

乌龙茶多糖分离提纯及其组分分析

陈梅春¹, 张海峰², 陈 峥¹, 潘志针¹, 朱育菁¹, 刘 波^{1*}

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003; 2. 福建省农业科学院, 福州 350003)

摘 要: **目的** 分离提纯乌龙茶多糖, 进行组分分析, 同时评价多糖清除 DPPH 自由基能力。**方法** 采用纤维素离子交换层析法从水提乌龙茶粗多糖中分离得到一种多糖组分(WTPS-1), 采用苯酚硫酸法测定该乌龙茶多糖的中性糖含量; 采用红外光谱测定该多糖的结构组成; 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析该多糖的单糖组成; 采用清除 DPPH 自由基能力评价多糖的抗氧化活性。**结果** 乌龙茶多糖 WTPS-1 含 β -糖苷键型吡喃糖, 其中性糖含量为 71.9%, 单糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 比例为 2.57:3.67:0.57:1:2.16:9.65。乌龙茶粗多糖、脱蛋白多糖和 WTPS-1 的 DPPH 自由基清除率分别为 91.6%、60.7% 和 9.20%。**结论** 乌龙茶粗多糖的抗氧化能力强于脱蛋白多糖和 WTPS-1, 为乌龙茶的进一步开发利用提供参考依据。

关键词: 茶多糖; 结构组成; 单糖组成; 清除 DPPH 自由基

Isolation purification and composition analysis of Oolong tea polysaccharides

CHEN Mei-Chun¹, ZHANG Hai-Feng², CHEN Zheng¹, PAN Zhi-Zhen¹, ZHUYu-Jing¹, LIU Bo^{1*}

(1. Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;
2. Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

ABSTRACT: Objective To isolate, purify and analyze the composition of Oolong tea polysaccharides, and to evaluate the DPPH· radical scavenging activity of polysaccharides. **Methods** Tea polysaccharids fraction (WTPS-1) was isolated and purified from Oolong tea using ion exchange chromatography, the neutral sugar of WTPS-1 was measured by phenol-sulfuric acid method, the structure of WTPS-1 was analyzed by infrared spectroscopy (IR), the monosaccharide composition of WTPS-1 was measured by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS), and the antioxidant activity of WTPS-1 was evaluated by DPPH assay. **Results** The polysaccharide WTPS-1 contained β -glycoside bond type pyranose, and the content of neutral sugar was 71.9%. The monosaccharide compositions were Rha, Ara, Xyl, Man, Glu and Gal with a ratio of 2.57:3.67:0.57:1:2.16:9.65. DPPH· scavenging activity of crude polysaccharide, deproteinized polysaccharide and WTPS-1 were 91.6%, 60.7% and 9.20%, respectively. **Conclusion** The crude polysaccharide exhibited the relative stronger DPPH· scavenging activity than deproteinized polysaccharide and WTPS-1, and the results would provide useful references for the development of Oolong tea.

KEY WORDS: polysaccharide; structure composition; monosaccharides components; DPPH· scavenging activity

基金项目: 福建省重大专项项目农业科技重大专项(2015NZ0003)、福建省农科院英才计划项目(YC2015-11)

Fund: Supported by the Fujian Key Science and Technology Special Projects (2015NZ0003) and the Youth Fund of Fujian Academy of Agricultural Sciences (YC2015-11)

*通讯作者: 刘波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。E-mail: fzliubo@163.com

*Corresponding author: LIU Bo, Researcher, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China. E-mail: fzliubo@163.com

1 引言

茶叶是中国古代记载中被提及最早天然药物之一,如曾有饮用粗老茶来治疗糖尿病的经验。茶多糖是继茶多酚之后,从茶叶中提取出来的天然生物大分子,具有防辐射、降血糖、降血脂、抗氧化、降血压、提高机体免疫力、抗凝血等多种生物活性作用^[1-4],与人类健康密切相关。随着多糖多方面生物活性的不断揭示,多糖的研究越来越引起人们的重视。我国是茶叶大国,资源丰富,茶树叶片愈老多糖含量愈高,但粗老茶口感及外形差,难以销售,严重积压造成资源浪费。利用粗老茶作原料提取茶多糖可以有效利用茶叶资源,提高经济效益,而且对预防疾病促进人类健康都有重要意义。

