

有机茶山海棠叶主要活性成分测定及模拟胃酸条件下清除亚硝酸盐的效果

王莹

(临沂大学生命科学学院, 山东 临沂 276005)

摘要:以茶山海棠的春、夏、秋叶为研究对象,分别以自然冲泡法和磨碎浸提两种方式采用分光光度法测定多酚类、黄酮类和甜茶苷的质量分数。在模拟胃酸条件下,测定自然冲泡条件下不同固液比、不同反应时间对 NO_2^- 的清除率的影响,并在此基础上分析各成分质量分数与清除亚硝酸盐(NO_2^-)的能力的相关性。结果表明,茶山海棠的多酚类质量分数在0.51%~1.55%,黄酮类在5.10%~12.20%,甜茶苷在2.34%~4.67%之间。自然冲泡条件下,3种茶汤都有较好的清除 NO_2^- 的能力,茶水比在1:50以下,对 NO_2^- 的清除作用随茶汤质量浓度的增加而增大。3种茶汤的 NO_2^- 清除率在固液比相同时存在显著性差异($P < 0.05$),其清除能力大小为:夏茶>春茶>秋茶。茶山海棠的春、夏、秋叶的 NO_2^- 清除率与黄酮类和甜茶苷的质量分数呈正相关性,与多酚类质量分数则无明显相关性。茶山海棠的清除 NO_2^- 反应较快,20min反应已基本完成;相同反应时间下,夏茶的清除率显著高于春茶和秋茶。

关键词:茶山海棠;活性成分;亚硝酸盐;体外实验

Major Bioactive Components in Organic Chashan *Malus hapehensis* and Its Scavenging Effect against Nitrite in Simulated Gastric Juice

WANG Ying

(College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China)

Abstract: Spring tea, summer tea and autumn tea of organic chashan *Malus hapehensis* were used as the materials to spectrophotometrically determine its major bioactive components. In stimulated gastric juice condition, the nitrite scavenging rate of tea at various concentrations were determined to analyze the correlation between major bioactive components and nitrite scavenging rate. Results showed that chashan *Malus hapehensis* contained 0.51% — 1.5% polyphenol, 5.10% — 12.20% rubusoside and 2.34% — 4.67% phloridzin. Three kinds of tea infusions can remove nitrite efficiently. When tea-to-water ratio was lower than 1:50, the scavenging capability of tea infusion on nitrite was increased with increasing tea concentration. Nitrite scavenging rate of three different tea infusions revealed a significant difference ($P < 0.05$) and the summer tea exhibited the best scavenging capability, followed by spring tea and autumn tea. The scavenging capability was positively correlated with the contents of rubusoside and phloridzin. However, no obvious correlation between scavenging capability and the content of polyphenol was observed. The nitrite scavenging reaction was fully completed in 20 min. Meanwhile, the scavenging capability of summer tea was significantly higher than that of spring tea and summer tea during the same time period.

Key words: Chashan *Malus hapehensis*; bioactive component; nitrate; experiment *in vitro*

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0105-04

茶山海棠又称平邑甜茶,是蔷薇科苹果属湖北海棠的一个品种。茶山海棠在我国已有上千年的栽种和饮用历史,其中含有多多种活性成分,如游离氨基酸、茶多酚、黄酮类、甜茶苷、可溶性糖等,具有药、糖、

茶三重功效,近年来茶山海棠与中药配伍治疗糖尿病^[1]。N-亚硝基化合物是一种致癌性很强的物质,亚硝胺的合成条件并不苛刻,无论在实验室和自然条件下,还是人体和动物体内均能反应合成,尤其在人和动物胃中更适

收稿日期: 2010-12-15

作者简介: 王莹(1979—),女,讲师,硕士,研究方向为食品科学与分子营养。E-mail: wangying200245@gmail.com

于合成亚硝酸^[2-3]。有文献表明^[4-8],许多天然产物具有抗氧化和清除亚硝酸盐的能力。茶山海棠的多酚类、黄酮类和甜茶苷的提取及抗氧化方面已有报道^[9-11]。对于它在不同时期主要活性成分的质量分数及清除亚硝酸盐的研究还未见报道,本实验对此进行初步研究,以期茶山海棠的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶山海棠春、夏、秋叶采摘于临沂市有机茶山海棠大田,春茶采摘于2010年4月2日;夏茶采摘于2009年7月18日;秋茶采摘于2009年9月29日;均为一芽二叶,采摘后进行炒制,封装。

