

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.02.030

胶红酵母 CICC 33013 胞外多糖抑制肝癌 细胞活性研究

Inhibitory effect of exo-polysaccharide from *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013 on hepatocellular carcinoma cell activity

马文锦 李梅林 王博 周彦兵

MA Wen-jin LI Mei-lin WANG Bo ZHOU Yan-bing

彭涛 张永显 于长青 班省华

PENG Tao ZHANG Yong-xian YU Chang-qing BAN Sheng-hua

(甘肃省轻工研究院有限责任公司, 甘肃 兰州 730000)

(Gansu Institute of Light Industry Limited Liability Company, Lanzhou, Gansu 730000, China)

摘要:采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法对胶红酵母胞外多糖组分(*Rhodotorula mucilaginosa* exo-polysaccharide 2-A, REPS2-A)抑制 10 种常见癌细胞(血癌细胞 K562、胃癌细胞 BGC823、胃癌细胞 SGC7901、胃癌细胞 MKN28、肝癌细胞 HepG2、BEL7402、Hep3B、胰腺癌细胞 HS66T、乳腺癌细胞 SKBR3、宫颈癌细胞 HeLa)能力进行了筛选,结果证明胞外多糖组分 REPS2-A 对肝癌细胞 HepG2 有较好的抑制效果。通过胞外多糖组分 REPS2-A 对 HepG2 细胞抑制作用最佳浓度及时效性的研究,探讨胞外多糖组分 REPS2-A 对肝癌 HepG2 细胞的生长抑制及其作用机制。结果表明:当胞外多糖组分 REPS2-A 的浓度为 1 mg/mL 时,肝癌细胞 HepG2 的抑制率高于 IC_{50} 时的抑制率,抑制效果明显优于其他浓度。肝癌细胞 HepG2 的自发凋亡率为 0.40%,当胞外多糖组分 REPS2-A 浓度为 1 mg/mL,分别处理 24, 48, 72 h,肝癌细胞 HepG2 的凋亡率依次为 77.70%, 88.18%, 97.08%。胞外多糖组分 REPS2-A 能有效抑制肝癌细胞的增殖,使肝癌细胞 HepG2 阻滞发生在 G1/S 期,并诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡,且存在剂量效应。

关键词:胶红酵母;胞外多糖;HepG2;细胞凋亡

基金项目:甘肃省重点研发计划(编号:18YF1FA012);西北特色农畜产品深加工国家地方联合工程研究中心创新能力建设项目(编号:发改高技[2015]3173号);甘肃特色农产品深加工技术创新中心平台能力建设项目(编号:甘科计[2018]23号);甘肃省特色农产品深加工成果转化基地科技计划项目(编号:2019-4-41)

作者简介:马文锦(1982—),男,甘肃省轻工研究院有限责任公司高级工程师,博士。E-mail:mawj0707@163.com

收稿日期:2019-08-30

Abstract: The anti-tumor activity of the exo-polysaccharide component REPS2-A metabolized by *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013 was studied. The exo-polysaccharide component REPS2-A was inhibited by tetramethylazole blue (MTT) method in 10 common cancer cells including blood cancer cell K562, gastric cancer cell BGC823, gastric cancer cell SGC7901, gastric cancer cell MKN28, liver cancer cell HepG2, BEL7402, Hep3B, pancreatic cancer cell HS66T, breast cancer cell SKBR3, and cervical cancer cell HeLa. The results showed that the exo-polysaccharide component REPS2-A had a good inhibitory effect on HepG2 cells. By studying the optimal concentration and time effect of exo-polysaccharide component REPS2-A on HepG2 cells, the growth inhibition and its mechanism of exo-polysaccharide component REPS2-A on HepG2 cells were investigated. The results showed that when the concentration of exo-polysaccharide component REPS2-A was 1 mg/mL, the inhibition rate of HepG2 in liver cancer cells was higher than that in IC_{50} , and the inhibition effect was significantly better than that in other concentrations. The spontaneous apoptosis rate of HepG2 was 0.40%. When the concentration of exo-polysaccharide component REPS2-A was 1 mg/mL, the apoptosis rate of HepG2 was 77.70%, 88.18% and 97.08% after 24, 48 and 72 h treatment, respectively. Exo-polysaccharide component REPS2-A could effectively inhibit the proliferation of liver cancer cells, cause HepG2 block in the G1/S phase, and induce HepG2 apoptosis in liver cancer cells with dose effect.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*; exo-polysaccharide; HepG2; cell apoptosis

