

茶多酚的色谱分析法

魏 泱, 丁明玉

(清华大学化学系, 北京 100084)

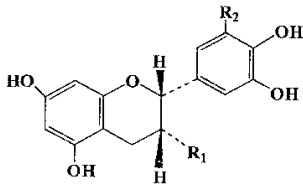
摘要 对茶多酚的主要成分——儿茶素的色谱分析法进行了综述。重点介绍了应用最多的反相高效液相色谱法, 同时简述了平板色谱法、气相色谱法以及目前出现的新的色谱分析方法。

关键词 色谱法; 平板色谱法; 气相色谱法; 高效液相色谱法; 茶多酚; 儿茶素

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2000)01-0035-04

1 前言

茶多酚是一类存在于茶树中的多羟基酚类化合物的简称, 尤以茶叶中的质量分数为最高, 干茶叶中茶多酚的质量分数在 30% 左右。茶多酚主要包括儿茶素类(黄烷酮类)、黄酮、黄酮醇类、花青素类、花白素类和酚酸及缩酚酸类。其中儿茶素类是茶多酚的主体组分, 约占茶多酚总量的 90% 左右。儿茶素的基本结构如下:



茶多酚是茶叶中最具生物活性的成分, 其中的儿茶素尤为突出。儿茶素在很大程度上决定了绿茶的苦味和涩味。目前已发现儿茶素具有良好的抗氧化能力^[1, 2], 研究结果证明儿茶素的抗氧化机理是由于其 B 环可被氧化为邻醌结构^[3]; 儿茶素还具有诸多药效, 如抗肿瘤^[4, 5]、抗诱变^[6]、预防龋齿^[7]等。因此儿茶素已成为一类重要的食品添加剂和药物。

目前研究茶多酚的文章很多, 其中对儿茶素研究得最仔细、最全面, 因此本文着重介绍儿茶素的色谱分析方法。在早期的研究中, 非色谱法只能测定茶多酚的总量, 直到 50~60 年代色谱法才用于研究茶多酚。目前, 儿茶素的分析方法中以高效液相色谱法(HPLC)为主, 该法可以在十几分钟内同时分离出多种儿茶素。随着色谱技术的发展, 新的色谱方法也逐渐用于茶多酚的分析。

2 色谱分析法

2.1 平板色谱法

最初分析儿茶素是为了研究其在茶树不同部位的分布情况以及在黑茶制作过程中儿茶素的反应变化情况。为此, Roberts 等人^[8]以及 Bhatia 和 Ullah^[9]用沸腾的甲醇萃取粉碎的绿茶茶叶, 用二维纸色谱法(PC)分离儿茶素。他们将分离后得到的斑点在氨气气氛下用紫外灯照射, 对那些可发出紫色荧光的斑点, 他们用冷水将其洗脱, 并在 275 nm 处测定溶液的吸光。Forrest 和 Bendall^[10]使用了二维薄层色谱法(TLC), 他们使用纤维素薄层, 在一个方向上用水或体积分数为 5% 的甲醇水溶液作展开剂, 在另一方向上用 1-丁醇-乙酸-水(体积比为 4:1:5)的混合溶液作展开剂, 将紫外光谱法和儿茶素特有的颜色反应结合起来检测儿茶素。相对于其它色谱方法, 平板色谱法简便、成本低、操作方便, 但其种类不多, 定量不够准确。在目前的研究中, TLC 法主要使用正相薄层板^[11], 根据各类茶多酚混合物中分子聚合程度的不同, 将单茶多酚类、寡聚茶多酚类和多聚茶多酚类分离, 单独用于儿茶素分离的文章极少。

2.2 气相色谱法

与 PC 和 TLC 相比, GC 法快速, 定量分析方便。Pierce 等人^[12]采用三甲基硅烷衍生分析儿茶素。Collier 和 Mallo^[13]进一步改进了 GC 法, 其进步表现在: 使用乙酸乙酯萃取进行预处理, 使用三甲基氯硅烷作为衍生剂, 使儿茶素衍生更完全; 采用程序升温法, 只用一个内标物就可以实现多种儿茶素的同步分析。使用 GC 法分析儿茶素时, 为了排除其它茶叶成分的干扰, 必须使用溶剂萃取进行预处理, 而

