

王 睿,赵 欣. 虫茶香气成分分析和体外功能性效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):327-329.

虫茶香气成分分析和体外功能性效果

王 睿,赵 欣

(重庆第二师范学院生物与化学工程系,重庆 400067)

摘要:通过气质联用(GC-MS)分析、清除 DPPH 自由基试验、抗突变试验、AGS 及 HT-29 癌细胞增殖抑制试验,明确虫茶的香气成分及其体外功效。结果发现,虫茶香气成分主要包括 11 种,这些成分具有体外抗氧化、抗突变、抗癌效果。

关键词:虫茶;香气成分;功效;抑制率

中图分类号:TS275.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)07-0327-03

虫茶是一种特殊的保健茶,它不属于普通茶的范畴,是以昆虫食用叶片后经过其体内作用生产出来的特殊茶饮料^[1]。目前,用来生产虫茶的昆虫有夜蛾科弓须亥夜蛾、雪夜夜蛾、螟蛾科米缟螟、白条谷螟,这些昆虫的幼虫取食苦藤茶、虫茶、化香树、大百解、三叶海棠等植物叶片后,排出颗粒,将其收集后经过一系列加工的产品即为虫茶产品^[1]。虫茶作为传统饮品和中药,具有清热、去暑、解毒、健胃、助消化等功效,对腹泻、鼻衄、牙龈出血、痔出血均有较好疗效,是一种很好的医药保健饮料^[2]。传统饮茶方式是用热水冲泡茶叶,大量挥发性成分在冲泡过程中散失,泡茶过程中的香气就是这些挥发性物质产生的。近年来,关于茶叶香气成分的研究已经陆续开展^[3],虫茶香气成分及其作用有待于研究。本研究通过气质联用(GC-MS)法对贵州省产虫茶的香气成分进行了分析,并对这些香气成分物质进行了体外的抗氧化、抗突变、抗癌试验,以期推广虫茶提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试虫茶为市售、原产于贵州省的虫茶。

试剂:无水乙醚(色谱纯)、癸酸乙酯(色谱纯)、无水硫酸钠(分析纯),上海士瑞化工实业有限公司生产;NaH₂PO₄·2H₂O、FeCl₃、三氯乙酸,广州化学试剂厂生产;2-硫代巴比妥酸,国药集团化学试剂有限公司生产;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、维生素 C、D-biotin、L-histidineHCl(monohydrate)、D-glucose-6-phosphate、NADP,美国 Sigma 公司生产;DMSO,日本纯正化学株式会社生产;RPMI 1640 培养液、FBS、trypsin、EDTA、100 U/mL Penicillin-Streptomycin,美国 Gibco 公司生产。

致突变物:N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG),美国 Aldrich 公司生产。标准菌株:TA100 营养缺陷型鼠伤寒沙氏

菌,美国 Sigma 公司生产。癌细胞:AGS 胃癌细胞株、HT-29 结肠癌细胞株,韩国细胞株银行生产。

1.2 主要仪器和设备

LS-B75L 型高压蒸气灭菌锅,江阴滨江医疗设备有限公司;WPL-30 型恒温培养箱,江东精密仪器有限公司;同时蒸馏萃取(SDE)装置,安徽省天长市华玻实验仪器厂;UV-1750 型紫外分光光度计,日本岛津公司;Agilent 7890/5975 GC-MS(配置电子轰击源),美国安捷伦公司;VS-15CFN 型冷冻离心机,韩国 Vision 科学株式会社;MC096 型二氧化碳培养箱,日本三洋电机株式会社;Elx800 型酶标仪,美国 Bio Tek instruments 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 虫茶香气物质的提取 通过 SDE 法对虫茶香气物质进行提取。将虫茶样品打碎,称取 50 g 于 SDE 装置的 2 L 圆底烧瓶中,加入煮沸的蒸馏水 1 L,同时加入 10 g/mL 癸酸乙酯 0.5 mL 以及少许玻璃珠,用 50 mL 重蒸乙醚萃取。对电热套加热,微沸下提取 20 min。向乙醚萃取液中加入无水硫酸钠除去水分。4 ℃静置 1 d 后用 N₂ 浓缩提取液至 0.2 mL,重复该过程 5 次,将 5 次收集到的提取液合并,冷冻干燥后加入 DMSO 备用^[4]。

