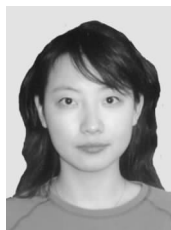


表 栝 儿 茶 素 栝 酸 酯 体 外 氧 化 及 其 低 聚 产 物 形 成 的 研 究



WANG Jing

王 静, 戚 向 阳*, 朱 学 良, 李 蕙 蕙, 刘 传 菊

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 为控制儿茶素类低聚氧化产物形成条件,以表栝儿茶素栝酸酯(EGCG)为代表进行体外化学氧化,通过对产物的 HPLC-MS 分析确定研究对象,即 EGCG 氧化低聚物(EOP),其主要有 3 种低聚产物:产物 1 m/z 911,产物 2 m/z 929,产物 3 m/z 911。产物 1 和产物 3 为 EGCG 脱氢二聚体;产物 2 为 EGCG 醌式二聚体。反应条件的研究表明,随温度升高 EGCG 氧化程度加剧,EOP 生成量也随之增加,但温度达 40 °C 时,EOP 的生成量在氧化 10 min 后下降;体系 pH 值增大可加剧 EGCG 氧化,但 pH 值 9.0 时,EOP 的生成量在 15 min 后有所下降;随氧化剂所占质量比的增大,EGCG 氧化程度加大,但 EOP 的生成量并不与之成正比。EOP 形成的最佳条件为:反应温度 25 °C ,pH 值 7.5,氧化剂与底物的质量比 1.5:1,氧化时间 15 min。

关键词: 表栝儿茶素栝酸酯;氧化低聚物;化学氧化

中图分类号:TQ91

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2007)05-0062-05

Effects of Reaction Condition on the Oxidation *in vitro* of Epigallocatechin-3-gallate and the Formation of Its Oligomers

WANG Jing, QI Xiang-yang, ZHU Xue-liang, LI Hui-hui, LIU Chuan-ju

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to control the formation condition of oxidation oligomers of flavanols, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) was oxidized *in vitro* and EGCG oligomeric products (EOP) were determined by HPLC-MS analysis. The influences of temperature, pH value, mass ratio of oxidant to EGCG on the oxidation of EGCG and the formation of EOP have been discussed. HPLC-MS analysis showed that there were mainly 3 oligomers, namely product 1 m/z 911, product 2 m/z 929, product 3 m/z 911. Products 1 and 3 were dehydromers of EGCG, product 2 was quinone dimer of EGCG. The study of reaction condition showed that oxidation of EGCG was enhanced with increased temperature. However when temperature reached 40 °C, the formation of EOP decreased after 10 min; EGCG oxidation reaction could be accelerated with increase of pH value. However, at pH value 9.0, the formation of EOP decreased after 15 min; EGCG oxidation yield was increased with increase of m (oxidant) : m (EGCG). However, the formation of EOP did not have a correlated relationship. The optimum conditions of EOP formation were: temperature 25 °C, pH value 7.5, m (oxidant) : m (EGCG) 1.5 : 1, oxidation time 15 min.

Key words: epigallocatechin-3-gallate; oligomeric products; chemical oxidation

自 Roberts^[1] 于 1957 年首次对儿茶素进行体外酶促氧化实验以来,人们对儿茶素类氧化产物进行了大量研究,发现儿茶素类氧化聚合物具有抗动脉粥样硬化,改善治疗心脑血管疾病,抑菌抗病毒等多种生理功效^[2],特别是其抗氧化活性强于原来未被氧化的前体物质^[3-4]。研究表明,儿茶素类氧化产物活性与其聚合度有关,一般低聚体活性较高,尤以二聚体的活性最为突出^[5],因此在制备儿茶素类氧化产物的过程中,对氧化条件的控制极为重要。近几年,体外化学氧化被认为是研究儿茶素类氧化产物形成机理及提高其得率行之有效的方法。该方法可以避免酶促氧化中酶提取纯化困难、性质不稳定、反应

收稿日期:2006-11-13

作者简介:王 静(1982-),女,北京人,硕士生,从事天然产物研究

* 通讯作者:戚向阳,博士,硕士生导师,主要从事天然产物及保健功能研究;E-mail:qxxyang@mail.hzau.edu.cn.

