

一种低浓度 L-半胱氨酸介导的表没食子儿茶素 没食子酸酯红色衍生物的制备方法

孟菲¹, 戴前颖¹, 刘亚军², 蒋晓岚¹, 韩莹莹¹, 王淑娟¹, 何媛媛¹, 夏涛^{1*}, 高丽萍^{2*}
(1. 安徽农业大学教育部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 优化低浓度 L-半胱氨酸介导的表没食子儿茶素没食子酸酯的红色衍生物的制备条件。其最佳反应条件为, 在 pH6.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液中, 80℃ 水浴反应 3 h, 底物表没食子儿茶素没食子酸酯浓度为 0.15 mg·mL⁻¹, L-半胱氨酸浓度为 0.01 mg·mL⁻¹。并探究该条件下制备的红色衍生物的固体粉末的外观特性、溶解特性、光谱学特性以及 HPLC 色谱行为, 为后续的分离纯化、结构鉴定打下基础。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; L-半胱氨酸; 红色衍生物

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)01-0007-05

A preparation method for low concentration L-cysteine mediated epigallocatechin gallate red derivatives

MENG Fei¹, DAI Qianying¹, LIU Yajun², JIANG Xiaolan¹, HAN Yingying¹,
WANG Shujuan¹, HE Yuanyuan¹, XIA Tao¹, GAO Liping²

(1. Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
2. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: This study optimized the preparation condition for low concentration L-cysteine mediated epigallocatechin gallate (EGCG) red derivatives. The reaction condition was optimized and established as: incubation in pH 6.0 phosphate - citric acid buffer solution for 3 hours at 80℃ with substrate 0.15 mg/ml EGCG and 0.01 mg/ml L-cysteine. Besides, we investigated the appearance characteristics, solubility, spectroscopy and HPLC chromatographic behavior of the red derivatives solid powder under the preparation condition, which would lay a solid foundation for further separation and structure purification of the red derivatives.

Key words: EGCG; L-cysteine; red derivatives

自从 1929 年日本人首次从茶叶中提取分离出 EGCG 以来, 已有大量的文献报道有关 EGCG 生理功效的研究。大量现代医学研究证实, 儿茶素具有抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗衰老、抗菌消炎、降糖和降压等多种生物学功能^[1], 所以被广泛应用于食品、药品和饮料行业。但是, EGCG 结构中含有大量的酚羟基, 容易被空气中的氧气氧化成醌类而提供质子氢, 在加工和储藏过程中的热作用下, 极易发生氧化(酶促氧化、化学氧化和自动氧化)等反应^[2-7], 虽然 EGCG 的氧化产物复杂而多变, 但肯

定的是伴随着氧化反应的发生, EGCG 的氧化产物多为有色物质, 多表现为黄色或棕褐色^[4-5]。

因为具有活泼的基团和低氧化还原电位, L-半胱氨酸(L-cys)和 L-抗坏血酸(L-Vc)等抗氧化剂可以用来抑制儿茶素的氧化。目前关于半胱氨酸抑制儿茶素类物质氧化的研究已有很多报道, 半胱氨酸之所以抗儿茶素(表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表没食子儿茶素(EC)、没食子儿茶素(C))氧化, 其抗氧化机理为: L-cys 是通过直接与其酶促或非酶促反应中间产物—醌类物质结合生成无色的

收稿日期: 2014-03-19

基金项目: 国家自然科学基金(31170647, 31170282 和 31270730) 共同资助。

作者简介: 孟菲, 硕士研究生。E-mail: mengfei62@163.com

* 通信作者: 夏涛, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: xiatao62@126.com 高丽萍, 教授。E-mail: gaolp62@126.com

硫化化合物而抑制儿茶素褐变的发生,并不是通过对多酚氧化酶活性中心的结构性修饰,或是发生共价结合来抑制其活性而实现的^[8-10]。

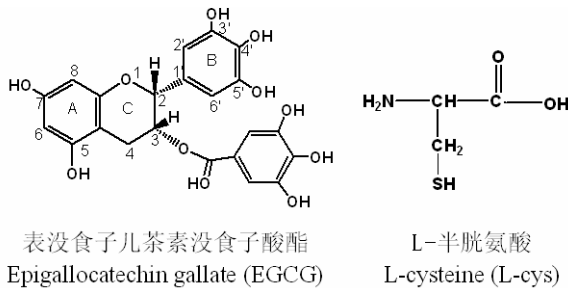


图1 表没食子儿茶素没食子酸酯和L-半胱氨酸结构式
Figure 1 The structures of epigallocatechin gallate and L-cysteine

