

不同饱和度脂肪酸豆甾醇酯的体外生物可给率

王涛¹, 刘睿杰¹, 王艳军², 王兴国¹, 常明¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 巴彦淖尔市科学技术成果转化中心, 内蒙古巴彦淖尔 150800)

摘要:为了探究脂肪酸饱和度对其植物甾醇酯生物可给率的影响, 采用体外模拟消化静态模型, 系统研究了油酸豆甾醇酯、亚油酸豆甾醇酯和亚麻酸豆甾醇酯的体外模拟消化规律。结果表明: 体外模拟消化结束后(120 min), 亚油酸豆甾醇酯游离脂肪酸(FFA)释放率最高, 为78.51%, 其次是亚麻酸豆甾醇酯, 为74.21%, 油酸豆甾醇酯FFA释放率最低, 为69.15%; 3种豆甾醇酯的水解速率由大到小为亚麻酸豆甾醇酯 > 亚油酸豆甾醇酯 > 油酸豆甾醇酯; 3种豆甾醇酯的水解度由大到小为亚油酸豆甾醇酯 > 亚麻酸豆甾醇酯 > 油酸豆甾醇酯; 油酸豆甾醇酯、亚油酸豆甾醇酯和亚麻酸豆甾醇酯生物可给率分别为14.01%、11.11%和10.19%, 总体差异较小。综上, 豆甾醇酯中结合态的脂肪酸(相同碳链长度)饱和度影响其水解速率, 但对豆甾醇酯生物可给率影响较小。

关键词:植物甾醇酯; 脂肪酸饱和度; 体外模拟消化; 生物可给率

中图分类号:TS201.2; O629.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2022)10-0072-05

In vitro bioaccessibility of fatty acid stigmaterol esters with different saturation

WANG Tao¹, LIU Ruijie¹, WANG Yanjun², WANG Xingguo¹, CHANG Ming¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

2. Bayannur City Science and Technology Achievement Transformation Center, Bayannur 150800, Inner Mongolia, China)

Abstract: In order to investigate the effect of fatty acid saturation on the bioaccessibility of phytosterol ester, a static model of in vitro digestion was used to study the digestion characteristics of stigmaterol oleate, stigmaterol linoleate and stigmaterol linolenate. The results showed that after the simulated digestion in vitro (120 min), the free fatty acid (FFA) release rate of stigmaterol linoleate was the highest with 78.51%, followed by stigmaterol linolenate with 74.21%, and that of stigmaterol oleate was the lowest with 69.15%. The hydrolysis rates of the three stigmaterol esters decreased in the order: stigmaterol linolenate > stigmaterol linoleate > stigmaterol oleate. The degree of hydrolysis of stigmaterol esters decreased in the order: stigmaterol linoleate > stigmaterol linolenate > stigmaterol oleate. The bioaccessibilities of stigmaterol oleate, stigmaterol linoleate and stigmaterol linolenate were 14.01%, 11.11% and 10.19% respectively, and the overall difference was small. In conclusion, the degree of saturation of bound fatty acids (same carbon chain length) in stigmaterol esters affects the hydrolysis rate, but has little effect on the bioaccessibility of stigmaterol esters.

Key words: phytosterol ester; fatty acid saturation; in vitro digestion; bioaccessibility

收稿日期: 2021-10-28; 修回日期: 2022-05-05

基金项目: 江苏省现代农业重点及面上项目(BE2019363)

作者简介: 王涛(1995), 男, 硕士研究生, 研究方向为粮油深加工(E-mail) wangtao_jn@163.com。

通信作者: 常明, 教授(E-mail) mingchang@aliyun.com。

植物甾醇是植物来源甾醇的总称, 其来源广泛, 种类繁多。但是植物甾醇不溶于水, 脂溶性差, 极大地限制了其应用范围, 而植物甾醇酯能有效改善植物甾醇的脂溶性和稳定性。有研究证明, 植物甾醇酯能显著提高植物甾醇在膳食混合胶粒中的溶解度

