

郑贵娟, 罗建群, 南占东, 等. 复合富硒植物固体饮料的制备及其生物活性研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 341–348. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020216

ZHENG Guijuan, LUO Jianqun, NAN Zhandong, et al. Preparation of Compound Selenium-enriched Plant Solid Beverage and Its Biological Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 341–348. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020216

· 营养与保健 ·

复合富硒植物固体饮料的制备及其生物活性研究

郑贵娟¹, 罗建群^{2,3}, 南占东^{2,3}, 杨 敏^{2,3}, 何美军^{2,3,4,*}, 姚广民^{1,2,*}

(1. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北武汉 430030;

2. 恩施硒禾生物科技有限公司, 湖北恩施 445000;

3. 恩施硒司令生态农业科技发展有限公司, 湖北恩施 445000;

4. 湖北省农业科学院中药材研究所, 湖北恩施 445000)

摘要: 为了开发一款功能性的复合富硒植物固体饮料, 本研究以药食同源富硒西兰花、葛根、藤茶、黄精、木瓜和西红柿为原料, 成功开发出一款复合植物固体饮料。同时, 对其抗肿瘤细胞增殖活性、抗氧化活性和镇痛活性进行了评价。利用荧光光度法测定该复合富硒植物固体饮料的总硒含量为 $540 \pm 30.12 \mu\text{g/kg}$ 。功能性评价结果表明该复合固体饮料在 $100 \mu\text{g/mL}$ 浓度下, 能够一定程度的抑制肿瘤细胞 (A549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW480) 的增殖, 抑制率分别为 $4.09\% \pm 1.36\%$ 、 $19.48\% \pm 3.18\%$ 、 $30.75\% \pm 1.45\%$ 和 $18.20\% \pm 1.12\%$, 且对人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 无细胞毒性, 具有一定的体外抗肿瘤活性。该复合固体饮料的 DPPH 自由基清除率呈现浓度依赖性升高, IC_{50} 为 $435.6 \pm 27.2 \mu\text{g/mL}$ 。该固体饮料能降低 H_2O_2 诱导的 LO2 细胞的氧化损伤和细胞内活性氧水平, 且在 $5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 浓度下呈现剂量和效应相关性, 表现出明显的抗氧化活性 ($P < 0.01$)。此外, 该复合富硒植物固体饮料高剂量组 (250 mg/kg) 具有显著的镇痛作用 ($P < 0.001$), 其镇痛抑制率为 92.3% , 其镇痛效果与阳性药吗啡 (5 mg/kg) 的效果相当。本研究结果为复合富硒植物固体饮料进一步开发奠定基础。

关键词: 复合富硒植物固体饮料, 生物活性评价, 抗肿瘤细胞增殖活性, 抗氧化活性, 镇痛活性

中图分类号: TS278

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)24-0341-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020216



本文网刊:

Preparation of Compound Selenium-enriched Plant Solid Beverage and Its Biological Activities

ZHENG Guijuan¹, LUO Jianqun^{2,3}, NAN Zhandong^{2,3}, YANG Min^{2,3}, HE Meijun^{2,3,4,*}, YAO Guangmin^{1,2,*}

(1. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science of Technology, Wuhan 430030, China;

2. Enshi Xihe Biotechnology Co., Ltd., Enshi 445000, China;

3. Enshi Selenium Commander Ecological Agriculture Technology Development Co., Ltd., Enshi 445000, China;

4. Institute of Chinese Herbal Medicines, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, China)

Abstract: A functional compound selenium-enriched plant solid beverage was successfully developed by taking the selenium-enriched medicinal and edible plants *Brassica oleracea*, *Pueraria lobata*, *Ampelopsis grossedentata*, *Polygonatum sibiricum*, *Chaenomeles sinensis*, and tomato as the materials. At the meantime, its biological activities including antiproliferative, antioxidant, and analgesic activities were evaluated. The total selenium content of the compound solid beverage

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 恩施州科技计划项目 (D20210028)。

作者简介: 郑贵娟 (1993-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: zhenghuster@qq.com。

* 通信作者: 何美军 (1974-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 功能食品研究与开发, E-mail: 840940513@qq.com。

姚广民 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学与创新药物研究, E-mail: gyap@hust.edu.cn。

was determined by fluorescence spectrophotometry as $540 \pm 30.12 \mu\text{g/kg}$. The biological results showed that the compound selenium-enriched plant solid beverage inhibited the proliferation of four cancerous cell lines A549, SMMC-7721, MCF-7, and SW480 with the inhibition values of $4.09\% \pm 1.36\%$, $19.48\% \pm 3.18\%$, $30.75\% \pm 1.45\%$, and $18.20\% \pm 1.12\%$, respectively, and had no cytotoxicity to the human normal lung epithelial cell BEAS-2B at a concentration of $100 \mu\text{g/mL}$, indicating its antiproliferative effect against cancer cells *in vitro*. The compound solid beverage had a clearance ability of DPPH radical at a concentration-dependent manner with an IC_{50} value of $435.6 \pm 27.2 \mu\text{g/mL}$. The compound solid beverage reduced the H_2O_2 -induced oxidative damage and the intracellular reactive oxygen fluorescence intensity in LO2 cells, and presented a dose-effect relationship within a concentration of $5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$, revealing its obvious antioxidant activity ($P < 0.01$). Additionally, the compound plant selenium solid beverage exhibited significant analgesic activity at the high-dose of 250 mg/kg with an inhibition rate of 92.3% ($P < 0.001$), which was equivalent to that of the positive drug morphine (5 mg/kg). The research results could lay a foundation for further development of the compound selenium-rich plant solid drink.

