

应用高效液相色谱法测定茶叶多糖

聂少平, 谢明勇*, 申明月, 王远兴

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 使用 Sephadex G-100 凝胶柱纯化制备得到茶叶多糖, 用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 鉴定了茶叶多糖的纯度并测定其分子量; 同时, 使用不同浓度的 NaCl 溶液作为流动相并用已知分子量的右旋葡聚糖作为标准曲线研究了茶叶多糖在凝胶色谱柱 (Ultrasphere™ 500) 上的色谱行为, 研究发现, 由于茶叶多糖的分子量随着流动相的离子浓度的改变而改变, 高效凝胶渗透色谱法是不适合用作测定茶叶多糖的分子量的方法的。然后, 本研究以自制茶叶多糖纯品作为标准品, 以 Ultrasphere™ 500 (7.8 × 300mm) 为固定相, 0.6ml/min 蒸馏水为流动相, 折光示差检测, 对多种茶叶中茶叶多糖含量进行了测定, 回收率在 80.4%~93.2% (RSD=5.42%) 之间, 回归方程为: $C=0.2503 \times 10^{-6}A-0.0087$, $r=0.9997$, 其浓度在 0.604~6.04mg/ml 范围内呈良好的线性关系。结果显示, 该方法是简单、准确、可靠的, 适合于作为茶叶多糖原材料和产品质量控制的方法。

关键词: 高效凝胶渗透色谱法; 茶叶多糖; 含量测定

Determination of Tea Polysaccharide by High Performance Liquid Chromatography

NIE Shao-ping, XIE Ming-yong*, SHEN Ming-yue, WANG Yuan-xing

(Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract Tea polysaccharide was purified by Sephadex G-100 gel filtration, and its purity and molecular weight (M_w) were determined by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). The GPC elution behavior of tea polysaccharide on Ultrasphere™ 500 (7.8 × 300mm) column was studied by using mobile phase with various concentrations of NaCl. Dextran T- system was found to be unsuitable as M_w calibration standards in GPC because the M_w of tea polysaccharide was changed with the change of ionic concentration in the mobile phase. Thus, the purified tea polysaccharide obtained in this study was standardized to be used instead as the calibration standards for the determination and comparison of tea polysaccharides in tea samples collected from different geographic locations and species varieties. The GPC was run at 35°C on an Ultrasphere™ 500 column (7.8 × 300mm) with a refractive index (RI) detector. Distilled water was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6ml/min. The calibration curve was linear over the tea polysaccharide concentration range of 0.604~6.04mg/ml, with a correlation coefficient of $r=0.9997$. The tea polysaccharide mass recovery ranged from 80.4% to 93.2% with a RSD of 5.42%. The assay method developed in this paper is found to be simple, reproducible and reliable, and thus ideally suitable for the quality control of tea polysaccharide derived products and raw materials.

Key words High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC); tea polysaccharide determination

中图分类号 TS2

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2006)04-0177-05

由于多糖类复合物(如多糖、糖蛋白、蛋白聚糖和糖脂等)等生物大分子的理化性质和生物活性与其分子量和分子量分布有很大关系, 因此, 在多糖类复合物的研究及其产品质量控制中, 分子量是一个重要指标^[1]。多糖类复合物的分子量的测定方法很多, 如渗透压法、蒸汽压法、端基法、光散射法、粘度法等^[2~5], 但这

些方法大多繁琐且误差很大, 而高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定多糖类复合物的分子量具有快速、高分辨和重现性好的优点, 在国内外已得到广泛应用^[6]。

茶叶是在中国古代文献中被最早提及的天然药物之一。茶叶被认为起源于中国, 神农尝百草时发现, 茶叶可以作为一些有毒草药的解毒剂。现在, 众多文献

收稿日期 2005-06-20

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(20462005); 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目

作者简介: 聂少平(1978-), 男, 博士研究生, 研究方向为食品营养与安全及天然产物化学。

已经报到茶叶具有广泛的药理和营养价值^[7~9]。许多研究表明, 茶叶中的多糖类复合物具有许多重要的生物活性^[10~12]。现有测定茶叶多糖含量的文献大都是测定总的多糖类复合物的含量^[13], 并未能对某个具有确定功效的组分进行测定, 本文对经 Sephadex G100 凝胶柱分离、纯化的茶叶多糖提取物用高效液相凝胶渗透色谱法鉴定其纯度^[14]并用已知分子量的右旋葡聚糖作为标准曲线测定了茶叶多糖的分子量, 同时研究了它在不同浓度的 NaCl 溶液作为流动相时在凝胶色谱柱(Ultrahydrogel™ 500)上的色谱行为, 最后以此纯品作为标准测定了多种茶叶中该组分的相对含量, 其结果可作为茶叶多糖原料筛选和产品质量控制的方法, 同时可为其开发研究提供相关依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

