

应用体外仿生模型分析海藻水煎液中 微量金属的形态和生物可给性

林路秀¹ 李顺兴^{* 1, 2} 郑凤英^{1, 2}

(漳州师范学院化学与环境科学系¹, 分析科学福建省高校重点实验室², 漳州 363000)

摘 要 将体外“半仿生消化”和“全仿生消化”法分别应用于海藻分析前处理, 即模拟人体消化环境, 加入消化液所含有机物和无机物, 模拟海藻(海带和紫菜)水煎液在胃肠中的吸收和转运机制。鉴于消化管和血管间的生物膜是类脂质膜, 以单层脂质体为细胞生物膜模型考察海藻水煎液中微量金属在单层脂质体-水体系中的分配行为。以单层脂质体结合态、水溶态界定水煎液中微量金属的形态; 以单层脂质体结合态含量评价微量金属的生物可给性; 比较单层脂质体结合态金属在胃肠中浓度, 确定微量金属的主要吸收部位。消化酶对海藻中微量元素的形态和生物可给性影响明显。水煎液全仿生化后, 海带和紫菜中的 Fe 均主要在胃被吸收, 海带中的 Mn 和 Zn 主要在肠被吸收; 紫菜中的 Mn 和 Zn 在胃与肠均有吸收。

关键词 体外仿生消化; 细胞膜仿生萃取; 海藻; 微量金属; 形态分析; 生物可给性评价

1 引 言

海带和紫菜为海生植物, 营养丰富, 是理想的食疗佳品。现代药理研究表明: 海带和紫菜中的多糖具有调节血脂、降血压、抗肿瘤、抗突变、防辐射及抗氧化等功效^[1~3]。近年来, 海藻微量金属分析多限于总量测定^[4~8]。微量金属的生物可给性和毒性与其形态密切相关^[9]。药用植物的基体成分复杂, 分析元素的具体形态(结合态、价态和结构态)费用高、耗时, 且目前样品前处理技术无法胜任, 因此美国食品药物管理局(U. S. Food and Drug Administration)对此未做要求。

本研究采用体外仿生消化技术对海藻(海带、紫菜)水煎液进行预处理, 应用“半仿生消化”(不含消化酶)和“全仿生消化”(含消化酶)方法, 探讨胃和肠所含的有机物、无机物及消化酶对海藻水煎液中微量金属(Fe, Mn, Zn)形态和生物可给性的影响。鉴于消化管和血管间的生物膜是类脂质膜, 以单层脂质体为细胞生物膜模型, 以单层脂质体结合态和水溶态定义植物类食品和药物中微量金属的形态和生物可给性, 以单层脂质体-水分配体系模拟海藻水煎液仿生提取液在人体中分配、吸收的情况。与动物模型相比, 体外全仿生化消化和单层脂质体萃取联用技术评价药物或者食物中微量金属的形态和生物可给性, 更可靠、简便、易行。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

GBC-932AA 型原子吸收光谱仪, 铁、锰、锌元素空心阴极灯(澳大利亚 GBC 公司); MK-型光纤压力自控密闭微波消解系统(上海新科微波溶样测试技术研究所); RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 86C-ULT 超低温冰箱(Thermo Electron 公司); SHA-B 水浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司); 320-S 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器公司); Leica DM LB2 徕卡显微镜(德国徕卡仪器有限公司)。

浓 HNO₃ 和浓 HCl(优级纯), KCl(分析纯); 淀粉酶、尿酸、粘液素、牛血清蛋白、胃蛋白酶、胰液素、脂肪酶、胆汁和卵磷脂(分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司)。Fe, Mn, Zn 的标准贮备液(1.0 g/L, 澳大利亚 GBC 公司); 超纯水。

海带和紫菜购买于漳州市, 经漳州市食品药品检验所陈育琳教授鉴定。用自来水将海带和紫菜样

2009-11-10 收稿; 2010-01-25 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20775067)、福建省高校服务海西建设重点项目(No. 闽教高 200908)、福建省科技厅项目(No. 2008F5063)、福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(No. 闽科教 200720)资助项目