条件难以控制、不利于儿茶素类氧化产物生成等问题^[6]。化学氧化简化了反应体系,因而日益受到人们的重视。但化学氧化中氧化条件,如 pH 值、温度等对氧化途径和氧化产物具体有何影响,目前尚缺乏深入的系统研究。作者以儿茶素类化合物中含量最高、活性最强的表儿茶素鞣酸酯(EGCG)为代表,进行体外化学氧化,探讨了氧化体系中反应温度、pH 值、氧化剂与底物的质量比对 EGCG 氧化及其主要低聚氧化产物形成的影响以期为体外高效合成儿茶素类氧化产物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

表儿茶素鞣酸酯(EGCG),质量分数 >99%,美国 Sigma 公司;乙腈为色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司;乙酸、柠檬酸、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $NaHCO_3$ 均为分析纯,上海虹光化工厂。

1.2 主要仪器

美国 Varian 高效液相色谱仪(PDA-410 检测器);美国 Aligent 1100 系列液质联用仪(DE14915085 DAD 检测器)。

1.3 实验方法

1.3.1 EGCG 化学氧化 参照 Wan 的化学氧化方法^[7],将 $K_3Fe(CN)_6$ 与 $NaHCO_3$ 按一定比例配制成化学氧化剂,滴加到 EGCG 溶液中,启动氧化反应,按规定时间加入柠檬酸调节反应液 pH 值 2~3 以终止反应,反应液经微孔滤膜过滤后立即进行 HPLC 分析。分别考察不同反应温度、不同反应体系 pH 值、氧化剂与底物的质量比对 EGCG 氧化及其低聚氧化产物(EOP)形成的影响。

1.3.2 HPLC 分析条件 色谱柱 Phenomenex C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙酸(2%); 流动相 B 为乙腈;流速 0.8 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL; 0~50 min 流动相 B 线性梯度变化 8%~31%, 53 min 时回到 8%。

1.3.3 HPLC/MS 分析条件 在上述相同液相条件下(除流动相流速改为 0.25 mL/min 的以外),电喷雾电离(ESI),扫描方式:负离子扫描(ESI m/z 100~2 000),喷雾气压力 206.7 kPa,干燥温度 300 °C,干燥气体的流速 8.0 L/min,毛细管电压为 4.0 kV。

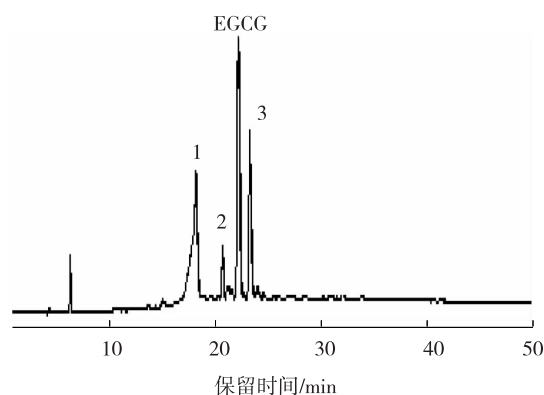
2 结果与讨论

2.1 EGCG 氧化产物的 HPLC 及 HPLC/MS 分析

EGCG 化学氧化产物的 HPLC 分析表明,在不同反应条件下,EGCG 氧化产物中共存在 3 个较为明显的色谱峰,如图 1 所示,说明这 3 种产物是构成 EGCG 氧化产物的主要物质。它们的保留时间分别为产物 1 18.11 min、产物 2 20.49 min、产物 3 24.21 min。MS 分析表明(图 2),产物 1 m/z 911 $[M-H]^-$,产物 2 m/z 929 $[M-H]^-$,产物 3 m/z 911 $[M-H]^-$ 。推测产物 1 和 3 可能为 EGCG 脱氢二聚体^[8];产物 2 经过 HPLC-DAD 检测,显示其 λ_{max} 220、278、380 nm,表明产物具有醌式结构,结合 Tanaka 等人的报道^[9],推测产物 2 为 EGCG 醌式二聚体。本实验选定这 3 种二聚体产物(即 EOP)为研究对象,考察反应条件对它们形成的影响。

