

毛尖茶叶多糖及其结合物的抗氧化活性研究

曲伟¹, 王孟君¹, 于海燕³, 刘钰³, 田旭东³, 范海涛^{2,3,4*}

¹北京联合大学, 北京 100101; ²军事医学科学院, 北京 100850; ³北京电子科技职业学院
生物工程学院, 北京 100029; ⁴北京大学医学部药学院, 北京 100191

摘要:本研究对毛尖茶叶多糖及其结合物的抗氧化和清除自由基活性开展了研究。采用水提醇沉法提取毛尖茶叶多糖, 经除蛋白和纯化后得到精制多糖(MP), 将MP在三氟乙酸条件下水解完全, 经C₁₈柱层析分离后得到水洗脱部分(MP-HCW)和甲醇洗脱部分(MP-HCM), 利用DPPH法和普鲁士蓝法测定MP、MP-HCM和MP-HCW的清除自由基和抗氧化能力。结果显示MP、MP-HCM和MP-HCW的DPPH自由基清除率分别为28.99%、13.1%、23.2%; 还原力指数分别为0.044、0.015、0.029。实验证明毛尖茶叶多糖及其结合物均有较强药理作用, 具有清除自由基和抗氧化活性。

关键词: 毛尖茶叶; 多糖; 结合物; 活性贡献

中图分类号: R917; R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.003

Study on the Antioxidant Activity of Maojian Tea Polysaccharides and Its Conjugate

QU Wei¹, WANG Meng-jun¹, YU Hai-yan³, LIU Yu³, TIAN Xu-dong³, FAN Hai-tao^{2,3,4*}

¹Beijing Union University, Beijing 100101, China; ²Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; ³College of Bioengineering, Beijing Polytechnic, Beijing 100029, China; ⁴Pharmaceutical College, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Abstract: The antioxidant activity and free radical clearing function of Maojian tea polysaccharides and its conjugate were investigated. The polysaccharides (MP) were extracted and purified from Maojian Tea by common methods including Sevag and acetone treatment. MP was hydrolyzed completely in TFA and the hydrolysates were separated into two parts (MP-HCM and MP-HCW) by C₁₈ chromatographic treatment. The antioxidant activity and free radical clearing function of MP, MP-HCM and MP-HCW were studied by DPPH method and Prussian Blue method. The results showed that the DPPH radical scavenging rates of MP, MP-HCM and MP-HCW were 28.99%, 13.1% and 23.2%, respectively. The deoxidization indexes of were 0.044, 0.015 and 0.029, respectively. The presented results confirmed both Maojian tea polysaccharides and its conjugates had capacity of eliminating DPPH radicals and had antioxidant activity.

Key words: Maojian tea; polysaccharides; conjugate; activity contribution

茶叶作为历史悠久的饮品, 经研究具有降血糖、降血脂、抗氧化、清除自由基、提高免疫力和抗肿瘤等活性^[1,2], 罗祖友等^[3,4]阐明了藤茶多糖抗氧化和清除自由基与抗肿瘤、提高免疫力的作用关系, 为研究和理解植物多糖的药理活性提供了依据。诸多研究表明, 茶叶中多种化学成分产生抗氧化和清除自由基活性, 包括多酚类、氨基酸、儿茶素、多糖等^[5,6], 关于茶叶多糖的抗氧化和清除自由基活性

研究均是以不同方法处理的茶叶多糖作为活性测试对象^[7,8], 多糖结合物对多糖活性贡献的研究至今未见报道。

多糖属于多羟基大分子物质, 可与其他物质结合形成多糖复合物, 结合物的活性会表现在多糖复合物的活性中, Chen HX等^[9]在绿茶抗氧化活性研究中称研究对象为多糖结合物(polysaccharide conjugate)。王元凤等^[10]通过实验证实茶多糖结合金属离子形成络合物后清除自由基活性会发生变化, 提示直接将除蛋白后并以多种常规方法精制的多糖作为研究对象考察多糖的抗氧化和清除自由基活性的结果并不能真实反映多糖本身及其结合物的活

