

毛豹皮樟叶水提物的活性成分及其清除亚硝酸钠和 阻断亚硝胺合成的作用

苟琳^a, 王春薇^b, 倪苏^{b, ①}, 钟宣伯^b

(四川农业大学: a. 生命科学学院, b. 农学院, 四川 成都 611130)

Active components in water extracts from leaf of *Litsea coreana* var. *lanuginosa* and its effects on scavenging sodium nitrite and blocking nitrosamine synthesis GOU Lin^a, WANG Chunwei^b, NI Su^{b, ①}, ZHONG Xuanbo^b (Sichuan Agricultural University: a. College of Life Science, b. College of Agronomy, Chengdu 611130, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(1): 102-104

Abstract: Contents of total polyphenols and total flavonoids in water extracts from leaf of *Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P. H. Huang were determined, and effects of these water extracts on scavenging sodium nitrite (NaNO_2) and blocking nitrosamine synthesis were studied. The results show that contents of total polyphenols and total flavonoids in water extracts from leaf of *L. coreana* var. *lanuginosa* are 4.64% and 2.96%, respectively. With enhancing of mass concentration of water extracts, both NaNO_2 scavenging rate and blocking rate of nitrosamine synthesis increase gradually, and there are obvious dose-effect relationships between mass concentration of water extracts with NaNO_2 scavenging rate and blocking rate of nitrosamine synthesis, their half-effect dose (ED_{50}) are 0.06 and 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. It is suggested that the effects of water extracts from leaf of *L. coreana* var. *lanuginosa* on scavenging NaNO_2 and blocking nitrosamine synthesis are related to polyphenols and flavonoids in the water extracts.

关键词: 毛豹皮樟叶; 总多酚; 总黄酮; 清除亚硝酸钠; 阻断亚硝胺合成; 半效剂量(ED_{50})

Key words: leaf of *Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P. H. Huang; total polyphenols; total flavonoids; scavenging sodium nitrite; blocking nitrosamine synthesis; half-effect dose (ED_{50})

中图分类号: S571.9; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)01-0102-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.01.13

亚硝酸盐在食材、食品加工和食品储存过程中普遍存在,它是亚硝基化合物合成的前体物质,在一定条件下亚硝酸盐极易转化为亚硝胺,二者均可致癌^[1-2],因此,清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成对于预防和控制癌症的发生具有重要意义。关于清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的研究已有较多报道,一些植物含有的天然活性成分,如植物中所含的多酚和黄酮类物质等,具有抗氧化、抗菌、清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的作用。顶羽菊[*Acroptilon repens* (Linn.) DC.]^[3]、黄花菜(*Heremacallis citrina* Baroni)^[4]和筋菜[*Acanthopanax trifoliatum* (Linn.) Merr.]^[5]等提取物具有清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的作用;黄俊生^[6]从南姜[*Alpinia galanga* (Linn.) Willd.]表皮中提取的色素也具有较强的清除亚硝酸钠和阻断亚硝胺合成活性。

毛豹皮樟[*Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P. H. Huang]为樟科(Lauraceae)木姜子属(*Litsea* Lam.)植物^[7],其嫩叶经加工后为老鹰茶或白茶。毛豹皮樟叶中含有多酚、黄酮和多糖等生物活性成分^[8-10],具有抗氧化、抗病毒

和降血糖等作用^[11-13],但关于毛豹皮樟叶水提物清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的研究却鲜见报道。为此,作者测定了毛豹皮樟叶水提物中总黄酮和总多酚的含量,并在体外模拟人体胃液(pH 3.0)条件下研究毛豹皮樟叶水提物清除亚硝酸钠(NaNO_2)及阻断亚硝胺合成的作用,以期为毛豹皮樟资源的进一步开发和利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料毛豹皮樟叶由四川雅安市名山区双河乡老鹰茶园提供,并经四川农业大学杨瑞武教授鉴定。新鲜叶晒干后于60℃烘干6h,粉碎并过60目筛,干燥保存、备用。

