

苦藟水提液抗突变等功能性质探讨

丁晓雯,王海燕,吕淑霞,张树利

(西南大学食品科学学院,重庆市农产品加工技术重点实验室,重庆 400716)

摘要:研究了苦藟水提液抗突变、抗氧化等功能性质,目的是为其深度开发提供理论依据。结果表明:2.0~80mg/mL的鲜苦藟提取液使蚕豆根尖的微核率由 $12.98\% \pm 5.36\%$ 降到 $6.97\% \pm 1.35\%$;0.01~1.0mg/mL的鲜苦藟提取液对0.1mol/L 1.0mL H_2O_2 的清除率为3.1%~19.8%,0.1~1.0mg/mL的鲜苦藟提取液对 $\cdot OH$ 的清除率为9.6%~76.9%;4~120mg/mL鲜苦藟提取液对亚硝酸盐的清除率为13.19%~100.00%,煮沸45min后清除率为14.13%~99.23%。结论:苦藟水提液有一定的抗突变、抗氧化和清除亚硝酸盐的作用,但随着煮沸时间的延长,可使这种清除能力降低。

关键词:苦藟 抗突变 抗氧化 亚硝酸盐 清除

Study on anti-mutation and other functional character of water extracts from *Allium chinensis* G. Don

DING Xiao-wen, WANG Hai-yan, LV Shu-xia, ZHANG Shu-li

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing Key Lab of Agricultural Product Processing, Chongqing 400716, China)

Abstract: Antimutation, antioxidation and clearing nitrite of water extracts from *Allium chinensis* G. Don were studied, it will provide thesis basic for deeply development. Results: MCN rate of *Vicia faba* root tip was $12.98\% \pm 5.36\% \sim 6.97\% \pm 1.35\%$ which was induced by extracts from fresh *Allium chinensis* G. Don of 2~80mg/mL. H_2O_2 and $\cdot OH$ would be scavenged, the clearance rate was 3.1%~19.8% and 9.6%~76.9%, respectively. The function was done by extracts from fresh *Allium chinensis* G. Don which was 0.01~1.0mg/mL and 0.1~1.0mg/mL. Nitrite would be scavenged by the extracts from *Allium chinensis* G. Don, the clearance rate was 13.19%~100.00% when the extract from fresh *Allium chinensis* G. Don of 4~120mg/mL, the clearance rate was 14.13%~99.23% when the extracts was boiled 45min. Conclusion: extracts from *Allium chinensis* G. Don had function of antioxidation, antimutation and clearing nitrite. Ability of clearing nitrite would be lower when the boiling time was longer.

Key words: *Allium chinensis* G. Don; antimutation; antioxidation; nitrite; clearing

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)03-0084-04

苦藟与藟头、薤白同属百合科(Liliaceae),葱属(*Allium*)是藟头的变种,为多年生宿根草本植物,原产我国,以我国南方各省栽培最多^[1]。苦藟与藟头在外观上相似,但藟头先端渐尖,基部鞘状抱茎,而苦藟基部比较粗,鳞茎多呈圆形,比藟头小。目前国内、外对藟头、薤白的功能性质有一定的研究。N-亚硝基化合物是公认的致癌物,亚硝酸盐作为产生N-亚硝基化合物的前体物质,可与胃、肠中的二级胺或三级胺反应生成N-亚硝基化合物^[2-4]。张桂英^[5]等研究发现,薤白有清除亚硝酸盐的作用,而且这个作用在酸性(pH2)和碱性(pH12)条件下较强。在正常状态下,机体内自由基的产生与清除处于动态平衡。如果自由基产生过多或清除过慢,它通过攻击生命大分子物质及各种细胞器,造成机体在分子水平、细

胞水平及组织器官水平的损伤^[6]。孟庆国^[7]等研究山东省平阴县和高密市的两种薤白水提物,发现它们均可抑制由Fenton反应引起的羟基苯甲酸的生成;丁丰^[8]等的研究也证明,薤白乙醚提取物和原汁对 $\cdot OH$ 具有明显的清除作用,作用强度与薤白提取液浓度存在正相关;夏新奎^[9]研究发现薤白多糖对超氧阴离子和 $\cdot OH$ 有清除作用。目前还未见对苦藟、藟头、薤白致突变作用的评价,国内外对苦藟的研究还基本处于空白。本文通过对苦藟抗突变等功能性质的研究,目的是为苦藟的深加工和进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜苦藟 购于重庆市北碚区天生农贸市场,洗净晾干表面水分、去掉根须后备用;番红花红 T 北京东环联合化工厂;环磷酰胺 山西普德药业有限公司;所用试剂 均为分析纯或生物试剂。