茶叶原料采自江西分宜、婺源、上犹等地的绿茶和红茶, 标准系列多糖 Dextran Blue (M_w 2000000), T-10 (M_w 100000), T-40 (M_w 40000), 70 (M_w 70000) 及 Sephadex G100 (Pharmacia 公司), 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

高效液相色谱仪: Waters 公司 515 二元高压梯度系统, 515 泵, 示差折光检测器, PCM 泵控制器, Millennium³² 色谱工作软件, 柱温箱, 手动进样器(20μl 定量环)。

UV2000 紫外分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; DK-S24 型电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司; TDL-5A 离心沉淀机 上海安亭分析仪器有限公司; RE-52 旋转蒸发器 上海亚荣生化有限公司; BSZ-100 自动部分收集仪、HL-1S 恒流泵 上海青浦沪西仪器厂; 凝胶柱(2.6×70cm) 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 茶叶多糖的制备

1.3.1 提取和分离

茶叶样品中加入 10 倍体积的 80% 乙醇溶液在室温下浸提 24h, 然后过滤, 在 50℃ 下挥干溶剂。加入 20 倍重量的蒸馏水, 在 50℃ 下搅拌提取 4h, 滤布过滤后, 重复一次, 合并两次滤液, 离心分离, 减压浓缩。浓缩液加入 Sevage 试剂去除游离蛋白(Sevage 试剂为 4:1 的氯仿、正丁醇)^[15]。然后透析(自来水透析两天, 蒸馏水透析一天, 透析袋规格为 8000~10000Da)。将袋内液取出, 加入无水乙醇至醇浓度为 70%, 在 4℃ 冰箱中静置过夜, 离心分离得沉淀物。

1.3.2 纯化

沉淀物加入蒸馏水使其溶解, 对蒸馏水透析一天, 袋内液上 Sephadex G100 凝胶色谱柱(2.6×70cm), 以

0.1mol/L 的 NaCl 为洗脱液进行色谱分离, 洗出液通过自动收集仪每 6min(洗脱流速 1.5ml/min) 逐管收集并逐管检测 620nm(多糖的蒽酮-硫酸显色)^[13] 和 280nm(蛋白) 处的吸收, 根据出峰情况收集主要组分, 浓缩, 干燥得茶叶多糖复合物。

1.4 茶叶多糖的均一性和分子量测定

采用 Waters 高效液相色谱仪对茶叶多糖的均一性进行鉴定, 色谱条件: 色谱柱为 Ultrahydrogel™ 500(7.8×300mm), 流动相: 蒸馏水, 流速: 0.6ml/min, 紫外和示差检测器, Millennium-32 色谱工作站, 柱温: 35℃, 示差检测器温度: 35℃。分子筛原理是 HPGPC 测定多糖或糖复合物分子量的根据, 分子量与其在凝胶柱上的洗脱体积 V_e、分配系数 K_{av} 存在如下关系^[16]:

$$V_e = a - b \log M_w$$

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

$$K_{av} = K_1 - K_2 \log M_w$$

其中 a、b、K₁、K₂ 为常数, V₀ 为蓝色葡聚糖的洗脱体积, V_t 为葡萄糖的洗脱体积。

根据该关系, 我们用已知分子量的右旋葡聚糖绘制标准曲线, 然后根据茶叶多糖的洗脱体积求得茶叶多糖的计算分子量。

1.5 茶叶多糖在高效液相凝胶柱上的色谱行为

使用凝胶柱测定不同 NaCl 浓度下的茶叶多糖分子量, 流动相为蒸馏水和 0.002、0.004、0.006、0.008、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20、0.40mol/L NaCl(均经超声脱气并过微孔滤膜)。自制茶多糖及标准葡聚糖 T-70 分别溶于上述流动相中, 浓度约为 0.2%(W/V), 其它按 1.4 色谱条件。