前人对茶多糖抗氧化活性展开了许多研究,倪德江等^[5]研究发现多糖清除·OH和O₂⁻自由基的能力与多糖含量、多糖中中性糖、蛋白质及糖醛酸含量并不完全成剂量效应关系,多糖的结构对其生物活性可能有更大的影响;Chen等^[6]研究发现茶多糖清除自由基能力和糖醛酸的含量有着直接的关系,糖醛酸含量越高,清除自由基能力越强;Chen等^[7]研究发现低档绿茶中提取的糖蛋白复合物具有强的羟基自由基、超氧自由基离子清除能力和脂质过氧化抑制反应,亦能提高超氧化歧化酶的活性;Chen等^[8]研究了绿茶多糖组成和分子量分布对抗氧化活性的影响,发现低分子量和高蛋白含量能提高多糖的抗氧化活性;Yang等^[9]研究发现从粗老茶中提取的低分子量的粗多糖清除自由基能力强于高分子量的多糖。不同原料和制备方法所得的多糖生物活性存在一定差异,其活性与多糖结构组成息息相关。乌龙茶茶叶比较粗老,多糖含量高于红茶和绿茶。福建作为乌龙茶生产大省,品种资源优良繁多,低档乌龙茶占据茶叶市场较大份额,从低档乌龙茶中提取茶多糖制作高附加值产品,对于促进乌龙茶产业发展具有重要意义。本研究以低级闽北水仙乌龙茶为研究对象,采用热水法提取乌龙茶多糖,通过Sevag法脱蛋白后进行层析柱分离,并对分离得到的多糖样品进行结构和抗氧化活性的初步研究,为乌龙茶的进一步开发利用奠定基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

DK-8D三孔电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有

限公司)、GL10MD湘仪离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司)、ABZ1-1001-P型实验室专用超纯化机(外商颐洋企业发展有限公司)、UV-2550紫外分光光度计(日本Shimadzu公司)、Nicolet Magana750 FT-IR光谱仪(美国Nicolet仪器公司)、7890A-5975C气质联用仪(美国Agilent公司)。

盐酸羟胺、吡啶、乙酸酐、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖(分析纯)购于国药集团化学有限公司;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)购于百灵威科技有限公司;牛血清蛋白(高纯)、考马斯亮蓝G-250、DEAE纤维素DE-52购于上海金穗生物科技有限公司。

茶叶来源:由龙兴茶业有限公司提供的水仙乌龙茶粉末。

2.2 茶多糖提取

热水法提取乌龙多糖,每克茶叶中加入20 mL水,50℃水浴1 h后,重复提取一次,将混合茶浸液过滤,浓缩后,用3倍体积95%乙醇沉淀,离心,热风干燥得茶多糖粗品。

2.3 茶多糖脱蛋白工艺

将提取的茶多糖粗品用蒸馏水溶解后,采用Sevag法脱蛋白。多糖溶液中加入Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1, V:V),混合震荡20 min后,离心5 min,取上层液,为茶多糖提取液,重复以上步骤,共脱蛋白3次后。旋转蒸发除去氯仿和正丁醇,加入3倍体积的95%乙醇沉淀后得多糖样品。

2.4 乌龙茶多糖的分离纯化

采用DEAE-52柱层析进行分级,层析条件为φ2.6 cm×50 cm色谱柱,分别用蒸馏水、0.1 mol/L、0.2 mol/L及0.3 mol/L NaCl溶液梯度进行洗脱,流速1 mL/min,用自动收集器进行收集,每3 min收集1管,用苯酚-硫酸法检测,以吸光度值对管数作图,得到洗脱曲线,收集各洗脱峰,浓缩、透析、干燥后得乌龙茶多糖各组分。

2.5 中性糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测中性糖含量,实验重复3次。

2.6 茶多糖清除DPPH·自由基能力的测定

配置0.2 mg/mL多糖溶液,加入0.2 mmol/L的DPPH·溶液2 mL,摇匀,放置30 min,以50%乙醇调

零, 在 525 nm 处测得吸光度 A_0 。同时, 测定待测溶液与 2.0 mL 60%乙醇在 525 nm 处的吸光度 A_j , 然后测定 2.0 mL DPPH·溶液与 2.0 mL 60%乙醇在 525 nm 处的吸光度 A_0 , 清除率计算公式为: 清除率(%)=[1-(A_j - A_0)/ A_0]×100。实验重复 3 次。

