

模拟胃液条件下假蒟叶提取物抑制亚硝化反应的研究

周斯仪¹, 袁颖雅¹, 黄晓桦¹, 谌素华¹, 廖森泰², 徐玉娟², 邹宇晓², 钟赛意^{1*}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088; 2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东广州 510610)

摘要 [目的] 研究不同溶剂的假蒟叶提取物对亚硝化反应的影响。[方法] 在模拟胃液条件下, 测定假蒟叶提取物亚硝酸盐清除率及亚硝胺合成阻断率。[结果] 不同溶剂的假蒟提取物均有一定的抑制亚硝化反应作用, 其中乙酸乙酯提取物的抑制作用最强, 且其对亚硝酸盐的清除率及对亚硝胺合成的阻断率在一定的浓度范围内随其浓度的增加而增加, 对亚硝酸盐清除能力较强, 其 IC_{50} 值为 0.425 mg/ml, 对亚硝胺合成阻断的能力相对较低, 其 IC_{50} 值为 4.064 mg/ml。[结论] 假蒟叶提取物具有较好的亚硝化反应抑制活性且主要通过清除底物亚硝酸盐来实现。

关键词 假蒟叶; 提取物; 清除亚硝酸盐; 亚硝胺合成阻断

中图分类号 S601.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)29-10326-02

Investigation on Inhibitory Effect of Extract of *Piper sarmentosum* Roxb. Leaves on the Nitrosation Reaction under Simulated Gastric Conditions

ZHOU Si-yi¹, YUAN Ying-ya¹, HUANG Xiao-hua¹, ZHONG Sai-yi^{1*} et al (1. School of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To investigate the effect of the extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. in different solvents on the nitrosation reaction. [Method] The nitrite scavenging activity and blocking effect of nitrosamine synthesis were determined under simulated gastric conditions. [Result] The extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. in different solvents exhibit the distinctive activity of nitrite scavenging and nitrosamine synthesis blocking. The fraction of ethyl acetate extract showed the strongest inhibitory activity of nitrosation reaction, scavenging nitrite and blocking nitrosamine formation in a dose-dependent manner. The IC_{50} value for nitrite scavenging was 0.425 mg/ml, and for nitrosamine synthesis 4.064 mg/ml. [Conclusion] The extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. showed significantly inhibitory activity of nitrosation reaction through nitrite scavenging.

Key words *Piper sarmentosum* Roxb. leaves; Extracts; Nitrite scavenging; Blocking nitrosamine formation

亚硝酸盐广泛存在于土壤、水和动植物体内, 也可由硝酸盐转化而来, 还可作为发色剂和抑菌剂广泛应用于食品加工。亚硝酸盐对人体具有一定的危害性, 不仅能将血红蛋白中的二价铁氧化成三价铁, 导致高铁血红蛋白血症^[1]; 而且在酸性条件下, 亚硝酸根可与食品或人体内的胺类发生亚硝化反应, 生成 N-亚硝胺类化合物。亚硝胺进入人体后, 主要经过肝微粒体内细胞色素 P450 酶的代谢活化, 生成烷基偶氮羟基化合物, 此类代谢产物具有很强的致癌和致突变活性^[2]。亚硝胺是目前所知的最强的化学致癌物质之一, 它能引起人和动物胃、肝脏等多种脏器的恶性肿瘤^[3]。除了通过直接摄入外, 亚硝胺在人体胃肠道的酸性环境中, 特别是胃液中更适于合成亚硝胺^[4], 虽然正常情况下不会对身体造成危害, 但如果摄入过多亚硝酸盐, 体内产生过多的亚硝胺, 会增加诱发癌症的风险。因此, 清除亚硝胺生成前体物或阻断亚硝胺在体内的合成, 是防癌抗癌的有效途径之一, 筛选出对亚硝化反应具有抑制作用的植物成分是一项具有积极意义的课题。

假蒟 (*Piper sarmentosum* Roxb.) 是胡椒科胡椒属植物, 广泛分布在我国东南沿海地区和东南亚国家, 是当地广为使用的调味品和药用植物。前人研究提示, 假蒟富含多种活性成分, 具有抗氧化、抑菌、抑癌等作用^[5-9], 但假蒟提取物对亚

