

毛细管电泳法同时分析茶黄素类和儿茶素类化合物

夏文娟¹, 张丽霞¹, 王日为², 史作安¹, 贾明¹

(1. 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018;

2. 山东农业大学化学与材料科学学院, 山东 泰安 271018)

摘要 :为了建立一种快速、准确、简便的同时分析茶黄素类和儿茶素类化合物的毛细管电泳方法以满足茶黄素体外氧化制备过程监测和茶多酚酶促氧化动力学研究的需要,研究了毛细管电泳同时分析4种茶黄素类和6种儿茶素类化合物的最佳分析条件,并将建立的方法进行应用评价。结果表明:以含有200 mmol/L H₃BO₃(pH 7.7)、10 mmol/L KH₂PO₄、9 mmol/L β-环糊精和27.5%乙腈为电泳介质,在电压25 kV、柱温30℃下分离和200 nm波长处检测,可在8 min内将10种待测组分全部分离,且各组分的浓度与峰面积呈良好的线性关系,相关系数 r 为0.9907~0.9998,检测限为0.39~0.88 μg/mL,各组分的加标回收率为91.5%~113.5%,相对标准偏差小于5%。

关键词 :毛细管电泳;茶黄素类;儿茶素类

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2006)06-0592-05 栏目类别:研究论文

Simultaneous Analysis of Theaflavins and Catechins by Capillary Electrophoresis

XIA Wenjuan¹, ZHANG Lixia¹, WANG Riwei², SHI Zuohan¹, JIA Ming¹

(1. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. College of Chemistry and Science of Material, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract : In order to monitor the changes of theaflavins and catechins during the process of tea polyphenol oxidation, a rapid, accurate, sensitive and convenient analytical method was established. The optimum analytical conditions for simultaneous analysis of four theaflavins (TFs) and six catechins by capillary electrophoresis were investigated. The electrolyte solution consisted of 200 mmol/L boric acid (pH 7.7), 10 mmol/L potassium dihydrogenphosphate, 9 mmol/L β-cyclodextrin and 27.5% acetonitrile. The experimental conditions of the instrument were selected as follows: voltage 25 kV, column temperature 30℃, and detection wavelength 200 nm. Ten constituents could be separated from each other completely within 8 min and each one had a good linear relationship between its peak area and corresponding concentration ($r = 0.9907 - 0.9998$). Furthermore, their detection limits were from 0.39 to 0.88 μg/mL, the mean recoveries varied from 91.5% to 113.5%. The relative standard deviations were less than 5%. All the above results showed that the developed method is especially suitable for the analysis of theaflavins and catechins.

Key words : capillary electrophoresis (CE); theaflavins; catechins

茶黄素类化合物(theaflavins, TFs)是指具有苯并卓酚酮结构的一类化合物,它最先在红茶中提取分离得到,随后通过体外模拟氧化(酶促氧化和化学氧化)茶多酚阐明了其形成机理。TFs不仅是红茶的重要品质成分^[1],而且还是一种良好的天然药物和保健品原料^[2-3],具有良好的市场发展前景。近年来,制备高纯度的TFs产品以满足市场需求成为茶叶科技工作者关注的热点。由于红茶中TFs

的含量仅有0.3%~1.5%^[4],提取分离的效率低,且TFs产品的纯度不高,所以目前人们更倾向于采用体外酶促氧化茶多酚来制备TFs。

为了获得高的TFs产率甚至定向合成某种茶黄素类单体,不仅需要优化反应条件(底物浓度、酶的活性、反应的温度、pH、时间等)进行优化研究,对反应过程进行监测,而且迫切需要探明底物中各儿茶素类组成比例的变化对产物组成以及产率的影响。

收稿日期:2005-12-19

第一作者:夏文娟,女,硕士研究生,E-mail:teaxj@sdau.edu.cn.

通讯联系人:张丽霞,女,博士,教授,研究方向为茶树生理生化,Tel (0538)8249983,E-mail:lxzhang@sdau.edu.cn.

基金项目:山东省教育厅重点项目(No. J02H04).

