

茶黄素与真菌多糖联合清除 ABTS 自由基活性的比较

张乃珣¹, 尹红力², 刘冉³, 于美汇¹, 李婷婷¹, 王振宇⁴

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 中国农业科学院农产品加工研究所主食加工技术研究院, 黑龙江哈尔滨 150040) (3. 聊城大学农学院食品科学与工程系, 山东聊城 252000) (4. 哈尔滨工业大学化工学院食品科学与工程系, 黑龙江哈尔滨 150090)

摘要: 本文分别比较了茶黄素 (TFs) 与黑木耳多糖 (AAP) 和灵芝孢子多糖 (GLP) 单一、联合使用清除 ABTS 自由基活性的作用。采用 Chou-Talaly 联合指数 (CI) 方法分析 ABTS 自由基清除实验结果, 并对单一和联合使用的清除效果、联合指数 (CI)、等效图和剂量减少指数 (DRI) 进行分析评价。单独使用茶黄素、黑木耳多糖和灵芝孢子多糖的 IC_{50} 值分别为 20.60 $\mu\text{g/mL}$ 、2.49 mg/mL 和 0.93 mg/mL, 联合使用茶黄素和黑木耳多糖与茶黄素和灵芝孢子多糖 (质量比为 1:3) 后, IC_{50} 值分别为 74.04 $\mu\text{g/mL}$ 和 58.92 $\mu\text{g/mL}$ 。联合指数 (CI) 分析表明, 从清除率 5% 到 97%, 茶黄素和灵芝多糖的联合指数都小于 1, 且 CI 有降低趋势, 二者间有协同作用; 剂量减少指数 (DRI) 分析显示, 从清除率 5% 到 97%, 茶黄素和灵芝多糖的剂量减少指数都大于 1, 以上结果茶黄素和黑木耳多糖联合使用均表现不一致。茶黄素和灵芝多糖之间存在协同清除 ABTS 自由基效应, 但茶黄素和黑木耳多糖不存在。

关键词: 真菌多糖; 茶黄素; 联合; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2017)2-21-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.004

ABTS Radical Scavenging Activity of Theaflavins Combined with Fungal Polysaccharides

ZHANG Nai-xun¹, YIN Hong-li², LIU Ran³, YU Mei-hui¹, LI Ting-ting¹, WANG Zhen-yu⁴

(1. College of Forestry, Northeast Forest University, Harbin 150040, China) (2. Institute of Food Science and Technology CAAS/Institute of Staple Food Processing Technology, Harbin 150040, China) (3. Liaocheng University, Agricultural College, Liaocheng 252000, China) (4. Department of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: The 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activities of theaflavins (TFs) alone and combined with *Auricularia auricular* polysaccharides (AAP) and *Ganoderma lucidum* spore polysaccharides (GLP) were compared in this paper. The results of ABTS radical scavenging experiments were analyzed using the Chou-Talalay combination index (CI), and the scavenging effects, combination index (CI), and dose-reduction index (DRI) of TFs, AAP, and GLP, alone and in combination, were evaluated. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of TFs, AAP, and GLP were 20.60 $\mu\text{g/mL}$, 2.49 mg/mL, and 0.93 mg/mL, respectively, while the IC_{50} values of a combination of TFs and AAP (mass ratio 1:3) and a combination of TFs and GLP (mass ratio 1:3) were 74.04 $\mu\text{g/mL}$ and 58.92 $\mu\text{g/mL}$, respectively. CI analysis indicated that with the clearance rate in the range of 5~97%, the CI values of TFs with GLP were < 1 and exhibited a downward trend, suggesting a synergistic effect between TFs and GLP. DRI analysis demonstrated that with the clearance rate in the range of 5~97%, the DRI values of TFs with GLP were greater than 1. Inconsistent results were obtained in the above analyses for a combination of TFs and AAP. Therefore, there was a synergistic effect between TFs and GLP for scavenging ABTS free radicals, but no similar effect was found between TFs and AAP.

Key words: fungal polysaccharides; theaflavin; combination; antioxidant activity

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (GA13B202)

作者简介: 张乃珣 (1991-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 植物资源开发利用

通讯作者: 王振宇 (1957-), 男, 研究生导师, 教授, 研究方向: 植物资源开发利用

茶黄素 (Theaflavin, TFs) 是乌龙茶和红茶生产中多酚氧化酶和空气氧化儿茶素的主要产物^[1]。实验表明茶黄素对羟自由基、DPPH 自由基^[2]和 ABTS 自由基^[3]有很好的清除能力。此外茶黄素还具有抗突变^[4]、抗炎^[5]和抗肿瘤^[6]等生理学特性。黑木耳 (*Auricularia auricula*) 是一种营养丰富的药食同源性

