

# 酶促乙酰化 EGCG 清除自由基及抗脂质过氧化活性研究

朱松<sup>1,2</sup>, 马朝阳<sup>2</sup>, 艾连中<sup>3</sup>, 娄在祥<sup>2</sup>, 王洪新<sup>2</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122) (2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

(3. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

**摘要:** 利用脂肪酶 Lipozyme RM IM 在乙腈反应体系中催化表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与乙酸乙烯酯进行乙酰化反应, 得到 EGCG 乙酰化产物。通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)和红外光谱对乙酰化产物进行了确证, 其产物为不同取代度的混合物。反应前后红外图谱对照表明, 乙酰化后 EGCG 主体结构类似, 但增加了明显的羰基、甲基吸收峰。通过测定乙酰化 EGCG 对超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )、DPPH 自由基的清除能力, 研究其体外抗氧化活性, 结果表明乙酰化 EGCG 对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH 均具有较强的清除能力, 半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 分别为 0.52 mg/mL、0.43 mg/mL 和 11.5 mg/L。体外抗脂质过氧化实验表明当乙酰化 EGCG 浓度为 320 mg/L 时, 对  $H_2O_2$  诱导大鼠肝线粒体丙二醛 (MDA) 生成的抑制率为 61.11%, 对  $H_2O_2$  诱导大鼠红细胞氧化溶解的抑制率达 93.54%。乙酰化 EGCG 具有良好的体外抗氧化活性, 其浓度与抗氧化活性呈现一定的量效关系。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 乙酰化; 体外; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2014)1-22-27

## Free Radicals Scavenging and Inhibition of Lipid Peroxidation Activity of the Enzymatic Acetylated EGCG

ZHU Song<sup>1,2</sup>, MA Chao-yang<sup>2</sup>, AI Lian-zhong<sup>3</sup>, LOU Zai-xiang<sup>2</sup>, WANG Hong-xin<sup>2</sup>

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (2.School of Food

Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (3.College of Medical Instrument and Food

Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) acetylated derivatives were prepared by enzymatic acylation with vinyl acetate and catalyzed by Lipozyme RM IM in acetonitrile. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and infrared (IR) spectrometry were used to confirm the acetylated EGCG product. It indicated that the product was a mixture of different degrees of substitutions. IR spectra showed that the acetylated EGCG derivatives had two strong absorption peaks of carbonyl and methyl, and the other parts were similar to EGCG. The antioxidant activity of acetylated EGCG *in vitro* was investigated by measuring scavenging effects of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The acetylated EGCG was found to have good scavenging effects on  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  and DPPH and the 50% inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were 0.52 mg/mL, 0.43 mg/mL and 11.5 mg/L, respectively. Anti-lipid peroxidation experiments showed that the inhibition rates of malonyldialdehyde (MDA) formation in rat liver mitochondria and hemolysis for rat red blood cells induced by  $H_2O_2$  were 61.11% and 93.54%, respectively, when acetylated EGCG concentration was 320 mg/L. Therefore, acetylated EGCG had strong antioxidant activity *in vitro*, and their antioxidant activity is positively related to their concentration.

**Key words:** (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate; acetylation; *in vitro*; antioxidant activity

儿茶素是茶叶中最重要的生理活性物质, 约占茶多酚总量的 60~80%, 是茶叶保健功能的主要物质成

收稿日期: 2013-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071601); “十二五” 国家科技支撑计划课题 (2012BAD33B05)

作者简介: 朱松 (1979-), 男, 工程师, 主要从事生物活性物质制备及功能性研究

通讯作者: 王洪新 (1964-), 男, 博士, 教授, 主要从事食品天然功能因子的研究开发

分。儿茶素中以表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 含量最高, 约占儿茶素总量的 50% 左右<sup>[1]</sup>。EGCG 分子结构上的 8 个酚性羟基, 使其成为一种不可多得的安全无毒的天然强抗氧化剂, 具有优异的抗氧化<sup>[2-3]</sup>、抗突变、防辐射、抗肿瘤<sup>[4-5]</sup>、调节免疫和延缓衰老<sup>[6]</sup>等生理活性作用, 近来有关 EGCG 的研究引人注目, 但就其应用而言, 目前还存在以下问题: ①EGCG 的多羟基水溶性限制了其在脂类产品中的应用, 特别是作为油脂类抗氧化剂, 在油脂中难以加至有效的抗氧

