

М. Н. ЗАПРОМЕТОВ и Г. А. СОБОЛЕВА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕВРАЩЕНИЙ КАТЕХИНОВ
ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ ЧАЯ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ
НА БУМАГЕ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 4 III 1954)

Широкое развитие хроматографического метода М. С. Цвета ⁽¹⁾ открыло новые возможности в изучении дубильных веществ чайного растения. Так, применение распределительной хроматографии на силикагелевых колонках привело к выделению из чайного танина семи кристаллических компонентов — катехинов ⁽²⁻⁴⁾. Удалось также определить количественный состав катехинов и изучить его изменение в процессе вегетации чайного растения ^(5, 6). Тем не менее, использование хроматографии на силикагелевых колонках для изучения метаболизма катехинов встречает известные трудности ввиду большой трудоемкости и потребности в значительных количествах анализируемого материала. Гораздо более прост и удобен метод распределительной хроматографии на бумаге, впервые примененный для аминокислот ⁽⁷⁾ и позднее распространенный на самые разнообразные соединения, в том числе и на полифенолы ⁽⁸⁻¹¹⁾.

Для хроматографии катехинов были использованы два сорта бумаги, выработанных Центральным научно-исследовательским институтом целлюлозной и бумажной промышленности в 1952 г.: хроматографическая № 2 и хроматографическая № 3 (ручной отлив). Сравнение указанных сортов с бумагами Ватман №№ 1 и 2 показало, что хроматографическая № 3 приближается по качеству к бумаге Ватман № 2, хроматографическая же № 2 менее однородна по плотности, содержит значительные количества загрязнений и при быстрой впитываемости обладает худшей разделяющей способностью.

Основным растворителем служила смесь *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (40 : 12 : 29 по объему). Выбранная концентрация уксусной кислоты была оптимальной для разделения таннинного комплекса.

Хроматограммы после удаления растворителя проявлялись опрыскиванием ванилиновым реактивом (1% раствор ванилина в конц. соляной кислоте ⁽¹²⁾). Для идентификации отдельных катехинов на ту же полосу бумаги рядом с исследуемым образцом наносились метчики в виде либо индивидуальных катехинов, либо в виде стандартного препарата чайного танина с заранее известным составом катехинов. В некоторых случаях тот или иной метчик добавлялся к анализируемому материалу, усиливая в определенных местах хроматограммы интенсивность окраски с ванилином.

Специально поставленными опытами было установлено, что хроматограммы препарата танина и хроматограммы водных экстрактов сухих чайных листьев при их сравнении для одного и того же образца полностью идентичны. По данным же Робертса и Вуда ⁽⁹⁾, идентичны и хроматограммы сока свежих чайных листьев и экстракта из сухих листьев. Тем самым подготовка материала для хроматографического исследования на бумаге может быть значительно упрощена. Обычно 6 г высушен-

ных чайных листьев растирались в ступке с 20 мл дистиллированной воды при 40—50°. Однородная масса отжималась через ткань, и жидкость подвергалась центрифугированию 15 мин. при 3000 об/мин на обычной лабораторной центрифуге. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор хранился в холодильнике при +2 — +4° и употреблялся для нанесения на бумагу в количестве 5—10 μ л. Одномерная хроматография проводилась на полосах бумаги длиной 45—55 см. Испытываемые образцы или растворы метчиков наносились при помощи микропипетки на линию, отстоящую на 6 см от края бумаги. Бумага с нанесенными на нее веществами помещалась для нисходящей хроматографии в цилиндрический сосуд (насыщенный парами растворителя) и после получасовой экспозиции приводилась в контакт с заливаемым в лодочку растворителем. Растворитель пропусклся от 16 до 24 час. в зависимости от сорта бумаги. Для хроматографической № 2 скорость впитывания смеси *н*-бутанол : уксусная кислота : вода составляла 2,4—2,7 см/час, для бумаги № 3—1,4—1,6 см/час.

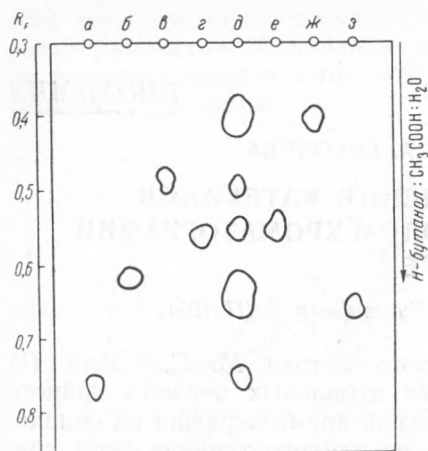


Рис. 1. Хроматограмма чайного танина. а — *l*-эпикатехингаллат, б — *l*-галлокатехингаллат, в — *d, l*-галлокатехин, г — *d, l*-катехин, д — стандартный препарат танина, выделенный из 3-листных побегов, е — *l*-эпикатехин, ж — *l*-эпигаллокатехин, з — *l*-эпигаллокатехингаллат

На рис. 1 изображена хроматограмма препарата танина, выделенного из молодых 3-листных побегов грузинского чайного растения, и соответствующих метчиков-катехинов (4).