1.6 HPGPC 法测定不同茶叶中茶叶多糖的含量

1.6.1 标准溶液的配制和标准曲线的绘制

精密称取茶叶多糖一定量, 溶解于水中, 制成 6.04mg/ml 的标准贮备液。标准贮备液经过适当溶解稀释配成系列标准溶液, 其范围为: 0.604~6.04mg/ml。色谱条件参见 1.4。将标准多糖浓度与其峰面积进行回归处理, 绘制标准曲线。

1.6.2 样品制备

样品按照 1.3.1 方法进行制备, 沉淀物最后溶解于水中。

1.6.3 回收率试验

精密称取 2g 已知茶叶多糖含量的样品(分宜绿茶), 再精密加入浓度为 2.416mg/ml 的茶叶多糖标准溶液 10ml, 按照 1.6.2 步骤制备样品, 取滤液 20μl, 注入液相色谱仪, 测定, 计算回收率及相对标准偏差(RSD)。

1.6.4 日内和日间精密度

采用日内和日间的可变性测定来判定所采用方法的

准确性和精密度。浓度为 2.416mg/ml 的茶叶多糖标准溶液和浓度为 2.59mg/ml 的右旋葡聚糖 T-70 被选用来测定日内和日间变异。日内变异在同一天内测定 5 次, 而日间变异则在 5d 中每天测定一次。分别取溶液 20 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 计算回收率及相对标准偏差 (RSD)。

1.6.5 稳定性和重现性测定

本研究测定了茶叶多糖在水提物中的稳定性。按 1.6.2 方法制备了 5 份分宜绿茶的水提物, 其中一份在室温和 4 $^{\circ}$ C 下在 2、4、6、8、10h 后分别测定以判定方法的稳定性。同时, 5 份样品在室温下直接进样测定以判定方法的重现性。每次取溶液 20 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 计算相对标准偏差 (RSD)。

1.6.6 样品测定

选取不同茶叶样品 (见表 5), 采用 HPGPC 法测定其中茶叶多糖含量。

2 结果与分析

2.1 茶叶多糖的制备

经过 Sephadex G-100 过滤后, 自动收集馏分, 逐管检测 A_{620nm} (多糖的蒽酮硫酸衍生物的吸收峰) 和 A_{280nm}

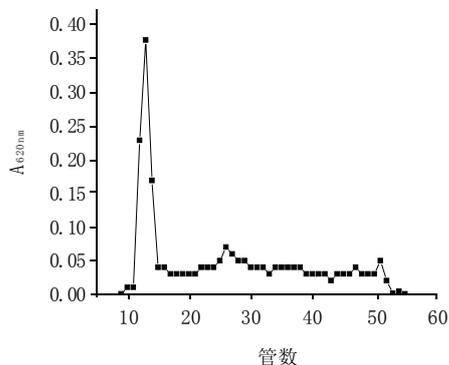


图1 逐管 A_{620nm} 检测结果

Fig.1 Each tube assay results at 620nm

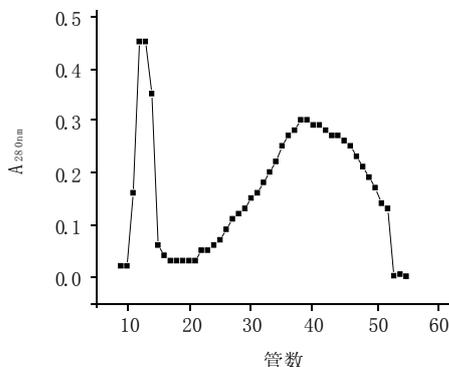


图2 逐管 A_{280nm} 检测结果

Fig.2 Each tube assay results at 280nm

(蛋白质吸收峰), 结果见图 1、2。从图中可以看出, 存在一个大的洗脱尖峰, 其 A_{620nm} 和 A_{280nm} 的最大值恰好重叠于第 14 管, 表明该组分很可能是糖蛋白。将该组分收集, 浓缩, 待用。

2.2 茶叶多糖的均一性和分子量测定

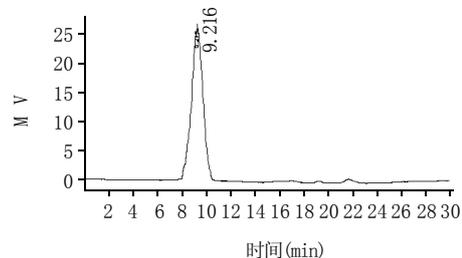


图3 茶叶多糖色谱图 (示差检测)

