

乌龙茶多糖的酶法提取及降血糖活性初步研究

张元¹, 林强^{1*}, 崔玉梅¹, 魏静娜² (1. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:目的 用纤维素酶辅助提取、膜过滤法纯化乌龙茶多糖, 并研究其降糖活性。方法 比较酶处理与否两种条件下的提取量及微滤前后多糖的纯度, 选择合适的提取分离路线; 注射四氧嘧啶制造高血糖模型, 灌胃给药 (IG) 28 d, 观察比较茶多糖的降糖效果。结果 增加酶处理过程后提取率提高 31.91%, 膜过滤使得粗茶多糖纯度由纯化前的 28.7% 提高到 45.3%; 乌龙茶多糖 (IG) 为 200 mg·kg⁻¹ 降糖效果较好 ($P < 0.05$)。结论 乌龙茶多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠有一定的治疗效果。

关键词: 茶多糖; 酶处理; 膜分离; 四氧嘧啶; 降血糖

中图分类号: R284.2; R285.5; R977.15

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)04-0286-03

Study on Preparation of Tea Polysaccharides from Oolong and Their Hypoglycemic Activity

ZHANG Yuan¹, LIN Qiang^{1*}, Cui Yu-mei¹, WEI Jing-na² (1. Biochemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Enzyme-assisted extraction and membrane separation technique (MST) were applied, and the hypoglycemic effects of tea polysaccharide (TSP) obtained were investigated; **METHODS** Effects of MST was investigated after the comparison of traditional and enzyme-assisted method to select a suitable program, and then TSP were gastric perfused to model of diabetic mellitus established by ip alloxan for 28 d in order to compare their hypoglycemic activities. **RESULTS** Cellulase treatment make a significant increase of extraction rate by 31.91% and purity of the crude polysaccharides was elevated from 28.7% to 45.3% through microfiltration; Best dose was 200 mg·kg⁻¹ Ig administration of tea polysaccharide. ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Tea polysaccharide showed good hypoglycemic effect.

KEY WORDS: tea polysaccharide; Cellulase treatment; membrane separation; alloxan; hypoglycemic activity

茶多糖 (tea polysaccharide, 简称 TSP) 是茶叶中一类水溶性复合多糖, 在天然植物中是与蛋白质结合在一起的酸性多糖或一种酸性糖蛋白, 产品的外观呈淡褐色, 易溶于热水, 不溶于乙醇、丙酮。药理研究表明, 茶多糖具有降血糖、降血脂、抗凝血、抗血栓、降血压、耐缺氧、增加冠状动脉血流量、防辐射、增强机体免疫力、抗炎、抗癌等多种功效, 尤其是显著的降血糖效果和免疫活性, 茶多糖可望成为预防治疗糖尿病及心血管疾病, 增加免疫功能的天然药物^[1]。茶叶中主要药理成分咖啡碱、茶多酚等含量都随茶树叶片的老化而减少, 而据文献报道^[2], 茶多糖则相反, 多糖含量是随茶叶原料的粗老度而增加的, 也就是说茶树叶片愈老, 茶多糖的含量愈高。

1 实验材料与方法

1.1 原料与试剂

粗老乌龙茶 (购自福建省福安市湾坞茶场驻京茗厚香茶行, 粉碎后过 60 目筛备用); 纤维素酶 (活力 22 000 u·g⁻¹, 天津得益酶制剂公司); 四氧嘧啶 (Fluka 产品); 氯化钠注射液 (0.9%, 石家庄四药股份有限公司); 消渴丸 (广州中一药业有限公司, 批号 H00932); 拜糖平 (Bayer 公司, 批号: 108527); 葡萄糖试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司);

其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

电子分析天平 AE100 (梅特勒 托利多仪器 (上海) 有限公司); 旋转蒸发器 RE-52C (上海亚荣生化仪器厂); 紫外可见分光光度计 TU-1810PC (北京普析通用仪器有限责任公司); 实验用膜分离装置 (上海亚东核级树脂有限公司); 便携式 pH 计 PHB-4 (上海精密科学仪器有限公司); 离心机 TGL-16C (上海安亭科学仪器厂); 罗氏优越血糖检测仪及血糖检测试纸 (罗氏诊断有限公司)。

1.3 动物

ICR 小鼠, 雄性, (20 ± 2) g, 清洁级, 许可证编号: SCXK (京) 2007-0001, 北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.4 茶多糖的提取

1.4.1 水提不加酶: 称取粉碎后的茶叶 100 g, 加 30 倍量的蒸馏水, 调节 pH 6.5, 于 80 °C 条件下, 浸提 3 h 后抽滤, 将滤液减压旋转蒸发浓缩至一定体积后, 缓慢加入 10 倍量的 95% 乙醇静置过夜后抽滤, 滤饼用乙醚、丙酮、无水乙醇交替洗涤 2 次, 抽滤, 滤饼真空干燥。

