

文章编号:1673-1689(2009)02-0192-05

复配香辛料提取物体外阻断 N-二甲基亚硝酸胺生成的效果

马俪珍, 王瑞, 熊勇, 甄润英

(天津农学院 食品科学系, 天津 300384)

摘要:在确定桂皮、柚子皮、八角和花椒 4 种香辛料中活性物质最佳提取条件的基础上,利用所提取的活性物质在不同浓度下进行阻断 N-二甲基亚硝酸胺生成的体外试验,并以不同比例进行复配,根据阻断率选出最佳复配比。结果显示:当桂皮、柚子皮、八角、花椒提取液四者达最佳复配比时,复配液具有较好的阻断效果。

关键词:香辛料;N-二甲基亚硝酸胺;阻断率;复配比

中图分类号:TS 201.2; TS 202.3

文献标识码:A

The Study on the Blocking Effect of the Compound of Spice Extraction on the Formation of N-Nitrosodimethylamine

MA Li-zhen, WANG Rui, XIONG Yong, ZHEN Run-ying

(Department of Food Science, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

Abstract:Based on the optimum conditions of the cutive substrate from cassia, pomelo-hull, aniseed, pricklyash, The blocking vitro tests to N-nitrosamine formation was performed with the different concentrations of the extraction. Then prepare the solution with the best concentration of all those materials, and the blocking rate was tested. The best meditation effect was achieved when the concentration ratio of cassia, pomelo-hull, aniseed and pricklyash was 2 : 1 : 4 : 3.

Key words: Spicery, N-Nitrosodimethylamine, mediation rate, compound proportion

亚硝酸胺类化合物对人类健康危害极大。食品中天然亚硝酸胺类化合物含量虽很少,但形成该类化合物的前体物质——亚硝酸盐和仲胺却广泛存在,当条件适宜时,它们可形成亚硝酸胺类物质^[1-3]。

植物提取物防癌活性表现在消除亚硝酸盐——亚硝化反应的前体物质,从而阻断 N-亚硝酸胺的合成,即表现在对亚硝化反应的抑制作用上,有

关这方面的研究已有报道。已证明,维生素 C 能同时在体内外阻断 N-亚硝酸胺的合成^[4]。此外,人们又发现除维生素 C 外,维生素 E、酚类化合物等也能抑制 N-亚硝酸胺在体内外的合成。宋圃菊等^[4]研究证明了中华猕猴桃汁、刺梨等能阻断 N-亚硝酸胺的合成。另外,已有人从体外实验和体内实验中研究了大蒜阻断 N-亚硝酸胺合成作用及阻断合成的有效成

收稿日期:2007-10-08

基金项目:天津农学院科学基金项目(2007010)。

作者简介:马俪珍(1963-)女,山西临猗人,工学博士,教授,主要从事肉品科学与技术的研究。Email:malizhen-6329@163.com

分^[5];也有人从体外试验研究了竹叶提取物对亚硝化反应的抑制作用^[6]。此外,胡道道等还报道,生姜汁对N-亚硝酸胺的合成也存在阻断作用^[7]。也有报道,香辛料精油对N-二甲基亚硝酸胺(NDMA)体外合成的阻断作用较明显,有些阻断效果还明显优于等剂量的抗坏血酸^[8]。复配香辛料提取物对亚硝酸胺生成的试验目前还未见报道。

试验中选择具有抗氧化作用的桂皮、花椒、八角和柚子皮4种天然香辛料,在优化的提取条件下制得提取液,在试管模拟胃液环境中进行阻断亚硝酸胺生成试验,利用比色法^[9]及紫外光解法^[10]测定抑制亚硝化反应的阻断率,进而筛选出几种天然物质阻断N-亚硝酸胺合成的最佳提取条件,然后将最佳浸提条件下得到的浸提液进行4因素4水平正交试验,优选出对N-亚硝酸胺合成阻断效果比较好的复配比例。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 原料 在市场上选购优质干燥桂皮、八角、花椒3种香辛料,烘干后用粉碎机磨粉后待用;将市购新鲜柚皮的黄皮层和白皮层剥离开,留黄皮层干燥后磨粉待用。

