

聚酰胺色谱法分离制备高纯度 表没食子儿茶素没食子酸酯

王传金 魏运洋* 朱广军 杜杨艳

(南京理工大学化工学院 南京 210094)

摘 要 绿茶的乙醇浸提液经浓缩、脱色和萃取,得茶多酚粗品,用聚酰胺层析柱分离提纯得(-)-EGCG 单体。采用正交试验法考察了绿茶的粒度、乙醇用量和提取次数对(-)-EGCG 提取率的影响,得出优化醇提工艺为:绿茶粉末粒径小于 0.960 mm,用 12 倍量的体积分数为 95% 的乙醇溶液,回流提取 3 次,每次提取 1 h。研究了绿茶醇提液的活性炭脱色工艺,考察了活性炭用量、脱色次数、脱色时间对脱色液的吸光度和(-)-EGCG 提取率的影响,得出优化的脱色工艺为:加入绿茶用量 36% 的活性炭脱色 2 次,每次脱色 30 min。研究了茶多酚粗品的聚酰胺色谱法分离条件,考察了聚酰胺的粒度和上样量与聚酰胺的量比对(-)-EGCG 提取率的影响。结果表明,当所用的聚酰胺的粒度为 0.170~0.210 mm,上样量与聚酰胺质量比为 1:50 时,(-)-EGCG 提取率达 50%。通过对醇提、脱色和分离工艺的优化,1 g 绿茶可提取出 0.04 g 纯度大于 99.0% 的(-)-EGCG 单体。采用质谱、元素分析、紫外、红外、核磁共振和高效液相色谱等测试技术表征了提取物的化学结构。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯;聚酰胺;液相色谱;提取工艺;正交实验;活性炭

中图分类号:O 621.1

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2007)04-0443-05

表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-EGCG]是从绿茶中提取分离出来的生物活性成分,毒性低,具有抗氧化、降血脂、降胆固醇、防癌、抗癌、抑制细菌和病毒等生理药理活性,可广泛用于粮油、食品、药品、精细化工等领域^[1]。(-)-EGCG 的提纯分离方法主要有 sephadex LX-20 柱层分离^[2],高效液相色谱法的制备分离^[3]和高速逆流色谱分离^[4]等。这些提取分离方法工艺流程长、提取过程中使用氯仿或重金属等有毒物质,设备投资高,分离材料昂贵,限制了其在食品、粮油、医药等领域的广泛应用。本文采用聚酰胺柱层分离法制备高纯度的(-)-EGCG,与所报道的提取纯化工艺相比较具有工艺简单、所用溶剂无毒无污染、安全、价廉、溶剂和聚酰胺可重复循环使用等优点,适合工业化生产。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 600 型高效液相色谱仪(HPLC)(美国);BRUKER(500 MHz)核磁共振仪(德国);D₂O 作溶剂;FNNIGAN 液-质联用仪(美国);UV-1601 型紫外分光光度计(日本);VECTOR-22 型红外光谱仪(德国);WZZ-2S 数字式旋光仪;ALPHA 16 型冷冻干燥机(德国);CHN-O-Rapid 元素分析仪(德国)。

玻璃层析柱规格 1200 mm×40 mm;聚酰胺粒径 0.170~0.210 mm;甲醇(色谱纯);乙酸乙酯(分析纯);乙醇(工业品);绿茶(安徽滁州市施集茶厂);实验用水为蒸馏水。

1.2 绿茶中(-)-EGCG 的含量测定与提取率的计算

取(-)-EGCG 标准样用 HPLC 法测定浓度-峰面积标准线性方程如下^[5]:

$$Y = 5\,586\,243 - 3X - 125\,577.5$$

式中, Y 为峰面积($\mu\text{V}\cdot\text{s}$); X 为(-)-EGCG 的质量浓度(mg/L);方程的线性相关系数为 1.00。色谱条件:以 $V(\text{CH}_3\text{OH}):V(\text{H}_2\text{O})=3:7$ 的混合溶剂为流动相,检测波长为 275 nm,流速为 1 mL/min。