Sang等^[11]首次在小鼠体内发现EGCG的硫醇结合物并进行了结构鉴定;然后谷胱甘肽或半胱氨酸通过巯基与邻醌进行亲核加成,形成无色的硫醇化合物,即遵循一个经典的共轭机理。孔维宝等^[8]研究确定了其最大吸收波长是295 nm。

本研究发现,向EGCG溶液中添加低浓度的L-cys,经过热处理会产生一种红色水溶性衍生物。为进一步分离、纯化鉴定该红色物质的结构、特性,作者对该红色衍生物生成的最适制备反应条件进行了优化,并进行的富集制备,为探究能否利用EGCG作为不同颜色的新型食品添加剂提供基础物质保证。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 表没食子儿茶素没食子酸酯((-)EGCG),购于福州日冕科技开发公司,纯度为90%;L-半胱氨酸(L-cys),购于上海谱振生物科技有限公司,纯度为99%。磷酸氢二钠,柠檬酸,分析纯。

1.1.2 主要仪器 日本 Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱仪;SPD6AV 可调波长紫外检测器(日本岛津公司);LC-solution 色谱工作站;U-3010 spectrophotometer 全波长扫描仪(日本日立);PB-10 酸度计,北京赛多利斯仪器系统有限公司;LGJ-12 冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 EGCG 红色衍生物的检测 (1) EGCG 红色衍生物的特征吸收峰检测。利用紫外分光光度计全波长扫描功能检测 EGCG 红色衍生物特征吸收峰。

(2) 反相高效液相色谱检测。HPLC 色谱条件:日本岛津 20AD 高效液相色谱仪;色谱柱:菲罗门

圣洁兰辐深 4 u 250×4.6 mm(Phenomenex Synergi 4 u Fusion 250×4.6 mm);检测器:日本岛津 SPD6AV 可调波长紫外检测器;灵敏度:0.01;检测波长:500 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样量:5 μL;采用梯度洗脱条件 A 相:0.2% 乙酸, B 相:色谱纯乙腈,洗脱梯度为前 15 min 内 A 相由 90% 到 70%, B 相由 10% 到 30%;19 min 到 24 min A 相由 67.5% 到 60%, B 相由 32.5% 到 40%;26 min 到 30 min A 相由 65% 到 20%, B 相由 35% 到 80%;35 min 到 36 min A 相由 20% 到 90%, B 相由 80% 到 10%;36 min, 停止。检测波长设置为 280 nm 和 500 nm。

1.2.2 EGCG 红色衍生物制备的条件 (1) 不同质量浓度的 L-cys 对 EGCG 红色衍生物生成的影响。比较不同质量浓度的 L-cys 对 EGCG 红色衍生物生成影响,在底物(EGCG)为 0.15 mg·mL⁻¹时,分别添加半胱氨酸溶液质量浓度为 0、0.002、0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 和 0.030 mg·mL⁻¹,其中 0 mg·mL⁻¹ 作为对照,热处理后测定全波长扫描图谱。

(2) 不同 pH 值和不同缓冲液类型对 EGCG 红色衍生物生成的影响。比较不同缓冲液 pH 对 EGCG 红色衍生物生成的影响,选择 A 组:醋酸缓冲液(pH3.5~5.0)、B 组:磷酸缓冲液(pH5.0~7.0)和 C 组:Tris-HCl 缓冲液(7.0~8.5),热处理后观察颜色变化并记录。

(3) 不同反应温度对 EGCG 红色衍生物生成的影响。比较不同反应温度对 EGCG 红色衍生物生成的影响。设置温度梯度:60、70、80、90 和 100 °C,热处理后测定全波长扫描图谱。

(4) 不同反应时间对 EGCG 红色衍生物生成的影响。比较不同反应时间对 EGCG 红色衍生物生成的影响。设置时间梯度:0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 h,热处理后测定全波长扫描图谱。

