

槲皮素 - 聚乙二醇固体分散体对亚硝化反应的抑制作用

吴 春¹, 车春波¹, 李俊生¹, 代丽君²

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨商业大学物流学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要: 以槐米为原料制备槲皮素。为改善槲皮素的水溶性, 以聚乙二醇为载体, 采用熔融法将其制成槲皮素-聚乙二醇固体分散体, 使其在水中的溶解度由 11.8mg/L 提高到 80.2mg/L。在模拟人体胃液的条件下, 考察该分散体对亚硝化反应的抑制作用。结果表明, 槲皮素-聚乙二醇固体分散体对亚硝化反应具有较强的抑制作用, 其对亚硝胺合成的最大阻断率达 91.3%, 对亚硝酸钠的最大清除率为 86.1%。

关键词: 槲皮素; 聚乙二醇; 固体分散体; 亚硝化

In vitro Inhibition of Quercetin-polyethylene Glycol Solid Dispersions against Nitroso Reaction

WU Chun¹, CHE Chun-bo¹, LI Jun-sheng¹, DAI Li-jun²

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. School of Logistics, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: The quercetin was prepared from *Flos Sophorae Immaturus*. To improve the solubility of quercetin in aqueous solution, the solid dispersions of quercetin-polyethyleneglycol were prepared by fusion method so as to increase quercetin as solid dispersion in water from 11.8 µg/ml to 80.2 µg/ml. Under the simulated gastric solution, the nitrosation inhibition was studied. The results showed that the solid dispersions of quercetin-polyethylene glycol have strong effects on disconnecting NDMA and scavenging sodium nitrite. The maximum disconnecting rate of NDMA is 91.3%, and the maximum scavenging rate of sodium nitrite is 86.1%.

Key words quercetin; polyethyleneglycol; solid dispersions; nitrosamine

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0053-03

亚硝胺是最令人关注的一类化学致癌物之一。它能引起人和动物的胃、肝脏等多种器官的恶性慢性肿瘤^[1]。正常情况下, 人们直接从食物中摄入的亚硝胺的量是微乎其微的, 但形成亚硝胺的前体物质却大量存在于食品中及产生于食物在体内的代谢过程中。亚硝胺在一系列酶的作用下生成亲电子的烷基自由基。正是这个烷基自由基使核酸烷化, 引起细胞遗传突变, 从而显示致癌性^[2]。因此, 阻断亚硝胺合成和清除亚硝胺的前体亚硝酸盐是防止癌症产生的有效途径。

据报道, 生物类黄酮具有广泛的抑癌和防癌作用^[3], 国内外学者对其抗癌、抗突变作用及其可能的作用机理进行了大量的研究和探讨。槲皮素(quercetin, 3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮)及其衍生物是植物界分布最广的黄酮类化

合物, 也是人类饮食中最主要的生物类黄酮, 具有抗氧化、抗自由基、抗炎抗菌、抗癌变等多种生理功能^[4], 其广泛存在于植物的花、叶、果实中, 其中槐米中的槲皮素含量高达 6% 左右。槐米为豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的干燥花及花蕾, 我国大部分地区都有生长, 具有凉血止血, 清肝泻火功能。其主要有效成分为芦丁(即槲皮素的芸香糖苷), 此外还有鞣质、鞣花酸、鞣花米甲、乙、丙素、鞣花皂苷等成分^[5]。医药工业中常采用从槐米中提取芦丁, 而后将其水解的方法来生产槲皮素。鉴于槲皮素具有良好的抗氧化活性及用于阻断亚硝胺的合成还未见报道, 本实验从槐米中提取芦丁, 将其水解制成槲皮素, 同时为改善其水溶性, 提高生物利用度, 将其制成聚乙二醇(PEG)

收稿日期: 2007-01-25

基金项目: 黑龙江省教育厅重点项目(11511Z03)

作者简介: 吴春(1962-), 女, 教授, 硕士, 研究方向为食品化学。E-mail: wuchun2005@sohu.com

固体分散体, 研究其对亚硝酸胺合成的阻断作用及对亚硝酸盐的清除作用, 最终为研究开发亚硝化反应抑制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

槐米 市购; 槲皮素标准品 美国Sigma公司; 聚乙二醇(PEG4000、PEG6000、PEG10000) 上海山浦化工有限公司; 亚硝酸钠、二甲胺、对氨基苯磺酸、 α -萘胺、N-1-萘乙二胺盐酸盐、柠檬酸钠等试剂均为分析纯。

UV365-紫外可见分光光度计、IR-435 红外分光光度计(KBr压片) 日本岛津公司; 721分光光度计 上海第三分析仪器厂; UV-8 三用紫外分析仪 无锡科达仪器厂。

1.2 槲皮素标准曲线的绘制

以50%乙醇水溶液为溶剂, 配制槲皮素溶液(浓度2~16 μ g/ml)在最大吸收波长370nm处分别测定其吸光度, 而聚乙二醇在200~400nm范围内无吸收, 对槲皮素无干扰。以吸光度A对浓度C进行线性回归。得回归方程为: $A=0.0591C+0.0041$, $R=0.9992$ 。

