

# 体外模拟消化对鸡爪槭叶多酚稳定性及其自由基清除和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

张露<sup>1</sup>, 杨斯涵<sup>1</sup>, 涂宗财<sup>1,2\*</sup>, 王豪<sup>1</sup>, 万婷婷<sup>1</sup>, 沙小梅<sup>1</sup>

<sup>1</sup>江西师范大学生命科学院, 南昌 330022; <sup>2</sup>南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047

**摘要:** 本文旨在通过研究鸡爪槭叶多酚提取物在体外模拟口腔和胃肠道消化过程中总酚、总黄酮和缩合单宁含量, 及其 DPPH·、ATBS<sup>+</sup>· 清除能力和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的变化, 阐述鸡爪槭叶中的多酚类化合物在人体消化过程中主要活性成分组成和活性的变化。研究表明, 体外模拟口腔和胃消化过程会降低消化产物中总黄酮含量, 但对酚类和缩合单宁类化合物的含量无显著性影响 ( $P > 0.05$ ); 肠消化过程会大大降低样品中活性成分的含量, 实验组样品中总黄酮、总酚和缩合单宁含量的损失率分别为 99.26%、52.95% 和 100%。口腔和胃部消化会降低样品的自由基清除能力和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力, 但不显著。肠道消化会使样品的抗氧化和酶抑制活性急剧降低, 在测试浓度范围内, DPPH· 和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力损失率达 100%, 清除 ATBS<sup>+</sup>· 的 IC<sub>50</sub> 值增加了 1.88 倍, 且实验组和 pH 组样品间不存在显著性差异 ( $P > 0.05$ )。总之, 胃肠道消化会降低鸡爪槭叶多酚的稳定性及其抗氧化和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 且主要发生在肠道消化阶段, pH 环境的改变是其主要影响因素。

**关键词:** 鸡爪槭叶; 体外模拟消化; 多酚类化合物; 抗氧化;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

中图分类号: 350.10

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.002

## Influence of *in vitro* Simulated Digestion on Stability and Free Radical Scavenging and $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities of *Acer palmatum* Leaves Polyphenols

ZHANG Lu<sup>1</sup>, YANG Si-han<sup>1</sup>, TU Zong-cai<sup>1,2\*</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>, WANG Ting-ting<sup>1</sup>, SHA Xiao-mei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract:** This research aimed to investigate the influence of *in vitro* gastrointestinal simulated digestion on the stability, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *A. palmatum* leaves polyphenols. The contents of phenolics, flavonoids and condensed tannins as well as the DPPH·, ATBS<sup>+</sup>· scavenging ability and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of *A. palmatum* leaves polyphenols before and after digestion were analyzed. The obtained results indicated that oral and stomach digestion reduced the total flavonoids content, but had insignificant difference on the content of phenolics and condensed tannins ( $P > 0.05$ ). Intestinal digestion can dramatically decrease the content of bioactive constituents present in *A. palmatum* leaves polyphenols extract. Contents of flavonoids, phenolics and condensed tannins in samples group decreased by 99.26%, 52.95% and 100%, respectively. Oral and stomach digestion decreased the radical scavenging ability and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of samples, but the influence was small, while, intestinal digestion resulted in sharp reduction of above bioactivity. On the test sample concentration range, the DPPH· scavenging ability and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of intestinal digestion sample decreased by 100% as compared to that of stomach digestion sample, and the IC<sub>50</sub> value for ATBS<sup>+</sup>· scavenging ability increased by 1.88 times, and insignificant difference was observed between the sample and pH group ( $P > 0.05$ ). Above all, gastrointestinal digestion will decrease the stability, and antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, which mainly occurs on the intestinal digestion phase, the change of pH is the major influence factor.

**Key words:** *Acer palmatum* leaves; *in vitro* simulated digestion; polyphenols; antioxidant activity;  $\alpha$ -glucosidase inhibition

收稿日期: 2017-09-12 接受日期: 2017-10-30

基金项目: 江西省青年科学基金(20171BAB214037); 江西省产学研合作项目(KJLDI3019)

\* 通信作者 E-mail: Tuzc\_mail@aliyun.com

鸡爪槭(*Acer palmatum* Thunb), 又名鸡爪枫, 为槭属落叶小乔木, 其叶形美观, 入秋后转为鲜红色, 灿烂如霞, 是我国优良的观赏药用两用植物。鸡爪

槭具有活血止痛、清热解毒、祛风湿等药理作用<sup>[1]</sup>,但有关鸡爪槭中生物活性成分的研究不多,只有 Aritomi 等从日本鸡爪槭叶中鉴定了牡荆素、异牡荆素、奥里恩亭和高奥里恩亭 4 种黄酮<sup>[2]</sup>,Ishikura 等从日本鸡爪槭叶中鉴定了花青素-3-*O*-芸香糖苷和花青素-3-*O*-葡萄糖苷 2 种花青素类化合物<sup>[3]</sup>。我们前期研究发现,鸡爪叶提取物具有很好的体外抗氧化和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用,多酚类化合物为其主要活性成分,并采用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术从鸡爪槭叶的乙酸乙酯部位中初步鉴定了 25 个化合物<sup>[4]</sup>。

