

琯溪蜜柚果皮提取物抑制亚硝化反应的研究

黄高凌, 翁聪泽, 倪 辉, 肖安风, 蔡慧农*

(集美大学生物工程学院, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

摘 要: 本实验以乙醇、丙酮和水作为提取剂, 对柚皮中的活性物质进行提取, 通过正交试验确定出最佳提取条件; 在模拟人体胃液环境条件下, 采用比色法和紫外光解法分别测定了柚皮提取液对亚硝酸根的清除作用和对亚硝酸合成的阻断作用。结果表明, 以乙醇为提取剂的最佳提取条件为: 90% 乙醇、60℃ 水浴冷凝回流, 提取时间 1h; 提取液对亚硝胺、亚硝酸钠的最大阻断率和清除率分别为 95.5% 和 91.8%。同时比较了柚皮提取物阻断亚硝胺合成及消除亚硝酸钠的效果。

关键词: 亚硝胺; 亚硝酸盐; 柚皮提取物; 抑制

Study on Inhibition of Extract from Guaixi Pomelo Peel to Nitrosation

HUANG Gao-ling, WENG Cong-ze, NI Hui, XIAO An-feng, CAI Hui-nong*

(School of Bio-engineering, Jimei University, Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: The active substance from Guaixi pomelo peel was extracted through different solvents such as ethanol, acetone and distilled water. The optimum extraction conditions were obtained by the orthogonal test: 90% ethanol in 60℃ water bath condenser extracting 1 hour. The maximum inhibition capability of the extract to nitrosamine ethylamine and scavenging sodium nitrite capability were 95.5% and 91.8%, respectively, and the inhibition capability of the extract to nitrosamine ethylamine and scavenging sodium nitrite capability were compared.

Key words nitrosation; sodium nitrite; shaddock peel extract; inhibition

中图分类号: S666.3 Q621.2554

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0036-04

收稿日期: 2007-09-30

*通讯作者

基金项目: 福建省自然科学基金项目(B0610030); 厦门市科技计划项目(3502Z20063016)

作者简介: 黄高凌(1966-), 女, 副教授, 研究方向为食品化学。

参考文献:

- [1] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. *Nutrition*, 1997, 127: 1395-1400.
- [2] TOMOTAKE H, SHIMAOKA I, KAYASHITA J, et al. A buckwheat protein products suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters[J]. *Nutrition*, 2000, 130(7): 1670-1674.
- [3] LAMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [4] FU T J, ABBOT U R, HATZOS C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 7154-7160.
- [5] NUNES A, CORREIA I, BARROS A, et al. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 2052-2058.
- [6] IWAMI K, SAKAKIBARA K, IBUKI F. Involvement of post-digestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50: 1217-1222.
- [7] GE S J, BAI H, YUAN H S, et al. Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 50: 161-170.
- [8] ZHENG G H, SOSULSKI F W, TYLER R T. Wet-milling, composition and functional properties of starch and protein isolated from buckwheat groats[J]. *Food Research International*, 1998, 30: 493-502.
- [9] FUJINO K, FUNATSUKI H, INADA M, et al. Expression, cloning, and immunological analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seed storage proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 1825-1829.
- [10] MARQUEZ M C, FERNANDEZ V, ALONSO R. Effect of dry heat on the *in vitro* digestibility and trypsin inhibitor activity of chickpea flour[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1998, 33: 527-532.

硝酸盐在微生物或催化剂的作用下,与二级胺作用生成种类繁多的N-亚硝基化合物。亚硝胺是最令人关注的一类化学致癌物^[1],它能引起人体和动物的肝脏等多种器官的恶性肿瘤,目前已发现的120多种N-亚硝基化合物中有80%具有较强的致癌性。其致癌机理为:在酶作用下,先在烷基的碳原子上进行羟基化,形成羟基亚硝胺,再经脱醛作用,生成单烷基亚硝胺,再经脱氮作用,形成亲电子的烷基自由基,后者在肝脏或细胞内使核酸烷基化,生成烷基鸟嘌呤,引起细胞遗传突变,从而显示致癌性。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于合成亚硝胺。唾液是人体将硝酸盐转化为亚硝酸盐的主要渠道,蔬菜中大量硝酸盐,在口内唾液腺分泌和酶的催化作用下,很容易还原为亚硝酸盐,而胃酸的条件也很适合亚硝化反应的进行。癌症乃是当前威胁人类生活的最大杀手。因此,抑制亚硝化反应的研究直接关系到人体健康。

