

# 槟榔籽乙醇提取物抗氧化性的研究

张璐<sup>2,3</sup>, 郑亚军<sup>1,2</sup>, 李艳<sup>2</sup>, 张有林<sup>1\*</sup>, 张润光<sup>1</sup>, 张玉峰<sup>2</sup>

(1. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 中国热带农业科学院 椰子研究所, 海南 文昌 571339; 3. 海南大学 园艺园林学院, 海南海口 570228)

**摘要:** 将槟榔籽干燥、粉碎后用 75% 乙醇提取, 以该提取液为研究对象, 分析其对 DPPH、羟基自由基、超氧根离子自由基、ABTS 自由基的清除能力, 并测试其还原力、对二价铁离子的络合能力和对亚油酸自氧化的抑制能力, 综合分析其体外抗氧化能力。结果表明, 槟榔籽乙醇提取物(AKEE)对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧根离子自由基的清除能力均强于 BHT, 均高于常用抗氧化剂 BHT。同时, AKEE 还表现出较高的还原力, 并能有效延缓亚油酸自氧化反应的速率。这表明槟榔籽乙醇提取物具有较好的抗氧化性, 在食品或其它工业中有潜在的用途。

**关键词:** 槟榔籽; 乙醇提取物; 抗氧化; 多酚

## Study on the Antioxidant of Ethanol Extraction from Areca Kernel

ZHANG Lu<sup>2,3</sup>, ZHENG Ya-jun<sup>1,2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, ZHANG You-lin<sup>1\*</sup>, ZHANG Run-guang<sup>1</sup>, ZHANG Yu-feng<sup>2</sup>

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China; 2. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropic Agriculture Science, Wenchang 571339, Hainan, China; 3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

**Abstract:** The areca kernel was dried, corssed and then extracted by 75 % ethanol aqueous. The antioxidant activity of the extraction from areca kernel by 75 % ethanol (AKEE) was studied through testing its scavenging activity on DPPH radical, hydroxyl radical, ABTS and superoxide radical. Besides, its reducing power, chelating capacity and inhibition of linoleic acid autoxidation were researched, too. Moreover, the polyphone composition of this extraction was also analyzed by RP-HPLC. Compared with BHT, the AKEE exhibited higher scavenging activity on DPPH·, ·OH and O<sub>2</sub><sup>-·</sup>, and showed higher reducing power. Results also showed that AKEE could effectively inhibit the autoxidation of linoleic acid. This meant that AKEE was a good nature antioxidant and had potential application in food or other industry.

**Key words:** areca kernel; ethanol extraction; antioxidant; polyphones

槟榔(*Areca catechu* L.), 棕榈科热带珍贵植物, 为“四大南药”之首, 经济价值极高。槟榔全身是宝, 其种子、果壳、花、花苞均可入药<sup>[1]</sup>。研究表明, 槟榔果可治腹泻、水肿脚气、小便不利等, 同时具有杀虫、抗疲劳、抗肿瘤等多种活性<sup>[2-7]</sup>。海南省万宁市是我国最重要的槟榔产地, 也有多家的槟榔初加工企业。据不完全统计, 2010年万宁市槟榔总产量 25 万 t, 总产值达 10 亿元, 农民槟榔人均年收入 2 292 元, 占年均收入的 39.4%, 槟榔已经成为热带农业的支柱产业<sup>[8]</sup>。目前槟榔加工

中主要利用槟榔的果壳, 而对槟榔籽(果仁)的利用率很低。大多数槟榔加工企业直接将槟榔籽丢弃, 造成了资源的浪费。

大量的国内外试验证明, 人体的许多疾病与体内自由基的失衡密切相关<sup>[9-10]</sup>。体内的羟基自由基、超氧根离子自由基可进一步引发多种化学反应, 生成一系列化学物质, 从而使人体自由基失衡, 最终导致疾病的产生<sup>[11]</sup>。同时, 羟基自由基等自由基也是导致油脂氧化酸败的重要因素。因而, 控制自由基的产生十分关键。目前常用的抗氧化剂多为化学合成, 但因安全性问题其使用量和使用范围受到越来越严格的限制。因此, 寻找安全、高效、无毒的天然抗氧化剂成为研究的热点。本试验以槟榔籽为原料, 研究槟榔籽乙醇提取

基金项目: 国家科技支撑项目(2012BAD31B03); 海南省重大科技项目(ZDZX2013011)

