

普洱茶茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合稳定常数的研究

周花香¹, 何 静¹, 崔佳丽¹, 龚加顺², 周红杰³, 李宝才^{1,*}

(1.昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500;

2.云南农业大学食品科技学院, 云南昆明 650201;

3.云南农业大学龙润普洱茶学院, 云南昆明 650201)

摘 要:利用离子交换平衡法研究了茶褐素与金属离子的络合作用,探讨了 pH 和温度对络合稳定常数的影响。结果表明,茶褐素与 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的络合稳定常数受 pH 影响,在 pH=7.0 时均最高;而升高温度不利于络合反应的进行;茶褐素与金属离子发生络合后其酸基含量减少,说明茶褐素中起主要络合作用的羧基和酚羟基等主要酸性基团与金属发生了络合作用。茶褐素与金属的络合作用为进一步研究茶褐素对人体的作用及其保健品的开发提供理论依据。

关键词:茶褐素,金属络合,稳定常数

Study on the stability constants of complication of theabrownine from Pu-er tea with Ca^{2+} and Zn^{2+}

ZHOU Hua-xiang¹, HE Jing¹, CUI Jia-li¹, GONG Jia-shun², ZHOU Hong-jie³, LI Bao-cai^{1,*}

(1.Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2.Faculty of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3.College of Long Run Pu-er Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The cation-exchange equilibrium method was used to research the complexation of theabrownine with metal ions, and probes into the pH and temperature impact on complex stability constant. The results showed that the pH influence the stability constants of theabrownine with Ca^{2+} and Zn^{2+} , and the stability constants was the highest when the pH was 7.0. While elevated temperature was adverse to the conduct of complex reaction. The acid-base content was reduced by the complex reaction, it was indicating that carboxyl and phenolic hydroxyl groups on theabrominen played a major role in the complexation to react with metal ions. The complexation of theabrownine with metal ions provided theoretical basis for further research of the human body and the development of health care products.

Key words: theabrownine; metal complex; steady constant

中图分类号: TS272.5⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)10-0189-04

茶褐素是普洱茶中最主要的色素成分,是一类能溶于水而不溶于乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂的褐色色素,也是一类十分复杂的化合物^[1]。它使普洱茶具有汤色红浓明亮、陈香显著、滋味浓醇回甘等特点^[2-3]。普洱茶具有降血糖、降血脂、抗突变、防癌等功能^[4],其中具有药理作用的主要成分是茶多酚、茶色素、茶多糖等。黄河宁等^[5]报道了茶多酚锰或锆的金属络合物可以诱导肿瘤细胞凋亡,而酚羟基是茶多酚与金属离子、蛋白质配位反应或亲和作用的结构基础,其亲和力强弱与酚羟基的

位点和数目有关。因此,我们推测普洱茶的品质和药理活性与茶褐素的化学结构,特别是官能团的种类和数量有密切关系。已有研究表明茶褐素的官能团主要为酚羟基和羧基等酸性基团,曾有人提出饮用普洱茶会导致骨骼中钙流失,也有研究报道指出饮用普洱茶不会导致骨钙的流失^[6]。关于普洱茶的功能研究已有不少,但茶褐素的功能尚不明确,而国内外关于茶褐素与金属络合的研究甚少。据此本研究根据茶褐素这类混合物的结构特性探讨其与钙离子和锌离子这两种金属的络合作用,为进一步研究茶褐素对人体的作用及其保健品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

普洱茶 普洱市宁洱县特种茶厂 2006 年生产

收稿日期: 2011-07-28 * 通讯联系人

作者简介: 周花香(1987-),女,硕士,研究方向:天然药物化学和食品保健。

基金项目: 国家自然科学基金(30760152, 21166013)。

表1 茶褐素的理化性质

Table 1 Physical properties of theabrowine

总酸性基 (mmol/g)	羧基 (mmol/g)	酚羟基 (mmol/g)	灰分(%)	水分(%)	蛋白质含量 (%)	茶多糖含量 (%)	茶多酚含量 (%)
10.2678	2.2329	7.8849	15.36	11.88	27.52	8.36	34.44

