

不同干燥方法对天山雪莲细胞黄酮含量及生物可接受率的影响

徐春明, 李婷, 王英英, 庞高阳, 孙宝国

(北京工商大学食品学院, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048)

摘要: 黄酮类化合物为天山雪莲的主要活性成分之一。本文采用自然风干、冷冻干燥、40℃烘干、60℃烘干及真空干燥等方法对天山雪莲培养物进行干燥, 研究不同干燥方法对天山雪莲细胞中黄酮类化合物含量的影响。研究表明不同干燥方式得到的总黄酮含量由大到小顺序为: 冷冻干燥>自然干燥>40℃烘干>真空干燥>60℃烘干, 雪莲培养物最佳干燥方式为冷冻干燥。进而用自然风干、冷冻干燥、40℃烘干得到的样品进行体外模拟消化实验, 研究天山雪莲培养物黄酮的生物可接受率。得天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率为30~45%, 且天山雪莲培养物的处理条件及其消化环境都影响其黄酮类化合物的生物可接受率。研究不同干燥方法对天山雪莲细胞黄酮含量及生物可接受率的影响, 以期对天山雪莲产品的开发提供理论依据。

关键词: 天山雪莲; 干燥; 生物可接受率

文章编号: 1673-9078(2014)1-126-130

Effects of Different Drying Methods on Flavonoids Content and Bioaccessibility of *Saussurea involucrate* Tissue Culture

XU Chun-ming, LI Ting, WANG Ying-ying, WANG Cheng-tao, SUN Bao-guo

(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Food Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Flavonoid is one of the main active ingredients in *Saussurea involucrate*. The influences of five drying methods including natural air drying, freeze drying, 40℃ drying, 60℃ drying and vacuum drying on the flavonoids content of *Saussurea involucrate*'s tissue culture were discussed in this paper. Freeze drying had the least effect on flavonoids content, followed by natural air drying, while 60℃ drying resulted in the loss of the most flavonoids. Then samples obtained from natural air drying, freeze drying and 40℃ drying were used to conduct *in vitro* simulated digestion experiments. The results showed that the biological acceptable rate of flavonoid was 30% to 45%. Flavonoids bioaccessibility was influenced by the culture condition and digestive environment of *Saussurea involucrate*.

Key words: *Saussurea involucrate*; drying; bioaccessibility

天山雪莲又名“雪荷花”, 属菊科风毛菊, 为多年生草本植物。天山雪莲是非常独特的植物只生长在天山南北坡、阿尔泰山和昆仑山雪线附近高寒冰碛地带的悬崖峭壁上。它独有的生存习性和独特的生长环境使其天然而稀有, 并造就了它独特的药理作用和神奇的药用价值, 人们奉雪莲为“百草之王”、“药中极品”^[1]。野生天山雪莲产量极低, 人们用人工培养雪

收稿日期: 2013-09-10

项目名称: 北京市食品学科特色教学科研创新平台建设(PXM2012-014213-000063)

作者简介: 李婷(1990-), 女, 研究生, 研究方向: 食品与生物化工

通讯作者: 徐春明(1978-), 男, 副教授, 研究方向: 食品与生物化工

莲细胞的方法扩大生产雪莲。将天山雪莲细胞用特定的MS培养基进行培养得天山雪莲培养物。因雪莲稀有的药用价值和独特的保健功效, 我们期望将雪莲培养物添加到食品中制成保健食品。2010年5月20号, 卫生部颁布的《关于批准金花茶、显脉旋覆花(小黑药)等5种物品为新资源食品的公告(2010年, 第9号)》中认定雪莲培养物(Tissue Culture of *Saussurea Involucrate*)为新资源食品, 并规定其食用量: 鲜品≤80g/d; 干品≤4g/d。天山雪莲的次生代谢中主要为黄酮类化合物, 其中有金合欢素、高车前素、槲皮素、芹菜素^[2], 此外还有黄酮苷类化合物, 如芦丁、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷、芹

菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷总黄酮粗提物等^[3]。黄酮类化合物为天山雪莲的主要活性成分之一,其众多药用价值都源于此类化合物。本实验研究了不同干燥方法对天山雪莲培养物黄酮类化合物含量的影响,以期确定雪莲培养物的最优干燥方法。