作者简介: 张璐(1993—), 男(汉), 本科在读, 研究方向: 园艺学。

\* 通信作者: 张有林, 教授, 博士生导师。

物的抗氧化性, 以期为槟榔籽的开发利用提供理论基础和指导。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

槟榔籽由海南省万宁市万城镇槟榔初加工基地提供。

### 1.2 试剂及仪器

#### 1.2.1 试剂

甲醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、三氯化铁、三氯乙酸、BHT、FeSO<sub>4</sub>、铁氰化钾、乙醇: 天津科密欧公司; DPPH、Ferrozine 试剂、没食子酸: Sigma 公司; 甲醇、冰醋酸等试剂为色谱级; 甲苯、二甲苯、苯并比等试剂均为分析纯。

#### 1.2.2 仪器

UV-1200 紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限公司; IFFM-E 旋转蒸发仪: 香港 BUCHI 公司; PYX-DHG-9101-25A 电热恒温鼓风干燥箱: 广东韶关科力实验仪器有限公司; JB-3 磁力搅拌器: 上海智光仪器仪表有限公司。QP2010Plus 型 GC-MS(气象色谱-质谱联用仪): 岛津(Shimadzu); D-78532 型台式高速冷冻离心机: 德国 Hittech 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 脱脂槟榔籽粉的制备

将槟榔籽切碎后于 50 ℃ 下在鼓风干燥箱中干燥 4 h, 粉碎, 过 20 筛。然后在过筛的槟榔籽中按照 1:10 的比例加入石油醚, 振荡提取 2 h 后, 过滤, 收集滤渣, 反复脱脂 3 次。将脱脂后的槟榔籽再次粉碎, 过 60 目筛, 得到脱脂槟榔籽粉。

#### 1.3.2 槟榔籽粉 75% 乙醇提取物的制备

称取槟榔籽粉 50 g, 加入 75% (体积比) 乙醇 500 mL, 超声波预处理(40 Hz, 35 ℃) 10 min 后, 磁力搅拌提取 2 h。过滤, 收集滤液。滤渣再次加入 75% 乙醇溶液, 反复提取 3 次, 合并滤液。将滤液在 4 ℃、4 000 r/min 下离心 30 min, 收集上清液, 冷冻真空干燥后得到槟榔籽 75% 乙醇提取物 (areca kernel ethanol extraction, AKEE)。

#### 1.3.3 槟榔籽乙醇提取物抗氧化性的测定

将按照 1.2.2 制备的 AKEE 复溶于 75% 乙醇中, 分别配制成 50、100、150、200 和 250 μg/mL 的溶液, 用于抗氧化试验。

##### 1.3.3.1 DPPH 自由基的清除作用

参照文献[12]的方法: 将 0.1 mL、不同浓度的 AKEE (50 μg/mL~250 μg/mL) 加入到 1.4 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液中, 再用 95% 乙醇稀释到 3 mL, 暗处放置 30 min 后, 517 nm 测吸光值, 以 BHT 作对照, 每

组 3 个重复, 一个空白。

$$\text{DPPH 清除率}/\% = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100$$

式中:  $A_{\text{样品}}$  为样品(或对照)管的吸光值;  $A_{\text{空白}}$  为空白管的吸光值。

##### 1.3.3.2 羟基自由基的清除作用

参照文献[13]的方法: 在 1.34 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L, pH7.4)中依次加入 28 mmol/L 的脱氧核糖溶液 0.3 mL, 28 mmol/L 的双氧水 0.3 mL, 2.5 mmol/L 的三氯化铁溶液 30 μL, 1 mmol/L 的 EDTA-Na<sub>2</sub> 0.3 mL 以及 0.1 mL 100 μg/mL 的样品溶液。然后添加 10 mmol/L 抗坏血酸 30 μL 引发反应, 37 ℃ 水浴 1 h, 加入 1% 的硫代巴比妥酸溶液 0.3 mL, 28% 的三氯乙酸 30 μL, 100 ℃, 水浴 20 min, 冷却后 532 nm 下测吸光值。模型管用水代替样品。以 BHT 作对照。

$$\text{羟基自由基的清除率}/\% = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{模型}}) \times 100$$

