

基于 DPPH - HPLC - Q - TOF - MS/MS 技术的 安化黑茶发酵前后抗氧化活性物质基础研究

周卿意骏^{1,2}, 贺 炜³, 张水寒^{1,2}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南 长沙, 410013;

3. 绿之韵生物工程集团有限公司, 湖南 长沙, 410329)

[摘要] 目的: 建立基于高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱技术(HPLC - Q - TOF - MS/MS)的安化黑茶抗氧化活性成分快速筛选和鉴别的方法, 并对安化黑茶生茶及熟茶的抗氧化活性成分分别进行检测和分析。方法: 采用 Inertsil ODS - 2C₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5μm)反相 HPLC 梯度洗脱法分离各主要成分, 在负离子模式下, 利用四级杆 - 飞行时间串联质谱对各主要活性成分进行检测; 进而在安化黑茶生茶及熟茶乙酸乙酯及正丁醇部位分别加入适量 1,1 - 二苯基 - 2 - 苦基苯肼(DPPH)作为实验组, 避光室温反应 30min 后经液质联用分析, 并与不加入 DPPH 的空白组物质进行比较, 快速发现其活性成分; 并采用对照品、文献比对、质谱裂解规律分析鉴定生茶、熟茶的抗氧化活性成分。结果: 依据质谱裂解规律及文献检索, 从安化黑茶生茶乙酸乙酯部位中共鉴定出 32 个抗氧化活性成分, 从生茶正丁醇部位中共鉴定出 28 个抗氧化活性成分; 从熟茶乙酸乙酯部位中共鉴定出 31 个抗氧化活性成分, 从熟茶正丁醇部位中共鉴定出 26 个抗氧化活性成分。结论: 利用 DPPH - HPLC - Q - TOF - MS/MS 技术快速筛选和鉴别安化黑茶中抗氧化活性成分的有效方法, 为其质量控制及物质基础研究提供了技术支持。

[关键词] 安化黑茶; HPLC - Q - TOF - MS/MS; DPPH; 抗氧化活性成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.08.064

Antioxidant components in Anhua dark tea before and after fermentation:

A basic research based on DPPH - HPLC - Q - TOF - MS/MS

ZHOU Qingyijun^{1,2}, HE Wei³, ZHANG Shuihan^{1,2}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China;

3. RESGREEN Biotechnology Group Co., Ltd., Changsha 410329, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To establish the method for rapid screening and identification of antioxidant components in Anhua dark tea based on high - performance liquid chromatography coupled with quadrupole time - of - flight tandem mass spectrometry (HPLC - Q - TOF - MS/MS), and to investigate the antioxidant components in raw and fermented Anhua dark tea. Methods: Reversed - phase HPLC was performed on an Inertsil ODS - 2 C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm), and gradient elution was performed to separate the main components. Q - TOF - MS/MS was used to detect major active components in the negative ion mode. 1,1 - Diphenyl - 2 - picrylhydrazyl - hydrate (DPPH) was added to the ethyl acetate extract and the n - butanol extract of raw and fermented Anhua dark tea, which was established as experimental group, and then liquid chromatography - mass spectrometry was performed after 30 minutes of reaction in a dark place at room temperature. The substances without the addition of DPPH were established as blank group, and the experimental group was compared with the blank group to rapidly identify active components. Reference substance, literature review, and fragmentation pattern in mass spectrometry were used to analyze the antioxidant components of raw and fermented Anhua dark tea. Results: Based on the fragmentation pattern in mass spectrometry and literature search, 32 antioxidant components were identified in the ethyl acetate extract of raw Anhua dark tea, and 28 antioxidant components were identified in the nbutanol extract of raw Anhua dark tea; 31 antioxidant components were identified in the ethyl acetate extract of fermented Anhua

第一作者: 周卿意骏, 男, 2015 级博士研究生, 研究方向: 中药制剂质量标准的研究

通讯作者: 张水寒, 女, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 中药资源、中药制剂及质量标准的研究及新药开发, E - mail: Zhangshuihan220@126.com

dark tea, and 26 antioxidant components were identified in the n-butanol extract of fermented Anhua dark tea. Conclusion: The DPPH-HPLC-Q-TOF-MS/MS method is an effective method for rapid screening and identification of antioxidant components in Anhua dark tea, which provides technical support for quality control and basic research.

[Key words] Anhua dark tea; high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-hydrate; antioxidant component

黑茶是我国特有的一类后发酵茶,其将鲜茶叶经杀青渥堆发酵蒸压等工序制成。安化黑茶(又叫湖南黑茶)是中国黑茶体系中最典型的代表,其含有茶多酚、咖啡碱、氨基酸、多糖、微量元素等化学成分,具有抗氧化、抑菌、降脂减肥、降血糖、抗肿瘤等功效^[1]。儿茶素类化合物是黑茶的重要组成部分。黑茶作为一种天然抗氧化剂,与现有的各种抗氧化剂相比较,具有极大的优势。黑茶抗氧化活性组分主要为茶叶内的茶多酚类及黄酮类组分。

