

张培月, 唐敏敏, 宋菲, 等. 食用槟榔废弃籽的活性成分提取及抗氧化、 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 253–260. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090023

ZHANG Peiyue, TANG Minmin, SONG Fei, et al. Bioactive Composition, Antioxidant, and α -Glucosidase Inhibition of Edible *Areca catechu* Waste Seed[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 253–260. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090023

· 分析检测 ·

食用槟榔废弃籽的活性成分提取及抗氧化、 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析

张培月^{1,2}, 唐敏敏^{2,3}, 宋菲^{2,3}, 刘璨^{1,2}, 陈华^{1,2,3,*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070;

2. 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339;

3. 海南省槟榔产业工程研究中心, 海南文昌 571339)

摘要: 针对食用槟榔加工后槟榔籽被当作废弃物而基本无大规模利用的问题, 本研究以食用槟榔加工后的废弃籽为研究对象, 75% 的乙醇溶液为提取溶剂, 超声辅助提取, 得到加工后槟榔籽 75% 乙醇提取物 (processed seed extraction, PSE), 测定其总多酚、总黄酮和原花青素含量。采用 DPPH 法、ABTS⁺法和 Fe³⁺还原法 3 种测定方法对槟榔提取物体外抗氧化活性进行评价。本文还研究了 PSE 对 α -葡萄糖苷酶活力的抑制能力。结果表明, PSE 含有丰富的多酚和黄酮等活性物质, 其中, 总多酚含量为 (127.29±5.16) mg 没食子酸/g 提取物、总黄酮含量为 (421.84±13.82) mg 芦丁/g 提取物, 原花青素含量为 (87.83±6.60) mg 儿茶素/g 提取物。PSE 检测到 44 种黄酮类化合物, 其中儿茶素相对含量高达 77.27%。PSE 具有一定的自由基清除力, 清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 值分别为 (310.10±0.62) 和 (150.10±11.57) μ g/mL。另外, PSE 表现出较强的 α -葡萄糖苷酶抑制能力, 其对 α -葡萄糖苷酶活力的抑制能力 (IC₅₀ 值为 (90.10±1.89) μ g/mL) 显著 ($P<0.05$) 强于阳性对照阿卡波糖 (IC₅₀ 值为 (453.60±4.02) μ g/mL)。因此, 回收再利用食用槟榔加工后的槟榔籽非常有必要。

关键词: 食用槟榔, 废弃籽, 总多酚, 总黄酮, 原花青素, 抗氧化活性, α -葡萄糖苷酶

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)12-0253-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090023

本文网刊:



Bioactive Composition, Antioxidant, and α -Glucosidase Inhibition of Edible *Areca catechu* Waste Seed

ZHANG Peiyue^{1,2}, TANG Minmin^{2,3}, SONG Fei^{2,3}, LIU Can^{1,2}, CHEN Hua^{1,2,3,*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Coconut Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang 571339, China;

3. Hainan Engineering Research Center of Arecanut Industry, Wenchang 571339, China)

Abstract: In view of the problem that edible *Areca catechu* seeds treated as waste and cannot be massively used after processing, in this study, the waste seeds after edible *Areca catechu* processing (PAS) are used. 75% ethanol extract of PAS (processed seed extraction, PSE) was extracted assisted by ultrasonic with a 75% ethanol solution as the extraction solvent. The contents of total polyphenols, total flavonoids and proanthocyanidins in the PSE were determined. Three methods (radical scavenging activities and Fe³⁺ reduction) were used to evaluate the antioxidant activity of PSE. Then the inhibitory of PSE on the activity of α -glucosidase was studied. The result showed that PSE was rich in polyphenols and flavonoid. The total contents of polyphenols, flavonoids and proanthocyanidins were (127.29±5.16) milligram gallic acid, (421.84±13.82)

收稿日期: 2021-09-03

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目: 辐照处理对槟榔鲜果品影响规律的研究 (320RC737); 槟榔产业创新团队: 槟榔产品加工工艺研究及新产品研发 (1630152017017)。

作者简介: 张培月 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 865007082@qq.com。

* 通信作者: 陈华 (1971-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: ch111666@126.com。

milligram rutin, and (87.83±6.60) milligram epicatechin in per gram of PSE, respectively. PSE contains 44 flavonoids were detected in PSE, in which the relative content of catechins was up to 77.27%. The IC_{50} for scavenging DPPH free radical and ABTS⁺ free radical of PSE were (310.10±0.62) and (150.10±11.57) $\mu\text{g/mL}$, respectively. In addition, PSE had significant inhibitory effect on α -glucosidase, and its ability to inhibit α -glucosidase (IC_{50} =(90.10±1.89) $\mu\text{g/mL}$) was significantly stronger ($P<0.05$) than acabosose as a positive control (IC_{50} =(453.60±4.02) $\mu\text{g/mL}$). Therefore, it is necessary to recycle the PAS.

