

硫酸-紫外法与苯酚-硫酸法测定千两茶中总多糖的比较

辛敏^{1,2}, 刘轩², 詹欣^{1,2}, 黄昀², 唐劲天^{1,2}, 盛军^{1,3*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084;

3. 云南农业大学普洱茶学教育部重点实验室, 昆明 650201)

[摘要] 目的: 比较苯酚-硫酸法与硫酸-紫外法在测定千两茶多糖含量上的差异。方法: 千两茶粉经水提醇沉, Sevage法除蛋白后, 采用苯酚-硫酸法和硫酸-紫外法测定茶多糖含量。结果: 苯酚-硫酸法标准曲线方程为 $Y = 4.7550X - 0.0295$ ($R^2 = 0.9904$), 硫酸-紫外法标准曲线方程为 $Y = 4.7700X - 0.0651$ ($R^2 = 0.9931$), 均在 $0.02 \sim 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 有良好的线性关系。所测茶多糖质量分数分别为 2.00%, 3.21%, 其差异有统计学意义。结论: 硫酸-紫外法作为一种多糖检测新手段, 可简便测定多糖含量。

[关键词] 茶多糖; 千两茶; 苯酚-硫酸法; 硫酸-紫外法, 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0062-04

[doi] 10.11653/syfy2014030062

Determination of Total Polysaccharides in Qianliang Tea by Sulfuric Acid-UV Method and Phenol-Sulfuric Acid Method

XIN Min^{1,2}, LIU Xuan², ZHAN Xin^{1,2}, HUANG Yun², TANG Jin-tian^{1,2}, SHENG Jun^{1,3*}

[收稿日期] 20130717(017)

[基金项目] 中国博士后基金项目(2013M530603)

[第一作者] 辛敏, 硕士, 从事微生物与生化药学研究, Tel: 010-62796784, E-mail: mthsyj@yeah.net

[通讯作者] * 盛军, 博士, 教授, 从事普洱茶学研究, Tel: 010-62796784, E-mail: shengj@ynau.edu.cn

[参考文献]

- [1] 李岩. 杜仲现代药理研究综述[J]. 按摩与康复医学, 2011, 12(24): 48.
- [2] 韩宇东. 杜仲药理活性研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2011, 11(2): 125.
- [3] 王丽楠, 李伟, 覃洁萍, 等. 同采收期杜仲不同部位主要有效成分的动态研究[J]. 中国药业, 2009, 18(18): 29.
- [4] 潘亚磊, 翟远坤, 武祥龙, 等. 杜仲活性成分的提取及分离纯化方法研究进展[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(2): 1.
- [5] 王少峰. 贵州杜仲产业发展概述[J]. 遵义科技, 2012(1): 13.
- [6] Lee M K, Cho S Y, Kim D J, et al. Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex water extract alters heme biosynthesis and erythrocyte antioxidant defense

system in lead-administered rats [J]. J Med Food, Spring, 2005, 8(1): 86.

- [7] 乔颖, 温静, 宋洋, 等. 基于 UPLC-PDA-MS-MS 技术的四逆散水煎液体内外物质基础研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1672.
- [8] Li X Q, Xiong Z L, Ying X X, et al. A rapid ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of the constituents of the flower of *Trollius ledibourii* Reichb. [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 580(2): 170.
- [9] 张丹, 张春风, 杨中林. 杜仲指纹图谱中化学成分的归属研究[J]. 中医药学报, 2012, 40(2): 58.
- [10] 卢定强, 赵辉, 王俊, 等. 杜仲的全生物炼制研究进展[J]. 现代化工, 2009, 29(3): 12.

[责任编辑 顾雪竹]

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Institute of Nuclear Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Yunnan Research Centre for Advance Tea Processing, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China.)

[Abstract] **Objective:** To compare differences between phenol-sulfuric acid method and sulfuric acid-UV method to determine polysaccharides content in Qianliang tea. **Method:** The two methods were employed to determine content of polysaccharides in Qianliang tea after water extracting-alcohol precipitating and sewage assays. **Result:** The total sugar stand curve equation were $Y = 4.755 0X - 0.029 5$ ($R^2 = 0.990 4$) (by sulfuric acid-UV method) and $Y = 4.770 0X - 0.065 1$ ($R^2 = 0.993 1$) (by phenol-sulfuric acid method), which showed a good linear relationship range from 0.02 to 0.1 g · L⁻¹. The determination of phenol-sulfuric acid method and sulfuric acid-UV method were 2.00% and 3.21%, which was statistically significance. **Conclusion:** As a new method, sulfuric acid-UV method could be a stable and simple method to measure the polysaccharide.