液质联用技术具有高效、快速、简便的特点,在快速分析鉴定中药化学成分方面具有明显优势,使其成为复杂成分分析的有效方法。HPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术具有周期短、灵敏度高、选择性强等特点,可在获得化合物准确分子质量碎片信息的基础上对被测成分进行精确地鉴别。安化黑茶含有黄酮类、生物碱类、酚类等多类抗氧化化学成分,运用 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对其进行成分分析,可快速鉴定安化黑茶的化学成分,对阐明其抗氧化活性物质基础具有重要的作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,包括二元高压泵、在线脱气装置、自动进样器、柱温箱、紫外检测器);6530 Q-TOF 质谱仪(美国安捷伦公司);电喷雾离子源(ESI);MassHunter 质谱工作站(美国安捷伦公司);AL204 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ5200DE 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 甲醇为色谱纯,甲酸均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH,分析纯,美国 Sigma 公司),各对照品分别为木犀草素、山奈酚,均购自中国食品药品检定研究院。安化黑茶由茶坤缘公司提供。

2 方法与结果

2.1 HPLC 条件 色谱柱为 Inertsil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm);检测波长 254nm;柱温 30℃;体积流量 1.0ml/min,柱后分流比为 2:1;进样量 10μl;流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B)溶液,梯度洗脱:0~5min,5~15% A;5~10min,15~25% A;10~40min,25~55% A;40~55min,55~100% A;55~60min,100% A;60~70min,100~5% A。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);正离子模式扫描;毛细管电压 4000V;离子源温度 350℃;雾化器压力 40psi (1psi=6894.8Pa);干燥器流速 6L/min;锥孔电压 65V;干燥器温度 350℃;碎片电压 130V;质量数扫描范围 m/z 100~1000;采样频率 0.1s,间隔 0.02s;碰撞能量分别采用 5、10、

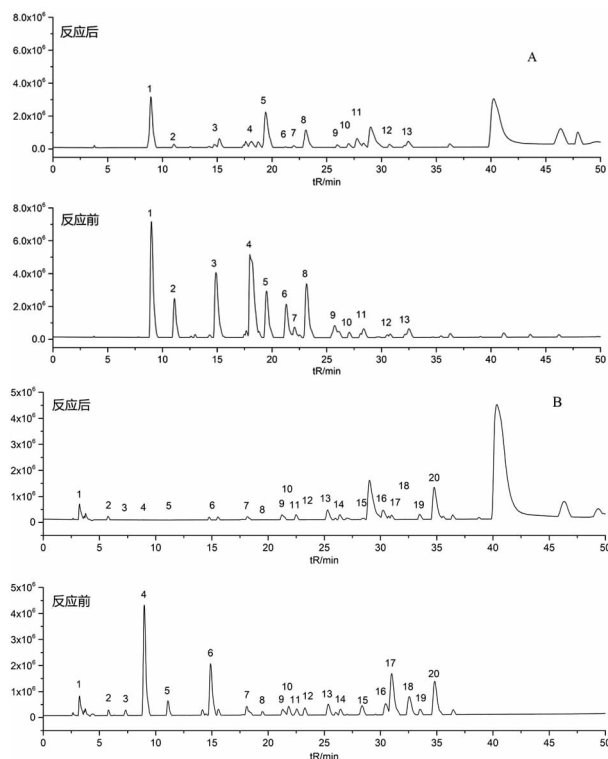
20、25、30、35eV。测量样品前,使用调谐液校准质量轴,以保证质量精度误差小于 1×10^6 。

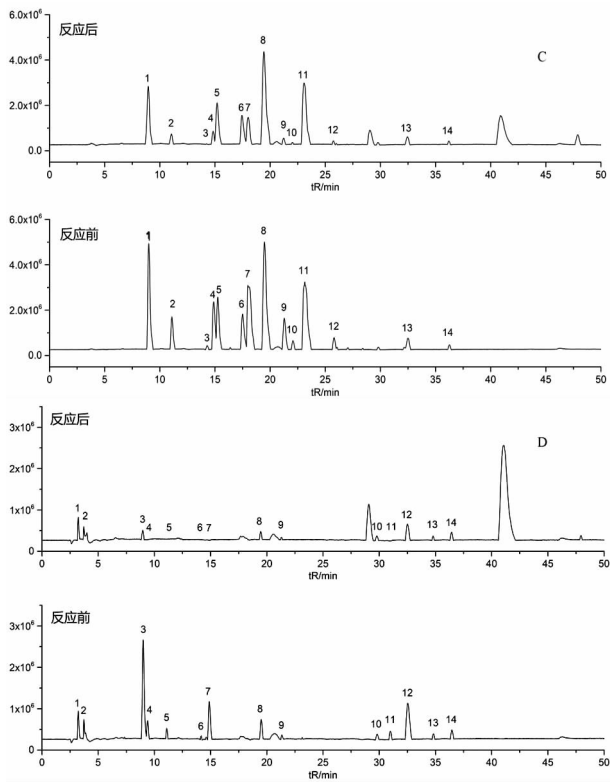
2.3 DPPH 溶液的制备 准确称取 DPPH 标准品,用甲醇溶解配置成 12mg/ml 的溶液,置于冰箱中,4℃ 保存备用。