Fig.3 The GPC chromatogram of tea polysaccharide on a Waters HPLC apparatus with a RI Detector

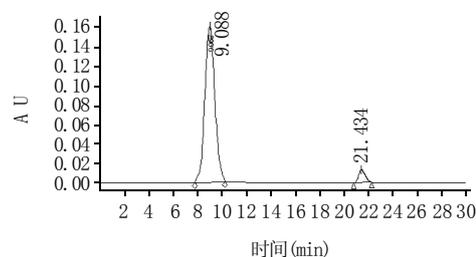


图4 茶叶多糖色谱图 (紫外检测)

Fig.4 The GPC chromatogram of tea polysaccharide on a Waters HPLC apparatus with a UV Detector

图 3、4 是茶叶多糖的高效液相凝胶渗透色谱的示差和 280nm 处的紫外谱图, 从图中可看出其为均匀对称单一峰, 由此可验证纯化所得茶叶多糖为一均一糖蛋白。以葡聚糖系列 (T-2000, T70, T-40, T10 和葡萄糖) 为标准, 采用分配系数 K_{av} 对葡聚糖标准的 $\log M_w$ 值进行回归处理, 得标准曲线 $K_{av}=1.5746-0.2458\log M_w$, $r=0.9977$ (见图 5), 从该标准曲线上可求得茶叶多糖的计算分子量为 1766038Da, 该结果与我们以前的研究报道的结果 (51500Da) 相差较大^[14]。由此我们接下来对茶叶多糖在高效液相凝胶柱上的渗透行为进行研究。

2.3 茶叶多糖在高效液相凝胶柱上的色谱行为

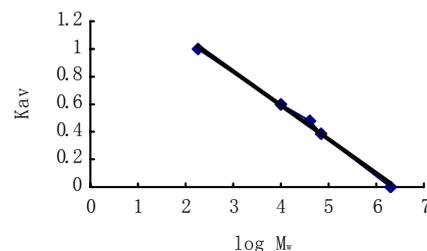


图5 葡聚糖标准曲线

Fig.5 The GPC calibration curve of Dextran standards

表1 不同 NaCl 浓度下茶多糖的保留时间、Kav 和计算分子量
Table 1 Retention time (t_R), Kav and the calculated M_w of tea polysaccharide in different concentration of mobile phase

NaCl 浓度 (mol/L)	茶多糖的 t_R (min)	Kav	茶多糖的计算分子量	T-70 的 t_R
0.000	9.275	0.039	1766038	13.017
0.002	9.471	0.057	1492794	13.114
0.004	9.899	0.097	1025652	13.080
0.006	9.979	0.104	961612	13.120
0.008	10.159	0.121	820352	13.113
0.010	10.441	0.147	642688	13.092
0.020	10.923	0.192	421697	13.080
0.040	11.321	0.229	297852	13.084
0.060	12.446	0.334	111429	13.095
0.080	13.156	0.400	60117	13.047
0.100	13.307	0.414	52723	13.050
0.200	13.387	0.421	49317	13.070
0.400	13.603	0.441	40926	13.023

表1给出了在葡聚糖标准曲线(图5)相同而流动相 NaCl 浓度不同情况下茶叶多糖的保留时间, 根据不同保留时间可从葡聚糖标准曲线上求得不同的茶叶多糖的计算分子量, 为了验证不同流动相对标准曲线的影响, 在测定样品同时测定了 Dextran T-70 的保留时间做对照。

从表1中可以看出, T-70 的保留时间不受流动相中 NaCl 的浓度的影响, 而茶叶多糖的保留时间却随着流动相中 NaCl 浓度的改变而改变, 结果显示茶叶多糖的计算分子量随着流动相的离子浓度的改变而改变。当流动相中 NaCl 的浓度小于 0.02mol/L 时, 茶叶多糖的计算分子量大于 500000Da, 而当流动相中离子浓度大于 0.06mol/L 时, 茶叶多糖的计算分子量小于 100000Da, 也就是说, 流动相中离子浓度越低, 茶叶多糖的计算分子量就越大。所以, 用 HPGPC 法所测得的茶叶多糖的计算分子量仅是一个相对值。但当流动相中 NaCl 浓度为 0.08~0.2mol/L 时, 茶叶多糖的计算分子量与我们以前的研究报道的结果(51500Da)相接近^[14]。由此可见, 要测定茶叶多糖的分子量大小, 不能单纯采用 HPGPC 法, 而应多种方法相互印证。

