普洱茶茶褐素中2种水溶性成分研究

董文明，谭 超，龚加顺*
(云南农业大学食品科学技术学院，云南 昆明 650201)

摘 要：从普洱茶中提取茶褐素，利用甲醇-水梯度分离、薄层色谱以及膜透析技术将茶褐素分离纯化出两种物质，并结合红外光谱、高效液相色谱、核磁共振、质谱等结构分析方法对两种物质进行鉴定。结果表明：化合物Ⅰ为含有大量多糖残基以半乳糖残基为主的含羧基的多羟基酚类高分子物质，化合物Ⅱ可能为磷酸甘酯钠$C_3H_8Na_2O_9P_2$。

关键词：茶褐素；组分；分离纯化；鉴定

Structural Identification of Components I and II from Pu-er Tea Theabrownins

DONG Wen-ming，TAN Chao，GONG Jia-shun*
(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract：In the present study, two components of the theabrownins extracted from Pu-er tea were obtained through gradient methanol-water extraction, thin-layer chromatography and dialysis, and both components were identified by infrared spectroscopy, high performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy. The results showed that compound I was a polyphenol polymer with carboxyl groups and a large number of polysaccharide residues (mainly galactose residues) and compound II may be $C_3H_8Na_2O_9P_2$.

Key words：theabrownins；component；isolation and purification；identification
中图分类号：TS272.5 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)23-0032-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201323008

茶色素是从茶叶中提取的以儿茶素为主的多酚类化合物[1]。经氧化、聚合而生成的水溶性色素混合物，主要包括橙黄色的茶黄素(theaflavin，TF)、棕红色的茶红素(thearubingin，TR)和棕褐色的茶褐素(theabrownine，TB)等[2-3]。茶色素被认为是茶叶中最有医疗保健价值的成分[4-5]。目前对普洱茶中提取氧化产物做的研究较少，特别是普洱茶多酚氧化产物中的茶红素、茶褐素等茶色素的研究甚少[6-7]。Millin[8]、Cattell[9]、Gong Jiashun[5]等做了较多的研究，但目前仅知道，茶褐素是一类分子差异极大的、复杂的高聚物，由多酚类、茶黄素、茶红素进一步氧化聚合转化而成[10]，其对普洱茶汤色红浓明亮、叶底褐色有重要影响[11]。本研究从普洱茶中提取茶褐素，利用甲醇/水梯度分离、薄层色谱以及膜透析技术将茶褐素分离纯化，并结合红外光谱、高效液相色谱、核磁共振、质谱等结构分析方法对普洱茶茶褐素活性类物质构成成分进行提取鉴定，为普洱茶茶褐素类物质结构组成研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普洱茶由勐海茶厂提供。

无水乙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、甲苯、丙酮、甲酸、甲醇、盐酸等，所有试剂均为分析纯； GF254硅胶板 青岛海洋化工有限公司；3000D透析袋。

1.2 仪器与设备

Bruker DRX500超导核磁共振 瑞士Bruker公司；VG AutoSpec 3000双聚焦三扇型有机磁质谱仪 英国Micromass公司；Bruker Tensor27傅里叶变换红外光谱仪 德国布鲁克公司；GC6890N/5975I安捷伦气相色谱/质谱联用仪 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 茶褐素提取

茶样加入70%乙醇-水浸泡4h(去除醇溶性色素)，将浸泡后的茶渣用85℃热水浸泡2h，过滤后取滤液并将其

收稿日期：2012-12-24
基金项目：国家自然科学基金项目(30760152；31260195；30960241)
作者简介：董文明(1973—)，男，副教授，硕士，主要从事分子营养学研究。E-mail：dongwenming88@sina.com
*通信作者：龚加顺(1971—)，男，教授，博士后，主要从事普洱茶研究。E-mail：gong199@163.com

