

- [3] 应国清,陆红娅,王 鸿,等. 中药肿节风的研究进展[J]. 上海中医药杂志,2007,41(6):85-87.
- [4] 田 萍,王道平,朱海燕,等. 高效液相色谱法测定连钱草中的迷迭香酸的含量[J]. 贵州大学学报,2008,25(2):169-171.
- [5] 王 砚,王钢力,姚令文,等. 肿节风药材中反丁烯二酸和异噁皮啶的含量测定[J]. 华西药学杂志,2005,20(1):60-62.
- [6] 王祝举,赵玉英,王 邻,等. 夏枯草中迷迭香酸含量分析方法研究[J]. 药物分析杂志,2006,26(3):399-340.
- [7] 张继华,王跃生,柏 健,等. RP-HPLC法测定肾茶药材中迷迭香酸的含量[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(1):43-44.

茶黄素复合物中单体对照品的制备研究

徐 懿¹,王 奕¹,屠幼英^{1,2*},蒋振华¹,吴媛媛¹

(1. 浙江大学 茶学系,浙江 杭州 310029;2. 杭州英仕利生物科技有限公司,浙江 杭州 310012)

摘 要:目的 研究茶黄素复合物和单体的对照品分离制备。方法 AB-8 树脂吸附茶黄素,乙醇梯度洗脱得茶黄素复合物,进一步用半制备液相色谱分离茶黄素单体。结果 AB-8 大孔树脂进行吸附,20%、30%、40%、50%、60%乙醇溶液梯度洗脱,洗脱速度为 2 BV/h,制得质量分数 80%的茶黄素复合物。以制备色谱进一步分离获得质量分数 90%以上茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯,以及质量分数大于 70%的茶黄素的单体。结论 大孔吸附树脂和制备色谱结合可以从茶黄素复合物中获得比较理想的单体对照品。
关键词:茶黄素;茶黄素-3-没食子酸酯;茶黄素-3'-没食子酸酯;茶黄素-3,3'-双没食子酸酯;大孔吸附树脂;制备色谱
中图分类号:R284.2;R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)12-1919-03

茶黄素是多酚物质氧化形成的一类能溶于醋酸乙酯的、具有苯骈萘酚酮的化合物的总称。茶黄素有 28 种组分,其中茶黄素、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯是 4 种最主要的茶黄素^[1]。茶黄素具有良好的医药保健功能,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。另外茶黄素还应用于食品着色剂^[2,3]。目前茶黄素单体分离方法主要有 Sephadex LH-20 柱色谱法和高效逆流色谱(HSC-CC)法。Sephadex LH-20 柱色谱法成本高,分离量少,分离时间长,并且多次使用时会造成不可逆吸附污染,分离效果变差。HSCCC 法分离时间较柱色谱法短,但是设备不易获得,粗品要具有一定的质量分数,而且分离量少,成本高^[4-8]。因此本实验先采用大孔吸附树脂优化条件得到质量分数 80%以上的茶黄素复合物,并进一步用于半制备液相色谱分离制备茶黄素等对照品。

1 材料与仪器

茶黄素粗品由杭州英仕利生物有限公司提供,质量分数为 50%;茶黄素混和对照品由 Sigma 公司提供;AB-8、NKA-9、三菱 SP-207 树脂;乙醇、冰乙酸(分析纯);乙腈(色谱纯)。

UV-2000 紫外分光光度计(尤尼科(上海)仪

器有限公司);BT-100 恒流泵(上海琪特分析仪器有限公司);AlpHa 1-2 LD 真空冷冻干燥(德国 Christ 公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂);LC2010 高效液相色谱(日本岛津公司);依利特 P270 半制备色谱,UV230+紫外可见检测器,EC2000 色谱数据处理工作站。

2 方法与结果

2.1 茶黄素粗品的大孔树脂静态吸附考察

2.1.1 吸附量的测定:称取经预处理的 AB-8、NKA-9、SP-207 树脂各 25 g,置于烧杯中,加入 10 mg/mL 茶黄素粗品水溶液 50 mL 搅拌 10 min,每隔 1 h 搅拌 1 次,24 h 充分吸附后,高效液相色谱法测定原溶液和吸附后溶液中茶黄素的质量浓度,计算吸附率,结果见表 1。