1.1.2 仪器 DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱,上海精密实验设备有限公司制造;752型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司制造;WHY-2型恒温水浴振荡器,江苏金坛金城国胜实验仪器厂制造;CTF-200型高速粉碎机,天津中药机械厂制造;R50型旋转蒸发器,上海申生科技有限公司制造;SHB-III型循环式多用真空泵,郑州长城科贸有限公司制造;SW-CJ-1FD型超净工作台,苏州净化设备有限公司制造;KQ-50E型超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司制造;1 000 μ L的移液枪,上海雷勃分析仪器有限公司制造。

1.1.3 试剂 无水乙醇,丙酮,冰乙酸,柠檬酸钠,盐酸, α -萘胺,亚硝酸钠,二甲胺盐酸盐,碳酸钠,抗坏血酸钠,以上均为分析纯,购自天津市永大化学试剂开发中心。无水对氨基苯磺酸,工作基准试剂,购自天津市北方玻璃购销中心。

1.2 试验方法

1.2.1 提取条件

在体外模拟胃液环境下,通过提取物对N-二甲基亚硝酸胺的阻断率作测定试验,优选出各香辛料中阻断亚硝酸胺合成的活性物质最佳提取条件。

桂皮、柚子皮、八角和花椒4种香辛料中活性

物质最佳提取条件见表1。

表1 最佳提取条件

Tab.1 Optimum extraction conditions

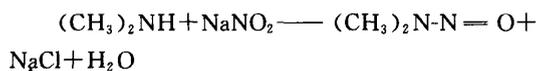
香辛料	溶剂	溶剂 质量分数/%	温度/ ℃	时间/ h
桂皮	水	100	70	5
柚子皮	丙酮	70	70	5
八角	水	100	80	5
花椒	丙酮	50	70	5

分别取各香辛料5g,以每克料15mL溶剂于常温下用溶剂浸泡17h后水浴振荡,提取液经抽滤后用旋转蒸发器挥发干溶剂,浓缩液用少量热水溶解,定容至25mL得到样液,备用;以水作溶剂的提取液经抽滤后真空浓缩,直接定容至25mL,此为最初提取液,4℃冷藏备用。

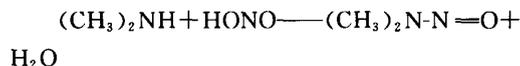
1.2.2 阻断试验

1) 阻断N-亚硝酸胺合成原理

在模拟人体胃液的条件,二甲胺与亚硝酸钠在37℃条件下可生成二甲基亚硝酸胺^[4],反应式如下:



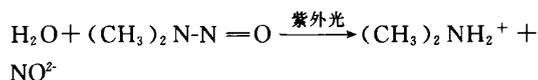
实质是:



当往香辛料的浸提液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N-二甲基亚硝酸胺生成的目的。据此可以比较相同条件下生成N-二甲基亚硝酸胺的多少来反映提取物阻断能力的强弱,生成N-二甲基亚硝酸胺量少,提取物的阻断能力就强,反之则弱。

2) 显色原理

在紫外光照射下,二甲基亚硝酸胺可分解成二甲胺仲胺和亚硝酸根,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,根据吸光度的大小即可比较N-亚硝酸胺含量的多少。

3) 操作步骤

取0.5mol/L pH 3.0的柠檬酸钠-盐酸缓冲液5.0mL,加入1mmol/L的亚硝酸钠0.5mL,加入

各个提取液 1.0 mL, 再加 1 mmol/L 的二甲胺 0.5 mL, 然后将反应体系定容到 10 mL, 37 °C 保温反应 1 h。取 1.0 mL 经反应的溶液至底面积约 7 cm² 的玻皿中, 加入 0.5 mL 质量分数 0.5% 的碳酸钠溶液, 于 15 W 紫外灯照射 15 min, 液面距灯高为 15 cm, 取出后加入质量分数 1% 的对氨基苯磺酸和质量分数 0.1% 的 α -萘胺各 1.5 mL, 加水至溶液体积精确为 5.0 mL, 放置 15 min 显色后在波长 525 nm 比色测定其吸光度。

