

间,茶多酚浸出量有所增加,但增幅不大,且延长了茶多酚制品的生产周期及增加能耗,故水浴浸提时间以 10min 为宜。

2.2 微波对茶多酚制品儿茶素组成影响分析

试验将茶叶经微波处理后,减压浓缩,氯仿去杂,乙酸乙酯萃取,真空冷冻干燥制得的茶多酚制品经 HPLC 检验(以传统经典乙醇浸提法^[5]作对照),研究微波对儿茶素组成的影响,结果见图 2。

由图 2 可知,两种不同方法制备的茶多酚制品的 HPLC 色谱图基本相似。但制品 (I) 色谱图中 EGCG 和 ECG 两峰之间出现一个峰 ($t_R = 16.337\text{min}$) 一经鉴定为 GCG,其含量达 5.2%。这表明微波的短时高温提取使 EGCG 和 ECG 含量下降并出现了 GCG。这与用沸水提取 0.5h 制备的茶多酚制品儿茶素的组成^[3]相似,但制品 (I) 中 EGCG 含量较制品 (II) 下降了 3.5%, ECG 下降了 3.4%,这均远小于用沸水提取 0.5h 的下降量^[3]。

3 结论

3.1 微波技术应用于茶叶多酚类物质的提取具有短时、高效、节能等优点。微波结合水浴提取,不仅茶多酚浸出率达 90% 以上,优于乙醇水提取,而且降低了成本和减少了污

染。

3.2 经微波处理提取的茶多酚制品主要成分—儿茶素组成略有变化,但酯型儿茶素 EGCG 和 ECG 的含量下降不大。

3.3 确定的最佳浸提条件为:料液比 (w/v) 1:20,时间 3min,微波处理 2 次,再 50℃ 水浴浸提 1 次 10min,茶多酚浸出率达 90% 以上。

参考文献

- 1 Miura S, Watanabe J et al. The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu^{2+} , mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* 1994; 17 (12): 1567 ~ 1572.
- 2 沈生荣 杨贤强 赵保路等. 茶多酚复合体及 (-)-EGCG 对氧自由基的清除作用. *茶叶科学*, 1992, 12 (1): 59 ~ 64.
- 3 严明潮 徐向群 单夏锋. 提取条件对茶多酚制品儿茶素组成的影响. *茶叶科学*, 1996, 16 (2): 155 ~ 156.
- 4 金钦汉主编. 微波化学. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- 5 黄意欢主编. 茶学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1997: 151 ~ 152.
- 6 熊何健. 高含量表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 茶多酚分离制备的研究. 华中农业大学硕士论文, 1994.

茶多酚在体外清除含氧自由基的作用分析

林一萍 吴瑞荣 福建省中医药研究院 福州 350003

摘要 根据 Fenton 和 Haber-Weiss 反应,以脱氧核糖作为羟自由基分子探针,检测脱氧核糖降解物与硫代巴比妥酸显色反应,对照分析超氧歧化酶 (SOD)、茶多酚、硫脲、人参对含氧自由基的清除作用,证明茶多酚能抑制氧化物阴离子自由基 (O_2^-) 作用与 SOD 相似。

关键词 茶多酚 人参 自由基

Abstract Based on reaction of Fenton and Haber-Weiss, by using the deoxyribose as a hydroxy radical molecular, probe the degradation product of deoxyribose by thiobarbituric acid reaction was tested, and compared. The action and potency of scavenging oxygen radical species by superoxide dismutase (SOD), thiourea, tea-polyphenol and ginseng were studied. The results showed that tea-polyphenol could inhibit the anion radical action of superoxide (O_2^-) with the effect similar to that of SOD. However ginseng could inhibit not only hydroxyradical (OH) but also O_2^- with the effect was similar to that of thiourea.

Key words Ginseng/pharm Polyphenol/pharm Tea/pharm Radical Scavenger

自由基的检测方法很多,如电子顺磁共振法,气—液相色谱法,发光法等,但大多数需要昂贵的仪器,操作也复杂,一般实验难以应用,我们根据 Halliwell^[1] 等人设计的以脱氧核糖作为羟自由基分子探针的反应系统,检测脱氧核糖降解物与硫代巴比妥酸显色反应,对照分析超氧歧化酶 (SOD)、硫脲、茶多酚、人参对含氧自由基的清除作用。此法简易、快速,适宜大量

样品比较分析,可作为筛选含氧自由基的清除作用。此法简易、快速,适宜大量样品比较分析,可作为筛选含氧自由基清除剂的有用指标。

1 材料和方法

1.1 2-脱氧-D-核糖 (瑞士进口)、1.1.3.3-四甲氧基

表 1 茶多酚等对含氧自由基的抑制作用

清除剂	羟自由基反应系统		氧自由基反应系统	
	A _{532nm}	清除率(%)	A _{532nm}	清除率(%)
对照	1.007 ± 0.046	—	0.384 ± 0.024	—
SOD(15u/ml)	0.675 ± 0.004	33%	0.257 ± 0.009	33%
茶多酚(13μg/ml)	0.847 ± 0.037	16%	0.324 ± 0.012	16%
硫脲(10mmol/L)	0.487 ± 0.013	52%	0.307 ± 0.001	20%
人参(0.02g/ml)	0.746 ± 0.04	26%	0.352 ± 0.02	8%

