

桑椹醇提取物清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究

廖素凤^{1,2,3}, 刘鑫义³, 刘江洪^{1,3}, 杨志坚¹, 郑金贵^{1,2,3*}

¹福建农林大学 福建省作物生物技术高校重点实验室; ²福建农林大学 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室;

³福建农林大学 福建省特种作物育种与利用工程技术研究中心, 福州 350002

摘要:为系统评价桑椹醇提取物对亚硝化反应的体外抑制活性,在体外不同桑椹品种、浓度和作用时间条件下,实验研究了桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除和二乙基亚硝胺(NDEA)生成的影响及其相关功能成分含量。结果显示,不同品种的桑椹总酚、原花青素和总黄酮含量差异显著,PR-01黑果桑的原花青素含量(155.41 mg/g)和总黄酮含量(3.05 mg/g)最高;随浓度提高和作用时间延长,桑椹醇提取物清除亚硝酸盐和阻断NDEA合成能力增强。15种桑椹醇提取物对亚硝化反应均具有一定的抑制作用,以PR-01黑果桑的效果最显著,其最大清除率和阻断率分别达到92.40%和87.25%,与抗坏血酸效果相当;桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除率和对NDEA合成的阻断率与其总酚、原花青素、总黄酮含量呈一定的相关性。综上:桑椹醇提取物具有较好的清除亚硝酸盐和阻断NDEA合成的作用,原花青素、多酚类、黄酮类物质可能是其发挥作用的物质基础。

关键词:桑椹醇提取物;亚硝酸盐;二乙基亚硝胺;总酚;原花青素;总黄酮

中图分类号:R284.3

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)3-0466-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.3.016

Investigation of nitrite scavenging and N-nitrosodiethylamine formation inhibiting with mulberry alcohol extraction

LIAO Su-feng^{1,2,3}, LIU Xin-yi³, LIU Jiang-hong^{1,3}, YANG Zhi-jian¹, ZHENG Jin-gui^{1,2,3*}

¹Key Laboratory of Fujian Province for Crop Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

²Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University;

³Fujian engineering and technology research center of breeding and utilization for Special crop, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: The effect of mulberry (*Fructus Mori*) alcohol extraction (MAE) for scavenging sodium nitrite and inhibiting the formation of N-nitrosodiethylamine (NDEA) was systematically investigated *in vitro* and the correlation between the capability of scavenging sodium nitrite, inhibiting NDEA synthesis and the contents of related functional components from fifteen mulberry samples was also analyzed. The results showed that there were significant differences in the total phenolics, procyanidins and total flavonoids contents of mulberry from different producing areas or different mulberry cultivars, among which, the black mulberry variety PR-01 showed the highest content of procyanidins (155.41 mg/g) and total flavonoids (3.05 mg/g). With the content of MAE increasing and reaction time extending, the effect on nitrite scavenging and NDEA formation in simulated gastric acid was enhanced. The MAE from fifteen mulberries had different effects on nitrite scavenging and NDEA formation inhibition. The extracts of PR-01 mulberry presented the best nitrite scavenging and NDEA formation inhibition effects with the maximum scavenging rate of sodium nitrite and blocking synthesis of NDEA at 92.40% and 87.25%, respectively, which were equivalent to that of ascorbic acid. Total phenolics, procyanidins and total flavonoids demonstrated correlations with the nitrite scavenging and synthesis blocking of NDEA. In conclusion, mulberry alcohol extracts has a potent ability to scavenge nitrite and block the synthesis of nitrosamines, and polyphenols, procyanidins, flavonoids may be the main bioactive compo-

收稿日期:2018-07-27 接受日期:2019-02-18

基金项目:国家科技部支撑计划(2013BAD01B05);福建省农业厅“五新”项目(KLd18001A, KLd18003A, K1518017A);福建省科学技术创新平台项目(PJH13001, PJH12015);福建农林大学科技创新基金(KFA17155A, KFA17420A);福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2016156)

* 通信作者 Tel: E-mail: jingzhen@126.com

nents for it to exert these effects.

Key words: mulberry alcohol extraction; nitrite; *N*-nitrosodiethylamine; total phenolics; procyanidins; total flavonoids

亚硝胺和亚硝酸盐是环境中最常见的化学致癌物,在食物、饮料、烟草、化妆品和工业污染中普遍存在^[1]。流行病学调查表明,消化道癌症频发与机体内的亚硝胺类物质有直接关系^[2]。亚硝酸盐是亚硝胺类化合物的前体物质,在胃液环境中极易通过亚硝化反应合成 *N*-亚硝胺^[3]。因此,研究清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的有效物质对于预防和控制相关癌症的发生具有重要意义。

目前关于多酚和黄酮类物质等植物化学物质清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的研究已有较多报道^[4-6]。赵岩等^[7]比较了 38 种药用植物醇提物对亚硝酸盐的清除作用,发现小花地笋、茜草和野生葡萄(籽)等醇提取物具有较强的清除亚硝酸盐的作用,且与总酚含量呈正向相关。范金波等^[8]研究发现,桑椹提取物总酚和黄酮含量较蓝莓和黑加仑多,其抗氧化能力也均强于蓝莓和黑加仑,提示桑椹总酚、黄酮含量与其抗氧化活性相关。综上所述,食用富含多酚类和黄酮类等活性物质的各种新鲜水果、蔬菜等天然植物,可以一定程度地清除亚硝酸盐或阻断亚硝胺的合成。

