

响应面法优化超声波提取槟榔多糖工艺及其抗炎活性

唐敏敏 陈 华 李 瑞

(中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339)

摘 要:采用响应面组合设计优化超声波提取未成熟的槟榔籽多糖的工艺。结果表明,提取功率、提取液料比和提取时间均能显著影响槟榔多糖的得率,且在预测的最佳工艺参数(提取功率 630 W,提取液料比 20.76 mL/g,提取时间 501s)条件下,槟榔多糖的实际提取率为 $(3.3206\pm0.0099)\%$ 。另外,槟榔多糖可以抑制脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞(RAW 264.7)内一氧化氮的生成,其 IC_{50} 为 85.64 $\mu\text{g/mL}$,说明槟榔多糖具有一定的抗炎潜力。

关键词: 槟榔多糖;超声波提取;抗炎

中图分类号 R284.1 文献标识码 A 文章编号 1007-7731(2019)09-0021-5

DOI:10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2019.09.009

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Areca Nut Polysaccharides based on Response Surface Methodology and Anti-inflammatory Activity

Tang Minmin et al.

(Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang 571339, China)

Abstract: This study determined the optimal conditions for ultrasound-assisted extraction of a polysaccharide, Areca nut polysaccharide, from the seed of Areca nut using response surface methodology. The optimal extraction ultrasonic power, ratio of liquid to raw material, and extraction time were 630W, 20.76 mL/g and 503s, respectively, giving a yield of $(3.3206\pm0.0099)\%$. The result showed that Areca nut polysaccharide inhibited NO production in lipopolysaccharide (LPS) treated RAW 264.7 cells with a dose-dependent manner. The IC_{50} value was 85.64 $\mu\text{g/mL}$, which indicated that areca nut polysaccharide had anti-inflammatory potential.

Key words: Areca nut polysaccharide; Ultrasound-assisted extraction; Anti-inflammatory activity

槟榔是棕榈科植物槟榔(*Areca catechu* L.)的果实,可食用、亦可药用。槟榔作为海南省第一大热作经济作物^[1],其产量占全国总产量的95%以上,且绝大部分用作食用槟榔产业的原料。然而,2003年8月7日国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)在其特别刊物第85卷中认定槟榔为一级致癌物,指出常嚼槟榔会造成口腔黏膜下纤维化,这是导致口腔癌病变的主要原因。从此,海南槟榔种植产业经常被“致癌”风波严重影响经济效益。

槟榔为我国“四大南药”之首,在我国中医药中的应用已超过1000年。据不完全统计,国内外共有225个药品采用槟榔作为原料,其中,2015年版《中华人民共和国药典》录入了槟榔、焦槟榔、大腹壳等3味槟榔药材,外加木香槟榔丸、槟榔四消丸(大蜜丸和水丸)等3味以槟榔为主要原料的成方制剂^[2]。现代研究表明,槟榔含有多种活性成分,如槟榔油、生物碱、多酚、鞣质等物质,具有抗氧化、缓解疲劳^[3]、改善肠胃功能^[4]、治疗糖尿病^[5,6]、促进神经兴奋^[7]、预防癌症^[8]、保护血管^[9]、抑制破骨基因表达^[10]

等多种生理活性。因此,槟榔具有较高的保健和药用价值。但目前,我国槟榔加工技术水平仍处于初级加工阶段,缺乏高附加值产品,严重影响了槟榔产业的健康可持续发展。

多糖是广泛存在于动物、植物、微生物中的一类碳水化合物,因其具有独特的物理化学特性和生物活性,越来越受到人们的关注和重视。迄今为止,大量研究结果表明,多糖具有广泛的药理活性^[11]。

目前,有关槟榔活性成分的研究主要集中于生物碱、多酚、色素等方面,而多糖方面则鲜见报道。本课题组前期研究结果表明,槟榔多糖粗提物(ASP)具有良好的体外的抗氧化活性,并可以抑制人皮肤成纤维细胞(HSF)内氧化损伤^[12]。本研究拟通过响应面法确定了槟榔多糖的最佳提取工艺,了解其对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞(RAW 264.7)产生一氧化氮(NO)的抑制作用,以期为槟榔的精深加工和海南槟榔产业绿色转型继续提供理论支撑。

基金项目: 海南省自然科学基金项目(20163154);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项项目(1630152017017)。

