

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)在超声场中热稳定性的动力学

许楠¹, 卓雅¹, 曹雁平^{1,2,*}, 肖俊松^{1,2}, 吴葛洋¹

(1. 北京工商大学食品学院, 北京 100048;

2. 食品添加剂与配料北京市高校工程研究中心, 北京 100048)

摘要: 研究弱酸环境下 pH 值对表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)的影响, 以及在非超声场和 0.25 W/cm²、135 kHz 超声场中 EGCG 的稳定性, 利用高效液相色谱对其进行定量分析。结果显示: 温度为 20℃、相同 pH 值时超声场中 EGCG 的稳定性均低于非超声场; pH 6.2、超声 40 min 时 EGCG 的损失率为 10.70%, 是非超声场的 5.63 倍。通过线性回归计算, 确定 EGCG 在非超声场及超声场中的反应均符合一级反应动力学规律。超声场中, EGCG 的反应速率常数为 0.00228 min⁻¹, 是非超声场的 4.3 倍; 反应活化能为 22861.13 kJ/mol, 比非超声场降低了 14.0%; 指前因子为 28.30 s⁻¹, 比非超声场提高了 13.5%。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 超声; 稳定性; 化学动力学; 模型

Kinetic Modeling of the Thermal Stability of EGCG in an Ultrasonic Filed

XU Nan¹, ZHUO Ya¹, CAO Yan-ping^{1,2,*}, XIAO Jun-song^{1,2}, WU Ge-yang¹

(1. School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing 100048, China)

Abstract: In this study the stability of epigallocatechin gallate (EGCG) in a weakly acidic environment alone and in combination with an ultrasonic field of 0.25 W/cm² and 135 kHz was quantitatively analysis by high performance liquid chromatography. It was shown that under 20℃ and the same pH conditions, ultrasonic treatment caused a decrease of the stability of EGCG, and the loss rate of EGCG was 10.70%, after 40 min exposure to pH 6.2 with ultrasonic treatment, exhibiting a 5.63-fold increase compared to the absence of ultrasonic. Linear regression indicated that the reaction of EGCG in an ultrasonic field and in a non-ultrasonic field followed first-order kinetics. The rate constant was 0.00228 min⁻¹ in the presence of ultrasonic, the activation energy 22861.13 kJ/mol, and the pre-exponential factor 28.30 s⁻¹, which were increased 4.3 times, decreased by 14.0% and increased by 13.5%, respectively.

Key words: epigallocatechin gallate; ultrasonic; stability; chemical dynamics; kinetic model

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0086-05

儿茶素是茶多酚类化合物中的主体物质, 存在于茶叶和水果中, 有较强的抗氧化^[1]及清除自由基作用^[2], 在生物学上, 具有抗癌^[3]、消炎以及抑菌^[4]等生理功效。儿茶素单体主要有 8 种, 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)作为一种酯型儿茶素, 含量最为丰富, 约占儿茶素总量的 45%~65%^[5]。因此, EGCG 成为目前研究最多的儿茶素之一。EGCG 中的 6 个邻位酚羟基(图 1), 易发生降解、异构化及氧化^[6], 随着 pH 值的增加, 主要发生降解反应^[7]。

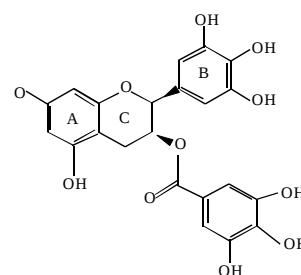


图 1 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)分子结构式
Fig.1 Structure of (-)-epigallocatechin gallate

收稿日期: 2011-08-10

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD23B02)

作者简介: 许楠(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学。E-mail: xunan_818@163.com

* 通信作者: 曹雁平(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: caoyyp@ph.btbu.edu.cn

超声波是弹性波,其空化效应、机械作用和热效应有利于改变植物组织、破碎细胞、加速溶解有效成分、促进扩散和传质等,已成为提取天然食品中有效成分的一种方法^[8];然而超声场也可引起有机物的聚合与降解^[9],影响提取效果,研究天然产物的超声化学对于超声提取技术有着重要的意义。

已有关于EGCG在微波条件下热稳定性的研究,Wang等^[10]利用微波加热EGCG溶液,建立了EGCG的降解及异构化的动力学方程,对微波处理技术与食品功能成分的损耗有一定参考价值,但关于超声场中有关EGCG化学反应动力学研究的报道较少。本实验以EGCG为研究对象,探讨非超声条件以及超声物理场对EGCG化学反应活性的影响,分别建立动力学方程,以期对超声提取儿茶素技术有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

