

槟榔鞣质水解条件的优化及其对多酚抗氧化活性的影响

龚茵茵,杨大伟

(湖南农业大学食品科技学院,长沙 410128)

摘要:为探讨槟榔鞣质水解最优条件以及水解对槟榔多酚体外抗氧化活性的影响,以醋酸为水解剂,鞣质含量为试验指标,利用正交设计对槟榔鞣质水解工艺进行了优化。结果表明:在70℃下,用2.5倍体积的冰醋酸水解40min,鞣质质量分数由36.80%降至28.86%。研究结果可为植物多酚的理论研究与生产实践提供有益的借鉴。

关键词:槟榔;多酚;鞣质;水解;抗氧化活性

中图分类号:TS255.41 **文献标志码:**A **文章编号:**1005-1295(2016)04-0015-05

doi:10.3969/j.issn.1005-1295.2016.04.004

Study on Optimal Conditions for Hydrolyzing Tannin and Effect of Hydrolysis on Antioxidant Activity of Polyphenols from Areca Catechu

GONG Yin-yin, YANG Da-wei

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract:The aim of the current study was to optimize the hydrolysis conditions of tannin from Areca catechu and explore effect of hydrolysis on antioxidant activity of polyphenols from areca, the orthogonal array design was carried out to optimize the hydrolysis technology of tannin from areca with the acetic acid being hydrolysis reagent and the content of tannin being test index. The results showed that the optimal conditions of hydrolyzing tannin were 40 min 70 ℃ and the ratio between glacial acetic acid and sample 2.5, under which the content of tannin was decreased from 36.80 % to 28.86 %. This results can provide beneficial reference for the theory research and production of plant polyphenols.

Key words:Areca catechu; polyphenols; tannin; hydrolysis; antioxidant activity

0 引言

槟榔(*Areca catechu* Linnaeus)属棕榈科(Arecaceae)槟榔亚科(Arecoideae)槟榔族(Arecinae)槟榔属(*Areca*)。槟榔多酚含有大量的鞣质,主要为缩合态,与槟榔碱结合存在^[1]。植物多酚物质

因具有极强的抗氧化能力、清除体内自由基、抗脂质氧化、延缓衰老、预防心血管疾病、防癌、抗辐射等生物活性功能^[2-3]。但槟榔鞣质也具有抗营养作用,若过量进食,会导致营养吸收不良。如果将缩合态鞣质进行水解,释放出更多的单体态多酚,不但可以解决缩合态鞣质的抗营养问题,还可以

收稿日期:2016-04-06; 修稿日期:2016-05-19

基金项目:海南省重大科技专项(ZDKJ2016003-02);校企合作项目(编号:1017DS0400)

作者简介:龚茵茵(1995-),女,本科,研究方向为食品工程,E-mail:1161864986@qq.com。

通信作者:杨大伟(1968-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物食品加工方面的研究,通信地址:410128 湖南长沙市芙蓉区农大路1号 湖南农业大学食品科技学院,E-mail:Yangdw0929@163.com。

提高槟榔多酚的抗氧化活性,这方面的研究还未见报道。本文作者在探讨槟榔鞣质水解最佳条件的基础上,对鞣质水解前后槟榔多酚抗氧化活性进行比较,研究鞣质水解对多酚抗氧化活性的影响,为槟榔植物资源的综合利用和多酚抗氧化的机理研究提供理论与试验依据。

1 试验材料与方法

1.1 材料与试剂

烟熏槟榔果:由湖南宾之郎食品有限公司提供;没食子酸标准品(纯度≥98%;中国药品生物制品检定所);1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH;美国 sigma 公司);叔丁基对苯二酚(TBHQ;上海阿拉丁试剂有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FW177 中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);CP214 电子分析天平(上海豪斯仪器有限公司);B-260 恒温水浴锅(上海惠海电器设备有限公司);TGL-16 台式电动离心机(常州市华普达教学仪器有限公司);722s 可见分光光度计(湖南省计量检测研究所);RE52CS-1 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D 循环水式多用真空泵(天津华鑫仪器厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 槟榔多酚与鞣质测定