桑椹(*Fructus Mori*)是桑科桑属植物的成熟果穗,为卫生部首批公布的“药食同源”食品之一^[9]。我国收集保存的 3 000 多个桑树种质资源分属于 15 个桑种 4 个变种^[10],是世界上桑椹资源最多的国家。近年来研究结果表明,桑椹除含有丰富的氨基酸、维生素、矿物质外,还含有黄酮、多酚、白藜芦醇和原花青素等活性成分^[11,12],具有抗氧化、抗肿瘤、降糖降脂和改善心血管功能等药理作用^[12,13]。

目前对多酚类、黄酮类化合物和原花青素抑制亚硝化反应的作用研究虽然较多,但其均为对特定品种植物的研究,不具有代表性,尚未发现有关桑椹活性物质清除亚硝酸盐和阻断二乙基亚硝胺(NDEA)合成作用的系统报道。本文拟采用超声辅助乙醇浸提的方法提取桑椹活性物质,在体外模拟胃液条件下探讨桑椹醇提物对亚硝酸盐的清除和对 NDEA 合成的影响,同时分析不同桑椹试样原花青素、总黄酮和总酚含量与清除亚硝酸盐、阻断 NDEA 合成作用的相关性,为研究桑椹在预防亚硝胺致癌方面的应用价值和进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 桑椹样品

辽宁大连黑果桑、山东青岛黑果桑和北京大兴黑果桑鲜果(一级),购自福州海峡果品批发交易市场;台湾四季果桑 46C016、台湾四季果桑 72C002、PR-01 黑果桑、白珍珠果桑、AH-07 果桑、野生蒙桑和推广品种栽培蒙桑,采自福建农林大学农产品品质研究所桑树种质资源圃(永泰基地),采摘时间为 2017 年 4~5 月;安徽野生桑椹冷冻果、百草味桑椹干(果脯类)购于淘宝网;新疆和田野生药桑干、北京普济仁堂桑椹干和安徽集泽堂桑椹干购于市场药店。上述桑椹鲜果均于采收后立即清洗,冷冻干燥后粉碎过 60 目筛,-80℃保存备用。

1.2 实验试剂

NDEA(纯度>99.9%,0.1 g)、亚硝酸钠(纯度为 99.999%,25 g)、没食子酸(纯度≥98%)、抗坏血酸(V_c ,纯度≥98%)和原花青素标准品(纯度≥98%,HPLC)均购自 Sigma 公司;芦丁对照品(纯度≥92.5%),购于中国药品生物制品检定所;Folin-Phenol 试剂,购于索来宝有限公司;乙腈(色谱纯),美国 Fisher 公司产品;甲醇、乙醇、碳酸钠、柠檬酸、盐酸、对氨基苯磺酸、亚硝酸钠、盐酸萘乙二胺和香草醛等试剂,购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 仪器

日立 L-2000 高效液相色谱仪(Hitachi 公司,日本),D-2000 Elite HPLC System(Hitachi 公司,日本),Waters SunFire C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,2.5 μ m,Waters 公司,美国),Infinite M200 TECAN 酶标仪(TECAN 公司,瑞士),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超市仪器有限公司,中国),3K-15 型高速冷冻离心机(Sigma 公司,德国),美国 Milli-Q Reference 型超纯水仪(厦门精艺兴业科技有限公司,中国),ALPHA 1-2LD PLUS 冻干机(Marin Christ 公司,德国)。

2 实验方法

2.1 桑椹醇提物的制备

采用乙醇为溶剂超声辅助提取桑椹活性物质^[14]:称取桑椹粉末 3.00 g,按料液比 1:25(g:mL)加入 75%乙醇(v/v)75 mL,在超声功率 200 W、35

℃条件下提取 30 min, 重复提取 3 次, 合并提取液, 过滤除渣, 滤液减压浓缩后定容, 测定原花青素、总酚和总黄酮含量, 剩余提取液浓缩冻干, 得提取物冻干粉, -80 ℃保存备用。

2.2 桑椹醇提液总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteus 法测定总酚含量^[15], 稍加修改。以没食子酸质量浓度(x , 单位 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标, 吸光度(y , 单位 A)为纵坐标, 制作标准曲线 $y = 0.0075x - 0.0125$ ($R^2 = 0.9994$)。取样品醇提液 1 mL, 按照绘制标准曲线的方法, 于波长 760 nm 下测定吸光度。以上操作重复 3 次。根据回归方程和下式计算样品中总酚含量(以没食子酸计)。

$$\text{总酚含量}(\text{mg}/\text{g}) = c \times V \times 25 \times 10^{-3} / (m \times V_1)$$

式中: c 为比色管中样品总酚浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), V_1 为反应体系中样品提取液体积(mL), V 为样品提取液总体积(mL), m 为用于提取的干粉质量(g)。

2.3 桑椹醇提液原花青素含量的测定

采用香草醛-盐酸法^[12]测定原花青素含量。以吸光度(y , 单位 A)为纵坐标, 原花青素质量浓度(x , 单位 mg/mL)为横坐标, 制作标准曲线 $y = 0.8422x - 0.0085$ ($R^2 = 0.9991$)。取稀释后的样品醇提液各 1 mL, 按照绘制标准曲线方法, 于波长 500 nm 处测定吸光度。以上操作重复 3 次。根据原花青素标准曲线和下式计算样品中原花青素含量(以原花青素计)。

$$\text{原花青素含量}(\text{mg}/\text{g}) = c \times V_1 \times X \times V / (m \times V_2)$$

式中: c 为反应液中原花青素的浓度(mg/mL), V_1 为反应液的总体积(6 mL), X 为提取液稀释的倍数, V 为待测提取液的总体积(mL), m 为用于提取的干物质重量(g), V_2 为反应液中稀释后的待测提取液体积(1 mL)。

