

# 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) 的分离与制备

王 霞<sup>1</sup>, 高丽娟<sup>1</sup>, 林炳昌<sup>2</sup>

(1.鞍山科技大学化工学院, 辽宁 鞍山

114044 2.鞍山科技大学分离技术中心, 辽宁 鞍山

114044)

**摘 要:** 采用高效液相色谱技术, 分离制备茶多酚中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)。制备工艺: 茶多酚原料(EGCG, 30%, HPLC)经乙酸乙酯萃取富集, 得儿茶素粗提液(EGCG, 60%, HPLC), 粗提液经层析纯化得EGCG 高纯度溶液, 溶液经旋转蒸发浓缩, 冷冻干燥, 得白色粉末(EGCG, 99%, HPLC)。

**关键词:** EGCG; 萃取; HPLC; 分离与制备

## Separation and Preparation of Epigallocatechin Gallate(EGCG)

WANG Xia<sup>1</sup>, GAO Li-juan<sup>1</sup>, LIN Bin-chang<sup>2</sup>

(1.School of Chemical Engineering, Anshan Science and Technology University, Anshan 114044, China

2.Center of Separation Technology, Anshan Science and Technology University, Anshan 114044, China)

**Abstract:** Separation and preparation of Epigallocatechin Gallate(EGCG) from tea polyphenols was investigated by HPLC. The EGCG was enriched after green tea polyphenols(30%) was extracted by ethyl acetate. The purity of EGCG was 60%. EGCG was Separated and purified by HPLC. The high purification solution of EGCG was collected. The solution was evaporated and freeze-dried under vacuum. Finally, the product was obtained and its purity was more than 99%.

**Key words:** EGCG; extraction; high performance liquid chromatography; separation and preparation

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)09-0242-05

茶多酚是由茶叶提取来的多羟基酚类混合物, 又名茶单宁, 或茶鞣质。以儿茶素为主的黄酮醇类化合物占茶多酚总量的60%~80%, EGCG是儿茶素中的一种主要酯型儿茶素。现代科学研究表明<sup>[1~3]</sup>EGCG具有显著的抗突变、抗氧化作用, 能够增强免疫系统功能, 抑制肝脂和胆固醇的增长, 抑制肿瘤的生长, 对痢疾、伤寒、金黄色葡萄球菌等细菌也有极强的抑制作用。现已被列为潜在的抗癌药物在中美等国被研究。由于EGCG与儿茶素中其它组分的化学结构和性质十分相近, 而且极易氧化, 聚(缩)合, 因而很难得到高纯度的EGCG单体。国内外对EGCG单体的提纯及应用研究已成为化学、药化、生化和化工技术交叉的热门学科。因此对分离提纯EGCG单体的研究具有很重要的现实意义。

目前, EGCG的提取工艺主要以色谱为核心<sup>[4~7]</sup>, 同时色谱分离过程与合适的前后处理工艺相结合, 基本上实现了对EGCG单体的高纯度分离。但这些工艺还存在着很多不足之处, 主要是前处理工艺步骤多, 操作复杂, 色谱分离时消耗大量的有机溶剂, 制备效率不高,

所以这些工艺都无法转化为工业生产。本文主要以色谱为基础, 寻找一条省时、省力、适合大规模工业生产的分离制备EGCG单体的工艺路线, 以及在这条工艺路线中原料的前后处理工艺。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器

LP-30C系列平流泵 北京星达科技开发公司; BSZ-30自动部分流份收集器 上海沪西分析仪器厂; RE52-05薄膜型旋转蒸发器 5L 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-C循环水真空泵 河南省巩义市英峪予华仪器厂。

#### 1.2 试剂

茶多酚 EGCG 含量 30% 福州日冕科技开发有限公司; EGCG 标样 浙江一新制药股份有限公司; 柠檬酸(分析纯) 北京化学试剂公司; 乙醇(分析纯) 北京化工厂; 乙酸乙酯(分析纯) 沈阳试剂二厂; 乙醇(工业纯) 鞍山第五制药厂; 冰醋酸(优级纯) 北京化工厂。

