

藤茶二氢杨梅素茶氨酸复合物的制备及抗氧化活性研究

曹敏惠¹, 姜晴¹, 郑西洲¹, 彭文¹, 倪德江²

(1. 华中农业大学理学院, 湖北武汉 430070)

(2. 华中农业大学园艺林学学院/教育部园艺林学重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要: 二氢杨梅素在天然藤茶中含量高达 25.6%, 具有多种生理功能, 受到广泛关注。但二氢杨梅素常温水溶性差, 生物利用度较低, 限制了其应用范围, 为了提高二氢杨梅素的水溶性, 对二氢杨梅素进行分子修饰, 制备了二氢杨梅素-茶氨酸复合物, 利用紫外光谱、红外光谱、质谱和核磁共振氢谱对复合物进行了结构表征, 测定了复合物的理化性质, 并考察了复合物的抗氧化活性。通过结构分析, 二氢杨梅素分子中 C3-OH、C5-OH、C7-OH、C3'-OH、C5'-OH 与茶氨酸的活泼氢通过氢键结合形成复合物; 复合物清除·OH 自由基的能力均强于二氢杨梅素和 Vc, 清除 O₂⁻·自由基和 DPPH 自由基的能力和二氢杨梅素相当, 比 Vc 强。二氢杨梅素和茶氨酸的复合, 不仅提高其水溶性, 在抗氧化活性方面也起到了强化的作用。

关键词: 二氢杨梅素-茶氨酸复合物; 制备; 抗氧化活性; 自由基

文章编号: 1673-9078(2014)10-36-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.007

Synthesis of Dihydromyricetin-theanine Complex and Its Antioxidant Activity

CAO Min-hui¹, JIANG Qing¹, ZHENG Xi-zhou¹, PENG Wen¹, NI De-jiang²

(1. College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

Abstract: Dihydromyricetin is currently attracting extensive scientific attention because of its various physiological functions. Although the content of dihydromyricetin in *Ampelopsis grossedentata* is up to 25.6%, its poor water solubility at room temperature and low bioavailability limit the scope of its application. In order to improve the water solubility of dihydromyricetin, its structure was modified and a dihydromyricetin-theanine complex was prepared. The structure was characterized by UV, IR, MS, and ¹HNMR spectra, its physical and chemical properties were measured, and the antioxidant activity of the complex was investigated. Based on structural analysis, the complex was found to be formed via hydrogen bonding interactions between C3-OH, C5-OH, C7-OH, C3'-OH, and C5'-OH in dihydromyricetin and active hydrogens in theanine. The scavenging capacity of the complex against hydroxyl free radicals was stronger than that of dihydromyricetin and Vc, and was equivalent to that of dihydromyricetin against superoxide and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals, but was better than that of Vc. It is therefore considered that the complexation of dihydromyricetin with theanine not only improved the water solubility of dihydromyricetin but also enhanced its antioxidant activity.

Key words: dihydromyricetin-theanine complex; synthesis; antioxidant activity; free radical

藤茶是一种古老的药食两用植物资源, 它集营养、保健和药用功效于一体, 广泛分布在我国湖南、湖北、广西等省份。具有清热解毒、祛风湿、强筋骨等功效,

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170646); 中央高校基本科研业务费(2013Q0017); 全国大学生创新创业训练计划创新训练项目(201410504065)

作者简介: 曹敏惠(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学

民间将其嫩叶制成保健茶, 用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、黄疸型肝炎等症, 已有数百年历史^[1]。经化学成分分析, 发现藤茶是一种富含黄酮类物质的特殊植物, 有效部位总黄酮含量达 39%左右^[2], 其中二氢杨梅素(3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基-2, 3-双氢黄酮, Dihydromyricetin, 简称 DMY)(化学结构见图 1)含量高达 25.6%。藤茶系目前国内发现的 DMY 单体含量最高的植物。DMY 因其广泛的生物活性而备受

关注,而且对生物体的毒副作用小,因此对DMY的研究已成为食品、医药、保健领域的热门课题^[3]。

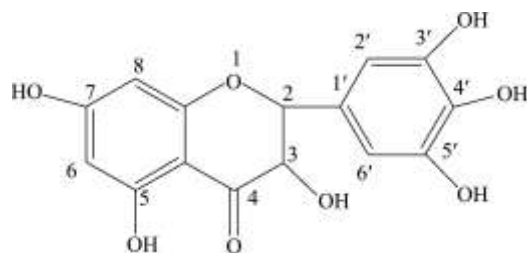


图1 二氢杨梅素的结构式

Fig.1 Structure of dihydromyricetin (DMY)

