

УДК 54.03 + 547.978.4

Устойчивость катехинов зеленого чая в твердой фазе и водном растворе

И. О. ЛОМОВСКИЙ^{1,2}

¹Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН,
ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

E-mail: Lomovsky@solid.nsc.ru

²НОЦ “Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии”,
Новосибирский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

(Поступила 01.06.11; после доработки 22.06.11)

Аннотация

Изучена стабильность катехинов зеленого чая в твердой фазе и в водных растворах при хранении; определены скорости их деградации в зависимости от внешних условий. Изучена стабильность катехинов при механической активации, показана возможность получения механокомпозиата, состоящего из растительного сырья и аскорбиновой кислоты и обладающего повышенной стабильностью.

Ключевые слова: катехины зеленого чая, устойчивость, механохимическая активация, механокомпозиат

ВВЕДЕНИЕ

Неблагоприятные внешние факторы, такие как нездоровая экологическая обстановка, радиоактивное и УФ-облучение, курение и алкоголизм, приводят к повышению уровня свободных радикалов в организме человека. Установлена связь между повышенным уровнем свободных радикалов в организме и развитием многих болезней. Для профилактики заболеваний предлагается вводить в рацион (пищу, напитки, пищевые добавки) антиоксиданты. Наиболее безопасным считается использование веществ-антиоксидантов природного происхождения, которые преимущественно представлены полифенольными соединениями [1].

Среди напитков по употреблению, безусловно, лидирует чай. В чайном листе содержится 6–16 мас. % соединений полифенольного ряда (катехинов), среди которых преобладают эпикатехин, эпигаллокатехин (EGC), эпикатехин галлат (ECG) и эпигаллокатехин

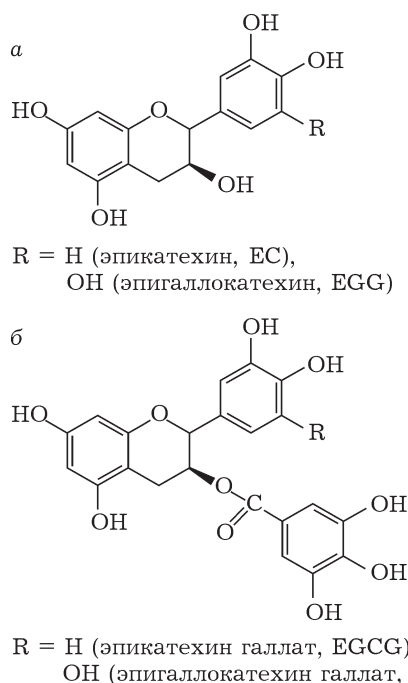


Рис. 1. Структурные формулы: а – эпикатехина и эпигаллокатехина, б – эпикатехина галлата и эпигаллокатехина галлата.

галлат (EGCG). Структурные формулы приведены на рис. 1. По-видимому, катехины можно считать одним из наиболее крупнотоннажных природных антиоксидантных ресурсов.

Катехины – высокореакционные соединения, наиболее активно вступают в реакции окисления и эпимеризации [2]. В этой связи при создании продуктов с повышенным содержанием катехинов особое внимание необходимо уделять окислительным процессам и процессам деградации, которые могут происходить в сырье во время его хранения и обработки.

Получение антиоксидантов из растений в основном базируется на многократной экстракции растворителями с различной полярностью. По химической природе антиоксидантные вещества являются восстановителями и сравнительно легко взаимодействуют с кислородом и другими окислителями. Техническим следствием реакций окисления в ходе экстракции водой и другими жидкими фазами становятся снижение выхода этих веществ и сложности в получении форм, устойчивых при хранении.

В последние годы механохимические методы получили широкое распространение в переработке пищевых видов сырья – продуктов растениеводства и животноводства, промышленно выращиваемых микроорганизмов, дикорастущих растений. Исследуются реакции основных составляющих компонентов растительного сырья: полисахаридных (целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина), полифенольных компонентов (лигнинов и гуминовых веществ), растительных белков и липидов. Механохимические методы стали применяться в переработке растительного и другого биогенного сырья с целью получения биологически активных веществ – алкалоидов, органических кислот [3] и гликозидов [4], т. е. компонентов, содержание которых в растительном сырье гораздо меньше содержания основных компонентов (обычно на уровне нескольких процентов).