* E-mail: lishunxing@fjzs.edu.cn

品洗净,用超纯水冲洗 3遍,于 80 ℃下恒温烘干至恒重,备用。

2 2 Fe Mn和 Zn标准曲线测定

准确量取 1 g/L Fe Mn Zn标准储备液适量,用 5% HCl(V/V)配制浓度分别为 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0和 5.0 mg/L Fe标准溶液和 0.3 0.5 0.8 1.2和 1.4 mg/L Zn标准溶液;用 5% HNO₃(V/V)配制浓度分别为 0.5 1.0 1.5 2.5和 3.5 mg/L Mn标准溶液;火焰原子吸收光谱法 (FAAS法)测定 Fe Mn和 Zn的吸光度,分别绘制标准曲线。FAAS工作参数见表 1。

表 1 火焰原子吸收光谱工作条件
Table 1 Operating conditions for FAAS

元素 Element	灯电流 Current (mA)	分析线波长 Wavelength (nm)	狭缝 Slit (nm)	乙炔流速 C ₂ H ₂ flow rate (L/min)	空气流速 Air flow rate (L/min)	燃烧器高度 Combustor height (mm)
Fe	7.0	248.3	0.2	2.3	8.5	5
Mn	5.0	279.5	0.2	2.3	8.5	5
Zn	5.0	213.9	0.5	2.0	8.5	4

2 3 胃和肠半仿生及全仿生消化液制备^[10]

参考文献 [10], (1) 制备胃 和肠半仿生消化液 分别加入胃和肠中所含的有机物和无机物,调 pH 值至各消化液对应的 pH 值; (2) 制备胃 和肠全仿生消化液 在半仿生消化液的基础上,分别加入相应消化酶。具体配制方法如表 2。

表 2 唾液、胃液、十二指肠液、胆汁组成成分
Table 2 Main components of saliva gastric juice duodenal juice and bile

	唾液 Saliva	胃液 Gastric juice	十二指肠液 Duodenal	胆汁 Bile
无机物 Inorganic materials	10 mL 89 g/L KCl	15.7 mL 175.3 g/L NaCl	40 mL 175.3 g/L NaCl	30 mL 175.3 g/L NaCl
	10 mL 20 g/L KSCN	3.0 mL 88.8 g/L NH ₄ PO ₄	40 mL 84.7 g/L NH ₄ CO ₃	68.3 mL 4.7 g/L NH ₄ CO ₃
	10 mL 88.8 g/L NH ₄ PO ₄	9.2 mL 89.6 g/L KCl	10 mL 8 g/L KH ₂ PO ₄	4.2 mL 89.6 g/L KCl
	10 mL 57 g/L Na ₃ PO ₄	18 mL 22.2 g/L CaCl ₂	6.3 mL 89.6 g/L KCl	0.2 mL 37% HCl
	1.7 mL 175.3 g/L NaCl	10 mL 30.6 g/L NH ₄ Cl	10 mL 5 g/L MgCl ₂	10 mL 2.2 g/L CaCl ₂
	1.8 mL 40 g/L NaOH	8.3 mL 37% HCl	0.18 mL 37% HCl	
			9 mL 22.2 g/L CaCl ₂	
有机物 Organic materials	8 mL Urea 25 g/L	10 mL 65 g/L Glucose	4 mL 25 g/L Urea	
		10 mL 2 g/L Glucuronic acid		
		3.4 mL 25 g/L Urea		
		10 mL 33 g/L Glucosamine hydrochloride		
消化酶 Enzymes	145 mg α-Amylase	1 g Bovine serum albumin	1 g Bovine serum albumin	1.8 g Bovine serum albumin
	15 mg Uric acid	1 g Pepsin	3 g Pancreatin	6 g Bile
	50 mg Mucin	3 g Mucin	0.5 g Lipase	
pH	6.5±0.2	1.07±0.07	7.8±0.2	8.0±0.2

