B型液相色谱(美国安捷伦科技公司);Eutech pH 700酸度计(上海默西科学仪器有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 TFs-Al络合制备工艺

在茶黄素水溶液加入适量氯化铝溶液,充分搅拌,用碳酸氢钠溶液调节pH,使茶黄素与铝离子发生络合作用产生沉淀,在7 000 rpm离心15 min,经去离子水清洗除去氯离子,50℃下干燥至恒重,得TFs-Al络合物。

### 2.2 TFs-Al络合反应工艺优化

以结合率为指标,考察TFs-Al物质的量比(茶黄素溶液中TFs与氯化铝物质的量比)、pH、反应时间、反应温度对TFs-Al结合率的影响。在单因素试验基础上,以结合率为响应值,采用软件Design-Expert 8.0.6设计响应面法优化TFs-Al络合工艺参数(表1)。

表1 响应面实验因素与水平

Table 1 Factors and levels used in response surface experiment

水平 Level	A 物质的量比 Molar ratio	B 时间 Time (min)	C 温度 Temperature(℃)	D pH	因素 Factor
-1	0.8	35	30	3	
0	1	40	60	4	
1	1.2	45	90	5	

### 2.3 液相色谱法测定茶黄素中各成分的含量

用50%甲醇配制茶黄素混合标准溶液,TF、TF-3-G、TF-3'-G和TFDG的浓度分别为0.26、0.265、0.255和0.395 mg/mL。采用Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱(5 μm,4.6×150 mm),流动相A为2%乙酸溶液、B为乙腈+乙酸乙酯( $V_{乙腈}:V_{乙酸乙酯}=21:4$ );等梯度洗脱:20%流动相A,80%流动相B,流动相流速1 mL/min,洗脱时间为40 min;检测波长280 nm,进样量10 μL。

### 2.4 TFs-Al络合物反应效率测定

$$\text{结合率} = (1 - C_2 V_2 / C_1 V_1) \times 100\%$$

式中: $V_1$ 为反应前TFs溶液的体积,mL; $V_2$ 为反应后上清液体积,mL; $C_1$ 为反应前溶液中TFs含量,mg/mL; $C_2$ 为反应后上清液中TFs含量,mg/mL。

### 2.5 TFs-Al络合物红外光谱分析

采用ATR法,在600~4 000  $\text{cm}^{-1}$ 范围内测定TFs-Al络合物及茶黄素的红外光谱图。

## 2.6 TFs-Al 络合物热稳定性分析

取 TFs-Al 络合物及茶黄素适量分别放入氧化铝坩埚,同步热分析仪分析条件为: $N_2$  气氛(流速为 20 mL/min),升温速率为 5  $^{\circ}C$ /min,温度范围为 50 ~ 800  $^{\circ}C$ ,每个样品重复实验 3 次。

## 3 结果与分析

### 3.1 TFs-Al 络合单因素工艺试验分析

#### 3.1.1 TFs-Al 物质的量比对络合反应的影响

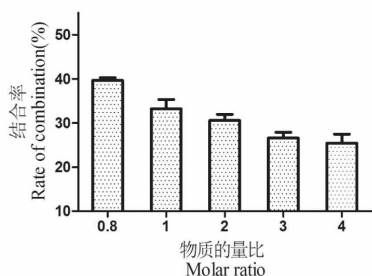


图 2 TFs-Al 物质的量比对结合率的影响

Fig. 2 The effect of TFs-Al molar ratio on the binding rate

在溶液 pH2.5、反应时间 30 min、反应温度 30  $^{\circ}C$  条件下,通过改变 TFs-Al 物质的量比依次制备 TFs-Al 络合物,分别检测茶黄素原液、与金属离子反应离心后上清液中茶黄素含量,计算茶黄素与铝离子的结合率,考察 TFs-Al 物质的量比单因素对结合率的影响。

由图 2 可知,随 TFs-Al 物质的量比减小、茶黄素浓度减少,茶黄素结合率随之增加,但若继续减少茶黄素浓度,金属离子过量后并不能提高络合物的得率。以 TFs-Al 物质的量比 0.8 为宜。