硝化反应的影响未见报道。笔者通过模拟人体胃液条件下, 不同极性溶剂的假蒟提取物对清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的作用, 并筛选出了具有良好作用效果的组分, 以期假蒟的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 假蒟叶: 2013 年 12 月, 采摘于广东省湛江市湖光岩, 洗净后阴干备用。主要试剂: 胃蛋白酶(酶活 600 ~ 1 000 U/mg), 北京鼎国昌盛生物; 石油醚、正丁醇、乙酸乙酯、氯仿、60% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、盐酸、氯化钠、亚硝酸钠、碳酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、 α -萘胺、二甲胺等试剂, 均为分析纯。主要仪器设备: KQ-500DB 数控超声波清洗器, N-1000D-W 旋转蒸发仪, CR22G III 冷冻干燥机, WD-9403-C 紫外仪, UV-3200PC 可见紫外分光光度计, HH.S21-6 数显水浴锅, AUW120 电子天平。

1.2 方法

1.2.1 假蒟浸提物的制备。 阴干后的假蒟叶粉碎至 80 目, 分别用石油醚、正丁醇、乙酸乙酯、氯仿、60% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇和水按 1: 20 g/ml 的料液比配置, 并用 400 W 超声波助提 30 min 后, 在 45 °C 水浴浸提 4 h, 然后经抽滤、减压旋转浓缩和真空干燥, 即得不同溶剂提取物。

1.2.2 模拟胃液的制备。 称取 2.0 g NaCl 加去离子水溶解, 加入 7 ml 浓 HCl, 加 6.0 g 的胃蛋白酶, 加去离子水定容至 1 000 ml。

1.2.3 亚硝酸钠标准溶液的配制。 准确称取 0.100 0 g 于硅胶干燥器中干燥 24 h, 加水溶解移入 500 ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 亚硝酸钠储备液 (200 μ g/ml), 避光保存备用。

基金项目 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201310566007); 农产品加工省部共建国家重点实验室培育基地、农业部功能食品重点实验室开放基金项目 (201306)。

作者简介 周斯仪 (1992 -), 女, 广东汕尾人, 本科生, 专业: 食品科学与工程。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事食品功能因子及功效评价方面的研究。

收稿日期 2014-09-04

临用前,吸取亚硝酸钠标准溶液 5.00 ml,置于 200 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,即得亚硝酸钠标准使用液 A (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$);吸取亚硝酸钠标准溶液 69.00 ml,置于 200 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,即得亚硝酸钠标准使用液 B (1.0 mmol/L)。

1.2.4 亚硝酸盐清除率的测定。采用盐酸萘乙二胺法^[10],在弱酸条件下,亚硝酸钠与对氨基苯磺酸发生重氮化后,与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色染料,用分光光度计测出吸光度,经计算即可得出提取物在模拟胃酸条件下对亚硝酸盐的清除率。

取 25 ml 比色管,加入 10 ml 模拟胃液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 取出,再加入 1 ml 的假蒟叶提取物和 2 ml 的 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亚硝酸钠,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,取出,立即加入 4 g/L 对氨基苯磺酸溶液 2 ml,混匀,静置 4 min 后各加入 2 g/L 盐酸萘乙二胺溶液 1 ml,加去离子水至刻度,混匀,静置 20 min,用 2 cm 比色杯于波长 538 nm 处测吸光度 A_1 。

空白对照组:以去离子水代替亚硝酸钠标液的空白对照试验测得吸光度 A_{01} ;以去离子水代替假蒟叶提取物溶液的空白对照试验测得吸光度 A_{02} 。

亚硝酸盐清除率 (%) = $[(A_{01} + A_{02} - A_1)/A_{02}] \times 100\%$
式中, A_1 ,加假蒟叶提取液的测定值; A_{01} ,去离子水代替亚硝酸钠标液的空白对照组的测定值; A_{02} ,以去离子水代替假蒟叶提取物溶液的空白对照组的测定值。

1.2.5 亚硝酸胺合成阻断率测定。采用 α -萘胺法^[11-12]。在模拟胃液条件下,亚硝酸钠与二甲胺生成二甲基亚硝酸胺。紫外光照下,二甲基亚硝酸胺可分解成甲基仲胺和亚硝酸根,亚硝酸根与对氨基苯磺酸发生重氮化反应后,再与 α -萘胺偶合生成红色化合物,用分光光度计测出吸光度值,经计算即可得出模拟胃液条件下样品对亚硝酸胺合成的阻断率。