[Key words] tea polysaccharides; qianliang tea; phenol-sulfuric acid; sulfuric acid-UV; determination

茶多糖 (tea polysaccharides, TPS) 是一类与蛋白质结合在一起的酸性多糖或酸性糖蛋白, 由茶叶中的糖类、蛋白质、果胶和灰分等物质组成, 具有降血糖、降血脂、抗凝血、抗血栓、增强机体免疫力、降血压、耐缺氧、减慢心率、增加冠状动脉血流量和防辐射等作用^[1]。茶多糖可用于抗肿瘤药、艾滋病等的抗病毒药、延缓衰老等功能性保健食品的开发及糖尿病患者的辅助治疗药物^[2-3]。此外, 茶多糖还具有乳化、增稠、稳定等能力^[4]。

黑茶是我国所拥有的六大茶类之一, 属于后发酵茶, 为我国所特有。黑茶因具独特风味和一定保健功能而备受欢迎。千两茶系紧压茶, 属黑茶类, 又称花卷茶, 产于湖南安化一带, 是主要的边销茶之一。千两茶水提物能呈剂量依赖性地降低高血脂症大鼠血清总胆固醇和低密度脂蛋白及甘油血脂水平, 能显著改善高脂所诱导的血管内皮舒张功能障碍, 降低血浆非对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和丙二醛 (ADMA) 含量, 增加一氧化氮水平^[5]。

已知的多糖的含量测定方法有比色法、滴定法、高效液相色谱法、气相色谱法、薄层扫描法、高效毛细管电泳法等^[6]。滴定法需在沸腾状态下滴定, 温度和滴定速度对结果影响较大, 且不能排除还原糖的干扰。高效液相色谱法、气相色谱法需要昂贵仪器。薄层扫描法、高效毛细管电泳法操作严格技术难度大。比色法中蒽酮-硫酸法所测结果偏高, 故选择线性好、准确度高、测定速度快、仪器简单的苯酚-硫酸法测定千两茶多糖含量。自 1956 年 DuBois 等^[7] 提出苯酚-硫酸法以来, 该法已广泛应用于多糖含量测定。苯酚-硫酸法对糖的检测因其种类 (中性糖或阴性糖) 而存在差异。2013 年 Ammar A 等^[8]

提出硫酸-紫外法以改善苯酚-硫酸法检测多糖含量。硫酸-紫外法可简化实验步骤, 有效缩短实验时间, 提高方法准确度, 同时可避免因苯酚-硫酸法中所使用的苯酚给人体及环境带来的危害。本研究针对茶多糖含量的测定运用硫酸-紫外法, 并与传统的苯酚-硫酸法进行比较^[9], 采用酶标仪高效、快速、稳定的检测千两茶多糖含量^[10-11]。

1 仪器与试剂

iMark 酶标仪 (美国 Bio-rad 公司), EnVision 多标记微孔板检测仪 (美国 Perkin Elmer 公司), FW100 型高速万能粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司), KQ 5200 DE 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司), himac CF 16RX 型冷冻离心机 (日本 HITACHI 公司), Venticell 型烘箱 (德国 MMM 公司), NANO pure 型超纯水系统 (美国 Barnstead 公司)。

千两茶购自湖南安化茶厂 (批号 201107, 20120606020, 20120820); 葡萄糖购自成都瑞芬思生物科技有限公司 (批号 P-012-110821, 纯度 > 98%); 硫酸、苯酚、正丁醇、氯仿、乙醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[12-15] 准确称取千两茶粉 20.00 g, 加入 200 mL 蒸馏水浸泡 30 min。在 80 ℃ 恒温超声 90 min, 过滤, 重复提取 1 次, 合并滤液。5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 取上清液, 减压浓缩至原体积的 1/4, 向浓缩液中加入 4 倍量无水乙醇, 静置 12 h 后 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清。固体用少量水溶解得 100 mL 供试品溶液 1 (除蛋白前), 取 90 mL 用 Sewage 法 (正丁醇-氯仿为 1:4) 除蛋白, 得