因为在 TFs 合成的酶促氧化反应体系中,其反应底物和产物都不是单一组分而是多组分,加之在实际生产中通常采用来源广、组成差异大的混合底物(茶多酚)和未经纯化的粗酶,使得底物与产物之间的关系非常复杂。为满足上述研究的需要,建立一种快速、简便、准确且能同时测定反应底物(儿茶素类)和产物(TFs)含量和组成变化的分析方法非常必要。分光光度法虽然简便、快速,但仅能分析儿茶素类和 TFs 的总量^[5]。高效液相色谱法(HPLC)虽然可以同时测定儿茶素类和 TFs 各组分含量,且准确度高、重复性好,但分析一个样品通常需 30~60 min^[5],不能很好地满足大批量样品快速分析的要求。

近年来,毛细管电泳分析方法(CE)因其具有分析速度快、灵敏度高和所需样品量少的特点^[6]而得到广泛应用,在化学反应动力学研究领域更有其独特的优势,并形成了诸如“电泳中介微分析”^[7]的酶活性及底物的在线分析新技术。虽然目前国外已有应用 CE 同时分析茶叶产品中的 TFs 和儿茶素类的研究^[8],但还存在表没食子儿茶素与表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯与表儿茶素没食子酸酯分离度较小,组分出峰时间相对集中(3.5~5.0 min 范围内出峰)的问题,其分析条件有待进一步优化。此外,目前还未见该方法应用于茶多酚酶促氧化制备茶黄素过程的监测以及反应动力学研究的报道。本文在进一步优化 CE 同时检测 TFs 和儿茶素类化合物分析条件的基础上,将其应用于监测茶多酚酶促氧化生成茶黄素类化合物的过程,为茶多酚氧化制备茶黄素类的反应动力学研究以及反应底物与产物相互关系的研究提供了一种快速、准确、灵敏、简便的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE System 5000 型高效毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司);弹性石英毛细管柱(50 μm \times 47 cm,有效长度 40 cm,河北永年锐沓色谱公司);PHSJ-4A 型 pH 计(上海雷磁公司)。

乙腈(HPLC 纯), H_3BO_3 、 KH_2PO_4 均为分析纯, β -CD(上海伯奥生物科技有限公司),0.1 mol/L HCl,0.1 mol/L NaOH,超纯水。

儿茶素类和茶黄素类化合物标样购自 Sigma 公司。各儿茶素类组分的纯度分别为:儿茶素(catechin,C)98%,没食子儿茶素(gallocatechin,GC)98%,表儿茶素(epicatechin,EC)98%,表没食子儿茶素(epigallocatechin,EGC)98%,表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate,ECG)98%,表没食子儿

茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate,EGCG)95%。茶黄素类化合物混合标样的纯度为 80%,其中茶黄素(theaflavin,TF)9.78%,茶黄素-3-没食子酸酯(theaflavin-3-gallate,TF-3-G)13.13%,茶黄素-3'-没食子酸酯(theaflavin-3'-gallate,TF-3'-G)22.99%,茶黄素双没食子酸酯(theaflavin digallate,TFDG)34.10%。

1.2 溶液配制

1.2.1 电泳介质

配制 400~600 mmol/L 的 H_3BO_3 (pH 6.5~9.0)、100 mmol/L KH_2PO_4 和 20~45 mmol/L β -环糊精(β -CD)溶液作为贮备液,根据实验设计要求将上述 3 种溶液与乙腈按 40:10:22.5:27.5 的体积比混合,得到所需的电泳介质。

1.2.2 儿茶素类及茶黄素类化合物的标准溶液

准确称取 6 种儿茶素类化合物标样各 1.00 mg 和茶黄素类化合物混合标样 2.00 mg,全部溶于 1 mL 25% 的乙腈水溶液中,所得溶液作为贮备液。然后将贮备液用 25% 乙腈水溶液分别稀释 2,4,20,40,200,2000 倍,配制成 10 种化合物的系列混合标准溶液。

1.3 样品制备

1.3.1 材料

茶多酚产品(纯度 95%,其中含儿茶素类化合物 72%,湖南金农公司)。多酚氧化酶粗酶液(PPO)用冷丙酮法制备,用柠檬酸-磷酸缓冲液(pH 5.6)提取^[9]。