Key words: compound selenium-enriched plant solid beverage; biological evaluation; antiproliferative activity; antioxidant activity; analgesic activity

硒(Selenium, Se)是一种稀散的元素^[1],在自然界中的含量及其稀少。世界卫生组织和国内营养组织认定硒是人体必需的微量元素之一^[2],缺硒会严重影响人体健康,如克山病、大骨节病、免疫缺陷和甲状腺疾病等^[3-5]。硒元素在自然界中存在有机硒和无机硒两种方式,其中有机硒包括硒蛋白、硒代氨基酸及硒多糖等,它们容易被人体吸收,但其物质成本高且成分复杂^[6]。人体硒的主要来源是通过食物摄入,其中富硒农作物是人体获取有机硒的重要途径之一^[7-8]。恩施州,誉有“世界硒都,中国硒谷”的美称,拥有不可替代的世界级硒资源,具有发展天然富硒特色农业和硒精深加工产业的顶级资源优势^[9]。

西兰花富含抗坏血酸、硫代葡萄糖苷等活性成分^[10],聚硒能力强^[11],具有抗衰老、防癌抗癌、增强机体免疫力等作用。葛根富含葛根素及异黄酮类物质,具有抗氧化、解酒护肝、预防骨质疏松等功效^[12]。藤茶中富含多酚类物质以及儿茶素的氧化聚合成分,具有抗炎、降血压、降血脂等作用^[13-14]。黄精富含甾体皂苷、黄精多糖和黄精低聚糖,能补气养阴,健脾润肺,具有增强免疫功能、抗衰老、耐缺氧、抗疲劳等作用。木瓜性温味酸,平肝和胃,具有抗氧化、增强人体免疫力等作用。西红柿富含胡萝卜素和番茄红素,对抗衰老、预防癌症、降低心血管疾病等具有积极作用^[15]。恩施地区丰富的药食同源植物因富含硒元素而具有更高的营养价值^[16],是发展有机硒产业的资源宝库。

近年来,随着生活水平的提高,人们医疗消费观念也从治已病转向“预防和保健”^[17]。保健饮料越来越受到消费者青睐,具有广阔的市场需求和发展前景。目前市售富硒固体饮料包括富硒葛桑饮、富硒黑木耳固体饮料、富硒姬松茸固体饮料、富硒麦芽粉固体饮料、富硒蛋白粉固体饮料等,配制原料通常为一种或两种,配伍简单,成分相对单一,且未见相关功能性研究的报道。本研究以药食同源植物材料富硒西兰花、葛根、藤茶、黄精、木瓜和西红柿等六种原料合理配伍,开发一款复合富硒植物功能性固体饮料,营养成分丰富。本研究对其开展多种功能活性评

价,包括抗肿瘤细胞增殖活性、抗氧化活性和镇痛活性等,并首次报道对该类固体饮料的抗肿瘤活性和镇痛活性研究。该富硒固体饮料的开发对于预防疾病、强身保健具有重要现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

富硒西兰花、葛根、藤茶、黄精、木瓜、西红柿等新鲜材料 恩施硒禾生物科技有限公司; 硒标准溶液($1000 \mu\text{g/mL}$) 国家有色金属及电子材料分析检测中心; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)、顺铂(DDP)、紫杉醇(Taxol)和维生素C等 Sigma 试剂公司; Biosharp 胎牛血清、DMEM 细胞培养液、RMPI-1640 细胞培养液、PBS 缓冲盐溶液、细胞裂解液、 H_2O_2 、DMSO、 HNO_3 、生理盐水和琼脂培养基等 迪米特(武汉)生物试剂有限公司; 无水乙醇、冰醋酸 分析纯, 国药集团有限公司; 大肠杆菌 CICC10389、沙门氏菌 CICC21513、志贺氏菌 CICC21680 和金黄色葡萄球菌 CICC21600 等微生物标准菌液 中国工业微生物菌种保藏管理中心; 肺癌细胞 A549、肝癌细胞 SMMC-7721、乳腺癌细胞 MCF-7、结肠癌细胞 SW480、人肺上皮细胞 BEAS-2B、人肝癌 LO2 细胞等细胞 实验室自存细胞株; 昆明 KM 小鼠 80 只,雌雄各半,体重约 $18 \sim 22 \text{ g}$,华中科技大学同济医学院实验动物中心,实验动物使用许可证号 SCXK(湖北)2021-0057,生产许可证号 SCXK(湖北)2020-0018。

DHG-9240A 鼓风干燥箱 上海超鸿仪器设备有限公司; PSD 型离心机 张家港市恒安机械制造有限公司; HZ-TNG 多功能提取浓缩机组 上海辉展实验设备有限公司; XDW-6 系列超微粉碎机 济南达微机械有限公司; GMS 红外干燥灭菌烘箱 常州市龙杰干燥机械有限公司; AFS-820 原子荧光光度计 北京吉天仪器有限公司; TE2000-S 荧光倒置显微镜 日本尼康公司; Bio-Rad680 多功能酶标仪

北京东迅天地医疗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 复合富硒植物固体饮料的研制 操作要点:

- a. 分选、去杂和漂洗: 选取基地种植的富硒西兰花、葛根、藤茶、黄精、木瓜和西红柿等原料, 其中干燥后的植物原料中硒含量均不低于 150 μg/kg^[18]。将泥土、杂质去除, 原材料清洗干净、沥水。
- b. 预处理: 根据物料特性将原料剪切和破碎等均匀处理。
- c. 干燥: 将剪切后的西兰花、黄精、藤茶、葛根、木瓜和西红柿用鼓风干燥箱进行干燥, 温度不高于 60 ℃, 烘干后含水率 3%~8%。
- d. 加热浸提: 按干燥后重量将西兰花、葛根、藤茶、黄精、木瓜、西红柿按照 3:4:2:2:2:2 配伍, 加入蒸馏水在 60 ℃ 浸提 2 h, 料液比为 10:1。
- e. 过滤、脱色: 用 100 目网筛的滤袋装离心机过滤, 除去废渣、颗粒性物质以及沉淀的淀粉等, 得到滤液 I。将滤液 I 用活性炭柱进行脱色处理, 得到滤液 II。
- f. 浓缩: 将滤液 II 真空浓缩, 温度 60 ℃, 真空度-0.06 Mpa, 浓缩至相对密度为 1.08~1.22, 放置室温无菌状态下冷却, 得到提取物干膏。
- g. 干膏粉碎: 将提取物干膏粉碎, 过 100 目筛, 得到固体粉末, 即为富硒固体复合固体饮料。
- h. 检验: 对产品感官品质、微生物限度以及硒含量等进行检验。