食用菌。黑木耳多糖 (*Auricularia auricular* polysaccharides, AAP) 是从黑木耳子实体中提取的多糖, 据研究具有抗氧化^[7]、抗辐射^[8]、降血脂^[9]、免疫调节^[10]、抗肿瘤^[11]和降血糖^[12]等多种生物学活性。灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 为多孔菌科真菌灵芝的子实体, 属于传统中药材, 灵芝多糖主要分布于灵芝孢子中^[13]。灵芝孢子多糖 (*Ganoderma lucidum* spore polysaccharides, GLP) 具有抗氧化^[14]、降血糖^[15]及免疫调节^[16]等生物学活性。现代恶劣的环境会诱导机体氧化应激, 这可能是各种临床疾病如糖尿病、动脉粥样硬化及恶性疾病等发生的罪魁祸首^[17]。清除自由基, 促进抗氧化防御系统的再生, 就可避免氧化应激带来的机体损伤。茶黄素、黑木耳多糖和灵芝孢子多糖都被判定具有良好的抗氧化效果, 但相比单一使用抗氧化剂的成本高和使用剂量大有可能引发安全问题, 联合使用药物若能产生协同作用将带来不可估量的经济效果和临床效果。虽然茶黄素、黑木耳多糖和灵芝孢子多糖都具有很强的抗氧化活性, 但是目前关于几种抗氧化剂协同抗氧化的报道还非常少, 而对酚类化合物和多糖两种重要抗氧化剂协同抗氧化的研究基本没有。所以本研究对茶黄素分别和黑木耳多糖、灵芝孢子多糖联合使用, 借鉴 Chou-Talalay 联合用药理论分析比较药物联合使用效果, 研究其是否具有协同抗氧化作用, 为抗氧化剂联合使用应用于体内研究提供体外参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

没食子酸标准品 (>99.0%) 购自天津百伦斯生物技术有限公司; ABTS 购自 Sigma 公司; 黑木耳 (*Auricularia auricular*) 购自中国哈尔滨市南极市场; 茶黄素和破壁灵芝孢子粉由总后军需研究院提供; 葡萄糖、碳酸钠、福林酚、苯酚和浓硫酸等均为分析纯。

恒温水浴锅 (上海普渡生化科技有限公司); RE-5205 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); TDL-40B-W 台式低速大容量离心机 (河南星科科学仪器有限公司); 721 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 黑木耳多糖 (AAP) 的提取

取黑木耳子实体进行机械粉碎得到黑木耳粉, 过 80 目筛, 筛下黑木耳粉备用。先后用石油醚、乙酸乙酯以 1:4 的比例浸泡黑木耳粉 24 h 除去其中粗脂肪。

取除脂肪后的黑木耳粉用 0.1 mol/L NaOH 以 1:50 的料液比, 80 °C, 机械搅拌 2 h 提取酸性黑木耳多糖, 离心得上清液, 重复提取两次, 合并两次提取液, 用 HCl 进行中和。多糖液 80 °C 减压浓缩, 缓慢加入 4 倍体积的无水乙醇, 于 4 °C 低温放置 24 h, 收集析出的粗多糖。粗多糖以 -70~-80 °C, 0.1~1 MPa 进行冻干, 干燥粗多糖备用。

1.2.2 灵芝孢子多糖 (GLP) 的提取

取破壁灵芝孢子粉以 1:50 的料液比加入蒸馏水, 80 °C, 机械搅拌 2 h 提取灵芝孢子多糖, 离心得上清液, 重复提取两次, 合并两次提取液。多糖液 80 °C 减压浓缩, 缓慢加入 4 倍体积的无水乙醇, 于 4 °C 低温放置 24 h, 收集析出的粗多糖。粗多糖以 -70~-80 °C, 0.1~1 MPa 进行冻干, 干燥粗多糖备用。

1.2.3 AAP 和 GLP 多糖含量的测定

参考 NY/T 1676-2008^[18] 进行多糖含量测定。根据下式(1)计算 AAP 和 GLP 多糖的含量 (AAP%/GLP%)。

$$\text{AAP/GLP 多糖含量 (AAP\%/GLP\%)} = \frac{\text{测定多糖质量}}{\text{粗多糖质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.4 茶黄素 (TFs) 多酚含量的测定

参考 GB/T 8313-2008^[19] 进行多酚含量测定。根据式 2 计算茶黄素多酚的含量 (TFs%)。

$$\text{TFs 多酚含量 (TFs\%)} = \frac{\text{测定多酚含量}}{\text{粗多酚含量}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.5 ABTS 自由基清除能力测定

先将 0.89 mL 浓度为 140 mM 的过硫酸钾溶液加入到 50 mL、7 mM 的 ABTS 自由基溶液中, 过夜, 4 °C 下保存, 制备成为 ABTS 储备液。临用前将 ABTS 储备液进行稀释, 在 734 nm 下使其吸光值在 0.70±0.02, 制成 ABTS 工作液。将 0.1 mL 不同浓度的茶黄素、黑木耳多糖和灵芝孢子多糖及其复配物 (多酚与多糖质量比 1:3) 加入到 1.9 mL 的 ABTS 工作液中, 充分混匀, 避光反应 6 min 后在 734 nm 下测定吸光值, 由以下公式计算试样对 ABTS 自由基的清除活性。

$$\text{清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

其中, A_0 为待测试样由等体积水代替测定的吸光值; A_1 为添加试样的吸光值; A_2 为 ABTS 工作液由等体积水代替测定的吸光值。

1.3 Chou-Talalay 联合用药理论

由于生物系统和剂量-效应模型十分复杂, 并且联合用药有很多颇有争议的模式、途径、假说和理论, 多年来并没有一种统一的联合用药的评价方法。Chou-Talalay 联合用药理论 (又称中值药效法, median-

drug effect analysis; 联合指数法, combination index method) 于 1984 年由 Chou 和 Talalay 共同建立, 对药物联合作用进行了定量。2005 年, 根据此理论开发出了“CompuSyn”软件。2010 年 Chou^[20]又进一步完善了该法。在联合用药方面已得到广泛应用。