胶红酵母是一种抗逆性较强的腐生酵母,含有包括

7 种人体必需氨基酸在内的 16 种常见的氨基酸,6 种脂肪酸,以及丰富的类胡萝卜素、V_E、核苷酸和虾青素等微量元素^[1]。胞外多糖(exo-polysaccharide, EPS)是由微生物包括细菌、真菌、藻类释放到周围环境中促进细胞生长,抑制溶菌酶,储存营养和加强耐有毒重金属的一类多糖^[2]。近年来,胶红酵母的研究主要集中在其类胡萝卜素^[3-4]的富集培养条件和优良菌株的筛选^[5-6]等方面。研究^[7-8]发现,酵母菌胞外多糖(YEPS)具有潜在的抗氧化、抗凝血、抗血栓和抗病毒活性,可用于生产有机体免疫调节剂。目前,国内外对细菌胞外多糖和一些大型真菌胞外多糖的研究较多^[9],而对酵母菌胞外多糖的菌株筛选、结构解析和功能活性研究较少^[10],尤其胶红酵母胞外多糖的结构解析和功能活性尚未见报道。

课题组^[11]前期通过醇沉,脱蛋白,透析等方法得到胶红酵母 CICC 33013 菌株代谢的胞外多糖(REPS),复溶后经 DEAE-52 纤维素层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离纯化,高效凝胶渗透色谱法色谱图显示胞外多糖组分 REPS2-A 是单一、对称峰,表明得到的胶红酵母胞外多糖组分 REPS2-A 是均相样品,根据葡聚糖标准,胞外多糖组分 REPS2-A 的平均分子量为 7.125×10^6 Da。并基于红外光谱、核磁共振和甲基化分析,确定了胶红酵母胞外多糖组分 REPS2-A 是高度分支的多糖,由(1→3)-连接的 Gal 为骨架组成,分支是由(1→2)-连接的 Glc、(1→4)-连接的 Man、(1→3)-连接的 Glc、(1→4,6)-连接的 Man 和(1→2,3,4)-连接的 Ara 组成。有研究^[12-13]表明,具有抗肿瘤活性的甘露聚糖多为(1→6)键型,活性半乳糖则以(1→3)糖苷键连接。试验拟从增殖、凋亡与周期等方面分析评价胞外多糖组分 REPS2-A 对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用,为胶红酵母胞外多糖在食品与药品中的应用提供理论支持和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胶红酵母菌株(*Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013):中国典型培养物保藏中心;

肝癌细胞 K562、胃癌细胞 BGC823、SGC7901、MKN28、肝癌细胞 HepG2、BEL7402、Hep3B、胰腺癌细胞 HS66T、乳腺癌细胞 SKBR3、宫颈癌细胞 HeLa:兰州大学第一医院中心实验室;

RPMI 1640 培养液:武汉凌飞科技有限公司;

胎牛血清:浙江天杭生物科技股份有限公司;

磷酸盐缓冲溶液、胰酶:天津科密欧化学试剂有限公司;

青霉素-链霉素溶液:国药集团化学试剂有限公司;

膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素细胞凋亡检测试剂盒:广州威佳科技有限公司;

其他试剂:均为分析纯;

流式细胞仪:LDZX-30KBS 型,上海申安医疗器械厂;

倒置显微镜:HH-4 型,金坛市宏华仪器厂;

酶联免疫检测仪:DG5033A 型,上海巴玖实业有限公司;

离心机:CT15RT 型,上海天美生化仪器设备有限公司;

