

文章编号: 1009-038X(2001)02-0117-05

茶叶儿茶素单体的分离纯化及鉴定

王洪新, 戴军, 张家骊, 吕源玲

(无锡轻工大学中央研究所, 江苏无锡 214036)

摘要: 将茶提取物(茶多酚)先经 Sephadex LH-20 柱层析分离, 脱除咖啡因和色素, 并将其中 7 种儿茶素分成 2 个流分. 再用半制备型 HPLC 分离纯化, 得到 7 种儿茶素的单体化合物. 用 UV、IR、NMR 及 MS 等方法鉴定和验证了其化学结构, 7 种单体儿茶素化合物的纯度均大于 99%, 总得率为 66.7%, 总回收率为 82.1%.

关键词: 茶多酚; 儿茶素; 分离; 纯化

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Separation, Purification and Identification of Tea Catechins

WANG Hong-xin, DAI Jun, ZHANG Jia-li, LU Yuan-ling

(Center Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: Tea polyphenols was fractionated by Sephadex LH-20 Column Chromatography to obtain two fractions mainly containing catechins which were taken off caffeine and pigments. The two fractions were separated and purified by semi-preparation HPLC respectively to obtain seven catechin monomers. Their molecular structures were identified or verified by UV, IR, H-NMR and MS methods. The purities of the seven catechins were over 99%, total yield and reclamation of seven catechins was 66.7% and 82.1% respectively.

Key words: tea polyphenols; tea catechins; separation; purification

茶叶儿茶素是茶叶中重要的一类天然活性物质, 不仅具有较强的抗氧化作用, 而且具有广泛的药理功效^[1,2]. 研究各种儿茶素的药理活性和协同作用以及在体内的代谢情况, 开发儿茶素类新药, 均需大量高纯度的多种儿茶素单体. 因此, 研究茶叶儿茶素单体的提取纯化方法和生产工艺具有重要的现实意义. 其方法主要有两类^[3,4]: 一是将溶剂萃取法得到的儿茶素粗品(茶多酚)用亲脂性凝胶或吸附树脂多次层析纯化; 二是制得粗品后直接用制备型 HPLC 分离纯化(以四氢呋喃/丙酮/水洗脱).

方法一操作步骤多, 周期长, 条件不易控制; 方法二难以同时得到大量的多种高纯度儿茶素, 而且柱子总负载量较大, 实际有效负载量较小, 制备效率不高, 色谱柱容易污染、寿命短. 作者把这两种方法结合起来, 将粗提品先经柱层析预分离, 再用制备型 HPLC 纯化精制, 从而克服了上述缺点, 使分离效率和产品纯度较高, 分离周期较短. 本方法制得的 7 种儿茶素单体纯度均在 99% 以上, 总产率为 66.7%, 总收率为 82.1%. 建立的制备液相色谱方法简便实用, 所选用的溶剂价廉, 毒性小, 易于回

收稿日期: 2000-08-24; 修订日期: 2000-12-21.

基金项目: 轻工总会科技发展项目(轻科 96044)和江苏省九五攻关项目(BE9805)资助课题.

作者简介: 王洪新(1964-), 男, 江苏徐州人, 工学博士, 高级工程师.

收,无残留.此外,还对儿茶素纯化产品进行了结构分析.结果表明:它们的四谱分析数据和标准图像数据一致,与相应的儿茶素结构相吻合.

1 材料、设备及方法

1.1 材料

Sephadex LH-20,瑞典 Pharmacia 公司制造;丙酮(分析纯),中国医药集团上海化学试剂公司生产;95%乙醇(分析纯),上海振兴化工一厂生产;甲醇(色谱纯),淮阴塑料制品厂精细化工研究所生产;超纯水,无锡华晶微电子公司生产.

