

高速逆流色谱-质谱分析茶多酚中的(-)-表儿茶素鞣酸酯

史国放 戴德舜 刘密新 吴筑平*

(清华大学分析中心 北京 100084)

摘 要 研究了高速逆流色谱(HSCCC)与电喷雾质谱(ESI-MS)的联用条件,并首次使用 HSCCC-ESI-MS/MS 分离分析了茶多酚中的重要组分(-)-表儿茶素鞣酸酯(EGCG),取得了较好的结果。

关键词 高速逆流色谱 质谱 茶多酚 (-)-表儿茶素鞣酸酯

Analysis of (-)-Epigallocatechin Gallate in Tea Polyphenols by High-speed Countercurrent Chromatography-Mass Spectrometry

Shi Guofang, Dai Deshun, Liu Mixin, Wu Zhuping

(Analysis Center, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract In this paper the conditions of HSCCC coupled with ESI-MS was studied and the system of HSCCC-ESI-MS was utilized to separate and analyse EGCG from the crude tea polyphenols.

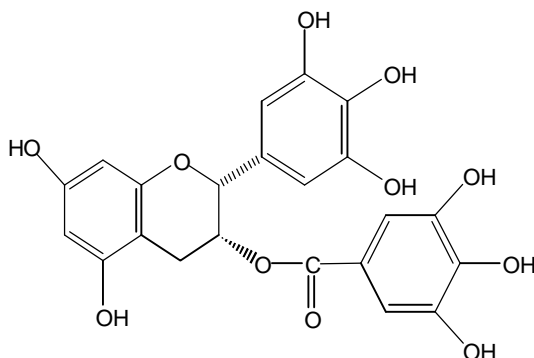
Key words High-speed countercurrent chromatography, Mass spectrum, Tea polyphenols, Epigallocatechin gallate

茶多酚是茶叶中富含的一类多羟基酚性化合物,是茶叶的主要成分之一。它包括儿茶素类、黄酮类、黄酮醇类等众多物质,具有很好的抗氧化功能和清除自由基的能力^[1]。儿茶素类是茶多酚的主要成分,在实现茶多酚的功能中起到重要的作用,该组分中包括(+)-儿茶素(+C)、(-)-表儿茶素(EC)、(-)-表儿茶素鞣酸酯(EGCG)、(-)-表儿茶素(EGC)和(-)-表儿茶素鞣酸酯(EGC)等,其中以 EGCG 化学活性最大,含量最高^[1]。EGCG 在治疗癌症^[2,3]、修复 DNA^[4]等方面已有应用,国外开展了很多这方面的研究。EGCG 的化学结构式如图 1 所示。

分离纯化 EGCG 的方法主要是使用葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)柱层析^[5],但该方法代价昂贵,且会发生不可逆吸附。高速逆流色谱(High-speed Countercurrent Chromatography,简称 HSCCC)是新型的液-液分配色谱技术,利用多层螺旋管同步行星式离心运动,在短时间内实现样品在互不相溶的两相溶剂系统中的高效分配,从而实现样品分离^[6]。它不使用固相载体作固定相,克服了样品吸附、损失、污染和峰形拖尾等缺点,因此十分适合天然产物有效成分的分离纯化。

HSCCC 在茶叶成分研究中已见应用^[7,8],但 HSCCC 与其它仪器的联用却少有研究。笔者采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水溶剂体系,在国内首次实现 HSCCC 与 ESI-MS/MS 联用系统用于茶多酚中 EGCG 的分析,该溶剂体系适用于 ESI-MS 的离子源。