2.2 反应条件对 EGCG 及 EOP 的影响

2.2.1 反应温度的影响 从图 3(a)可看出,EGCG 的氧化反应随着温度的升高而加剧,在反应的初始阶段(0~10 min)表现尤为显著。姚立虎等认为酚类物质只要以水溶液状态存在,其氧化反应不管有无酶或其他催化剂的存在都会自动进行^[10];10~45 min,各温度下的 EGCG 氧化均达到平衡。低聚产物



1、3. EGCG脱氢二聚体 EGCG dehydrodimer;
2. EGCG醌式二聚体 EGCG quinone dimer

图 1 EGCG 氧化产物的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of EGCG oxidation products

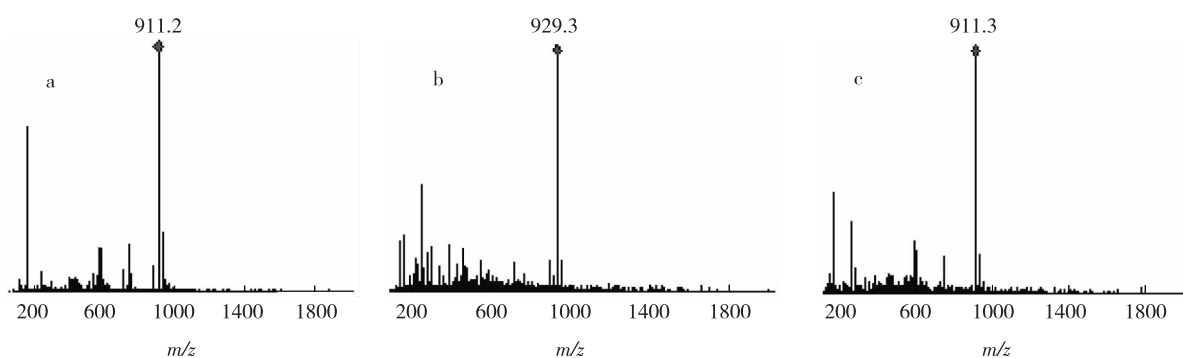


图2 产物1 (a)、产物2 (b)、产物3 (c)的MS分析

Fig.2 MS analysis of product 1 (a), product 2 (b) and product 3 (c)

EOP的变化如图3(b)所示。0~10 min, EOP的生成量随着反应温度的升高及反应时间的延长迅速增加, 40 °C 反应10 min时, EOP生成量达到最大, 但随后呈明显下降趋势。其因为EGCG二聚体属于氧化过程的中间产物, 对温度敏感, 在较高温度下易降解; 其次反应体系中的溶氧量会随着反应温度的升高而降低, 氧浓度的降低会使儿茶素类氧化产物的生成迟滞^[11-13]; 另外, 温度的升高加速氧化反应达到平衡。因此3因素的共同作用导致EOP生成量降低。