收稿日期: 1999-02-09, 修回日期: 1999-05-24

作者简介: 魏泱(1975-), 男, 硕士。E-mail: wei986051@263.net。

通讯联系人: 丁明玉(1960-), 男, 博士, 副教授。电话(010) 62781687, 传真(010) 62781106。

且需经衍生化使儿茶素气化。目前,GC法在儿茶素分析中使用得不多。

2.3 液相色谱法

液相色谱法是最早用来将儿茶素从绿茶中进行预分离的方法。有人用沸水和水-丙酮混合液将儿茶素从绿茶中萃取后,在 Sephadex LH-20 等柱上进行分离^[14,16]。

由于反相 HPLC 法具有样品预处理简单、色谱柱的选择范围较宽、流动相的种类及比例可任意变化、分析时间较短和检测方式多样等优点,所以发展特别迅速。1976 年, Hoefler 和 Coggor^[17]将反相 HPLC 法用于儿茶素的分析。他们使用丙酮-水混合液对绿茶进行预处理,萃取出儿茶素,除去丙酮后直接进样,所使用的流动相为乙酸-甲醇-DMF(*N,N*-二甲基甲酰胺)-水(体积比为 1:2:40:157),色谱柱为 μ Bondapak C₁₈(10 μ m, 30 cm \times 4 mm i. d.) 紫外检测器在 280 nm 处检测,在 35 min 内成功地分离了表没食子儿茶素(EGC, epigallocatechin)、儿茶素(+C, +catechin)、表儿茶素(EC, epicatechin)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG, epigallocatechin gallate)、表儿茶素没食子酸酯(ECG, epicatechin gallate)和咖啡因。此后,在对儿茶素分析研究中,反相 HPLC 法不断得到改进。本文将从以下几个方面论述这些进展。

(1) 流动相

Hirose 等^[18]在 Hoefler 等研究的基础上,用乙腈代替甲醇作流动相。日本研究者^[19]采用丙酮-四氢呋喃(THF)-水(体积比为 12:10:78)作流动相。马卿云等^[20]采用了反相梯度洗脱法,其流动相 A 为醋酸-甲醇-水(体积比为 1:1:98),B 为醋酸-甲醇-DMF-水(体积比为 1:1:50:48),线性梯度为 20%B-100%*t*(030 min),100%*t*(3040 min),反梯度 100%B-20%*t*(4045 min),然后在 20%B 下平衡 10 min,在 21 min 内检出了中国山茶中的 EGC, +C, EC, EGCG, ECG 和咖啡因、可可碱、没食子酸、茶碱。由于梯度洗脱法对儿茶素的洗脱能力更强,此后众多研究者采用了该方法。人们发现,当流动相呈酸性时,可改善流出组分的峰形。Lunt^[21]采用如下的流动相:A 为 50 mol/L 磷酸铵-磷酸缓冲液(pH 2.5),B 为乙腈,梯度为 5%B-25%*t*(050 min)。Treutter^[22]采用的流动相为 A 5% 醋酸, B: 甲醇。熊凤麒等人^[23]采用流量梯度洗脱,其流动相为醋酸-甲醇-DMF-水(体积比为 2:3:35:160),流量梯度为 1.5 mL/min^t(016 min),16 min 后逐步增至 2 mL/min,分