柚皮中含有大量柚皮甙等黄酮类生理活性物质的^[2-3],国内外对柚皮提取物的研究非常活跃^[4-6]。从防癌抗癌角度考虑,可以采取阻断亚硝胺合成,清除亚硝胺前体或烷基自由基来达到防癌目的。研究表明,柚皮的有效提取成分对亚硝胺合成反应具有抑制效果^[7-8]。本研究以此为出发点,从蜜柚果皮中提取活性物质,探究柚皮中抑制亚硝化反应的活性物质的最佳提取条件,并在模拟人体胃液环境条件下,采用比色法^[9]和紫外光解法^[10]分别测定柚皮提取液对亚硝酸根的清除作用和对亚硝胺合成的阻断作用,研究柚皮提取物阻断亚硝胺合成及消除亚硝酸钠的效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

琯溪蜜柚柚皮 本地市场水果摊收集。

无水乙醇、丙酮、一水柠檬酸、氢氧化钠、柠檬酸钠、37%盐酸、亚硝酸钠、33%二甲胺水溶液、碳酸钠、对氨基苯磺酸、 α -萘胺和N-1-萘乙二胺盐酸盐,以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器

紫外-可见分光光度计 Cary50 瓦里安公司;HHS 电热恒温水浴锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电热鼓风干燥箱 DHG/9146H 上海精宏实验设备有限公司;电子分析天平 FA1004 上海精科天平有限公司;精密酸度计 PH211C 北京哈纳科仪科技有限公司;SKZ-III 循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂;ZF-20C 暗箱式紫外分析仪 上海宝山顾村电光仪器厂;FW100 高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;KQ-500DA 型

数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 柚皮提取液的制备

1.3.1.1 柚皮粉的制备

将琯溪蜜柚果皮(由黄色外果皮和白色中果皮组成)晒干并在60℃烘箱中烘烤48h后,剪成小块碎片,再进行粉碎,制备成柚皮粉,于冰箱内冷藏备用。

1.3.1.2 柚皮提取液的制备

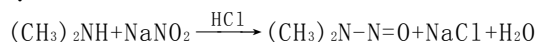
称取10.0g柚皮粉,放入250ml圆底烧瓶中,加入70ml 90%乙醇(丙酮或水)溶液,在60℃恒温水浴锅内加热,并且冷凝回流1h,真空抽提后放在冰箱内保藏使用。

1.3.2 正交试验测定最佳提取条件

分别用三种提取剂(乙醇、丙酮和水)提取柚皮活性物质,设计四因素三水平的正交试验。根据水平因素表,把试验条件进行排列组合展开分析。

1.3.3 阻断亚硝胺合成的原理

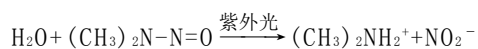
在模拟人体胃液的条件下,二甲胺与亚硝酸钠在37℃条件下,可适宜地生成二甲基亚硝胺,反应式如下:



当往柚皮提取物中依次加入二甲胺与亚硝酸钠时,提取物优先同亚硝酸钠作用,使得二甲胺不能与亚硝酸钠反应,达到阻止亚硝胺生成的目的。据此可以比较相同条件下生成亚硝胺量的多少来反映提取物阻断能力的强弱,生成亚硝胺量少,提取物的阻断能力就强,反之则弱。

1.3.4 二甲基亚硝胺的测定及阻断率的测定

在紫外光照射下,二甲基亚硝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值可计算上述反应液中亚硝胺含量的多少。

分别取提取液5ml于50ml容量瓶中,加入25ml柠檬酸钠-盐酸缓冲液,1mmol/L NaNO_2 溶液2.5ml,1mmol/L二甲胺溶液2.5ml,在用蒸馏水定容至刻度,在37℃水浴恒温1h,定量滤纸进行过滤。用移液管吸取1.0ml上述含NDMA(对亚硝胺)的反应液加到50ml烧杯中,加入0.5% Na_2CO_3 溶液0.5ml,于黑布遮盖的紫外分析仪上照30min,紫外灯离液面15cm,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,0.5ml蒸馏水,然后摇匀放置15min后,用分光光度计在525nm处测定吸光度(A_x)。同时用相同浓度浸提剂做空白实验,并计

算阻断率:

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

式中, A_0 为加入对应浓度浸提剂的吸光度(空白实验); A_x 为加入各组提取液时的吸光度。

1.3.5 NaNO_2 的测定及清除率的计算

亚硝酸钠在弱酸性的条件下, 能与对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。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钠含量的多少。

取提取液 5ml 于 50ml 容量瓶中, 加入 25ml 柠檬酸钠-盐酸缓冲液(pH3.0), 再加入 100mg/kg 的 NaNO_2 溶液 5ml, 用蒸馏水定容至刻度, 37℃ 水浴恒温 1h, 然后各吸取 10ml 反应液于试管中, 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, 于 540nm 处测吸光度, 分别用相应浓度相同用量的浸提剂做空白实验, 最后计算清除率:

