

孙海红,董国强,蔡葵,等.油茶变态叶中糖类物质的单糖组成与抗氧化活性分析[J].江苏农业科学,2022,50(17):217-221.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.035

# 油茶变态叶中糖类物质的单糖组成与抗氧化活性分析

孙海红<sup>1</sup>,董国强<sup>2</sup>,蔡葵<sup>1</sup>,吕享华<sup>1</sup>,孙永红<sup>1</sup>,薛鲁燕<sup>1</sup>,张瑞巧<sup>1</sup>,王文娇<sup>1</sup>,赵征宇<sup>1</sup>,石大川<sup>1</sup>

(1. 青岛市农业科学研究院,山东青岛 266100; 2. 青岛市农产品质量安全中心,山东青岛 266100)

**摘要:**旨在从油茶(*Camellia oleifera* Able)正常叶片及其被细长叶表生菌[*Exobasidium gracile* (shirai) Syd]寄生后形成的变态叶片茶耳叶片中提取获得水提液及粗多糖,并对其进行一些理化性质、单糖组成和抗氧化活性的测定。采用水提法从油茶叶片中获得油茶叶滤液(CF)和茶耳滤液(TF),通过醇沉法获得油茶粗多糖(CCP)和茶耳粗多糖(TCP)。采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率和超氧阴离子清除率等方法进行理化性质、单糖组成及抗氧化活性的测定等理化性质和结构的分析。结果表明,被细长叶表真菌寄生后的茶耳的抗氧化性明显优于未被寄生的油茶叶,油茶叶多糖主要由甘露糖(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)5种单糖组成,比例为3.0%:5.8%:22.3%:19.7%:16.0%。茶耳多糖主要由甘露糖(Man)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)4种单糖组成,比例为23.8%:20.7%:22.9%:6.7%。

**关键词:**细长叶表生菌;抗氧化活性;油茶

**中图分类号:** S794.401 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)17-0217-05

油茶(*Camellia oleifera* Abel)是山茶花中一种重要的木本食用油料树种,它主要分布于我国的湖南、湖北、江西、广西、浙江和福建等省份,是我国独有的一种食用油料树种,别称楂木,通常为常绿灌木林,有时为小乔木,高度为3~4 m,极少数可达

8 m。油茶树皮呈淡黄褐色,平滑但不裂;小枝微被短柔毛;单叶互生;叶柄长4~7 mm,有毛;叶片多为厚革质,形状为卵状椭圆形或卵形,长度为3.5~9.0 cm,宽度多为1.8~4.2 cm,其顶点相对较钝,基部呈楔形,边缘多呈细锯齿形,上部则呈亮绿色,通常为无毛或中脉有硬毛,下面中脉基部有毛或无毛,其侧脉不明显;花为两性花,1~3朵生于枝顶或叶腋上,直径达到3~5 cm,无梗;通常有5张萼片,形状接近圆形,外表面有被绢毛;花瓣数一般为5~7瓣,花色为白色,花分离,形状为倒卵形至披针形,长度多为2.5~4.5 cm,先端常有凹缺,外表面有

收稿日期:2021-05-17

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31800164);农业农村部农产品质量安全风险评估项目(编号:GJFP2019015)。

作者简介:孙海红(1978—),女,山东潍坊人,博士,高级工程师,主要从事农产品质量安全风险评估方面的研究。E-mail: sunhaihong@hotmail.com。

(Cambridge, England), 2014, 50(15): 1848-1850.

[23] Ansari S A, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 512-523.

[24] Xiong Y, Leng Y K, Li X M, et al. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2020, 126: 115861.

[25] Xie T, Wang A, Huang L, et al. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8.

[26] Liu L, Hao Y Q, Deng D H, et al. Nanomaterials - based colorimetric immunoassays [J]. Nanomaterials, 2019, 9(3): 316.