2.4 HPGPC 法测定不同茶叶中茶叶多糖的含量

按 1.4 色谱条件测定茶叶多糖峰面积, 将茶叶多糖浓度与其峰面积进行回归处理, 标准曲线见图 6, 回归方程为: $C=0.2503 \times 10^{-6}A-0.0087$, $r=0.9997$, 其浓度在 0.604~6.04mg/ml 范围内呈良好的线性关系。按试验给定条件测得回收率在 80.4%~93.2% 之间(见表 2)。表 3、4 分别是茶叶多糖(2.416mg/ml)和 Dextran T-70(2.59mg/ml)的日内和日间的精密性试验结果。在室温和 4℃ 下分别测定了样品的稳定性, 结果显示供试品溶液中茶叶多糖在 10h 内峰面积无明显变化, 茶叶多糖峰面积相对标准偏差分别为 0.54% 和 0.61%; 同时在室温下对 5 份样品的重现性进行了考察, 5 份样品峰面积的相对标准偏

表2 样品回收率试验

Table 2 Recovery of tea polysaccharide in the samples extraction procedure

添加量(mg)	回收量(mg)	回收率(%)	RSD (%)
	19.42	80.4	
	20.17	83.5	
24.16	22.51	93.2	5.42
	19.96	82.6	
	21.43	88.7	

表3 茶多糖的日内和日间标准偏差试验

Table 3 Intra- and inter-day variation for the assay of tea polysaccharide

	峰面积	RSD (%)	峰面积	RSD (%)
	945534		962350	
	967613		958712	
日内试验	954897	1.52	930596	1.93
	928846		949680	
	931876		914165	

表4 葡聚糖 T-70 的日内和日间标准偏差试验

Table 4 Intra- and inter-day variation for the assay of Dextran T-70

	峰面积	RSD (%)	峰面积	RSD (%)
	1079427		1096338	
	1071563		1073974	
日内试验	1062049	0.74	1065312	1.06
	1058690		1071439	
	1060175		1088756	

差为 3.72%, 可见该方法有较好的重现性。

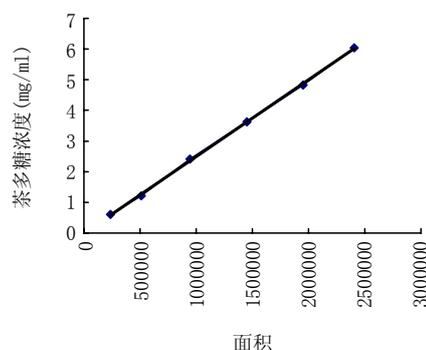


图6 茶多糖纯品的标准曲线

Fig.6 The GPC calibration curve of tea polysaccharide standard

以上结果显示, 高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 具有快速、高分辨和重现性好等优点, 适合作为不同茶叶样品中茶叶多糖含量的测定。同时, 我们也认为该方法适合于作为茶叶多糖原材料和产品质量控制的方法。

按照 1.4 描述的色谱条件测定不同茶叶中茶叶多糖的含量, 图 7、8 是两个代表性的示差色谱峰(其中绿茶峰形相似, 只列出分宜绿茶色谱图)。表 5 显示的是样品中茶叶多糖含量测定结果, 由表 5 可以看出, 绿茶的

表5 不同样品茶多糖测定结果

Table 5 The results of the content of tea polysaccharide at different tea samples by determining by using HPGPC

产地	品种	级别	茶多糖含量(%)	RSD ^a (%)
江西分宜县	绿茶	六级	0.926	3.58
江西上犹县	绿茶	六级	1.274	2.78
江西婺源县	绿茶	五级	1.192	3.09
江西婺源县	绿茶	三级	1.063	1.01
江西婺源县	绿茶	特级	0.879	1.73
江西婺源县	红茶	统装	0.608	1.69

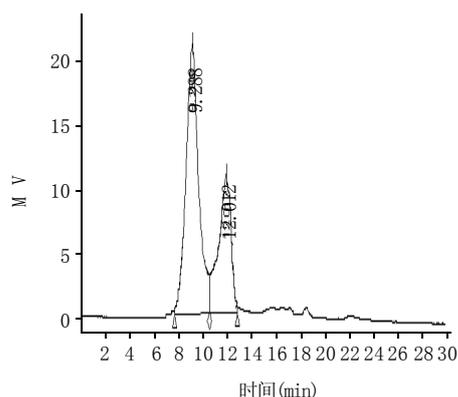
注：^a 相对标准偏差(n=3)。

图7 绿茶中茶多糖色谱图(示差检测)