DMY常温下在水中的溶解度仅为0.0691 g^[4],水溶性差,影响了DMY在体内的吸收和代谢,降低了生物利用度,限制了它的给药途径,从而阻碍了其开发成为新药的可能性^[5-6]。最近的研究也表明,在新药开发中,有41%的工作量是为了提高难溶性药物的溶解度,改善生物利用度^[7]。据统计,目前至少有40%的药物因溶解度问题而使其使用受到限制。众所周知,氨基酸水溶性好,而且具有多种生理功能^[8-9]。茶叶中特有的茶氨酸不仅能促进大脑的学习和记忆功能并能对帕金森氏症、更年期综合症、老年性痴呆、传导神经功能紊乱等疾病起预防作用^[10-11],茶氨酸有强心利尿、扩张血管的作用,且有利于防治肝昏迷、记忆障碍和智力减退^[12-13]。

本实验通过从藤茶中提取的DMY与茶氨酸反应制备了DMY茶氨酸复合物,并对复合物的抗氧化活性进行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藤茶采自恩施来凤县,由本院陈玉琼副教授鉴定为显齿蛇葡萄*Ampelasis grassedentata*。

L-茶氨酸为生化试剂,其他试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

600 MHz核磁共振仪:德国Bruker公司,内标均采用TMS; UV-2450紫外分光光度计,日本岛津; AVATAR 330红外色谱仪,美国Nicolet; 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂; SKFG-01型电热恒温干燥箱,黄石医疗设备厂; 冷冻干燥机,美国SCANVAC。

1.3 方法

1.3.1 DMY氨基酸复合物的制备方法

按物质的量1:1比例称取DMY和茶氨酸,DMY在微温下溶于30 mL无水乙醇中。将茶氨酸完全溶于

少量蒸馏水中,缓慢滴加到DMY无水乙醇中,恒温水浴至60℃,回流搅拌反应60 min,有不溶物产生。反应完毕,冷却离心,用无水乙醇洗涤后抽滤、冷冻干燥后即得DMY-茶氨酸复合物(Dihydromyricetin - Theanine Complex,简称DTC)。

1.3.2 DMY-茶氨酸复合物的性质及表征

1.3.2.1 主要理化性质测定

取少量DTC,测定熔点与水溶性。另外取适量DMY和FeCl₃反应。

1.3.2.2 紫外-可见吸收光谱

分别取适量DMY及DTC溶解于蒸馏水中,以蒸馏水为参比,在200~800 nm之间进行扫描。

1.3.2.3 红外光谱

取适量的DMY及DTC和KBr以1%的比例混合研磨压片后,进行红外光谱分析。

1.3.2.4 核磁共振氢谱

以氘代二甲亚砜(DMSO-d₆)为溶剂,TMS为内标测定了样品的¹H NMR谱。

1.3.2.5 质谱分析

电喷雾离子源(ESI),电子能量70 eV,传输线温度为275℃,离子源温度为200℃。

1.3.3 抗氧化活性测定

1.3.3.1 样品对羟基自由基(·OH)的清除作用

采用D-脱氧核糖-铁体系法^[14]。样品在底物D-脱氧核糖的作用下,清除由H₂O₂释放出来的·OH自由基。试验设DMY、DTC组和Vc对照组,每组设定不同的浓度梯度,各组分设3个平行管,每组做3个重复实验。清除·OH自由基的活性以IC₅₀(mg/mL)值表示。以清除率为纵坐标,样品或Vc浓度为横坐标,建立回归方程,可计算出·OH自由基清除率为50%时样品或Vc的浓度,即IC₅₀。按下式计算样品对·OH的抑制率:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

注:A₀:未加样品的吸光值;A₁:加入样品后的吸光值;A₂:试剂空白的吸光值。

1.3.3.2 样品对超氧阴离子自由基的清除作用

将样品配制成不同浓度的溶液,采用黄嘌呤氧化酶法,采用南京建成SOD试剂盒测定方法进行测定。试验DMY、DTC组和Vc对照组,每组设定不同的浓度梯度,各组分设3个平行管,每组做3个重复实验。按下式计算样品对O₂⁻·自由基的清除率:

$$\text{清除率}\% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

注:A₀对照管吸光值A₁测定管吸光值。

清除 O₂·自由基的能力以 IC₅₀ (mg/mL)值表示。以清除率为纵坐标, 样品或 Vc 浓度为横坐标, 建立回归方程, 可计算出 O₂·自由基清除率为 50%时的样品或 Vc 浓度, 即 IC₅₀。