1.2 设备

Waters 600/2487 分析/半制备型高效液相色谱仪,岛津 GC14A 气相色谱仪,岛津 UV-240 紫外分光光度计,岛津 IR-440 红外分光光度计,布鲁克 AR×300 核磁共振波谱仪,Waters LCZMSD 液-质联用仪,旋转蒸发器,电热恒温水浴锅,Consel 24 冷冻干燥机.

1.3 儿茶素的提取和纯化工艺流程

1.3.1 粗提 茶叶经热水浸提、过滤、浓缩、冷却后用乙酸乙酯萃取,之后用酯相真空浓缩,得浓缩液,冷冻干燥后得儿茶素粗提品.

1.3.2 预分离 加水溶解至 100 mL,过滤上 Sephadex LH-20 柱(D 2.5 cm×75 cm),用丙酮/水梯度洗脱,10 g 儿茶素粗品得到 4 种流份.其中流份 I 为咖啡因等;流份 II 主要含 EC,D-C,EGC;流份 III 主要含 EGCG,GCG,ECG;流份 IV 为色素等杂质.

1.3.3 HPLC 分离纯化 流份 II 或 III 经浓缩除去丙酮,加甲醇/水溶解,HPLC 纯化后浓缩,冷冻干燥得儿茶素纯品.其中粗提在工厂进行,预分离和 HPLC 分离纯化均在实验室进行.

1.4 制备色谱条件

色谱柱 ODS D 10 mm×15 cm($10\ \mu$);流动相及梯度洗脱程序见表 1~2.

表 1 流份 II 洗脱条件

Tab.1 The condition of the gradient elution for fraction II			
时间/min	体积流量/(mL/min)	甲醇/水	梯度曲线
0	5	34:66	线性
34	5	34:66	线性
39	5	45:55	线性
50	5	45:55	线性
55	5	50:50	线性
70	5	50:50	线性
73	5	34:66	线性
75	万方数据 5	34:66	线性

表 2 流份 III 洗脱条件

Tab.2 The condition of the gradient elution for fraction III			
时间/min	体积流量/(mL/min)	甲醇/水	梯度曲线
0	5	38:62	线性
45	5	38:62	线性
50	5	42:58	线性
65	5	42:58	线性
70	5	50:50	线性
85	5	50:50	线性
90	5	38:62	线性
95	5	38:62	线性

注:检测时 UV278 nm,柱温为室温(25℃左右),进样量为 50~100 mg.

1.5 产品纯度检验的色谱条件

色谱柱 Zrohax SBC18 4.6 mm×15 cm($5\ \mu$ m);流动相等强度洗脱 MeOH:H₂O:TFA 为 35:65:0.05;检测时 UV278 nm,体积流量为 1 mL/min,柱温为 35℃.

1.6 溶剂残留检测气相色谱条件

色谱柱 PEG-20M 弹性石英毛细管柱, D 0.32 mm×32 m;检测器 FID;载气 N₂,体积流量为 1 mL/min;燃气 H₂,压力为 0.65 kg/cm²;气化室温度为 240℃,检测器温度 220℃;程序升温为 40℃保持 5 min,然后以每分钟 5℃升温,至 200℃保持 10 min.样品制备时用正丁醇溶解样品直接进样.

2 结果与讨论

2.1 儿茶素的分组分离

将儿茶素粗提品溶于水过滤后,上凝胶柱(Sephadex LH-20)以纯水 500 mL 和体积分数为 30%,45%,60%,80%的丙酮各 1 000 mL 依次梯度洗脱.每 100 mL 收集在一个三角瓶中,然后对每个瓶中流份作 HPLC 分析,根据分析结果,作出每个儿茶素的流出曲线,见图 1.图 1 显示:咖啡因在用纯水和 30%丙酮洗脱时即首先流出,接着非酯型儿茶素 EGC、D-C、EC 和酯型儿茶素 EGCG、ECG、GCG、CG 被分离成两组(馏分 II 和馏分 III)先后洗出,35#瓶中已无儿茶素(此时体积分数为 60%的丙酮刚好用完),在用体积分数为 80%的丙酮洗脱时,流出颜色明显由淡黄色逐渐变成棕黄色,即弱极性的色素被洗出.经此步预分离,咖啡因和大部分色素被去除,儿茶素分离成两组流份,使 HPLC 的进一步分离纯化变得较方便.