生物可接受率(bioaccessibility),是指食物可被机体吸收利用的程度,数量上为经胃肠液溶解消化后剩余的量占进食总量的比例。生物利用度是反应所给食物进入人体循环的量的比例,它描述的是食物由胃肠道吸收,及经过肝脏而达体循环血液中的量占进食量的百分比^[4]。食物的有效活性成分取决于它们在消化道上的可获得性其次是各个器官对它们的生物利用率^[5]。生物可接受率在数量上要大于生物利用度,这是由小肠的不完全吸收导致的^[6]。将天山雪莲培养物加工成食品,被人体食用后,了解其中的活性成分被机体消化吸收利用情况是非常必要的。本实验利用胃蛋白酶,胰液,胆汁等消化液及无机盐模拟人体消化环境,研究设计了天山雪莲培养物的体外模拟消化实验,得出了天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率。并利用扫描电镜观察消化前后天山雪莲培养物的形态结构变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

天山雪莲培养物:本实验室用MS培养基(NA 2.0 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L)人工培养的天山雪莲细胞经干燥后获得。胃蛋白酶、胰液、胆汁:北京拜尔迪生物技术有限公司;芦丁、乙醇:北京汇海科仪技术有限公司。

1.2 仪器与设备

微型高速万能试样粉碎机:北京中兴伟业仪器有限公司;冷冻干燥机:美国Labconco公司;-40℃冰箱:海尔公司;酶标仪:美国Molecular Devices公司SpectraMax® 190酶标仪;真空干燥箱:上海-恒科学仪器有限公司DZF-6050B型;电热鼓风干燥箱:北京仪诚科技公司;PHS-3D pH计:上海三信仪表厂

1.3 实验方法

1.3.1 不同干燥方法对天山雪莲培养物黄酮类化合物含量的影响

1.3.1.1 标准曲线的制作

准确称取0.1 g芦丁,置500 mL烧杯中,加入乙醇溶解,制得质量浓度为0.2 g/L的芦丁对照品溶液。

准确量取芦丁对照品溶液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL分别置于10 mL量瓶中,分别加乙醇溶液至3.0 mL,加5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min,加10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min,最后加1 mol/L NaOH溶液4 mL,再加去离子水稀释至刻度线,摇匀,放置15 min,在510 nm波长处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线如图1所示。

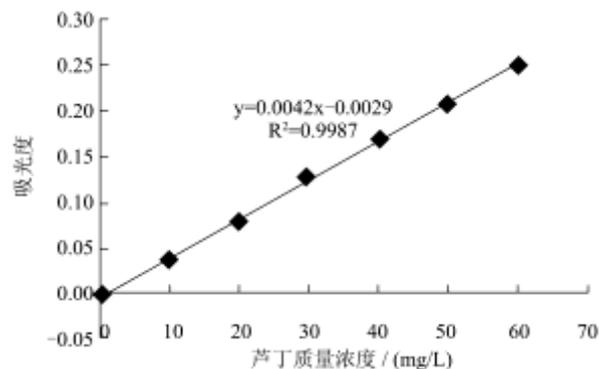


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

计算回归方程为 $y=0.0042x-0.0029$ ($R^2=0.9987$),确定了10~60 mg/L芦丁吸光度与质量浓度的线性关系。

1.3.1.2 供试品溶液的制备

从MS培养基中取出雪莲细胞,分成五等份各10克,分别进行自然风干、冷冻干燥、40℃烘干、60℃烘干及真空干燥处理。将不同干燥方式得到的干燥的天山雪莲培养物分别用粉碎机粉碎,过80目筛。各称取0.50 g干燥粉末,置于锥形瓶中,加入乙醇至60 mL,称重。超声萃取90 min,取出,补足重量,过滤,收集滤液,乙醇补充损失体积,所得溶液即为供试品溶液,实验重复三次。

取供试品溶液各1 mL分别置于10 mL量瓶中,加乙醇溶液至3.0 mL,加5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min,加10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min,最后加1 mol/L NaOH溶液4 mL,再加去离子水定容至10 mL,摇匀,放置15 min,在510 nm波长处测定其吸收度。比较不同干燥方式得到的雪莲培养物的总黄酮含量。