1.3.3.3 样品对 DPPH 自由基的清除作用

DPPH 自由基是一种稳定的有机自由基, 目前广泛应用于测定抗氧化剂的体外抗氧化活性。DPPH 自由基因具有单电子而在 517 nm 处有一强吸收(呈深紫色), 自由基清除剂可与其单电子配对而使其吸收逐渐消失, 其退色程度与其所接受的电子数成定量关系。

准确称取 0.0030 g DPPH 溶解于无水甲醇中, 定容于 50 mL 容量瓶中。然后将容量瓶用黑色包装袋包好避光置于冰箱中冷藏备用。测定方法: 在 2 mL DPPH 醇溶液中加入 2 mL 样品溶液或 Vc, 混匀器混匀后避光反应 20 min, 然后在 517 nm 处测定吸光值。各组分设 3 个平行管, 每组做 3 个重复实验。样品及 Vc 对 DPPH 自由基的清除率用下面的公式表示:

$$SA/\% = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

注: A₀: 2 mL DPPH 醇溶液+2 mL 超纯水的吸光值; A_i: 2 mL DPPH 醇溶液+2 mL 样品溶液后的吸光值; A_j: 2 mL 样品溶液+2 mL 超纯水的吸光值。

清除 DPPH 自由基的活性以 IC₅₀ (mg/mL)值表示。以清除率为纵坐标, 样品或 Vc 浓度为横坐标, 建立回归方程, 可计算出 DPPH 自由基清除率为 50%时的样品或 Vc 浓度, 即 IC₅₀。

1.3.4 数据处理

采用 Microsoft Office Excel 2007、PASW Statistics 18 软件进行数据统计分析处理。

2 结果与分析

2.1 主要理化性质测定

二氢杨梅素氨基酸复合物为浅黄色固体, 熔点为 273 °C, 常温下在 100 g 水中的溶解度为 66.8 g。与三氯化铁显色反应呈阳性说明分子中保留了多酚结构。

2.2 复合物结构表征

2.2.1 紫外-吸收光谱

图 3 显示, DTC 最大吸收分别在 330 nm 处, 与二氢杨梅素最大吸收 290 nm 相比, 吸收峰发生红移现象, 由此推测是二氢杨梅素与茶氨酸复合后, 使分子的共轭效应增强。

2.2.2 红外光谱

从 DMY 和 DMY 茶氨酸复合物的红外光谱图看

出, DMY 分子 4 位的羰基振动频率位于 1637 cm⁻¹。当 DMY 与茶氨酸形成复合物后, 此 4 位 C=O 特征吸收峰位于 1637 cm⁻¹ 左右, 并无明显移动。

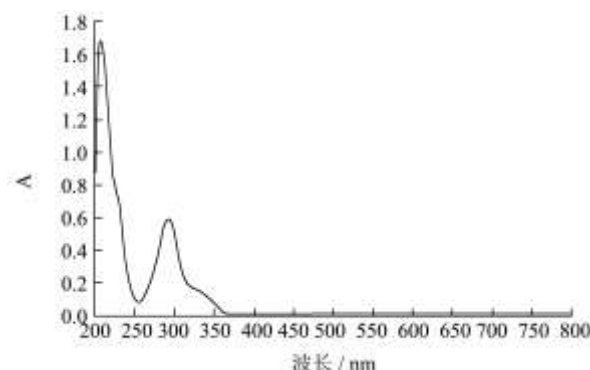


图 2 DMY 的紫外吸收光谱图

Fig.2 Ultraviolet visible absorption spectrum of DMY

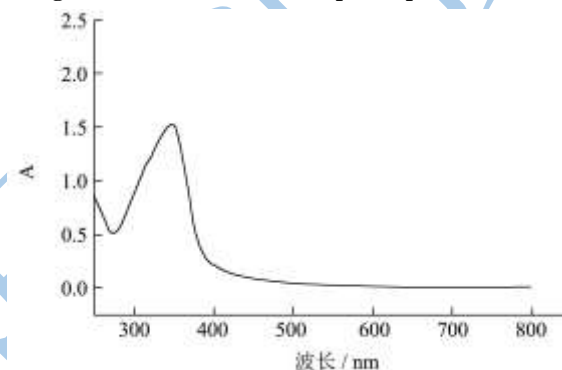


图 3 DTC 的紫外可见光谱图

Fig.3 Ultraviolet-visible absorption spectrum of dihydromyricetin-theanine complex

