

文章编号: 1000—369X(2003)02—0119—04

脂溶性茶多酚中的主要活性组分及对人卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外抑制活性

陈平¹, 钟建华¹, 孙东²

(1. 浙江大学化学系, 浙江 杭州, 310028; 2. 温州医学院, 浙江 温州, 325000)

摘要: 利用高速逆流色谱对脂溶性茶多酚中的主要活性组分进行分离和纯化, 获得了一种新的单取代的长碳链脂溶性儿茶素? 表没食子儿茶素-3-O-没食子酸-4'-棕榈酸酯, 并对其分子结构进行了元素分析、IR、MS 和 ¹H-NMR 等表征。药理学实验考察并比较了脂溶性的表没食子儿茶素-3-O-没食子酸-4'-棕榈酸酯、水溶性的绿茶多酚和脂溶性茶多酚对人卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外抑制活性。结果表明, 单取代的 EGCG 棕榈酸酯的活性比脂溶性茶多酚强, 而与绿茶多酚相当。

关键词: 茶学; 茶多酚; 脂溶性茶多酚; EGCG 棕榈酸酯; 高速逆流色谱; 人卵巢癌细胞株; 体外抑制活性
中图分类号: TS201.2; R963 **文献标识码:** A

The Main Active Component of Lipophilic Tea Polyphenols and *in vitro* Inhibition Activity on Ovarian Cancer Cells HO-8910

CHEN Ping¹, ZHONG Jian-hua¹, SUN Dong²

(1. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China; 2. Medical College of Wenzhou, Wenzhou 325000, China)

Abstract: A single-substitution long-chain lipophilic catechin was isolated and purified from lipophilic tea polyphenols by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). Its molecular structure was elucidated as epigallocatechin-3-O-gallate-4'-palmitate by elemental analysis, IR, MS and ¹H-NMR. The *in vitro* inhibition activity of the lipid-soluble epigallocatechin-3-O-gallate-4'-palmitate on ovarian cancer cells HO-8910 was investigated and compared with that of green tea polyphenols and lipophilic tea polyphenols. The results demonstrated that the inhibition activity of the single-substitution EGCG palmitate was almost corresponding to green tea polyphenols, and more effective than lipophilic tea polyphenols.

Key words: Tea science; Tea polyphenols; Lipophilic tea polyphenols; EGCG palmitate; HSCCC;
Ovarian cancer cells; *in vitro* inhibition activity

茶多酚是一种高效低毒的自由基清除剂, 在防辐射损伤、抑菌、抗病毒、抗感染、抑制肿瘤、防治心脑血管疾病、抗衰老等方面具有较好的功效^[1,6], 因此, 茶多酚作为天然自由基清除剂及抗氧化剂在天然药物研究与开发上有着很好的应用前景。但由于绿茶多酚易

溶于水, 妨碍了它在脂溶性体系中充分发挥效用, 因此需对茶多酚中的儿茶素分子进行结构修饰, 使其水溶性改性成脂溶性。尽管已有学者对绿茶茶多酚改性为脂溶性的方法及抗氧化活性进行了许多研究^[7,9], 但对于改性后茶多酚的儿茶素分子结构的测定及结构与其活

收稿日期: 2003—01—12

修订日期: 2003—08—20

作者简介: 陈平(1964—), 男, 浙江宁波人, 理学博士, 浙江大学副教授, 主要从事有机催化及其动力学的研究。

性之间的关系研究至今尚无文献报导。本文利用高速逆流色谱对改性后的脂溶性茶多酚中的主要活性组分进行分离和纯化,获得了一种新的单取代的长碳链脂溶性儿茶素,通过元素分析、红外、质谱和核磁共振等现代仪器进行了分子结构测定,并通过药理学实验考察了对人卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外抑制活性。

1 材料和方法

1.1 主要原料

绿茶多酚(多酚含量: $\geq 95\%$, EGCG 含量: $\geq 50\%$)和脂溶性茶多酚均由浙江余姚四明茶叶生物制品有限公司提供,其中脂溶性茶多酚是按专利技术制造的产品^[10];标样 EGCG 购自 Sigma 公司;人卵巢癌 HO-8910 细胞株由浙江省肿瘤研究所建立并提供;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(四元泵, VWD 检测器), Carlo-Erba EA1110 元素分析仪, Bruker Vector 22 红外分光光度计, Esquire-LC 电喷雾离子阱(ESI)质谱仪, Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪及高速逆流色谱(HSCCC, 柱容量 1100 ml)系统一套。