的普洱熟沱;所用药品和试剂均为分析纯;实验室用水 蒸馏水和去离子水。

pHS-29A 型 pH 计 上海精密科学仪器有限公司;UV-2550PC 型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;722E 型可见分光光度计、85-2 型恒温磁力搅拌器 金坛市富华仪器有限公司;SB-2000 型电热恒温水浴锅、旋转蒸发仪 北京莱伯泰科仪器有限公司;BP-6033型真空干燥箱 上海一恒科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶褐素的制备 普洱茶样用两倍体积的无水乙醇浸提 2 次,每次 24h,过滤后茶渣用 83℃ 热水浸提 3 次,收集茶汤。50℃ 下减压浓缩至原体积的 1/10,滤液依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取(至有机相无色),水相用 2 倍体积乙醇沉淀 12h,过滤后在 40℃ 的真空箱中干燥。干燥后样品冷冻保存。

1.2.2 茶褐素部分功能基和基本性质测定 总酸性基采用氢氧化钡法^[7];羧基采用醋酸钙法测定^[7];酚羟基测定采用差减法^[8];酚羟基含量为总酸性基与羧基含量之差;灰分的测定采用《食品中灰分的测定》(GB5009.4-2010),预灰化后在 820℃ 条件下灼烧至恒重;茶多糖含量采用蒽酮—硫酸法^[9]测定;茶多酚含量采用国家标准法(GB8313-87)酒石酸铁法测定;蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定。

1.2.3 茶褐素与金属离子络合稳定常数的测定^[7] 络合稳定常数的测定采用离子交换平衡法,该方法可以同时获得络合稳定常数与配位数的数值,可以应用于较广范围的温度、pH,浓度极低的金属离子溶液。阳离子交换平衡法主要根据平衡时,一定量阳离子树脂(R)吸附的某种金属离子的数量(MR)在 1 个相当大的浓度范围内与溶液中金属离子浓度(M)成正比。体系中无络合剂或有络合剂时金属离子的分配系数分别为 λ_0 和 λ :

$$\lambda_0 = [\text{MR}]/[\text{M}], \lambda = [\text{MR}]/[\text{M}] + [\text{MAx}]$$

式中,[MR]为平衡时单位重量阳离子交换树脂所吸附的金属离子的摩尔数;[M]为平衡时溶液中游离的金属离子浓度(mol/L);[M] + [MAx]为络合剂平衡时溶液中金属离子总的摩尔浓度(mol/L)。

设茶褐素与金属离子络合平衡反应表述为: $\text{M} + x\text{A} \rightleftharpoons \text{MAx}$ 式中 M 为金属离子;A 为络合剂;x 为络合物的配位数。取对数求络合稳定常数: $\log(\lambda_0/\lambda - 1) = \log K + x \log [A]$,在一定条件下,改变茶褐素的浓度($A_1, A_2, A_3 \dots$),即可得相应的 λ 值($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \dots$),以 $\log(\lambda_0/\lambda - 1)$ 为纵坐标, $\log [A]$ 为横坐标作图,就从截距求得络合稳定常数 $\log K$,从斜率求出配位数 x。

分别吸取已知浓度($36.436 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的茶褐素溶液 0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0mL 分别于 100mL

烧杯中,加水至 25mL 左右,加入 5mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液,各加入一定浓度的 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子储备液,然后将此溶液转移至带刻度的 100mL 离心管中,加去离子水至 47mL,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 分别调节 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,补去离子水至总体积为 50mL,然后在每只离心管中加入 1.0g Na 型阳离子交换树脂,避光恒温振荡 1h,考虑茶褐素-金属离子反应体系的非平衡体系特征,使反应达稳态后过滤,用化学分析法测定平衡时溶液中游离金属离子的含量。

1.2.4 热力学参数的计算 根据不同条件下的络合表观稳定常数,结合热力学公式,求出络合反应的热力学标准自由能变 ΔG_m^θ ,焓变 ΔH_m^θ ,熵变 ΔS_m^θ 。

$$\Delta G_m^\theta = -2.303RT \log K$$

$$\Delta H_m^\theta = 2.303RT_1T_2/(T_1 - T_2) \log(K_1/K_2)$$

$$\Delta G_m^\theta = \Delta H_m^\theta - T\Delta S_m^\theta$$

1.2.5 茶褐素特征官能团含量的测定 茶褐素官能团的定量分析方法——BaCl₂ 法和 Ca(CH₃COO)₂ 法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 茶褐素的理化性质

