

分类号：TS217

密 级：公开

单位代码：10363

学 号：2210510104

茶黄素分离纯化及其抗氧化与 TFDG 抑制 α -葡萄糖
苷酶机制研究

ISOLATION, PURIFICATION AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF THEAFLAVINS AND THE MECHANISM OF
INHIBITION OF α -GLUCOSIDASE BY TFDG

姓 名： 曹宇凡

指导教师： 蔡为荣

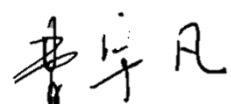
专 业： 食品科学与工程

研究方向： 食品功能因子

论文答辩日期：2024 年 06 月 03 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确和隐含的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学术论文作者签名： 

日期：2024年06月03日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后使用本版权书

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：曹宇凡

指导教师签名：李万荣

日期：2024 年 06 月 03 日

日期：2024 年 06 月 03 日

茶黄素分离纯化及其抗氧化与 TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶机制研究

摘 要

本文基于对茶叶加工中产生的碎末进行开发再利用，而研究红茶中重要功能活性成分茶黄素。目前对茶黄素的研究主要集中在茶黄素（Theaflavin，TF1）、茶黄素-3-没食子酸酯（Theaflavin-3-gallate，TF2A）、茶黄素-3'-没食子酸酯（Theaflavin-3'-gallate，TF2B）和茶黄素-3, 3'-双没食子酸酯（Theaflavin-3,3'-digallate，TFDG）这四个单体物质的生理活性功能上，但部分生物活性机制尚缺乏深度解析。本研究以红茶粉末为原料，从中提取、分离、纯化茶黄素，研究其抑制 α -葡萄糖苷酶的机制，并联合密度泛函理论方法和体外抗氧化实验研究其抗氧化活性。主要研究内容如下：

（1）基于单因素实验确定茶黄素的提取分离条件为：提取时间 80 min，提取温度为 80℃，料液比 1：30，纯度为 35.66%。经 30% 乙醇除杂后，大孔树脂分离得到的茶黄素纯度提升到了 59.86%。根据分配系数 K 和分离因子 α ，确定以乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水（3：1：1：6）为溶剂体系，进行高速逆流色谱纯化，分离出六个组分，经高效液相色谱和质谱检测和鉴别，确定 F2 组分为 TF1，纯度为 93.61%；F4 组分为 TFDG，纯度为 94.42%；F3 组分为 TF2A 和 TF2B 的混合物，纯度分别为 54.71%和 37.87%。

(2) 以高速逆流色谱 (HSCCC) 分离出的后四个组分对 α -葡萄糖苷酶进行体外抑制实验, 根据 IC_{50} 值选取抑制效果最好的 TFDG ($IC_{50}=1.945\pm0.097 \mu\text{g/mL}$) 进行后续酶抑制动力学、多光谱、分子对接实验。结果表明抑制是可逆的, 并呈现竞争性和非竞争性混合抑制, 且只有一类结合位点; TFDG 与 α -葡萄糖苷酶形成复合物来猝灭其固有荧光, 两者之间距离为 2.54 nm; 正值的 ΔH° ($102.54 \text{ kJ mol}^{-1}$)、 ΔS° ($443.19 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) 和负值的 ΔG° 表明结合是自发吸热熵增的, 且疏水相互作用是主要驱动力; 结合改变了 α -葡萄糖苷酶的构象和二级结构含量, 增强了酪氨酸残基附近的疏水性和色氨酸残基周围的极性, α -螺旋、 β -折叠和 β -转角含量降低, 无规则卷曲含量增加。分子对接显示 TFDG 结合在酶活性位点附近, 并与附近氨基酸残基 Phe450、Trp406 之间存在两种疏水相互作用, 且与 Asp203、Phe 450、G1603 形成三个氢键。

(3) 以 ABTS⁺、DPPH[•]、 $\cdot\text{OH}$ 、PTIO[•] 四种体外抗氧化实验检测出组分 F2、F4 的抗氧化性优于 F3 和 VC 对照组。利用密度泛函理论方法计算出四个茶黄素分子酚羟基中氢原子的键长、自然键轨道 (NBO) 电荷布局数、键解离能 (BDE)、最高电子占据轨道 (HOMO) 和最低电子未占据轨道 (LUMO) 的能级及能级差。结果表明茶黄素分子中 C11-OH、C11'-OH、C12-OH 三个羟基相较于其他位置有更高的活性; 没食子酰基的取代会部分降低原本羟基的活性; 没食子酰基上的三个酚羟基活性有很大差别, 可能是由于其形成分子内氢键, 导致部分羟基活性降低。整体来看, TF1 上的酚

羟基相比于其他茶黄素具有更高的活性，但由于 TFDG 的酚羟基数量更多，并且考虑到空间位阻效应，所以理论上是 TF1 和 TFDG 的抗氧化活性更好，这与上述抗氧化实验结论一致。

关键词：茶黄素； α -葡萄糖苷酶；多光谱；抗氧化；密度泛函理论

ISOLATION, PURIFICATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THEAFLAVINS AND THE MECHANISM OF INHIBITION OF α - GLUCOSIDASE BY TFDG

Abstract

In this paper, theaflavins, an important functional active ingredient in black tea, were studied based on the valorization of tea residue generated during the processing of tea for further utilization. Current research endeavors predominantly center around the physiological activities of four major theaflavins monomers: theaflavin (TF1), theaflavin-3-gallate (TF2A), theaflavin-3'-gallate (TF2B), and theaflavin-3,3'-digallate (TFDG). However, certain biological activity mechanisms of these theaflavins remain inadequately understood. In this research, utilizing black tea powder as the raw material, we aim to extract, isolate, and purify theaflavins, and subsequently delve into their inhibitory mechanism against α -glucosidase. Furthermore, we employ a combined approach involving Density Functional Theory (DFT) methods and in vitro antioxidant assays to systematically investigate the antioxidant properties of the theaflavins. The primary research contents are outlined as follows:

- (1) Based on single-factor experiments, the most favorable

extraction parameters for theaflavins were ascertained to be an extraction duration of 80 minutes, an extraction temperature at 80°C, a solid-to-liquid ratio of 1 : 30, resulting in the purity of the product is 35.66%. After decontamination using 30% ethanol, the purity of the theaflavins was enhanced to 59.86% following separation via macroporous resin. Utilizing distribution coefficient K and separation factor α , a solvent system comprising ethyl acetate, n-hexane, methanol, water (3:1:1;6) was selected for high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) purification. This process led to the isolation of six components, which upon mass spectrometry (MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis and identification, revealed the component F2 to be TF1 with a purity of 93.61%; the component F4 was identified as TFDG, with a purity of 94.42%; and the component F3 was characterized as a mixture of TF2A and TF2B, with individual purities of 54.71% and 37.87%, respectively.

(2) The last four components isolated from HSCCC were subjected to in vitro α -glucosidase inhibition assays, and among these, TFDG (with an IC_{50} value of $1.945 \pm 0.097 \mu\text{g/mL}$) exhibited the most potent inhibitory effect and was thus chosen for further kinetic, multi-spectral, and molecular docking studies. The results indicated that the inhibition by TFDG was reversible and displayed a mixed mode of competitive and non-competitive inhibition, and there was only a single binding site.

TFDG quenched the intrinsic fluorescence of α -glucosidase upon forming a complex with α -glucosidase, with a Förster resonance energy transfer (FRET) distance calculated to be 2.54 nm. The positive ΔH° (102.54 kJ mol⁻¹) and ΔS° (443.19 J mol⁻¹ K⁻¹), coupled with the negative ΔG° , suggested that the binding was spontaneous endothermic entropy increase, with hydrophobic interactions playing a dominant role. The conformation and polypeptide skeleton structure of α -glucosidase were changed, the hydrophobicity near Tyr residue and the polarity around Trp residue were enhanced, the contents of α -helix, β -sheet and β -turn decreased, while the random coil increased. Molecular docking revealed that TFDG binds in proximity to the enzyme's active site, engaging in two hydrophobic interactions with Phe450 and Trp406 residues, as well as forming three hydrogen bonds with Asp203, Phe450, and Gln603 amino acid residues.

(3) The antioxidant capacities of components F2 and F4 were assessed using four in vitro assays, namely ABTS⁺, DPPH $\cdot$, $\cdot$ OH, and PTIO $\cdot$, which demonstrated superior performance compared to those of F3 and the VC control group. Employing DFT calculations, the bond lengths of the phenolic hydroxyl hydrogen atoms, natural bond orbital (NBO) charges, bond dissociation energies (BDE), the energy levels of the highest occupied molecular orbitals (HOMO), and the lowest unoccupied molecular orbitals (LUMO), along with their energy gaps, were computed for the four theaflavins. The findings indicated that the hydroxyl groups

at positions C11-OH, C11'-OH, and C12-OH within the theaflavin molecule exhibit heightened reactivity relative to other locations. The substitution of gallate esters was shown to partially diminish the activity of the original hydroxyl groups. Among the three phenolic hydroxyls present in the gallate moiety, substantial differences in their activities were observed, potentially due to the formation of intramolecular hydrogen bonding, leading to reduced reactivity for some hydroxyls. Overall, the phenolic hydroxyls in TF1 displayed higher activity compared to other theaflavins. However, considering that TFDG possesses a greater number of phenolic hydroxyls and taking into account steric hindrance effects, theoretically, both TF1 and TFDG are expected to have better antioxidant activity. This theoretical prediction aligns with the experimental antioxidant assay outcomes mentioned above.

CAO Yufan (Food Science and Engineering)

Supervised by Prof. Cai Weirong

KEY WORDS: Theaflavins; α -Glucosidase; Multispectral; Antioxidation; Density Functional Theory

目录

摘 要	I
Abstract.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 茶黄素简介.....	1
1.2 茶黄素的制备及分离纯化.....	2
1.2.1 制备方法.....	2
1.2.2 分离纯化方法.....	3
1.3 茶黄素的生理活性.....	4
1.3.1 抗氧化活性.....	4
1.3.2 抗炎.....	5
1.3.3 抗肿瘤.....	5
1.3.4 抑菌抗病毒.....	6
1.3.5 抗代谢综合征.....	6
1.3.6 增强肌肉性能.....	7
1.4 茶黄素在胰岛素抵抗和二型糖尿病中的研究.....	7
1.5 密度泛函理论在研究多酚抗氧化性中的应用.....	8
1.6 研究背景、研究目的和研究内容.....	8
1.6.1 研究背景.....	8
1.6.2 研究意义及目的.....	9
1.6.3 研究内容.....	10
第 2 章 茶黄素的制备、分离纯化及鉴别	11
2.1 引言.....	11
2.2 实验材料及仪器.....	11
2.2.1 实验材料.....	11
2.2.2 实验仪器.....	12
2.3 实验方法.....	12
2.3.1 粗品茶黄素的提取.....	12
2.3.2 粗品茶黄素的测定.....	12

2.3.3 AB-8 大孔树脂分离茶黄素	13
2.3.4 HSCCC 分离茶黄素	13
2.3.5 HPLC 定性、定量分析茶黄素	14
2.3.6 质谱分析	15
2.3.7 数据分析	15
2.4 结果分析	15
2.4.1 单因素分析	15
2.4.2 AB-8 大孔树脂分离茶黄素	16
2.4.3 HSCCC 分离茶黄素	16
2.4.4 HPLC 及质谱分析结果	18
2.5 结论	19
第 3 章 茶黄素-3,3'-双没食子酸酯对 α-葡萄糖苷酶抑制机制	21
3.1 引言	21
3.2 实验材料及仪器	21
3.2.1 实验材料	21
3.2.2 实验仪器	22
3.3 实验方法	22
3.3.1 酶抑制活性及动力学分析	22
3.3.2 荧光光谱分析	23
3.3.3 荧光共振能量转移	23
3.3.4 圆二色谱	23
3.3.5 分子对接模拟	24
3.3.6 数据分析	24
3.4 结果分析	24
3.4.1 茶黄素抑制 α -葡萄糖苷酶活性	24
3.4.2 TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的可逆性研究	25
3.4.3 酶抑制动力学分析	25
3.4.4 荧光猝灭分析	27
3.4.5 热力学分析	29

3.4.6 同步荧光光谱分析.....	29
3.4.7 三维荧光光谱分析.....	30
3.4.8 荧光共振能量转移.....	31
3.4.9 圆二色光谱分析.....	32
3.4.10 分子对接.....	33
3.5 结论.....	35
第 4 章 基于密度泛函理论研究茶黄素抗氧化活性	36
4.1 引言.....	36
4.2 实验材料与仪器.....	36
4.2.1 实验试剂与材料.....	36
4.2.2 实验仪器.....	37
4.3 实验方法.....	37
4.3.1 HSCCC 分离组分清除 ABTS ⁺	37
4.3.2 HSCCC 分离组分清除 DPPH•	37
4.3.3 HSCCC 分离组分清除•OH	37
4.3.4 HSCCC 分离组分清除 PTIO•	37
4.3.5 Gaussian 计算模型和方法	38
4.4 结果与讨论.....	38
4.4.1 HSCCC 分离组分体外抗氧化能力分析.....	38
4.4.2 茶黄素分子酚羟基中 O-H 键键长分析.....	40
4.4.3 四种茶黄素酚羟基上 H 原子的 NBO 电荷布局数分析.....	41
4.4.4 四种茶黄素酚羟基中 O-H BDE 分析.....	43
4.4.5 前线分子轨道及能级分析.....	44
4.5 结论.....	46
第 5 章 结论与展望.....	47
5.1 结论.....	47
5.2 创新点.....	48
5.3 展望.....	48
参考文献	49

攻读学位期间发表的学术论文目录	61
致谢	62

第 1 章 绪论

茶叶在我国农副产品中的地位非常重要，它不仅是农业生产的重要组成部分，也是我国传统农耕文化、经济结构以及国际贸易中不可或缺的元素。中国是世界上最大的茶叶生产国和消费市场，根据 2022 年的数据，全国茶园面积稳定增长至约 4995.40 万亩，同比增长 2.03%，年产量超过 300 万吨，占据全球市场的四分之一以上，并且持续稳步增长。虽然我国茶叶深加工产业相较于日本等国，技术和市场应用方面仍有较大的发展空间，但全球范围内的茶叶加工损耗普遍存在，尽管为了降低损耗，各国茶企采取了改进加工工艺、严格控制加工环境、提升工人技能培训、研发新型包装材料减少运输损耗等方式。但茶叶碎末的产生还是贯穿茶叶生产的各个环节，虽然茶叶碎末在一定程度上被认为是正常的，但如果过多，则可能影响品饮体验和茶叶的市场价值。因此对茶叶碎末进行深入研究开发与利用，不仅有助于解决茶叶加工过程中的废弃物问题，同时也拓展了茶叶产业链，创造了额外的经济价值和社会价值。

1.1 茶黄素简介

茶黄素作为茶叶中重要的生物活性成分，是近来的研究热点。在由鲜茶制作成红茶的发酵环节中，多酚氧化酶将儿茶素（EC、EGC、ECG、EGCG）B 环上酚羟基氧化成邻醌，这种茶黄素中间体易进一步缩合氧化生成茶黄素（Theaflavins）、茶红素、和茶褐素等茶色素类物质，这些色素共同决定了红茶最终的颜色、香气和口感。其中茶黄素是一类具有苯骈卓酚酮结构化合物的总称，它最早是由英国的生物学家 Roberts 发现的^[1]，迄今为止已鉴定出 31 种^[2, 3]，其中 TF1、TF2A、TF2B、TFDG 是四种占比最高的茶黄素，其前体和结构分别如表 1-1 和图 1-1 所示。茶黄素的合成极为复杂，儿茶素的 C-C 键断裂和氧化后形成二聚体^[4]，再根据儿茶素母体上没食子酰基的数量、位置及其与邻近儿茶素单元连接的方式产生了多种茶黄素^[5]。研究表明^[6]，茶黄素的液相图在温度升高后出现吸收面积峰面积减少且吸收峰增多的情况，均说明温度越高，茶黄素稳定性越低。

表 1-1 四种茶黄素及前体

Table 1-1 Four types of theaflavins and their precursors

茶黄素种类	前体
TF1	EGC+EC
TF2A	EGCG+EC
TF2B	ECG+EGC
TFDG	EGCG+ECG

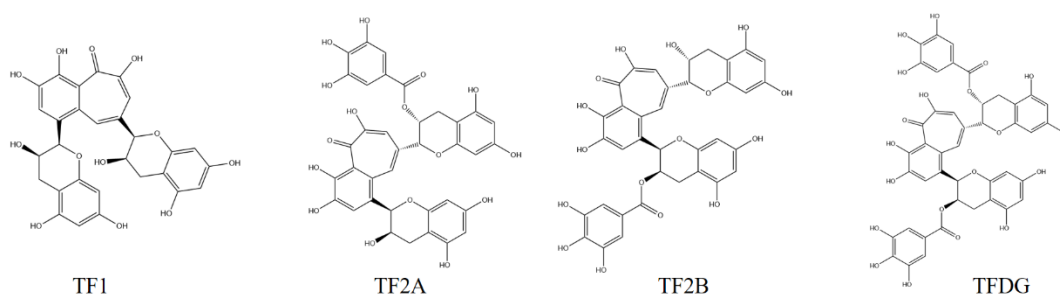


图 1-1 茶黄素的结构式

Figure 1-1 The structural formulas of theaflavins

1.2 茶黄素的制备及分离纯化

1.2.1 制备方法

在 Roberts 发现茶黄素后，众多科学家进一步研究了制备茶黄素的各种方法，总结来说可以分为溶剂提取和氧化合成。

具有代表性的溶剂提取法有 Collier 法^[7]和 Ullah 法^[8]，两者方法类似，都是利用茶黄素易溶于水和乙酸乙酯、不溶于三氯甲烷的特性和红茶中其他组分与茶黄素的溶解度差异来达到分离茶黄素的目的。

茶黄素在茶叶中含量极低，而儿茶素含量却很高，因此可以根据茶黄素的合成机理在体外模拟儿茶素氧化合成茶黄素。根据催化剂种类可将氧化合成分为无机氧化和酶促氧化。张建勇^[9]等人利用 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化儿茶素得到茶黄素，且发现碱性环境更易生成酯型茶黄素。目前酶促氧化主要研究酶源、pH、反应时间、底物配比等。Takashi^[10]匀浆处理 62 种植物样本，有 46 种可以氧化形成茶黄素，其中枇杷、蓝莓产量甚至高于鲜茶。在合成过程中多酚氧化酶对茶黄

素没有产物抑制，但过氧化氢酶会分解茶黄素并重组^[11]。天然酶源活力不稳定，且价格高昂，因此固定化酶被广泛用于氧化合成茶黄素，其不仅可以重复利用降低成本，还在更宽的温度、pH 区间内拥有更稳定的活性^[12]。

1.2.2 分离纯化方法

纤维素层析由于所使用的填料的普适性及对茶黄素的高分辨率和高稳定性，可用于分离茶黄素，但由于孔径问题，其分离效能并不理想，实际应用有局限性。Berkowltz^[13]等人将预处理过的茶黄素粗品过纤维素层析柱，得到 3 种茶黄素，但流程复杂且产量较低。

以天然高分子凝胶为固定相的葡聚糖凝胶层析法，由于其步骤简单、设备便宜、产物纯度高而广泛应用于各种成分分离。其中羟丙酰基交联葡聚糖凝胶（Sephadex LH-20）由于其亲水、亲脂且条件温和的性质，对于分子量在其分离范围内的茶黄素有较佳的分离效果。竹尾忠一^[14]利用 Sephadex LH-20 层析，以丙酮溶液梯度洗脱出四个茶黄素单体。但昂贵的凝胶价格限制了其应用。

硅胶柱层析的吸附能力与硅羟基数量相关，适用于极性和非极性物质分离，应用较为广泛。苏亚伦^[15]联合 Sephadex LH-20 和硅胶柱层析分离茶黄素，但使用 Sephadex LH-20 效果一致，且产量低，不适用于大规模生产。

聚酰胺层析基于聚酰胺高分子聚合物稳定的氢键吸附性能，成为黄酮类、酚类及醌类等高效分离的关键技术。因其材料性质稳定、可重复使用、无污染而备受青睐。丁阳平^[16, 17]研究 NKA 大孔吸附树脂纯化茶黄素的工艺参数，分离出 TF1 和 TF2A。尽管在大规模制过程中，聚酰胺层析因其良好的分离效果、较大的上样量及工业化生产能力而显得尤为适用，但市场上可供选择的产品种类有限且价格相对较高，其安全性也仍需进一步评估验证。

大孔吸附树脂作为一种具有显著孔隙结构和高比表面积有机高分子材料，尤其因其成本效益高、稳定性强以及可循环利用的特性，在天然产物分离纯化方面占有很大的比重。郁军^[18]等人比较了几种大孔树脂分离茶黄素的效果，并确定了几种影响因素的最佳值。