1.2.2 复合富硒植物固体饮料感官评价指标测定 称取 5 g 样品于洁净玻璃杯中, 在室温、自然光环境下用肉眼观察其色泽和外观形态。称取一定量样品按照比例在无色玻璃杯中冲溶稀释后, 立即嗅其香气, 辨其滋味, 静置 2 min 后, 观察烧杯底部有无沉淀。选择 10 名有经验的专业人员(男 6 名, 女 4 名), 年龄在 20~35 之间的成员组成的品评小组, 分别从色泽(25 分)、滋味(25 分)、香气(25 分)和组织形态(25 分)等方面综合评定复合富硒植物固体饮料的品质^[14], 满分 100 分。品评指标见下表 1。

1.2.3 微生物指标测定 参考国家标准 GB 4789.2-2016^[19]、GB 4789.3-2016^[20] 和 GB 4789.4-2016^[21] 测定复合富硒植物复合固体饮料中菌落总数、大肠杆菌数和致病菌数。取 10 g 富硒复合固体饮料装入

有 100 mL 生理盐水的无菌均质袋中, 制成 1:10 的样品溶液; 取 1:10 的样品溶液 1 mL, 沿管壁缓慢注入装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中, 注意吸管不要触碰稀释液面, 振摇试管混合均匀, 制成 1:100 的样品溶液; 取 1:100 的样品溶液 1 mL, 沿管壁缓慢注入装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中, 振摇试管混合均匀, 制成 1:1000 的样品溶液。根据每个活的细菌能长出一个菌落的原理设计, 分别吸取 1 mL 的 1:10、1:100、1:1000 的样品溶液于无菌平板中, 每个浓度平行做 3 个平板。同时, 吸取 1 mL 的空白稀释液加入 3 个无菌平板中作为空白对照, 吸取 1 mL 标准菌液加入 3 个无菌平板中作为阳性对照。加入琼脂培养基, 并混合均匀, 在 37 ℃ 下培养 48 h, 根据培养出的菌落数, 计算活菌数。

1.2.4 复合富硒植物固体饮料硒含量的测定 采用荧光光度法测定复合富硒植物固体饮料中的硒含量^[22]。使用体积分数为 5% HNO₃ 溶液, 将硒标准储备液逐级稀释, 配制系列浓度 0、0.5、1、5、10、20、40 和 80 μg/L, 制备硒标准溶液。

称取复合富硒固体饮料粉末 0.5 g 置于石英试管中, 加入 5% HNO₃ 溶液 10 mL, H₂O₂ 溶液 5 mL, 浸泡 12 h, 放入微波消解仪中消解 10 min(功率 1000 W, 温度 130 ℃)。冷却后超声脱气 5 min, 定容至 25 mL, 摇匀, 待测定硒含量, 平行测定 3 次, 同时做空白实验。

1.2.5 复合富硒植物固体饮料抑制肿瘤细胞增殖活性测定 采用 MTS 法^[23-26] 评价该固体饮料对 4 株肿瘤细胞(肺癌 A549、肝癌 SMMC-7721、乳腺癌 MCF-7 和结肠癌 SW480)和 1 株正常肺上皮细胞(BEAS-2B)的细胞增殖活性的影响。设定顺铂(DDP)和紫杉醇(Taxol)为 2 组阳性对照, 添加剂 DMSO 为阴性对照。

用含 10% 胎牛血清的细胞培养液(DMEM 或 RPMI-1640)配成单细胞悬液种于 96 孔板(1×10⁴ 个/孔), 每孔体积 100 μL, 培养 24 h 后加入待测定样品溶液。植物硒固体饮料的粉末用 DMSO 溶解, 以 100 μg/mL 浓度初筛, 每孔终体积为 200 μL, 每种处理均设 3 个复孔。在细胞培养箱中 37 ℃, 5% CO₂ 培养 48 h 后, 吸弃孔内培养液, 每孔加 20 μL MTS 溶液和 100 μL 培养液, 继续孵育 2~4 h。使用多功

表 1 复合富硒植物固体饮料感官评价指标表
Table 1 Sensory evaluation indexes for the compound selenium-enriched plant solid beverage

项目	评价指标			
	优	良	中	差
色泽(25分)	浅黄色, 悦目, 色泽均匀(20~25)	黄色, 色泽较均一(15~20)	深黄色, 色泽不均一(10~15)	色泽完全不相符, 微浑, 失光(<10)
滋味(25分)	口感好, 酸甜可口, 后味绵长(20~25)	口感较好, 后味重(15~20)	口味一般, 苦味厚重, 酸甜适中, 无异味(10~15)	口味稍差, 口感过淡, 酸甜比失调, 有异味(<10)
香气(25分)	香气浓郁协调(20~25)	香气良好, 尚悦怡(15~20)	气味不柔和, 过于浓厚(10~15)	稍有异味或刺激味(<10)
组织形态(25分)	饮料澄清, 组织细腻(20~25)	稍有沉淀, 组织细腻(15~20)	有沉淀物, 并能看到分散的不溶性纤维浓厚(10~15)	底部有大量的沉淀物(<10)

能酶标仪读取 492 nm 波长下各孔光吸收值, 记录结果, 处理数据。

1.2.6 复合富硒植物固体饮料抗氧化活性测定

1.2.6.1 复合富硒植物固体饮料 DPPH 自由基清除力的测定 精确称取复合富硒植物固体饮料的粉末样品, 用无水乙醇配置成浓度梯度的溶液(50、100、200、500、1000 和 2000 $\mu\text{g/mL}$), 取 100 μL 样品溶液, 加入 100 μL 0.2 mol/L DPPH 溶液、立即混匀, 每种处理均设 3 个复孔。室温避光放置 30 min, 使用多功能酶标仪读取 517 nm 波长下各孔光吸收值^[27-28]。设定维生素 C 为阳性对照, 无水乙醇为阴性对照组, 按如下公式计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_s - A_{sb}) / A_b] \times 100$$