#### 3.1.2 反应温度对结合率的影响

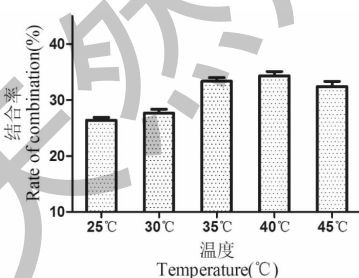


图 3 反应温度对结合率的影响

Fig. 3 The effect of reaction temperature on binding rate

在 TFs-Al 物质的量比 1,溶液 pH2.5、反应时间 30 min 条件下,通过改变温度依次制备 TFs-Al 络合物,分别检测茶黄素原液、与金属离子反应离心后上清液中茶黄素含量,计算茶黄素与铝离子的结合率,

考察温度单因素对结合率的影响。

由图 3 可知,随着反应温度的升高,结合率先增大后减小,说明适度提升反应温度对 TFs-Al 的络合具有促进作用,但反应温度过高会影响络合物的稳定性从而使得结合率下降。沉淀温度以 40  $^{\circ}C$  为宜。

#### 3.1.3 反应时间对结合率的影响

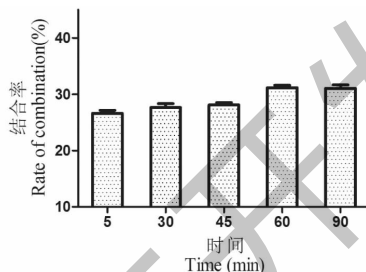


图 4 反应时间对结合率的影响

Fig. 4 The effect of reaction time on binding rate

在 TFs-Al 物质的量比 1,溶液 pH2.5、反应温度 30  $^{\circ}C$  条件下,通过改变反应时间依次制备 TFs-Al 络合物,分别检测茶黄素原液、与金属离子反应离心后上清液中茶黄素含量,计算茶黄素与铝离子的结合率,考察时间单因素对结合率的影响。

由图 4 可知,随着时间的增加,反应的结合率逐渐上升,直到趋于稳定,反应时间取 60 min 为宜。

#### 3.1.4 反应 pH 对结合率的影响

在 TFs-Al 物质的量比 1,反应温度 30  $^{\circ}C$ ,反应时间 30 min 条件下,通过改变体系 pH 依次制备 TFs-Al 络合物,分别检测茶黄素原液、与金属离子反应离心后上清液中茶黄素含量,计算茶黄素与铝离子的结合率,考察 pH 单因素对结合率的影响。

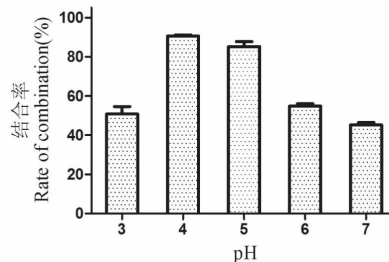


图 5 pH 对结合率的影响

Fig. 5 The effect of pH value on binding rate

由图 5 可知,随着 pH 的增大,结合率呈先上升后下降趋势,这是由于当茶黄素分子与  $Al^{3+}$  络合时会释放出  $H^+$ ,若不控制 pH,溶液的 pH 将下降到 2.5 左右。由于一般较高 pH 有利络合,以 pH 为 4