化浓度阈值;②在人体功效方面,由于脂溶性差 EGCG 不易透过双脂层细胞膜,难以到达靶向作用点,从而导致可有效利用的浓度很低,大大降低其生物利用度<sup>[7-8]</sup>。基于以上存在的问题,对其结构进行分子修饰已成为当前研究的热点之一。

有关 EGCG 分子修饰的研究主要是利用生物或化学合成的方法,对其分子上的羟基进行乙酰化或酯化。在采用化学方法酰化的过程中,由于 EGCG 羟基较多,且所处环境相似,每一个羟基均有可能与酰化试剂形成酯键,故此类化合物的区域选择性合成一直是有机合成中颇具挑战性的问题。利用化学法酰化 EGCG 存在诸多缺点:区域选择性差;产物产率低;反应耗时长;分离纯化困难等<sup>[9]</sup>。而酶促酰化 EGCG 具有反应条件温和,区域选择性高,副反应少,反应步骤少,环境友好等优点。本文通过非水相脂肪酶催化作用,表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与乙酸乙烯酯反应制备得到乙酰化 EGCG。采用抑制 DPPH·、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、·OH 的反应体系实验,抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导大鼠肝脏线粒体脂质过氧化实验,抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导大鼠红细胞溶血实验,来评价乙酰化 EGCG 的抗氧化性能,并与 EGCG 进行比较,从而为 EGCG 的分子修饰及其功能性开发提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),杭州禾田生物技术有限公司;Lipozyme RM IM 脂肪酶,诺维信生物技术有限公司;乙酸乙烯酯,分析纯;乙腈,分析纯;二苯代苦味肼基自由基(DPPH),美国Sigma公司;TBHQ,分析纯;Vc,分析纯;抗超氧阴离子自由基测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;羟自由基测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。丙二醛(MDA)试剂盒,南京建成生物工程研究所;牛血清蛋白,美国Sigma公司;试验动物SPF级昆明种大白鼠,雄性,体重120.0±2.0 g,许可证号:SCXK(沪)2005-0008,上海思瑞达生物科技有限公司。

### 1.2 主要仪器及设备

DF-101S 集热式磁力加热搅拌器,金坛市医疗仪器厂;DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司;KA-RV10 型旋转蒸发仪,德国 IKA 公司;C-MAG HS7 磁力搅拌器,德国 IKA 公司;真空干燥箱,上海一恒科技有限公司;UV-1100 型紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;分析天

平, METTLER TOLEDO 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 乙酰化EGCG的酶法制备

准确称量250 mg EGCG, 12.5 mg Lipozyme RMIM 脂肪酶,置于具塞玻璃瓶中,再用量筒准确加入47.5 mL 乙酸乙烯酯和100 mL乙腈,放入转子,置于磁力加热搅拌器中,于45 °C恒温水浴加热10 h。反应结束后,将反应液过滤,采用旋转蒸发仪将溶剂蒸干,后置于真空干燥箱中真空干燥2 h。将所得粉末收集起来,放入干燥器中,密封保存,备用。

#### 1.3.2 红外光谱法定性EGCG乙酰化产物

采用KBr压片法制作样品,取EGCG和乙酰化EGCG各5 mg,分别与50 mg干燥的KBr粉末在玛瑙研钵中混匀,充分研磨后,约取10~30 mg装填到模具中,用手柄式压片机制成半透明的晶片。将两种样品晶片分别进行红外光谱扫描,分辨率:4 cm<sup>-1</sup>,扫描次数:32次。

#### 1.3.3 LC-MS/MS确证EGCG乙酰化产物

色谱条件:色谱仪WATERS ACQUITY UPLC;检测器WATERS ACQUITY PDA;分析柱BEH C18 2.1×100 mm, 1.7 μm;流动相20%乙腈+0.1%甲酸;柱温45 °C;检测波长220 nm;流速0.3 mL/min;进样量1 μL。质谱条件:离子方式ESI<sup>+</sup>;毛细管电压3.5 kV;锥孔电压45 V;离子源温度100 °C;脱溶剂气温度300 °C;碰撞能量6 eV;质量范围50~2000 m/z;电压1600~1700 V。