1.3.2 GC-MS 法测定虫茶成分和含量 GC 分析条件:HP-5 MS 柱,30 m × 0.25 mm × 0.25 μm;进样口温度 250 ℃;载气为高纯 He,恒流模式,流速为 1 mL/min;初始温度 50 ℃,保留 1 min,10 ℃/min 升至 220 ℃,保持 1 min,5 ℃/min 升至 280 ℃,保持 4 min,50 ℃/min 升至 300 ℃,保持 2 min。进样量 1 mL,进样方式为不分流。EI-MS 分析条件:离子源温度 280 ℃;电离能量 70 eV;溶剂延迟时间 4 min;电子轰击电离源(EI)。将得到的质谱数据对照标准谱库对虫茶香气成分进行确认。并用各香气组分的峰面积占总峰面积的比值表示各组分的相对含量。

1.3.3 羟基自由基清除能力测定 将 6 mol/L 脱氧核糖溶液 0.2 mL、pH 值 7.4 的磷酸钠缓冲溶液 0.2 mL、400 mmol/L FeCl₃ 溶液 0.2 mL、400 mmol/L FeSO₄-EDTA 溶液 0.2 mL、3 mol/L H₂O₂ 溶液 0.2 mL、400 mmol/L 维生素 C 溶液 0.2 mL、0.2 mL 虫茶香气物质溶液混合,在 37 ℃水浴中放置 1 h,再加入 1 mL 三氯乙酸、1 mL 2-硫代巴比妥酸,将混合溶液在 90 ℃水浴中煮沸 20~25 min 后在 532 nm 波长处测定

收稿日期:2013-10-14

作者简介:王 睿(1982—),男,重庆人,硕士,讲师,研究方向为功能性食品的保健效果。Tel:(023)65628256;E-mail:foods@live.cn。
通信作者:赵 欣,博士,教授,研究方向为功能性食品的保健效果。Tel:(023)64099815;E-mail:zhaoxin@zhaoxin.org。

吸光度,计算清除自由基能力^[5]。

1.3.4 DPPH 自由基清除能力测定 将不同浓度虫茶香气物质 100 μL 和 0.15 mmol/L DPPH 试剂 60 μL 混匀后,加入 96 孔板中室温下避光放置 30 min,再在 540 nm 波长下测定吸光度。按下式计算清除 DPPH 自由基能力^[6]:

$$\text{清除 DPPH 自由基能力} = \frac{(\text{对照值} - \text{对照空白值}) - (\text{样品值} - \text{样品空白值})}{\text{对照值} - \text{对照空白值}} \times 100\%。$$

式中:对照为没有加入样品孔,空白为加入样品但没有加入 DPPH 试剂孔。

1.3.5 Ames 抗突变试验 虫茶香气物质提取物设 2 个试验剂量组(1.25、2.5 mg/皿)、自发回变组、对照组,每组设 3 个平行皿。向灭菌试管中加入磷酸盐缓冲液、培养 12 h 后的 10 亿~20 亿个/mL 的菌株 0.1 mL、样品物质提取物溶液 50 μL 、致突变物(MNNG)50 μL ,轻微振荡后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min,加入顶层培养基 2 mL 混合,再倒在底层培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,进行平板计数。按下式计算抑制率^[7]:

$$\text{抑制率} = [(\text{对照组菌落数} - \text{样品处理组菌落数}) / (\text{对照组菌落数} - \text{自发回变组菌落数})] \times 100\%。$$