较宜。

### 3.2 TFs-Al 络合响应面试验分析

表 4 响应面试验设计与结果

Table 4 Response surface experiment design and results

试验号 No.	A 物质的量比 Molar ratio	B 反应时间 Time (min)	C 反应温度 Temperature (°C)	D pH	结合率 Rate of combination (%)		误差 Residual (%)
					实际值 Actual value	预测值 Predicted value	
1	1.2	60	35	4	79.64	78.49	1.15
2	1.2	90	40	4	83.92	85.78	-1.86
3	1.2	60	40	5	65.83	64.81	1.02
4	1.2	30	40	4	84.06	84.16	-0.1
5	0.8	60	40	5	76.45	78.52	-2.06
6	1	30	35	4	80.9	80.35	0.55
7	1	90	35	4	85.93	83.27	2.66
8	0.8	60	40	3	49.28	48.47	0.81
9	1	90	40	3	48.01	49.8	-1.79
10	1	60	40	4	93.18	90.89	2.29
11	1	60	35	3	36.93	40.98	-4.05
12	1.2	60	45	4	79.43	83.52	-4.09
13	0.8	30	40	4	94.01	92.08	1.92
14	1	90	45	4	88.05	86.77	1.28
15	0.8	90	40	4	92.11	91.94	0.17
16	1	60	40	4	91.13	90.89	0.24
17	0.8	60	35	4	87.08	84.88	2.2
18	1	60	45	3	50.46	47.9	2.56
19	1	90	40	5	70.67	71.14	-0.46
20	1	60	40	4	88.81	90.89	-2.08
21	1	60	45	5	74.15	70.04	4.11
22	1	60	40	4	89.81	90.89	-1.08
23	1.2	60	40	3	51.98	48.09	3.89
24	0.8	60	45	4	88.17	91.2	-3.04
25	1	30	45	4	87.37	88.21	-0.83
26	1	30	40	3	45.58	47.01	-1.43
27	1	30	40	5	72.34	72.44	-0.1
28	1	60	40	4	91.52	90.89	0.63
29	1	60	35	5	63.1	65.61	-2.5

在单因素试验基础上,确定 TFs-Al 物质的量比、反应时间、反应温度、pH 四因素三水平,以结合率为响应值,通过拟合曲线,建立数学模型,利用三维立体图形,观察响应面,采用响应面法优化络合工艺条件(表 4)。

#### 3.2.1 回归模型的拟合及方差分析

响应面试验设计是以 TFs-Al 物质的量比、反应时间、反应温度、pH 为自变量,以结合率  $Y$  为响应值。采用软件 Design-Expert 8.0.6 对数据进行分析,得到结合率的预测值  $Y$  与编码值自变量 A、B、

$$C、D \text{ 的二次多项回归方程的关系式: } Y = 90.89 - 3.33AD - 1.09BC - 1.02BD - 0.62CD - 1.26A^2 - 1.14B^2 - 3.52A + 0.37B + 2.84C + 11.69D + 0.44AB - 0.32AC - 5.10C^2 - 29.66D^2 \quad (1)$$

表5 回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value prob > <i>F</i>	显著性 Significance
Model	7 877.784	14	562.698 9	59.303 4	< 0.000 1	**
A- Molar ratio	148.605 7	1	148.605 7	15.661 7	0.001 4	**
B- Time	1.640 686	1	1.640 686	0.172 914	0.683 8	
C- Temperature	96.710 41	1	96.710 41	10.192 41	0.006 5	**
D-pH value	1 640.542	1	1 640.542	172.898 4	< 0.000 1	**
AB	0.782 661	1	0.782 661	0.082 485	0.778 2	
AC	0.419 059	1	0.419 059	0.044 165	0.836 6	
AD	44.433 13	1	44.433 13	4.682 852	0.048 2	*
BC	4.724 009	1	4.724 009	0.497 868	0.492 0	
BD	4.190 224	1	4.190 224	0.441 612	0.517 1	
CD	1.543 299	1	1.543 299	0.162 65	0.692 8	
A <sup>2</sup>	10.350 49	1	10.350 49	1.090 848	0.314 0	
B <sup>2</sup>	8.375 649	1	8.375 649	0.882 718	0.363 4	
C <sup>2</sup>	168.981 8	1	168.981 8	17.809 16	0.000 9	**
D <sup>2</sup>	5 704.801	1	5 704.801	601.234 7	< 0.000 1	**
Residual	132.838 7	14	9.488 476			
Lack of Fit	121.686 9	10	12.168 69	4.364 746	0.084 2	
Pure Error	11.151 79	4	2.787 948			

注: \*\* 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), \* . 差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: \*\* The difference was very significant ( $P < 0.01$ ); \* The difference was significant ( $P < 0.05$ ).