1.3.2 样品制备

在 250 mL 的烧杯中依次加入 100 mL 1 g/L 的茶多酚溶液(pH 5.6)和 20 mL 多酚氧化酶粗酶提取液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中并不断搅拌。在反应 0~70 min 时间内每隔 10 min 从烧杯中取 5 mL 反应液置于烧杯中,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 3 min 后终止反应,反应液作为毛细管电泳分析用样品。

1.4 电泳条件

电泳介质为 200 mmol/L H_3BO_3 (pH 7.7)、10 mmol/L KH_2PO_4 、9 mmol/L β -CD 和 27.5% 乙腈的混合溶液,压力进样 3 s,在电压 25 kV、柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 下分离,于 200 nm 波长处检测。电泳介质、标准溶液和样品溶液在进样前均用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,再用超声波脱气 10 min。为保证实验结果的重复性,两次进样间用 0.1 mol/L NaOH、超纯水和电泳介质冲洗毛细管 2 min。

2 结果与讨论

2.1 电泳介质的优化

磷酸盐和硼酸盐均是毛细管电泳分析常用的缓

冲液体系,分析茶多酚时以磷酸盐缓冲体系效果最佳^[10],分析 TFs 时则多选用硼酸缓冲体系,并在其中加入一定量的磷酸盐提高体系的离子强度^[8]。由于儿茶素类和 TFs 化合物含有同分异构体,单纯的硼酸-磷酸盐缓冲体系并不能使其达到基线分离,因而需要加入改性剂来改善分离效果。已有研究表明,有机溶剂乙腈可以减小流动相的极性,改变毛细管管壁的 Zeta 电势,降低电渗流的速度,从而提高选择性; β -CD 则是一种常用的手性选择剂^[11],它可与对映体形成具有不同稳定常数的包容配合物,借此实现对映体的分离。此外,缓冲液的 pH 值不仅影响各组分的分离效果,同时也影响儿茶素类和 TFs 化合物的稳定性,过酸情况下儿茶素类化合物会发生异构化反应,而碱性条件下儿茶素类和 TFs

化合物易被氧化^[12]。因此,本实验从硼酸浓度、缓冲液 pH 值、改性剂(乙腈和 β -CD)的含量等方面对电泳介质体系进行优化。

2.1.1 H_3BO_3 浓度

调节 pH 7.0 的硼酸溶液浓度为 160 ~ 240 mmol/L,使其与 10 mmol/L 的 KH_2PO_4 、4.5 mmol/L β -CD 和 27.5%(体积分数)乙腈混合组成电泳介质,在电压 25 kV、柱温 30 °C 下对 6 种儿茶素类及 4 种茶黄素类的混合标样进行分析。从图 1-a 可以看出:绝大部分组分的迁移时间随着硼酸浓度的不断提高而逐渐延长;C 与 EGC 两组分的峰完全重叠,且与 GC、EC 之间的分离度较小,当硼酸浓度为 200 mmol/L 时,虽然其分离度达到最大,但各组分之间仍不能达到基线分离。

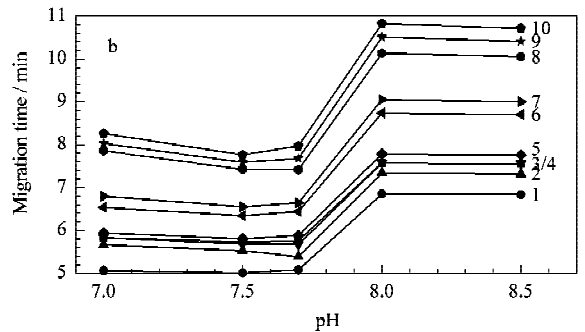
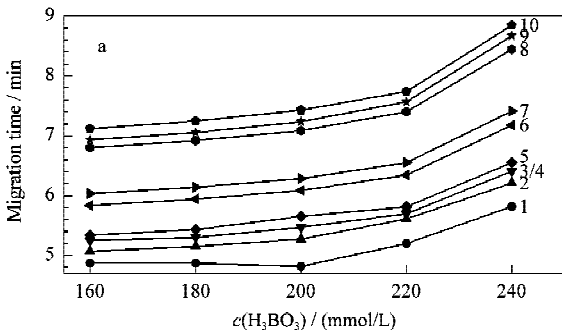


图 1 (a)硼酸浓度及(b)缓冲液 pH 值对组分迁移时间的影响

Fig.1 Influence of (a) H_3BO_3 buffer concentration and (b) buffer pH value on migration time of the components

Analytical parameters : voltage , 25 kV ; column temperature , 30 °C ; detection wavelength , 200 nm.