多酚类化合物在人体中发挥其作用前通常首先要经过人体胃肠道的消化,因此多酚类化合物及其生物活性的消化稳定性已成为当前食品和功能性食品领域研究的热点之一,如 Marchese 等研究发现,经胃和十二指肠模拟消化后,绿茶饮料中的单宁类化合物均大幅度降低,且经过胃肠道消化后其抑菌活性消失,但胃消化对其抑菌活性影响不大<sup>[5]</sup>。Burgos-Edwards 等报道,*Ribes magellanicum* 和 *R. punctatum* 提取物在体外模拟胃肠道消化后,其总酚和总黄酮含量降低了 50% 左右,主要花青素和羟基肉桂酸损失了 80%,其抗氧化活性在消化过程中也逐渐下降,但 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力变化较小<sup>[6]</sup>。Corrê 等研究表明,胃肠道消化过程会大大降低葡萄皮提取物中多酚类化合物的种类和含量,并降低其抗氧化和抑菌活性<sup>[7]</sup>。但鸡爪槭叶多酚在胃肠道消化过程中的稳定性如何?其生物活性会如何变化?这些问题均有待解决。

本文以鸡爪槭叶多酚提取物为研究对象,采用体外实验模拟人口腔、胃和肠道消化过程,通过评价消化产物中总酚、总黄酮和水解单宁含量的变化评价鸡爪槭叶多酚在消化过程中的稳定性,并进一步研究消化产物的 DPPH· 和 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的变化,从而为鸡爪槭叶资源在食品领域的很合理应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

2016 年 11 月 28 日于江西师范大学瑶湖校区采集鸡爪槭(*A. palmatum* Thunb) 叶,经生命科学学院植物分类领域专家鉴定后用自来水洗净后冷冻干燥,粉碎,于-20℃保存。

2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)

(ABTS)、1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)、阿卡波糖、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(酵母、EC 3.2.1.20)和对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷,购自 Sigma;没食子酸、槲皮素、芦丁,购自于 Aladin;其他所用试剂购于索莱宝。所有试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-3200 紫外-可见光分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;Synergy H1 酶标仪,美国 Bio Tek 公司;KQ5200DE 台式数控超声波清洗器,北京仪诺科兴科技发展有限公司;EYELA 旋转蒸发仪,日本 EYELA。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品制备

称取 100 g 鸡爪槭叶粉末,以 90% 甲醇为溶剂按 1:15 的料液比(g/mL)室温浸提 6 h,抽滤,收集滤液,残渣再用相同方式浸提 2 次。合并上清液,旋转浓缩除去有机溶剂,剩余的含水提取液-80℃预冻后冷冻干燥。最后称取 1.5 g 冻干后的提取物用蒸馏水溶解,配成 50 mg/mL 的溶液用于体外模拟消化。

#### 1.3.2 体外模拟消化<sup>[8]</sup>

模拟唾液配置:用 1 mM CaCl<sub>2</sub> 配置 100 U/mL 的 $\alpha$ -淀粉酶溶液,然后用 1 M NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.0;

模拟胃液配制:准确称取 1.6 g 胃蛋白酶、1.0 g NaCl,用蒸馏水溶解后定容至 50 mL,然后用 5 M HCl 调 pH 为 2;

模拟肠液配置:配制含有 4 mg/mL 胰液素和 25 mg/mL 胆盐的混合溶液,用 1.0 M NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.0;

口模拟腔消化:取 1.0 mL 模拟唾液,添加 8.0 mL 50 mg/mL 样品和 1.0 mL 蒸馏水,100 rpm 震荡消化 5 min 后,取 5.0 mL 样品过 0.22  $\mu$ m 尼龙膜后-20℃冷藏,得到口腔消化样品(K),剩余 5 mL 溶液用于胃部模拟消化。

胃模拟消化:取 15 mL 模拟胃液与 5.0 mL 口模拟腔消化样品混合,37℃ 100 rpm 消化 2.0 h,取 5.0 mL 过 0.22  $\mu$ m 尼龙膜后-20℃冷藏,得到胃部消化样品(W)。

肠道模拟消化:用 1.0 M NaHCO<sub>3</sub> 将胃模拟消化后的消化液(15 mL)的 pH 调至 7.5,然后加入 5.0 mL 肠道消化液,37℃ 100 rpm 消化 2.0 h,最后取部分样品过 0.22  $\mu$ m 尼龙膜,-20℃保存,得到肠