高速逆流色谱法（HSCCC）是一项创新的液-液分离技术，其显著特点在于无需固态载体或支撑体^[19, 20]。该方法通过避免样品与载体表面接触，有效防

止了样品在分离过程中可能发生的变性和不可逆吸附现象^[21]。江和源^[22, 23]等人首次运用 HSCCC，以甲醇-乙酸乙酯-水-正己烷（1：3：6：1，V/V）溶剂体系分离出 TF1 和 TFDG 两种茶黄素单体。Wang^[24]等在江和源研究的基础上运用制备型液相将另外两种茶黄素 TF2A 和 TF2B 分离。Yang^[25]等发现联合 HSCCC 的甲醇-乙酸乙酯-正己烷-水-乙酸（1：5：1：5：0.25，V/V）溶剂体系和 Sephadex LH-20 更易分离 4 种茶黄素单体。

表 1-2 茶黄素分离方法的比较

Table 1-2 Comparison of Separation Methods for Tea Flavonoids

方法	优点	缺点
纤维素层析	可分离 TFDG	操作复杂，制备量少，不能分离其他单体
葡聚糖凝胶层析	重复性好，可分离 TF1 和 TFDG	洗脱时间长，填料贵，制备量少，不能分离其他单体
硅胶	重复性好，可分离 TF1 和 TFDG	洗脱时间长，填料贵，制备量少，其他单体分离效果差
聚酰胺层析	可以分离出四种单体	安全性需要进一步研究
大孔吸附树脂	可以分离四种单体，制备量大，原料便宜，操作简单	纯度不高
高速逆流色谱	可以分离出四种单体，重现性好，分离效率高	对进样纯度有一定要求

综合考虑表 1-2 中各种分离方法的优缺点，选用大孔树脂联合 HSCCC 分离茶黄素，利用操作简单，制备量大，大孔树脂初步浓缩纯化粗品茶黄素，得到四种茶黄素的混合物，再经过 HSCCC 分离达到制备茶黄素单体的目的。

1.3 茶黄素的生理活性

1.3.1 抗氧化活性

茶黄素的抗氧化性表现在很多方面，由于其自身结构特性，它能够提供大量质子，直接有效的清除自由基来达到抗氧化作用，一般这种抗氧化机制称为氢原子转移（HAT）^[26]。羟基解离能（BDE）被认为是 HAT 发生与否的重要指标，BDE 越小，羟基越容易断裂，越容易失去氢原子，也越容易与自由基反应。有研究证明^[27]四种茶黄素在清除羟自由基方面均强于 EGCG；茶黄素还可以抑

制脂质过氧化来避免细胞膜系统损失导致的细胞凋亡，相关研究^[28]表明对于细胞介导的低密度脂蛋白氧化，茶黄素的效果要高于儿茶素和没食子酸酯；通过络合过渡态金属离子^[29]，茶黄素也可以抑制低密度脂蛋白氧化和自由基生成^[30]；调节酶活性是茶黄素发挥抗氧化作用的重要途径，它可以降低体内一些氧化酶的生物活性，如谷胱甘肽-S-转移酶^[31]、黄嘌呤氧化酶^[32]，同时还可以激活过氧化物酶^[33]和超氧化物歧化酶^[34]。

1.3.2 抗炎

机体存在炎症时，炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 会高度表达，持续产生的活性氧（ROS）和其他炎性介质可导致正常细胞结构破坏、功能障碍，甚至引发细胞凋亡或坏死。Xu^[35]等人揭示茶黄素可以调节由叔丁基过氧化氢诱发的软骨细胞中代谢失常，明显降低了软骨细胞被叔丁基过氧化氢刺激后的凋亡与衰老响应，体外分子结合分析表明，茶黄素可能参与了调节 Keap1/Nrf2/HO-1。针对脑出血引发的炎症，茶黄素可以通过调控 NF- κ B 等通路来减轻脑损伤^[36]。茶黄素还可以通 EGFR 信号通路抑制 EGFR 的激活，降低 MUC5AC 水平，缓解气道粘液高度分泌来治疗慢性气道炎症^[37]。TF2A 通过下调 COX-2 的转录来抑制 TPA 诱导的 COX-2 的基因表达，以此调控 NF- κ B 等通路^[38]。

1.3.3 抗肿瘤

茶黄素不仅可以抑制癌变进程，还可以有效的治疗癌症。TF1 通过降低 COX-2 和 iNOS 的表达，降低致癌物引发的 SD 大鼠肠癌的概率^[39]。相比于对照组，茶黄素可以有效降低大鼠体内镉水平，大鼠排泄物中镉含量在升高，并且保护 DNA^[40]。细胞凋亡是一种由基因调控的自主性细胞有序死亡，茶黄素可以通过诱导 DNA 损伤、破坏细胞核结构、激活凋亡通路来杀死癌细胞。茶黄素通过上调关键的肿瘤抑制因子 p53 和细胞周期调节蛋白 p21 表达水平，有效地抑制了 NF- κ B 信号通路的活性，调整细胞内促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白的比例来促进细胞凋亡^[41]。此外，茶黄素还能触发由 p53 介导的 Bax 蛋白激活过程，该过程会破坏线粒体膜电位的稳定性，进而导致细胞色素 C 从线粒体中释放到细胞质中，启动细胞内的凋亡级联反应^[42]。增值速度是癌细胞有别于正常细胞

的一大特征，而茶黄素可以有效抑制，甚至可以针对性的只抑制癌细胞而无碍正常细胞^[43]，并且降低 COX-2 和 iNOS 的合成，对 NO 的生成产生抑制，阻断 NF- κ B 的核易位，引起细胞凋亡^[44]。此外，茶黄素还可以通过抑制蛋白酶体活性^[45]、生长因子受体^[46]来抑制细胞增殖。诱导周期阻滞是使癌细胞凋亡的一个重要途径，茶黄素诱导癌细胞周期阻滞的机理可以分为上调 CDKI 表达^[47]和影响细胞骨架^[48]。癌症治疗困难的一个重要因素就是癌细胞可以侵蚀周围组织。研究表明^[49]茶黄素通过 p53-ROS 介导 p38MAPK 在反馈回路中诱导 p53 磷酸化，以抑制 I κ B α 磷酸化和 NF- κ B/p65 核转位，从而下调转移蛋白金属蛋白酶（MMP）-2 和 MMP-9 来抑制乳腺癌细胞转移。

1.3.4 抑菌抗病毒

茶黄素被认为是一种广谱抑菌剂，其发挥抑菌作用的主要途径一般为损伤膜系统^[50]、与微生物受体结合等。Liu^[51]等人的研究证明 TFDG 可以调节肠道菌群，对拟杆菌、粪杆菌、副拟杆菌和双歧杆菌的生长有促进作用，以及抑制普雷沃氏菌和梭杆菌的生长。还有研究表明^[52]茶黄素通过干扰 HIV-1 包膜糖蛋白引发的细胞膜融合过程，来阻止 HIV-1 进入靶细胞。Ohba 等^[53]研究茶黄素可以抑制人类病毒性肠胃炎的主要病因之一杯状病毒，阻止其进入细胞，并且存在浓度依赖性。茶黄素还可以通过直接作用于病毒颗粒，阻止丙型肝炎病毒（HCV）其扩散，并且还可以与其他抑制剂联合使用，有累加作用^[54]。

1.3.5 抗代谢综合征

代谢紊乱综合征，是一组复杂的相互关联的代谢异常疾病集群，主要包括中心性肥胖、高血压、高血糖、血脂异常等表现。这些病症共同存在时会显著增加患者心血管疾病以及 2 型糖尿病的风险。茶黄素通过下调脂肪酸合酶基因的表达水平以及增强能量代谢来抑制脂肪生成，有研究表明^[55]喂食茶类可以显著降低大鼠的体重及其血浆甘油三酯，胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇，介导 EGFR/PI3K/Akt/Sp-1 信号转导途径来抑制脂肪酸合酶基因。此外，茶黄素还通过 LKB1 和活性氧途径刺激 AMP 激活的蛋白激酶来抑制乙酰辅酶 A 和羧化酶的活性^[56]。茶黄素通过抗氧化，抗炎和抗凋亡机制对脂肪肝的急性缺血再灌注

损伤具有保护作用^[57]。研究表明低剂量的绿茶可以有效降低收缩压^[58]，红茶也可降低收缩压和舒张压，并可防止脂肪负荷后血压升高^[59]。Mario 等^[60]发现红茶和绿茶均可以刺激牛主动脉内皮细胞（BAEC）中的 eNOS 活性和磷酸化，以及大鼠主动脉环中的血管舒张程度类似。茶黄素在 NO 产生和血管舒张方面显示出比 EGCG 更好的效果。

1.3.6 增强肌肉性能

剧烈运动、衰老及多种疾病会增加体内活性氧水平，引发骨骼肌收缩功能障碍并加速疲劳进程，甚至导致肌肉萎缩。Basu^[61]等研究表明茶黄素通过调控 Ca^{2+} 和 NO 合酶来影响骨骼肌的收缩机制。茶黄素激活 PI3K 和 AMPK 依赖性途径，通过诱导胰岛素受体底物-1，非典型蛋白激酶 C 和 AMP 活化蛋白激酶（AMPK）的磷酸化来促进骨骼肌细胞中 GLUT4 易位和糖原积累，为骨骼肌提供能量^[62]。TFDG 通过恢复 AMPK 活性，部分逆转了 NRCM 中高糖诱导的 Cx43 表达和自噬的抑制^[63]。慢补充含有茶黄素的多酚，还可以改变骨骼肌中因剧烈运动后急性肌肉损伤导致的凋亡信号传导^[64]。

1.4 茶黄素在胰岛素抵抗和二型糖尿病中的研究

越来越丰富的物质条件，导致糖尿病及胰岛素抵抗的患病人数逐年上升^[65]。糖尿病是一种代谢紊乱的慢性疾病，其中占糖尿病总病例数 90% 以上的 II 型糖尿病被认为是胰岛素利用不足而引起的^[66, 67]。Reaven^[68]在 1998 年首次提出胰岛素抵抗概念。胰岛素抵抗是指靶组织（如肌肉、脂肪和肝脏）对胰岛素的响应减弱，需要更高水平的胰岛素才能发挥正常的糖代谢调节作用， β 细胞可以通过增加胰岛素分泌来补偿抵抗，导致 β 细胞功能逐渐衰退，胰岛素分泌减少，从而导致高血糖。控制餐后血糖水平是预防及治疗糖尿病的一种有效手段，因为它可以减轻对胰岛 B 细胞的刺激^[69]，而餐后血糖水平主要由碳水化合物消化速度及程度决定的。碳水化合物消化的最后一步是位于小肠上皮绒毛膜刷状沿的 α -葡萄糖苷酶水解寡糖非还原末端的 α -1,4 糖苷键^[70]。因此，抑制 α -葡萄糖苷酶活性被认为是控制餐后血糖水平的有效方法^[71, 72]。目前，一些 α -葡萄糖苷酶抑制剂，如阿卡波糖、伏格列波糖等已经在医学上被用于治疗 II 型糖尿病，

但长期服用后其副作用不可忽视^[73]。所以，有必要寻找和开发有效、低副作用的新 α -葡萄糖苷酶抑制剂。葡萄糖的转运和吸收需要钠-葡萄糖共转运蛋白（SGLT1）介导的主动转运过程完成，在这个过程中，葡萄糖借助 Na^+ 顺浓度梯度从肠腔向血液内转移时的能量，逆浓度梯度被吸收入细胞内，在近端小肠上皮细胞中还存在另一种转运蛋白-葡萄糖转运蛋白 2（GLUT2），它允许葡萄糖在浓度梯度下以易化扩散的方式从小肠上皮细胞进入血液循环系统。茶黄素可以通过抑制钠钾泵^[74]和葡萄糖转运蛋白 4（GLUT4）^[75]来减少葡萄糖的吸收，缓解高血糖症。胰岛素作为体内唯一降血糖的激素，茶黄素可以提高胰岛素的效率^[76]，降低血清中的胰岛素含量^[77]。此外，茶黄素还可以提高胰岛素受体的活性来增强胰岛素的敏感性^[78]。

1.5 密度泛函理论在研究多酚抗氧化性中的应用

密度泛函（DFT）是一种研究多电子体系的理论方法，它被 Wright^[79]等首次用于计算多酚的量子化学参数如 BDE 等。一般利用 DFT 探索多酚抗氧化机制时，首先需要优化多酚分子的几何构型以获取能量最低态，再根据反应前后多酚分子结构进行计算能量，最后依据能量差值分析结果^[80]。张鑫^[81]等研究发现四种甘草类黄酮分子上 C-7 位羟基最为活跃， $\text{C2}=\text{C3}$ 双键可以提高分子活性，糖苷取代 C-4'位羟基会抑制其抗氧化活性。刘靖丽^[82]等在此基础上考虑溶剂效应，并根据抽氢反应机理和单电子转移机理研究四种甘草类黄酮，验证了上述结果，并提出抽氢反应主要发生在非极性溶剂体系中，而单电子转移反应则相反。刘科梅^[83]等研究表明柚皮素、柚皮苷、橙皮素、橙皮苷四种黄酮的抗氧化活性大小符合体外抗氧化实验结果，C-4'和 C-5'位羟基是它们最活跃的基团。Cai^[84]等研究了金丝桃苷、槲皮素、芦丁的抗氧化活性与其构效关系，结果与羟基自由基清除能力相吻合，且糖基化会降低分子活性。

1.6 研究背景、研究目的和研究内容

1.6.1 研究背景

茶作为世界上三大无酒精饮料之一，无论从文化遗产、经济价值还是生活

风尚等方面都在国际社会上占据着不可替代的地位。而在茶叶加工过程中产生的碎茶，也是潜在的经济损失和浪费，因此针对碎茶的进一步的开发利用，不仅是提升资源利用效率、降低浪费的有效途径，也是我国茶叶产业可持续发展和产业升级的重要环节。

控制餐后高血糖是控制糖尿病患者发病的重要手段，而 α -葡萄糖苷酶参与碳水化合物消化的最后一步，通过抑制其活性，有助于平滑了餐后血糖高峰，稳定血糖水平。 α -葡萄糖苷酶抑制剂正是针对这一机制设计的降糖药物，可以降低 II 型糖尿病及并发症的发生率。目前，临床上主要使用的阿卡波糖、伏格列波糖、米格列醇等 α -葡萄糖苷酶抑制剂，拥有较大毒副作用，如硬便、便秘、腹部气胀等。

通过密度泛函理论计算分子结构，基于量子化学计算结果可分析其清除自由基的活性部位。自由基是人体正常的代谢产物，自由基过量则会损害人体。茶黄素结构上有大量的羟基，这种特异性的结构代表其是一种天然的抗氧化剂，且已有研究表明茶黄素拥有优异的抗氧化性，然而，目前尚未确定究竟是哪些特定羟基在决定其抗氧化活性的过程中发挥重要作用。

1.6.2 研究意义及目的

茶黄素作为茶叶中的功能活性成分之一，研究如何提高其产率及纯度，有利于为其大规模生产加工提供一定的理论基础。此外，茶黄素拥有广泛的生物活性功能，研究其相关的活性机制，有助于为相关产品的研发生产提供理论基础。

鉴于现有 α -葡萄糖苷酶抑制剂的副作用，寻求源于天然产物且兼具高效与低副作用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂显得尤为迫切和重要。既往研究成果已证实茶黄素拥有良好的抑制活性，因此，深入探究茶黄素对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制，可为研制新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂类抗糖尿病药物提供理论基础。

研究茶黄素的抗氧化机制有利于为后续进一步研究打下基础，因此结合茶黄素的抗氧化实验与密度泛函理论计算来分析其抗氧化活性与其结构上羟基位置和数量的关系。

1.6.3 研究内容

本文原料来自于安徽皖垦茶叶有限公司提供的红茶粉末。

(1) 优化从红茶粉末中提取、分离、纯化四种茶黄素的工艺，并鉴别。

(2) 通过酶抑制动力学、多种荧光光谱、紫外光谱、圆二色谱、分子对接模拟分析茶黄素抑制 α -葡萄糖苷酶的机制。

(3) 研究茶黄素体外抗氧化性，并结合密度泛函理论分析其清除自由基能力与其羟基位置和数量的关系。

第 2 章 茶黄素的制备、分离纯化及鉴别

2.1 引言

茶叶中的多酚除了茶黄素还有儿茶素类、黄酮类、酚酸类、鞣质等，这些物质在提取茶黄素时容易被一起被提取出来，因此需要进一步分离纯化。常规的层析方法各有优缺点，而 HSCCC 作为新型液液分配色谱，通过多次将样品在上下相中萃取达到分离样品的目的，其拥有非不可逆吸附、保护样品、回收率高、进样量大、成本低等优点。

本章节将优化茶黄素的提取技术流程，并结合 AB-8 型大孔吸附树脂与 HSCCC 对茶黄素进行分离纯化，同时使用 HPLC 和质谱鉴别。为后续大规模生产茶黄素提供理论基础。

2.2 实验材料及仪器

2.2.1 实验材料

表 2-1 实验材料及试剂

Table 2-1 Experimental materials and reagents

试剂	规格/级别	厂家
红茶碎末	—	安徽皖垦茶叶有限公司
碳酸氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
三氯甲烷	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
甲基异戊酮 (IBMK)	AR	国药集团化学试剂有限公司
正己烷	色谱纯	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	色谱纯	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	色谱纯	国药集团化学试剂有限公司
大孔吸附树脂	AB-8	郑州和成新材料科技有限公司
茶黄素	标准品	上海同田生物技术有限公司
茶黄素-3-没食子酸酯	标准品	上海同田生物技术有限公司
茶黄素-3'-没食子酸酯	标准品	上海同田生物技术有限公司
茶黄素-3,3'-没食子酸酯	标准品	上海同田生物技术有限公司

2.2.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental Instruments

仪器	型号	厂家
电子天平	CP214	奥豪斯仪器有限公司
紫外分光光度计	Uvmini-1280	日本岛津有限公司
真空冷冻干燥机	—	松源华兴科技发展有限公司
旋转蒸发仪	RE-52AA	上海一恒仪器厂
电脑紫外检测仪	HD-5	骥辉分析仪器有限公司
恒流泵	DHL-A	保定芯之有限公司
雷磁 pH 计	PHSJ-5	上海雷磁有限公司
数显恒温水浴锅	HH-S28	金坛大地自动化仪器厂
高速逆流色谱	TBE-300A	上海同田生物技术有限公司
高效液相色谱	Waters 2998	美国 Waters 公司
自动部分收集器	BS-100A	上海沪西分析仪器厂有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 粗品茶黄素的提取

以茶黄素的提取得率为指标，以水为提取剂，考察三个因素料液比（1：10、1：15、1：20、1：25、1：30、1：35）、提取时间（50、60、70、80、90、100 min）、水浴温度（60、65、70、75、80、85℃）对提取得率的影响，茶黄素含量的测定方法参考 2.3.2。提取结束后冷却至室温，5000 r/min 离心 15 min，弃沉淀，上清液使用三氯甲烷等体积萃取，保留上相水相，弃去下相中咖啡碱等物质，水相再用乙酸乙酯萃取，保留乙酸乙酯相并用 2.5%碳酸氢钠水溶液萃取，弃去水相中茶红素等物质。最后将上相中的乙酸乙酯萃取液蒸干，加水复溶后冻干收集。

2.3.2 粗品茶黄素的测定

略微修改文献^[85]中的方法来测定实验中粗品茶黄素的含量：将提取液和两倍体积的萃取液甲基异戊酮（IBMK）混合后，剧烈摇晃 1 min，静置待其分层后，取澄清液 2 mL 和 2 mL 2%茶黄素乙醇溶液、4 mL 无水乙醇混合，15 min

完全显色后在 625 nm 测定吸光度。以 IBMK-茶黄素试剂-乙醇 (1:1:2) 混合液作为对照。茶黄素含量以下列公式计算:

$$TFs(mM) = 0.024 \times f \times n \quad (2-1)$$

$$\text{茶黄素提取率}(\%) = \frac{C \times N \times V \times M \times 10^{-3}}{W} \times 100\% \quad (2-2)$$

式中: n 为提取稀释因数; f 为摩尔换算因数, 当 $n = 1$ 时, f 值为 47.8; C 为茶黄素浓度 (mM); N 为稀释倍数; V 为体积 (mL); M 为茶黄素分子量; W 为红茶沫质量 (g)。

2.3.3 AB-8 大孔树脂分离茶黄素

对比几种大孔树脂分离茶黄素的优缺点^[86], 选用 AB-8 大孔树脂进行分离纯化。对 AB-8 大孔树脂进行预处理, 以去除树脂可能携带的杂质、保护剂、残留单体和其他物质。使用 95%乙醇浸泡溶胀, 再用 5% HCl 溶液浸泡树脂 3 小时, 然后用蒸馏水冲洗树脂至流出液呈中性, 再用 3% NaOH 浸泡树脂 3 小时, 然后用蒸馏水冲洗树脂至流出液呈中性, 再用乙醇浸泡后装柱备用。利用 AB-8 大孔树脂进一步分离茶黄素, 并优化样品浓度、洗脱流速、洗脱剂种类的影响。

