

茶黄素抗氧化化学机制研究

Chemical mechanism of antioxidation of theaflavin

谢虹 罗志聪 李熙灿

XIE Hong LUO Zhi-cong LI Xi-can

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

摘要:采用 DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、 Cu^{2+} 还原能力评价法 3 种化学模型,测定茶黄素的体外抗氧化能力(以 Trolox 作为阳性对照),并进一步探讨其化学机制。结果表明:在 3 种化学模型中,茶黄素(及 Trolox)的抗氧化能力表现出良好的剂量相关性;茶黄素的 IC_{50} 值均低于阳性对照 Trolox。茶黄素在上述 3 种化学模型中,抗氧化活性分别相当于 Trolox 的 2.57, 3.13, 3.74 倍。作为一种天然的抗氧化剂,茶黄素抗氧化的化学机制涉及氢原子转移(HAT)和电子转移(ET)。通过 HAT 机制,茶黄素可能转化为稳定的邻苯醌式产物。

关键词:茶黄素;抗氧化;机制;氢原子转移

Abstract: To research the antioxidant chemical mechanism of theaflavin, the antioxidant activities of theaflavin were measured *in vitro* using several chemical models, including DPPH $\cdot$ (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) scavenging, ABTS $^{+}$ $\cdot$ [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] scavenging, and Cu^{2+} -reducing power assays, which was compared with the positive control Trolox. In these assays, theaflavin along with positive control Trolox exhibited dose-dependently antioxidant abilities. The relative antioxidant levels of theaflavin vs Trolox (i.e. $\text{IC}_{50, \text{Trolox}}/\text{IC}_{50, \text{theaflavin}}$ value) were calculated as 2.57, 3.13 and 3.74, respectively for DPPH $\cdot$ -scavenging assay, ABTS $^{+}$ $\cdot$ -scavenging assay, and Cu^{2+} -reducing power assay. In conclusion, theaflavin possessed higher antioxidant levels than Trolox. Its antioxidant mechanisms may include hydrogen atom transfer (HAT) and electron transfer (ET). Through HAT mechanism, theaflavin may be transferred into stable *ortho*-quinone form.

Keywords: Theaflavin; antioxidant; mechanism; hydrogen atom transfer

红茶是一种全发酵型茶类,因其香气甜纯、滋味浓厚而广泛受到世界消费者的喜爱。茶黄素(图 1)是红茶在发酵过程中,由简单儿茶素类聚合而成的黄烷醇类化合物^[1],是衡量红茶品质的重要因素。现代药理学研究表明,茶黄素有显著的抗肿瘤^[2]、抗炎^[3]、抗氧化作用^[4-5],是红茶发挥保健作用的重要物质基础。陈虎等^[6]认为茶黄素能调节体内生物酶系的活性、防止低密度脂蛋白的氧化,修复生物系统的氧化损伤。最新的研究^[7-8]还表明,茶黄素能通过 hedgehog 或 Shh 等信号通路限制肝的瘤变。但这些研究侧重阐明其抗氧化的生物机制,没有涉及化学机制。

本研究采用化学模式,研究茶黄素清除各种自由基的清除活性。在此基础上,进一步讨论其机制,以阐释茶黄素体内抗氧化的化学本质。

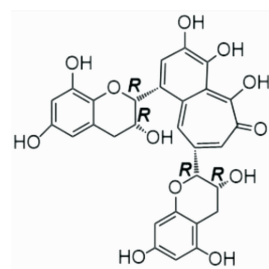


图 1 茶黄素的结构式

Figure 1 Structure of theaflavin

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

茶黄素(CAS: 4670-5-7): HPLC $\geq 98\%$, 四川省维克奇生物科技有限公司;

新铜试剂、DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基、Trolox: HPLC $\geq 98\%$, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

$(\text{NH}_4)_2\text{ABTS}$ [2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺

基金项目:国家自然科学基金(编号:81573558);粤港联合创新项目(编号:2017A050506043)

作者简介:谢虹,女,广州中医药大学在读硕士研究生。

通信作者:李熙灿(1970—),男,广州中医药大学教授,硕士。

E-mail: lixican@126.com

收稿日期:2017-11-15

酸)二铵盐]:美国 Amresco 公司;

$K_2S_2O_8$ 、 $CuSO_4$ 、 CH_3COONH_4 、95%乙醇:AR级,广州化学试剂厂。

1.1.2 仪器设备

紫外-可见分光光度计:UV2100型,上海尤尼柯仪器有限公司;