#### 1.3.4 提取物抗氧化活性测定方法

DPPH·清除能力参照文献<sup>[10]</sup>的方法;羟基自由基清除能力参照文献<sup>[11]</sup>的方法;超氧阴离子自由基清除能力参照文献<sup>[12]</sup>的方法,并做适当改进。

#### 1.3.5 IC<sub>50</sub>值的计算

IC<sub>50</sub>为样品对自由基清除率为50%时,对应的样品浓度。IC<sub>50</sub>越小,清除作用越强,抗氧化活性越强。本研究以样品质量浓度与清除率绘制曲线图,通过曲线拟合,得到当清除率达到50%时所对应的样品质量浓度,即样品的IC<sub>50</sub>。

#### 1.3.6 大鼠肝脏线粒体制备

取大鼠肝组织在冰浴下以0.25 mol/L蔗糖溶液制成10%匀浆,3000 r/min 4 °C离心20 min,沉淀用冷的0.25 mol/L蔗糖洗两次,合并上清液。10000 r/min 4 °C离心20 min,沉淀用冷的0.25 mol/L蔗糖洗两次,合并沉淀。所得沉淀即为线粒体。沉淀用缓冲溶液(Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.4, KCl 0.18 mol/L)制成悬浮液,用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,0~4 °C储存

备用。

### 1.3.7 抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠肝脏线粒体脂质过氧化作用

取线粒体悬浮液 3 mL, 内含 1.0 mg 线粒体蛋白, 依次加入 0.2 mL 不同浓度的样品 (终浓度分别为 20、40、80、160、320 mg/L EGCG, 20、40、80、160、320 mg/L 乙酰化 EGCG), 0.1 mL 的 0.2 mol/L, pH=7.4 的 Tris-HCL 缓冲溶液, 0.05 mL 3.5 mol/L 的 KCl 溶液, 加入 0.1 mL 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 (空白组以等体积生理盐水代替样品溶液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 对照组以等体积生理盐水代替样品溶液), 37 °C 温育 1 h 后并与冷却取出按 MDA 测定试剂盒方法操作测 MDA 含量和 A<sub>532</sub>。

$$\text{抑制率}/\% = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

### 1.3.8 大鼠红细胞制备

先制备抗凝管 (取 0.3 g 肝素钠加到 7 mL 生理盐水中, 用配好的溶液分别润湿带试管塞的试管, 放入干燥箱 40 °C), 从大鼠眼眶取血, 滴入抗凝管中, 盖好塞子, 以 3000×g 离心 10 min, 分离得到红细胞, 冷生理盐水洗涤红细胞三次, 再以生理盐水制备成 0.5% 大鼠红细胞悬浮液, 备用。

### 1.3.9 抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠红细胞溶血实验

样品组: 取 1 mL 红细胞悬浮液, 加入 0.2 mL 不同浓度样品溶液 (终浓度分别为 20、40、80、160、320 mg/L EGCG, 20、40、80、160、320 mg/L 乙酰化 EGCG) 混匀, 加入 0.1 mL 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 混匀, 37 °C 温育 1 h 后, 以生理盐水稀释 6 倍, 1000×g 离心 10 min, 取上清液, 以生理盐水调零, 于 415 nm 处比色测定吸光度。空白组: 以等体积生理盐水代替样品液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 其余同样品组。对照组: 以等体积生理盐水代替样品液, 其余同样品组。分别以吸光度计算溶血度和抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

$$\text{溶血率}/\% = (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

## 1.4 数据分析

数据用平均值±标准偏差 (X±SD) 表示, 试验重复次数n=3, 组间差异进行方差分析及t检验, 用SAS 8.2 软件完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 EGCG 乙酰化产物的确证

利用脂肪酶Lipozyme RM IM在乙腈反应体系中催化EGCG与乙酸乙烯酯进行乙酰化反应, 得到EGCG乙

酰化产物 (反应过程见图1), 图2为EGCG乙酰化产物的LC-MS/MS分析结果, EGCG的分子量为458, 一个羟基上的氢被一个乙酰基取代, 分子量增加42。通过选择离子分析, 4.77 min色谱峰分子量为459 (M+H), 可以认为是未转化的EGCG。5.6~6.2 min的三个小峰, 分子量均为501, 是EGCG的一个羟基上的氢被一个乙酰基取代的产物, 出现三个小峰可能是因为取代位置不同。在6.6~7.0 min处的三个峰分子质量为543, 是不同位置上二取代的产物。7.2~7.8 min的三个峰, 分子量为585, 是不同位置上三取代的产物。经质谱确证, 用酶法分子修饰EGCG后得到了不同取代度的乙酰化产物, 产物的转化率为89.57%。

