

茶树可溶性糖含量的 HPLC-ELSD 检测 及其与茶树抗寒性的相关分析

葛菁, 庞磊, 李叶云, 江昌俊*

(安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 建立了茶树叶片中可溶性糖的高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)的测定方法。以 Agilent Zorbax carbohydrate 柱为分离柱, 流动相为乙腈-水(75:25, V/V), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 上样量 10 μL。蒸发光散射检测器漂移管温度 85℃, 雾化器温度 36℃。通过该方法测定越冬期间皖茶 91、乌牛早、平阳特早和龙井 43 叶片中果糖、葡萄糖和蔗糖的含量变化。结果表明, 越冬期间 3 种可溶性糖含量的变化幅度一致: 皖茶 91 > 龙井 43 > 平阳特早 > 乌牛早。在茶树叶片中的含量均随着气温的降低呈现增长趋势, 且具有较好的规律性。蔗糖作为茶树叶片中可溶性糖的主要成分, 用 HPLC-ELSD 法可以方便、快速、准确的检测出来。因此低温胁迫下通过 HPLC-ELSD 法测定茶树叶片中蔗糖含量的变化, 可作为鉴定茶树品种抗寒性的一种新方法。

关键词: 茶树; 高效液相色谱; 可溶性糖; 越冬期; 抗寒性

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)03-0470-04

Determination of soluble sugar in tea plant by HPLC-ELSD and its relationship with freezing resistance

GE Jing, PANG Lei, LI Ye-yun, JIANG Chang-jun

(Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: A HPLC-ELSD method for quantification analysis of the soluble sugar in the leaves of tea plant (*Camellia sinensis*) was developed under the following chromatographic condition: column, Agilent Zorbax carbohydrate, 4.6×250 mm, 10 μm; mobile phase, acetonitrile-water (75:25, V/V); flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 30℃; sampling volume, 10 μL. The temperature of drift tube was 85℃, and the nebulizer temperature was 36℃. The contents of fructose, glucose and sucrose in the leaves of four tea tree species during overwintering periods were determined with this method. The results show that the change ranges of three soluble sugars are all in the order of *Wancha91* > *Longjing43* > *Pingyangtezao* > *Wuniuzao*. The soluble sugar content in the tea leaves has a regular increasing trend with decline of temperature. As the main ingredient of the soluble sugar, sucrose could be detected rapidly, simply and accurately by HPLC-ELSD. It's a new way to determine the freezing resistance of tea plant.

Key words: *Camellia sinensis*; high performance liquid chromatography (HPLC); soluble sugar; wintering period; freezing resistance

茶树是一种原产于热带的喜温暖植物。随着茶叶产业的发展, 其种植区域开始向北扩增, 在长期对低温胁迫的适应过程中, 通过自然选择茶树逐渐发展和形成了对抗低温胁迫的抗寒性^[1-2]。在低温逆

境中, 茶树体内发生一系列生理生化变化。低温逆境中, 茶树体内碳水化合物的代谢为提高细胞内糖分含量起重要作用。可溶性糖中主要有果糖、葡萄糖、蔗糖等, 作为渗透因子增加组织中非结冰水。

收稿日期: 2012-10-18

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划课题(2011BAD01B01)资助。

作者简介: 葛菁, 女, 硕士研究生。

* 通信作者: 江昌俊, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: jiangcj@ahau.edu.cn

朱政等^[3]研究表明, 随着低温胁迫时间的延长, 茶树叶片可溶性糖含量一直呈现上升的趋势。原田等^[1]研究表明, 可溶性糖含量与抗寒性存在平行现象, 抗寒性强的品种, 可溶性糖含量高。可见, 茶树体内可溶性糖的变化与其抗寒性有一定关系。目前, 关于茶树叶片可溶性糖的研究多采用蒽酮法^[4], 利用糖的还原性进行测定, 操作过程繁复且得到的结果是总糖含量。目前在茶树中通过高效液相色谱测定蔗糖含量的研究还少见报道。作者通过 HPLC-ELSD 法研究了皖茶 91、乌牛早、龙井 43 和平阳特早 4 种茶树叶片内的果糖、葡萄糖和蔗糖含量变化, 以及低温逆境下茶树叶片可溶性糖含量变化与抗寒性的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料选取自安徽农业大学大杨店农业园内的同龄无性系的茶树品种 4 个: 皖茶 91 (*Camellia sinensis* cv. "Wancha91"), 乌牛早(*Camellia sinensis* cv. "Wuniuzao"), 平阳特早 (*Camellia sinensis* cv. "Pingyangtezao") 和龙井 43 (*Camellia sinensis* cv. "Longjing43")。从 2011 年 9 月开始, 每月对 1 年生枝条上的 3、4 叶进行采样至次年 3 月。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 高效液相色谱泵 Waters600, 蒸发光散射检测器 Waters2424, Agilent 碳水化合物分析