史国放 男,24岁,硕士研究生,现从事天然产物提取和仪器分析方面的研究。*联系人
2001-05-11 收稿,2001-06-04 修回



(-) 表儿茶素鞣酸酯

图 1 EGCG 的化学结构式

Fig.1 The chemical structures of (-)-epigallocatechin gallate

1 实验部分

1.1 仪器

GS-20 分析型高速逆流色谱仪 (聚四氟乙烯螺旋管柱体, 内径 1.0mm、柱体体积 40mL、最高转速 2000r/min、 $\beta=0.4\sim0.7$); 8823A 型紫外检测器; 输液泵; 速度控制器; 岛津 C-R3A 型记录仪; API-3000 型 ESI 离子源 LC/MS/MS 仪。

1.2 试剂

市售普通绿茶; 氯仿、正己烷、甲醇、乙酸乙酯均为国产分析纯, 0.45 μ m 有机相滤膜过滤; 自制二次重蒸去离子水; EGCG 标准品。

1.3 茶多酚粗品的制备

5g 市售绿茶茶叶使用沸水浸提一次, 浸提液采用有机溶剂 (氯仿-乙酸乙酯) 萃取法处理, 得到 0.6142g 茶多酚粗品。

1.4 HSCCC 分离条件和 MS/MS 分析条件

按 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:5:1:5$ 配制正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系共 240mL, 室温静置 30min (保证体系的分配平衡) 后, 得上相 115mL, 下相 125mL, 超声除去两相的气泡。以 9.0mL/min 的流速将固定相 (上相) 注入柱体后, 调节柱体转速达 1800r/min, 平衡 1min 后, 流动相 (下相) 流速 1.0mL/min 注入柱体。柱体内溶剂体系达到离心动力学平衡后, 固定相保留 28mL, 保留值为 70%。紫外检测器灵敏度 0.05, 记录仪纸速 2.5mm/min。柱体内溶剂体系达到离心动力学平衡后进样, 进样量 2mg, 进样 14min 后记录谱图。

在以上实验的基础上, 采用 HSCCC 与 ESI-MS 联用, 在线分析茶多酚粗品。

实验所用质谱仪本身的 ESI 接口带有分流装置, 通过分流进样可使进入离子源的流速达到仪器的要求。使用三通接口将 HSCCC 和 ESI-MS 的分流进样接口联接起来, 待进样 14min 后再将 HSCCC 流出物引入质谱以减轻仪器离子源负担。联用和分流进样原理参见图 2 和图 3。联用时高速逆流色谱条件同上, 电喷雾-质谱/质谱条件: 负离子扫描模式; 质量扫描范围 250.0~600.0amu; 离子源电压 3800V; 锥形孔电压 41V; 聚焦环电压 170V。