亚硝酸钠、0.4%对氨基苯磺酸、2%盐酸萘乙二胺、酒石酸钾钠、硫酸亚铁、硝酸铝、氢氧化钠、根皮苷标准品等均为分析纯;乙腈、甲醇为色谱纯。

1.2 仪器与设备

DHG-9240A 电热鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;HH.S 精密数显水浴锅 江苏金坛市医疗仪器厂;T6 新悦可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;AB204-N 电子分析天平 瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司;Waters 2690 高效液相色谱仪(配有可变波长紫外检测器和 Waters empower2 色谱工作站)、Waters Symmetry C₁₈(150mm × 46mm, 5 μm) 美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 茶样处理

自然冲泡法(a):即茶叶审评标准冲泡法,取 3g 茶叶加入 150mL 沸水,静置 5min,过滤定容。磨碎浸提法(b):即茶叶内含成分测定标准方法,将茶叶样品磨碎过 40 目筛,取 3g 样品沸水浴 45min 过滤定容。分别测定上述两种浸提方法下的各主要活性成分的质量分数,按式(1)计算两种测定结果的浸出率。

$$\text{浸出率}/\% = \frac{\text{自然冲泡中浸出液各成分质量分数}}{\text{磨碎浸出液中该成分质量分数}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 茶样活性成分测定方法

黄酮类测定:三氯化铝比色法^[12];茶多酚测定:

酒石酸亚铁比色法^[12];pH 值测定:精密 pH 试纸法;甜茶苷测定:高效液相色谱法^[13]。

1.3.3 NO₂⁻的测定及清除率的计算^[14]

取一定量茶汤于 50mL 容量瓶中,加入 25mL 模拟胃酸,加 3mL 5 μg/mL NaNO₂ 应用液,混匀反应 10min;蒸馏水代替茶汤进行空白对照实验。按测定 NO₂⁻的方法进行显色,用 1cm 比色皿中进行光谱扫描,最大吸收波长在 538nm 处。按式(2)计算样液对 NO₂⁻的清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A₀ 为空白对照吸光度; A₁ 为样品溶液吸光度。

1.3.4 数据统计分析

实验数据用平均值±标准差表示(n=3),采用 DPS 统计软件对组间及组内数据进行分析, P < 0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 自然冲泡及磨碎浸提茶样浸出液主要活性成分分析
分别以自然冲泡法和磨碎浸提法对茶山海棠的春、夏、秋叶进行浸提,按 1.3.2 节方法测定茶山海棠不同采收期各活性物质的质量分数。

由表 1 可知,茶山海棠的多酚类质量分数较绿茶低,仅有 0.51%~1.55%;黄酮类质量分数较高,达到 5.10%~12.2%;茶山海棠含有绿茶所没有的甜茶苷成分,其质量分数在 2.34%~4.67%。茶山海棠的多酚类、黄酮类物质的质量分数在春夏季呈上升趋势,夏季后迅速下降。甜茶苷质量分数在春季新生的嫩芽中质量分数最高,随后逐渐降低。磨碎浸提获得的茶汤各活性物质的质量分数明显高于自然冲泡的条件,这与细胞组织的破坏程度有关,因此在测定茶叶内含物时对茶样进行研磨处理或加入酶将有利于准确测定其质量分数。由于春、夏、秋茶都是采摘的一芽二叶进行加工,因而浸出率对与不同采收期的茶山海棠没有明显差别。

2.2 不同茶汤固液比对 NO₂⁻清除率的影响

由于饮茶者多数饮用的是茶叶,因而采取自然冲泡法测定茶汤对 NO₂⁻的清除率。将各茶样按不同固液比冲入沸水,静置 5min 过滤,在体外模拟胃酸条件下测定不同茶汤固液比对 NO₂⁻的清除率的影响。

表 1 茶山海棠叶主要活性成分质量分数及浸出率

Table 1 Contents and extraction rates of major bioactive components in Chashan Malus hapehensis