EGCG(>99%) 上海友思生物技术公司;NaHCO₃(分析纯)、柠檬酸(分析纯) 北京化工厂;冰乙酸(色谱纯) 天津市光复精细化工研究所;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯) 美国Fisher公司。

1.2 仪器与设备

JXD-02型超声装置(135kHz) 北京金星超声波设备技术有限公司;DCW-3506型低温恒温循环水浴槽 宁波新芝生物科技股份有限公司;2695型高效液相色谱(HPLC)仪、2996型二极管阵列检测器(DAD) 美国Waters公司。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱和二极阵列检测器法(HPLC-DAD)分析

色谱条件:柱型:Sunfire C₁₈色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm);流动相A液:甲醇;B液:2%冰乙酸;C液:乙腈;等度洗脱条件:甲醇、2%冰乙酸、乙腈体积比为1:8:1;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样量:10.0μL;检测波长:280nm。

1.3.2 EGCG溶液的配制及样品的制备

EGCG溶液配制:参照Wan等^[11]的方法,用NaHCO₃-柠檬酸溶液调节溶液pH值。称取一定质量的EGCG标准品,溶于上述溶液中,配制成一定浓度的EGCG溶液。

样品制备:将配制好的EGCG溶液倒入棕色玻璃瓶中,放入一定条件的非超声场或超声场中。每隔20min取样,经0.45μm滤膜过滤后,用高效液相色谱(HPLC)分析。

1.3.3 pH值对EGCG稳定性的影响

配制初始浓度为1.0mmol/L、不同pH值(6.0、6.2、6.4、6.6、6.8)的EGCG溶液,分别置于20℃的非超声

场以及超声场(135kHz、0.25W/cm²)中处理,定时取样测定EGCG浓度。

1.3.4 EGCG稳定性的动力学研究

反应级数的测定:依据1.3.3节所得实验结果,配制pH6.2、不同初始浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mmol/L)的EGCG溶液,分别置于20℃的非超声场以及超声场(135kHz、0.25W/cm²)中处理,定时取样测定EGCG浓度。

反应活化能(E_a)和指前因子(A)的测定:依据1.3.3节所得实验结果,配制pH6.2、初始浓度1.0mmol/L的EGCG溶液,分别置于不同温度(20、30、40、50、60℃)的非超声场以及超声场(135kHz、0.25W/cm²)中处理,定时取样测定EGCG浓度。

1.3.5 数据处理方法

1.3.5.1 反应级数的确定及速率常数的计算

分别以 $c-t$ 、 $\ln(c/c_0)-t$ 、 $1/(c-c_0)-t$ 作图,通过最小二乘法对数据进行线性回归分析,其相关系数为最大值的直线即为该反应的速率特征方程,所对应的反应级数分别为零级、一级、二级。

式中: c 为EGCG在 t 时刻的浓度/(mol/L); c_0 为 $t=0$ 时刻EGCG的浓度/(mol/L)。

1.3.5.2 E_a 和 A 的计算

依据Arrhenius公式 $k=Ae^{-E_a/RT}$ 的对数形式 $\ln k=-E_a/(RT)+\ln A$,对 $\ln k-1/T$ 作图,所得直线斜率等于 $-E_a/R$,截距等于 $\ln A$ 。式中: k 为EGCG反应速率常数; R 为理想气体常数; T 为热力学温度; A 为指前因子。

2 结果与分析

2.1 pH值对EGCG稳定性的影响

2.1.1 非超声条件下pH值对EGCG稳定性的影响

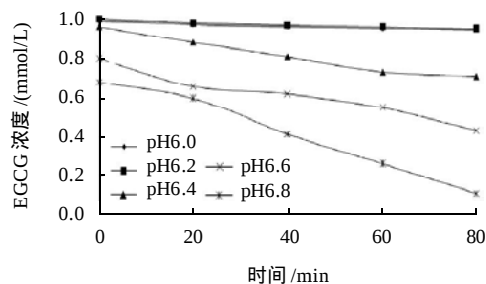


图2 非超声场中不同pH值条件下的EGCG浓度

Fig.2 Effect of pH on EGCG stability without ultrasonic treatment

由图2可知,非超声条件下,pH6.0、6.2时,EGCG的浓度变化不大,较为稳定,40min时的损失率均在10%以内,分别为1.7%、1.9%;pH6.4时,浓度明显减小,40min时的损失率达到16.0%,说明EGCG在pH6.2以下稳定;pH6.6、6.8时EGCG的反应更为迅速,40min时损失率分别高达37.5%、58.4%。