式中: A_s 为 DPPH 溶液加入样品后的吸光度值; A_{sb} 为样品本身的吸光度值(不加 DPPH 溶液); A_b 为空白组吸光度值。

1.2.6.2 复合富硒植物固体饮料对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞形态的影响 实验分组: 空白对照组、 H_2O_2 造模组、*N*-乙酰半胱氨酸(NAC)阳性药组和待测定样品组, 每组均设定 3 个复孔。设定复合固体饮料粉末浓度梯度为 5、10、15、20、30 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

实验步骤参考文献[29], 取处于对数生长期且生长状态良好的 LO2 细胞, 消化计数后接种于 24 孔板(4×10^4 个/孔), 每孔体积 500 μL , 培养 24 h 后加入待测定样品。用培养基稀释样品储备液至待测定样品的浓度, 每孔加入 500 μL 样品, 其中空白对照组、 H_2O_2 造模组只加入培养基, NAC 阳性对照组加入 4 mmol/L NAC, 继续培养 24 h。吸弃孔内液体, 用 PBS 润洗两次, 所有组加入 H_2O_2 (1 mmol/L) 作用 30 min。吸除 H_2O_2 , PBS 润洗两次, 每孔加 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 染色 30 min, 室温下避光。每孔用 PBS 润洗两次, 吸除 PBS 后在荧光显微镜下拍照(放大 200 倍), 观察各组 LO2 细胞形态。

1.2.6.3 复合富硒植物固体饮料对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞内活性氧的影响 利用 DCFH-DA 荧光探针法^[30-31] 评价该固体饮料对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞内活性氧影响。

实验分组和细胞培养步骤同上述 1.2.6.2, 设定复合固体饮料粉末浓度梯度为 5、10、15 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 。每组细胞加入 H_2O_2 诱导后, 每孔加入 400 μL 裂解液, 室温下避光摇床孵育 10 min, 将 24 孔板中的裂解液分别加至黑框透明底的 96 孔板的 3 个孔中(100 μL /孔)。采用荧光酶标仪检测细胞内活性氧荧光强度, 激发光波长 488 nm, 发射光波长 520 nm。

1.2.7 复合富硒植物固体饮料镇痛活性的测定 昆明 KM 小鼠, 体重约 18~22 g, 为避免由于性别差异造成的实验误差, 小鼠雌雄各半分成八组, 每组 10 只。动物实验经华中科技大学同济医学院实验动物

伦理委员会批准(批准文号 2021-S748), 实验人员严格遵守动物伦理准则。

设模型组(0.9% NaCl 溶液), 阳性对照组(吗啡溶液 5、1、0.2 和 0.04 mg/kg)^[32-35] 和复合植物固体饮料的高中低三个剂量组(250、50 和 10 mg/kg^[36-37], 标记为 A1、A2 和 A3)。

小鼠在醋酸诱导疼痛模型下会表现出比较明显的扭体反应, 而具有镇痛效果的活性成分则会减少扭体次数^[32-35]。小鼠出现腹部内凹, 躯干与后肢伸张, 臀部高起等行为^[37], 称为一次完整的扭体反应。实验前小鼠禁食不禁水 12 h, 各组小鼠称重。将每只小鼠单独放在铁网笼里独立观察, 腹腔注射不同剂量的待测定样品溶液 30 分钟后, 腹腔注射 0.8% V/V 的醋酸溶液(0.1 mL/10 g), 记录每只小鼠 30 min 内的扭体次数。

镇痛抑制率(%) = [(模型组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 模型组扭体次数] $\times 100$

1.3 数据处理

各组实验数据均以平均值 $\pm$ 方差表示, 采用统计软件 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析并绘图, 两组数据间比较采用 *t* 检验法, * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 和 *** $P < 0.001$ 表示具有显著性差异, ns 表示无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 感官指标

分别从色泽、滋味、香气和组织等四方面综合评定复合富硒植物固体饮料的感官品质, 四个评定项目的权重相同, 综合品评小组 10 人的打分, 该样品感官指标得分均值为 92.15 分。该复合富硒植物固体饮料溶解后呈浅黄色, 色泽均一; 口感好, 酸甜可口, 后味绵长; 澄清透明, 组织细腻; 香气浓郁协调。

2.2 微生物指标

固体饮料中微生物指标的标准值为菌落总数 ≤ 30000 CFU/g, 大肠杆菌 ≤ 900 MPN/kg, 不得检出沙门氏、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌等致病菌。按照微生物检测方法测得该复合富硒植物固体饮料中的菌落数 ≤ 1000 CFU/g, 大肠杆菌 ≤ 40 MPN/kg, 且未检测出相关致病菌, 符合国家标准要求(GB 4789.2-2016、GB 4789.3-2016 和 GB 4789.4-2016)。

2.3 复合富硒植物固体饮料中硒含量测定

以质量浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标, 荧光强度值为纵坐标, 绘制硒溶液标准曲线。硒含量在 0~80 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9999, 回归方程为 $Y = 112.50X - 5.82$ (图 1)。根据湖北省制定的《富有机硒食品硒含量要求》中规定食品中的总硒含量达到 150 $\mu\text{g/kg}$ (固体) 或 75 $\mu\text{g/L}$ (液体), 即可称“富含硒”或“富硒”食品。通过对复合富硒固体饮料的样品进行硒含量检测, 其总硒含量为 540 ± 30.12 $\mu\text{g/kg}$, 符合富硒要求。