本文借鉴 Chou-Talalay 联合用药理论, 用于评价茶黄素和黑木耳多糖及灵芝孢子多糖单独和联合使用的效果。

1.3.1 中值效应方程(The Median-Effect Equation)

$$F_a/F_u=(D/D_m)^m \quad (4)$$

D 是药物剂量或者浓度, F_a 是 D 剂量下的作用分数(即抑制百分比), F_u 是不作用分数(即 $F_u=1-F_a$)。 D_m 是中效剂量(例如 IC_{50} , ED_{50} 或 LD_{50}), 是清除率 50%时的剂量, m 是表示剂量-效应关系曲线的系数。

经过变化可以得到

$$D=D_m[F_a/(1-F_a)]^{1/m} \quad (5)$$

$$F_a=1/[1+(D_m/D)^m] \quad (6)$$

基于式4进行对数换算得到式7, 作 $x=\log(D)$, $y=\log(F_a/F_u)$ 曲线, 叫做中值效应图(the median-effect plot)。

$$\log(F_a/F_u)=m\log(D)-m\log(D_m) \quad (7)$$

中值效应图中, m 是斜率, 根据 x 轴上的截距可以得到 D_m 。

1.3.2 联合指数定律(The Combination Index Theorem)

中值效应方程可以延伸到两种物质的联合使用, 可以得到式(8):

$$\left[\frac{(F_a)_{1,2}}{(F_u)_{1,2}}\right]^{1/m} = \left[\frac{(F_a)_1}{(F_u)_1}\right]^{1/m} + \left[\frac{(F_a)_2}{(F_u)_2}\right]^{1/m} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2} \quad (8)$$

基于式(8), Chou 和 Talalay 于 1983 年提出联合指数(CI), 计算公式见上式(9), 来量化两种物质的协同或拮抗作用。

$CI < 1$, $=1$ 和 >1 分别表示协同作用, 加和作用和拮抗作用。分母中, $(D_x)_1$ 是只有 D_1 存在清除率 $x\%$ 时的剂量, $(D_x)_2$ 是只有 D_2 存在清除率 $x\%$ 时的剂量。 $(D_x)_1$ 和 $(D_x)_2$ 值可由式(8)计算得出。分子中, $(D)_1$ 和 $(D)_2$ 是两种联合时清除率 $x\%$ 时各自的剂量。CI 在 1.0 附近时又可以细化为 0.85~0.90 为轻微协同作用, 0.90~1.10 为近加和作用, 1.10~1.20 为轻微拮抗作用。

当 $CI=1$ 时, 等式(9)经过变换可得

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1[F_a/(1-F_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2[F_a/(1-F_a)]^{1/m_2}} \quad (9)$$

$$\frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = 1 \quad (10)$$

那么就两种物质可以在清除率 $x\%$ 时对 ED_x 做等效应图。

1.3.3 剂量减少指数方程(The Dose-Reduction Index Equation)

联合使用的一个重要目的就是减少物质使用剂量, 从而保持原效果的同时减少毒性。于是 Chou 于 1988 年提出剂量减少指数(DRI)这一概念。DRI 是用来衡量相同作用水平下, 协同使用时相比单独使用每种物质剂量减少多少倍的指数。所以可得

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{1}{(DRI)_1} + \frac{1}{(DRI)_2} \quad (11)$$

$$(DRI)_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1}, (DRI)_2 = \frac{(D_x)_2}{(D)_2}, \dots$$

DRI 越大意味着相同治疗效果下剂量减少越多, 但不一定暗示协同作用。

2 结果与分析

2.1 TFs、AAP 和 GLP 多酚、多糖含量比较

经测定和计算得到 TFs、AAP、GLP 多酚和多糖的含量如表 1。

表 1 茶黄素、黑木耳多糖和灵芝孢子多糖含量比较

Table 1 Content of polysaccharide and polyphenol in TFs, AAP, and GLP

	TFs	AAP	GLP
多酚含量/%	66.18±1.77	-	-
多糖含量/%	-	81.28±2.54	68.309±1.20

2.2 TFs、AAP 和 GLP 单独对 ABTS 自由基

清除效果比较

TFs、AAP 和 GLP 单独对 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 值比较如表 2。

表 2 ABTS 自由基清除能力 IC_{50} 值比较

Table 2 Comparison of IC_{50} values of ABTS radical scavenging

ability of TFs, AAP, and GLP

样品	TFs/(μ g/mL)	AAP/(mg/mL)	GLP/(mg/mL)
ABTS 清除能力 IC_{50}	20.60±0.03	2.49±0.06	0.93±0.02