2.3.4 HSCCC 分离茶黄素

根据茶黄素的结构特性, 选取乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水溶剂体系, 并筛选比例^[57, 87-89]。并利用 2.3.5 中的 HPLC 方法测定目标组分在各个体系上下相的峰面积, 以 $S_{上}$ 、 $S_{下}$ 表示。分配系数 K 和分离因子 α , 由下式计算:

$$K = S_{上}/S_{下} \quad (3)$$

$$\alpha = K_i/K_j \quad K_i > K_j \quad (4)$$

式中: K_i 和 K_j 分别代表不同组分在溶剂体系中的分配系数。

HSCCC 的其他实验条件为转速 700 r/min, 流速 1.2 mL/min, 以 5mL 流动相溶解 100 mg 大孔树脂洗脱组分上样。收集分离组分, 并相对于 HSCCC 进样样品计算得率。

2.3.5 HPLC 定性、定量分析茶黄素

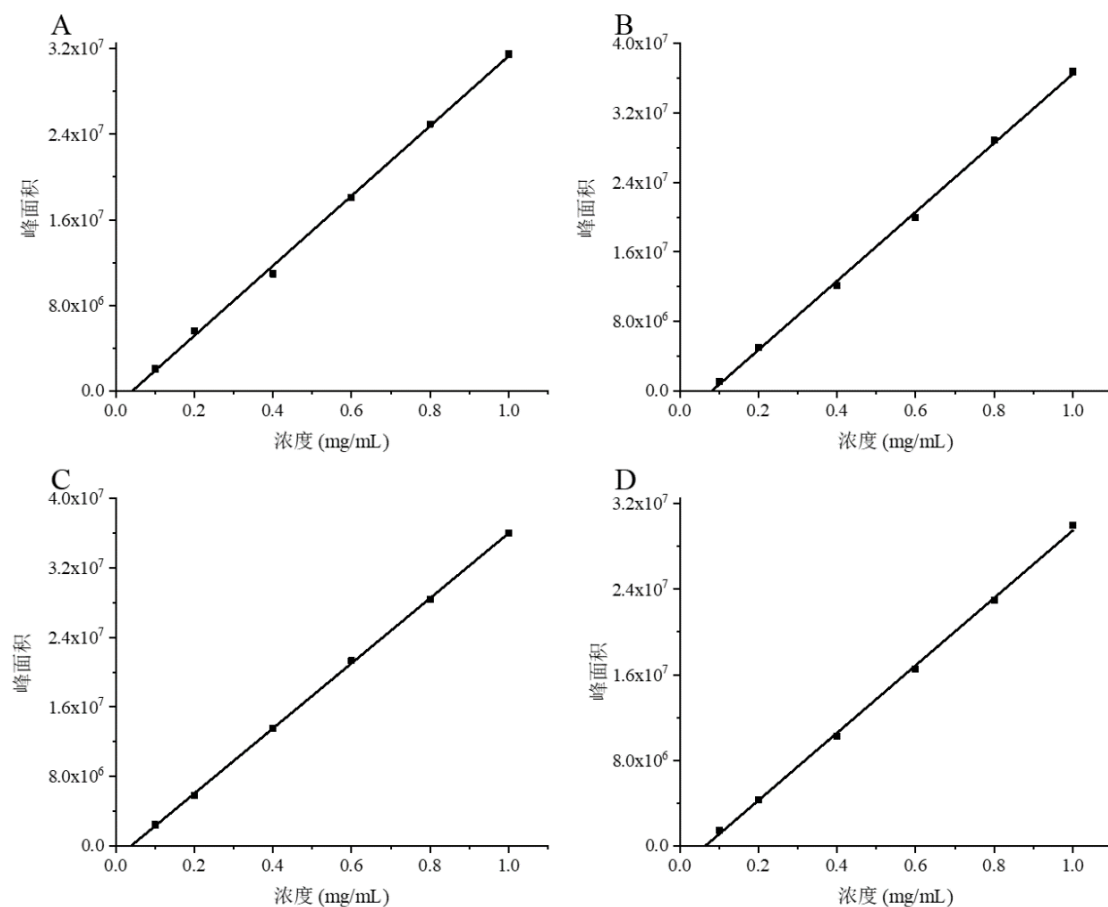


图 2-1 (A) TF1、(B) TF2A、(C) TF2B、(D) TFDG 的标准曲线

Figure 2-1 The standard curves of (A) TF1, (B) TF2A, (C) TF2B, (D) TFDG

表 2-3 四种茶黄素标准曲线

Table 2-3 The standard curves for four types of theaflavins

茶黄素	标准曲线	R ²	线性范围 (mg·mL ⁻¹)
TF1	$Y=3.266 \times 10^7 X - 1.351 \times 10^6$	0.9987	0.1~1
TF2A	$Y=3.964 \times 10^7 X - 3.190 \times 10^6$	0.9989	0.1~1
TF2B	$Y=3.742 \times 10^7 X - 1.429 \times 10^6$	0.9997	0.1~1
TFDG	$Y=3.151 \times 10^7 X - 2.024 \times 10^6$	0.9989	0.1~1

称取一定量四种茶黄素的标准品，配置成 1 mg/mL 并稀释到合适浓度，以浓度和峰面积为横纵坐标作标准曲线。以对应的回归方程测定各个组分中对应茶黄素的含量。色谱条件：C18 柱（150×4.6 mm，5 μm），进样量 10 μL，在

254 nm 测定。A 相为 0.1%甲酸乙腈，B 相为 0.1%甲酸水。梯度洗脱：0-6 min, 8% A; 6-10 min, 8%-15% A; 10-25 min, 15-25% A; 25-35 min, 25% A; 35-40 min, 25-27% A; 40-49 min, 27% A; 49-49.1 min, 8% A; 49.1-50 min, 8% A。

2.3.6 质谱分析

质谱检测方法：电喷雾离子源（350℃），以-3500 V 扫描电压进行负离子点扫描，雾化器压力为 35 p.s.i，雾化气体为 N₂，气流速度为 15 L/min。

2.3.7 数据分析

数据经 SPSS 25.0 统计分析，显著性分析由 ANOVA 完成，由 Origin 2018 进行绘图。

2.4 结果分析

2.4.1 单因素分析

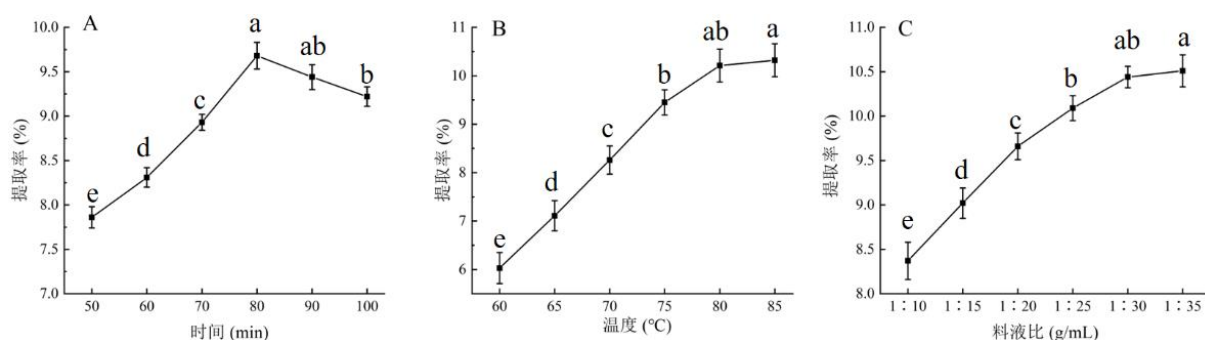


图 2-2 提取时间 (A)、提取温度 (B)、料液比 (C) 对提取得率的影响

Figure 2-2 The impact of varying extraction durations (A), temperatures (B), and solid-to-liquid ratios (C) on extraction yield

根据 2.3.1 方法，提取时间 (A)、提取温度 (B)、料液比 (C) 对茶黄素提取得率的影响如图 2-2 所示。图 2-2 (A) 显示提取得率伴随着提取时间的增加，先上升到 9.86% 再下降，这种现象可能是因为过长的提取时间导致已溶解出的茶黄素被氧化成醌类^[90]。因此以 80 min 的提取时间进行后续实验。图 2-2 (B) 显示提取温度与茶黄素的提取得率成正相关，说明升温有利于茶黄素的溶出，

但 80 和 85℃的提取得率并没有显著差异,说明高温可能会加速茶黄素的氧化。图 2-2 (C) 显示提取得率随溶剂的增多一直增加,但越来越缓慢,且最后两个比例下的提取得率没有显著性差异,考虑到溶剂消耗,所以选择料液比为 1 : 30 进行后续实验。优化后的条件为提取时间 80 min,提取温度为 80℃,料液比 1 : 30,提取得率达到 11.24%,以此得到的茶黄素代入 2.3.2 中公式 (2-1) 和 (2-2),得到其纯度为 35.66%。

2.4.2 AB-8 大孔树脂分离茶黄素

柱体积 120 mL,以 10 mL 30%乙醇溶解 0.2 g 粗品茶黄素后上样,以 4 BV 30%乙醇除杂,4 BV 60%乙醇洗脱,流速 5 mL/min,以电脑紫外检测仪在 280 nm 监视,结果如图 2-3 所示,第一个峰为除杂组分,主要成分为儿茶素类,第二个峰为洗脱组分 (TFs),主要为茶黄素。分别收集后浓缩冻干,经过公式 (2-1) 和 (2-2) 测定茶黄素含量,分别为 6.15%和 59.86%。

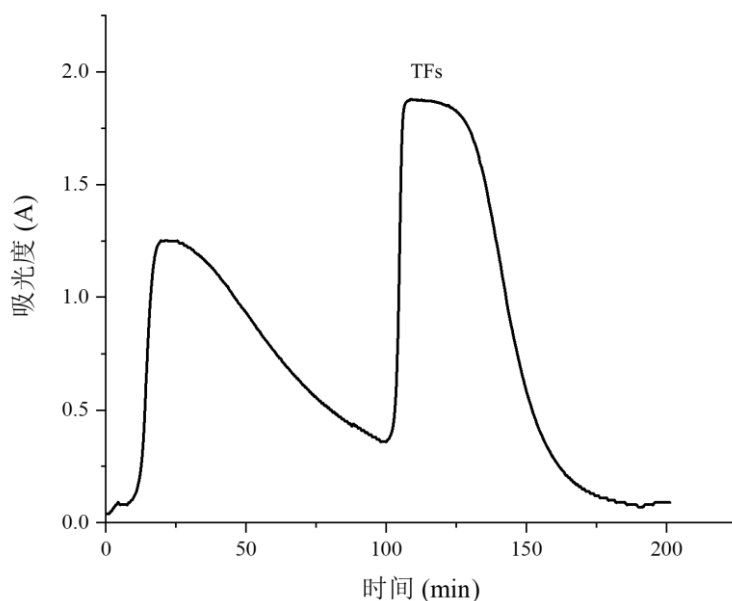


图 2-3 AB-8 大孔树脂分离茶黄素

Figure 2-3 Separation of theaflavins by AB-8 macroporous resin

2.4.3 HSCCC 分离茶黄素

利用 2.3.5 中 HPLC 的方法计算出分配系数 K 和分子因子 α 的值如表 2-4 所示。 K 一般决定溶剂体系对目标组分的分离效率和有效性,一般在 0.5~2 时最

佳^[91], 过小则样品保留时间过短, 分离效果不佳, 过大则分离时间太长, 分离效率降低。 α 反映了分子在溶剂中的扩散能力, 较小的 α 会导致分离时间延长, 而过大的 α 则可能降低分辨率, 因为快速的扩散可能导致组分在柱内混杂。因此选取溶剂体系为乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水 (3:1:1:6), 以此进一步纯化茶黄素。

HSCCC 分离茶黄素的色谱图如图 2-4 所示, 收取分离组分 F1、F2、F3、F4 浓缩冻干后称重, 相较于进样样品, 其得率分别为 7.39%、12.52%、15.48%、26.59%。

表 2-4 三个体系中四个组分的 K 与 α

Table 2-4 K and α of four components in three solvent systems

溶剂体系	K1	K2	K3	K4	α_{12}	α_{34}
乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水 (4:1:1:5)	1.19	1.49	2.74	3.82	1.25	1.39
乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水 (3.5:1:1:5.5)	1.5	1.71	2.45	3.06	1.14	1.25
乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水 (3:1:1:6)	1.71	1.82	2.29	2.66	1.06	1.16

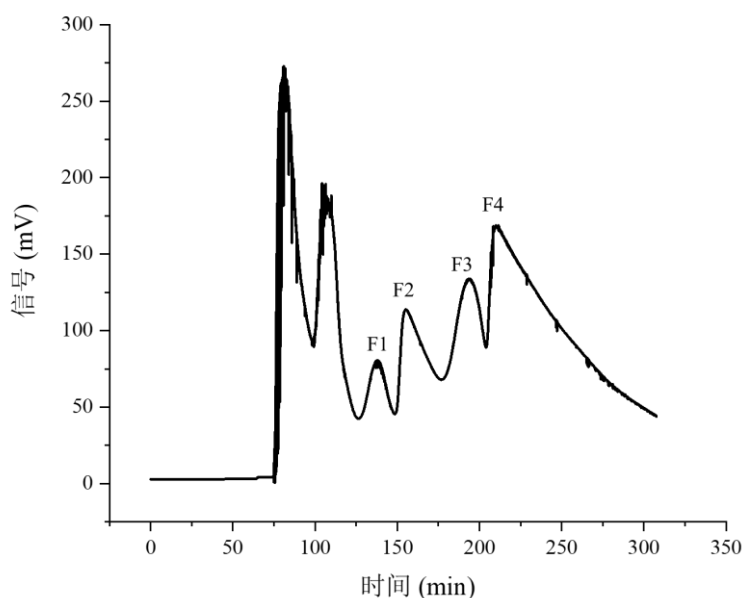


图 2-4 TFs 的 HSCCC 分离色谱图

Figure 2-4 Chromatogram of TFs separated by HSCCC

2.4.4 HPLC 及质谱分析结果

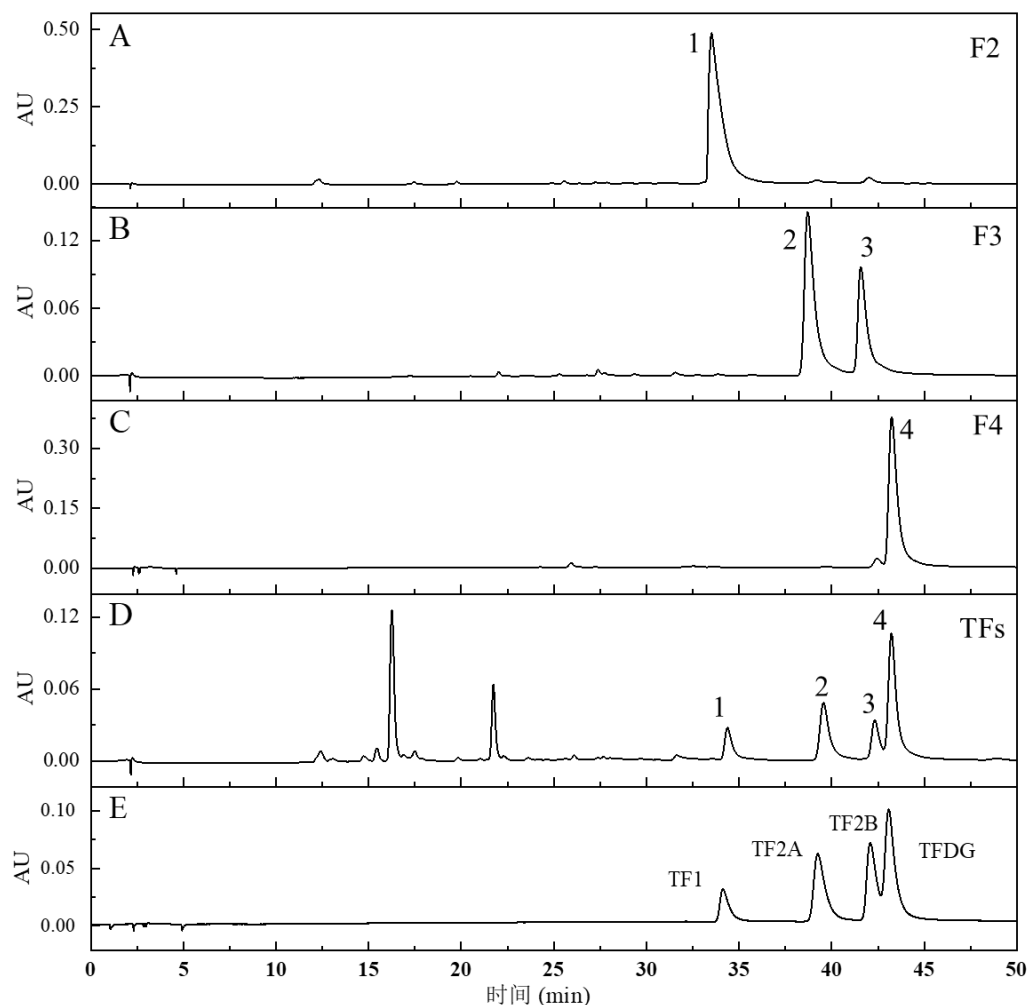


图 2-5 HSCCC 分离 TFs 后三个组分的 HPLC 图 (A、B、C); D 为 HSCCC 进样样品的 HPLC 图; E 为四种茶黄素标准品混合 HPLC 的图

Figure 2-5 HPLC diagram of the last three components obtained from the separation of TFs by HSCCC (A, B, C); D is HPLC diagram of HSCCC injected sample; E is HPLC diagram of four theaflavin standards

如图 2-5 所示, 子图 (A)、(B)、(C)、(D) 分别是 HSCCC 分离组分中的 F2、F3、F4 和 HSCCC 进样样品的 HPLC 图, 其中 F2 和 F4 为单峰, F3 为双峰, 对照图 2-5E 中四种茶黄素标准品的 HPLC 图, 可以初步认定三个分离组分为四种茶黄素, 以峰面积归一法和 2.3.5 中四种茶黄素的标准曲线计算纯度。

F2 的保留时间 33.515 min, TF1 标准品的保留时间为 33.710 min, 图 2-6 (A) 的质谱信息显示 F2 分子的离子峰为 m/z 563.5 $[M-H]^-$, 而 TF1 的相对分

子质量为 564.5, 加入 TF1 标准品后 F2 峰面积增大且没有增加峰数, 因此可以认定 F2 为 TF1, 其纯度为 93.61%。F4 的保留时间 43.240 min, TFDG 标准品的保留时间为 43.098 min, 图 2-6 (B) 的质谱信息显示 F4 分子的离子峰为 m/z 867 $[M-H]^-$, 而 TFDG 的相对分子质量为 868, 加入 TFDG 标准品后 F4 峰面积增大且没有增加峰数, 由此可以认定 F4 为 TFDG, 其纯度为 94.42%。上述质谱信息与 Kuhnert^[92]的研究结果一致。F3 中两个峰的保留时间分别为 39.160 min 和 41.942 min, TF2A 和 TF2B 标准品的保留时间则为 39.619 min 和 42.225 min, 加入 TF2A 和 TF2B 标准品后 F4 的两个峰面积均增大且没有增加峰数, 再结合图 2-5 (D) 中四个峰的位置和 Tao^[93]等人研究中茶黄素的出峰顺序, 基本可以认定 F3 为 TF2A 和 TF2B 的混合物, 纯度分别为 54.71%和 37.87%。

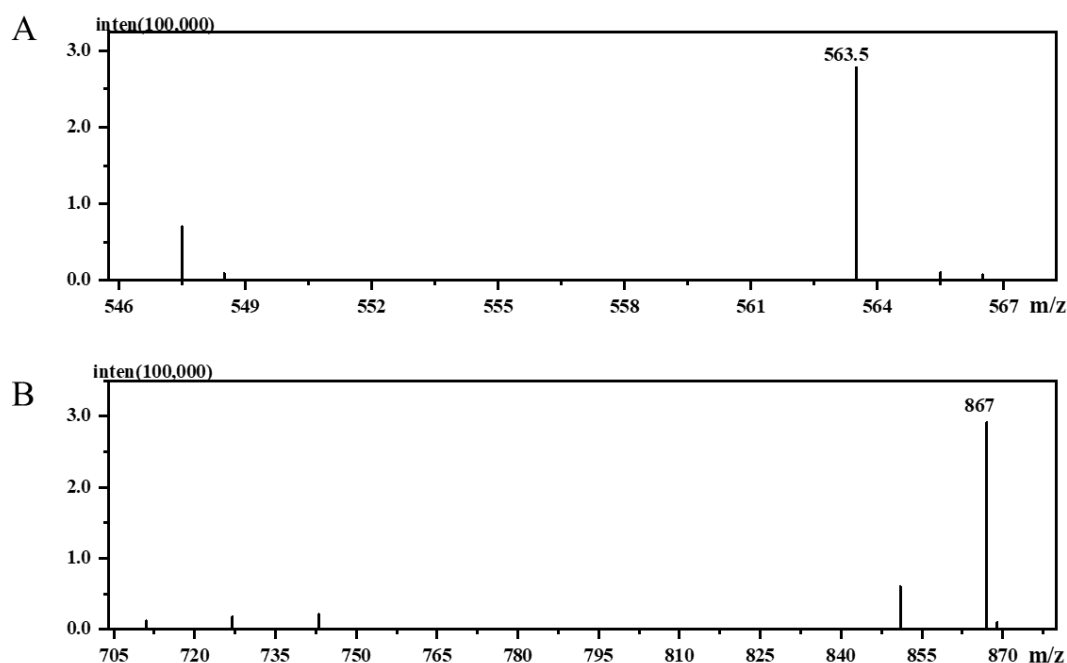


图 2-6 HSCCC 分离组分 F2 (A) 和 F4 (B) 的一级质谱图

Figure 2-6 Primary mass spectrum of HSCCC isolated components F2 (A) and F4 (B)

