

利用高速逆流色谱分离茶黄素单体^{*}

赵勤 屠幼英

(浙江大学茶学系 浙江杭州 310029)

摘要 高速逆流色谱技术因其特有的液-液分配和适应性较强的溶剂系统,正成为广泛应用的一种新型色谱技术。本文主要介绍和探讨了高速逆流色谱的特点、优点和利用高速逆流色谱分离茶黄素单体的现状和在茶学研究中的重要性。

关键词 茶黄素单体 高速逆流色谱 分离

茶黄素是多酚物质氧化形成的一类能溶于乙酸乙酯的、具有苯骈卓酚酮的化合物的总称^[1,2]。茶黄素有12种组分,其中茶黄素(TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)、茶黄素-3,3-双没食子酸酯(TFDG)和茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)是4种最主要的茶黄素^[3]。

茶黄素不仅是红茶的重要品质成分^[4],还具有好的医药保健功能,诸如抗氧化、预防心脑血管疾病、预防龋齿、防癌抗癌、抗菌抗病毒等^[5]。茶黄素在某些方面的药效甚至比儿茶素还要强。有研究指出:TF-3-G和TFDG比EGCG抑制脂肪氧化酶活性效果要强;茶黄素对龋齿的抑制作用超过了儿茶素各个单体。另有报道指出:在对脂质氧化酶抑制作用中,TFDG的抗氧化能力是儿茶素中抗氧化能力最强的EGCG的23倍^[5]。由此不难看出,茶黄素良好的医药保健功能使其药用开发具有十分广阔和诱人的前景。另外茶黄素还应用于食品着色剂^[5]。但目前对茶黄素单体的生理活性的研究还不充分,且单体生产的工业化程度尚低。本文将简述利用高速逆流色谱分离茶黄素单体的现状和可行性。

1 茶黄素分离技术的发展

自从Roberts E A H发现茶黄素以来^[6],已经进行了许多茶黄素分离、纯化和测定的研究。五六十年代,曾用硅胶纤维系层析和纸层析对茶多酚类物质进行分离纯化研究,获得茶黄素没食子酸酯的纯品。后来采用分子筛原理提出的Sephadex LH-20柱层析是一种有效的分离红茶色素的方法。由于茶黄素在乙酸乙酯、甲醇和水中呈橙黄色的针状结晶,易溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇和乙酸乙酯,难溶于乙醚,不溶于氯仿和苯等^[4],所以茶黄素的提取分离方法,一般采用热水提取,醋酸乙酯转溶,然后用Sephadex LH-20柱层析分离,茶黄素异构体再辅以制备性纸色谱分离,分离物可再用Sephadex LH-20柱层析分离纯化。随着色谱技术的快速发展,HPLC越来越广泛地应用于物质的测定分析,在茶黄素分析中的应用也很多。Bailey R. G.等^[7]使用光电二极管阵列检测器的反相HPLC研究红茶浸出液的性质,四种茶黄素能够得到分离纯化。Bailey R. G等^[8]又比较了不同的HPLC分析柱对红茶酚类色素分析的效果,结果表明用HyperSil ODS色谱柱第一次在同一

色谱上得到8种茶黄素。但是这些方法存在的最大缺点是分离时间过长,达30多个小时左右;上样量少,一次仅上样几十毫克,成本高昂。所以寻找一种快速、高效的分离方法对茶黄素的生产十分重要。

2 高速逆流色谱的发展和应

高速逆流色谱(High-speed Countercurrent Chromatography,简称HSCCC)是由美国国立卫生研究院博士研制开发的新型色谱技术,可以在短时间内实现高效分离和制备,并且可以达到几千个理论塔板数的分离效果^[9-10]。HSCCC不使用固相载体作为固定相,而是使用液相载体做固定相,利用螺旋柱在行星运动时产生的离心力,使互不相溶的两相不断混合,同时保留其中的一相(固定相),利用恒流泵连续输入另一相(流动相),随流动相进入螺旋柱的溶质在两相之间反复分配,按分配系数的大小次序,被依次洗脱。在流动相中分配比例大的先被洗脱,反之,在固定相中分配比例大的后被洗脱。

