

## 中压硅胶柱层析连续纯化茶叶中 EGCG 及 ECG 的研究



YANG Lei

杨磊<sup>1</sup>, 高彦华<sup>1</sup>, 祖元刚<sup>1\*</sup>, 祖述冲<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学 植物药工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 东北林业大学 职业技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘 要:** 采用一种连续中压硅胶柱层析分离高纯度表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)及表儿茶素没食子酸酯(ECG),原料为含量高于 98% 的茶多酚。连续中压柱层析分离工艺条件为: 160~280  $\mu\text{m}$  硅胶为填充料, 1 200 mm  $\times$  80 mm 的自制不锈钢中压层析柱, 洗脱液为乙酸乙酯-石油醚-甲酸(体积比 6:4:1), 洗脱流速为 30 mL/min, 负载量为 35 g/kg(以硅胶计,下同),可以得到纯度大于 98% 的 EGCG 产品(平均回收率为 85.5%)和 98% 的 ECG 产品(平均回收率均为 80.3%)。回收的洗脱剂先校正 pH 值,再经薄层层析校正后可重复使用。使用后的层析柱用乙酸乙酯再生,石油醚为平衡剂平衡,平衡后的层析柱可重复使用。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯;表儿茶素没食子酸酯;硅胶;连续中压柱层析

中图分类号:TQ91;Q949.744

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2007)02-0100-05

## Study on Successive Purification of Epigallocatechin Gallate and Epicatechin Gallate by Column Chromatography

YANG Lei<sup>1</sup>, GAO Yan-hua<sup>1</sup>, ZU Yuan-gang<sup>1</sup>, ZU Shu-chong<sup>2</sup>

(1. Engineering Research Center of Plant Medical, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. Vocational and Technical College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** A method is described for successive purification of epigallocatechin gallate (EGCG) and epicatechin gallate (ECG) by medium-pressure silica gel column chromatography. The raw material was 98% tea polyphenols. The operating conditions of the chromatographic steps were investigated and optimized, using 1 200 mm  $\times$  80 mm stainless steel column as chromatographic column. The optimum condition was as followed: 160-280  $\mu\text{m}$  silica gel as filling material, ethyl acetate-petroleum ether-formic acid 6:4:1 as eluting solvent, flowing rate 30 mL/min, loading amount 35 g/kg silica gel. The average yields of 98% EGCG and 98% ECG were 85.5% and 80.3%, respectively. A reclaimed eluting solvent can be used repeatedly, it's pH value is first adjusted, and concentration ratio is then adjusted by TLC method. The chromatographic column which was regenerated by ethyl acetate, and equilibrated with petroleum, can be used repeatedly.

**Key words:** epigallocatechin gallate; epicatechin gallate; silica gel; successive medium-pressure column chromatography

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)及表儿茶素没食子酸酯(ECG)是茶叶中的一类主要生物活性成分<sup>[1]</sup>。国外一些学者研究表明<sup>[2-8]</sup>:具有抗氧化活性的 EGCG 能够与癌细胞基底膜粘蛋白受体(67-kDa laminin receptor, 67LR)结合,抑制肿瘤细胞的转移。而 ECG 在抑制人体病毒侵袭、清除脂质自由基方面作用显著。同时, ECG 具有极强的抑菌活性,可望开发成一种天然的类抗生物质。因此, EGCG 及 ECG 的提取和应用已受到广泛关注。由于茶叶中各种多酚组分的化学结构与性质十分相近,极性较强,水溶性好,单体的分离难度大。根据相关文献来看,目前对 EGCG 和 ECG 单体的纯化主要路线为<sup>[9-14]</sup>:采用葡聚糖凝胶如 Sephadex LH-2 柱层析,再经过多步重结晶过程分离,工艺过程复杂,所需溶

收稿日期:2005-11-17

作者简介:杨磊(1964-),男,黑龙江哈尔滨人,副教授,博士,主要从事天然产物的提取分离和应用的研究工作

\* 通讯作者:祖元刚,博士生导师,从事植物化学和植物药研发;E-mail:zygorl@vip.hl.cn.