参考文献[5]方法,称取 1.0 g 份的经粉碎过孔径为 0.960 mm 筛的绿茶粉末 3 份,置于 3 个圆底烧瓶中。分别加入体积分数为 50% 的乙醇溶液 10 mL,在水浴中恒温 50 ℃回流提取 2 h 过滤。滤饼再按以上步骤重复提取 2 次。合并滤液,定容至 50 mL 容量瓶中作为供试品液。用 HPLC 法测定峰面积,根据标准样的浓度-峰面积标准线性方程计算绿茶中(–)-EGCG 的质量分数(ω)为 8.0%。

在后续醇提和脱色工艺研究中,每次取提取液或脱色液总体积的 1/5 分别加入体积分数为 50% 的乙醇,定容至 50 mL 容量瓶中作为供试品液;在聚酰胺柱层分离工艺研究中,每次取洗脱液 80 mL,分别加入体积分数为 50% 的乙醇,定容至 100 mL 容量瓶中作为供试品液。用 HPLC 法测定各供试品液的峰面积,根据标准样的浓度-峰面积标准线性方程计算供试品液中(–)-EGCG 的质量分数(ω'),按下式计算(–)-EGCG 的提取率:

$$(–)\text{-EGCG 的提取率}(\%) = \frac{\omega'}{\omega} \times 100\%$$

1.3 聚酰胺的处理和装柱

将 50 g 聚酰胺置于 600 mL 乙醇中加热回流 2 h 过滤,滤饼用蒸馏水洗 3 次,滤液中的乙醇回收重复使用。再向聚酰胺中加入 300 mL 蒸馏水浸泡过夜。用脱脂棉塞住层析柱底部,将蒸馏水浸泡处理好的备用聚酰胺细粉除去气泡后,倒入层析柱中,使聚酰胺自然沉降,放出柱内多余的蒸馏水,至水面略高于聚酰胺粉表面时关闭活塞,待用。

1.4 提取分离步骤

称取 10 g 绿茶,粉碎过孔径为 0.960 mm 筛,用乙醇液热提,抽滤,滤液经旋转蒸发回收乙醇,得比重为 1.03 的浓缩液,加入 3.6 g 活性炭脱色。用乙酸乙酯萃取,萃取液经旋转蒸发回收乙酸乙酯,得茶多酚粗品。加适量蒸馏水溶解,配成质量分数为 25% 的水溶液加入到聚酰胺柱上。先用蒸馏水洗脱,流速为 2.5 mL/min,至收集液由黄色变成无色为止。换体积分数为 50% 的乙醇水溶液洗脱,流速为 4.0 mL/min,按每份 50 mL 收集,HPLC 检测至洗脱完全。将含(–)-EGCG 的流份合并,回收乙醇,浓缩液经冷冻干燥后,得 0.4 g (–)-EGCG 的类白色粉末,提取率 50%,HPLC 测得(–)-EGCG 含量为 99%。

2 结果与讨论

2.1 产物的结构表征

2.1.1 旋光度测定 在与文献^[6]相同的条件下,测定提取物的旋光度,结果与文献值^[9]完全一致, $[\alpha]_D = -148.0(c=1.0 \text{ THF})$ 。

2.1.2 紫外光谱和红外光谱 提取物水溶液紫外光谱上的最大吸收波长为 275 nm,与文献^[7]报道的(–)-EGCG 的紫外吸收峰 273.4 nm 一致。

提取物的红外光谱在 1 692 cm^{-1} 处有 1 组较强的 $\nu_{C=O}$ 伸缩振动吸收峰,在 1 190 ~ 1 240 cm^{-1} 处有 1 组较强的 ν_{C-O-C} 非对称伸缩振动吸收峰,在 1 450 ~ 1 610 cm^{-1} 处有苯环骨架特征振动吸收峰,与文献^[7]报道一致。

2.1.3 元素分析和质谱 提取物的质谱峰 m/z 457(100%, $M^+ - H$), 413(15%), 357(14%), 335(10%), 317(10%)。(–)-EGCG 分子量为 458 质荷比 457 的基峰应是分子离子脱氢形成的,因此提取物的质谱与(–)-EGCG 的结构一致。

提取物按 $C_{22}H_{18}O_{11}$ 的元素分析值(计算值) %: C 57.55(57.65), H 4.02(3.96), 与(–)-EGCG 的结构一致。