2.4 桑椹醇提物总黄酮含量的测定

采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{Cl})_3$ 法测定总黄酮含量^[16]。以吸光度(y , 单位 A)为纵坐标, 芦丁质量浓度(x , 单位 mg/mL)为横坐标, 制作标准曲线 $y = 12.633x - 0.0336$ ($R^2 = 0.9991$)。取各样品醇提液 0.5 mL, 按照绘制标准曲线的方法, 于波长 510 nm 处测定吸光度。以上操作重复 3 次。

$$\text{总黄酮含量}(\text{mg}/\text{g}) = c \times V_1 \times V / (m \times V_2)$$

式中: c 为反应液中总黄酮浓度(mg/mL), V_1 为反应液的总体积(25 mL), V 为待测提取液的总

体积(mL), m 为用于提取的干物质重量(g), V_2 为反应液中加入的测提取液体积(0.5 mL)。

2.5 桑椹醇提物对亚硝化反应的抑制作用

2.5.1 桑椹醇提物浓度对亚硝酸盐清除率的影响

将 PR-01 黑果桑醇提物冻干粉配置成 2 mg/mL 的样品溶液(含有 1.49 mg/mL 原花青素), 分别吸取一定体积的上述样品溶液用蒸馏水配成 0.02、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL 的待测液(相当于原花青素浓度为 6、15、30、59、119、178、238、297 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

在体外模拟胃液条件下(pH3.0, 37 ℃), 采用盐酸萘乙二胺法^[7]测定不同桑椹醇提物对亚硝酸盐的清除率。在 25mL 容量瓶中准确吸取不同浓度的桑椹醇提物待测液各 1 mL, 参照赵岩等^[7]的反应方法, 以不加桑椹醇提物待测液的反应液做空白, 在 540 nm 处测定吸光值。用 V_c 做对照实验。每个样品重复检测 3 次, 用下式计算清除率:

$$\text{亚硝酸盐清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100\%$$

式中: A_0 为不加桑椹醇提物待测液的反应液的吸光度, A_1 为加入桑椹醇提物的反应液的吸光度。

2.5.2 反应时间对桑椹醇提物清除亚硝酸盐的影响

固定桑椹醇提物待测液浓度为 0.8 mg/mL , 按 2.5.1 方法研究不同反应时间(0、10、20、30、40、50、60、70、80 min)对桑椹醇提物清除亚硝酸盐的影响。用 V_c 做对照实验。

不同桑椹样品醇提物对亚硝酸盐的清除作用采用上述筛选的最佳醇提物浓度和反应时间进行清除反应, 并比较清除率。

2.5.3 二乙基亚硝胺标准曲线的制作

采用 HPLC 法检测 NDEA^[17]。利用日立 L-2000 高效液相色谱仪的 D-2000 Elite HPLC System, 吸收波长 230 nm, Waters SunFire C_{18} 反相色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 2.5 μm), 流速 0.5 mL/min , 进样量 20 μL , 流动相: 甲醇/水 = 50 / 50 (体积比), 柱温 30 ℃。用蒸馏水配制 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、15、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NDEA 标准溶液, 0.22 μm 滤膜过滤后进行液相色谱测定。以 NDEA 质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制 NDEA 的标准曲线。根据标准曲线计算样品和空白样反应体系中 NDEA 的生成量, 再根据公式计算桑椹醇提物对 NDEA 合成的阻断率。

$$\text{NDEA 合成的阻断率}(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} * 100\%$$

式中 C 和 C_0 分别为样品和空白样反应体系中 NDEA 的生成量 (μg)。

2.5.4 模拟人体胃液条件下桑椹醇提物对 NDEA 合成阻断率的测定

在各试管中加入 0.1 mol/L 柠檬酸 0.8 mL、1 mol/L 二乙胺 0.1 mL 和 100 mmol/L 亚硝酸钠 0.1 mL, 混合, 分别加入 2.5.1 配制的不同浓度的桑椹醇提物溶液 1 mL, 涡旋混合调节 pH 至 3.0。在 37 °C 条件下反应 4 h 后, 再加入 0.1 mL 的 1% 对氨基苯磺酸混匀终止反应。用 V_c 做对照实验。按 2.5.3 的方法进行液相色谱测定和计算阻断率。不同样品桑椹醇提物对 NDEA 合成的阻断实验采用上述筛选的最佳醇提物浓度进行比较。每个样品重复检测 3 次。

2.6 桑椹醇提物清除亚硝酸盐、阻断 NDEA 合成的能力与其原花青素、总酚和总黄酮含量的相关性分析

本研究应用简单的线性回归分析 15 个不同桑椹醇提物对亚硝酸盐的清除率、对 NDEA 合成的阻断率及其与醇提物中总酚、总黄酮含量之间的相关性。

2.7 数据分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 21.0 和 Excel 2013 软件进行数据统计与分析, 多重比较采用 Duncan 新复极差法。采用 GraphPad Prism 6.01 软件作图。