1. TF ; 2. GC ; 3/4. C/EGC ; 5. EC ; 6. TF-3'-G ; 7. TF-3-G ; 8. EGCG ; 9. ECG ; 10. TFDG.

2.1.2 缓冲液 pH 值

采用能获得最大分离度的 H_3BO_3 溶液(200 mmol/L),调节其 pH 为 7.0 ~ 8.5 ,其余电泳介质组成和仪器工作条件同“ 2.1.1 ”节所述,分析混合标样。从图 1-b 可知 :当 pH 为 7.7 时,可使原来重叠的 C 和 EGC 组部分分离(分离度为 0.71);当 pH 为 7.7 ~ 8.0 时,各组分的迁移时间发生了显著的变化,pH 8.0 条件下各组分的迁移时间较 pH 7.7 时延长 2 ~ 3 min。综合考虑各组分的分离度和迁移时间,以 pH 7.7 H_3BO_3 溶液分离效果最好。

2.1.3 改性剂

在选定的 H_3BO_3 溶液(200 mmol/L ,pH 7.7)和 10 mmol/L KH_2PO_4 中,分别调节改性剂乙腈的含量(体积分数为 20% ~ 30%)和 β -CD 的浓度(4.5 ~ 11.5 mmol/L),研究其对各组分分离度的影响,仪器工作条件同“ 2.1.1 ”节。

从图 2-a 可看出:随着乙腈含量的增加,各组分的迁移时间不断延长;同时乙腈含量的高低显著影响 EGC 与 EC、C 的分离度,当乙腈含量 \leq 25% 时,

EGC 与 C 之间的分离度小;而当其含量为 30% 时,EGC 与 EC 两组分重叠;只有当乙腈含量为 27.5% 时,才能使 EGC 与 EC、C 之间的分离度达到最大,因此本实验选择在电泳介质中乙腈含量为 27.5%。

从图 2-b 可以看出 β -CD 的浓度变化对各组分的分离度影响很显著,当 β -CD 浓度为 9 mmol/L 时,不仅能缩短 ECG、EGCG、C 和 GC 4 种儿茶素的迁移时间,而且使得 C 与 EGC、GC 之间得到完全分离,各组分之间的分离度分别为:TF 与 GC 3.19,GC 与 C 0.97,C 与 EGC 1.54,EGC 与 EC 1.05,TF-3'-G 与 TF-3-G 1.68,EGCG 与 ECG 1.10,ECG 与 TFDG 2.83。所以缓冲液中 β -CD 的最佳浓度为 9 mmol/L。

2.2 仪器工作条件选择

在选定的电泳介质、固定柱温 30 °C 的条件下,研究不同电压(20 ~ 30 kV)下的分析效果,结果表明:随着电压的升高,各组分迁移时间缩短,但基线噪声加大。综合考虑迁移时间和灵敏度,分离电压选用 25 kV。

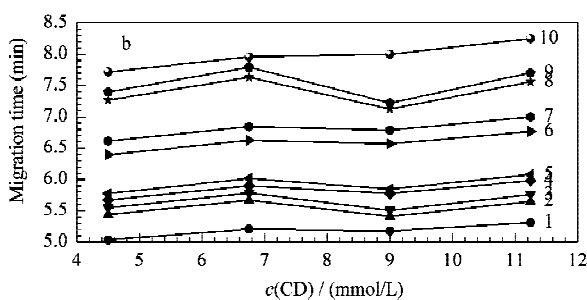
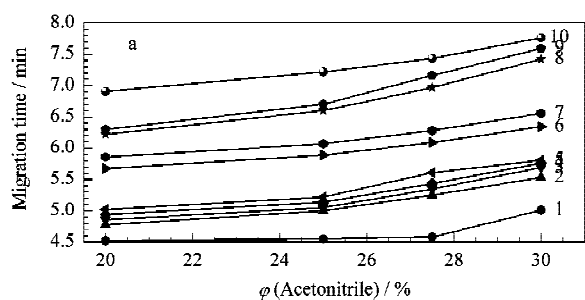


图 2 (a)乙腈含量和(b) β -CD 浓度对组分迁移时间的影响

Fig.2 Influences of (a) acetonitrile content and (b) β -CD concentration on migration times of the components

Analytical parameters were the same as in Fig. 1.