注:1. 对照组 不含清除剂的氧自由基反应系统

$$2. \text{清除率}(\%) := \frac{100(A_0 - A_x)}{A_0} \times \%$$

A₀ = 对照的 A_{532nm} A_x = 加清除剂的 A_{532nm}

丙烷(日本进口)、SOD、黄嘌呤氧化酶、次黄嘌呤(上海东风试剂厂)其余试剂为国产分析纯。

1.2 茶多酚(TP) 含 TP > 95% 的黄色粉剂。

人参(Ginseng)购自福建中医学院国医堂(3g 级)。

1.3 分析羟自由基反应系统:在 2ml 的反应液中有 2-脱氧-D-核糖(30mmol/L) 170μl; EDTA(mmol/L) 40μl; FeSO₄(2mmol/L) 40μl; 次黄嘌呤(2mmol/L) 200μl; 磷酸缓冲液(0.15mol/L, pH7.4) 1.5ml; H₂O₂(17.6mmol/L) 10μl, 反应开始加入黄嘌呤氧化酶(0.4u/ml) 40μl。反应混合液在 35℃ 培养 15min。

1.4 分析氧自由基反应系统:用 0.15mol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液代替上述羟自由基反应系统中的 FeSO₄ 和 H₂O₂。

1.5 硫代巴比妥酸(TBA)显色反应:取上述培养液 1ml 加入 TBA(1% W/V 于 0.05mol/L NaOH) 1ml 和冰醋酸 1ml, 混匀后在沸水浴中加热 30min, 冷却后于分光光度计上测定 A₅₃₂, 以 1.1.3.3-四甲氧基丙烷作为标准液, 每种样品重复测定 6 份。

2 实验结果

几种清除剂对氧自由基(O⁻²)和羟自由基(OH[·])的抑制作用见表 1。

3 讨论

H₂O₂ 可被某些变价金属离子(Fe²⁺)或含氧自由基(O⁻²)还原产生 OH[·], 这是两个最常见的可以产生 OH[·] 的反应即 Fenton 反应和 Haber-Weiss 反应; 而黄嘌呤氧化酶可以催化次黄嘌呤氧化生成尿酸, 同时还还原氧分子成为 O⁻², 这些反应生成的含氧自由基可以使 2-脱氧-D-核糖降解, 其产物与硫代巴比妥酸起显色反应, 在 A_{532nm} 处有显著的吸收。已经证实 O⁻²、Fe³⁺ 和抗坏血酸能驱动 Fenton 反应, 使之增加系统中的 OH[·], 本实验以黄嘌呤氧化酶和次黄嘌呤反应生成的 O⁻² 作为 Fenton 反应的驱动。

根据 CeDerbaum 等人的报道^[2], 二甲亚砷、异丙醇、乙醇、甘露醇和硫脲都是羟自由基的清除剂, 本实验也证明了硫脲不仅能有效地抑制羟自由基反应系统内脱氧核糖降解及产生的

TBA 反应(抑制率达 52%, 见表 1) 同时还能抑制氧自由基反应系统中含氧自由基降解脱氧核糖及产生的 TBA 反应。因此硫脲对 OH[·] 和 O⁻² 均有清除作用。SOD 是已知的 O⁻² 清除剂, 它能促使 O⁻² 变为过氧化氢和氧分子, 从而达到清除 O⁻²。本实验中的 OH[·] 反应系统和 O⁻² 反应系统均能被 SOD 抑制, 并且清除率均为 33%, 因为 OH[·] 反应系统中以 O⁻² 作为驱动 Fenton 反应的因子, 由此证明 SOD 只抑制 O⁻²。王成莲^[3] 等证明, 在铜离子(Cu⁺⁺)存在下, 依赖抗坏血酸的 OH[·] 形成不受 SOD 的抑制, 因为该系统中未见同时产生 O⁻² 的迹象, 这和我们的实验观察是一致的。

茶叶已经被证明能有效地抗脂质过氧化物作用^[4], 具有延缓衰老的作用, 且有效成分是茶多酚, 它是否也能清除含氧自由基, 我们采用总茶多酚作为反应的清除剂, 其结果与 SOD 的作用相似, 它能抑制 O⁻² (两个反应系统的清除率均为 16%)。人参是中医传统的抗衰老药物, 其主要功用为大补元气、调补五脏, 延缓衰老, 在本实验条件下, 我们观察到它同时可以抑制 O⁻² 和 OH[·] 系统, 其作用与硫脲相似。

在生物体内, 任何参与自由基反应又不给细胞造成损害, 都可以作自由基的清除剂, 使之形成比原来的自由基具有较小毒性的产物, 从而对细胞起保护作用。本实验的结果从清除自由基的角度证明了茶多酚延缓衰老的原理。同时, 上述的方法可以快速地检测一种物质对自由基的抑制作用, 对筛选含氧自由基的清除剂提供有用的信息。

参考文献

- Halliwell B, Gutteridge JMC. In: Greenwal RA ed, Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton CRC press, 1985. 177 ~ 180.
- Cederbaum AI, Cohen G, In: Greenwal RA ed, Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton CRC press, 1985. 81 ~ 87.
- 王成莲, 等. 比色法测定抗坏血酸体系产生的 OH[·] 自由基. 生物化学与生物物理进展, 1989, (6) 473.
- 林一萍, 等. 茉莉花茶的抗脂质过氧化物作用及对果蝇寿命的影响. 福建茶叶, 1986, (4) 26.