1.4.2 水提加酶: 称取粉碎后的茶叶 100 g, 加 500 mL 水, 0.20% 纤维素酶, 于 pH 5.0, 40 °C 下酶解 4 h 后, 按照“1.4.1”

作者简介: 张元, 男, 硕士, 讲师 * 通讯作者: 林强, 男, 博士后, 教授

Tel: (010) 67373086

E-mail: linqiang@buu.com.cn

项下的方法提取。

1.5 茶多糖的纯化

先用去离子水冲洗膜组件 10 min(滤膜截留分子量 30 万,进口压力 0.20 mPa),测定并记录清水流量,随后将配制好粗多糖溶液(10 g·L⁻¹)2.0 L 过滤,并记录流量,透过液总体积。

微滤后用去离子水、0.1% 氢氧化钠溶液清洗滤膜 20 min,再用去离子水清洗 10 min,记录清洗前后的流量。

苯酚硫酸法测定茶多糖含量^[3]。

1.6 茶多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠的降血糖作用研究

将小鼠分笼,标记,称重,禁食 24 h(不禁水)后,腹腔注射四氧嘧啶 150 mg·kg⁻¹,72 h 后断尾取血测空腹血糖,血糖高于 11 mmol·L⁻¹作为糖尿病模型鼠,模型鼠体重下降,活动减少,毛疏松无光泽,饮水量增加,食量增多,说明造模成功。

将成模小鼠随机分为 6 组(每组 10 只),分别为茶多糖中、低、高剂量组,拜糖平组,消渴丸组和模型组,同时设正常小鼠组做空白对照。每天灌胃给药 1 次,其中模型组及空白对照组小鼠灌生理盐水,连续 28 d,在 14 d、28 d 给药后 1.5 h 尾静脉取血测血糖。用罗氏优越血糖检测仪检测血糖。

1.7 血糖测定和统计学分析:使用 SPSS(12.0)版软件进行统计分析。数据处理:选择 One-Way ANOVA 方式。所用指标以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用方差分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

2 结果及讨论

2.1 茶多糖提取分离

100 g 粗老乌龙茶用常规的水提醇沉法得到 4.7 g 粗多糖,而采用纤维素酶预处理后再提取,多糖含量可达到 6.2

表 1 茶多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effect of tea polysaccharides on blood glucose of alloxan induced diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组号	组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	造膜后血糖值 /mmol·L ⁻¹	给药后 14 d 血糖值 /mmol·L ⁻¹	给药后 28 d 血糖值 /mmol·L ⁻¹
1	茶多糖	50	26.58 ± 2.59 ¹⁾	24.83 ± 5.60 ¹⁾	25.10 ± 7.08 ¹⁾
2	茶多糖	100	27.99 ± 4.06 ¹⁾	23.80 ± 3.32 ¹⁾²⁾	25.48 ± 5.51 ¹⁾
3	茶多糖	200	25.37 ± 3.58 ¹⁾	22.13 ± 3.17 ¹⁾²⁾	21.35 ± 3.81 ¹⁾²⁾
4	拜糖平	20	26.11 ± 1.16 ¹⁾	19.52 ± 1.86 ¹⁾²⁾	21.87 ± 1.80 ¹⁾
5	消渴丸	2 500	24.84 ± 0.83 ¹⁾	19.04 ± 1.89 ¹⁾²⁾	17.41 ± 3.51 ¹⁾²⁾
6	空白对照组	-	7.09 ± 0.26	7.15 ± 0.40 ²⁾	7.21 ± 0.36 ²⁾
7	模型对照组	-	18.80 ± 0.20 ¹⁾	29.17 ± 1.88 ¹⁾	30.75 ± 2.30 ¹⁾

注:给药组与空白对照组的比较,¹⁾ $P < 0.05$,给药组与模型对照组的比较,²⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, vs model group and vs group;²⁾ $P < 0.05$, vs model group and vs drug group

3 讨论

乌龙茶中多糖的含量高于红茶,降血糖效果优于绿茶^[4]。因此本实验采用乌龙茶作原料。

酶辅助提取及膜分离技术都是近些年来发展起来的新方法,纤维素酶可以切断 β-葡萄糖苷键,破坏细胞壁,从而降低了有效成分向溶液中扩散的阻力。文献研究证明,多糖含量随茶的粗老的增加而增加,但同时纤维素含量也随着细胞

g,产率提高了 31.91%。

2.2 茶多糖纯化

膜过滤前检测(苯酚硫酸法)茶多糖粗品中总糖含量为 28.7%,总糖浓度为 7.187 μg·mL⁻¹。将透过液(共 1 740 mL)浓缩干燥得纯化后的产品 7.9 g,总糖含量为 45.3%,多糖回收率 62.35%。