同时在不加浸提剂的情况下做空白实验, 测量其吸光度, 并计算阻断率。

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

A_0 为加入对应浓度浸提剂的空白样的吸光度值; A_x 为加入各组提取液时的吸光度值。

1.2.3 单因素阻断试验 首先进行不同体积的提取液对 N-二甲氨基亚硝胺的阻断试验。加入各提取液时, 添加剂量为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 mL。按上述方法进行测定, 同时做阳性对照(添加 VC)和空白对照(不加阻断剂), 计算每一体积时的阻断率, 并进行分析。

1.2.4 最佳复配比的优选 为系统考察桂皮、柚子皮、八角、花椒最佳提取条件提取物的最佳复配

比例, 根据已有资料和单因素试验^[6], 设计试验如下: 选用桂皮、柚皮、八角、花椒的最佳提取条件提取物的体积为考察因素, 以测得的提取样品对 N-二甲氨基亚硝胺合成的阻断率为考察指标, 选用 L₁₆(4⁴) 正交试验, 因素水平见表 2。

表 2 最佳复配比因素水平

试验水平	A 桂皮 提取液 体积/mL	B 花椒 提取液 体积/mL	C 八角 提取液 体积/mL	D 柚皮 提取液 体积/mL
1	0.5	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0	1.0
3	1.5	1.5	1.5	1.5
4	2.0	2.0	2.0	2.0

注: 各个最佳条件提取液按表 2 及表 4 的要求复配后, 定容到 10 mL 待用。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

不同质量浓度的提取液及 VC 对亚硝胺的阻断率见表 3。

表 3 不同质量浓度的提取液及 VC 对 N-二甲氨基亚硝胺的阻断率

提取液	不同质量浓度/(mg/mL)									
	0	1	2	4	8	12	16	20	30	40
VC	0.00	21.51	32.80	41.94	53.76	69.35	77.96	79.57	85.48	84.95
桂皮	0.00	34.16	49.07	61.08	72.05	75.57	81.16	81.37	82.61	81.99
柚皮	0.00	20.40	43.23	47.68	54.55	60.61	66.06	72.12	77.24	77.58
八角	0.00	4.59	26.15	40.31	48.30	53.49	62.28	67.27	76.65	71.86
花椒	0.00	8.06	21.06	26.37	41.21	60.26	64.65	74.36	78.75	73.99

由表 3 可知, 桂皮最佳条件提取物质量浓度在 0~30 mg/mL 时, 对亚硝胺合成的阻断率在 0~82.61%, 当质量浓度继续升高时, 阻断作用有趋于平缓的趋势, 同时当质量浓度达到 4 mg/mL 时, 阻断率就可逾 60%; 同样, 柚皮最佳条件提取物质量浓度在 40 mg/mL、八角最佳条件提取物质量浓度在 30 mg/mL、花椒最佳条件提取物质量浓度在 30 mg/mL 左右时阻断作用最佳。为了更直观地看出, 下面将以曲线图的形式表现出来, 见图 1。

从图 1 可以看出, 桂皮的阻断率始终要高于其它 3 种物质, 特别是明显高于 VC 阳性对照组, 说明桂皮浸提液对亚硝基化反应的阻断效果非常明显。

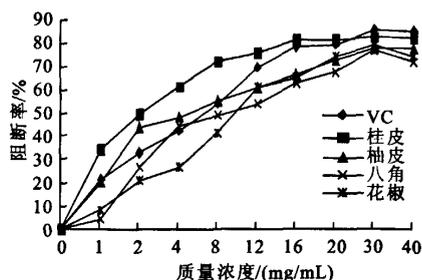


图 1 4 种阻断剂和 VC 不同质量浓度下的阻断率变化趋势

Fig. 4 Inhibitory rate trends on N-dimethylnitrosamine of different concentrations of four kinds of blockers and VC