析时间为 46 min。Shao 等^[24]采用的流动相为 A 5 mL/L 的醋酸水溶液, B 300 mL/L 的乙腈和 5 mL/L 的醋酸水溶液,梯度为 100%A-100%*t*(035 min),流量为 1 mL/min,在 17 min 内分离出了 5 种儿茶素。Moiani 等^[25]将组分梯度洗脱和流量梯度洗脱结合起来,其流动相组成为 A:去离子水(用磷酸调 pH 至 2.8), B:甲醇,其梯度洗脱程序为:流速 1.0 mL/min,13%B-60%*t*(011 min);流速 1.00.8 mL/min(1114 min);流速 0.8 mL/min,60%B-80%B(1434 min),20 min 内在血浆中检出了 5 种儿茶素。在这些研究中,只能检出部分儿茶素,一般都是如前所述的 5 种。Lin 等^[26]采用等度洗脱和梯度洗脱两种方式分析茶叶。其等度洗脱的流动相为甲醇-水-甲酸(体积比为 9.5:80.2:0.3),在 60 min 内分离了 EGC, +C, EGCG, EC, 没食子儿茶素没食子酸酯(GCG, galocatechin gallate)和 ECG 等 6 种儿茶素,其检测灵敏度达到 1.5 mg/L;其梯度洗脱的流动相 A 为甲醇-甲酸-水(体积比为 20:0.3:79.7), B 为甲醇-甲酸(体积比为 99.7:0.3),梯度为 100%A(010 min),100%A-90%A(1115 min),90%A-70%A(1635 min),70%A(3650 min),在 36 min 内检出了 EGC, +C, EGCG, EC, GCG, ECG 和儿茶素没食子酸酯(CG, catechin gallate)等 7 种儿茶素。他们比较了等度洗脱与梯度洗脱两种方法后认为,由于梯度洗脱后需用流动相将柱子恢复到最初的平衡状态,虽然其洗脱能力强,但其总计花费的时间更多,而等度洗脱操作更方便,更适合于系统地分析各类茶叶。Goto 等^[27]采用流动相 A 为水-乙腈-体积分数为 85%的磷酸(体积比为 95.45:4.5:0.05), B 为水-乙腈-体积分数为 85%的磷酸(体积比为 49.95:50:0.05),梯度为 90%A(05 min),90%A-70%A(68 min),70%A(810 min),70%A-20%A(1115 min),20%A(1620 min),在 17 min 内同时分离出了没食子儿茶素(GC, galocatechin), EGC, +C, EC, EGCG, GCG, ECG, CG 等 8 种儿茶素和咖啡因。Tsuchiya 等人^[28,29]将体液样品预处理后,采用流动相 A 为乙腈-三氟乙酸-水(体积比为 10:0.3:89.7), B 为乙腈-水(体积比为 30:70),梯度洗脱 100%A-25%A(017 min),同样在 17 min 内检出 8 种儿茶素。Dalluge 等^[30]研究了反相 HPLC 法分离绿茶中儿茶素时色谱柱和梯度洗脱系统的选择。他们认为含酸的流动相与去活化的单体 C₁₈柱的使用可显著提高色谱分离效率。最近香港研究者^[31,32]发现,儿茶素在沸水中可保持较长时间的稳定,而在碱性条件下不稳定。

他们进一步研究又发现,儿茶素在 $\text{pH} < 4$ 时很稳定,抗坏血酸的存在可显著增强儿茶素的稳定性。他们的研究成果可帮助研究者选择流动相。

(2) 样品处理方式与检测方式

将不同的样品处理方式和检测方式适当地组合起来,可以提高茶多酚的检测灵敏度。多数研究者采用沸水提取的样品处理方式,此法简便可靠。在某些情况下,为了增强检测灵敏度,也可采取特殊的样品处理方式。对于分离出的儿茶素的检测方式也是多种多样的。很多研究者^[17, 20, 23, 25]采用紫外检测器,并在儿茶素的最大紫外吸收波长处(280 nm)检测。马卿云等^[20]所用的方法测定儿茶素的灵敏度达 $30 \mu\text{g/L}$;Maiani 等^[26]所采用方法的检测限约为 $0.5 \sim 1.3 \text{ mg/L}$;Goto 等^[27]在 231 nm 处检测儿茶素,检测限为 $0.2 \mu\text{g/L}$;Dalluge 等^[30]则选在 210 nm 处检测。Risch 等^[33]采用苯甲酰氯在吡啶溶剂中使儿茶素发生苯甲酰化反应,经 HPLC 分离后,使用二极管阵列紫外检测器在 231 nm 处对儿茶素的苯甲酰化产物进行检测。他们发现样品经衍生后,检测灵敏度提高了 $10 \sim 20$ 倍,检测限可以达到 $0.2 \mu\text{g/g}$ 。Tsuchiya 等^[28, 29]使用二苯基硼酸盐作络合剂,在碱性条件下与儿茶素形成络阴离子,再以四丁基铵作为反离子,与儿茶素络阴离子形成离子对,该离子对可被萃取入有机相,利用三氟乙酸水溶液可将儿茶素反萃取回水相。如此预处理使体液中的儿茶素更易被检测。他们使用二极管阵列紫外检测器,得到 mg/L 级的检测限。其他一些研究者^[34, 37]也采用了二极管阵列紫外检测器。Bronner 等^[37]发现流动相中加入醋酸盐可使检测在低波长下进行。他们以 210 nm 为检测波长,并发现在 210 nm 处检测信号是长波长(280 nm)处的数倍,显著提高了信噪比。Lunte^[21]将紫外可见分光检测器和电化学检测器结合起来,使分离出的峰能更准确地定性。Hayes 等^[38, 39]比较了紫外检测器和电化学检测器在检测酚类化合物时的优劣。他们认为电化学检测器在检测该类化合物时灵敏度更好,选择性更强。Madigan 等^[40]采用了双电极电化学检测器,使儿茶素的检测灵敏度达到 $0.1 \sim 5.0 \text{ mg/L}$,与单电极电化学检测器相比,选择性进一步提高,峰鉴别能力更强。Treutter^[22]采用衍生化试剂 4-N,N'-二甲胺-肉桂醛对儿茶素进行柱后衍生,在 640 nm 处检测其衍生产物(-)EC 比其它酚类化合物的灵敏度高 20040 000 倍。Ho 等^[41]采用 Al_2O_3 螯合法萃取 + C,使用荧光检测器,检测下限和定量下限分别为 1