pH 值对于 EGCG 的稳定起到了至关重要的作用。在采用非超声手段提取或者储存 EGCG 的过程中, 可以将 pH 值调节在 6.2 以下, 以减少损失。

2.1.2 超声条件下 pH 值对 EGCG 稳定性的影响

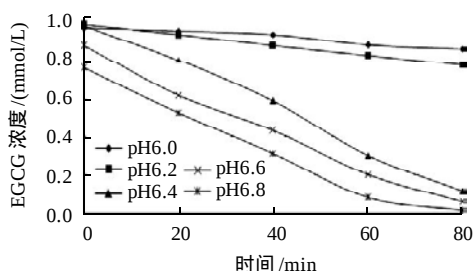


图3 超声场中不同 pH 值条件下的 EGCG 浓度

Fig.3 Effect of pH on EGCG stability with ultrasonic treatment

由图 3 可知, 超声条件下, pH6.0、6.2 时 EGCG 的浓度明显减少, 40min 时的损失率分别为 3.4%、10.7%, 比非超声提高了 100%、463.2%; pH6.4 时更加明显, 40min 时, 损失率已达 40.1%, 比非超声提高了 150.6%; 在 40min 时, pH6.6、6.8 的损失率为 56.6%、68.7%; 80min 时已检测不到 EGCG。

无论是在非超声场还是超声场中, EGCG 在 pH6.2 ~ 6.4 之间的损失率均突然增加; 在相同 pH 值条件下, EGCG 在超声场中的稳定性明显低于非超声场, 可见超声波加速了 EGCG 的化学反应, 造成了 EGCG 的消耗, 在一定程度上不利于超声提取 EGCG, 然而可以通过降低 pH 值的影响提取效果。

2.2 EGCG 稳定性动力学

2.2.1 非超声场中 EGCG 稳定性动力学

2.2.1.1 非超声场中 EGCG 反应级数的确定

依据 1.3.5.1 节方法对数据进行处理, 发现以一级反应计算, 结果呈现较好的线性关系, 可以确定此反应为一级反应。如表 1 所示, 一级反应速率方程的回归系数 R^2 均大于 0.95, 反应速率常数平均值为 $k = 0.000531$ (平均偏差范围为 - 3.20% ~ 1.13%)。

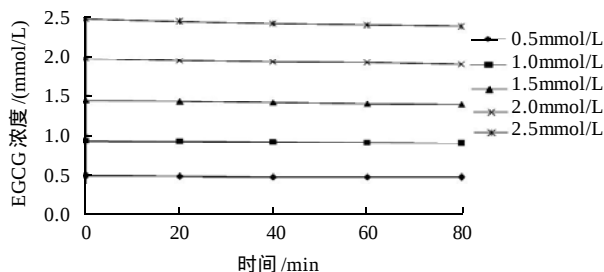


图4 非超声场中 EGCG 在不同时间的浓度

Fig.4 Decomposition curves of EGCG at various initial concentrations during exposure to pH 6.2 and 20

表 1 不同初始浓度 EGCG 在非超声场中 $\ln(c_0/c)$ 与时间 t 的回归方程

Table 1 Regression equations of $\ln(c_0/c)$ against t for EGCG at various initial concentrations during exposure to pH 6.2 and 20

初始浓度/(mmol/L)	一级反应特征方程	R^2	RSD/%
0.5	$\ln(c_0/c)=0.000537t$	0.9719	< 5.5
1.0	$\ln(c_0/c)=0.000543t$	0.9971	< 10
1.5	$\ln(c_0/c)=0.000514t$	0.9808	< 9.0
2.0	$\ln(c_0/c)=0.000519t$	0.9501	< 8.7
2.5	$\ln(c_0/c)=0.000542t$	0.9611	< 7.3