2.4 供试品溶液的制备 准确称取安化黑茶生茶、熟茶粗粉各 10g,用 80% 乙醇加热回流 2 次,每次 2h,合并滤液,浓缩得浸膏。分别取生茶、熟茶浸膏各 1g,用 100ml 水复溶,并先后用等体积乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 3 次,合并各部位萃取液,浓缩得乙酸乙酯部位浸膏和正丁醇部位浸膏。取各部位浸膏各 0.05g,分别溶于 5ml 甲醇中,得样品溶液。取适量各部位样品溶液与等体积 DPPH 溶液 37℃ 条件下避光反应 30min,经 0.22μm 滤膜过滤,得实验组供试品溶液,备用待测。另取适量样品溶液与等体积甲醇混合后,经 0.22μm 滤膜过滤,得空白组供试品溶液,备用待测。

2.5 对照品溶液的制备 精密称量木犀草素对照品 10mg,置 100ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后即得浓度分别为 100μg/ml 的对照品溶液。精密称量山奈酚对照品 20mg,置 100ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后即得浓度分别为 200μg/ml 的对照品溶液。

2.6 供试品的检测 采用 HPLC-ESI-MS 对安化黑茶实验组和空白组中化学成分进行测定,得到的负离子模式的质谱总离子流图。(见图 1)





A—生茶乙酸乙酯;B—生茶正丁醇;
C—熟茶乙酸乙酯;D—熟茶正丁醇

图 1 各样品负离子模式下的总离子流图

表 1 安化黑茶生茶乙酸乙酯部位抗氧化成分的鉴定

PN	RT(min)	MS	M - X	MS ²	Identification
1	8. 963	169. 0134	M - H	125, 107	Gallic acid
2	11. 088	368. 0624	M - H	305, 219, 179, 125	Galocatechin derivative
3	11. 096	373. 0541	M - H	327, 305, 219, 179, 125	Galocatechin derivative
4	11. 113	611. 1385	M - H	305	Galocatechin dimmer
5	11. 163	305. 0650	M - H	289, 179, 137, 125	Galocatechin
6	12. 581	153. 0190	M - H	136, 109	protocatechuic acid
7	14. 166	633. 0762	M - H	463, 301, 275, 169	Strictinin
8	14. 299	577. 1354	M - H	425, 407, 289, 245, 125	Procyanidin B4
9	14. 500	745. 1395	M - H	577, 441, 407, 289	Epigallocatechin - (4β→8) - epicatechin - 3 - O - gallate
10	14. 867	368. 0604	M - H	305, 219, 179, 125	Epigallocatechin derivative
11	14. 883	305. 0654	M - H	289, 179, 137, 125	Epigallocatechin
12	14. 900	611. 1394	M - H	305	Epigallocatechin dimmer
13	15. 250	289. 0712	M - H	271, 245, 203, 179, 151, 137	Catechin
14	16. 168	729. 1439	M - H	577, 441, 407, 289	Catechin - (4β→8) - epicatechin - 3 - O - gallate
15	17. 519	277. 0731	M - H	233, 215, 191	Teasperol
16	18. 070	457. 0770	M - H	305, 193, 169, 125	Epigallocatechin gallate
17	18. 103	520. 0703	M - H	457, 305, 193, 169	Epigallocatechin gallate derivative
18	18. 136	915. 1602	M - H	457	Epigallocatechin gallate dimmer
19	19. 504	289. 0703	M - H	271, 245, 203, 179, 151, 137	Epicatechin
20	21. 289	457. 0766	M - H	305, 169, 125	Galocatechin gallate
21	22. 273	635. 0928	M - H	483, 465, 313, 295	1, 2, 6 - trigalloylglucose

2.7 化合物的鉴定与分析 通过 HPLC - ESI - MS 检测到的安化黑茶乙酸乙酯部位和正丁醇部位中抗氧化活性成分的保留时间和质谱信息,并依据质谱裂解规律与查阅相关文献^[2-8]结合的方法对提取离子流图进行分析,鉴别出部分抗氧化活性成分结果见表 1~4。其中儿茶素、没食子儿茶素、儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯的二级质谱图见图 2。

通过分析对比生茶和熟茶乙酸乙酯及正丁醇部位分别与 DPPH 反应前后的 TIC 质谱图可以发现,生茶乙酸乙酯部位反应前后峰面积变化较大的峰经鉴定分别为 2 号峰 GC, 3 号峰 C, 4 号峰 EGCG, 6 号峰 GCG, 8 号峰 ECG, 均为儿茶素类;生茶正丁醇部位反应前后峰面积变化较大的峰经鉴定分别为 3 号峰 1 - galloyl - glucose, 4 号峰 Gallic acid, 5 号峰 GC, 6 号峰 C, 8 号峰 EC, 10 号峰 1, 2, 6 - trigalloylglucose, 12 号峰 CG, 15 号峰 Myricetin - 3 - O - glucoside, 17 号峰 Quercetin - 3 - β - D - glucoside, 18 号峰 Rutin;熟茶乙酸乙酯部位反应前后峰面积变化较大的峰经鉴定分别为 1 号峰 Gallic acid, 2 号峰 GC, 3 号峰 EGC, 4 号峰 C, 7 号峰 EGCG, 9 号峰 GCG, 10 号峰 ECG, 12 号峰 CG;熟茶正丁醇部位反应前后峰面积变化较大的峰经鉴定分别为 3 号峰 Gallic acid, 4 号峰 Theogallin, 5 号峰 GC, 6 号峰 EGC, 7 号峰 C, 8 号峰 EC, 11 号峰 Quercetin - 3 - β - D - glucoside, 12 号峰 Rutin。由此可见,安化黑茶发酵前后茶多酚类物质种类基本没有变化,安化黑茶的主要抗氧化活性成分基本为儿茶素类、多酚类及黄酮类等茶多酚类物质。

