

# 聚酰胺分离纯化茶黄素类物质研究

丁阳平<sup>1,2</sup>, 刘仲华<sup>1,\*</sup>, 黄建安<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128 2. 西南大学茶学系, 重庆 400716)

**摘 要:** 本实验利用聚酰胺分离茶黄素类, 研究发现其最佳的分离条件为: 上样量 250mg/50ml 聚酰胺, 上样浓度 20%, 洗脱剂为甲醇:氯仿:丙酮:冰醋酸=3:5:8:0.5, 等度洗脱, 流速 0.6BV/h。得到 TF、TF-3'-G 两个组分, 含量分别为 93%、85%。这是一种简单、有效的茶黄素类分离方法。

**关键词:** 茶黄素类; 聚酰胺; 分离纯化

## Study on Separation and Purification of Theaflavins by Polyamide

DING Yang-ping<sup>1,2</sup>, LIU Zhong-hua<sup>1,\*</sup>, HUANG Jian-an<sup>1</sup>

(1. Research Institution of Natural Product, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Department of Tea Science, Southwestern University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** This study investigated purification of theaflavins by polyamide. The optimal separation conditions were the volume of theaflavins 250 mg/50 ml polyamid, the solvent system including methanol, chloroform, acetone and glacial acetic acid with their respective ratio as 3:5:8:0.3, and speed of washout 0.6 BV/h. Two components of TF and TF-3'-G were obtained, and their concentrations were 93% and 85% respectively. This is a simple and effective method for separation and purification of the theaflavins.

**Key words** theaflavins; polyamide; separation and purification

中图分类号: Q946.841

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0055-03

茶黄素类(theaflavins, 简称TFs)是由儿茶素聚合而成的一类多羟基化合物, 目前国内外大量研究证实其具有抗肿瘤<sup>[1]</sup>、抗炎<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>、抗菌<sup>[5-6]</sup>及抗心血管疾病等作用, 是一类极具开发潜力的天然产物。茶黄素类是一类混合物, 其单体分离纯化难度大, 大部分药理实验仅限用低含量的茶黄素, 很多作用机理

无法得到解释, 限制了茶黄素类的进一步研究, 因此寻找一种简单、高效的茶黄素单体分离纯化方法显得尤为重要, 目前应用的方法较多, 有硅胶、NKA 大孔树脂、Sephadex LH-20 柱层析<sup>[7]</sup>及高速逆流色谱法<sup>[8-9]</sup>等。前者成本高, 分离时间长, 后者进样量小, 分离度有限。为此, 本实验采用聚酰胺分离茶黄素类, 以期有

收稿日期: 2006-10-09

\*通讯作者

基金项目: 湖南省科技攻关资助项目(03JZY3016)

作者简介: 丁阳平(1978-), 男, 博士研究生, 讲师, 主要从事茶叶及天然产物开发研究。

果也较为理想, 同时乙醇对吸附多酚的洗脱率较高。

研究进一步考察 XDA-5 树脂对多酚果胶的分离条件, 确定以 pH 值为 2.0 的提取液直接上样, 上样流速 3.0ml/min, 最大上样量 5.5BV, 用 60% 的乙醇溶液洗脱 2.5BV, 洗脱峰集中, 拖尾现象不明显。

## 参考文献:

[1] CODY V M E, HARBORNE J B. Plant Flavonoids in biology and medicine:biochemical, pharmacological and structure-activity relationship

[M]. Alan R Liss Inc, New York, 1986.

[2] SINGLETON V L, JOSEPH A, ROSSO J R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenum-dicphosphotungstic acid reagents[J]. J Sci food Agric, 1965(10): 144-148.

[3] 慕华容, 于淑萍. 食品分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 68-70.

[4] 何立芳, 章汝平. 树脂在果胶提取中的应用[J]. 龙岩师专学报: 自然科学版, 1991, 9(3): 127-128.

[5] 何立芳, 卢学传. 从柑橘皮中提取果胶[J]. 龙岩师专学报, 1990, 8(2): 136-138.