1.3 槲皮素的制备

取一定量的槐米粉碎后, 按料液比为1:6(g/ml)加入饱和石灰水溶液, 直火加热1h, 趁热抽滤, 残渣反复提取3次, 合并滤液, 然后用15% HCl中和, 调节pH值为3~4, 放置2h, 抽滤, 干燥得芦丁粗提物。将芦丁粗提物按1:200加水重结晶, 得精制芦丁。

取上述精制芦丁, 按1:80加入2% H_2SO_4 , 直火加热1h, 冷却抽滤, 残渣水洗至中性, 用95%乙醇重结晶, 得槲皮素精品。

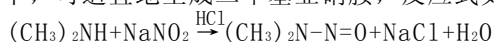
1.4 槲皮素-聚乙二醇固体分散体的制备及溶解度的测定^[6]

将聚乙二醇置入蒸发皿中。于70℃水浴锅上加热至溶解。将槲皮素(与聚乙二醇质量比为1:5)加入其中, 使其均匀分散后, 立即置于冰箱内低温骤冷。冷冻维持30min后, 于干燥器内干燥, 粉碎, 得到固体分散体。

取槲皮素20mg及槲皮素-PEG固体分散体(相当于槲皮素20mg), 分别加水20ml配成溶液, 在25℃搅拌6h(使溶解达饱和), 分别取样5ml, 过0.45 μ m微孔滤膜, 取滤液3ml, 加体积分数40%甲醇精确定容, 在370nm处测定吸光度, 代入标准工作曲线计算试样中槲皮素的浓度, 再折算回饱和水溶液的浓度。

1.5 阻断亚硝酸胺合成的原理^[2]

在模拟人体胃液的条件下, 二甲胺与亚硝酸钠在37℃条件下, 可适宜地生成二甲基亚硝酸胺, 反应式如下:

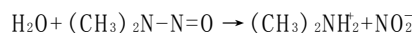


当往槲皮素-PEG固体分散体中依次加入二甲胺与亚

硝酸钠时, 槲皮素-PEG固体分散体优先同亚硝酸钠作用, 使得二甲胺不能与亚硝酸钠反应, 达到阻止亚硝酸胺生成的目的。据此可以比较相同条件下生成亚硝酸胺的多少来反映槲皮素-PEG固体分散体阻断能力的强弱, 生成亚硝酸胺量少, 阻断能力就强, 反之则弱。

1.6 NDMA合成阻断率的浓度梯度实验

在紫外光照射下, 二甲基亚硝酸胺可分解成二甲基仲胺和亚硝酸根, 反应式如下:



亚硝酸根与对氨基苯磺酸重氮化后, 再与 α -萘胺偶合生成红色化合物。用分光光度计测出该化合物的吸光度可计算上述反应液中亚硝酸胺含量的多少。

取pH 3.0的柠檬酸钠-盐酸缓冲液25ml, 加入1mmol/L $NaNO_2$ 2.5ml, 再加入1mmol/L二甲胺2.5ml及一定量的槲皮素-PEG固体分散体, 将反应体系定容至50ml, 在37℃下恒温1h。用移液管吸取1.0ml该溶液加到7cm²的培养皿中, 加入0.5%的 Na_2CO_3 溶液0.5ml, 紫外灯照射15min, 取出后加1%对氨基苯磺酸溶液1.5ml, 再加0.1%的 α -萘胺1.5ml, 加水至溶液体积精确为5.0ml, 摇匀放置15min后, 用分光光度计在525nm处测吸光度(A_x)。同时做空白实验(A_0), 计算阻断率。

$$\text{阻断率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$$

1.7 $NaNO_2$ 清除率的浓度梯度试验

亚硝酸盐在弱酸性的条件下, 能与氨基苯磺酸重氮化后, 再与N-1-萘乙二胺盐酸盐偶合生成红色的化合物。在50ml容量瓶中, 加入25ml pH3.0的柠檬酸钠-盐酸缓冲液及一定量的槲皮素-PEG固体分散体, 再加入100mg/kg的 $NaNO_2$ 溶液5ml, 用蒸馏水定容至刻度, 37℃下恒温1h, 然后各吸取1ml反应液于7cm²的培养皿中, 加入0.4%的对氨基苯磺酸溶液2ml, 0.2%的N-1-萘乙二胺盐酸盐溶液2ml, 摇匀放置15min后, 用分光光度计在540nm处测吸光度(A_x), 同时做空白实验(A_0), 计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 槲皮素的结构印证

对自制槲皮素进行紫外光谱和红外光谱检测, 结果表明, 自制的槲皮素在370nm处有一强吸收, 而该波长处正是槲皮素的特征吸收峰, 自制槲皮素的红外光谱图与对照品相比较, 其特征峰位置基本一致。确证本实验所得晶体为槲皮素。

2.2 槲皮素及其固体分散体的溶解度

不同相对分子质量的聚乙二醇其固载槲皮素的量有所不同, 为了确定不同的聚乙二醇增溶的能力大小, 分别采用相对分子质量为4000、6000、10000的聚乙二醇与槲皮素形成固体分散体, 并测定其在水中的溶解度, 结果见表1。