1.3.6 MMT 法测定虫茶香气物质提取物的体外癌细胞增殖抑制效果 将 AGS 胃癌细胞和 HT-29 结肠癌细胞复苏后接种在含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中,将癌细胞置于培养箱中以 5% 的 CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养,每周更换培养液 2~3 次并进行传代培养 1 次。按 200 μL /孔将含癌细胞的培养液接种于 96 孔培养板中,培养液的癌细胞浓度为 1 万个/mL,然后将 96 孔培养板放入培养箱中继续培养 1 d,吸出 96 孔板中的培养液,加入虫茶香气物质提取物的培养液

200 μL 。再经过 2 d 培养后,再次吸出各孔内上清液,再向各孔加入 5 g/L MTT 试剂 200 μL 后继续培养 4 h,吸出各孔内的上清液,在每孔中加入 200 μL DMSO 后避光振荡 30 min,用酶标仪在 540 nm 波长下测定各孔吸光度,按下式计算细胞增殖抑制率^[8]:

$$\text{抑制率} = [(\text{空白孔吸光度值} - \text{样品孔吸光度值}) / \text{空白孔吸光度值}] \times 100\%。$$

1.4 数据统计

试验数据均以“平均值 \pm 标准差”表示,各数据间差异显著性比较采用 SAS 软件进行统计学检验。

2 结果与分析

2.1 虫茶香气成分的分析

通过 GC-MS 法分析(图 1)可知,虫茶香气物质中主要含有 5-乙基-2-oxa-1,3,4,5a,10-pentaazacyclopenta-[a]芴(5.837 min)、癸烷(6.043 min)、(9-oxo-9,10-dihydroacridin-4-yl)乙酸(6.532 min)、7-氯-4-甲氧基-3-甲基喹啉(7.342 min)、1-(3-氢氧化-4-甲基)-1,3,3,6-四甲基-5-茛满醇(9.826 min)、丙烯酮(11.454 min)、4-氨基苯乙烯酸(12.891 min)、草酰胺(12.906 min)、缩水甘油(13.960 min)、2-乙酰基-1,3,3,4,4-五甲基环戊烯缩氨基脲(16.987 min)、棕榈酸(18.400 min)这 11 种化合物在虫茶中的含量分别为 1.353%、9.242%、7.733%、2.280%、1.189%、2.508%、2.981%、0.448%、0.533%、1.901%、1.566%。

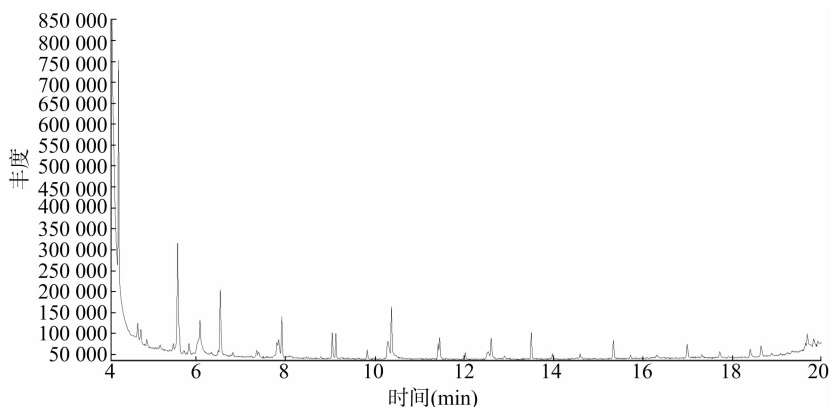


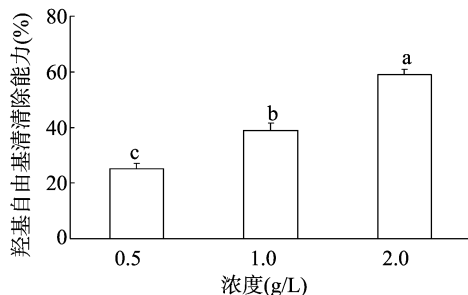
图1 虫茶香气物质的色谱图

2.2 虫茶香气成分的抗氧化效果

通过测定虫茶挥发性物质提取物的羟基自由基、DPPH 自由基清除能力可以判断虫茶香气物质的抗氧化效果。由图 2、图 3 可知,在一定浓度范围内,随着虫茶挥发性物质提取物浓度的升高,虫茶挥发性物质提取物的羟基自由基、DPPH 自由基清除能力均得到提高。已有研究表明,香气成分中的棕榈酸等物质具有抗氧化效果^[9],这些物质的存在使得虫茶香气成分具有抗氧化效果。

