

中图分类号: R917; R284 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)22-0077-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.22.017



硅胶柱层析法分离纯化表没食子儿茶素没食子酸酯

于春刚¹, 李小平², 刘黎莎¹, 卢晓东¹, 李荣运¹, 韩志武^{1△}

(1. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266555; 2. 山东省青岛市妇女儿童医院, 山东 青岛 266034)

摘要:目的 优化表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的分离纯化条件。方法 采用硅胶柱层析法,用氯仿和乙酸乙酯对儿茶素富集物进行萃取富集,考察洗脱条件(洗脱剂的类型、体积分数、pH、流速)及上样量对EGCG分离纯化效果的影响,收集高纯度的EGCG馏分,采用高效液相色谱(HPLC)法对儿茶素单体进行检测。结果 最佳洗脱条件为,儿茶素富集物上样量为0.4 g,以80%乙醇为洗脱剂,在pH 4.0、流速3 mL/min条件下进行洗脱。在此条件下,EGCG得率为81.79%,纯度为91.14%。结论 硅胶柱层析法具有方便、快速、纯化分离效果好等优点,可经济、有效地分离出高纯度EGCG。

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯;硅胶柱层析法;分离;纯化;得率;纯度

Separation and Purification of Epigallocatechin Gallate by Silica Gel Column Chromatography

YU Chungang¹, LI Xiaoping², LIU Lisha¹, LU Xiaodong¹, LI Rongyun¹, HAN Zhiwu¹

(1. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China 266555; 2. Women and Children's Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong, China 266034)

Abstract: Objective To optimize the separation and purification of epigallocatechin gallate (EGCG). **Methods** Silica gel column chromatography was adopted. Catechin enrichment was extracted and concentrated by chloroform and ethyl acetate. The effects of elution conditions (eluent type, volume fraction, pH and flow rate) and sample amount on the separation and purification of EGCG were investigated. High-purity EGCG fractions were collected, and catechin monomers were detected by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. **Results** The optimal elution conditions were as follows: the catechin enrichment amount was 0.4 g, 80% ethanol was as the eluent, the sample was eluted at pH 4.0 and flow rate of 3 mL/min. Under the above conditions, the yield of EGCG was 81.79%, and its purity was 91.14%. **Conclusion** The silica gel column chromatography method is convenient, fast and effective, which can separate the high-purity EGCG economically.

Key words: epigallocatechin gallate; silica gel column chromatography; separation; purification; yield; purity

儿茶素又称茶单宁,是从茶叶中分离获得的一类以2-苯基苯并吡喃为基本结构的类黄酮化合物^[1],可分为表儿茶素(EGC)、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯(EGC)及表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)4种主要类型^[2],以EGCG含量最高。流行病学调查和实验室研究均表明,EGCG具有抗肿瘤、抗氧化及清除自由基等功效^[3-5]。目前,EGCG分离纯化方法主要包括高效液相色谱法、高速逆流色谱(HSCCC)法、超临界流体萃取法、柱层析分离法等^[6-8]。但这些方法使用中

存在设备一次性投入资金大、分离工艺周期长及最后制备所得成品数量少等问题,致使产品价格昂贵,从而给大规模分离制备儿茶素单体带来较大困难。传统的柱层析方法具有操作简便、价格经济的优点,是一条较合理可行的制备途径。本研究中采用硅胶柱层析法分离和纯化儿茶素的单体成分EGCG,考察洗脱条件对分离的影响,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定其含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公

第一作者:于春刚,男,硕士,主管药师,研究方向为药理学,(电子信箱)yuchungang@126.com。

△通信作者:韩志武,男,硕士,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)zhiwu1218@126.com。

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2017, 1863(10): 2633 - 2644.
[12] SHIRAIISHI N, AONO M, KAMEYAMA Y, et al. Effects of cardiac output on the onset of rocuronium - induced neuromuscular block in elderly patients [J]. J Anesth, 2018, 32(4): 547 - 550.
[13] VAN MONTFOORT JE, HAGENBUCH B, FATTINGER KE, et al. Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphipathic type II organic cations [J].

J Pharmacol Exp Ther, 1999, 291(1): 147 - 152.
[14] PROOST JH, ERIKSSON LI, MIRAKHUR RK, et al. Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans [J]. Br J Anaesth, 2000, 85(5): 717 - 723.
[15] ROBERTSON EN, DRIESSEN JJ, BOOIJ LHDJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium in patients with and without renal failure [J]. Eur J Anaesthesiol, 2005, 22(1): 4 - 10.