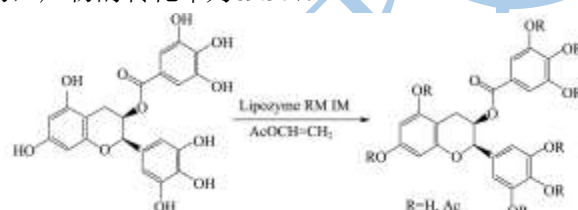


图1 EGCG 酶法乙酰化反应过程

Fig.1 The reaction process of enzymatic acetylation of EGCG

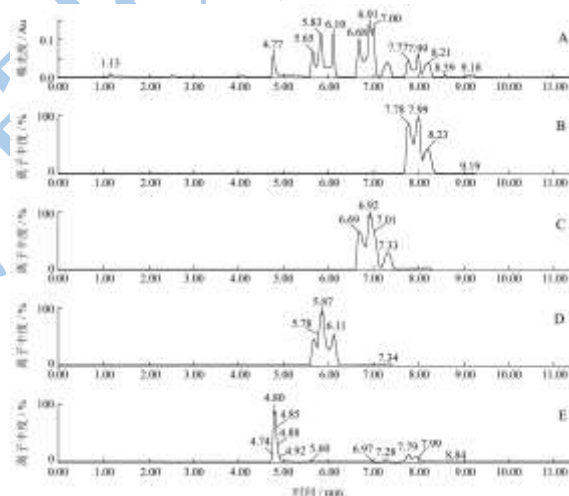


图2 EGCG 酰化产物质谱分析结果

Fig.2 LC-MS/MS results of acetylated EGCG

注: A: 乙酰化反应后产物在 280 nm 下的液相色谱图; B: EGCG 分子中 3 个羟基被乙酰化产物 (Mw=585) 的质谱选择离子图; C: EGCG 分子中 2 个羟基被乙酰化产物 (Mw=543) 的质谱选择离子图; D: EGCG 分子中 1 个羟基被乙酰化产物 (Mw=501) 的质谱选择离子图; E: EGCG 分子 (Mw=459) 的质谱选择离子图。

### 2.2 乙酰化 EGCG 产物的红外光谱分析

图3是 EGCG 的红外光谱图, 图4是乙酰化 EGCG 的红外光谱图, 从两张图中可以看到二者有两处明显的不同, 首先乙酰化 EGCG 在 1738.4 cm<sup>-1</sup> 处有一个明显的吸收峰, 这是羰基(C=O)酯键的特征吸收峰, 说

明 EGCG 中的羟基 (-OH) 被乙酰基所取代, 形成了酯键; 其次乙酰化 EGCG 的红外光谱图中, 在2970.4  $\text{cm}^{-1}$ 处, 有一个吸收峰, 此处是烷烃中甲基(-CH<sub>3</sub>)伸缩振动的特征吸收峰, EGCG 分子结构中没有烷烃存在, 而乙酰基中含有一个甲基, 说明在乙酰化 EGCG 样品中存在乙酰基结构。通过 EGCG 反应前后红外图谱对照分析进一步证明酶法乙酰化 EGCG 是成功的。