吸附率=(原溶液中茶黄素的质量浓度-吸附后溶液中茶黄素质量浓度)/原溶液中茶黄素质量浓度×100%

2.1.2 解吸量的测定:取吸附完全的 3 种树脂各 25 g,置烧杯中,加入 50 mL 70%乙醇溶液搅拌 10 min,每隔 1 h 搅拌 1 次,24 h 充分解吸后,高效液相色谱法测定解吸液中茶黄素的质量浓度,计算解吸率,结果见表 1。

解吸率=解吸液中茶黄素的质量浓度/(原溶液中茶黄素的质量浓度-吸附后溶液中茶黄素的质量浓度)×100%

收稿日期:2009-03-12

基金项目:国家中小型创新项目企业技术创新资金资助项目(07C26223301397);浙江省农业科技重大专项重点项目(2007C12068);浙江大学 SRTTP 项目支持

作者简介:徐 懿,浙江诸暨人,博士研究生,研究方向为茶叶化学与制茶工程。E-mail:cimaogengen@126.com

* 通讯作者 屠幼英 Tel:(0571)86971743 E-mail:youyutu@zju.edu.cn

表1 3种树脂对茶黄素的吸附率和解吸率的比较

Table 1 Comparison of adsorption and desorption of theaflavins on three types of resins

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
AB-8	76.77±0.11	73.64±0.13
NKA-9	44.59±0.06	68.11±0.10
SP-207	47.08±0.09	94.63±0.07

由表1可知,3种树脂中,AB-8对茶黄素的吸附作用最好,可以达到76.77%。但是SP-207在70%乙醇洗脱下,茶黄素几乎完全解吸,达到94.63%;其次是AB-8,解吸率也达到了73.64%。综合考虑茶黄素的吸附和解吸作用,选择AB-8用于茶黄素的动态吸附试验。

2.2 茶黄素粗品的大孔树脂动态吸附考察

2.2.1 洗脱流速的选择:配制10 mg/mL茶黄素粗品溶液,以2 BV/h上样1 BV,用2.5 BV 40%乙醇分别以1、2、3 BV/h洗脱,40%乙醇洗脱1 BV后开始收集,每管20 mL;洗脱液经高效液相色谱检测茶黄素的质量浓度后,合并茶黄素质量分数大于80%的洗脱液,旋转蒸发去除乙醇,冷冻干燥得茶黄素成品,测定茶黄素的实际质量分数并且计算得率,结果见表2。

2.2.2 洗脱梯度的选择:配制10 mg/mL茶黄素粗品溶液,以2 BV/h上样1 BV,分别用20%、30%、40%、50%、60%乙醇各0.5 BV进行梯度洗脱和20%、40%、60%乙醇各0.83 BV进行梯度洗脱,洗脱流速为2 BV/h,乙醇洗脱1 BV,每管20 mL;洗脱液经高效液相色谱检测茶黄素质量浓度后,合并茶黄素质量分数大于80%的洗脱液,旋转蒸发去除乙醇,冷冻干燥得茶黄素成品,测定茶黄素的实际质量分数并且计算得率,结果见表2。

茶黄素得率=成品中茶黄素的质量分数/粗品中茶黄素的质量分数×100%

表2 不同条件洗脱所得茶黄素产品的比较

Table 2 Comparison of theaflavins products obtained by different elutions

洗脱条件	得率/%
40%乙醇,1 BV/h	26.45±0.01
40%乙醇,2 BV/h	39.29±0.01
40%乙醇,3 BV/h	40.34±0.02
20%-40%-60%乙醇,2 BV/h	51.88±0.02
20%-30%-40%-50%-60%乙醇,2 BV/h	54.76±0.02

茶黄素经AB-8树脂上样吸附后,用合适体积分数的乙醇洗脱,可以去除大部分的儿茶素杂质,得到质量分数大于80%的茶黄素成品,得率见表2。可知,洗脱流速为1 BV/h时,茶黄素产品的得率最