[27] Zeng K, Wei D L, Zhang Z, et al. Enhanced competitive

immunomagnetic beads assay with Gold Nanoparticles and Carbon Nanotube - Assisted Multiple enzyme probes [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 292: 196-202.

[28] Xu Y, Yang H W, Huang Z B, et al. A peptide/maltose - binding protein fusion protein used to replace the traditional antigen for immunological detection of deoxynivalenol in food and feed [J]. Food Chemistry, 2018, 268: 242-248.

[29] Han L, Li Y T, Jiang J Q, et al. Development of a direct competitive ELISA kit for detecting deoxynivalenol contamination in wheat [J]. Molecules, 2019, 25(1): 50.

[30] Hou S L, Ma J J, Cheng Y Q, et al. Quantum dot nanobead - based fluorescent immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of fumonisin B<sub>1</sub>, deoxynivalenol, and zearalenone in grains [J]. Food Control, 2020, 117: 107331.

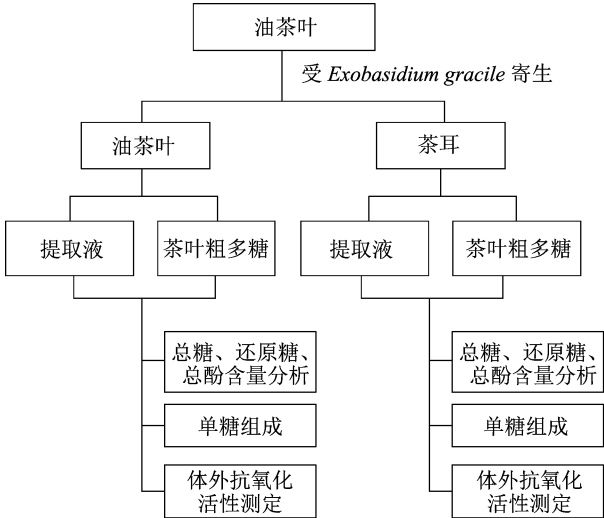
毛;雄蕊更多,无毛外观,外部花丝仅有基部连合;上部子房长有密集白色丝状绒毛,花柱先顶三浅裂;蒴果形状为近球形,直径通常达到 3~5 cm,其果皮较厚,为木质,室背 2~3 裂;种子形状为背圆腹扁形,长度达 2.5 cm;花期为 10、11 月,果期在次年 10 月<sup>[1]</sup>。油茶的栽培历史较为悠久,分布区域很广,栽培面积很大,用途较多,由于其具有收敛止血、解毒之功效,因此常常被用于治疗鼻衄病、皮肤溃烂瘙痒、疮疽等症状<sup>[2]</sup>。此外,油茶具有较强的清除自由基、抗肿瘤、抗炎、降血脂的作用,在食品药品、营养保健、日用化工等领域也具有良好的应用价值。但是,目前油茶叶资源并未得到良好、可循环的利用,特别是在油茶整形修剪、低产油茶林的改造等不当应用下,大量油茶叶常被作为废弃物丢弃,使其功能和使用价值大大降低,极大地浪费了资源。通过大量的研究发现,油茶叶中也含有多种不同的黄酮类化合物,黄酮类化合物常常具有良好的抗油脂氧化性能,并有报道指出,油茶提取物可用于治疗一些无名肿毒病症、犬咬或是火烧成疮等疾病<sup>[3]</sup>。油茶叶茶多糖是一类成分复杂的糖类混合物。此外,油茶多糖功效很多,具有抵抗各种辐射、增加人体内白细胞的数量、提高人体免疫力的作用,还可以降低人体血糖。通过泡饮用油茶制成的粗茶来治糖尿病的尝试和方法较为流行,原因可能是茶多糖发挥了作用。但是茶多糖的抗氧化能力较弱,在受到胞外真菌的寄生后,有关茶耳的理化性质及其糖类成分的研究在我国和世界范围内还有待拓展,因此本研究旨在分析油茶叶可食用真菌在营养成分及体外抗氧化性方面的作用。