及生物可给率^[1-2],但是不同植物甾醇酯的体外生物可给率差异较大,植物甾醇酯上结合态的脂肪酸是影响植物甾醇酯体外生物可给率的因素之一。

植物甾醇酯在肠道中水解产生的游离脂肪酸和植物甾醇会在胆盐、磷脂的作用下与膳食脂肪水解的单甘油酯、脂肪酸等物质形成膳食混合胶粒。膳食混合胶粒中脂肪酸碳链长度和饱和度是影响活性物质生物可给率的重要因素,植物甾醇酯结合的短链脂肪酸较少,市面上通常以十八碳脂肪酸为主的植物甾醇酯居多,而脂肪酸的饱和度对植物甾醇酯的体外生物可给率的影响还不清楚^[3-4]。因此,本实验选取3种不同饱和度的十八碳脂肪酸豆甾醇酯进行体外模拟消化,以探究植物甾醇酯中结合态的十八碳脂肪酸饱和度对植物甾醇酯体外生物可给率的影响,以期植物甾醇酯的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

油酸豆甾醇酯、亚油酸豆甾醇酯、亚麻酸豆甾醇酯,纯度均大于85%,由本实验室自制;胆固醇酯酶(源于猪胰腺,酶活 ≥ 300 U/g),阿拉丁生化科技股份有限公司;胰脂肪酶(源于猪胰腺,100~500 U/mg),美国Sigma-Aldrich公司;猪胆盐,生化级,临沂西亚化学工业公司;三油酸甘油酯、卵磷脂、氯化钠、氯化钙、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、石油醚,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;正己烷、甲醇、乙腈、丙酮,均为色谱纯,百灵威科技有限公司(中国上海)。

1.1.2 仪器与设备

T960 pH-stat 自动电位滴定仪,中国济南海能公司;IKA T18 高速分散机,德国 IKA 公司;BL19-1-7 高速离心机,上海化科有限公司;R-210 旋转蒸发仪,瑞士 Buchi 公司;1260 Infinity 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;TRACE™ 1310 气相色谱仪,赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

模拟小肠消化液(SIF)的配制:分别称取一定质量的氯化钙和氯化钠,用蒸馏水溶解,使最终氯化钙和氯化钠的质量浓度分别为36.667、219.133 g/L,即得SIF。SIF可在室温长期存放。

胆盐溶液的配制:称取一定质量的猪胆盐,溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中,配制质量浓度为10 mg/mL的胆盐溶液。注意提前24 h配制,室温搅拌溶解,模拟小肠消化前于37℃预热40 min。

胰脂肪酶溶液的配制:称取一定质量的胰脂肪酶,溶于PBS中,配制质量浓度为24 mg/mL的胰脂肪酶溶液。注意室温搅拌溶解,模拟小肠消化前于37℃预热40 min。

胆固醇酯酶溶液的配制:称取一定质量的胆固醇酯酶,溶于PBS中,配制质量浓度为1 mg/mL的胆固醇酯酶溶液。注意室温搅拌溶解,模拟小肠消化前于37℃预热40 min。

1.2.2 豆甾醇酯粗乳液的制备

基于 Moran-Valero 等^[1]植物甾醇酯的消化方法,取3个100 mL的敞口反应釜,置于转速为120 r/min的恒温水浴振荡器中,于55℃水浴10 min。称取油酸豆甾醇酯、亚油酸豆甾醇酯和亚麻酸豆甾醇酯各0.360 g于3个反应釜中,分别加入0.160 g卵磷脂、0.450 g三油酸甘油酯、40 mL PBS,于55℃、500 r/min条件下搅拌10 min,再用高速剪切仪剪切15 min,得到豆甾醇酯粗乳液。

1.2.3 豆甾醇酯体外模拟消化

通常脂质体外模拟消化采用恒定pH-stat模型,该模型包括:①一个恒温反应容器,其中包含代表肠道环境的缓冲液,该缓冲液不含外源性脂质(胆盐、磷脂、胰脂肪酶和脂肪酶);②pH滴定系统,监测培养的pH,并将pH的任何变化滴定至设定点;③持续搅动消化液的装置^[5]。该模型以胰脂肪酶为主要消化酶源,可合理反映脂质水解程度和脂质产物比例等体内生理结果,但胰脂肪酶几乎不水解植物甾醇酯,因此本研究将脂质体外模拟消化模型应用于植物甾醇酯需要进行一些简单修改,如添加可水解植物甾醇酯的胆固醇酯酶,以适应底物。首先调节豆甾醇酯粗乳液的pH至7.0,加入2 mL SIF、4 mL胰脂肪酶溶液、5 mL胆盐溶液和2 mL胆固醇酯酶溶液,于37℃消化120 min,期间用0.10 mol/L NaOH溶液调节体系pH为6.995~6.999。实验重复3次,用pH-stat自动电位滴定仪监控体系反应过程中NaOH溶液的消耗量。