低,多梯度洗脱与等梯度洗脱相比较,前者茶黄素的得率明显高于后者。而且,5个梯度洗脱处理又稍优于3个梯度洗脱处理,得率最高可达54.76%。梯度洗脱时,20%~30%乙醇洗脱收集液中主要为咖啡因和非酯型儿茶素类物质,在40%~50%乙醇洗脱收集液中为大量的酯型儿茶素和少量茶黄素类物质,在60%乙醇洗脱收集液中为质量分数达80%以上的茶黄素。这是因为茶黄素和儿茶素之间的相对分子质量和极性有一定差别,咖啡因和非酯型儿茶素亲水性大,低体积分数的乙醇即可全部洗脱,而酯型儿茶素亲水性小,随着乙醇体积分数的提高而慢慢被洗脱下来,茶黄素的亲水性更小,只有在大于50%乙醇下才能很好的洗脱。所以采用梯度洗脱的方法可以使儿茶素和茶黄素达到更好的分离效果。

2.3 制备液相色谱分离茶黄素单体

2.3.1 色谱条件:依利特C₁₈色谱柱(250 mm×10 mm,10 μm);柱温:20℃;波长:280 nm。

2.3.2 流动相选择:茶黄素成品用甲醇溶解后用于制备色谱分离茶黄素单体,每次进样5 mg,以流动相重蒸水-乙腈-冰醋酸(69.5:30:0.5)或重蒸水-乙腈-冰醋酸(73.5:26:0.5)洗脱,体积流量为5 mL/min。结果在流动相为重蒸水-乙腈-冰醋酸(69.5:30:0.5)条件下,茶黄素4个单体中的茶黄素-3'-没食子酸酯、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯两个峰重合,不能分离;而在流动相为重蒸水-乙腈-冰醋酸(73.5:26:0.5)条件下,茶黄素4个单体峰之间具有良好的分离度。

2.3.3 体积流量的选择:茶黄素成品用甲醇溶解后用于制备色谱分离茶黄素单体,每次进样5 mg,以流动相重蒸水-乙腈-冰醋酸(73.5:26:0.5)洗脱,调整体积流量为2.5、5、10 mL/min。结果在流动相为重蒸水-乙腈-冰醋酸(73.5:26:0.5)条件下,当洗脱流速太大时,茶黄素出峰时间缩短,并且峰与峰之间有交集,不利于分离和收集,当流速太小时,茶黄素出峰时间大大延长,峰形平伏。为缩短分离时间,且保持良好的分离效果,选择流速5 mL/min。

2.3.4 最大上样量:茶黄素成品用甲醇溶解后用于制备色谱分离茶黄素单体,每次进样5、10、20、30 mg,以流动相重蒸水-乙腈-冰醋酸(73.5:26:0.5)洗脱,体积流量为5 mL/min,筛选最佳上样量。结果随着进样量的增大,色谱峰变宽,组分峰重叠加重,茶黄素的分离效率降低。而且,进样量越大,馏分中茶黄素单体的质量分数越低。当进样量达到30 mg时,茶黄素各单体峰之间的分离度达到极限,尤其

是茶黄素-3'-没食子酸酯、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯两峰之间的分离度明显下降,有部分重合之势。

因此,茶黄素单体制备的最佳液相参数为:流动相为重蒸水-乙腈-冰醋酸(73.5:26:0.5),体积流量为5 mL/min,最大上样量为30 mg。

2.4 茶黄素的高效液相色谱分析

2.4.1 色谱条件:岛津 LC-2010A 液相色谱仪;Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);测定波长:280 nm;流动相为重蒸水-乙腈-冰醋酸(76.5:23:0.5);体积流量1.0 mL/min;柱温:35℃,进样量:10 μL;0~60 min 等梯度洗脱。

2.4.2 结果:液相制备色谱最优条件下收集的茶黄素单体峰经高效液相检测,茶黄素质量分数为73%,茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯的质量分数分别达到90.05%、92.48%、92.40%。4种茶黄素单体质量分数相当高,适于对照品、生化试剂等质量分数要求较高的产品需要。

3 讨论

王坤波^[3]报道中制得茶黄素质量分数为17.42%,得率为0.51%;本研究优化工艺用于放大实验,所得茶黄素不仅质量分数高于80%,其得率可达50%,远远超过其他研究。本实验的加工工艺经放大可用于大量制备高纯度的茶黄素复合物,开阔了茶黄素在医药、食品、化工等领域的应用。