Zimeri 等^[12]研究发现, EGCG 在不同浓度条件下的降解为一级反应, 本研究结果与之相一致。

2.2.1.2 非超声场中 EGCG 的反应活化能和指前因子

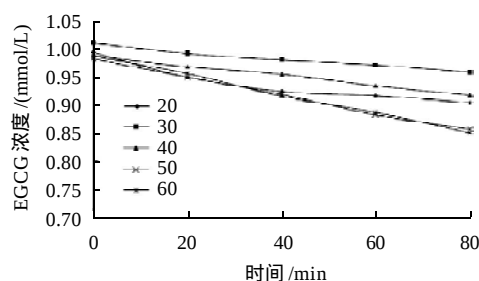


图5 不同温度条件下 EGCG 在非超声场中不同时间的浓度

Fig.5 Decomposition curves of EGCG during exposure to pH 6.2 and different temperatures

已确定非超声场中 EGCG 的反应符合一级反应规律, 以 $\ln(c_0/c)$ 对 t 作图, 得到各温度条件下的一级反应速率方程(表 2), 其中直线斜率为该温度条件下的反应速率常数 k , 回归系数均大于 0.97, 相对标准偏差均在 7.0% 以内。

表 2 不同温度条件下 EGCG 在非超声场中 $\ln(c_0/c)$ 与时间 t 的回归方程

Table 2 Regression equations of $\ln(c_0/c)$ against t for EGCG during exposure to pH 6.2 and different temperatures

温度/°C	一级反应特征方程	R^2	RSD/%
20	$\ln(c_0/c)=0.000543t$	0.9815	< 1.6
30	$\ln(c_0/c)=0.000667t$	0.9880	< 6.0
40	$\ln(c_0/c)=0.00105t$	0.9815	< 4.3
50	$\ln(c_0/c)=0.00143t$	0.9859	< 5.3
60	$\ln(c_0/c)=0.00190t$	0.9968	< 4.9

以 $\ln k - 1/T$ 作图, 所得线性关系如图 6 所示。根据 1.3.5.2 节方法计算, 得到活化能和指前因子分别为 $E_a = 26573.13 \text{ kJ/mol}$, $A = 24.93 \text{ s}^{-1}$ 。

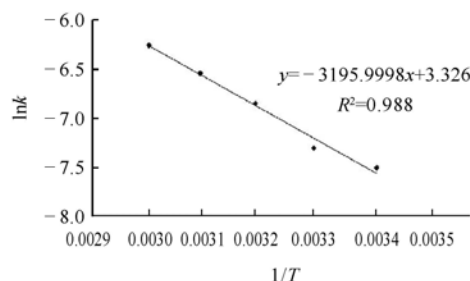


图6 非超声场中反应速率常数与温度间的关系

Fig.6 Relationship between reaction rate constant and temperature for EGCG decomposition in non-ultrasonic field

2.2.2 超声场中 EGCG 稳定性的动力学

2.2.2.1 超声场中 EGCG 反应级数的确定

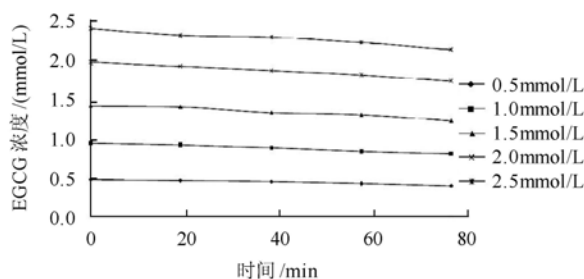


图7 超声场中 EGCG(pH6.2)在不同时间的浓度

Fig.7 Decomposition curves of EGCG at various initial concentrations during exposure to pH 6.2, 20 °C and ultrasonic

依据 1.3.5.1 节方法对数据进行处理,发现以一级反应计算,结果呈现较好的线性关系,可以确定此反应为一级反应。如表 3 所示,一级反应速率方程的回归系数 R^2 均大于 0.92,反应速率常数平均值为 $k = 0.00228$ (平均偏差范围为 $-7.62\% \sim 6.13\%$)。

表3 不同初始浓度 EGCG 在超声场中 $\ln(c_0/c)$ 与时间 t 的回归方程
Table 3 Regression equations of $\ln(c_0/c)$ against t for EGCG at various initial concentrations during exposure to pH 6.2, 20 °C and ultrasonic

初始浓度/(mmol/L)	一级反应特征方程	R^2	RSD/%
0.5	$\ln(c_0/c) = 0.00242t$	0.9298	< 3.6
1.0	$\ln(c_0/c) = 0.00239t$	0.9430	< 10.0
1.5	$\ln(c_0/c) = 0.00227t$	0.9057	< 4.3
2.0	$\ln(c_0/c) = 0.00211t$	0.9405	< 6.5
2.5	$\ln(c_0/c) = 0.00223t$	0.9854	< 3.2