1.3.2 天山雪莲培养物生物可接受率实验

1.3.2.1 实验组和对照组样品的制备

各取0.3 g不同干燥方法得到的天山雪莲粉末分别加入20 mL去离子水及20 mL 40%乙醇溶液中,制成实验组溶液。另各取0.3 g不同干燥方法得到的天山雪莲粉末加入到20 mL 40%乙醇溶液中,制成对照组溶液。

1.3.2.2 体外模拟消化实验步骤^[7]

准确量取 10 mL 实验组溶液, 用 6 N HCl 调溶液 pH 至 2.0, 将酸化溶液放置 15 min, 再分别加入到 50 mL 0.32% 胃蛋白酶溶液(0.1 M HCl, 0.25% NaCl)中, 再用 6 N HCl 调溶液 pH 至 2.0, 将溶液放置在 37 °C, 200 r/min 摇床中消化 2 h。取出适量样品, 过滤的滤液, 测其吸光度。后用 0.1 M NaHCO₃ 调剩余溶液 pH 至 7.0, 再加入 4 mL 胰液和胆汁混合溶液(4.5 mg/mL 胰液素, 25 mg/mL 胆汁), 再次用 0.1 M NaHCO₃ 微调 pH 至 7.0, 迅速将溶液放置在 37 °C, 200 r/min 摇床中消化 2 h。消化结束后对样品抽滤, 获得滤液, 测其吸光度。

同样准确量取 10 mL 对照组溶液, 加入到 50 mL 40% 的乙醇溶液中, 和实验组同时放置在 37 °C, 200 r/min 摇床中, 且同时取出, 取出适量溶液, 过滤得滤液, 测其吸光度。后再加入 4 mL 40% 的乙醇溶液, 再与实验组同时放置 37 °C, 200 r/min 摇床中, 且同时取出。最后对样品抽滤, 获得滤液, 测其吸光度。

1.3.3 消化前后雪莲细胞的扫描电镜观察

电镜观察天山雪莲培养物粉末消化前后干燥样品。观察其消化前后在形态方面的变化。消化前样品即为 1.3.1.2 步骤获得的冷冻干燥、自然风干、40 °C 烘干得到的干燥粉末。将 1.3.2.2 步骤实验组抽滤后获得的滤渣收集, 使其自然风干作为消化后样品, 用电镜对其观察。

1.4 数据分析

应用 Sigma Plot 10.0 软件对数据进行统计处理, 对有必要进行差异显著性分析的样品组采用 SPSS 软件进行分析, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 不同干燥方式对天山雪莲培养物失水率的影响

表 1 不同干燥方式对天山雪莲培养物干重的影响

Table 1 Effect of drying conditions on dry weight of *Saussurea involucre*'s tissue culture

不同干燥方式	湿重/g	干重/g	失水率/%
冷冻干燥	10.01±0.03 ^a	0.83±0.03 ^a	91.21±1.03 ^c
真空干燥	10.01±0.02 ^a	1.00±0.01 ^c	89.97±0.06 ^{ab}
自然风干	11.01±1.62 ^a	1.12±0.05 ^d	89.73±0.96 ^a
40 °C 烘干	10.11±0.14 ^a	1.09±0.04 ^d	89.19±0.29 ^a
60 °C 烘干	10.03±0.05 ^a	0.91±0.01 ^b	90.96±0.05 ^{bc}

由表 1 可得雪莲培养物在不同干燥条件下的失水率不同, 失水率由高到低排列为冷冻干燥>60 °C 烘干>真空干燥>自然风干>40 °C 烘干。

2.2 不同干燥方式对雪莲培养物总黄酮含量的影响

不同干燥方式对雪莲培养物总黄酮含量的影响如表 2 所示。

表 2 不同干燥方式对天山雪莲培养物总黄酮含量的影响

Table 2 Effect of different drying methods on flavonoids content of *Saussurea involucre*'s tissue culture

不同干燥方式	真空干燥	冷冻干燥	自然风干	40°C 烘干	60°C 烘干
供试品溶液总黄酮浓度/(mg/L)	221.87±1.42 ^a	293.16±10.82 ^c	256.03±4.90 ^b	223.93±10.57 ^a	211.99±1.77 ^a
供试品溶液总黄酮含量/(mg)	13.31±0.09 ^a	17.59±0.65 ^c	15.36±0.29 ^b	13.44±0.63 ^a	12.72±0.11 ^a
干燥样品中总黄酮的含量/(mg/g)	26.62±0.17 ^a	35.18±1.30 ^c	30.72±0.59 ^b	26.88±1.27 ^a	25.44±0.21 ^a