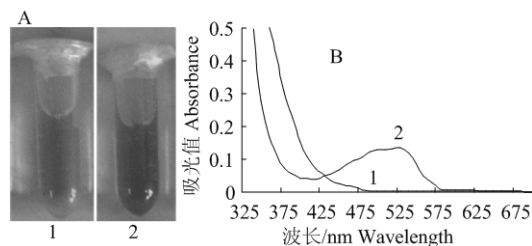
1.2.3 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)红色衍生物制备 反应体系为:在 4 L 棕色反应瓶中,依次加入 3.2 L 的 pH 磷酸缓冲液、0.4 L 质量浓度为 0.15 g·L⁻¹ 半胱氨酸,0.4 L 质量浓度为 0.01 g·L⁻¹ 的 EGCG 溶液,超声振荡混合均匀后,于 80°C 水浴热处理反应 3 h,得到 EGCG 红色衍生物反应液。再经冷冻干燥浓缩富集后,得到该衍生物的红色固体粉末。

2 结果与分析

2.1 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)红色衍生物的发现

本研究发现,当向质量浓度为 0.15 mg·mL⁻¹ 的 EGCG 标准溶液中等体积添加 0.01 mg·mL⁻¹ 的 L-cys

溶液时, 经过 80°C 水浴 3 h 后会生成粉红色溶液, 而不添加 L-cys 的 EGCG 溶液热处理后为黄色溶液, 如图 2A 所示。



A: L-半胱氨酸介导形成的 EGCG 红色衍生物溶液; B: L-半胱氨酸介导形成的 EGCG 红色衍生物的特征吸收峰

A: The solution of EGCG red derivatives mediated with L-cysteine; B: The characteristic absorption peak of EGCG red derivatives mediated with L-cysteine.

1: 不加 L-半胱氨酸的 EGCG 反应溶液; 2: 加入 L-半胱氨酸和 EGCG 反应溶液

1: EGCG reaction solution without L-cysteine; 2: EGCG reaction solution containing L-cysteine

图 2 L-半胱氨酸介导形成的 EGCG 红色衍生物

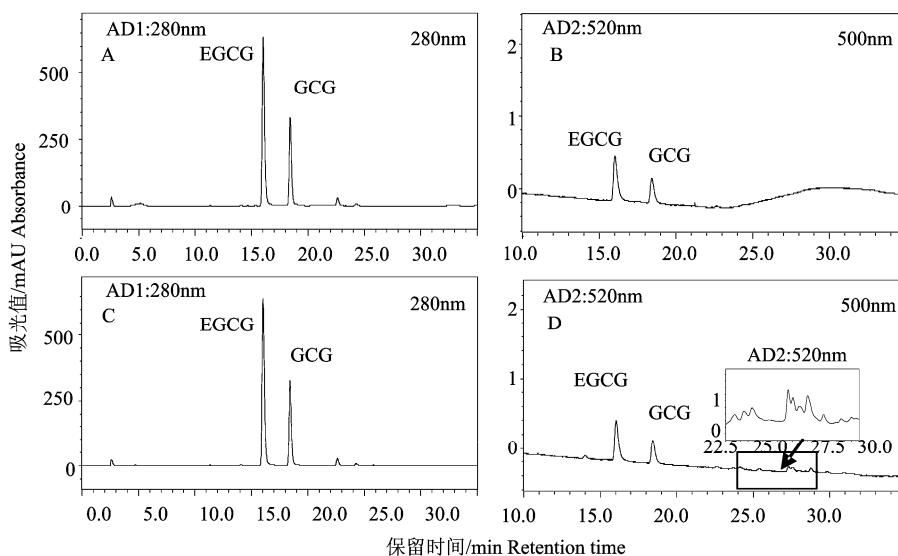
Figure 2 Red EGCG derivatives mediated with L-cysteine

2.2 EGCG 红色衍生物的检测

2.2.1 EGCG 红色衍生物的光谱学特征 添加 L-cys 的 EGCG 溶液在热处理后, 生成红色衍生物, 在 500 nm 处有特征吸收峰(见图 2B), 并随时间增加吸光值增加。因此, 选择在 500 nm 波长处检测反应时间、反应温度等对 EGCG 红色衍生物生成的影响。

2.2.2 EGCG 红色衍生物的 HPLC 色谱特征 图 3 为热反应后红色衍生物的 HPLC 图谱, 分别在 280 nm 处检测反应底物的变化和 500 nm 处检测反应产物的合成情况。从图中可以看出, EGCG 溶液在 280 nm 下检测到保留时间在 16.2 min 和 18.5 min 的 2 个峰, 在 500 nm 下是 2 个峰的残留(图 3-A 和 3-B)。而添加 L-cys 的 EGCG 溶液在 500 nm 处除了这 2 个峰还有新合成的其他峰, 保留时间在 22.5~30 min 之间, 即是红色衍生物色谱峰(图 3-D)。其特征在于:

(1) 保留时间相近且色谱峰数目不只一个; (2) 在 500 nm 下表现为检测响应值较低。故本实验首先探究了红色衍生物合成的影响因素, 并综合考虑选择了 EGCG 红色衍生物合成的最佳反应条件。



A 和 B 分别是不含 L-半胱氨酸的 EGCG 反应液在 280 nm、500 nm 下的 HPLC 色谱图; C 和 D 分别是加入 L-半胱氨酸和 EGCG 反应液在 280 nm、500 nm 下的 HPLC 色谱图

(A) and (B) represented chromatograms at 280 nm and 500 nm of EGCG reaction solution without L-cysteine; (C) and (D) represented chromatograms at 280 nm and 500 nm of EGCG reaction solution containing L-cysteine

图 3 L-半胱氨酸介导的 EGCG 红色衍生物的 HPLC 分析

Figure 3 The HPLC analysis of EGCG red derivatives mediated with L-cysteine

2.3 EGCG 红色衍生物合成条件的优化

2.3.1 最适的 L-cys 浓度的确定 图 4 为向 0.15 mg·mL⁻¹ 的 EGCG 标准溶液中添加 L-cys 溶液, 80°C 水浴保温 3 h 后全波长扫描图谱。从图中可以看出,

不添加半胱氨酸的对照, 在 380 nm 处吸收值较高而在 500 nm 处没有吸收值, 表明 EGCG 氧化产物较高, 而红色衍生物没有合成; 随着半胱氨酸浓度增加, 380 nm 处吸收值逐渐降低而 500 nm 处吸收值逐渐增

加,至半胱氨酸浓度达到 $0.0825 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 500 nm 吸收值达到最大,表明红色衍生物合成量最大;之后,随着半胱氨酸浓度继续增加,在 380 nm 和 500 nm 吸收值均下降,也表明 EGCG 氧化产物和红色衍生物合成均受到抑制。以上结果表明该红色衍生物是 EGCG 在低浓度的 L-半胱氨酸介导下合成的。故本实验选择 $0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 分别为底物 EGCG 和介质 L-半胱氨酸的浓度。另外,该 EGCG 红色衍生物的合成还与缓冲溶液类型、pH、反应温度、反应时间等因素有关。

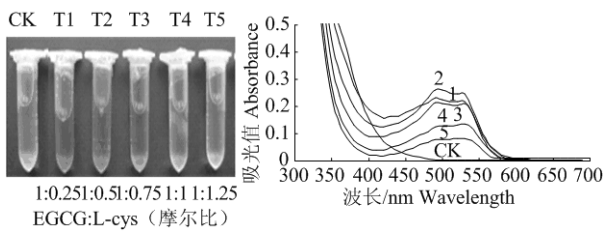
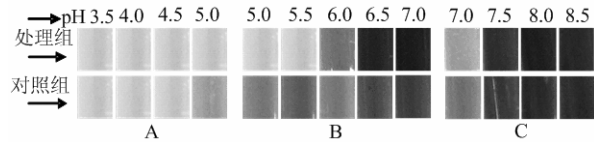
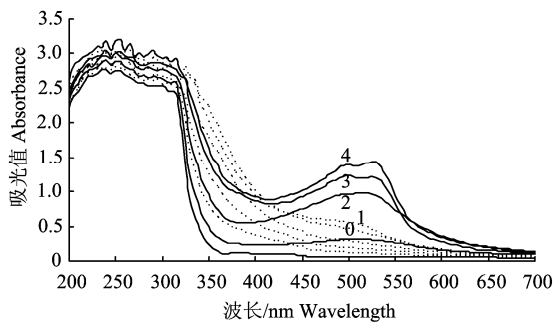


图 4 L-cys 浓度对 EGCG 红色衍生物合成的影响
Figure 4 The influence of L-cys concentration on synthesis of L-cysteine mediated EGCG red derivative



A: pH3.5-5.0 醋酸缓冲液; B: pH5.0-7.0 磷酸-柠檬酸缓冲液; C: pH7.0-8.5 Tris-HCl 缓冲液
A: pH3.5-5.0 acetic acid buffer; B: pH5.0-7.0 phosphoric acid-citric acid buffer; C: pH7.0-8.5 Tris-HCl buffer

图 5 不同 pH 对 EGCG 红色衍生物生成的影响
Figure 5 The influence of different pH values on EGCG red derivatives formation



