

文章编号: 1009-038X(2000)06-0583-04

# 竹叶提取物对亚硝化反应的抑制

许钢, 张虹, 庞洁

(杭州商学院食品科学与工程系, 浙江杭州 310035)

**摘要:** 研究了竹叶提取物对亚硝胺合成的阻断作用和亚硝酸钠的消除作用, 并选择了最佳提取条件. 结果显示, 最佳提取条件为: 55% 的丙酮于 80 °C 水浴回流 1 h, 此提取物具有较高阻断亚硝胺合成及清除亚硝酸钠的效果.

**关键词:** 竹叶提取物; 阻断; 清除

中图分类号: O61

文献标识码: A

## Inhibiting Nitrosation by Extract of Bamboo Leaves

XU Gang, ZHANG Hong, PANG Jie

(Department of Food Science and Engineering, Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou 310035)

**Abstract:** This paper deals with the optimum extract conditions of bamboo leaves and capabilities of disconnecting nitrosodimethylamin (NDMA) compost and scavenging sodium nitrite by extract of bamboo leaves. The result showed that the optimum condition is 55% acetone extract for one hour in water bath at 80 °C. The extract has high capabilities of disconnecting NDMA compost and scavenging sodium nitrite.

**Key words:** extract of bamboo leaves; disconnecting; scavenging

竹叶是禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)多年生常绿植物. 我国是竹子的中心产区之一, 竹叶的医疗保健作用早已为我国人民所认识,《本草求真》曰: 竹叶“轻能解上, 辛能散郁, 甘能缓脾, 凉能入心, 寒能疗热.”竹汁含有丰富的营养物质并具有清热解暑, 镇痰止渴, 延缓衰老, 防癌抗癌等功效<sup>[1]</sup>.

亚硝胺是当前最令人关注的一类化学致癌物质, 它能引起人和动物的肝脏等多种器官的恶性慢性肿瘤. 正常情况下, 人们直接从食物中摄入的亚硝胺量是微乎其微的, 但形成 N-硝胺类的前体物质却大量存在于食物中以及食物在体内的代谢过程

中<sup>[2]</sup>. 亚硝酸盐与仲胺无论在实验室和自然条件下还是在人体和动物体内均能反应合成亚硝胺, 尤其在人和动物的胃中更适于合成亚硝胺<sup>[3]</sup>. 因此, 阻断亚硝胺合成或消除亚硝胺的前体是防治癌病产生的有效途径之一. 竹叶防癌活性表现的一个方面是清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺的合成——即对亚硝化反应的抑制作用, 而有关天然产物抑制亚硝化反应方面的研究几乎未见报导. 本文从有利发挥防癌活性方面考虑, 找出从竹叶中提取抑制亚硝化反应的活性物质的最佳条件, 初步研究竹叶提取物消除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的浓度效应, 旨在探讨竹叶资源在防癌抗癌领域中的应用.

收稿日期: 2000-01-24; 修订日期: 2000-09-13.

作者简介: 许钢(1958-), 女, 浙江杭州人, 工学学士, 实验师.

## 1 实验材料

### 1.1 原料

浙江慈溪产的四季竹,鲜叶洗净后,自然阴干,机器磨碎成粉状备用。

### 1.2 主要试剂

无水乙醇、甲醇、丙酮、醋酸、盐酸、0.5 mol/L pH 3.0 的柠檬酸钠-盐酸缓冲液<sup>[4]</sup>、亚硝酸盐钠、二甲胺、碳酸钠、对氨基苯磺酸、 $\alpha$ -萘胺、萘基盐酸二氨基乙烯,所有试剂均为分析纯。

### 1.3 主要设备

日产岛津 UV-1601 型紫外可见分光光度计,日产岛津 AEL-160 型电子分析天平,日超音波工业会社产 UT-52 超声波发生器,上海申科机械研究所生产的 R-201 型旋转蒸发仪,上海产紫外分析仪,北京长安科学仪器厂生产的恒温水浴锅。