从表 2 中可看出: 不同干燥方法所得到的天山雪莲培养物的总黄酮含量不同。不同干燥方式得到的总黄酮含量由大到小顺序为: 冷冻干燥>自然干燥>40 °C 烘干>真空干燥>60 °C 烘干。因此利用冷冻干燥法最适合干燥天山雪莲培养物, 该方法对天山雪莲培养物的活性成分破坏最小。本实验自然风干的温度在室温下进行, 真空干燥时设备设定温度为 50 °C。因此可以推测采用不同干燥方法所得到的天山雪莲培养物的总黄酮含量不同是因为每种干燥方法的作用温度不同, 作用温度越低, 黄酮化合物保留率越高, 黄酮化合物受到的破坏越小。

2.3 天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率

实验研究不同干燥方法对雪莲培养物中黄酮类化合物的含量影响得出: 冷冻干燥, 40 °C 烘干, 自然干燥得到天山雪莲培养物中黄酮类化合物含量较高, 因此用这三种干燥方式处理的样品进行体外模拟消化实验, 研究天山雪莲培养物中的黄酮类化合物的生物可接受率。由滤液吸光度带入标准曲线方程可得滤液中黄酮类化合物的浓度, 测得各个样品滤液体积, 求出

滤液中总黄酮的含量。

生物可接受率是指营养素被动物食入后，经胃、小肠消化后可被小肠吸收利用的量占食入总量的比值。经胃蛋白酶消化后，测溶液吸光度，可得雪莲细胞经胃液消化后所剩黄酮含量；经胰酶消化后，测溶液吸光度，可得雪莲细胞中黄酮的生物可接受率。图2为雪莲细胞经胃蛋白酶消化后的黄酮含量，再经胰酶消化后得图3雪莲细胞黄酮的生物可接受率。

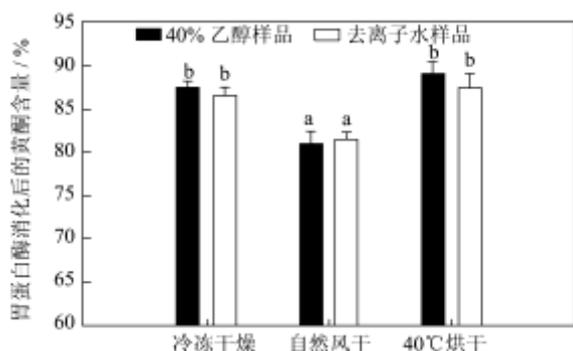


图2 胃蛋白酶消化后雪莲细胞的黄酮含量

Fig.2 Flavonoid content in *Saussurea involucrate*'s cell after pepsin digestion

本实验中生物可接受率如下定义：

$$\text{生物可接受率} = \frac{\text{实验组样品黄酮含量}}{\text{对照组样品黄酮含量}} \times 100\%$$

将不同样品的生物利用率做成柱状图如图3所示，实验数据更容易分析，实验结果更明显。

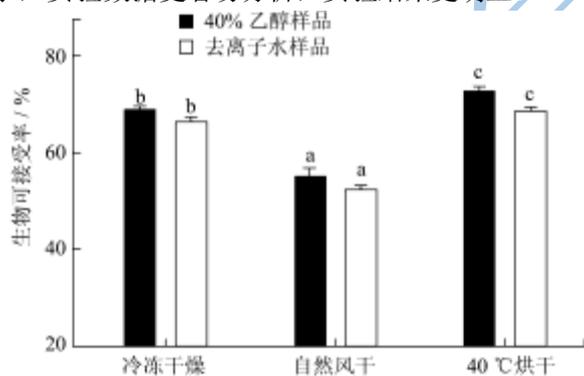


图3 天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率

Fig.3 Bioavailability of flavonoid compounds of *Saussurea involucrate*'s tissue culture