1.3 实验方法

1.3.1 脂溶性茶多酚的高速逆流色谱分离和纯化

采用正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水 = 1:1:1:1(v/v)的溶剂系统,下相为固定相,上相有机相为流动相,对脂溶性茶多酚进行高速逆流色谱分离和纯化,转速 750 r/min,流量 3.2 ml/min,自动部分收集器收集,并在线记录分离谱图。进样 6 h 后停止,用 HPLC 检测,收集其中含单一组分的溶液,经浓缩干燥,得到一种粉状的固体。将脂溶性茶多酚和分离得到的粉状固体分别溶于 85% 甲醇水溶液中,按以下条件进行 HPLC 分析:色谱柱 Zorbax-ODS (5 μm , 4.6 mm I.D. \times 25 cm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流动相 85% 甲醇水溶液,流速 1.0 ml/min,检测波长 280 nm。

1.3.2 药理学实验

将受试样品绿茶多酚、脂溶性茶多酚及其分离得到的粉状化合物分别用 DMSO 溶解,使浓度分别为 31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g/ml}$,取处于指数生长期的 HO-8910 细胞株一瓶,加入适量的 Trypsin-EDTA 溶液,使贴壁细胞脱落,用 10 ml 含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配成悬液。计数后用完全培养液稀释成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液。取 24 孔板,每孔加上述细胞悬液 1.0 ml,放入培养箱 48 h。然后依次加入 5 个浓度的受试样品和 DMSO,每个浓度 4 孔。培养 48 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 100 μl ,温育 48 h,吸去上清液,加入 0.5 ml 的 DMSO,摇匀,每孔吸出 0.1 ml 于 96 孔板,用酶标仪于 550 nm 处测定每个小孔的 OD 值,用 Bliss 法求出 IC_{50} 。细胞成活率的计算公式为:

$$\text{细胞成活率}(\%) = \frac{\text{加药细胞 OD 值}}{\text{对照细胞 OD 值}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 脂溶性茶多酚的分离和结构表征

由于茶多酚中大部分为儿茶素,并且其中以表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的含量为最高。因此,茶多酚改性成脂溶性茶多酚后,其组成中也应以 EGCG 的衍生物含量最高,且大部分是同系物,性质十分相近,通常的纯化方法较难分离。实验采用高速逆流色谱进行分离和纯化,达到了较好的分离效果(图 1)。收

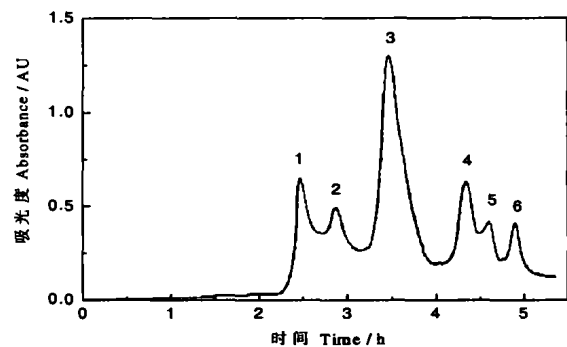


图 1 脂溶性茶多酚的高速逆流色谱分离谱图
Fig. 1 HSCCC separation chromatogram of lipophilic tea polyphenols

集谱图中峰 3 的组分, 进行 HPLC 分析(图 2b), 可见该组分为脂溶性茶多酚的 HPLC 分析谱图(图 2a)中保留时间 11.7 min 的单一组分, 元素分析结果可初步确定该组分为一单取代的 EGCG 棕榈酸酯化合物($C_{38}H_{48}O_{12}$, 理论值: C65.52%, H6.90%; 实验值: C65.38%, H6.85%)。电喷雾离子阱(ESI)质谱(图 3)表明其分子离子峰 m/z 695.4 为单取代的 EGCG 棕榈酸酯化合物(分子量 696.8)的负离子碎片, 主要碎片离子峰 m/z 457.1 为新酯键断裂后的 EGCG 负离子碎片, 由此可确证样品峰 3 组分为 EGCG-COOC₁₅H₃₁。对峰 3 组分作红外测定, 其红外谱图如图 4 所示, 与标样 EGCG 的红外