2.3 TFs 和 AAP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除效果

2.3.1 TFs 和 AAP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除剂量-效应关系

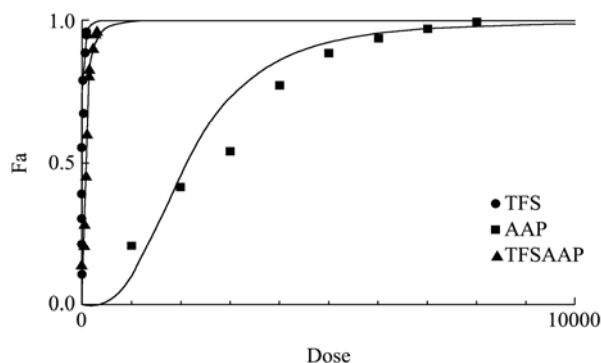


图 1 TFs 和 AAP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除剂量-效应图

Fig.1 Dose-effect curves of ABTS radical scavenging activity of TFs and AAP alone and in combination

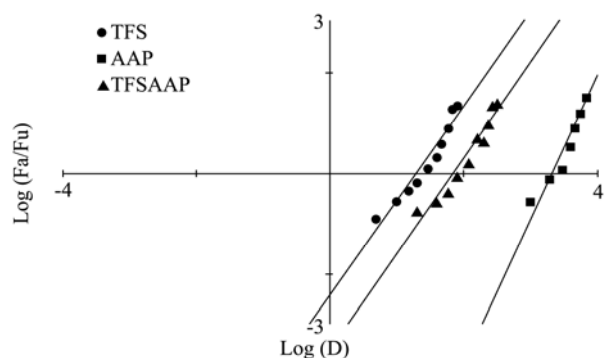


图 2 TFs 和 AAP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除中值效应图

Fig.2 Median-effect plot of ABTS radical scavenging activity of TFs and AAP alone and in combination

如图 1 所示, TFs 和 AAP 单独及联合使用对 ABTS 自由基的清除能力随浓度增加而增大, 且具有很明显的量效关系。TFs 对 ABTS 自由基清除能力要远远大于 AAP。当单独使用浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TFs 时, 清除率为 39.61%; 单独使用浓度为 2 mg/mL 的 AAP 时,

清除率为 41.74%; 当联合使用 TFs (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 AAP (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 清除率为 45.81%, 大于相同剂量作用之和。由图 2 所示, 联合使用对 ABTS 自由基清除能力的中效剂量介于 TFs 和 AAP 两者之间。

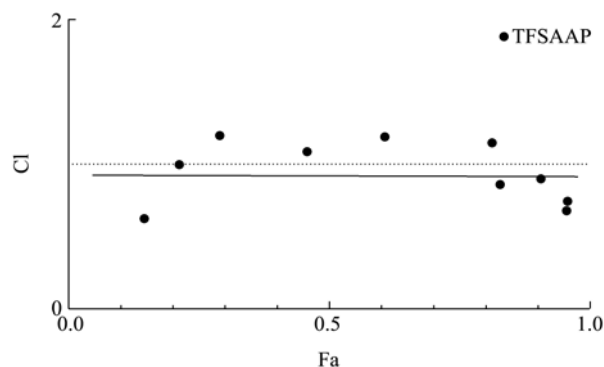


图 3 TFs 和 AAP 联合使用对 ABTS 自由基清除联合指数作用图
Fig.3 Fa-CI plot of ABTS radical scavenging activity of a combination of TFs and AAP

如图 3 所示, 从清除率 5%至 95%相互作用指数基本处于 1 附近, 且随着清除效果增加, CI 没有明显的变化趋势, 表明 TFs 和 AAP 可能不具有协同抗氧化效果, 可能是近加和作用。

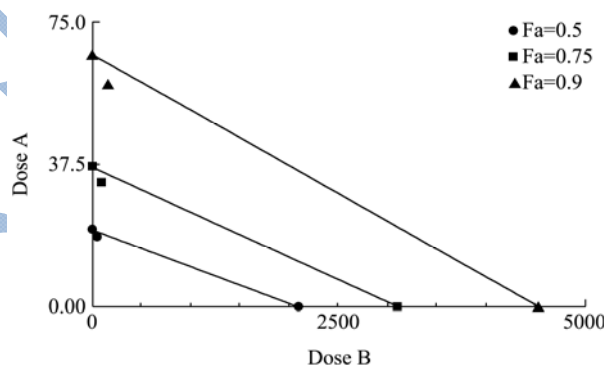


图 4 TFs 和 AAP 复配物对 ABTS 自由基清除等效图
Fig.4 Isobologram at ED50, ED75, and ED90 of ABTS radical scavenging activity of TFs in combination with AAP

由图 4 可以看出, 在清除率为 50%、75%和 90%时, 联合使用的数据点都落在了斜边附近, 说明联合使用中 TFs 和 AAP 的使用剂量基本等于同清除效果下单独物质的使用剂量。

表 3 TFs 和 AAP 不同清除效果下的浓度及剂量减少指数 (DRI)