取 5 支 25 ml 比色管中加入模拟胃液 10 ml,分别加入 1 ml 的样品或对照组,再加入浓度 1 mmol/L 的二甲胺溶液 1 ml,1 mmol/L 的 NaNO_2 溶液 1 ml,用蒸馏水稀释至刻度,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 1 h。用移液管吸取 2 ml 上述溶液加到试管和培养皿,加入质量分数 0.5% Na_2CO_3 溶液 1 ml,于紫外分析仪(波长 254 nm)上斜放射射 15 min。取出后加入质量分数 1% 对氨基苯磺酸 3 ml,摇匀后静置 3~5 min,再加入 α -萘胺 3 ml,摇匀静置 20 min,在波长 538 nm 下测定吸光度 A_2 。以去离子水代替亚硝酸钠标液的空白对照试验,测得吸光度 A_{03} ;以去离子水代替假蒟叶粗提取液的空白对照试验测得吸光度 A_{04} 。

$$\text{亚硝酸胺合成的阻断率}(\%) = [(A_{03} + A_{04} - A_2)/A_{04}] \times 100\%$$

式中, A_2 ,加假蒟叶提取物的测定值; A_{03} ,去离子水代替亚硝酸钠标液的空白对照组的测定值; A_{04} ,以去离子水代替假蒟叶提取物溶液的空白对照组的测定值。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂的假蒟叶提取物对亚硝酸盐清除率的影响 由图 1 可以看出,在模拟胃液条件下,8 种不同溶剂的假

蒟叶提取物对亚硝酸盐均有一定的清除作用,其对亚硝酸盐的清除活性强弱依次为:乙酸乙酯 > 无水乙醇 > 石油醚 > 60% 乙醇 > 95% 乙醇 > 氯仿 > 正丁醇 > 水。其中乙酸乙酯提取物(0.05%)清除亚硝酸盐的能力最强,高达 99.187%,与同浓度的阳性对照 V_c 对亚硝酸盐的清除率相当,其他各提取物清除亚硝酸盐的能力明显弱于 V_c ,水提取物的清除率最低。

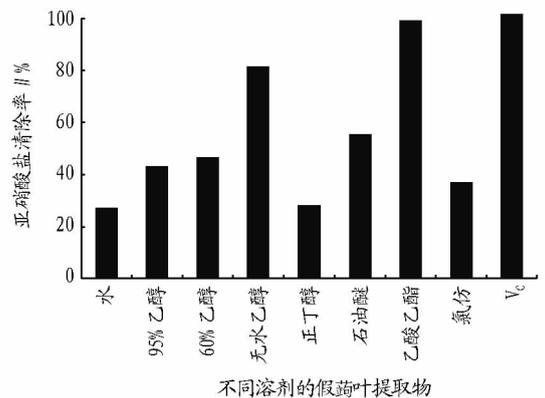


图 1 不同溶剂的假蒟叶提取物对亚硝酸盐清除率的比较

2.2 不同溶剂的假蒟叶提取物对亚硝酸胺合成阻断率的影响 由图 2 可以看出,在模拟胃液条件下,8 种不同溶剂的假蒟叶提取物对亚硝酸胺合成均有一定的阻断作用,其对亚硝酸胺合成阻断活性强弱依次为:95% 乙醇 > 乙酸乙酯 > 60% 乙醇 > 无水乙醇 > 正丁醇 > 石油醚 > 氯仿 > 水。其中 95% 乙醇提取物、乙酸乙酯提取物(0.05%)对亚硝酸胺合成阻断的能力最强,高于 43.842%,接近同浓度的阳性对照 V_c 的作用,其他各提取物阻断亚硝酸胺合成的能力明显弱于 V_c ,水提取物的阻断率较低。综合分析不同提取物对亚硝酸盐清除能力和亚硝酸胺合成阻断率的影响,乙酸乙酯提取物对亚硝化反应的抑制能力最强,因此对其作进一步的量效分析。