道消化样品(C)。

在口腔、胃和肠道模拟消化过程中,以酶液的溶剂代替酶液的体系为 pH 对照组。所有消化过程在 50 mL 离心管中进行,根据每步消化的稀释倍数计算口腔、胃和肠道模拟消化过程中样品的浓度,最后将口腔、胃和肠道消化阶段的样品的浓度稀释到 2.5 mg/mL 用于后续分析。

### 1.3.3 总酚含量测定

采用 Folin-Ciocalteu 法测定样品中总酚的含量<sup>[4]</sup>。分别取 200  $\mu$ L 稀释后的待测样品,加 0.1 mL Folin-Ciocalteu 试剂,摇匀,5 min 后再加入 0.3 mL 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液和 1.0 mL 蒸馏水,室温避光反应 30 min 后取 200  $\mu$ L 于 96 孔酶标板中,用酶标仪测定样品在 765 nm 处的吸光值,以蒸馏水代替 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的反应体系为样品空白。以没食子酸为标品,结果表示为毫克没食子酸当量每克提取物 (mg GAE/g E)。

### 1.3.4 总黄酮含量测定

采用硝酸铝显色法测定样品中总黄酮含量<sup>[9]</sup>。取 0.25 mL 适宜浓度的样品或槲皮素标准品溶液与 50  $\mu$ L 5%  $\text{NaNO}_2$  混合,6 min 后加入 50  $\mu$ L 10%  $\text{AlCl}_3$ ,摇匀,静置 6 min 后再加入 0.5 mL 4%  $\text{NaOH}$  溶液和 0.5 mL 蒸馏水,摇匀,室温反应 15 min 后取 200  $\mu$ L 于 96 孔酶标板中用酶标仪测样品于 510 nm 处测吸光值  $A_i$ ,用蒸馏水代替  $\text{AlCl}_3$  溶液的反应体系的吸光值为  $A_j$ ,样品溶液的吸光值  $A = A_i - A_j$ 。结果表示为毫克槲皮素当量每克提取物 (mg QuE/g E)。

### 1.3.5 缩合单宁含量测定

采用香草醛法测定样品中缩合单宁的含量<sup>[10]</sup>。取 0.5 mL 稀释到适宜浓度的样品与 3.5 mL 新鲜配制的 1% 香草醛溶液 (7 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  配制) 混合,避光反应 15 min 后用紫外-可见分光光度计测体系在 500 nm 的测吸光值。以儿茶素为标品绘制标准曲线,结果表示为毫克儿茶素当量每克提取物 (mg CE/g E)。

### 1.3.6 DPPH·清除能力

通过 DPPH·的清除能力实验评价鸡爪槭叶提取物在消化过程中抗氧化能力的变化<sup>[11]</sup>。分别取 50  $\mu$ L 稀释到适宜浓度的样品和槲皮素与 150  $\mu$ L 0.15 mM DPPH 溶液 (甲醇配制) 于 96 孔酶标板上混合,避光室温反应 30 min 后于 517 nm 测吸光值  $A_s$ ,清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(A_c - A_b) - (A_s - A_j)}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

其中,  $A_c$  为样品溶液被 50  $\mu$ L 90% 甲醇替代的反应体系的吸光值;  $A_j$  为 DPPH·溶液被甲醇替代的反应体系的吸光值;  $A_b$  为样品和 DPPH 溶液分别被 90% 甲醇和甲醇替代的反应体系的吸光值,  $\text{IC}_{50}$  值为清除 50% 的自由基所需要的样品浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 1.3.7 总抗氧化能力测定<sup>[4]</sup>

ABTS<sup>+</sup>·溶液配置:准确称取 38.4 mg ABTS 与 6.6 mg 过硫酸钾,用蒸馏水溶解后定容至 10 mL,室温避光反应 12-16 h 后用甲醇稀释到溶液在 734 nm 的吸光值为  $0.7 \pm 0.2$ 。

样品测定:取 50  $\mu$ L 不同浓度的样品或槲皮素分别与 200  $\mu$ L 稀释后的 ABTS<sup>+</sup>·溶液于室温反应 6 min,然后用酶标仪测反应体系在 734 nm 的吸光值,样品的总抗氧化能力的计算公式同公式(1)。

### 1.3.8 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性

参照前期研究的方法测定样品抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的能力<sup>[4]</sup>。依次取 50  $\mu$ L 稀释到适宜浓度的样品或阿卡波糖、50  $\mu$ L PB (0.1 mM, pH 6.9) 和 100  $\mu$ L 0.1 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 (用 0.1 M, pH 6.9 PB 配置) 于 96-孔酶标板中混匀,25  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后加入 50  $\mu$ L 5 mM pNPG 溶液 (0.1 M PB, pH 6.9 配置)。25  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 min 后于 405 nm 测吸光值  $A_s$ 。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的百分抑制率的计算方程为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_c - A_b) - (A_s - A_b)}{A_c - A_b} \times 100\%$$