RE52CS 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;

收稿日期: 2009-12-28

作者简介: 丁晓雯(1963-),女,教授,博士,研究方向: 食品安全与质量控制。

S22PC 可见光分光光度计 上海棱光技术有限公司; XSN-3G 显微镜 重庆光电仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苦藜提取液的制备

1.2.1.1 鲜苦藜提取液的制备 称取洗净的鲜苦藜, 打碎, 加苦藜重量 1/3 的蒸馏水浸泡 30min, 过滤, 将残渣加少量蒸馏水浸泡 30min, 过滤, 如此重复处理 3 次, 合并滤液并定容至每毫升苦藜提取液相当于 1.0g 鲜苦藜, 冰箱中保存备用。

1.2.1.2 煮沸不同时间苦藜提取液的制备 分别称取洗净的鲜苦藜, 打碎, 加适量蒸馏水分别加热煮沸 5、10、20、30、45min, 过滤得滤液, 如此重复处理 3 次, 合并滤液并定容至每毫升苦藜提取液相当于 1.0g 鲜苦藜, 冰箱保存备用。

1.2.2 鲜苦藜提取液对蚕豆根尖细胞微核率影响的测定 将鲜苦藜提取液分别稀释, 配制成 2.0、4.0、6.0、8.0、20.0、40.0、60.0、80.0mg/mL 的浓度, 用蒸馏水做阴性对照, 10 μ g/mL 环磷酰胺溶液作阳性对照, 按参考文献 [10] 的方法处理蚕豆根尖, 每组镜检至少 6 个根尖, 每个根尖至少观察 1000 个间期细胞, 统计微核细胞数。按式 (1)、式 (2) 分别计算微核率和微核指数:

$$\text{MCN}(\text{微核率})(\%) = \frac{\text{溶液染毒根尖观察到的 MCN 数}}{\text{溶液染毒根尖观察到的细胞数}} \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

$$\text{微核指数} = \frac{\text{根本的微核率}}{\text{阴性对照的微核率}} \quad \text{式(2)}$$

结果判定: 受试物所致的微核率与阴性对照比较, 如果差异有显著性且微核指数 ≥ 1.5 , 判断其具有致突变作用。

1.2.3 鲜苦藜提取液体外抗氧化能力的测定

1.2.3.1 鲜苦藜提取液对 H₂O₂ 清除率的测定 用碘量法 [11] 测定。在碘量瓶中加入一定量的鲜苦藜提取液, 1.0mL pH6.4 的缓冲液, 0.1mol/L H₂O₂ 1.0mL, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min 后取出, 加入 1.0mL 饱和 KI, 再于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 2h, 用标准 Na₂S₂O₃ 滴定剩余的 I₂。按照公式 (3) 计算苦藜提取液对 H₂O₂ 清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{V_1 - V_2}{V_1 - V_0} \times 100\% \quad \text{式(3)}$$

式中: V₁ 为用蒸馏水代替同体积苦藜提取液所耗 Na₂S₂O₃ 的体积 (mL); V₂ 为苦藜提取液消耗 Na₂S₂O₃ 的体积 (mL); V₀ 为试剂所耗 Na₂S₂O₃ 的体积 (mL)。

1.2.3.2 鲜苦藜提取液对 \cdot OH 清除率的测定 根据参考文献 [12] 进行测定。由 EDTA Na₂-Fe(II)-H₂O₂ 体系产生 \cdot OH, 由于 \cdot OH 可使番红花 T 褪色, 可根据褪色的程度衡量苦藜提取液清除 \cdot OH 的能力。取 0.05mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液 1.0mL, 70 μ g/mL 的番红花 T 1.0mL, 一定量的苦藜提取液, 3% 过氧化氢 1.0mL, 6mmol/L EDTA Na₂-Fe(II) 1.0mL, 混合后于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30min 后取出, 在 520nm 测定吸光度。按照公式 (4) 计算苦藜提取液对 \cdot OH 的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100\% \quad \text{式(4)}$$