2.3 虫茶香气成分的抗突变效果

MNNG 是一种广泛存在的化学诱变剂和致癌剂,其引起的突变与肿瘤发生密切相关,通过体外抗突变试验可以从一定程度上判断食品的抗突变性^[10]。Khan 等建立的 MNNG 诱



不同小写字母表示各组数据差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图2 虫茶香气物质的羟基自由基清除效果

导TAI00鼠伤寒沙门杆菌回复突变试验作为最典型的抗突

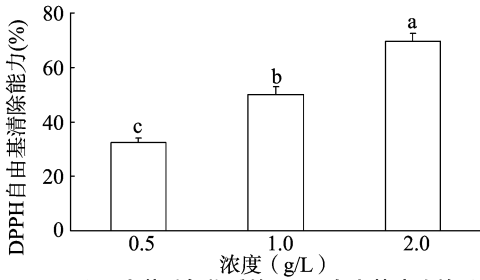


图3 虫茶香气物质的DPPH自由基清除效果

变试验,被广泛用于茶叶抗突变效果的检测^[11]。虫茶香气成分提取物对 MNNG 诱导的 TA100 菌具有一定抑制作用。由表 1 可知,提取物浓度为 1.25、2.5 mg/皿时,TA100 菌生长抑制率分别为 44.9%、69.7%,在增大样品浓度后,抗突变效果也明显增加,表明虫茶香气成分具有抗突变作用,且抗突变效果随着虫茶挥发性物质浓度的增大而增加。

表 1 虫茶香气成分在致突变物 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG,0.4 μg/皿) 诱导 TA100 菌株下抗突变效果

样品剂量 (mg/皿)	TA100 菌数 (皿)			抑制率 (%)
	自发回变	对照	虫茶香气成分	
1.25	1 314 ± 88a	1 314 ± 88a	779 ± 41b	44.9
2.50	123 ± 11	1 314 ± 88a	484 ± 27c	69.7

2.4 虫茶香气成分的癌细胞体外增殖抑制效果

观察体外癌细胞增殖的变化情况可以从一定程度上判断食品的抗癌功能性^[12]。本研究用虫茶香气成分提取物对体外生长的 AGS 胃癌细胞和 HT-29 结肠癌细胞进行处理,观察其体外增殖抑制效果。由表 2 可知,用 MTT 法观察不同浓度提取物处理癌细胞后的吸光度,可以看到各组细胞的吸光度均发生明显变化,高浓度提取物处理癌细胞后,AGS、HT-29 细胞的吸光度均低于低浓度处理,通过计算可得高浓度样品具有更高的体外癌细胞生长抑制率,可见虫茶香气成分具有一定的体外抗癌效果。以癸烷为基团的一些化合物也具有抑制癌细胞生长的作用^[13],有研究表明包含丙烯酮基团的一些物质也具有抗氧化效果^[14],可见虫茶中所含的这些物质也是合成其他一些功能性成分的重要部分,这些香气成分在被进一步深加工时可能转化为一些其他功能性成分,提高虫茶品质。

表 2 虫茶香气成分对 AGS、HT-29 癌细胞的体外增殖抑制效果

虫茶香气成分 质量浓度 (mg/L)	AGS 胃癌细胞		HT-29 结肠癌细胞	
	$D_{540\text{ nm}}$	抑制率 (%)	$D_{540\text{ nm}}$	抑制率 (%)
0 (对照)	0.487 ± 0.006a		0.466 ± 0.004A	
400	0.340 ± 0.010b	30.2	0.316 ± 0.010B	32.2
800	0.206 ± 0.012c	57.7	0.172 ± 0.011C	63.1