电子天平:BS110S型,北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DPPH·清除能力的测定 依据文献[9]并做适量修改。称取1 mg DPPH,加入95%乙醇20 mL,超声使之完全溶解。取溶解后的DPPH·溶液1 mL与95%乙醇500 μ L混合,利用紫外分光光度计在519 nm下测吸光度(A_0)值。取该DPPH·溶液1 mL分别与20,40,60,80,100 μ L的茶黄素溶液(0.1 mg/mL)混合,再向其中分别加入480,460,440,420,400 μ L的95%乙醇使之总体积为1.5 mL,静置30 min后,在519 nm下测吸光度值。平行测定3次。以Trolox(0.1 mg/mL)为阳性对照。样品清除DPPH·的能力按式(1)计算:

$$R = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

R——自由基清除率,%;

A_0 ——未加样品液时所测吸光度值;

A——加入样品液时所测吸光度值。

1.2.2 ABTS⁺·清除能力的测定 依据文献[10]并做适量修改。取7.4 mmol/L (NH₄)₂ ABTS溶液和2.6 mmol/L K₂S₂O₈溶液各1 mL混合,在室温避光下放置12 h,使之反应完全。用95%乙醇稀释此ABTS⁺·工作液,利用紫外分光光度计在734 nm下测 A_0 值,调整 A_0 至(0.7±0.02)。取该ABTS⁺·工作液800 μ L,加茶黄素(0.025 mg/mL) x μ L ($x=15,30,45,60,75$),再加95%乙醇(200- x) μ L,振摇10 s以充分混合,然后在734 nm下测定吸光度值,平行检测3次。以Trolox (0.025 mg/mL)标准品为阳性对照。样品清除ABTS⁺·的能力按式(1)计算。

1.2.3 Cu²⁺还原能力的测定 依据文献[11]并做适量修改。取0.01 mol/L CuSO₄溶液和7.5 mmol/L新铜试剂各125 μ L混匀,依次加入茶黄素(0.1 mg/mL) x μ L ($x=15,30,45,60,75,90$)、CH₃COONH₄缓冲液(700- x) μ L,混合,静置30 min,于450 nm处测吸光度值,平行检测3次。以Trolox (0.1 mg/mL)标准品为阳性对照。样品Cu²⁺还原能力按式(2)计算:

$$S = \left(\frac{A - A_0}{A_{max} - A_0}\right), \tag{2}$$

式中:

S——Cu²⁺的相对还原率,%;

A_0 ——未加样品液时所测吸光度值;

A_{max} ——一次测量内最大的吸光度值;

A——加入样品液时所测吸光度值。

1.2.4 数据分析 每个样品重复3次试验,试验结果以平均

值±标准差表示,采用SPSS 13.0对数据进行 t 检验。 $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 DPPH 自由基清除活性及机制

DPPH 自由基是一种以N为中心的稳定自由基,由于其分子中存在多个吸电子的—NO₂和苯环的大 π 键,所以氮自由基能稳定存在^[12]。DPPH 自由基的乙醇溶液为深紫色,其在517 nm处有强吸收。若与样品混合,反应液的颜色变淡,同时在517 nm下吸光度值减少,据此可以判断样品清除DPPH 自由基的能力^[13]。从图2中可以看出,在0~6 μ g/mL的浓度范围内,茶黄素清除DPPH·的能力逐渐增加,并且表现出良好的量效关系。其 $IC_{50} = (7.7 \pm 0.1) \mu$ mol/L,小于Trolox的(见表1),说明茶黄素清除DPPH·的能力强于Trolox。此前的文献^[14]认为,氢原子转移(hydrogen atom transfer, HAT)是DPPH·清除涉及到的重要机制,活泼的DPPH·接受了一个氢原子后形成了稳定的DPPH—H分子。因此,DPPH·清除模型可以用来衡量抗氧化剂的HAT能力^[15]。

依据文献[16],茶黄素分子与DPPH·发生的反应,可表示为图3。在反应中,茶黄素上的邻二酚羟基(O—H键)发生均裂,失去H·后形成茶黄素自由基(I),H·与DPPH·结合生成稳定的DPPH—H分子。茶黄素自由基(I),进一步转化为更稳定的邻苯醌式产物(II)。不难看出,正是邻苯醌式产物的稳定性,导致了茶黄素分子的强抗氧化活性。因此,茶黄素发挥其体外抗氧化作用可能与其具有的

表1 茶黄素和Trolox在各种抗氧化分析法中的 IC_{50} 值[†]

Table 1 The IC_{50} values of theaflavin and Trolox in several antioxidant assays