摇床振荡器:ZD-9550 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

CO₂ 培养箱:UV-1100 型,上海美谱达仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 癌细胞筛选 在倒置光学显微镜下观察各组癌细胞,选取生长良好的各癌细胞^[14]。选出的细胞进行分类处理:① 悬浮类细胞直接移入无菌的离心管进行离心;② 贴壁类细胞移除原有的培养基,用 PBS 清洗 2~3 次,加入 1~2 mL 胰酶静止 3~5 min,加入完全培养液终止消化,移入无菌的离心管,离心条件为 1 000 r/min、5 min,移除上清液。

将对数生长期的血癌细胞 K562、胃癌细胞 BGC823、胃癌细胞 SGC7901、胃癌细胞 MKN28、肝癌细胞 HepG2、BEL7402、Hep3B、胰腺癌细胞 HS66T、乳腺癌细胞 SKBR3、宫颈癌细胞 HeLa 接种在无菌的 96 孔板,接种浓度约为 10^4 个/mL,重复 7 次,并设置空白对照组,加入多糖(浓度为 1.0 mg/mL),混合均匀放入 CO₂ 培养箱中培养 24 h。吸去上清液,加入 RPMI 1640 培养液和 MTT 溶液,于 37 °C、5% CO₂ 的条件下继续培养 4 h。吸去上清液,分别加入 DMSO,置于摇床上低速振荡 10~15 min,使结晶物溶解完全。在波长为 490 nm 条件下对各孔的吸光值进行测定^[15-16]。细胞增殖抑制率按式(1)计算:

$$R = (1 - \frac{A_p}{A_c}) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——细胞增殖抑制率, %;

A_p——试验组吸光值;

A_c——空白组吸光值。

1.2.2 多糖药物对 HepG2 细胞作用浓度及时效性测定 经过筛选肝癌细胞 HepG2 为后续主要的研究对象。在 96 孔板内接种对数生长期的 HepG2 细胞,使每孔细胞数约为 1.0×10^4 个。多糖浓度分别为 0.0, 0.5, 1.0, 10.0 mg/mL, 做 6 个重复并设置空白对照,并以人正常细胞株(L02)和 Oxaliplatin 处理 HePG2 分别为阴性和阳性对照组。加样完成后振荡均匀,于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养 24, 48, 72 h 进行测定^[17]。

1.2.3 HepG2 细胞凋亡检测 多糖作用于 HepG2 细胞

的浓度为 1.0 mg/L, 未添加多糖的细胞做为空白对照。放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24, 48, 72 h 形成 3 个试验组, 每组各做 3 个平行。培养结束后移除培养液, 加入 PBS, 细胞刮分散细胞, 移入离心管离心 (1 000 r/min, 4 °C, 5 min), 移除上清, 收集细胞。吸取 10 μL 细胞沉淀悬于 190 μL 结合缓冲液, 加入膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素细胞凋亡显像剂, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 加入 295 μL 结合缓冲液, 在 1 h 内上机检测, 上机前 5 min 加入 5 μL PI (碘化丙啶)^[18-19]。

1.2.4 细胞形态学观察 细胞制成单细胞悬液, 细胞数约 10⁶ 个/mL, 同时设不加 HepG2 细胞对照组和浓度为 1.0 g/L 的多糖作用 24, 48, 72 h 的试验组, 培养结束后, 在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.5 细胞周期测定 将培养细胞制成单细胞悬液, 细胞数约 10⁶ 个/mL, 同时设细胞对照组和浓度为 1.0 g/L 的多糖作用 24, 48, 72 h 的试验组。用 PBS 清洗 2 次, 匀浆细胞, 用预冷的 75% 酒精 (1~3 mL) 固定, 加入 PI, 置 4 °C 避光染色 30 min, 400 目尼龙网过滤后, 将样品加入流式细胞仪, 氩离子激发 PI 荧光, 波长 488 nm 处测定。

1.3 数据统计分析

数据采用 Sigmaplot 12.5 进行统计分析, 试验结果用 (x±s) 表示, 3 个平行试验, 采用 ANOVA 进行 Duncana 多重比较分析 (P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 多糖组分 REPS2-A 对不同癌细胞的作用