浓缩，逐次反复用三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取，剩余水层加入无水乙醇至80%，收集沉淀冷冻干燥得粗制茶褐素。茶褐素理化分析方法参照文献[12-15]。测得茶褐素样品中，结合多糖含量(22.53±0.16)%、结合蛋白(16.40±0.96)%、茶色素(56.35±1.02)%。

1.3.2 两种化合物分离纯化[16]

1.3.2.1 化合物Ⅰ的分离纯化

茶褐素粗提物40%甲醇-水溶解部分(占35%)→37℃氮气干燥→再次40%甲醇-水溶解部分→37℃氮气干燥→蒸馏水溶解→Sevag法除蛋白→3000D透析膜透析→薄层层析(甲苯:丙酮:甲酸=3:3:1，*V*/*V*)→收集从下至上第2点得到化合物Ⅰ。

1.3.2.2 化合物Ⅱ的分离纯化

茶褐素粗提物60%甲醇-水溶解部分(占33%)→37℃氮气干燥→蒸馏水溶解→盐酸水解得沉淀物→乙醇溶解沉淀→薄层层析(*V*(甲苯):*V*(丙酮):*V*(甲酸)=3:3:1)→收集从下至上第3点得到化合物Ⅱ。

1.3.3 结构分析

1.3.3.1 IR分析

将茶褐素经KBr压片，于红外光谱仪上扫描分析，扫描范围500～4000cm^{-1}，分辨率为8cm^{-1}，扫描次数为16。

1.3.3.2 凝胶色谱(GPC)分析

采用凝胶色谱法测定茶褐素相对分子质量(M_r)分布特征。色谱条件：Mltrahydrogel Linear Column (7.8mm×300mm)柱；柱温为25℃；0.2mol/L NaCl盐水溶液为流动相；对照品溶液进样50μL，供试品溶液进样10μL，流速0.08mL/min，结果用GPC凝胶色谱软件处理。

1.3.3.3 HPLC分析

色谱柱：WondaSil C_{18}(4.6mm×150mm，5μm)；柱温：30℃；流动相：甲醇-水，1.0mL/min；进样量：10μL；检测波长：280nm；流动相梯度0～5min：甲醇10%＋水90%，5～40min内甲醇体积分数：从10%提升至90%，40～50min：水10%＋甲醇90%，50～52min内甲醇比例：从90%降至10%，52～60min甲醇10%＋水90%。

1.3.3.4 GC-MS分析

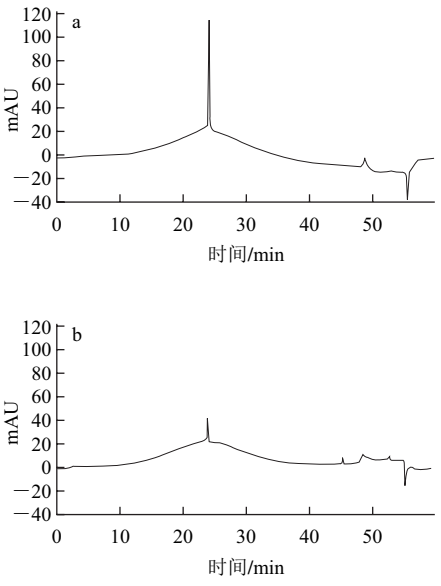
色谱条件DB-5石英毛细管柱(30m×0.25mm，0.25μm)；进样口温度250℃；流量1mL/min；升温程序195℃保持3min，8℃/min升温至250℃，250℃保持6min；质谱EI源，电离电压70eV；检测器FID检测器，温度220℃；进样量0.2μL，分流比30:1，扫描范围*m*/*z* 20～600。

1.3.3.5 核磁共振(NMR)分析

制备好的粉末状样品1mg左右，装入内径5mm专用核磁管中，用移液器吸取氘代试剂1mL，在核磁管中高度约4cm。室温上机Bruker DRX500测试，图谱采用Mest-ReC 4.9.9.9统计分析。