Многие лабильные биологически активные вещества, в том числе галлокатехины зеленого чая, более устойчивы в твердой фазе, нежели в жидкой. Однако сравнительная устойчивость галлокатехинов в жидкой и твердой фазах практически не изучалась, хотя твердофазные методы оказались перспективными в препаративной химии ряда органических веществ [5, 6].

Показано, что выделение и хранение многих неустойчивых антиоксидантов более эффективно в присутствии второго, более устойчивого антиоксиданта – аскорбиновой кислоты [7].

Цель работы – исследование механической активации процесса экстракции катехинов из растительного сырья и влияния добавки антиоксиданта (аскорбиновой кислоты) на данный процесс, как в водном растворе, так и в твердой фазе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

В качестве исходного сырья использовался чай зеленый байховый ТУ 9191-003-00570186-04 (ООО “ДагомысЧай”, Россия), кислота аскорбиновая квалификации “ч. д. а.”, катехол >99 % (компания Alfa Aesar).

Механическая активация

Навеску зеленого чая обрабатывали в мельнице-активаторе центробежного типа АГО-2 (фирма “Новиц”, Новосибирск) при ускорении мелющих тел 200, 400 и 600 м/с². Время обработки составляло 1–2 мин.

Получение водных экстрактов

Навеску растительного сырья экстрагировали водой при соотношении твердой и жидкой фаз 1 : 1000 (по массе) в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт отфильтровывался на фильтре 0.45 мкм и использовался для последующих анализов.

Хранение на воздухе

Полученный экстракт находился при постоянном перемешивании в стакане при доступе воздуха и света. В определенное время отбиралась проба для анализа.

Хранение без доступа воздуха

Полученный экстракт хранился в герметичной колбе без доступа воздуха на свету.

В определенное время отбиралась проба для анализа.

Хранение в твердой фазе

Образец хранился в вакуумном пакете при доступе света. В определенное время отбиралась проба и проводилась ее водная экстракция.

ВЭЖХ-анализ

Анализ проводился с использованием прибора “Миллихром А-02” (фирма “Эконова”, Новосибирск). В качестве сорбента использовался ProntoSil 120-5-C18. Элюция проводилась в градиентном режиме, элюент А – бидистиллированная вода, Б – ацетонитрил. Детекция осуществлялась фотометрически на длине волны 290 нм.

Обработка данных

Каждый эксперимент проводился в пяти повторностях. Из полученных кинетических данных для каждой точки рассчитывалась константа реакции деградации в приближении псевдопервого порядка по уравнению $k = \ln([C_0]/[C])/t$, где C – концентрация вещества в момент времени t ; C_0 – начальная концент-

рация, рассчитанная методом наименьших квадратов. Доверительный интервал рассчитывался для доверительной вероятности 0.9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика деградации катехинов в растворе

Процесс деградации катехинов в водном растворе исследовался ранее (например, [7]). Содержание основных и минорных компонентов в экстракте может варьироваться в зависимости от исходного сырья. В исследованных нами образцах содержится 150 мкг суммы катехинов на 1 мл в водном экстракте, в том числе EGС – 60 мг/мл, EGCG – 70 мг/мл, ЕСG – 10 мг/мл. Изучена кинетика деградации катехинов в зависимости от доступа воздуха к раствору (рис. 2, а). При отсутствии доступа воздуха деградация замедляется (см. рис. 2, б), но полностью не прекращается, что свидетельствует о наличии в экстракте других соединений-окислителей.

В водном растворе при доступе воздуха, 20 °С и нейтральном рН суммарная концентрация катехинов уменьшается в 7–9 раз в течение 6 ч за счет деградации основных активных компонентов – EGCG и EGС. Вве-