式中: A₁: 按要求加入样品液和全部试剂测得的吸光度值; A₂: 只加样品液不加其它任何试剂所测得吸光度值; A₃: 用蒸馏水代替样品液和 \cdot OH 产生体系, 测得的番红花 T 的吸光度值; A₄: 用蒸馏水代替样品液, 测得的 \cdot OH 使番红花 T 褪色后的吸光度值。

1.2.4 苦藜提取液对亚硝酸盐清除率的测定 将 5mL pH 3.3 的柠檬酸钠缓冲液加入到 25mL 容量瓶中, 加入一定体积的 5 μ g/mL 的 NaNO₂, 分别加入不同体积的苦藜提取液, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 1h 后, 按参考文献 [13] 中第二法测定残余亚硝酸钠在 538nm 的吸光度值, 按照公式 (5) 计算苦藜提取液对 NaNO₂ 的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\% \quad \text{式(5)}$$

式中: A₀ 为不加苦藜提取液的亚硝酸钠的吸光度值; A_x 为加入苦藜提取液后残余亚硝酸钠的吸光度值。

上述实验均作 3 次以上的重复, 实验数据用 excel(2003 版) 进行处理。

2 结果与分析

2.1 苦藜提取液对蚕豆根尖细胞微核率的影响

微核 (micronucleus, 简称 MCN) 是染色体畸变在间期细胞中的一种表现形式, 微核率的高低与诱变因子的剂量呈正相关, 与肿瘤发生率也有较好的相关性 [14-15]。用鲜苦藜提取液作用于蚕豆根尖细胞, 观察它们对其微核率的影响, 从而评价苦藜提取液是否具有致突变或抗突变作用, 实验结果见表 1。

表 1 苦藜提取液对蚕豆根尖微核率的影响

苦藜提取液 (mg/mL)	MCN(%) (X \pm SD)	微核指数
蒸馏水	9.03 \pm 1.01	
10 μ g/mL 环磷酰胺	26.72 \pm 4.94	2.96
2.0	12.98 \pm 5.36	1.44
4.0	12.97 \pm 4.84	1.44
6.0	13.25 \pm 1.60	1.47
8.0	8.62 \pm 2.83	0.95
20.0	7.85 \pm 2.94	0.87
40.0	8.17 \pm 0.88	0.90
60.0	6.85 \pm 3.51	0.76
80.0	6.97 \pm 1.35	0.77

通过表 1 的实验结果可知, 蒸馏水 (阴性对照)、10.0 μ g/mL 环磷酰胺 (阳性对照) 作用于蚕豆根尖产生的微核率 (%) 分别是 9.03% \pm 1.01% 和 26.72% \pm 4.94%。环磷酰胺所致的微核率明显高于阴性对照, 微核指数达到 2.96。鲜苦藜提取液的浓度从 2.0mg/mL 上升到 80.0mg/mL, 所致蚕豆根尖细胞微核率 (%) 由 12.98% \pm 5.36% 下降到 6.97% \pm 1.35%, 微核指数为 1.44~0.77, 都没有超过 1.5。结果表明, 鲜苦藜提取液不使蚕豆根尖微核率显著升高, 而且对其有一定的降低作用, 与阴性对照比较, 80mg/mL 的苦藜提取液所致蚕豆根尖细胞微核率降低了 22.82%。表明鲜苦藜提取液有一定的抗突变作用。

2.2 鲜苦蕒提取液体外抗氧化作用

2.2.1 鲜苦蕒提取液对 H_2O_2 的清除作用 所有能产生 $O_2^{\cdot-}$ 的生物体系都能通过歧化反应产生 H_2O_2 。 H_2O_2 在有过渡金属离子(如 Fe^{2+} 或 Cu^+) 存在时,发生典型的 Fenton 反应,生成 $\cdot OH$, $\cdot OH$ 是化学性质最活泼、毒性最大的活性氧^[16]。如果在反应体系中对 H_2O_2 的清除率越高,表明对活性氧的清除作用越强。鲜苦蕒提取液对 0.1mol/L 1.0mL H_2O_2 的清除作用的实验结果如图 1 所示。