作者简介: 唐敏敏(1984—),女,山东泰安人,硕士,副研究员,研究方向:功能性食品。

收稿日期: 2019-03-25

1 材料

1.1 原料 5月龄左右的槟榔鲜果,采自中国热带农业科学院椰子研究所科研基地。清洗后晾干,取种子冷冻干燥,粉碎备用。

1.2 细胞系 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW 264.7)细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.3 培养基 高糖DMEM培养基:含4500mg/L D-葡萄糖、584mg/L L-谷氨酰胺、3700mg/L碳酸氢钠、10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素,pH值7.0~7.4。

2 实验方法

2.1 槟榔多糖的超声波提取 工艺流程如下:新鲜槟榔→去壳→冷冻干燥→粉碎→石油醚浸泡→过滤,挥干有机溶剂→蒸馏水浸泡→冰浴超声波提取→离心→乙醇沉淀→水复溶→冷冻干燥→槟榔粗多糖。分别称取2.00g槟榔籽粉末,以水作为溶剂,按照不同的提取超声功率、不同提取时间以及不同液料比进行冰浴-超声波提取,将提取液离心,其残渣按照同样的超声提取条件重复提取1次,合并提取液。将提取液进行旋转蒸发浓缩,向浓缩后的多糖溶液中加入4倍体积的95%乙醇,静置过夜,离心得到析出的多糖,然后将沉淀加水复溶得到多糖提取物的水溶液。向提取物水溶液中加入1/5体积的sevage试剂,混合震荡,除去有机层,重复3~4次,直至水相和有机相之间没有白色乳状层为止。待水相冷冻干燥,即得槟榔粗多糖,称重后,溶解到一定体积的蒸馏水中,备用。

2.2 苯酚-硫酸法检测多糖含量 精确移取系列浓度标准无水葡萄糖溶液(0、8、16、24、32、40、48μg/mL)各2mL,分别加入6%苯酚溶液1.00mL,摇匀后迅速加入5.00mL浓硫酸,混匀,1~2min后于沸水液中加热15min,取出放入冰水浴冷却15min,于485nm下测定吸光度。以吸光度为纵坐标,对应葡萄糖溶液浓度为横坐标进行线性回归,绘制标准曲线。

2.3 槟榔多糖样品含量及得率的计算 取一定的槟榔多糖溶液,按照2.2中的操作方法于485nm出测定其吸光值,代入回归方程及以下公式,即可算出槟榔中多糖的提取率。

多糖得率(%)=C×N×V/10⁶/W×100

式中:C为多糖溶液的浓度(μg/mL);V为多糖溶液体积(mL);N为测定时多糖溶液的稀释倍数;W为槟榔粉末质量(g)。

2.4 超声波辅助提取法提取槟榔多糖单因素实验

2.4.1 超声波功率 准确称取干燥的槟榔粉末2.00g于100mL烧杯中,分别加入40mL蒸馏水后,依次采用270W、360W、450W、540W、630W提取多糖,提取360s。得到粗多糖溶液,去除蛋白,冷冻干燥,复溶,测定多糖含量,计算得率。

2.4.2 液料比 准确称取干燥的槟榔粉末2.00g于10mL烧杯中,分别加入20mL、30mL、40mL、50mL、60mL的蒸馏水后,采用540W的提取功率,提取多糖360s,得到粗多糖溶液,去除蛋白,冷冻干燥,复溶,测定多糖含量,计算得率。

2.4.3 提取时间 准确称取干燥的槟榔粉末2.00g于100mL烧杯中,分别加入40mL蒸馏水后,采用540W的提取功率,依次提取多糖120、240、360、480、600s。得到粗多糖溶液,去除蛋白,冷冻干燥,复溶,测定多糖含量,计算得率

2.4.4 响应面设计 以单因素试验结果为基础,每个因素选择3个影响较大的水平,以槟榔多糖提取量为响应值,建立3因素3水平中心组合试验,各因素3个水平采用-1,0,1进行编码。超声波破碎法提取槟榔多糖因素与水平设计见表1。

表1 超声破碎法提取槟榔多糖因素与水平设计

因素	代用符号	水平		
		-1	0	1
提取功率(W)	X ₁	450	540	630
提取液料比(mL/g)	X ₂	15	20	25
提取时间(s)	X ₃	360	480	600

2.5 槟榔多糖的抗炎作用研究

2.5.1 细胞培养 RAW264.7细胞复苏后,采用含10%胎牛血清、1%的青霉素-链霉素双抗的DMEM培养液,置于37℃,5%CO₂的培养箱中培养。换液后待细胞生长融合度达到70%~80%即可进行传代。根据不同实验要求,将单细胞悬液稀释至需要的浓度接种至孔板中,或分装到培养皿中继续培养传代。