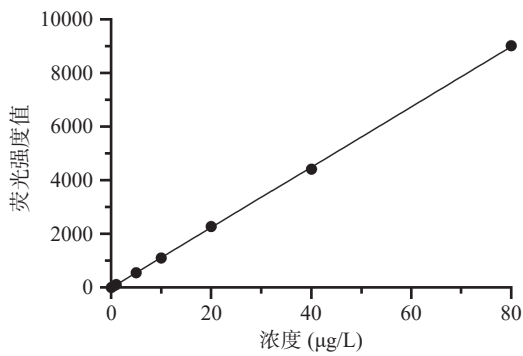


图 1 硒含量标准曲线

Fig.1 Standard curve of selenium content

2.4 复合富硒植物固体饮料抑制肿瘤细胞增殖作用

以细胞抑制率为纵坐标, 顺铂(DDP)和紫杉醇(Taxol)的浓度为横坐标, 绘制细胞的存活率图(图 2), 应用 Reed-Muench 公式计算阳性药的 IC₅₀ 值(表 2), 表明此研究模型成立。

结合植物硒固体饮料组数据可见(图 3), 复方富硒固体饮料在 100 μg/mL 浓度下, 能够促进人正常

肺上皮细胞 BEAS-2B 的增殖, 增长率为 12.56%±1.85%。同时, 该复方富硒固体饮料能够一定程度的抑制肺癌细胞 A-549, 肝癌细胞 SMMC-7721, 乳腺癌细胞 MCF-7 和结肠癌细胞 SW480 的增殖, 抑制率分别为 4.09%±1.36%, 19.48%±3.18%, 30.75%±1.45% 和 18.20%±1.12%, 说明该复合富硒固体饮料能一定程度的体外抑制癌细胞增殖且对正常细胞没有破坏作用。本研究结果表明该类复合固体饮料具有体外的抗肿瘤细胞增殖活性。

2.5 复合富硒植物固体饮料抗氧化作用

2.5.1 复合富硒植物固体饮料 DPPH 自由基清除活性 由图 4 可知, 植物硒固体饮料在 50 μg/mL 浓度下 DPPH 自由基清除率为 32.28%; 在 50~1000 μg/mL 浓度范围时, DPPH 自由基清除率随着样品浓度的升高而升高; 在 1000~2000 μg/mL 间, DPPH 自由基清除率稳定在 90% 以上, 其 IC₅₀ 为 435.6±27.2 μg/mL。该实验结果表明该富硒复合固体饮料样品有一定的 DPPH 自由基清除能力, 并呈现一定的量效关系, 说明该富硒复合固体饮料具有抗氧化作用。

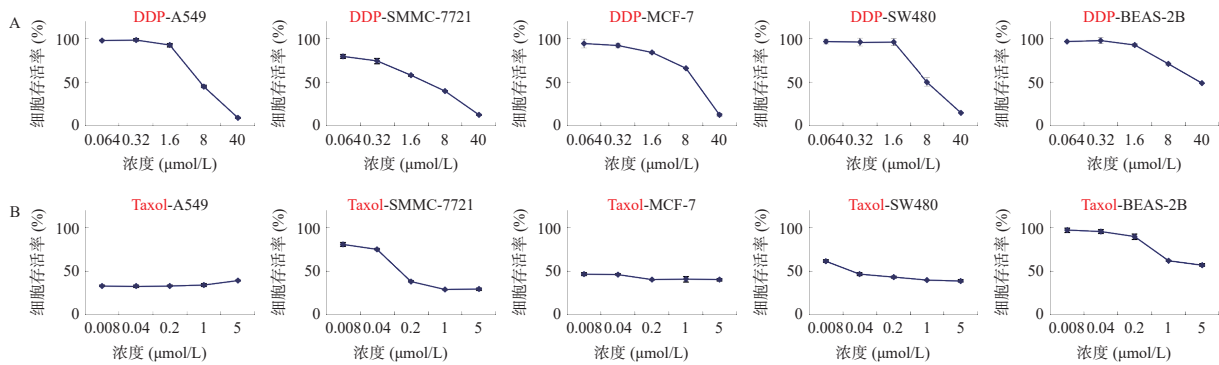


图 2 顺铂(DDP)和紫杉醇(Taxol)对肿瘤细胞和正常细胞的活力影响

Fig.2 Effects of *cis*-platin and taxol on the viability of cancer cell and normal cell lines

表 2 阳性药对 5 种细胞株的生长抑制作用表

Table 2 Inhibition activities of *cis*-platin and taxol of five cell lines

组别/IC ₅₀ (μmol/L)	A-549	SMMC-7721	MCF-7	SW480	BEAS-2B
顺铂(DDP)	20.66±1.02	12.05±1.84	11.97±0.63	11.82±0.47	>40
紫杉醇(Taxol)	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008	>5

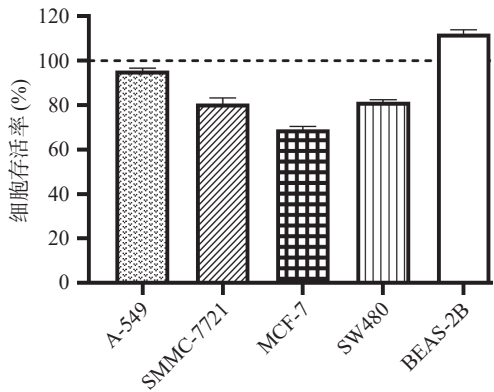


图 3 复合富硒植物固体饮料对癌细胞和正常细胞的活力影响

Fig.3 Effects of compound selenium-enriched plant solid beverage on the viability of cancer cell and normal cell lines

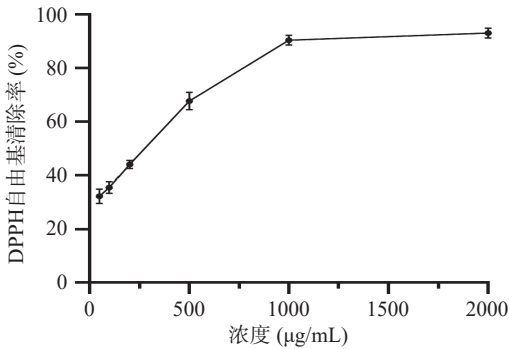


图 4 复合富硒植物固体饮料的 DPPH 自由基清除能力

Fig.4 DPPH radical scavenging ability of the compound selenium-enriched plant solid beverage