由表5可知,回归模型高度显著 ( $P < 0.001$ ),失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ),即在研究的整个回归区域内模型拟合较好,反应时间因素对结合率影响不显著。 $R^2 = 0.983 4$ ,说明模型的相关性很好。 $R_{Adj}^2 = 0.966 8$ ,说明模型可以解释96.68%的试验数据变异性。可见,所建立的回归模型与实际实验结果较吻合,可用此模型对TFs-Al结合率进行分析和预测。各因素对结合率影响的主次顺序依次为pH(D) > TFs-Al物质的量比(A) > 反应温度(C) > 反应时间(B)。

### 3.2.2 自变量交互作用对TFs-Al结合率的影响

利用Design-Expert软件绘制响应面图及对应的等高线图,更直观地反映自变量交互作用对结合率的影响<sup>[17]</sup>。由于反应时间因素对结合率影响不显著,因此取TFs-Al物质的量比(A)与pH(D)、反应温度(C)与pH(D)两个交互作用为例,研究交互作用对结合率的影响(图6,7)。

因子的交互作用效应可以从响应曲面的坡度变化及等高线的形状得到反映<sup>[18]</sup>。由图6可知,等高线pH变化较密集,说明pH对结合率的影响大于物质的量比的影响,同时由响应面的坡度也可知沿着pH轴的坡度更陡峭。由图7可知,等高线沿反应温度轴变化较松散,响应面沿温度轴较平缓,说明反应温度对结合率的影响小于pH的影响。

对优化后的二次回归模型进行响应面分析,得到最大结合率对应的条件为TFs-Al物质的量比0.8、温度41.64℃、时间50.94min、pH4.25,预测结合率可达95.59%。考虑实际实验操作的可行性,将条件调整为物质的量比0.8、温度41℃、时间51min、pH4.3。

### 3.2.3 回归模型验证结果

为了检验响应面模型所得结果的可靠性,采用上述优化条件进行3次重复实验,结合率的实测值为94.52%,该值落在响应值的95%预测区间

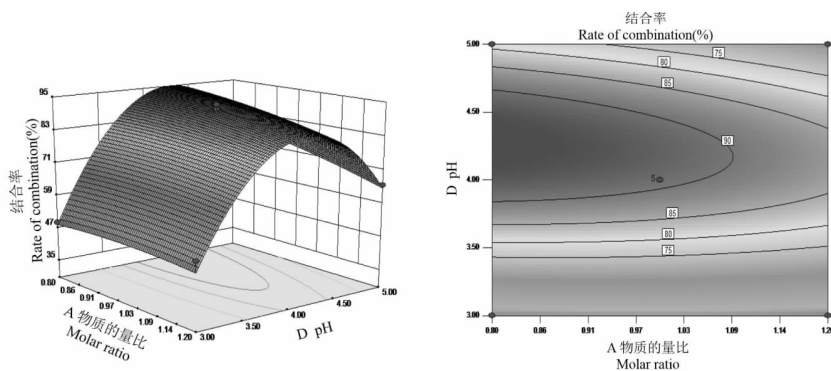


图 6 TFs-Al 物质的量比与 pH 交互作用对结合率的影响

Fig. 6 The effect of interaction between TFs-Al molar ratio and pH value on binding rate

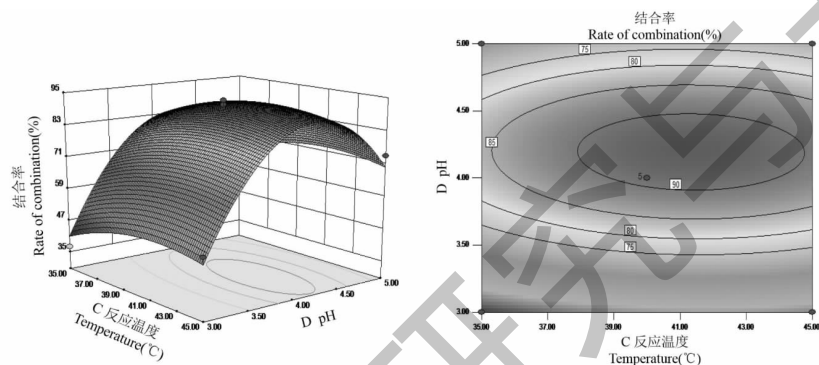


图 7 反应温度与 pH 交互作用对结合率的影响

Fig. 7 The effect of interaction between reaction temperature and pH value on binding rate

