

- [7] Aida K, Tawata M, Shindo H, *et al.* Isoliquirigenin: A new aldose reductase inhibitor from *Glycyrrhizae Radix* [J]. *Planta Med*, 1990, 56(3): 254-258.
- [8] 宋纯清, 盛宛云. 膜荚黄芪中的紫穗烷和异黄烷类化合物[J]. *植物学报*, 1997, 39(12): 1169-1171.
- [9] Nakanishi T, Inada A, Kambayashi K, *et al.* Flavonoid glycosides of the roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(2): 339-341.
- [10] Zhang C Z, Xu X Z, Li C. Fructosides from *Cynomorium songaricum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 975-976.
- [11] 贾世山, 董颖. 中间锦鸡儿根异黄酮苷分离鉴定[J]. *中草药*, 1991, 22(10): 441-443.

茶多糖纯化组分的理化分析

陈小强¹, 成浩¹, 叶阳¹, 周瑛², 尹军峰¹

(1. 中国农业科学院茶叶研究所, 农业部茶叶化学工程重点实验室, 浙江 杭州 310008;

2. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310032)

摘要:目的 研究茶叶粗多糖化学组成和理化性质。方法 茶叶粗多糖经DEAE-纤维素DE-52柱色谱纯化, 获得3个纯化的茶多糖组分:TPS-I、TPS-II和TPS-III。结果 其中性糖质量分数分别为42.2%、21.7%和14.6%, 糖醛酸质量分数分别为21.1%、55.0%和18.8%, 蛋白质质量分数分别为3.35%、3.14%和3.29%。HPGPC-ELSD分析茶多糖纯化组分的均一性分布及所占比重, 揭示TPS-I由8种均一组分组成, TPS-II和TPS-III有3种均一组分; 紫外-可见光扫描发现, 茶叶粗多糖和TPS-III在258 nm处有特征吸收, TPS-I和TPS-II组分无特征吸收, 红外光谱揭示3组分的糖类化合物特征; 圆二色谱分析了TPS-I、TPS-II和TPS-III的cotton效应, 拟合计算了3组分所含蛋白质的二级结构分量。结论 为茶多糖的生物活性筛选和组效关系研究提供理化特性信息。

关键词:茶; 茶多糖; 纯化

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0828-03

茶叶里的复合多糖茶多糖(tea polysaccharide, TPS)具有多方面的生物学活性, 如降血糖、增强免疫等功效。根据一些学者的分析数据, 茶叶愈粗老, 多糖量越高^[1]。从粗老茶叶中提取高活性的多糖, 可作为医药保健品和食品的主、辅料, 也为低档茶、茶叶加工的下脚料等提供了资源综合利用的途径, 具有较好的应用前景。

本研究以龙井-43茶树品种制作的低档绿茶为原料提取茶叶粗多糖, 经过离子交换柱色谱纯化制备了若干多糖组分, 并对这些组分进行了系统的光谱特性分析, 为茶多糖的生物活性筛选和组效关系研究提供多糖的理化特性信息。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及主要仪器:低档绿茶由龙井-43茶树品种采制, 中国农业科学院茶叶研究所提供; 二乙基氨基乙醇(DEAE)-纤维素DE-52为Whatman公司产品; 蒽酮和半乳糖醛酸为Fluka产品; Bradford蛋白质测定试剂盒为碧云天生物技术研究产品; BECKMAN COULTER Avanti J-30I高速冷冻离心机; SHIMADZU UV-2550紫外可见分光光度计, Nicolet Nexus 670 FT-IR分析仪,

J-815圆二色光谱仪; FTS SYSTEMS冷冻干燥机; Agilent 1100系列高效液相色谱仪(HPLC), ALLTECH ELSD 2000ES蒸发光散射检测器, TSK-GEL G4000PW_{XL}(300 mm×7.8 mm)凝胶色谱柱。其他试剂为国产分析纯。

1.2 茶多糖的提取及纯化

1.2.1 茶叶粗多糖(crude tea polysaccharide, CTPS)的提取:以1:15料液比沸水提取1.5 h, 真空冷冻浓缩, 3倍体积乙醇沉淀, H₂O₂脱色, 三氯乙酸去蛋白, 透析, 真空冷冻干燥, 得茶叶粗多糖。