2.5.2 复合富硒植物固体饮料对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞形态影响 LO2 细胞用 H_2O_2 造模处理 30 min, H_2O_2 造模组的荧光强度明显强于空白对照组, 说明 LO2 细胞氧化损伤模型造模成功。图 5 为复合富硒固体饮料对 H_2O_2 诱导的 LO2 细胞形态图。植物硒固体饮料样品组的荧光强度均明显低于造模组, 且与空白对照组和 NAC 阳性药组的荧光强度接近, 样品组各浓度之间荧光强度无明显差异, 说明该复合富硒植物固体饮料具有显著的抗氧化活性。

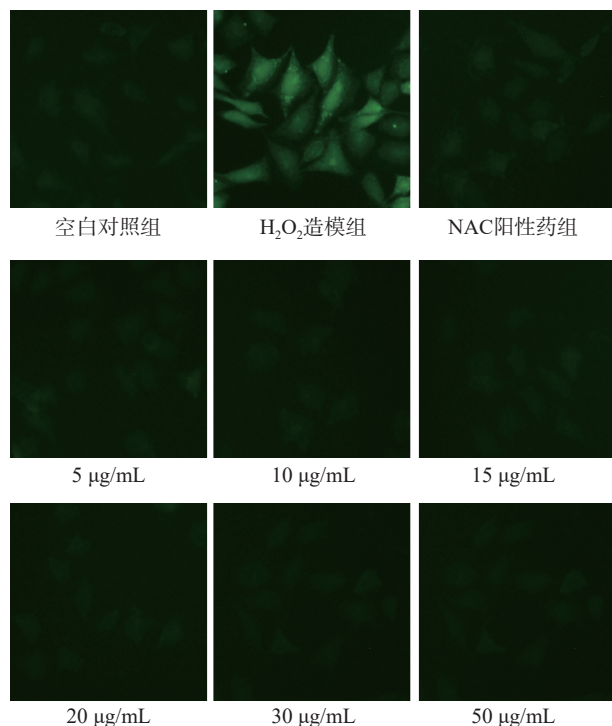


图 5 复合富硒植物固体饮料对 H_2O_2 诱导的 LO2 细胞形态的影响

Fig.5 Effects of the compound selenium-enriched plant solid beverage on morphology of H_2O_2 -induced LO2 cells

2.5.3 复合富硒植物固体饮料对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞内活性氧的作用 DCFH-DA 在细胞内被水解为 2',7'-二氯二氢荧光素 (DCFH), DCFH 在细胞内与活性氧反应生成有荧光的 2',7'-二氯荧光素 (DCF), 由此 DCFH-DA 荧光强度可反映细胞内活性氧水平。如图 6 所示, 植物硒固体饮料实验组在 5、10、15 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 氧化损伤的 LO2 细胞内荧光强度依次减弱, 细胞内活性氧水平依次降低。该固体饮料能逆转 H_2O_2 诱导 LO2 细胞内活性氧水平升高, 具有抗氧化活性。植物硒固体饮料在 20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 其抗氧化活性与阳性药 N-乙酰半胱氨酸 (NAC, 4 mmol/L) 活性相当。实验结果表明该复合富硒固体饮料具有明显的抗氧化活性。

2.6 复合富硒植物固体饮料镇痛作用的研究结果

小鼠在醋酸诱导疼痛模型下会表现出比较明显的扭体反应。统计各实验组数据, 复合富硒固体饮料镇痛作用结果如图 7 所示, 在醋酸诱导的小鼠扭体

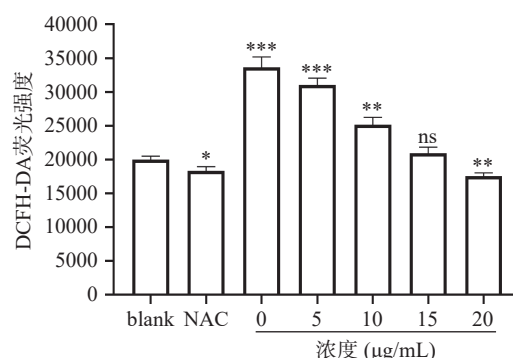


图 6 复合富硒植物固体饮料的活性氧荧光强度

Fig.6 Active oxygen fluorescence intensity of the compound selenium-enriched plant solid beverage

注: 实验组 vs 空白组, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 和 *** $P<0.001$ 表示显著性差异, ns 表示无显著性差异。

实验中, 与模型组相比较, 该复合富硒固体饮料各剂量组 (A1: 250 mg/kg; A2: 50 mg/kg; A3: 10 mg/kg) 均具有显著的镇痛作用 ($P<0.01$), 其镇痛抑制率分别为 92.3%、75.6% 和 67.5%。其中该复方固体饮料的高剂量组 (250 mg/kg) 的效果与阳性药组吗啡 (5 mg/kg) 的效果相当。本研究首次报道该类复合固体饮料的镇痛活性, 研究结果表明该植物硒固体饮料具有显著的镇痛作用。

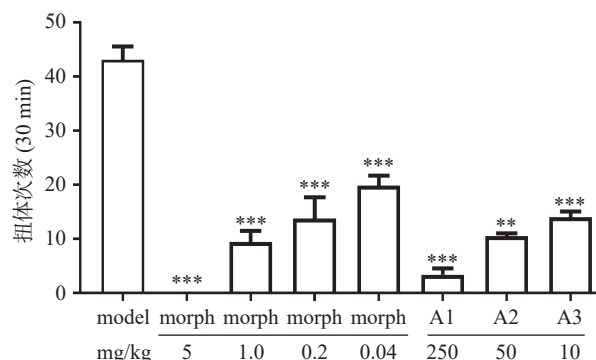


图 7 复合富硒植物固体饮料在醋酸扭体模型中的镇痛作用
Fig.7 Analgesic activities of the compound selenium-enriched plant solid beverage in the writhing model