注 (Notes): 用 HCl 或 NaHCO₃ 溶液调 pH 值,用超纯水定容至 500 mL,在 4 ℃下保存 (pH values of all solutions were adjusted using HCl or NaHCO₃ and the total volume of each digestion solution was diluted to 500 mL with ultrapure water before storage at 4 ℃)。

2 4 海藻水煎液制备及其半仿生和全仿生提取液制备

称取海带、紫菜样品各约 20 g 每次加超纯水 200 mL,加热至沸腾,保持微沸约 1 h 煎煮 3 次; 合并 3 次煎煮液,用 0.45 μm 滤膜过滤,加热浓缩并定容至 500 mL,得水煎液,于 4 ℃下保存待用。

各取海带、紫菜水煎液 80 mL,加半仿生或全仿生唾液 5 mL,在 37℃下恒温振荡 5 min 后,加胃液 150 mL,在 37℃下恒温振荡 2 h 从胃仿生消化食糜中取 100 mL,用 0.45 μm 滤膜抽滤,得胃半仿生或全仿生提取液; 往余下的胃仿生消化食糜中加十二指肠液 200 mL 和胆汁 80 mL,在 37 ℃下恒温振荡 7 h 取肠仿生消化食糜 100 mL,用 0.45 μm 滤膜抽滤,得水煎液肠的半仿生或全仿生提取液。胃和肠的半仿生或全仿生提取液于 4 ℃下保存待用。

2 5 海藻水煎液及其仿生提取液在单层脂质体-水体系中分配行为研究

参考文献 [12]制备单层脂质体: 称取约 0.25 mg 蛋黄卵磷脂, 溶于 5 mL 氯仿, 将溶液移入具塞圆底烧瓶, 于旋转蒸发器上抽真空旋转蒸发 10 min 形成均匀的多层脂质体膜; 分别取海藻水煎液、水煎液的仿生提取液各 25 mL, 加至多层脂质体中, 充氮气, 水浴恒温 (37 ℃) 振荡, 让脂质体膜全部进入仿生提取液中, 在超低温冰箱 (-71 ℃) 中冷冻 20 min, 于 37 ℃ 下融化, 重复冻融 3 次, 促进仿生提取液在单层脂质体-水体系中的分配。制成的单层脂质体, 用徕卡显微镜 (放大倍数 4000 倍) 表征如图 1 所示。

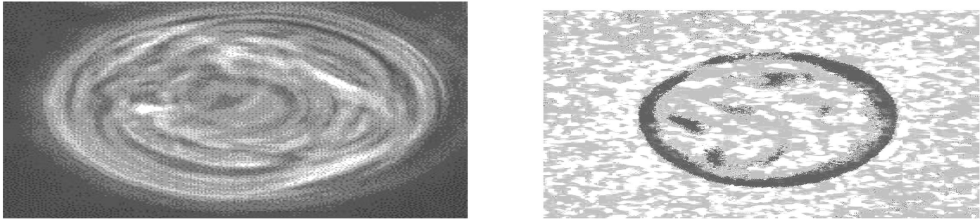


图 1 放大 4000 倍后多层脂质体 (左) 和单层脂质体 (右) 表征
Fig 1 Morphologies of multilayer (left) and monolayer liposome (right) after amplifying 4000 times

单层脂质体粒径为 0.3~0.35 μm, 依次用孔径为 0.45 和 0.22 μm 的滤膜抽滤冻融液, 可使单层脂质体膜从溶液中分离, 海带、紫菜水煎液的仿生提取液中单层脂质体结合态和水溶态微量金属分别存留于单层脂质体膜相和水相 (即滤液) 中。

2 6 海藻水煎液及其仿生提取液中微量金属测定

取 10 mL 海藻水煎液、2.3 节制得的海藻水煎液胃 (或肠) 仿生提取液 10 mL、2.4 节制得的单层脂质体膜相 (全部) 和水相 (10 mL) 于消化罐中, 加浓 4.0 mL HNO₃ 和 2.0 mL H₂O₂, 消解 10 min, 冷却, 定容至 25 mL, 分别用于海藻水煎液中微量金属总含量、仿生提取液金属含量、仿生提取液中单层脂质体结合态、水溶态金属含量的测定。