1.2.2 茶多糖的纯化:茶叶粗多糖上DEAE-纤维素DE-52柱色谱(30 cm×2.6 cm), 依次用H₂O、0.25 mol/L NaCl、0.40 mol/L NaCl溶液洗脱, 流速2.5 mL/min, 分部收集, 每管10 mL, 蒽酮-硫酸法示踪检测, 以620 nm波长下的吸光度为纵坐标, 洗脱管数为横坐标做洗脱曲线图, 根据洗脱曲线图的主峰位分别合并收集液, 各合并液充分透析后真空冷冻干燥, 得到茶多糖纯化组分。

1.3 茶多糖纯化组分的糖^[2]和蛋白质质量分数测定:中性糖质量分数测定采用蒽酮-硫酸法, 以葡萄糖为标准品; 糖醛酸质量分数的测定采用硫酸-咔唑

收稿日期:2007-11-26

基金项目:浙江省自然科学基金资助(Y306437)

作者简介:陈小强(1978-), 男, 硕士, 助理研究员。 E-mail:biomed528@163.com

法,以半乳糖醛酸为标准品;蛋白质质量分数测定采用Bradford法,以牛血清白蛋白为标准品,按试剂盒操作方法操作。

1.4 茶多糖纯化组分的均一性分布及其比例分析:配制2 mg/mL浓度的各纯化组分水溶液,采用高效液相凝胶渗透色谱-蒸发光散射检测器(HPGPC-ELSD)分析。

HPGPC-ELSD分析条件:进样量20 μ L;TSK-GEL G4000 PW_{XL}(300 mm $\times$ 7.8 mm)色谱柱,柱温为40 $^{\circ}$ C;流动相为H₂O,流速为0.8 mL/min;检测器为ELSD,雾化气体(氮气)流速为3.2 L/min,漂移管温度115 $^{\circ}$ C。

1.5 茶多糖的紫外-可见吸收光谱及红外光光谱分析:将茶叶粗多糖、茶多糖纯化分级组分样品配制成80 μ g/mL浓度溶液,在700~200 nm区域扫描;茶多糖纯化分级组分经KBr压片,在4 000~400 cm^{-1} 红外波数内扫描^[3]。

1.6 茶多糖的圆二色谱分析:配制0.5 mg/mL TPS-I和TPS-II水溶液,TPS-III浓度为0.125 mg/mL,在室温条件下测定。波长范围为187~350 nm,5 mm石英池,扫描速度为200 nm/min,带宽(band width)为5.00 nm,每个样品扫描3次。

2 结果与讨论

2.1 茶多糖的提取和纯化:茶叶粗多糖为淡黄色的疏松状固体粉末,粗多糖的提制过程尽量避免高温

环节和除乙醇之外的有机溶剂,如采取冷冻真空浓缩和适量三氯乙酸脱蛋白等工艺。

茶叶粗多糖经DEAE-纤维素DE-52柱色谱,获得3个多糖组分,根据梯度洗脱过程的管号标记,3组分的洗脱阶段基本对应于H₂O、0.25 mol/L NaCl和0.40 mol/L NaCl洗脱部分,依次命名为TPS-I、TPS-II和TPS-III,均为疏松状固体粉末,TPS-I为白色,TPS-II较TPS-I略带黄色,TPS-III为黄色粉末,以10 mg/mL浓度衡量,TPS-I和TPS-II能充分溶解,溶液透明,TPS-III有少量不溶物,可能为果胶成分。

2.2 茶多糖纯化组分的糖和蛋白质质量分数:茶多糖 TPS-I、II、III组分中性糖质量分数分别为42.21%、21.75%和14.62%;糖醛酸质量分数分别为21.06%、55.03%和18.81%;蛋白质质量分数接近,分别为3.35%、3.14%和3.29%。

2.3 茶多糖纯化组分的均一性组分分布及其比例:TPS-I、II、III组分的HPGPC-ELSD图谱见图1。组成TPS-I茶多糖的有8种均一性组分,依组分出峰顺序其质量比例分别为63.48%、12.15%、6.56%、3.31%、2.29%、0.70%、9.10%和2.40%;TPS-II含有3种均一性组分,依组分出峰顺序其质量比例分别为97.69%、2.01%和0.30%;TPS-III含有3种均一性组分,依组分出峰顺序其质量比例分别为94.47%、4.70%和0.83%。