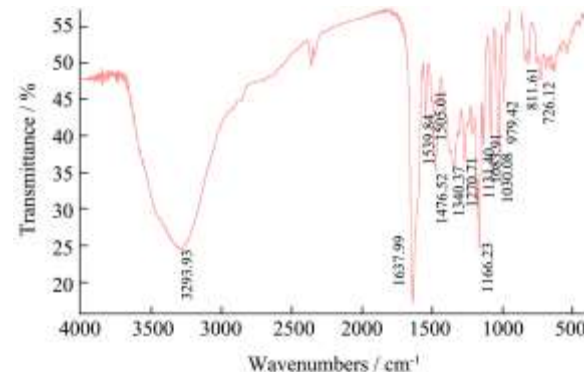


图 4 DMY 的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum of dihydromyricetin

复合物在 3400 cm⁻¹ 左右有宽而强的氨基特征伸缩振动峰, 在 3100 cm⁻¹ 左右处出现另一宽而强的吸收峰, 可能是由于分子中部分酚羟基与氨基酸分子中氨基和羟基形成氢键, 使羟基的伸缩振动吸收峰向低频移动, 且同时强度增加。酚的 δO-H 在 1350 左右 cm⁻¹, DMY 氨基酸复合物中酚羟基的存在。

分子中的 C-O-C 键的振动频率 (1080 cm⁻¹) 基本未变, 表明 C 环醚键仍然存在。芳环骨架振动 νC=C

频率为 1450 cm⁻¹~1600 cm⁻¹, DMY 复合物在此区域出现相应的吸收峰, 说明复合物中苯环的存在。

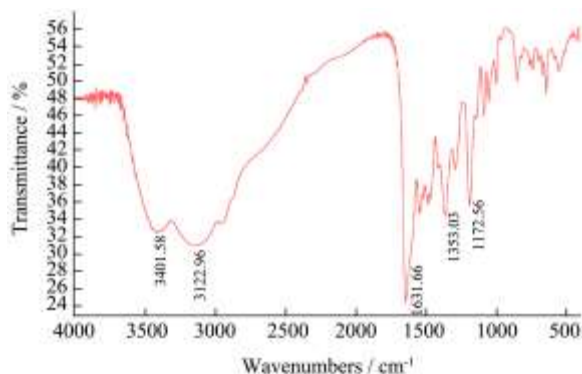


图 5 DTC 的红外光谱图

Fig.5 Infrared spectrum of dihydromyricetin-theanine complex

注: DTC: IR_{max}(cm⁻¹): 3400(OH-), 1637(C=O), 1595, 1500, 1465(芳环C=C), 1080(C-O-C)。

2.2.3 质谱

EI-MS: m/z 493[M-H]⁺; 408[M-H-CONHCH₃]⁺; 363[M-H-(CH₂)₂CHNH₂COOH]⁺; 319[M-H-The]⁺; 301[M-H-The-H₂O]⁺; 175[H-DMY]⁺。复合物质谱、二氢杨梅素和茶氨酸的简单混合物的质谱结果见图 6、图 7。

