

海南槟榔提取物急性毒性研究 及保健饮料开发^①

刘月丽^{1)②} 刘让如¹⁾ 陈 良¹⁾

虞道锐²⁾ 任 瑞²⁾ 刘 辉²⁾ 易西南^{2)③}

(1 海南医学院药学院 海南海口 571199;

2 海南医学院理学院 海南海口 571199)

摘 要 研究海南槟榔提取物的急性毒性及保健饮料的开发。一次性灌胃给予小鼠最大容积和最大混悬浓度的槟榔提取物, 观察小鼠急性毒性反应, 评价槟榔提取物的安全性; 正交设计法优化得出槟榔提取物、白砂糖和柠檬酸的最佳配方; 用不同用量的阿拉伯胶、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠作为稳定剂, 评价最佳稳定剂。14 d 内, 小鼠外观、精神、行为无异常, 槟榔提取物最大给药量为 5.0 g/kg; 槟榔饮料的最佳配方为槟榔提取物添加量 0.2%, 柠檬酸添加量 0.05%, 白砂糖添加量 10%, 槟榔饮料的最佳稳定剂为 0.2% 的阿拉伯胶。槟榔提取物安全性高, 槟榔保健饮料具有槟榔的淡香味, 适合大众口味。

关键词 槟榔; 急性毒性; 保健饮料

中图分类号 S59 **文献标志码** A **Doi**: 10.12008/j.issn.1009-2196.2016.11.020

Research on Acute Toxicity Testing and Preparation of Functional Health Beverage of Betel Nut Extract Cultivated in Hainan Island

LIU Yueli¹⁾ LIU Rangru¹⁾ CHEN Liang¹⁾

YU Daorui²⁾ REN Rui²⁾ LIU Hui²⁾ YI Xinan²⁾

(1 School of Pharmacy, Hainan Medical College, Hainan Province, Haikou, 571199;

2 School of Science, Hainan Medical College, Hainan Province, Haikou, 571199)

Abstract To study acute toxicity and preparation of functional health beverage of betel nut extract cultivated in Hainan Island; Betel nut extract was given to mice in the maximum volume and concentration, the response of mice was observed within 14 days to evaluate safety of betel nut extract. Orthogonal experimental design was employed to optimize the preparation of betel nut extract, white granulated sugar and citric acid and then the best stabilizer was figured out among different dose of arabic gum, sodium carboxymethyl cellulose and sodium alga acid. Mice did not show abnormal response to betel nut extract in appearance, consciousness, and behavior within 14 days, the maximum dose of betel nut extract was 5.0 g/kg. Optimized preparation of functional health beverage of betel nut extract was 0.2% betel nut extract, 0.05% citric acid and 10% white granulated sugar. 0.2% arabic gum was the best stabilizer. Betel nut extract is safe and functional health beverage of it posses light smell of betel nut and is suitable to be consumed among population.

Keywords Betel nut; Acute toxicity; Functional health beverage

① 基金项目: 海南省重点科技计划项目, 海南槟榔抗衰老、抗动脉粥样硬化成份提取与鉴定及保健饮料研发(No. ZDXM20120050)。

收稿日期: 2016-07-21; 责任编辑/白 净; 编辑部 E-mail: rdnk@163.com。

② 刘月丽(1980~), 女, 副教授, 药理学硕士, 主要研究方向为心血管药理学, E-mail: lyl20041981@126.com。

③ 通讯作者: 易西南(1962~), 男, 教授, 解剖学博士, 主要研究方向为周围神经损伤修复, E-mail: 1272791897@qq.com。

槟榔是四大南药之首,在海南广泛种植,槟榔提取物富含多酚,能清除氧自由基,长期应用可以减少肠道脂肪的吸收,是中医常用的驱虫、消积药物。因其食用和药用价值,槟榔已得到广泛的应用。研究发现,长期咀嚼槟榔可以导致口腔黏膜下纤维性变、免疫抑制以及神经、生殖毒性等,限制了槟榔的使用^[1];槟榔保健饮料前期已有报道,主要以槟榔鲜果或槟榔花为主要原料制备^[2-3]。本研究采用乙醇浸泡、过滤,获得槟榔提取物,评价其急性毒性,并以安全性较高的槟榔提取物为主要原料,开发槟榔保健饮料,拓宽槟榔的使用范围。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

健康雄性昆明种小鼠 40 只,体重 18~22 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2013-0002。

槟榔鲜果,采至海南万宁后安镇,柠檬酸、白砂糖均为食用级,阿拉伯胶、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠为药用级。

1.1.2 设备及仪器

Anke TDL80-2B 型离心机,Phenix UV1800PC 型紫外可见分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 槟榔提取物的制备

将槟榔鲜果洗净,切开,40℃烘干,粉碎。称取槟榔粉末 20 g,按料液体积比 1:10、1:8、1:6 加 80%乙醇冷浸 3 d,提取 3 次,过滤,合并滤液,定容至 500 mL,得槟榔 80%乙醇提取物溶液。旋蒸,冷冻干燥,得槟榔提取物。