(收稿日期: 2022-12-28; 修回日期: 2023-05-11)

司);SENCOR-201型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型循环水真空泵(天津华鑫仪器厂);LXJ2X型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂);BT125D型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);DZF-6050型真空干燥箱(上海凯朗仪器设备有限公司);玻璃层析柱(100~200目,上海仪容玻璃有限公司);柱层析硅胶(100~200目,青岛海洋化工厂);KQ500DE型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

儿茶素提取物(青岛大学药物化学教研室提供);儿茶素对照品(批号为20100107s,含量>95%)、EGCG对照品(含量>98%,批号为060104),均购自杭州和田生物技术有限公司;环己烷、丙酮、乙酸乙酯、乙腈、甲醇均为色谱纯,无水乙醇、氯仿、冰乙酸、浓盐酸均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Pronaos C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A为乙腈-冰乙酸-水(9:1.5:89.5,V/V/V),B为乙腈-冰乙酸-水(80:1.5:18.5,V/V/V),梯度洗脱(0~10 min时100%A,10~25 min时100%A→70%A,25~36 min时70%A,36~50 min时70%A→100%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:35℃;进样量:10 μL^[9]。

2.1.2 硅胶预处理及装柱

先将硅胶于110℃烘箱中活化2 h。放至室温后,过200目筛;取适量,用洗脱剂充分浸泡^[10]。湿法装柱。预先在层析柱底部放置大小、厚度合适的脱脂棉,将浸泡好的硅胶边搅拌边缓慢倒入层析柱,使硅胶自然下沉,轻敲击柱壁,使硅胶沉积压实,再用其7~10倍柱床体积的洗脱剂继续淋洗,调节至柱平衡。

2.1.3 溶液制备

对照品溶液:取EGCG对照品50 mg,精密称定,用双蒸水溶解并定容至25 mL,摇匀,超声(功率450 W、频率45 kHz,下同)处理10 min,即得质量浓度为2 mg/mL的对照品溶液。

供试品溶液:取儿茶素提取物适量,加水溶解后倒入分液漏斗,再加入等量氯仿,振摇、静置,分层后取上层(水层),重复萃取2次;合并水层后加入等量乙酸乙酯,振摇、静置,分层后取上层(脂层),重复萃取2次,合并脂层,置旋转蒸发仪上旋转浓缩,取浓缩物放入40℃真空干燥箱中减压干燥,得儿茶素富集物;取适量,精密称定,溶于少量洗脱剂中,超声除气泡,缓慢将样品溶液用滴管均匀地滴加于柱床表面,待样品溶液完全

渗入硅胶后泵入洗脱剂进行层析,分段收集洗脱液。将上述EGCG含量高的馏分合并浓缩后,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 方法学考察

取2.1.3项下对照品溶液及供试品溶液,按相应要求进行方法学考察。结果精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%,表明方法精密性、重复性良好,供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

2.2 工艺参数优化

洗脱剂:其他条件保持不变,对不同洗脱剂进行考察。结果50%乙醇为洗脱剂时洗脱效果最好。详见表1[其中EGCG得率(%)=儿茶素富集物层析后的EGCG的质量/儿茶素富集物中EGCG的质量×100%;EGCG纯度(%)=EGCG峰面积/总峰面积×100%]。

表1 不同洗脱剂对分离纯化效果的影响(% , n = 3)

指标	50% 环己烷	50% 丙酮	50% 乙酸乙酯	50% 乙醇
EGCG 纯度	70.65	79.67	80.86	85.63
EGCG 得率	61.42	70.73	72.92	76.35
RSD	1.52	1.84	2.01	1.51

乙醇体积分数:其他条件保持不变,考察乙醇不同体积分数时对EGCG分离纯化效果的影响。结果以无水乙醇效果最好但80%乙醇效果与之基本相当,出于经济因素考虑选择80%乙醇为洗脱剂。详见表2。

表2 乙醇体积分数对分离纯化效果的影响(% , n = 3)

指标	20%	40%	60%	80%	无水乙醇
EGCG 纯度	79.51	83.39	87.05	90.86	91.14
EGCG 得率	67.38	72.89	77.21	80.72	81.06
RSD	1.14	2.73	2.18	1.39	1.53