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

式中, A_0 为加入相应浸提剂空白实验的吸光度; A_x 为加入不同用量提取液时的吸光度。

2 结果与分析

2.1 柚皮中获取阻断亚硝胺合成的活性物质的最佳提取条件的确定

为了系统考察柚皮活性物质提取的最佳条件, 选用了 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 其中选取的因素及水平如表 1 所示, 并以测得的 9 个提取液样品对亚硝胺合成的阻断率为考察指标, 从而确定出最佳提取条件。

表 1 试验设计与结果表
Table 1 Table of test design and results

因素	A 浸提剂	B 浸提剂浓度(%)	C 水浴温度(℃)	D 水浴时间(h)	阻断率 (%)
试验 1	乙醇	50	70	1	69.9
试验 2	乙醇	70	60	1.5	77.3
试验 3	乙醇	90	50	2	81.4
试验 4	丙酮	50	60	2	48.2
试验 5	丙酮	70	50	1	50.2
试验 6	丙酮	90	70	1.5	47.1
试验 7	水	50	50	1.5	56.9
试验 8	水	70	70	2	56.6
试验 9	水	90	60	1	67.7
均值 1	76.2	58.3	57.9	62.6	
均值 2	48.5	61.4	64.4	60.4	
均值 3	60.4	65.4	62.8	62.1	
极差 R	27.7	7.1	6.5	2.2	

从表 1 可知, 最佳因素组合是 $A_1B_3C_2D_1$, 即用 90% (质量分数) 乙醇在 60℃ 水浴下冷凝回流提取 1h 所得的柚皮提取物对阻断亚硝胺合成的效果最好。从极差 R 的直观反映出各因素对结果影响大小的顺序为 $A > B > C > D$, 其中因素 A 的影响最大, 因素 D 的影响最小。对表 1 的数据进行处理, 可以计算出正交试验的直观分析表(如表 2 所示)。

表 2 正交试验方差分析表
Table 2 Table of square error analyse to orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
浸提剂 A	1158.5	2	151.5	9	*
浸提剂浓度 B(%)	75.4	2	9.861	9	*
水浴温度 C(℃)	69.8	2	9.129	9	*
水浴时间 D(h)	7.6	2	1	9	
误差	7.7	2			

方差表更进一步分析出四种因素对结果影响, 很容易看出因素 A 对整个提取实验的影响是最显著的, B 和 C 也有一定的显著性, 而 D 则没有显著性。因此, 可以确定最佳提取条件是: 90% 乙醇在 60℃ 水浴冷凝回流提取 1h。

2.2 不同浓度提取液对 NDMA 的阻断效应

分别取柚皮最佳提取液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0ml 于 10 个 50ml 容量瓶中, 加入 25ml 柠檬酸钠-盐酸缓冲液(pH3.0)、1mmol/L NaNO_2 溶液 2.5ml、1mmol/L 二甲胺溶液 2.5ml, 再用蒸馏水定容至刻度, 在 37℃ 水浴恒温 1h, 定量滤纸进行过滤。用移液管吸取 1.0ml 上述含 NDMA(对亚硝胺)的反应液加到 50ml 烧杯中。然后紫外光解并重氮偶合, 在 525nm 波长处测定该重氮偶合物的吸光度, 并计算阻断率, 结果列于表 3。

表 3 不同用量的柚皮提取液对 NDMA 的阻断率
Table 3 Dependence of NDMA interdiction on extracts from shaddock peel

加入提取液量(ml)	A_0	A_x	阻断率(%)
0.5	0.225	0.159	29.6
1	0.231	0.122	47.1
2	0.253	0.087	65.8
4	0.264	0.058	78.0
5	0.272	0.040	85.3
6	0.268	0.025	90.8
7	0.279	0.013	95.5
8	0.287	0.028	90.2
9	0.287	0.029	90.1
10	0.289	0.036	87.5

由表 3 得知, 随着提取液用量的增加, 阻断率呈现出规律的变化, 即先增后降。由开始阻断率迅速上涨, 尤其是加入 1~2ml 提取液时突变最大, 从 29.6%

提高到 65.8%。当提取液用量增到 7ml 时, 阻断率达到最大 95.5%。表明用提取液最佳用量为 7ml。

2.3 不同浓度提取液对 NaNO_2 的清除效应

分别取柚皮最佳提取液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0ml 于 10 个 50ml 容量瓶中, 加入 25ml 柠檬酸钠-盐酸缓冲液(pH3.0), 再加入 100mg/kg 的 NaNO_2 溶液 5ml, 用蒸馏水定容至刻度, 37℃ 水浴恒温 1h 并用定量滤纸过滤, 然后各吸取 1ml 反应液于试管中, 经过重氮偶合后, 于 540nm 处测吸光度。同时, 进行空白实验测定 A_0 , 结果见表 4。