## 2 内容与方法

### 2.1 正交设计

为系统考察竹叶防癌活性物质提取的最佳条件,根据已有资料 and 实际情况,设计实验如下:实验分为水浴试验组和超声试验组。水浴试验组选用浸提剂、浸提剂体积分数、水浴温度和水浴时间作为考察因素,以测得的提取样品对亚硝胺合成的阻断率为考察指标,选用  $L_9(3^4)$  正交表试验。超声试验组选用浸提剂、浸提剂体积分数、超声时间和液固比作为考察因素,也以测得的样品对亚硝胺合成的阻断率为考察指标,选用  $L_9(3^4)$  正交表试验。因素水平分别见表 1~2。

表 1 水浴试验因素—水平表

Tab. 1 Levels and factors of water bath

水平	因素			
	浸提剂	浸提剂体积分数	水浴温度/ $^{\circ}\text{C}$	水浴时间/h
	A	B	C	D
1	乙醇	55%	80	2
2	甲醇	85%	65	1
3	丙酮	70%	50	3

表 2 超声试验因素—水平表

Tab. 2 Levels and factors of supersonic tests

水平	因素			
	浸提剂	浸提剂体积分数	超声时间/min	液固比
	A	B	C	D
1	乙醇	55%	30	15:1
2	甲醇	85%	20	10:1
3	丙酮	70%	10	20:1

的要求进行提取,提取液经抽滤后用旋转蒸发仪挥干溶剂,浓缩液用少量热水洗下,定容至 10 mL 得到样液,备用。

超声试验组:称取竹叶样品 5 g,按表 2 及表 4 的要求进行提取,后处理与水浴同,得到样液,备用。

将获得的 18 个提取液分别进行二甲基亚硝胺合成的阻断试验<sup>[3]</sup>:取 0.5 mol/L pH 3.0 的柠檬酸钠-盐酸缓冲液 5.0 mL,加入 1 mmol/L 的亚硝酸盐 0.5 mL,竹叶提取液 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 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h。取 1.0 mL 反应的溶液至约 7 cm<sup>2</sup> 的玻皿中,加入 0.5 mL 0.5% 碳酸钠溶液,紫外灯照射 15 min,加入 1% 对氨基苯磺酸和 0.1%  $\alpha$ -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 处比色测定,结果见表 3。

表 3 水浴正交试验设计及结果

Tab. 3 Results of orthogonal design(extraction by water bath)

设计序号	A	B	C	D	吸光度	对 NDMA 的阻断率/%
1	1	1	1	1	0.107	67.38
2	1	2	2	2	0.119	63.72
3	1	3	3	3	0.150	54.27
4	2	1	2	3	0.113	65.55
5	2	2	3	1	0.151	57.01
6	2	3	1	2	0.133	59.45
7	3	1	3	2	0.098	70.12
8	3	2	1	3	0.112	65.85
9	3	3	2	1	0.123	62.50
空白					0.328	
$k_1$	1.8537	2.0305	1.9268	1.8683		
$k_2$	1.8201	1.8658	1.9177	1.9329		
$k_3$	1.9847	1.7622	1.8140	1.8567		
极差	0.1646	0.2683	0.1128	0.0762		
	$(k_1 + k_2 + k_3)/9 = 62.87\%$					

注:按液固比为 15:1 浸泡 17 h 后水浴。

### 2.2 亚硝酸盐清除率和 N-亚硝胺(NDMA)合成阻断率的浓度梯度试验

为了搞清提取液最佳体积分数对亚硝胺的阻断效果及对亚硝酸盐的清除效果,本研究作了浓度梯度试验。用 2.1 正交设计所确定的最佳条件对竹叶进行提取,准确吸取样液 0, 0.02, 0.04, 0.1, 0.5,

水浴试验组:称取竹叶样品 5 g,按表 1 及表 3

1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL(相当于一组浓度梯度), 按二甲亚硝胺合成阻断试验项操作测定阻断率. 另外, 准确吸取样液 0, 0.02, 0.04, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL(相当于一组浓度梯度), 按亚硝酸钠标准曲线的绘制项操作测定清除率, 结果见表 4.