2 结果与分析

2.1 化合物Ⅰ光谱学特征及结构鉴定



a.检测波长254nm；b.检测波长280nm。

图1 化合物Ⅰ的HPLC梯度冲洗图谱

Fig.1 HPLC separation of compound Ⅰ by gradient elution

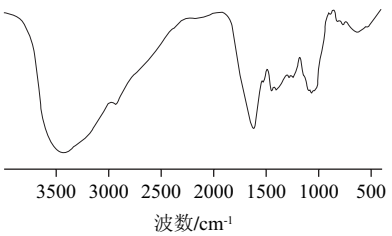
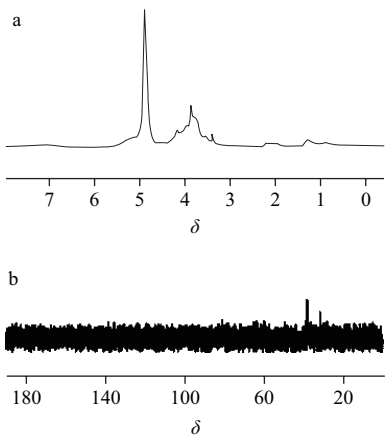


图2 化合物Ⅰ的红外图谱

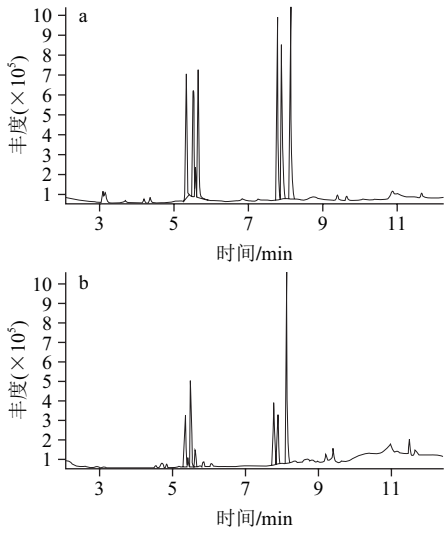
Fig.2 IR spectrum of compound Ⅰ



a. ^{1}H-NMR(D_2O，500MHz)；b. ^{13}C-NMR(D_2O，125MHz)。

图3 化合物Ⅰ的核磁共振图谱

Fig.3 NMR spectraof compound Ⅰ



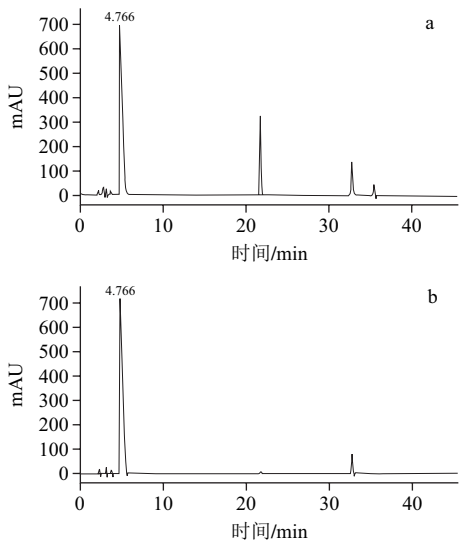
标准单糖出峰时间：核糖5.34min、阿拉伯糖5.52min、木糖5.66min、甘露糖7.79min、葡萄糖7.90min、半乳糖8.15min；化合物Ⅰ出峰时间：核糖5.36min、阿拉伯糖5.51min、木糖5.63min、甘露糖7.78min、葡萄糖7.89min、半乳糖8.145min。

图4 标准单糖(a)和化合物Ⅰ(b)水解后的GC-MS图谱

Fig.4 GC-MS chromatograms of standard mono-polysaccharide and hydrolyzed compound I