图2与图3对比可以看出，胃蛋白酶和胰酶的消化作用都会使雪莲细胞的黄酮含量降低，但经胰液对黄酮类化合物的消化作用比胃蛋白酶的消化作用更大，胰液的消化作用使黄酮含量下降比例大。从图3中可以看出不同的干燥方式下天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率存在显著差异。不论是在40%乙醇溶解还是用去离子水溶解，40℃烘干得到的天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率最高

为72.7%，且差异显著。冷冻干燥和自然风干得到的天山雪莲培养物中黄酮类化合物的生物可接受率为53~69%，且冷冻干燥样品的消化利用率比自然风干样品略高一些。可推测干燥温度对黄酮类化合物的生物可接受率有一定影响。40℃烘干作用温度最接近人体胃肠道消化环境温度，冷冻干燥和自然风干作用温度都明显低于体温。不同温度的处理会导致样品中黄酮含量和存在状态（苷和苷元、单糖苷、双糖苷、三糖苷）的不同，胃肠道内的各种消化酶对不同种类的黄酮的消化程度也不同^[8]。

在相同干燥条件下对比用40%乙醇处理的样品和用去离子水处理的样品。结果表明用40%乙醇处理的样品中黄酮类化合物的生物可接受率较高，这在40℃烘干的样品中最为显著。分析原因为：乙醇存在的环境下会促进机体对黄酮类化合物的吸收。有研究表明口服药物的生物利用度低下的原因可大致归纳为3种：药物的溶解度和溶出速率较少，药物的胃肠道黏膜渗透性较差以及药物在体内的快速消除^[7]。黄酮类化合物的溶解度因结构及存在状态不同而存在很大差异，一般游离苷元难溶或不溶于水，易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂。用40%乙醇处理的样品黄酮的溶解度及溶出速度较去离子水样品的大，因此样品得到的生物可接受率大。袁勇^[9]等人研究天山雪莲中的活性成分芦丁、绿原酸等在大鼠肠道吸收部位的研究结果表明，天山雪莲提取物在大鼠全肠道有良好的吸收，吸收窗主要在小肠，且吸收不受自身浓度影响，主要是通过溶于膜的类脂中透过脂质层，以被动扩散机制进入体循环。

2.4 雪莲培养物消化前后形态变化

观察上述图片，雪莲培养物消化前后结构形态有明显不同。未经蛋白酶消化的雪莲细胞，细胞壁相对完整，形态相对规则；经蛋白酶处理后的雪莲细胞壁破裂，形态不规则，多褶皱不完整。细胞表面不光滑，有细小颗粒在表面附着，可能为酶液或是被消化的雪莲细胞的碎屑。人体内的各种消化酶会对雪莲细胞产生作用，机体会选择性消化吸收天山雪莲培养物中的活性成分^[10]。

3 结论

通过本实验研究发现，采用自然风干、冷冻干燥、40℃烘干、60℃烘干及真空干燥等5种干燥方式得到的天山雪莲培养物中黄酮类化合物含量最高的为冷冻干燥（36mg黄酮类化合物/g雪莲培养物干品），自然风干次之，60℃烘干最低。不同干燥方法所得到的

天山雪莲培养物的总黄酮含量的高低与每种干燥方法的作用温度有关,作用温度越低,黄酮化合物保留率越高,黄酮化合物受到的破坏越小。体外模拟消化实验及电镜照片表明,机会选择性消化吸收天山雪莲培养物中的活性成分。雪莲培养物中的黄酮类化合物的生物可接受率在 53~70.8%, 40 °C 烘干得到的天山雪莲培养物黄酮的可吸收率最好。消化环境中含有乙醇会提高天山雪莲培养物活性成分的消化吸收,这是因乙醇会使黄酮的溶解度及溶出速度升高。总之,天山雪莲培养物含有较高的活性成分,且人体对其活性成分的可利用率较高。作为新资源食品的雪莲培养物,在新产品的开发和应用方面具有良好的发展前景。