Fig.7 The GPC chromatogram of tea polysaccharide of green tea on a Waters HPLC apparatus with a RI Detector

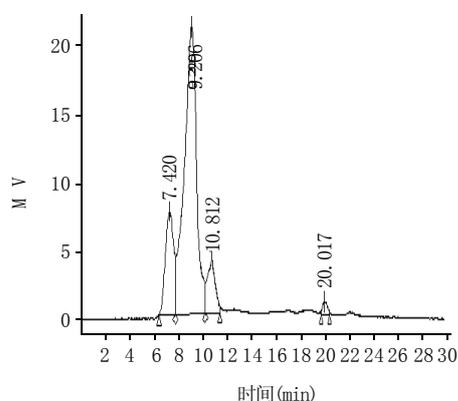


图8 红茶中茶多糖色谱图(示差检测)

Fig.8 The GPC chromatogram of tea polysaccharide of red tea on a Waters HPLC apparatus with a RI Detector

等级越高(如六级),则茶叶多糖含量越高,红茶和绿茶的茶叶多糖含量也有很大差异,由此可见,茶叶多糖含量受到产地、品种、级别影响。该结果可为选择茶叶原料提供一个很好的参考。

3 结论

通过 HPGPC 鉴定,采用 Sephadex G-100 凝胶渗透法纯化得到的茶叶多糖应该是一均一性组分。

由于茶叶多糖的分子量随着流动相中离子浓度的改变而不同,可见 HPGPC 是不适合于作为茶叶多糖分子量的测定方法。

高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)具有快速、高分辨和重现性好等优点,适合作为不同茶叶样品中茶叶多糖含量的测定。同时,我们也认为该方法适合于作为茶叶多糖原材料和产品质量控制的方法。

茶叶多糖含量受到产地、品种、级别影响。该结果可为选择茶叶原料提供一个很好的参考。

参考文献:

- [1] 陈惠黎, 王克夷. 糖复合物的结构与功能[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997.
- [2] Qiong Ding, Suhong Jiang, Lina Zhang, et al. Laser light-scattering studies of pachyman[J]. Carbohydrate Research, 1998, 308: 339-343.
- [3] Zvonko Burkus, Feral Temelli. Determination of the molecular weight of barley β -glucan using intrinsic viscosity measurements[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 51-57.
- [4] Rajesh Dhama, Stephen E Harding, Timothy Jones, et al. Physico-chemical studies on a commercial foodgrade xanthan-I. Characterisation by sedimentation velocity, sedimentation equilibrium and viscometry [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 27: 93-99.
- [5] GM Pavlov, EB Tarabukina, SYa Frenkel. Self-sufficiency of velocity sedimentation for the determination of molecular characteristics of linear polymers[J]. Polymer, 1995, 36: 2043-2048.
- [6] 张志花, 杨晓彤, 方积年. 云芝糖肽在高效液相凝胶柱上色谱行为的研究[J]. 色谱, 1997, 15(2): 150-152.
- [7] 严鸿德, 汪东风, 王泽农, 等. 茶叶深加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [8] Richard Béliveau, Denis Gingras. Green tea: prevention and treatment of cancer by nutraceuticals[J]. The Lancet, 2004, 364: 1021-1022.
- [9] Marcel WL Koo, Chi H Cho. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 500: 177-185.
- [10] Wang Dongfeng, Wang Chenghong, Li Jun, et al. Components and activity of polysaccharides from coarse tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 507-510.
- [11] 陈海霞, 谢笔钧. 富硒茶叶中茶多糖的某些化学性质及对羟自由基的清除作用[J]. 卫生研究, 2001, 30(1): 58-59.
- [12] 刘立军, 韩驰, 陈君石. 茶叶防癌有效成份的短期细胞生物学筛选[J]. 卫生研究, 1998, 27(1): 53-56.
- [13] 傅博强, 谢明勇, 聂少平, 等. 茶叶中多糖含量的测定[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 69-73.
- [14] 周鹏, 谢明勇, 王远兴. 高效液相色谱-电喷雾质谱法用于茶多糖蛋白的纯度和相对分子质量的测定[J]. 色谱, 2004, 22(1): 27-29.
- [15] L Navarini, R Gilli, V Gombac, et al. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 40: 71-81.
- [16] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.