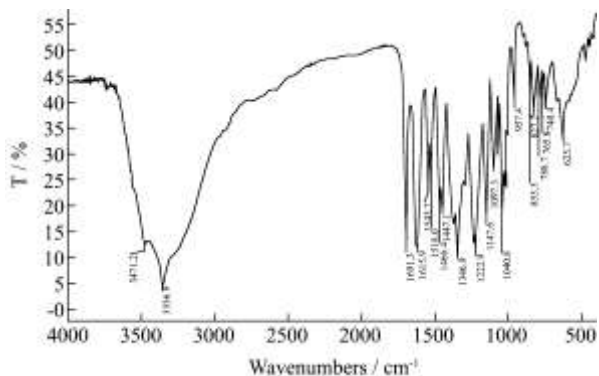


图3 EGCG的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrogram of EGCG

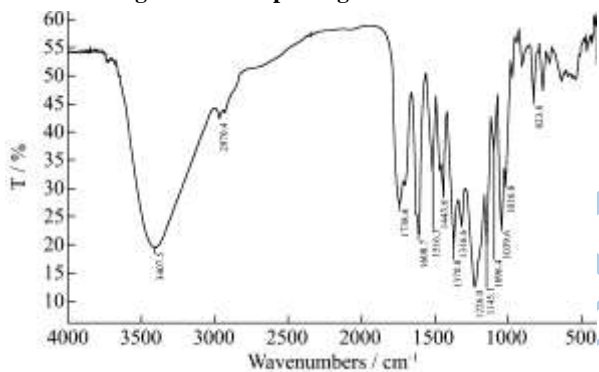


图4 乙酰化EGCG的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrogram of acetylated EGCG

### 2.3 乙酰化 EGCG 对超氧阴离子自由基的抑制作用

超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 本身不太活泼, 但可通过歧化反应和其它反应途径产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\cdot\text{OH}$ , 是生物体系中自由基产生的根源。人体内有一定数量的超氧阴离子自由基存在, 不发生化学变化时对人体无害, 但是一旦与羟基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 结合后, 其产物会导致细胞 DNA 损伤, 破坏人类机体功能<sup>[12]</sup>。不仅  $\text{O}_2^{\cdot-}$  本身有毒害作用, 而且其衍生的自由基也具有细胞毒性, 会导致细胞 DNA 损伤及细胞膜损伤, 所以本实验研究了乙酰化 EGCG 的清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  能力。

根据抗超氧阴离子自由基测定试剂盒的方法, 测得不同浓度的抗氧化剂的超氧阴离子自由基抑制率结果如图5。由图5可知: 在0.1~0.7  $\text{mg/mL}$ 浓度范围内, 随着抗氧化溶液浓度的增大, 测得清除超氧阴离子能力也逐渐增大。不同抗氧化剂质量浓度与超氧阴离子自由基抑制率之间呈量效关系。在0.5  $\text{mg/mL}$ 浓度下, Vc样品溶液的抗超氧阴离子自由基抑制率最高, 达到87.82%; EGCG为41.32%, 乙酰化EGCG和TBHQ的抑制率相当, 分别为35.52%和36.49%。结果表明清除超氧阴离子自由基抑制率能力大小为: Vc>EGCG>TBHQ~乙酰化EGCG。

随着抗氧化溶液浓度的增大, 测得清除超氧阴离子能力也逐渐增大。不同抗氧化剂质量浓度与超氧阴离子自由基抑制率之间呈量效关系。在0.5  $\text{mg/mL}$ 浓度下, Vc样品溶液的抗超氧阴离子自由基抑制率最高, 达到87.82%; EGCG为41.32%, 乙酰化EGCG和TBHQ的抑制率相当, 分别为35.52%和36.49%。结果表明清除超氧阴离子自由基抑制率能力大小为: Vc>EGCG>TBHQ~乙酰化EGCG。

随着抗氧化溶液浓度的增大, 测得清除超氧阴离子能力也逐渐增大。不同抗氧化剂质量浓度与超氧阴离子自由基抑制率之间呈量效关系。在0.5  $\text{mg/mL}$ 浓度下, Vc样品溶液的抗超氧阴离子自由基抑制率最高, 达到87.82%; EGCG为41.32%, 乙酰化EGCG和TBHQ的抑制率相当, 分别为35.52%和36.49%。结果表明清除超氧阴离子自由基抑制率能力大小为: Vc>EGCG>TBHQ~乙酰化EGCG。

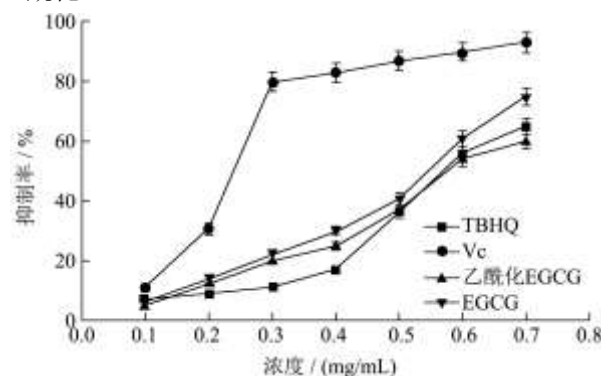


图5 乙酰化EGCG清除超氧阴离子能力

Fig.5  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging activity of acetylated EGCG