通过HPLC梯度冲洗样品纯度分析(图1)可以看出，化合物Ⅰ纯度相对较高，可进行结构分析。红外光谱分析(图2)，化合物Ⅰ含有O－H基团(最大吸收波长3424.02cm^{-1})、N－H基团(最大吸收波长3600～3000cm^{-1})；C－H基团(最大吸收波长2933.46cm^{-1})；C＝O(最大吸收波长1626.45cm^{-1})、芳香基团(最大吸收波长 1529.76cm^{-1})；COO^-基团(最大吸收波长 1408.46cm^{-1})；酚类C－O基团(最大吸收波长1245.43cm^{-1})；C－O－C基团(1095.93cm^{-1}、1070.19cm^{-1})图谱与糖苷的特征吸收相类似，为多羟基酚类物质，并含有羧基，可能与蛋白质相互结合。周斌星等[17]研究表明，普洱茶茶褐素形成后，部分能与蛋白质结合而沉淀于叶底，形成叶底的色泽。核磁共振(NMR)分析(图3)，^{1}H-NMR(D_2O，500MHz)δ=0.87～0.94，δ=1.18～1.28，δ=1.95～2.02，δ=3.38～3.54，δ=3.78～4.24；^{13}C-NMR(D_2O，125MHz)仅在δ=31.23，δ=37.75，δ=37.92出现化学位移，其余部分无法确定，从^{1}H-NMR和^{13}C-NMR图谱无法有效得出化合物Ⅰ结构，猜测其可能含有多糖基团的高分子类物质。通过对样品进行凝胶色谱分析(GPC)，发现化合物Ⅰ的重均相对分子质量(M_w)为4719，数均相对分子质量(M_n)为3070，聚合度(DP)为1.54。证明上面的推测，化合物Ⅰ为高分子物质。为分析化合物Ⅰ多糖基团糖分构成，将其真空酸水解(0.6mol/L HCl，120℃，真空水解18h)，衍生化后进行气质联用(GC-MS)分析(图4)[18]。可以看出，化合物Ⅰ中多糖基团主要由半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、核糖、葡萄糖和木糖组成，物质的量比构成分别为40.9:19.2:13.8:12.3:10.2:3.6。半乳糖最多，其次为阿拉伯糖、甘露糖、核糖、葡萄糖和木糖。分析原因可能由于普洱茶茶叶在发酵过程中，茶叶内多酚类物质的氧化产物与茶多糖在长时间的高温湿热作用下(35～60℃)发生了偶联反应所致。这与前人研究相一致[19]。综上所述，可看出，化合物Ⅰ为含有大量多糖残基以半乳糖残基为主的含羧基的多羟基酚类高分子物质。

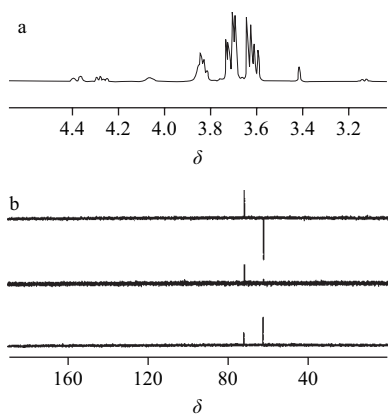
2.2 化合物Ⅱ光谱学特征及结构鉴定



a.纯化前样品HPLC图；b.纯化后化合物II的HPLC图。

图5 化合物Ⅱ的HPLC梯度冲洗图谱

Fig.5 HPLC separation of compound Ⅱ by gradient elution



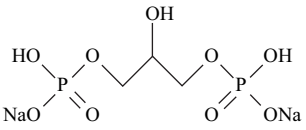
a. ^{1}H-NMR(D_2O，500MHz)；b. ^{13}C-NMR(D_2O，125MHz)。

图6 化合物Ⅱ的核磁共振图谱

Fig.6 NMR spectra of compound Ⅱ

TLC分离后得一粗组分，通过HPLC梯度冲洗样品纯度分析(图5a)可以看出，该组分的主成分峰为保留时间4.766min，利用半制备HPLC纯化。得到该主要组分化合物Ⅱ(图5b)，根据核磁共振分析(图6)，^{1}H-NMR(D_2O，500MHz)：δ=3.57～3.68(2H，m)，δ=3.79(1H，m)，δ=3.57～3.68(2H，m)；^{13}C-NMR(D_2O，125MHz)：