#### 1.3 分析条件

收稿日期: 2005-03-02

作者简介: 王霞(1974-), 讲师, 硕士研究生, 研究方向为分离科学与技术。

色谱柱 Diamonsil 色谱柱(ODS 填料, 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm);  
 检测器 SPD-10AT 紫外检测器;  
 流动相 V(1%醋酸水):V(乙腈) =15:85;  
 流速 1ml/min; 检测灵敏度: 0.0800AUFS;  
 检测温度 室温; 检测波长  $\lambda$  =278nm; 进样量 10 $\mu$ l。

1.4 绘制表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的标准曲线  
 实验方法: 将EGCG 标样分别配制成 0.1、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0mg/ml 等一系列的标准溶液, 然后对配制好的不同浓度的标样进行 HPLC 检测, 以 HPLC 色谱峰面积 Y 与该峰代表的EGCG 的浓度 X 进行回归, 见图 1 所示。

EGCG 的浓度对峰面积进行回归, 回归方程为:  
 $Y=1.384 \times 10^7 X + [-7.867 \times 10^5]$ , 相关系数  $R=0.9996$ ,  
 结果表明在该范围内线性良好。以下检测结果均经该曲线校正。

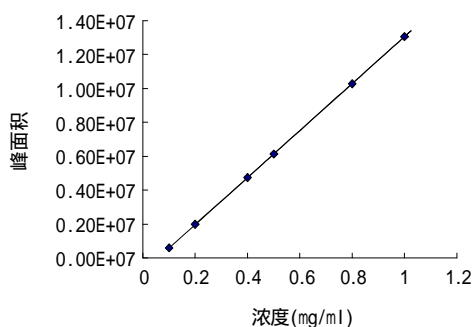


图1 EGCG 的浓度与峰面积关系

Fig.1 Relations between concentration of EGCG and peak area

1.5 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的分离与纯化

1.5.1 样品前处理

茶多酚原料用 pH=4.0(柠檬酸酸化)蒸馏水溶解, 加三倍于蒸馏水的乙酸乙酯, 将混合液振荡摇匀, 静置数分钟, 待溶液明显分层, 此时会看到上层的溶液为棕色, 即为第一次萃取的酯层, 下层为棕黑色即为第一次萃取的水层。然后再次萃取, 得萃取的酯层, 用 0.45 的滤膜过滤酯层, 滤液作为原料, 备用。萃取前后见图 2、3。

1.5.2 制备色谱条件:

色谱柱 ODS 填料, 30~40 $\mu$ m, 2.8 $\times$ 50cm;  
 检测器 SPD-10AVP 紫外检测器 流动相 V(乙醇):  
 V(水)=15:85;  
 流速 20ml/min; 检测波长  $\lambda$  =278nm; 进样体积 15ml。