剂量大,处理量较小,填料价格昂贵,采用敞口常压柱层析,生产周期长,分离效果不好,且易逸出有机溶剂蒸气污染环境,因此,作者采用连续中压硅胶柱层析法进行了分离,为扩大生产提供了有参考价值的分离工艺。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

不锈钢中压层析柱,根据文献[15]自制,柱长 1 200 mm,内径 80 mm,耐压 20 MPa,内装 160 ~ 280  $\mu\text{m}$  薄层层析硅胶;2J-X16/15 柱塞式计量溶剂泵,杭州之江科学仪器厂;循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;旋转薄膜蒸发器,上海申胜公司;负压成膜浓缩装置,东北林业大学植物药工程研究中心研制(专利申请号:200420063621.6);D99 型台式高速微型离心机,宁波新芝科器研究所;高效液相色谱仪,1580 泵,1575 型紫外检测器,日本 Jasco 公司;PHS-3C 型酸度计,上海精密仪器仪表有限公司;SD-05 型喷雾干燥仪,英国 Labplant 公司。

### 1.2 材料

98% 茶多酚,自制,含 EGCG 60.5%,ECG 15.3%,对照品 EGCG、ECG 购自 Sigma 公司,含量均高于 98%;色谱检测试剂乙腈、乙酸乙酯、硫酸为色谱纯,购自美国 Dima Technology Inc. 公司;硅胶购自青岛海洋化工有限公司,其它试剂为国产分析纯。

## 2 实验方法

### 2.1 EGCG 及 ECG 含量测定方法

**2.1.1 色谱条件**<sup>[16]</sup> 色谱柱 ODS-C<sub>18</sub>(200 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );检测波长:280 nm;流动相:乙腈-水-乙酸乙酯-硫酸(体积比 80:11:2:0.18);流速 1.0 mL/min,柱温为室温;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.1.2 标准曲线的绘制** 精密称取对照品 EGCG 2.9 mg 于 10 mL 容量瓶中,流动相溶解并稀释至刻度,得每毫升含 EGCG 0.284 2 mg 的对照品储备液,备用。精密吸取对照品储备液 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL,分别置于 5 mL 容量瓶中,流动相稀释至刻度,制成不同质量浓度的对照品溶液。

依次取 10  $\mu\text{L}$  上述对照品溶液进样,每个质量浓度重复 3 次。按上述色谱条件测定,绘制标准曲线,并计算回归方程。结果表明,EGCG 在 0.028 42 ~ 0.284 2 g/L 之间呈良好的线性关系。其线性回归方程及相关系数为: $Y = 14\ 683\ 154.941x - 21\ 671.933$ ,  $R^2 = 0.999$ ,式中, $Y$  为峰面积积分值; $x$  为对照品质量浓度, g/L。

精密称取对照品 ECG 2.0 mg,方法同上,绘制标准曲线(图略),并计算回归方程。结果表明,ECG 在 0.019 6 ~ 0.196 g/L 之间呈良好的线性关系。其线性回归方程及相关系数为: $Y = 22\ 341\ 997.565X + 6\ 212.478$ ,  $R^2 = 0.999$ ,式中, $Y$  为峰面积积分值; $X$  为对照品质量浓度, g/L。

### 2.2 硅胶柱层析纯化

**2.2.1 层析柱装填** 称取一定量硅胶,用石油醚分散驱除空气后匀浆湿法装柱,放置至填料充分沉降,洗脱液以一定流速淋洗直至柱平衡。

**2.2.2 柱层析纯化过程** 称取一定量的茶多酚原料用少量乙酸乙酯溶解后,柱塞式溶剂泵进液,洗脱液洗脱,洗脱液分段收集,TLC 和 HPLC 检测,合并,减压浓缩回收洗脱液,浓缩物加去离子水溶解后喷雾干燥得产品,低纯度组分收集后作为层析原料再次纯化。有效成分经 TLC 及 HPLC 检识全部流出后,层析柱用乙酸乙酯再生,石油醚平衡后可再次上样,反复使用。