δ=62.5(CH_2)，δ=72.1(CH)，δ=62.5(CH_2)可知该化合物中有一个亚甲基和两个次甲基两种结构单元，表明化合物Ⅱ为一对称结构。结合质谱分析(图6)，FAB-MS：251[M－1]，与化合物$C_3H_8O_9P_2$一致，鉴定该化合物Ⅱ为磷酸甘酯，其以钠盐形式存在(图7)。从普洱茶茶褐素中发现磷酸甘酯物质，分析原因可能由于其是生物膜的重要组成部分。目前其在茶叶中的生物活性功效还有待于进一步研究。



$C_3H_8Na_2O_9P_2$(M_w295.94)

图7 化合物Ⅱ分子结构

Fig.7 Molecular formula of compound Ⅱ

3 结 论

分离得到普洱茶茶褐素中两种水溶性组分，化合物Ⅰ为含有大量多糖残基以半乳糖残基为主的含羧基的多羟基酚类高分子物质，化合物Ⅱ为磷酸甘酯钠$C_3H_8Na_2O_9P_2$。

参考文献：

[1] 陈宗道. 茶叶化学工程学[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 1999: 108-110.

[2] 杨新河, 王丽丽, 黄建安, 等. 普洱茶茶褐素的分级及相关性质初步研究[J]. 茶叶科学, 2011, 31(3): 187-194.

[3] SANO M, TAKENAKA Y, KOJIMA R, et al. Effects of Pu-erh tea on lipid metabolism in rats[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(1): 221-228.

[4] 李宝才, 龚加顺, 张惠芬, 等. 腐植酸与普洱茶茶色素[J]. 腐植酸, 2007(1): 19-26.

[5] GONG Jiashun, PENG Chunxiu, CHEN Ting, et al. Effects of theabrownin from Pu-erh tea on the metabolism of serum lipids in rats: mechanism of action[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): 182-189.

[6] 易恋, 黄建安, 刘仲华. 普洱茶多酚与茶褐素研究进展[J]. 中国食物与营养, 2009(12): 29-31.

[7] 王栋, 康健. 茶多酚的功效、提取和应用前景[J]. 新疆大学学报, 2006, 24(2): 217-221.

[8] MILLIN D J, WAINE D S, DIX P L. Separation and classification of the brown pigment of aqueous of black tea[J]. J Sci Food Agric, 1969, 20(5): 296-302.

[9] CATTELL D J, NURSTEN H E. Separation of thearubigins on Sephadex LH-20[J]. Phytochemistry, 1977, 16: 1269-1272.

[10] 谭超, 郭刚军, 李宝才, 等. 普洱茶茶褐素理化性质与光谱学性质研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(4): 53-58.

[11] 龚加顺, 周红杰, 张新富, 等. 云南晒青绿毛茶的微生物固态发酵及成分变化研究[J]. 茶叶科学, 2005, 3(4): 126-132.

[12] EDWIN H. Thoughts on theatubigins[J]. Phytochemistry, 2003, 64(1): 61-73.

[13] LIANG Yuerong, ZHANG Lingyun, LU Jianliang. Study on chemical estimation of Pu-erh tea quality[J]. Sci Food Agric, 2005, 85: 381-390.

[14] 陆松侯. 茶叶审评与检验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 55-70.

[15] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 126-147.

[16] 谭超, 彭春秀, 高斌, 等. 普洱茶茶褐素类主要组分特征及光谱学性质研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(4): 1051-1056.

[17] 周斌星, 高林瑞. 普洱茶茶色素研究进展[J]. 茶叶科学技术, 2005(3): 8-9.

[18] 白娣斯, 张静. 气相色谱分析多糖衍生化方法的研究与比较[J]. 食品工业科技, 2011(2): 322-326.

[19] 龚加顺, 陈一江, 彭春秀, 等. 普洱茶发酵过程中不同添加物对茶褐素及其形成机制的影响[J]. 茶叶科学, 2010, 30(2): 101-108.