本实验通过选择合适的 HPLC 制备色谱条件,一次分离可以得到质量分数在90%以上的茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯3种茶黄素单体以及质量分数在70%以上的茶黄素,每次分离耗时仅1 h,上样量30 mg。Sephadex LH-20 柱色谱是用丙酮梯度淋洗分离红茶中茶黄素,可分离出3个单体峰,其中茶黄

素-3-没食子酸酯和茶黄素-3'-没食子酸酯没有分开,结合硅胶柱色谱分离,可进一步分离着这两种单体,但是 Sephadex LH-20 柱色谱成本很高,上样35 mg,分离时间长达30 h^[3]。宛晓春等^[7]结合 Sephadex LH-20 柱色谱和高速逆流色谱分离茶黄素单体,最终仅得到茶黄素-3,3'-双没食子酸酯单体,茶黄素单体中混有 ECG,也没有分开茶黄素-3-没食子酸酯和茶黄素-3'-没食子酸酯。有报道^[9]采用高速逆流色谱可分离得到4种茶黄素单体,但每次分离耗时500 min,进样量仅30 mg,其效率没有本试验中用半制备液相色谱的效率。本实验结果和相关研究报道相比较,在茶黄素单体分离上具有一定的优势。同时也发现制备液相色谱存在着效率不高的缺点,用于大量制备茶黄素单体,有一定的局限性,这有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杨子银,屠幼英. 茶黄素开发抗肿瘤抗生素替代品的初步探讨[J]. 中国茶叶加工,2003(4):28-31.
- [2] 杜琪珍,江和源. 茶色素的药理及其应用[J]. 中国茶叶,1997(5):36-37.
- [3] 王坤波,刘仲华,黄建安. 茶黄素的提取分离与纯化研究进展[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2002,28(4):355-358.
- [4] 江和源,程启坤,杜琪珍. 高速逆流色谱在茶黄素分离上的应用[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(4):30-35.
- [5] 赵勤,屠幼英. 利用高速逆流色谱分离茶黄素单体[J]. 福建茶叶,2004(2):17-18.
- [6] 杨子银,屠幼英,赵勤,等. 高速逆流色谱分离茶黄素单体的初步研究[J]. 食品科学,2005,26(10):87-90.
- [7] Yang C J, Li D X, Wan X C. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods an approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea. [J]. J Chromatogr B, 2008, 861: 140-144.
- [8] Yang Z Y, Tu Y Y, Jie G L. Radical-scavenging abilities and antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters in H₂O₂-mediated oxidative damage system in the HPF-1 cells [J]. Toxicol in vitro, 2009, 22: 1250-1256.
- [9] Wang K B, Liu Z H, Huang J A, et al. Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography [J]. J Chromatography B, 2008, 867: 282-286.

欢迎订阅《中国新药与临床杂志》(原名《新药与临床》)

《中国新药与临床杂志》(原名《新药与临床》),由中国药学会和上海市食品药品监督管理局科技情报研究所共同主办,为全国性期刊,被确认为全国中文核心期刊(内科学、药理学),也是统计源期刊。荣获首届国家期刊奖、第2届全国期刊奖提名奖,分别荣获第2届全国、中国科协、上海市优秀科技期刊一等奖。《中国新药与临床杂志》报道国内外新药,着重报道国产新药的临床研究、合并用药、合理用药和不良反应等。适用于医师、药师、医药教学和科研人员等阅读和参考。《中国新药与临床杂志》具有新药密切结合临床的特色,强调实用性,强调新药的临床应用,以提高医务人员的用药水平,博得全国医师、药师等的好评。《中国新药与临床杂志》1982年创刊,月刊,每月25日出版,88页,A4开本,电脑排版、彩色、胶印。向国内外公开发售,欢迎在11月份向当地邮局订阅。也可直接向编辑部订阅。定价每期12.00元,全年144.00元。本刊邮发代号:4-347。国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京399信箱),国外代号:RM5892。

地址:上海市柳州路615号1号楼315/317室
电话:021-61673769 传真:021-64511836

邮编:200233