3 结果与分析

3.1 不同试样桑椹醇提物中原花青素、总酚和总黄酮的含量

表 1 15 个桑椹试样的原花青素、总酚和总黄酮含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The contents of procyanidins, total phenolics, total flavonoids in 15 mulberry samples ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号 No.	中文名 Chinese name	原花青素含量 Procyanidins content (mg/g)	总酚含量 Total phenolics content (mg/g)	总黄酮含量 Total flavonoids content (mg/g)
1	辽宁大连黑果桑 <i>Liaoning Dalian black mulberry (Morus nigra L.) fruit</i>	129.34 ± 3.50 ^{bB}	10.90 ± 0.21 ^{bB}	1.53 ± 0.09 ^{eE}
2	山东青岛黑果桑 <i>Shandong Qingdao black mulberry fruit</i>	138.09 ± 14.45 ^{bB}	10.90 ± 0.21 ^{bB}	2.90 ± 0.07 ^{aA}
3	北京大兴黑果桑 <i>Beijing Daxing black mulberry fruit</i>	76.87 ± 3.69 ^{dE}	10.80 ± 0.34 ^{bB}	1.54 ± 0.07 ^{eE}
4	栽培蒙桑 <i>Cultivated Morus mongolica Schneid</i>	53.52 ± 6.79 ^{eF}	4.71 ± 0.17 ^{fE}	0.41 ± 0.02 ^{gG}
5	台湾四季果桑 46C016 <i>Taiwan Morus alba L No. 46C016</i>	100.43 ± 20.09 ^{cC}	11.06 ± 0.32 ^{bAB}	2.23 ± 0.18 ^{cC}
6	台湾四季果桑 72C002 <i>Taiwan Morus alba L No. 72C002</i>	69.86 ± 5.06 ^{dEF}	11.19 ± 0.04 ^{bAB}	1.48 ± 0.16 ^{eE}
7	PR-01 黑果桑 <i>Black mulberry fruit variety PR-01</i>	155.41 ± 3.34 ^{aA}	9.46 ± 0.46 ^{cC}	3.05 ± 0.11 ^{aA}
8	白珍珠果桑 <i>White mulberry fruit</i>	15.38 ± 1.28 ^{gHI}	5.23 ± 0.95 ^{eE}	0.72 ± 0.10 ^{fF}
9	AH-07 黑果桑 <i>Black mulberry fruit variety AH-07</i>	92.87 ± 0.42 ^{cCD}	10.86 ± 0.31 ^{bB}	1.89 ± 0.10 ^{dD}
10	野生蒙桑 <i>Wild Morus mongolica</i>	91.19 ± 5.01 ^{cCD}	11.86 ± 0.15 ^{aA}	2.49 ± 0.24 ^{bB}
11	安徽野生桑椹冷冻果 <i>Anhui frozen wild mulberry fruit</i>	32.21 ± 6.84 ^{fG}	9.23 ± 0.56 ^{cC}	1.98 ± 0.06 ^{dD}
12	新疆和田野生药桑干 <i>Xinjiang Hetian dried wild medicine mulberry</i>	30.98 ± 2.06 ^{fGH}	8.32 ± 0.19 ^{dD}	0.86 ± 0.06 ^{fF}
13	北京普济仁堂桑椹干 <i>Beijing Pujirentang Trading dried mulberry</i>	15.79 ± 1.36 ^{gGHI}	8.22 ± 0.14 ^{dD}	0.84 ± 0.06 ^{fF}
14	安徽集泽堂桑椹干 <i>Anhui Jizetang dried mulberry</i>	8.33 ± 1.26 ^{shI}	5.38 ± 0.17 ^{eE}	0.88 ± 0.04 ^{fF}
15	杭州百草味桑椹干 <i>Hangzhou Be&Cheery dried mulberry</i>	2.36 ± 0.07 ^{hI}	0.79 ± 0.18 ^{fF}	0.31 ± 0.08 ^{gG}

注:同一指标中不同上标小写字母表示样品间差异达显著水平 ($P < 0.05$), 大写字母不同, 表示组间差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。下同。
Note: Different superscript lowercase letters in the same index indicated a significant difference between the samples ($P < 0.05$); Different superscript capital letters in the same index indicated a very significant difference between the samples ($P < 0.01$). Same as below.

从表 1 可知,15 种试样桑椹醇提物的原花青素、总酚和总黄酮含量存在显著差异,范围分别为 $2.36 \pm 0.07 \sim 155.41 \pm 3.34$ mg/g(以原花青素计,干基)、 $0.79 \pm 0.18 \sim 11.86 \pm 0.15$ mg/g(以没食子酸计,干基)和 $0.31 \pm 0.08 \sim 3.05 \pm 0.11$ mg/g(以芦丁计,干基),桑椹鲜果冻干粉的醇提取物中上述活性成分含量普遍高于市售桑椹干的。另外,同一季节不同产地(辽宁大连、山东青岛和北京大兴)的黑果桑原花青素和总黄酮含量存在显著差异,不同桑椹原花青素、总酚和总黄酮含量也存在显著差异,其中,引进的 PR-01 黑果桑的总黄酮和原花青素含量均最高,分别为 3.05 ± 0.11 、 155.41 ± 3.34 mg/g,是推广品种栽培蒙桑的 7.44 倍和 2.90 倍,多酚含量最高的品种是野生蒙桑,为 11.86 ± 0.15 mg/g,是栽培蒙桑的 2.52 倍,而百草味桑椹干的 3 个活性成分含量均最低。

此外,本文还分析了 PR-01 黑果桑醇提取物冻干粉的总酚类、总黄酮和原花青素含量。测定结果显示,PR-01 醇提取物冻干粉中总酚类、总黄酮和原花青素含量分别为 187.25 ± 6.35 mg/g(以没食子酸计)、 79.01 ± 4.78 mg/g(以芦丁计)和 297.12 ± 3.34 mg/g(以原花青素计),其中原花青素含量较高,黄酮含量相对较低。