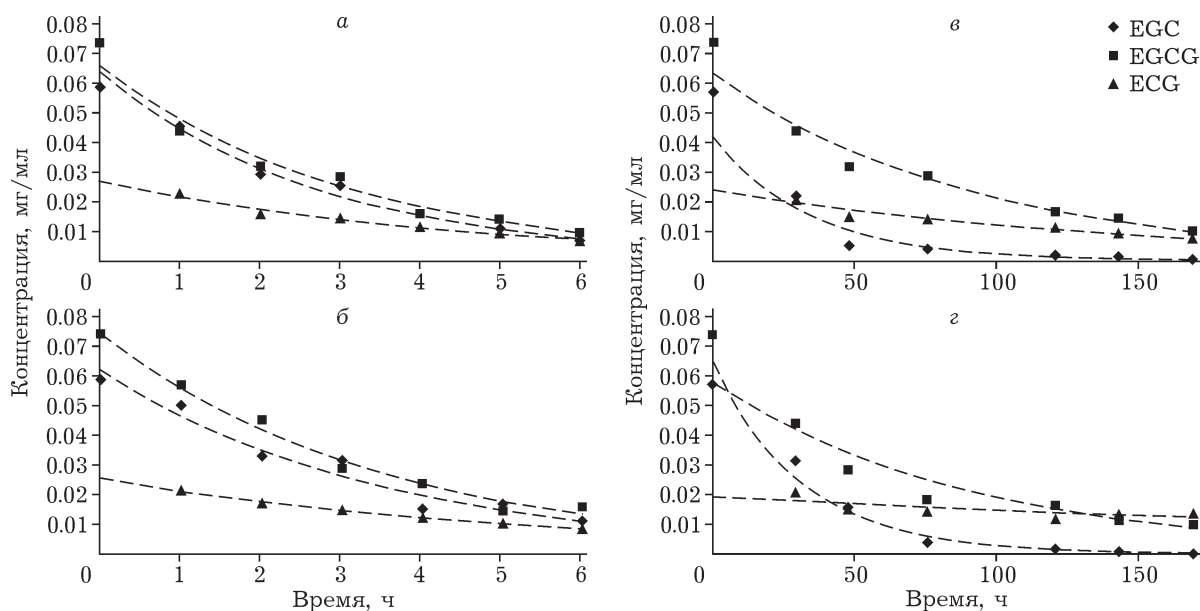


Рис. 2. Кинетические кривые деградации катехинов в водном экстракте: а – при доступе воздуха, б – то же в присутствии аскорбиновой кислоты (1 мг/мл), в – без доступа воздуха, г – то же в присутствии аскорбиновой кислоты (1 мг/мл).

дение стабилизаторов, например аскорбиновой кислоты, приводит к небольшому снижению скорости деградации катехинов (см. рис. 2, б). Полученные данные соответствуют литературным.

Таким образом, в данном случае минорные компоненты слабо влияют на процесс деградации на воздухе, который может включать в себя широкий ряд реакций. Считается, что основным процессом является генерация соответствующих радикалов при взаимодействии катехинов с кислородом воздуха [8] и дальнейшая полимеризация катехинов. В этой связи нами проведены эксперименты по хранению водных экстрактов без доступа воздуха.

Деградация катехинов в водном растворе без доступа кислорода воздуха также имеет место (см. рис. 2, в). В первую очередь реагируют наиболее активные компоненты (EGCG и EGC). Продолжительность 90 % превращения увеличивается с 6 до 96 ч для EGC и до 260 ч для EGCG, остальные компоненты деградируют в течение 96 ч не более чем на 35 %. Добавление аскорбиновой кислоты снижает скорость реакции (см. рис. 2, г). Степень превращения 90 % EGCG достигается за 530 ч, а EGC – за 340 ч, остальные компоненты за 340 ч деградируют не более чем на 40 %.

Таким образом, показано, что деградация катехинов в экстрактах зеленого чая происходит и без доступа воздуха. В данном случае деградация может происходить за счет эпимеризации, окисления и полимеризации с другими компонентами экстракта, например фенольными кислотами [9, 10]. Об изменении механизма окисления также свидетельствует изменение отношения констант скоростей. Без доступа воздуха наиболее быстро деградирует EGC, в то время как при доступе воздуха наиболее активным компонентом был EGCG. В данном случае значимого изменения скорости деградации компонентов при добавлении аскорбиновой кислоты не происходит. По-видимому, процесс протекает не по свободнорадикальному механизму. В работе [11] показано, что во многих бутилированных чаях содержание катехинов в десятки раз меньше, чем в свежих экстрактах, и этот факт, скорее всего, объясняется именно процессами деградации без доступа воздуха.