1.2.4 模拟消化过程中游离脂肪酸(FFA)释放率的计算

豆甾醇酯体外模拟小肠消化过程中会生成FFA,根据pH-stat自动电位滴定仪记录的NaOH溶液消耗情况,按公式(1)计算FFA释放率。

$$\varphi = \frac{V \times C \times M}{W} \times 100\% \quad (1)$$

式中: φ 为FFA释放率; V 为消耗的NaOH溶液体积,L; C 为NaOH溶液的浓度,mol/L; M 为豆甾醇酯的摩尔质量,g/mol; W 为体外模拟小肠消化的豆

甾醇酯质量, g。

1.2.5 豆甾醇酯模拟消化过程中 FFA 释放动力学参数的确定

豆甾醇酯在模拟消化过程中, 释放的 FFA 随消化时间延长逐渐积累, 消化结束后得到 FFA 最大释放率(φ_{\max})。根据一阶动力学模型^[6], 以 $\ln[(\varphi_{\max} - \varphi_t)/\varphi_{\max}]$ 对时间 t 作图, 得到一阶动力学曲线, 通过线性拟合(见公式 2)求得 FFA 释放的一阶动力学速率常数(k)。

$$\ln[(\varphi_{\max} - \varphi_t)/\varphi_{\max}] = -kt + b \quad (2)$$

式中: t 为模拟小肠消化过程的持续时间, s。

1.2.6 消化产物中脂质的提取

体外模拟消化结束后, 对消化产物中的 FFA、豆甾醇和未水解的豆甾醇酯进行提取。参照 Soler - Rivas 等^[6]的方法, 将消化产物在 4 °C、4 500 r/min 下离心 40 min, 分为三层, 上层为油相, 中间层为胶束相, 下层为沉淀相。分别收集三相, 其中胶束相通过 0.45 μm 滤膜过滤, 再分别用正己烷 - 甲基叔丁基醚(体积比 3:2)对油相、胶束相和沉淀相萃取 3 次, 收集上清液, 萃取过程中可适当加乙醇和饱和氯化钠溶液破乳。将收集的上清液用旋转蒸发仪蒸除有机溶剂后, 置于 -80 °C 下储藏待用。

1.2.7 胶束相脂肪酸组成分析

参照刘慧敏^[7]的方法, 将提取的胶束相(脂质)进行甲酯化, 经 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后, 待 GC 分析。

GC 分析条件: TRACE TR - FAME 毛细管柱(60 m \times 250 μm \times 0.25 μm); 火焰离子化检测器(FID); 检测器和进样口温度均为 250 °C; 空气压力 50 kPa, 流速 400 mL/min; 氢气压力 60 kPa, 流速 30 mL/min; 氮气压力 240 kPa, 流速 25 mL/min; 进样量 1 μL ; 分流比 1:100; 升温程序为初始温度 60 °C 保持 3 min, 以 5 °C/min 升温至 175 °C, 保持 15 min, 以 2 °C/min 升温至 220 °C, 保持 20 min。

采用 37 种脂肪酸甲酯混合标准品定性, 面积归一化法定量。

1.2.8 脂质组成及生物可给率的测定

参考 Chang 等^[8]的方法, 采用高效液相色谱法测定 1.2.6 得到的脂质提取物的组成, 并计算豆甾醇酯的体外生物可给率。

标准曲线的绘制: 称取 10.00 mg 豆甾醇标准品, 溶于正己烷并定容至 5 mL, 继续用正己烷稀释得到豆甾醇质量浓度为 0.25、0.50、0.80、1.20、1.60 mg/mL 的系列标准工作液, 进高效液相色谱进行分析(每个样平行测定 3 次, 测定条件见文献

[8]), 以峰面积(y)为纵坐标, 豆甾醇质量浓度(x)为横坐标绘制标准曲线, 并拟合得到标准曲线回归方程, 即: $y = 13\,735.0x - 3\,087.4$ ($R^2 = 0.990\,2$)。按相同的方法得到油酸豆甾醇酯、亚油酸豆甾醇酯和亚麻酸豆甾醇酯的标准曲线回归方程, 即: $y = 3\,574.5x - 5\,165.7$ ($R^2 = 0.993\,5$), $y = 8\,798.0x - 7\,031.3$ ($R^2 = 0.992\,8$), $y = 2\,898.2x - 1\,783.8$ ($R^2 = 0.989\,4$)。