2.5 结论

(1) 通过单因素实验优化了提取茶黄素的工艺条件: 提取时间 80 min, 提取温度为 80℃, 料液比 1 : 30。以此得到的茶黄素提取率为 11.24%, 纯度为 35.66%。

(2) 以 30%乙醇除杂, 60%乙醇洗脱后, 大孔树脂分离得到的茶黄素纯度

提升到了 59.86%。再以乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水（3：1：1：6）为溶剂体系，对大孔树脂洗脱组分 TFs 进行 HSCCC 纯化，分离出六个峰，茶黄素主要集中在后三个组分中。

（3）将 HSCCC 分离出的后三个组分进行 HPLC 和质谱检测，对照质谱图和四种茶黄素标准品的 HPLC 图，鉴别出 F2 组分为 TF1，纯度为 93.61%；F4 组分为 TFDG，纯度为 94.42%；F3 组分为 TF2A 和 TF2B 的混合物，纯度分别为 54.71%和 37.87%。

第 3 章 茶黄素-3,3'-双没食子酸酯对 α -葡萄糖苷酶抑制机制

3.1 引言

已有研究表明茶黄素在预防和治疗糖尿病方面具有重要作用，这可能因为其对 α -葡萄糖苷酶的抑制效应。 α -葡萄糖苷酶是肠道内分解碳水化合物的关键酶之一，其活性过高会导致餐后血糖水平迅速上升，进而加剧糖尿病病情的发展。所以对 α -葡萄糖苷酶实施抑制性调节，可以有效管理血糖水平并预防与治疗糖尿病。然而，目前临床使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂都存在一定的副作用和局限性，探索天然来源且安全有效的抑制剂显得尤为重要。

目前，多种光谱技术如荧光光谱、紫外光谱、圆二色谱和分子对接技术等常用来研究蛋白质和生物活性分子之间的相互作用^[94, 95]。先前的研究表明 TF2A 通过静态猝灭消除 α -葡萄糖苷酶的固有荧光，并通过疏水相互作用自发与其结合^[96]。Sun 等人^[69]发现没食子酰基的位置和数量对儿茶素和茶黄素抑制 α -葡萄糖苷酶活性有很大的影响，相较于不含没食子酰基的，含有的儿茶素和茶黄素对 α -葡萄糖苷酶展现出更高的抑制活性。然而，部分茶黄素抑制 α -葡萄糖苷酶的机制尚未清楚。因此，本章主要以酶抑制动力学和多光谱法及分子对接技术从分子层面上初步揭示茶黄素对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制，旨在为治疗糖尿病提供一种可行的功能因子。

3.2 实验材料及仪器

3.2.1 实验材料

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

试剂/原料	级别/规格	厂家/来源
F1	--	第 2 章 HSCCC 分离组分
F2 (TF1)	93.61%	第 2 章 HSCCC 分离组分
F3 (TF2A+TF2B)	54.71%+37.87%	第 2 章 HSCCC 分离组分
F4 (TFDG)	94.42%	第 2 章 HSCCC 分离组分
α -葡萄糖苷酶 (酵母)	50 units/mg	上海源叶生物科技有限公司
4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG)	AR	合肥博美有限公司
阿卡波糖	AR	南京都莱生物技术有限公司
磷酸氢二钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
碳酸氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司

3.2.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental Instruments

仪器	型号	厂家
电子天平	CP214	奥豪斯仪器有限公司
全自动酶标仪	1510	美国赛默飞世尔科技公司
数显生化培养箱	WJ-80B-II	上海圣科仪器设备有限公司
荧光分光光度计	F-7100	日本 Hitachi 公司
圆二色光谱仪	Chirascan V100	英国应用光物理公司
紫外分光光度计	UVmini-1280	岛津仪器 (苏州有限公司)

3.3 实验方法

3.3.1 酶抑制活性及动力学分析

适当修改 Li^[97]等人的方法。 α -葡萄糖苷酶 (30 μ L, 1 U/mL) 和 30 μ L 不同浓度 HSCCC 分离组分 (F1、F2、F3、F4) 及 PBS (70 μ L, pH6.8) 混合后在 37°C 恒温培养箱中孵育 10 min, 加入 pNPG (30 μ L, 20 mmol/L), 37°C 反应 20 min, 再加入 Na₂CO₃ (90 μ L 1mol/L) 终止反应。以阿卡波糖作为阳性对照。利用酶标仪在 405 nm 测定吸光度, 抑制率以公式 (3-1) 计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (3-1)$$

式中: A_1 为空白组的吸光度, A_2 为实验组吸光度。

选取抑制 α -葡萄糖苷酶活性能力最强的一个组分进行后续实验。根据上述反应体系，固定 p NPG 浓度（20 mmol/L），调节 α -葡萄糖苷酶浓度从 0.5 上升至 1 U/mL，测定不同浓度 TFDG（0、0.5、1、1.5 μ g/mL）存在时的酶反应初速度（ V ）。固定 α -葡萄糖苷酶浓度（1 U/mL），调节 p NPG 浓度从 5 上升至 20 mmol/L，测定 TFDG 在和不在时的酶促反应速率（ v ），绘制曲线判断抑制类型。

3.3.2 荧光光谱分析

将 1 mL TFDG（0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 μ g/mL）与 1 mL PBS 和 1 mL α -葡萄糖苷酶（1 U/mL）混合，在 298、303、310 K 温度孵育 5 min 后，设置激发波长 280 nm，发射波长 290~500 nm，狭缝宽度 5 nm，扫描速度 1200 nm/min，以获得荧光发射光谱^[98]。

采用上述反应体系，将激发和发射波长的间隔（ $\Delta\lambda$ ）调节为 15 nm 时，获得酪氨酸残基的同步荧光光谱，调节为 60 nm 时获得色氨酸残基的同步荧光光谱，狭缝宽度设置为 5 nm，在 200~400 nm 范围内，获得不同浓度 TFDG 和 α -葡萄糖苷酶的同步荧光光谱^[99]。

采用上述反应体系，激发和发射波长均设置为 200~600 nm，增量 5 nm，测定含有或不含有 TFDG 的 α -葡萄糖苷酶三维荧光光谱，以后者为空白对照^[100]。

3.3.3 荧光共振能量转移

根据 Förster 的非放射性共振能量转移理论， α -葡萄糖苷酶的荧光发射光谱在激发波长 280 nm，发射波长 300~500 nm 范围内测得，TFDG 的紫外吸收光谱在相同波长范围内测得^[101]。

3.3.4 圆二色谱

α -葡萄糖苷酶（1 mL，1 U/mL）和 TFDG（0、1 mL，1 μ g/mL）混合后，以 100 nm/min 扫描速度，带宽 1 nm，恒定氮气环境下利用圆二色光谱仪在波长 190~250 nm 范围内扫描。光谱数据导入 SELCON3 在线程序，计算 α -葡萄糖苷酶二级结构的含量变化^[102]。

3.3.5 分子对接模拟

从蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获得 α -葡萄糖苷酶的 X 射线晶体结构 (PDB 代码: 2QLY)。TFDG 的 3D 结构由 Chem3D 得到, 并使用 MM2 优化几何构型, 使其能量最小化。利用 Auto Dock Tools 软件完成 TFDG 和 α -葡萄糖苷酶的对接。选取结合能最低的结构, 将结果导入到 PyMOL 和 Discovery Studio 软件进行可视化分析^[103]。

3.3.6 数据分析

数据经 SPSS 25.0 统计分析, 显著性分析由 ANOVA 完成, 由 Origin 2018 进行绘图。

3.4 结果分析

3.4.1 茶黄素抑制 α -葡萄糖苷酶活性

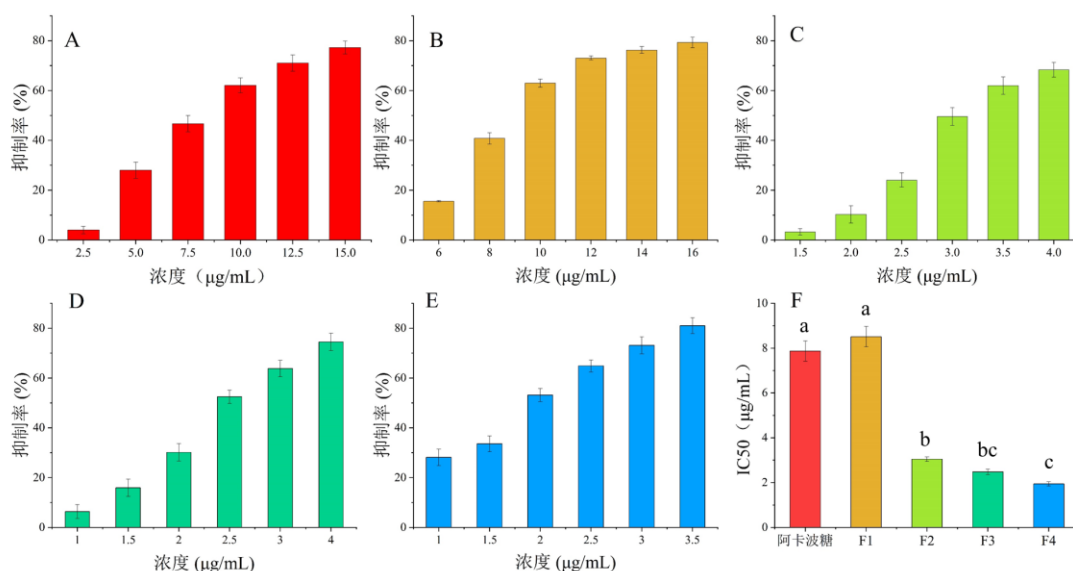


图 3-1 阿卡波糖 (A) 和 HSCCC 分离组分 F1 (B)、F2 (C)、F3 (D)、F4 (E) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率及其 IC_{50} 值 (F), 不同字母代表数据间存在显著性差异

Figure 3-1 Inhibition rates of Acarbose(A), F1(B), F2(C), F3(C) and F4(E) on α -glucosidase and its IC_{50} value(F). There are significant differences between different letters representing data.

以 $p\text{NPG}$ 为底物，体外测定阿卡波糖及 HSCCC 分离的 4 个组分抑制 α -葡萄糖苷酶的结果如图 3-1 所示。结果表明阿卡波糖和 4 个组分都对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制作用，且均存在剂量依赖关系。图 3-1 (F) 显示 F4 组分的 IC_{50} 值（当抑制率为 50% 时抑制剂的浓度）为 $1.945 \pm 0.097 \mu\text{g/mL}$ ，比阿卡波糖的 IC_{50} 值（ $7.872 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$ ）低 4 倍，表明 F4 组分是一种高效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。虽然显著性分析显示 F3 和 F4 的 IC_{50} 值没有显著性差异，但由于 F3 组分是 TF2A 和 TF2B 的混合物，纯度并不高。所以选择 F4 组分，即 TFDG 进行后续实验。

3.4.2 TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的可逆性研究

酶抑制可以分为可逆抑制和不可逆抑制。在饱和底物条件下，理论上所有酶分子都能迅速与底物结合，单独一个酶分子催化底物转变为产物的效率并未因抑制剂的存在而发生改变，对于这些酶分子来说，它们催化的单次反应的速度并没有变慢。但是，由于抑制剂的存在使得一部分酶分子失去了与底物结合的机会，导致整个体系中酶的实际催化反应速率（整体反应初速度）降低。

TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的可逆性可由图 3-2 (A) 看出，四个浓度的 TFDG 经线性拟合后均经过原点，且斜率随着 TFDG 浓度的增加逐渐减小，这说明 TFDG 并没有减少可用酶的数量而是通过非共价键相互作用降低其活性达到抑制效果^[104]，通过物理方法如超滤、升温等可以解除抑制，这种属于可逆抑制。

3.4.3 酶抑制动力学分析

可用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法来判断 TFDG 对 α -葡萄糖苷酶抑制类型，对于混合抑制类型，相关参数以公式为 (3-2) 计算。将双倒数图中斜率和纵截距与 TFDG 浓度进行二次作图来判断结合位点数^[105]。具体计算公式为 (3-3)、(3-4)：

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \left(\frac{[I]}{K_i} + 1 \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \left(\frac{[I]}{K_i'} + 1 \right) \quad (3-2)$$

$$Slope = \frac{K_m}{v_{max} K_i} [I] + \frac{K_m}{v_{max}} \quad (3-3)$$

$$Y_intercept = \frac{1}{v_{app}^{max}} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{[I]}{K_i' v_{max}} \quad (3-4)$$

式中： v 为 α -葡萄糖苷酶的酶促反应速率； K_m 为米氏常数（Michaelis-Menten）； K_i 和 K_i' 分别为抑制剂与酶和抑制剂与酶-底物复合物的抑制常数； v_{max} 为最大反应速率；TFDG 和 p NPG 浓度分别为 $[I]$ 和 $[S]$ 。

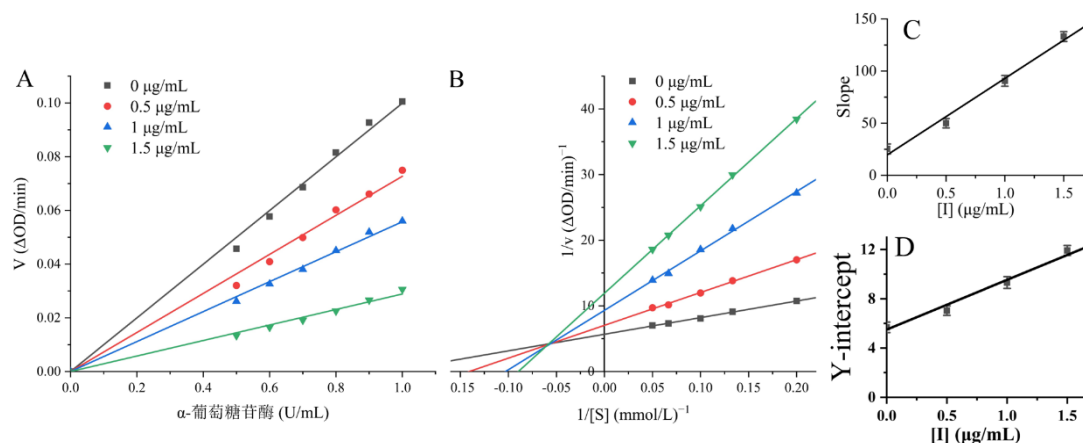


图 3-2 (A) TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的动力学曲线；(B) Lineweaver-Burk 曲线；图 B 中曲线斜率 (C) 和纵轴截距 (D) 与抑制剂浓度 $[I]$ 的线性拟合。

Figure 3-2 (A) Kinetic curve of TFDG inhibition of α -glucosidase. (B) Lineweaver-Burk plots. Linear fitting of the slope (C) and the intercept (D) of the curve in Figure B with the inhibitor concentration $[I]$

表 3-3 混合型抑制的酶抑制动力学参数

Table 3-3 Kinetic parameters of mixed inhibition of enzymes

$[I]$ ($\mu\text{g/mL}$)	V_{max} ($\Delta\text{OD/min}$)	K_m (mmol/L)	K_i ($\mu\text{mol/L}$)	K_i' ($\mu\text{mol/L}$)
0	0.176	4.752	--	--
0.5	0.153	0.745	0.0648	4.836
1	0.131	0.622		
1.5	0.113	0.540		

如图 3-2 (B) 所示，所有直线的斜率和纵截距都不同，但都交于第二象限的一点，并且随着 TFDG 浓度的增大， V_{max} 和 K_m 依次减小（表 3-3），说明 TFDG 是通过混合竞争的方式来抑制 α -葡萄糖苷酶，即抑制剂可与酶或酶-底物复合物结合，且抑制剂、酶、底物之间的结合相互干扰^[106]。如图 3-2 (C) 和 (D) 所示，对四条直线的斜率 Slope 与纵截距 Y-intercept 分别与 TFDG 浓度 $[I]$

进行线性拟合后，根据公式（3-3）和（3-4）得出 K_i 和 K_i' 的值分别为 $0.0649 \pm 0.009 \mu\text{mol/L}$ 和 $4.836 \pm 0.126 \mu\text{mol/L}$ ，这两个值分别符合图 3-2（B）中交点的横纵坐标。因为交点在第二象限且 $K_i < K_i'$ ，所以得出该混合抑制主要是非竞争和竞争型抑制，即相对于酶-底物复合物，抑制剂更易与酶结合^[107]。此外如图 3-2（C）所示，四个浓度 TFDG 的酶抑制动力学曲线斜率与 $[I]$ 线性相关，代表 α -葡萄糖苷酶上仅含一类 TFDG 的抑制位点^[108]。

3.4.4 荧光猝灭分析

荧光猝灭试验可以提供大量分子间相互作用信息。 α -葡萄糖苷酶在 280 nm 激发光下，约在 340 nm 处有最大的荧光强度，这一现象是由于酶分子中存在的色氨酸和酪氨酸，这些氨基酸残基所具有的共轭芳香体系在吸收特定波长的紫外光后，会跃迁到激发态，并在返回基态时释放出荧光^[109]。

图 3-3（A）、（B）和（C）显示 3 种温度下 α -葡萄糖苷酶和不同浓度 TFDG 的荧光发射光谱，可以看出添加的 TFDG 浓度与 α -葡萄糖苷酶的荧光强度成负相关，且结合导致 α -葡萄糖苷酶的最大发射峰移动，说明 TFDG 通过相互作用来猝灭 α -葡萄糖苷酶的固有荧光，并引起了 α -葡萄糖苷酶构象变化^[110]。

根据荧光猝灭理论，荧光猝灭机制包括静态猝灭和动态猝灭，可根据猝灭常数 K_{SV} 判断。动态猝灭是由抑制剂和酶之间的碰撞引起的，温度升高会加强分子间运动，导致抑制剂和酶之间碰撞的概率增加；静态猝灭是由抑制剂和酶结合引起的，而络合物的稳定性随着温度上升而下降。因此，随着温度的升高，动态猝灭的 K_{SV} 值增大，静态猝灭的 K_{SV} 值减小^[111]。

猝灭常数 K_{SV} 和猝灭速率常数 K_q 可由 Stern-Volmer 公式计算^[112]：

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 * [Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3-5)$$

式中： F_0 表示 α -葡萄糖苷酶的荧光强度， F 表示加入 TFDG 后的荧光强度； τ_0 为荧光团在不存在猝灭剂时的平均寿命（ 10^{-8}s ）； $[Q]$ 为抑制剂浓度。

由图 3-3（D）可以看出三种温度下（298、303、310 K）的 Stern-Volmer 曲线呈现出良好的线性关系，说明 TFDG 对 α -葡萄糖苷酶的猝灭机制只有一种。表 3-4 可以看出随着温度从 298 K 上升到 310 K， K_{SV} 值由 $3.61 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ 下降到 $2.67 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ ，表明 TFDG 对 α -葡萄糖苷酶的猝灭机制为静态猝灭。此外，

通常认为猝灭速率常数 K_q 值大于最大散射碰撞猝灭常数 ($2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 时, 猝灭机制为静态猝灭。三个温度下的 K_q 值均远大于 $2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 进一步证实 TFDG 对 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭是与之形成络合物的静态猝灭^[113]。

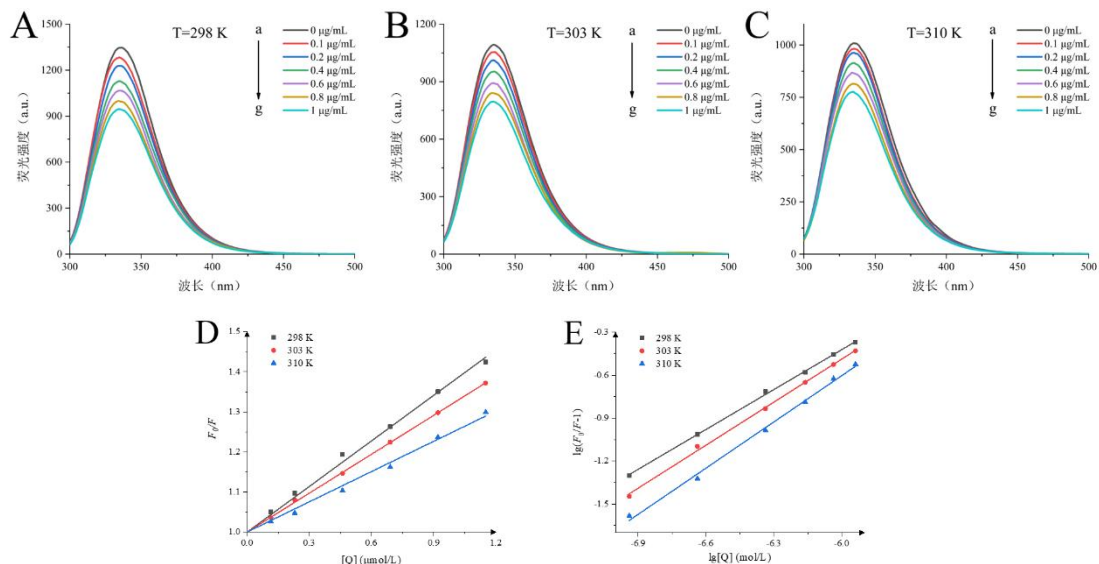


图 3-3 在不同 TFDG 浓度下, α -葡萄糖苷酶在 298 K (A), 303 K (B), 310 K (C) 时的荧光发射光谱; (D) 不同温度下, 荧光强度的比值与 TFDG 浓度的 Stern–Volmer 图; (E) 不同温度下 α -葡萄糖苷酶荧光强度的比值与 TFDG 浓度的双对数图

Figure 3-3 Fluorescence emission spectra of α -glucosidase at 298 K(A), 303 K(B), and 310 K(C) under different concentrations of TFDG; (D) Stern–Volmer plots of the ratio of fluorescence intensity to TFDG concentration at different temperatures; (E) Logarithmic diagram of the ratio of fluorescence intensity of α -glucosidase to TFDG concentration at different temperatures.