(91.982 3% ,99.198 8%) 范围内,表明建立的模型对 TFs-Al 结合效率具有良好的预测性。

### 3.3 TFs-Al 络合物红外光谱结构表征及分析

由图 8 可知,TFs 在  $3231\text{ cm}^{-1}$  处为 -OH 特征吸收峰,与 Al 配合后羟基吸收峰明显红移为  $3223\text{ cm}^{-1}$ ,游离的 -OH 吸收峰红移了  $8\text{ cm}^{-1}$ 。 $1690\text{ cm}^{-1}$  处是 C=O 吸收峰,从配合物的图中得知此峰的强度明显下降,说明  $\text{Al}^{3+}$  与 TFs 中的 C=O 基团有配位作用<sup>[14]</sup>,TFs 图中  $1516$ 、 $1450\text{ cm}^{-1}$  两个吸收峰为苯环 C=C 吸收峰,配合物中的 C=C 吸收峰分别为  $1502$ 、 $1464\text{ cm}^{-1}$ ,因受  $\text{Al}^{3+}$  络合的影响, $\pi$  电子往环外转移,故吸收峰发生蓝移, $1364\text{ cm}^{-1}$  可指认为  $\text{Al}^{3+}$  及亚甲基的倍频吸收峰<sup>[12]</sup>。 $1031\text{ cm}^{-1}$  处为芳基烷基醚 C-O-C 吸收峰,在配合物中此峰变弱,这是由于与  $\text{Al}^{3+}$  配位使苯环  $\pi$  电子向环外转移<sup>[19]</sup>。由此可以说明 TFs 与 Al 发生了络合,形成了稳定的络合物。

### 3.4 TFs-Al 络合物热稳定性分析

由图 9 可知,两种样品的质量在室温  $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$

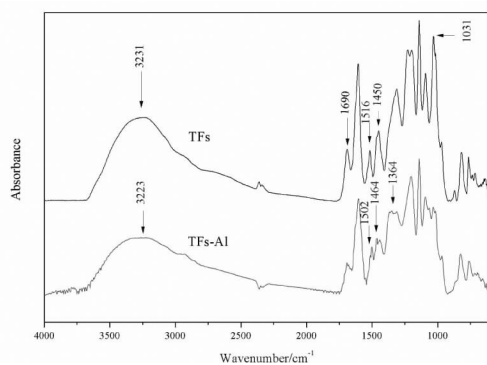


图 8 TFs 与 TFs-Al 的红外光谱图

Fig. 8 Infrared spectra of TFs and TFs-Al

有少量损失,这是由于试样中的游离水去除引起的。由 TFs-Al 曲线可知,在  $100 \sim 247.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,样品的质量有一定的损失,可能是样品中羟基被分解,随着温度继续上升,样品逐渐分解,最后残留的是铝的氧化物。由 TFs 曲线可知, $100 \sim 224.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,质量损失较小,可能是因为分子间的氢键在此温度下被破坏,在  $224.7 \sim 245.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,大量的羟基被分解,继而随着温

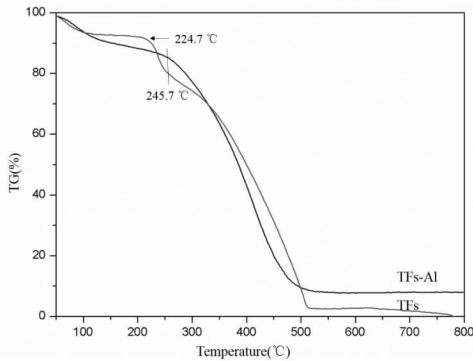


图9 TFs与TFs-Al的热重分析图

Fig. 9 Thermogravimetric analysis of TFs and TFs-Al

度升高,样品彻底被分解。由于TFs分子中有部分羟基与铝络合,导致分子结构中总羟基数较少,在245.7℃时,TFs-Al的失重率低于TFs,总体来看,TFs-Al络合物的热稳定性较茶黄素有一定的提升。

#### 4 结论

通过单因素试验和响应面分析优化TFs-Al络合物制备工艺,结果表明:影响 $Al^{3+}$ 络合TP的主要因素依次为pH、TFs-Al物质的量比、反应温度、反应时间;优化工艺为TFs-Al物质的量比0.8、反应温度41℃、反应时间51 min、pH4.3,此工艺条件下结合率达到94.52%,在模型预测范围内,证明了二次回归模型在实验预测范围内有很好的预测性;此外,红外光谱分析表明 $Al^{3+}$ 与TFs形成了稳定的TFs-Al络合物,且热稳定性优于茶黄素(TFs)。