谱图比较, 发现两图谱较为相似, 但样品峰 3 组分在 2924 cm^{-1} 和 2853 cm^{-1} 处分别有两个较强的长链烷烃的 ν_{as} 和 ν_s 的特征吸收峰, 在 1735 cm^{-1} 处有一非共轭饱和脂肪酸酯 $\nu_{C=O}$ 的特征峰, 表明脂肪酸链以酯键与 EGCG 相连。

样品峰 3 组分的 $^1\text{H-NMR}$ 测量表明, 各相关质子峰的化学位移与标样 EGCG [$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} : 2.65 (d, 1H, 4e-H), 2.92 (m, 1H, 4a-H), 4.95 (s, 1H, 2-H), 5.36 (s, 1H, 3-H), 5.82 (dd, 1H, 8-H), 5.93 (dd, 1H, 6-H), 6.40 (s, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.81 (s, 2H, 2''-H, 6''-H), 8.01 (s, 1H, 4'-OH), 8.70 (s, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 8.89 (s, 1H, 4''-OH), 9.03 (s, 1H, 7-OH), 9.18 (s, 2H, 3''-OH,

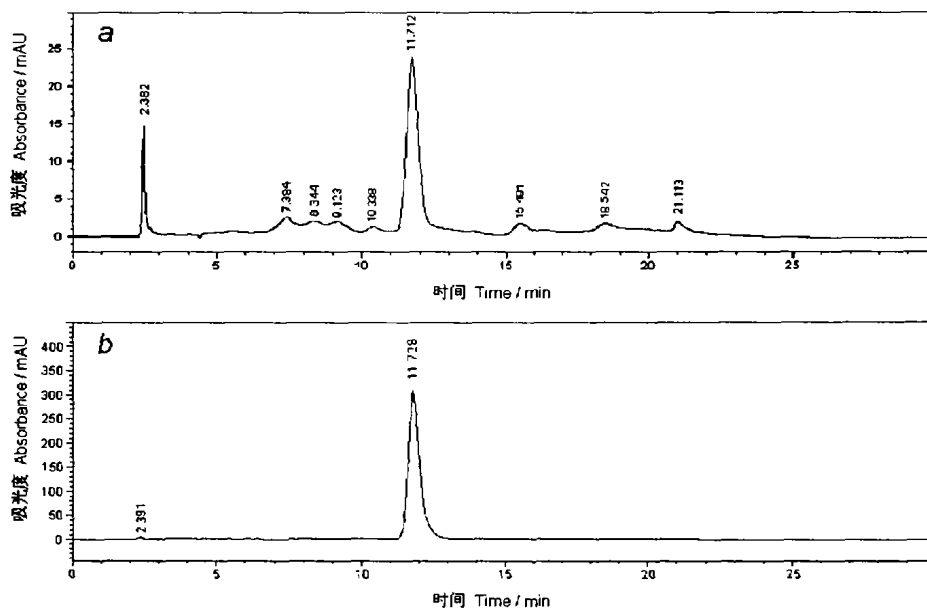


图 2 脂溶性茶多酚(a)和高速逆流色谱分离谱图中峰 3 组分(b)的 HPLC 分析
Fig. 2 HPLC analysis of (a) lipophilic tea polyphenols and (b) the fraction corresponding to peak 3 in HSCCC separation chromatogram

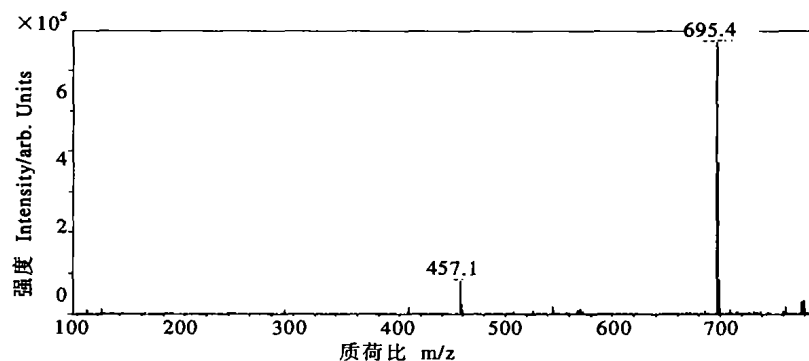


图 3 EGCG 棕榈酸酯的电喷雾离子阱质谱图
Fig. 3 The Electrospray ionization(ESI) MS of EGCG palmitate

