

物总离子流(TIC)峰面积包含萃取产物总量及其极性分布信息,在测量条件相同及产物共存组份数量和比例变化不大的情况下,选择离子峰面积在总离子流峰面积的百分比(归一化法)能在一定程度上反映目标产物在总萃取产物中的含量相对关系。本实验利用这一特性对所选改性剂的萃取和选择性进行了对比和选择,简捷而直观。

References

- [1] Maurakami T, Tanaka N. Occurrence, structure and taxonomic implications of fern constituents [J]. *Prog Chem Org Nat Prod*, 1988, 54: 301-310.
- [2] Liang N C, Cui L. Extracts from *Pteris semipinnata* L. and their combined drugs [P]. CN: 1138998, 2002-04-03.
- [3] Zhang J C. *Extraction by Supercritical Fluid* (超临界流体萃取) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [4] Zhou S L, Hamburger M. Application of liquid chromatograph-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis: Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 755: 189-204.

制备高效液相色谱分离纯化茶氨酸对照品

肖伟涛, 朱小兰, 陈波*, 姚守拙*

(湖南师范大学化学研究所, 湖南 长沙 410081)

摘要: 目的 研究制备型高效液相色谱分离纯化茶氨酸对照品的方法。方法 原料水提后的水相用被水饱和的氯仿萃取, 水相蒸发浓缩后离心, 上清液进行HPLC分离制备, 收集液冷冻干燥, 粗产品用甲醇清洗即得。结果 该法所得产品用外标法定量, 纯度大于98%, 制备收率大于60%。结论 本法生产周期短, 产品质量高, 方法简便, 生产费用低, 茶氨酸产品可用作分析方法的对照品。

关键词: 茶氨酸; 对照品; 制备高效液相色谱

中图分类号: R 284.2; R 286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)02-0148-03

Preparation and purification of theanine reference substance by preparative HPLC

XIAO Wei-tao, ZHU Xiao-lan, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo

(Institute of Chemistry, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: **Object** To establish an isolation method of theanine reference substance by preparative HPLC. **Methods** After raw material extracted by water, the water phase was extracted by chloroform saturated with water, then concentrated on a thermostat. After centrifuged, supernatant was isolated and purified by preparative HPLC. Fraction was frozen and dried by Flexi-Drier. Crude product was rinsed by methanol. The purity of product was determined by analytical HPLC. **Results** The purity of product is higher than 98% and theanine yield from raw material by this method exceeds 60%. **Conclusion** The developed method is simple, rapid, and at low production cost. The product owns the quality of reference substance.

Key words: theanine; reference substance; preparative HPLC

茶氨酸(*N*-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是影响茶叶品质的重要组成部分^[1]。茶氨酸是茶叶氨基酸中一种非蛋白氨基酸,约占茶叶中游离氨基酸的40%以上,占茶叶干重的1%~2%^[2],并使茶汤鲜爽、有焦糖味^[3]。药理学研究表明茶氨酸能拮抗咖啡碱引起的神经系统的兴奋作用和降血压^[4,5]。随着茶氨酸的保健功效逐渐为人们所认识,对茶氨酸的需求量不断上升。目前关于茶氨酸对照品的合成、分离方法的研究报道甚少。茶氨酸可采用化学合成、微生物发酵

法合成^[6,7]。现仅日本有少量的茶氨酸对照品,且价格较贵,限制了对其进一步的研究与应用。本实验采用制备高效液相色谱技术,对25%茶叶提取物中茶氨酸进行制备、分离纯化。

1 制备与分离

1.1 仪器与试剂: Waters Prep LC4000 高效液相制备色谱仪, Waters 2487 Dual λ Absorbance 紫外检测器, 10 mL 定量环, Waters Millennium³² 色谱工作站, JCX-250W 超声波清洗器(山东济宁电子仪

* 收稿日期: 2003-05-16

基金项目: 国家“十五”攻关资助项目(2001BA746C, 2001BA804A 21)

* 通讯作者 E-mail: drchenpo@vip.sina.com Fax: (0731) 8865515

器厂), LD4—2A 离心机(北京医用离心机厂), TGL—16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂), Kinetics Flexi-Dry™ MP 冷冻干燥机(FTS® systems, NY, USA)。二次蒸馏水, 试剂均为分析纯。茶叶提取物由本实验室制备, 其中茶氨酸含量约为25%。

1.2 制备条件

1.2.1 原料的预处理: 称取1 g 茶叶提取物于20 mL 具塞试管中, 加二次蒸馏水至刻度, 超声10 min, 4 500 r/min 离心, 上清液用等体积水饱和的氯仿萃取1次。水相置于水浴锅上蒸发浓缩至10 mL, 再以11 000 r/min 离心3 min, 所得溶液备用。

1.2.2 色谱条件: 色谱柱: 反相Waters Prep Nova-pak® HR C₁₈柱(300 mm × 19 mm, 6 μm); 柱温: 室温; 检测波长: 215 nm; 流动相: 0.1% 甲酸水溶液; 流速: 5 mL/min。制备色谱图见图1。