1 试验方法

本试验的总流程见图 1。

1.1 油茶和茶耳水提物及多糖的提取

油茶叶产自湖南省株洲市,采集时间为 2018 年 4 月。试验时间为 2018 年 5—6 月,试验地点为青岛农业科学研究院。将油茶叶叶片和茶耳叶片粉碎后按 1 g : 30 mL 的料液比加入蒸馏水,放入恒温水浴锅中于 65 ℃ 提取 2 h,分别抽滤得到油茶叶滤液(CF)、茶耳滤液(TF)。取一部分滤液旋蒸浓缩后按 1 : 4 的体积比加入无水乙醇醇沉,将沉淀物在 4 ℃ 条件下静置过夜,取其沉淀物放置于离心机内并且于 4 000 r/min 离心 15 min,将沉淀物再次溶解于蒸馏水后,用离心机离心以除去水中那些不溶性



Exobasidium gracile 表示细长叶表生菌

图1 试验总流程

杂质,使用流水透析 72 h,将透析后的样品经冷冻干燥后,便可得到油茶粗多糖(CCP)、茶耳多糖(TCP),进而计算粗多糖产率。

1.2 理化形式分析

1.2.1 总糖含量的测定 标准曲线的绘制。首先,在干燥的 100 mL 容量瓶中准确称量 18.80 mg 无水葡萄糖,加水溶解并稀释至刻度处,充分摇匀,然后在 50 mL 容量瓶中准确吸取 10 mL 葡萄糖溶液,加蒸馏水至刻度线标记处,充分摇动,得到 0.037 6 mg/mL 无水葡萄糖标准贮备液。分别精确量取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 mL 葡萄糖参比溶液(浓度)于干燥的试管中,每管补加蒸馏水至 0.5 mL。每管再加入 300 μL 6% 苯酚溶液,充分摇匀后再次加入 1.5 mL 浓硫酸溶液(浓度),振荡摇匀后在沸水浴中充分反应 15 min,再取出混合物,并置于冰浴中冷却至室温,通过测定推导出回归方程<sup>[4]</sup>。

样品的测定:将多种样品配制成 5 mg/mL 水溶液备用,再精确移取 0.2 mL 水溶液,按上述操作分别测量样品,并根据标准曲线计算总糖含量。

1.2.2 还原糖含量的分析 将各种样品制备成质量浓度为 5 mg/mL 的水溶液,分别精确移取 1.0 mL 水溶液转移到 25 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容。然后精确移取 2.5 mL 稀释后的供试样品溶液至容量瓶中,准确加入 2.5 mL DNS 试剂,充分混匀,沸水浴加热 5 min 后,用冷流水冷却,将体积调节至标记线处(25 mL),以去离子水作为空白对照组,测量其在 540 nm 处的吸光度。以葡萄糖作为标准品,根据

标准曲线计算出其还原糖含量<sup>[5]</sup>。

1.2.3 总酚含量的分析 精确量取 5 mL 各种供试品溶液于干燥试管中,再加入 5 mL 福林酚试剂,摇匀后在室温下放置 3 min。再次加入 5 mL 10% 碳酸钠溶液,充分摇匀后在室温下显示 1 h(使用相应试剂作为空白对照),用紫外-可见分光光度法在 700 nm 处测量吸光度。以 50  $\mu\text{g/mL}$  没食子酸溶液作为标准溶液,并根据其标准曲线计算出其总酚含量<sup>[6]</sup>。

