

## HP-20 大孔吸附树脂分离纯化儿茶素 EGCg 的效果

龚志华<sup>a, b</sup>, 黄甜<sup>a</sup>, 庞月兰<sup>a</sup>, 肖文军<sup>a, b\*</sup>

(湖南农业大学 a.园艺园林学院; b.茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**以 EGCg(表没食子儿茶素没食子酸酯)含量为 31.52% 的儿茶素粗提物为原料,比较 D<sub>202</sub>、XDA-1、D201、D900、LSA-7、HP-20 等 6 种大孔吸附树脂对 EGCg 的静态吸附与解吸的效果,并应用最佳大孔吸附树脂 HP-20 对 EGCg 分别进行动态等梯度洗脱和梯度洗脱试验,优化 HP-20 大孔吸附树脂分离纯化 EGCg 的技术参数.结果表明,应用体积为 125 mL 的柱进行等梯度洗脱时,1.8 g 上样量、2 BV/h 流速、40%乙醇体积分数、2 BV 洗脱体积,EGCg 的纯度和得率分别达 55.92%和 95.22%;以同样的柱进行梯度洗脱时,1.8 g 上样量、30%乙醇洗脱、2 BV/h 流速、2 BV 洗脱体积、收集 1~2 BV 的体积段,EGCg 的纯度和得率分别达 68.32%和 72.08%.

**关键词:**表没食子儿茶素没食子酸酯; HP-20 大孔树脂; 分离纯化

中图分类号: O652.62; O625.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0087-04

## Separation and purification of EGCg in catechins by HP-20 macroporous resin

GONG Zhi-hua<sup>a, b</sup>, HUANG Tian<sup>a</sup>, PANG Yue-lan<sup>a</sup>, XIAO Wen-jun<sup>a, b\*</sup>

(a.College of Horticulture and Landscape; b.Tea Key Laboratory of the Ministry of National Education, HNAU, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The rude catechin extracts of EGCg(Epi-gallate-catechin-gallate) with 31.52% as raw material, the HP-20 macroporous resin was screened from the six kinds of macroporous resin of D<sub>202</sub>, XDA-1, D201, D900, LSA-7, HP-20 by comparing their effects of static adsorption and de-sorption on EGCg. The HP-20 macroporous resin was then applied for gradient elution and in-gradient elution experiment, and the technological parameters were optimized. The result showed that 1.8 g injection solution, 2 BV/h flowing speed, 40% ethanol, 2 BV elution volume were the best parameters for gradient elution, and the purity and yield rate of EGCg reached 55.92% and 95.22% separately. While the parameters of 1.8 g injection solution, 2 BV/h flowing speed, 30% ethanol, 2 BV elution volume and 1-2 BV collection volume were the best parameters for in-gradient elution, and the purity and the yield rate of EGCg reached 68.32% and 72.08% in sequence, which showed good application value in industry.

**Key words:** EGCg; HP-20 macroporous resin; isolation and purification

茶多酚对茶叶品质的影响最显著<sup>[1]</sup>.自 20 世纪 90 年代后,随着“绿色化学”口号的提出,越来越多的学者致力于对茶多酚生产过程的精细化,其研究多集中于茶多酚的主体部分儿茶素(占茶多酚总量的 70%~80%),尤其是儿茶素中的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCg).

EGCg 是茶叶中的主要儿茶素之一,占茶多酚总量的 40%~50%,作为天然抗氧化剂和自由基清除剂,具有明显的抗衰老、抗突变、防癌抗癌、预防心血管疾病、防辐射等多种生物学活性,广泛应用于食品加工、医药保健和日用化工领域<sup>[2-5]</sup>.是酯型儿茶素单体 EGCg 的分离纯化,成为儿茶素分离、

收稿日期: 2009-09-23

基金项目: 国家 APEC 基金项目(200847); 中国博士后基金项目(20070410985); 湖南省博士后基金(2006FJ4263)

作者简介: 龚志华(1969-),女,湖南桃源人,副教授,从事茶及植物功能成分化学研究; \*通讯作者, xiaowenjun88@sina.com

纯化与临床应用研究的焦点。

分离儿茶素单体的过程<sup>[6]</sup>主要为:提取茶多酚粗品(TP)→分离儿茶素→纯化儿茶素单体。目前分离制备儿茶素单体的方法主要有柱色谱法<sup>[7]</sup>、柱色谱预分离-制备型 HPLC 纯化法<sup>[8]</sup>、有机溶剂富集-柱色谱纯化、高效液相色谱法<sup>[9]</sup>、高速逆流色谱法(HSCCC)<sup>[10]</sup>、沉淀-吸附法<sup>[11]</sup>、有机溶剂萃取法<sup>[12]</sup>等,但在降低成本、提高得率、保持产物的天然活性以及实现工业化等方面依然存在技术瓶颈。