成分	春茶			夏茶			秋茶		
	自然冲泡	磨碎浸提	浸出率	自然冲泡	磨碎浸提	浸出率	自然冲泡	磨碎浸提	浸出率
多酚类	0.89 ± 0.04	1.21 ± 0.03	74	1.15 ± 0.04	1.55 ± 0.01	74	0.51 ± 0.07	0.73 ± 0.04	70
黄酮类	7.08 ± 0.05	9.55 ± 0.04	74	8.38 ± 0.07	12.2 ± 0.03	69	5.10 ± 0.07	7.45 ± 0.06	68
甜茶苷	3.73 ± 0.01	4.67 ± 0.03	80	2.57 ± 0.03	3.36 ± 0.02	76	2.34 ± 0.02	3.27 ± 0.04	72

表2 不同固液比对 NO_2^- 的清除作用
Table 2 Nitrite scavenging rate under different tea-to-water ratio

样品	固液比							%
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	
春茶	67.3 ± 0.17 ^{aA}	75.8 ± 0.12 ^{aA}	76.4 ± 0.15 ^{bA}	72.5 ± 0.09 ^{cA}	61.3 ± 0.06 ^{dA}	40.2 ± 0.17 ^{eA}	35.5 ± 0.07 ^{fA}	
夏茶	73.6 ± 0.16 ^{aB}	79.2 ± 0.14 ^{aB}	78.4 ± 0.13 ^{bB}	77.5 ± 0.14 ^{cB}	63.4 ± 0.06 ^{dB}	45.8 ± 0.12 ^{eB}	38.6 ± 0.11 ^{fB}	
秋茶	67.0 ± 0.14 ^{aA}	73.2 ± 0.07 ^{bC}	71.9 ± 0.03 ^{cC}	69.5 ± 0.12 ^{dC}	48.4 ± 0.08 ^{eC}	33.5 ± 0.06 ^{fC}	25.1 ± 0.13 ^{gC}	

注：大写字母不同，表示同列数据相比差异显著($P < 0.05$)；小写字母不同，表示同行数据相比差异显著($P < 0.05$)。下同。

由表2可知，当固液比为1:500时，3种茶汤对 NO_2^- 清除率均小于40%，当固液比为1:50时，3种茶汤的清除率均大于70%，随茶汤浓度的增加，对 NO_2^- 清除能力增加，当固液比为1:25时清除率下降。说明3种茶汤对 NO_2^- 清除作用都有一个最佳固液比，茶汤比在1:50以下，对 NO_2^- 清除作用随茶汤固液比的增加而增加($P < 0.05$)，当超过一定固液比时，清除率下降。春茶、夏茶和秋茶的清除率在固液比相同时存在显著性差异($P < 0.05$)，其清除能力大小为：夏茶>春茶>秋茶。

2.3 不同固液比条件下茶汤各活性物质质量分数对 NO_2^- 清除率的影响

在不同固液比条件下，以自然冲泡法得到的各茶汤的有效成分质量分数为自变量，以茶水比在1:50以下的不同固液比茶汤对亚硝酸盐的清除率为依变量，计算清除率与各活性成分质量分数的关系。

表3 不同固液比各茶活性成分质量分数与清除率的关系
Table 3 Effect of tea-to-water ratio on nitrite scavenging rate

样品	多酚类	黄酮类	甜茶苷
春茶	0.5066	0.7851 [*]	0.7694 [*]
夏茶	0.5387	0.8142 [*]	0.7751 [*]
秋茶	0.4805	0.7642 [*]	0.7578 [*]

