

茶叶中儿茶素薄层色谱分离所用展开剂的优化

王丽丽^{a,b}, 王坤波^{a,b}, 黄建安^{a,b*}, 徐仲溪^{b*}

(湖南农业大学 a.国家植物功能成分利用工程技术研究中心; b.园艺园林学院; 湖南 长沙 410128)

摘 要: 室温条件下, 以硅胶板为固定相, 用 5 种展开剂(体积比 9 : 9 : 2 的甲苯-丙酮-甲酸、5.0 : 10.0 : 1.0 : 0.5 的甲苯-甲酸乙酯-甲醇-甲酸、8.0 : 5.0 : 15.0 : 0.3 的甲苯-三氯甲烷-丙酮-甲酸、12.5 : 7.5 : 1.8 : 0.6 的三氯甲烷-丙酮-甲醇-水、12.5 : 7.5 : 1.8 : 0.6 的三氯甲烷-丙酮-甲酸-水)对茶叶中的儿茶素进行薄层色谱分离, 筛选出其中较优的展开剂后, 进一步优化其配比, 并用其分离绿茶和白茶提取物中的儿茶素以进行验证。结果表明, 以体积比 12.5 : 7.5 : 2.2 的三氯甲烷-丙酮-甲酸为展开剂, 茶叶内主要的 4 种儿茶素单体(EGCg、EGC、ECg、EC)可得到良好分离, 绿茶与白茶提取物中的儿茶素能较好地得以分离。

关 键 词: 茶叶; 展开剂; 儿茶素; 高效薄层色谱; 硅胶板

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)01-0102-04

Optimization of developing solvents of high performance thin-layer chromatography for separating catechins in tea

WANG Li-li^{a,b}, WANG Kun-bo^{a,b}, HUANG Jian-an^{a,b*}, XU Zhong-xi^{b*}

(a. National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals
b. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: At room temperature, methylbenzene-acetone-formic acid (9 : 9 : 2, V/V), methylbenzene-ethyl formate-methanol-formic acid (5.0 : 10.0 : 1.0 : 0.5, V/V), methylbenzene-chloroform-acetone-formic acid (8.0 : 5.0 : 15.0 : 0.3, V/V), chloroform-acetone-methanol-water (12.5 : 7.5 : 1.8 : 0.6, V/V) and chloroform-acetone-formic acid-water (12.5 : 7.5 : 1.8 : 0.6, V/V) on silica gel marked as solvent I, II, III, IV and V respectively were applied as developing solvent respectively in high performance thin-layer chromatography (HPTLC) for isolating catechins in the tea. Among them, solvent V was found to be the best for separation of catechins, this solvent was then modified mainly regarding the volume ratios of formic acid. The results showed the modified solvent V, namely, chloroform- acetone- formic acid (12.5 : 7.5 : 2.2, V/V) was the optimum for separation of the four main catechins (EGCg, EGC, ECg, EC) in the tea. The applicability of the optimized developing solvent was further confirmed by separation of catechins in the extracts of the green and the white tea.

Key words: tea; solvent; catechins; high performance thin-layer chromatography(HPTLC); silica gel

茶儿茶素属黄烷醇类, 占绿茶干重的 20%~30%, 是绿茶苦味和收敛性的主要成分。茶鲜叶中的儿茶素主要包括表没食子酸儿茶素没食子酸酯(EGCg)、

表没食子酸儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECg)、表儿茶素(EC)^[1], 其中 EGCg 含量最丰富, 约占儿茶素总量的 50%~80%。

收稿日期: 2011-10-26

基金项目: 国家重大科技成果转化项目(湘财企指(2010)44 号); 教育部创新团队计划项目(IRT0963)

作者简介: 王丽丽(1985—), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 主要从事茶及植物功能成分研究, wanglili20050910@sina.com; *通信作者, Jian7518@sina.com, googletea@163.com