柱 (4.6×250 mm), 配有保护柱, 柱温 30℃, 进样量 10 μL, 流动相为乙腈:水(3:1), 流速 1 mL·min⁻¹。ELSD 检测器参数: 高纯氮气作为载气, 气压 35 psi。漂移管温度为 85℃, 雾化器温度 36℃。

1.2.2 标准曲线的制作 精确称取 200 mg 的果糖、葡萄糖、蔗糖和棉子糖标准品, 加入到 10 mL 的容量瓶中, 用超纯水定容, 得到浓度为 mg·mL⁻¹ 的混合标准液。之后分别稀释成 0.5、1.0、2.0、8.0 和 10.0 mg·mL⁻¹ 系列标准溶液, 在相同条件下分别进样, 以混合标准液的浓度为 x 值, 以测得的峰面积为 y 值进行线性回归, 得到标准曲线方程 $y=ax+b$, a 、 b 为常数。

1.2.3 样品的处理 叶片经微波杀青 2 min 后, 至于 80℃ 的烘箱中烘 6 h 至恒重后磨成粉末状。称取 0.5 g 样品粉末, 加入 10 mL 纯水, 于 90℃ 水浴锅中浸提 1 h。将浸提液转入离心管中 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液并定容至 10 mL, 得到样品提取液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤待 HPLC 分析。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

精密配制不同质量浓度系列果糖、葡萄糖、蔗糖标准溶液进行分析, 进样体积 10 μL, 以测得的峰面积值为纵坐标 (y), 相应糖的浓度为横坐标 (x) 进行线性回归, 得到曲线方程。结果表明, 峰面积与进样浓度具有良好的线性关系 (见表 1)。

表 1 线性方程、相关系数及线性回归方程

Table 1 Linearity range, correlation coefficient and linear regression equation

	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围/μg Linearity range
果糖 Fructose	$y=(1E+06)x - 650\ 755$	0.996 1	2.5~100
葡萄糖 Glucose	$y=(1E+06)x - 674\ 119$	0.995 4	2.5~100
蔗糖 Sugar	$y=(1E+06)x - 855\ 997$	0.994 3	2.5~100

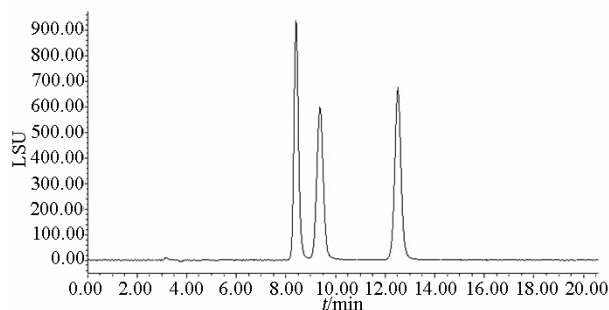


图 1 混合对照品溶液的高效液相色谱图

Figure 1 Liquid chromatogram of mixed reference substance solution

在上述色谱条件下, 混合标准品分离良好, 果糖、葡萄糖及蔗糖的保留时间为 8.27 min、9.32min 和 12.60 min, 标准品色谱图见图 1。

2.2 合肥地区越冬期间温度变化

从 2011 年 9 月至次年 3 月, 合肥地区的月平均气温分别为 23.1℃、18.1℃、14.1℃、5.8℃、3.1℃、3.5℃和 9.6℃。其中, 在最寒冷的 1 月中旬至 2 月上中旬期间, 合肥地区总体气温较往年偏低, 降水量偏多。由图 2 的温度变化趋势可以看出, 温度从 3 月开始显著回升。