3 结论

虫茶香气物质中主要含有 11 种成分,分别为 5-乙基-2-oxa-1,3,4,5a,10-pentaazacyclopenta-[a] 茈、癸烷、(9-oxo-9,10-dihydroacridin-4-yl) 乙酸、7-氯-4-甲氧基-3-甲基喹啉、1-(3-氢氧化-4-甲基苯基)-1,3,3,

6-四甲基-5-茈萜醇、丙烯酮、4-氨基苯乙炔酸、草酰胺、缩水甘油、2-乙酰基-1,3,3,4,4-五甲基环戊烯缩氨基脒、棕榈酸。通过对虫茶香气物质清除羟基自由基和 DPPH 自由基的能力测定发现,虫茶香气物质具有一定的抗氧化能力,并且随虫茶挥发性物质提取物浓度的增大,抗氧化效果也增加。通过 Ames 抗突变试验检验虫茶香气物质对 TA100 沙门氏菌的增殖抑制作用,结果发现,虫茶香气物质显示出良好的抗突变效果。虫茶香气物质对 AGS 胃癌细胞、HT-29 结肠癌细胞处理后,癌细胞的体外增殖都明显减少。成分分析试验和体外功能性效果试验证明,虫茶香气成分具有体外抗氧化、抗突变、抗癌效果,改进饮茶方式或加强工业茶饮料的制作工艺,保留虫茶香气成分,可以进一步利用虫茶的使用价值和保健价值。

参考文献:

- [1] 蒋三俊. 中国虫茶资源及其保健功用[J]. 特种经济动植物, 2000,3(5):36.
- [2] 陈晓阳,文礼章,李 晨,等. 三叶虫茶对肾性高血压大鼠神经免疫调节作用的实验研究[J]. 湖南中医学院学报,2006,26(2):4-6.
- [3] 戴素贤,谢赤军,袁学培,等. 苦丁茶香气的化学组成[J]. 华南农业大学学报,1998,19(1):71-75.
- [4] 张 莹,钟应富,袁林颖,等. 永川秀芽茶特征香气成分研究[J]. 西南农业学报,2012,25(6):2046-2049.
- [5] Kang H S, Chung H Y, Jung J H, et al. Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Archives of Pharmacal Research, 1997, 20(5): 496-500.
- [6] Wang Q, Zhao X, Qian Y, et al. *In vitro* antioxidative activity of yellow tea and its *in vivo* preventive effect on gastric injury[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 6(2): 423-426.
- [7] Zhao X, Ju J, Kim H M, et al. Antimutagenic activity and *in vitro* anticancer effects of bamboo salt on HepG2 human hepatoma cells[J]. Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology, 2013, 32(1):9-20.
- [8] Zhao X, Kim S H, Yc Q, et al. Effects of different kinds of salt in comutagenicity and growth of cancer cells[J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2012, 41(1):26-32.
- [9] 李林强,李建科. 华山松籽油的成分分析及其抗氧化的研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(10):1788-1791.
- [10] Qian Y, Zhu K, Wang Q, et al. Antimutagenic activity and preventive effect of black tea on buccal mucosa cancer[J]. Oncology Letters, 2013, 6(2):595-599.
- [11] Khan J A, Jalal J A, Ioannes C, et al. Assessment of the antimutagenic effect of Doash tea extract fractions[J]. Toxicology and Industrial Health, 2012, 28(10):867-875.
- [12] Zhao X, Deng X X, Park K Y, et al. Purple bamboo salt has anticancer activity in TCA8113 cells *in vitro* and preventive effects on buccal mucosa cancer in mice *in vivo* [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 5(2):549-554.
- [13] 熊小琴,沈久明,梁 峰. 1-对甲苯磺酰基-3-羟基-1,5,8-三氮杂环癸烷的合成及抗肿瘤活性的初步研究[J]. 化学研究与应用, 2011, 23(4):466-469.
- [14] 宋成荣,师 伟,张 琨,等. 1-(2-羟基-4,5-亚甲二氧基)苯基-2-甲基丙烯酮类化合物的合成及抑菌活性[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2012, 40(1):147-151.