高效薄层色谱法(high performance thin-layer chromatography, HPTLC) 具有操作简单、色谱结果直观、灵敏度高等特点,在化学分析、天然物质提取与分离、药物研究、医学研究等领域都有广泛应用。已有不少关于薄层色谱分离茶叶儿茶素方面的研究^[2-6]。于健东等^[2]以正丁醇-醋酸-水(5 5 3, 体积比,下同)为展开剂,用纤维素预制板使儿茶素与表儿茶素得到了较好的分离。王坤波等^[3]以正丁醇-丙酮-冰醋酸(5 5 3)为展开剂,应用聚酰胺板分离出茶叶中的5种儿茶素。傅冬和等^[4]采用乙醇-丙酮-冰醋酸(5 5 3)展开剂在聚酰胺薄层板上对混合儿茶素进行层析分离,除立体异构体EGC及Cg的 R_f (原点到斑点中心的距离与原点与溶剂前沿距离的比值)差异不大外,其他都差异明显,均能清晰显示各斑点。文献[5]中使用的展开剂甲苯-丙酮-甲酸(9 9 2)与文献[6]中使用的展开剂甲苯-甲酸乙酯-甲醇-甲酸(5.0 10.0 1.0 0.5),均可使EGCg、EGC、ECg及EC等4种儿茶素得到较好分离。文献[7]中以正丁醇-水-冰醋酸(20 80 1)为展开剂,在纤维素薄层板分离出绿茶提取物中的5种儿茶素(EGCg、EGC、ECg、GC、EC)。笔者以硅胶板为分离介质,选取以上文献中的展开剂进行儿茶素薄层分离试验,以期对分离茶儿茶素的展开剂进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料

儿茶素单体(EGCg、EGC、ECg、EC)、小叶种茶儿茶素样品、大叶种茶儿茶素样品、绿茶及白茶提取物,均为国家植物功能成分利用工程技术研究中心制备。

硅胶 G 薄层板为青岛海洋化工厂生产;高效薄层色谱系统,包括 Linomat 5 点样机、Reprostar 3 数码成像系统以及 100 μ L 微量注射器,为瑞士 CAMAG 生产。

香草醛、甲苯、甲酸乙酯、甲醇、甲酸、丙酮、三氯甲烷、浓盐酸等均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

室温条件下,以硅胶板为固定相,用 5 种展开剂对茶叶中的儿茶素进行薄层色谱分离,筛选出其

中较优的展开剂后(以下简称“比较试验”),进一步优化其配比(以下简称“优化试验”),并用其分离绿茶和白茶提取物中的儿茶素以进行验证(以下简称“验证试验”)。在优化筛选展开剂时,仅调整其中的甲酸体积比至 1.8、2.0 与 2.2。5 种展开剂如下。

I: 甲苯-丙酮-甲酸(体积比 9 9 2);

II: 甲苯-甲酸乙酯-甲醇-甲酸(体积比 5.0 10.0 1.0 0.5);

III: 甲苯-三氯甲烷-丙酮-甲酸(体积比 8.0 5.0 15.0 0.3);

IV: 三氯甲烷-丙酮-甲醇-水(1 体积比 2.5 7.5 1.8 0.6);

V: 三氯甲烷-丙酮-甲酸-水(体积比 12.5 7.5 1.8 0.6)。

1.2.2 样品处理

将干茶样经沸水浸提、过滤、减压浓缩、冷冻干燥等,制得粉末样品(提取物),置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 溶液配制

准确称取各儿茶素单体(EGCg、EGC、ECg、EC) 5 mg,于甲醇中溶解,制得 5 mg/mL 的溶液。混合标样由上述4种单体标样等体积混合制得。

准确称取小叶种茶儿茶素样品、大叶种茶儿茶素样品、绿茶及白茶提取物各 10 mg,分别于甲醇中溶解,制得 5 mg/mL 的溶液。

1.2.4 硅胶板的活化

使用前于 110 $^{\circ}$ C 加热 20 min,冷却后置于盛有硅胶的干燥器内,以防止空气中的污染物重新附着在其上面。

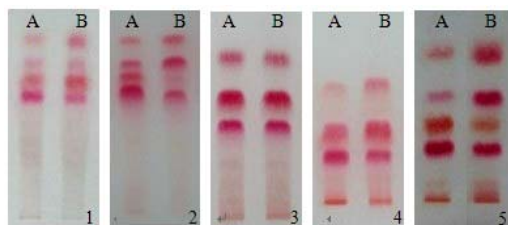
1.2.5 点样、展开与显色

采用 Linomat 5 半自动点样,硅胶板规格为 10 cm \times 10 cm。在比较试验及优化试验中,小叶种茶儿茶素与大叶种茶儿茶素的点样量均为 5 μ L;在验证试验中,各单体标样、混合标样与茶叶提取物的点样量分别为 2、6、12 μ L。带宽 8 mm,待溶剂前沿至 95 mm,取出晾干,1%香草醛-浓盐酸溶液显色,105 $^{\circ}$ C 烘 3 min,拍照保存。