分析方法	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		$IC_{50, \text{Trolox}}/IC_{50, \text{茶黄素}}$
	茶黄素	Trolox	
DPPH·清除能力	7.7 ± 0.1^a	19.8 ± 0.3^b	2.57
ABTS ⁺ ·清除能力	2.3 ± 0.1^a	7.2 ± 0.2^b	3.13
Cu ²⁺ 还原能力	9.2 ± 0.2^a	34.4 ± 0.3^b	3.74

[†] IC_{50} 值是指当自由基的清除率为50%时样品的浓度;同行不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

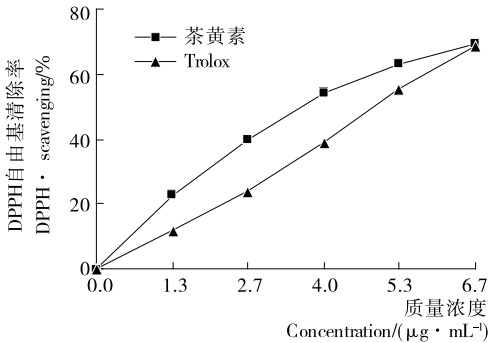


图2 茶黄素和Trolox的DPPH 自由基清除率曲线

Figure 2 The dose response curves of theaflavin and Trolox in DPPH·-scavenging assay

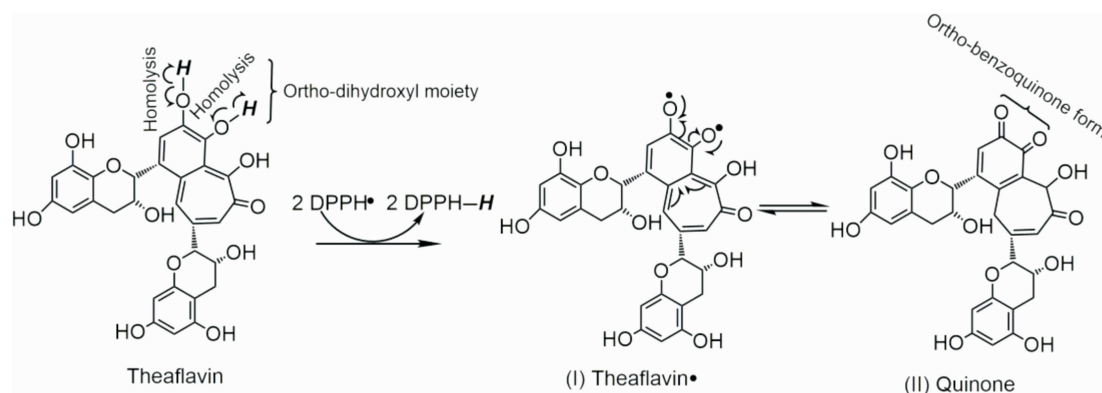


图 3 茶黄素与 DPPH· 可能发生的反应式

Figure 3 The proposed reaction of theaflavin with DPPH·

HAT 能力有关。值得一提的是,茶黄素的邻苯醌式产物多存在于环状化合物,链状化合物由于不具有环状结构,无法转变为醌式结构,所以大多不表现出抗氧化活性(如十六酸)^[17]。

2.2 ABTS 自由基清除活性及机制

ABTS 法是一种经典的检测物质抗氧化能力的方法^[18],适用于天然的或合成的抗氧化剂^[19]。(NH₄)₂ABTS 与 K₂S₂O₈ 反应可以生成稳定的 ABTS⁺· 自由基,此自由基呈深绿色,在 734 nm 处有最大吸收。如果 ABTS⁺· 被样品清除,其 734 nm 的吸光度值会降低,颜色变浅。据此,可以来判断样品清除 ABTS⁺· 的能力^[20]。从图 4 中可以看出,在 0~2 μg/mL 的浓度范围内,茶黄素清除 ABTS⁺· 的能力与其浓度形成良好的量效关系。其 IC₅₀ 值为 (2.3±0.1) μmol/L,小于 Trolox 的(见表 1),说明茶黄素清除 ABTS⁺· 的能力强于 Trolox。通常认为 ABTS⁺· 被清除的机制是电子转移(ET)的过程(ABTS⁺· + e⁻ → ABTS)^[21]。据此推测,茶黄素具有较强的 ABTS⁺· 清除能力,其清除过程至少包括 ET 机制。

2.3 Cu²⁺ 还原能力及机制

抗氧化剂对金属离子的还原能力,也可用于衡量其活性强弱^[22]。从图 5 中可以看出,在 0~90 μg/mL 的质量浓度范围内,茶黄素对铜离子的相对还原率与浓度呈现出良好的线性关系。其 IC₅₀ = (9.2±0.2) μmol/L,小于 Trolox 的(见