2.5.2 RAW264.7细胞存活率 将100μL密度为5×10⁴个/mL的细胞接种于96孔板中,37℃,5%二氧化碳浓度,培养过夜,加入不同浓度的槟榔多糖,每个浓度至少3个平行。放回细胞培养箱中孵育24h后,每孔加入5mg/mL的MTT溶液20μL,继续孵育2h后,取出96孔板。吸出上清,每孔加入200μLDMSO,待甲臞结晶充分溶解后,用酶标仪于495nm波长测量吸光度。计算公式如下:

存活率(%)=加药孔OD值/对照孔OD值×100

2.5.3 LPS诱导的RAW264.7细胞产生的一氧化氮含量 将100μL密度为5×10⁵个/mL的细胞接种于96孔板中,过夜培养,实验组加入LPS(终浓度为1μg/mL)培养1h后,继续加入不同浓度的槟榔多糖溶液,正常组不做任何处理,只加LPS的用作阴性对照。孵育24h后,取出96孔板,然后从96孔板各孔中分别取出各组细胞上清液50μL,转移至新的96孔板并向所有孔中分别加入50μL Griess试剂(25g/L),室温下反应10min,用酶标仪于570nm波长测量吸光度。计算公式如下:

NO抑制率(%)=加药孔OD值/阴性对照孔OD值×100

3 结果与分析

3.1 槟榔多糖的含量 采用苯酚—硫酸法检测槟榔多糖的含量,其葡萄糖标准液的标准曲线如图1所示。由图1可知,在该试验和仪器条件下,吸光度和质量浓度的关系为 $Y=0.0088X+0.0251$, $R^2=0.9951$ (Y为吸光度,X为标准溶液质量浓度,mg/L)。

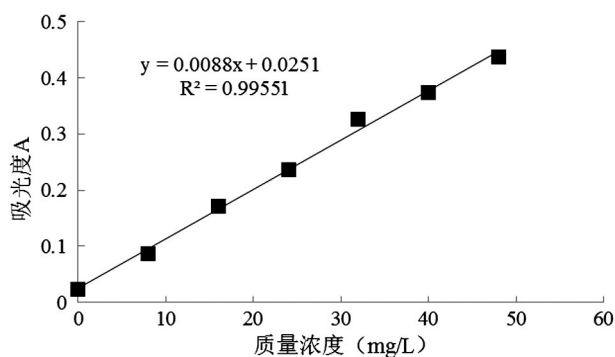


图1 葡萄糖标准液的标准曲线

3.2 超声波辅助提取法工艺条件对提取槟榔多糖得率的影响 目前,超声波提取技术已广泛应用于对各种食品和中药等原料中的有效成分的提取中^[13]。超声功率、温度、时间、溶剂类型、溶液浓度、料液比、颗粒大小等工艺条件是超声波提取工艺过程中主要考察的因素^[14]。本试验考察了超声功率、时间和液料比对槟榔多糖得率的影响,结果如图2所示。由图2可知:当提取功率为270~540W时,槟榔多糖的提取率逐渐增加,并达到最大值。因为超声波产生的物理效应,促使细胞壁破碎,加快多糖的溶出。在提取超声功率达到540W时,槟榔多糖的提取率达到最大,之后功率进一步增加,但是提取率却减少,这可能是由于随着超声波功率的加大,空化作用和机械作用加大,引起了多糖物质的结构破坏。因此,选定540W为最优提取超声功率。液料比也是影响活性物质提取率的重要因素。当液料比从15mL/g增加到20mL/g时,槟榔多糖提取率逐渐升高,原因可能是溶剂过少时,不利于多糖的溶出。当液料比从20mL/g增加到35mL/g时,槟榔多糖提取率基本无变化,说明多糖的溶出与损耗已经达到一定的平衡。综合考虑浓缩时间和耗费的成本,最适宜的料液比为20mL/g。提取时间方面,随着提取时间的延长,槟榔多糖提取率呈先增大后降低的趋势,当提取时间达到480s时,槟榔多糖的得率达到最大值;当提取时间超过480s时,槟榔多糖的提取率开始降低。因此,最适提取时间为480s。