洗脱剂pH:其他条件保持不变,考察层析时不同pH对EGCG分离纯化效果的影响。结果最佳pH为4.0。详见表3。

表3 洗脱剂pH对分离纯化效果的影响(% , n = 3)

指标	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 6.0	pH 8.0
EGCG 纯度	81.14	87.06	89.58	83.15	79.53
EGCG 得率	70.75	78.19	79.84	72.28	68.02
RSD	2.81	1.94	2.04	3.25	1.87

洗脱剂流速:其他条件保持不变,考察层析时不同的流速对EGCG分离纯化效果的影响。结果当流速为3.0 mL/min时,EGCG的纯度和得率均较高,且分离时间较短。详见表4。

上样量;其他条件保持不变,考察不同上样量对EGCG分离纯化效果的影响。结果上样量为0.4 g时EGCG的纯度及得率均较好。详见表5。

表4 洗脱剂流速对分离纯化效果的影响(% , n = 3)

Tab. 4 Effect of eluent flow rate on the separation and purification (% , n = 3)

指标	1.0 mL/min	2.0 mL/min	3.0 mL/min	4.0 mL/min	5.0 mL/min	6.0 mL/min
EGCG纯度	80.47	87.71	90.21	89.87	87.45	80.64
EGCG得率	70.61	76.39	81.56	81.36	79.05	70.07
RSD	1.82	1.56	2.35	1.32	3.08	0.96

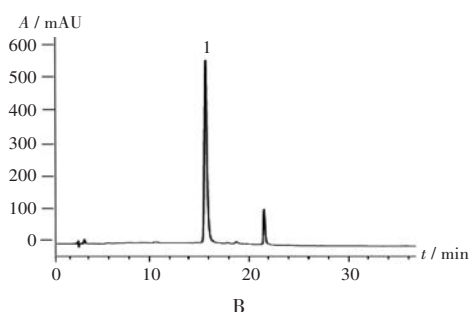
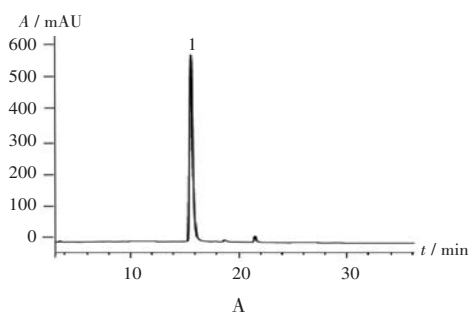
表5 上样量对分离纯化效果的影响(% , n = 3)

Tab. 5 Effect of sample amount on the separation and purification (% , n = 3)

指标	0.1 g	0.2 g	0.4 g	0.8 g	1.0 g
EGCG纯度	84.54	90.23	91.16	89.12	86.27
EGCG得率	77.06	81.81	81.34	80.67	78.31
RSD	1.49	3.27	0.78	1.57	2.50

2.3 优化条件下EGCG分离纯化效果

取儿茶素富集物0.4 g,精密称定,用适量乙醇溶解,经硅胶柱层析分离纯化,以80%乙醇(盐酸调pH至4.0)洗脱液,流速为3 mL/min,收集洗脱液,将洗脱液旋转浓缩后,用水定容,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图1)。结果,供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰。采用标准曲线法进行定量计算,所得EGCG纯度为91.14%,得率为81.79%。



1. 表没食子儿茶素没食子酸酯
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Epigallocatechin gallate
A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

3 讨论

3.1 分离方法选择

目前,分离制备儿茶素单体的方法主要有柱色谱法^[11]、HPLC法^[12]、HSCCC法^[13]、吸附分离法^[14]等。由于酯型儿茶素类单体的化学结构和性质很相近,要得到高纯度的儿茶素单体EGCG,采用一般的化学分离富集方法很难实现其单体的分离。现在所采用的分离方法基本是在较高纯度茶多酚的基础上,对其进行进一步的分离纯化。