60 mL 供试品溶液 2(除蛋白后)。干燥后得多糖提取物 1.342 0 g,得率 7.46%。

2.2 标准曲线的绘制

2.2.1 苯酚-硫酸法标准曲线 精密称取葡萄糖对照品 10 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加适量水溶解,稀释至刻度,摇匀,即得 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖母液。稀释葡萄糖母液至 $0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液。精密吸取各浓度葡萄糖溶液 2 mL 分别置于 30 mL 加塞试管中,加入 5% 苯酚水溶液 1.0 mL 混匀,随后快速加入 5 mL 浓硫酸,10 min 后摇匀 30 s, 30 ℃ 水浴 20 min,准确吸取 150 μL 葡萄糖溶液至 96 孔板中在 490 nm 波长处以试剂空白溶液为参比,测定吸光度^[7]。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4.755 0X - 0.029 5 (R^2 = 0.990 4)$ 。表明在 $0.02 \sim 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,吸光度与葡萄糖浓度有良好线性关系。

2.2.2 硫酸-紫外法标准曲线 精密吸取 $0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液 1 mL,分别置于 30 mL 加塞试管中,快速加入 3 mL 浓硫酸,摇匀 30 s,放入冰中冷却 2 min 至室温。准确吸取 150 μL 葡萄糖溶液至 96 孔板中在 315 nm 波长处以试剂空白溶液为参比,测定吸光度^[8]。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4.770 0X - 0.065 1 (R^2 = 0.993 1)$ 。表明在 $0.02 \sim 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,吸光度与葡萄糖浓度有良好线性关系。

2.3 精密度试验 精密吸取供试品溶液 1 的 80 倍稀释液和供试品溶液 2 的 80 倍稀释液各 6 份,按 2.2.1 项下方法和 2.2.2 项下方法连续测定 6 次^[14-15],求 RSD。苯酚-硫酸法所测供试品溶液 1 稀释液吸光度和供试品溶液 2 稀释液吸光度 RSD 分别为 0.79%, 0.45%。硫酸-紫外法所测供试品溶液 1 稀释液吸光度和供试品溶液 2 稀释液吸光度 RSD 分别为 0.41%, 0.54%,表明两方法精密度良好。

2.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 1 的 80 倍稀释液和供试品溶液 2 的 80 倍稀释液,按 2.2.1 项下方法和 2.2.2 项下方法在 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180 min 测定吸光度^[14-15]。苯酚-硫酸法所测供试品溶液 1 稀释液吸光度和供试品溶液 2 稀释液吸光度 RSD 分别为 1.10%, 1.60% ($n = 6$)。硫酸-紫外法所测供试品溶液 1 稀释液吸光度和供试品溶液 2 稀释液吸光度 RSD 分别为 2.26%,

2.32% ($n = 6$),表明样品溶液在 3 h 内稳定。

2.5 加样回收试验

2.5.1 苯酚-硫酸法加样回收试验 精密量取已知含量的 2.1 项下供试品溶液 2 的 80 倍稀释液 1.0 mL,分别精密加入质量浓度为 $0.065, 0.070, 0.075, 0.080, 0.085, 0.090 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液 1 mL,按 2.2.1 方法测定吸光度,计算回收率^[14-15]。结果见表 1。

表 1 苯酚-硫酸法总多酚加样回收试验

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.065 0	0.139 7	99.71		
0.070 0	0.145 1	100.00		
0.075 0	0.151 3	100.80	99.92	0.98
0.080 0	0.152 4	98.26		
0.085 0	0.159 6	99.69		
0.090 0	0.166 8	101.03		

注:样品中含量均为 0.075 1 mg。

2.5.2 硫酸-紫外法加样回收试验 精密量取已知含量的 2.1 项下供试品溶液 2 的 80 倍稀释液 0.5 mL,分别精密加入质量浓度为 $0.065, 0.070, 0.075, 0.080, 0.085, 0.090 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液 0.5 mL,按 2.2.2 方法测定吸光度,计算回收率^[14-15],见表 2。

表 2 硫酸-紫外法加样回收试验

取样量 /mL	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.5	0.060 0	0.032 5	0.091 1	98.49		
0.5	0.060 0	0.035 0	0.094 9	99.89		
0.5	0.060 0	0.037 5	0.098 2	100.72	100.34	1.31
0.5	0.060 0	0.040 0	0.101 7	101.70		
0.5	0.060 0	0.042 5	0.101 9	99.41		
0.5	0.060 0	0.045 0	0.106 9	101.81		

2.6 样品测定

2.6.1 苯酚-硫酸法测定样品 精密吸取 2.1 项下方法所制备供试品稀释液 2 mL,分别置于 30 mL 加塞试管中,加入 5% 苯酚水溶液 1.0 mL 混匀,随后快速加入 5 mL 浓硫酸,10 min 后摇匀 30 s,30 ℃ 水浴 20 min,准确吸取 150 μL 溶液至 96 孔板中在 490 nm 波长处以试剂空白溶液为参比,测定吸光度^[7]。依据标准曲线计算多糖含量。结果见表 3。供试品溶液 1、供试品溶液 2 多糖质量分数分别为 3.14%, 2.00%。