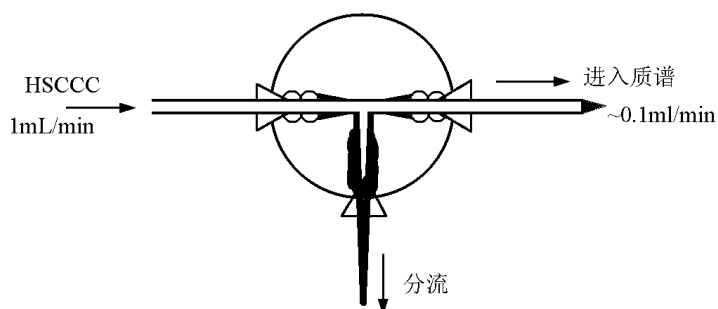


图 2 T 形分流设计示意图

Fig.2 Schematic diagram of the design of T-split

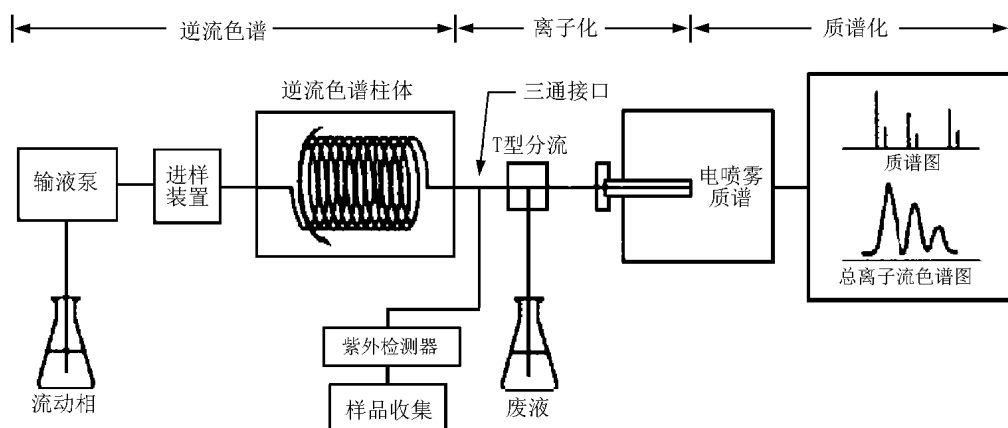


图 3 HSCCC-ESI-MS 示意图

Fig.3 Schematic diagram of the HSCCC-ESI-MS system

2 结果与讨论

2.1 HSCCC 分离条件的确立和分离结果

样品的溶解度实验表明样品易溶于乙酸乙酯、乙醇、甲醇、水等。结合自行设计的溶剂体系选择和优化专家系统, 最终采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 1:5:1:5)的溶剂体系, 上相作固定相, 下相作流动相。根据流动相流速、柱体转速、进样量三因素二水平优化仪器参数, 最后确定为: 柱体转速 1800r/min, 流动相流速为 1.0mL/min, 进样量为 2mg。紫外检测波长选择 280nm。HSCCC 使用该条件分离茶多酚粗提样品共得到 4 个部分(图 4)。

2.2 质谱条件的选择和 HSCCC/ESI-MS 分析结果

利用质谱仪 Autotune 功能, 经试验选定上文所述的质谱条件。HSCCC 和 ESI-MS 联用时, 随时观测 HSCCC 紫外信息图与 MS 总离子流色谱图的对应关系。HSCCC 和 ESI-MS 联用所得图 3 中 2 号峰的质谱图参见图 5a 和 b。图 5a 所示为 2 号峰的一级质谱图, 图中 $m/Z=457$ 为分子离子峰 $[M-H]^-$ 。从 EGCG 的结构式中不难看出, EGCG 在 ESI 源中容易失去一个质子, 以负离子方式出峰, 形成 $m/Z=457$ 的分子离子峰, 因此可以初步推测 HSCCC 分离得到的 2 号峰为 EGCG。图 5b 所示的为该峰的子离子谱碎片峰情况, 该谱图和 EGCG 标准品的子离子谱(图 5c)相一致, 因此可以确认 2 号峰为 EGCG。