1.2.2 槟榔提取物急性毒性实验

槟榔提取物用 0.5%羧甲基纤维素钠混悬,得最大浓度混悬液(0.1 g/mL 合生药量 0.125 g/mL)。取小鼠 20 只,灌胃给予最大剂量(40 mL/kg)槟榔提取物,观察 1 周,未见死亡,故按最大耐受量进行试验。小鼠分为 2 组,给药组 and 对照组,每组 20 只。禁食 12 h 后,给药组按最大容积灌胃给予槟榔提取物的混悬液 1 次,对照组给予等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠,给药后观察小鼠急性毒性反应,记录

动物的外观、行为活动、精神状态、摄食、大小便及其颜色、被毛、肤色、呼吸、鼻、眼、口腔有无异常分泌物,体重变化以及死亡等情况,给药后连续观察 4 h。其后每天固定时间观察 1 次,连续观察 14 d。给药后第 7 天、第 14 天称重,末次称重后,脱颈椎将其处死,进行大体解剖观察,若发现肉眼可见病变,则进行病理组织学检查。

1.2.3 槟榔提取物保健饮料生产工艺流程

槟榔保健饮料的生产工艺流程为:新鲜槟榔果→烘干、粉碎→浸提→过滤、旋蒸→冷冻、干燥→取槟榔提取物→调配→冷藏。

1.2.4 保健饮料最佳配方和最佳稳定剂判定

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验方案(见表 1)研究槟榔提取物添加量(0.1%, 0.2%, 0.3%)、白砂糖添加量(6%, 8%, 10%)及柠檬酸添加量(0.05%, 0.10%, 0.15%)对饮料品质的影响,感官评价饮料品质,总分为 100 分,评价标准见表 2。感官评价由 22 位相关人员根据感官评价标准完成,以此判断最佳配方。最佳配方饮料再加入不同浓度的阿拉伯胶(0.1%、0.2%)、羧甲基纤维素钠(0.1%、0.2%)、海藻酸钠(0.1%、0.2%),取部分饮料于高速离心机中 4 000 r/min 离心 15 min,于 600 nm 下测定其吸光度,对比离心后与离心前的吸收度值,比值越大者越稳定。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

水平	槟榔添加量 /%	糖添加量 /%	柠檬酸添加量 /%
1	0.1	6	0.05
2	0.2	8	0.10
3	0.3	10	0.15

表 2 槟榔饮料感官评价标准

项目	评分标准	满分
色泽	颜色均匀,呈红褐色或淡红褐色	30
口感	口感细腻,酸甜适中,爽口,无苦涩感	40
风味	有宜人的槟榔香味,无其他不良气味	30

1.2.5 统计分析

结果以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析,采用单因素方差分析比较 2 组小鼠间体重质量变化, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 槟榔提取物急性毒性结果

给药组小鼠精神行为状态无异常,毛色光泽,摄食饮水情况正常,无躁动不安、呼吸障碍、心跳过速、惊厥、突眼等急性毒性表现,14 d 后小鼠均健康存活,未见明显毒性反应。处死小鼠后,观察心、肝、脾、肺、肾等脏器,未观察到肉眼可见病变。小鼠体重给药前后无明显变化,见表 3。故得出小鼠对槟榔提取物的最大给药量为 5 g/kg(生药量)

表 3 槟榔提取物对小鼠体重的影响

组别	体重 /g		
	给药前	给药后 7 d	给药后 14 d
对照组	(18.8±0.5)	(25.4±0.8)	(30.1±0.9)
给药组	(18.9±0.6)	(25.6±0.8)	(30.3±1.2)
<i>F</i>	0.008	0.538	0.254
<i>P</i> 值	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05

2.2 槟榔饮料的最佳配方和最佳稳定剂判定

由极差大小分析,对槟榔饮料口感影响的主次顺序为 B(白砂糖添加量%)>A(槟榔提取物添加量%)>C(柠檬酸添加量%),即最佳配方为 A2B3C1,即槟榔提取物添加量为 0.2%,柠檬酸添加量为 0.05%,白砂糖添加量为 10%,该配方下的槟榔初饮料色泽呈淡红褐色,感觉舒服,口感细腻,酸甜适中,没有苦涩感,有淡淡的槟榔香味,大多数评价者认为其较适合大众化口味,试验结果见表 4。通过对比加入前和加入后的槟榔保健饮料的吸光度可知,槟榔保健饮料的最佳稳定剂为 0.2%的阿拉伯胶,具体见表 5。