Table 3 Concentrations and dose-reduction index (DRI) of TFs and AAP under different clearance rates

Fa	TFs Dose/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	AAP Dose/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	Total Dose/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	TFs DRI	AAP DRI
0.05	4.28	755.01	15.74	1.09	63.96
0.1	6.38	980.30	23.31	1.09	56.06
0.2	9.83	1301.49	35.71	1.10	48.59
0.3	13.11	1571.26	47.42	1.11	44.18
0.4	16.59	1833.61	59.82	1.11	40.87

转下页

接上页

0.5	20.60	2112.74	74.04	1.11	38.05
0.6	25.57	2434.37	91.64	1.12	35.42
0.7	32.36	2840.84	115.61	1.12	32.76
0.8	43.14	3429.68	153.50	1.12	29.79
0.9	66.48	4553.38	235.14	1.13	25.82
0.97	131.49	7119.29	460.71	1.14	20.60

根据公式11可以看出, DRI>1并不一定暗示协同作用。如表3知, 从Fa>0.05开始, TFs和AAP的DRI值均大于1, 且TFs的DRI值随作用效果增大而增大。由于DRI值可以体现联合使用时比单独使用每种物质剂量减少的指数, 因此比值越大, 联合使用时剂量减少的越显著, 这样必然会降低药物对机体的毒性。

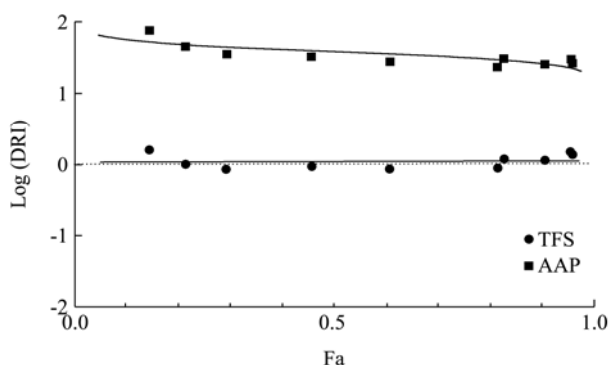


图5 TFs和AAP对ABTS自由基清除效应与剂量减少指数对数图
Fig.5 Fa-Log(DRI) plots of ABTS radical scavenging activity of TFs and AAP

从图5可以看出, TFs和AAP的log(DRI)均大于0, 且AAP显著高于TFs, 说明对AAP单一药物的用量减少更大。

2.3.2 TFs 和 GLP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除剂量-效应关系

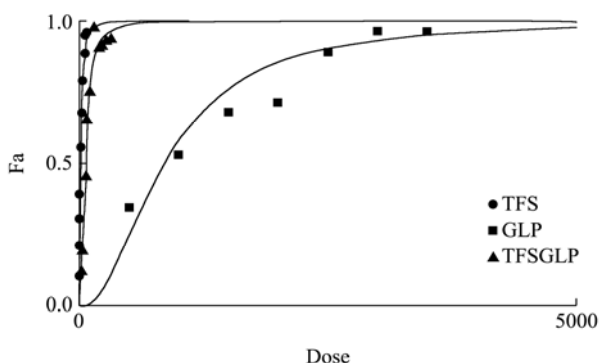


图6 TFs 和 GLP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除剂量-效应图

Fig.6 Dose-effect curves of ABTS radical scavenging activity of TFs and GLP alone and in combination

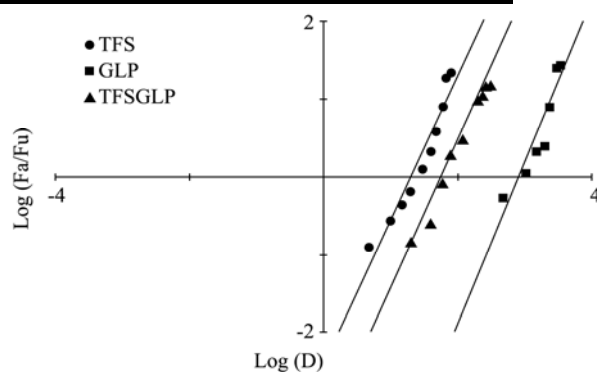


图7 TFs 和 GLP 单独和联合使用对 ABTS 自由基清除中值效应图

Fig.7 Median-effect plot of ABTS radical scavenging activity of TFs and GLP alone and in combination

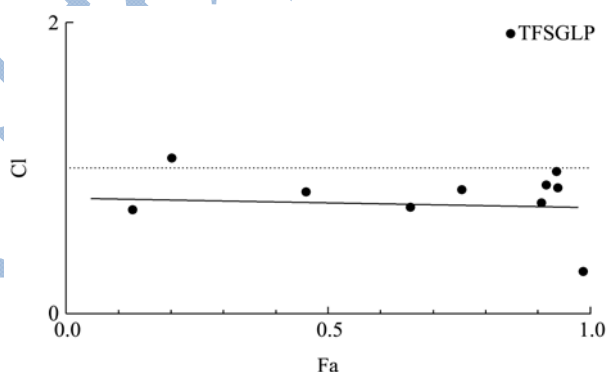


图8 TFs 和 GLP 联合使用对 ABTS 自由基清除联合指数作用图

Fig.8 Fa-CI plot of ABTS radical scavenging activity of a combination of TFs and GLP