但在浸提液质量浓度高于 30 mg/mL 时, 4 组植物

浸提液和 VC 组的阻断率差异不显著,并且有下降的趋势。柚皮浸提液当质量浓度在 1~8 mg/mL 范围内时,其对亚硝基化反应的阻断效果要明显好于 VC 组。花椒和八角浸提液对 N-二甲基亚硝胺的阻断率无论浓度高低始终低于 VC 阳性对照组。

2.2 最佳复配比的选择

按因素水平表 2,最佳复配正交试验结果见表 4。

表 4 最佳复配比正交试验设计及结果

Tab. 4 The design and the results of the orthogonal experiment

序号	桂皮 提取液 体积 A	花椒 提取液 体积 B	八角 提取液 体积 C	柚皮 提取液 体积 D	吸光 度	阻断 率/%
1	1	1	1	1	0.086	54.26
2	1	2	2	2	0.087	53.72
3	1	3	3	3	0.074	60.90
4	1	4	4	4	0.041	78.19
5	2	1	2	3	0.067	64.36
6	2	2	1	4	0.058	69.15
7	2	3	4	1	0.024	87.23
8	2	4	3	2	0.043	77.13
9	3	1	3	4	0.064	65.96
10	3	2	4	3	0.092	51.06
11	3	3	1	2	0.123	34.57
12	3	4	2	1	0.121	35.64
13	4	1	4	2	0.126	32.98
14	4	2	3	1	0.155	17.55
15	4	3	2	4	0.147	21.81
16	4	4	1	3	0.068	63.83
空白	0	0	0	0	0.188	0
K ₁	247.07	217.55	221.81	194.68		
K ₂	297.87	191.49	175.53	198.40		
K ₃	187.23	204.52	221.54	240.16		
K ₄	136.17	254.79	249.47	235.11		
\bar{K}_1	61.77	54.39	55.45	48.67		
\bar{K}_2	74.47	47.87	43.88	49.60		
\bar{K}_3	46.81	51.13	55.39	60.04		
\bar{K}_4	34.04	63.70	62.37	58.78		
极差 R	40.43	15.82	18.48	11.37		

由表 4 中的 R 值可以看出 A 因素即桂皮最佳

万方数据

条件提取物的体积为最重要的因素,其次为 C 因素,即八角最佳条件提取物的体积。但根据表 5 的方差分析结果,各因素的 F 值均不显著,这是由于误差自由度过小,分析的灵敏度不高的缘故,使因素的效应达不到显著水平。因此,下面将按正交试验设计再设置几个重复,以增加分析的灵敏度。根据表 5 的方差分析,A、C 因素相对为重要因素,B 因素和 D 因素为次要因素。对 A、C 因素进行多重比较,见表 6 和表 7。

表 5 正交试验方差分析

Tab. 5 Variance analysis of orthogonal experiment

变异来源	SS	df	均方和 S/f	F ¹⁾	显著性
A	3 716.061	3	1 238.687	3.826	
B	558.665 4	3	186.221 8	0.575	F _{0.05(3,3)} = 9.28
C	704.376 1	3	234.792	0.725	
D	427.030 6	3	142.343 5	0.440	
误差	971.253 1	3	323.751		

表 6 多重比较用 SSR 及 LSR 值

Tab. 6 Multiple comparisons with SSR and LSR values

秩次距	SSR		LSR	
	K	0.05	0.01	0.05
2	4.50	8.26	40.05	74.31
3	4.50	8.50	40.05	76.47
4	4.50	8.60	40.05	77.37

$$LSR = SSR_{0.05} * S_{\bar{x}}$$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{S_e^2/4} = \sqrt{323.751/4} = 8.9$$