#### 参考文献

- 1 He H. Research progress on theaflavins: efficacy, formation, and preparation [J]. *Food & Nut Res*, 2017, 61: 1344521-1344529.
- 2 Wang Z, Luo H, Xia H. Theaflavins attenuate ethanol-induced oxidative stress and cell apoptosis in gastric mucosa epithelial cells via downregulation of the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18: 3791-3799.
- 3 Fatima M, Rizvi SI. Anti oxidative effect of black tea theaflavin on erythrocytes subjected to oxidative stress [J]. *National Acad Sci Lett*, 2015, 38(1): 25-28.
- 4 Lyu H, Hua T, Yu J H, et al. Effect of theaflavins on Ox-LDL-induced adhesion of monocyte endothelial cells [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2005, 28: 304-306.
- 5 Miyamoto T, Zhang X, Ueyama Y, et al. Development of novel monoclonal antibodies directed against catechins for investigation of antibacterial mechanism of catechins [J]. *J Microbi-*

- ol Methods, 2017, 137: 6-13.
- 6 Jiang HY, Ma YX, Zeng WZ, et al. Effects of theaflavin, thearubigins and theabrownine on intestinal flora in rats fed with high-fat diet [J]. *Sci Tech Food Ind (食品工业科技)*, 2018, 39: 274-279 + 351.
- 7 Wang C, Li Y. Research progress on property and application of theaflavins [J]. *African J Biotechnol*, 2016, 5: 213-218.
- 8 Wu Y, Kuraji R, Taya Y, et al. Effects of theaflavins on tissue inflammation and bone resorption on experimental periodontitis in rats [J]. *J Period Res*, 2018, 53: 1009-1019.
- 9 Davies MJ, Judd JT, Baer DJ, et al. Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults [J]. *J Nutrit*, 2003, 133: 3298-3302.
- 10 Yamaoka Y, Ohguchi K, Itoh T, et al. Effects of theaflavins on melanin biosynthesis in mouse B16 melanoma cells [J]. *J Agric Chem Soc Japan*, 2009, 73: 1429-1431.
- 11 Bodini ME, Del Valle MA, Tapia R, et al. Zinc catechin complexes in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide radical anion [J]. *Polyhedron*, 2001, 20: 1005-1009.
- 12 Zhou WF. Syntheses and characterizations of tea-polyphenols/selenium complexes [J]. *Fine Chem (精细化工)*, 2007, 24: 248-251.
- 13 Liu LN, Yan ZB. Study on the formation of complexes of tea polyphenols with aluminum by  $^{27}Al$  NMR [J]. *J Mol Sci (分析科学学报)*, 2006, 22: 631-635.
- 14 Ócoinceanainn M, Astill C, Schumm S. Potentiometric, FTIR and NMR studies of the complexation of metals with theaflavin [J]. *Dalton Transactions*, 2003, 5: 801.
- 15 Wang LL, Liu XL, Shi XK, et al. Preparation of tea polyphenol- $Zn^{2+}$  complex and its application in tread stock [J]. *J Chem Eng Chin Univ (高校化学工程学报)*, 2018, 32: 215-220.
- 16 Fairweather-Tait SJ, Faulks RM, Fatemi SJA, et al. Aluminium in the diet [J]. *Human Nutr: Food Sci Nutr*, 1987, 41: 183-192.
- 17 Yuan CX, Liu XF, Jing RS. Optimization of preparation conditions for tea polyphenols-zinc complex by central composite design [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2015, 36(16): 1-6.
- 18 Gong WQ, Liu R. Optimization of microwave-assisted extraction of pu'er tea pigments via response surface methodology [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2010, 31: 137-142.
- 19 Luypaert J, Zhang MH, Massart DL. Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy in the qualitative and quantitative analysis of green tea, *Camellia sinensis* (L.) [J]. *Anal Chim Acta* 2003, 47: 303-312.