式中:  $A_{\text{样品}}$  为样品(或对照)管的吸光值;  $A_{\text{模型}}$  为模型管的吸光值。

##### 1.3.3.3 对超氧根离子的清除能力的测定

参照文献[14]的方法: 将 AKEE 溶解于 0.1 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中配成不同浓度(50 μg/mL~250 μg/mL)的样品溶液。取该样品溶液 0.1 mL, 加入到 3 mL、3 mmol/L 的邻苯三酚溶液中, 混合均匀后, 在 320 nm 下比色, 每隔 30 s 记录一次吸光值, 共记录 10 min。模型管用水代替样品, 以 BHT 做对照。

$$\text{超氧根离子的清除率}/\% = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{模型}}) \times 100$$

式中:  $A_{\text{样品}}$  为样品管的吸光值;  $A_{\text{模型}}$  为模型管的吸光值。

##### 1.3.3.4 Fe<sup>2+</sup>络合能力的测定

参照文献[14]的方法: 移取 50 μL、不同浓度的 AKEE (50 μg/mL~250 μg/mL) 于试管中, 加入 1 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液 25 μL, 5 mmol/L 的 Ferrozine 试剂 50 μL, 室温反应 10 min 后, 用甲醇定容到 3 mL, 在 562 nm 下测吸光值。模型管用甲醇代替样品, 用 BHT 作对照。

$$\text{Fe}^{2+}\text{络合率}/\% = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{模型}}) \times 100$$

式中:  $A_{\text{样品}}$  为样品(或对照)管的吸光值;  $A_{\text{模型}}$  为模型管的吸光值。

##### 1.3.3.5 还原能力测定

参照文献[15]的方法: 移取 200 μL 的 AKEE (50 μg/mL~250 μg/mL) 于试管中, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH6.6), 1 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 混合后于 50 ℃ 水浴加热 20 min, 然后加入 10% 的三氯乙酸 1 mL, 4 000 r/min 常温离心 10 min, 取上清液 2 mL, 加入 2 mL 蒸馏水以及 0.1% 三氯化铁 400 μL, 混匀后在 700 nm 测吸光值, 用 BHT 作对照。

##### 1.3.3.6 抑制脂质过氧化能力的测定

参照文献[16]的方法, 略有改进。取 3 mL、10 mmol/L

亚油酸溶液,加入 100  $\mu\text{L}$  AKEE (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),混匀后于 37  $^{\circ}\text{C}$ 下暗反应 8 d,空白管不加样品。每天吸取反应液 200  $\mu\text{L}$ ,加入 10 mmol/L 硫氰酸铵,300  $\mu\text{L}$ 、30%氯化亚铁,旋涡混合器充分混合,于 500 nm 测定其吸光值。用 BHT 作对照。

### 1.3.4 数据处理

抗氧化试验均重复 3 次,取平均值。采用软件 DPS 7.05 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 AKEE 对 DPPH·的清除能力

DPPH 自由基已被广泛应用于测定植物提取物的抗氧化活性。槟榔籽 75%乙醇提取物(AKEE)在不同浓度下对 DPPH·的清除能力见图 1。

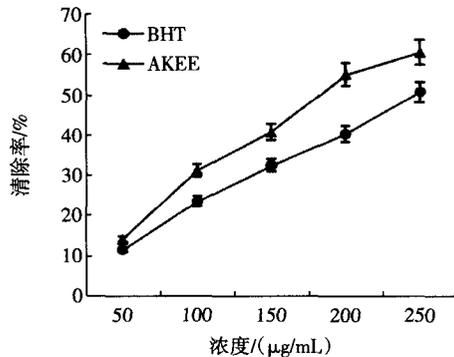


图 1 AKEE 对 DPPH·的清除能力

Fig.1 Scavenging activity of AKEE on DPPH radical

如图 1 所示,与 BHT 相比,在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内,AKEE 显示出更强的清除能力。

### 2.2 AKEE 对·OH 的清除能力

AKEE 对·OH 的清除能力见图 2。

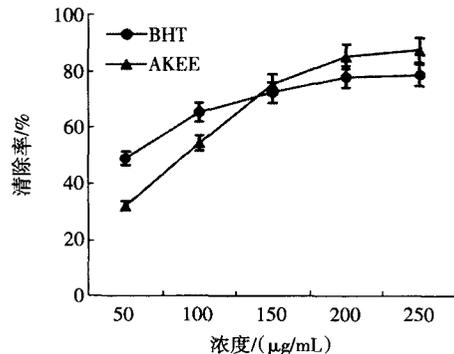


图 2 AKEE 对·OH 的清除能力

Fig.2 Scavenging ability of AKEE on hydroxyl radical

目前,活性氧诱导的 DNA 损伤被认为是机体老化的主要原因<sup>[8-9,13]</sup>。而·OH 是已知的活性氧中对生物体毒性最强的一种自由基,它可以通过多种反应破坏生物体的各种大分子,如蛋白质、脂肪和 DNA,特别是  $\text{V}_\text{B}_1$  和鸟嘌呤核苷<sup>[10]</sup>,对生物体造成很大程度的损伤。是机体内最活跃的自由基之一,它是多种自由基合成