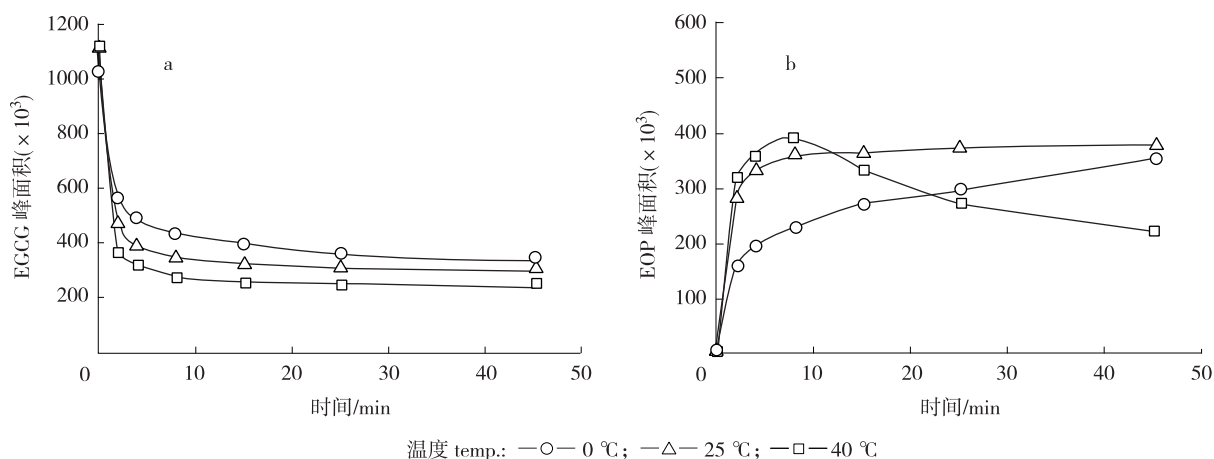


图3 反应温度对EGCG氧化(a)及EOP形成(b)的影响

Fig.3 Effects of temperature on EGCG oxidation (a) and EOP formation (b)

2.2.2 反应体系pH值的影响 通过柠檬酸或碳酸氢钠将反应液调至所需pH值。反应体系pH值对EGCG及EOP的影响如图4所示, 由图4(a)可看出, EGCG在碱性条件下易氧化, 这是因为碱性条件有利于其B环上·OH的裸露, 更易发生氧化聚合^[12]; 弱酸性条件下不利于EGCG氧化, 这与EGCG本身也属弱酸性物质有关。EOP的生成情况基本与EGCG的氧化程度相对应(图4(b)), 在碱性条件下EOP生成量最大, 在弱酸性条件下生成量最小。但随着氧化时间的延长, 碱性条件下EOP的生成量在15 min后呈下降趋势。一般说来, 在弱碱性条件下, $K_3Fe(CN)_6$ 的氧化还原电位升高, 使尽可能多的儿茶素类化合物发生氧化生成邻醌再聚合; 但碱性较高时, 随着氧化时间的延长, 将会影响到 $K_3Fe(CN)_6$ 的解离, 使之游离出较多的 Fe^{3+} , 而 Fe^{3+} 易与多酚发生络合, 从而影响到儿茶素类氧化产物的形成^[14]。从图4(b)中还可观察到, 在pH值4.0时, EOP的生成量在反应后期略有下降, 由于儿茶素类物质的酸性氧化机制尚未阐明^[15], 因此导致该现象的原因还有待于进一步探讨。

2.2.3 氧化剂与底物质量比的影响 图5为氧化剂与底物的质量比对EGCG氧化及EOP形成的影响。图5(a)表明随着氧化剂所占质量比的增大, EGCG氧化程度加剧, 特别在氧化剂与底物的质量比为2:1反应45 min时, EGCG几乎消耗殆尽。

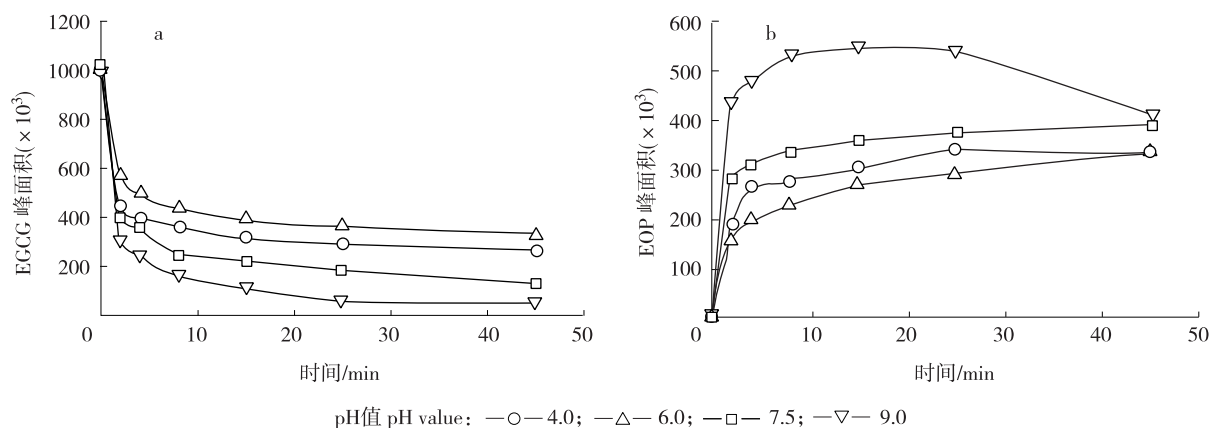


图4 反应体系 pH 值对 EGCG 氧化 (a) 及 EOP 形成 (b) 的影响
Fig. 4 Effects of pH value on EGCG oxidation (a) and EOP formation (b)