样品分析: 将 1.2.6 得到的脂质提取物溶于 5 mL 正己烷中, 适当稀释, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 经高效液相色谱检测, 根据峰面积和相应标准曲线回归方程获得脂质中豆甾醇和豆甾醇酯的含量。根据测得的油相、胶束相、沉淀相中未水解的豆甾醇酯质量与初始豆甾醇酯质量的比值计算豆甾醇酯的水解度。

以胶束化率代表豆甾醇体外生物可给率, 计算如公式(3)所示。

$$Y = m_1/m_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中: Y 为胶束化率; m_1 为胶束中豆甾醇质量; m_0 为消化前豆甾醇质量, 由豆甾醇酯换算而来(根据豆甾醇占豆甾醇酯分子质量的比例换算)。

2 结果与讨论

2.1 体外模拟消化过程中的 FFA 释放率

豆甾醇酯在体外模拟消化过程中 FFA 释放率见图 1。

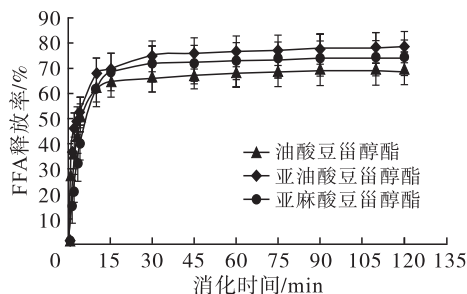


图 1 豆甾醇酯体外模拟小肠消化阶段的 FFA 释放率

由图 1 可知: 3 种豆甾醇酯的 FFA 释放率均呈先快速增加后缓慢变化的趋势, 在消化开始 10 min 后 FFA 释放率增加趋势变缓; 消化结束后, 亚油酸豆甾醇酯 FFA 释放率最高, 为 78.51%, 其次是亚麻酸豆甾醇酯, 为 74.21%, 油酸豆甾醇酯 FFA 释放率最低, 为 69.15%。这可能是由 3 种豆甾醇酯结构的不同导致胆固醇酯酶对底物水解的差异, 以及释放的 FFA 电离常数不同导致其与 NaOH 中和速率的差异造成的。

2.2 体外模拟消化过程中 FFA 释放动力学参数

按 1.2.5 的方法得到不同脂肪酸豆甾醇酯的一阶动力学曲线, 如图 2 所示。对不同脂肪酸豆甾醇酯的动力学曲线进行线性拟合, 结果见表 1。

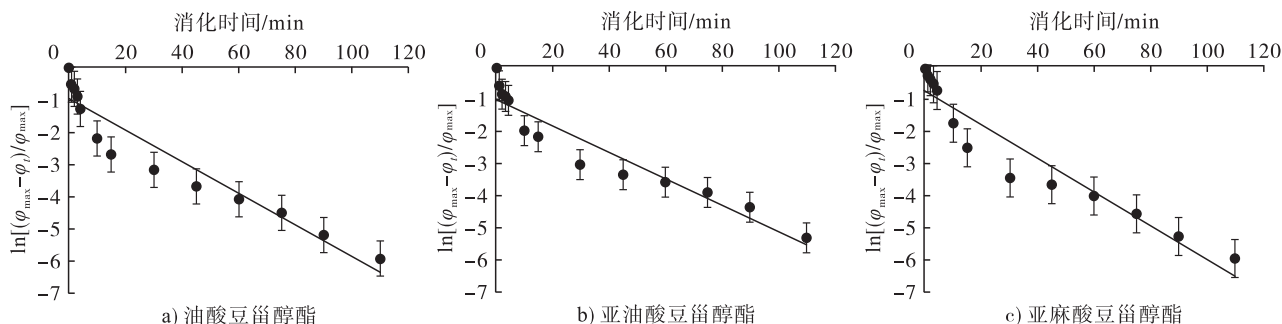


图2 3种豆甾醇酯体外模拟小肠消化FFA释放拟合的一阶动力学曲线

表1 3种豆甾醇酯模拟小肠消化过程中FFA释放动力学方程

豆甾醇酯	一阶动力学方程	k/s^{-1}	R^2
油酸豆甾醇酯	$y = -0.0413x - 1.0095$	0.0413	0.9084
亚油酸豆甾醇酯	$y = -0.0429x - 1.0463$	0.0429	0.9064
亚麻酸豆甾醇酯	$y = -0.0519x - 0.7730$	0.0519	0.9110