$A_c$  为样品溶液被 50  $\mu$ L 90% 甲醇替代的反应体系的吸光值;  $A_j$  为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液被 100  $\mu$ L 0.1 M, pH 6.9 PB 替代的反应体系的吸光值;  $A_b$  为样品和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液分别被 50  $\mu$ L 90% 甲醇和 100  $\mu$ L 0.1 M, pH 6.9 PB 替代的反应体系的吸光值。 $\text{IC}_{50}$  为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性被抑制 50% 时所需要的样品浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 1.3.9 数据分析

每个样品设置三个平行,所有实验重复三次,结果用平均值  $\pm$  标准偏差 (mean  $\pm$  SD) 表示。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行相关性分析和方差分析,  $P < 0.05$  表示样品间具有显著性差异。通过 Origin 8.0 软件对样品浓度与其百分抑制率的线点图进行线性或曲线拟合计算样品清除自由基和抑制

$\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的  $IC_{50}$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 总黄酮含量分析

鸡爪槭叶提取物在体外模拟消化后总黄酮含量变化如图 1 所示。由图可知,鸡爪槭叶提取物经胃部模拟消化后,消化组和 pH 组的总黄酮含量分别为 307.92 和 288.08  $\mu\text{g QuE}/\text{mg E.}$ ,与原样相比,总黄酮含量分别降低了 9.88% 和 15.69%,但与口腔消化后样品相比,pH 的降低不会导致黄酮含量的显著变化( $P > 0.05$ )。经肠模拟消化后,实验组和 pH 组的总黄酮含量迅速下降,分别为 2.28 和 84.35  $\mu\text{g QuE}/\text{mg E.}$ ,与胃消化后样品中的总黄酮含量相比,黄酮含量分别下降了 99.26% 和 70.72%。以上结果表明,消化酶和化学酸碱环境都是引起总黄酮含量下降的原因,且 pH 的影响大于消化酶的影响,酸性环境下(pH 2.0)黄酮类化合物相对稳定,但当 pH 由酸性变为中性时鸡爪槭叶中的黄酮类化合物极不稳定,其结构重组或降解成其他非黄酮类化合物。如,Burgos-Edwards 等表明,*R. magellanicum* 和 *R. punctatum* 提取物在模拟胃消化后总黄酮含量仅下降 11.6%,但在肠消化后总黄酮含量分别下降了 46.2% 和 34.1%<sup>[6]</sup>;李俦等发现表儿茶素和儿茶素经模拟肠液消化后其含量分别降低为 23.04% 和 25.78%<sup>[12]</sup>;Cilla 等报道表明,葡萄汁中的黄烷酮类、黄酮类和黄烷-3-醇类化合物经胃肠道模拟消化后其含量分别降低了 37%、38% 和 47%<sup>[13]</sup>。

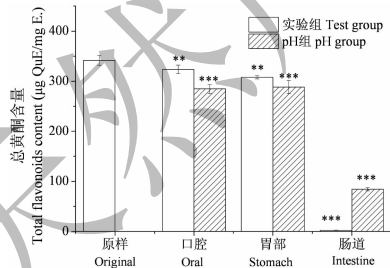


图 1 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物中总黄酮含量变化

Fig. 1 Changes of total flavonoids content in *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

### 2.2 总酚含量的测定

鸡爪槭叶提取物在体外模拟消化后总酚含量变化如图 2 所示。鸡爪槭叶提取物经口腔、胃模拟消

化后,原样、消化组和 pH 组样品间的总酚含量均不存在显著性差异( $P > 0.05$ ),总酚浓度为 174.25 ~ 164.87  $\mu\text{g GAE}/\text{mg E.}$ ,说明 pH 2.0 的酸性环境、 $\alpha$ -淀粉酶和胃蛋白酶对鸡爪槭叶多酚的组成均无显著影响。由胃部到肠道消化后,消化组和 pH 组的总酚含量显著性减少,与胃消化阶段相比,分别降低了 52.95% 和 48.16%,但两者之间不存在显著性差异( $P > 0.05$ ),表明在肠道消化过程中,主要是 pH 环境的变化影响鸡爪槭叶多酚的稳定性,使酚酸类物质转换或降解成其他物质,含量急剧降低,而消化酶对鸡爪槭叶提取物中多酚的含量影响不大。以上研究结果与许多研究结果一致,李俦等研究表明,胃消化过程对酚酸类化合物的影响较小,其含量无显著变化,而模拟肠液处理后,绿原酸、咖啡酸和没食子酸的含量均显著降低<sup>[12]</sup>; *R. magellanicum* 提取物经胃消化后其总酚含量无显著性变化,但肠道消化使总酚含量降低了约 50%,其中绿原酸和咖啡酰糖苷分别降低了 99.1% 和 68.5%<sup>[6]</sup>;尹世磊等发现,胃肠道消化可使六堡茶水提取物中没食子酸的含量降低 80%<sup>[14]</sup>。已有研究表明鸡爪槭叶中含有丰富的没食子酸、没食子酸衍生物以及绿原酸等羟基肉桂酸类化合物<sup>[4]</sup>,肠道消化过程中这些化合物结构的变化可能是模拟消化后鸡爪槭叶提取物中总酚含量下降的原因之一。