2 结果与分析

2.1 比较试验结果

由图 1 和表 1 可见,展开剂 I、II、V 的分离效果较好,共得到 4 条带,从下至上分别为 EGCg、EGC、ECg 及 EC; III、IV 的分离效果较差,在图谱上只能看到 3 条带,中间带为 EGC 与 ECg 的混合物。就展开剂 I、II、V 而言, I、II 展开图谱中各条带的 R_f 值均较高,为 0.40~0.65,且条带紧凑; V 展开图谱中条带的 R_f 值分布范围较广,为 0.15~0.50,分离度好,分离效果优于 I 与 II。另外,展开剂 I、II、III 中均含甲苯,其毒性强于三氯钾烷。相比较而言,5 种展开剂中以展开剂 V 对儿茶素的分离效果较好。



1、2、3、4、5 分别对应展开剂 I、II、III、IV、V。A 小叶种茶儿茶素样品; B 大叶种茶儿茶素样品。下同。

图 1 不同展开剂分离儿茶素的薄层图谱

Fig.1 HPTLC of catechins using different developing solvents

表 1 不同展开剂分离儿茶素的 R_f 值

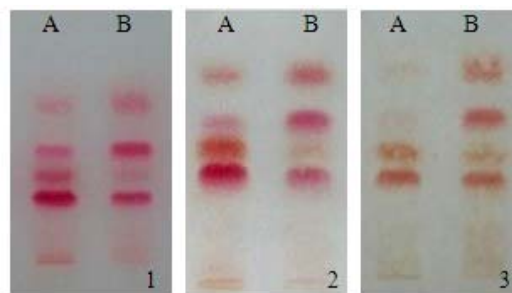
Table 1 R_f values of catechins using different developing solvents

展开剂	R_f			
	EGCg	EGC	ECg	EC
I	0.45	0.51	0.57	0.65
II	0.44	0.49	0.54	0.63
III	0.25	0.33	0.33	0.43
IV	0.12	0.19	0.19	0.31
V	0.17	0.23	0.33	0.46

2.2 优化试验结果

在试验中发现,展开剂中不加水仍可分离出 4 条带,因此,将展开剂简化为由三氯钾烷、丙酮与甲酸等 3 种溶剂构成。

图 2 中从下至上各条带依次为 EGCg、EGC、ECg 及 EC 带。由表 2 可见,随着甲酸体积比的增加,各条带 R_f 值增大,各条带亦趋于分散,其中,以图 2-3 中的分离度与条带分散情况最好,因此,高效薄层色谱分离茶叶中儿茶素的最优展开剂为体积比 12.5 : 7.5 : 2.2 的三氯钾烷-丙酮-甲酸。



1、2、3 分别对应甲酸体积比为 1.8、2.0、2.2 的展开剂 V。

图 2 不同甲酸体积比下展开剂 V 的薄层图谱

Fig.2 HPTLC of catechins using developing solvent V with different volume ratios of formic acid

表 2 不同甲酸体积比展开剂 V 分离儿茶素的 R_f 值

Table 2 R_f values of catechins using developing solvent with different volume ratios of formic acid

展开剂中 甲酸体积比	R_f			
	EGCg	EGC	ECg	EC
1.8	0.21	0.26	0.31	0.43
2.0	0.27	0.33	0.40	0.51
2.2	0.28	0.35	0.42	0.54

2.3 验证试验结果

以体积比 12.5 : 7.5 : 2.2 的三氯钾烷-丙酮-甲酸为展开剂对绿茶及白茶提取物进行薄层分离的结果(图 3, 表 3)表明:各单体标样(EGCg、EGC、ECg 及 EC)的条带清晰、集中、无拖尾;混合标样中 4 条带明显分开,分离度良好;在绿茶及白茶提取物的展开图谱中可观察到至少 4 条带,且与混合标样的 R_f 值相当;绿茶与白茶的条带数相当,但条带颜色的强度有所差异(因加工工艺不同所致)。以上结果表明,绿茶及白茶提取物中的儿茶素得到了较好的分离。