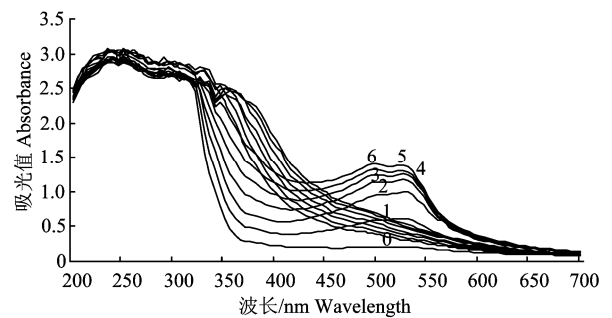
0~4 表示反应温度分别为 60、70、80、90 和 100°C
0-4 represents the reaction results at 60, 70, 80, 90 and 100°C , respectively

图 6 反应温度对 EGCG 红色衍生物生成的影响
Figure 6 The influence of reaction temperature on the EGCG red derivatives formation

2.3.2 不同缓冲液类型和最适 pH 的确定 图 5 所示

为不同 pH 对 EGCG 红色衍生物合成的影响。结果显示,当 pH 小于 6.0 时,反应液颜色很浅,表明在较强的酸性环境下,红色衍生物形成很少,见图 5-A 和 5-B;当磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 pH 大于 6.0 或 Tris-HCl 缓冲液 pH 大于 7.0 时,反应液颜色由浅及深,呈红褐色;但是随着 pH 的增加,黄色氧化产物也增加,见图 5-B 和 5-C;为了减少分离纯化过程中氧化产物的干扰,故本实验选择 pH 6.0 的磷酸缓冲液为制备红色衍生物的缓冲液。

2.3.3 最适反应温度的确定 图 6 为不同反应温度条件下,EGCG 红色衍生物的全波长扫描图谱。从图中可以看出,随着温度增加,60 和 70°C 时红色物质在 500 nm 左右的吸收值增加不大,在 80°C 下增加量最大,当在 90°C 和 100°C 时其吸收值增加不大。故本实验选择 80°C 为制备 EGCG 红色衍生物的反应温度。



0~6 表示反应时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 h

0-6 represents the results with reaction time of 0.5,1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 h respectively

图 7 反应时间对 EGCG 红色衍生物生成的影响
Figure 7 The influence of reaction time on the EGCG red derivatives formation

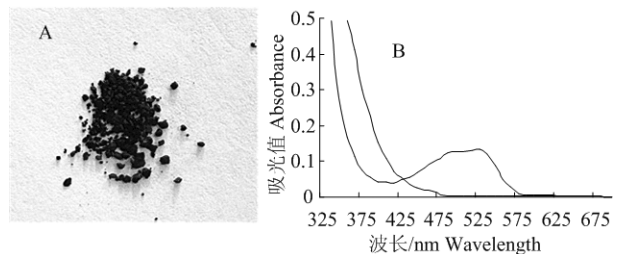


图 8 EGCG 红色衍生物的外观特性(A)及紫外光谱特性(B)
Figure 8 The appearance features (A) and ultraviolet spectral characteristics (B) of the EGCG red derivative

2.3.4 最适反应时间的确定 图 7 为不同反应时间条件下,EGCG 红色衍生物的全波长扫描图谱。从图 7 中可以看出,随着反应时间增加,该 EGCG 红色衍生物的量呈现依次上升趋势,3 h 后 EGCG 红色衍生物生成量逐渐趋于稳定。故本实验选择 3 h

为制备 EGCG 红色衍生物的反应时间。

2.4 红色衍生物的制备及浓缩富集

在优化的最适反应条件下制备的红色衍生物, 并采用 -80°C 冷冻干燥得到红色衍生物粉末, 如图 8 所示。该红色衍生物其外观特性为固体粉末状, 较为细腻; 溶解特性为: 溶于甲醇、乙醇, 含水甲醇, 溶于热水, 不溶于冷水; 紫外可见光谱特性为: 在紫外光谱区的吸收峰为 220 和 278 nm, 可见光谱区特征吸收峰为 500 nm, 该红色衍生物的光谱及色谱性质符合 2.2 的特征。浓缩富集红色衍生物, 为进一步的分离鉴定以及生物活性的相关研究提供稳定的物质基础。