1. TF ; 2. GC ; 3. C ; 4. EGC ; 5. EC ; 6. TF-3'-G ; 7. TF-3-G ; 8. EGCG ; 9. ECG ; 10. TFDG.

同样条件下,将分离电压固定为 25 kV,在不同柱温(20 ~ 35 $^{\circ}$ C)条件下考察柱温对分离的影响。随着柱温升高,组分的迁移时间缩短,但分离度降低;柱温为 30 $^{\circ}$ C 时分离效果和分离时间均较合适。

综上所述,采用毛细管电泳法同时分离 6 种儿茶素类和 4 种 TFs 化合物的最佳电泳介质由 200 mmol/L H_3BO_3 (pH 7.7)、10 mmol/L KH_2PO_4 、9 mmol/L β -CD 和 27.5% 乙腈组成,最佳仪器工作条件为电压 25 kV、柱温 30 $^{\circ}$ C。在此条件下分析混合

标样和样品(按“1.3.2”节方法制备,反应 10 min)的图谱见图 3。由图 3 可看出,分析时间仅需 8 min,且各组分峰形对称。与文献[8]比较,EGC 与 EC、EGCG 与 EGC 之间的分离度得到了有效的提高,基本达到基线分离,同时各组分峰在图谱中的分布较为均衡,避免了出峰时间过于集中、分离度低的问题。与标样图谱相比,样品图谱中 EGCG 组分的迁移时间略有提前,这是由于 EGCG 与酶蛋白发生配合作用,导致质荷比改变的结果。

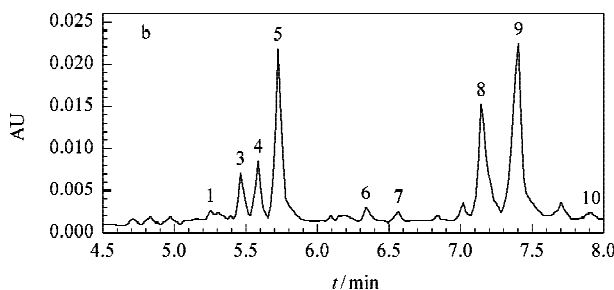
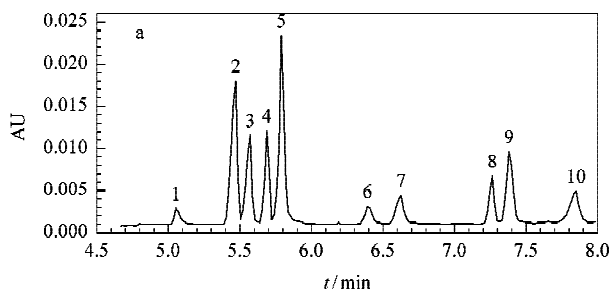


图 3 最优分析条件下的(a)儿茶素类、茶黄素类化合物标样和(b)样品的 CE 色谱图

Fig.3 Electropherograms of (a) a mixture of catechin and theaflavin standards and (b) a sample under optimum conditions

Electrolyte solution : 200 mmol/L H_3BO_3 (pH 7.7) + 10 mmol/L KH_2PO_4 + 9 mmol/L β -CD + 27.5% acetonitrile. Analytic parameters were the same as in Fig. 1. Concentrations of standards : GC, C, GC, EC, EGCG, ECG, 50 μ g/mL ; TF, 9.78 μ g/mL ; TF-3'-G, 13.13 μ g/mL ; TF-3-G, 22.99 μ g/mL ; TFDG, 34.10 μ g/mL.