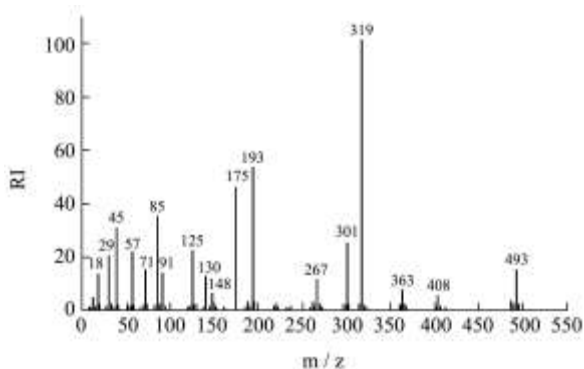


图 6 DTC 的质谱图

Fig.6 Mass Spectrum of DTC

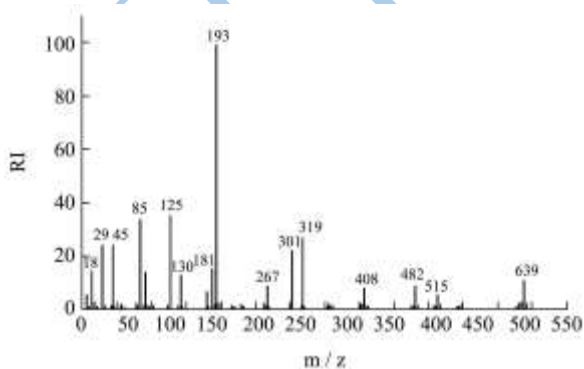


图 7 DMY 和茶氨酸混合物的质谱图

Fig.7 Mass Spectrum of a mixture of DMY and theanine

通过核磁共振图谱显示 DMY 和氨基酸的结合是通过分子间的氢键连接, 推测 DMY 的 C3-OH、

C5-OH、C7-OH、C3'-OH、C5'-OH 与氨基酸的活泼氢通过氢键结合形成 DMY 氨基酸超分子复合物。

2.2.4 核磁共振氢谱

表 1 DTC 的 ¹H NMR 的数据分析结果

Table 1 ¹H NMR results of DTC

二氢杨梅素 C 位	¹ H NMR	H 的归属
2	5.456(1H,d)	C2-H
3	5.436(1H,d)	C3-H
6	5.640(1H,d)	C6-H
2'	6.647(1H, s)	C2'-H
6'	6.647(1H, s)	C6'-H
3	6.644(1H,s)	C3-OH
5	7.681(1H,s)	C5-OH
7	7.681(1H,s)	C7-OH
3'	7.381(1H,s)	C3'-OH
4'	6.831(1H,s)	C4'-OH
5'	7.381(1H,s)	C5'-OH
8	5.620(1H,s)	C8-H

茶氨酸的 C 位		
1	6.835(1H,s)	COOH
2	2.159(1H,m),4.513(2H,d)	-(CH)-,-NH ₂
3	1.636(2H,m)	-(CH ₂)-
4	1.634(2H,m)	-(CH ₂)-

N-乙基	5.181(1H,m),1.636(2H,m)	-NH,-(CH ₂)-
	1.290(3H,t)	-CH ₃

2.3 抗氧化活性分析

2.3.1 样品对羟基自由基 (·OH) 的清除作用

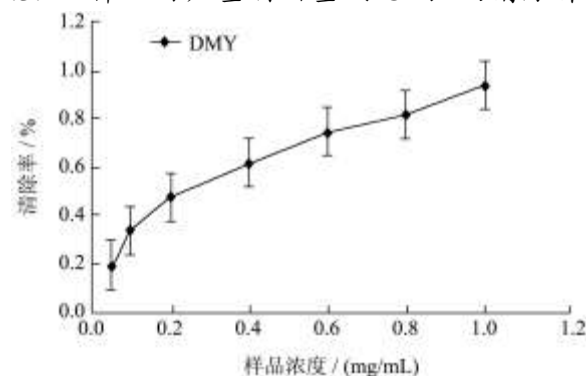


图 8 DMY 对 ·OH 的清除作用

Fig.8 Scavenging capacity of DMY against ·OH

·OH 是毒性较大的活性氧自由基, 对细胞内 DNA 的破坏作用最大, 造成糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤, 使细胞坏死或突变, 从而产生遗传突变。由图可知, DMY、DTC 和 Vc 清除·OH 的 IC₅₀ 值分别为 0.320 mg/mL、0.186 mg/mL 和 13.348 mg/mL。随着各物质在反应液中浓度的增

加,对·OH自由基清除率呈上升趋势。在实验浓度范围内,对·OH自由基的清除能力 DTC>DMY>Vc,结果显示:DMY和DTC对·OH自由基的清除能力显著高于阳性对照Vc(P<0.05);DTC对·OH自由基的清除能力显著高于DMY(P<0.05)。DTC的抗氧化活性得到了强化。