结合常数 K_A 和结合位点数 n 由双对数方程 (3-6) 确定^[114]:

$$\lg\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3-6)$$

由表 3-4 观察到 K_A 值随着温度的上升而增大, 表明 TFDG 与 α -葡萄糖苷酶的结合更紧密, 这种现象可能是由于升温增加分子热运动, 使疏水基团更倾向于聚集在一起以减少与水分子的接触, 从而强化疏水相互作用^[115]。此外, 在 TFDG 在 310 K 时的 K_A 值 ($7.10 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$), 高于其他抑制剂: 木犀草素 ($2.04 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$)^[105]; 表没食子儿茶素没食子酸酯 ($5.139 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$)^[103] 等, 说明 TFDG 是优良的抑制剂。结合位点数 (n) 在三个温度下均约等于 1, 这与上述酶抑制动力学分析结果一致, 代表 α -葡萄糖苷酶上仅含一类 TFDG 的

抑制位点。

3.4.5 热力学分析

小分子与生物大分子之间的相互作用主要由疏水相互作用、氢键、静电力、范德华力这四种力驱动的^[116]。热力学参数对于研究分子间相互作用、反应动力学和了解反应过程的能量变化具有重要作用。相关参数利用 van't Hoff 方程 (3-7)、(3-8) 得到^[117]:

$$\lg K_A = -\frac{\Delta H^\circ}{2.303RT} + \frac{\Delta S^\circ}{2.303R} \quad (3-7)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (3-8)$$

式中: ΔH° 为焓变、 ΔG° 为反应的吉布斯自由能、 ΔS° 为熵变; R 为理想气体常数 ($8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$); T 为反应体系的温度; K_A 为相应温度下的结合常数。

由表 3-4 可知 ΔG° 的值为负, 这说明 TFDG 和 α -葡萄糖苷酶的结合是自发进行的。 ΔH° 和 ΔS° 的值分别为 $102.54 \text{ kJ mol}^{-1}$ 和 $443.19 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, 表明反应是吸热和熵增的, 这与 K_A 随温度增加的结果一致。皆为正值的 ΔH° 和 ΔS° 说明 TFDG 和 α -葡萄糖苷酶结合的主要驱动力是疏水相互作用^[118], 但是由于 TFDG 上存在许多羟基, 因此不应排除氢键存在的可能性^[119]。

表 3-4 α -葡萄糖苷酶与 TFDG 在不同温度下的 K_{SV} 、 K_q 、 K_A 、相关热力学参数及 n

Table 3-4 K_{SV} , K_q , K_A , relative thermodynamic parameters and n for TFDG and α -glucosidase at different temperatures

T (K)	K_q ($\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_{SV} (L mol^{-1})	R^a	K_A (L mol^{-1})	R^b	n	ΔH° (kJ mol^{-1})	ΔG° (kJ mol^{-1})	ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
298	3.61×10^{13}	3.61×10^5	0.9976	1.41×10^5	0.9976	0.9285		-29.53	
303	3.21×10^{13}	3.21×10^5	0.9995	3.30×10^5	0.9982	1.0011	102.54	-31.74	443.19
310	2.67×10^{13}	2.67×10^5	0.9959	7.10×10^5	0.9969	1.0759		-34.85	

注: R^a 和 R^b 分别是 K_{SV} 和 K_A 的相关系数。

3.4.6 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可以用来观测蛋白酶构象变化, 将同步荧光光谱的 $\Delta\lambda$ 设置为 15 和 60 nm 时, 能够显示酪氨酸和色氨酸残基周围微环境的动态变化^[120]。

从图 3-4 (A) 和 (B) 看出, α -葡萄糖苷酶中酪氨酸和色氨酸残基的荧光

强度与添加 TFDG 的浓度呈负相关，且色氨酸残基的荧光强度比酪氨酸降低的更多。酪氨酸和色氨酸残基的最大发射波长分别发生略微的蓝移和红移，表明 TFDG 的结合引起 α -葡萄糖苷酶的构象发生变化，导致酪氨酸残基附近的疏水性略微增强，而色氨酸残基周围的极性略微增强^[121]。

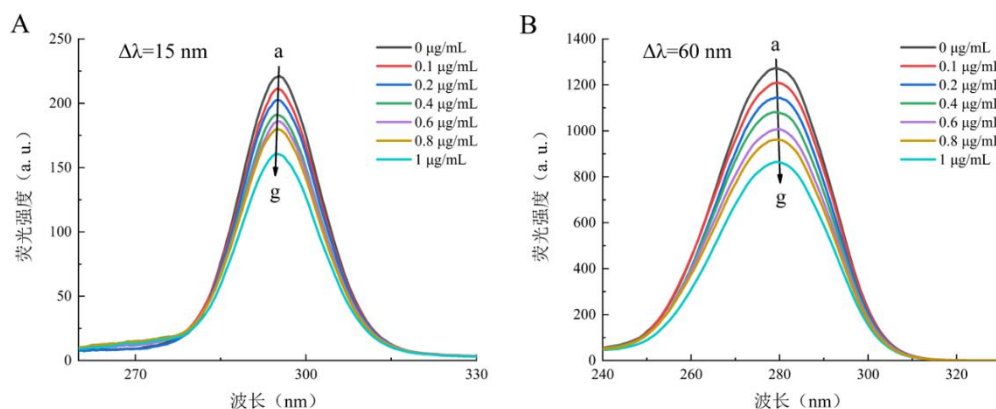


图 3-4 当 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ (A)、 60 nm (B) 时 α -葡萄糖苷酶与不同浓度 TFDG 的同步荧光光谱

Figure 3-4 Synchronous fluorescence spectra of various concentrations of TFDG with α -glucosidase when $\Delta\lambda$ equal to 15 nm (A) and 60 nm (B)

3.4.7 三维荧光光谱分析

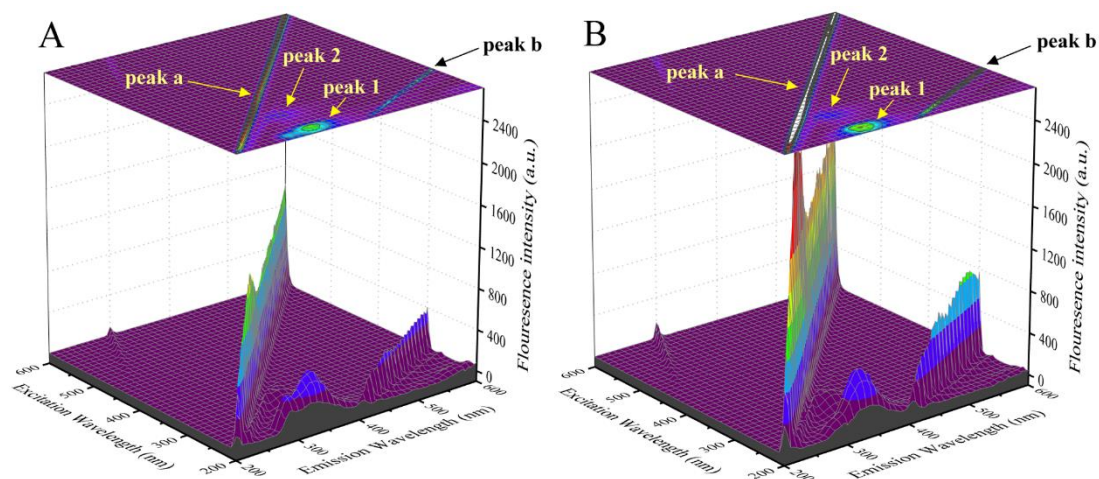


图 3-5 α -葡萄糖苷酶 (A) 和 α -葡萄糖苷酶-TFDG 复合物 (B) 的三维荧光光谱

Figure 3-5 Three-dimensional fluorescence spectra of α -glucosidase (A) and the complex of α -glucosidase-TFDG (B)

利用三维荧光光谱进一步分析 TFDG 对 α -葡萄糖苷酶构象的变化。如图 3-5 (A) 所示， α -葡萄糖苷酶的三维荧光光谱存在四个特征峰，峰 a 为瑞利散射

峰 ($\lambda_{EX} = \lambda_{EM}$)，峰 b 为二阶散射峰 ($2\lambda_{EX} = \lambda_{EM}$)。峰 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=225\text{ nm}/340\text{ nm}$) 反映的是多肽骨架结构中 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的光谱行为，峰 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=280\text{ nm}/335\text{ nm}$) 表示酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱^[122]。如图 3-5 (B) 所示，TFDG 的添加增强了峰 a、b 的荧光强度，说明 α -葡萄糖苷酶与 TFDG 的相互作用引起瑞利散射和二阶散射增强^[123]。同时峰 1 强度约增加了 6%，发射波长蓝移了 5 nm，说明 TFDG 和 α -葡萄糖苷酶复合物的形成改变了 α -葡萄糖苷酶构象，即二级结构相互转变了，峰 2 的变化也说明了这一点，尽管荧光强度没有显著改变，但其激发波长红移了 5 nm，发射波长蓝移了 15 nm，说明 TFDG 的加入改变了酪氨酸和色氨酸残基的微环境^[124]。

表 3-5 α -葡萄糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶-TFDG 复合物的三维荧光光谱峰的信息

Table 3-5 Information of the three-dimensional fluorescence spectra peaks of α -glucosidase and α -glucosidase-TFDG complex

峰序号	α -葡萄糖苷酶		TFDG- α -葡萄糖苷酶	
	峰位置 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}(\text{nm}/\text{nm})$	峰强度 a. u.	峰位置 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}(\text{nm}/\text{nm})$	峰强度 a. u.
Peak 1	225/340	561.1	225/335	597.6
Peak 2	280/335	193.5	285/320	196.4

3.4.8 荧光共振能量转移

根据 Förster 的非放射性共振能量转移理论，当供体荧光分子的发射光谱与受体分子的紫外吸收光谱之间存在较大的重叠积分区域，并且两分子间的空间距离限制在不大于 8 nm 的情况下，能量就能够从供体有效转移到受体^[113]。

TFDG 和 α -葡萄糖苷酶结合过程中的能量转移以公式 (3-9) 计算出：

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (3-9)$$

式中：r 表示 TFDG 与 α -葡萄糖苷酶的结合距离；F 和 F_0 的值等于公式 (3-5) 中的；E 表示能量转移效率； R_0 由公式 (3-10) 计算，代表 E=50% 时的临界距离：

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} \kappa^2 N^{-4} \varphi J \quad (3-10)$$

式中： $\kappa^2=2/3$ ，为 α -葡萄糖苷酶和 TFDG 的空间取向因子； $N=1.336$ ，为介质的折射率； φ 是 α -葡萄糖苷酶量子荧光产率 ($\varphi=0.089$)^[100]；J 为 TFDG 的紫外吸

收光谱与 α -葡萄糖苷酶的荧光发射光谱重叠的积分，由公式（3-11）计算：

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad (3-11)$$

式中： $F(\lambda)$ 指在波长 λ 处 α -葡萄糖苷酶的荧光强度； $\epsilon(\lambda)$ 指 TFDG 在波长 λ 处的摩尔吸光系数。

TFDG 的紫外吸收光谱（b）与 α -葡萄糖苷酶的荧光发射光谱（a）如图 3-6（A）所示。根据公式计算出 $E=0.7587$ ， $R_0=3.07$ nm， $r=2.54$ nm。TFDG 与 α -葡萄糖苷酶的结合距离（ r ）大于 1 nm，小于 8 nm，且 $0.5R_0 < r < 1.5R_0$ ，这有力地证明 TFDG 与 α -葡萄糖苷酶相互作用过程中，其荧光猝灭的一个重要原因在于发生了非辐射性荧光共振能量转移^[125]。

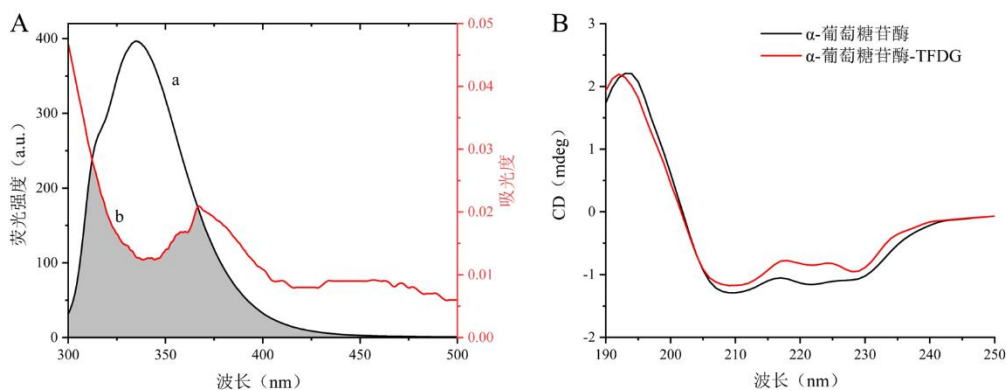


图 3-6（A）阴影部分表示 α -葡萄糖苷酶（a）与 TFDG（b）的荧光光谱与紫外吸收光谱的重叠。（B） α -葡萄糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶-TFDG 复合物的圆二色光谱

Figure 3-6 (A) The shaded area indicates the overlap of the fluorescence spectra and the ultraviolet absorption spectra of α -glucosidase (a) and TFDG (b). (B) Circular dichroism spectra of α -glucosidase and the TFDG- α -glucosidase complex

3.4.9 圆二色光谱分析

圆二色光谱（CD）是研究抑制剂对蛋白酶二级结构影响最常用的技术之一。如图 3-6（B）显示， α -葡萄糖苷酶的 CD 为黑色曲线，其中 α -螺旋的标志特征是位于 209 nm 和 222 nm 的两个负峰，这是由酰胺基团 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的^[120]。TFDG 的加入，使 α -葡萄糖苷酶在 209 和 222 nm 处的 CD 强度均有所减弱（趋近零），但峰位置没有发生显著偏移。表 3-6 为 α -葡萄糖苷酶二级结构含量，变化趋势与图 3-6（B）显示结果相似，在添加 TFDG 后，无规则卷曲含

量增加， α -螺旋、 β -折叠和 β -转角含量降低，这说明 α -葡萄糖苷酶的多肽链有轻微的去折叠。在热力学分析中，熵增的结果也说明了结合导致了复合物的无序性增加。这与其他研究结果相似，有研究报道，木犀草素^[105]和 TF2A^[96]都降低了 α -葡萄糖苷酶二级结构中 α -螺旋的含量。

表 3-6 α -葡萄糖苷酶在添加 TFDG 前后二级结构的含量

Table 3-6 The content of secondary structure of α -glucosidase before and after the addition of TFDG

	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
α -葡萄糖苷酶	11.2%	36.8%	18.1%	33.9%
α -葡萄糖苷酶-TFDG	8.1%	34%	17.8%	40.1%

3.4.10 分子对接

分子对接技术被用来预测 TFDG 的结合位置和与 α -葡萄糖苷酶的非共价相互作用。经过 100 次运行后，选取最低结合能 (-8.14 kcal/mol) 进行分析，如图 3-7 (A) 所示。分子对接模拟得出的结合自由能数值稍低于在 298 K 标准状态下测得的 ΔG° 值 (-7.06 kcal/mol)。这一偏差可能源于对接过程是在真空中进行的计算模拟，未能充分考虑溶剂效应对分子间相互作用及稳定态自由能的影响，溶剂分子与体系间的相互作用会贡献一部分能量^[126]。如图 3-7 (B) 所示，TFDG 结合在活性口袋附近，可能阻碍底物与 α -葡萄糖苷酶结合，以竞争方式抑制 α -葡萄糖苷酶。同时如图 3-7 (D) 所示，TFDG 并没有与活性位点 (Asp443、Glu446) 发生实质的相互作用，而是改变酶的构象来抑制酶活性，荧光光谱及圆二色谱证实了这一点，这符合非竞争性抑制^[127]。因此可知，TFDG 以竞争性和非竞争性混合抑制的方式抑制 α -葡萄糖苷酶，这些与上述酶抑制动力学结果一致。

TFDG 与活性位点附近的氨基酸残基 Asp203 ($2.99\text{\AA}$)、Phe450 ($3.08\text{\AA}$)、Gln603 ($2.85\text{\AA}$) 形成了氢键，但这些氢键较长，表明它们并不是很稳定^[128]。图 3-7 (C) 是 TFDG 与 α -葡萄糖苷酶结合处的表面疏水性图，棕色和蓝色分别代表疏水性和亲水性，它显示 TFDG 插入 α -葡萄糖苷酶的疏水腔，这与另一种 α -葡萄糖苷酶混合抑制剂桦木酸相似^[122]。此外，图 3-7 (D) 显示，Phe450 与

TFDG 骨架上苯环之间存在 Pi-Pi 堆积这种疏水相互作用力，这种作用在骨架上的力会增强复合物的稳定性^[129]。另一种疏水相互作用 Pi-Pi T 型存在于 Trp406 和没食子酸的苯环之间。上述对接模拟对实验结论进行了补充印证，再次证明 TFDG 结合 α -葡萄糖苷酶是由疏水相互作用和氢键驱动的。

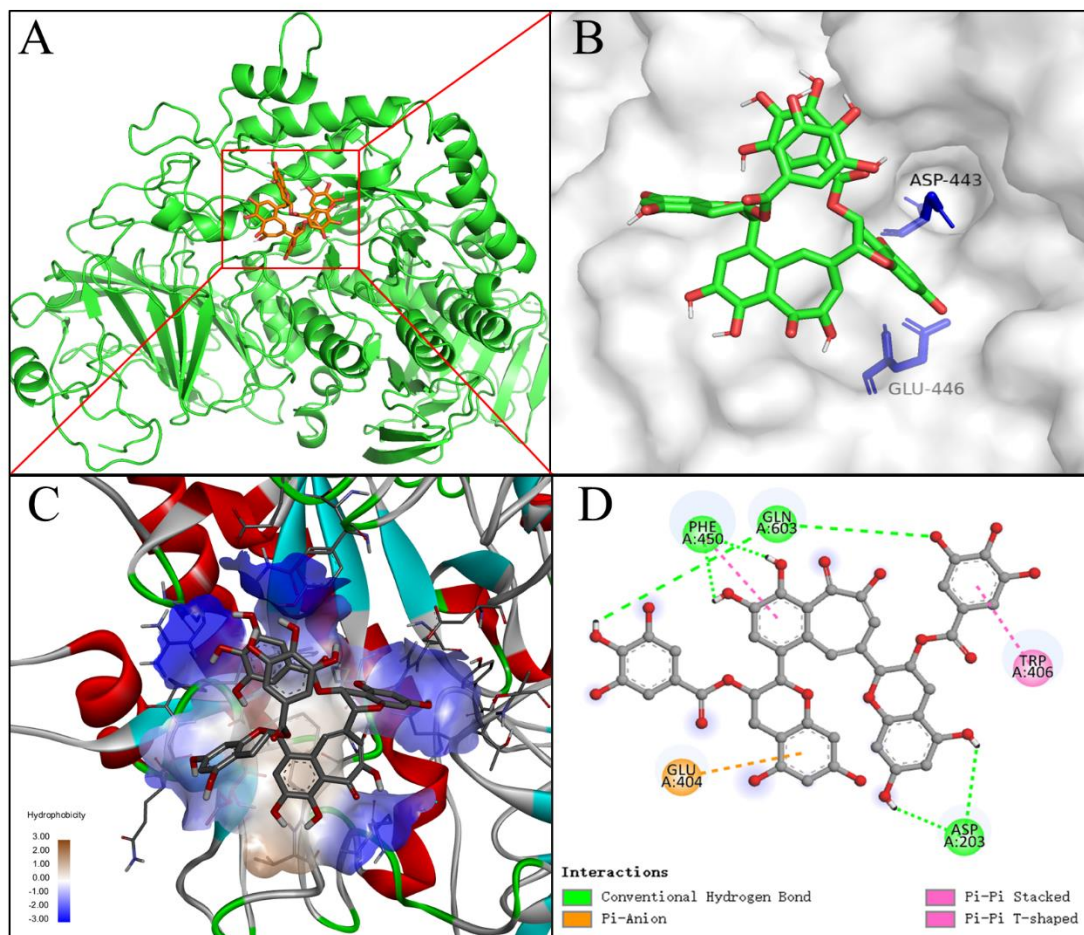


图 3-7 (A) TFDG 与 α -葡萄糖苷酶的结合图；(B) A 的相应部分视图，其中两个氨基酸残基（蓝色）是 α -葡萄糖苷酶的活性位点；(C) α -葡萄糖苷酶的疏水表面与 TFDG 相互作用，棕色和蓝色分别代表疏水性和亲水性；(D) TFDG 与其结合位点周围氨基酸残基之间的相互作用。

Figure 3-7 (A) Binding diagram of TFDG and α -glucosidase; (B) Corresponding partial view of A, where two amino acid residues (blue) are the active sites of the α -glucosidase; (C) The Hydrophobic surface of α -glucosidase interact with TFDG, the brown and blue represent hydrophobicity and hydrophily, respectively; (D) Interaction between TFDG and amino acid residues around its binding site.