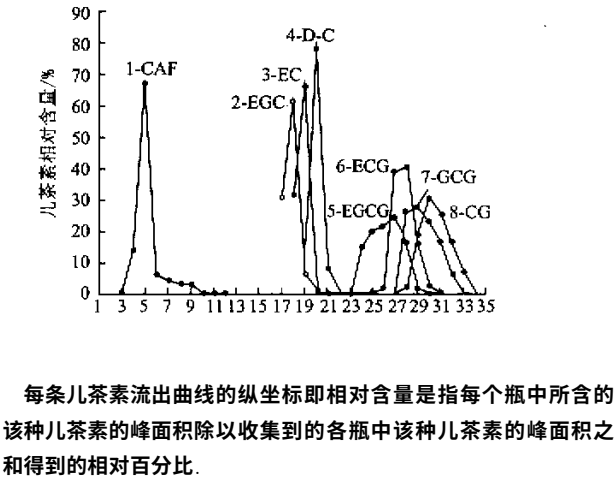


图 1 儿茶素在 Sephadex LH-20 柱上的流出曲线
Fig.1 The elution profile of catechins on Sephadex LH-20 column

2.2 HPLC 的纯化

流份Ⅱ和Ⅲ在 HPLC 上的制备色谱图见图 2，
3. 由图可见，7 种儿茶素单体分离效果均较好。

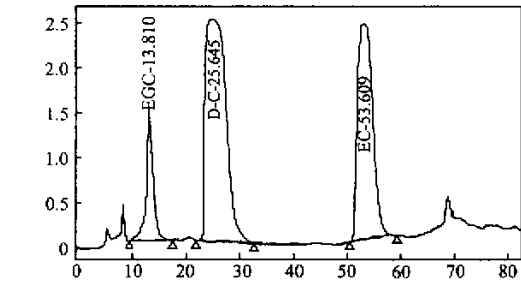


图 2 流份Ⅱ的制备色谱图
Fig.2 Preparative HPLC chromatogram of fraction Ⅱ

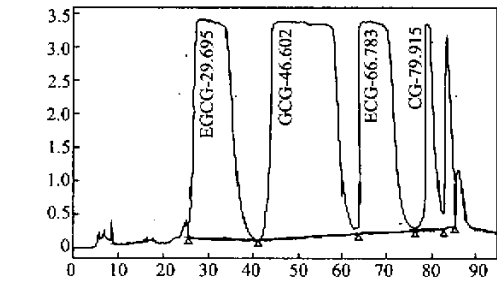


图 3 流份Ⅲ的制备色谱图
Fig.3 Preparative HPLC chromatogram of fraction Ⅲ

2.3 产品纯度检验

用 HPLC 峰面积归一化法检验各种儿茶素纯化产品的纯度^[5]，结果见表 3。表 3 显示各种儿茶素产品的纯度均在 99% 以上，Sigma 公司的儿茶素标准品纯度为大于或等于 98%。

表 3 儿茶素纯品检测结果

Tab.3 Determination results of the purity of catechins

儿茶素	纯度/%	儿茶素	纯度/%
EGC	99.65	GCG	99.62
D-C	99.86	ECG	99.51
EGCG	99.72	CG	99.16
EC	99.68		

2.4 儿茶素产率和收率

儿茶素粗提品(茶多酚)经预分离和 HPLC 纯化,制得 7 种儿茶素单体的产率和收率见表 4。

表 4 儿茶素产率和收率

Tab.4 The yield and recovery of catechins

儿茶素	原料茶多酚质量/g	茶多酚中儿茶素质量分数/%	纯化产品质量/g	产率/%	回收率/%
EGC		0.67	0.0677	0.0525	0.52 77.5
D-C		3.39	0.3424	0.2849	2.82 83.2
EGCG		33.86	3.4199	2.7462	27.19 80.3
EC	10.10	3.51	0.3545	0.3030	3.00 85.5
GCG		28.40	2.8684	2.3841	23.60 83.1
ECG		7.55	0.7626	0.6494	6.43 85.2
CG		3.83	0.3868	0.3146	3.11 81.3
总 计		81.21	8.2023	6.7347	66.7 82.1