Кинетика деградации катехинов в твердой фазе

Стабильность катехинов в твердой фазе в составе экстракта зависит от влажности окружающей среды и добавок в смеси [12]. Деградация ускоряется при влажности атмосферы более 40 % при 22 °С. При такой влажности окружающей среды содержание воды в исходном твердом экстракте превышает 10 %. Видимо, это значение соответствует образованию фазы воды, в которой протекают процессы быстрой деградации. Однако из-за малого объема воды они протекают значительно медленнее, чем деградация в растворах. Причем в этом случае аскорбиновая кислота играет роль прооксиданта и ускоряет процесс деградации катехинов.

Исследован процесс деградации катехинов в исходном растительном сырье. Ввиду отсутствия в сырье фазы воды выбранное значение влажности окружающей среды составило 20 %. Влажность исходного сырья составляла 6.7 %. Показано, что в твердой фазе процессы деградации катехинов происходят очень медленно (рис. 3, а). При этом скорость деградации механической смеси растительного сырья с аскорбиновой кислотой не отличается

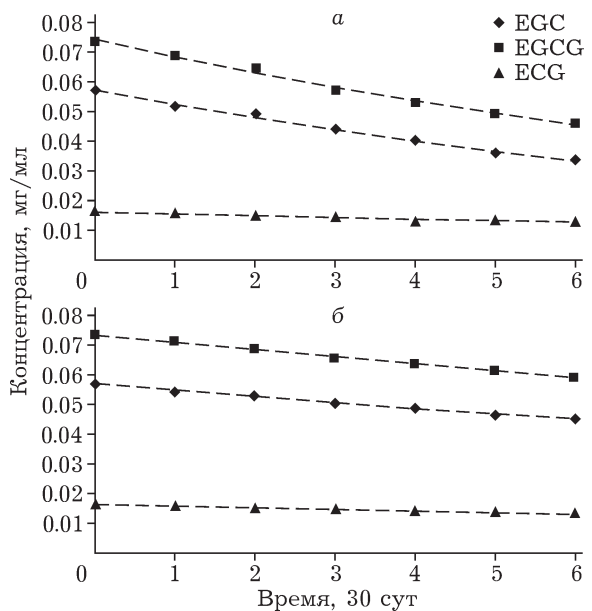


Рис. 3. Кинетические кривые деградации катехинов в твердой фазе в составе растительного сырья (а) и в составе механокомпозиата с 10 мас. % аскорбиновой кислоты (б).

ТАБЛИЦА 1

Константы скорости деградации катехинов в твердой и жидкой фазах в приближении реакции псевдопервого порядка, с⁻¹

| Условия проведения опытов | ECG | EGCG | ECG |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| В водном экстракте при доступе воздуха | $(8.7 \pm 0.7) \cdot 10^{-5}$ | $(10 \pm 1.5) \cdot 10^{-5}$ | $(8.0 \pm 0.9) \cdot 10^{-5}$ |
| В растворе аскорбиновой кислоты (0.1 мг/мл) при доступе воздуха | $(7 \pm 1) \cdot 10^{-5}$ | $(7.7 \pm 0.6) \cdot 10^{-5}$ | $(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ |
| В водном экстракте без доступа воздуха | $(9.7 \pm 1.5) \cdot 10^{-6}$ | $(3.9 \pm 0.5) \cdot 10^{-6}$ | $(2.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$ |
| В растворе аскорбиновой кислоты (0.1 мг/мл) без доступа воздуха | $(8 \pm 1) \cdot 10^{-6}$ | $(4.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-6}$ | $(1.7 \pm 0.6) \cdot 10^{-6}$ |
| В твердой фазе в составе растительного сырья | $(3.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ | $(3.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ | $(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ |
| В твердой фазе, механическая смесь растительного сырья с аскорбиновой кислотой (10 мас. %) | $(3.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ | $(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ | $(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ |
| В твердой фазе, механическая активация с аскорбиновой кислотой (10 мас. %) | $(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ | $(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ | $(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ |

ся от скорости деградации в исходном сырье. Это объясняется тем, что процессы деградации носят локальный характер, а так как диффузия в твердой фазе крайне затруднена, добавка твердой аскорбиновой кислоты не влияет на процесс.