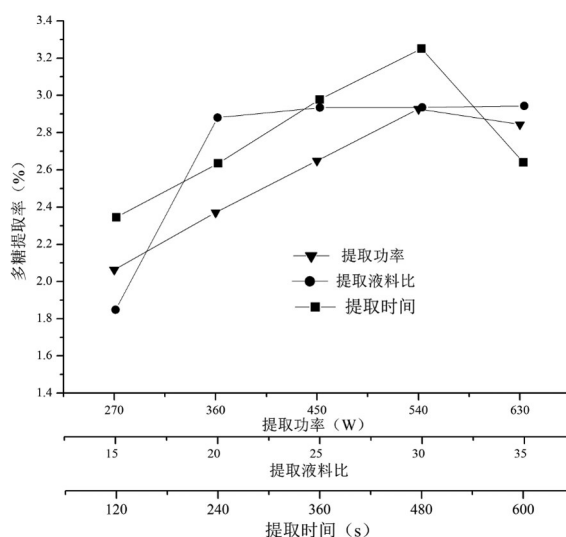


图2 不同单因素对槟榔得率的影响

3.3 响应面试验结果

3.3.1 响应值结果及其拟合模型 依据 Box-Behnken 中心组合设计原理,在单因素实验结果的基础上,以超声时间 X_1 ,超声温度 X_2 ,液料比 X_3 3个因素为自变量,槟榔多糖得率 $Y(\%)$ 为响应值,采用 Design Expert 8.0.6 软件做3因素3水平响应面分析试验设计,共17个实验点,响应面试验结果如表2。对表2数据进行分析,得到了可以描述槟榔多糖得率 Y 与3个自变量的数学模型方程,如下所示: $Y=3.28+0.29X_1+0.039X_2+0.068X_3+0.023X_1X_2-0.005X_1X_3+0.036X_2X_3-0.26X_1^2-0.23X_2^2-0.19X_3^2$ 。

表2 响应面中心组合试验实验设计方案与结果

序号	提取功率 (X_1 , W)	提取液料比 (X_2 , mL/g)	提取时间 (X_3 , s)	多糖得率 (Y , %)
1	450	15	480	2.5028
2	630	15	480	3.0295
3	450	25	480	2.5077
4	630	25	480	3.1273
5	450	20	360	2.4491
6	630	20	360	3.0297
7	450	20	600	2.6297
8	630	20	600	3.1907
9	540	15	360	2.7900
10	540	25	360	2.8199
11	540	15	600	2.8199
12	540	25	600	2.9956
13	540	20	480	3.2590
14	540	20	480	3.2737
15	540	20	480	3.3224
16	540	20	480	3.2444
17	540	20	480	3.2834

由表3可知,回归模型极显著($P<0.0001$)、失拟不显著($P=0.3691$),说明未知因素对实验结果影响很小,预测

的回归模型与实验结果拟合得较好。而且预测模型的 $R^2=0.9951$,说明多糖提取率的实验值与预测值之间一致性较好,该模型的变异系数 $CV=0.49\%<5\%$,校正系数 $R^2_{Adj}=0.9887$,说明预测的模型能反映98.87%响应值的变化,因此通过回归方程能够预测并分析实验真实数据。通过表3中的方差分析结果可知,各单因素对槟榔提取率影响显著,其影响大小顺序为提取功率>提取时间>液料比,而单因素之间的交互作用对提取率的影响不显著($P>0.05$)。

表3 回归方程方差分析

变异来源	平方和SS	自由度	均方(MS)	F值	P值
模型	1.44	9	0.16	157.02	<0.0001
X_1 -提取功率	0.65	1	0.65	641.51	<0.0001
X_2 -提取液料比	0.012	1	0.012	11.64	0.0113
X_3 -提取时间	0.037	1	0.037	36.68	0.0005
X_1X_2	0.002	1	0.002	2.12	0.1889
X_1X_3	0	1	0	0.093	0.7689
X_2X_3	0.0053	1	0.005	5.2	0.0565
X_2 1	0.28	1	0.28	275.12	<0.0001
X_2 2	0.22	1	0.22	211.99	<0.0001
X_2 3	0.16	1	0.16	154.76	<0.0001
残差	0.007	7	0.001		
失拟项	0.004	3	0.001	1.38	0.3691
纯误差	0.004	4	0.001		
总值	2.8213	32			

3.3.2 响应面图形 通过Box-Behnken实验得到的多元回归模型所作的响应曲面图见图3,响应面图能够直观地反映各因素之间的交互关系,曲面越陡峭,说明该因素对响应值的影响越显著,从图中的等高线密集程度可看出对产率的影响,越密集说明影响越显著,越稀疏表明影响越小。可见,提取功率所对应的曲面最为陡峭,提取时间所对应的曲面最为平滑,这说明提取功率对槟榔多糖提取率的影响最显著,提取液料比的影响最小。