实验结果显示,通过微孔膜过滤,茶多糖的纯度从 28.7%提高到 45.3%,基本达到了纯化的目的,但多糖的损失率较高(达到了 37.65%),引起多糖损失的可能原因是多方面的:①膜分离过程的原理是利用膜的选择性透过而使不同的物质得到分离,本实验使用相对分子质量为 30 万的滤膜截流,相比分子质量 30 万的多糖分子理所当然就被除去了;②糖类为黏性物质,很容易吸附到膜表面造成膜孔堵塞(同时黏附在膜表面的多糖也就损失掉了),这样滤膜孔径实际上要缩小很多,这可以由膜渗透通量的减少反应出来,实验开始的 10 min 内,药液中分子量较大或者抽滤时未能滤掉的颗粒迅速沉积在膜表面,造成膜渗透通量急剧降低,当系统稳定下来后,膜表面的沉积运动达到平衡,膜通量也趋于稳定。实验后对膜进行再生,通量恢复率为 86.5%。

2.3 茶多糖降血糖作用研究

实验结果表明,空白对照组正常血糖值处于比较稳定状态,而模型对照组的血糖值呈逐渐上升状态。14 d 血糖值的比较:茶多糖的三个剂量组、拜糖平组、消渴丸组的血糖值在给药后第 14 天都有不同程度的降低。茶多糖的中、小剂量组的血糖值在第 28 天与第 14 天的血糖值比较都有反弹上升,但都未高于模型对照组的血糖值。试验结果表明茶多糖大剂量组(200 mg·kg⁻¹)对小鼠的降血糖作用最为明显,结果见表 1。

的成熟而提高,本实验结果恰也说明细胞壁是茶多糖溶出的一大障碍,采用酶辅助提取法可极大提高乌龙茶多糖的提取率。本试验未对膜分离后的多糖中蛋白质及其他杂质的残留量进行检测,实属遗憾。

各组造模后的血糖值,与空白对照组相比较全部处于明显的高血糖状态,说明四氧嘧啶造高血糖模型成功,且与空白对照组相比存在显著性差异($P < 0.05$)。由表中可以看出

空白对照组正常血糖值处于比较稳定状态,而模型对照组的血糖值呈逐渐上升状态,糖尿病病情逐渐加重。阳性对照药品拜糖平有效成分为阿卡波糖,是 α -葡萄糖苷酶抑制剂,通过对蔗糖酶、葡萄糖淀粉酶和麦芽糖酶的抑制,降低多糖及蔗糖分解生成葡萄糖,从而延迟来自多糖、低糖及双糖的葡萄糖的吸收,达到降低餐后高血糖和空腹血糖及降低糖化血红蛋白值的作用。消渴丸由葛根、地黄、黄芪、天花粉、玉米须、南五味子、山药、格列本脲组成,主要用于气阴两虚型消渴病。14 d测血糖表明,茶多糖的大、中剂量组、拜糖平组、消渴丸组的血糖值在给药后第14天都有不同程度的降低,小剂量降低不明显,但各组血糖值升高的幅度均小于模型组。第28天血糖值测定表明茶多糖的中、小剂量组、拜糖平组的血糖值在28 d时与第14天的血糖值比较都有反弹上升,但都未高于模型对照组的血糖值,说明上述多糖对糖尿病远期病情有一定的控制作用。茶多糖大剂量组第28天的血糖值较第14天的血糖值有所下降。在茶多糖三个剂量中,大剂量组给药 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的茶多糖对小鼠的降血糖作用最为明显。茶多糖的降糖作用可能与提高肝脏抗氧化能力,增强肝葡萄糖激酶活性,降血脂,抗氧化,抑制糖异生和提高胰岛素敏感性作用等密切相关^[5]。关于茶多糖降糖的

作用机制,还有待进一步深入的研究。

REFERENCES

- [1] CHEN J G. Study on the extraction and pharmacology of the Tea polysaccharides [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2000, 31(7): 6-7.
- [2] XIE M Y *et al.* A review of the research progress on Tea polysaccharide [J]. J Food Sci Biotechnol, 2006, 3(2): 107-109.
- [3] FU B Q, XIE M Y, NIE S P, *et al.* Method simplified in assaying Tea polysaccharide [J]. Food Sci(食品科学), 2001, 22(11): 69-73.
- [4] NI D J, CHEN Y Q, XIE B J, *et al.* Studies on composition, antioxidation and hypoglycemic effects of polysaccharides from Green Tea, Oolong Tea and Black Tea [J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2004, 26(1): 57-60.
- [5] FU J. Progress of application of Tea polysaccharides on diabetic Mice [J]. Amino Acids Biotic Resour(氨基酸和生物资源), 2006, 28(2): 67-69.

收稿日期: 2007-04-03