### 2.4 乙酰化 EGCG 清除羟基自由基能力

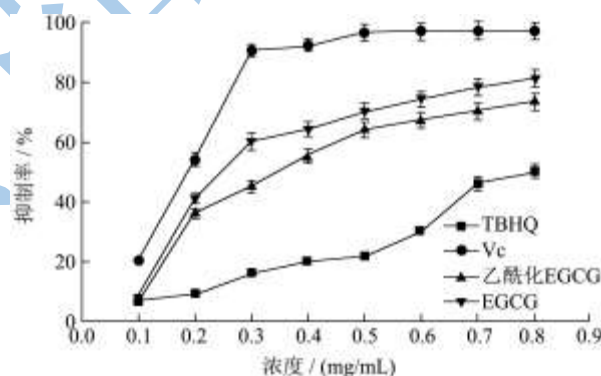


图6 乙酰化EGCG清除羟基自由基能力

Fig.6  $\cdot\text{OH}$  scavenging activity of acetylated EGCG

$\cdot\text{OH}$ 是已知的存在于需氧生物代谢过程中的氧化性最强的氧自由基, 几乎可以和所有的生物大分子发生不同类型的反应, 具有非常高的速率常数, 其危害最大, 能够引起膜脂、蛋白质和核酸的氧化损伤, 导致细胞衰老、死亡和机体病变<sup>[11]</sup>。机体内的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可变为 $\cdot\text{OH}$ , 能产生 $\cdot\text{OH}$ 的体系还有Fenton反应体系、还原性谷胱甘肽- $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系、烟酰胺腺嘌呤磷酸二核苷酸- $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系、邻菲啉-抗坏血酸- $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系、抗坏血酸- $\text{Cu}^{2+}$ 体系等。本实验采用的是Fenton反应体系体系来检测不同浓度抗氧化剂清除 $\cdot\text{OH}$ 的效果, 结果如图6所示。由图6可知: 在0.1~0.8  $\text{mg/mL}$ 浓度范围内, 随着抗氧化溶液浓度的增大, 测得羟自由基抑制率也逐渐增大。不同抗氧化剂质量浓度与 $\cdot\text{OH}$ 清除率呈量效关系。

0.5 mg/mL浓度的四种抗氧化剂样品,测得的羟自由基抑制率值:Vc最高,为97.82%;TBHQ最低,为23.49%;EGCG为69.67%;乙酰化EGCG为62.52%。以上数据表明羟自由基抑制率大小顺序为:Vc>EGCG>乙酰化EGCG>TBHQ。

### 2.5 乙酰化 EGCG 清除 DPPH· 能力

表1 不同抗氧化剂对DPPH自由基的清除作用

Table 1 DPPH radical scavenging activities of different

antioxidant		
样品	抑制率/%*	IC50 浓度/(mg/L)
Vc	94.43±4.85	8.51
EGCG	88.34±4.01	9.85
乙酰化 EGCG	87.24±3.87	11.5
TBHQ	84.28±3.21	12.8

注: \*抑制率为浓度为 200μg/mL 时的抑制率

DPPH·是一种具有稳定的未配对电子的化合物,在 517 nm 处有一强吸收,使其乙醇溶液呈深紫色,而当有自由基清除剂存在时,由于其单电子配对而使其吸收逐渐消失,继而褪色,其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系。实验测得 EGCG、乙酰化EGCG、TBHQ、Vc 的 DPPH 自由基抑制率结果如表 1 所示。从 IC<sub>50</sub> 浓度来看,四种抗氧化剂的 DPPH·抑制率由大到小的顺序是: Vc>EGCG>乙酰化EGCG>TBHQ。乙酰化 EGCG 组的 DPPH·清除率与 EGCG 相比有所下降,可能因为在乙酰化过程中,将 EGCG 中具有清除自由基活性的羟基进行了部分的取代,在提升了 EGCG 的脂溶性的同时,其清除自由基能力必然要有所损失,但总体损失的程度较小,还保留了较强的清除自由基能力。但与 TBHQ 相比,乙酰化 EGCG 的 DPPH·清除率要略高一些。