表1 槲皮素及其固体分散体的溶解度(mg/L, 25℃)
Table 1 Solubility of quercetin and solid dispersions of quercetin-PEG (mg/L, 25℃)

槲皮素	固体分散体		
	PEG4000	PEG6000	PEG10000
11.8	40.5	72.6	80.2

由表1可知, 固体分散体对槲皮素有较大程度的增溶作用, 随着PEG相对分子质量的增大, 固体分散体中槲皮素的溶解度增加, 其中PEG10000最大程度的对槲皮素增溶, 使其在水中的溶解度由11.8mg/L提高到80.2mg/L。所以选用PEG10000作为槲皮素载体的固体分散体进行以下的实验研究。

2.3 槲皮素-PEG固体分散体对NDMA合成阻断作用的浓度效应

不同浓度的槲皮素-PEG固体分散体对NDMA合成的阻断作用结果见图1。

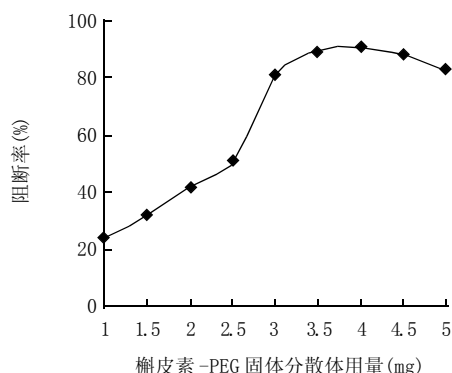


图1 槲皮素-PEG固体分散体对亚硝胺合成的阻断率

Fig.1 Capabilities of disconnecting NDMA by quercetin-PEG solid dispersions

由图1可知, 随着槲皮素-PEG固体分散体用量的增多, 阻断率呈现出明显的梯度变化, 先增后减。刚开始时阻断率迅速上升, 特别在加入2.5~3mg时, 突变最大, 由50.6%跃迁到81.6%。当用量达到3.5mg时, 阻断率提高缓慢, 峰值出现在用量4mg处, 最大阻断率达91.3%。当用量超过4mg时, 其对NDMA合成的阻断率有下降趋势, 这可能是因为槲皮素浓度过高时, 容易发生自身氧化聚合, 导致活性降低, 所

以适量的槲皮素-PEG固体分散体对亚硝化反应具有良好的抑制作用。

2.4 槲皮素-PEG固体分散体对NaNO₂清除作用的浓度效应

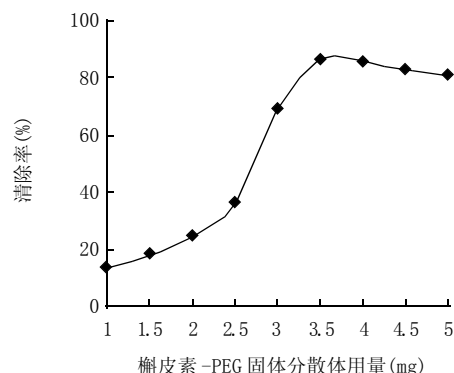


图2 槲皮素-PEG固体分散体对亚硝酸钠的清除率

Fig.2 Capabilities of scavenging NaNO₂ by quercetin-PEG solid dispersions

不同浓度的槲皮素-PEG固体分散体对NaNO₂清除作用结果见图2。由图2可知, 当槲皮素-PEG固体分散体用量在1~3.5mg时, 其对亚硝酸钠的清除率逐渐增加, 此过程中突变最大的出现在2.5~3mg之间, 阻断率增大将近三十二个百分点之多。最大清除率为86.1%, 出现在用量为3.5mg时。

3 结论

通过上述体外模拟胃液条件下, 对槲皮素-PEG固体分散体抑制亚硝化反应的活性研究, 不难看出无论是阻断亚硝胺的合成, 还是清除其前体亚硝酸盐, 槲皮素-PEG固体分散体均表现出较高的活性, 而且其制备工艺简单, 原料槐米资源丰富, 具有一定的开发应用价值。

参考文献:

- [1] 陈忻, 刘爱文, 陈纯馨, 等. 壳聚糖及其衍生物对亚硝化反应的抑制作用[J]. 精细化工, 2005, 22(3): 209-211.
- [2] 袁毅桦, 陈忻, 陈纯馨, 等. 柚皮提取物对亚硝化反应抑制作用研究[J]. 化学世界, 2004, 45(1): 26-28, 34.
- [3] 卢志强, 姜红祥. 植物活性成分与癌症的化学预防[J]. 中草药, 2002, 33(6): 563-566.
- [4] 王艳芳, 王新华, 朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 171-173.
- [5] 何勤, 徐雄良, 柯尊洪, 等. 正交试验法优选槐米中槲皮素的提取工艺[J]. 中草药, 2003, 34(5): 409-412.
- [6] 李宝红, 张立坚, 东野广智, 等. 不同相对分子质量聚乙二醇对槲皮素的增溶作用[J]. 西北药学杂志, 2004, 19(4): 171-172.