3.5 结论

通过荧光光谱、紫外吸收光谱、CD 等多种光谱技术，联合酶抑制动力学分析和分子对接技术，研究了 TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的潜在机制。主要结果为：

(1) HSCCC 分离的后四个组分均对 α -葡萄糖苷酶有良好的抑制活性，其中 F4 组分，即 TFDG 的抑制效果最为显著。实验表明抑制是可逆的，并呈现出竞争和非竞争性混合型抑制。

(2) TFDG 通过与 α -葡萄糖苷酶形成只有一类结合位点的 TFDG- α -葡萄糖苷酶复合物来猝灭 α -葡萄糖苷酶的荧光，其平均结合距离只有 2.54 nm，并且结合伴随着非辐射能量转移。热力学参数 ΔG° 值为负数， ΔH° 和 ΔS° 的值分别为 $102.54 \text{ kJ mol}^{-1}$ 和 $443.19 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ，表明结合是自发吸热熵增的，且疏水相互作用是主要驱动力。同步荧光光谱、三维荧光光谱、CD 结果显示 TFDG 的加入，增强了酪氨酸残基附近的疏水性和色氨酸残基周围的极性，改变了二级结构含量。

(3) 分子对接分析验证了上述试验结论，结果显示 TFDG 插在活性位点附近，但并未与活性位点发生直接的相互作用，而是通过阻碍底物进入活性位点和改变酶构象来抑制酶活性；TFDG 与 Phe450、Trp406 之间存在两种疏水相互作用，且与 Asp203、Phe450、Gln603 形成三个氢键，进一步表明疏水相互作用和氢键是结合的主要驱动力。这些研究结果为 TFDG 作为药物或膳食补充剂治疗糖尿病提供相应的理论基础，其体内影响有待进一步考证。

第 4 章 基于密度泛函理论研究茶黄素抗氧化活性

4.1 引言

人体生理代谢过程、免疫反应以及外界环境因素都会导致人体产生大量的自由基，会直接攻击 DNA 分子，造成碱基突变，链断裂等；蛋白质氨基酸与自由基反应会丧失功能活性，且自由基会参与并加剧炎症反应，长期的高水平自由基会导致免疫系统紊乱，造成免疫力下降。茶黄素作为一种天然抗氧化剂，拥有良好的清除自由基能力。黄酮类化合物通过将酚羟基的氢原子提供给自由基，来中断自由基的链式反应，自身则形成一个相对稳定的半醌式自由基，这属于抗氧化机制中的氢原子转移机制。本章运用密度泛函理论方法，对四种茶黄素分子的抗氧化活性进行研究，同时结合 HSCCC 分离组分的体外抗氧化实验进行讨论，为茶黄素的进一步研究提供理论参考。

4.2 实验材料与仪器

4.2.1 实验试剂与材料

表 4-1 实验试剂

Table 4-1 Experimental reagents

试剂	级别	厂家
2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑 6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)	AR	国药集团化学试剂有限公司
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)	AR	合肥博美有限公司
F2 (TF1)	93.61%	第 2 章 HSCCC 分离组分
F3 (TF2A+TF2B)	54.71%+37.87%	第 2 章 HSCCC 分离组分
F4 (TFDG)	94.42%	第 2 章 HSCCC 分离组分
过硫酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧代-1- 氧 (PTIO)	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸亚铁	AR	国药集团化学试剂有限公司
水杨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
过氧化氢	AR	国药集团化学试剂有限公司

4.2.2 实验仪器

表 4-2 实验仪器

Table 4-2 Experimental Instruments

仪器	型号	厂家
电子天平	CP214	奥豪斯仪器有限公司
数显恒温水浴锅	HH-S28	金坛大地自动化仪器厂
酶标仪	Multiskan FC	赛默飞世尔仪器有限公司

4.3 实验方法

4.3.1 HSCCC 分离组分清除 ABTS⁺

等体积混合 7 mM 的 ABTS⁺和 2.5 mM 的过硫酸钾，避光保存 12 h 后，将其吸光值稀释至 0.7，将不同浓度 HSCCC 分离组分（F2、F3、F4）组分与基准液混合，以维生素 C（VC）作为阳性对照，以 A_S表示其在 734 nm 的吸光度，以 A_C和 A_B表示空白组和对照组。自由基清除率由下式得到：

$$\text{自由基清除率 (\%)} = 1 - \frac{A_S - A_C}{A_B} \times 100\% \quad (4-1)$$

4.3.2 HSCCC 分离组分清除 DPPH•

将不同浓度 HSCCC 分离组分（F2、F3、F4）组分与甲醇溶解的 0.5mM DPPH•溶液混合，暗处反应 30min 后，在 517nm 处测定吸光度值，以 VC 作为阳性对照。实验组、空白组、对照组及清除率公式同 4.3.1 中方法。

4.3.3 HSCCC 分离组分清除•OH

将不同浓度 HSCCC 分离组分（F2、F3、F4）组分与等体积的 3 mM 乙醇-水杨酸溶液、3 mM 硫酸亚铁溶液和 3 mM 的 H₂O₂溶液混合，以 VC 作为阳性对照。实验组、空白组、对照组、波长及清除率公式同 4.3.2 中方法。

4.3.4 HSCCC 分离组分清除 PTIO•

将不同浓度 HSCCC 分离组分（F2、F3、F4）组分与等体积 0.65 mM 的

PTIO•溶液混合后反应 30 min, VC 为阳性对照, 以 A_s 表示其在 557 nm 的吸光度。实验组、空白组、对照组及清除率公式同 4.3.1 中方法。

4.3.5 Gaussian 计算模型和方法

本章利用 Gaussian09 软件中的密度泛函理论方法 B3LYP 在 6-311G (d, p) 水平上对四个茶黄素分子进行结构优化, 并分析茶黄素分子酚羟基中 O-H 键键长、酚羟基上 H 原子的自然键轨道 (Natural bond orbital, NBO) 电荷布局数、酚羟基中 O-H 键解离能 (Bond dissociation energy, BDE)、最高电子占据轨道 HOMO 和最低电子未占据轨道 LUMO 的能级及 $\Delta E_{(LUMO-HOMO)}$ 等量子化学参数对其抗氧化能力的影响。

4.4 结果与讨论

4.4.1 HSCCC 分离组分体外抗氧化能力分析

ABTS 可以被过硫酸钾氧化成稳定的蓝色 $ABTS^+$, 在大约 734 nm 波长处有最大吸收^[130]。待测样品会与 $ABTS^+$ 反应, 通过提供氢原子中和自由基, 从而降低吸光度。如图 4-1 (A) 所示, 三个组分清除 $ABTS^+$ 的能力均强于对照组 VC, 且呈剂量依赖性。表 4-3 显示三个茶黄素组分及 VC 清除 $ABTS^+$ 的 EC_{50} 值, 可以看出 TF1 和 TFDG 清除能力最佳, 分别达到 3.15 和 3.01 $\mu\text{g/mL}$ 。

DPPH• 呈现深紫色, 在 515 nm 波长处有显著的吸光值, 本身带有未配对电子, 抗氧化剂能够捐赠一个氢原子给 DPPH•, 使其被还原成相应的胍衍生物, 颜色会变为淡黄色或近乎无色^[131]。图 4-1 (B) 显示, 三个组分都具有良好的清除 DPPH• 能力, 且呈剂量依赖性。约在 70 $\mu\text{g/mL}$ 之前, 三个组分的清除率都高于对照组。表 4-3 显示, TF1 清除 DPPH• 的能力最佳, EC_{50} 值为 30.75 $\mu\text{g/mL}$ 。

如图 4-1 (C) 和表 4-3 显示, 三个组分清除 •OH 的能力均大于 VC, 且 $F2 > F3 > F4$, F2 清除 •OH 的 EC_{50} 值为 87.84 $\mu\text{g/mL}$, 显著低于其他组分。PTIO• 与抗氧化剂反应后, 会被还原成非自由基形式, 溶液颜色会变浅。三个组分及 VC 清除 PTIO• 的能力呈现良好的量效关系。在 60 $\mu\text{g/mL}$ 时, 除了对照组以外的自由基清除率都达到了一半, 其中 F4 达到了 82.94%, 效果最好, 其 EC_{50} 值

为 21.51 $\mu\text{g/mL}$ 。整体来说, 四种茶黄素分子中 TF1 和 TFDG 的抗氧化活性最佳。

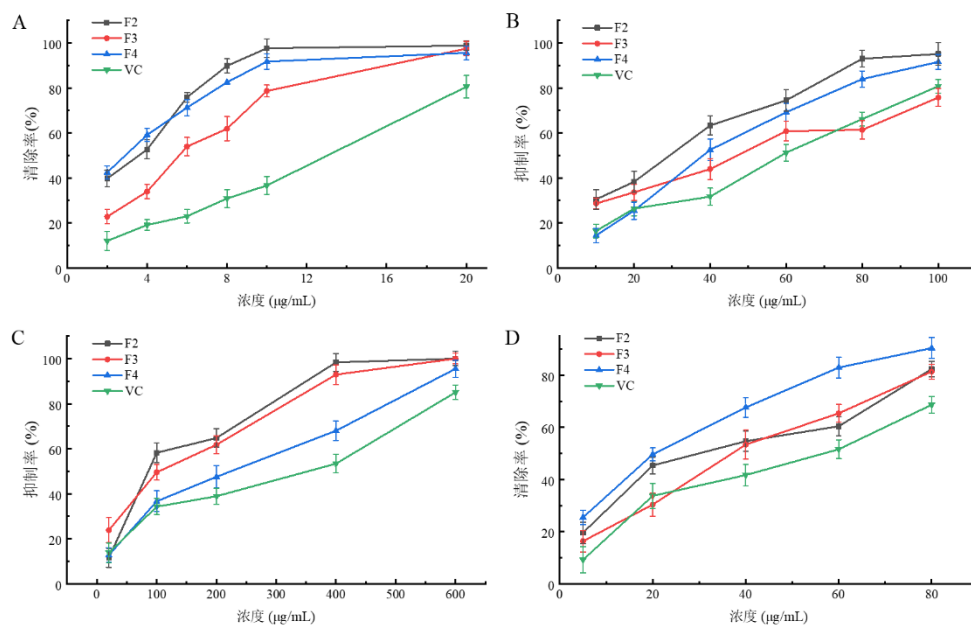


图 4-1 HSCCC 分离组分清除 ABTS^+ (A)、 $\text{DPPH}\cdot$ (B)、 $\cdot\text{OH}$ (C)、 $\text{PTIO}\cdot$ (D) 的效果

Figure 4-1 ABTS^+ (A), $\text{DPPH}\cdot$ (B), $\cdot\text{OH}$ (C), $\text{PTIO}\cdot$ (D) scavenging effect of HSCCC components

表 4-3 HSCCC 分离组分对四种自由基清除率的 EC_{50} 值

Table 4-3 EC_{50} values of HSCCC components for the scavenging rates of four free radicals

组分	EC_{50} 值 ($\mu\text{g/mL}$)			
	ABTS^+	$\text{DPPH}\cdot$	$\cdot\text{OH}$	$\text{PTIO}\cdot$
F2	3.15 ± 0.19^a	30.75 ± 2.36^a	87.84 ± 6.85^a	32.71 ± 3.31^b
F3	6.72 ± 0.13^b	50.73 ± 1.99^c	102.83 ± 4.73^b	43.85 ± 2.14^c
F4	3.01 ± 0.23^a	44.06 ± 2.73^b	255.71 ± 6.43^c	21.51 ± 3.35^a
VC	14.86 ± 1.18^c	58.24 ± 3.76^d	382.53 ± 8.92^{da}	61.48 ± 2.45^d

注: 不同字母代表同组数据之间显著差异

4.4.2 茶黄素分子酚羟基中 O-H 键键长分析

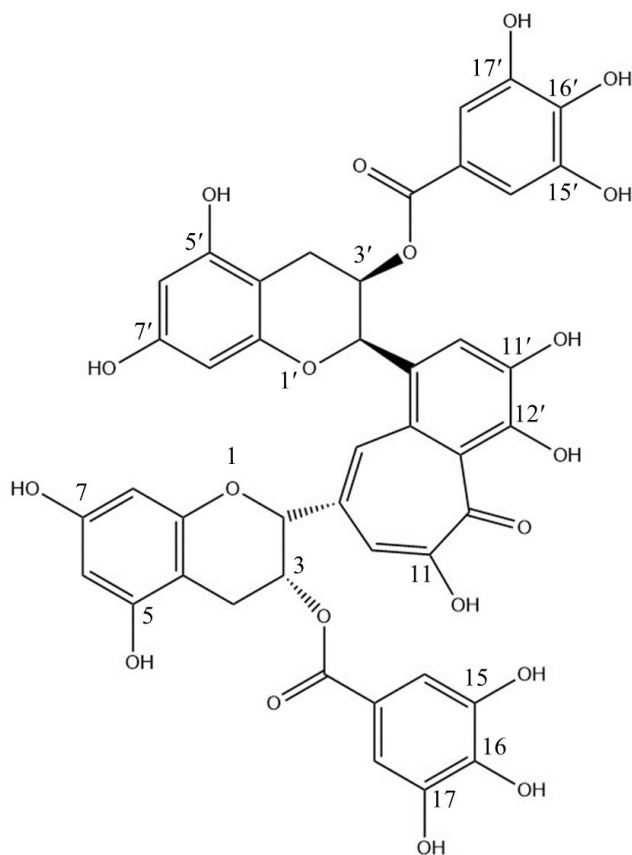


图 4-2 TFDG 的分子结构

Figure 4-2 The molecular structures of the TFDG

运用 B3LYP/6-311G(d, p)方法优化得到四种茶黄素的酚羟基中 O-H 键键长数据如表 4-4 所示。酚羟基是多酚类化合物发挥抗氧化活性的主要功能位点，其抗氧化性的强弱取决于酚羟基的个数和位置，而酚羟基的抗氧化活性则是根据其自由基发生氢转移反应的难易程度，以及该反应后生成的新自由基的稳定性来进行量化评估^[132]。在相似的条件，同种化学键键长越长，越容易断裂，相对来说更活泼。茶黄素就是通过断裂酚羟基中 O-H 键来清除自由基的。

从表 4-4 中可知，四种茶黄素所有的酚羟基中 C5-OH（或 C5'-OH）的 O-H 键长最短，且 TF1 的键长大于 TF2A、TF2B 和 TFDG，这可能是由于没食子酰基的取代，降低了邻近羟基的活性。在四个茶黄素分子所有的酚羟基中，都是 C12'-OH 的 O-H 键最长，这说明这个位置的酚羟基是分子结构上最活跃的部分，这可能是由于苯环和旁边七元环上羰基都是吸电子基，使该酚羟基上电子云密

度增加，活性增强。其次则是位于没食子酰基上的酚羟基的 O-H 键长，这可能是由于其在分子结构外围，受其他基团影响较少。

仅从键长角度来看，TF1 拥有的所有酚羟基（C3、C3'、C5、C5'、C7、C7'、C11、C11'、C12'-OH）都比其他三个茶黄素在同一位置的酚羟基活性更高，而处于没食子酰基上的酚羟基，则是 TFDG 中的活性更高，且 TFDG 的酚羟基数目最多，由此可以得知，四种茶黄素中 TF1 和 TFDG 的抗氧化活性较好。这与 4.4.1 中四种体外抗氧化活性实验的结论一致。

表 4-4 四种茶黄素酚羟基中 O-H 键键长（单位：Å）

Table 4-4 The O-H bond length in the phenolic hydroxyls of four types of theaflavins

	TF1	TF2A	TF2B	TFDG
C3-OH	0.9774152	--	0.9626695	--
C3'-OH	0.9773701	0.9630748	--	--
C5-OH	0.9757947	0.9621126	0.9624599	0.9623452
C5'-OH	0.9758261	0.9623204	0.9619756	0.9623633
C7-OH	0.9762220	0.9626330	0.9632528	0.9628001
C7'-OH	0.9761875	0.9633887	0.9625864	0.963399
C11-OH	0.9944203	0.9651339	0.9636242	0.9651702
C11'-OH	0.9770347	0.9628263	0.9631286	0.9651702
C12'-OH	1.0093523	0.9965087	0.9965744	0.9947904
C15-OH	--	0.9751801	--	0.9753455
C15'-OH	--	--	0.9742526	0.9762892
C16-OH	--	0.9671243	--	0.9673006
C16'-OH	--	--	0.966917	0.9762892
C17-OH	--	0.9660935	--	0.9661715
C17'-OH	--	--	0.9660726	0.9677063

4.4.3 四种茶黄素酚羟基上 H 原子的 NBO 电荷布局数分析

在生物体内，大部分自由基（约 95%）属于含氧自由基类别，这类自由基往往在其氧原子端呈现出较高的电子密度，从而表现出强烈的亲电性，易于与电子云密度较低或者带正电荷的原子或官能团发生相互作用。换言之，在茶黄素分子结构中，酚羟基所连的氢原子若电荷密度较高，即氢原子越容易被自由基捕获，那么该酚羟基就越容易与这些含氧自由基发生有效的抗氧化反应。

表 4-5 为各个酚羟基上氢原子的 NBO 电荷布局数，从中可知，TF1、TF2A 和 TF2B 上 C3 和/或 C3'位酚羟基上氢原子所带正电荷都是最少，说明该位置的酚羟基与自由基反应的能力最弱。而 TFDG 中最低的是 C5 位酚羟基，但却比另外三个茶黄素中的高，且 TF2A 和 TF2B 都高于 TF1，可能是因为没食子酰基的取代，增加了该酚羟基 H 原子上的电荷布局数。对于不含有没食子酰基的 TF1，电荷布局数最高的还是 C12'位，其次是 C11，此顺序与 4.4.2 中结论一致。而含有没食子酰基的三个茶黄素上电荷布局数最高两位都是位于没食子酰基上的 C15（15'）位和 C16（16'）位，再次才到 C12'位，这可能与 C17（17'）位酚羟基有关，因为理论上没食子酰基上三个酚羟基活性应该相差不大，且 4.4.2 中结果也显示如此，但在电荷布局数中 C17（17'）位却是低于 C12'位，这可能是三个酚羟基之间形成了分子内氢键，这导致提供 H 原子的 C17（17'）-OH 上的 H 原子电荷被分散^[133]。通过茶黄素分子之间对比，发现大部分酚羟基上 H 原子电荷布局数都是 TFDG 最大，其次是 TF2A 和 TF2B，TF1 最低，但考虑到自由基进攻带有没食子酰基的茶黄素时，受空间位阻影响较大，因此还需要结合其他因素来判断四个茶黄素的抗氧化性。

表 4-5 四种茶黄素酚羟基上 H 原子的 NBO 电荷布局数（e）

Table 4-5 The NBO charge number (e) of H atom on the phenolic hydroxyls of four theaflavins