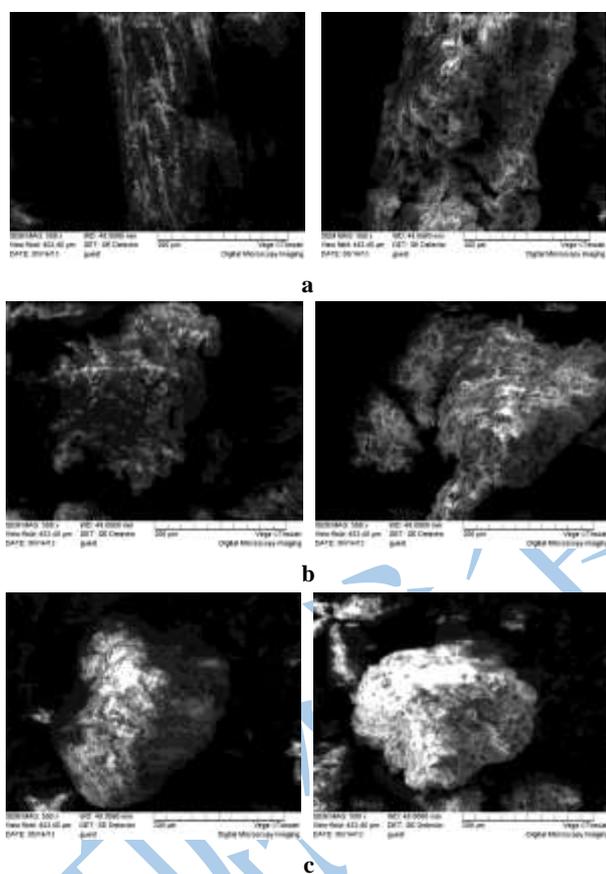


图4 不同干燥方式获得雪莲培养物体外消化扫描电镜照片
Fig.4 *In vitro* digestion SEM photos of *Saussurea involucrate*'s tissue culture with different drying methods

注: a: 真空干燥消化前(前者)与消化后(后者)电镜照片; b: 40 °C 烘干消化前(前者)与消化后(后者)电镜照片; c: 冷冻干燥消化前(前者)与消化后(后者)电镜照片。

参考文献

- [1] 李君山,蔡少青.雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J]. 中国药学杂志,1998,33(8):449-451
LI Jun-Shan, CAI Shao-qing. Chemical and Pharmacological

- Research Progress of *Saussurea involucrate* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1998, 33(8): 449-451
- [2] 王晓玲,李启发,丁立生.天山雪莲的化学成分研究[J].中草药,2007,38(12):1795-1797
WANG Xiao-ling, LI Qi-fa, DING Li-sheng. Study of the Chemical Composition of Herba *Saussureae involucrate* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2007, 38(12): 1795-1797
- [3] 翟科峰,王聪,高贵珍,等.天山雪莲的研究进展[J].湖北农业科学,2009,48(11):2869-2873
JAI Ke-feng, WANG Cong, GAO Gui-zhen, et al. Research Progress of Herba *Saussureae Involucrate* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(11): 2869-2873
- [4] 赖珺,廖正根,杨明福,等.生物利用度的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):226-229
LAI Jun, LIAO Zheng-gen, YANG Ming-fu, et al. The Research Progress of Bioavailability [J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16(18): 226-229
- [5] Jaouad B, Hannah D, Lucien H, et al. Bioaccessible and Dialysable Polyphenols in Selected Apple Varieties Following *In Vitro* Digestion vs. their Native Patterns [J]. Food Chemistry, 2012, 131: 1466-1472
- [6] Lauren C, Seeberger, Robert A, et al. Optimizing Bioavailability in the Treatment of Parkinson's Disease [J]. Neuropharmacology, 2007, 53(7): 791-800
- [7] Carolien H M Versantvoort, Agnes G Oomen, Erwin Van de Kamp. Applicability of an *In Vitro* Digestion Model in Assessing the Bioaccessibility of Mycotoxins from Food [J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43: 34-40
- [8] Caterina D, Patrizia M, Anna M A. Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during *In Vitro* Digestion [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 8423-8429
- [9] 袁勇,邢建国,刘桂花,等.天山雪莲提取物主要成分的大鼠在体肠吸收动力学[J].中国医院药学杂志,2011,31(17): 1407-1410
YUAN Yong, XING Jian-Guo, LI Gui-hua, et al. *In situ* Rat Intestinal Absorption of Two Active Components in *Saussurea Involucrate* [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2011, 31(17): 1407-1410
- [10] SHI Miao-miao, GAO Qun-yu. Physicochemical Properties, Structure and *In Vitro* Digestion of Resistant Starch from Waxy Rice Starch [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84, 1151-1157

现代食品科技