2.2.2.2 超声场中 EGCG 的反应活化能和指前因子

已确定超声场中 EGCG 的反应符合一级反应规律,以 $\ln(c_0/c)$ 对 t 作图,得到各温度下的一级反应速率方程

(表 4),其中直线斜率为该温度下的反应速率常数 k ,回归系数均大于 0.94,相对标准偏差均在 8.0% 以内。

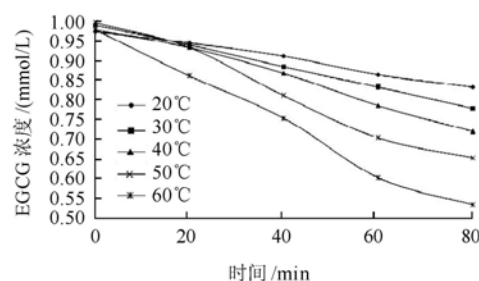


图8 不同温度条件下 EGCG 在超声场中不同时间的浓度

Fig.8 Decomposition curves of EGCG during exposure to pH 6.2, different temperatures and ultrasonic

表4 不同温度条件下 EGCG 在超声场中 $\ln(c_0/c)$ 与时间 t 的回归方程

Table 4 Regression equations of $\ln(c_0/c)$ against t for EGCG during exposure to pH 6.2, different temperatures and ultrasonic

温度/°C	一级反应特征方程	R^2	RSD/%
20	$\ln(c_0/c) = 0.00239t$	0.9430	< 3.9
30	$\ln(c_0/c) = 0.00340t$	0.9664	< 5.3
40	$\ln(c_0/c) = 0.00427t$	0.9658	< 7.1
50	$\ln(c_0/c) = 0.00537t$	0.9880	< 6.6
60	$\ln(c_0/c) = 0.00752t$	0.9877	< 3.7

以 $\ln k - 1/T$ 作图,所得线性关系,如图 9 所示。根据 1.3.5.2 节方法计算,得到活化能和指前因子分别为 $E_a = 22861.13 \text{ kJ/mol}$, $A = 28.30 \text{ s}^{-1}$ 。

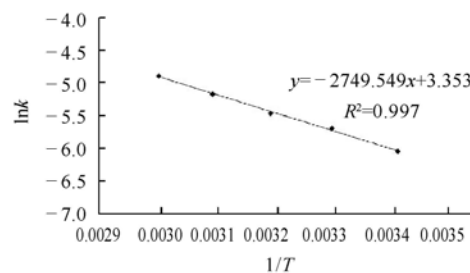


图9 超声场中反应速率常数与温度间的关系

Fig.9 Relationship between reaction rate constant and temperature for EGCG decomposition in ultrasonic field

与 2.2.1.2 节的结果对比后发现,在超声场中,EGCG 稳定性的活化能低于非超声场,这可能是由于超声波的空化效应,为化学反应提供了一种新的反应途径^[13],使得 EGCG 的稳定性降低;指前因子高于非超声场,表明超声波提高了分子间的碰撞频率,也证明了 EGCG 的稳

定性与分子间的碰撞频率有关。这也进一步说明了,超声波在一定程度上不利于 EGCG 的稳定性。

孙庆磊等^[14]研究发现超声场对茶汤的品质有一定影响,与非超声条件相比,低温条件下超声波辅助浸提的提取率较高,这与本研究结果相一致。

2.3 动力学模型的确定及验证

2.3.1 非超声场中 EGCG 反应动力学模型验证

根据速率方程 $kt = -\ln(c/c_0)$, 计算在超声场中,温度为 40℃ 时,不同反应时间所对应的 EGCG 浓度,得到理论值,其中 $k = 24.93e^{(-26573.13/RT)}$, 结果见表 5。通过对 EGCG 的理论值与实测值比较, RSD 值均小于 2.0%,说明得到的动力学模型能够很好的模拟实际反应进程。

表 5 非超声场中温度为 313.15K(40℃)时动力学模型计算
Table 5 Model predictions and experimental data of residual EGCG concentration during decomposition without ultrasonic treatment

时间/min	C 理论值/(mmol/L)	C 测量值/(mmol/L)	RSD/%
20	0.981	0.970	0.81
40	0.962	0.956	0.47
60	0.944	0.935	0.67
80	0.926	0.919	0.53
100	0.909	0.887	1.7
120	0.892	0.867	2.0