主要试剂:芦丁(纯度 $\geq 95\%$)购自美国Sigma-Aldrich公司;二甲胺水溶液(质量分数33%)为国产化学纯;没食子酸、 NaNO_2 、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺和 α -萘胺等其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971795)

作者简介: 苟琳(1963—),女,四川成都人,硕士,副教授,主要从事生物化学及分子酶学方面的研究。

①通信作者 E-mail: ns13@163.com

主要仪器:FW80型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂);UV-1200型紫外/可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);ESJ-B系列多功能电子分析天平(沈阳龙腾电子有限公司);DK-8D三孔电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有限公司);SC-04低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 叶水提物的制备 称取1.0 g叶粉末样品,按固液比1:30(m:V)加蒸馏水浸润5 min后煮沸5 min,冷却至室温,6 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液;沉淀加30 mL蒸馏水后再煮沸2 min,冷却至室温,6 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液,余下沉淀重复此操作1次。合并3次上清液并用蒸馏水定容至100 mL,配制成质量浓度10 mg·mL⁻¹叶水提物溶液。

1.2.2 总多酚和总黄酮含量的测定 采用Folin-Ciocalteu法^[14]测定毛豹皮樟叶水提物中的总多酚含量。以没食子酸为标准品,于波长765 nm处测定吸光值;并以吸光值(Y)为纵坐标,没食子酸质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得到的线性回归方程为 $Y=0.0094X+0.0073$ ($R^2=0.9991$)。按同法测定毛豹皮樟叶水提物溶液的吸光值,根据标准曲线方程计算总多酚含量。实验重复3次。

采用硝酸铝-亚硝酸钠法^[15]测定毛豹皮樟叶水提物中的总黄酮含量。以芦丁为标准品,于波长510 nm处测定吸光值;并以吸光值(Y)为纵坐标,芦丁质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得到的线性回归方程为 $Y=11.68X+0.0039$ ($R^2=0.9995$)。按同法测定毛豹皮樟叶水提物溶液的吸光值,根据标准曲线方程计算总黄酮含量。实验重复3次。

1.2.3 对NaNO₂清除率的测定 采用盐酸萘乙二胺法^[16]测定质量浓度0.00、0.02、0.04、0.20、0.40、0.80、1.20和1.60 mg·mL⁻¹毛豹皮樟叶水提物对NaNO₂的清除率。分为3组处理,其中,A₀为检测体系中添加NaNO₂但不添加叶水提物溶液,A₁为检测体系中添加NaNO₂和叶水提物溶液,A₂为检测体系中添加叶水提物溶液并添加同体积蒸馏水代替NaNO₂;分别在波长538 nm处测定吸光值,并按公式“NaNO₂清除率= $\frac{A_0-(A_1-A_2)}{A_0} \times 100\%$ ”计算NaNO₂清除率。实验重复3次。

1.2.4 对亚硝酸合成阻断率的测定 采用 α -萘胺法^[17]测定质量浓度0.00、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40和0.48 mg·mL⁻¹毛豹皮樟叶水提物对亚硝酸合成的阻断率。分为3组处理,其中,A₀为检测体系中不添加叶水提物溶液,A₁为检测体系中添加叶水提物溶液,A₂为检测体系中添加叶水提物溶液但不添加NaNO₂;分别在波长525 nm处测定吸光值,同时做空白对照实验;按公式“亚硝酸合成阻断率= $\frac{A_0-(A_1-A_2)}{A_0} \times 100\%$ ”计算亚硝酸合成的阻断率。实验重复3次。

1.3 数据处理

采用SPSS 16.0统计分析软件对实验数据进行统计分析,

并使用该软件中的Curve Estimation模块进行曲线拟合,选择最优模型,确定NaNO₂清除率和亚硝酸合成阻断率分别为50%时毛豹皮樟叶提取物的质量浓度(半效剂量ED₅₀)。