2.7 紫外可见光谱

配置 1.0 mg/mL DEAE-52 水洗脱多糖溶液, 于紫外光谱仪上扫描, 扫描波长范围 200~400 nm。

2.8 红外光谱

DEAE-52 水洗脱多糖样品经 KBr 压片, 用于傅里叶红外光谱仪扫描分析, 扫描波数范围 4000~400 cm^{-1} 。

2.9 茶多糖的气相色谱-质谱分析

多糖的水解: 取茶多糖 WTPS-1 样品 20 mg 溶于 2 mL 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA)中, 封管, 于 100 °C 水解 6 h, 减压蒸馏除去 TFA。

糖腈乙酰酯衍生物的制备: 在水解产物中加入 20 mg 盐酸羟胺和 1 mL 吡啶, 封管于 90 °C 反应 30 min。冷却至室温, 再加入 1 mL 乙酸酐, 封管于 90 °C 反应 30 min, 冷却后取出上清液, 减压浓缩至干, 滴入 0.5 mL 氯仿溶解后进行 GC-MS 分析。同样方法制备标准单糖衍生物。

色谱条件: HP-5MS 柱, 气化室温度 270 °C, 柱前压 17.8 kPa, 分流比 10:1, 隔垫吹扫流量 3 mL/min, 进样量 1 μL , 升温程序: 起始温度 150 °C 保持 6 min, 以 2 °C/min 升至 220 °C, 保持 2 min。

质谱条件: 离子源 EI; 采集模式为全扫描; 溶剂延迟为 6 min; 质量扫描范围: 25.00~550.00 amu; EMV 模式为相对值; MS 离子源温度为 230 °C, MS 四级杆温度 150 °C。

3 结果与分析

3.1 茶多糖的 DEAE-52 纤维素柱层析

采用 DEAE-52 纤维素柱层析对茶多糖进行分级, 其洗脱曲线如图 1 所示, 经水、0.1、0.2、0.3 mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱后, 得到 3 个洗脱峰, 收集各洗脱峰, 经乙醇沉淀后收集, 其中蒸馏水洗脱得到的多糖组分(WTPS-1)得率最高, 仅对该多糖做进一步研究。