注：*表示 $r_{0.05}$ 条件下的相关性， $r_{0.05}=0.7545$ 。

由表3可知，茶山海棠的春、夏、秋叶的清除率与黄酮类和甜茶苷的质量分数呈正相关性，与多酚类质量分数则无明显相关性。绿茶、红茶由于黄酮类质量分数较低，至今未见报道茶类的黄酮类质量分数与抗氧化、清除亚硝酸盐的相关性，但是已有报道称无花果叶、夏枯草等的黄酮类化合物质量分数较高，具有明显的抗氧化作用^[15-16]。蜜柚果皮提取物、板栗花粗提取物等含有丰富的黄酮类化合物，具有清除亚硝酸盐的作用^[17-18]。在文献[6]湖北海棠提取物的体外抗氧化活性研究中，甜茶苷作为提取物的主要活性物质，是清除亚硝酸盐的活性成分之一。茶山海棠作为茶叶的一种，含有较多的黄酮类化合物和甜茶苷，表现为黄酮类、甜茶苷质量分数与清除亚硝酸盐能力相关，与上述文献报道相符。数据显示，茶山海棠的清除率与多酚类质量

分数无明显相关性，与周才琼等^[19-20]、吴永宁等^[21]报道的结果不同。周才琼、吴永宁等是以绿茶为研究对象，绿茶的多酚类质量分数较高，一般能达到10%以上，黄酮类质量分数较低。茶山海棠中多酚质量分数小于2%。黄酮类质量分数大于5%，并且含有大于2%的甜茶苷。绿茶与茶山海棠各活性物质质量分数及种类的不同导致了相异的实验结果。

2.4 反应时间对 NO_2^- 清除率的影响

表4 反应时间对 NO_2^- 清除率的影响
Table 4 Effect of reaction time on nitrite scavenging rate

样品	10min	15min	20min	25min	30min	%
春茶	35.6 ± 0.23 ^{aA}	56.8 ± 0.14 ^{aA}	76.4 ± 0.22 ^{aA}	76.2 ± 0.11 ^{bA}	75.0 ± 0.11 ^{cA}	
夏茶	37.8 ± 0.15 ^{aB}	72.5 ± 0.21 ^{aB}	78.4 ± 0.16 ^{aB}	77.8 ± 0.27 ^{bA}	77.1 ± 0.19 ^{eB}	
秋茶	35.8 ± 0.22 ^{aA}	60.7 ± 0.31 ^{aC}	71.9 ± 0.11 ^{aC}	70.4 ± 0.26 ^{bB}	69.8 ± 0.25 ^{cC}	

由表4可知，茶山海棠对亚硝酸盐的清除速率较快，反应进行20min，对亚硝酸盐的清除作用已基本上完成，清除率都达到各条件下的最大值。延长反应时间未能显著提高亚硝酸盐清除率($P > 0.05$)，随着时间的延长，20min以后清除率反而略有下降。相同反应时间下，夏茶的清除率显著高于春茶和秋茶的清除率($P < 0.05$)。

3 结 论

各季节的茶山海棠的活性物质质量分数是有波动的，多酚类、黄酮类物质的质量分数在春、夏季呈上升趋势，夏季后迅速下降。甜茶苷质量分数在春季新生的嫩芽中质量分数最高，随后逐渐降低。茶多酚质量分数在0.51%~1.55%、黄酮质量分数在5.10%~12.2%和甜茶苷质量分数在2.34%~4.67%之间。自然冲泡条件下，3种茶汤对 NO_2^- 的清除作用都有一个最佳固液比，茶汤比在1:50以下，对 NO_2^- 的清除作用随茶汤固液比的增大而增加($P < 0.05$)，当超过一定固液比时，清除率下降。春茶、夏茶和秋茶对 NO_2^- 的清除率在固液比相同时存在显著性差异($P < 0.05$)，其清除能力大小为：夏茶>春茶>秋茶。茶山海棠对 NO_2^- 的清除率与其黄酮类和甜茶苷的质量分数之间存在量效相关性，与多酚类质量分数无关。各茶汤对 NO_2^- 的清除反应时

间较短, 20min 内即能完成对 NO_2^- 的清除。数据分析表明, 夏茶的清除能力最好, 并且与春茶和秋茶相比存在显著差异($P < 0.05$)。

亚硝酸盐中 N 的氧化数为 +3, 在酸性溶液中还原剂作用下亚硝酸及其盐本身被还原为 NO , 凡具有氧化还原当量的天然产物均具有一定的抗氧化活性及清除 NO_2^- 的能力^[14]。多酚类抗氧化作用机理是由于儿茶素环上的酚性羟基具有供氢的活性, 参与氧化还原反应^[22]。黄酮类化合物主要是指以 2- 苯基色原酮为基核的化合物, 分子中有多酚羟基, 能提供活泼的氢原子, 甜茶素的结构类似于甜叶菊苷, 具有多个羟基, 可参与抗氧化及清除亚硝酸盐的反应^[22-23]。