2.1.4 核磁共振氢谱和碳谱 提取物的氢谱为: $^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O}, 500 \text{ MHz})$, δ 6.73(s, 1H), 6.72(s, 1H), 6.31(s, 1H), 6.30(s, 1H), 5.88 ~ 5.89(m, 2H), 5.20(d, $J=2.5 \text{ Hz}$, 1H), 4.52 ~ 4.54(m, 1H), 2.66(b, 2H)。结合 ChemDraw Ultra 8.0 软件的预测,各峰的归属如 Scheme 1 所示。苯环 A 和 B 上各有 2 个 H,因化学环境不完全相同,化学位移略有差异(相差 $\delta 0.01$)。苯环 C 上的 2 个 H 可能存在 W 偶合,出现多重峰。在 $\delta 2.66$ 处的 CH_2 基团出现比较宽的单峰,可能是因为分辨率不高,峰的裂分未显示

出来。对提取物进行氢谱分析所用的是 500MHz 核磁共振仪, 溶剂是 D₂O; 而文献^[9]是采用 400 MHz 核磁共振仪, 溶剂是 acetone d₆ D₂O (2:1)。得到的氢谱图与文献有区别, 但通过上述分析表明, 所得到的氢谱图与 (–)-EGCG 的结构一致。

提取物的核磁共振碳谱化学位移值如下:
¹³C NMR(D₂O, 500 MHz)实测值(文献值^[6]), δ
167.1(166.4), 155.5(156.6), 155.4(156.0),
145.1(145.5), 144.4(145.2), 138.2(138.5),
132.1(132.4), 129.9(129.9), 120.5(120.5),
110.0(109.4), 106.8(106.1), 99.3(98.1), 96.2
(95.8), 95.5(95.0), 77.3(77.4), 69.3(69.5),
25.1(25.9)。结果可见, 与文献^[6](100 MHz
CDCl₃)基本一致。

2.2 影响 (–)-EGCG 分离纯化的因素

2.2.1 影响醇提过程的因素 (–)-EGCG 为醇溶性的儿茶素类成分, 采用体积分数为 95%乙醇为溶剂进行提取。选择绿茶粒度(mm)、回流提取次数(T)、每次加入体积分数为 95%乙醇用量(mL)这 3 个因素, 每个因素选取 3 个水平, 采用 L₉(3⁴)正交试验。绿茶均取 5.0 g 每次提取时间为 1.0 h 以 (–)-EGCG 的提取率为考察指标。

由正交试验得出, 各因素对 (–)-EGCG 的提取率影响程度依次为: 回流提取次数>绿茶粒度>95%的乙醇用量。同时得出, 用 95%乙醇提取 (–)-EGCG 的最佳工艺条件为: 绿茶粒度 0.960 mm, 每次加入 60 mL 的体积分数为 95%乙醇, 提取 3 次, 每次 1.0 h。按照优选工艺条件重复试验 3 次, 所得 (–)-EGCG 的平均提取率为 96.8%。

绿茶粒度对 (–)-EGCG 的提取率的影响: 绿茶粒度较小时, 在提取的渗透阶段, 体积分数为 95%乙醇易于渗入到绿茶颗粒内部; 在扩散阶段, 由于其具有较大的扩散面积, 较短的扩散距离, 有利于 (–)-EGCG 的浸出。但是, 如果绿茶粉碎得太细, 导致大量的细胞破裂, 使细胞内的一些高分子物质(如树脂、黏液质等)易溶于浸出液中, 从而使绿茶外部的溶液黏度增加, (–)-EGCG 扩散系数降低, 导致 (–)-EGCG 的提取率下降。如果绿茶的粒度过大, 使绿茶颗粒的总扩散面积下降, (–)-EGCG 有较长的扩散距离, 也导致 (–)-EGCG 的提取率下降。