注: 实验组 vs 模型组, ** $P<0.01$ 和 *** $P<0.001$ 表示显著性差异。

3 结论

本研究以药食同源富硒西兰花、葛根、藤茶、黄精、木瓜和西红柿为原料, 开发一款功能性的复合植物硒固体饮料, 其总硒含量为 $540\pm30.12 \mu\text{g/kg}$ 。该复合植物固体饮料不仅保留了植物原料的香气, 无添加剂, 食用安全, 而且体积小, 携带方便, 符合现代人群的快节奏生活需求。本研究首次对固体饮料类产品的抗肿瘤活性和镇痛活性进行研究, 结果表明此款复合植物硒固体饮料具有一定的体外抗肿瘤活性, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对四种肿瘤细胞株 (A549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW480) 的抑制率范围 4.09%~30.75%。该固体饮料在高剂量组 (250 mg/kg) 具有显著的镇痛作用 ($P<0.001$), 其镇痛抑制率为 92.3%, 其镇痛效果与阳性药吗啡 (5 mg/kg) 的效果相

当。因此,该复合植物硒固体饮料具有广阔的应用价值,本研究结果可为复合富硒植物固体饮料进一步开发奠定基础,为恩施地区药食同源植物资源的综合利用提供了理论依据。但本实验所得数据尚不充分,还需要更多不同的活性评价模型来开展深入研究,且该复合固体饮料的活性机制尚不明确,故对该复合固体饮料的认识还需更充分细致的研究。

参考文献

- [1] VINCETI M, FILIPPINI T, WISE L A. Environmental selenium and human health: An update[J]. *Current Environmental Health Reports*, 2018, 5(4): 464-485.
- [2] KIELISZEK M, BLAZEJAK S. Current knowledge on the importance of Selenium in food for living organisms: A review[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 609.
- [3] 黄韬睿, 郑立新, 雷健, 等. 红心火龙果富硒红茶复合饮料加工工艺[J]. *食品工业*, 2022, 43(5): 25-28. [HUANG T R, ZHENG L X, LEI J, et al. The processing technology of compound beverage with red pitaya and Selenium enriched black tea[J]. *The Food Industry*, 2022, 43(5): 25-28.]
- [4] 张勇胜, 李仁兰, 刘妍, 等. 硒对人体健康作用的研究进展[J]. *内科*, 2018, 13(4): 623-625, 662. [ZHANG Y S, LI R L, LIU Y, et al. Research progress on effects of selenium on human health[J]. *Internal Medicine*, 2018, 13(4): 623-625, 662.]
- [5] 房敏. 慢型克山病与扩张型心肌病患者血液微量元素测定研究[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2018, 6(16): 85. [FANG M. Blood trace element determination study in patients with chronic Creutzfeldt-Jakob disease and dilated cardiomyopathy[J]. *Cardiovascular Disease Electronic Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2018, 6(16): 85.]
- [6] 慧香, 吕晓超, 封雪. 富硒食品中硒元素测定方法对比和创新研究[J]. *食品安全导刊*, 2022, 343(14): 178-180. [HUI X, LÜ X C, FENG X. Comparative and innovative study on determination methods of selenium in selenium rich foods[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022, 343(14): 178-180.]
- [7] EBRAHIMI N, HARTIKAINEN H, HAJIBOLAND R, et al. Uptake and remobilization of selenium in *Brassica napus* L. plants supplied with selenate or selenium-enriched plant residues[J]. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*, 2018, 182(2): 196-202.
- [8] 黄亚涛, 雷宁宇, 范蓓, 等. 硒对农产品营养品质的影响[J]. *农产品质量与安全*, 2021, 110(2): 80-87. [HUANG Y T, LEI N Y, FAN B, et al. Effect of selenium on nutrient quality of agricultural products[J]. *Quality and Safety of Agro-Products*, 2021, 110(2): 80-87.]
- [9] 陈洋洋, 程水源. 世界硒都—湖北恩施硒加工企业发展现状与对策研究[J]. *科技促进发展*, 2021, 17(10): 1851-1857. [CHEN Y Y, CHEN S Y. Research on the development status and countermeasures of Selenium processing enterprises in Enshi prefecture (Known as the selenium capital of the world), Hubei province[J]. *Science & Technology for Development*, 2021, 17(10): 1851-1857.]
- [10] 王宏达, 孙萍, 李晓丹, 等. 西兰花热风干燥特性及品质研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(1): 182-189. [WANG H D, SUN P, LI X D, et al. Study on hot air drying characteristics and quality of *Brassica oleracea* L. var *italica* Planch[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(1): 182-189.]
- [11] 南占东, 于斌武, 赵静, 等. 恩施富硒西兰花产品营养成分分析[J]. *中国果蔬*, 2020, 40(9): 46-48, 55. [NAN Z D, YU B W, ZHAO J, et al. Nutrient analysis of products develop with selenium-rich broccoli in Enshi[J]. *China Fruit & Vegetable*, 2020, 40(9): 46-48, 55.]
- [12] 南占东, 赵静, 杨新旋, 等. 葛的有效成分及功能食品开发探讨[J]. *南方农业*, 2021, 15(1): 12-15. [NAN Z D, ZHAO J, YANG X X, et al. Discussion on the effective ingredients and functional food of *Pueraria lobate*[J]. *South China Agriculture*, 2021, 15(1): 12-15.]
- [13] LI Y, KUMAR P S, TAN S Q, et al. Anticancer and antibacterial flavonoids from the callus of *Ampelopsis grossedentata*; A new weapon to mitigate the proliferation of cancer cells and bacteria[J]. *RSC Advances*, 2022, 12: 24130-24138.
- [14] 袁名远, 刘玉, 黄东海, 等. 响应面优化复合藤茶固体饮料研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(8): 96-103. [YUAN M Y, LIU L, HUANG D H, et al. Optimization of compound *Ampelopsis grossedentata* solid beverage by response surface methodology[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(8): 96-103.]
- [15] 王丹丹. 西红柿黄瓜胡萝卜复合饮料的研制[J]. *太原师范学院学报(自然科学版)*, 2019, 18(4): 93-96. [WANG D D. Preparation of compound beverage of tomato cucumber and carrot[J]. *Journal of Taiyuan Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 18(4): 93-96.]
- [16] 彭祚全. 恩施州富有机硒食品现状及评价[J]. *微量元素与健康研究*, 2018, 35(2): 45-46, 48. [PENG Z Q. Status and evaluation of selenium-rich foods in Enshi Prefecture[J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2018, 35(2): 45-46, 48.]
- [17] 辛二旦, 张爱霞, 司昕蕾, 等. 植物饮品保健作用探究进展[J]. *中兽医医药杂志*, 2018, 37(5): 94-96. [XIN E D, ZHANG A X, SI X L, et al. Progress in research on health function of plant beverages[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2018, 37(5): 94-96.]
- [18] 胡婷, 吴文良, 赵桂慎, 等. 我国富硒农产品及食品标准体系发展与展望[J]. *中国标准化*, 2019, 547(11): 136-144. [HU T, WU W L, ZHAO G S, et al. Development and prospect of selenium-enriched agricultural products and food standards in China[J]. *China Standardization*, 2019, 547(11): 136-144.]
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 4789.2-2016 National food safety standard food microbiology test in detection of aerobic bacterial counts[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 4789.3-2016 National food safety standard food microbiology test in enumeration of coliforms[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 4789.4-2016 National food safety standard microbiology test in food-Cronobacter testing[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [22] 廖彪. 紫阳县双安镇玉米硒含量测定及安全性分析[J]. *陕西农业科学*, 2018, 64(4): 16-18. [LIAO B. Selenium content determination and safety analysis of maize in Shuang'an Town of Zichang[J]. *Shaanxi Agricultural Science*, 2018, 64(4): 16-18.]