从数据上看, 即使在较高浓度如固液比为 1:50 时, 对 NO_2^- 的清除率均小于 80%。相比与绿茶, 茶山海棠的清除率较低, 对亚硝酸盐不能达到全部清除, 有必要在以后的研究中进行更深入的探讨。

参考文献:

- [1] 田翠平, 瞿伟菁. 甜茶素提取物对 STZ 致高血糖大鼠的降血糖作用研究[J]. 营养学报, 2003, 25(1): 29-32.
- [2] YANG Lei, CHEN Zhonglin, SHEN Jimin, et al. Reinvestigation of the nitrosamine formation mechanism during ozonation[J]. Envi Sci Tech, 2009, 43(14): 5481-5487.
- [3] LLIINSKY W. Nitrosamines and nitrosamindies in the etiologly of stomach bowel cancers[J]. Cancer Res, 1997, 40: 244-256.
- [4] PENG Changlian, CHEN Shaowei, LIN Zhifang. Detection of antioxdative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH[J]. Prog Biochem Biophys, 2000, 27: 658-661.
- [5] CICHEWICH R H, NAIR M G. Isolation and characterization of stelladerol, a new antioxidant naphthalene glycoside, and other antioxidant glycosides from edible daylily (*Henerocallis*) flowers[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 87-91.
- [6] YESILADA E, TSUCHIYA K, TAKAISHI Y, et al. Isolation and the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation[J]. J Ethnopharm, 2000, 73: 471- 478.
- [7] LEE S C, KIM S Y, JEONG S M, et al. Effect of far-infrared irradiation on catechins and nitrite scavenging activity of green tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(2): 399-403.
- [8] LEE G D, CHANG H G, KIM H K. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms[J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 1998, 29(3): 432- 436.
- [9] 张宏岐, 汪鋈植, 邹坤, 等. 湖北海棠提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2008, 33(11): 183-186.
- [10] 王耀峰, 宫智勇, 方敏. 湖北海棠叶黄酮类物质提取工艺的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2008, 27(2): 12-15.
- [11] 方荣, 杨茜, 李莉, 等. 湖北海棠中根皮苷含量测定[J]. 食品科技, 2008 (6): 195-196.
- [12] 钟萝. 茶叶品质理化分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 111-117.
- [13] 银胜高, 刘莉丽, 刘君玲, 等. 广西瑶山甜茶中甜茶苷的提取工艺筛选[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(4): 45-48.
- [14] 王莹. 模拟胃酸条件下紫甘薯花色苷清除亚硝酸盐的效果[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 109-111.
- [15] 杨润亚, 明永飞, 王慧. 无花果叶中总黄酮的提取及其抗氧化活性测定[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 79-82.
- [16] 熊双丽, 李安林. 桔草总黄酮的提取分离与自由基清除活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 194-197.
- [17] 黄高凌, 翁聪泽, 倪辉, 等. 馆溪蜜柚果皮提取物抑制亚硝化反应的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 36-39.
- [18] 吴雪辉, 张喜梅, 李廷群, 等. 板栗花粗提物的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 14-17.
- [19] 周才琼, 陈玉山, 李干红, 等. 茶及茶多酚对 NO_2^- 清除作用的体外试验研究[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(1): 59-61.
- [20] 周才琼, 周张章, 范勇, 等. 不同茶样冲泡浸出液对 NO_2^- 清除作用的体外试验研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 201-206.
- [21] 吴永宁, 王淮洲. 茶叶中影响 N-硝基化反应有效成分的初步探讨[J]. 营养学报, 1987, 9(4): 304-309.
- [22] 陈金娥, 丰慧君, 张海容. 红茶、绿茶、乌龙茶活性成分抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 62-66.
- [23] UNTEN L, KOKETSU M, KIM M. Antidiscooring activity of green tea polyphenol on β -carotene[J]. Agric Food Chem, 1997, 45: 2009-2012.