1. TF ; 2. GC ; 3. C ; 4. EGC ; 5. EC ; 6. TF-3'-G ; 7. TF-3-G ; 8. EGCG ; 9. ECG ; 10. TFDG.

2.3 方法评估

2.3.1 工作曲线

在最佳分析条件下,测定含有 6 种儿茶素类和 4 种 TFs 的系列混合标准溶液,然后以组分的峰面积对相应的浓度进行回归,得到各组分的线性回归方程和相关系数。从表 1 可知:各组分的峰面积和浓度之间均呈良好的线性关系,相关系数为 0.990 7 ~ 0.999 8,方法检测限为 0.39 ~ 0.88 μ g/mL。

2.3.2 回收率和精密度

取已知各组分含量的茶多酚反应液(氧化 50 min),加入一定量的混合标准样,在最佳条件下进行 5 次平行测定,计算回收率并考察方法的精密度,结果见表 2。各组分的平均回收率为 91.5% ~

表 1 6 种儿茶素类与 4 种茶黄素类化合物的线性关系及检测限
Table 1 Linearities and limits of detection of catechins and TFs

Comp.	Linear range/ (μ g/mL)	Regression equation	r	LOD/ (μ g/mL)
GC	5 - 500	$Y = 341.25X - 178.44$	0.9998	0.62
C	5 - 500	$Y = 172.61X + 39.337$	0.9980	0.45
EGC	5 - 500	$Y = 177.05X - 100.06$	0.9988	0.63
EC	5 - 500	$Y = 384.84X - 113.94$	0.9985	0.39
EGCG	5 - 500	$Y = 193.39X - 71.778$	0.9995	0.52
ECG	5 - 500	$Y = 194.63X - 133.28$	0.9987	0.78
TF	0.978 - 97.8	$Y = 133.94X - 94.148$	0.9976	0.88
TF-3'-G	1.313 - 131.3	$Y = 152.07X - 80.637$	0.9907	0.66
TF-3-G	2.299 - 229.9	$Y = 145.72X - 85.910$	0.9953	0.86
TFDG	3.410 - 341	$Y = 168.39X - 123.09$	0.9982	0.80

Y : peak area ; X : mass concentration, μ g/mL.

113.5% 相对标准偏差(RSD)小于 5% ,说明该方法的准确度和精密度良好。

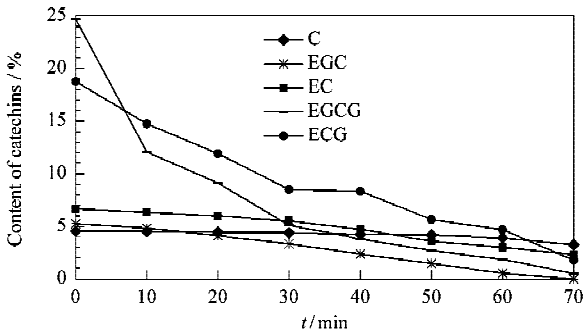
表 2 方法的回收率及精密度

Table 2 Recovery and precision of the method

Comp.	Background/ ($\mu\text{g/mL}$)	Added/ ($\mu\text{g/mL}$)	Found/ ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery/ %	RSD/ %
GC	0	100	100	100	3.2
C	30.18	100	142.52	109.5	2.1
EGC	9.790	100	101.13	92.1	1.5
EC	24.00	100	112.07	90.4	1.6
EGCG	17.98	100	133.89	113.5	2.7
ECG	37.63	100	125.97	91.5	2.7
TF	1.692	9.780	10.97	95.6	4.6
TF-3'-G	14.10	13.13	26.88	98.7	2.3
TF-3-G	12.43	22.99	37.61	106.2	4.2
TFDG	4.512	34.10	43.15	111.7	1.9

2.4 方法的应用

按“ 1.3.2 ”节方法制备的样品液在最佳电泳条



件下进行分析,以外标法计算样品中各组分的含量,监测茶多酚酶促氧化反应过程中儿茶素类和茶黄素类化合物含量的变化,结果如图 4。由图 4 可以看出,在此反应条件中,儿茶素类化合物的含量随着反应的进行而不断减少,EGCG、EGC、ECG 消耗最为迅速,EC 也有部分减少,C 的变化不明显,仅有少量消耗,GC 未检出。当反应进行至 70 min 时,EGCG 和 EGC 几乎完全氧化,EC、ECG 和 C 有少量保留。TFs 总量则是先增加后减少,在反应 0~50 min 内 4 种茶黄素类单体的含量均呈上升趋势;当反应至 50 min 时,茶黄素类化合物的总量达到最大值(6.90%),TF-3'-G 的生成量最多(2.25%),TF 次之(2.12%),TFDG 生成量最小;反应超过 50 min 以后,各种茶黄素类组分的含量均急剧下降。由此可知,在此反应条件下,反应 50 min 是制备 TFs 的最佳时间。以上变化趋势与文献 [13-14] 有很好的—致性。