茶黄素类物质的分离纯化提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

茶黄素类(自制)含量85%。制备方法:用NKA大孔树脂,醇梯度洗脱回收60%乙醇浓缩即得。其HPLC图谱如图1所示。

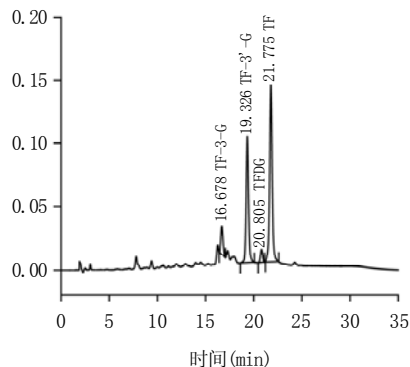


图1 茶黄素类高效液相色谱图

Fig.1 Chromatograms of theaflavins

聚酰胺(尼龙-6, 聚己内酰胺, 80~100目)。

层析柱;自动分部收集仪;旋转蒸发器;冷冻干燥机;高效液相色谱仪 日本Shimadzu公司。

乙腈(色谱纯);丙酮、氯仿、甲醇、冰醋酸(均为分析纯)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 聚酰胺层析柱分离茶黄素类单体的技术参数

柱床体积0.05L( $\phi$ 1.12cm $\times$ 20cm);上样量250mg;上样浓度20%;洗脱剂为甲醇:氯仿:丙酮:冰醋酸=3:5:8:0.5;等度洗脱;流速0.6BV/h;分部收集。

#### 1.2.2 工艺放大实验

柱床体积0.8L( $\phi$ 5cm $\times$ 100cm);上样量4.5g。其余同上。

#### 1.2.3 TFs分析色谱条件

色谱柱C<sub>18</sub> Shim-pack VP-ODS(4.6 $\times$ 150mm);流速0.9ml/min;柱温40℃;检测波长280nm;进样量10 $\mu$ l;流动相A:2%冰醋酸(HAC),B:乙腈:乙酸乙酯=7:1(V/V)。

表1 TFs洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution for TFs

时间(min)	A(%)	B(%)	持续时间(min)
0	82	18	26
26	70	30	2
28	82	18	5
33	stop		

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳洗脱剂的选择

本研究首先选用薄层色谱的展开剂为柱色谱的洗脱剂,即:甲醇:丙酮:冰醋酸=8:5:3,按1.2.1的条件进行洗脱,结果发现不到5h就将所用化合物全部洗脱下来,要在如此短的时间内分离出单体是不可能的。同时也说明此洗脱液的洗脱能力太强,进一步实验必须降低洗脱能力。本实验添加对茶黄素类溶解度较低的氯仿进行实验,洗脱剂甲醇-氯仿-丙酮-冰醋酸其比例为8:5:5:3,此时洗脱能力虽然降低了,但仍未达到分离效果,需要进一步降低洗脱能力即甲醇的比例。第三次选用甲醇-氯仿-丙酮-冰醋酸其比例为3:5:5:3,此时分离效果好,能收集到七个明显不同的色段,第一段大于10cm(与后段间距即前一段刚好出完时与后一段的距离,下同),第二段0.8cm,第三段1.2cm,第四段1.0cm,第五段2.8cm,第六段1.0cm。但洗脱时间过长(72h)。同时也发现由于冰醋酸的沸点高浓缩困难,虽然在完全没有冰醋酸的条件下,分离度要差,但发现分离度并不与冰醋酸的浓度成正比,所以第四次选择洗脱剂在提高丙酮比例的同时也降低冰醋酸的比例,这样既提高洗脱能力缩短时间,也减少浓缩困难。此次选用甲醇-氯仿-丙酮-冰醋酸其比例为3:5:8:0.5,同样能得到七个不同的色段,并且时间大大缩短(36h)。

### 2.3 最佳上样量的选择

以上述的溶剂系统为洗脱剂,按1.2.1的条件进行操作,上样量分别选用150、250、350、450mg,其中前两种上样量分离度好,条带清晰,上样量为350mg的条带模糊,交叉现象严重,上样量为450mg时已看不见条带,其各物质含量也大大降低。所以最佳上样量为250mg/50ml聚酰胺,最大不能超过300mg/50ml聚酰胺。

### 2.4 最佳流速的选择

此次实验分别选用了0.2、0.4、0.6、0.8BV/h四种流速来进行最佳流速的选择。结果发现前三种流速都能很好的分离茶黄素类,能见七个色带,但前两种分离时间过长,而0.8BV/h的流速不能达到有效分离,故0.6BV/h为最佳流速。

### 2.5 结果分析

按不同色段进行分部收集(由于前三段太少不做分离),再浓缩、冷冻干燥,经HPLC分析发现第七段为TF(如图2),含量93%,第六段为TF-3'-G(如图3),含量85%,其中第四、第五段仍为混合物,只是以某种物质为主,仍需要进一步分离。