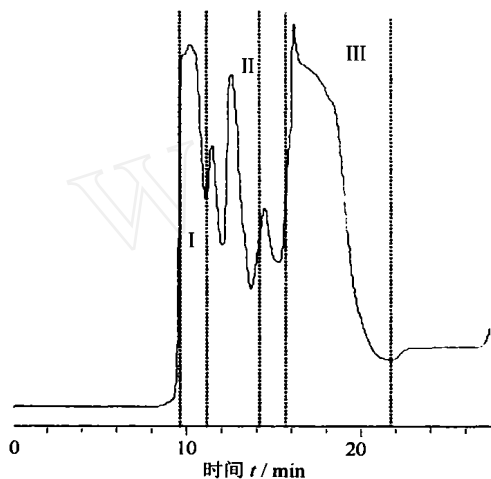


图1 茶氨酸的制备 HPLC 谱图

Fig 1 Preparative HPLC chromatogram of theanine

1.3 HPLC 收集液的处理方法: 收集液冷冻干燥得淡黄色粉末状晶体, 用无水甲醇将晶体超声10 min后, 离心, 如此反复两次, 得白色晶体。

2 产品质量分析

2.1 仪器与试剂: Waters 2695 分离单元, PDA 996 二极管阵列UV 检测器, Waters Masslynx™ 3.5 色谱管理系统。乙腈为色谱纯, 甲酸为分析纯, 水为二次蒸馏水。茶氨酸对照品由日本东京化成工业株式会社提供, 纯度大于98%。

2.2 色谱分析: 色谱柱: Spherigel C₁₈柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 柱温: 30 °C; 检测波长: 200 nm; 流动相: 0.1% 甲酸水溶液; 流速: 1 mL/min。产品与对照品的色谱图见图2, 3。

3 结果与讨论

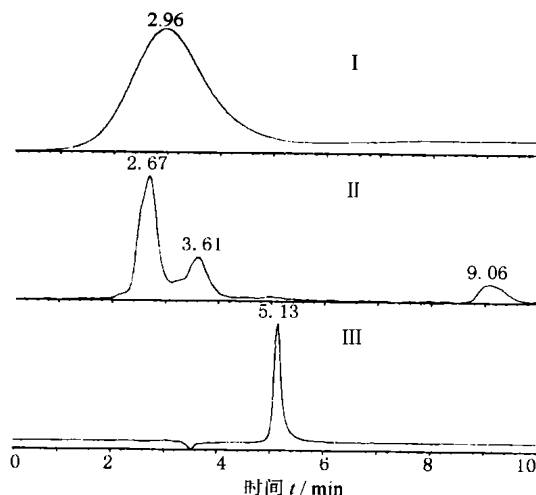


图2 相应制备收集液的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of relevant fractions

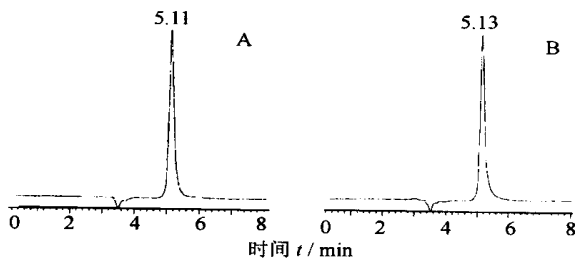


图3 茶氨酸对照品(A)和产品(B)的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC chromatograms of theanine reference substance (A) and product (B)

3.1 制备分离波长的选择: 因制备分离所用检测器为分析型紫外检测器, 灵敏度高, 当大量样品溶液进入色谱柱后, 所分离的目标成分绝对量较大, 采用200 nm 检测时, 已超出检测器的检测线性范围, 无法监控组份分离情况; 因此在本实验中采用响应灵敏度较低的215 nm 进行分离检测, 可有效解决检测灵敏度与制备分离量不相匹配的问题。

3.2 产品纯度分析及收得率: 1 g 茶叶提取物可制备约160 mg 茶氨酸, 面积归一化定量确定产品纯度为98.86%。外标法定量确定产品纯度为98%以上。按98%的纯度来计算原料中茶氨酸的收率为62.72%。

3.3 前处理条件的优化

3.3.1 提取: 由于茶氨酸在水中溶解度很大, 用20 mL 去离子水处理茶叶提取物, 茶氨酸基本提取完全。将一次提取的不溶物再用20 mL 去离子水重新处理, 发现茶氨酸含量很低, 仅为原来的2%左右, 而咖啡因等杂质含量很高, 这些杂质的引入将会干扰后面的分离纯化, 故原料仅提取一次。若提取物用80% 甲醇水溶液进行处理, 亦能提取98% 茶氨酸,

但将该甲醇水溶液进制备色谱, 不能将茶氨酸分离出来。

3.3.2 萃取: 在前处理过程中若不用被水饱和的氯仿萃取1次, 原料中咖啡因、可可豆碱等将会干扰后面的分离纯化。被水饱和的氯仿萃取后, 不仅能将咖啡因、可可豆碱萃取一大部分, 而且茶氨酸没有损失。