由图 5(b) 可看出,不同条件下,EOP 生成量均随氧化时间的延长而增加。其中 0 ~ 10 min,氧化剂与底物的质量比 2:1 时,EOP 的生成量最大;10 min 后则以氧化剂与底物的质量比 1.5:1 的 EOP 生成量最大。在实验中发现,氧化剂与底物的质量比为 2:1 时的反应液中有少量红棕色不溶物,该物仅溶于甲醇、丙酮等有机溶剂,推测为茶红素类物质^[16]。由此可见,并非体系中氧化剂所占比例越大越有利于 EOP 的生成,还要考虑到氧化产物在氧化剂的作用下进一步氧化,有可能转变为聚合度更大的物质,从而影响 EOP 的生成。

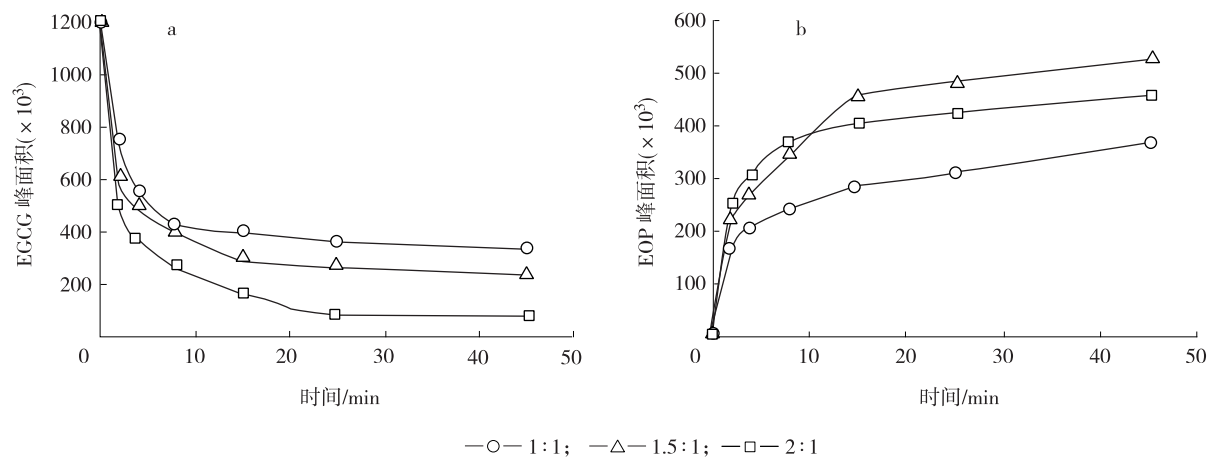


图5 氧化剂与底物不同质量比对 EGCG 氧化 (a) 及 EOP 形成 (b) 的影响
Fig. 5 Effects of mass ratio of oxidant to substrate on EGCG oxidation (a) and EOP formation (b)

3 结论

3.1 HPLC/MS 分析表明,EGCG 化学氧化产物主要有 3 种,产物 1 m/z 911,产物 2 m/z 929,产物 3 m/z 911。产物 1、3 为 EGCG 脱氢二聚体;产物 2 为 EGCG 醌式二聚体。3 种产物均为 EGCG 氧化低聚物。

3.2 通过探讨反应条件对 EGCG 及 EOP 的影响发现:随着反应温度的上升,EGCG 的氧化程度加剧,但较高温度不利于 EOP 的形成;EGCG 在碱性条件下反应剧烈,氧化程度较高,但随着时间的延长会使 EOP 生成量下降;氧化剂比例的加大有助于 EGCG 的氧化,但 EOP 的生成量不与氧化剂所占的比例呈正相关。从有利于 EOP 的形成及保持其稳定看来,EOP 生成的最佳条件为:温度 25 °C, pH 值 7.5,氧化剂与底物的质量比 1.5:1,氧化时间 15 min。

参考文献:

- [1] ROBERTS E A H. The phenolic substances of manufactured tea II — Their origin as enzymic oxidation products in fermentation[J]. J Sci Food Agric, 1958, 4(9): 212-216.
- [2] 李春美, 谢笔钧. 儿茶素氧化聚合产物药理作用研究概况[J]. 茶叶, 2001, 27(1): 28-34.
- [3] LI Chung-mei, XIE Bi-jun. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxy-polymers[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(12): 6362-6366.
- [4] 李春美, 谢笔钧. 茶多酚及其氧化产物清除不同体系产生的活性氧自由基的分光光度法研究[J]. 精细化工, 2000, 17(4): 241-244.
- [5] 吕丽爽. 天然抗氧化剂低聚原花青素的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 147-150.
- [6] 李大祥, 宛晓春, 萧伟祥. 儿茶素化学氧化条件的研究简报[J]. 茶业通报, 2000, 22(2): 17-18.
- [7] WAN Xiao-chun, NURSTEN H E. A new type of tea pigment from the chemical oxidation of epicatechin gallate and isolated from tea[J]. J Sci Food Agric, 1997, 74: 401-408.
- [8] TANAKA T, MINE C. Structures of two new oxidation products of green tea polyphenols generated by model tea fermentation[J]. Tetrahedron, 2002, 58: 8851-8856.
- [9] TANAKA T, MATSUO Y. A novel black tea pigment and two new oxidation products of epigallocatechin-3-*o*-gallate[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 7571-7578.
- [10] 姚立虎, NURSTEN H E. 利用带光电二极管阵列检测的反相 HPLC 对 ECG, EGCG 和红茶中的氧化产物的分析研究[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(1): 11-16.
- [11] HILTON P J, ELLIS R T. Estimation of market value of Central African tea by theaflavin analysis [J]. J Sci Food Agric, 1972, 23: 227-232.
- [12] 李大祥, 宛晓春. 论茶儿茶素的化学氧化[J]. 茶业通报, 2000, 22(3): 22-23.
- [13] 胡耀武. 双灌相发酵应用于茶色素形成与制取的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学茶学硕士论文, 1998: 6-7.
- [14] 宛晓春, 李大祥, 萧伟祥. 儿茶素化学氧化条件的研究[C]//海峡两岸茶叶科技学术研讨会论文集. 福州: [出版者不详], 2000: 86-91.
- [15] 李立祥. 茶多酚氧化实验研究[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(2): 101-104.
- [16] 夏涛, 高丽萍. 红茶色素分离测定方法及其对品质影响的研究概述[J]. 中国茶叶加工, 1999(2): 42-45.

下 期 要 目

原位固化落叶松单宁对 Cr(VI) 的氧化还原吸附

迷迭香抗氧化剂和精油综合提取技术研究(III)——
超临界 CO₂ 萃取法

木聚糖酶基因 xyn I 的克隆和序列分析

氢化萘烯酯型环氧树脂基多元醇的合成与结构表征

核桃楸树皮的化学成分及其抗氧化活性研究(英文)

桦木醇提取及纯化工艺的研究

叔胺型与季铵型阳离子分散松香施胶剂的性能比较

小茴香籽精油成分及其抗菌活性研究

纳米镍催化树脂酸歧化反应的研究(II)

纳米 Pd 组装介孔分子筛 MCM-41 催化松香加氢反应

苗药那信论中的一个新三萜成分(英文)

黑曲霉胞外耐高糖 β-葡萄糖苷酶的分离纯化及部分特性

竹材茶酚液化及胶黏剂制备工艺

复合催化体系 (HSO₃⁻-pmim) H₂PO₄⁻-ClCH₂COOH 在 α-萜
烯水合反应中的应用

磺化去氢枞酸盐的合成与生物活性测试

不同采收期单叶蔓荆子挥发油成分的 GC-MS 分析比较

1,2,3-三甲氧基苯含量测定方法的研究

牵牛子化学成分研究(II)

固体超强酸 SO₄²⁻/TiO₂-ZrO₂ 催化 β-月桂烯与马来酸
酐的 Diels-Alder 反应研究

竹叶总黄酮不同提取方法的比较研究

竹笋水溶性多糖提取工艺研究

减压蒸馏法提取核桃楸树皮中的胡桃醌

制备生物柴油用脂肪酶产生菌的诱变和筛选