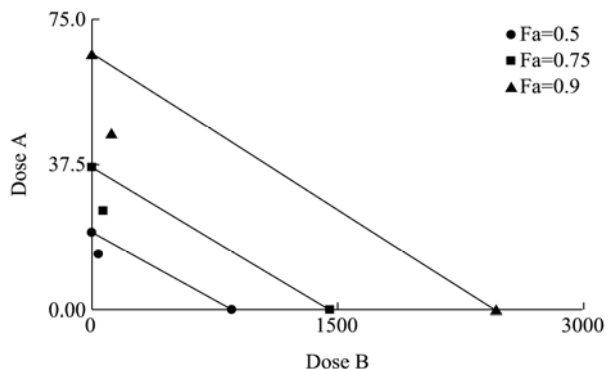


图9 TFs 和 GLP 联合使用对 ABTS 自由基清除等效线图

Fig.9 Isobologram at ED50, ED75, and ED90 of ABTS radical scavenging activity of a combination of TFs and GLP

如图6所示, TFs和GLP单独及联合使用对ABTS自由基的清除能力随浓度增加而增大, 且具有很明显的量效关系。由表2、图6和图7可知TFs对ABTS自由基清除能力要远远大于GLP。当单独使用浓度为20 μg/mL的TFs时, 清除率为39.61%; 单独使用浓度为0.5 mg/mL的GLP时, 清除率为35.13%; 当联合使用TFs(20 μg/mL)和GLP(60 μg/mL), 清除率为65.82%, 大于相同剂量作用之和。对比AAP可以发现GLP的ABTS自由基清除能力更强, TFs和GLP的联合使用对ABTS自由基的清除能力也比TFs和

AAP的联合使用强。

如图8所示, 从清除率5%至97%相互作用指数都小于1, 而且具有随着清除效果的增加, CI也随之降低的趋势, 基本可以说明TFs和GLP有协同抗氧化作用。

由图9可以看出, 在清除率为50%、75%和90%时, 联合使用的数据点都落在了斜边之下, 说明联合使用中TFs和GLP的使用剂量都低于同清除效果下单独物质的使用剂量, 暗示联合使用具有协同作用。

表4 TFs和GLP不同清除效果下的浓度及剂量减少指数(DRI)

Table 4 Concentrations and dose-reduction index (DRI) of TFs and GLP under different clearance rates

Fa	TFs Dose/(μg/mL)	GLP Dose/(μg/mL)	Total Dose/(μg/mL)	TFs DRI	GLP DRI
0.05	4.28	208.29	12.88	1.33	21.57
0.1	6.38	298.36	18.94	1.35	21.00
0.2	9.83	440.68	28.79	1.37	20.41
0.3	13.11	571.09	38.04	1.38	20.02
0.4	16.59	706.30	47.79	1.39	19.71
0.5	20.60	858.38	58.92	1.40	19.43
0.6	25.57	1043.21	72.64	1.41	19.15
0.7	32.36	1290.20	91.26	1.42	18.85
0.8	43.14	1672.02	120.56	1.43	18.49
0.9	66.48	2469.58	183.27	1.45	17.97
0.97	131.49	4568.23	354.77	1.48	17.17

如表4可以发现, 从Fa>0.05开始, TFs的DRI值均大于1, 且随作用效果增大而增大, 说明联合使用中TFs的使用比单独使用时减少, 可见联合使用减少TFs的使用量; 而从Fa>0.05开始, GLP的DRI值均大于1。

3 讨论

多酚、黄酮和单宁比普通膳食有更高的潜在抗氧化能力^[20], 有很多报道研究了多酚(黄酮)之间的联合使用抗氧化能力。Minghua Li等^[21]研究发现黄芪(AME)和甘草(GU)的乙酸乙酯混合物(AG)有很强的抗氧化能力和铁还原能力, 相比两种单独物质之和要显示出更高的抗氧化活性; 且其中的多酚和黄酮是引起协同抗氧化能力的主要化合物。Shanshan Wang等^[22]用等辐射分析法确定喜马拉雅金老梅提取物(A)和银杏叶提取物(EGb761)的联合使用有很大的协同效果, 进一步发现咖啡酸+异鼠李素有最好的协同效果, 而(+)-儿茶素+异鼠李素在DPPH实验中显示拮抗作用。联合使用多酚和多糖的研究较少, 王岳飞等^[23]比较研究茶多酚和西洋参的协同增效作用, 发现不同浓度的茶多酚和西洋参之间均存在明显的协同增效作用, 并且随着浓度上升, 协同增效作用也相应增强。白海娜等^[24,25]发现沙棘、蓝靛果、黑木耳复合物中的多酚、花色苷和黄酮含量最高, 总还原能力也最强, 具有最显著的辐射防护功能; 针对体外