收稿日期: 2014-09-03 接受日期: 2014-12-30

基金项目: 北京市属高等学校人才强教计划(PHR 201107151); 北京市高等学校教学名师项目(PXM2014-014306-000075; PXM2014-014306-000087-00140333)

* 通讯作者 Tel: 86-10-84647160; E-mail: f181896605@163.com

性,具有一定的局限性,多糖结合物对多糖活性的贡献不应被忽视。

本研究采用水提醇沉法提取毛尖茶叶多糖,经多步处理后得到精制多糖(MP),将MP水解完全使糖苷键断裂结合物得到释放,水解产物经 C_{18} 柱层析分离后得到多糖水解的单糖及水溶性物质部分和极性较小的多糖结合物部分,即水洗脱部分(MP-HCW)和甲醇洗脱部分(MP-HCM),并以DPPH自由基清除法和普鲁士蓝法测定其活性,计算各部分的相应活性贡献值。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CARY 50 全波长紫外扫描仪,瓦里安公司;WZZ-2S 自动旋光仪,上海精密科学仪器有限公司;安捷伦 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪,DB-5 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),质谱检测器,安捷伦科技有限公司;安捷伦 1200 高效液相色谱仪,G1352A RID 检测器,安捷伦科技有限公司;Shodex[®] KS-805 凝胶色谱柱,9 mm × 250 mm;旋转蒸发仪,德国 Heidolph;电子天平,奥豪斯公司;高速离心机,上海安亭科学仪器厂;冷冻干燥机,天津因赛科技发展有限公司;紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;电热恒温水浴锅,北京长安永剑科学仪器有限公司。

1.2 材料

DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼),Sigma 公司;多糖分子量测定用标准品 Dextran,Sigma 公司,美国聚合物标准品公司;毛尖茶叶,购于吴裕泰北京北苑店(产地河南信阳);十八烷基键合硅胶(C_{18}),silicycle[®] C_{18} ;透析袋,MYM[®],截留分子量 2000 Da;苯酚,为重蒸苯酚,购自北京鼎国生物技术有限责任公司; V_C ,分析纯,北京长城化学试剂厂;葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、氯化钠、三氯甲烷、正丁醇、无水乙醇等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 MP 的提取与精制

称取 50 g 毛尖茶叶,沸水提取 30 min,冷却后 3000 rpm 离心,取上清,50 °C 减压浓缩至小体积,冷却至室温后加入乙醇,至溶液中乙醇的体积分数为 80%,置于 4 °C 冰箱中过夜,次日弃上清,并将沉淀

挥干乙醇后以水溶解后再次离心,上清液再次以 80% 乙醇沉淀,4 °C 冰箱中过夜后弃上清,如此反复处理多次,直至目测多糖溶液无色,将多糖溶液以 Sevag 法除蛋白多次,直至其在 280 nm 处无明显紫外吸收峰,除蛋白结束,浓缩水层得粗多糖溶液,冷冻干燥得毛尖茶叶粗多糖。

将毛尖茶叶粗多糖透析处理,并以无水乙醇、丙酮反复洗涤 8 次后真空冷冻干燥,即得毛尖茶叶精制多糖(MP)。本实验室曾对该操作下的黑骨藤精制多糖进行了验证,可保证多糖溶液中基本不含其他游离型杂质^[11]。

2.2 MP 的特性分析

2.2.1 旋光度测定

称取 MP 10.0 mg,以水溶解,定容至 25 mL,以水为空白,自动旋光仪测量旋光度,经计算,得 $[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}} = +62.5^\circ$ 。

2.2.2 分子量分布的测定

以 HPLC 对系列多糖标准品和 MP 进行测定,Shodex[®] KS-805 凝胶色谱柱,柱温 30 °C,纯水为流动相,流速 0.5 mL/min,RID 检测。