笔者以 EGCg 含量为 35.52% 的儿茶素粗提物为原料,应用近年出现的新型大孔吸附树脂 HP-20 对 EGCg 进行分离纯化试验,并对相关技术参数进行了优化筛选,以期工业化生产制备高纯 EGCg 提供新途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

70% 小叶儿茶素(EGCg 含量为 31.52%,湖南金农生物资源股份有限公司产品);HP-20、D<sub>202</sub>、XDA-1、D201、D900、LSA-7 大孔吸附树脂(长沙市化学试剂玻璃仪器有限公司产品)。

### 1.2 方 法

(1) 树脂预处理。大孔吸附树脂上柱前,分别清洗干净,即采用 95% 乙醇浸泡充分溶胀→95% 乙醇洗至流出液加适量水无白色浑浊现象→去离子水洗尽乙醇后,以 4 倍体积 3% NaOH 溶液浸泡 4 h→去离子水洗至 pH 值为中性→4 倍体积 3% HCl 溶液浸泡 4 h→去离子水洗至 pH 值中性。

(2) 原料液制备。按照每次试验的上样量将儿茶素粗提物溶于蒸馏水,配制成质量分数为 20% 的水溶液。

(3) 不同大孔吸附树脂的静态吸附与解吸效果比较。将经预处理的 6 种大孔吸附树脂去表面水,各精密称取 1 g,置于具塞磨口锥形瓶中,分别加入 50 mL 的原料液,摇床振荡 24 h,过滤,检测滤液中 EGCg 的含量,计算单位质量树脂对 EGCg 的吸附量,并将吸附饱和的树脂再各用 50 mL 95% 乙醇解吸 24 h,检测解吸液中 EGCg 的含量,计算其解吸率,

筛选对 EGCg 吸附与解吸具有最佳效果的树脂。

(4) 最佳吸附与解吸效果树脂的等梯度洗脱条件优化。以乙醇为洗脱剂,设计乙醇体积分数(20%、40%、60% 等 3 个水平)、洗脱流速(0.5、1.0、2.0 BV/h 等 3 个水平)、上样量(0.2、0.6、1.8 g 等 3 个水平)、洗脱体积(2、4、6 等 3 个水平)的正交试验<sup>[13-15]</sup>,优化筛选最佳树脂的等梯度洗脱参数。

(5) 最佳吸附与解吸效果树脂的连续梯度洗脱条件优化。以 EGCg 得率与纯度为考察指标,以上述试验中最佳等梯度洗脱技术参数为基础,保持流速、上样量、洗脱体积不变,分别以 30%、35%、40%、45%、50% 乙醇进行连续梯度洗脱,分段收集洗脱液至流出液无色时,换下一梯度进行洗脱,筛选连续梯度洗脱的最佳乙醇体积分数。以最佳乙醇体积分数、洗脱流速、上样量、洗脱体积为操作参数,将原料液重新上柱进行洗脱,每收集 0.5 BV 洗脱液作为一个样品,筛选 EGCg 得率、纯度综合效果较好的收集段。

EGCg 含量采用高效液相色谱法测定。色谱柱: Nova-Pak C<sub>18</sub>(3.9 mm×150 mm);流速: 1.0 mL/min;柱温: 35 °C;检测波长: 278 nm;进样量: 10 μL;流动相: 采用二元梯度洗脱, A 相为超纯水, B 相为有机相(N,N-二甲基甲酰胺: 甲醇: 冰醋酸 = 80:4:3);梯度条件: B 相, 0.01 min 时 17%、15 min 时 20%、28 min 时 32%、34 min 时 32%、36 min 时 17%、40 min 时 17%。

水浸出物含量测定采用全量法<sup>[16]</sup>。

EGCg 纯度、EGCg 得率计算参照文献<sup>[15]</sup>方法。数据统计与分析采用正交设计助手 IIV3.1.1 软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同大孔吸附树脂对 EGCg 的静态吸附与解吸效果

HP-20、D<sub>202</sub>、XDA-1、D201、D900、LSA-7 等 6 种大孔吸附树脂对 EGCg 的吸附量和洗脱率如表 1 所示。由表 1 可知,单位质量的 HP-20 大孔吸附树脂对 EGCg 具有较好的吸附与解吸效果,其静态解吸量达 46.47 mg/g,在 6 种树脂中效果最佳。