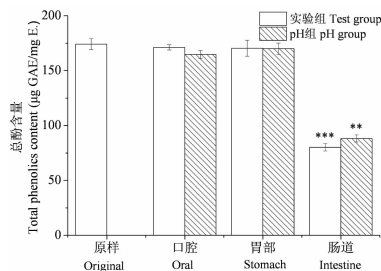


图 2 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物中总酚含量变化  
Fig. 2 Total phenolics content in *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

### 2.3 缩合单宁含量变化

体外模拟消化对鸡爪槭叶提取物中缩合单宁类化合物含量的影响如图 3 所示。原样和口腔消化样品中缩合单宁的含量为 128.4 ~ 139.4  $\mu\text{g CE}/\text{mg E.}$ ,且样品间不存在显著性差异( $P > 0.05$ );经胃消化后,与原样相比,实验组的缩合单宁含量无显著变化,但 pH 组样品中缩合单宁含量下降了 6.7%,表明口腔消化对鸡爪槭叶中的缩合单宁类化合物无影

响,强酸性环境(pH 2)会降低其含量,但影响不大。经肠道消化后,实验组和 pH 组样品中的缩合单宁类化合物均无法检出,含量损失率达 100%。这一方面可能是由于缩合单宁类化合物与胰蛋白酶结合,降低了其溶解性<sup>[15]</sup>,另一方面,溶剂由强酸性变为中性后,缩合单宁类化合物的结构发生变化,导致含量的降低。大量研究表明,缩合单宁类化合物在肠消化阶段极不稳定,如六堡茶水提取物经肠模拟消化后表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)和原花青素的含量分别下降了 97%、95% 和 100%<sup>[14]</sup>;葡萄皮提取物经胃肠道消化后,儿茶素、B-型表儿茶素二聚体、B-型表儿茶素三聚体、B-型表儿茶素四聚体的含量分别降低了 75.65%、74.69-100%、88.57%-100% 和 93.87%<sup>[7]</sup>;Marchese 等研究表明,绿茶提取物中的表儿茶素没食子酸酯(ECG)在十二指肠消化过程中被水解成表儿茶酸,EGCG 可与消化酶反应形成高分子质量的没食子酰化合物,导致十二指肠消化过程中 EGCG 和 ECG 的损失率分别高达 100% 和 96.7%<sup>[5]</sup>。

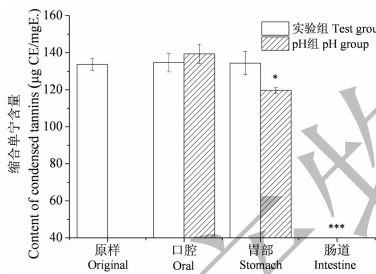


图3 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物中缩合单宁含量变化

Fig. 3 Condensed tannins content in *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

## 2.4 DPPH·清除能力的测定

鸡爪槭叶提取物及其口腔、胃肠道消化样品的 DPPH·清除能力由图 4 和表 1 所示,除肠道消化样品外,所有样品的 DPPH·清除能力均随样品浓度的增加而增加,且口腔、胃肠道模拟消化后,样品的 DPPH·清除能力均小于原样。口腔和胃模拟消化后,鸡爪槭叶提取物清除 DPPH·的  $IC_{50}$  值增加了 16.05%~21.27%,实验组和 pH 组的 DPPH·清除能力无显著性差异( $P > 0.05$ ),但经肠道消化后,实验组和 pH 组在样品浓度为 19.53~625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时均不存在 DPPH·清除能力。以上结果显示,口腔

消化会降低鸡爪槭叶提取物的 DPPH·清除能力,口腔到胃消化阶段对其清除能力无显著影响,但肠道消化过程会大大降低鸡爪槭叶提取物的 DPPH·清除能力。相关性分析表明,总黄酮、总酚、缩合单宁与 DPPH 清除能力的相关系数分别为 0.936、0.965 和 0.978,由此可以推断,鸡爪槭叶提取物在体外模拟消化过程中 DPPH·清除能力能力的下降或消失是由其总酚、总黄酮和缩合单宁含量的降低引起的。