的中间产物。如图 2 所示,随着浓度的增大,AKEE 和 BHT 对羟基自由基的清除能力也逐渐变大。而在 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内,AKEE 显示出更强的清除能力。

### 2.3 AKEE 对超氧根离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )的清除能力

AKEE 对超氧根离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )的清除能力见图 3。

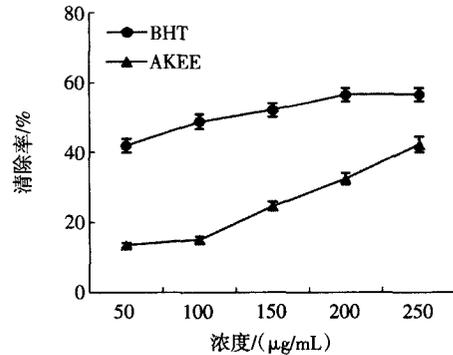


图 3 AKEE 对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除能力

Fig.3 Scavenging ability of AKEE on superoxide radical

$\text{O}_2^{\cdot-}$  是机体受损或代谢失衡时最先产生的自由基之一, $\text{O}_2^{\cdot-}$  会引发一系列化学反应,产生更多的自由基。因而  $\text{O}_2^{\cdot-}$  既是机体氧化反应的产物,也是许多氧化反应的引发物和底物。图 3 的结果表明,AKEE 具有一定的清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  能力,且随浓度的提高,其清除能力也提高。

### 2.4 AKEE 的还原力

AKEE 的还原力见图 4。

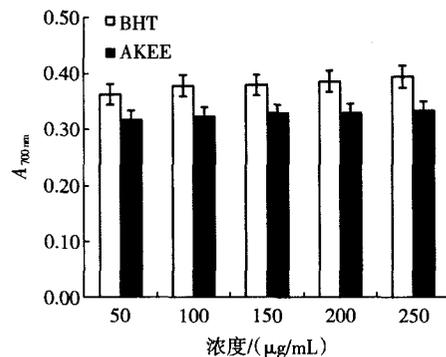


图 4 AKEE 的还原力

Fig.4 Reducing power of AKEE

抗氧化剂将铁氰化钾中的三价铁还原为二价铁离子,二价铁离子进一步生成普鲁士蓝,其在 700 nm 处有最大吸收波长。因此在 700 nm 下的吸光值越高,表明该抗氧化剂的还原力越高,抗氧化性越强<sup>[16]</sup>。如图 4 所示,AKEE 与 BHT 表现出相似的还原力;但在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内,二者的还原力并未随浓度的增大而增强。

### 2.5 AKEE 对 $\text{Fe}^{2+}$ 的络合能力

AKEE 对  $\text{Fe}^{2+}$  的络合能力见图 5。

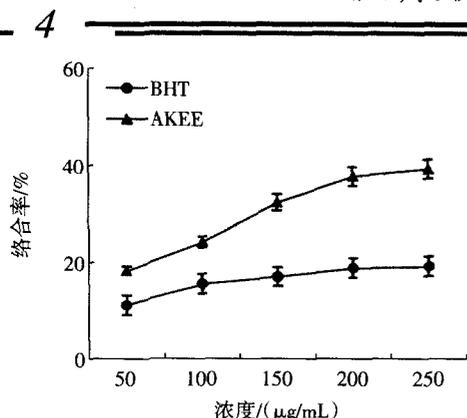
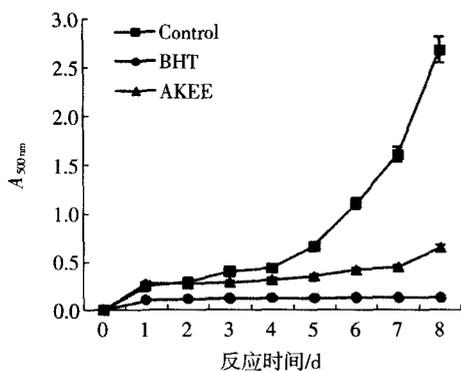
图5 AKEE对Fe<sup>2+</sup>的络合能力