2 结果和分析

2.1 叶水提物中总多酚和总黄酮的含量

测定结果显示:毛豹皮樟叶水提物中总多酚含量为4.64%,总黄酮含量为2.96%。

2.2 叶水提物对NaNO₂的清除作用

随质量浓度提高,毛豹皮樟叶水提物对NaNO₂清除率的变化趋势见图1。结果显示:随毛豹皮樟叶水提物质量浓度的提高,NaNO₂清除率逐渐升高;当水提物质量浓度在0.02~0.20 mg·mL⁻¹时,NaNO₂清除率急速升高;当水提物质量浓度高于0.40 mg·mL⁻¹时,NaNO₂清除率增幅趋缓并趋于稳定。当毛豹皮樟叶提取物质量浓度为1.60 mg·mL⁻¹时,NaNO₂清除率可达99.1%。毛豹皮樟叶水提物质量浓度(X)与NaNO₂清除率(Y)的拟合方程为: $Y=e^{\frac{-0.0353}{X}+4.5456}$ ($R^2=0.964$),据此方程计算出NaNO₂清除率达50%时毛豹皮樟叶水提物的质量浓度(半效剂量ED₅₀)为0.06 mg·mL⁻¹。

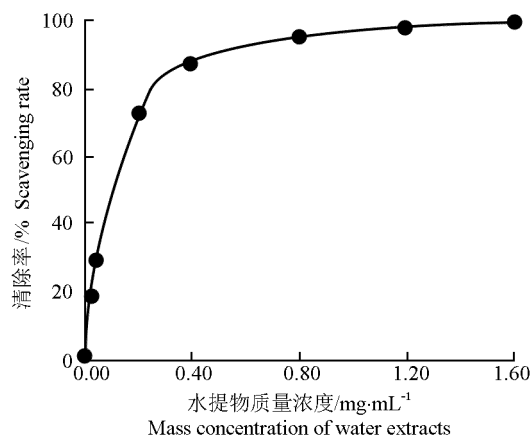


图1 不同质量浓度毛豹皮樟叶水提物亚硝酸钠清除率的变化
Fig. 1 Change in sodium nitrite scavenging rate of water extracts with different mass concentrations from leaf of *Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P. H. Huang

2.3 叶水提物对亚硝酸合成的阻断作用

随质量浓度提高,毛豹皮樟叶水提物对亚硝酸合成阻断率的变化趋势见图2。结果显示:随叶水提物质量浓度的提高,亚硝酸合成阻断率逐渐升高;当提取物质量浓度达到0.48 mg·mL⁻¹时,亚硝酸合成阻断率为63.3%。毛豹皮樟叶水提物的质量浓度(X)与亚硝酸合成阻断率(Y)的拟合方程为 $Y=-218.631X^2+217.543X+9.259$ ($R^2=0.997$),据此方程计算出亚硝酸合成阻断率达50%时毛豹皮樟叶水提物的质量浓度(半效剂量ED₅₀)为0.25 mg·mL⁻¹。

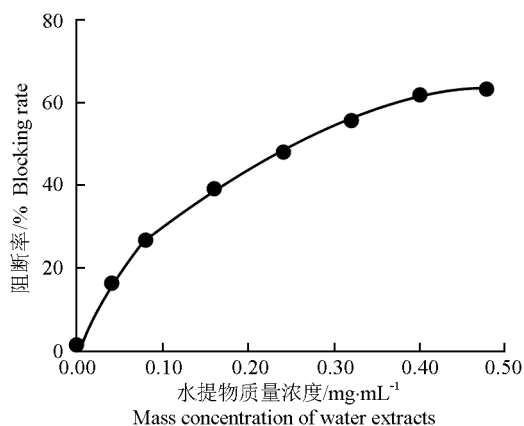


图2 不同质量浓度毛豹皮樟叶水提取物亚硝胺合成阻断率的变化
Fig. 2 Change in blocking rate of nitrosamine synthesis of water extracts with different mass concentrations from leaf of *Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P. H. Huang