表 7 A 因素水平均值多重比较

Tab. 7 Multiple comparisons of A factor level mean

	A 因素			
	A ₂	A ₁	A ₃	A ₄
\bar{x}_i	74.47	61.77	46.81	34.04
显著性(5%)	a	ab	ab	b

多重比较的结果以 A₂ 为最好,另外 A₁ 也可以考虑,可作为分析其他指标后综合平衡选择之用。由表 4 可直观看出最佳组合为:A₂B₄C₄D₃。

3 结 语

桂皮、花椒、八角和柚皮 4 种物质最佳复配条件为:桂皮提取液 10 mL,花椒提取液 20 mL,八角提取液 20 mL,柚皮提取液 15 mL。复配后的混合提取物对 N-二甲基亚硝胺合成的阻断率最高可达

到87.23%，比单因素试验中最高阻断率85.48%略高，对N-二甲基亚硝胺生成具有较理想的阻断效果。复配混合提取物应用到肉类产品的生产中不

仅能起到抑制亚硝胺的效果，还能为产品提供更出色的风味。这为开发安全美味的肉类食品提供了参考。

参考文献(References):

- [1] 张文敏. N-亚硝基化合物在动物体及人体内的合成[J]. 国外医学:卫生学分册, 1978, 8(2):78
ZHANG Wen-min. The synthesis of N-nitrosamine compounds in vivo of animals[J]. *Medical Sciences-hygine*, 1978, 8(2): 78. (in Chinese)
- [2] 于世光, 刘志诚, 于宋洋, 等. 常见蔬菜阻断N-亚硝基化合物(NC)形成的研究[J]. 营养学报, 1988(10):15-18.
YU Shi-guang, LIU Zhi-cheng, YU Song-yang, et al. A study of inhibiting effect of ordinary vegetables on the formation of N-nitroso compounds[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1988(10):15-18. (in Chinese)
- [3] 许后效. 环境中的N-亚硝基化合物[M]. 北京:科学出版社, 1979:23-103.
- [4] 宋圃菊, 张琳. 在体外模拟胃液对亚硝胺合成的阻断作用-Ames 试验方法检测[J]. 营养学报, 1984, 4(6):24-27.
SONG Pu-ju, ZHANG Lin. The blocking effects of Chinese actinidia sinensis planch juice on the formation of N-nitrosamine[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1984, 4(6):24-27. (in Chinese)
- [5] 刘进周, 彭恕生. 大蒜阻断亚硝胺的化学合成[J]. 营养学报, 1986, 8(1):9-13.
LIU Jin-zhou, PENG Shu-sheng. The blocking effect of garlic extract on the in vitro chemical formation of nitrosamines [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1986, 8(1):9-13. (in Chinese)
- [6] 许钢, 张虹, 庞洁. 竹叶提取物对亚硝化反应的抑制[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(6):583-586.
XU Gang, ZHANG Hong, PANG Jie. Inhibiting nitrosation by extract of bamboo leaves[J]. *Journal of WuXi University of Light Industry*, 2000, 19(6):583-586. (in Chinese)
- [7] 胡道道. 生姜对亚硝胺合成的阻断作用初探[J]. 食品科学, 1989, 2(6):36.
HU Dao-dao. A study of the blocking effect of ginger extract on the in vitro chemical formation of nitrosamines[J]. *Food Science*, 1989, 2(6):36. (in Chinese)
- [8] 时艳玲, 王光慈. 某些香辛料精油抑制N-二甲基亚硝胺体外合成的研究[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(4):359-363.
SHI Yan-ling, WANG Guang-ci. Studies on NDMA inhibition of eight spice essential oils in vitro[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1997, 19(4):359-363. (in Chinese)
- [9] 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, 1997:126-132.
- [10] 胡荣梅, 马立珊. N-亚硝基化合物分析方法[M]. 北京:科学出版社, 1980.

(责任编辑:秦和平,朱明)