槟榔多酚提取方法参考文献[4],多酚含量采用 Folin-Ciocalteu 比色法(FC 法)测定[5]。

鞣质含量采用干酪素法测定,参考文献并在其基础上进行改进[6]。供试品溶液经乙酸-乙酸钠调节 pH 至 4.8 后,精确量取 25mL,加至已盛有干酪素 0.60g 的 100mL 具塞锥形瓶中,密塞,置 30℃ 水浴中保温 1h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 2mL,置 50mL 容量瓶中,参照上述多酚含量测定方法,测定吸光度,以 pH 值为 4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液代替供试品做干酪素吸附空白对照,从标准曲线中读出干酪素吸附后滤液中多酚的含量。鞣质含量计算公式如下:

鞣质含量% = $\frac{\text{总酚量} - \text{不被吸附的多酚量}}{\text{总酚量}} \times 100$

1.3.2 槟榔鞣质的水解方法

采用酸水解法水解槟榔鞣质,因强酸会使缩合单宁进一步缩合形成不溶于水的红粉,故以冰

醋酸作为水解用酸,以鞣质含量为指标,考察温度(0、60、70、80、90、100℃)、时间(0、10、20、30、40、50、60、120、180、240、300min)以及样品:醋酸(V/V:5:1、2:1、1:1.5、1:2.0、1:2.5)三个单因素对水解效果的影响,在单因素试验结果的基础上进行正交试验 $L_9(3^4)$,因素与水平见表 1。

表 1 水解条件优化正交试验因素水平

水平	因素		
	A(时间/min)	B(温度/℃)	C(样品:醋酸/v:v)
1	40	70	1:1.5
2	50	80	1:2.0
3	60	90	1:2.5

1.3.3 槟榔多酚体外抗氧化活性的检测

(1)采用普鲁士兰法测定多酚总还原能力[7];(2)采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法测定多酚清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)能力[8];(3)清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)能力的测定方法。采用光照核黄素-氮蓝四唑(NBT)法,参考文献[9]并在其基础上进行改进[9]。取 2.5mL pH 7.8 0.2mol/L 的磷酸缓冲液,加入 0.4mL 0.06mol/L 的核黄素、0.4mL 30mmol/L 的甲硫氨酸、50μL 样品溶液和 0.2mL 1.125mmol/L 的 NBT,充分摇匀。暗箱上方安装一只节能灯,距离节能灯 20cm 处光照 30min 后,于 560nm 下测定吸光度(A),以蒸馏水代替样品溶液测定空白吸光度(A_0)。超氧阴离子清除率计算公式:

清除率% = $\frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$

(4)多酚清除 DPPH 自由基能力的测定方法参考文献[10]。

2 试验结果与分析

2.1 槟榔鞣质水解条件的优化

2.1.1 时间对槟榔鞣质水解效果的影响

槟榔鞣质含量随水解时间的变化如图 1 所示。

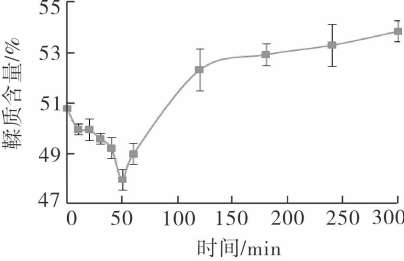


图 1 水解时间对鞣质含量的影响

由图 1 可知,水解时间对鞣质水解的影响非常显著,在 0 ~ 50min 内鞣质含量随水解时间的延长逐渐降低,50min 以后随水解时间的延长,鞣质含量呈现先升高后趋于平稳的趋势,虽然聚合原花青素单元间的连接键不稳定,在酸性作用下易被打开,但原花青素在酸性溶液中同时会发生自身缩合现象,这可能是水解时间过长导致鞣质含量反而增加的原因。

2.1.2 温度对槟榔鞣质水解效果的影响

槟榔鞣质含量随水解温度的变化如图 2 所示。

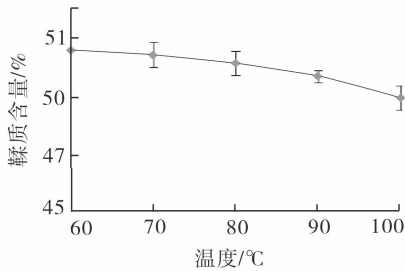


图 2 水解温度对鞣质含量的影响

由图 2 可知,在一定温度范围内,水解温度对鞣质水解的影响相对于时间因素较弱,随着温度的升高,鞣质含量缓慢降低,100℃时鞣质含量虽继 90℃后仍有下降的趋势,但水解液不稳定,放置一段时间后产生红褐色沉淀,可能是缩合单宁在酸性条件下进一步缩合生成了不溶性物质所致,故水解温度以低温为宜。