3 结果与讨论

3 1 回收率实验

以海带和紫菜的水煎液为样品, 用标准加入法进行回收率实验, 由表 3 可见, 被测微量金属的回收率为 96.7%~103.1%, 说明微波消解-FAAS 法测定海带和紫菜的水煎液中微量金属含量准确度较好, 结果可靠。

表 3 海藻水煎液中微量金属 Fe、Mn 和 Zn 含量及其回收率
Table 3 Analytical results for Fe, Mn, and Zn in marine algal soup and their recovery

元素 Element	海带 <i>Laminaria japonica</i>			紫菜 <i>Porphyra haianensis</i>		
	Found (mg/kg)	Added (mg/kg)	Recovery (%)	Found (mg/kg)	Added (mg/kg)	Recovery (%)
Fe	22.86	20.0	96.7	40.03	40.0	99.2
Mn	9.47	10.0	98.5	22.99	25.0	103.1
Zn	18.35	20.0	101.2	89.52	90.0	97.6

3 2 海藻水煎液仿生胃肠提取液中微量金属形态分析和生物可给性评价

海藻半仿生和全仿生提取液中微量金属单层脂质体结合态和水溶态含量如表 4 所示。海带水煎液的半仿生胃提取液中, Fe、Mn、Zn 均以水溶态为主; 海带水煎液肠提取液中, Fe 以单层脂质体结合态为主, Mn 和 Zn 单层脂质体结合态与水溶态含量相差不大。紫菜水煎液的半仿生胃提取液中, Fe、Zn 的单层脂质体结合态和水溶态含量相当, Mn 以水溶态为主; 紫菜水煎液的肠提取液中, Fe 和 Zn 以单层脂质体结合态为主, Mn 以水溶态为主。海带水煎液全仿生化后, 胃提取液中 Fe、Mn 和 Zn 均以水溶态为主; 肠提取液中 Fe 以水溶态为主, Mn 和 Zn 以单层脂质体结合态为主。紫菜水煎液全仿生化后, 胃提取液中 Fe 和 Mn 以水溶态为主, Zn 以单层脂质体结合态为主; 肠提取液中 Fe、Mn、Zn 均以水溶态为主。对比胃提取液和肠提取液中单层脂质体结合态微量金属含量可得, 海带和紫菜中 Fe 均主要在胃被吸收, 海带中 Mn 和 Zn 主要在肠被吸收; 紫菜中 Mn 和 Zn 在胃、肠均有吸收。由半仿生和全仿生后单层

脂质体结合态微量金属含量可得,消化酶通过影响消化过程,影响微量金属配合物的配体组成,从而对海藻中微量元素的形态和生物可给性产生明显影响。

表 4 海藻水煎液半仿生和全仿生提取液中微量金属 Fe Mn和 Zn形态分析 (μg/g)
Table 4 Analytical results ofFe Mn and Zn in the filtrate of extracts from semi-bionic and whole-bionic digestion ofmarine algal soup (μg /g)

海藻 Marine alga	金属 Metals	胃提取液 Gastric extracts				肠提取液 Intestinal extracts			
		MLBM s		WSM s		MLBM s		WSM s	
		SBD	WBD	SBD	WBD	SBD	WBD	SBD	WBD
海带 Laminaria japonica	Fe	1.84	7.56	10.44	9.87	10.03	1.93	2.23	7.06
	Mn	2.24	1.39	4.54	5.36	1.56	4.98	1.26	3.49
	Zn	5.63	2.68	16.62	16.72	0.44	10.18	0.45	6.02
紫菜 Porphyra haitanensis	Fe	23.22	35.48	21.41	49.78	27.31	17.1	17.54	25.77
	Mn	3.80	3.05	11.21	17.41	2.31	4.06	5.15	15.02
	Zn	7.66	11.84	7.80	3.49	16.06	10.18	7.13	13.45