3 讨 论

在生物的体内和体外系统中多酚和黄酮类成分都具有较强的清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的作用^[18-19]。本研究结果显示:毛豹皮樟叶水提取物中总多酚和总黄酮的含量分别为4.64%和2.96%,该水提取物对NaNO₂的清除作用和对亚硝胺合成的阻断作用均较为明显;并随水提取物质量浓度的提高,NaNO₂清除率和亚硝胺合成阻断率也逐渐升高,表明出一定的量效关系。据此推测毛豹皮樟叶水提取物对亚硝酸盐的清除作用和对亚硝胺合成的阻断作用可能与叶片中所含的多酚和黄酮类成分有关,但其相关性有待进一步研究。综上所述,毛豹皮樟叶水提取物能有效清除亚硝酸盐并阻断亚硝胺的合成,因此,可以将毛豹皮樟叶进行深入研究并开发成相关保健产品。

参考文献:

[1] 黄宗海,田宇静,马丽珍. N-亚硝胺及亚硝酸盐测定与相关性分析[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(12): 79-81.
[2] 徐专红. 食品中的硝酸盐和亚硝酸盐与人体健康[J]. 食品科技, 1999(4): 53-55.
[3] 库尔班·吐松,展锐,张宏,等. 顶羽菊提取物清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成能力的研究[J]. 生物技术, 2010, 20(1): 57-59.

[4] 傅茂润,陈庆敏,茅林春. 黄花菜提取物对亚硝化反应的抑制能力研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 114-119.
[5] 张成,兰阳,袁麒,等. 筋菜茶提取液对亚硝化反应清除和阻断作用的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 53-56.
[6] 黄俊生. 南姜表皮花青素清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 243-246.
[7] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志: 第三卷[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 34.
[8] 陈玉璞,程文明,李俊. 老鹰茶中黄酮类化学成分分析[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(1): 65-67.
[9] 沈君子,叶明,舒阿庆,等. 老鹰茶(*Litsea coreana* Lévl. var. *lanuginosa*)多酚类化合物的提取纯化及EGCG含量测定[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 36(3): 329-334.
[10] JIA X J, DING C B, YUAN S, et al. Extraction, purification and characterization of polysaccharides from Hawk tea[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99: 319-324.
[11] JIA X J, DONG L H, YANG Y, et al. Preliminary structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from Hawk tea (*Litsea coreana* var. *lanuginosa*) [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95: 195-199.
[12] 吕雄文,李俊,邹宇宏,等. 老鹰茶总黄酮降血糖作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(2): 119-121.
[13] 曾凡力,周敏,许敏,等. 贵州老鹰茶提取物体外抗单纯疱疹病毒1型活性的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 282-284.
[14] 石雪萍,吴亮亮,高鹏,等. 20种食用辛香料抗氧化性及其与黄酮和多酚的相关性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 83-86.
[15] 陈志红,徐美奕. 香菜乙醇提取液的体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(11): 69-71.
[16] 吴佳,解成喜. 石榴皮总黄酮的提取工艺及抑制亚硝化反应[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 111-114.
[17] 吴春,黄梅桂. 槲皮素-锌(II)配合物体内抑制亚硝胺合成的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 35-38.
[18] 贾长虹,常丽新,杨亚男,等. 玫瑰叶黄酮提取及其对亚硝酸盐的清除作用[J]. 食品与机械, 2009, 25(5): 78-81.
[19] 刘钢,贾冬英,赵甲元,等. 石榴皮多酚提取物对亚硝酸盐的体外清除作用研究[J]. 中国调味品, 2011, 36(7): 41-44.

(责任编辑:张明霞)