赵敏等^[15]以毛尖茶叶为原料,用加速溶剂萃取法提取茶多酚粗品,取得较高的粗提率。包笋等^[16]采用HPLC法测定4种温州早茶样品中EGCG、EGC的含量,结果显示被测组分的含量与其峰面积线性关系良好。刘少静等^[17]采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法定量分析了安吉白茶中主要儿茶素类有效成分,结果EGC, EGCG, ECG的平均回收率分别为98.80%, 97.83%, 99.38%。王尉等^[13]采用HSCCC法对绿茶化学成分进行分离,通过对绿茶有效部位的分段萃取和多种溶剂系统的筛选,建立了分离绿茶化学成分的HSCCC法,分离得到的EGC, EGCG, ECG单体化合物纯度分别为97.2%, 98.8%, 99.2%。从国内外已有的文献报道及专利来看,茶多酚分离纯化技术仍存在缺点。溶剂萃取法由于很多物质的极性都相似或相近,导致提取液中不仅有茶多酚,还会有其他物质,杂质较多,故要得到较纯的茶多酚就需用大量的有机溶剂进行反复精制,易造成环境污染,不符合绿色化学理念。HPLC法制备儿茶素分离效率高,条件易控制,单体纯度高,在保持EGCG原药效性能的前提下,产品稳定性大幅增强。但该方法设备投资大、制备量较小,生产成本较高,难以工业化推广。HSCCC法可实现儿茶素单体的分离,但同样存在生产成本高,一次性设备投入高,制备量小的缺点,难以实现工业化、规模化生产。而传统的柱层析方法具有操作简便、价格经济的优点,为较合理可行的制备途径。

3.2 试验条件优化

EGCG属黄烷醇类物质,极性较强,洗脱剂的极性越大,对EGCG的分离纯化效果影响越明显,但若极性过大,所有组分可能均被带至溶剂前沿,无法分离^[18]。本试验中考察了不同洗脱剂,确定乙醇的洗脱效果最优。但不同体积分数的乙醇对洗脱效果仍存在显著影响^[18],综合考虑选用80%乙醇。由于儿茶素与硅醇基氢键作用的强弱与环境的酸碱度密切相关^[19-20],故也考察了洗脱剂的pH。当pH为2.0或3.0时,EGCG的纯度和得率均较pH为4.0时降低,这可能是由于酸度过高导致其分子基团破坏,致使洗脱下来的馏分中EGCG含量下降,表明EGCG分离纯化效果受酸碱度影响较大;

当 $\text{pH} > 4.0$ 时 EGCG 的纯度和得率呈逐渐降低趋势,这可能是因为儿茶素在中性或碱性条件下不稳定,易被氧化降解,致使 EGCG 含量降低^[21]。当洗脱剂流速 $> 3.0 \text{ mL/min}$ 时,EGCG 纯度及得率均较低,且洗脱剂的耗量大,色带也拖长;当洗脱剂流速 $< 3.0 \text{ mL/min}$ 时,EGCG 不仅纯度和得率均较低,且分离时间长。这是由于流速过大时,两相间浓度很难均衡分配,使分离效果变差;而流速过低时,轴向扩散的影响变大,使层析效果变差^[22-23]。本试验结果显示,当洗脱剂流速为 3.0 mL/min 时,EGCG 纯度及得率均为最高。平均流速为 4 mL/min 时,纯度及得率与平均流速为 3 mL/min 时基本相当,但洗脱剂的耗量增大,色带也拖长,综合考虑选择流速为 3.0 mL/min 为优化流速条件。随着上样量逐渐增加,由于各组分的峰形在色谱图上呈部分重叠现象,致使 EGCG 纯度及得率下降;上样量过大时,硅胶柱吸附饱和,EGCG 纯度及得率均显著降低,达不到要求,故以一次上样量为 0.4 g 为佳。

经氯仿和乙酸乙酯萃取后的儿茶素富集物,再经硅胶柱层析进一步分离纯化可得到高纯度的 EGCG 单体。试验通过优化 EGCG 硅胶柱层析分离纯化过程中的参数进行,得到最佳工艺参数为:儿茶素富集物上样量为 0.4 g ,洗脱剂乙醇溶液体积分数为 80% , pH 为 4.0 ,流速为 3 mL/min 。在上述条件下分离得到的 EGCG 经 HPLC 检测,其纯度超过 90% ,得率超过 80% 。