分别称取适量的分子量为 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 Da 的 Dextran 标准品,加入去离子水,将其配成浓度约 0.5 mg/mL 的对照品溶液,0.22 μm 水系滤膜过滤,之后逐一进行 HPLC 检测,以保留时间(RT)为横坐标 x,分子量的 \log_{10} 值为纵坐标 y,得标准曲线 $y = -0.1797x + 9.0456$ ($R = 0.9456$)。

称取一定量的 MP,按上述方法进行检测,以 MP 保留时间依上述标准曲线公式进行计算,得 MP 的分子量分布约为 $1.65 \times 10^6 \sim 2.50 \times 10^6$ Da。

2.2.3 单糖组成的测定

称取 MP 10 mg,以 3 mL 浓度为 2.23 mol/L 的 TFA 溶解后置于具塞试管中封管 99 °C 水解 5 h,按照文献^[12]中多糖糖醇醋酸盐衍生物的方法对 MP 的单糖组成和摩尔比进行测定,气相条件为,色谱柱:DB-5(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);检测器:质谱检测器;进样口温度:250 °C;检测器温度:280 °C;氮气流速:0.6 mL/min;分流比:20:1;进样量:1 μL;升温程序:200 °C 保持 2 min,以 3 °C/min 的速率升至 245 °C,再以 10 °C/min 的速率升至 270 °C,保持 2 min。测得 MP 由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 3.18 : 0.78 : 1.36 : 4.29。

2.3 MP-HCW 和 MP-HCM 的制备

称取 MP 50 mg, 以 15 mL 浓度为 2.23 mol/L 的 TFA 溶解后置于具塞试管中封管 99 °C 水解 5 h。水解结束后水解液反复加水减压蒸至无酸味, 以少量水溶解, C₁₈ 柱层析进行分离, 分别以水及甲醇洗脱 5 个柱体积, 两部分分别减压蒸干, 既得 MP-HCW 和 MP-HCM 部分。

2.4 MP、MP-HCM 和 MP-HCW 的清除自由基活性测定

按照文献所述方法^[13], 对 MP、MP-HCW 和 MP-HCM 进行清除自由基活性测定, 以样品对 DPPH 自由基的清除率作为评价指标。

2.4.1 溶液的配制

DPPH 溶液的配制: 精密称取 DPPH 8.01 mg, 以 60% 乙醇溶解并定容至 200 mL 棕色容量瓶中, 得浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 避光保存, 备用。

2.4.2 测定方法及结果

取 0.5 mg/mL MP 水溶液 1.0 mL, 置 10 mL 比色管中, 加入 3.0 mL 的 DPPH 溶液, 水浴 30 °C 避光反应 30 min, 以蒸馏水为空白, 于 517 nm 波长处测定吸光值。按下列公式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [A_0 - (A_S - A_C)] / A_0 \times 100\%$$

式中, A₀—1.0 mL 蒸馏水 + 3.0 mL DPPH 溶液的吸光度值; A_S—1.0 mL 样品溶液 + 3.0 mL DPPH 溶液的吸光度值; A_C—1.0 mL 样品溶液 + 3.0 mL 无水乙醇的吸光度值。将实验重复 6 次, 求得 MP、MP-HCM 和 MP-HCW 的 DPPH 自由基清除率分别为 28.99%、13.1%、23.2%, 其活性贡献关系如图 1。MP-HCM 对 MP 的 DPPH 自由基清除率贡献为 45.19%。