1.5.3 HPLC 分离与精制

在线检测, 制备柱的色谱流出曲线见图 4, 根据出峰的情况收集 EGCG 产品的馏份: 前 40min 的馏份作为

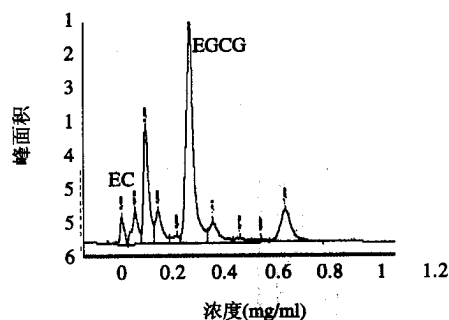


图2 原料谱图

Fig.2 Chromatogram of raw material

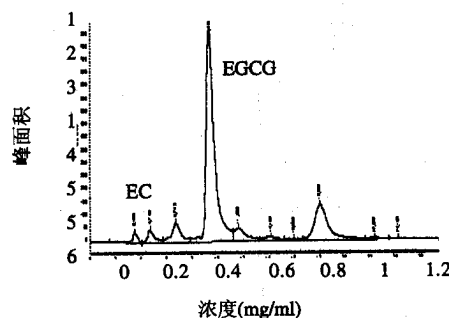


图3 萃取后乙酸乙酯层谱图

Fig.3 Chromatogram of EtOAc phase

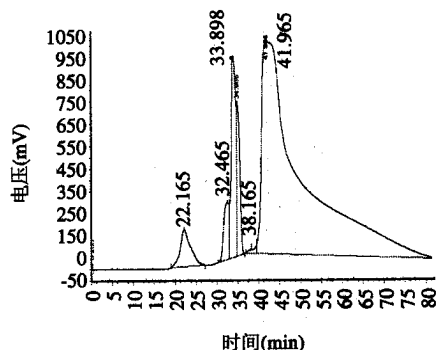


图4 制备柱的色谱分离图

Fig.4 Chromatogram of preparative column

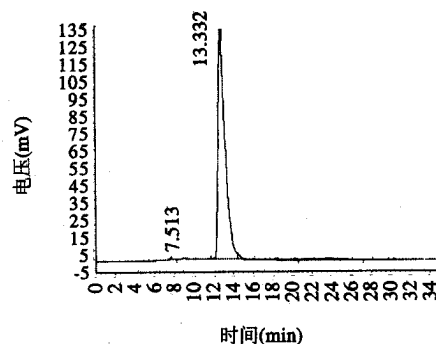


图5 EGCG 产品谱图

Fig.5 Chromatogram of product

前杂质馏份收集在一起, 41~70min 的馏份作为产品馏份收集在一起, 70min 后用纯乙醇冲洗柱子收集在一起为后杂质馏份; 各馏份段按 1.3 的分析条件检测, 其检测结果见图 5~7, 产品馏份在 RE52-05 型薄膜旋转蒸发器减压蒸馏浓缩, 控制恒温槽温度为 50℃, 浓缩液经冷冻干燥后得白色粉末。

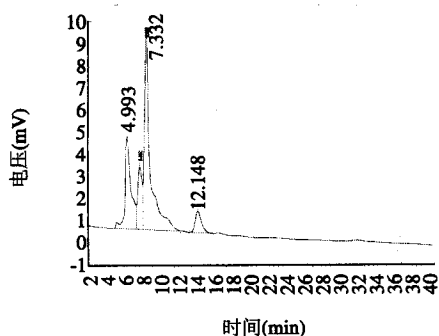


图 6 EGCG 前杂质谱图  
Fig.6 Chromatogram of raffinate of EGCG

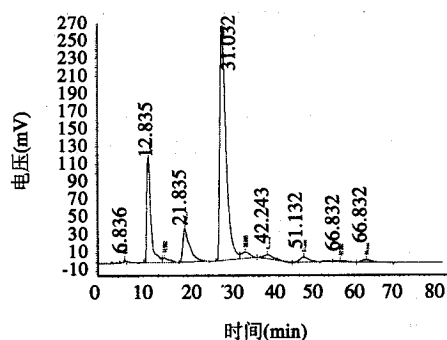


图 7 EGCG 后杂质谱图  
Fig.7 Chromatogram of postimpurity of EGCG

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理方式的选择

由于茶多酚原料成分复杂, 直接进色谱柱对填料的污染很大, 降低填料的分离能力, 所以对原料进行预处理除去部分杂质, 使目标物富集是很有必要的。儿茶素单体柱前富集的方法主要有: 乙酸乙酯萃取、聚酰胺柱层析、SephadexLH-20 柱层析等方法。