3.2 乌龙茶 WTPS-1 多糖的紫外和红外光谱分析

配制 0.4 mg/mL 的 WTPS-1 多糖溶液, 在紫外波

长 200~400 nm 范围进行扫描, 结果如图 2 所示。在 200~400 nm 之间未见明显的蛋白和核酸的吸收峰。

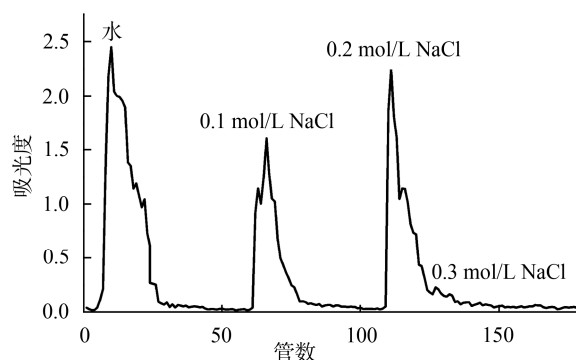


图 1 茶多糖在 DEAE-cellulose 柱上的洗脱曲线

Fig. 1 Chromatographic isolation of tea polysaccharides by DEAE-cellulose column

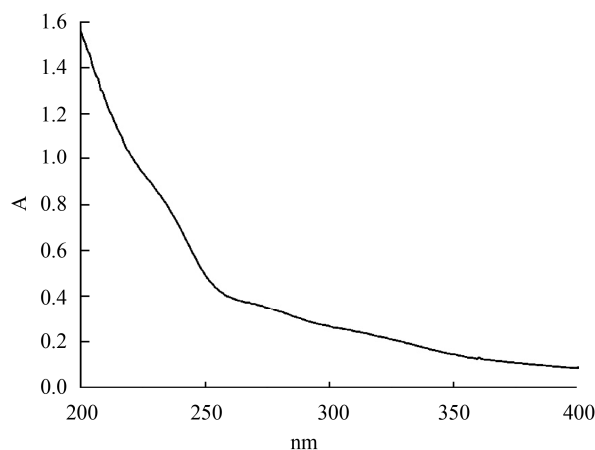


图 2 乌龙茶多糖 WTPS-1 的紫外光谱图

Fig. 2 UV spectrum of Oolong tea polysaccharides WTPS-1

从图 3 上可以看出在 3600~3200、3200~2800、2000~1400 和 1200~1000 cm^{-1} 这 4 个谱段内都出现了典型糖类物质的吸收峰。3430 cm^{-1} 处的吸收峰强且宽, 为分子间缔合羟基的伸缩振动; 2945 cm^{-1} 为 C-H 的伸缩振动吸收峰; 1615 cm^{-1} 处出现典型酰胺谱图; 1328 cm^{-1} 处吸收峰为酰胺中的 C-N 伸缩振动吸收峰, 表明糖中残留蛋白质; 1153 cm^{-1} 处的吸收峰是环上 C-O 吸收峰; 1418 cm^{-1} 处吸收峰为 =CH₂ 的变形吸收峰; 1099 cm^{-1} 和 1010 cm^{-1} 处的吸收峰是醇羟基的变角振动吸收峰; 887 cm^{-1} 是 β -D-甘露吡喃糖环 β -端基差向异构的 C-H 变角振动的特征吸收峰; 773 cm^{-1} 是 D-葡萄糖吡喃糖环 C-O-C 振动吸收峰, 887 cm^{-1} 处的吸收峰, 而在 844 cm^{-1} 处没有特征

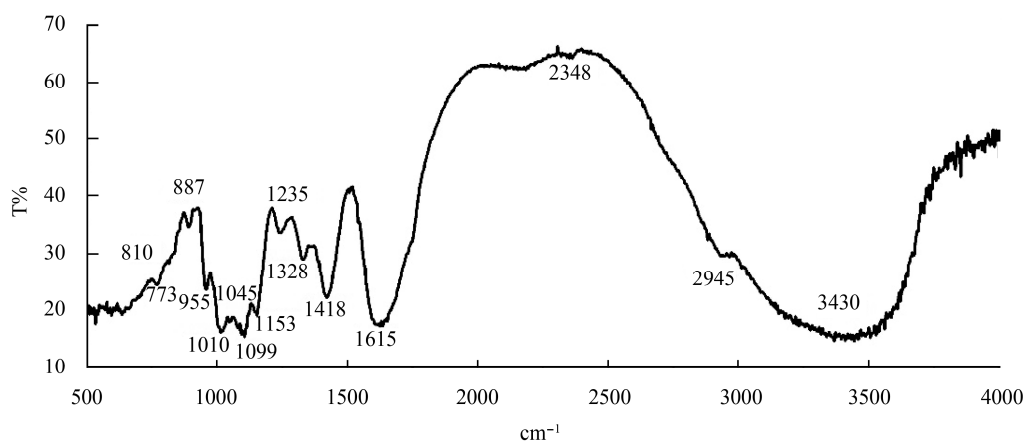


图 3 乌龙茶多糖 WTPS-1 的红外光谱图

Fig. 3 IR spectrum of Oolong tea polysaccharides WTPS-1

吸收峰, 说明该多糖组分里存在 β -型糖苷键; 810 cm^{-1} 的弱吸收峰是甘露糖的特征吸收峰。通过对特征峰指认, 确认分离纯化出来的 WTPS-1 多糖组成含 β -糖苷键构型吡喃糖。

3.3 乌龙茶 WTPS-1 多糖的单糖组成

经苯酚-硫酸法测得 WTPS-1 的中性糖含量为 71.9%。多糖 WTPS-1 的水解产物和标准单糖经糖脲乙酸酯衍生化后, 利用 GC-MS 进行检测分析, 结果如图 4 所示。各标准单糖出峰顺序和保留时间: 1-鼠李糖 Rha(16.453 min)、2-阿拉伯糖 Ara(17.297 min)、3-木糖 Xyl(17.980 min)、4-甘露糖 Man(27.490 min)、5-葡萄糖 Glu(28.005 min) 及 6-半乳糖 Gal(29.119 min)。将 WTPS-1 多糖水解产物衍生化图谱与标准单糖衍生化图谱对照, 结合出峰时间及质谱结果说明 WTPS-1 多糖是由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成的杂多糖, 其比例为 2.57:3.67:0.57:1:2.16:9.65。