采用 MTT 法研究多糖组分 REPS2-A 对 10 种常见癌细胞的抑制作用, 效果如图 1 所示。结果表明, 多糖组分 REPS2-A 对选取的 10 种癌细胞都有一定的抑制作用, 癌细胞的种类不同, 抑制效果亦不相同。其中血癌细胞 K562、胃癌细胞 BGC823、胃癌细胞 SGC7901、胃癌细胞 MKN28、肝癌细胞 BEL-7402、肝癌细胞 Hep-3B、胰腺癌细胞 HS66T、乳腺癌细胞 SKBR3、宫颈癌细胞 HeLa 9 种癌细胞的抑制率均低于 50%, 说明多糖组分 REPS2-A

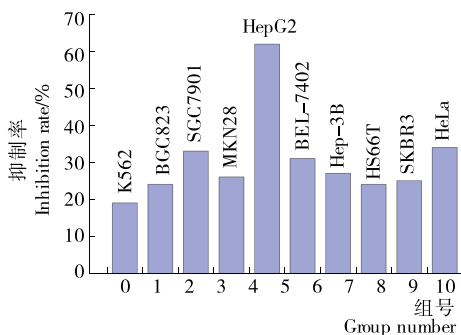


图 1 多糖 REPS2-A 对不同癌细胞的抑制结果

Figure 1 Inhibitory effect of polysaccharide REPS2-A on different cancer cells

对这些细胞没有明显的抑制效果, 可能是自发凋亡引发的结果。对肝癌细胞 HepG2 的抑制率明显的高于其他 9 种癌细胞, 其抑制率为 62%, 高于 50%, 说明多糖组分 REPS2-A 对肝癌细胞 HepG2 的抑制具有特异性。因此后续试验选取肝癌细胞 HepG2 作为研究对象。

2.2 多糖组分 REPS2-A 溶液的浓度及时效性分析

如图 2 所示, 随着多糖组分 REPS2-A 溶液浓度的增加, 其对肝癌细胞 HepG2 的抑制率逐渐升高, 而随着作用时间的延长, 多糖 REPS2-A 溶液对肝癌细胞 HepG2 的抑制率变化范围较小, 说明在一定的时间 (72 h) 内, 时间的变化对多糖 REPS2-A 溶液的作用效果影响不大。当浓度低于 1.0 mg/mL 时, 多糖 REPS2-A 溶液对肝癌细胞 HepG2 的抑制率均低于 50%, 说明多糖组分 REPS2-A 溶液浓度低于 1.0 mg/mL 时的研究意义不大。浓度为 1.0 mg/mL 时, 多糖组分 REPS2-A 溶液对肝癌细胞 HepG2 的抑制率均高于 50%, 对正常肝细胞 L02 的抑制率为 31%, 说明在该浓度下肝癌细胞 HepG2 得到了较好的抑制效果。当浓度为 10.0 mg/mL 时, 抑制率接近 100%, 此时的多糖组分 REPS2-A 溶液的浓度太高影响了细胞的生长, 因此, 无实际研究意义。

以经典抗癌药物奥沙利铂作为阳性对照, 给予铂类药物后, 肝癌细胞 HepG2 的生长均受到明显抑制, 细胞生长密度明显降低, 活细胞数量明显减少。随着给药浓度增强和给药时间延长, 铂类药物对肝癌细胞的抑制作用逐渐增强, 以 24~48 h 的抑制作用最为明显。以药物作用 48 h 肝癌细胞株的 IC₅₀ 值显示: HepG2 细胞株对铂类药物敏感。相比多糖作为抑制剂, 10 mg/L 多糖对肝癌细胞的抑制率与 0.1 mg/L 奥沙利铂药物的相当。

2.3 多糖组分 REPS2-A 对 HepG2 细胞凋亡的影响

由图 3、4 可知, 未经多糖组分 REPS2-A 处理的 HepG2 细胞的自发凋亡率是 0.40%; 当多糖组分 REPS2-A 浓度为 1 mg/mL 作用 24, 48, 72 h 时, 其细胞早期凋亡