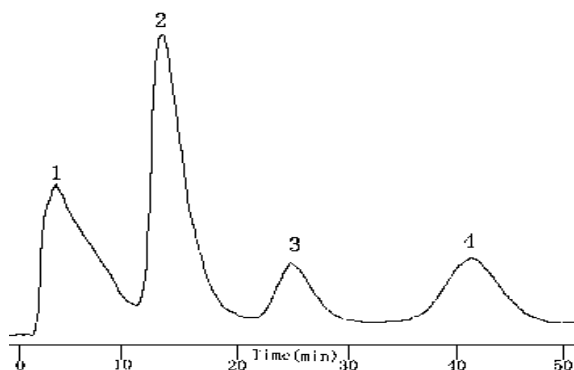


图 4 HSCCC 分离茶多酚粗品

1、3、4 为未知峰, 2 为 EGCG

Fig.4 Analytical HSCCC separation of crude tea polyphenols

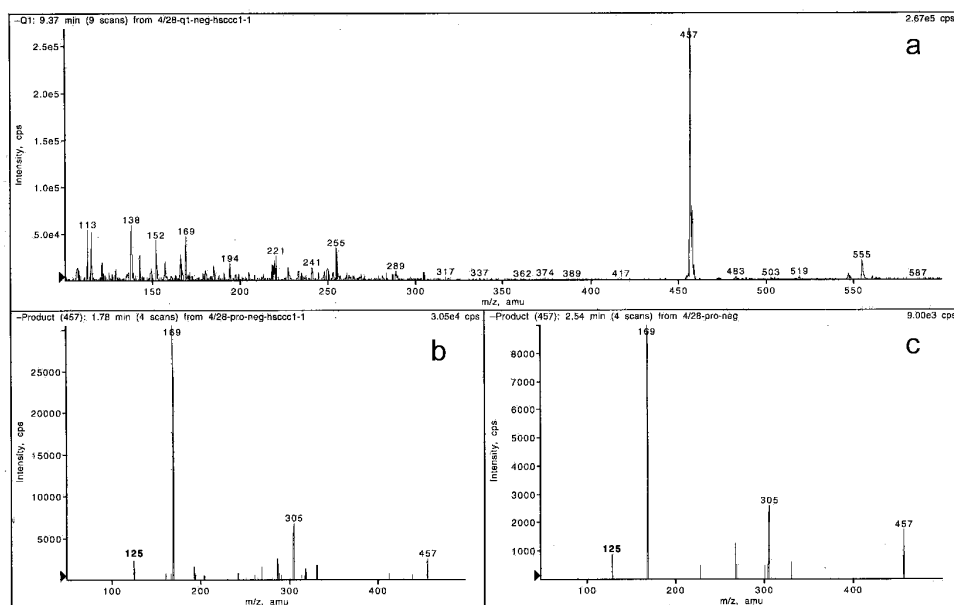


图 5 2 号峰的一级质谱和二级质谱以及 EGCG 标准品的子离子谱

Fig.5 Mass spectra of the peak of No.2 and ESI-MS/MS spectrum of the peak of No.2 and EGCG standard sample

2 号峰的一级质谱图没有其它分子离子峰存在, 表明在本实验条件下, HSCCC 对 EGCG 有很好的分离效果。EGCG 的子离子的形成过程参见图 6, 由于共轭作用和羧酸酯的碳氧键易发生断裂, 因此 EGCG 子离子谱图中主要的子离子是 $m/Z=169$ 和 $m/Z=305$ 。

2.3 HSCCC-MS 的影响因素分析

HSCCC-MS 的影响因素如喷针的位置、电压、气体的流速和温度、pH 等与 LC-MS 相类似, 以下主要分析对 HSCCC-MS 结果有较大影响的因素。

2.3.1 分流比 样品的浓度应该适合质谱的检测。浓度过低, 导致仪器无法检测; 浓度过高, 可能导致空间电荷效应产生, 使谱图发生畸变, 还会污染仪器管道, 导致严重的仪器本底。同时, ESI 质谱进入离子源的液体样品允许流速为 $1\sim 100\mu\text{L}/\text{min}$ 。GS20 型 HSCCC 的流动相流速多为

1 mL/min, 带出的样品浓度一般也较质谱检测上限大, 所以在进入质谱之前须经过分流。本文按照图 2 所示的 T 型接口实现分流, 分流比为 1:10 左右。