表 4 超声正交试验设计及结果表

Tab. 4 Results of orthogonal design(extraction by supersonic)

设计序号	A	B	C	D	吸光度	对 NDMA 的阻断率/%
1	1	1	1	1	0.096	66.78
2	1	2	2	2	0.088	69.55
3	1	3	3	3	0.174	39.79
4	2	1	2	3	0.092	68.17
5	2	2	3	1	0.101	65.05
6	2	3	1	2	0.108	62.68
7	3	1	3	2	0.128	55.71
8	3	2	1	3	0.142	51.02
9	3	3	2	1	0.135	53.59
空白					0.289	
$k_1$	1.7612	1.9066	1.8048	1.8512		
$k_2$	1.9590	1.8562	1.9101	1.8794		
$k_3$	1.6002	1.5576	1.6055	1.5898		
极差	0.3588	0.3490	0.3046	0.2896		
$(k_1+k_2+k_3)/9=59.12\%$						

### 3 结果与分析

#### 3.1 最佳提取条件的确定

从表 3, 4 的直观分析可知: 水浴浸提比超声提取效果好. 水浴浸提 4 种因素的最佳组合为  $A_3B_1C_1D_1$ , 即用 55% 的丙酮, 在 80 °C 下浸提 1 h 的提取物起阻断作用的效果最好; 超声提取 4 种因素的最佳组合为  $A_2B_1C_2D_2$ , 即用 55% 的甲醇超声 20 min, 液固比为 10 : 1 时效果最好.

从表 3 的直观分析和表 5 的方差分析可知: 水

表 5 水浴试验组方差分析表

Tab. 5 Analysis of variance in bath test

变异来源	平方和 S	f	MS	F	显著性
A	50.426	2	25.21	13.65	*
B	122.049	2	61.02	33.04	**
C	26.178	2	13.09	7.09	△
D	3.694	2	1.847	1	

注:  $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ ,  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ ,  $F_{0.10}(2, 2) = 9.0$ . 表中 \* 和 \* 分别表示  $P < 0.05$  和  $0.05 < P < 0.10$  有极显著性和显著性统计学意义; △表示没有显著统计学意义.

浴浸提 4 种因素对结果影响的大小依次为  $B > A > C > D$ , B、A 因素有极显著影响, C 的影响较显著, 而 D 的作用不明显.

从表 4 的直观分析和表 6 的方差分析可知: 超声提取的 4 种因素对结果影响的大小依次为  $A > B > C > D$ , 但 A、B、C、D 因素的影响都不明显.

表 6 超声试验组方差分析表

Tab. 6 Analysis of variance in supersonic tests

变异来源	平方和 S	f	MS	F	显著性
A	215.32	2	107.66	1.35	△
B	237.23	2	118.61	1.49	△
C	159.54	2	79.77	1	
D	170.00	2	85.00	1.07	△

注:  $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ ,  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ ,  $F_{0.10}(2, 2) = 9.0$ . 表中 \* 和 \* 分别表示  $P < 0.05$  和  $0.05 < P < 0.10$ , 有极显著性和显著性统计学意义; △表示没有显著统计学意义.

#### 3.2 竹叶对 N-亚硝胺合成的阻断作用及对亚硝酸盐的消除的浓度效应

##### 3.2.1 对 N-亚硝胺合成的阻断作用 最佳条件时竹叶提取物对 N-亚硝胺合成的阻断作用结果见表 7.

表 7 竹叶提取物对 N-亚硝胺合成的阻断率

Tab. 7 Capabilities of disconnecting NDMA by extract of bamboo leaves

样品量/mg	质量浓度/(mg/mL)	吸光度	阻断率/%
0	0	0.280	—
0.02	0.9754	0.258	7.86
0.04	1.9508	0.232	17.14
0.1	4.8770	0.190	32.14
0.5	24.3850	0.078	72.14
1.0	48.7700	0.063	77.50
1.5	73.1550	0.043	84.64
2.0	97.5400	0.031	88.92
2.5	121.9250	0.020	92.86
3.0	146.310	0.021	92.50