本实验比较了三种预处理方式的除杂和对目标物的富集能力。结果表明, 聚酰胺有一定的除杂和脱色能力, 但是需要用大量的高浓度流动相洗脱, 目标物还需浓缩后才能进柱, 因此经济效益较低; SephadexLH-20 有较好的脱色能力, 但所耗时间比较长, 特别是茶多酚中已被氧化的成分在柱体中移动缓慢, 洗脱困难, 生产效率低。乙酸乙酯萃取可以使酯相的亲水性杂质和部分非酯型儿茶素转入水相, 酯型儿茶素因其在酯相中具有较高的分配比值, 提高茶多酚的纯度及其酯型儿茶

素 EGCG 的纯度。故本实验选用的前处理方式是乙酸乙酯萃取。同时乙酸乙酯的萃取液, 不需浓缩, 可以直接进色谱柱分离, 避免了浓缩时产品的氧化损失, 并节省了能耗。

### 2.2 萃取条件的优化

#### 2.2.1 萃取剂比对萃取效果的影响

称取 5 份等量的茶多酚原料, 分别放入锥形瓶中, 依次向锥形瓶中加入用柠檬酸酸化的蒸馏水 6、8、10、15、30ml, 再依次加入 54、52、50、45、30ml 乙酸乙酯。即在水与乙酸乙酯的总体积不变的情况下, 分别按水与乙酸乙酯的比例为: 1:9、1:6.5、1:5、1:3、1:1 的条件萃取原料。静置分层后的酯相用 0.45 的滤膜过滤后, 经 HPLC 检测, 以萃取剂的比例为横坐标, 以 EGCG 的峰高与非酯型儿茶素 EC 峰高的比值为纵坐标作图, 如图 8。

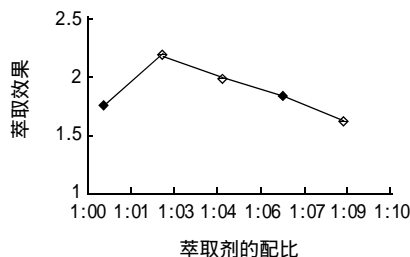


图 8 萃取剂的比例对萃取效果的影响  
Fig.8 Effect of ratio of extract solvent on extract result

由图 8 可知: 萃取剂的配比为 1:3 时, 萃取的效果最好, 故选用水: 乙酸乙酯的体积比为 1:3 的配比作为本实验的萃取剂。

#### 2.2.2 pH 值对萃取效果的影响

称取 5 份等量的茶多酚原料, 放入 5 个锥形瓶中, 分别加 pH=2.5、3.0、3.5、4.0、4.8 的等体积的蒸馏水(加柠檬酸调酸, 下同)溶解, 按水与乙酸乙酯的体积比为 1:3 的萃取剂萃取原料, 分层后将酯层分别用 0.45 的滤膜过滤, 经 HPLC 检测, 以 pH 值为横坐标, 以 EGCG 的峰高与非酯型儿茶素 EC 峰高的比值为纵坐标作图如图 9。

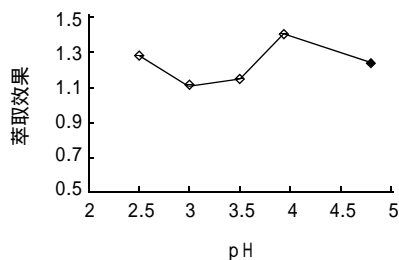


图 9 pH 值对萃取效果的影响  
Fig.9 Effect of pH condition of extract solvent on extract result

由图可知,用柠檬酸酸化 pH 为 4 的蒸馏水对萃取的效果最佳,故本实验选择 pH=4 的柠檬酸水溶液。

### 2.2.3 固液比对萃取效果的影响

分别称取 3、4、5、6、7 g 的茶多酚原料放入锥形瓶中,分别用 pH 值为 4.0 的 15ml 蒸馏水溶解,再用 45ml 的乙酸乙酯萃取得酯层,分别用 0.45 的滤膜过滤, HPLC 检测,以原料量为横坐标,以 EGCG 的峰高与非酯型儿茶素 EC 峰高的比值为纵坐标作图如图 10。