3.3 方法评价

硅胶柱层析法具有方便、快速、生产周期短、纯化分离效果好等优点,可经济、有效地分离出高纯度 EGCG 单体成分。

参考文献

- [1] FATHIMA A, RAO JR. Selective toxicity of Catechin - a natural flavonoid towards bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016,100(14):6395 - 6402.
- [2] KOCH W, KUKULA - KOCH W, GŁOWNIAK K. Catechin Composition and Antioxidant Activity of Black Teas in Relation to Brewing Time[J]. J AOAC Int, 2017,100(6):1694 - 1699.
- [3] GAN RY, LI HB, SUI ZQ, et al. Absorption, metabolism, anti - cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018,58(6):924 - 941.
- [4] XIONG LG, CHEN YJ, TONG JW, et al. Tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits Escherichia coli by increasing endogenous oxidative stress[J]. Food Chem, 2017,217:196 - 204.
- [5] KUMAR R, SHARMA A, KUMARI A, et al. Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K / Akt / mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax / Bcl - 2 pathway [J]. Biogerontology, 2019,20(2):171 - 189.
- [6] JIN X, LIU M, CHEN Z, et al. Separation and purification of epigallocatechin - 3 - gallate (EGCG) from green tea using combined macroporous resin and polyamide column chromatography [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015,1002:113 - 122.
- [7] PENG J, LI K, ZHU W, et al. Separation and purification of four phenolic compounds from persimmon by high - speed counter - current chromatography [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018,1072:78 - 85.
- [8] FU Q, LIANG T, LI Z, et al. Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. Carbohydr Res, 2013,379:13 - 17.
- [9] 罗晓明,周春山,钟世安,等. 茶多酚浸提工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002,23(3):41 - 43.
- [10] HAZGUI S, BONNOMET A, NAWROCKI - RABY B, et al. Epigallocatechin - 3 - gallate (EGCG) inhibits the migratory behavior of tumor bronchial epithelial cells [J]. Respir Res, 2008,9:33.
- [11] 刘伟,陈茜,周洁,等. 柱色谱分离制备无酯儿茶素[J]. 食品工业科技, 2012,33(18):58 - 62.
- [12] 李媛,苏美冬,刘佩. 茶叶中儿茶素的高效液相色谱法研究[J]. 农产品加工, 2017(15):29 - 30.
- [13] 王尉,林楠,乐胜锋,等. 高速逆流色谱法分离绿茶中的化学成分[J]. 食品科学, 2014,35(8):137 - 141.
- [14] 董占波. 吸附分离法制备茶叶儿茶素类和茶氨酸的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [15] 赵敏,唐美华,张之翼,等. 茶多酚的加速溶剂萃取与分析[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2012,34(4):123 - 127.
- [16] 包箐箐,向铮,林崇良. 高效液相色谱法测定温州早茶中儿茶素含量[J]. 中国药业, 2011,20(22):50 - 51.
- [17] 刘少静,谭雄,王晓茹,等. RP - HPLC 定量分析茶叶中几种主要儿茶素类有效成分[J]. 化学工程师, 2021,35(11):20 - 22.
- [18] 田娜,周达力,曹佩琴,等. 大孔吸附树脂对虎杖中白藜芦醇的分离纯化研究[J]. 中国农学通报, 2013,29(22):147 - 151.
- [19] TAN C, CELLI GB, SELIG MJ, et al. Catechin modulates the copigmentation and encapsulation of anthocyanins in polyelectrolyte complexes (PECs) for natural colorant stabilization[J]. Food Chem, 2018,264:342 - 349.
- [20] 华杰,陈平,张建博,等. 测定不同 pH 条件下三果汤中鞣质云实素 GA、EGCG、EGC、ECG 的含量变化[J]. 云南中医中药杂志, 2016,37(2):44 - 47.
- [21] 刘坤,孙来娣,高华,等. 儿茶素提取新工艺[J]. 食品研究与开发, 2011,32(9):36 - 39.
- [22] LI H, YE B, ZHU L, et al. Epigallocatechin gallate inhibits corneal neovascularization in rat alkaline burn model[J]. Pak J Pharm Sci, 2018,31(3(Supplementary)):1087 - 1092.
- [23] CUI L, LIU Y, LIU T, et al. Extraction of Epigallocatechin Gallate and Epicatechin Gallate from Tea Leaves Using β - Cyclodextrin[J]. J Food Sci, 2017,82(2):394 - 400.

(收稿日期:2022 - 12 - 03;修回日期:2023 - 05 - 28)