$\mu\text{g/L}$ 和 $20 \mu\text{g/L}$ 。Poorf^[42]以及 Cheynier^[43]采用 LC-电喷雾离子化质谱联用法,使各分离组分结构得到确定。

正相 HPLC^[44]类似于目前采用的正相薄层板 TLC 法,主要根据各类茶多酚混合物中分子聚合程度不同来将单茶多酚类、寡聚茶多酚类和多聚茶多酚类分离,单独用于儿茶素的分离的文章极少。

2.4 其它色谱法

随着色谱技术的发展,一些新的色谱方法渐渐得到应用。Horie 等^[45]采用毛细管区带电泳(CZE)分析绿茶。他们采用了熔融的石英毛细管柱,以四硼酸钠缓冲液调 pH 为 8.0,用紫外检测器在 200 nm 处检测,在 10 min 内检出了 EC, ECG, EGC, + C, EGCG 等 5 种儿茶素以及咖啡因、茶氨酸和维生素 C。Tomás-Barberán 等^[46]比较了分析多酚类化合物时 CE 与 HPLC 的优劣。他们认为 HPLC 在准确性和灵敏度方面比 CE 更有优势,而且 HPLC 可用于样品的制备和半制备, CZE 的分离效率更高,可解决反相 HPLC 分离多酚类化合物时出现的峰展宽现象,而且由于 CE 所需样品量少,分析速度快,在实际样品分析中实用性和经济性更有优势。Larger^[47]采用胶束电动色谱法,它在某些方面体现出了比 HPLC 更优越之处,比如某些物质更易分开,但其毛细管壁对分离物质有吸收是其有待解决的问题。Yoshida 等^[48]采用了逆流色谱法分析多酚类化合物。他们认为逆流色谱法可避免 HPLC 中固定相对部分分析物的吸附及峰拖尾现象。

在儿茶素的色谱分析法中,反相 HPLC 已成为目前使用最广泛、技术最成熟的方法。一些新方法体现出了自己的独特之处,但其技术有待完善。

参 考 文 献

- 1 Salah N, Miller N J, Paganga G et al. Arch Biochem Biophys, 1995, 322: 339-346
- 2 Vinson J A, Dabbagh Y A, Serry M M et al. J Agric Food Chem, 1995, 43: 2800-2802
- 3 Sawai Y, Sakata K. J Agric Food Chem, 1998, 46: 111-114
- 4 Shi S T, Wang Z Y, Smith T J et al. Cancer Res, 1994, 54: 4641-4647
- 5 Lin Y L, Juan I M, Chen Y L et al. J Agric Food Chem, 1996, 44: 1387-1394
- 6 Wang Z Y, Cheng S J, Zhou Z C et al. Mutat Res, 1989, 223: 273-289
- 7 Otake S, Makimura M, Kuraki T et al. Caries Res, 1991, 25: 438-443