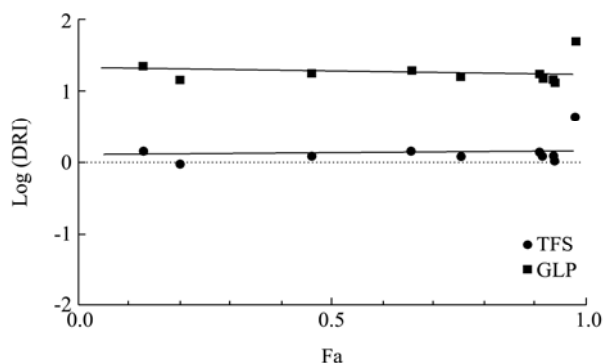


图10 TFs和GLP对ABTS自由基清除效应与剂量减少指数对数图
Fig.10 Fa-Log(DRI) plots of ABTS radical scavenging activity of TFs and GLP

从图10可以看出, TFs和GLP的log(DRI)均大于0, TFs的log(DRI)有增大趋势, 联合使用对TFs和GLP的使用量都有减少作用。

ABTS⁺和 DPPH·的清除能力,发现白藜芦醇、原花青素与黑木耳多糖具有协同抗氧化作用,咖啡酸和儿茶素分别与黑木耳多糖也同样具有协同抗氧化作用。这可能暗示二苯乙烯类多酚和多糖存在一定的协同作用。所以本文选择茶黄素和黑木耳多糖、灵芝孢子多糖两种多糖进行复配,比较其是否具有协同作用并选择复配效果较好的一组。

本实验发现,TFs 具有很高的清除 ABTS 自由基活性。这可能是茶黄素苯并环庚三烯酚酮部分在优先氧化的位置提供氧化保护^[26],且由于谐振形式的存在还可能负责电子的供给;而没食子酸部分对其抗氧化活性必不可少,没食子酸极性基团例如羟基的增加会提高抗氧化能力^[27]。相比 TFs 和 AAP 联合使用,TFs 和 GLP 的联合使用在清除 ABTS 自由基能力上呈现明显的协同作用。这可能是由于灵芝多糖由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、海藻糖、木糖和阿拉伯糖组成^[28],主干大多是由阿拉伯糖和木糖以 1→4 糖苷键连接而成^[29],而大分子量杂多糖抗氧化活性高^[30,31];并且有研究显示,灵芝多糖的分支中具有低分子量的 β-1,3-葡聚糖(LMG),这显著增强灵芝多糖的抗氧化活性^[32]。

当 TFs 上苯并环庚三烯酚酮部分被氧化后,GLP 由于富含糖醛酸可能与游离基产生新的酚类化合物或活化游离基,两种抗氧化剂之间修复再生,继续发挥抗氧化作用;并且 GLP 抗氧化活性高于 AAP,所以 TFs 和 GLP 的联合使用清除 ABTS 自由基活性更强。关于 TFs 和 GLP 联合使用进而产生协同作用的机制可能是由于抗氧化剂的修复再生,但相互作用机制尚不明确,还需要进一步的研究。

4 结论

本研究发现茶黄素和灵芝孢子多糖复配在对 ABTS 自由基清除作用上会产生协同作用,且对 ABTS 自由基清除能力大于茶黄素和黑木耳多糖的复配物。对其联合使用产生结果的不同解释,有必要在今后的体内试验中进行研究,从而深入阐释其相互作用机制。

参考文献

- [1] Lovedeep Kaur, Shiromani Jayasekera, Paul J Moughan. Chapter 13-antioxidant quality of tea (*Camellia sinensis*) as affected by environmental factors, in processing and impact on antioxidants in beverages [M]. San Diego: Academic Press, 2014
- [2] Zi-yin Yang, Guo-liang Jie, Fang Dong, et al. Radical-scavenging abilities and antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters in H₂O₂-mediated oxidative damage system in the HPF-1 cells [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(5): 1250-1256
- [3] N J Miller, C Castelluccio, L Tijburg, et al. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators [J]. FEBS Letters, 1996, 392: 40-44
- [4] Z Apostolides, D A Balentine, M E Harbowy, et al. Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters [J]. Mutation Research, 1997, 389(9-2): 167-172
- [5] M H Pan, S Y Lin-shiau, C T Ho, et al. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages [J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 59(4): 357-367
- [6] YY Tu, A B Tang, N Watanabe. The theaflavin monomers inhibit the cancer cells growth *in vitro* [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2004, 36(7): 508-512
- [7] 张宁.黑木耳分级多糖制备及抗氧化研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2011
ZHANG Ning. Study on preparation and antioxidant activities of fractionation polysaccharide by alcohol in *Auricularia auricular* [D]. Harbin: Northeast Forest University, 2011
- [8] 樊黎生,龚晨睿,张声华.黑木耳多糖抗辐射效应的动物实验[J].营养学报,2005,27(6):525-526
FAN Li-sheng, GONG Chen-wei, ZHANG Sheng-hua. Study on radio-protective effects of the polysaccharide from *Auricularia auricular* in mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2005, 27(6): 525-526
- [9] Ma Jiang-wei, Qiao Zeng-yong, Xiang Xia. Optimisation of extraction procedure for black fungus polysaccharides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(3): 1061-1068
- [10] Min Shi, Yin-gnan Yang, Xuan-sheng Hu, et al. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue [J]. Food Chemistry, 2014, 155(10): 50-56
- [11] Xiao-bo Sun, Chen Zhao, Wei Pan, et al. Carboxylate groups play a major role in antitumor activity of *Ganoderma applanatum* polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers,