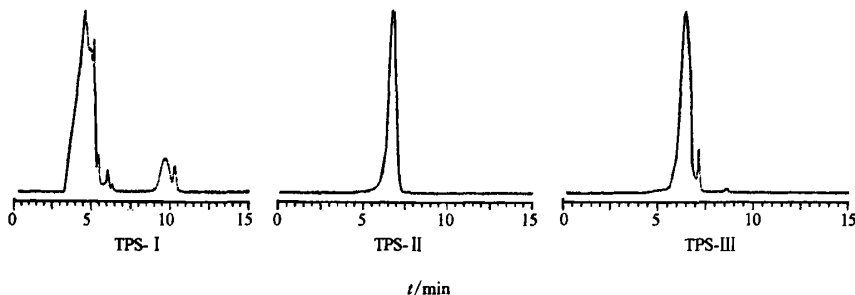


图1 茶多糖纯化组分TPS-I、II和III的HPGPC-ELSD图谱

Fig.1 HPGPC-ELSD Chromatogram of purified TPS-I, II, and III

2.4 茶多糖的紫外-可见吸收光谱及红外光光谱分析:紫外可见光扫描图谱(图2)显示,TPS-I和II组分在200~700 nm扫描区域无特征吸收峰,表明该组分不含有游离的蛋白质和核酸;茶叶粗多糖(CTPS)和TPS-III组分在258 nm处均有特征吸收峰,TPS-III峰型更为“尖锐”。因测得3个纯化组分蛋白质质量接近,而TPS-I和II无特征吸收峰,说明TPS-III组分含有核酸,不含有游离蛋白质。通常蛋白质特征吸收峰在280 nm附近,核酸在260 nm附

近,纯蛋白质的 A_{280}/A_{260} 约为1.8,纯核酸的比值约为0.5。TPS-III的 $A_{280}/A_{260}=0.509$,也印证上述结论。CTPS峰型较“钝”,其 $A_{280}/A_{260}=0.591$,查“紫外吸收法测定蛋白质质量的校正因子表”可知在核酸与游离蛋白质的比例中,核酸占到20%^[4],含有核酸和游离蛋白质。同时,UV图谱揭示,在DEAE-纤维素柱色谱洗脱过程中,核酸出现在较高离子强度洗脱部分,3个组分所测定到的蛋白质是与糖以结合态形式存在。

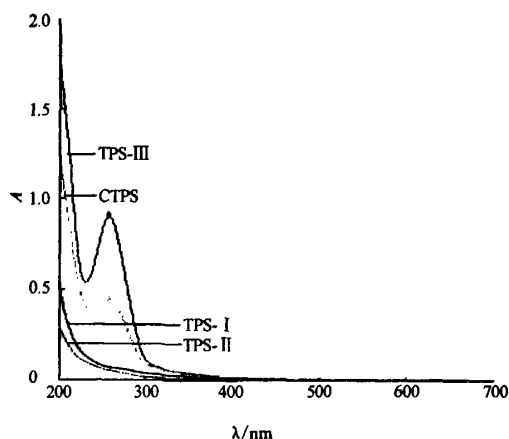


图2 茶多糖的紫外-可见吸收光谱

Fig. 2 UV Absorption spectra of TPS

3个纯化组分的红外光谱图相近,显示了糖类化合物官能团的特征。TPS-I、II和III均在 3409 cm^{-1} 区域有强宽谱带为缔合羟基的伸缩振动吸收

峰, 550 cm^{-1} 附近的一个宽峰是含有多羟基化合物的特征峰(缔合羟基的弯曲振动吸收峰), 2924 和 2850 cm^{-1} 谱带区域为 $-\text{CH}_2-$ 官能团的C-H伸缩振动吸收峰, 1420 cm^{-1} 谱带区域是C-H弯曲振动的吸收峰, 1078 cm^{-1} 为C-O的伸缩振动吸收峰, 1620 cm^{-1} 左右的大峰是水的峰(多糖易吸水)。因蛋白质的官能团出峰的地方正好跟水及C-H的 1410 cm^{-1} 的谱带重叠,故仅用IR无法判定茶多糖的结合蛋白成分的存在与否。TPS-I和II组分的IR吸收谱带基本相同。

TPS-III的IR光谱较其他组分的IR图谱复杂,其中 1494 cm^{-1} 还有较高吸收的峰,可能是苯环的骨架吸收。 1234 cm^{-1} 的吸收峰可能是苯醚结构的C-O吸收,从该组分的颜色较其他组分要深,推测可能是色素的IR光谱吸收结果。