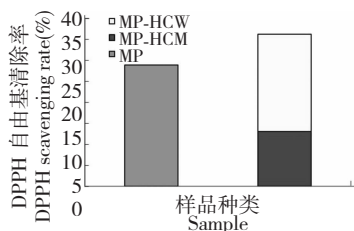


图 1 MP、MP-HCM 和 MP-HCW 的 DPPH 自由基清除率贡献关系图

Fig. 1 Contribution of DPPH radical scavenging rates of MP, MP-HCM and MP-HCW

2.5 MP、MP-HCM 和 MP-HCW 的总还原力活性测定

按照文献所述方法^[14], 对 MP、MP-HCW 和 MP-HCM 进行总还原力活性测定, 以还原力指数作为评价指标。

2.5.1 V_C 标准曲线的绘制

用蒸馏水配制浓度分别为 0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045 mg/mL 的 V_C 溶液。以移液管吸取 1 mL V_C 水溶液到具塞试管中, 加入 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH = 6.6) 2.5 mL 和 1% 的铁氰化钾溶液 2.5 mL, 混合溶液于 50 °C 水浴保温 20 min, 反应结束后 30 °C 水浴冷却 5 min, 加入 2.5 mL 10% (w/v) 三氯乙酸溶液, 3000 rpm 离心 10 min, 精密吸取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 混匀。同时以 1 mL 蒸馏水代替 V_C 溶液按照如上方法操作, 作为空白对照, 在 700 nm 处测吸光度 A_{VC}。

将配制的梯度浓度的 V_C 标准溶液均按照上述方法测定 A_{VC}, 结果绘制 V_C 的浓度-还原力标准曲线, 得标准曲线方程为 A_{VC} = 7.057C_{VC} - 0.015, R = 0.997。

2.5.2 样品的测定

取 0.5 mg/mL (C_S) 的 MP 溶液, 按照 2.4.1 方法进行操作, 重复六次, 求得 A_S 的平均值及 RSD 值。以 V_C 标准曲线求得 A_S 下 V_C 的浓度 C_{VC}, 以两浓度的比值作为还原力指数, 以评价样品的还原力, 公式如下:

$$\text{还原力指数} = C_{VC} / C_S$$

MP-HCM 和 MP-HCW 以相当于 0.5 mg/mL MP 浓度的样品溶液, 按照上述方法进行测定, 分别以甲醇和水作为空白试剂, 经测定, 计算得 MP、MP-HCM 和 MP-HCW 的还原力指数分别为 0.044、0.015、0.029, 其活性贡献关系如图 2。MP-HCM 对 MP 的总还原力贡献为 34.09%。

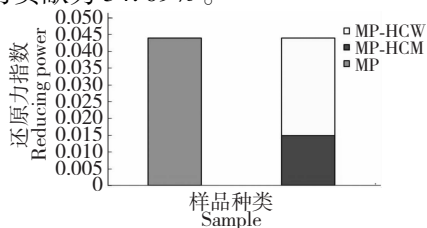


图 2 MP、MP-HCM 和 MP-HCW 的还原力活性贡献关系图

Fig. 2 Contribution of reducing power of MP, MP-HCM and MP-HCW

3 讨论

茶叶在我国资源丰富,饮用历史悠久,并被认为是具有较好的保健功效。现代医学药学研究对茶叶成分及其活性有广泛研究,尤其对茶多糖的抗氧化、清除自由基等活性的研究多有报道,并有学者通过实验证实茶多糖及其他植物多糖的抗氧化活性与提高机体免疫力和抗肿瘤等活性的潜在关系,对正确认识茶多糖的药理作用、开发新型药物具有重要意义。

现代植物化学研究范畴认为,多糖是由多个单糖通过糖苷键连接形成的大分子物质,经提取、分离、纯化后在生化或体外药理等活性检验中表现出抗氧化、清除自由基、免疫、抗肿瘤等活性。作为多羟基大分子化合物,多糖可形成空间立体结构,并可制成微胶囊与活性药物分子结合成复合物,作为新的给药方式^[15],可能与多糖的多羟基立体结构同药物分子结合成稳定复合物有关。特定多糖的空间结构可与小分子物质形成复合物,此时多糖表现出的活性包含了其结合物的活性。暨南大学郭凌^[16]等将琼枝麒麟菜和异枝麒麟菜硫酸多糖部分进行了水解,探讨了多糖及其水解产物抑菌活性的差异,虽未确证抑菌活性变化的机理,依然提示多糖水解后活性的变化趋向。