Fig.5 Chelating capacity of AKEE on ferrous ion

在生物体内,Fe<sup>2+</sup>不仅可催化脂质过氧化反应,还能与活性氧反应产生羟基自由基,从而破坏生物体的生物大分子。而生物体的抗氧化剂能够络合二价铁离子而降低其损害。如图5所示,在50 μg/mL~250 μg/mL的范围内,AKEE对Fe<sup>2+</sup>的络合能力显著地高于BHT,且随浓度的升高,AKEE的对Fe<sup>2+</sup>的络合能力相应提高。

## 2.6 AKEE对亚油酸自氧化的抑制能力

AKEE对亚油酸自氧化的抑制能力见图6。



Control 表示未加任何抗氧化剂。

图6 AKEE对亚油酸自氧化的抑制能力

Fig.6 The inhibition ability of AKEE on autoxidation of linoleic acid

脂质过氧化是油脂中多不饱和脂肪酸侧链与活性氧(ROS)氧化反应形成脂质过氧化产物(lipid peroxide, LPO)的过程。脂质过氧化是导致食品腐败变质、丧失食用和商用价值的重要原因之一。图5表明,亚油酸的酸败速度很快,在暗反应3 d后,自氧化的速率呈几何级数增长。而在测试的8 d内,AKEE对亚油酸的自氧化反应的抑制能力与BHT相近,可有效延缓亚油酸变质。

## 3 结论与讨论

机体新陈代谢所产生的自由基,是代谢过程中的副产物,其过量积累可造成机体损伤。因此,筛选具有清除自由基和脂质过氧化抑制作用的功能因子是目前研究的重点。本实验结果表明,槟榔籽乙醇提取物(AKEE)

对DPPH自由基、羟基自由基、超氧根离子自由基具有较强的清除能力;同时表现出较高的还原力,一定的Fe<sup>2+</sup>络合能力,并能有效延缓亚油酸自氧化反应的速率。这表明槟榔籽乙醇提取物具有较好的抗氧化性。

槟榔籽是目前槟榔加工业中的副产物,价格低廉、来源丰富。因此,槟榔籽乙醇提取物是一种来源丰富、经济、前景良好的抗氧化剂资源。

## 参考文献:

- [1] 张春江,吕飞杰,陶海腾. 槟榔活性成分及其功能作用的研究进展[J]. 中国食物与营养,2008(6):50-53
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:中国档案出版社,1999:1412-1416
- [3] 邹永,钟裕国,金初容,等. 槟榔碱类似物的合成及活性筛选[J]. 中国药物化学杂志,1999,4(4):252-256
- [4] 郑亚军,李艳,陈华,等. 槟榔红色素的抗氧化活性[J]. 热带作物学报,2009,30(6):881-884
- [5] 郑亚军,李艳,陈卫军,等. 槟榔色素稳定性的研究[J]. 热带作物学报,2010,31(12):2203-2206
- [6] 郑亚军,李艳,陈卫军,等. 槟榔红色素提取工艺的研究[J]. 热带作物学报,2010,31(1):141-145
- [7] Wang C K Lee, W H Peng C H. Contents of phenolics and alkaloids in Areca catechu Linn during maturation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1997, 45(4): 1185-1188
- [8] Holdsworth D K, Jones R A, Self R. Volatile alkaloids from Areca catechu[J]. Phytochemistry,1998, 48(3): 581-582
- [9] Byun S J, Kim H S, Jeon S M, et al. Supplementation of Areca catechu L. extract alters triglyceride absorption and cholesterol metabolism in rats[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2001, 45(6): 279-284
- [10] Pacifici R E, Davies K J A. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited[J]. Gerontology, 1991, 37(1/3): 166-180
- [11] Muramatsu H, Kogawa K, Tanaka M, et al. Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility[J]. Cancer research, 1995, 55(24): 6210-6214
- [12] Han Y K, Kim I H, Hong J W, et al. Apparent ileal digestibility of nutrient in plant protein feedstuffs for finishing pigs[J]. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2003, 16(7): 1020-1024
- [13] Guo Z, Liu H, Chen X, et al. Hydroxyl radicals scavenging activity of N-substituted chitosan and quaternized chitosan[J]. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2006, 16(24): 6348-6350
- [14] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38(2): 175-182
- [15] 邹磊,甄少波,宋杨. 食品抗氧化能力检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 463-466
- [16] Awika J M, Rooney L W, Wu X, et al. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum products[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry,2003,51(23): 6657-6662