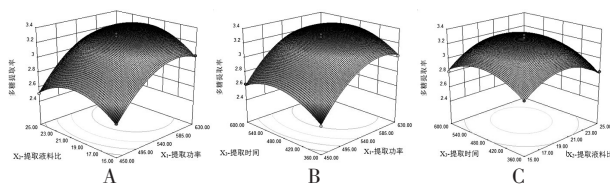


图3 响应曲面

3.3.3 最优提取条件的预测及结果合理性验证 对进一步分析,得到超声波提取槟榔多糖的最优参数是:提取功率630W,提取液料比20.76mL/g,提取时间501.34s,预测槟榔多糖提取率为3.3147%。为了实际操作方便,理论优化条件优化为提取功率630W,提取液料比20.76mL/g,提取时间501s,在此条件下,进行3组实验,槟榔多糖实际提取率为 $(3.3206\pm 0.0099)\%$,说明响应面法优化得到的工艺参数是可靠的。

3.4 槟榔多糖对RAW264.7细胞存活率的影响 如图4所示,槟榔多糖在20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 5个浓度剂量下,单独作用处理24h后,与正常对照组相比,对小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7存活率无显著影响($P<0.05$),这表明在此浓度范围内,槟榔多糖对细胞无毒性作用。

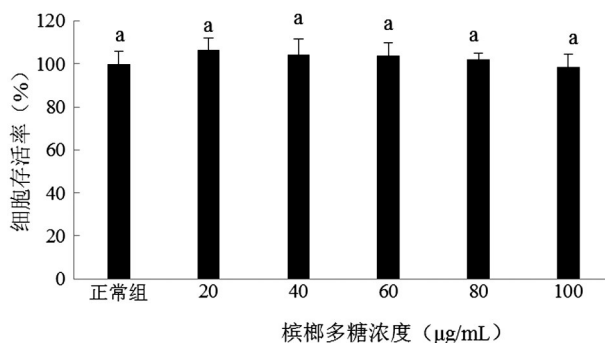


图4 不同浓度槟榔多糖对RAW264.7细胞存活率的影响

3.5 槟榔多糖对LPS诱导的RAW264.7细胞产生的一氧化氮含量的影响 炎症是机体对致炎物质的刺激产生的防御性反应^[15]。脂多糖诱导的巨噬细胞RAW264.7已被广泛用于各种物质的抗炎作用评价^[16]。由图5可知,在20~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,槟榔多糖有较好的抑制小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7产生NO的作用,并随多糖浓度升高,其抑制NO分泌作用增强,即在实验测定范围内,槟榔多糖对细胞模型内NO的抑制作用具有浓度依赖性;绘制质量浓度-抑制率曲线,经计算得半数抑制浓度(IC_{50})为85.64 $\mu\text{g/mL}$ 。

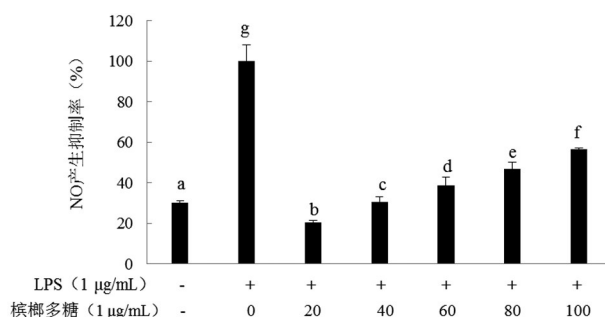


图5 不同浓度槟榔多糖对LPS处理的RAW264.7细胞NO抑制率

4 结论

超声波在多糖提取过程中,利用空化作用和机械效应破坏生物细胞壁,加速浸提物的溶出,从而提高了多糖得率^[17]。本试验得到了超声波提取槟榔多糖的最佳工艺条件,即提取功率630W,提取液料比20.76mL/g,提取时间501s。在此条件下,槟榔多糖实际提取率为 $(3.3206\pm 0.0099)\%$ 。并且对槟榔多糖的抗炎活性进行了初步筛选,结果表明,在20~100 $\mu\text{g/mL}$,槟榔多糖对RAW264.7无毒副作用,且对LPS诱导的NO产生具有一定的抑制作用。

参考文献

- [1]张岩松,许启泰. 槟榔安全性简析[J]. 食品安全导刊, 2017, 3: 153-154.
- [2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北(下转74页)