### 1.3 单糖组分分析

由于在测定单糖组成前首先需要将多糖降解为单糖后才能测定,因此试验前准确称取 5 mg 已经分离纯化的油茶叶滤液、油茶叶粗多糖、茶耳滤液、茶耳粗多糖样品,分别置于不同安瓿瓶中,加入 1 mL 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA)溶液,使用乙醇喷灯封闭瓶口,将密封的安瓿瓶放到温度为 110  $^{\circ}\text{C}$  的烘箱内进行水解反应(反应 8 h 使反应完全)。等待水解反应完全后,将样品用甲醇溶液(浓度 100%)溶解并转移到不同鸡心瓶内,用甲醇溶液旋蒸多次,直至除去所有样品中的 TFA,并转移至 EP 管中供以后使用,最后放置于 40  $^{\circ}\text{C}$  烘箱内烘干。

标准溶液的制备。分别准确称取干燥的甘露糖(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、葡萄糖(Glc)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)和岩藻糖(Fuc)的单糖标准品,用蒸馏水配制成 1.0 mg/mL 的标准溶液。然后采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法<sup>[7]</sup>对各种单糖标准品和油茶叶滤液、油茶叶粗多糖、茶耳滤液、茶耳多糖水解产物进行衍生化,然后进行高效液相色谱分析。

试验条件:色谱柱为 KP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH 值 = 6.7) - 乙腈(体积比 = 82 : 18);流速为 1 mL/min;柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量为 20  $\mu\text{L}$ ;检测器为紫外检测器;检测波长为 254 nm。

### 1.4 体外抗氧化能力的测定

DPPH 自由基清除率的测定。将油茶叶多糖和茶耳多糖分别配制成浓度为 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的水溶液。将油茶叶多糖(HE)、茶耳多糖(IE)水提液分别配制成 0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/mL 水溶液,然后吸取 250  $\mu\text{L}$  0.02% DPPH - 甲醇

(DPPH 为 1,1-二苯基-2-硝基苯肼)溶液加到 1 mL 样品水溶液中。在室温下避光放置 30 min 后,以维生素 C 作为阳性对照,在 517 nm 处测量其混合物的吸光度。DPPH 自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{D_{517 \text{ nm}(o)} - D_{517 \text{ nm}(i)}}{D_{517 \text{ nm}(o)}} \times 100\%$$

式中: $D_{517 \text{ nm}(i)}$  为样品的吸光度; $D_{517 \text{ nm}(o)}$  为空白样品的吸光度。

羟基自由基清除率的测定。将多糖分别配制成质量浓度为 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的水溶液。将水提液 HE、IE 分别配制成质量浓度为 0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/mL 的水溶液,吸取 1 mL 9 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液和 1 mL 9 mmol/L 水杨酸-甲醇溶液加入 1 mL 样品水溶液中。混合后,向混合物中加入 1 mL 9 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液。在 37  $^{\circ}\text{C}$  避光 30 min 后,以维生素 C 作为阳性对照,在 517 nm 处测量混合物的吸光度。其对羟基自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{羟基自由基清除率} = \frac{D_{517 \text{ nm}(o)} - D_{517 \text{ nm}(i)}}{D_{517 \text{ nm}(o)}} \times 100\%$$

式中: $D_{517 \text{ nm}(i)}$  为样品的吸光度; $D_{517 \text{ nm}(o)}$  为空白样品的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 油茶、茶耳水提物及多糖的提取

本试验提取的油茶、茶耳水提物的颜色均为红棕色,醇沉后的多糖为褐色粉末,油茶叶多糖的产率为 16.9%,茶耳多糖的产率为 10.24%,多糖的理化性质分析结果见表 1。通过分析健康油茶叶、被 *Exobasidium gracile* (shirai) Syd 真菌寄生后油茶叶茶耳中多糖相关成分的性质发现,被感染叶片茶耳的总糖含量高于健康叶片,还原糖含量也显著增加。由试验结果可以看出,真菌的寄生可以促进一些糖类物质的转化,使被真菌寄生的叶片的含糖量比健康叶片高。通过比较总酚含量发现,真菌的寄生可以提高叶片中的酚类物质含量。