- 2015, 123: 283-287
- [12] Ke-xue Zhu, Shao-ping Nie, Chuan Li, et al. A newly identified polysaccharide from *Ganoderma atrum* attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 57(6): 142-150
- [13] 毛泉明,叶福提,吴倩,等.栽培灵芝与灵芝孢子粉有效成分含量比较[J].药学实践杂志,1997,15(3):172-173
MAO Quan-ming, YE Fu-ti, WU Qian, et al. Determination of amantadine hydrochloride syrup by acid dye colorimetry [J]. The Journal of Pharmaceutical Practice, 1997, 15(3): 172-173
- [14] X L Li, A G Zhou, X M Li. Inhibition of Lycium barbarum polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by γ -irradiation in rat liver mitochondria [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(1): 172-178
- [15] Jie Jia, Xi Zhang, Yong-shan Hu, et al. Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats [J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 32-36
- [16] 王君巧,聂少平,余强,等.黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J].食品科学,2012,30(23):274-277
WANG Jun-qiao, NIE Shao-ping, YU Qiang, et al. Immune modulation and antioxidation activity of polysaccharides from *Ganoderma atrum* in Immunosuppressed Mice [J]. Food Science, 2012, 30(23): 274-277
- [17] Elena Figuera, Mena Soory, Rocío Cerero, et al. Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, coenzyme Q10, pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts [J]. Steroids, 2006, 71(12): 1062-1072
- [18] NY/T 1676-2008 食用菌粗多糖测定[S].2008
NY/T 1676-2008 Determination of crude mushroom polysaccharides [S]. 2008
- [19] GB/T8313-2008 茶叶中多酚和儿茶素测定[S].2008
GB/T8313-2008 Determination of total polyphenols and catechins content in tea [S]. 2008
- [20] H B Li, C C Wong, K W Cheng, et al. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41: 385-390
- [21] Ming-hua Li, Yan Xu, Wen-jian Yang, et al. *In vitro* synergistic anti-oxidant activities of solvent-extracted fractions from *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(8): 1745-1751
- [22] Shan-shan Wang, Dong-mei Wang, Ze-hua Liu. Synergistic, additive and antagonistic effects of *Potentilla fruticosa* combined with EGb761 on antioxidant capacities and the possible mechanism [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 67: 227-238
- [23] 王岳飞,李磊,谢争珍,等.茶多酚西洋参抗氧化活性比较及协同增效作用研究[J].中外医疗,2008,27(29):68
WANG Yue-fei, LI Lei, XIE Zheng-zhen, et al. Study on comparison and synergistic effect of tea polyphenols and Panax quinquefolius combination on antioxidation activity [J]. China and Foreign Medical Treatment, 2008, 27(29): 68
- [24] 白海娜,王振宇,李辉,等.五种浆果多酚与黑木耳多糖复合物的辐射防护作用[J].食品工业科技,2013,34(16):117-120, 124
BAI Hai-na, WANG Zhen-yu, LI Hui, et al. Effect of five berry polyphenols and *Auricularia auricular* polysaccharides combination on radiation protection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(16): 117-120, 124
- [25] 白海娜,王振宇,张华,等.多酚类化合物与黑木耳多糖协同抗氧化作用研究[J].食品工业科技,2013,34(22):124-127, 134
BAI Hai-na, WANG Zhen-yu, ZHANG Hua, et al. Study on synergistic effect of polyphenols and an *Auricularia auricular* polysaccharides combination on antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(22): 124-127, 134
- [26] M Shiraki, Y Hara, T Osawa, et al. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea [J]. Mutation Research, 1994, 323(1-2): 29-34
- [27] C Rice-Evans, B Halliwell, G G Lunt. Free radicals and oxidative stress: Environment, drugs and food additives [M]. London: Portland Press Ltd., 1995
- [28] S. Nie, H Zhang, W Li, et al. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: isolation, structure and bioactivities [J]. Bioact. Carbohydrates Dietary Fibre, 2013, 1: 10-20
- [29] Pan Yi, Nai-sheng Li, Jian-bo Wan, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide from *Ganoderma capense* [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 121(5): 183-189
- [30] C-W Ma, M Feng, X Zhai, et al. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities [J]. J. Taiwan. Inst. Chem. Eng., 2013, 44(6): 886-894
- [31] Isabel C F R Ferreira, Sandrina A Heleno, Filipa S Reis, et al. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with

- antioxidant, antitumor and antimicrobial activities [J].
Phytochemistry, 2015, 114: 38-55
- [32] P F Kao, S H Wang, W T Hung, et al. Structural
characterization and antioxidative activity of low-molecular-
weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted
Ganoderma lucidum fruiting bodies [J]. J. Biomed.
Biotechnol., 2011, 2102: 1-8

现代食品科技