### 2.6 放大实验

按1.2.2条件进行放大实验,上样4.5g,最终回

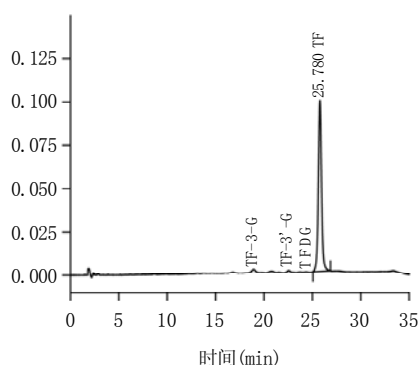


图2 TF HPLC 图谱

Fig.2 Chromatography of TF component by HPLC

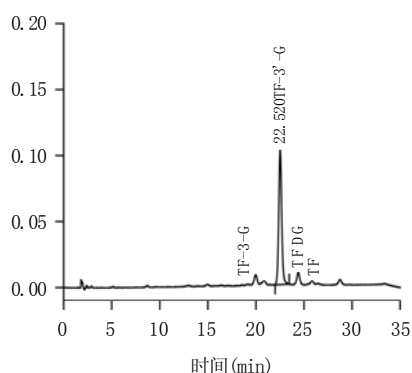


图3 TF-3'-G HPLC 图谱

Fig.3 Chromatography of TF-3'-G component by HPLC

收TF 1.52 g, 含量为93%, 得率33.78%, TF回收率69.85%; TF-3'-G 1.42 g, 含量85%, 得率31.56%, TF-3'-G回收率80.2%。

## 2.7 讨论

聚酰胺为尼龙-6(聚己内酰胺), 其既亲水又亲脂, 因此它既能分离水溶性物质又能分离脂溶性物质。茶黄素类是儿茶素的聚合物, 其比儿茶素具有更多的羟基, 更易与聚酰胺形成氢键, 结合更牢固。并且茶黄素类是弱极性色素, 其水溶性远不如儿茶素, 况且实验选用的流动相为甲醇-氯仿-丙酮-冰醋酸, 使整个条件更接近于反相色谱, 所以儿茶素比茶黄素类先洗脱下来。另外实验选用的是80~100目聚酰胺, 除了上述作用之外, 分子本身的大小也起到很大作用。这也使得分子

量较小的儿茶素先洗脱下来。TF后于TF-3'-G及TF-3-G, 证明后两者所带的没食子酰基增加了它们的极性, 而没食子酰基所带的羟基并没有使TF-3'-G、TF-3-G与聚酰胺结合, 可能它们是邻位羟基, 使吸附力减小的缘故<sup>[10]</sup>。

实验证实聚酰胺分离茶黄素类是可取的。最佳的分离条件为: 上样量250mg/50ml聚酰胺, 上样浓度20%, 洗脱剂为甲醇:氯仿:丙酮:冰醋酸=3:5:8:0.5, 等度洗脱, 流速0.6BV/h。此条件下, TF含量为93%, 得率33.78%, 回收率69.85%; TF-3'-G含量85%, 得率31.56%, 回收率80.2%。由于本实验材料的限制(TF、TF-3'-G含量高, 而TF-3-G、TFDG含量很少), 结果只得到TF、TF-3'-G, 希望下次能制备出TF-3-G、TFDG含量高的茶黄素类, 进一步研究TF-3-G、TFDG单体制备工艺。

## 参考文献:

- [1] CHUNG J K, HUANG C, MENG X, et al. Inhibition of activator protein 1 activity on cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved[J]. Cancer Research, 1999, 59(18): 4610-4617.
- [2] KATIIYAR S K, MUKHTAR H. Inhibition of phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate caused inflammatory responses in SENCAR mouse skin by black tea polyphenols[J]. Carcinogenesis, 1997, 18(10): 1911-1916.
- [3] 倪德江, 陈玉琼, 谢笔钧, 等. 绿茶、乌龙茶、红茶的茶多糖组成、抗氧化及降血糖作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(1): 57-60.
- [4] WEISBURGER J H. Proceedings of the first international symposium on tea and health[J]. Prev Med, 1992, 220: 193-275.
- [5] TODA M, OKUBO S, IKIGA H, et al. The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae*[J]. J Appl Bacter, 1990, 69(2): 109-114.
- [6] TODA M, OKUBO S, IKIGAI H, et al. The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1[J]. Appl Bacteriol, 1991, 70(2): 109.
- [7] LEA A G H, CRISPIN D J. The separation of theaflavins on Sephadex LH-20[J]. J Chromatography, 1971, 54: 133-135.
- [8] 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]. 茶叶科学, 2000(1): 40-44.
- [9] 江和源, 程启坤, 杜琪珍. 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(4): 30-35.
- [10] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社出版, 1983: 103-106.