2.6.2 硫酸-紫外法测定样品 精密吸取 2.1 项下方法所制备供试品稀释液 1 mL,分别置于 30 mL 加塞试管中,快速加入 3 mL 浓硫酸,摇匀 30 s,放入冰中冷却 2 min 至室温。准确吸取 150 μ L 葡萄糖溶液至 96 孔板中在 315 nm 波长处以试剂空白溶液为参比,测定吸光度^[8]。依据标准曲线计算多糖含量。结果见表 3。

表 3 千两茶多糖质量分数

测定方法	样品来源	多糖质量分数/%
苯酚-硫酸	除蛋白前	3.14
	除蛋白后	2.00
硫酸-紫外	除蛋白前	4.38
	除蛋白后	3.21

3 讨论

通过对苯酚-硫酸法和硫酸-紫外法 Sevage 法除蛋白前后多糖含量的比较,多糖质量分数分别由 3.14%、4.38% 降到 2.00%、3.21%,存在统计学意义,Sevage 法方便有效的去除蛋白质的同时去除约 1.1% 的多糖,可能由于部分多糖与蛋白质结合牢固而被去除,导致茶多糖的损失^[16-17]。通过 Sevage 法除蛋白前后苯酚-硫酸法和硫酸-紫外法多糖含量的比较,硫酸-紫外法所测多糖质量分数分别为 4.38%、3.21%,高于苯酚-硫酸法所测多糖质量分数 3.14%、2.00%,存在统计学意义,可能苯酚-硫酸法是将多糖用强酸处理,脱水生产糖醛或其衍生物,再与酚类作用生成有特殊颜色的物质再比色处理,硫酸-紫外法则直接对强酸处理多糖所产生的糖醛或其衍生物进行测定,两种方法机制存在一定差异,故所测结果有所不同。

实验中应用酶标仪,其在快速、多通道、用量少等方面较可见-紫外分光光度计有明显优势。实验中所用 5% 苯酚溶液容易被氧化,需现配现用。测定多糖含量时,应注意试液的充分混匀,严格控制混匀时间和放置时间,以免影响测定结果。

[参考文献]

- [1] 徐仲溪,王坤波. 茶多糖化学及生物活性的研究[J]. 茶叶科学,2004,24(2):75.
[2] 傅海平,黄怀生,胡孟阳,等. 茶多糖生物活性及提取

纯化的研究进展[J]. 茶叶通讯,2006,33(2):24.

- [3] Wang D F, Wang C H, Li J, et al. Components and activity of polysaccharides from coarse tea[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(1):507.
[4] 易风英,刘素纯,李佳莲,等. 茶多糖的提取方法及其生理功能研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(6):2911.
[5] 黄春桃. 十两茶水提取物降糖作用及机制研究[D]. 湖南:湖南师范大学,2012.
[6] 黄瑞松. 中草药多糖含量测定方法概述[J]. 中国药师,2005,8(1):68.
[7] Michel DuBois, K A Gilles, J K Hamilton, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28(3):350.
[8] Ammar A Albalasmeh, Asmeret Asefaw Berhe, Teamrat A. Ghezzehei. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry [J]. Carbohydr Polym, 2013(97):253.
[9] 刘晓涵,陈永刚,林励,等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J]. 食品科技,2009,34(9):270.
[10] 苏颖,周选围. 改进苯酚-硫酸法快速测定虫草多糖含量[J]. 食品研究与开发,2008,29(3):118.
[11] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format[J]. Anal Biochem,2005,339(1):69.
[12] 周斌星,孔令波,陈军贤. 普洱茶多糖的提取及降血糖的研究[J]. 中国农学通报,2009,25(15):55.
[13] 卢金珍,孙金龙,任俊,等. 绿茶茶多糖提取工艺优化研究[J]. 食品科学,2012(7):335.
[14] 周斌星,孔令波,陈军贤. 普洱茶多糖的提取及降血糖的研究[J]. 中国农学通报,2009,25(15):55.
[15] 武晓英,侯冬岩,回瑞华. 黑茶中茶多糖含量的测定[J]. 鞍山师范学院学报,2011,13(2):36.
[16] 扈瑞平,张兴夫,杜玲,等. 沙葱多糖 Sevage 法除蛋白工艺的研究[J]. 内蒙古大学学报,2009,40(6):658.
[17] Nie Shao-Ping, Xie Ming-Yong. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities[J]. Food Hydro,2011(25):144.

[责任编辑 顾雪竹]