由于HSCCC不使用固相载体作固定相,它克服了使用固相载体带来的样品吸附、损失、污染和峰形拖尾等缺点^[11],特别适用于分离极性大的组分和一些生物大分子。HSCCC通过使用两个互不相溶的溶剂相在高速旋转的螺旋管中单向分布来实现对样品的分离,这是保持对活性无伤害的分离。并且HSCCC可以采用不同物化特性的溶剂体系和多样性的操作条件,其具有较强的适应性。80年代后期,因其特有的分离特性和较强的适应性而被大量的用于天然产物化学成分的分析 and 分离制备^[12]。高速逆流色谱分离制备天然产物,不仅适用于极性化合物,还适用于非极性化合物;不仅适用于天然产物粗提物的去杂,还适用于最后产物的精制,甚至纯化^[12]。

3 高速逆流色谱分离茶黄素单体的探讨

江和源等首次将高速逆流色谱法应用在分离纯化茶黄素上,经过比较研究,最终选择甲醇:水:乙酸乙酯:正己烷(1:6:3:1, v/v)作为溶剂系统进行茶黄素单体的分离^[17]。杜琪珍等^[18], Degenhardt A等^[19]也利用高速逆流色谱分离出了茶黄素,实验结果表明,分离效果达到了预期的要求。

但至今没有研究报道讨论这样的溶剂系统比例是否达到了最佳的分离效果,因为研究者没有发表将高速逆流色谱分离出

^{*} 该项目为浙江大学SRTP资助项目

的茶黄素单体用 HPLC 进行单个组分检验的结果;另外从红茶中提取茶黄素的前处理方法怎样更有效,前处理是否会影响分离效果,这些问题的研究报道不多。

作者认为不光是茶黄素,还包括其他的天然产物,在应用高速逆流色谱分离纯化含有目标提取物的粗品时,分离实验应至少满足以下两个条件:

(1) 粗品应具有一定的纯度。由于高速逆流色谱所具有的较强的适应性,使得它能分离制备诸如天然产物、抗生素、蛋白质和肽、无机物等^[12]。这有利也有弊。利的是使得高速逆流色谱具有较广的适用范围,弊的是其对进入高速逆流色谱分离的粗品纯度提出了较高的要求。高速逆流色谱属于精密的分析仪器,检测物质的灵敏性较高,如果进入高速逆流色谱的粗品含有较多的杂质,将必然影响目标提取物的分离制备。所以要用高速逆流色谱分离茶黄素,最好是先制得具有一定纯度的茶黄素粗品。如采用固定化多酚氧化酶催化高纯度茶多酚生产纯度高达以上 75% 的茶黄素。应用该工艺茶多酚的转化率高,可达到 40%;茶黄素含量达到 75%^[16],然后进行 HSCCC 方法将茶黄素单体分离,这样就可能达到更高效的分离的目的。

(2) 最优化选择适宜的溶剂体系。由于高速逆流色谱主要是利用目标提取物在流动相和固定相两相中分配系数的不同而被洗脱的原理来分离制备,所以两相的分配系数应有一定的适宜的差别,而这主要是通过选择不同的溶剂按一定的比例搭配来实现的。所以首先选用的溶剂系统应满足进行高速逆流色谱实验的基本条件:溶剂可分层,且两相不能相互反应;被分离物质的分配系数(K)的范围在 0.5~2 之间^[17]。 $K < 0.5$ 将导致峰分离度下降,而 $K > 2$ 则会使保留时间太长,样品峰过宽;为保证固定相保留值合适(不低于 50%),溶剂系统的分层时间应小于 30s;尽量采用挥发性溶剂,以方便后续处理,易于物质纯化^[12]。第二,溶剂系统基本确立后,通过最优化选择试验来确立最合适的溶剂系统比例,使得用这个比例的溶剂系统来分离茶黄素达到最佳的效果。如通过改变溶剂系统中一种或若干成分的容积比例或浓度,来进行正交试验,最终确定具有最佳分离效果的溶剂系统比例。杨福全等在利用高速逆流色谱从中国黄连中分离制备生物碱的实验中,就是通过改变甲醇的容积比例和稀盐酸的浓度,这样的一个正交试验来确定最后的具有最佳分离效果的溶剂系统比例。^[13]