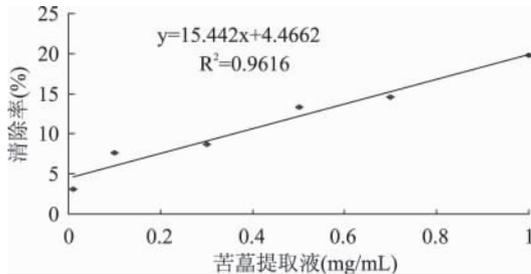


图 1 苦蕒提取液对 H_2O_2 的清除作用

由实验结果可知,鲜苦蕒提取液的浓度在 $0.01\sim 1.0\text{mg/mL}$ 时,对 0.1mol/L 1.0mL H_2O_2 的清除率由 3.1% 升高到 19.8% ,而且它们之间呈良好的正相关,相关系数达到 0.9806 。表明随着鲜苦蕒提取液浓度的增加,对 H_2O_2 的清除能力将增强。

2.2.2 鲜苦蕒提取液对 $\cdot OH$ 的清除作用 不同浓度的鲜苦蕒提取液对 $\cdot OH$ 清除作用的实验结果见图 2。

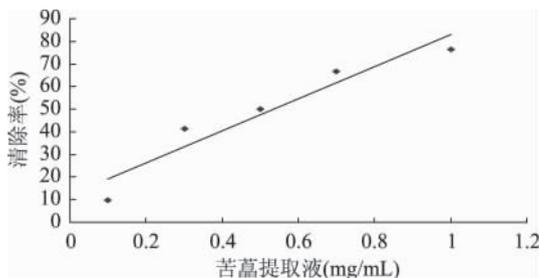


图 2 苦蕒提取液对 $\cdot OH$ 的清除作用

由图 2 的实验结果可知,鲜苦蕒提取液的浓度为 $0.1\sim 1.0\text{mg/mL}$ 对 $\cdot OH$ 的清除率从 9.6% 上升到 76.9% ,它们之间呈良好的正相关,相关系数为 0.9569 。表明随着鲜苦蕒提取液浓度的增加,对 $\cdot OH$ 的清除能力将增强。

2.3 苦蕒提取液对 $NaNO_2$ 的清除作用

2.3.1 鲜苦蕒提取液对 $NaNO_2$ 的清除作用 取 $5\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸钠溶液 1.0mL ,加入不同量的鲜苦蕒提取液,反应一定时间后测定残余的亚硝酸盐的量,计算鲜苦蕒提取液对亚硝酸盐的清除率,实验结果见图 3。

由图 3 的实验结果可知,鲜苦蕒提取液对 $0.2\mu\text{g/mL}$ 亚硝酸盐有明显的清除作用,而且鲜苦蕒提取液的浓度与亚硝酸盐清除率呈正相关,当苦蕒提取液的浓度达到 80mg/mL 以上,它们能够完全清除浓度为 $0.2\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸盐,清除率为 100% 。

分别在 0.2 、 0.4 、 $1.0\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸钠溶液中加入较低剂量的鲜苦蕒提取液,反应一定时间后测定

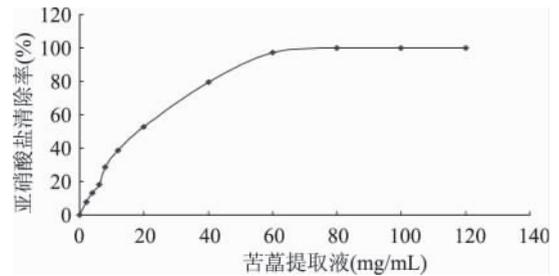


图 3 苦蕒提取液对 $NaNO_2$ 的清除作用

残余亚硝酸盐的量,计算清除率,实验结果见图 4。

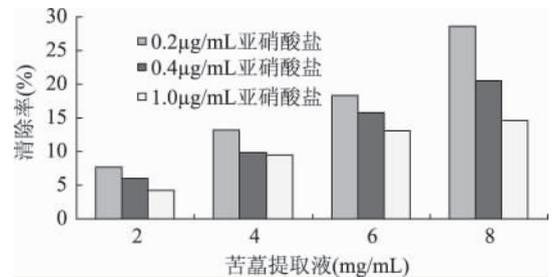


图 4 苦蕒提取液对不同浓度 $NaNO_2$ 的清除率 (%)

从图 4 可以清楚地知道,随着苦蕒提取液浓度的增加,对一定浓度亚硝酸盐的清除率增强;当苦蕒提取液的浓度一定时,随着亚硝酸盐浓度的增高,清除率逐渐减少。因此要发挥苦蕒提取液对亚硝酸盐的清除作用,必须注意足够的用量才能发挥良好的清除作用。