2.2 普洱茶茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 的络合稳定常数

本文以茶褐素在 25℃、pH = 4.0 时与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 的络合过程为例说明络合稳定常数的测定和计算过程,实验数据列于表 2。将表 2 中数据拟合方程 $\log(\lambda_0/\lambda - 1) = \log K + x \log [A]$,其中, $\lambda_0 = [\text{MR}]/[\text{M}]$,为无络合剂时金属离子的分配系数; $\lambda = [\text{MR}]/[\text{M}] + [\text{MAx}]$,为有络合剂时金属离子的分配系数;方程的截距即为络合稳定常数。通过上述方程得到茶褐素与 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的络合稳定常数列于表 2。

根据表 2 中的实验数据用拟合方程 $\log(\lambda_0/\lambda - 1) = \log K + x \log [A]$ 处理得到稳定常数,结果见图 1 和图 2。

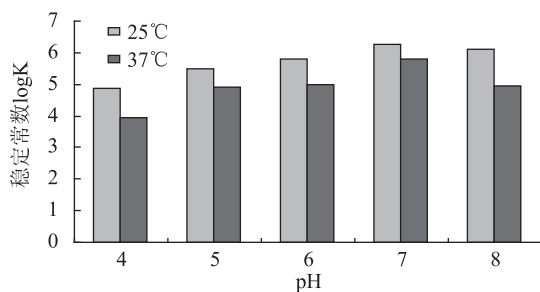


图1 25℃、37℃不同 pH 条件下茶褐素与 Ca^{2+} 的络合稳定常数 $\log K$ 值

Fig.1 Stability constant coefficient ($\log K$) of Ca^{2+} with theabrowine in different pH

由图 1、图 2 可以看出,pH 对茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 的络合表观稳定常数均有一定的影响,这可能是

表2 茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 的络合常数测定 (pH = 4.0)
Table 2 Measurement of stability constant of Ca^{2+} and Zn^{2+} with theabrowine (pH = 4.0)

加入制备液 体积 (mL)	络合剂浓度 [A] ($\times 10^{-5}$ mol/L)	$\log[A]$	金属离子 (Ca^{2+}) 初始浓度 [Mf] ($\times 10^{-5}$ mol/L)	平衡后溶液中金属离子浓度 [Mf] ($\times 10^{-5}$ mol/L)
0			15.37	1.36
1	3.65	-4.4377	15.37	2.72
2	7.30	-4.1367	15.37	4.08
4	14.60	-3.8356	15.37	6.12
8	29.20	-3.5346	15.37	8.84
16	58.40	-3.2336	15.37	10.88

加入制备液 体积 (mL)	络合剂浓度 [A] ($\times 10^{-5}$ mol/L)	$\log[A]$	金属离子 (Zn^{2+}) 初始浓度 [Mf] ($\times 10^{-5}$ mol/L)	平衡后溶液中金属离子浓度 [Mf] ($\times 10^{-5}$ mol/L)
0			13.91	1.70
1	3.65	-4.4377	13.91	3.41
2	7.30	-4.1367	13.91	5.68
4	14.60	-3.8356	13.91	7.39
8	29.20	-3.5346	13.91	8.52
16	58.40	-3.2336	13.91	10.23

注:茶褐素制备液浓度为 $3.5486\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,表2中数据为三次处理的平均值。

表3 不同温度下茶褐素与 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 络合稳定常数及热力学参数 (pH = 7.0)
Table 3 Stability constant coefficient of Zn^{2+} and Ca^{2+} with theabrowine and its thermodynamic function at different temperatures (pH = 7.0)

络合物	温度 (K)	稳定常数 (logK)	ΔG_m^θ	ΔH_m^θ	ΔS_m^θ
TB-Zn	298	6.95	-39.655	-240.263	-0.673
	310	5.32	-31.577	-240.263	-0.673
TB-Ca	298	6.28	-35.832	-72.226	-0.457
	310	5.79	-34.367	-72.226	-0.457