## 3 结果与讨论

### 3.1 洗脱液溶剂配比

根据茶多酚中各多酚的性质,选择乙酸乙酯、石油醚、甲酸按不同比例混合进行试验,经  $G_{f254}$  荧光硅胶板展开,EGCG 的  $R_{f1}$  值和 ECG 的  $R_{f2}$  值分别如下:乙酸乙酯、石油醚、甲酸 7:3:0.5(体积比,下同)

时,拖尾较严重;6:4:1时,无拖尾现象, $R_{f1}=0.18$ , $R_{f2}=0.21$ ;5:5:1时,无拖尾现象, $R_{f1}=0.07$ , $R_{f2}=0.09$ ;3:7:1时,展开剂分层。

从上述结果分析可知,3种溶剂体积比7:3:0.5和3:7:1时不适合作为柱层析的洗脱液,6:4:1和5:5:1可作为柱层析的洗脱液,柱层析校正实验表明,体积比为5:5:1时作洗脱液,成分可得到较好分离,但洗脱液极性太小,分离时间很长,不仅所需溶剂较多,同时柱内物质扩散严重,得到的交叉组分较多;而6:4:1时极性适中,各组分得到较好的分离,同时分离时间较短,柱内物质扩散不明显,达到了分离的目的。经实验验证,选择最佳的洗脱液比例为:乙酸乙酯、石油醚、甲酸的体积比为6:4:1。

### 3.2 硅胶粒度

硅胶的化学成分是二氧化硅,是柱层析常用的固定相之一。硅胶颗粒的大小直接影响柱层析的分离效果,一般来讲,硅胶颗粒越小,对样品的分离效果越好,反之则越差,但是硅胶颗粒太小,不仅价格较贵,还会降低洗脱流速。经实验验证,60~120  $\mu\text{m}$ 以及120~160  $\mu\text{m}$ 的硅胶虽展开剂流速较快,使整个纯化周期减小,但是,EGCG与ECG的分离不明显,280~450  $\mu\text{m}$ 的硅胶,虽分离效果较好,但是硅胶颗粒太细,洗脱液流速慢,柱压加大,增加泵负荷,因此,160~280  $\mu\text{m}$ 的硅胶相对较理想,能达到快速分离的目的。

### 3.3 洗脱速度

取160~280  $\mu\text{m}$ 硅胶3 kg,经石油醚分散上柱,以乙酸乙酯、石油醚、甲酸6:4:1为洗脱液,上样量100 g,测试了洗脱液流速分别为25、30、35和40 mL/min条件下的分离效果,分离周期以及回收率,结果如图1(a)所示。由图可知,当流速为25~40 mL/min时,EGCG及ECG分离纯度高于98%的组分的回收率都随洗脱液流速的提高表现为先上升后下降的趋势,当流速为25 mL/min时,由于流速低,造成分离时间长,同时柱层析内组分扩散效应严重,分离效果不理想,当流速大于30 mL/min时,回收率显著下降,所以确定分离流速为30 mL/min。

### 3.4 负载量

以乙酸乙酯、石油醚、甲酸体积比为6:4:1为洗脱液,流速控制在30 mL/min,测试了样品在不同负载量下的分离效果,以98% EGCG以及98% ECG的回收率为指标,结果如图1(b)所示。由图可知,分离效果随负载量的增加逐渐变差,当负载量大于35 g/kg(以硅胶计,下同)时,分离度下降,高纯度EGCG和ECG的回收率显著降低。考虑到实际工业化生产时,希望能够一次处理尽量多的样品,减少生产成本。所以选择35 g/kg硅胶的负载量,能够保证产品分离纯度的条件下实现更大的产品产量,以达到理想的效益。