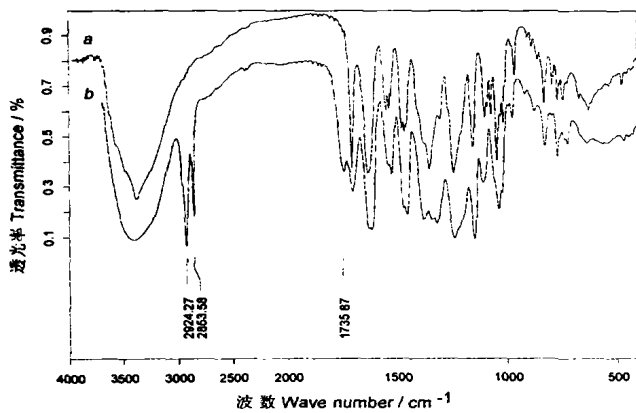


图 4 EGCG(a)和 EGCG 棕榈酸酯(b)的红外谱图
Fig. 4 The IR spectra of (a) EGCG and (b) EGCG palmitate (KBr)

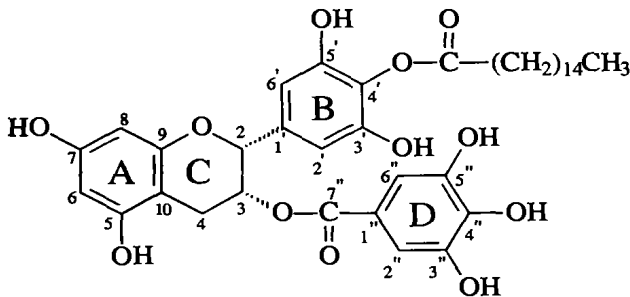


图 5 EGCG 棕榈酸酯分子的结构
Fig. 5 The molecular structure of EGCG palmitate

5"-OH), 9.27 (s, 1H, 5-OH)] 较为相近, 但 δ 8.01 质子峰消失, 同时在 δ 0.85 (t, 3H, $J=6.72$ Hz), δ 1.24 (m, 26H), δ 1.58 (m, 2H) 三处出现了较强的质子峰, 而 δ 0.85、 δ 1.24、 δ 1.58 分别为长链脂肪烃上 $-\text{CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_{13}$ -及 $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 所对应的质子峰。由于 δ 8.01 为 EGCG 中 B 环上 4'-OH 对应的质子峰^[11], 表明长碳链酰基已导入了 EGCG 分子结构的 B 环 4' 位酚羟基上, 而 EGCG 的母体环没有发生改变。由此可见, 该单取代的 EGCG 棕榈酸酯化合物的结构可确定为表没食子儿茶素-3-O-

没食子酸-4'-棕榈酸酯(图 5)。

2.2 EGCG 棕榈酸酯对人卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外抑制活性

表 1 为采用 MTT 法检测三种受试样品对人卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外抑制活性对比的实验结果。从表中可以看出, 脂溶性茶多酚中长碳链基团的导入, 在提高茶多酚脂溶性的同时, 原有的生物活性有所下降, 而单取代的 EGCG 棕榈酸酯仍保持较好的抗癌效果, 其体外抑制活性与茶多酚相当, 而比脂溶性茶多酚有更强的活性。说明茶多酚经改性后, 虽然脂溶性增加, 清除脂溶性自由基的能力较强, 但长链脂溶基团一方面可以单取代和多取代形式与儿茶素分子结合, 使儿茶素分子中的酚羟基数目减少, 而且多取代形式在空间结构上会对周围其他羟基产生屏蔽作用; 另一方面, 长链脂溶基团的导入使得脂溶性茶多酚的平均分子量增加, 引起相同重量浓度下的摩尔浓度下降, 最终导致了脂溶性茶多酚对癌细胞抑制活性的下降。而对于单取代的 EGCG 棕榈酸酯, 虽然其分子量有所增加, 但不存在多取代形式在空间结构上对周围羟基的屏蔽作用, 由于组分上是单一的儿茶素中最具活性的 EGCG 的单取代衍生物, 不仅改善了水溶性 EGCG 的脂溶性, 其分子更易穿过脂质层, 深入脂质体的憎水区, 对脂溶性自由基的清除能力增强, 而且相应浓度下抑制癌细胞的活性组分的有效浓度高。因此, 脂溶性茶多酚中的主要活性组分表没食子儿茶素-3-O-没食子酸-4'-棕榈酸酯作为抑制癌细胞的有效活性组分, 可望替代混合物的水溶性茶多酚, 在西药开发中有着潜在的应用前景。[下转第 104 页]