3.4 乌龙茶多糖清除 DPPH· 自由基

0.2 mg/mL 粗多糖、经 Sevag 脱蛋白后多糖及 DEAE 分离的 WTPS-1 多糖组分, DPPH· 自由基清除率分别为 91.6%、60.7%和 9.20%。从结果中可以看出粗多糖经脱蛋白后, 其清除 DPPH· 自由基能力减弱。纤维素柱层析分离得到的 WTPS-1 多糖组分对 DPPH· 自由基的清除作用明显弱于粗多糖和脱蛋白后的多糖样品。

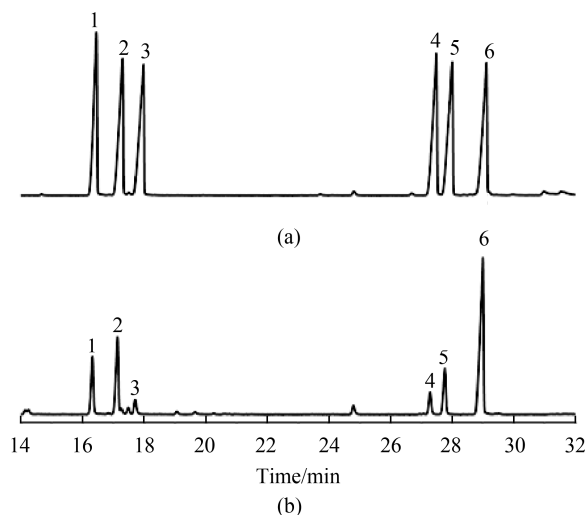


图 4 标准单糖混合物(a)和乌龙茶多糖 WTPS-1 水解后糖脲乙酸酯衍生物(b)的 GC-MS 总离子流图

1-鼠李糖(Rha); 2-阿拉伯糖(Ara); 3-木糖(Xyl); 4-甘露糖(Man); 5-葡萄糖(Glu); 6-半乳糖(Gal)

Fig. 4 GC-MS total ion chromatograms of acetylated aldonitriles of standard monosaccharides and WTPS-1 polysaccharides hydrolysate
1-Rha; 2- Ara; 3-Xyl; 4-Man; 5-Glu; 6-Gal

4 讨论

茶多糖是由 10 个分子以上的一种或多种单糖以糖苷键方式连接而成的大分子化合物, 包括中性多糖和酸性多糖, 往往与蛋白质紧密结合形成糖蛋白复合物。本研究分离得到的乌龙茶 WTPS-1

多糖存在 β -糖苷键构型, 其单糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成(2.57:3.67:0.57:1.2:1.6:9.65)。不同品种和产地的茶叶, 其多糖组成结构不同。陈海霞等^[7]从低档绿茶中分离得到的茶多糖 TPS4-1 存在 α 和 β 两种糖苷键构型, 其单糖组成为阿拉伯糖、核糖、木糖、葡萄糖和半乳糖(4.88:2.19:3.07:1.82:1), 还含有少量的甘露糖。倪德江等^[5]从乌龙茶中分离得到的多糖 OTS2-1 是一种含有吡喃环的糖蛋白复合物, 其单糖组成为半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、岩藻糖和鼠李糖组成(7.58:2.14:7.05:1.76:1.02)。丁婧思等^[10]从江西婺源源的粗老绿茶中分离得到的酸性多糖主要由鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成(1.26:3.18:4.08:1.00:1.52:3.92)。邵淑宏^[11]从三种发酵程度不同的乌龙茶(安溪铁观音、凤凰单丛、武夷大红袍)中分离的多糖的单糖均由鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成。