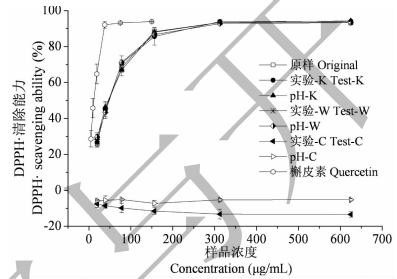


图4 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物的 DPPH·清除能力变化

Fig. 4 DPPH· scavenging ability of *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

## 2.5 ABTS<sup>+</sup>·清除能力的测定

鸡爪槭叶提取物及其口腔、胃肠道消化样品的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力由图 5 和表 1 所示,所有样品的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力均呈良好的量效关系。原样和口腔样品具有最高的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力( $IC_{50} = 34.16 \sim 36.07 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $P > 0.05$ ),其次为胃消化样品,肠道模拟消化样品的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力最低,其  $IC_{50}$  值约为胃消化样品的 1.88 倍,为原样的 3.7 倍。以上结果表明,口腔咀嚼过程对样品的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力无影响;胃消化后会降低样品的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力,但这主要是由 pH 值的改变所引起;样品经

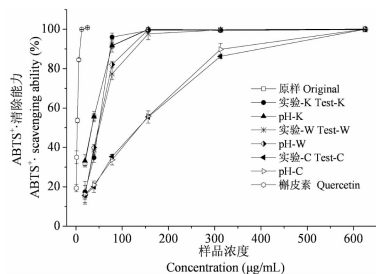


图5 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力变化

Fig. 5 ABTS<sup>+</sup>· scavenging ability of *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

表 1 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物清除 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>· 和抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的 IC<sub>50</sub> 值Table 1 DPPH· and ABTS<sup>+</sup>· scavenging ability and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

消化阶段 Digestion phase	样品 Samples	DPPH·	ABTS <sup>+</sup> ·	$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -Glucosidase
		IC <sub>50</sub> 值 IC <sub>50</sub> values ( $\mu$ g/mL)		
原样 Original	实验组 Test group	38.07 $\pm$ 2.70	35.99 $\pm$ 0.58	10.55 $\pm$ 0.39
口腔 Oral phase	实验组 Test group	45.85 $\pm$ 3.11 **	36.07 $\pm$ 2.70	14.52 $\pm$ 0.72 **
	pH 组 pH group	48.36 $\pm$ 3.50 ***	34.16 $\pm$ 3.01	15.98 $\pm$ 0.58 **
胃 Stomach	实验组 Test group	47.59 $\pm$ 2.30 ***	46.54 $\pm$ 2.59 **	17.68 $\pm$ 0.47 ***
	pH 组 pH group	45.35 $\pm$ 2.70 **	45.85 $\pm$ 1.14 **	17.67 $\pm$ 0.67 ***
肠道 Intestine	实验组 Test group	N. D.	134.00 $\pm$ 6.59 ***	N. D.
	pH 组 pH group	N. D.	118.89 $\pm$ 1.11 ***	N. D.

肠道消化后其 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力急剧降低,且实验组样品的活性低于 pH 组,说明在肠消化阶段,化学环境和胰液素均会降低鸡爪槭叶提取物的 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力,但化学环境的影响大于消化酶。相关性分析表明,总黄酮、总酚、缩合单宁与 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力的相关系数分别为 0.969、0.983 和 0.995,说明总黄酮、总酚和缩合单宁均为鸡爪槭叶提取物中重要的 ABTS<sup>+</sup>· 清除活性成分,由此可推断,模拟消化过程中总黄酮、总酚和缩合单宁含量的降低是鸡爪槭叶提取物 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力下降的主要原因。

许多文献也报道了相似的研究结果,如 Pinto 等研究表明,在 DPPH、ABTS<sup>+</sup>· 等四种抗氧化模型试验中,接骨木莓浆果和叶提取物的自由基清除能力在模拟肠道消化后分别降低了 24% ~ 54% 和 35% ~ 67% [16]。Bao 等报道,体外模拟消化后,黑苦荞米黄酮的 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力分别降低了 58.3% 和 37.6% [17]。但也有部分研究显示,水果蔬菜的抗氧化能力在模拟胃肠道消化后显著提高,这是因为在胃肠道模拟消化过程中,蔬菜水果中的多酚类化合物逐渐被释放出来,消化液中多酚类化合物的含量增加,从而提高了消化产物的抗氧化能力 [18,19]。另外,Wootton-Beard 等研究表明,西红柿、胡萝卜、甜菜根等 23 种商业蔬菜汁在胃肠道模拟消化后仍具有较好的抗氧化能力,消化后样品的 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力为消化前的 56% ~ 158% [11];Ryan 等对 25 种果汁进行了研究,发现体外模拟胃肠道消化会增加大部分果汁的自由基清除能力 [20],本实验得到的不同研究结果可能是由于果