表 1 油茶、茶耳水提物及其各多糖成分含量 %

类别	总糖含量	总酚含量	还原糖含量
油茶叶多糖	31.4	22.9	5.1
茶耳多糖	45.0	26.9	27.8

### 2.2 油茶和茶耳水提物及多糖的单糖组成分析

分析图 2 至图 6 可知,油茶叶多糖由甘露糖

(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)5种单糖组成,由其相对峰面积比可以看出,5种单糖的含量比例为2.96:5.83:22.28:19.71:15.99。分析图3、图6可知,油茶叶水提液由甘露糖(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)5种单糖组成,由其相对峰面积比可以看出,5种单糖的含量比例为0.85:9.80:71.86:4.10:3.63。分析图4、图6可知,茶耳多糖由甘露糖(Man)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)4种单糖组成,由其相对峰面积比可以看出,4种单糖的含量比例为23.81:20.71:22.88:6.74。分析图5、图6可以看出,茶耳水提液由甘露糖(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)5种单糖组成,由其相对峰面积比可以看出,5种单糖的含量比例为5.54:3.80:63.73:6.83:3.25<sup>[8-9]</sup>。

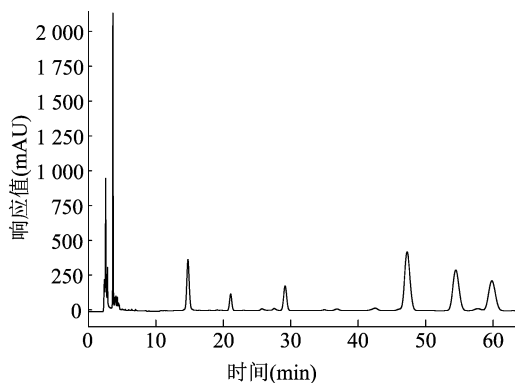


图2 油茶叶多糖 PMP 柱前衍生高效液相色谱结果

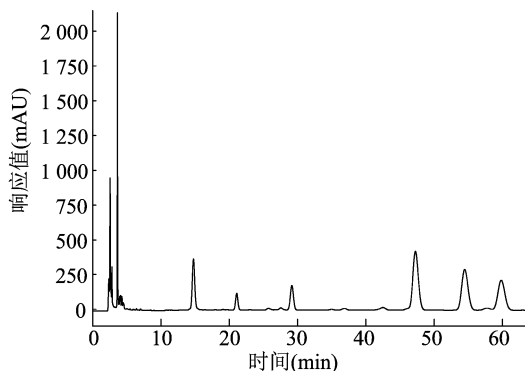


图3 油茶叶水提液 PMP 柱前衍生高效液相色谱结果

通过比较茶耳多糖和油茶叶粗多糖的单糖组分发现,茶耳多糖的甘露糖含量明显高于油茶叶多糖,并且茶耳多糖组分中没有油茶叶多糖的氨基葡萄糖成分<sup>[10]</sup>。