2.1.3 冰醋酸用量对槟榔鞣质水解效果的影响

槟榔鞣质含量随冰醋酸用量的变化如图 3 所示。

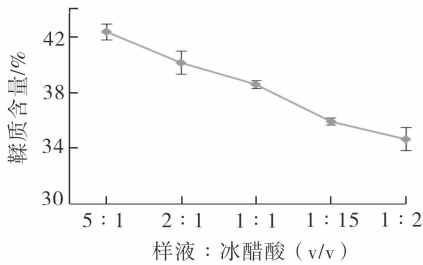


图 3 冰醋酸用量对鞣质含量的影响

由图 3 可知,冰醋酸用量对鞣质水解的影响显著,随着冰醋酸用量的增加,溶液酸性增强,更多高聚体间的连接键被打开,鞣质含量逐渐降低,在冰醋酸体积为样液的 2 倍时,鞣质含量达到最低。

2.1.4 正交优化试验

为得到鞣质水解工艺最佳条件,对影响因素

及参数进一步优化,根据上述单因素试验结果,设计了 3 因素 3 水平正交试验,试验结果经极差和方差分析如表 2 和表 3 所示。

表 2 水解条件优化 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	空列	鞣质%
1	1	1	1	1	34.76
2	1	2	2	2	33.09
3	1	3	3	3	29.98
4	2	1	2	3	34.21
5	2	2	3	1	31.46
6	2	3	1	2	38.82
7	3	1	3	2	31.64
8	3	2	1	3	38.04
9	3	3	2	1	37.05
K_1	97.83	100.61	111.62	103.27	$T = 309.05$
K_2	104.49	102.59	104.35	103.55	
K_3	106.73	105.85	93.08	102.23	
k_1	32.61	33.54	37.21	34.42	
k_2	34.83	34.2	34.78	34.52	
k_3	35.58	35.28	31.03	34.08	
R	2.97	1.74	6.18	0.44	

由表 2 极差分析结果可知,各因素的主次顺序为 $C > A > B$,即醋酸用量 > 水解时间 > 水解温度。最优组合为 $A_1B_1C_3$,即水解条件为时间 40min,温度 70℃,样品:醋酸 (v/v) = 1:2.5。在此条件下进行验证试验,鞣质占多酚含量比例由 36.80% 降低至 28.86%,比未水解前降低了 7.94%。由表 3 可知,3 个因素对槟榔鞣质水解的影响均极显著。

表 3 正交试验结果方差分析

差异源	平方和	自由度	均方差	F 值	F 临界值
A	14.29	2	7.15	44.69 **	$F_{0.05}(2,8) = 4.46$
B	4.67	2	2.34	14.63 **	$F_{0.01}(2,8) = 8.65$
C	58.18	2	29.09	181.82 **	
误差	0.32	2	0.16		
总变异	77.46	8			

参照魏冠红测定聚合度的方法(改良香草醛法)对槟榔鞣质提取液水解前后的平均聚合度进行测定^[11],结果显示,采用正交试验获得的最优水解条件对槟榔鞣质提取液进行水解后,平均聚合度由 3.11 降至 2.46,说明以鞣质含量为指标,水解槟榔鞣质的结果可靠。

2.2 鞣质水解对槟榔多酚体外抗氧化活性的影响结果

在最优水解条件下处理槟榔鞣质,将未水解液及水解液分别配制成一定质量浓度梯度的样品溶液,考察槟榔多酚体外抗氧化活性。

2.2.1 总还原能力

鞣质水解前后的总还原能力与抗坏血酸比较,结果如图 4 所示。

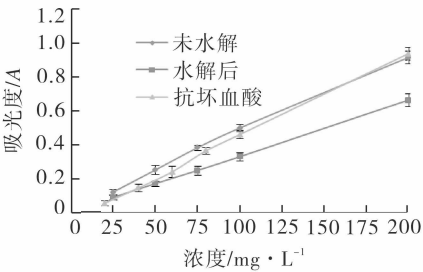


图 4 水解前后槟榔多酚总还原能力

由图 4 可知,水解处理前,槟榔多酚的总还原能力与抗坏血酸相当,水解后其总还原能力有所降低,在浓度为 200mg/L 时,吸光度值下降了 0.251,说明水解处理虽然可以水解鞣质,同时也导致了其它结构类型的多酚被破坏,所以多酚的总还原能力降低了。另外,总还原能力与各样品质量浓度均存在明显的剂量-效应关系,不同样品多酚质量浓度与总还原能力的线性关系见表 4。