续表 1

PN	RT(min)	MS	M - X	MS ²	Identification
22	23. 158	883. 1721	M - H	441	Epicatechin gallate dimmer
23	23. 174	441. 0822	M - H	289,271,169	Epicatechin gallate
24	25. 743	568. 1436	M - H	416,305,193,169,125	Catechin gallate derivative
25	25. 793	441. 0821	M - H	289,271,193,169	Catechin gallate
26	26. 044	275. 0563	M - H	231,203,187,137	Teadenol A(B)
27	28. 396	479. 0822	M - H	316,271,178	Myricetin - 3 - O - glucoside
28	35. 436	317. 0288	M - H	193,178,165,151	Myricetin
29	37. 702	300. 9973	M - H	283,257,229	Ellagic acid
30	41. 174	301. 0345	M - H	273,193,178,151	Quercetin
31	43. 526	285. 0396	M - H	267,151,133	Lutealin
32	46. 246	285. 0411	M - H	267,199,175,151,133	Kaempferol

表 2 安化黑茶生茶正丁醇部位抗氧化成分的鉴定

PN	RT(min)	MS	M - X	MS ²	Identification
1	3. 744	191. 0560	M - H	171,153,137,109	Quinic acid
2	7. 331	331. 0659	M - H	271,211,169,151	1 - galloyl - glucose
3	9. 016	169. 0140	M - H	125,107	Gallic acid
4	9. 433	343. 0660	M - H	191,169	Theogallin
5	11. 118	305. 0665	M - H	287,219,179,137,125	Gallocatechin
6	13. 581	353. 0838	M - H	191,179,173	3 - caffeoylquinic acid
7	14. 171	633. 0711	M - H	465,327,301,275,137	Strictinin
8	14. 254	577. 1326	M - H	425,407,289. 245,125	Procyanidin B4
9	14. 888	305. 0654	M - H	287,219,179,137,125	Epigallocatechin
10	15. 255	289. 0718	M - H	271,245,203,179,151,137	Catechin
11	15. 586	321. 0601	M - H	289,277,233,215	(R) - 2 - methyl - 6 - oxo - 4 - ((2R,3R) - 3,5,7 - trihydroxy - 3,4 - dihydro - 2H - chromen - 2 - yl) - 3,6 - dihydro - 2H - pyran - 2 - carboxylic acid
12	17. 339	353. 0843	M - H	191,179,173	4 - caffeoylquinic acid
13	17. 796	353. 0853	M - H	191,179,173	5 - caffeoylquinic acid
14	18. 108	457. 0764	M - H	305,193,169,125	Epigallocatechin gallate
15	18. 275	349. 0556	M - H	331,305,287,245,125	6 - carboxyl - (-) - gallocatechin
16	19. 509	289. 0716	M - H	271,245,203,179,151,137	Epicatechin
17	21. 294	337. 0918	M - H	191,173,163,119	3 - P - coumaroylquinic acid
18	21. 311	457. 0753	M - H	305,193,169,125	Gallocatechin gallate
19	22. 295	635. 0886	M - H	465,1313,169	1,2,6 - trigalloylglucose
20	23. 179	441. 0817	M - H	289,271,169	Catechin gallate
21	23. 229	416. 1354	M - H	371,349,305,287	Catechin gallate derivative
22	28. 350	479. 0827	M - H	316,271,178	Myricetin - 3 - O - glucoside
23	31. 036	771. 1926	M - H	609,533,301,178	Quercetin - 3 - O - [β - D - glucoside - (1→3) - O - α - L - rhamnose - (1→6) - O - β - D - glucoside]
24	32. 438	463. 0859	M - H	301,151,107	Quercetin 3 - β - D - glucoside
25	32. 554	609. 1434	M - H	301,151	Rutin
26	41. 179	301. 0338	M - H	273,193,178,151,107	Quercetin
27	43. 581	285. 0405	M - H	151,133	Kaempferol
28	46. 200	285. 0389	M - H	151,133,107	Luteolin