- 8 Roberts E A H , Cartwright R A , Oldschool M. J Sci Food Agric , 1957 , 8 :72-80
- 9 Bhatia I S , Ullah M R. J Sci Food Agric , 1968 , 19 :535-542
- 10 Forrest G I , Bendall D S. Biochem J , 1969 , 113 :741-755
- 11 Sun B , Leandro C , Jorge M et al. J Agric Food Chem , 1998 , 46 :1390-1396
- 12 Pierce A R , Graham H N , Glassner S et al. Anal Chem , 1969 , 41 :298-302
- 13 Collier P D , Mallows R. J Chromatogr , 1971 , 57 :29-45
- 14 Saijo R. Agric Biol Chem , 1982 , 46 :1969-1970
- 15 Nonaka G I , Kawahara O , Nishioka I. Chem Pharm Bull , 1983 , 31 :3906-3914
- 16 Hashimoto F , Nonaka G , Nishioka I. Chem Pharm Bull , 1989 , 37 :77-85
- 17 Hoefler A C , Coggon P. J Chromatogr , 1976 , 129 :460-463
- 18 Hirose S , Tamada S. Chaguo Kenkyu Hokoku(Japan) , 1979 , 50 :51-55
- 19 Hara M. JP60013780. 1985
- 20 马卿云 , 王小霞. 分析测试通报 , 1988 , 7 :2527
- 21 Lunte S M. J Chromatogr , 1987 , 384 :371-382
- 22 Tretter D. J Chromatogr , 1989 , 467 :185-193
- 23 熊凤麒 , 袁吕江 , 吕才有. 色谱 , 1993 , 11(4) :2512-2514
- 24 Shao W F , Powell C , Clifford M N. J Sci Food Chem , 1995 , 69 :535-540
- 25 Maiani G , Serafini M , Salucci M et al. J Chromatogr B , 1997 , 692 :311-317
- 26 Lin J K , Lin C L , Liang Y C et al. J Agric Food Chem , 1998 , 46 :3635-3642
- 27 Goto T , Yoshida Y , Kiso M et al. J Chromatogr A , 1996 , 749 :295-299
- 28 Tsuchiya H , Sato M , Kato H et al. J Chromatogr B , 1997 , 703 :253-258
- 29 Tsuchiya H , Sato M , Kato H et al. Talanta , 1998 , 46 :717-726
- 30 Dalluge J J , Nelson B C , Thomas J B et al. J Chromatogr A , 1998 , 793 :265-274
- 31 Zhu Q Y , Zhang A , Tsang D et al. J Agric Food Chem , 1997 , 45 :4624-4628
- 32 Chen Z Y , Zhu Q Y , Wong Y F et al. J Agric Food Chem , 1998 , 46 :2512-2516
- 33 Risch B , Galensa R , Herrmann K. J Chromatogr , 1988 , 448 :291-295
- 34 Opie S C , Robertson A , Clifford M N. J Sci Food Agric , 1990 , 50 :547-561
- 35 Bailey R G , McDowell I , Nursten H E. J Sci Food Agric , 1990 , 52 :509-525
- 36 Bailey R G , Nursten H E. J Chromatogr , 1991 , 542 :115-128
- 37 Bronner W E , Beecher G R. J Chromatogr A , 1998 , 805 :137-142
- 38 Hayes P J , Smyth M R , Mcmurrough I. Analyst , 1987 , 112 :1197-1204
- 39 Hayes P J , Smyth M R , Mcmurrough I. Analyst , 1987 , 112 :1205-1207
- 40 Madigan D , Mcmurrough I , Smyth M R. Analyst , 1994 , 119 :863-868
- 41 Ho Y , Lee Y L , Hsu K Y. J Chromatogr B , 1995 , 665 :383-389
- 42 Poon G K. J Chromatogr A , 1998 , 794 :63-74
- 43 Cheyner V , Doco T , Fullrand H et al. Analysis Magazine , 1997 , 25 :M32-M37
- 44 Rigaud J , Escribano-Bailon M T , Prieur C et al. J Chromatogr A , 1993 , 654 :225-260
- 45 Horie H , Mukai T , Kohata K. J Chromatogr A , 1997 , 758 :332-335
- 46 Tomás-Barberán F A , García-Viguera C. Analysis Magazine , 1997 , 25 :M23-M25
- 47 Larger P J , Jones A D , Dacombe C. J Chromatogr A , 1998 , 799 :309-320
- 48 Yoshida T , Hatano T. Analysis Magazine , 1997 , 25 :M20-M22

Chromatographic Analysis of Tea Polyphenols

WEI Yang , DING Ming-yu

(*Department of Chemistry , Tsinghua University , Beijing 100084 , China*)

Abstract: A review is presented about the chromatographic analysis of the polyphenols. Some of the chromatographic methods such as plate chromatography , gas chromatography , reversed-phase high performance liquid chromatography and some new chromatographic methods are introduced.

Key words: chromatography ; plate chromatography ; gas chromatography ; high performance liquid chromatography ; tea polyphenols ; catechin