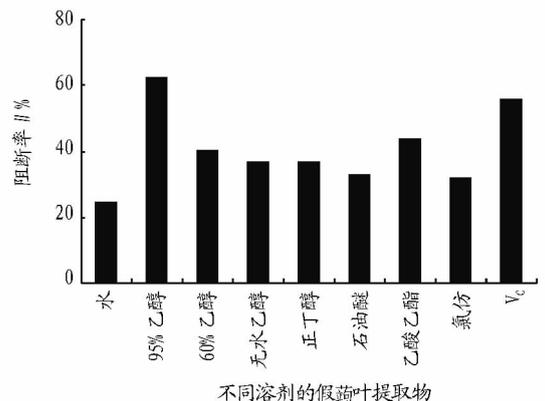


图 2 不同溶剂的假蒟叶提取物对亚硝酸胺合成阻断率的比较

2.3 假蒟叶乙酸乙酯提取物对亚硝化反应抑制的剂量-效应关系 假蒟叶乙酸乙酯提取物对清除亚硝酸盐和阻断亚硝酸胺合成反应的剂量-效应关系见图 3。如图 3 所示,在低浓度时,浓度与亚硝酸盐清除率呈现显著的量效关系,而且显示出较强的亚硝酸盐清除能力,当浓度达到 1 mg/ml 时清除率即达到饱和,且增加浓度清除率也维持在饱和状态。假

(下转第 10330 页)

究所出资+科技人员入股+社会资本”模式,并聘请专业经理人经营。有科技人员的入股,容易调动他们的积极性和解决技术难题;有社会资本的加入,有利于扩大企业的发展规模,解决资金难题;聘请专业经理人,有利于企业的规范经营。

“不能自己产业化”的产品主要是指,生产环节多、销售环节非常长的产品。这类产品绝对不适合于科研单位自己产业化——创办企业,需要严格控制。因为生产管理、市场销售风险太大,农业科研单位无法掌控,同时也缺乏管理与营销人才。

参考文献

- [1] 王庆煌,欧阳欢,龙宇宙. 科研、开发、旅游三位一体改革模式的研究[J]. 华南热带农业大学学报,2004,10(1):1-6.
- [2] 李红铁. 地市级农业科研单位2种开发模式的比较[J]. 河北农业科学,2009,13(7):142-144.
- [3] 蒋和平,孟俊杰. 我国农业技术推广的现状与改善对策[J]. 农业科技管理,2007,26(5):61-65.

(上接第10327页)

蒺藜叶乙酸乙酯提取物对亚硝酸胺合成阻断相对较弱,但在试验浓度范围内0.125~4.000 mg/ml,总体上随着提取物浓度的增加,阻断率也呈缓慢增加的趋势。说明亚硝酸盐清除率和亚硝酸胺合成阻断率与样品质量浓度存在剂量-效应关系。

采用SPSS软件对试验数据进行多项式回归,根据拟合方程求出抑制率为50%时所需样品的浓度,即半数抑制浓度 IC_{50} 。样品浓度与清除率回归方程为 $Y = -14.346X^2 + 77.73X + 19.525$,样品浓度与阻断率的回归方程为 $Y = -3.9937X^2 - 28.921X - 1.573$, R^2 值均在0.95以上,回归方程显著。计算可得出亚硝酸盐清除率的 IC_{50} 值为0.425 mg/ml,亚硝酸胺合成阻断率的 IC_{50} 值为4.064 mg/ml。

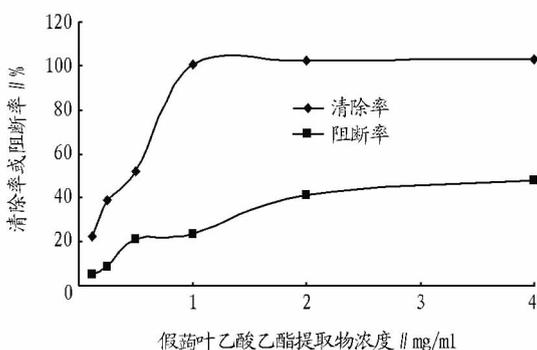


图3 假蒺藜叶乙酸乙酯提取物抑制亚硝化反应的剂量-效应关系

3 结论

在模拟胃液条件下,不同溶剂的假蒺藜提取物对亚硝酸盐均有一定的清除作用,其对亚硝酸盐的清除活性强弱依次为:乙酸乙酯>无水乙醇>石油醚>60%乙醇>95%乙醇>氯仿>正丁醇>水;不同溶剂的假蒺藜提取物对亚硝酸胺合成均有一定的阻断作用,其对亚硝酸胺合成阻断活性强弱依次为:95%乙醇>乙酸乙酯>60%乙醇>无水乙醇>正丁醇>石油醚>氯仿>水。综合分析清除亚硝酸盐和阻断亚硝酸胺合成的能力,其中假蒺藜叶乙酸乙酯提取物抑制亚硝化反应的作