2.5 茶多糖的圆二色谱分析:TPS-I、II和III的圆二色光谱扫描图见图3。3个组分呈现了不同的CD

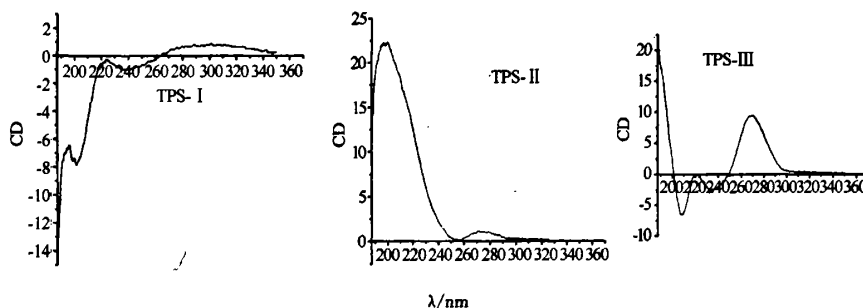


图3 茶多糖纯化组分TPS-I、II和III的圆二色谱图

Fig. 3 CD Spectra of purified TPS-I, II, and III

谱图。TPS-I茶多糖组分在 301 nm 有正Cotton效应,在 196 、 202 和 239 nm 处有负Cotton效应。TPS-II茶多糖组分在 199 和 276 nm 处有正Cotton效应。TPS-III组分在 270 nm 有正Cotton效应,在 235 和 208 nm 处有负Cotton效应。CD仪器软件拟合计算3个茶多糖组分所含蛋白质的二级结构分量,结果表明TPS-I组分的蛋白质含有 43.6% 的 β -折叠, 14.5% 的 β -转角和 41.9% 的无规卷曲;TPS-II组分的蛋白质含有 14.0% 的 α -螺旋和 86.0% 的 β -折叠;

TPS-III组分的蛋白质含有 81.3% 的 α -螺旋和 18.7% 的无规卷曲。

参考文献:

- [1] 傅博强, 谢明勇, 周 鹏. 茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2001, 25(4): 358-364.
- [2] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [3] 康学军, 曲见松, 顾忠泽. 白芷多糖的分析 [J]. 分析化学, 2006, 34(4): 533-535.
- [4] 陈钧辉. 生物化学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.

茶多糖纯化组分的理化分析

作者: 陈小强, 成浩, 叶阳, 周瑛, 尹军峰
作者单位: 陈小强, 成浩, 叶阳, 尹军峰(中国农业科学院茶叶研究所, 农业部茶叶化学工程重点实验室, 浙江, 杭州, 310008), 周瑛(浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江, 杭州, 310032)
刊名: 中草药 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39(6)
被引用次数: 2次

参考文献(4条)

1. 傅博强;谢明勇;周鹏 茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展[期刊论文]-南昌大学学报(理科版) 2001(04)
2. 张惟杰 糖复合物生化研究技术 1999
3. 康学军;曲见松;顾忠泽 白芷多糖的分析[期刊论文]-分析化学 2006(04)
4. 陈钧辉 生物化学实验 2003

本文读者也读过(7条)

1. 崔宏春, 江和源, 张建勇, 寇小红, 袁新跃, 刘晓辉, 高晴晴, 江用文 茶多糖的结构研究进展[期刊论文]-安徽农业科学2009, 37(1)
2. 陈小强, 周瑛, 叶阳, 成浩, 尹军峰, CHEN Xiao-Qiang, ZHOU Ying, YE Yang, CHENG Hao, YIN Jun-Feng 碱溶性茶多糖的提取及其分析[期刊论文]-应用化学2008, 25(12)
3. 周裔彬, 汪东风, 宛晓春, 杜先锋, Zhou Yibin, Wang Dongfeng, Wang Xiaohun, Du Xianfeng 茶多糖的纯化及结构分析[期刊论文]-化学通报(印刷版) 2008, 71(9)
4. 曹延杰, 李飞, 谭鹏 蒸制对中药多糖和5-羟甲基糠醛含量影响的研究概况[会议论文]-2008
5. 李秀娟, 刘洪莲, 刘新 峰县榴叶茶[期刊论文]-中国林副特产2000(3)
6. 杜绍亮, 刘富岗, 董晶晶, 杨云 法定中药材多糖研究概况[会议论文]-2009
7. 汪庆华, 鲁成银 茶叶中多种有机磷农药残留量的测定方法[期刊论文]-农业质量标准2003(6)

引证文献(2条)

1. 陈小强, 张志发, 王川丕, 何自强, 陈建新, 陈红平 热处理对高温煎煮和低温酶法提制绿茶多糖的影响[期刊论文]-应用化学 2011(4)
2. 余志, 石玉涛 茶多糖研究的新进展[期刊论文]-广东茶业 2008(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806010.aspx