表 3 安化黑茶熟茶乙酸乙酯部位抗氧化成分的鉴定

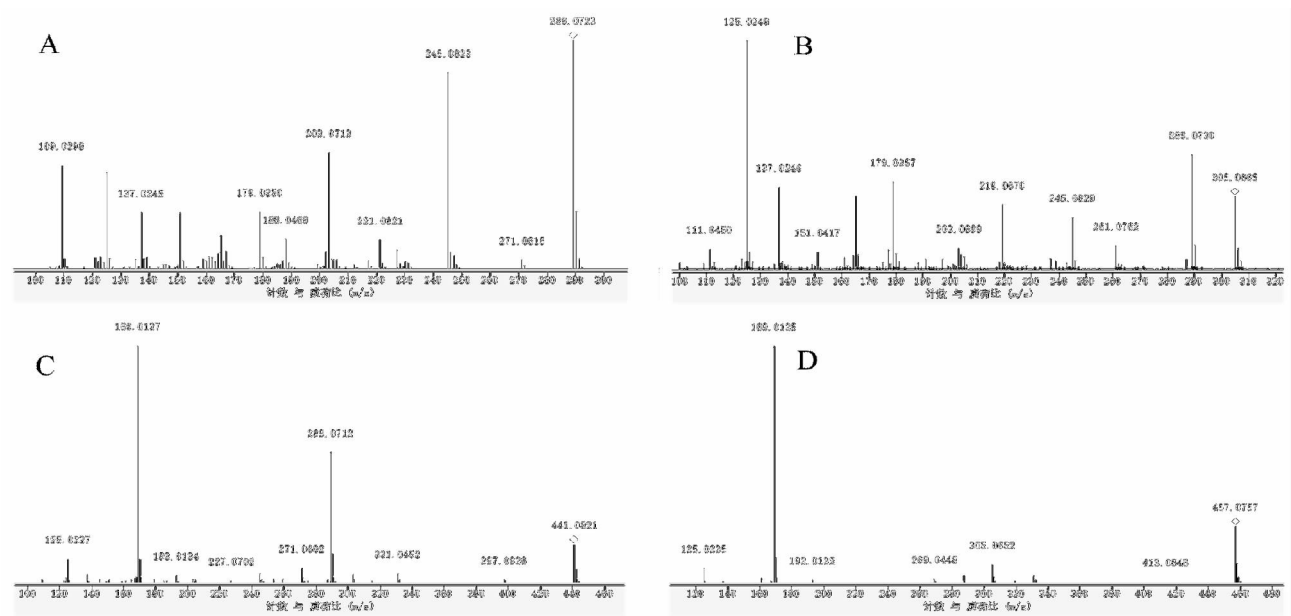
PN	RT(min)	MS	M - X	MS ²	Identification
1	9. 008	169. 0129	M - H	125, 107	Gallic acid
2	11. 060	305. 0650	M - H	289, 179, 137, 125	Galocatechin
3	11. 081	611. 1385	M - H	305	Galocatechin dimmer
4	11. 110	373. 0541	M - H	327, 305, 219, 179, 137	Galocatechin derivative
5	11. 127	368. 0625	M - H	305, 219, 179, 137	Galocatechin derivative
6	12. 595	153. 0141	M - H	136, 109	protocatechuic acid
7	14. 130	633. 0762	M - H	463, 301, 275, 169	Strictinin
8	14. 547	745. 1395	M - H	577, 407, 289	Epigallocatechin - (4β→8) - epicatechin - 3 - O - gallate
9	14. 880	305. 0652	M - H	289, 219, 179, 137, 125	Epigallocatechin
10	14. 897	611. 1395	M - H	305	Epigallocatechin dimmer
11	14. 930	368. 0546	M - H	305, 219, 179, 137	Epigallocatechin derivative
12	14. 947	373. 0463	M - H	327, 305, 219, 179, 137	Epigallocatechin derivative
13	15. 247	289. 0700	M - H	271, 245, 203, 179, 151, 137	Catechin
14	16. 132	729. 1439	M - H	577, 441, 407, 289	Catechin - (4β→8) - epicatechin - 3 - O - gallate
15	17. 483	277. 0731	M - H	233, 215, 191	Teasperol
16	18. 100	457. 0756	M - H	305, 193, 169, 125	Epigallocatechin gallate
17	18. 083	915. 1602	M - H	457	Epigallocatechin gallate dimmer
18	18. 088	520. 0738	M - H	457, 305, 193, 169, 125	Epigallocatechin gallate derivative
19	19. 501	289. 0711	M - H	271, 245, 203, 179, 151, 137	Epicatechin
20	21. 303	520. 0637	M - H	457, 305, 193, 169, 125	Galocatechin gallate derivative
21	21. 320	457. 0762	M - H	305, 193, 169, 125	Galocatechin gallate
22	23. 155	441. 0821	M - H	289, 271, 169	Epicatechin gallate
23	23. 171	883. 1721	M - H	441	Epicatechin gallate dimmer
24	25. 740	568. 1361	M - H	416, 305, 193, 169, 125	Catechin gallate derivative
25	25. 807	441. 0821	M - H	289, 271, 169	Catechin gallate
26	28. 360	479. 0814	M - H	316, 271, 178	Myricetin - 3 - O - glucoside
27	34. 632	300. 9926	M - H	283, 257, 229	Ellagic acid
28	36. 886	317. 0288	M - H	193, 178, 165, 151	Myricetin
29	41. 188	301. 0292	M - H	273, 193, 178, 151	Quercetin
30	43. 540	285. 0337	M - H	267, 199, 175, 151, 133	Luteolin
31	46. 126	285. 0338	M - H	267, 151, 133	Keampferol