- [4] 谭新红,金龙新,邹小芹. 农业科研单位科技企业的现状、问题及发展对策[J]. 湖南农业科学,2005(3):59-60.
- [5] 车克钧. 美国科研开发和创新能力的考察研究[J]. 甘肃林业科技,2007,32(4):46-51.
- [6] 刘书庆,韩亚辉,苏秦. 年转制科研院所科技成果产业化模式研究[J]. 科技进步与对策,2011,28(12):20-25.
- [7] 佟屏亚. 农业科研院所办企业:是进还是退[J]. 农业科技管理,2008,27(1):4-8.
- [8] 王勇,俞菊生. 农业科研院所与企业合作的模式、现状与对策(以上海市农业科学院为例)[J]. 上海农业学报,2001,17(4):6-9.
- [9] 程勉中. 高校科技成果转化的系统失效与机制创新[J]. 科技管理研究,2006(10):130-133.
- [10] 吴述纲,吴静. 高校科技成果产业化模式比较[J]. 高校科研,2004(24):10-11.
- [11] 一鸣. 科研成果转让要“扶上马,送一程”[N]. 宁波日报,2014-02-28(A07).
- [12] 郭金超. 李克强考察沈阳,建议给科技人员股权[EB/OL]. (2014-03-26)[2014-04-02]. http://news.ifeng.com/mainland/detail_2014_03/26/35160187_0.shtml.
- [13] 裴翠娟,董志强,贾秀领. 我国农业科技成果转化的现状、问题与对策[J]. 农业科技管理,2010,29(5):83-85.

用最强,且其与亚硝酸盐清除率和亚硝酸胺合成阻断率存在质量浓度-效应关系,对亚硝酸盐清除率的 IC_{50} 值为0.425 mg/ml,对亚硝酸胺合成阻断率的 IC_{50} 值为4.064 mg/ml,具有良好的抑制亚硝化反应活性且主要通过清除底物亚硝酸盐来实现。

清除体内亚硝酸盐和阻断亚硝酸胺的合成是防癌的有效途径,假蒺藜提取物能有效地清除亚硝酸盐和阻断亚硝酸胺的合成,因此,假蒺藜功能食品的开发对防治癌症病因的产生可能具有一定的利用价值。假蒺藜有可能成为一种经济、高效、具有抗癌作用的保健食品新资源。

参考文献

- [1] 杨建军,徐建国,段满林. 亚硝酸盐中毒-重度高铁血红蛋白血症[J]. 临床麻醉学杂志,2000,16(12):628-629.
- [2] YAMAZAKI H, INUI Y, YUN C H, et al. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes[J]. Carcinogenesis,1992,13(10):1789-1794.
- [3] BARTSCH H, MONTESANO R. Relevance of nitrosamines to human cancer[J]. Carcinogenesis,1984,5(11):1381-1393.
- [4] BRYAN N S, ALEXANDER D D, COUGHLIN J R, et al. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk; an updated review[J]. Food and Chemical Toxicology,2012,50(10):3646-3665.
- [5] CHANWITHEESUK A, TEERAWUTGULRAG A, RAKARIYATHAM N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand[J]. Food Chemistry,2005,92(3):491-497.
- [6] ZAIDAN M R, NOOR RAIN A, BADRUL A R, et al. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method[J]. Trop Biomed,2005,22(2):165-170.
- [7] SUBRAMANIAM V, ADENAN M I, AHMAD A R, et al. Natural antioxidants: Piper sarmentosum (Kadok) and Morinda elliptica (Mengkuadu)[J]. Mal J Nutr,2003,9(1):41-51.
- [8] FERNANDEZ L, DARULIZA K, SUDHAKARAN S, et al. Antimicrobial activity of the crude extract of Piper sarmentosum against methicillin-resistant[J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences,2012,16:105.
- [9] HUSSAIN K, ISMAIL Z, SADIKUN A, et al. Cytotoxicity evaluation and characterization of chloroform extract of leaf of Piper sarmentosum possessing antiangiogenic activity[J]. Pharmacologyonline,2009,2:379-391.
- [10] 宋茹,韦荣,胡金申,等. 荔枝皮色素体外清除亚硝酸盐作用研究[J]. 食品科学,2010(5):104-107.
- [11] 王晓波,黄香玲,刘冬英,等. 鸡骨草总黄酮清除自由基及抑制亚硝化作用研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(4):942-944.
- [12] 王瑞凤,刘元英. α -萘胺比色法测定水中亚硝酸盐氮的研究[J]. 山西水利科技,1996(1):86-88.