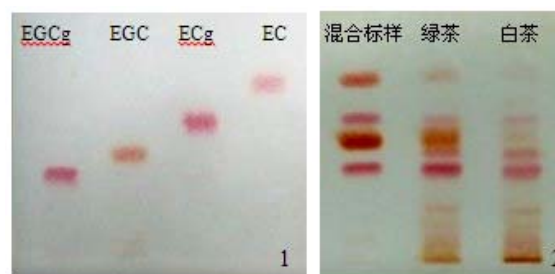


图 3 最优展开剂分离茶叶中儿茶素的薄层图谱

Fig.3 HPTLC of individual catechins separated from the mixed standards the extracts of the green and the white tea using the optimized developing solvent

表 3 最优展开剂分离茶叶中儿茶素的 Rf 值
Table 3 Individual Rf values of catechins separated from the mixed standards and the extracts of the green and the white tea using the optimized developing solvent

供试品	Rf			
	EGCg	EGC	ECg	EC
单体	0.27	0.35	0.43	0.54
混合标样	0.27	0.36	0.41	0.53
绿茶提取物	0.27	0.37	0.41	0.53
白茶提取物	0.27	0.37	0.41	0.53

3 结论与讨论

室温条件下，以硅胶板为固定相，以体积比 12.5 7.5 2.2 的三氯甲烷-丙酮-甲酸为展开剂，对茶叶中的儿茶素进行薄层色谱分离，茶叶内主要的 4 种儿茶素单体(EGCg、EGC、ECg、EC)可得到良好分离，绿茶与白茶提取物中的儿茶素能较好地得以分离，分离出的儿茶素单体条带清晰、集中，Rf 为 0.20~0.60。层析后可结合薄层扫描对其结果进行定量分析。整个过程可以在 1 h 内完成。

文献[8]中提到，中国药典^[9]薄层色谱法中部分含苯、甲苯的展开剂可进行改进，用三氯甲烷替代苯和甲苯可获得等同效果或更好效果的薄层色谱。本试验结果验证了这一结论。

高效液相色谱虽能准确分离并测定各儿茶素单体的含量，但每次只能进一个样，待测样品数量大时耗时较多，检测费用也高。高效薄层色谱法则能较好地解决以上问题。

聚酰胺薄膜、色谱滤纸、硅胶板是薄层色谱分离中常见的层析介质，都可用于分离黄酮、酚类等极性物质^[10]。这 3 种层析介质中，笔者认为使用最方便的是硅胶板，因为作为固定相的硅胶是被均匀附着在玻璃基板这一支持物上，浸入展开剂后不会像色谱滤纸、聚酰胺薄膜一样存在卷曲、塌陷现象，

整个展开过程容易操作与控制，从而更易得到条带清晰、集中、且无拖尾现象的薄层图谱。此外，硅胶板的质量尤其影响薄层图谱的美观度与试验结果的可重复性，因而，选择涂布均匀、颗粒细度一致的硅胶板是保证试验高质量完成的关键之一。

参考文献：

[1] 贾旭东. 茶类黄酮类功能及其应用[J]. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(6): 369-371 .
[2] 于健东, 王钢力, 高天兵, 等. 薄层色谱法鉴别儿茶中儿茶素和表儿茶素[J]. 中国药师, 2000, 3(1): 3 .
[3] WANG Kuo-bo ,LIU Zhong-hua ,HUANG Jian-an ,et al. TLC separation of catechins and theaflavins on polyamide plates[J]. Journal of Planar Chromatography 2009 22(2) : 97-100 .
[4] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 茶叶中儿茶素的高效薄层色谱分离研究[J]. 中国茶叶, 2005(4): 31 .
[5] Eike Reich , Anne Schibli , Valeria Widmer . HPTLC methods for identification of green tea and green tea extract [J] . Journal of Liquid Chromatography & Rleated Technologies , 2006 , 29 : 2141-2151 .
[6] 梁效忠, 肖培根. 薄层扫描法测定金荞麦根茎中原矢车菊甙元 B-2 的含量[J]. 药物分析杂志 ,1990(10) :114 .
[7] Irena Vovk ,Breda Simonovska ,Heikki Vuorela .Speration of eight selected flavan-3-ol on cellulose thin-layer chromatography[J] .Journal of Chromatography A ,2005 , 1077(2) : 188-194 .
[8] 陈蔼, 梁洁莹, 李书渊. 对中国药典(2005 年版一部)薄层色谱法中部分含苯、甲苯展开剂的改进[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(4): 360-362 .
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005 年版一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005 .
[10] 龚雨顺, 刘仲华, 黄建安, 等. 大孔吸附树脂分离茶儿茶素和咖啡因的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(1): 50-52 .

责任编辑: 王赛群