汁中的化学组成与本实验鸡爪槭叶提取物中化学成分的差异所致。

## 2.6 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力

鸡爪槭叶提取物及其口腔、胃肠道消化样品的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力如图 6 和表 1 所示,鸡爪槭叶提取物及其口腔、胃消化样品均具有很好的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力,IC<sub>50</sub> 值为 10.55 ~ 17.68  $\mu$ g/mL,各测试样品的抑制能力的变化趋势为:原样 > 口腔实验组 = 口腔 pH 组 > 胃实验组 = 胃 pH 组 > 肠消化样品。样品经口腔和胃模拟消化后,其酶抑制活性均有所下降,但 IC<sub>50</sub> 值变化不大,经肠道模拟消化后,酶抑制活性迅速下降,实验组和 pH 组样品在浓度为 2.0 ~ 62.5  $\mu$ g/mL 时不存在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力,相反,我们在 pH 组样品中检测到了促进作用,这可能是由于本实验所用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 为 7.0 左右。相关性分析表明,总黄酮、总酚和缩合单宁与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力的相关系数分别为 0.888、0.938 和 0.936,说明黄酮、酚类和缩合单宁类化合物的含量与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力呈强相关性,我们的前期研究也显示,黄酮、酚类和单宁类化合物是鸡爪槭叶中主要的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制成分 [4]。因此,鸡爪槭叶提取物中黄酮、酚类和缩合单宁类化合物含量的降低是其  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力下降的主要原因。

## 3 结论

口腔消化对鸡爪槭叶提取物中的总酚、缩合单宁含量和 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力无显著影响,会降低样

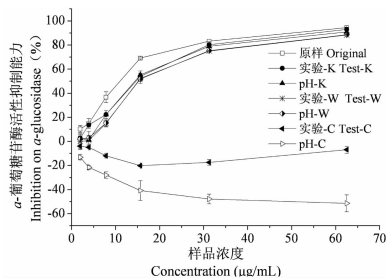


图6 体外模拟消化过程中鸡爪槭叶提取物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力变化

Fig. 6  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of *A. palmatum* leaves extract during *in vitro* simulated digestion

品的总黄酮含量及其 DPPH·清除能力和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力,但其影响较小,且主要由 pH 和离子环境的变化所引起。

胃部消化对样品中的总酚、总黄酮含量和 DPPH·清除能力无显著影响,但会略微降低样品的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制能力, pH 和离子环境的改变是其主要影响因素。

肠道消化会大大降低鸡爪槭叶中活性成分的稳定性及其生物活性,消化组样品中总酚、总黄酮和缩合单宁的含量分别降低了 52.95%、99.26% 和 100%;在测定浓度范围内,样品的 DPPH·清除能力和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的损失率为 100%,与胃消化后样品相比,消化组和 pH 组样品清除 ABTS<sup>+</sup>·的 IC<sub>50</sub>值分别增加了 1.88 和 1.59 倍。

总之,胃肠道消化会降低鸡爪槭叶多酚稳定性及其抗氧化和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, pH 环境的改变是其稳定性和活性的主要影响因素。

#### 参考文献

- Tang W (唐雯), Wang JJ(王建军), Xu JX(徐家星), *et al.* Advances of chemical composition of medicinal plants in *Aceraceae*[J]. *Northern Horticult* (北方园艺), 2012, 18: 194-200.
- Aritomi M, Chiang JH, Nakahashi T. Chemical constituents in aceraceae plants. ii, flavonoid constituents in leaves of *Acer carpinifolium* Siebold Et Zuccarini, *Acer diabolicum* Blume, *Acer marmoratum* Hara Form, *Dissectum* Rehder, and *Acer negundo* Linnaeus[J]. *J Pharm Soc Japan*, 1964, 84: 360-362.
- Ishikura N. Anthocyanins and other phenolics in autumn leaves[J]. *Phytochem*, 1972, 11: 2555-2558.
- Zhang L, Tu ZC, Xie X, *et al.* Antihyperglycemic, antioxidant activities of two *Acer palmatum* cultivars, and identification of

phenolics profile by UPLC-QTOF-MS/MS: New natural sources of functional constituents[J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 89:522-532.

- Marchese A, Coppo E, Sobolev AP, *et al.* Influence of *in vitro* simulated gastroduodenal digestion on the antibacterial activity, metabolic profiling and polyphenols content of green tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Food Res Int*, 2014, 63:182-191.
- Burgos-Edwards A, Jiménez-Aspee F, Thomas-Valdés S, *et al.* Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Food Chem*, 2017, 237:1073-1082.
- Corrêa RCG, Haminiuk CWI, Barros L, *et al.* Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation[J]. *J Funct Food*, 2017, 36: 410-417.
- Celep E, Charehsaz M, Akyüz S, *et al.* Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines[J]. *Food Res Int*, 2015, 78:209-215.
- Zhang JM (张津鸣), Zhong XT (钟筱婷), Shen DQ (盛德乔), *et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of total flavonoids from *Chaenomeles speciosa* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1602-1606.
- Euch E, Bouajila J, Bouzouita N. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts[J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 76:1100-1105.
- Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods[J]. *Food Res Int*, 2011, 44:217-224
- Li T (李俦), Wang XY (王谢祗), Zhai YX (翟宇鑫), *et al.* Stability of polyphenols during *in vitro* digestion[J]. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37(13):1-5.
- Cilla A, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, *et al.* Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells[J]. *Food Chem*, 2009, 114:813-820.
- Yin SL (尹世磊), Zhao MM (赵谋明), Teng JW (滕建文), *et al.* Study on changes of components and antioxidant activities of Liubao Tea during gastrointestinal digestion[J]. *Modern Food Sci Technol* (现代食品科技), 2017, 33(8): 1-7.