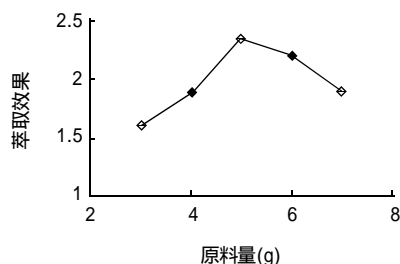


图 10 原料量对萃取效果的影响  
Fig.10 Effect of weight of raw material on extract result

由图 10 可知:在萃取剂总量为 60ml 的前提下,选择 5g 的原料量,萃取效果最好。故本实验选择 1:12 的固液比。

### 2.2.4 萃取次数对萃取效果的影响

称取 5g 的茶多酚原料放入锥形瓶中,用 pH 值为 4 的 15ml 的蒸馏水溶解,加入 45ml 乙酸乙酯萃取茶多酚溶液,然后将酯层再加入 pH 值为 4 的 15ml 的蒸馏水反萃取,将水层加入 45ml 乙酸乙酯再萃取;如此重复四次,经四次萃取后的酯相均经 HPLC 检测,以萃取次数为横坐标,以 EGCG 的峰高与非酯型儿茶素 EC 峰高的比值为纵坐标作图 11。由图中可看出,萃取次数越多,产品的纯度越高,但是产品的收率也随着下降。综合产品纯度和收率,本实验选择两次萃取。

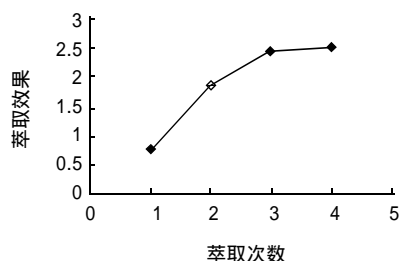


图 11 萃取次数对萃取效果的影响  
Fig.11 Effect of times of extract on extract result

## 2.3 制备色谱条件的选择

### 2.3.1 流动相组成对分离效果的影响

比较乙醇与水的比例(体积比)分别为 14.5:85.5, 15.0:85.0, 15.5:84.5, 16:84.0 和 16.5:83.5, 从色谱峰

的分离情况、洗脱时间等综合分析, V(乙醇):V(水)=15:85 最好, 所以选择 V(乙醇):V(水)=15:85 为流动相。

### 2.3.2 洗脱流速对分离效果的影响

以 V(乙醇):V(水)=15:85 为流动相, 实验了不同流速下, 制备柱的分离效果, 见表 1。

表 1 洗脱流速选择  
Table 1 The option of mobile phase flow-rate

洗脱流速(ml/min)	18	20	25	28
理论塔板数	886	1019	1000	926

从表 1 不同流速下的理论塔板数可以看出, 虽然流速为 20ml/min 的柱效最高, 但流速为 25ml/min 时的柱效与 20ml/min 时的柱效接近, 从提高生产效率和柱效综合角度分析, 实验中选用 25ml/min。

### 2.3.3 进样体积对分离效果的影响

由于本实验所用原料是经过萃取的原料, 原料的浓度一定, 所以在原料的浓度一定的条件下, 试验了进样体积对色谱分离效果的影响, 随着进样体积增大, 色谱柱的分离效果逐渐下降, 色谱峰明显不对称。结果见表 2。