研究表明多糖具有抗氧化活性, 其可能的作用机制包括以下几种: 一是多糖可以提供活泼 H, 能够和自由基结合形成稳定的原子团消除自由基链反应; 二是多糖能够和自由基离子结合终止自由基链反应; 三是多糖通过提高抗氧化酶(如超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶)的活性起抗氧化作用; 四是多糖上的羟基可与产生羟自由基等所必须的金属离子如 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 络合, 使其不能产生脂质过氧化的羟自由基或使其不能分解脂质过氧化产生的脂氢过氧化物(ROOH), 从而抑制自由基的产生^[7]。本文中多糖对 DPPH 自由基清除能力大小为: 粗多糖>脱蛋白后的多糖>纯化后的 WTPS-1 多糖, 且脱蛋白后的多糖(0.2 mg/mL)清除 DPPH 自由基能力(60.7%)强于邵淑宏^[11]所报道的 3 种乌龙茶多糖(0.5 mg/mL, DPPH 自由基清除率低于 40.0%)。研究表明乌龙茶多糖抗氧化活性与蛋白质含量呈显著正相关^[11], 各级分乌龙茶多糖之间存在协同增效的作用^[5]。本文中粗多糖具有最强的清除 DPPH 自由基能力, 可能与其蛋白质含量高及多糖组分的协同增效作用相关。之前研究表明对多糖进行改造能够提高其生物活性^[12-14], 因此下一步将对 WTPS-1 多糖进行改造, 以期提高其抗氧化能力, 并对其抗氧化能力与多糖构造关系进行研究。

参考文献

- [1] Cai WR, Xie LL, Chen Y, *et al.* Purification, characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92: 1086–1090.
- [2] Müller N, Ellinger S, Altheld B, *et al.* Bolus ingestion of white and green tea increases the concentration of several flavan-3-ols in plasma, but does not affect markers of oxidative stress in healthy non-smokers [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54: 1636–1645.
- [3] Monobe M, Ema K, Kato F, *et al.* Immunostimulating activity of a crude polysaccharide derived from green tea (*Camellia sinensis*) extract [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(4): 1423–1427.
- [4] Zhou X, Wang D, Sun P, *et al.* Effects of soluble tea polysaccharides on hyperglycemia in alloxan-diabetic mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(14): 5523–5528.
- [5] 倪德江, 陈玉琼, 余志, 等. 乌龙茶加工过程中多糖的变化、组分分离及特性研究[J]. *茶叶科学*, 2005, 25(4): 282–288.
Ni D J, Chen Y Q, Yu Z, *et al.* Change of polysaccharide during the processing of Oolong tea and its structure characteristic [J]. *J Tea Sci*, 2005, 25(4): 282–288.
- [6] Chen HX, Zhang M, Xie BJ. Quantification of uronic acids in tea polysaccharide conjugates and its antioxidant properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(11): 3333–3336.
- [7] Chen HX, Zhang M, Xie BJ. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea [J]. *Food Chem*, 2005, 90(1–2): 17–21.
- [8] Chen HX, Zhang M, Qu ZH, *et al.* Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2008, 106(2): 559–563.
- [9] Yang F, Yang ZW, Xiao JB. Radical scavenging activity of crude polysaccharides from *camellia sinensis* [J]. *Arch Biol Sci*, 2011, 63 (3): 717–721.
- [10] 丁婧思, 聂少平, 冯燕玲, 等. 茶叶酸性多糖的分离、纯化及其理化性质研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 57–60.
Ding QS, Nie SP, Feng YL, *et al.* Isolation, purification and physico-chemical properties of acidic polysaccharides from green tea [J]. *Food Sci*. 2014, 35(23): 57–60.
- [11] 邵淑宏. 乌龙茶多糖理化性质及抗氧化、降血糖活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
Shao SH. Physicochemical properties, antioxidant and hypoglycemic activities of the polysaccharides from Oolong tea [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [12] 彭永华, 金征宇, 王元凤. 硫酸酯化茶多糖的制备及降血糖活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(11): 167–169.
Peng YH, Jin ZY, Wang YF. Study on preparation and hypoglycemic effect of sulfated tea polysaccharides [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2006, 27(11): 167–169.

- [13] 李玉华, 王凤山, 贺艳丽. 多糖化学修饰方法研究概况[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 62-65.

Li YH, Wang FS, He YL. Research status of the chemical modification methods of polysaccharides [J]. Chin J Biochem Pharm, 2007, 28(1): 62-65.

- [14] 梁进, 张剑韵, 崔莹莹, 等. 茶叶多糖的化学修饰及体外抗凝血作用研究[J]. 茶叶科学, 2008, 28(3): 45-49.

Liang J, Zhang JY, Cui YY, *et al.* Study on chemical modification and anticoagulant function *in vitro* of tea polysaccharides [J]. J Tea Sci, 2008, 28(3): 45-49.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈梅春, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为生物活性物质及保健功效研究。
E-mail: cmczjw@163.com



刘 波, 博士, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物研究。
E-mail: fzliubo@163.com