3.4 进样量的选择: 约1g茶叶提取物用20mL去离子水处理, 每次进样1.5mL, 分离效果很好, 但制备量偏小, 上柱量不足20mg; 当进样2mL, 突破了检测极限, 不能准确收集产品。将20mL水溶液浓缩至10mL左右, 每次进样2mL, 上柱量约50mg, 不影响分离度, 纯度亦符合质量要求(98%, HPLC)。且根据分析色谱仪对相应收集液进行跟踪检测, 可知III部分为目标物茶氨酸的收集液(图2)。

3.5 制备柱的清洗与再生: 原料经水提、萃取、浓缩离心等预纯化, 尽管将茶氨酸的含量大幅提升, 但溶液中仍含有一些杂质, 如咖啡因、可可豆碱等, 在进行HPLC分离时, 杂质亦同步进入制备柱中, 且在制备流动相条件下无法完全被洗脱。这不仅严重损害柱寿命, 而且影响下一次分离效果。因此, 必须在每次分离纯化后用约150mL分析纯乙腈冲洗制备柱, 然后再用甲酸水溶液平衡色谱柱, 进行下一次的分离纯化。

3.6 粗产品纯化条件的优化: 收集到的溶液, 经冷冻干燥后, 得淡黄色的粉末状晶体。面积归一化法定量, 其纯度为98%以上。但采用外标法, 其纯度仅为90%左右。于是对粗产品进一步纯化条件进行了探讨。

粗产品溶于水用活性炭进行处理后, 发现淡黄

色溶液变得澄清, 但茶氨酸被活性炭强烈吸附, 吸附率为35%, 故用活性炭处理不可取。

茶氨酸易溶于水, 不溶于甲醇、乙醇等。通过考察茶氨酸在甲醇、乙醇中的溶解情况表明, 茶氨酸在二者中仅一小部分被溶解(约3%)。采用甲醇超声, 离心得白色粉末状晶体, 经外标法分析, 其纯度为98%以上, 且得率在95%以上。

4 结论

本实验建立的茶氨酸对照品的分离纯化方法通过原料预纯化, HPLC分离制备, 结晶过程, 能得到高收率、高纯度的茶氨酸对照品, 且该方法具有生产周期短, 产品质量高, 方法简便, 生产费用低廉等特点。

References

- [1] Yuan H B, Tong H R, Gao A H. The synthetic method and properties of theanine [J]. *Guangzhou Food Sci Tech* (广州食品工业科技), 2002, 18(2): 39-40.
- [2] Ekgor-Ott K H, Taylor A, Armstrong D W. Varietal differences in the total and enantiomeric composition of theanine in tea [J]. *J Agr Food Chem*, 1997, 45: 353-363.
- [3] Guo S P. Study on the determination of theanine in tea by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1996, 14(6): 464-466.
- [4] Zhao D, Wang C X. The latest research of theanine at home and abroad [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23(5): 145-147.
- [5] Chen Y. Study of method on extracting theanine [J]. *J Shaoxing Coll Arts Sci* (绍兴文理学院学报), 1997, 17(6): 71-75.
- [6] Li Y, Chen X. Synthesis and application of theanine [J]. *Guangzhou Food Sci Tech* (广州食品工业科技), 1998, 14(3): 23-26.
- [7] Chen Y, Tao W Y. Influences of plant hormones on the synthesis of theanine from tea callus [J]. *J Wuxi Univ Light Ind* (无锡轻工业大学学报), 1998, 17(1): 74-77.

超临界CO₂流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的工艺研究

黄纪念^{1,2}, 屠鹏飞^{1*}, 蔡同一^{2*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学食品学院, 北京 100094)

摘要: 目的 考察影响超临界CO₂流体萃取迷迭香中抗氧化物质的因素。方法 采用正交试验设计, 以两级萃取物中主要抗氧化活性成分鼠尾草酸含量作为考察指标, 对影响超临界CO₂流体萃取鼠尾草酸工艺的因素进行研究。结果 得到了萃取鼠尾草酸的最佳工艺条件。一级分离的最佳试验工艺条件为: 萃取压力40MPa, 萃取温度55℃, 分离压力5MPa, 分离温度70℃; 二级分离的最佳试验工艺条件为: 萃取压力20MPa, 萃取温度75℃, 分离压力15MPa, 分离温度80℃。结论 超临界CO₂流体萃取技术可用于迷迭香中抗氧化成分鼠尾草酸的提取。

关键词: 迷迭香; 超临界CO₂流体萃取; 鼠尾草酸; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)02-0150-04

* 收稿日期: 2003-04-11

作者简介: 黄纪念(1971—), 男, 河南省汝南县人, 在读博士生, 研究方向为天然抗氧化剂。E-mail: hjinian@sohu.com

* 通讯作者 Tel: (010) 62091702 Fax: (010) 62092750