2.5 溶剂残留检测

儿茶素产品是从甲醇-水混合溶剂中浓缩、冻干得到的,由于甲醇具有一定的毒性,故有必要对儿茶素产品中可能残留的甲醇进行检测。气相色谱分析结果为 7 种儿茶素产品中均未检出甲醇^[5]。

2.6 纯化产品的结构分析

上述分离纯化得到的 7 个儿茶素产品,按色谱分析图上出峰时间顺序依次编号为 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#]、6[#]、7[#]。用 Sigma 标准品在同一条件下作 HPLC 分析,根据保留时间初步定性为 EGC、D-C、EGCG、EC、GCG、ECG、CG。为进一步确认,对它们分别进行了 UV、IR、HNMR 及 ESI-MS 四谱分析。结果表明 它们的四谱分析数据^[5]和标准光谱图数据^[4,5]一致,与相应的儿茶素结构相吻合。表 5~7 分别是纯化产品的 ESI 负离子质谱分析结果和红外光谱特征吸收 H NMR 图谱的化学位移与归属。

表 5 纯化产品的 ESI 负离子质谱分析结果

Tab.5 ESI-MS results of catechins products

产品号	对应的儿茶素	相对分子质量	质谱图中 M-1 值
1	EGC	306	304.9
2	D-C	290	288.9
3	EGCG	458	457.0
4	EC	290	288.9
5	GCG	458	457.0
6	ECG	442	441.0
7	CG	442	441.1

表 6 纯化产品的红外光谱特征吸收

Tab.6 IR spectrums data of catechins

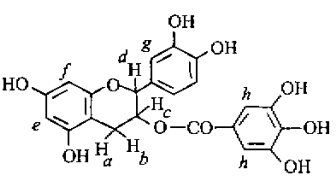
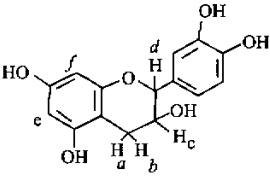
产品号	O-H	C=O	苯环骨架振动	指纹区
1	3 200	—	1 620,1 510	1 355,1 185,1 145,1 030,1 015
2	3 200	—	1 600,1 510	1 280,1 235,1 142,1 028,815
3	3 200	1 690	1 600,1 508	1 340,1 200,1 140,1 085,1 010
4	3 200	—	1 620,1 510	1 280,1 260,1 149,1 055,1 013,790
5	3 200	1 680	1 605,1 515	1 340,1 230,1 135,1 060,1 020
6	3 200	1 690	1 608,1 510	1 340,1 230,1 139,1 081,1 023
7	3 394	1 689	1 611,1 518	1 449,1 320,1 242,1 143,1 062,1 035
D-C·XH ₂ O	3 411	—	1 610,1 515	1 293,1 236,1 144,1 021,832
标准图谱	3 215	—		
EC	3 455	—	1 626,1 521	1 261,1 144,1 069,1 017,795
标准图谱	3 176	—		
EGC	3 400	—	1 630,1 510	1 465,1 355,1 190,1 145,1 015
文献值				
EGCMG	3 375	1 685	1 610,1 515	1 460,1 330,1 225,1 140,1 085,1 015
文献值				