3 讨论

目前关于半胱氨酸抑制儿茶素类物质的相互作用多集中在抗氧化研究方向。研究表明, L-半胱氨酸是通过直接与其酶促或非酶促反应中间产物—醌类物质结合生成无色的硫氢化合物而抑制儿茶素褐变的发生, 并不是通过对多酚氧化酶活性中心的结构修饰, 或是发生共价结合来抑制其活性而实现的^[10-12]。如 Sang 等^[11]首次在小鼠体内发现 EGCG 的硫醇结合物并进行了结构鉴定; 他推理 EGCG 可能先被过氧化物酶和过氧化氢酶氧化生成半醌自由基, 在 B 环与没食子环形成邻醌, 然后谷胱甘肽或半胱氨酸通过巯基与邻醌进行亲核加成, 形成相关的硫醇化合物, 即遵循一个经典的共轭机理。这样的硫醇结合物是无色的, 且孔维宝^[8]等的研究确定了其最大吸收波长是 295 nm。

本课题组研究也发现, 向 EGCG 溶液中添加高浓度半胱氨酸时, 其热处理后的反应液则显示无色, 达到抑制 EGCG 褐化的效果, 且 EGCG 的保留量比不加的处理组要高的多, 说明半胱氨酸表现为抑制 EGCG 的氧化、增强 EGCG 热稳定性的作用^[13]。但是半胱氨酸的抗氧化特性需要高浓度的剂量, 研究发现低浓度半胱氨酸下, EGCG 的反应液热处理后会生成红色衍生物并呈现出稳定的红色。这种 EGCG 红色衍生物的特点与之前报道的 EGCG 与半胱氨酸结合形成的无色硫醇化合物并不一致, 需要进一步研究确定。

本实验提供了一种低浓度 L-半胱氨酸介导的 EGCG 红色衍生物的制备方法, 并筛选了 EGCG 红色衍生物生成的最佳条件如下: 在反应底物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)浓度为 $0.15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,

反应介质半胱氨酸的浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液为 pH6.0, 温度为 80°C 条件下, 水浴加热 3 h。采用优化后的方法制备的红色衍生物, 其特征吸收峰处的吸收值都在 1.5 左右, 而优化前起始反应的吸收值不到 0.2。采用该法制备的红色衍生物性质稳定, 为后续实验进一步的分离纯化以及结构鉴定提供物质保证, 从而为深入的探讨其对茶叶品质、生理功能的构效关系以及为开发新型天然色素提供理论依据。

参考文献:

- [1] Ikeda I, Kobayashi M, Hamada T, et al. Heat-epimerized tea catechins rich in gallic catechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(25): 7303-7307.
- [2] 张玉艳, 沈生荣, 唐德松, 等. Cu^{2+} 与 EGCG 络合作用的研究[J]. *浙江大学学报*, 2004, 30(3): 290-295.
- [3] 王静, 戚向阳. 表没食子酸儿茶素没食子酸酯体外氧化影响因素及其氧化产物分析[J]. *精细化工*, 2006, 11: 1094-1098.
- [4] 何建波, 孟凡顺, 周园, 等. 不同 pH 值下儿茶素氧化的现场光谱电化学研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(5): 11-15.
- [5] 姚立虎. 表儿茶素没食子酸酯及表没食子儿茶素没食子酸酯单体的化学氧化研究[J]. *食品与发酵工业*, 1997, 23(5): 21-25.
- [6] 李春美, 窦宏亮, 陈美红, 等. 儿茶素氧化产物的分离鉴定及其抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 141-145.
- [7] 刘玉婷, 吴宏伟, 吕博, 等. 半胱氨酸在食品中的应用研究[J]. *中国调味品*, 2009, 12(34): 33-35.
- [8] 孔维宝, 陆健, 赵海锋, 等. L-半胱氨酸抑制多酚氧化酶的机制研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 66-70.
- [9] Robert C, Richard-Forget F, Rouch C, et al. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1996, 28(4): 457-463.
- [10] Richard-Forget F C, Rouet-Mayer M A, Goupy P M, et al. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(11): 2114-2122.
- [11] Sang S, Lambert J D, Hong J, et al. Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, 18(11): 1762-1769.
- [12] Robert C, Cadet F. The inhibition of studies on polyphenoloxidase by cysteine[J]. *Biochem Educa*, 1996, 24: 157-159.
- [13] 吴平, 夏涛, 高丽萍, 等. 热处理过程中表没食子儿茶素没食子酸酯变化的动力学研究[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(11): 34-39.