表 4 柚皮提取液不同浓度对亚硝酸钠的清除率
Table 4 Dependence of sodium nitrite scavenging rate on extracts from shaddock peel

加入提取液量(ml)	A_0	A_x	清除率(%)
0.5	0.850	0.704	17.2
1	0.847	0.479	43.4
2	0.876	0.330	62.3
4	0.867	0.164	81.1
5	0.892	0.128	85.7
6	0.903	0.122	86.5
7	0.918	0.103	88.8
8	1.049	0.086	91.8
9	0.982	0.083	91.5
10	1.013	0.102	90.0

从表 4 可以看出, 开始时, 增加提取液用量, 清除率迅速升高; 随提取液用量不断增加, 清除率变化趋于缓和; 当提取液用量增加到 8ml 时, 清除率达到最大值, 此时清除率为 91.8%。之后随提取液用量的增加清除率又有所下降。因此, 选择提取液用量为 8ml。

3 结 论

3.1 采用四因素三水平正交法对柚皮活性物质的提取工艺进行研究, 活性物质的最佳提取条件是: 用 90% 乙

醇在 60℃ 水浴温度下冷凝回流提取 1h。

3.2 在弱酸条件下(即在模拟人体胃液环境条件下, pH 值为 3.0), 柚皮提取物能有效阻断亚硝胺的合成, 其对亚硝胺的最大阻断率是 95.5%; 柚皮提取物能有效清除亚硝酸钠, 其对亚硝酸钠最大清除率达 91.8%。

3.3 柚皮原料易得, 研究柚皮中生理活性物质不仅能变废为宝, 提高柚子的利用价值, 而且将柚皮提取物添加到食品中时, 能提高食品的营养价值, 具有良好的保健功能。尤其是在抗癌、防癌方面开发利用前景可观, 因此有可能成为一种经济的、有效的具有防癌作用的天然生物资源。

参考文献:

- [1] 勃拉特 A.H. 有机合成: 第二集 (中译本) [M]. 北京: 科学出版社, 1964: 321.
- [2] 董朝青, 蒋新宇, 周春山. 柚子中柚皮甙提取工艺研究[J]. 湖南文理学院学报: 自然科学版, 2004, 16(1): 34-36.
- [3] 贾冬英, 姚开, 何强, 等. 柚皮提取物不同级分的抗氧化活性研究[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2004, 36(6): 48-50.
- [4] 张海德, 杨晓泉, 李琳, 等. 柚皮提取物的抗氧化作用研究[J]. 中国油脂, 2001, 26(4): 54-57.
- [5] Zia ur R. Citrus peel extract-A natural source of antioxidant[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 450-454.
- [6] CHAWLA S P, KANG C J H J, IMM J, et al. Bioactivities of citrus (*Citrus unshiu*) peel extracts subjected to different extraction conditions, storage temperatures, and irradiation[J]. Journal of Food Science and Nutrition, 2003, 8(4): 349-355.
- [7] 李春美, 杜靖, 谢笔钧. 柚皮提取物的抑菌作用[J]. 食品与发酵工业研究报告, 2004, 30(1): 38-56.
- [8] 唐渝, 陈翠娟, 刘雁敏, 等. 柚子皮中果胶提取剂脱色工艺[J]. 食品科学, 1998, 19(11): 29-31.
- [9] 胡荣梅, 马立珊. N-亚硝基化合物分析方法[M]. 北京: 北京科学出版社, 1980: 4-7.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 食品卫生检验方法理化部分[M]. 北京: 中国标准出版社, 1995: 138.

信 息

研究显示: 吃鱼有助于老年人保持记忆力

据路透社报道, 此项研究在挪威进行, 研究成果发表于《美国临床营养学杂志》。研究人员在对 2031 名年龄在 70 岁到 74 岁之间的老年人进行测试后发现, 那些经常吃鱼的老年人在记忆力、视觉概念、空间运动技能、注意力、方向感和语言流畅性等测试中, 表现都要好于不常吃鱼的老年人。

研究负责人 A·戴维·史密斯博士说: “在这 6 项认知测试中, 经常吃鱼的老年人表现得更为出色。”他还表示, 如果每天摄入鱼类的量可以达到 80g, 那么效果会更明显。

史密斯博士说, 他们将继续研究, 希望可以探知究竟是哪种成分在起作用。他表示, 起作用的可能不仅仅是已经为人们所知的 omega-3 型脂肪酸。