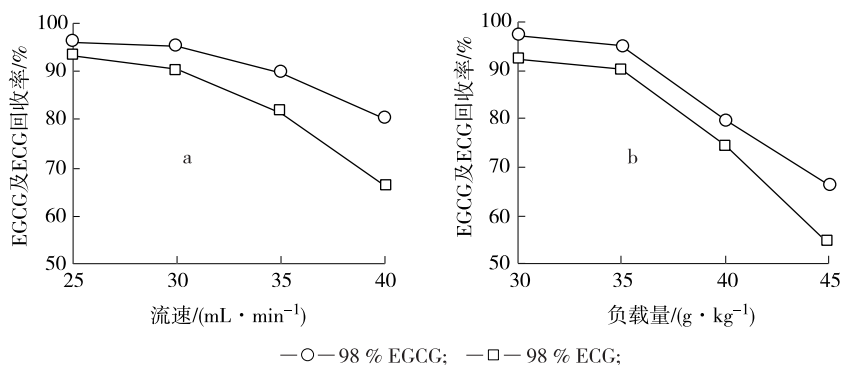


图1 流速(a)和负载量(b)对EGCG及ECG回收率的影响

Fig. 1 Effects of elution rate (a) and loading amount (b) on the yields of EGCG and ECG

### 3.5 柱层析纯化过程

层析柱采用湿法填充,称取35 kg 160~280  $\mu\text{m}$ 硅胶装于0.1 m<sup>3</sup>调配罐中,加入石油醚45 L,搅拌,使硅胶均匀分散在石油醚中,除去气泡,然后装入1200 mm×80 mm不锈钢中压层析柱,使硅胶均匀填满整个柱体不留死体积,密封后用管道与柱塞泵连接。以乙酸乙酯、石油醚、甲酸6:4:1为洗脱液,调

配好后装于洗脱液贮罐中,再生液乙酸乙酯装于再生液贮罐中,平衡液石油醚装于平衡液贮罐中。将含量为 60 % EGCG 的茶多酚用 500 mL 乙酸乙酯溶解后泵入层析柱柱头,用洗脱液以流速 30 mL/min 进行洗脱,定量分批连续接收洗脱流分,每瓶 2 L,以 TLC 定性及 HPLC 定量检识。薄层展开剂为苯-丙酮-甲酸(体积比 6:5.8:0.9),于紫外灯下与 EGCG 及 ECG 标准品对照。流分经 TLC 定性分析后,再经 HPLC 定量检测 EGCG 及 ECG 相对峰面积,并将峰面积值代入标准曲线中计算浓度,洗脱曲线如图 2。