### 2.3 油茶和茶耳水提物及多糖的抗氧化活性

由图7至图10可以看出,油茶叶、茶耳水提取

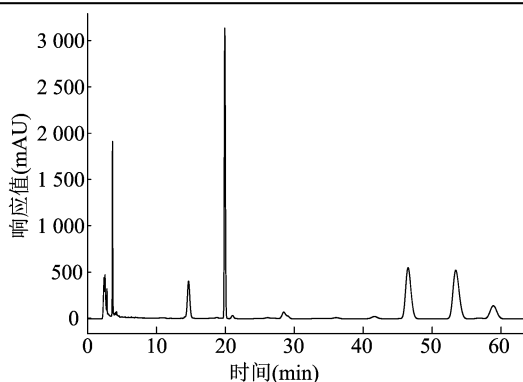


图4 茶耳多糖 PMP 柱前衍生高效液相色谱结果

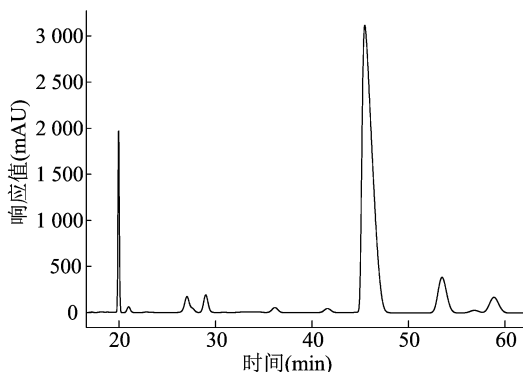


图5 茶耳水提液 PMP 柱前衍生高效液相色谱结果

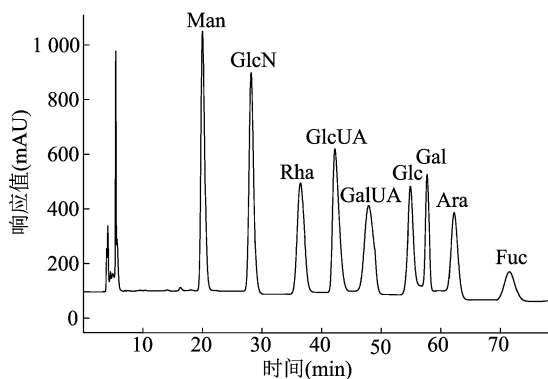


图6 单糖标准品分析

物具有良好的抗氧化活性。本研究分析了油茶叶、茶耳、油茶叶水提液和茶耳水提液对 DPPH 自由基的清除活性,并将其与阳性对照抗坏血酸进行了比较。由结果可知,茶叶水提液、茶耳水提液对 DPPH 自由基的清除效果都明显优于多糖。茶叶提取物、茶耳提取物清除 DPPH 自由基的  $EC_{50}$  分别为 0.07、0.03 mg/mL (图 8)。水提取物具有良好的抗氧化活性,可能与其内部酚类物质含量丰富有关。茶耳粗多糖、油茶叶粗多糖清除 DPPH 自由基的  $EC_{50}$  分别为 4.7、3.4 mg/mL (图 7)。通过图 9、图 10 比较茶叶水提液和茶耳水提液对羟自由基的清除活性,并与油茶叶多糖和茶耳多糖进行了比较。由结果