- 15 Bourvellec CL, Renard CC. Interactions between polyphenols and macromolecules; quantification methods and mechanisms [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52:213-248.
- 16 Pinto J, Spínola V, Llorent-Martínez EJ, et al. Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated *in vitro* digestion [J]. *Food Res Int*, 2017, 100:404-410.
- 17 Bao T, Wang Y, Li YT, et al. Antioxidant and antidiabetic properties of tartary buckwheat rice flavonoids after *in vitro* digestion [J]. *J Zhejiang Univ-Sci B*, 2016, 17:941-951.
- 18 Chen GL, Chen SG, Zhao YY, et al. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion [J]. *Ind Crop Prod*, 2014, 57:150-157.
- 19 Chandrasekara A, Shahidi F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation [J]. *J Funct Food*, 2012, 4:226-237.
- 20 Ryan L, Prescott SL. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2010, 45:1191-1197.

(上接第 384 页)

- 2 Yan Z, Wang GY, Jin J, et al. Expressions of oncogenes c-fos and c-myc in skin lesion of cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Asian Pacific J Tropic Med*, 2014, 11:761-764.
- 3 Fuchs U, Damm W, Borkhards A, et al. Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs [J]. *Curr Mot Med*, 2004, 4:507-517.
- 4 Ling CQ, Yue XQ, Ling C, et al. Three advantages of using traditional Chinese medicine to prevent and treat tumor [J]. *J Integr Med*, 2014, 12:331-335.
- 5 Wang Y, Li J, Guo J, et al. Cytotoxic and antitumor effects of curzerene from *Curcuma longa* [J]. *Planta Med*, 2017, 83:23-29.
- 6 Ann M. Roussely says EDF can launch EPR project with 2005 [J]. *Nucleonics Week*, 2004, 45(4):8.
- 7 Augustine A, Anitha P, Sreerag G, et al. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives [J]. *J Tradit Complement Med*, 2017, 7:205-233.
- 8 Li J, Feng TL. Why bortezomib cannot go with green? *Cancer Biol Med*, 2013, 4:206-213.
- 9 Safreen SDA, Sneha V, Kumaresan R. Screening of potential plant compounds as survivin inhibitors and its anti-cancer efficacy by molecular docking [J]. *Curr Enzyme Inhibit*, 2016, 13:41-48.
- 10 Laura B, Isabella C, Carmine F, et al. Survivin expression in canine epidermis and in canine and human cutaneous squamous cell carcinomas [J]. *Veterin Dermatol*, 2009, 20:369-376.
- 11 Wei WT(韦武亭), Wang HD(王汉东), Wu Y(吴永), et al. Effects of lipoic acid on neuronal apoptosis in traumatic brain injury in mice [J]. *J Med Sci (医学研究生学报)*, 2015, 28:574-578.
- 12 Eric B, Iris G, Versha B, et al. Abstract 314: Low-dose NAMPT inhibition by FK866 initiates autophagy to counteract cellular energy crisis, which is overridden by apoptosis at higher drug concentrations [J]. *Cancer Res*, 2014, 74:314.
- 13 Li SW, Ling L, Liang L, et al. MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors [J]. *Blood*, 2015, 125:1302-1313.
- 14 Tu YH(涂云华), Zhou Y(周英), Kang YQ(康颖倩), et al. The mechanism of turmeric volatile oil on the proliferation and apoptosis of WM35 cells [J]. *Chin J Dermatol Venereal Dis (中国皮肤性病学杂志)*, 2015, 12:1001-7089.
- 15 Hao ZG, Erin C, Robert D, et al. Effects of drying and blanching on the retention of bioactive compounds in ginger and turmeric [J]. *Horticulturae*, 2016, 3:13-16.
- 16 Betül K, Nevin S. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57:2889-2895.
- 17 Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: Fulfilled promises and open questions [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28:1133-1139.
- 18 Lebelt A, gnieszka R, Jaczun K, et al. Survivin, caspase-3 and MIB-1 expression in astrocytic tumors of various grades [J]. *Adv Med Sci*, 2016, 61:237-243.