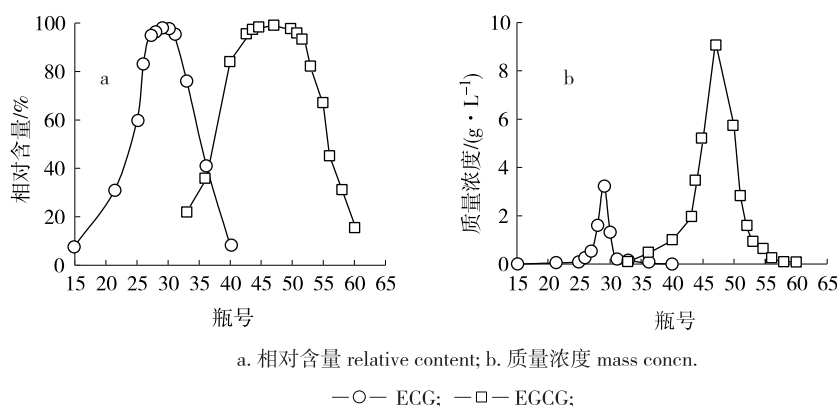


图 2 EGCG 及 ECG 洗脱曲线

Fig. 2 Eluting curves of EGCG and ECG column chromatography

由图 2 可知,ECG 相对峰面积高于 95 % 并且浓度较高的区间为瓶号 27 ~ 31 流分,而 EGCG 相对峰面积高于 95 % 并且浓度较高的区间为瓶号 43 ~ 51 流分,分别收集后,采用负压成膜浓缩装置回收洗脱液后,加少量去离子水,真空喷雾干燥得产品,HPLC 测定 EGCG 含量为 98.3 %,收率为 85.3 %, ECG 含量为 98.1 %,收率为 83.7 %。将 EGCG 与 ECG 两者交叉区间中浓度较高的瓶号 40 ~ 42 流分及 EGCG 浓度较高的瓶号 52 ~ 55 流分收集,负压成膜浓缩回收洗脱液后,得浓缩物作为下次上柱原料。回收的洗脱液为乙酸乙酯、石油醚和甲酸的三元洗脱液,在溶剂回收过程中三者的损失不同,造成回收后的洗脱液三者的配比与使用前不同,因此需要首先进行 pH 值的校正,方法是在回收洗脱剂中加入适量甲酸使其与使用前的 pH 值一致,然后再加入适量乙酸乙酯或石油醚校正,用 TLC 法分别以使用前和校正后的洗脱液为展开剂展开 EGCG 对照品,使 EGCG 在两者中的  $R_f$  值相同。经上述方法校正后的洗脱液可重复使用。

向洗脱后的层析硅胶柱泵入 150 L 乙酸乙酯洗除强极性杂质,将其再生,然后泵入 250 L 石油醚平衡柱体,平衡后的层析硅胶柱重复使用。

### 3.6 重现性实验

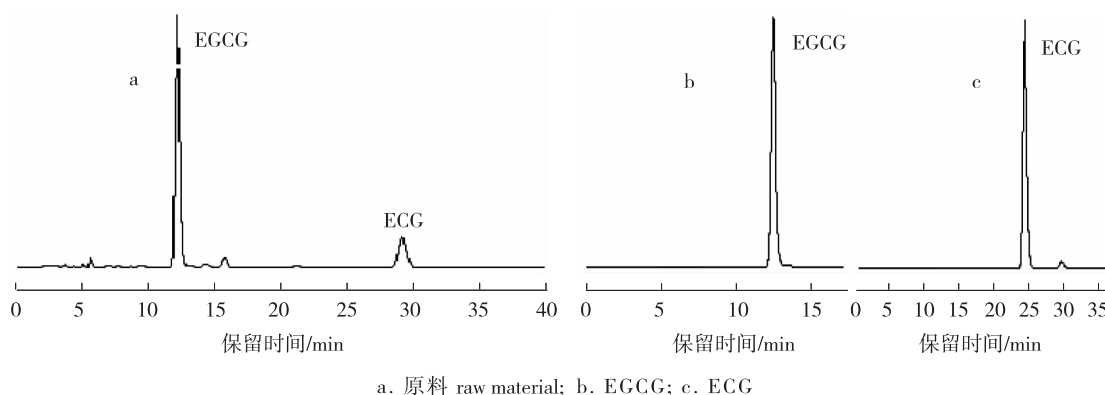
按上述工艺条件,重复上样于经乙酸乙酯再生、石油醚平衡后的层析柱,实验 3 次,结果见表 1。

表 1 重现性实验结果

Table 1 The results of proof test

实验号 test No.	原料/g raw material	98 % EGCG 回收率/% recovery rate of 98 % EGCG	98 % ECG 回收率/% recovery rate of 98 % ECG
1	100.5	85.3	83.7
2	100.8	86.1	83.1
3	100.0	85.1	83.4