表 1 受试样品对人卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外抑制率(%)及 IC_{50}
Table 1 The *in vitro* inhibition activity and IC_{50} of samples on ovarian cancer cells HO-8910

受试样品名称 Samples	浓度 Concentration ($\mu\text{g/ml}$)					IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	31.25	62.5	125	250	500	
EGCG 棕榈酸酯 (EGCG palmitate)	29.6	55.2	58.6	75.4	92.8	78.2
脂溶性茶多酚 (lipophilic tea polyphenols)	23.0	46.0	56.3	70.4	87.8	88.9
绿茶茶多酚 (green tea polyphenols)	33.3	50.0	59.0	78.4	93.0	72.2

- the antitumor activity of adenylylase[J]. *Cancer-letters*, 1996, 105 (2): 203 – 209.
- [9] Sadzuka Y, Sugiyama T, Sonobe T. Improvement of idarubicin induced antitumor activity and bone marrow suppression by theanine, a component of tea[J]. *Cancer-letters*, 2000, 158 (2), 119 – 124.
- [10] Sugiyama T, Sadzuka Y, Tanaka K, Sonobe T. Inhibition of glutamate transporter by theanine enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin[J]. *Toxicology-letters*, 2001, 121(2), 89 – 96.
- [11] Menozzi A Appiani G, 1892 Sopra un nuovo acido derivato dal glutammico. *Gazz. Chim. Ital.*, 22, 105 – 108.
- [12] Menozzi A, Appiani G, 1892 Sopra alcuni derivati dell'acido glutammico: acidi piroglutammici e piroglutammidi. *Gazz. Chim. Ital.*, 24, 370 – 391.
- [13] Abderhalden E, Kautzsch K, 1910 Zur kenntnis der glutaminsäure und der Pyrrolidoncarbonsäure. *Physiol. Chem.*, 68, 447 – 459.
- [14] Beecham A F, 1954 The action of ammonia and other bases on γ -methyl and γ -ethyl L-glutamate. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4615.
- [15] Lichtenstein N, 1942 Preparation of γ -alkylamides of glutamic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 1021 – 1022.
- [16] Sakato Y, Hashizume T, Kishimoto Y, 1950 The chemical constituents of tea: V, Synthesis of theanine, *J. Agric. Chem. Soc. Jap.*, 23, 269 – 271.
- [17] Kawagishi H, Sugiyama K, 1992 Facile and large-scale synthesis of L- theanine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, (4) 689.
- [18] Marfey P, 1984 Determination of D-amino acids: II, Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.*, 49, 591 – 596.

[上接第 118 页]

参考文献:

- [1] Fujiki H, Sukanuma M, Imai K, *et al.* Green tea: cancer preventive beverage and/or drug[J]. *Cancer Letters*, 2002, 188: 9-13
- [2] Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols[J]. *Mutation Research*, 1999, 436: 69-97.
- [3] 刘刚, 陆劲松, 邵志敏, 等. 茶多酚对肿瘤防治作用的研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2002, 12(3): 265-268.
- [4] 彭慧琴, 蔡卫民, 项哨. 茶多酚体外抗流感病毒 A3 的作用[J]. *茶叶科学*, 2003, 23(1): 79-81.
- [5] 胡秀芳, 杨贤强. 茶儿茶素对癌细胞凋亡作用的研究[J]. *茶叶科学*, 2001, 21(1): 26-29.
- [6] 胡秀芳, 沈生荣, 朴宰日, 等. 茶多酚抗氧化机理研究现状[J]. *茶叶科学*, 1999, 19(2): 93-103.
- [7] 王巧娥, 唐安斌, 马志红, 等. 含不同脂肪链脂溶性茶多酚的合成及其抗氧化活性研究[J]. *精细化工*, 2002, 19(2): 86-89.
- [8] 李清禄, 林新华. 增效脂溶性茶多酚溶液的制备及其在食用植物油中的抗氧化性能[J]. *福建农业大学学报*, 2001, 30(2): 244-249.
- [9] 梁燕, 沈生荣, 杨贤强, 等. 脂溶性茶多酚抗氧化特性的研究[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 1999, 25(5): 529-534.
- [10] 钟建华, 陈平, 张广元, 等. 脂溶性茶多酚及其酯化法生产方法[P]. 1999, CN 1231277A.
- [11] 贾志胜, 周波, 杨立, 等. 绿茶中茶多酚的 2D NMR 研究[J]. *波谱学杂志*, 1998, 15(1): 23-30.