Как видно из рис. 1, в отличие от силикагеля, при одномерной хроматографии на бумаге не наблюдается разделения таких эимерных пар, как *l*-эпикатехин и *d, l*-катехин, *l*-эпигаллокатехингаллат и *l*-галлокатехингаллат. В то же время *l*-эпигаллокатехин и *d, l*-галлокатехин могут быть разделены. Аналогичная картина наблюдается и для смеси фенол : уксусная кислота : вода (50 : 4 и вода до насыщения). В табл. 1 приводятся средние значения R_F , полученные при 18—22° для различных катехинов.

Поскольку бумага № 3 была доступна лишь в ограниченном количестве, то основная часть работы проводилась на бумаге «хроматографическая № 2». Для более четкого разделения катехинов была использована двумерная хроматография. Первым растворителем служила вышеуказанная смесь фенол : уксусная кислота : вода, причем в этом случае растворитель пускался по длине волокон. После тщательного просушивания

Таблица 1

Значения R_F для катехинов, входящих в состав чайного танина

Катехины	<i>н</i> -бутанол : : $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ (40 : 12 : 29)		Фенол : : $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ (50 : 4 и H_2O до насыщения)
	хромат. бум. № 2	хромат. бум. № 3	хромат. бум. № 2
<i>l</i> -эпигаллокатехин	0,57	0,40	0,46
<i>d, l</i> -галлокатехин	0,68	0,50	0,62
<i>l</i> -эпикатехин . . .	0,72 ₅	0,56	0,62
<i>d, l</i> -катехин . . .	0,72 ₅	0,56	0,62
<i>l</i> -эпигаллокатехин- галлат	0,79	0,64	0,58
<i>l</i> -галлокатехингал- лат	0,79	0,64	0,58
<i>l</i> -эпикатехингаллат	0,87	0,77	0,66

для удаления фенола через бумагу (лист размером 42×42 см) пропускался в перпендикулярном направлении второй растворитель — *n*-бутанол : уксусная кислота : вода.

Из рис. 2 А видно, что двумерная хроматография катехинов на бумаге «хроматографическая № 2» приводит лишь к более четкому разделению части компонентов, а не к их полному разделению, описанному для бумаги Ватман № 1 (9). Метод хроматографии на бумаге в применении к катехинам достаточно чувствителен (он позволяет открывать 10—15 μ г вещества) и прост. Недостатком метода является его качественный характер.

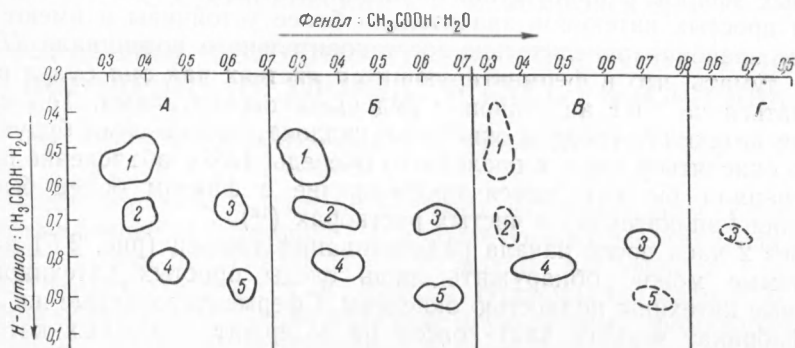


Рис. 2. Двумерные хроматограммы катехинового комплекса чайных листьев на различных стадиях производства черного чая. А — танина исходных зеленых листьев чая, Б — танина завяленных листьев, В — танина листьев чая после 1-го скручивания, Г — танина листьев чая после 2-го скручивания. 1 — *l*-эпигаллокатехин, 2 — *d, l*-галлокатехин, 3 — *l*-эпикатехин и *d, l*-катехин, 4 — *l*-эпигаллокатехингаллат и *l*-галлокатехингаллат, 5 — *l*-эпикатехингаллат

Хроматография на бумаге была использована для изучения превращения катехинов в процессе изготовления черного чая. Известно, что при ферментации листьев чая таннинный комплекс подвергается ферментативному окислению под действием полифенолоксидазы (13—17). Это окисление сопровождается увеличением молекулярного веса танина и его частичным переходом в нерастворимую форму. Представлялось интересным выяснить, какие изменения претерпевают отдельные катехины в ферментирующихся листьях чая. С этой целью в августе 1951 г. на Анасеульской опытной чайной фабрике в Грузии из одной партии сырья были отобраны образцы по различным стадиям производственного процесса: 1) исходных зеленых листьев, 2) завяленных листьев, 3) листьев после 1-го скручивания (30 мин.), 4) листьев после 2-го скручивания (2 часа) и 5) полуфабриката черного чая. Образцы фиксировались в токе горячего воздуха. Из сухого материала вышеописанным способом готовились водные вытяжки. Учитывая потери катехинов в результате окисления, при хроматографии образцов 2-го скручивания и полуфабриката количество наносимого на бумагу экстракта удваивалось. На рис. 2 представлены двумерные хроматограммы катехинового комплекса чайных листьев на различных стадиях производства черного чая (бумага «хроматографическая № 2»).