表 4 总还原能力与多酚质量浓度的线性关系

样品	线性范围/ mg · L ⁻¹	线性方程	R ²
提取液	25 ~ 200	$y = 0.00449x + 0.03299$	0.9965
水解液	25 ~ 200	$y = 0.00328x + 0.00759$	0.9998
抗坏血酸	20 ~ 200	$y = 0.00494x - 0.04125$	0.9989

2.2.2 清除羟基自由基能力

鞣质水解前后的清除羟基自由基能力与抗坏血酸比较,结果如图 5 所示。

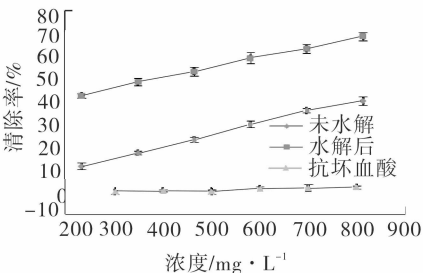


图 5 水解前后槟榔多酚清除羟基自由基能力

由图 5 可知,水解前后槟榔多酚清除羟基自由基的能力差异非常显著,水解后其清除羟基自由基能力比水解前明显提高,说明鞣质水解后,清除羟基自由基的多酚功能结构基团增加了。另外,清除羟基自由基能力与多酚质量浓度存在明显的剂量-效应关系,在一定浓度范围内与清除率线性关系良好,如表 5 所示,以半数清除率计,水解后 IC₅₀降低了 597.66mg/L。试验中发现抗坏血酸在该体系内对羟基自由基的清除能力很弱,在较低浓度范围内基本无清除效果,当浓度达到 2000mg/L 时,其清除羟基自由基能力才达到 37.60%,赵艳红在石榴皮多酚的抗氧化分析中发现^[12],抗坏血酸对羟基自由基的清除能力在不同质量浓度梯度下差异不大而且效果差,也可能是抗坏血酸浓度还未达到清除羟基自由基的浓度所致。

表 5 清除羟基自由基能力与多酚质量浓度的线性关系

样品	线性范围/ mg · L ⁻¹	线性方程	R ²	IC ₅₀ /mg · L ⁻¹
提取液	232 ~ 812	$y = 0.05111x - 0.44652$	0.9967	987.02 ± 0.712
水解液	232 ~ 812	$y = 0.04461x + 32.63063$	0.9976	389.36 ± 0.527

2.2.3 清除超氧阴离子自由基能力

鞣质水解前后的清除超氧阴离子自由基能力与抗坏血酸比较,结果如图 6 所示。

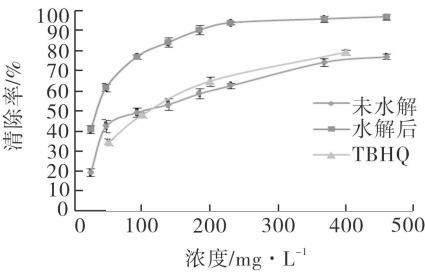


图 6 水解前后槟榔多酚清除超氧阴离子自由基能力

由图 6 可知,水解前后槟榔多酚清除超氧阴离子自由基的能力差异非常显著,水解后其清除超氧阴离子自由基能力比水解前明显提高,说明鞣质水解后,清除超氧阴离子自由基的多酚功能结构基团增加了。另外,清除超氧阴离子自由基能力与多酚质量浓度存在明显的剂量-效应关系,但各浓度范围内多酚质量浓度与清除率线性关系均不明显,水解前质量浓度在 23 ~ 368mg/L 范围内快速增加,进一步增加浓度其清除率变化很小,当浓度为 460mg/L 时,清除率为 77.6%,水