2.3.2 煮沸不同时间的苦蕒提取液对亚硝酸盐的清除作用 用不同浓度、煮沸不同时间的苦蕒提取液处理 $0.2\mu\text{g/mL}$ 的 $NaNO_2$,考察高温是否对苦蕒提取液对 $NaNO_2$ 的清除率有影响,实验结果如图 5。

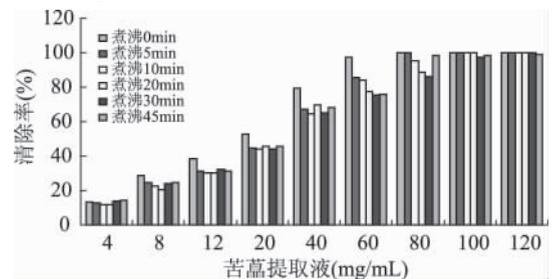


图 5 煮沸不同时间的苦蕒提取液对 $NaNO_2$ 的清除率

由图 5 可知 $4\sim 120\text{mg/mL}$ 的鲜苦蕒提取液对亚硝酸盐的清除率由 13.19% 上升到 100.00% ;煮沸 5min 后的 $4\sim 60\text{mg/mL}$ 苦蕒提取液对亚硝酸盐的清除率比鲜苦蕒提取液下降了 $1.14\%\sim 11.70\%$,提取液浓度在 80mg/mL 以上时,其清除率可以达到 100.00% ;煮沸 10min 后的 $4\sim 60\text{mg/mL}$ 苦蕒提取液清除率下降了 $10.31\%\sim 13.76\%$,提取液浓度在 80mg/mL 以上时,其清除率可以达到 100.00% ;煮沸 20min 后的 $4\sim 60\text{mg/mL}$ 苦蕒提取液清除率下降了 $11.71\%\sim 20.15\%$,提取液浓度在 100mg/mL 以上时,其清除率可以达到 100.00% ;煮沸 30min 后的 $4\sim 60\text{mg/mL}$ 苦蕒提取液清除率下降了 $3.56\%\sim 22.45\%$,提取液浓度在 120mg/mL 时,其清除率可以达到 100.00% ;煮沸 45min 后的 $4\sim 60\text{mg/mL}$ 苦蕒提取液清除率下降了 $7.12\%\sim 21.76\%$,提取液浓度在 120mg/mL 时,其清除率也达不到 100.00% 。实验结

果表明,同样浓度的苦藟提取液,鲜苦藟提取液对亚硝酸盐的清除率高于加热处理的,随着加热时间的延长,苦藟提取液的清除率有一定的下降,表明加热对苦藟提取液所含的对亚硝酸盐有清除作用的成分有一定的破坏作用。

3 结论

3.1 2.0~80mg/mL 的鲜苦藟提取液使蚕豆根尖的微核率由 $12.98\% \pm 5.36\%$ 降到 $6.97\% \pm 1.35\%$,表明鲜苦藟提取液有一定的抗突变作用。

3.2 0.01~1.0mg/mL 的鲜苦藟提取液对 0.1mol/L 1.0mL H_2O_2 的清除率为 3.1%~19.8%; 0.1~1.0mg/mL 的鲜苦藟提取液对 $\cdot OH$ 的清除率为 9.6%~76.9%。鲜苦藟提取液的浓度与它对 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 的清除能力间呈良好的正相关。

3.3 4~120mg/mL 鲜苦藟提取液对亚硝酸盐的清除率为 13.19%~100.00%,煮沸 45min 后清除率为 14.13%~99.23%。表明苦藟提取液对亚硝酸盐有清除作用,提取液的浓度与清除率有良好的正相关,随着苦藟提取液浓度的增高,对亚硝酸盐的清除率增强;随着苦藟提取液煮沸时间的延长,清除能力降低。

上述研究结果表明,苦藟与同属的薤白的生理功能有一定的相似性,即都具有清除亚硝酸盐、抗氧化作用,苦藟还具有一定的抗突变作用。

参考文献

- [1] 周向荣,夏延斌,周跃斌,等.藟头的主要功能成分及其作用的研究进展[J].食品与机械,2006,22(3):73-75.
- [2] 丁晓雯,沈立荣.食品安全导论[M].北京:中国林业出版社,2008:66-68.