### 2.6 乙酰化 EGCG 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导大鼠肝脏线粒体脂质过氧化作用

机体通过酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,如醛基(MDA)、酮基、羟基、羰基、氢过氧基或内过氧基,以及新的氧自由基等。产物中的有害物质能引起细胞代谢及功能障碍甚至死亡,因此机体中MDA含量的变化可反应机体内脂质过氧化化的程度<sup>[13]</sup>。Fe<sup>2+</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>都是很强的自由基诱导剂,在大鼠肝脏线粒体中添加Fe<sup>2+</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,其产生的MDA显著增加。乙酰化EGCG和EGCG对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠肝脏线粒体MDA生成的影响结果见表2。与正常组相比,在

加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>之后,对照组机体中的MDA含量显著增加,说明·OH可促使大鼠肝线粒体脂质过氧化反应。当加入不同浓度的乙酰化EGCG和EGCG后,MDA的生成量显著减少,表明乙酰化EGCG和EGCG在20~320 mg/L范围内都能有效抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠肝线粒体的氧化作用,抑制率随着他们浓度的增加而提高,并存在一定的量效关系。在EGCG浓度为320 mg/L时,抑制率能达到69.44%。总体而言,EGCG抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠肝脏线粒体脂质过氧化能力比乙酰化EGCG稍强。

表2 乙酰化 EGCG 和 EGCG 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导大鼠肝线粒体抗氧化性影响 (n=3, X±SD)

Table 2 Effect of acetylated EGCG and EGCG on lipid peroxidation of liver induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

组别	浓度/(mg/L)	抑制率/%	MDA 生成量/(nmol/mg pro)
空白组	/	/	0.65±0.07
对照组	/	/	6.54±0.16
EGCG 样品组	320	69.44±4.08*	2.45±0.14*
	160	58.33±3.07*	3.11±0.16*
	80	47.22±2.25**	3.76±0.18**
	40	25.00±1.07**	5.07±0.20**
	20	16.67±0.31**	5.56±0.10**
乙酰化 EGCG 样品组	320	61.11±1.65*	2.94±0.08*
	160	47.22±2.25*	3.76±0.18*
	80	41.67±2.84*	4.09±0.28*
	40	19.44±0.75**	5.39±0.21**
	20	13.89±0.98**	5.72±0.31**

注: \*:P<0.05, \*\*:P<0.01与对照组比,下同。

### 2.7 乙酰化 EGCG 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导大鼠红细胞溶血实验

红细胞具有典型的生物细胞膜结构,容易获得,被广泛地应用于膜脂质过氧化的研究中。生物体内红细胞处于充足的氧环境中,含有启动和催化脂质过氧化反应的金属络合物血红蛋白,且膜上富含多价不饱和脂肪酸,这些特点均使得红细胞对氧化损伤极为敏感。因而考察抗氧化剂对红细胞结构和功能的影响被公认为是研究细胞氧化损伤的重要方法之一<sup>[14]</sup>。本试验通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化,加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后红细胞溶血量显著高于正常组,说明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>使红细胞膜受氧化而损伤,胞内容物外流。在体系中加入不同浓度的乙酰化EGCG和EGCG后,可显著抑制红细胞的氧化损伤。由表3可见,在浓度为80 mg/L时,乙酰化EGCG和EGCG的溶血率分别为20.92%和18.31%,抑制率分别为79.08%和81.69%,

随着乙酰化EGCG和EGCG浓度的增加,对抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠红细胞氧化溶血的效果越好,且呈良好的剂量关系。乙酰化EGCG与EGCG对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠红细胞溶血能力相差不大,EGCG比乙酰化EGCG略强。

表3 不同浓度乙酰化EGCG与EGCG抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠红细胞溶血结果

Table 3 Effect of acetylated EGCG and EGCG on erythrocytic hemolysis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

组别	浓度/(mg/L)	抑制率/%	溶血率/%
空白组	/	/	16.67±0.58
对照组	/	/	100
EGCG 样品组	320	96.31±2.95**	3.69±0.05**
	160	89.85±2.70**	10.15±0.31**
	80	81.69±2.64*	18.31±0.59**
	40	71.23±2.75*	28.77±1.09*
	20	58.62±1.25*	41.38±2.08*
乙酰化EGCG 样品组	320	93.54±2.60**	6.46±0.08**
	160	84.77±2.51**	15.23±0.53**
	80	79.08±1.78*	20.92±0.49**
	40	69.08±1.97*	30.92±1.12*
	20	58.15±1.09*	41.85±1.98*