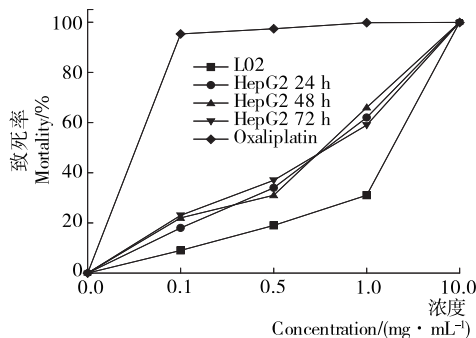


图 2 REPS2-A 溶液对肝癌细胞 (HepG2) 作用的浓度及时效性

Figure 2 The effect of concentration and timeliness of REPS2-A on HepG2 cells

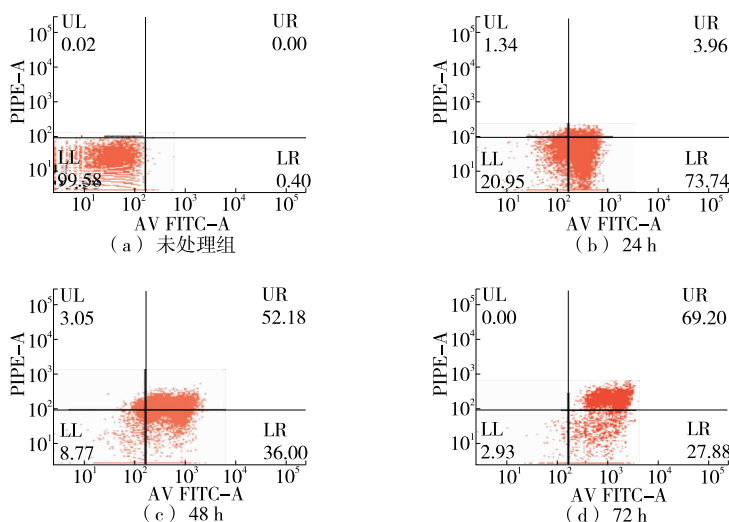


图 3 REPS2-A 浓度为 1 mg/mL 时不同时间 HepG2 细胞凋亡分析

Figure 3 Apoptotic rates of HepG2 cells untreated and treated with 1 mg/mL exopolysaccharide REPS2-A for 24, 48, and 72 h

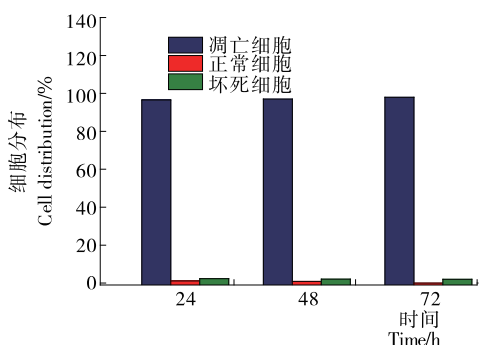


图 4 REPS2-A 浓度为 1 mg/mL 时不同时间 (24, 48, 72 h) HepG2 细胞凋亡率

Figure 4 The apoptosis rate of HepG2 cells at different time (24, 48 and 72 h) when the concentration of reps2-a was 1 mg/mL

率分别为 73.74%, 36.00%, 27.88%, 凋亡率分别为 77.70%, 88.18%, 97.08%。与对照组相比,多糖组分 REPS2-A 能促进肝癌 HepG2 细胞凋亡。

2.4 多糖组分 REPS2-A 对 HepG2 细胞形态学的影响

由图 5 可以看出, HepG2 细胞在 REPS2-A 作用下生长、繁殖受到明显的抑制,并且随着浓度的增加抑制效果有明显的增加。

2.5 多糖组分 REPS2-A 对 HepG2 细胞周期的影响

用流式细胞仪检测 HepG2 细胞在多糖组分 REPS2-A 浓度为 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/mL, 作用 24 h 各试验组细胞周期的变化,结果如图 6 和表 1 所示。随着浓度的增加, G0~G1 期细胞所占百分比升高,表明 G1/S 期发生阻滞。