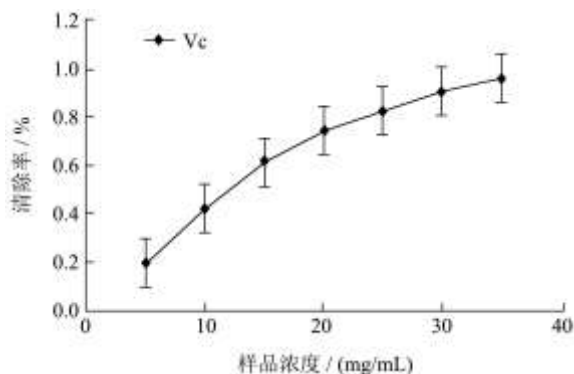


图9 Vc对·OH的清除作用

Fig.9 Scavenging capacity of Vc against ·OH

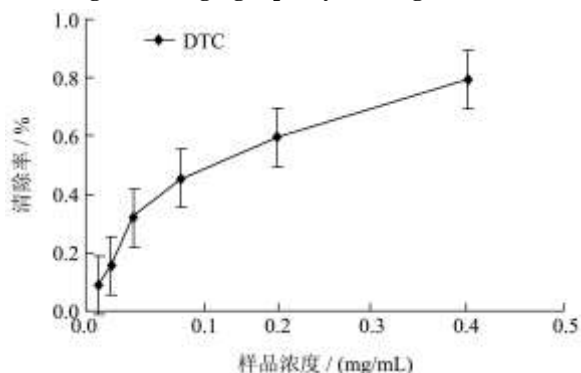


图10 DTC对·OH的清除作用

Fig.10 Scavenging capacity of DTC against ·OH

2.3.2 样品对超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的清除作用

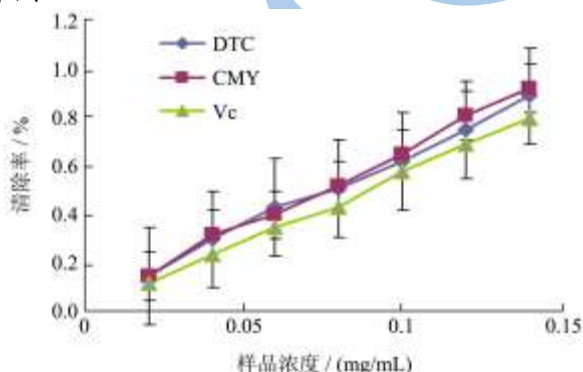


图11 DMY、Vc和DTC对O₂^{-·}的清除作用

Fig.11 Scavenging capacities of DMY, Vc and DTC against O₂^{-·}

样品和Vc对超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的清除结果分别见图11。由图可知,随着三种物质在反应液中浓度的增加,对O₂^{-·}清除率呈上升趋势。在实验浓度范围内,各样品对超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的清除IC₅₀

值分别0.074 mg/mL、0.076 mg/mL和0.087 mg/mL。各物质的清除O₂^{-·}的能力比较如下:DMY>DTC>Vc。结果显示,DMY和DTC对超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的清除能力显著高于阳性对照Vc(P<0.05)。但DTC和DMY对超氧阴离子自由基的清除能力相比较,无显著差异(P>0.05)。

2.3.3 样品对DPPH自由基的清除作用

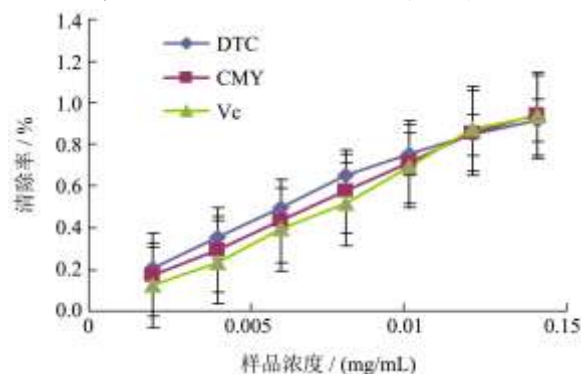


图12 DMY、Vc和DTC对DPPH的清除作用

Fig.12 Scavenging capacities of DMY, Vc, and DTC against DPPH

样品和Vc对DPPH自由基的清除结果分别见图12,DMY衍生物和Vc在实验浓度范围内对DPPH自由基的清除能力呈现良好的量效关系,随浓度增加清除率也逐渐增强。在实验浓度范围内,DMY、DTC和Vc清除DPPH自由基的IC₅₀值分别为0.0069 mg/mL、0.0062 mg/mL和0.0066 mg/mL。DMY衍生物清除DPPH自由基的能力有如下趋势:DTC>Vc>DMY。结果表明DTC对DPPH自由基的清除能力与DMY和阳性对照Vc无显著差异(P>0.05)。