3 结论与讨论

槟榔是四磨汤、柴胡舒肝丸等多种中药方剂中的组成成分,具有杀虫、消积、行气和利水等功效^[4]。现代药理学研究发现,槟榔提取物有抗氧化、促进胃肠蠕动、调节血脂、抗疲劳以及抗菌作用^[5-11]。槟榔碱的神经毒性、免疫毒性以及口腔黏膜下纤维变性毒性^[1]等大大限制了槟榔的应用。本研究采用槟榔鲜果 40℃烘干,80%乙醇冷浸、提取、冷冻烘干,得槟榔乙醇的粗提物,此方法过滤出槟榔果的纤维残渣,保留槟榔果多酚及其抗氧化功能^[6,12]。

一次性灌胃给予小鼠最大浓度最大体积的槟榔

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验

试验号	槟榔添加水平	白砂糖添加水平	柠檬酸添加水平	空列	感官评价
1	A1	B1	C1	1	61
2	A1	B2	C2	2	71
3	A1	B3	C3	3	79
4	A2	B1	C2	3	73
5	A2	B2	C3	1	77
6	A2	B3	C1	2	90
7	A3	B1	C3	2	63
8	A3	B2	C1	3	70
9	A3	B3	C2	1	77
均值 1	70.3	65.7	73.7	71.7	
均值 2	80.0	72.7	73.7	74.7	
均值 3	70.0	82.0	73.0	74.0	
极差	10.0	16.3	0.7	3.0	

表 5 不同稳定剂及用量对槟榔饮料稳定性的影响

稳定剂和用量	离心前吸光度(A0)	离心后吸光度(A1)	A1/A0
阿拉伯胶(0.1%)	0.015	0.008	0.533
阿拉伯胶(0.2%)	0.023	0.013	0.565
羧甲基纤维素钠(0.1%)	0.018	0.009	0.500
羧甲基纤维素钠(0.2%)	0.010	0.004	0.400
海藻酸钠(0.1%)	0.039	0.016	0.410
海藻酸钠(0.2%)	0.075	0.026	0.347

80%乙醇提取物,观察其急性毒性反应。结果发现,1 周内小鼠未出现死亡,未测出 LD_{50} ,继而进行最大给药量试验。最大容积最大浓度灌胃 1 次后,连续观察 14 d,小鼠未出现精神行为状态异常,14 d 后均健康存活,未见明显毒性反应,处死后肉眼观察心、肝、脾、肺、肾,未发现异常,体重给药前后无明显变化。由此可知,槟榔提取物的小鼠最大给药量为 5.0 g/kg。

槟榔提取物保健饮料最佳配方:槟榔提取物添加量 0.2%,柠檬酸添加量 0.05%,白砂糖添加量 10%;最佳稳定剂:0.2%的阿拉伯胶。该配方下饮料颜色为淡红褐色,口感细腻,酸甜适中,没有苦涩感,有淡淡的槟榔香味,较适合大众化口味。槟榔是全球广泛使用的嗜好品,但槟榔毒性限制了其使用。槟榔保健饮料除去槟榔的纤维成分,保留其它营养物质及抗氧化成分,具有较高的食用价值。

(下转第 110 页)

2011, 32(3): 1-7.

- [13] 李 民, 李晓文, 秦韶山, 等. 热处理温度对橡胶木物理性质的影响[J]. 木材工业, 2011: 25(4): 47-49.

- [14] Rosen H Z. Pressure steam drying of lumber[J]. Forest Products Journal, 1983, 33(1): 17-24.

- [15] 程万里. 木材高温高压蒸汽干燥工艺学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 150-152.

(上接第 98 页)

参考文献

- [1] 李习雄, 胡冠英, 张三印. 槟榔毒性机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 212-216.
- [2] 周文化, 李忠海, 崔阳阳, 等. 槟榔固体饮料的加工工艺研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(5): 131-135.
- [3] 李 梁, 吉建邦, 康效宁, 等. 槟榔花茶饮料的研制及货架期分析[J]. 2014, 39(4): 78-83.
- [4] 赵达文. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 342-343.
- [5] 张海德, 黄玉林, 范燕忠. 槟榔提取物对 DDPH 自由基的清除作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 74-77.
- [6] 韩 林, 黄玉林, 张海德, 等. 槟榔籽中抗氧化成份的提取及活性研究[J]. 食品发酵工业, 2009, 35(9): 157-159.

- [7] 吕 涛, 魏睦新. 槟榔促大鼠结肠平滑肌收缩的量效及机制探讨[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 141-143.
- [8] 郭喜军. 槟榔对大鼠胃运动及神经递质的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 17(5): 300-303.
- [9] 袁列军, 李忠海, 郑锦星. 槟榔提取物对大白鼠血脂调节作用的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(2): 188-192.
- [10] 何 双, 李忠海, 钟海燕, 等. 槟榔提取物对小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(2): 67-70.
- [11] 黄玉林, 袁蜡梅, 兰淑惠, 等. 槟榔提取物抗菌活性的研究[J]. 2009, 34(1): 202-204.
- [12] 袁列军, 李忠海, 郑锦星. 槟榔提取物对小鼠体内抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 225-227.