由表1可知, R^2 在0.9064~0.9110之间,说明各曲线拟合度良好。对比一阶动力学速率常数可知,亚麻酸豆甾醇酯的明显高于油酸豆甾醇酯和亚油酸豆甾醇酯的,说明亚麻酸豆甾醇酯的水解速率最快。不同脂肪酸甾醇酯水解速率与其结构有关:①脂肪酸酸度系数的影响。脂肪酸的酸度系数(pKa)越大则酸性越弱,在pH7和同一浓度下,其离解氢离子的能力越弱,油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)的pKa分别为9.85、9.24和8.28^[9],因此在pH7时中和相同摩尔数的3种脂肪酸所需要的NaOH量不同,从而使得水解速

率有差异。②脂肪酸不饱和度的影响。Brown等^[10]研究发现,对于相同植物甾醇不同脂肪酸酯化的植物甾醇酯,在胆固醇酯酶催化下,油酸甾醇酯的水解速率优于硬脂酸甾醇酯和棕榈酸甾醇酯,说明饱和脂肪酸硬脂酸(C18:0)和棕榈酸(C16:0)的水解速率较慢。③脂肪酸碳链长度的影响。Bonsdorff-Nikander等^[3]研究发现,短碳链和中碳链脂肪酸甾醇酯疏水性较小,更容易位于油滴和水两者介质的界面,比溶解在油滴核心的长碳链脂肪酸甾醇酯更容易被酶水解,水解速率更快,但是降胆固醇效果却不如长碳链脂肪酸甾醇酯。本实验中,相同碳链长度的脂肪酸豆甾醇酯的水解速率随着饱和度和酸度系数的增加而降低,进而降低了FFA释放量。

2.3 体外模拟消化产物胶束相的脂肪酸组成

膳食混合胶束相中的FFA参与胶束组装的过程,其结构与含量会影响膳食混合胶粒中豆甾醇的溶解特性。本研究测定了3种不同饱和度脂肪酸豆甾醇酯体外模拟消化产物胶束相中的FFA组成,结果如表2所示。

表2 3种豆甾醇酯消化产物胶束相中的FFA组成及含量

豆甾醇酯	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
油酸豆甾醇酯	9.25 ± 0.74 ^b	4.71 ± 0.15 ^a	69.97 ± 2.19 ^a	16.07 ± 0.42 ^c	-
亚油酸豆甾醇酯	9.70 ± 0.24 ^a	5.04 ± 0.74 ^a	56.50 ± 0.71 ^b	28.76 ± 1.33 ^a	-
亚麻酸豆甾醇酯	8.71 ± 0.33 ^c	4.45 ± 0.68 ^b	56.03 ± 0.58 ^b	18.13 ± 0.59 ^b	12.66 ± 0.91 ^a

注: -表示未检出;同列不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

由表2可见,3种豆甾醇酯消化产物胶束相中均有较高含量的油酸(C18:1),主要是乳液中溶解豆甾醇酯的脂质——三油酸甘油酯水解产生的,相比之下,3种豆甾醇酯水解产生的脂肪酸在胶束相中含量较低。

2.4 豆甾醇酯水解度及生物可给率

按照1.2.8的方法,对体外模拟消化产物中的油相、胶束相和沉淀相中未水解的豆甾醇酯进行测定,并计算豆甾醇酯水解度,结果如图3所示。

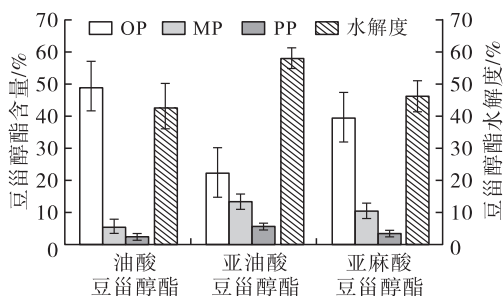


图3 3种豆甾醇酯消化产物中油相(OP)、胶束相(MP)、沉淀相(PP)中的豆甾醇酯分布情况

由图3可见,体外模拟消化产物中未消化的豆甾醇酯大部分集中在油相中。此外,相对于油酸豆甾醇酯,亚油酸豆甾醇酯和亚麻酸豆甾醇酯胶束相中豆甾醇酯含量偏高,油酸豆甾醇酯的水解度42.54%,亚油酸豆甾醇酯的水解度58.12%,亚麻酸豆甾醇酯的水解度46.24%,可见亚油酸豆甾醇酯的水解度最高。