可知,油茶叶多糖、茶耳多糖具有弱的羟自由基清除作用。研究结果表明,真菌的寄生会提升叶片提取物的体外抗氧化能力。

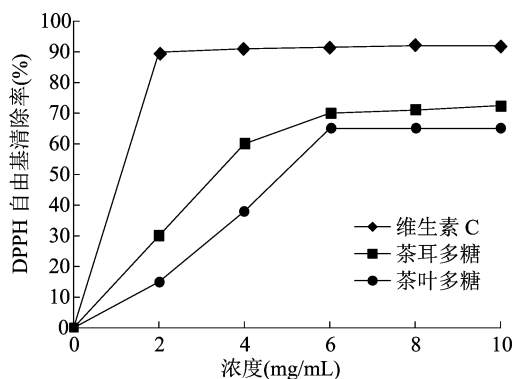


图7 茶耳多糖、油茶叶粗多糖对 DPPH 自由基的清除效果

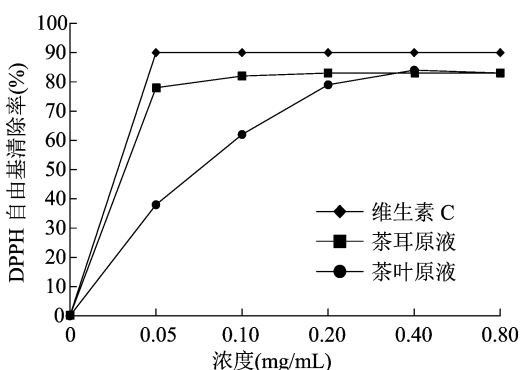


图8 茶耳原液、油茶叶原液对 DPPH 自由基的清除效果

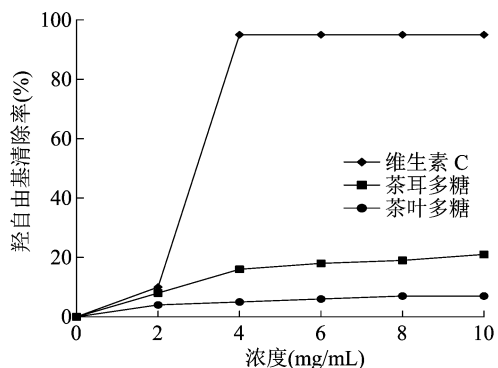


图9 油茶叶粗多糖、茶耳粗多糖对羟自由基的清除效果

### 3 结论

本试验从油茶叶和茶耳中提取水提物与活性多糖,分析其单糖组成及化学性质。结果表明,真菌寄生后茶叶中的总糖、还原糖和总酚含量均有增加。本研究结果表明,真菌可以将油茶叶片中的一

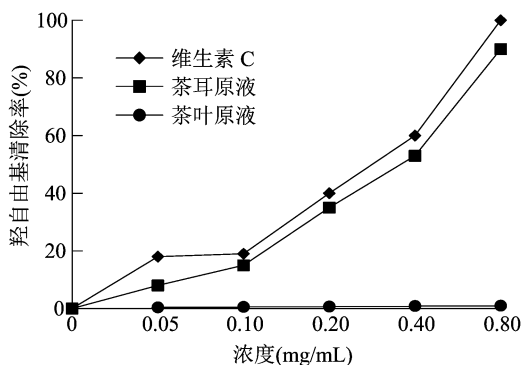


图10 茶耳原液、油茶叶原液对羟自由基的清除效果

些营养物质转化为糖类、酚类物质。将茶叶水提液和茶耳水提液、茶叶多糖和茶耳多糖的体外抗氧化能力进行比较发现,真菌寄生后可以使叶片提取物的抗氧化能力显著增强,可以为市场上油茶叶真菌污染问题提供一些解决方法,同时可对一些真菌污染后的油茶叶进行处理以开发一些茶饮料,减少经济损失。

### 参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:3-562.
- [2] 尹卫平. 伏牛山药用植物志:第5卷(上册)[M]. 北京:科学出版社,2013:354-355.
- [3] 李姣娟,黄克瀛,龚建良,等. 油茶叶乙醇提取物清除 DPPH 自由基作用的研究[J]. 林产化学与工业,2008,28(2):82-86.
- [4] 郭雷,吕明生,王淑军. 苯酚-硫酸法测定樱桃酒中总糖[J]. 食品研究与开发,2010,31(6):130-132.
- [5] 宝萍萍,图力古尔,包海鹰. 栽培灵芝不同生长阶段多糖和三萜类化合物的含量测定[J]. 菌物研究,2011,9(2):110-113,118.
- [6] 吕露阳,刘圆,张志锋,等. 十七种不同品种的酸甜石榴皮及叶中总酚的测定[J]. 时珍国医国药,2015,26(2):299-300.
- [7] 戴军,朱松,汤坚,等. PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报,2007,26(2):206-210.
- [8] 方东军,赵润琴,张晓娟. 茯苓多糖的总糖含量及糖醛酸含量测定[J]. 中医药信息,2011,28(4):42-44.
- [9] 杨贤庆,赵永强,戚勃,等. 离子色谱法与硫酸钡比浊法测定琼胶糖中硫酸基含量的比较研究[J]. 食品科学,2009,30(18):340-343.
- [10] Dong Z, Liu W, Zhou D J, et al. Bioactive exopolysaccharides reveal *Camellia oleifera* infected by the fungus *Exobasidium gracile* could have a functional use[J]. Molecules,2019,24(11):2048-2054.