表 7 纯化产品¹H-NMR 图谱化学位移及其归属

Tab.7 The ¹H-NMR spectrum data of catechins products

产品号	$\delta/(ug/g)$								
	a	b	c	d	e	f	g	g'	h
1	2.52 (dd)	2.92 (dd)	3.98 (6)	4.49 (d)	5.89 (d)	6.05 (d)	6.49 (s,2H)		
2	2.54 (dd)	2.91 (dd)	4.0 (6)	4.57 (d)	5.89 (d)	6.05 (d)	6.78 (6,2H)	6.93 (d)	
3	2.95 (dd)	3.05 (dd)	4.09 (4)	5.08 (s)	6.05 (d)	6.08 (d)	6.69 (s,2H)		7.07 (s,2H)
4	2.75 (dd)	2.88 (dd)	4.23 (s)	4.89 (s)	5.95 (d)	6.06 (d)	6.84 (6,2H)	7.07 (d)	
5	2.73 (dd)	2.78 (dd)	5.37 (4)	5.09 (d)	6.01 (d)	6.09 (d)	6.55 (s,2H)		7.08 (s,2H)
6	3.02 (dd)	3.16 (dd)	5.54 (s)	5.15 (s)	6.07 (d)	6.09 (d)	6.87 (dd,2H)	7.12 (d)	7.07 (s,2H)
7	2.76 (dd)	2.97 (dd)	5.39 (4)	5.12 (d)	6.01 (d)	6.11 (d)	6.83 (s,2H)	6.99 (s)	7.08 (s,2H)
D-C 标准图谱 (Sadtlr)	2.46	2.83	3.91	4.58	5.86	6.00	6.60-7.00		

H 位置图示



其它儿茶素 H 位置表示与 D-C,ECG 相同。

2.7 关于儿茶素构型转化问题

上述分离纯化和分析鉴定的结果表明 本研究建立的分
离纯化路线和工艺以及制备色谱方法完全适合儿茶素的分离纯化,其分离效率和产品纯度

均较高,HPLC 纯化所用溶剂价廉,毒性小,易于回收,无残留.7 种纯化产品可以确认为所定性的 7 种儿茶素单体.
由于茶叶中儿茶素单体结构不同,其抗氧化、

医药、保健等作用效能亦不尽相同,尤其是其中有几对互为同分异构体,如 EGCG 和 GCG, ECG 和 CG, 以及 DC 和 EC. 因此掌握其转化规律, 控制其转化, 以满足不同用途需要, 具有重要意义. 应尽量避免防止它们在分离纯化和分析过程中的转化, 以保证研究方法的稳定性和可靠性.

在本研究中, GCG 与 CG 的相对含量比较高, 高于其在天然茶叶中儿茶素组成比例. 但这不是由于分离、制备和分析方法引起的. 原因如下:

1) 所用茶多酚原料是由工业化生产获得的, 其中 $EGCG/GCG = 1.192$, $ECG/CG = 1.97$ 而分离制

备后的产物中, $EGCG/ECG = 1.152$, $ECG/CG = 2.064$. 两者的比值基本一致, 少许的差别是由实验误差引起的.

2) 根据有机化学理论及生产实践证明, 茶多酚的生产过程条件可引起儿茶素结构的变化, 尤其是受热过程. 在生产中已探索出控制加工条件从而控制儿茶素结构变化的条件.

3) 作者研究了分离纯化条件和效果, 选用 GCG、CG 相对含量较高的茶多酚样品, 是为了得到更多的单体纯品, 是可行的.

参考文献:

- [1] 张可钦. 由中国茶叶中提取抗氧化剂的研究[J]. 食品与发酵工业, 1991, 17(1): 1~5.
- [2] 项秀兰, 李楠, 张小安. 茶叶多元酚及其衍生物茶色素的研究进展[J]. 食品科学, 1997, 18(1): 15~17.
- [3] 松崎妙子, 原征彦. 茶叶カテキン类的抗酸化作用について[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1985, 59(2): 129~134.
- [4] RYOYASU SAIJO. Isolation and chemical structures of two new catechins from fresh tea leaf[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(7): 1969~1970.
- [5] 戴军. 半制备高效液相色谱法分离纯化茶叶儿茶素单体的方法研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1999.