表 4 安化黑茶熟茶正丁醇部位抗氧化成分的鉴定

PN	RT(min)	MS	M - X	MS2	Identification
1	3. 726	191. 0509	M - H	171, 153, 137, 109	Quinic acid
2	7. 346	331. 0599	M - H	271, 211, 169, 151	1 - galloyl - glucose
3	8. 998	169. 0128	M - H	153, 125, 107	Gallic acid
4	9. 432	343. 0664	M - H	191, 169	Theogallin
5	11. 100	305. 0657	M - H	287, 219, 179, 137, 125	Galocatechin
6	11. 133	368. 0567	M - H	305, 219, 179, 125	Galocatechin derivative
7	13. 152	353. 0838	M - H	191, 179, 173	3 - caffeoylquinic acid
8	14. 153	633. 0731	M - H	465, 327, 301, 275, 137	Strictinin
9	14. 286	577. 1346	M - H	425, 407, 289, 245, 125	Procyanidin B4
10	14. 370	745. 1431	M - H	577, 441, 407, 289	Epigallocatechin - (4β→8) - epicatechin - 3 - O - gallate
11	14. 870	305. 0668	M - H	287, 219, 179, 137, 125	Epigallocatechin
12	14. 903	368. 0602	M - H	305, 219, 179, 125	Epigallocatechin derivative
13	14. 920	373. 0504	M - H	327, 305, 219, 179, 125	Epigallocatechin derivative

续表 4

PN	RT(min)	MS	M - X	MS2	Identification
14	15. 003	321. 0585	M - H	289,277,233,215	(R) - 2 - methyl - 6 - oxo - 4 - ((2R,3R) - 3,5,7 - trihydroxy - 3,4 - dihydro - 2H - chromen - 2 - yl) - 3,6 - dihydro - 2H - pyran - 2 - carboxylic acid
15	15. 304	289. 0720	M - H	271,245,203,179,151,137	Catechin
16	17. 432	353. 0843	M - H	191,179,173	4 - caffeoylquinic acid
17	17. 893	353. 0853	M - H	191,179,173	5 - caffeoylquinic acid
18	19. 524	289. 0718	M - H	271,245,203,179,151,137,109	Epicatechin
19	21. 343	337. 0895	M - H	191,173,163,119	3 - P - coumaroylquinic acid
20	23. 128	441. 0825	M - H	289,271,169,125	Epicatechin gallate
21	23. 328	416. 1270	M - H	371,349,305,287	Epicatechin gallate derivative
22	25. 813	441. 0815	M - H	289,271,169,125	Catechin gallate
23	26. 047	275. 0540	M - H	231,203,187,137	Teadenol A(B)
24	31. 002	771. 1873	M - H	609,533,301,178	Quercetin - 3 - O - [β - D - glucoside - (1 $\rightarrow$ 3) - O - α - L - rhamnose - (1 $\rightarrow$ 6) - O - β - D - glucoside]
25	32. 470	463. 0859	M - H	301,151,107	Quercetin 3 - β - D - glucoside
26	32. 603	609. 1388	M - H	301,151	Rutin



A—儿茶素;B—没食子儿茶素;C—儿茶素没食子酸酯;D—没食子儿茶素没食子酸酯

图 2 二级质谱图

3 讨 论

本研究采用HPLC - Q - TOF - MS/MS 联用技术,对安化黑茶生茶及熟茶的抗氧化活性物质基础进行了研究。通过获得化合物精确分子量,分析裂解规律,对安化黑茶中的抗氧化活性成分进行测定。其中木犀草素、山奈酚等成分通过与对照品对照进行确认,其他化学成分则通过二级质谱(MS/MS)联用所提供的结构信息通过解析化合物质谱裂解规律与查阅相关文献相结合的方式加以确认。

由于茶类抗氧化活性成分主要为茶多酚类及黄酮类物质,且研究表明茶类抗氧化活性为乙酸乙酯部位及正丁醇部位最佳^[9],因此本研究选取乙酸乙酯部位及正丁醇部位

作为安化黑茶抗氧化活性部位进行研究。本研究采用HPLC - Q - TOF - MS/MS 联用技术对安化黑茶生茶、熟茶分别进行了正负模式的测定,结果表明安化黑茶主要抗氧化活性成分在负模式下响应良好,而在正模式下几乎没有响应,因此选择使用负模式对安化黑茶抗氧化活性部位进行测定。

在 ESI 负模式下,安化黑茶生茶共鉴定出 46 种抗氧化活性成分,其中从安化黑茶生茶乙酸乙酯部位中鉴定出 32 个抗氧化活性成分,从生茶正丁醇部位中鉴定出 28 个抗氧化活性成分。安化黑茶熟茶共鉴定出 46 种抗氧化活性成分,其中从熟茶乙酸乙酯部位中鉴定出 31 个抗氧化活性成分,从熟茶正丁醇部位中鉴定出 26 个抗氧化(下转第 170 页)

● 文献综述 ●

帕金森病运动并发症的中西医治疗进展

刘春柳¹, 覃雪云¹, 胡玉英²

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁, 530023;

2. 广西中医药大学, 广西 南宁, 530001)

[关键词] 帕金森病; 运动并发症; 中西医疗法; 综述; 学术性

[中图分类号] R277.725 [文献标识码] A DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.08.065