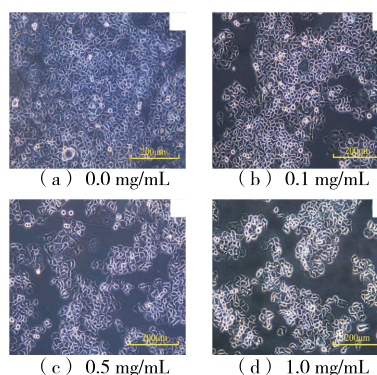


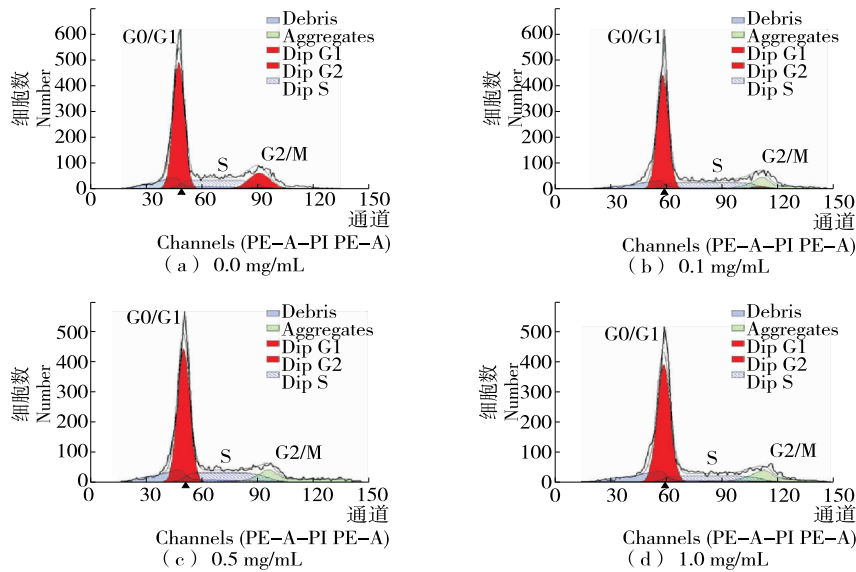
图 5 不同多糖 REPS2-A 浓度处理时 HepG2 细胞形态特征

Figure 5 Morphological characteristics of HepG2 cells treated with different concentrations of polysaccharide REPS2-A

周期分析结果与细胞生长形态影响结果相一致,当 REPS2-A 浓度为 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/mL 作用 24 h 后。多糖组分 REPS2-A 对 HepG2 细胞的生长有明显的抑制作用。

3 结论

试验以胶红酵母 CICC 33013 代谢的胞外多糖组分 REPS2-A 为研究对象,揭示胶红酵母胞外多糖在肝肿瘤细胞活性中的抑制作用,结果显示:当多糖组分 REPS2-A 浓度为 1 mg/mL,作用时间分别为 24, 48, 72 h 时,肝癌细胞 HepG2 凋亡率分别为 77.70%, 88.18%, 97.08%。采用流式细胞仪测定多糖对 HepG2 细胞作用周期,结果显示:多糖组分 REPS2-A 溶液使 HepG2 细胞在 G1/S 期



Debris:细胞碎片,Aggregates:聚集体,Dip G1:G1期DNA的相对含量,Dip G2:G2期DNA的相对含量,Dip S:S期DNA的相对含量

图6 不同浓度的REPS2-A处理24h的HepG2细胞的流式细胞仪分析图

Figure 6 Flow cytometry analysis of HepG2 cells treated with REPS2-A of various concentrations: 0.0 (control), 0.1, 0.5, 1.0 mg/mL for 24 h

表1 多糖REPS2-A不同浓度处理的HepG2细胞的周期分析表

Table 1 The cell cycles of HepG2 treated with various concentration of REPS2-A

浓度/ (mg · mL ⁻¹)	细胞所占百分比/%		
	G0~G1期	S期	G2~M期
0.0	61.00	24.46	14.54
0.1	68.96	27.94	3.11
0.5	71.56	28.09	0.35
1.0	75.09	23.99	0.92