- yang County[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2018, 64(4): 16–18.]
- [23] ZHENG G J, KADIR A, ZHENG X F, et al. Spirodesertols A and B, two highly modified spirocyclic diterpenoids with an unprecedented 6-isopropyl-3*H*-spiro[benzofuran-2,1'-cyclohexane] motif from *Salvia deserta*[J]. *Organic Chemistry Frontier*, 2020, 7: 3137–3145.
- [24] ZHENG X F, KADIR A, ZHENG G J, et al. Antiproliferative abietane quinone diterpenoids from the roots of *Salvia deserta* [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 104: 104261.
- [25] KADIR A, ZHENG G J, ZHENG X F, et al. Structurally diverse diterpenoids from the roots of *Salvia deserta* based on nine different skeletal types[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84: 1442–1452.
- [26] ZHANG H Q, PENG X, ZHENG X F, et al. Lanostane triterpene glycosides from the flowers of *Lyonia ovalifolia* var. *hebecarpa* and their antiproliferative activities[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 96: 103598.
- [27] 白莉, 王辉敏, 李冠文, 等. 参芪复合固体饮料工艺优化、质量评价及体外抗氧化活性研究[J]. *现代食品*, 2021(24): 109–116, 120. [BAI L, WANG H M, LI G W, et al. Study on optimization and quality evaluation of shenqi compound solid beverage and its antioxidant activities[J]. *Modern Food*, 2021(24): 109–116, 120.]
- [28] 蒋雨心, 邓岚, 范方宇. 鱼腥草根总黄酮超声辅助酶法提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 277–235. [JIANG Y X, DENG N, FAN F Y. Ultrasonic assisted extraction process of flavonoids from *Houttuynia cordata* Thund and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(6): 277–235.]
- [29] 王碧雪, 祝雅雯, 何庆, 等. 袋鼠皮多肽对 H₂O₂ 诱导人肝细胞 LO2 氧化损伤的影响[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2019, 58(5): 701–706. [WANG B X, ZHU Y W, HE Q, et al. Effect of kangaroo skin peptide on the oxidative damage of human hepatocyte LO2 cells induced by H₂O₂[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2019, 58(5): 701–706.]
- [30] 胡海涛, 钱婷婷, 杨玲. 基于 H2DCFDA 荧光探针的植物活性氧检测方法[J]. *植物学报*, 2022, 57(3): 320–326. [HU H T, QIAN T T, YANG L. Detection of relative oxygen species using H2DCFDA probe in plant[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(3): 320–326.]
- [31] OPARKA M, WALCZAK J, MALINSKA D, et al. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and hyPer[J]. *Methods*, 2016, 109: 3–11.
- [32] FENG Y Y, ZHA S Q, ZHANG H Q, et al. Rhodauricanol A, an analgesic diterpenoid with an unprecedented 5/6/5/7 tetracyclic system featuring a unique 16-oxa-tetracyclo [11.2. 1.0^{1,5}. 0^{7,13}] hexadecane core from *Rhododendron dauricum*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2023, 34: 107742.
- [33] HUANG L, ZHENG G J, FENG Y Y, et al. Highly oxygenated dimeric grayanane diterpenoids as analgesics; TRPV1 and TRPA1 dual antagonists from *Rhododendron molle*[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2022, 40: 2285–2295.
- [34] JIN P F, YUAN X H, MA X M, et al. Epoxymicranthols A–N, 5, 9-epoxygrayanane diterpenoids as potent analgesics from *Rhododendron micranthum*[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2021, 39: 1997–2008.
- [35] FENG Y Y, ZHA S Q, GAO B, et al. Discovery of kalmene diterpenoids as potent analgesics from the flowers of *Rhododendron dauricum*[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2022, 40: 1019–1027.
- [36] 胡然, 庠宝善, 朱素君, 等. 贯叶连翘提取物和盐酸赖氨酸复方的镇痛作用研究[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(26): 3600–3601. [HU R, KU B S, ZHU S J, et al. Study of analgesic effect of the complex of *Hypericum perforatum* L. extract and lysine hydrochloride[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2003, 7(26): 3600–3601.]
- [37] 黄玉香, 徐先祥, 陈剑雄, 等. 七叶莲果实的抗炎镇痛作用研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 397–398, 402. [HUANG Y X, XU X X, CHEN J X, et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effect of the fruit of *Scheffera arboricola* Hayata in experimental animal models[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(24): 397–398, 402.]