帕金森病(parkinson disease, PD)是全球第二大神经退行性疾病,同时也是最常见的运动障碍性疾病,多发于中老年人。目前左旋多巴作为药物治疗的金标准,早期阶段的临床疗效显著。但随着病程进展,左旋多巴的疗效减退而毒副作用渐增,尤其是多种运动并发症的出现,使得临床治疗难度加大。研究发现,左旋多巴治疗超过5年的PD患者出现运动并发症的概率为40%~50%,超过10年的则高达90%^[1]。中医药依其整体观念及辨证论治的优势,可从多靶点、多途径、多层面上改善PD患者的运动并发症,提高患者的生活质量,现将中西医治疗PD运动并发症的研究进展综述如下。

1 发病机制

PD运动并发症的确切发病机制尚未阐明,目前研究表明除左旋多巴药物代谢、间歇多巴胺(DA)刺激、脑组织及神经生化改变等主要因素外^[2],年龄因素也与之相关,发病年龄越早,左旋多巴每天剂量越大,疗程越长,越容易出现运动并发症^[3]。

2 临床表现

PD运动并发症的临床表现主要有症状波动与异动症两种类型。在使用左旋多巴药物治疗的过程中发现,疗程超过4年后症状波动发生率为12%~60%,异动症为8%~64%^[4]。其中症状波动包括剂末现象和开关现象;而异动症主要包括剂峰异动、双相异动和肌张力障碍。两种类型的运动并发症发生的时间有所不同,剂末现象作为症状波动最常见的类型,也是PD进展过程中最早出现的症状^[5]。疾病的晚期,症状波动和异动症常同时出现,使得临床表现复杂多变,治疗起来更加棘手^[6]。

3 西医治疗

西医治疗包括药物治疗及手术治疗。其中药物治疗主要有早期的保护性治疗与中晚期的症状性治疗,而手术治疗主要有神经核毁损术和脑深部电刺激(DBS)。

3.1 早期的保护性治疗 由于PD早期DA更新率增加及受体失神经超敏两大机制,导致患者在代偿期可无明显的

临床症状和体征^[7],故PD一旦被诊断就应及早给予保护性治疗。目前临床上作为保护性治疗的药物主要有单胺氧化酶B型抑制剂,这类药物包括司来吉兰和雷沙吉兰。司来吉兰利用其神经保护及抗凋亡的特性,对纹状体神经元进行保护,从而延缓PD疾病的进展,但其与酪胺的增强有关,使用过程中应注意剂量,剂量过大可引起“干酪反应”^[8]。雷沙吉兰结构虽与司来吉兰相似,但是它在使用过程中不会出现“干酪反应”,且其代谢产物(R)-1-氨基二氢苄具有神经保护作用,目前美国食品药品监督管理局已批准其作为初始单药,用于PD早期治疗;除此之外,其亦可通过抑制内源性及外源性DA分解,延长DA的作用时间来改善患者临床症状,延缓疾病的进展^[9]。

3.2 中晚期的症状性治疗 目前PD运动并发症的中晚期治疗方法主要是在调整左旋多巴药物的基础上联合多巴胺受体(DR)激动剂或第三代儿茶酚氧位甲基转移酶(COMT)抑制剂治疗。

3.2.1 DR激动剂 DR激动剂目前大多推崇非麦角类DR激动剂作为首选。非麦角类DR激动剂主要包括吡贝地尔、盐酸普拉克索、罗匹尼罗、罗替高汀和阿仆吗啡。目前国内上市的主要有吡贝地尔与普拉克索。吡贝地尔可直接通过刺激纹状体DR及补充患者脑内DA的浓度,在抑制左旋多巴引起的并发症的同时也保护脑细胞^[10]。而盐酸普拉克索亦能改善左旋多巴引起的运动障碍,临床上单独使用可减少“关”的时间来缓解“开-关”现象效应的严重程度^[11];亦可作为左旋多巴的辅助疗法以减少左旋多巴的毒副作用并增加晚期PD治疗的有效性,从而改善临床症状,减缓运动并发症的进展^[12]。

3.2.2 COMT抑制剂 COMT抑制剂目前用于临床上的主要有恩他卡朋和托卡朋,此类药物对PD运动并发症患者的运动波动有显著疗效^[13]。恩他卡朋作为一种可逆的、特异性的COMT抑制剂,除治疗波动症状外,对治疗异动症的临床疗效亦显著^[14],且能够延缓左旋多巴的降解速度,延长左旋多巴的作用时间,提高药物的有效利用率,与复方左旋多

5次,共治疗4周。并与采用地衣芽孢杆菌胶囊及蒙脱石散治疗的30例作对照观察。结果显示,中医证候评分针刺组优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由上可知,针刺治疗PCS主要以消化道经络为主,胁痛以肝经及胆经为主,腹痛腹胀及腹泻主要以相应胃经及大肠经为主,并根据患者的具体情况选取相应的穴位。

3 小结

西医在临床上针对PCS多采用利胆、消炎、解经止痛等药物治疗^[21],若患者症状加重甚至需二次手术时,中医药可从整体观辨证论治,多方位、多角度综合治疗,以改善症状,减轻患者痛苦,在一定程度上避免二次手术对患者的伤害。