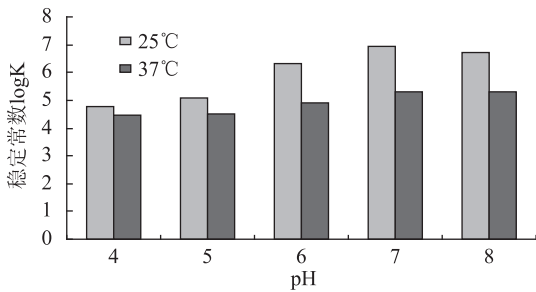


图2 25℃、37℃不同条件下茶褐素与 Zn^{2+} 的络合稳定常数 logK 值
Fig.2 Stability constant coefficient (logK) of Zn^{2+} with theabrowine in different pH

由于不同 pH 能够影响茶褐素的羧基和酚羟基中 H^+ 的解离程度,一般来说,pH 愈高则 H^+ 的解离程度愈大^[10],在低 pH 时,茶褐素的酸效应较明显,降低了茶褐素的配位能力,减小了络合反应向右进行的程度,从而使表观稳定常数较小。因此,pH 越高越有利于茶褐素与金属离子形成稳定的络合物。然而,随着 pH 的升高,平衡体系中 OH^- 的浓度随之增加, OH^- 与茶褐素竞争金属离子的能力增强,使金属离子与茶褐素的络合能力下降,导致络合物稳定性降低,综合分析得出最佳的络合 pH 是 7.0。

2.3 温度对茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合稳定性的影响及热力学参数的影响

在离子强度一定、pH 为 7.0 的条件下,改变温度为 298、310K,然后对其稳定常数和热力学常数进行

研究,测定结果见表 3。

由表 3 可以看出,温度升高,稳定常数 logK 值减小,即温度升高不利于络合反应的进行,说明茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合反应为放热反应,这与热力学特征函数标准焓变 $\Delta H_m^\theta < 0$ 也相符。

2.4 普洱茶茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合前后特征官能团的测定

根据茶褐素官能团的定量分析方法分析处理茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合前后其主要光能团的变化,实验数据如表 4 所示(以 Zn^{2+} 为例)。

从表 4 可以看出,茶褐素与金属离子发生络合后,总酸性基浓度减少,尤其是酚羟基的浓度减少的很快,但是羧基却呈增加的趋势,说明茶褐素与金属离子能够发生络合作用的主要因素的是酚羟基。在这过程中,一部分酚羟基发生了络合作用,还有一部分酚羟基在络合的过程中氧化成了羧基。

3 结论

3.1 pH 影响茶褐素的解离程度,在实验范围内随着 pH 的升高,茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合反应稳定常数增大,利于络合反应的进行。

3.2 茶褐素与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 络合反应是自发进行的放热反应,升高温度不利于络合作用。但是在体内温度 310K 时其稳定常数趋于平衡,它随 pH 变化的影响小,这为进一步研究茶褐素对人体的作用提供了理论依据。

(下转第 201 页)

寻求变异度较高的基因作为研究对象加以分析。

RAPD 技术由于具有操作简单、分析速度快、成本较低、安全等优点,得到了广泛应用。陈剑^[10]等利用 RAPD 技术鉴定了草菇杂交后代;傅俊生^[11]等利用 RAPD 标记和 SRAP 标记对草菇杂交菌株 2628 做了鉴定和品比实验;余志晟^[12]等利用 RAPD 对草菇栽培菌株 DNA 多态性进行了分析。本研究利用 RAPD 对草菇单孢子和亲本进行分析,不同引物的扩增效果有差异,20 条随机引物进行扩增,只有 S47、S48 及 S32 出现了多态性条带;S47 出现条带相对较少,引物 S48 和 S32 形成的 RAPD 条带较为清楚,效果较好,但总体数据略显不足。聚类分析的结果提示我们,RAPD 技术可以应用于探索草菇有性生殖过程中的遗传分离规律。

对草菇性模式的探讨已有多年的历史,现在学术界基本倾向于草菇是一种初级同宗结合菌,但是草菇的有性遗传现象的表现不一致,存在不确定性。同宗结合是一个复杂的遗传过程,是部分细胞核发生变异后才发生遗传重组,还是同质细胞核间发生重组,这种重组是如何发生的等问题仍然没有得到合理解释,因此,基于染色体行为的研究必须应用大量的分子标记、DNA 序列分析等新的方法才能打开新的局面。

参考文献

[1] Chang S T, Chu S S. Nuclear behaviour in the basidium of *Vovariella volvacea* [J]. *Cytofogia*, 1969, 34: 293-299.