表 1 不同树脂对 EGCg 的静态吸附量与静态洗脱率

Table 1 The static adsorption capacity and the static desorption percentage of EGCg by different resins

树脂	EGCg 静态吸附量/(mg·g <sup>-1</sup> )	EGCg 静态解吸率/%	EGCg 静态解吸量/(mg·g <sup>-1</sup> )
D <sub>202</sub>	32.21	4.48	1.44
XDA-1	29.62	80.51	23.85
D201	33.13	4.57	1.51
D900	34.32	0.30	0.10
LSA-7	21.22	93.16	19.77
HP-20	62.87	74.23	46.67

## 2.2 HP-20 树脂的等梯度洗脱条件优化

HP-20 对 EGCg 的等梯度洗脱正交试验结果如表 2 所示。结果表明,以 EGCg 的得率和纯度作为考察指标,对 EGCg 洗脱得率影响的显著程度大小依次为乙醇体积分数、上样量、洗脱流速、洗脱体积,并以 1.8 g 上样量、2 BV/h 流速、40%乙醇、洗脱体积 2 BV 为最佳组合,在此工艺条件下,EGCg 的得率与纯度分别为 95.22 %和 55.92 %。

表 2 正交试验中 EGCg 得率与纯度的极差分析

Table 2 The poor analysis of EGCg yield rate and purity in orthogonal experiment

处理号	上样量/g	流速/(BV·h <sup>-1</sup> )	乙醇体积分数/%	洗脱体积/BV	得率/%	纯度/%	干物重/mg
1	0.2	0.5	20	2	0.05	0.06	82.75
2	0.2	1.0	40	4	44.81	22.06	205.00
3	0.2	2.0	60	6	65.24	38.98	168.75
4	0.6	0.5	60	6	76.44	39.53	589.50
5	0.6	1.0	40	2	81.74	44.32	567.25
6	0.6	2.0	20	4	36.55	45.74	224.00
7	1.8	0.5	60	4	43.79	47.29	1 709.50
8	1.8	1.0	20	6	33.19	46.80	653.25
9	1.8	2.0	40	2	95.22	55.92	1 568.00
K <sub>1</sub>	110.10	120.28	69.79	177.01			
K <sub>2</sub>	194.73	159.74	221.77	125.15			
K <sub>3</sub>	172.20	197.01	185.47	174.87			
k <sub>1</sub>	36.70	40.09	23.26	59.00			
k <sub>2</sub>	64.91	53.25	73.92	41.72			
k <sub>3</sub>	57.40	65.67	61.82	58.29			
R <sub>1</sub>	28.21	25.58	50.66	17.28			
K <sub>4</sub>	61.10	86.88	101.72	100.30			
K <sub>5</sub>	129.59	113.18	122.30	115.09			
K <sub>6</sub>	150.01	140.64	125.8	125.31			
k <sub>4</sub>	20.37	28.96	33.91	33.43			
k <sub>5</sub>	43.20	37.73	40.77	38.36			
k <sub>6</sub>	50.00	46.88	41.93	41.77			
R <sub>2</sub>	29.63	17.92	8.02	8.34			

表 3 不同体积分数乙醇洗脱 EGCg 得率和纯度

Table 3 Effect of different ethanol concentration on the yield rate and purity of EGCg

样号	洗脱梯度/%	洗脱体积/BV	干物重/mg	洗脱量/mg	纯度/%	得率/%
1	30	0.5	38.97	0.02	0.06	0
2	30	0.8	695.02	306.99	44.17	28.47
3	30	1.0	629.57	429.87	68.28	45.71
4	30	1.0	252.69	74.97	29.67	7.57
5	30	1.0	72.42	7.97	11.00	0.91
6	35	1.0	91.03	3.52	3.87	0.38
7	35	1.0	51.98	0.52	1.01	0.05
8	35	0.8	18.51	0.12	0.63	0.01
9	35	1.0	18.54	0.07	0.38	0.01
10	40	1.0	25.28	0.04	0.17	0.01

## 2.3 HP-20 树脂的连续梯度洗脱条件优化

## 2.3.1 乙醇体积分数的筛选

结果(表 3)表明,采用 30%乙醇洗脱并收集 1~5 号样,几乎可以把 EGCg 完全洗脱下来,其中 3 号样的纯度和得率最高,可达 68.28%和 45.71%。同时,EGCg 主要集中在 0.6~2.5 BV 段(图 1),其后的洗脱液中 EGCg 纯度及得率均较低,因此收集 30%乙醇洗脱液中的 0.6~2.5 BV 体积段,可得到较高纯度及含量的 EGCg。