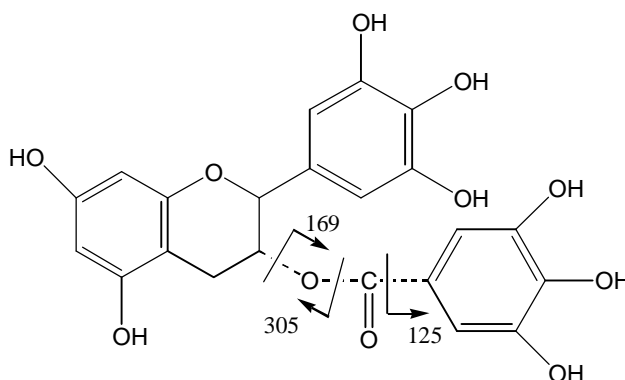


图 6 EGCG 子离子的产生

Fig.6 Schematic diagram of product-ion of EGCG

2.3.2 杂质的影响 杂质对样品的测量有很大影响, 极少量杂质的存在有助于样品离子的产生, 杂质含量太高会掩盖样品的检测信号, 有碍于样品的检测。此外, 对复杂样品进行分析时, 其中的组分会互为杂质, 单独对每一组分检测时都会受到来自其它组分的干扰。一般情况下, HSCCC 分离所得为天然产物粗制品, 须从样品和所用的溶剂两方面入手, 减少杂质对分析结果的影响。在 LC-MS 中, 复杂样品经色谱柱分离后再进行质谱分析, LC 的分离情况对 MS 的检测有较大影响。对于 HSCCC-MS 联用分析而言, 样品同样应经过 HSCCC 的分离且分离效果较好, 才能得到准确的质谱信息。

2.3.3 流动相的组成 虽然 HSCCC 可以选择的溶剂范围十分广泛, 基本上可以使用所有的有机溶剂。但是在 HSCCC-MS 中, 必须考虑到溶剂体系对 ESI 离子源的影响, 含有大量乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳和丙酮等溶剂的体系会损害离子源, 应尽可能不用于 HSCCC-MS 系统。实验中所选用的溶剂体系正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 1:5:1:5), 测算表明下相(流动相)中正己烷和乙酸乙酯的含量都很低, 分别为 1×10^{-4} mol/L 和 1.3×10^{-3} mol/L, 不会对离子源造成损害。

2.4 结论

优化选择了合适的 HSCCC 溶剂体系, 并在国内首次采用 HSCCC-ESI-MS 联用分析茶多酚中的 EGCG。实验表明使用 HSCCC-MS 对茶多酚粗提样品能够取得很好的分离分析结果。

分析型 HSCCC 能够更广泛地使用多样化的检测条件, 如傅立叶变换红外检测器(FTIR)、蒸发激光检测器(ELSD)、质谱(MS)等, 克服了以前单纯依靠紫外检测器(UV)的局限性。HSCCC 分离纯化后, 如用 MS 离线检测, 样品须经过处理才能利用 MS 或 LC/MS 进行分析, 此时须除去溶剂实现样品转移, 有可能会样品污染。HSCCC 与 MS 的联用克服了这些缺陷, 具有很强的实用价值。

由于自身的限制, HSCCC 和 MS 的联用目前发展缓慢, 其技术也不够成熟。HSCCC 所使用的很多溶剂体系会损害 MS 的离子源, 使得 HSCCC-MS 系统的应用受到了很大限制。HSCCC 和 MS 之间的联接还没有得到很好的解决, 没有专门的接口技术, 也没有实现接口的模块化和

自动化, 尽管可以通过 LC-MS 接口技术来联接 HSCCC 和 MS, 但有很多 HSCCC 溶剂系统不适合在这种情况下使用。随着接口技术的改进, HSCCC-MS 的应用将越来越广泛, 在天然产物有效成分的分离分析方面, HSCCC-MS 将会起到更大的作用。

参考文献

- [1] 陈为钧, 万圣勤. 中草药, 1993,24(9):493~499.
- [2] Lin J K, Liang Y C, Lin-Shiau S Y et al. Biochemical Pharmacology, 1999, 58(6):911~915.
- [3] Zong P C, Schell B, Ho C T et al. Cancer Letters, 1998, 129(2):173~179.
- [4] Johnson M K, Loo G. Mutation Research/DNA Repair, 2000, 459(3):211~218.
- [5] 周瑞宝. 中国粮油学报, 2000, 15(2):37~39.
- [6] 张天佑. 北京:北京科学技术出版社, 1989:267.
- [7] 江和源, 程启昆, 杜琪珍. 茶叶科学, 2000, 20(1):40~44.
- [8] 袁黎明, 傅若农, 张天佑 等. 色谱, 1998, 16(4):361~362.