2.3 茶树可溶性糖含量的动态变化

2.3.1 果糖含量的变化 如图 3 所示, 茶树叶片中

果糖含量变化为:皖茶91从 $1.07\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $10.42\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约8.74倍;乌牛早从 $2.57\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $6.77\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约1.63倍;龙井43从 $1.22\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $9.08\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约6.44倍;平阳特早从 $2.76\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $8.10\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约1.93倍。随着温度的持续降低,皖茶91的叶片中果糖含量变化幅度远高于其他3种茶树。乌牛早和平阳特早的果糖含量增加倍数则相对较低,龙井43的果糖增长幅度较这2个品种稍高。随着2、3月份气温的逐步回升,4个茶树品种叶片中果糖含量均呈现显著下降的趋势。

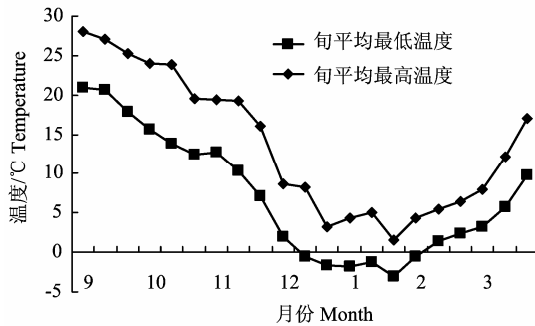


图2 越冬期间最高温度和最低温度变化情况

Figure 2 Changes of the highest and lowest temperatures during overwintering period

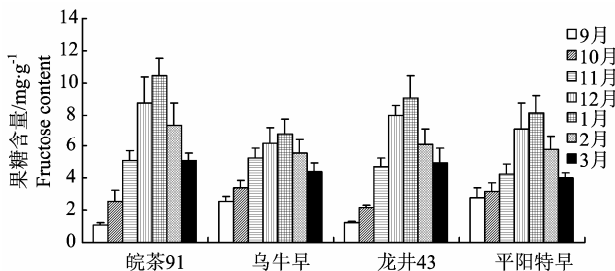


图3 越冬期间茶树体内果糖含量的变化

Figure 3 Changes of the fructose content in tea plants during overwintering period

2.3.2 葡萄糖含量的变化 如图4所示,茶树嫩叶的葡萄糖含量变化为:皖茶91从 $2.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $12.53\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约3.38倍;乌牛早从 $3.51\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $9.48\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约1.70倍;龙井43从 $2.76\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $10.7\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约2.91倍;平阳特早从 $3.16\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $9.75\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约2.09倍。随着温度的持续降低,4种茶树的叶片中葡萄糖含量变化幅度规律一致,由大到小排列为皖茶91>龙井43>平阳特早>乌牛早。随着2、3月份气温的逐步回升,4个茶树品种体内葡萄糖含量

均出现明显下降。

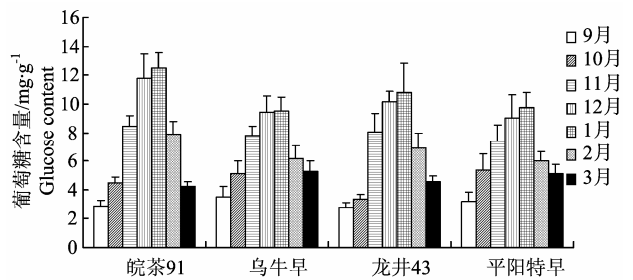


图4 越冬期间茶树体内葡萄糖含量的变化

Figure 4 Changes of the glucose content in tea plants during overwintering period

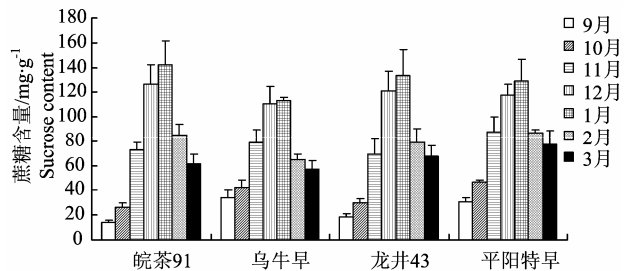


图5 越冬期间茶树体内蔗糖含量的变化

Figure 5 Changes of the sucrose content in tea plants during overwintering period