### 3 结论

由于EGCG含有多个酚羟基,脂溶性较差,导致其不易透过双脂层细胞膜,难以到达靶向作用点,从而可有效利用的浓度很低,大大降低其生物利用度。目前有关改善EGCG脂溶性分子修饰的研究主要是对其分子上的羟基进行酰化或酯化。本文通过非水相脂肪酶催化作用,EGCG与乙酸乙烯酯反应制备得到乙酰化EGCG。测定了乙酰化EGCG对超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、羟基自由基(·OH)、DPPH自由基的清除能力。结果表明,乙酰化对O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、·OH、DPPH均具有较强的清除能力,其浓度与抗氧化活性呈现一定的量效关系。比较了EGCG、脂溶性EGCG、TBHQ和Vc的抗氧化能力,结果清除氧阴离子自由基抑制率能力为:Vc>EGCG>TBHQ≈乙酰化EGCG。羟自由基抑制率能力为:Vc>EGCG>乙酰化EGCG>TBHQ。DPPH抑制率能力为:Vc>EGCG>乙酰化EGCG>TBHQ。通过体外抗脂质过氧化实验,乙酰化EGCG能够明显抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠肝线粒体MDA生成和抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠红细胞溶血作用。总体而言,乙酰化EGCG的抗氧化能力与EGCG相比有所下降,这是由于在乙酰化过程中,EGCG分子中的酚羟基被乙酰基部分取代,在提升了EGCG的脂溶性的同时,其清除自由基能力有所损失,但总体损失的程度较小,还保留了较强的体外抗氧化

活性。

### 参考文献

- [1] Chaturvedula V S P, Prakash I. The aroma, taste, color and bioactive constituents of Tea [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(11): 2110-2124
- [2] Dai F, Chen W F, Zhou B. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles [J]. Biochimie., 2008, 90: 1499-1505
- [3] Devika P T, Stanely M P P. Protective effect of (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG) on lipid peroxide metabolism in isoproterenol induced myocardial infarction in male Wister rats: A histopathological study [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2008, 62(10): 701-708
- [4] Mitsuyo N, Masatoshi Y, Sumiko W, et al. Inhibitory effect of the tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate, on growth of cervical adenocarcinoma cell lines [J]. Cancer Letters, 2006, 234(2): 135-142
- [5] Larsen CA, Dashwood RH. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits Met signaling, proliferation, and invasiveness in human colon cancer cells [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010, 501(1): 52-57
- [6] Zhang LZ, Jie GL, Zhang JJ, et al. Significant longevity-extending effects of EGCG on C.elegans under stresses [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2009, 46: 414-421
- [7] Sang S, Lambert JD, Yang CS. Bioavailability and stability issues in understanding the cancer preventive effects of teapolyphenols [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2006, 86(14): 2256-2265
- [8] Henning SM, Niu Y, Lee NH, et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement [J]. American journal of clinical nutrition, 2004, 80(6): 1558-1564
- [9] 卢聪聪,邵卫梁,杭晓敏,等.两种茶多酚化学改性制备的脂溶性茶多酚抗氧化性能研究[J].安徽医药,2008,12(3):201-204  
LU Cong-cong, SHAOWei-liang, HANG Xiao-min, et al. Two kinds of chemicalmodification on tea polyphenols and study on the antioxidant activity of the lipid-soluble tea polyphenols [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2008, 12(3): 201-204
- [10] Zhu KX, Zhou HM, Qian HE. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1296-1302

- [11] Li YH, Jiang B, Zhang T. Antioxidant and free radical scavenging activities of chick pea protein hydrolysate(CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 444-450
- [12] Yuan JF, Zhang ZQ, Zhi CF, et al. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from Ligusticum chuanxiong Hort [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74: 822-827
- [13] Junhui Zhang, Hui Zhang, Li Wang, et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysates: identification of the active peptide[J]. European Food Research and Technology, 2009, 229: 709-719
- [14] Zhang Z, Wang S, Qiu H, et al. Waltonitone induces human hepatocellular carcinoma cells apoptosis in vitro and in vivo[J]. Cancer Letter, 2009, 286(2): 223-230

现代食品科技