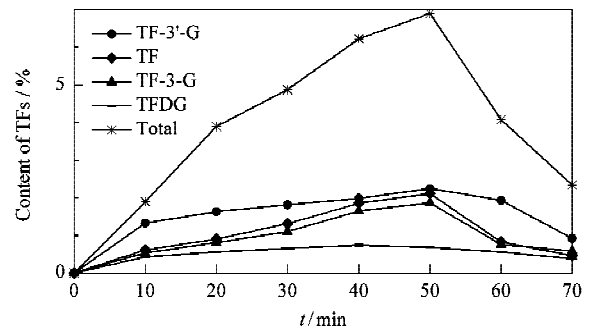


图 4 茶多酚酶促氧化反应过程中儿茶素类和茶黄素类化合物含量的变化

Fig. 4 Changes of contents of catechins and TFs with fermentation time during process of tea polyphenol oxidation

通过对底物(儿茶素类)和产物(TFs)的同时分析发现:EGCG 和 ECG 的降解量很大,但对应的产物 TFDG 的生成量却很低。EC 和 EGC 转化为 TF 和 TF-3'-G 的实际量却大于 EC 和 EGC 的减少量,这可能与本实验采用多酚氧化酶粗酶有关,因为粗酶中可能含有酯水解酶,它能将 EGCG 和 ECG 水解转化生成 EGC 和 EC,从而使 TF-3'-G 和 TF 的生成量较多。由此也可以看出:对于复杂的底物、产物和粗酶组成的反应体系,同时测定底物和产物的组成及含量的动态变化是十分必要的。

参考文献:

[1] Jiang Heyuan, Cheng Qikun, Du Qizhen, Wang Huafu. China Tea (江和源,程启坤,杜琪珍,王华夫.中国茶叶), 1998(3):18

[2] Luczaj W, Skrzydlewska E. Food Chem Toxicol, 2004, 42(12):2045

[3] Lu J B, Ho C T, Ghai G, Chen K Y. Cancer Res, 2000, 60(22):6465

[4] Yang Xianqiang, Wang Yuefei, Chen Liuji. Tea Polyphenol Chemistry. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical

Publishers (杨贤强,王岳飞,陈留记.茶多酚化学.上海:上海科学技术出版社), 2003:12

[5] Wang Kunbo, Liu Zhonghua, Huang Jian'an. Food Science (王坤波,刘仲华,黄建安.食品科学), 2001, 22(11):104

[6] Luo Guoan, Wang Yiming. Chinese Journal of Chromatography (罗国安,王义明.色谱), 1995, 13(4):254

[7] Yang Wenchu, Yu Aimin, Chen Hongyuan. Chemical Journal of Chinese Universities (杨文初,俞爱民,陈洪渊.高等学校化学学报), 2001, 22(4):547

[8] Lee B L, Ong C N. J Chromatogr A, 2000, 881:439

[9] Zhong Luo. Physical and Chemical Analysis of Tea Quality. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers (钟萝.茶叶品质理化分析.上海:上海科学技术出版社), 1989

[10] Song Guanqun, Lin Jinming. World Science-Technology Research and Development (宋冠群,林金明.世界科技研究与发展), 2004, 26(1):41

[11] Wang Yiming, Luo Guoan. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王义明,罗国安.分析化学), 1995, 23(7):850

[12] Ling Min, Liu Li, Yuan Hua, Yu Zongyuan. Hubei Chemical Industry (凌敏,刘丽,袁华,喻宗沅.湖北化工), 2001, 18(3):29

[13] Li Lixiang. Journal of Nanjing Agricultural University (李立祥.南京农业大学学报), 2002, 25(2):101

[14] Wang Kunbo, Liu Zhonghua, Huang Jian'an. Journal of Tea Science (王坤波,刘仲华,黄建安.茶叶科学), 2004, 24(1):53