(上接第 83 页)

多糖 POJ-U1a 为葡聚糖,极易溶于水,黏度非常高,估计是麦冬中黏性物质的主要成分。用原子力显微镜观察麦冬多糖 POJ-U1a,结果得到了清晰、稳定的图像,证明麦冬多糖具有高度分枝的化学结构。

参考文献

- [1] 田友清,于伯阳,寇俊平.麦冬药理研究进展[J].中国医学生物技术应用杂志,2004(2):78.
- [2] 蒋凤荣,张旭,范俊,等.麦冬药理作用研究进展[J].中医药学刊,2006,24(2):236-237.
- [3] Cote GL, Willet JL. Thermomechanical depolymerization of dextran[J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 39(2): 119-126.
- [4] Zhang M, Zhang L, Cheung PCK, et al. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium* [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56(2): 123-128.
- [5] Morris VJ, Gunning AP, Kirby AR, et al. Atomic force microscopy of plant cell walls, plant cell wall polysaccharides and gels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1997, 21: 61-66.
- [6] 张晶,韩喜江,李艳波.枸杞多糖的分离纯化及性质研究

[3] Lijinsky W. Nitrosamines and nitrosamindies in the etiology of stomach bowel cancers [J]. Cancer Res, 1997, 40: 2446.

[4] 何计国,甄润英.食品卫生学[M].北京:中国农业大学出版社,2003:89-100.

[5] 张桂英,赵林伊,王宝贵,薤白、毛葱清除亚硝酸盐作用的研究[J].长春中医学院学报,2002,18(4):43-44.

[6] 秦涛余,陈志伟.机体内活性氧生理功能研究进展[J].生命科学仪器,2008(2):12-16.

[7] 孟庆国,朱庆磊,邓淑娥.薤白水提取物对羟自由基的清除作用[J].潍坊医学院学报,1998,20(1):66-67.

[8] 丁丰,焦淑萍,方良.薤白提取物清除羟自由基及抗 DNA 损伤作用的实验研究[J].中药材,2005,28(7):592-593.

[9] 夏新奎.薤白多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[D].西北农林科技大学硕士学位论文,2007:46-47.

[10] 孔志明.环境毒理学[M].第二版.南京:南京大学出版社,2004:196-198.

[11] 潘勇军,谢洪泉,谭晓明,等.碘量滴定法测定过氧化氢溶液浓度的改进[J].理化检验·化学分册,2003,39(7):404-405.

[12] 秦德安,苏丹,王晓玲.橙皮苷对羟自由基的清除作用[J].中国药学杂志,1996,31(7):396-398.

[13] 国家质量技术监督局.GB/T 5009.33-2008,食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定方法[S].

[14] 高雪,胡婧,金毅. EDTA 对蚕豆根尖细胞微核的诱变作用[J].氨基酸和生物资源,2004,26(1):35-37.

[15] 陶少武.利用蚕豆根尖细胞诱变微核率变化筛选抗肿瘤中草药的尝试[J].广州中医药大学学报,2005,22(6):482-483.

[16] 盛丽,苏碧泉.过氧化物酶体中活性氧的生成与清除机理[J].辽宁化工,2003,32(2):84-87.

[J].黑龙江大学学报:自然科学版,2008,25(3):377-380.

[7] 孙元琳,顾小红,汤坚,等.当归水溶性多糖的分离、纯化及结构初步分析[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):1-4.

[8] 魏远安,方积年.高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量[J].药学学报,1989,24(7):532-535.

[9] 石磊,附佑丽,陈靠山.柘树根多糖的分离纯化及组成初步研究[J].山东大学学报:理学版,2007,42(5):74-78.

[10] 韦革宏,李素俭,徐万里,等.根瘤菌菌体及胞外多糖红外光谱特征[J].应用与环境生物学报,1999,5(3):310-314.

[11] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].第二版.杭州:浙江大学出版社,1998.

[12] Zhang J, Wu J, Liang JY, et al. Chemical characterization of *Artemisia* seed polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67: 213-218.

[13] Morris VJ, Mackie AR, Wilde PJ, et al. Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers at the molecular level [J]. Lebensm - Wiss u - Technol, 2001, 34: 3-10.

[14] 孙润广,张静.甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究[J].化学学报,2006,64(24):2467-2472.

[15] 李国有,陈勇,王云起,等.原子力显微镜在多糖分子结构研究中的应用[J].现代仪器,2006(5):14-17.