表 2 进样体积对分离效果的影响  
Table 2 Effect of feed volumn on separation result

进样体积(ml)	5	10	12	15	18	20
分离度	0.80	0.72	0.70	0.69	0.60	0.50

从表 2 可以看出, 当进样体积超过 15ml 时, 色谱柱的分离度明显下降, 所以本实验选择 15ml 的进样量。

## 2.4 产品纯度检验

从图 1 的 EGCG 标准曲线上计算 EGCG 的纯度, 结果显示其纯度在 99% 以上。经 HPLC 检测, 结果如图 5。

## 3 结 论

根据以上实验, 本文找到了一条以高效液相制备色谱技术为基础的 EGCG 的分离纯化工艺。

3.1 原料预处理采用萃取的方法代替柱层析取得了较好的效果。

最佳的萃取条件为: 萃取剂的配比为 V(水):V(乙酸乙酯)=1:3, 用柠檬酸调萃取液的 pH 值为 4, 固液比为 W(g):V(ml)=1:12, 萃取次数为 2 次。EGCG 含量由原料中的 30%, 提高到 60%, 回收率为 50%。

采用乙酸乙酯对原料中的 EGCG 进行富集后, 萃取液可以直接与色谱分离相衔接, 不必再经过浓缩, 因此该工艺操作简单, 速度快, 能耗少, 回收率高, 有利于工业化生产。

3.2 通过层析纯化条件的选择, 产品中 EGCG 的纯度为 99%, 回收率为 85%。产品的得率与质量都能同时

# 前期盐渍因子及后期调味配方对 低温发酵蔬菜产品品质的影响

纪凤娣, 籍保平\*, 李 博, 刘宗林

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘 要:** 本文研究了盐渍时间、盐渍温度、盐渍配方、腌制方式等对蔬菜包装发酵(4℃)过程产品品质的影响。试验中采用4种盐渍时间(4、10、16、24h), 2种盐渍温度(15、25℃), 3种配方(原味, 辣味, 虾味), 对蔬菜发酵过程中, 微生物, 亚硝酸盐, 及感官变化进行检测分析。结果表明, 不同处理所得到的发酵蔬菜制品, 细菌总数在 $10^2 \sim 10^4$ cfu/g之间, 亚硝酸盐低于国家标准, 产品品质好。

**关键词:** 盐渍; 包装发酵; 亚硝酸盐; 配方

## The Effects of Salt Factors and Spice Compounds on the Quality of Packaged Fermented Vegetable

Ji Feng-di, Ji Bao-ping\*, Li Bo, Liu Zong-lin

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In order to get a kind of good quality, low salt, safety fermented vegetable product. In this study, the effects of the salting time (4, 10, 16, 24h), salting temperature (15, 25℃), different spices, salting method etc, on the microorganism, nitrite forming during the fermentation of packaged vegetable (4℃) were investigated. It was showed that the total bacterial was  $10^2 \sim 10^4$ cfu/g and the nitrite content was below 0.5g/L.

**Key words:** salting; packaged fermentation; nitrite; spice compounds

中图分类号 TS205.2

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)09-0246-05

收稿日期: 2005-06-26

作者简介: 纪凤娣(1977-), 女, 博士研究生, 研究方向为食品发酵技术。

达到较好的效果, 并且收率高, 生产成本低。

### 参考文献:

- [1] Roberts EAH. Economic importance of flavonoid substance: Tea fermentation[M]. In: Chemistry of flavonoid compounds, ed Geissman T A. Pergamon Oxford UK, 1962. 468-512.
- [2] Sanderson GW. The chemistry of tea and tea manufacturing [J]. Recent Advances in Phytochemistry, 1972, 5: 247-316.
- [3] 张瑜, 邹国林, 彭少君. 表没食子儿茶素没食子酸酯研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(4): 51-54.
- [4] 钟世安, 周春山, 杨娟玉. 高效液相色谱法分离纯化酯型儿茶素的研究[J]. 化学世界, 2003, (5): 237-240.
- [5] 戚向阳, 谢笔钧, 胡慰望. 高纯度表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的分离与制备[J]. 精细化工, 1994, 11(4): 40-46.
- [6] 朱勤艳, 陈振宇. 茶中茶多酚的高效液相色谱法分离与分析[J]. 分析实验室, 1999, 18(4): 72-74.
- [7] 王洪新, 戴军, 等. 茶叶儿茶素单体的分离纯化及鉴定[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(2): 117-121.