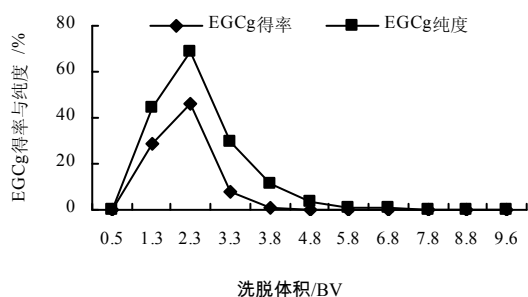


图1 30%乙醇梯度洗脱 EGCg 纯度及得率

Fig.1 The curve of EGCg's yield rate and purity in gradient elution by 30% ethanol

### 2.3.2 EGCg 得率、纯度综合效果较好收集段筛选

表4结果表明,在30%乙醇,125 mL树脂上样1.8 g,2 BV/h流速的条件下,收集的第三个样液,EGCg纯度最高,可达71.55%,得率为28.14%。第二个收集样液的EGCg纯度与得率分别为65.09%和43.94%,因此合并两个收集段的样液,EGCg的纯度与得率分别为68.32%和72.08%。将所得合并液浓缩、结晶,可得到相应的EGCg高纯品,符合工业化高效生产高纯EGCg的技术要求。

表4 30%乙醇洗脱分步收集 EGCg 的得率与纯度

Table 4 The extraction yield and purity of EGCg collected step by step by 30% ethanol

样号	洗脱量/mg	干物重/mg	纯度/%	得率/%
1	264.13	66.34	25.12	7.97
2	562.69	366.23	65.09	43.94
3	327.39	234.26	71.55	28.14
4	208.46	96.25	46.17	11.56
5	113.21	32.35	28.53	3.89

## 3 结论

HP-20 大孔树脂具有较好的分离纯化 EGCg 的性能,其最优工艺技术参数为:柱体积为 125 mL 分离纯化 EGCg 时,上样量 1.8 g、30%乙醇、流速 2 BV/h、洗脱体积 2 BV,收集 1~2 BV 体积段的洗脱液,EGCg 的纯度和得率分别达 68.32%和 72.08%,具有较好的工业化应用价值。

## 参考文献:

- [1] 宛晓春,王泽农,汪琢成,等.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 梅全喜,毕焕新.现代中药药理手册[K].北京:中国中医药出版社,1998.
- [3] Sakata R, Ueno T, Nakamitra T, et al. Green tea polyphenol epigal catechin-3-gallate inhibits platelet derived growth factor induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90[J]. J Hepatol, 2004, 40(1): 52-59.
- [4] Frei B, Higdon J. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies[J]. J Nutr, 2003, 133: 3275-3284.
- [5] 方芳,崔志清,韩永晶.茶儿茶素的药效研究概况[J].中草药,2000,16(6):124-125.
- [6] 汪茂田,谢培山,王忠东,等.天然有机化合物提取分离与结构鉴定[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [7] 陶容达.茶多酚的制备和应用进展[J].化学世界,1994,12(2):64-67.
- [8] 于海宁,沈生荣,臧荣春,等.茶多酚中儿茶素类的 HPLC 分析方法学考察[J].茶叶科学,2001,21(1):61-66.
- [9] Zhong S A, Zhou C S, Yang J Y. Separation and preparation of ester catechins by high performance liquid chromatography[J]. Chem World, 2003, 34(5): 237-240.
- [10] 杜琪珍,李名君,陈启坤.高速逆流色谱法分离茶叶中的儿茶素[J].色谱,1996,14(4):20-21.
- [11] 葛宜掌,金红.茶多酚的离子沉淀提取法[J].应用化学,1995,12(2):107-109.
- [12] 董文宾,胡英,周玲.有机溶剂法制备茶多酚的工艺研究[J].食品工业科技,2002,9(23):44-47.
- [13] 王霞,高丽娟,林炳昌.表没食子儿茶素没食子酸酯EGCg 的分离与制备[J].食品科学,2005,26(9):242-245.
- [14] 张盛,刘仲华,黄建安,等.吸附树脂法制备高纯儿茶素的研究[J].茶叶科学,2002,22(2):125-130.
- [15] 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):50-51.
- [16] GB/T8305-87 茶水浸出物测定[S].

责任编辑:罗慧敏

英文编辑:胡东平