3 结论

我国的DMY资源丰富、具有很高的开发利用价值。但DMY水溶性和稳定性都较差,影响其临床应用,故通过结构修饰来提高其水溶性和抗氧化的能力。研究表明,在25℃时,产物DTC(66.8g)较DMY(0.0691g)的水溶性有了极大改善。本研究探索了DTC的制备方法,通过UV、IR、MS和¹HNMR确定了DTC的结构。对进一步提高DMY的生物利用度,拓宽给药途径以及开发相关的药物有很大的意义。通过抗氧化试验的结果,我们发现DTC清除DPPH自由基和·OH自由基的能力均强于DMY和Vc,清除O₂^{-·}自由基的能力和DMY相当,比Vc强。因此,DMY和茶氨酸的结合,不仅可以增加其水溶性,而且可以发挥协同增效的作用,其食用和药用价值有待进一步研究与开发。

参考文献

- [1] 李燕婧,钟正贤.浅谈藤茶的研究与应用[J].中国民族民间医药,2013,16:26-27
LI Yan-jing, ZHONG Zheng-xian. The research and application of ampelopsis grossedentata [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2013, 16: 26-27
- [2] 周耀,丰来,周政.藤茶植株叶果与组培物中二氢杨梅素含量的比较研究[J].湖南农业科学,2012,13:105-107
ZHOU Yao, FENG Lai, ZHOU Zheng. Compare of contents of dihydromyricetin in leaf, fruit and tissue culture objects of ampelopsis grossedentata [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2012, 13: 105-107
- [3] 陈玉琼,向班贵,倪德江,等.恩施富硒藤茶安全性毒理学实验研究[J].茶叶科学,2005,25(3):295-299
CHEN Yu-qiong, XIANG Ban-gui, NI De-jiang et al. Study on the toxicology of se-enriching ampelopsis grossedentata from enshi [J]. Journal of Tea Science, 2005, 25(3): 295-299
- [4] Benguo Liu, Yuxiang Ma, Chao Yuan, et al. Characterization, stability and antioxidant activity of the inclusion complex of dihydromyricetin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. Journal of Food Biochemistry, 2012, 36: 634-641
- [5] Qingquan Guo, Jinhua Zeng, Yao Lu, et al. Effect of solubility, thermal stability and antioxidant properties of acylating dihydromyricetin [J]. Advanced Materials Research, 2013, 791-793: 101-105
- [6] Cushnie TP Tim, Lamb Andrew J. Recent advances in understanding the antibacterial flavonoids [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011, 38: 99-107
- [7] Perrutm, Jung J, Leboev F. Enhancement of dissolution rate of poorly soluble active ingredients by supercritical fluid processes [J]. Part I: Micronization of neat particles. Int J Phar, 2005, 288(1): 3-10
- [8] 林淑英.显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的提取纯化及抗氧化活性研究[D].广州:华南理工大学图书馆,2004
LIN Shu-ying. Study on extraction, purification and antioxidant activity of dihydromyricetin in ampelopsis grossedentata [D]. Guang Zhou: South China University of Technology, 2004
- [9] 将才武,梁晶,覃洁萍,等.水溶性双氢杨梅素复合物的制备、表征及抗肿瘤活性研究[J].广西中医药,2007,30(2):50-52
JIANG Cai-wu, LIANG Jing, QIN Jie-ping, et al. Studies on preparation of water-soluble dihydromyricetin arginine compound and its characterization and antineoplastic activity [J]. Guangxi Traditional Chinese Medicine, 2007, 30(2): 50-52
- [10] Terashima T, Takido J, Yokogoshi H. Time-dependent changes of amino acids in the serum, liver, brain and urine of rats administered with theanine [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1999, 63(4): 615-618
- [11] Unno T, Suzuki Y, et al. Metabolism of theanine, γ -glutamylethylamide, in rats [J]. J. Agric. Food Chem., 1999, 47(4): 1593-1596
- [12] Yokogoshi H, Kobayashi M, et al. Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats [J]. Neurochem. Res., 1998, 23(5): 667-673
- [13] Kakuda T, Nozawa A, et al. Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 2000, 64(2): 287-293
- [14] 倪德江.乌龙茶多糖的形成特征、结构、降血糖作用及其机理[D].武汉:华中农业大学图书馆,2003
NI De-Jiang. Formation characteristic, structure, hypoglycemic activity and its mechanism of polysaccharides from oolong tea [J]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2003