发生阻滞。试验证实胶红酵母胞外多糖能有效抑制肝癌HepG2细胞的增殖,其机制之一是REPS2-A使HepG2细胞阻滞发生在G1/S期,并诱导HepG2细胞凋亡。

胶红酵母胞外多糖有可能成为治疗肝癌的天然产品或作为抗肿瘤药的辅助药物,但胶红酵母胞外多糖对于癌症的抑制通路机制、胶红酵母胞外多糖的毒性以及产糖相关的优异基因仍不清楚,需进一步深入研究。

参考文献

[1] 杨铿, 杨莺莺, 李卓佳, 等. 胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)营养成分分析[J]. 广东农业科学, 2014, 41(5): 146-149.
 [2] RAVELLA S R, QUIÑONES T S, RETTER A, et al. Exopolysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-

like fungus *Aureobasidium pullulans* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 728-732.
 [3] 孙佳静, 李貌, 孙志洪, 等. 胶红酵母产类胡萝卜素固态发酵工艺[J]. 中国农业科学, 2018, 51(10): 1982-1994.
 [4] 俞国伟, 魏春, 张艳丽, 等. 胶红酵母利用番茄渣和豆粕为原料发酵生产类胡萝卜素的研究[J]. 生物学杂志, 2014(4): 55-59.
 [5] 梁金钟, 梅剑秋, 王翼雪. 胶红酵母菌降解毒死蜱发酵工艺研究[J]. 农产品加工, 2017(1): 45-50.
 [6] 管志荣, 朱研, 童志霞, 等. 骆驼刺青贮中胶红酵母菌分离鉴定和菌株特性研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2014(8): 25-27.
 [7] PAROLIS L A, PAROLIS H, KENNE L, et al. The extracellular polysaccharide of *Pichia (Hansenula) holstii* NRRL Y-2448: The phosphorylated side chains [J]. Carbohydrate Research, 1998, 309(1): 65-77.
 [8] HASHIMOTO K, OKAWA Y, SUZUKI K, et al. Antitumor activity of acidic mannan fraction from bakers' yeast [J]. Journal of Pharmacobio-dynamics, 1983, 6(9): 668-675.
 [9] FREITAS F, ALVES V D, REISM A M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications [J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(8): 388-398.
 [10] 包怡红, 梁雪, 李锐达, 等. 产胞外多糖酵母菌株的筛选鉴定及发酵产糖[J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 278-283.
 [11] MA Wen-Jin, CHEN Xue-feng, WANG Bo, et al. Characterization, antioxidativity, and anti-carcinoma activity of

- exopolysaccharide extract from *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 181(1): 768-777.
- [12] KHALIKOVA T A, ZHANAEVA S Y, KOROLENKO T A, et al. Regulation of activity of cathepsins B, L, and D in murine lymphosarcoma model at a combined treatment with cyclophosphamide and yeast polysaccharide[J]. Cancer Letters, 2005, 223(1): 77-83.
- [13] KRIZKOVÁ L, DURACKOVÁ Z, SANDULA J, et al. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans *in vitro* [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis, 2001, 497(1/2): 213-222.
- [14] 孙建新, 朱虎虎, 肖辉, 等. 4 种新疆植物提取物对人肝癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(7): 828-830.
- [15] LIN Yu-ching, LU Li-ting, CHEN Hsin-yi, et al. SCP phosphatases suppress renal cell carcinoma by stabilizing PML and inhibiting mTOR/HIF signaling[J]. Cancer Research, 2014, 74(23): 6 935-6 946.
- [16] WANG Yue, WANG Wen-liang, XIE Wen-li, et al. Puerarin stimulates proliferation and differentiation and protects against cell death in human osteoblastic MG-63 cells via ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation[J]. Phyto-medicine, 2013, 20(10): 787-796.
- [17] 刘婷, 傅颖媛. 丰城鸡血藤 H-103 树脂提纯物体外抗肿瘤作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1 537-1 539.
- [18] 王惠国, 李雨桐, 蔡珂, 等. 青蒿素抑制人肝癌细胞 Huh7 和 SMMC-7721 增殖及其机制[J]. 华西药理学杂志, 2019(6): 1-4.
- [19] 张华, 王振宇. 黑木耳多糖的羧甲基化及其对肝癌细胞 HePG2 的抑制作用[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 42-44.