Изучена деградация катехинов в механически активированной смеси зеленого чая и аскорбиновой кислоты (см. рис. 3, б). Во время механической активации скорость деградации возрастает, но добавка аскорбиновой кислоты замедляет скорость деградации при хранении. При механической активации образуется так называемый механокомпозит [13], в котором количество контактов между частицами зеленого чая и аскорбиновой кислоты велико; частицы аскорбиновой кислоты в механокомпозите покрывают частицы чая и тем самым предотвращают окисление катехинов.

Сравнительный анализ кинетических данных

Процесс деградации катехинов является многостадийным и включает как минимум несколько параллельно протекающих реакций и диффузионные процессы, однако кинетические кривые хорошо описываются уравнением псевдопервого порядка. Соответствующие константы скорости приведены в табл. 1.

Видно, что деградация катехинов в твердой фазе в исследуемых образцах порошковых препаратов происходит в 1000 раз медленнее, чем в растворах – экстрактах из этих образцов.

В растворе аскорбиновая кислота замедляет процесс деградации, но незначительно.

В твердой фазе механическая смесь аскорбиновой кислоты и зеленого чая по устойчи-

вости не отличается от исходного зеленого чая. Для замедления деградации в твердой фазе необходимо, чтобы аскорбиновая кислота образовала механокомпозит с зеленым чаем. В таком случае скорость деградации EGCG и EGC снижается вдвое.

ВЫВОДЫ

1. Применение твердофазных механохимических процессов позволяет снизить потери катехинов в ходе технологических операций получения антиоксидантных препаратов зеленого чая.

2. Антиоксиданты зеленого чая в твердой фазе (в составе сырья, в механокомпозитах, полученных совместной обработкой с аскорбиновой кислотой) примерно в 1000 раз более устойчивы по сравнению с антиоксидантами в составе растворов.

3. Получение устойчивого механокомпозита обеспечивается механической обработкой смеси зеленого чая и аскорбиновой кислоты при ускорении воздействующих тел 20g в течение 2 мин.

Работа выполнена при финансовой поддержке CRDF (ROX0-008-ТЩ-06) и Минобрнауки РФ (РНП.2.2.2.2/340). Автор выражает искреннюю благодарность научным наставникам — проф. О. И. Ломовскому и доценту А. А. Политову.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Минина С. А., Каухова И. Е. // Химия и технология фитопрепаратов. М: ГЭОТАР-Медиа. 2009. 560 с.
- 2 Vuong Q. V., Golding J. B., Nguyen M., Roach P. D. // J. Sep. Sci. 2010. Vol. 33. P. 3415–3428.
- 3 Korolev K. G., Lomovsky O. I., Rozhanskaya O. A., Vasiliev V. G. // Chem. Nat. Comp. 2003. Vol. 39, No. 4. P. 366–372.

- 4 Ломовский О. И., Болдырев В. В. Механохимия в решении экологических проблем. Новосибирск: Изд-во ГПНТБ СО РАН, 2006. 221 с.
- 5 Boldyrev V. V. // *J. Mater. Sci.* 2004. Vol. 39. P. 5117–5120.
- 6 Tanaka K., Toda F. // *Chem. Rev.* 2000. Vol. 100, No. 3. P. 1025–1074.
- 7 Chen Z., Zhu Q., Wong Y., Zhang Z. and Chung Y. // *J. Agric. Food Chem.* 1998. No. 46. P. 2512–2516.
- 8 Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y. // *Free Radical Biol. Med.* 1996. No. 21. P. 895–902.
- 9 Wang R., Zhou W., Jiang X. 2008. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. No. 56. P. 2694–701.
- 10 Tanaka T., Mine C., Watarumi S., Fujioka T., Mihashi K., Zhang Y.-J., Kouno I. // *J. Nat. Prod.* 2002. Vol. 65. P. 1582–1587.
- 11 Chen Z., Zhu Q., Tsang D., Huang Y. // *J. Agric. Food Chem.* 2001. № 49. P. 477–482.
- 12 Ortiz J., Ferruzzi M. G., Taylor L. S., Mauer L. J. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. No. 56. P. 4068–4077.
- 13 Анчаров А. И., Аульченко В. М., Барина А. П. и др. Механокомпозиты – прекурсоры для создания материалов с новыми свойствами / Отв. ред. О. И. Ломовский. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 424 с.