3.2 模拟胃液条件下桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除效果

3.2.1 不同桑椹醇提取物浓度对亚硝酸盐清除能力的影响

如图 1 所示,随着浓度的增大,桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除率快速提高,增加到一定浓度后,清除率的增幅减缓,并趋于平稳。当桑椹醇提取物浓度为 0.8 mg/mL(其原花青素浓度为 $238 \mu\text{g/mL}$)时,对 $25 \mu\text{g NaNO}_2$ 的清除率最高达 92.07% ,仅略微低于同等条件下维生素 C 的清除能力(95.67%),表明桑椹醇提取物对亚硝酸盐具有较强的清除能力。因此,后续实验选用 0.8 mg/mL 桑椹醇提取物进行不同试样桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除实验。

3.2.2 不同作用时间下桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除率的影响

由图 2 可知,在模拟胃液条件($\text{pH 值} = 3, T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$)下,当作用时间从 0 min 增加至 60 min 时,浓度为 0.8 mg/mL 的桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除率明显上升,增加至 60 min 时清除率升至最高(86.16%),继续增加作用时间,清除率基本保持不

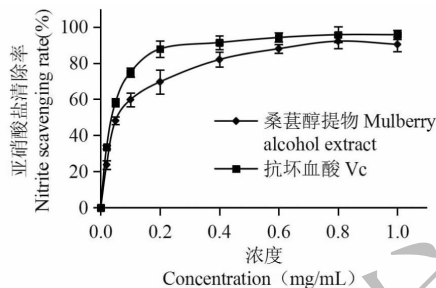


图 1 模拟胃酸条件下不同桑椹醇提取物浓度对亚硝酸盐清除能力的影响

Fig. 1 The effect of different concentration of mulberry alcohol extract on nitrite scavenging rate under simulated gastric juice

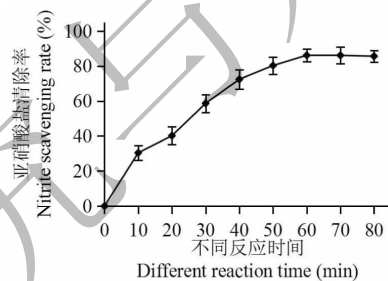


图 2 模拟胃液条件下不同反应时间对桑椹醇提取物清除亚硝酸盐的影响

Fig. 2 The effect of different reaction time on nitrite scavenging rate with mulberry alcohol extracts under simulated gastric juice

变,说明在一定时间内桑椹醇提取物对亚硝酸盐的清除率与作用时间呈正相关,超出一定时间范围清除率保持不变,所以后续实验选用 60 min 作为反应时间。

3.2.3 不同桑椹试样对亚硝酸盐的清除率比较

由表 2 可知,控制桑椹醇提物的原花青素质量浓度相同时($238 \mu\text{g/mL}$),15 种桑椹试样醇提取物对亚硝酸盐均具有一定的清除作用,但不同样品的清除能力存在较大差异,其中 PR-01 黑果桑、山东青岛黑果桑和野生蒙桑的醇提取物对亚硝酸盐的清除率均大于 80.00% ,显示出很强的亚硝酸盐清除作用;辽宁大连黑果桑、台湾四季果桑 46C016、AH-07 黑果桑和安徽野生桑椹冷冻果的醇提取物对亚硝酸盐清除率大于 50.00% ,也具有较强的亚硝酸钠清除能力。另外,冻干的桑椹鲜果普遍优于市场上的桑椹干,其中 PR-01 黑果桑的清除率最高,达 92.25% ,而百草味桑椹干的清除率最低,两者相差 19.38 倍。

表 2 15 种桑椹试样醇提物的亚硝酸盐清除率和 NDEA 合成阻断率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 The nitrite scavenging rate and blocking NDEA synthesis rate of 15 mulberry samples ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号 No.	对亚硝酸盐的清除率 Scavenging rate of nitrite (%)	对 NDEA 合成的阻断率 Blocking rates of NDEA synthesis (%)	编号 No.	对亚硝酸盐的清除率 Scavenging rate of nitrite (%)	对 NDEA 合成的阻断率 Blocking rates of NDEA synthesis (%)
1	66.06 ± 4.20 ^{eD}	46.06 ± 4.20 ^{eD}	9	70.66 ± 5.19 ^{eD}	57.33 ± 3.53 ^{cdC}
2	88.87 ± 3.47 ^{aAB}	87.20 ± 2.01 ^{aA}	10	82.15 ± 2.78 ^{bBC}	75.48 ± 4.22 ^{bB}
3	34.43 ± 1.86 ^{fGH}	47.77 ± 4.08 ^{eD}	11	50.76 ± 1.79 ^{dE}	60.76 ± 1.79 ^{cC}
4	41.00 ± 1.48 ^{eF}	21.00 ± 1.48 ^{ghEF}	12	31.68 ± 4.51 ^{fgGH}	25.01 ± 2.42 ^{fgE}
5	79.80 ± 5.84 ^{bC}	70.46 ± 5.49 ^{bB}	13	33.52 ± 3.79 ^{fGH}	17.85 ± 2.15 ^{hiFG}
6	35.18 ± 2.19 ^{fG}	55.18 ± 2.19 ^{dC}	14	26.55 ± 2.09 ^{gH}	27.22 ± 2.16 ^{IE}
7	92.25 ± 1.42 ^{aA}	87.25 ± 3.32 ^{aA}	15	4.76 ± 1.43 ^{hI}	0.97 ± 1.71 ^{hI}
8	17.10 ± 1.68 ^{hI}	13.10 ± 2.00 ^{iGH}	抗坏血酸 Vc	95.67 ± 2.97 ^{aA}	91.59 ± 3.52 ^{aA}