由表 7 可见, 在 pH 3.0 的柠檬酸钠-盐酸缓冲液中, 37 °C 保温反应 1 h. 在最佳条件下, 当竹叶提取物质量浓度在 0~146.31 mg/mL 时, 对 N-亚硝胺合成的阻断率为 0%~92.86%. 在质量浓度从 0~24.3850 mg/mL 递增的过程中, 阻断率迅速从 0% 上升至 72.14%, 此后阻断率仍有明显上升. 当样品质量浓度在 121.925~146.310 mg/mL 之间, 阻断率几乎无明显变化. 当质量浓度在 121.9250 mg/mL 时, 达到区间最大阻断率, 为 92.86%.

### 3.2 竹叶对亚硝酸盐的清除作用

最佳条件下竹叶提取物对亚硝酸盐的清除作用结果见表8.

表8 竹叶提取物对亚硝酸盐的清除率

Tab. 8 Capabilities of scavenging sodium nitrite by extract of bamboo leaves

样品量/mg	质量浓度/(mg/mL)	吸光度	清除率/%
0	0	0.141	—
0.02	0.9754	0.123	12.77
0.04	1.9508	0.102	27.66
0.1	4.8770	0.088	37.59
0.5	24.3850	0.025	82.27
1.0	48.7700	0.017	87.94
1.5	73.1550	0.015	89.36
2.0	97.5400	0.014	90.07

由表8可见,竹叶最佳条件提取物质量浓度在0~97.54 mg/mL时,对亚硝酸盐的清除率在0%~90.07%之间.当质量浓度由0~24.3850 mg/mL递增时,清除率上升极为迅速.当质量浓度在24.3850~97.54 mg/mL时,清除率提高缓慢,曲线趋于平缓.当质量浓度为97.54 mg/mL时达到最大清除率,为90.07%,此时清除的亚硝酸盐的量约为100  $\mu\text{g}$ .

这说明竹叶提取物在体外模拟胃液条件下,

能有效地清除亚硝酸盐和阻断强致癌物NDMA的合成,并且在一定范围内随质量浓度的增加,呈现出明显梯度变化.当达到一定质量浓度后,清除率和阻断率提高细微,趋于稳定.

## 4 讨论

1) 实验表明,采用55%丙酮浸泡,于80℃水浴回流1h是有利获得竹叶中具有防癌活性物质提取的最佳条件.在体外模拟人体胃液条件下,竹叶有效成分对亚硝酸盐的清除率及对N-亚硝胺合成的阻断率在一定质量浓度范围内,随其质量浓度的增加而增加.在质量浓度大于24.385 mg/mL后,浓度增加对清除作用的增强已意义不大.

2) 浓度—阻断率曲线与浓度—清除率曲线有一定的相似性.在质量浓度大于24.385 mg/mL后,阻断水平与清除水平随质量浓度的增加上升缓慢,甚至出现下降趋势.这说明24.385 mg/mL可能是竹叶提取物用于防癌作用的一个经济的剂量水平.

3) 竹叶提取物具有显著的清除 $\text{NO}_2^-$ 及阻断亚硝胺合成的作用.同时有研究表明,竹叶提取物具有清除活性氧自由基的优良性能.因此,竹叶保健食品的开发对防治癌病因的产生可能具有更重要的价值.

## 参考文献

- [1] 周奇文.实用食品加工新技术[M].北京:中国食品出版社,1998.98~100
- [2] 张英,丁霄霖.竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究[J].竹子研究汇刊,1996,7:17~24.
- [3] 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,1980.4~7
- [4] 杭州大学化学系分析化学教研室编.分析化学手册(第二分册)[M].北京:化学工业出版社,1982.48~65
- [5] 国家技术监督局.食品卫生检验方法——理化部分[M].北京:中国标准出版社,1997.156~157
- [6] 郑用熙.分析化学中的数理统计方法[M].北京:科学出版社,1986.180~208

(责任编辑:李春丽)