本研究以毛尖茶叶多糖为研究对象,采用酸水解的方法使多糖中糖苷键断裂,多糖结合物被释放,收集水解后的单糖部分和多糖结合物部分,并对各个部分进行活性检测和比较,证实多糖结合物具有一定的抗氧化和清除自由基活性,并初步计算了其在多糖复合物活性中的贡献值,对科学认识多糖提供了新的思路和依据,对天然来源多糖的研究具有重要意义。

参考文献

- 1 Lu M (卢敏). Advances in studies on pharmacological activities of tea polysaccharides. *Drug Eval Res* (药物评价研究), 2009, 1: 67-69.
- 2 Quan JS (全吉淑), Yin XZ (尹学哲), Jin ZWD (金泽武道). Study of antioxidant activity of tea polysaccharides. *J Chin Med Mater*, 2007, 9: 1116-1118.
- 3 Luo ZY (罗祖友), Yan FW (严奉伟), Xue ZH (薛照辉), et al. Study on antioxidant activity of polysaccharide from *Ampelopsis grossedentata*. *Food Sci* (食品科学), 2004, 11: 291-295.
- 4 Luo ZY (罗祖友), Chen GH (陈根洪), Chen Y (陈业), et al. Study on antitumor and immunoregulation effect of polysaccharide from *Ampelopsis grossedentata*. *Food Sci* (食品科学), 2007, 08: 457-461.
- 5 Lv HP (吕海鹏). Analyze of components and study on antioxidant activity of Pu-erh tea. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (中国农业科学院), MSc. 2005.
- 6 Mateos-Aparicio I, Mateos-Peinado C, Jiménez-Escrig A, et al. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. *Carbohydr Polymers*, 2010, 2: 245-250.
- 7 Su BX (苏冰霞), Zhang Y (张月), Ge HL (葛会林), et al. Influence on antioxidant activity of separation Mallotus Furetianus tea polysaccharides. *Food Sci Technol* (食品科技), 2013, 09: 160-164.
- 8 Li XM, Li XL, Zhou AG. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro*. *Eu Polymer J*, 2007, 2: 488-497.
- 9 Chen HX, Zhang M, Xie BJ. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chem*, 2005, 1-2: 17-21.
- 10 Wang YF (王元凤), Jin ZY (金征宇), Wei XL (魏新林). Preparation and hydroxyl radical-scavenging effects of tea polysaccharides metal complex. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 382-387.
- 11 Sun L (孙磊), Qiao SY (乔善义), Zhao YM (赵毅民). Studies on content determination of polysaccharides in *Periploca forrestii*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 10: 1241-1244.
- 12 Bai DS (白娣斯), Zhang J (张静). Study and comparison of two derivatization methods of polysaccharides by GC. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 02: 322-324.
- 13 Wu YJ (吴玉娟), Wang YP (王懿萍), Jiang YW (姜延伟), et al. Study of determination and antioxidant activity on polysaccharide of the rhizome of Chinese gold thread. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时针国医国药), 2008, 08: 1906-1908.
- 14 Hou XJ (侯秀娟). Studies on the extraction, purification, antioxidant activities and biological activities of polysaccharides of *Exocarpium Citri Grandisthis*. Nanchang: Jiangxi Agricultural University (江西农业大学), MSc. 2013.
- 15 Liu XD (刘袖洞), He Y (何洋), Liu Q (刘群), et al. Microcapsule and its application in biomedical field. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2000, 23: 2476-2485.
- 16 Guo L (郭凌), Bao HY (包惠燕), Ye SM (叶绍明), et al. Antibacterial activities of *Eucheuma gelatinae*, *Euchemas triatum* and their hydrolysates. *J Jinan Univ, Nat Sci* (暨南大学学报, 自科版), 2002, 23(3): 79-83.