按照1.2.8的方法,对体外模拟消化产物中的油相、胶束相和沉淀相中豆甾醇的含量进行测定,结果如图4所示。

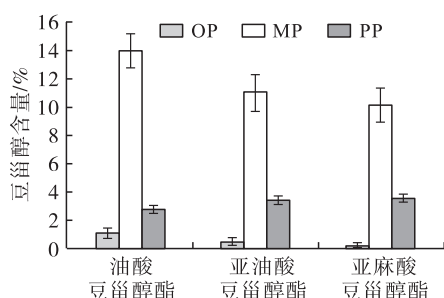


图4 3种豆甾醇酯消化产物中油相(OP)、胶束相(MP)、沉淀相(PP)中的豆甾醇分布情况

根据图4数据,计算出油酸豆甾醇酯生物可给率为14.01%,亚油酸豆甾醇酯生物可给率为11.11%,亚麻酸豆甾醇酯生物可给率为10.19%,可见油酸豆甾醇酯体外模拟消化释放的豆甾醇生物可给率相对最高,但是三者总体差异较小。

3 结论

通过对3种不同饱和度脂肪酸豆甾醇酯体外模拟消化研究,发现豆甾醇酯中结合态的脂肪酸饱和度不同可以影响豆甾醇酯的水解速率,但是豆甾醇酯水解速率对豆甾醇酯生物可给率影响较小,因为膳食混合胶粒中脂肪酸组成取决于溶解豆甾醇酯的脂质,导致3种豆甾醇酯中的生物可给率差异较小。

参考文献:

[1] MORAN - VALERO M I, MARTIN D, TORRELO G, et al. Phytosterols esterified with conjugated linoleic acid. In vitro intestinal digestion and interaction on cholesterol bioaccessibility[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(45):

11323 - 11330.

- [2] GLEIZE B, NOWICKI M, DAVAL C, et al. Form of phytosterols and food matrix in which they are incorporated modulate their incorporation into mixed micelles and impact cholesterol micellarization[J]. Mol Nutr Food Res, 2016, 60(4): 749 - 759.
- [3] BONSDORFF - NIKANDER A V, CHRISTIANSEN L, HUIKKO L, et al. A comparison of the effect of medium - vs. long - chain triglycerides on the in vitro solubilization of cholesterol and/or phytosterol into mixed micelles [J]. Lipids, 2005, 40(2): 181 - 190.
- [4] PORTER C J, CHARMAN W N. Lipid - based formulations for oral administration: opportunities for bioavailability enhancement and lipoprotein targeting of lipophilic drugs[J]. J Recept Sig Transd Res, 2001, 21(2/3): 215 - 221.
- [5] PORTER C, CHARMAN W. In vitro assessment of oral lipid based formulations[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 50(2): s127 - s147.
- [6] SOLER - RIVAS C, MARIÍN F R, SANTOYO S, et al. Testing and enhancing the in vitro bioaccessibility and bioavailability of rosmarinus of ficinalis extracts with a high level of antioxidant abietanes [J]. J Agric Food Chem, 2010, 41(4): 242 - 251.
- [7] 刘慧敏. 不同植物油微量成分与抗氧化能力的相关性研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2015.
- [8] CHANG M, ZHANG T, FENG W, et al. Preparation of highly pure stigmasteryl oleate by enzymatic esterification of stigmasteryl enriched from soybean phytosterols[J]. LWT - Food Sci Technol, 2020, 128(10): 109464 - 109471.
- [9] NIOT I, POIRIER H, TRAN T T, et al. Intestinal absorption of long - chain fatty acids: evidence and uncertainties[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(2): 101 - 115.
- [10] BROWN A W, HANG J, DUSSAULT P H, et al. Plant sterol and stanol substrate specificity of pancreatic cholesterol esterase[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(8): 736 - 740.