3.3 模拟胃酸条件下桑椹醇提物对二乙基亚硝胺形成的影响

3.3.1 二乙基亚硝胺的检测

如图 3A 所示, NDEA 标样的色谱峰尖锐, 峰形对称, 基本无拖尾现象, 分离效果较好。样品的典型色谱图见图 3B, 图中所示的是 0.05 mg/mL 桑椹醇提物对 NDEA 生成的作用。NDEA 峰型对称, 分离效果好, 与标准品的保留时间一致。以 NDEA 质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。当 NDEA 浓度为 0 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 回归方程为 $y = 2\,713.5x + 93.792$, $R^2 = 0.999\,2$, 说明有很好的线性关系。

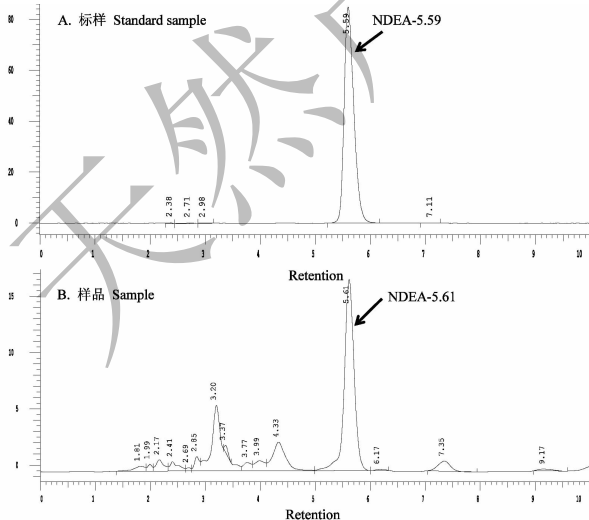


图 3 二乙基亚硝胺 (NDEA) 的色谱图

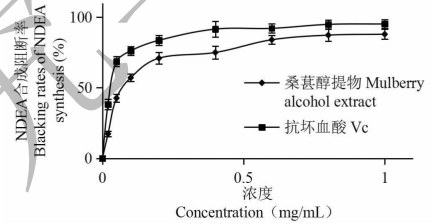
Fig. 3 The chromatogram of *N*-nitrosodiethylamine (NDEA)

图 4 模拟胃液条件下不同桑椹醇提物浓度对 NDEA 合成阻断率

Fig. 4 The effect of different concentration of mulberry alcohol extract on blocking rates of NDEA synthesis under simulated gastric juice

3.3.2 桑椹醇提物浓度对 NDEA 合成的阻断效果的影响

由图 4 可见, 在 0 ~ 0.6 mg/mL 范围内, 随着质量浓度的增加, 桑椹醇提物对 NDEA 合成的阻断率逐渐提高, 浓度大于 0.6 mg/mL 后, 阻断率趋于饱和, 变化较小 (84.01% ~ 87.94%)。同时, 在 0 ~ 0.4 mg/mL 范围内, 随着 Vc 浓度的增加, 对 NDEA 合成的阻断率快速提高至 91.58%, 继续增加 Vc 质量浓度, 二乙基亚硝胺的生成几乎被完全抑制。本研究中桑椹醇提物和 Vc 对 NDEA 合成的阻断能力的 IC_{50} 值分别为 36 $\mu\text{g/mL}$ 和 33 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 桑椹醇提物对 NDEA 合成的抑制作用趋势与 Vc 基本一致, 同等条件下其阻断效果仅略低于 Vc。

3.3.3 不同桑椹试样对 NDEA 合成阻断率的比较

各试样桑椹醇提物对 NDEA 合成的抑制率结果见表 2。由表 2 可知, 在控制原花青素质量相同

(质量浓度为 238 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,15 种桑椹试样阻断二乙基亚硝胺合成能力亦各不相同,0.8 mg/mL PR-01 黑果桑和山东青岛黑果桑对 NDEA 合成阻断作用最大,分别达到了 87.25% 和 87.20%,其次为野生蒙桑,阻断率为 75.48%,作用最弱的为百草味桑椹干,仅为 0.97%。

3.4 各试样桑椹醇提物清除亚硝酸盐、阻断 NDEA 合成的能力与其总酚和总黄酮含量的相关性

相关性分析结果显示(图 5),当醇提物中原花

青素含量相同时,本实验供试的 15 种桑椹试样醇提物对亚硝酸盐的清除率、NDEA 合成的阻断率与其总黄酮含量呈正向相关,其相关系数 R^2 分别为 0.829 6 和 0.960 8;各桑椹醇提物对亚硝酸盐的清除率和 NDEA 合成阻断率与体系中总酚含量之间呈一定的正相关,但其相关系数较小,分别为 0.529 1 和 0.639 7。以上结果表明,原花青素、多酚类物质、黄酮类物质可能是桑椹醇提物发挥作用的物质基础。

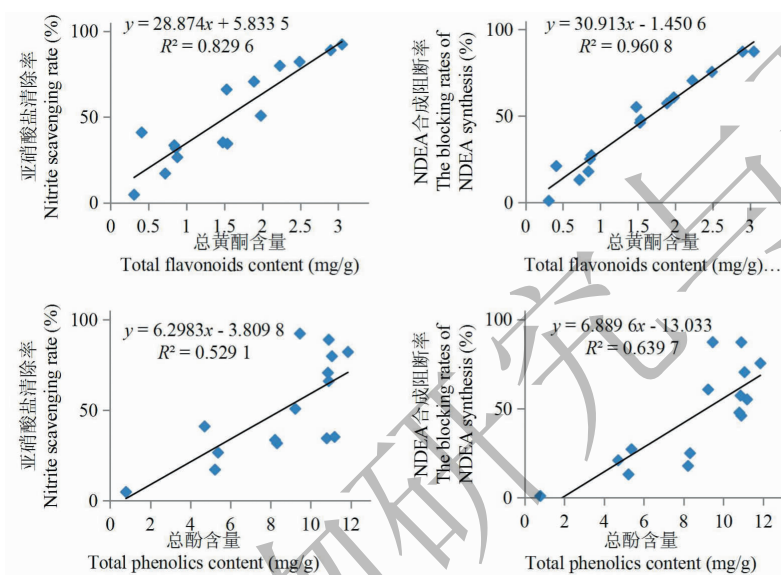


图 5 桑椹醇提物对亚硝酸盐清除率、NDEA 合成阻断率与总黄酮、总酚含量的相关性分析

Fig. 5 Correlation between nitrite scavenging rate, synthesis blocking rate of NDEA and total flavonoids content, total phenolics content of alcohol extract from fifteen mulberries samples.