2.3.3 蔗糖含量的变化 如图5所示,茶树嫩叶的蔗糖含量变化为:皖茶91从 $14.13\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $142.67\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约9.10倍;乌牛早从 $34.54\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $113.15\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约2.26倍;龙井43从 $18.25\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $133.23\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约6.30倍;平阳特早从 $30.71\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $129.45\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,增加了约3.22倍。随着温度的持续降低,其中皖茶91的叶片中蔗糖含量增长幅度远高于乌牛早和平阳特早。龙井43的蔗糖含量增加幅度则介于皖茶91和其他2个品种之间。随着春季来临,气温逐步回升,不同品种茶树的叶片和嫩根中蔗糖含量均呈现显著下降的趋势。

3 讨论

高效液相色谱法测定糖含量的方法准确、可靠,而蒸发光散射检测器(ELSD)稳定性好,近年来被广泛用于多种糖分的检测分析^[5-9]。本试验通过HPLC-ELSD法建立了对越冬期间茶树体内3种可溶性糖成分的变化分析的方法。果糖、葡萄糖及蔗糖在不同茶树品种叶片中的含量均随着气温的降低呈现增长趋势,且具有较好的规律性。在茶树叶片可溶性糖中,果糖、葡萄糖含量均较低,蔗糖的含

量占有较大的比重。从 2011 年 9 月到次年 1 月, 4 种茶树叶片中的蔗糖含量分别增加了约 9.10 倍、2.26 倍、6.30 倍以及 3.22 倍, 将其按大小排列为: 皖茶 91>龙井 43>平阳特早>乌牛早, 且在最寒冷的 1 月时测得的蔗糖含量由大至小的排列顺序为皖茶 91>龙井 43>平阳特早>乌牛早。综合张翠玲^[10]等对青岛地区 11 种茶树以及庞磊^[11]等对合肥大杨店农业园内 3 种茶树的抗寒性评价可知, 本试验中所选的 4 种茶树抗寒性排序为: 皖茶 91>龙井 43>平阳特早>乌牛早。

蔗糖在茶树抵御低温胁迫中起重要作用, 随着温度的逐渐降低, 茶树体内的蔗糖含量相应随之上升, 抗寒性越强的品种在低温逆境中增加幅度越大。因此, 作者认为可以通过 HPLC-ELSD 法测定茶树体内蔗糖的变化, 快速准确鉴定不同茶树品种抗寒性。

参考文献:

- [1] 粟本文. 茶树抗寒性研究概况[J]. 茶叶科学简报, 1991, (4): 27-29.
- [2] 骆颖颖, 梁月荣. 茶树抗寒性的间接鉴定[J]. 茶叶科学技术, 1998(3): 1-7.
- [3] 朱政, 蒋家月, 江昌俊, 等. 低温胁迫对茶树叶片 SOD、可溶性蛋白和可溶性糖含量的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(1): 24-26.
- [4] 李合生. 植物生理生化实验原理及技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [5] 蔡欣欣, 张秀尧. 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(06): 968-969.
- [6] 杨俊, 刘江生, 蔡继宝, 等. 高效液相色谱一蒸发光散射检测法测定烟草中的水溶性糖[J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1596-1598.
- [7] 闫正, 张玉, 李盈晨, 等. HPLC-ELSD 法同时测定乳制品中 5 种水溶性糖的含量[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2011, 31(01): 52-55.
- [8] 王艳颖, 胡文忠, 庞坤, 等. 高效液相色谱蒸发光散射法测定苹果中可溶性糖的含量[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(6): 129-131.
- [9] 辛秀兰, 李小萍, 马越, 等. HPLC-ELSD 法测定红树莓果实中水溶性糖含量[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 624-627.
- [10] 张翠玲, 侯君舍, 王芝云. 青岛地区茶树无性系品种抗寒性比较试验[J]. 山东林业科技, 2008, 2: 30-31.
- [11] 庞磊, 周小生, 李叶云, 等. 应用叶绿素荧光法鉴定茶树品种抗寒性的研究[J]. 茶叶科学, 2011, 31(5): 259-262.