	TF1	TF2A	TF2B	TFDG
C3-OH	0.44987	--	0.4803	--
C3'-OH	0.44814	0.48325	--	--
C5-OH	0.46558	0.4884	0.49016	0.48993
C5'-OH	0.46469	0.49364	0.49046	0.49421
C7-OH	0.46046	0.4845	0.5072	0.50244
C7'-OH	0.45972	0.50662	0.48565	0.50676
C11-OH	0.46579	0.49679	0.48751	0.49723
C11'-OH	0.46005	0.48451	0.48773	0.49137
C12'-OH	0.47378	0.51765	0.51732	0.51748
C15-OH	--	0.52704	--	0.52761
C15'-OH	--	--	0.52735	0.49882
C16-OH	--	0.51997	--	0.5206
C16'-OH	--	--	0.51979	0.53675
C17-OH	--	0.5061	--	0.50666
C17'-OH	--	--	0.50618	0.50892

4.4.4 四种茶黄素酚羟基中 O-H BDE 分析

酚羟基的 O-H 键 BDE 可以作为评判其活性的重要指标之一，BDE 值越小，说明断裂这个键所需的能量越少，也就更容易断裂，清除自由基的反应越容易发生。 $BDE=E_{Sr}+E_{Hr}-E_s$ ，分别是分子失去一个氢原子形成的自由基的能量、氢原子的能量、分子的能量。四个茶黄素分子酚羟基中 O-H 键的 BDE 值如表 4-5 所示。

从表中数据可知，四个茶黄素分子中都是 C11'-OH 中 O-H 的 BDE 值最小，说明该位置的羟基最容易发生反应，其次是 C11-OH 位，这表明茶黄素分子中七元环和旁边的苯环是其主要活性部位，其上的羟基会优先与自由基反应。C16-OH（和/或 C16'-OH）的 BDE 值也较低，这符合 NBO 和键长分析中的结论，但 C17 位（和/或 C17'-OH）的 BDE 值却很高，这可能是由于前者的 O 与后者的 H 之间形成了氢键。通过分子间对比发现，除了没食子酰基上的羟基，同一位置酚羟基的 BDE 值基本都是 TF1 的更小，这说明 TF1 的酚羟基抗氧化活性更好，这与 4.4.2 中结论一致。

表 4-5 四种茶黄素酚羟基中 O-H 键 BDE（单位：kJ/mol）

Table 4-5 The O-H bond BDE in the phenolic hydroxyls of four types of theaflavins (kJ/mol)

	TF1	TF2A	TF2B	TFDG
C5-OH	384.1922898	382.348807	383.1188974	383.3438918
C5'-OH	381.8773543	383.1686743	381.8978421	383.580562
C7-OH	381.8883209	383.7477578	383.1610139	383.9840863
C7'-OH	381.8790712	383.4789943	383.3860897	383.8788518
C11-OH	376.6968243	379.6101107	378.7399436	380.5892677
C11'-OH	361.6676898	378.6715945	378.6489869	380.1508072
C12'-OH	385.2753467	385.3103221	384.8220691	384.8824765
C15-OH	--	385.7543951	--	385.8753467
C15'-OH	--	--	385.6936527	382.6727877
C16-OH	--	381.9737393	--	382.5690579
C16'-OH	--	--	381.570952	382.1554082
C17-OH	--	384.1480729	--	384.3743225
C17'-OH	--	--	383.6597936	384.4598992

4.4.5 前线分子轨道及能级分析

根据前线分子轨道理论，分子的化学反应活性在很大程度上受到最高占据分子轨道（HOMO）和最低未占据分子轨道（LUMO）能级分布的影响。HOMO 轨道的能量层次若相对较高，则表明其上的电子具有更强的离域性和活性，从而更容易参与电子转移或丧失的过程。反之，LUMO 轨道则以其低能量特性表现为对电子的接纳倾向，其能级越低，对电子的亲和力越大，越有利于捕获外部电子。两者共同决定了分子参与化学反应的可能性和选择性。而两者的能级差 $\Delta E_{(LUMO-HOMO)}$ 越小，代表电子从占据轨道跃迁到空轨道所需能量越小，即反应更容易发生。四个茶黄素分子的相关参数如表 4-6 所示，前线分子轨道图见图 4-3。

无论从 HOMO 能级、LUMO 能级，还是 ΔE 值判断，最容易发生反应的都是 TF1，其次是 TF2A 和 TF2B，最后是 TFDG，这与体外 $\bullet$ OH 自由基清除实验得到的顺序一致。

表 4-6 四个茶黄素的 E_{HOMO} 和 E_{LUMO} 及 $\Delta E_{(LUMO-HOMO)}$ (a. u.)

	TF1	TF2A	TF2B	TFDG
E_{LUMO}	-0.2239	-0.21737	-0.21674	-0.21441
E_{HOMO}	-0.29975	-0.30069	-0.30021	-0.30094
$\Delta E_{(LUMO-HOMO)}$	0.07585	0.08332	0.08347	0.08653

注：1 a.u. = 2625.5 kJ/mol

前线分子轨道图可以反映分子中活性最高的部位，HOMO 能级图显示该位置活性强，易发生反应。由图 4-3 可知，四个茶黄素分子主要活性部位都在七元环和旁边苯环上的 C11、C11'、C12'-OH，这与上述结论一致，另外没食子酰基的取代除了使其失去 C3-OH（和/或 C3'-OH），并没有显著影响其原本的酚羟基的活性，这与前文中键长和 BDE 的研究结果一致。对于一个没食子酰基的取代，考虑到酚羟基活性的差异，以及空间位阻效应，可能导致 TF2A 和 TF2B 的抗氧化活性不如 TF1，但两个没食子酰基的取代，带来更多的酚羟基，使得 TFDG 的抗氧化活性与 TF1 相差不大。

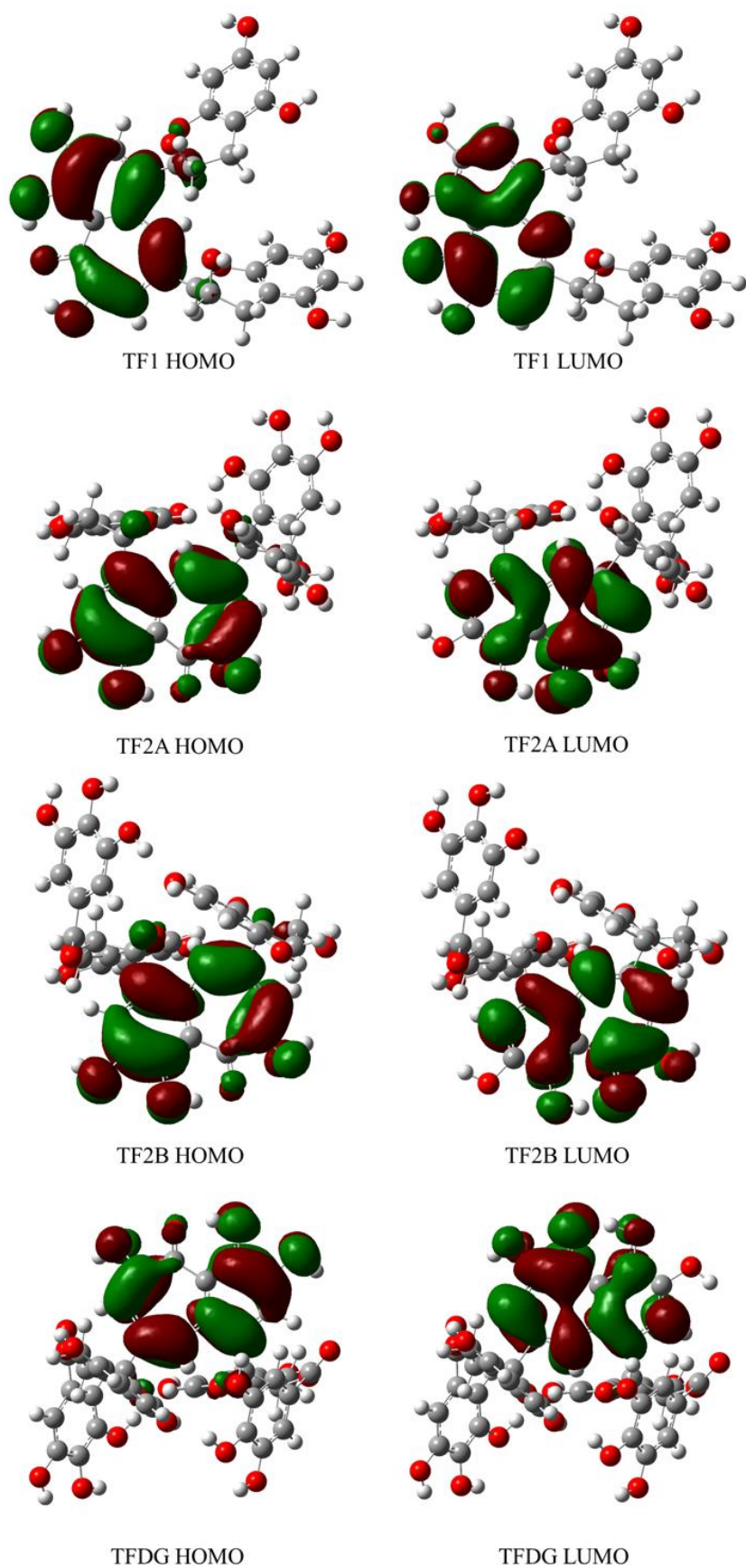


图 4-3 四种茶黄素的前线分子轨道结构图

Figure 4-3 The frontier molecular orbitals structure of four theaflavins

4.5 结论

通过 ABTS^+ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{PTIO}\cdot$ 四种体外抗氧化实验和量子化学理论计算研究了四种茶黄素的抗氧化活性。从酚羟基中氢原子的键长、NBO 电荷布局数、BDE、HOMO、LUMO 及前线分子轨道分析了茶黄素抗氧化活性与其结构上羟基位置和数量的关系，结果如下：

(1) HSCCC 分离组分 F2、F3、F4 的抗氧化活性都优于 VC 对照组，且 F2 和 F4 组分，即 TF1 和 TFDG 的活性更佳。

(2) 酚羟基中氢原子的键长结果分析表明，C5-OH（或 C5'-OH）的 O-H 键长最短，是茶黄素分子中活性最低的羟基，且邻近 C3-OH（C3'-OH）被没食子酰基取代后，其键长会缩短，活性进一步降低。最长的键长则是 C12'-OH，其次是位于没食子酰基上的羟基。TF1 上的所有羟基中氢原子的键长都比其他三个茶黄素同一位置的高，而位于没食子酰基上的羟基中氢原子的键长则是 TFDG 中的最高。

(3) NBO 电荷布局数结果分析表明，没食子酰基取代会增加邻位羟基上氢原子的电荷布局数；没食子酰基上的羟基可能由于形成分子内氢键，导致部分羟基上氢原子的电荷布局数升高，部分降低；C12'-OH 上氢原子的电荷布局数还是较高；大部分羟基上氢原子的电荷布局数都是 TFDG 上的活性更高，其次是 TF2A、TF2B。

(4) BDE 值分析结果表明，C11'-OH（C11-OH）活性较高，其次是没食子酰基上的 C16-OH（和/或 C16'-OH）位，C17 位（和/或 C17'-OH）的活性较低，再次表明没食子酰基上的羟基可能形成分子内氢键。TF1 上的羟基的 BDE 值基本都比其他三个茶黄素的低。

(5) HOMO、LUMO 及其能级间隙表明，TF1 最容易发生反应，TF2A 和 TF2B 其次，最后是 TFDG。前线分子轨道显示茶黄素分子中的七元环及旁边的苯环是其主要活性位置，其上的三个羟基具有更高的活性。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

(1) 利用单因素优化提取茶黄素的工艺条件为提取时间 80 min, 提取温度为 80°C, 料液比 1 : 30, 纯度为 35.66%; 大孔树脂除杂后纯度达到 59.86%; 通过分配系数和分离因子确定溶剂体系为乙酸乙酯-正己烷-甲醇-水 (3 : 1 : 1 : 6), 以此进行 HSCCC 纯化, 分离出的组分经 HPLC 和质谱检测和鉴别, 得出 F2 组分为 TF1, 纯度为 93.61%; F4 组分为 TFDG, 纯度为 94.42%; F3 组分为 TF2A 和 TF2B 的混合物, 纯度分别为 54.71%和 37.87%。

(2) 体外 α -葡萄糖苷酶抑制实验表明 TFDG 的效果最好, IC_{50} 值为 $1.945 \pm 0.097 \mu\text{g/mL}$, 酶抑制动力学表明该抑制是可逆的, 且是竞争性和非竞争性混合抑制。荧光光谱表明 TFDG 与 α -葡萄糖苷酶形成复合物来猝灭其荧光, 结合距离为 2.54 nm, 热力学参数表明结合是自发吸热熵增的, 主要驱动力是疏水相互作用, 且结合导致 α -葡萄糖苷酶的构象和二级结构发生改变, 增强了酪氨酸残基附近的疏水性和色氨酸残基周围的极性, 以及 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角含量降低, 无规则卷曲含量增加。分子对接显示 TFDG 插在活性位点附近来抑制酶活性, 并且与 α -葡萄糖苷酶之间存在两种疏水相互作用和三个氢键。

(3) 四种体外抗氧化实验表明 TF1 和 TFDG 的效果好于 TF2A 和 TF2B 的混合物; 氢原子的键长分析结果表明没食子酰基的取代会降低邻近 C5 (5')、C7 (7') 位羟基的键长, 但 NBO 电荷布局数的分析结果表明取代会增加邻近羟基上 H 原子的电荷布局数, BDE 及上述实验都表明没食子酰基上三个羟基的活性有很大差别, 可能是由于形成分子内氢键。所有结果都表明 C11-OH、C11'-OH、C12-OH 的活性高于其他位置的酚羟基。综合来看, TF1 上的酚羟基相比于其他茶黄素同一位置的具有更高的活性, 但 TFDG 的酚羟基数量更多, 所以理论上是 TF1 和 TFDG 的抗氧化活性更好, TF2A 和 TF2B 的活性低一点, 这与上述抗氧化实验结论一致。

5.2 创新点

- (1) 对 TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的机制进行深入研究。
- (2) 结合密度泛函理论方法和体外抗氧化实验研究四种茶黄素酚羟基的位置和个数对其抗氧化性的影响以及为什么四种茶黄素中 TF1 和 TFDG 的抗氧化活性更好。

5.3 展望

- (1) 选用新的溶剂体系，尝试将 TF2A 和 TF2B 两种同分异构体分离开；进一步利用制备型液相色谱分离两种同分异构体。
- (2) 进行细胞实验和动物实验，研究 TFDG 抑制 α -葡萄糖苷酶的体内效应。
- (3) 进一步研究茶黄素与自由基反应的过渡态结构及能量壁垒。

参考文献

- [1] ROBERTS E A H, CARTWRIGHT R A, OLDSCHOOL M. The phenolic substances of manufactured tea. I.—Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1957, 8(2): 72-80.
- [2] CHEN H D, SHURLKNIGHT K, LEUNG T, et al. Structural identification of theaflavin trigallate and tetragallate from black tea using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(43): 10850-10857.
- [3] AKHTER T, NAKAGAWA T, KOBAYASHI A, et al. Suppression of regucalcin mRNA expression in the hearts of rats administered with free radical compound: the administration-induced death is accelerated in regucalcin transgenic rats [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2007, 19(4): 653-658.
- [4] MATSUO Y, TANAKA T, KOUNO I. Production mechanism of proepitheafagallin, a precursor of benzotropolone-type black tea pigment, derived from epigallocatechin via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate [J]. *Tetrahedron Letters*, 2009, 50(12): 1348-1351.
- [5] STODT U W, BLAUTH N, NIEMANN S, et al. Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(31): 7854-7861.
- [6] 俞晨秀, 秦亚东, 孙莉, 等. 外界多因素对茶黄素类单体稳定性的影响 [J]. *武汉轻工大学学报*, 2022, 41(03): 27-31.
- [7] COLLIER P, BRYEE T, MALLOWS R. The theaflavins of black tea [J]. *Tetrahedon*, 1973, 29: 125-142.
- [8] 严鸿德, 汪东风, 王泽农, 等. 茶叶深加工技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [9] 张建勇. 酯型茶黄素化学氧化形成的影响因素及其机理研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [10] TANAKA T, MINE C, INOUE K, et al. Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechin quinone in the synthesis and degradation of theaflavin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(7): 2142-2148.
- [11] SUBRAMANIAN N, VENKATESH P, GANGULI S, et al. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins

- [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(7): 2571-2578.
- [12] ZENG J, DU G, SHAO X, et al. Recombinant polyphenol oxidases for production of theaflavins from tea polyphenols [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 134: 139-145.
- [13] NARAI-KANAYAMA A, UCHIDA Y, KAWASHIMA A, et al. Elimination of hydrogen peroxide enhances tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavins [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 85: 19-28.
- [14] 竹尾忠一. 茶黄素的分离与定量 [J]. *茶叶技术研究*, 1973, 45.
- [15] 苏亚伦, 陈若芸, 陈振宇. 祁门红茶抗氧化有效成分的研究 [J]. *中药材*, 2004, 27(10).
- [16] 丁阳平. 茶黄素类分离纯化技术及其生理活性研究 [D]. 长沙; 湖南农业大学, 2005.
- [17] 丁阳平, 刘仲华, 黄建安. 聚酰胺分离纯化茶黄素类物质研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 55-57.
- [18] 郁军, 王丽璞, 岳鹏翔, 等. 三种大孔吸附树脂纯化茶黄素的研究 [J]. *茶叶科学*, 2011, 31(5): 447-452.
- [19] 耿姗, 王娟强, 席兴军, 等. 大孔树脂-高速逆流色谱分离纯化薇甘菊中的黄酮类化合物 [J]. *色谱*, 2017, 35(03): 302-307.
- [20] 王亚钦, 吴迪, 赵学志, 等. 正交设计试验优化高速逆流色谱分离制备玛咖中芥子油苷的条件 [J]. *色谱*, 2016, 34(08): 788-794.
- [21] 孙珊珊. 高速逆流色谱分离纯化百华花楸中的多酚化合物及几种小分子化合物与人血清白蛋白相互作用研究 [D]. 辽宁; 辽宁大学, 2019.
- [22] 江河源, 程启珍, 杜琪珍. 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素 [J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(4).
- [23] 江河源, 程启珍, 杜琪珍. 高速逆流色谱在茶黄素分离上的应用 [J]. *茶叶科学*, 2000, 20(1): 40-44.
- [24] WANG K, LIU Z, HUANG J-A, et al. Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography [J]. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2008, 867(2): 282-286.
- [25] YANG C, LI D, WAN X. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea [J]. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2008, 861(1): 140-144.
- [26] LEOPOLDINI M, RUSSO N, TOSCANO M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 288-306.