注 (Notes): MLBM s(单层脂质体结合态金属, Mono layer liposome-bonded metals), WSM s(水溶态金属, Water-soluble metals), SBD (半仿生消化, Semi-bionic digestion), WBD(全仿生消化, Whole-bionic digestion)。

3.3 仿生消化对海藻水煎液中微量金属配合物分配系数的影响

以正辛醇为生物膜模型评价中药中微量金属的形态和生物可给性已有报道^[12~15]。全仿生消化后,胃肠仿生提取液接近其在消化系统消化后的有效成分群,微量金属也转化成细胞膜吸收前最终配合物^[16]。鉴于消化管和血管间的生物膜是类脂质膜,以单层脂质体为细胞生物膜模型和固相萃取剂,提取具有细胞膜亲合性的中药有效成分群,合乎中医药理论的系统观和整体观。以单层脂质体结合态金属含量评价金属细胞膜亲合性、生物可给性,较常用的有机态,更能揭示其药理和药效机制。本实验以单层脂质体/水体系测定药物的分配系数 D_{MW} (D_{MW} = 化合物在单层脂质体膜相中平衡浓度/该化合物水相中的平衡浓度)。海带和紫菜水煎液的仿生提取液中微量金属的 D_{MW} 如表 5 所示。

表 5 海带和紫菜的水煎液胃、肠半仿生和全仿生提取液中 Fe Mn和 Zn分配系数 D_{MW} 值
Table 5 D_{MW} values ofFe Mn and Zn in the filtrate of chyme from semi-bionic and whole-bionic digestion of marine algal soup in stomach and intestine

海藻 Marine alga	金属 Metals	半仿生消化 Semi-bionic digestion		全仿生消化 Whole-bionic digestion	
		胃提取液 Gastric extracts	肠提取液 Intestinal extracts	胃提取液 Gastric extracts	肠提取液 Intestinal extracts
海带 Laminaria japonica	Fe	0.18	4.50	0.77	0.27
	Mn	0.49	1.24	0.26	1.43
	Zn	0.34	0.98	0.16	1.69
紫菜 Porphyra haitanensis	Fe	1.08	1.56	0.71	0.66
	Mn	0.34	0.45	0.18	0.27
	Zn	0.98	2.25	3.39	0.76

对于海带水煎液,半仿生消化后,Fe Mn Zn在肠提取液中的 D_{MW} 值高于胃提取液;全仿生消化后,Fe在胃提取液中的 D_{MW} 值高于肠提取液,Mn和 Zn在肠提取液中的 D_{MW} 值高于胃提取液;加入消化酶,胃提取液中Mn Zn的 D_{MW} 值降低,Fe的 D_{MW} 升高,而肠提取液情况却相反。

对于紫菜水煎液,加入消化酶,胃肠提取液中 Fe和 Mn的 D_{MW} 值下降;Zn的 D_{MW} 值在胃提取液中显著增加,但在肠提取液中下降。微量金属的 D_{MW} 值越高,单层脂质体结合态金属所占比例越高,生物可给性越强。上述情况说明消化酶可通过影响微量金属配合物的配体组成,从而对海带和紫菜中的微量元素的形态分布和生物可给性产生影响。

海藻种类和仿生消化方式差异对微量金属配合物的形态分布影响随金属种类不同而异,主要归因于: (1)海藻种类不同,其有机和无机成分不同,经不同的消化方式后产生的食糜中成分也不同,导致微量金属配体的差异性; (2)不同微量金属的配位能力不同; (3)金属间和配体间均产生配位竞争反应。海藻中基体成分复杂,因此评价海藻中微量金属的形态和生物可给性,可通过全仿生消化进行预处理,再采用仿生细胞膜萃取,以细胞膜亲合性为评价依据,鉴别微量金属的形态和生物可给性。