由表 1 可知,3 次实验所得到 98 % EGCG 产品平均回收率为 85.5 %,98 % ECG 产品平均回收率为 83.4 %。表明实验所确定的工艺条件分离 EGCG 和 ECG 效果较好,层析柱用乙酸乙酯再生石油醚平衡后使用的重现性较好,免去了层析过程每次均重新装柱的繁琐操作,达到清洁生产的目的。原料以及产品 HPLC 检测谱图如图 3。



a. 原料 raw material; b. EGCG; c. ECG

图3 原料及产品的 HPLC 谱

Fig.3 HPLC of the raw material and products

## 4 结论

**4.1** 连续中压硅胶柱层析分离 EGCG 和 ECG 的工艺条件为:1 200 mm × 80 mm 不锈钢中压层析柱装填 160 ~ 280 μm 层析硅胶,乙酸乙酯、石油醚、甲酸的体积比 6:4:1 为洗脱液,洗脱流速 30 mL/min,负载量为 35 g/kg(以硅胶计),可以同时得到纯度大于 98% EGCG 及 ECG 产品,EGCG 回收率 85.5% 以上,ECG 回收率达 83.3% 以上。同时,回收的洗脱液经 pH 值、薄层层析校正后可重复使用。使用后的层析柱以乙酸乙酯为再生液再生,石油醚为平衡液平衡,平衡后的层析柱可重复使用多次。

**4.2** 利用该工艺方法纯化 EGCG 及 ECG,与传统方法相比具有以下优点:溶剂用量少、层析填料价格低廉,除杂快速、方便、生产周期短、分离效果好,易于实现连续工业化清洁生产。

**致谢:**本实验所用自制实验仪器由实验室祖柏实高级工程师协助提供,在此表示感谢。

### 参考文献:

- [1] HAROLD N, GRAHAM PhD. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry [J]. Preventive Medicine, 1992, 21(3): 334-350.
- [2] HIROFUMI T, KIYOSHI K, YOSHINORI F, et al. A receptor for green tea polyphenol EGCG [J]. Nature, 2004, 11(4): 380-381.
- [3] GARBISA S, BIGGIN S, CAVALLARIN N, et al. Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea [J]. Nature Medicine, 1999, 5: 1216.
- [4] KIM C H, MOON S K. Epigallocatechin-3-gallate causes the p21/WAF1-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and inhibits matrix metalloproteinase-9 expression in TNF-alpha-induced vascular smooth muscle cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 435(2): 264-272.
- [5] ROOMI M W, IVANOV V, KALINOVSKY T, et al. In vivo antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human colon cancer cell HCT 116 xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry [J]. Oncol Rep, 2005, 13(3): 421-425.
- [6] YIHAI C, RENHAI C. Angiogenesis inhibited by drinking tea [J]. Nature, 1999, 398:381.
- [7] BACHMEIER B E, IANCU C M, JOCHUM M, et al. Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2005, 5(1): 149-163.
- [8] 张盛,刘仲华,黄建安.高 ECG 型儿茶素纯化工艺研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(2):144-146.
- [9] 苏文强,杨磊,朱明华,等.中压柱层析法分离白藜芦醇的研究[J].林产化学与工业,2004,24(1):39-42.
- [10] 浙江一新制药股份有限公司.高含量 EGCG 儿茶素的提取方法:中国,1367171A[P].2002-09-04.
- [11] 北京市新技术应用研究所.高纯度单体儿茶素的高速逆流色谱分离制备方法:中国,1277068A[P].2000-12-20.
- [12] 中国科学院福建物质结构研究所.一种茶多酚中儿茶素类化合物的分离方法:中国,1319597A[P].2001-10-31.
- [13] 浙江海正药业股份有限公司.表没食子儿茶素没食子酸酯单体纯化工艺:中国,1470510A[P].2004-01-28.
- [14] 浙江大学.表没食子儿茶素没食子酸酯单体纯化方法:中国,1465572A[P].2004-01-07.
- [15] 霍斯泰特曼 K,马斯顿 A,霍斯泰特曼 M.制备色谱技术[M].北京:科学出版社,2000:106-119.
- [16] SHARMA V, GULATI A, RAVINDRANATH S D, et al. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC [J]. Journal of Food Composition and Analysis S A,2005, 18: 583-594.