[2] Chang S T, Ling K Y. Nuclear behaviour in the Basidiomycete, *Vovariella volvacea* [J]. *American Journal of*

Botany, 1970, 57: 165-171.

[3] Li, Shuxian, CHANG Shu Ting. Selection and characterization of crystal - violet and malachite - green - resistant mutants in *Vovariella volvacea* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1991(7): 541-550.

[4] Chang S T, Yau C K. *Vovariella volvacea* and its life history [J]. *American Journal of Botany*, 1971, 58: 552-561.

[5] Raper C A. Sexuality and breeding [M]. New York and London: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms, 1978: 83-117.

[6] Xu Xuefeng, Li Anzheng, Cheng Shuiming, et al. Reappraisal of phylogentic status and genetic diversity analysis of Asian population of *Lentinula edodes* [J]. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(3): 274-280.

[7] 王德信. 天麻 ITS 序列分析及变异类型鉴定[J]. *生物技术*, 2010, 20(6): 33-35.

[8] 徐学锋, 李安政, 程水明, 等. 亚洲香菇 *Lentinula edodes* 系统发育学地位的重新评估与遗传多样性分析[J]. *自然科学进展*, 2005, 15(10): 22-29.

[9] 徐学锋, 林范学, 程水明, 等. 中国香菇自然种质的 rDNA 遗传多样性分析[J]. *菌物学报*, 2005, 24(1): 29-35.

[10] 陈剑, 林原, 谢宝贵, 等. 利用 RAPD 技术鉴定草菇杂交后代[J]. *食药菌*, 2011, 19(2): 21-23.

[11] 傅俊生, 朱坚, 谢宝贵, 等. 草菇杂交菌株 2628 的鉴定与品比实验[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(14): 48-53.

[12] 余志晟, 吕作舟, 陈明杰, 等. 草菇栽培菌株 DNA 多态性的 PCR-RFLP 和 RAPD 分析[J]. *农业生物技术科学*, 2005, 21(6): 58-62.

(上接第 191 页)

表 4 茶褐素与锌离子络合官能团的变化
Table 4 The functional groups varied in Zn²⁺ complexed with theabrowine

茶褐素质量 (g)	锌离子浓度 (×10 ⁻³ mol/L)	总酸性基浓度 (×10 ⁻³ mol/L)	羧基浓度 (×10 ⁻³ mol/L)	酚羟基浓度 (×10 ⁻³ mol/L)
0.0575		5.9039	1.3702	4.5337
0.0574	0.0127	5.4775	1.8439	3.6336
0.0575	0.0301	4.6505	2.1583	2.4922
0.0574	0.0575	4.0398	2.9265	1.1133
0.0576	0.0895	3.9124	3.7821	0.1303

参考文献

[1] 李连喜. 不同制法普洱茶茶褐素及其在贮存中变化的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2005.

[2] 张俊, 陈文品, 白文祥. 普洱茶发展历史三阶段[J]. *中国茶叶*, 2004(1): 35-37.

[3] 罗龙新, 吴小崇, 邓余良, 等. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. *茶叶科学*, 1998, 18(1): 53-60.

[4] 赵龙飞, 周红杰, 安文杰. 云南普洱茶保健功效的研究[J]. *食品研究与开发*, 2005, 26(2): 114-118.

[5] 黄河宁, 李安章, 翁露娜, 等. 茶多酚锰合成、表征及络合和诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28

(6): 1072-1076.

[6] 饶华, 曹振辉, 刘二伟, 等. 普洱茶对大鼠钙磷吸收利用的影响[J]. *云南农业大学学报*, 2008, 23(5): 646-647.

[7] 文启孝. 土壤有机质研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1984: 68-106.

[8] 秦谊, 龚加顺, 张惠芬, 等. BaCl₂ 和 Ca(CH₃COO)₂ 沉淀法定量分析普洱茶茶褐素官能团[J]. *林产化学与工业*, 2010(6): 107-112.

[9] 傅博强, 谢明勇, 最少平. 茶叶中多糖含量的测定[J]. *食品科学*, 2001(11): 69-73.

[10] Stevenson F J. 腐殖质化学[M]. 夏荣基, 译. 北京: 北京农业大学出版社, 1994.