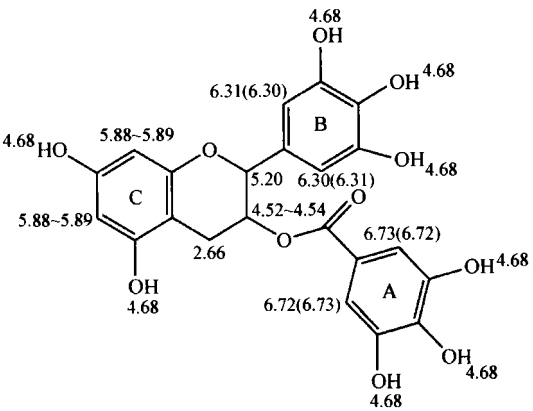
在提取时间一定的条件下(为 1.0 h), 回流提取次数对 (–)-EGCG 的提取率有显著的影响, 若提取次数过少, 将会使 (–)-EGCG 浸出不完全。而提取次数过多, 生成成本增加。在 (–)-EGCG 的醇提过程中, 每次所用体积分数为 95%乙醇的量过少, 将使 (–)-EGCG 的扩散存在较小的浓度梯度和较小的扩散系数, 从而降低 (–)-EGCG 的浸出; 但若用量过大, 将导致生成成本增加。

2.2.2 影响活性炭脱色过程的因素 选择活性炭用量(g)、脱色次数(T)、脱色时间(min) 3 个因素, 每个因素选取 3 个水平, 采用 L₉(3⁴)正交试验。取绿茶粗粉(粒度为 0.960 mm) 90 g 用 12 倍量体积分数为 95%的乙醇溶液在 85℃回流提取 3 次, 将 3150 mL 合并提取液均分为 9 份, 以 (–)-EGCG 提取率及脱色溶液中叶绿素 A(663 nm 处)和叶绿素 B(645 nm 处)吸收度作为综合考察指标。

综合考察指标 = 25% $\underline{X}$ + 25% $\underline{Y}$ + 50% $\underline{Z}$ 。
式中, $\underline{X}$ 为 9 份脱色液中叶绿素 A 吸收度, $\underline{X}$ 为其平均值; $\underline{Y}$ 为 9 份脱色液中叶绿素 B 吸收度, $\underline{Y}$ 为其平均值; $\underline{Z}$ 为 9 份脱色液中 (–)-EGCG 的提取率, $\underline{Z}$ 为其平均值。

由正交试验得出, 各因素对 (–)-EGCG 的提取率及脱色溶液中叶绿素 A 和叶绿素 B 吸收度综合影响程度依次为: 脱色次数>活性炭用量>脱色时间。绿茶的醇提液用活性炭脱色的最佳工艺条件为: 活性炭粉末 3.6 g 回流脱色 3 次, 每次 30 min。

根据优选工艺条件重复试验 3 次, 所得 (–)-EGCG 的提取率为 65.4%。脱色液中叶绿素 A 和叶绿



Scheme 1 Assignments of the ¹H NMR chemical shifts for the extract

素 B 的吸收度分别为 0.013 2 和 0.013 6 综合指标为 2.210 3。

活性炭用量对绿茶醇提取液脱色效果有着显著的影响,当活性炭用量较大时,对色素的吸附力增强,脱色效果亦增强;但若过大,将增加对 (-)-EGCG 的吸附力,导致 (-)-EGCG 的提取率下降。当活性炭用量较小时,对 (-)-EGCG 吸附力减弱,使 (-)-EGCG 的提取率增加;但对色素的吸附力减弱,脱色效果下降。

随着活性炭脱色次数的增加和脱色时间的延长,活性炭对色素的吸附能力增大、脱色能力增强,当加入活性炭粉末 3.6 g 回流脱色 2 次,每次 30 min 即有较好的脱色效果,再增加活性炭脱色次数和延长脱色时间,脱色液无明显变化,而 (-)-EGCG 的提取率不断下降。

2.2.3 影响柱层分离过程的因素 在 (-)-EGCG 的柱层分离过程中,以 (-)-EGCG 的提取率和洗脱液的流速作为考察指标,对聚酰胺的粒度进行了优选,结果见表 1。

表 1 聚酰胺粒度的影响

Tab le 1 Influence of particle diameter of polyamide on extraction rate of (-)-EGCG

Diameter of polyamide/mm	Extraction rate of (-)-EGCG /%	Current velocity of elution/(mL·min ⁻¹)
0.300~0.575	10.48	7.8
0.210~0.300	20.89	6.0
0.170~0.210	50.40	4.0
0.140~0.170	51.34	2.5

粒度越小,分离效果越好,但流速减慢,分离时间延长,效率下降;粒度越大,虽然流速加快,但是 (-)-EGCG 与杂质成分的分离度下降,影响 (-)-EGCG 的提取率。综合考虑,以粒径为 0.170 ~ 0.210 mm 的聚酰胺作为分离材料时, (-)-EGCG 的提取率接近最大值,且洗脱液流速较快,生产效率高。