Из этих хроматограмм нетрудно видеть, что частичное окисление катехинов начинается уже во время завяливания. Вследствие образования продуктов окисления пятна становятся более размазанными и менее ярко окрашенными (рис. 2 Б). Раздавливание листьев приводит уже к энергичному окислению чайного танина. При этом отдельные катехины окисляются с весьма различной скоростью. Так, за 30 мин., прошедшие с начала раздавливания листьев (рис. 2 В), *l*-эпигаллокатехин, *d, l*-галлокатехин и *l*-эпикатехингаллат были почти полностью окислены,

а пятно 4 (*l*-эпигаллокатехингаллат и *l*-галлокатехингаллат) заметно уменьшило интенсивность своей окраски. Простые же катехины (*l*-эпикатехин и *d*, *l*-катехин), несмотря на то, что их количество в 8 раз меньше количества галлокатехинов⁽⁴⁾, почти не были затронуты окислением за этот срок. Таким образом, при ферментации окислению подвергаются в первую очередь катехины, содержащие оксигруппы рядового расположения.

Ранее А. Курсановым и М. Запрометовым⁽¹⁸⁾ было показано, что простые катехины ускоряют и углубляют окисление галлокатехинов и их галловых эфиров в присутствии полифенолоксидазы. Так как хинонные формы простых катехинов значительно более устойчивы и имеют более высокие значения окислительно-восстановительного потенциала (E_0), то можно думать, что в ферментирующихся листьях чая они будут восстанавливаться за счет катехинов с рядовыми оксигруппами. Тем самым, простые катехины, ускоряя окисление галлокатехинов, сами будут необратимо окисляться лишь в последнюю очередь. Такое объяснение процесса устраняло бы кажущееся противоречие с фактом более быстрого окисления *l*-эпикатехина в чистых растворах⁽¹⁸⁾.

Через 2 часа после начала раздавливания листьев (рис. 2 Г) на хроматограмме можно обнаружить лишь следы простых катехинов; все остальные катехины полностью окислены. Сферментированные же листья (полуфабрикат черного чая) совсем не содержат свободных катехинов или наиболее близких продуктов их окисления — на такой хроматограмме обработка ванилиновым реактивом приводит к проявлению интенсивно окрашенного пятна лишь в исходной точке нанесения сока. Таким образом, качество черного чая, в значительной мере зависящее от состава дубильных веществ⁽¹³⁾, определяется не свободными катехинами, а продуктами их окисления и вторичного превращения.

Авторы приносят благодарность акад. А. Л. Курсанову за ценные советы и указания, способствовавшие осуществлению настоящей работы.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
3 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. С. Цвет, Тр. Варш. общ. естествоисп., отд. биол., 14, 20 (1903).
² A. Bradfield, M. Penney, W. Wright, J. Chem. Soc. London, 32 (1947).
³ A. Bradfield, M. Penney, *ibid.*, 2249 (1948). ⁴ М. Н. Запрометов, Биохимия, 17, 97 (1952). ⁵ М. Н. Запрометов, ДАН, 87, 649 (1952).
⁶ М. Н. Запрометов, Чайный танин. Его состав, свойства и превращения. Автореф. кандидат. дисс., М., 1952. ⁷ R. Consden, A. H. Gordon, A. Martin, Biochem. J., 38, 244 (1944). ⁸ A. Bradfield, E. Bate-Smith, Biochem. et Biophys. Acta, 4, 441 (1950). ⁹ E. A. H. Roberts, D. J. Wood, Biochem. J., 49, 414 (1950). ¹⁰ O. Th. Schmidt, R. Lademan, Lieb. Ann. Chem., 547, 41 (1951).
¹¹ R. S. Asquith, Nature, 168, 738 (1951). ¹² А. Л. Курсанов, Биохимия, 6, 128 (1941). ¹³ А. Л. Курсанов, Синтез и превращения дубильных веществ в чайном растении. VII Баховское чтение, М., 1952. ¹⁴ А. И. Опарин, Биохимия чайного произв., 1, 6 (1935). ¹⁵ М. А. Бокучава, Дубильные вещества и окислительные ферменты грузинского чая. Автореф. докт. дисс., М., 1949. ¹⁶ А. Л. Курсанов, К. М. Джемухадзе, М. Н. Запрометов, Биохимия, 12, 121 (1947).
¹⁷ А. Л. Курсанов, Биохимия чайного произв., 5, 7 (1946). ¹⁸ А. Л. Курсанов, М. Н. Запрометов, Биохимия, 17, 230 (1952).