4 讨论

目前从桑属植物中分离得到的化合物有近 400 个,以多糖、多酚类、黄酮类等活性物质为主^[18,19]。利用有机溶剂(60%~95%的乙醇)在低温下浸提的桑椹提取物主要为黄酮类、多酚类和原花色素类等物质^[11,20,21]。本文以 75% 乙醇提取 15 种桑椹活性物质,对其原花青素、总酚和总黄酮含量的检测结果显示,桑椹醇提物中原花青素含量占比相对较高,总酚次之,总黄酮最少;15 种桑椹醇提物的原花青素、总酚和总黄酮含量存在显著差异,以 PR-01 黑果桑的总黄酮和原花青素含量均最高,野生蒙桑的多酚含量最高,并且以黑紫色桑椹鲜果总多酚含量较为丰富,该结果与闫祝炜等^[15]研究结果一致。另外,3 个不同产地的黑果桑鲜果原花青素和总黄酮含量差异较大,福建种植的 PR-01 黑果桑总黄酮含量(3.05 mg/g)也明显高于周庆颂等测定^[22]的四川南充

的桑椹总黄酮含量(最高 2.074 mg/g)。可见,桑椹中有效成分的含量受品种、地质、环境、气候的影响。

本试验首次系统评价了富含活性成分的桑椹对亚硝酸盐的清除和 NDEA 生成的影响,结果显示,在模拟胃液条件下,随着浓度提高和反应时间延长,桑椹醇提物对亚硝酸盐的清除和阻断 NDEA 合成能力有较明显的提高,表明桑椹醇提物能在胃中有效清除亚硝酸盐和阻断 NDEA 合成,且在一定浓度范围内呈剂量依赖关系。本试验中除 4 种桑椹干及白珍珠果桑外,其它桑椹试样醇提物都表现出较好的清除 NaNO_2 及阻断 NDEA 合成的作用,其中 PR-01 黑果桑醇提物抑制亚硝化作用最强。在浓度为 0.8 mg/mL、反应时间 60 min 时,PR-01 黑果桑醇提物对 NaNO_2 的清除率最高达 92.25%,而对 NDEA 合成的阻断率也最高,达 87.25%,效果与 Vc 相当,有望作为后续防癌功能食品的开发资源。

还原性成分的种类、含量及其氧化还原特性是果蔬清除亚硝酸盐能力的关键因素^[23]。本研究结果发现,11个桑椹试样醇提物对NDEA合成的阻断率均低于对亚硝酸盐的清除率,其余4个则相反,与前人^[23]报道的一致,这可能是由于不同抗氧化剂和二乙胺竞争性与亚硝酸盐反应能力不同造成的。本试验以原花青素为基准设置不同桑椹醇提物浓度,发现其清除亚硝酸盐和阻断NDEA合成的效果随浓度的增加而提高,表明桑椹醇提物抑制亚硝化作用活性与其原花青素含量正相关。本试验相关性分析结果也显示,各样品桑椹醇提物对亚硝酸盐清除率、对NDEA合成阻断率与总黄酮、总酚含量呈一定的正相关,表明原花青素、多酚类物质、黄酮类物质可能是桑椹醇提物发挥作用的物质基础。另外,多酚类、黄酮类成分不同、含有的酚羟基数量及位置不同都可能影响到其对亚硝化反应的抑制作用。如AH-07黑果桑和野生蒙桑的醇提物原花青素含量相当,总酚和总黄酮含量不同,其清除亚硝酸盐活性亦有较大差别。因此,后续研究可进一步对桑椹醇提物进行色谱分离纯化,进一步探讨原花青素、多酚类物质和黄酮类物质的各单体结构与其抑制亚硝化作用之间的关系。这也可能是各桑椹试样醇提物对亚硝酸盐的清除率与其总酚、总黄酮含量的相关系数存在不同的原因

综上所述,桑椹醇提物富含原花青素、总酚和总黄酮等活性物质,在体外具有较好的清除亚硝酸盐和阻断NDEA合成的作用,15个桑椹试样中PR-01黑果桑表现出最高的原花青素含量(155.41 ± 3.34 mg/g)和总黄酮含量(3.05 ± 0.11 mg/g),其醇提物也具有最强的对亚硝酸盐的清除率(92.40%)和对NDEA合成的阻断率(87.25%),若开发PR-01黑果桑桑椹醇提物为食品添加剂或防癌功能食品,将对预防相关癌症具有重要的意义。