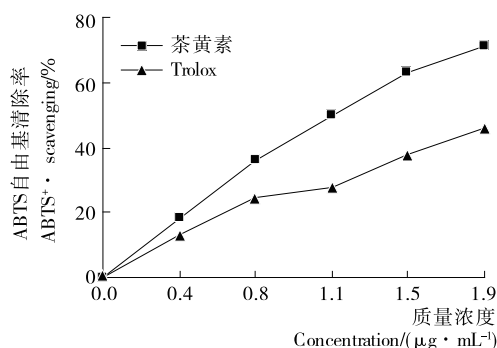
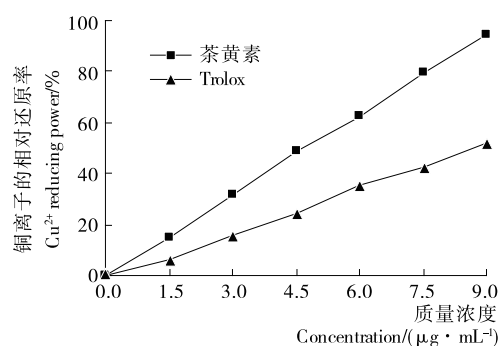
图 4 茶黄素和 Trolox 的 ABTS⁺· 清除率曲线Figure 4 The dose response curves of theaflavin and Trolox in ABTS⁺·-scavenging assay图 5 茶黄素和 Trolox 的相对 Cu²⁺ 还原能力浓度曲线Figure 5 The dose response curves of theaflavin and Trolox in Cu²⁺-reducing assay

表 1),表明茶黄素还原 Cu²⁺ 的能力强于 Trolox。文献[20]表明,Cu²⁺被还原成 Cu⁺是电子转移的过程。这进一步印证了茶黄素具有 ET 能力的推测。

3 结论

作为一种存在于红茶中的天然抗氧化剂,茶黄素在 DPPH 自由基清除、ABTS 清除、Cu²⁺ 还原力 3 个方面,其活性均明显强于 Trolox。它的抗氧化作用可能涉及氢原子转移(HAT)和电子转移(ET)。并且通过 HAT 机制,茶黄素可转化为稳定的邻苯醌式产物。此研究阐明了茶黄素抗氧化的化学机制,有助于理解抗氧化活性与结构的关系,为茶黄素类衍生物的开发利用提供理论基础。但该试验对于茶黄素所涉及的化学机制研究尚不全面,仍有待进一步分析完善。

参考文献

- [1] KUSANO R, MATSUO Y, SAITO Y, et al. Oxidation mechanism of black tea pigment theaflavin by peroxidase[J]. Tetrahedron Letters, 2015, 56: 5 099-5 102.
- [2] GAO Ying, RANKIN G O, TU You-ying, et al. Inhibitory effects of the four main theaflavin derivatives found in black tea on ovarian cancer cells[J]. Anticancer Research, 2016, 36(2): 643-651.
- [3] CAI Fei, LI Cai-rong, WU Ji-liang, et al. Theaflavin ameliorates

- cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-inflammatory effect and modulation of STAT-1[J]. *Mediators of Inflammation*, 2006, 5: 30-490.
- [4] MANGERICH A, KNUTSON C G, PARRY N M, et al. Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(27): E1 820-E1 829.
- [5] 沈丽萍. 茶黄素研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(1): 134-139.
- [6] 陈虎, 胡英, 周睿, 等. 茶黄素的抗氧化机理的研究进展[J]. *茶叶科学*, 2005, 25(4): 237-241.
- [7] SUR S, PAL D, MANDAL S, et al. Tea polyphenols epigallocatechin gallate and theaflavin restrict mouse liver carcinogenesis through modulation of self-renewal Wnt and hedgehog pathways[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 27: 32-42.
- [8] LI Xi-can, WEI Gang, WANG Xiao-zhen, et al. Targeting of the shh pathway by atractylenolides promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem Cells[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35: 1 328-1 335.
- [9] WANG Ting-ting, ZENG Gong-chang, LI Xi-can, et al. In vitro studies on the antioxidant and protective effect of 2-substituted-8-hydroxyquinoline derivatives against H_2O_2 -Induced oxidative stress in BMSCs[J]. *Chemical Biological Drug Design*, 2010, 75(2): 214-222.
- [10] LI Xi-can, CHEN Dong-feng, MAI Ying, et al. Concordance between antioxidant activities in vitro and chemical components of *Radix Astragali* (Huangqi)[J]. *Natural Product Research*, 2012, 26: 1 050-1 053.
- [11] LI Xi-can, LIU Jing-jing, LIN Jian, et al. Protective effects of dihydromyricetin against $\cdot OH$ -induced mesenchymal stem cells damage and mechanistic chemistry[J]. *Molecules*, 2016, 21: 604.
- [12] LI Xi-can, JIANG Qian, WANG Ting-ting, et al. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: Understanding the role of the 6"-OH group[J]. *Molecules*, 2016, 21: 1 246.
- [13] LI Xi-can, HAN Lu, LI Yung-rong, et al. Protective effect of sinapine against hydroxyl radical-induced damage to mesenchymal stem cells and possible mechanisms[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 64: 319-325.
- [14] LI Xi-can, HAN Wei-juan, MAI Wen-qiong, et al. Antioxidant Activity and Mechanism of Tetrahydroamentoflavone in vitro[J]. *Natural Product Communications*, 2013, 8: 787-789.
- [15] WANG Guang-rong, LI Xi-can, ZENG He-ping. Synthesis, antioxidation activity of (*E*)-9-*p*-Tolyl-3-[2-(8-hydroxy-quinol-2-yl)vinyl]-carbazole and (*E*)-9-(*p*-Anisyl)-3-[2-(8-hydroxy-quinol-2-yl)vinyl]-carbazole and their induction proliferation of mesenchymal stem cells[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2009, 67(9): 974-982.
- [16] CHEN Dong-feng, LI Xi-can, XU Zhi-wei, et al. Hexadecanoic acid from buzhong yiqi decoction induces proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2010, 13: 967-970.
- [17] LI Xi-can, HU Qiu-ping, JIANG Shu-xia, et al. *Flos Chrysanthemi Indici* protects against hydroxyl-induced damages to DNA and MSCs via antioxidant mechanism: A chemistry study[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2015, 19: 454-460.
- [18] TAN Dun-xian, HARDELAND R, MANCHESTER L, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical[J]. *Journal of Pineal Research*, 2003, 34: 249-259.
- [19] LIN Jian, LI Xi-can, CHEN Li, et al. Protective effect against hydroxyl radical-induced DNA damage and antioxidant mechanism of [6]-gingerol: A chemical study[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2014, 6: 1 633-1 638.
- [20] LI Xi-can, MAI Wen-qiong, CHEN Dong-feng, et al. Chemical study on protective effect against hydroxyl-induced DNA damage and antioxidant mechanism of myricitrin[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2014, 61: 383-390.
- [21] LIU Jing-jing, LI Xi-can, LIN Jian, et al. *Sarcandra glabra* (Caoshanhu) protects mesenchymal stem cells from oxidative stress: A bioevaluation and mechanistic chemistry[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16: 423.
- [22] VALENT I, TOPOLSKÁ D, VALACHOVÁ K, et al. Kinetics of ABTS derived radical cation scavenging by buccillamine, cysteine, and glutathione: Catalytic effect of Cu^{2+} ions[J]. *Biophysical Chemistry*, 2016, 212: 9-16.

(上接第18页)

- [15] ASTM. D882-01 Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting[S]. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 2005.
- [16] 张慧芸, 郭新宇, 康怀彬, 等. 添加适量丁香精油提高大豆分离蛋白膜性能[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(4): 247-254.
- [17] 张赞彬, 江娟. 大豆分离蛋白可食膜的生产工艺及性能表征[J]. *食品科学*, 2012, 33(6): 100-104.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 1037—1988 塑料薄膜和片材透水蒸气性试验方法杯式法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1988: 1-5.
- [19] 马丹, 赵晓燕, 马越, 等. 不同工艺生产大豆分离蛋白的成膜性能[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(10): 239-242.
- [20] 徐林林, 王岸娜, 吴立根. 谷朊粉可食性膜研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2014(1): 22-25.
- [21] MASTROMATTEO M, CHILLO S, BUONOCORE G G, et al. Effects of spelt and wheat bran on the performances of wheat gluten films[J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 88(2): 202-212.
- [22] 段林娟, 卢立新. 甘油含量对 MC/WG 可食性复合膜性能的影响[J]. *包装工程*, 2011, 32(1): 43-45.
- [23] 周盛华, 黄龙, 张洪斌. 黄原胶结构、性能及其应用的研究[J]. *食品科技*, 2008, 33(7): 156-160.
- [24] 郭嘉. 谷朊粉中麦谷蛋白和麦醇溶蛋白的分离及应用研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011: 3-4.
- [25] 李凤林, 黄聪亮, 余蕾. 食品添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 44-45.