在聚酰胺柱层分离过程中,上柱样品和所用聚酰胺的质量比不能太大,否则 (-)-EGCG 的分离效率下降;但也不能太小,否则聚酰胺的用量增加,增加了生产成本。二者质量比以 1:40~1:60 为好,在此范围内的质量比对 (-)-EGCG 分离效果的影响结果见表 2。

表 2 样品和聚酰胺的质量之比的影响

Tab le 2 Influence of mass ratio of sample to polyamide on extraction rate of (-)-EGCG

<i>m</i> (sample)/ <i>m</i> (polyamide)	Extraction rate of (-)-EGCG /%	<i>m</i> (sample)/ <i>m</i> (polyamide)	Extraction rate of (-)-EGCG /%
1:40	35.60	1:55	51.43
1:45	42.36	1:60	51.85
1:50	51.26		

由表 2 结果可知,当上柱样品和所用聚酰胺的质量比为 1:50 时, (-)-EGCG 的提取率基本不再增加,所以确定二者质量比为 1:50。

参 考 文 献

1 ZHANG Yu(张瑜). *Amino Acids & Biotic Resources*(氨基酸和生物资源)[J], 1998, 20(4): 51

2 ZHANG XingHai(张星海), GUO BiHua(郭碧花), SHEN Sheng Rong(沈生荣). *J Tea*(茶叶)[J], 2002, 28(3): 136

3 ZHONG ShiAn(钟世安). *Chem World*(化学世界)[J], 2003 (5): 237

4 ZHANG Ying(张莹), SHI Zhao Peng(施兆鹏), NIE Hong Yong(聂洪勇), HUANG ZhiQiang(黄志强). *J Hunan Agricultural Univ(NatSci)*(湖南农业大学学报(自然科学版))[J], 2003, 29(5): 408

5 YU HuaZhong(于华忠), ZHANG Dong Shan(张东山), GONG Zhu Qiong(龚竹琼). *Teain Fujian*(福建茶叶)[J], 2004, 4: 28

6 Li L H, Chan T H. *Org Lett*[J], 2001, 3(5): 739

7 Q I X iang Yang(戚向阳), X I E B i Jun(谢笔钧), H U W e i W ang(胡慰望). *Fine Chan* (精细化工) [J], 1994 11(4): 40

Preparation of High Purity Epigallocatechin Gallate by Polyamide Packed Chromatographic Column Separation

WANG Chuan Jin WEI Yun-Yang^{*}, ZHU Guang Jun DU Yang-Yan
(School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094)

Abstract Polyphenols were obtained from green tea by soaking it with ethanol followed by concentration, decolorization and extraction with ethyl acetate. High purity (–)-EGCG was then obtained by polyamide packed chromatographic column separation. Orthogonal design of experiment was used to determine the optimal amount of alcohol, extraction times and particle diameter of green tea to maximize the extraction yield of (–)-EGCG. The optimal conditions were determined as follows: Twelve mL of 95% alcohol were used to extract 1 g of green tea with particle size less than 0.960 mm for 1 hour and the extraction was repeated 3 times. The decolorization of the ethanol extract of green tea with active carbon was studied. Optimal results of decolorization were obtained by using 0.36 g of activated carbon to decolor 1 g of green tea for 30 min and the decolorization was repeated 2 times. The polyamide chromatography separation conditions of crude polyphenol were investigated. The influence of particle size and amount of polyamide used on extraction yield of (–)-EGCG were studied. It was found that best separation results were obtained if 50 g of polyamide with particle size of 0.170~0.210 mm were used for 1 g extraction of green tea. 0.04 g of (–)-EGCG with over 99.0% purity was obtained from 1 g of green tea through optimized process of ethanol extraction, decolorization and separation. The extraction yield of (–)-EGCG was 50%. The structure of the final product separated was identified by LC-MS, elemental analysis, UV, IR, HPLC and NMR. It was experimentally demonstrated that the proposed process is a safe, mild, low cost and waste free procedure.

Keywords (–)-EGCG, polyamide, HPLC, extraction process, orthogonal design of experiment, activated carbon