解后质量浓度在 184mg/L 时清除率已经迅速增长至平稳趋势,当浓度为 460mg/L 时,清除率达到 97.3%,比水解前增加了 19.7%。

2.2.4 清除 DPPH 自由基能力测定

鞣质水解前后的清除 DPPH 自由基能力与抗坏血酸比较,结果如图 7 所示。

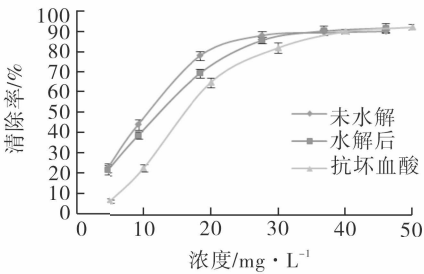


图 7 水解前后槟榔多酚清除 DPPH 自由基能力

由图 7 可知,水解前后槟榔多酚清除 DPPH 自由基能力差异不显著,但在较低浓度范围内均高于抗坏血酸的清除能力,说明水解处理在一定程度上破坏了清除 DPPH 自由基的多酚功能结构基团,导致水解后清除 DPPH 自由基能力降低。另外,清除 DPPH 自由基能力与多酚质量浓度呈明显的剂量 - 效应关系,在一定范围内清除率与质量浓度线性关系良好,如表 6 所示,以半数清除率计,水解前后 IC₅₀ 只相差 1.5mg/L,当浓度达到 40mg/L 后,三者对 DPPH 自由基的清除率均达到 90% 且基本不再发生变化。

表 6 清除 DPPH 自由基能力与多酚质量浓度的线性关系

样品	线性范围/ mg · L ⁻¹	线性方程	R ²	IC ₅₀ / mg · L ⁻¹
提取液	4.6 ~ 18.4	y = 3.96139x + 5.82171	0.9958	11.15 ± 2.55
水解液	4.6 ~ 18.4	y = 3.45057x + 6.36552	0.9988	12.65 ± 1.16
抗坏血酸 (VC)	5.0 ~ 20.0	y = 3.93097x - 14.30037	0.9963	16.36 ± 2.56

试验结果说明,植物鞣质水解对多酚抗氧化活性的影响以及多酚结构与抗氧化功能之间的关系有待进一步深入研究。

3 结论

以醋酸为水解介质,以鞣质含量为指标,通过单因素试验和正交设计优化,得到槟榔鞣质最佳水解工艺条件为:温度 70℃,样液:冰醋酸 =

1:2.5,时间 40min,在该条件下,槟榔鞣质含量由 36.80% 降至 28.86%,槟榔鞣质提取液水解后平均聚合度由 3.11 降至 2.46。水解后槟榔多酚总还原能力与清除 DPPH 自由基能力有所降低,清除羟基自由基能力以及清除超氧阴离子自由基能力显著增强。

综上所述,本文研究可为植物多酚的理论研究与生产实践提供有益的借鉴。

参考文献:

[1] 高晓婷,杨大伟,蒋晨风. 基于多级错流提取槟榔生物碱的工艺优化[J]. 食品与机械,2015 (11):182 - 185.

[2] 尹娜,温成荣,叶伟健,等. 超声波辅助提取魔芋多酚工艺的研究[J]. 包装与食品机械,2013,31 (4): 1 - 4.

[3] 李娜,李瑜,谷文荣. 响应面法优化冬瓜皮多酚提取工艺[J]. 包装与食品机械,2015,33 (1):27 - 32.

[4] 蒋晨凤,杨大伟,高晓婷. 基于因素最少化的槟榔多酚错流提取条件研究[J]. 中国酿造,2015,34 (9):87 - 91.

[5] 田文礼,孙丽萍,董捷,等. Folin-Ciocalleu 比色法测定蜂花粉中的总酚[J]. 食品科学,2007,28 (2):258 - 260.

[6] 张笑颖,帕丽达·阿不力孜,朱焱,等. 干酪素法测定新疆不同产地石榴皮中鞣质的含量 [J]. 食品科学,2009,30 (8): 260 - 262.

[7] 赵艳红,李建科,李国秀. 天然抗氧化物体外活性评价方法的优选与优化[J]. 食品科学,2008,29 (6):64 - 69.

[8] 张笑颖,帕丽达·阿不力孜,朱焱,等. 干酪素法测定新疆不同产地石榴皮中鞣质的含量[J]. 食品科学,2009,30 (8):260 - 262.

[9] 朱靖博,韩少华,王妍妍,等. 氮蓝四唑光照法评价丹参水溶性成分清除超氧阴离子 (O^{2·-}) 活性[J]. 大连工业大学学报,2009,28 (4):251 - 254.

[10] Zhang W W, Duan X J, Huang H L, et al. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from Symphyocladia latiuscula (Rhodomelaceae). J Appl Phycol[J]. Journal of Applied Phycology,2007, 19 (2):97 - 108.

[11] 魏冠红,魏作君,苏宝根,等. 测定原花青素平均聚合度的一种新方法[J]. 中国食品学报,2006 (6):112 - 116.

[12] 赵艳红,李建科,李国荣. 石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J]. 食品科学,2010,31 (11):31 - 37.