2.3.2 超声场中 EGCG 反应动力学模型验证

根据速率方程 $kt = -\ln(c/c_0)$, 计算在超声场中,温度为 40℃ 时,不同反应时间所对应的 EGCG 浓度,得到理论值,其中 $k = 28.30e^{(-22861.13/RT)}$, 结果见表 6。通过对 EGCG 的理论值与实测值比较, RSD 值均小于 2.5%,说明得到的动力学模型能够很好的模拟实际反应进程。

表 6 超声场中温度为 313.15K(40℃)时动力学模型计算
Table 6 Model predictions and experimental data of residual EGCG concentration during decomposition with ultrasonic treatment

时间/min	C 理论值/(mmol/L)	C 测量值/(mmol/L)	RSD/%
20	0.914	0.932	1.4
40	0.836	0.867	2.6
60	0.765	0.785	1.9
80	0.699	0.719	1.9
100	0.640	0.617	2.5
120	0.585	0.565	2.4

3 结 论

pH 值对 EGCG 的稳定性影响为:无论在非超声场或超声场中 pH 值越大, EGCG 的稳定性越差;相同 pH 值

条件下,超声场中 EGCG 的稳定性均低于非超声场;在超声场中,40min 时 pH6.2 时 EGCG 的损失率达 10.70%,是非超声场的 5.63 倍。

EGCG 稳定性的动力学研究结果:超声场中,平均反应速率常数 k 为 0.00228,是非超声条件下的 4.3 倍;反应活化能为 22861.13kJ/mol,比非超声场中的降低了 14.0%;指前因子为 $28.30s^{-1}$,比非超声场高了 13.5%。

本实验仅研究了 135kHz 的超声频率,具有一定局限性,不能全面的解释 EGCG 在超声中动力学规律,但为儿茶素超声稳定性的研究提供了一种可行性,也为超声波提取较高生物活性的茶多酚提供了参考。在今后的研究中,可以通过鉴定 EGCG 在超声场中的产物,对其反应机理进行研究。

参 考 文 献 :

- [1] 赵文红, 邓泽元, 范亚苇, 等. 儿茶素体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(12): 278-282.
- [2] 沈生荣, 赵玉芳, 杨贤强, 等. 儿茶素类与羟自由基的作用动力学[J]. 茶叶科学, 1997, 17 (增刊 1): 113-118.
- [3] 赵洁, 田庆伟. 绿茶儿茶素抗癌作用机理的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2003(2): 26-28.
- [4] 李志光, 谢文刚, 张铭. 茶多酚、灵芝等提取物与细菌作用的研究[J]. 食品科学, 1999, 20(7): 49-51.
- [5] TANAKA T, WATARUMI S, MATSUO Y, et al. Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation-reduction dismutation of dehydrotheasinensin A[J]. Tetrahedron, 2003, 59: 7939-7947.
- [6] KOMATSU Y, SUEMATSU S, HISANOBU Y, et al. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 907-910.
- [7] SHARMA A, ZHOU Weibiao. A stability study of green tea catechins during the biscuit making process[J]. Food Chemistry, 2011, 126: 568-573.
- [8] 曹雁平, 刘佐才. 植物成分超声浸取研究现状[J]. 化工进展, 2005, 24(11): 1249-1252.
- [9] 袁英髦, 曹雁平. 食品工业中超声技术现状与发展趋势[J]. 食品工业科技, 2011(3): 442-445.
- [10] WANG Rong, ZHOU Weibiao, WEN Ruth-annu huiyi. Kinetic study of the thermal stability of tea catechins in aqueous systems using a microwave reactor[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (16): 5924-5932.
- [11] WAN Xiaochun, NURSTEN H E, CAI Y, et al. A new type of tea pigment from the chemical oxidation of epicatechin gallate and isolated from tea[J]. Sci Food Agric, 1997, 74: 401-408.
- [12] ZIMMERI J, TONG C H. Degradation kinetics of (-)-epigallocatechin gallate as a function of pH and dissolved oxygen in a liquid model system[J]. Food Sci, 1999, 64(5): 753-758.
- [13] BROCHETTE-LEMOINE S, TROMBOTTO S, JOANNARD D, et al. Ultrasound in carbohydrate chemistry: sonophysical glucose oligomerisation and sonocatalysed sucrose oxidation[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2000, 7(4): 157-161.
- [14] 孙庆磊, 梁月荣, 陆建良, 等. 不同浸提方法对茶汤品质的影响[J]. 茶叶, 2005, 31(2): 91-94.