- [27] LEI S C, XIE M H, HU B, et al. Effective synthesis of theaflavin-3,3'-digallate with epigallocatechin-3-O-gallate and epicatechin gallate as substrates by using immobilized pear polyphenol oxidase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 94: 709-718.
- [28] YOSHIDA H, ISHIKAWA T, HOSOAI H, et al. Inhibitory Effect of Tea Flavonoids on the Ability of Cells to Oxidize Low Density Lipoprotein [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 58: 1695-1703.
- [29] SHARMA N, PHAN H T, CHIKAE M, et al. Black tea polyphenol theaflavin as promising antioxidant and potential copper chelator [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(7): 3126-3135.
- [30] 沈丽萍. 茶黄素研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(1): 134-139.
- [31] SAHA P, DAS S. Regulation of hazardous exposure by protective exposure: modulation of phase II detoxification and lipid peroxidation by *Camellia sinensis* and *Swertia chirata* [J]. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement*, 2003, 1: 313-322.
- [32] LIN J K, CHEN P C, HO C T, et al. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(7): 2736-2743.
- [33] HASANIYA N, YOUN K, XU M, et al. Inhibitory activity of green and black tea in a free radical-generating system using 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline as substrate [J]. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 1997, 88(6): 553-558.
- [34] VU H T, SONG F V, TIAN K V, et al. Systematic characterisation of the structure and radical scavenging potency of Pu'Er tea polyphenol theaflavin [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(46): 9942-9950.
- [35] XU X-X, ZHENG G, TANG S-K, et al. Theaflavin protects chondrocytes against apoptosis and senescence via regulating Nrf2 and ameliorates murine osteoarthritis [J]. *Food & Function*, 2021, 12(4): 1590-1602.
- [36] FU G L, WANG H, CAI Y L, et al. Theaflavin Alleviates Inflammatory Response and Brain Injury Induced by Cerebral Hemorrhage via Inhibiting the Nuclear Transcription Factor Kappa beta-Related Pathway in Rats [Retraction] [J]. *Drug design, development and therapy*, 2022, 16: 2341-2342.
- [37] WU H Q, LI Q, ZHOU X D, et al. Theaflavins Extracted from Black Tea Inhibit Airway Mucous Hypersecretion Induced by Cigarette Smoke in Rats [J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 271-279.
- [38] 刘伟, 周洁, 龚正礼. 茶黄素的功能活性研究进展 [J]. *食品科学*, 2013,

- 34(11): 386-391.
- [39] SENGUPTA A, GHOSH S, DAS R K, et al. Chemopreventive potential of diallylsulfide, lycopene and theaflavin during chemically induced colon carcinogenesis in rat colon through modulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase pathways [J]. European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP), 2006, 15(4): 301-305.
- [40] WANG W X, SUN Y, LIU J, et al. Protective effect of theaflavins on cadmium-induced testicular toxicity in male rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(9): 3243-3250.
- [41] MOHANTY S, ADHIKARY A, CHAKRABARTY S, et al. Operation 'p53 Hunt' to combat cancer: theaflavins in action [J]. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2012, 4(1): 300-320.
- [42] LAHIRY L, SAHA B, CHAKRABORTY J, et al. Contribution of p53-mediated Bax transactivation in theaflavin-induced mammary epithelial carcinoma cell apoptosis [J]. Apoptosis: an international journal on programmed cell death, 2008, 13(6): 771-781.
- [43] LU J, HO C T, GHAI G, et al. Differential effects of theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis, and Cox-2 gene expression in cancerous versus normal cells [J]. Cancer research, 2000, 60(22): 6465-6471.
- [44] LAHIRY L, SAHA B, CHAKRABORTY J, et al. Theaflavins target Fas/caspase-8 and Akt/pBad pathways to induce apoptosis in p53-mutated human breast cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(2): 259-268.
- [45] GOSSLAU A, JAO D L E, HUANG M T, et al. Effects of the black tea polyphenol theaflavin-2 on apoptotic and inflammatory pathways in vitro and in vivo [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(2): 198-208.
- [46] 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.
- [47] GAO Y, RANKIN G O, TU Y Y, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate decreases human ovarian carcinoma OVCAR-3 cell-induced angiogenesis via Akt and Notch-1 pathways, not via MAPK pathways [J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(1): 281-292.
- [48] CHAKRABARTY S, DAS A, BHATTACHARYA A, et al. Theaflavins Depolymerize Microtubule Network through Tubulin Binding and Cause Apoptosis of Cervical Carcinoma HeLa Cells [J]. Journal of Agricultural and

- Food Chemistry, 2011, 59(5): 2040-2048.
- [49] ADHIKARY A, MOHANTY S, LAHIRY L, et al. Theaflavins retard human breast cancer cell migration by inhibiting NF- κ B via p53-ROS cross-talk [J]. Febs Letters, 2010, 584(1): 7-14.
- [50] SIRK T W, FRIEDMAN M, BROWN E F. Molecular Binding of Black Tea Theaflavins to Biological Membranes: Relationship to Bioactivities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(8): 3780-3787.
- [51] LIU Z, DE BRUIJN W J C, BRUINS M E, et al. Microbial Metabolism of Theaflavin-3,3'-digallate and Its Gut Microbiota Composition Modulatory Effects [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 69(1): 232-245.
- [52] LIU S, LU H, ZHAO Q, et al. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41 [J]. Biochimica et biophysica acta, 2005, 1723(1-3): 270-281.
- [53] OHBA M, OKA T, ANDO T, et al. Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses [J]. Journal of Antibiotics, 2017, 70(4): 443-447.
- [54] CHOWDHURY P, SAHUC M E, ROUILLÉ Y, et al. Theaflavins, polyphenols of black tea, inhibit entry of hepatitis C virus in cell culture [J]. Plos one, 2018, 13(11).
- [55] LIN J-K, LIN-SHIAU S-Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols [J]. Molecular nutrition & food research, 2006, 50(2): 211-217.
- [56] LIN C L, HUANG H C, LIN J K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells [J]. Journal of lipid research, 2007, 48(11): 2334-2343.
- [57] LUO X Y, TAKAHARA T, HOU J G, et al. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 417(1): 287-293.
- [58] PENG X L, ZHOU R, WANG B, et al. Effect of green tea consumption on blood pressure: A meta-analysis of 13 randomized controlled trials [J]. Scientific Reports, 2014, 4.
- [59] GRASSI D, DRAIJER R, DESIDERI G, et al. Black Tea Lowers Blood Pressure and Wave Reflections in Fasted and Postprandial Conditions in Hypertensive Patients: A Randomised Study [J]. Nutrients, 2015, 7(2): 1037-1051.
- [60] LORENZ M, URBAN J, ENGELHARDT U, et al. Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved [J]. Basic Research in Cardiology, 2009, 104(1): 100-

- 110.
- [61] BASU S, CHAUDHURI T, CHAUHAN S P S, et al. The theaflavin fraction is responsible for the facilitatory effect of black tea at the skeletal myoneural junction [J]. *Life Sciences*, 2005, 76(26): 3081-3088.
- [62] NAGANO T, HAYASHIBARA K, UEDA-WAKAGI M, et al. Black Tea Polyphenols Promotes GLUT4 Translocation through Both PI3K-and AMPK-dependent Pathways in Skeletal Muscle Cells [J]. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21(3): 489-494.
- [63] SHEN Z D, CHEN Q, JIN T T, et al. Theaflavin 3,3'-digallate reverses the downregulation of connexin 43 and autophagy induced by high glucose via AMPK activation in cardiomyocytes [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(10): 17999-18016.
- [64] TOWNSEND J R, STOUT J R, JAJTNER A R, et al. Polyphenol supplementation alters intramuscular apoptotic signaling following acute resistance exercise [J]. *Physiological Reports*, 2018, 6(2).
- [65] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2018, 138: 271-281.
- [66] ZAHARUDIN N, STAERK D, DRAGSTED L O. Inhibition of α -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin [J]. *Food Chemistry*, 2019, 270: 481-486.
- [67] ZHAO C, YANG C, WAI S T C, et al. Regulation of glucose metabolism by bioactive phytochemicals for the management of type 2 diabetes mellitus [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 59(6): 830-847.
- [68] REAVEN G M. Insulin resistance and human disease: a short history [J]. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 1998, 9(2-4): 387-406.
- [69] SUN L, SONG Y, CHEN Y, et al. The galloyl moiety enhances the inhibitory activity of catechins and theaflavins against α -glucosidase by increasing the polyphenol-enzyme binding interactions [J]. *Food & Function*, 2021, 12(1): 215-229.
- [70] ZHANG J, LI S, LIU X, et al. Inconsistency between polyphenol-enzyme binding interactions and enzyme inhibition: Galloyl moiety decreases amyloglucosidase inhibition of catechins [J]. *Food Research International*, 2023, 163.
- [71] SUN L, WARREN F J, NETZEL G, et al. 3 or 3'-Galloyl substitution plays an important role in association of catechins and theaflavins with porcine

- pancreatic α -amylase: The kinetics of inhibition of α -amylase by tea polyphenols [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 26: 144-156.
- [72] OH J, JO S H, KIM J S, et al. Selected Tea and Tea Pomace Extracts Inhibit Intestinal α -Glucosidase Activity in Vitro and Postprandial Hyperglycemia in Vivo [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 16(4): 8811-8825.
- [73] HOTTA N, KAKUTAB H, SANOC T, et al. long-term Effect of Acarbose on Glycaemic Control in Non-insulin dependent Diabetes Mellitus: A Placebo-controlled Double-blind Study [J]. *Diabetic Medicine*, 1993, 10: 134-138.
- [74] KREYDIYYEH S I, ABDEL-HASAN BAYDOUN E, CHURUKIAN Z M. Tea extract inhibits intestinal absorption of glucose and sodium in rats [J]. *Comparative biochemistry and physiology Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, 1994, 108(3): 359-365.
- [75] NISHIUMI S, BESSYO H, KUBO M, et al. Green and Black Tea Suppress Hyperglycemia and Insulin Resistance by Retaining the Expression of Glucose Transporter 4 in Muscle of High-Fat Diet-Fed C57BU6J Mice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(24): 12916-12923.
- [76] ANDERSON R A, POLANSKY M M. Tea enhances insulin activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(24): 7182-7186.
- [77] JIN D Y, XU Y, MEI X, et al. Antiobesity and lipid lowering effects of theaflavins on high-fat diet induced obese rats [J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(3): 1142-1150.
- [78] 王文祥, 苏畅, 廖惠珍. 茶色素对胰岛素抵抗大鼠胰岛素受体的影响 [J]. *茶叶科学*, 2008, 6: 455-458.
- [79] WRIGHT J S, JOHNSON E R, DILABIO G A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(6): 1173-1183.
- [80] 常瑞, 朱秋劲. 密度泛函理论在多酚抗氧化机制中的应用 [J]. *山地农业生物学报*, 2019, 38(2): 52-60.
- [81] 张鑫, 杨英杰, 吕庆章. 4 种甘草黄酮类化合物抗氧化活性的密度泛函理论研究 [J]. *计算机与应用化学*, 2012, 29(6): 656-660.
- [82] 刘靖丽, 权彦, 闫浩, 等. 基于 DFT 方法研究甘草中黄酮类化合物的抗氧化活性 [J]. *当代化工*, 2020, 49(10): 2163-2170.
- [83] 刘科梅, 聂挺, 潘栋梁, 等. 量子化学计算研究 4 种黄酮类天然抗氧化物清除自由基活性的构效关系 [J]. *南昌大学学报*, 2016, 40(03): 250-256.
- [84] CAI W R, CHEN Y, XIE L L, et al. Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing

- analogues [J]. European food research and technology, 2014, 238(1): 121-128.
- [85] 朱樱. 茶黄素的分离纯化及抗氧化与抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究 [D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2022.
- [86] 郁军, 王丽璞, 岳鹏翔, 等. 三种大孔吸附树脂纯化茶黄素的研究 [J]. 茶叶科学, 2011, 31(5): 447-452.
- [87] DEGENHARDT A, ENGELHARDT U H, LAKENBRINK C, et al. Preparative Separation of Polyphenols from Tea by High-Speed Countercurrent Chromatography [J]. Agriculture Food Chemistry, 2000, 48: 3425-3430.
- [88] LV H, OUYANG J, WANG X, et al. Separation and Purification of Four Flavan-3-ols From *Iris Lactea* Pall. var. *Chinensis* (Fisch.) Koidz by High-Speed Counter-Current Chromatography with Flow-Rate Gradient [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2015, 38(15): 1486-1493.
- [89] ZHANG S, LI L, CUI Y, et al. Preparative high-speed counter-current chromatography separation of grape seed proanthocyanidins according to degree of polymerization [J]. Food Chemistry, 2017, 219: 399-407.
- [90] 朱兴一, 顾艳芝, 谢捷. 响应面法优化红茶中茶黄素的浸提条件 [J]. 食品工业, 2012, 33(11): 93-95.
- [91] WANG K, LIU Z, HUANG J A, et al. Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 867(2): 282-286.
- [92] KUHNERT N, CLIFFORD M N, MÜLLER A. Oxidative cascade reactions yielding polyhydroxy-theaflavins and theacitrins in the formation of black tea thearubigins: Evidence by tandem LC-MS [J]. Food & Function, 2010, 1(2): 180-199.
- [93] TAO W Q, ZHOU Z G, ZHAO B, et al. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC-MS-MS method [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 131: 140-145.
- [94] WANG J, SUN S, ZHAO K, et al. Insights into the inhibitory mechanism of purpurogallin on xanthine oxidase by multiple spectroscopic techniques and molecular docking [J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1228.
- [95] LI J, TIAN R, LIANG G, et al. Interaction mechanism of flavonoids with whey protein isolate: A spectrofluorometric and theoretical investigation [J]. Food Chemistry, 2021, 355.
- [96] LI S, YIN L, YI J, et al. Insight into interaction mechanism between theaflavin-3-gallate and α -glucosidase using spectroscopy and molecular

- p docking analysis [J].
- Journal of Food Biochemistry*
- , 2020, 45(1).
-
- [97] LI X, JIN W, ZHANG W, et al. The inhibitory kinetics and mechanism of quercetin-3-O-rhamnoside and chlorogenic acid derived from
- Smilax china*
- L. EtOAc fraction on xanthine oxidase [J].
- International Journal of Biological Macromolecules*
- , 2022, 213: 447-455.
-
- [98] LIN M-Z, CHAI W-M, ZHENG Y-L, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of rifampicin on
- α
- glucosidase: Insights from spectroscopic and molecular docking analyses [J].
- International Journal of Biological Macromolecules*
- , 2019, 122: 1244-1252.
-
- [99] CAO Q, HUANG Y, ZHU Q-F, et al. The mechanism of chlorogenic acid inhibits lipid oxidation: An investigation using multi-spectroscopic methods and molecular docking [J].
- Food Chemistry*
- , 2020, 333.
-
- [100] PENG X, ZHANG G, LIAO Y, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on
- α
- glucosidase [J].
- Food Chemistry*
- , 2016, 190: 207-215.
-
- [101] ZHANG L L, HAN L, YANG S Y, et al. The mechanism of interactions between flavan-3-ols against
- α
- glucosidase and their in vivo antihyperglycemic effects [J].
- Bioorganic Chemistry*
- , 2019, 85: 364-372.
-
- [102] GREENFIELD N J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure [J].
- Nature Protocols*
- , 2007, 1(6): 2876-2890.
-
- [103] DAI T, LI T, HE X, et al. Analysis of inhibitory interaction between epigallocatechin gallate and
- α
- glucosidase: A spectroscopy and molecular simulation study [J].
- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*
- , 2020, 230.
-
- [104] SI Y-X, WANG Z-J, PARK D, et al. Effect of hesperetin on tyrosinase: Inhibition kinetics integrated computational simulation study [J].
- International Journal of Biological Macromolecules*
- , 2012, 50(1): 257-262.
-
- [105] YAN J, ZHANG G, PAN J, et al.
- α
- Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking [J].
- International Journal of Biological Macromolecules*
- , 2014, 64: 213-223.
-
- [106] FAN M, ZHANG G, PAN J, et al. An inhibition mechanism of dihydromyricetin on tyrosinase and the joint effects of vitamins B6, D3 or E [J].
- Food & Function*
- , 2017, 8: 2601-2610.
-
- [107] YU Q, FAN L, DUAN Z. Five individual polyphenols as tyrosinase inhibitors: Inhibitory activity, synergistic effect, action mechanism, and molecular docking [J].
- Food Chemistry*
- , 2019, 297.
-
- [108] MASUOKA N, NIHEI K I, MAETA A, et al. Inhibitory effects of cardols and related compounds on superoxide anion generation by xanthine oxidase [J].

- Food Chemistry, 2015, 166: 270-274.
- [109] WANG S, XIE X, ZHANG L, et al. Inhibition mechanism of α -glucosidase inhibitors screened from *Artemisia selengensis* Turcz root [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 143.
 - [110] WANG S, LI Y, HUANG D, et al. The inhibitory mechanism of chlorogenic acid and its acylated derivatives on α -amylase and α -glucosidase [J]. Food Chemistry, 2022, 372.
 - [111] REN G, SUN H, LI G, et al. Molecular docking and multiple spectroscopy investigation on the binding characteristics of aloe-emodin to pepsin [J]. Journal of Molecular Structure, 2019, 1195: 369-377.
 - [112] LI J, ZHANG J, YU W, et al. Soluble dietary fibres decrease α -glucosidase inhibition of epigallocatechin gallate through affecting polyphenol-enzyme binding interactions [J]. Food Chemistry, 2023, 409.
 - [113] YU C, YU Z Y, WEN Y T, et al. Omeprazole inhibits α -glucosidase activity and the formation of nonenzymatic glycation products: Activity and mechanism [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 133(2): 110-118.
 - [114] KUMARI M, SINGH U K, SINGH P, et al. Effect of N-Butyl-N-Methyl-Morpholinium Bromide Ionic Liquid on the Conformation Stability of Human Serum Albumin [J]. ChemistrySelect, 2017, 2(3): 1241-1249.
 - [115] JOYE I J, DAVIDOV-PARDO G, LUDESCHER R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins [J]. Food Chemistry, 2015, 185: 261-267.
 - [116] FAN M, ZHANG G, HU X, et al. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism [J]. Food Research International, 2017, 100: 226-233.
 - [117] PEROZZO R, FOLKERS G, SCAPOZZA L. Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects [J]. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2009, 24(1-2): 1-52.
 - [118] JIA J, GAO X, HAO M, et al. Comparison of binding interaction between β -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods [J]. Food Chemistry, 2017, 228: 143-151.
 - [119] ZHANG J, SUN L, DONG Y, et al. Chemical compositions and α -glucosidase inhibitory effects of anthocyanidins from blueberry, blackcurrant and blue honeysuckle fruits [J]. Food Chemistry, 2019, 299.
 - [120] WANG M, SHI J, WANG L, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of

- flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaf against pancreatic α -amylase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 2589-2596.
- [121] TANG H, MA F, ZHAO D, et al. Exploring the effect of salvianolic acid C on α -glucosidase: Inhibition kinetics, interaction mechanism and molecular modelling methods [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 78: 178-188.
- [122] DING H, WU X, PAN J, et al. New Insights into the Inhibition Mechanism of Betulinic Acid on α -Glucosidase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(27): 7065-7075.
- [123] ZHANG Y Z, ZHOU B, ZHANG X P, et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163(2-3): 1345-1352.
- [124] XIAO F, GU M, LIANG Y, et al. Spectroscopic investigation on the interaction of hyperbranched poly (amine) ester with model plasma protein: Effect on the structural and conformational changes [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 118: 1106-1112.
- [125] LIU Y, ZHU J, YU J, et al. A new functionality study of vanillin as the inhibitor for α -glucosidase and its inhibition kinetic mechanism [J]. *Food Chemistry*, 2021, 353.
- [126] WU H, ZENG W, CHEN L, et al. Integrated multi-spectroscopic and molecular docking techniques to probe the interaction mechanism between maltase and 1-deoxynojirimycin, an α -glucosidase inhibitor [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 1194-1202.
- [127] YAMAMOTO K, MIYAKE H, KUSUNOKI M, et al. Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose [J]. *FEBS Journal*, 2010, 277(20): 4205-4214.
- [128] DAI T T, LI T, HE X H, et al. Analysis of inhibitory interaction between epigallocatechin gallate and α -glucosidase: A spectroscopy and molecular simulation study [J]. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 230.
- [129] TANG H, ZHAO D. Investigation of the interaction between salvianolic acid C and xanthine oxidase: Insights from experimental studies merging with molecular docking methods [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 88.
- [130] 李云飞. 短链脂肪酸对秀丽隐杆线虫寿命的影响及分子机制的初步探究 [D]. 长春; 长春理工大学, 2019.
- [131] 文雨欣. 莲蓬多酚的生物活性评价及其在月饼中的应用 [D]. 广州; 华南理

工大学, 2021.

- [132] 范庸. 基于量子化学研究五种黄酮类化合物的抗氧化机制及其在大豆油的应用 [D]. 南昌; 南昌大学, 2019.
- [133] 吴莉. 花青素类化合物抗氧化活性的密度泛函理论研究 [D]. 新乡; 河南师范大学, 2015.

攻读学位期间发表的学术论文目录

- [1]曹宇凡, 黄伟, 陈取明, 蔡为荣. 茶黄素-3,3'-双没食子酸酯对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制[J]. 食品科学, 已录用.
- [2]王晴晴, 蔡为荣, 汪玉玲, 卓允允, 黄伟, 曹宇凡. 蛋清多肽-铁螯合物的制备、表征及对 Caco-2 细胞的促增殖作用[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(04): 197-203.
- [3]蔡为荣, 朱樱, 汪玉玲, 王晴晴, 卓允允, 曹宇凡, 黄伟. 一种简便逆流萃取色谱装置[P]. 安徽省: CN202220215860.7, 2022-07-12.

致谢

在撰写这篇致谢时，我的心中充满了感激与不舍。研究生旅程，如同一场漫长而精彩的探索，每一处风景、每一次挑战，都凝聚了无数人的期望与关爱。此刻，我愿借此机会，向那些在我学术道路上给予我支持与启迪的人们，表达我最深的感谢。

我要衷心感谢我的导师——蔡为荣教授。您的严谨治学、博大胸怀以及对学术的无限热爱，是我前行路上最明亮的灯塔。从选题的迷茫到论文的成型，您的悉心指导与严格要求，让我学会了如何在知识的海洋中航行，如何在困境中寻找突破。您的每一次鼓励，都是我勇气的源泉；您的每一条建议，都如甘露般滋养了我的学术之树。还要感谢我的师姐们、同门、师妹在这段共同奋斗的日子里，我们彼此鼓励，共同进步，是你们的存在，让这段旅程充满了欢笑与温暖。无数次的讨论与合作，不仅深化了我们的友谊，也拓宽了我的视野，这将成为我一生中最宝贵的记忆。

此外，我要向我的家人致以最深的感激。无论是在我遇到挫折时的安慰，还是在我取得成绩时的喜悦分享，你们始终是我最强有力的后盾。父母的理解与默默支持，让我有了坚持梦想的力量，是我不断前行的动力源泉。

还要感谢每一位在我的学术道路上留下痕迹的师长与朋友，你们的每一份贡献，都是我能够顺利完成学业不可或缺的一部分。

总而言之，我的研究生生涯，是成长与收获的见证，更是感恩与珍惜的旅程。在未来的日子里，我将怀揣这份感恩之心，继续探索未知，用实际行动回馈社会，不负所有帮助与支持过我的人。