目前报道的茶黄素的 HSCCC 分离方法中均未见此方面的详细研究报道,并且所见发表论文中的图谱的拖尾现象较明显,因此筛选适宜的溶剂体系对改进茶黄素分离效果是一个重要的工作。

除了确立溶剂系统的成分及其比例,还应当设计一个设备参数选择试验,通过这个试验来优化高速逆流色谱的分离条

件。对分析型逆流色谱,我们应当考虑进样浓度(即确立流动相流速后的进样量)、流动相流速、固体转速等变量对试验结果的影响,设计相关的正交试验来选择具有较佳分离效果的设备参数^[17],使高速逆流色谱分离茶黄素的条件得到优化,为工业化分离提供有效的参数。

利用高速逆流色谱分离茶单体的技术尚未成熟,还有很多尚需通过试验和论证的地方,本文只是在前人做过的试验的基础上一个小小的总结,希望能抛砖引玉,使高速逆流色谱技术在茶叶界的应用更为广泛。

参 考 文 献

- [1] 陈宗懋. 茶对人体的生理调节机能[J] 茶叶,1994(1):1—8; (2):1—9.
- [2] 王坤波 刘仲华 黄建安,茶黄素的提取分离与纯化研究进展,湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(4),355-358
- [3] Collier P D, Malbois R, Korver O, et al. The theaflavins of black tea[J]. Tetrahedron, 1973, 29:125-142
- [4] 程启坤, 红茶中的茶黄素, 国外农学茶叶, 1983; 1, 1-14
- [5] 宛晓春 李大祥 夏涛, 茶色素及其药理学功能, 天然产物研究与开发, 2001, 13(4), 65-70
- [6] Roberts E. A. H. The phenolic substances of manufactured tea[J] J Sci Food Agric. 1958, 9:212-216
- [7] R. G. Bailey, L. M. Odowell, H. E. J. Sæ of an HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor, J. Sci. Food Agric. 1990, 52:509-525
- [8] R. G. Bailey, H. E. N. Ursten. Comparative study of the reversed-phase high-performance liquid chromatography of black tea liquors with special reference to theaflavins. J. Chromatogr. 1991, 542:115-128
- [9] Ito Y. Chromatogr. 1981, 214:122-125
- [10] Ito Y. Chromatogr. 1981, 207:161-170
- [11] Zhang Tianyou(张天佑), The Technology of Counter-current Chromatography(逆流色谱技术) Beijing(北京): Science and Technology Press of Beijing(北京科学技术出版社), 1991: 267
- [12] 戴德舜 王义明 罗国安, 高速逆流色谱研究进展, 分析化学, 2001, 29(5):586-591
- [13] 江和源 程启坤 杜琪珍, 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素, 天然产物研究与开发, 2000, 12(4):30-35
- [14] Qizhen Du, Heyuan Jiang, Yoichiro Ito Separation of theaflavins of black tea: High-speed counter-current chromatography vs. sephadex LH-20 gel column chromatography[J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2001, 24(15):2363-2369
- [15] Degenhardt A, Engelhardt U, H. Wendt A, S. et al. Isolation of black tea pigments using High-speed counter-current chromatography and studies on properties of black tea polymers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11):5200-5205
- [16] 屠幼英 夏会龙. 固定化多酚氧化酶催化高纯度茶黄素的方法. 专利申请号: 02136982.8
- [17] 戴德舜 伍方勇 王义明 罗国安, 高速逆流色谱实验体系的选择和优化, 分析仪器, 2001, 3:31-34