参考文献

- Zhu YF. Carcinogenesis and prevention of nitrosamines[J]. *Envir Pro & Re-cycling Econ* (环境保护与循环经济), 2008, 5:34-39.
- World Cancer Research Fund/American institute for Cancer Research. Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. continuous update project expert report [R]. Britain: WCRF, 2018.
- Huang XD, Li YH, Dai CJ, et al. Evaluation *in vitro* of scavenging effect on nitrite and interdicting effect on nitrosamine synthesis of extract from *aegiceras corniculatum*[J]. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2015, 15(9):15-22.
- Li GX, Hu XD, Sun HN, et al. Clearance effect of apple polyphenols on nitrite in mimic gastric juice[J]. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32(11):1-4.
- Zhao EL, Yang QS, Hao LQ, et al. Study on the blocking of nitrosamine synthesis and antibacterial activity of pumpkin yellow pigment[J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 2016, 32:701-704.
- Zhong XQ, Liang SS, Cai QC et al. Effect of tea infusions on inhibition of nitrosification[J]. *Food Sci Technol* (食品科技), 2014, 39(3):45-52.
- Zhao Y, Leng YT, Yu T, et al. Nitrite scavenging effect of alcohol extracts of thirty-eight medicinal plants[J]. *J Northwest A&F Univ* (西北农林科技大学学报), 2017, 45:189-202.
- Fan JB, Cai XT, Feng XQ, et al. Phenolic content and antioxidant capacity of blueberry, mulberry and blackcurrant[J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2015, 41:157-162.
- Li DX, Chen QX. Study progress of functional ingredient and development in mulberry[J]. *Chin Agri Sci Bull* (中国农学通报), 2009, 25:293-297.
- Pan YL. Progress and prospect of germplasm resources and breeding of mulberry[J]. *Sci Sericulture* (蚕业科学), 2000, 26(z1):1-8.
- Zhang XF, He Q, Zhang B, et al. Ionic liquid based ultrasonic-assisted extraction of procyanidins from mulberry[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:963-970.
- Liao SF, Liu JH, Xu M, et al. Evaluation of the liver cancer prevention of anthocyanin extracts from mulberry (*Morus alba* L.) variety PR-01[J]. *Adv Biosci Biotechnol*, 2018, 9:423-442.
- Wang Y, Xiang L, Wang C, et al. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e71144.
- Zhu CL, Chen M, Wang MH, et al. *In vitro* characterization of the anti-inflammatory effects of mulberry extract and the molecular mechanisms[J]. *Mod Food Sci Tech* (现代食品科技). 2017, 33:61-66, 37.
- Yan ZW, Lu Y, Yang T. Determination of total polyphenol in three colors of mulberries by spectrophotometry[J]. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2011, 28:325-332.
- Zhong H, Pu JS, Xiang ZH, et al. Extraction and antioxidant activity of total flavonoids from black mulberry fruit[J]. *Food Sci* (食品科学), 2014, 35(12):7-12.
- Song Y. Study of extract of polyphenol from burdock leaves

- on inhibition of nitrosification[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2016,37(14):22-24.
- 18 Natic MM, Dabic DC, Papetti A, et al. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia [J]. Food Chem, 2015;171:128-136.
- 19 Huang HP, Ou TT, Wang CJ. Mulberry and its bioactive compounds, the chemoprevention effects and molecular mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. J Tradit Complement Med, 2013,3(1):7-15.
- 20 Li BY, Yang ML, Cao JX, et al. Extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from mulberry [J]. J Yunnan Nationalities Univ(云南民族大学学报),2017,26:97-103.
- 21 Bae SH, Suh HJ. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea [J]. Food Sci Technol, 2007, 40(6):955-962.
- 22 Zhou QS, Sun RF, Yan LF, et al. Determination of total flavonoids in mulberry fruits with different origins [J]. Hubei Agri Sci(湖北农业科学),2014,53:5526-5534.
- 23 Li L, Zhang C, Zhou GH, et al. Effects of polyphenols on the nitrite scavenging and *N*-nitrosamine formation in simulated gastric acid [J]. J Nanjing Agri Univ(南京农业大学学报), 2013,36:111-116.
-
- (上接第 516 页)
- 11 Li YM, Zheng YZ, Zhang DX, et al. Expression of NMDA Receptor subunit 2B and iNOS in rat striatum by synergizing methamphetamine and human immunodeficiency virus protein tat [J]. J Kunming Med Uni(昆明医科大学学报),2017,7:1-6.
- 12 Singhakumar R, Boontem P, Ekthuwapranee K, et al. Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of neurogenesis in the adult mouse hippocampus; an *in vivo* study [J]. Neurosci Lett, 2015, 606:209-214.
- 13 Kao J, Huang E Y, Tao P. NR2B subunit of NMDA receptor at nucleus accumbens is involved in morphine rewarding effect by siRNA study [J]. Drug Alcohol Depen, 2011, 118(2-3):366-374.
- 14 Kato H, Narita M, Suzuki M, et al. Role of tyrosine kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in morphine reward [J]. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi, 2007, 42(1):13-20.
- 15 Zhou JY, Mo ZX. The effect of rhynchophylline on NR2B expression in nucleus accubens and amygdaloid of amphetamine-dependent rats [J]. Chin J Drug Depend(中国药物依赖性杂志), 2007, 1:12-19.
- 16 Zhou JY, Mo ZX. The effect of rhynchophylline on NR2B mRNA expression in nucleus of amphetamine-dependent rats [J]. Chin Pharmacol Bul(中国药理学通报), 2007, 9:1141-1145.
- 17 Zhou JY, Chen J, Zhou SW, et al. Individual and combined effects of rhynchophylline and ketamine on proliferation, NMDAR1 and GluA2/3 protein expression in PC12 cells [J]. Fitoterapia, 2013, 85:125-129.
- 18 Liu W, Peng QX, Lin XL, et al. Effect of rhynchophylline on the expression of p-CREB and sc-Fos in triatum and hippocampal CA1 area of methamphetamine-induced conditioned place preference rats [J]. Fitoterapia, 2014, 92:16-22.