参考文献

- [1] Boc Pribram, MD Berlin, Lrce. Ether treatment of gallstones impacted in the commonduct lancet[J]. Lancet, 1939, 233(6041): 1311-1313.
- [2] 熊为民,邓剑,丁志平,等. 胆囊切除术后综合征原因分析与治疗对策[J]. 中国实用医药, 2016, 11(3): 12-13.
- [3] 印会河. 中医基础理论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 52.
- [4] 王红,顾勤. 胆囊切除术后综合征中医病机及辨证分型探讨[J]. 中医学报, 2011, 26(3): 283-285.
- [5] 王东亮,黄雅慧. 黄雅慧教授治疗胆囊术后综合征的临床经验[J]. 光明中医, 2015, 30(4): 719-721.
- [6] 陈爱国. 旋覆花汤加味治疗胆囊术后综合征42例[J]. 西部中医药, 2013, 26(9): 68-69.
- [7] 尤金桐,石海霞,刘彩云. 加味小柴胡汤治疗胆囊切除术后腹泻35例[J]. 宁夏医学杂志, 2015, 37(6): 599-560.
- [8] 孙朝军. 大柴胡汤加味治疗胆囊切除术后综合征32例[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(5): 339.

- [9] 展文国. 裴正学教授治疗胆囊术后综合征的临床经验[J]. 光明中医, 2013, 28(7): 1318-1320.
- [10] 周继. 自拟疏肝理气汤治疗胆囊术后综合征临床观察[J]. 安徽医药, 2015, 19(5): 990-991.
- [11] 原晓倩,李艳,贾佳. 排石汤加减治疗胆囊术后综合征的疗效[J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(14): 2879, 2882.
- [12] 高允海. 愈胆汤防治胆囊切除术后综合征的临床与实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [13] 李淑琴,吴佐玉,殷建亭,等. 香草利胆丸治疗胆囊切除术后综合征31例[J]. 中成药, 2010, 32(6): 1084-1085.
- [14] 郭明浩. 胆宁片治疗胆囊切除术后综合征128例疗效分析[C]//2016全国慢性病诊疗论坛论文集, 2016: 141.
- [15] 张建权. 胆舒胶囊对胆囊切除术后综合征的临床疗效及安全性[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(4): 490-492.
- [16] 李习雄,胡冠英,苗维纳. 胆舒胶囊抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(4): 163-165.
- [17] 蒋欢欢,张霞,杜文泽,等. 围手术期应用大黄利胆胶囊对胆囊切除术后综合征的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(1): 71-73.
- [18] 夏晨,孙建华,盛灿若. 心胆同治针灸治疗胆囊切除术后胁痛经验[J]. 四川中医, 2014, 32(3): 48-49.
- [19] 沈幼星,陈旻. 针刺配合中药治疗胆囊术后综合征疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(3): 291-293.
- [20] 孙健. 针刺治疗胆囊切除术后胃肠功能紊乱30例疗效观察[J]. 河北中医, 2014, 36(7): 1042-1043.
- [21] 朱佳杰,于博文,李鹏,等. 胆囊切除术后综合征的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(10): 1730-1734.

(收稿日期: 2018-10-15)

(上接第151页)活性成分。在目前检测的乙酸乙酯部位及正丁醇部位中,主要鉴定出抗氧化活性成分为酚类及黄酮类成分,生茶与熟茶二者之间成分差异较少,因此推测造成安化黑茶生茶及熟茶抗氧化活性差异成分可能为其他种类化学成分,或者存在于其他极性部位中。且本文仅对安化黑茶生茶及熟茶各抗氧化活性成分的种类进行了快速筛选及鉴别,安化黑茶生茶与熟茶的抗氧化活性差异也可能由二者共有活性成分之间的转变导致含量差异所产生。

本实验建立了基于DPPH-HPLC-Q-TOF-MS/MS的安化黑茶抗氧化活性成分快速筛选和鉴别的方法,对安化黑茶生茶及熟茶的抗氧化活性成分分别进行检测和分析。初步探索了安化黑茶生茶、熟茶的抗氧化活性物质基础,为研究二者抗氧化活性物质基础及抗氧化活性差异提供了试验依据。

参考文献

- [1] 刘建宇,刘丹,张辉,等. 安化黑茶化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1449-1457.
- [2] 黄浩,郑红发,赵熙,等. 基于UPLC-ESI-Q-TOF-MS的“散茶发花”茯茶加工前后的物质变化分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 1-15.

- [3] Zhao Y, Chen P, Longze Lin, et al. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1269-1277.
- [4] Uczaj W, Skrzydlewska E. Antioxidative properties of black tea[J]. Preventive Medicine, 2005, 40(6): 910-918.
- [5] 许敏,陶慕珂,董鸿竹,等. 普洱熟茶化学成分的HPLC-DAD-MS分析[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(9): 1212-1217.
- [6] Chunyan Wu, Hairong Xu, Julien Héritier, et al. Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties[J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 144-149.
- [7] Heyuan Jiang, Ulrich H. Engelhardt, Claudia Thrne, et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC[J]. Food Chemistry, 2015, 15(183): 30-35.
- [8] Del RD, Stewart AJ, Mullen W, et al. HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2807-2815.
- [9] 杨新河,陈梦圆,彭洋,等. 青砖茶提取物不同极性部位的体外抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2016, 41(7): 207-210.

(收稿日期: 2018-12-25)