(上接第 61 页)

- [4] 翁仕洋, 成露露, 查文, 等. 日本晚樱叶挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(7): 3 111-3 112.
- [5] 吴练中, 顾维戎, 周秀云, 等. 樱花树叶总黄酮、微量元素的含量及毒性的测定和药理研究[J]. 上海医药, 1994(4): 45-46.
- [6] 严文芳, 高新华, 赵兴文, 等. 云南樱花鲜花营养成分及污染物含量分析与评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5 734-5 738.
- [7] 陆伟, 彭才锋. 樱花糕点及其制备方法: 中国, 103651688A[P]. 2014-03-26.
- [8] 陆伟, 彭才锋. 樱花口味麻糍及其制备方法: 中国, 103651687A[P]. 2014-03-26.
- [9] 陆伟, 彭才锋. 樱花慕斯及其制备方法: 中国, 103548964A[P]. 2014-02-05.
- [10] 陆伟, 彭才锋. 樱花裱花蛋糕及其制备方法: 中国, 103548963A[P]. 2014-02-05.
- [11] 杜丽娟, 苏秀芳, 梁翠君. 樱花叶总黄酮的超声波法提取工艺优化及其抗氧化能力的研究[J/OL]. 食品工业科技. [2019-12-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20191212.1522.004.htm>
- [12] 徐广新, 倪翊, 杨仁琴, 等. 樱花提取物对酸奶发酵特性的影响[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 25-27.
- [13] 王瑞瑞, 陈苏, 金凤, 等. 朱樱花的抗氧化性及抗炎作用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6 994-6 995.
- [14] WHO. Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of food components from plants derived by modern biotechnology[R]. Geneva: WHO, 1995: 11.
- [15] 魏月媛, 李理. 火麻仁油安全性的毒理学评价[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 4-11, 108.
- [16] 秦珩, 李世芬, 胡奇, 等. 梅花鹿茸冰冻干粉的安全性评价及缓解体力疲劳功能研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 161-166, 176.

(上接第 83 页)

104.0%;As(V)检测结果水平的回收率在 86.0%~102.0%;经分析测量过程中的不确定度主要来源为标准曲线拟合和样品加标回收率,其他分量影响相对较小,基本可以忽略不计。该样品无机砷 i-As 扩展不确定度为 0.007,无机砷含量检测结果可以表示为(0.096±0.007)mg/kg。因此在试验过程中要充分考虑各个分量对试验结果的影响,以确保试验结果的准确性。

参考文献

- [1] CAMPBELL Kate M, NORDSTROM D Kirk. Arsenic speciation and sorption in natural environments[J]. Reviews in mineralogy and geochemistry, 2014, 79(1): 185-216.
- [2] NORWOOD W P, BORGMANN U, DIXON D G. Chronic toxicity of arsenic, cobalt, chromium and manganese to *Hy-* alella azteca in relation to exposure and bioaccumulation[J]. Environmental Pollution, 2007, 147(1): 262-272.
- [3] 苏祖俭, 胡曙光, 蔡文华, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定大米中无机砷的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 61-68.
- [4] 苏美冬, 杨锐, 陈佳, 等. 液相色谱-原子荧光光谱法测定稻米中无机砷含量的不确定度评定[J]. 农产品加工, 2019(18): 43-45.
- [5] 刘付英, 邵志凌, 李彩霞. 液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中无机砷含量的不确定度评定[J]. 粮油食品科技, 2018, 26(4): 45-49.
- [6] 王林裴, 郑亚哲, 彭新然. HPLC-ICP-MS 法测定水产动物及其制品中 5 种砷形态的含量[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 61-66.
- [7] 杨先颖. 不确定度评定中两个相关性的处理[J]. 品牌与标准化, 2014(12): 90.