References

- 1 Yuan Y V, Walsh N A. *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, 44: 1144~1150
- 2 Wang J, Zhang Q, Zhang Z S, Li Z E. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2008**, 42(2): 127~132
- 3 Zhang Z S, Zhang Q B, Wang J, Shi X L, Song H F, Zhang J J. *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 78(3): 449~453
- 4 Jackson G E, Mkhonta-Gana L, Voy A, Kelly M. *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 79(1-4): 147~152
- 5 Wondimu T, Ueno A, Kanamari I, Yamaguchi Y K, McCrindle R, Hanaoka K I. *Food Chem.*, **2007**, 104: 542~555
- 6 Rendas de la Rocha S, Sanchez-Muniz F J, Gomez-Juaristi M, Larrea Marin M T. *J. Food Comp. Anal.*, **2009**, 22: 330~336
- 7 Subba Rao P V, Mantri V A, Ganesan K. *Food Chem.*, **2007**, 102: 215~218
- 8 Dominguez-Gonzalez R, Moreda-Piñero A, Bermejo-Barrena A, Bermejo-Barrena P. *Talanta*, **2005**, 66(4): 937~942
- 9 GUO Peng-Ran(郭鹏然), MOU De-Hai(牟德海), WANG Chang(王畅), QIU Rong-Liang(仇荣亮), DU Hong(杜虹). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(11): 1645~1650
- 10 Oomen A G, Rampeberg C J M, Buihl M A, Dobbe C J G, Pereboom D P K H, Sips A J A M. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2003**, 44: 281~287
- 11 DAI Shu-Gui(戴树桂), WANG Yu-Qiu(王玉秋), SUN Hong-Wen(孙红文), LI Shu-Xia(李书霞), CAO Zhong-Hong(曹仲宏). *Chin. J. Environ. Sci.* (环境科学), **2002**, 23(4): 97~101
- 12 Li S X, Deng N S, Zheng F Y. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **2003**, 32: 51~57
- 13 Li S X, Deng N S, Zheng F Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14(2): 505~510
- 14 Li S X, Zheng F Y, Liu X L, Cai W L. *Phytochem. Anal.*, **2005**, 16(6): 405~410
- 15 Zheng F Y, Li S X, Lin L X. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2007**, 21: 77~83
- 16 Li S X, Zheng F Y. *Planta Med.*, **2008**, 74(10): 1302~1307

Application of in vitro Bionics Models for Speciation Analysis and Bioavailability Assessment of Trace Metals in Marine Algal Soup

LI Lu-Xiu¹, LI Shun-Xing^{*1,2}, Zheng Feng-Ying^{1,2}

¹(Department of Chemistry & Environmental Science, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou 363000)

²(Fujian Province University Key Laboratory of Analytical Science, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou 363000)

Abstract Two new bionic technologies, i.e. in vitro bionic digestion and bionic biomembrane extraction, were developed for the pretreatment of marine algal soup. The soup of *Laminaria japonica* and *Porphyra haitanensis* was digested at 37 °C under the action of saliva, the acidity of the stomach or intestine with the inorganic and organic compounds (including digestive enzymes) that were found in the stomach or intestine, and then the chymes were obtained. Being similar to the biomembrane between the gastrointestinal tract and blood vessels, monolayer liposome was used as biomembrane model. Monolayer liposome-bonded (MLBMs) was used for oral bioaccessibility assessment of trace metals (Fe, Mn and Zn) in the chyme. The species distribution and bioavailability of trace metals in marine alga were obviously affected by the existence of the bioenzymes. Based on the concentration of MLBMs and whole-bionic digestion, the main absorption site of trace metals in marine algal soup was proposed as follows: iron in both *Laminaria japonica* and *Porphyra haitanensis* was absorbed mainly in stomach; manganese and zinc in *Laminaria japonica* were absorbed mainly in intestine and these two metals in *Porphyra haitanensis* were absorbed both in stomach and intestine.

Keywords In vitro bionic digestion; Biomimetic membrane extraction; Marine alga; Trace metals; Speciation analysis; Bioavailability assessment

(Received 10 November 2009; accepted 25 January 2010)