Key words: edible *Areca catechu*; waste seed; total polyphenols; total flavonoids; proanthocyanidins; antioxidant activity; α -glucosidase

槟榔是一种棕榈科常绿乔木植物的果实,可药用和食用^[1]。全球槟榔生产与消费有 3000 年历史,目前,世界上有十分之一的人嚼食槟榔^[2-3]。在我国,槟榔主要有两种食用方式,一种是鲜食,即把槟榔鲜果切开后,包上涂有贝壳粉的蒺藜直接嚼食;另一种食用的是加工后的槟榔干果^[4]。海南省是我国槟榔种植规模最大的省份,2019 年末全省槟榔面积超过 11.51 万 hm^2 ,总产量超过 28.70 万吨,槟榔已成为海南 230 万农民的主要经济来源^[5]。湖南省是我国食用槟榔的主要加工省份,加工食用槟榔已成为中国食品加工的一大产业,其消费已经遍布全国各地,2019 年全国槟榔产业年产值超过 400 亿元,带动物流、包装、食品添加剂等相关产业产值超 500 亿元^[6]。槟榔废籽由槟榔鲜果经过多个加工工艺加工后切开除籽而来,据统计,食用槟榔每年加工剔除的槟榔籽多达 35000 吨,被剔除的槟榔籽一般被当做废弃物处理,基本被焚烧,甚至丢弃,既污染环境,又造成了资源浪费。

槟榔含有多种活性成分,对于槟榔中多酚^[7-8]和生物碱^[9-10]等活性成分的功效功能已有较多研究。槟榔碱是槟榔的主要药用成分之一^[11]。有研究表明,一定含量的生物碱可以增加小鼠脑中乙酰胆碱的浓度,激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴^[12],改善老年性痴呆症^[13],明显地增强小鼠肠道和离体肠蠕动,兴奋胃肠道平滑肌,影响离体豚鼠回肠自发收缩,槟榔碱还可在一定程度上对抗血栓形成^[14],抗炎^[11]和抑制骨质疏松^[15]。也有研究指出,槟榔生物碱有致口腔粘膜下纤维性变、损害神经系统和生殖系统等的作用^[16]。黄酮类化合物被证明有抗氧化的作用^[17-18],韩林等发现未经加工的槟榔籽提取物具有抗氧化活性,且抗氧化活性的大小与总酚的含量及组成有关^[19],宋菲等认为未经加工的槟榔籽多酚提取物具有降血糖功能^[20],张璐等检测到经初加工的槟榔籽提取物具有抗氧化能力^[21],而对于槟榔废籽的活性成分含量、抗氧化活性和降血糖功能的系统研究较少。

因此,本文以食用槟榔废籽为研究对象,以 75% 乙醇为提取溶剂进行超声辅助提取,测定了其总多酚、总黄酮、原花青素含量及槟榔生物碱等活性成分,检测了部分黄酮组分,并且利用体外抗氧化评价体系 and 降血糖评价体系对其进行抗氧化能力和降血糖能力研究,以期为槟榔废弃籽的开发利用提供理论

参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

槟榔废弃籽 某食用槟榔加工企业提供; L-抗坏血酸(维生素 C) 上海麦克林生化科技有限公司; 没食子酸、芦丁和儿茶素等标准品、 α -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母, 14.5 U/mL) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 1, 1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)、阿卡波糖 北京索莱宝科技有限公司; 2, 2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS⁺) 上海阿拉丁生化科技有限公司; 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(P-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, PNP) 上海源叶生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

A11BS25 高速中药粉碎机 德国 IKA 公司; ALLPSE-40 超声波清洗机 深圳市超艺达科技有限公司; AL204-IC 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; DK-98-11A 电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司; Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪 美国 Thermo 公司; MVA15G0014 紫外可见分光光度计 翱艺仪器(上海)有限公司; PHS-3C pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; DP-406DG 真空冷冻干燥机 无锡德普仪器制造有限公司; ExionLC AD 超高效液相、QTrap 6500 高灵敏度质谱 美国应用生物系统公司。

1.2 实验方法

1.2.1 槟榔废弃籽活性物质提取 清除杂物后,将槟榔废籽 60 $^{\circ}\text{C}$ 低温烘干,然后用高速中药粉碎机粉碎,以 75% 的乙醇作为提取溶剂,超声辅助提取。料液比 1:10 (g/mL),超声波频率 40 kHz,提取 3 次每次 30 min,400 目纱布过滤,合并滤液,1500 r/min,离心 30 min,收集上清液,低温旋蒸除去乙醇后冷冻干燥。取适量提取物溶于甲醇,得到 200 mg/mL 的储备液,过 0.20 μm 的微孔滤膜后存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 活性成分含量测定

1.2.2.1 总多酚含量的测定 总多酚含量的测定采用福林酚氧化法^[22]。在波长 765 nm 处测定吸光值,用甲醇溶液作为空白对照,以浓度 C(Y, $\mu\text{g/mL}$)对吸光值(X)作图,得到没食子酸的标准曲线。没食子酸浓度 $C=86.966\times A_{765}-7.0379$, $R^2=0.9987$ 。样品按照

相同的方法测定其吸光值,总多酚含量以每克提取物中的没食子酸含量计。

1.2.2.2 总黄酮含量的测定 总黄酮含量的测定采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[22]。在波长 510 nm 处测吸光值,用甲醇溶液作为空白对照,以浓度 $C(Y, \mu\text{g/mL})$ 对吸光值(X)作图,得到芦丁的标准曲线。芦丁浓度 $C=296.84 \times A_{510} - 15.207$, $R^2=0.9987$ 。样品按照相同的方法测定其吸光值,总黄酮含量以每克提取物中的芦丁含量计。

1.2.2.3 原花青素含量的测定 原花青素含量的测定采用香草醛-盐酸法^[23],于暗处反应 30 min,然后在波长 510 nm 处测吸光值,用甲醇溶液作为空白对照,以浓度 $C(Y, \mu\text{g/mL})$ 对吸光值(X)作图,得到儿茶素的标准曲线。儿茶素浓度 $C=415.1 \times A_{510} - 15.304$, $R^2=0.9994$ 。样品按照相同的方法测定其吸光值,原花青素含量以每克提取物中的儿茶素含量计。

1.2.2.4 黄酮类化合物组分测定 黄酮类化合物组分测定参照文献^[24]。

黄酮类化合物提取:取 10 mg PSE 加入 5 mL 离心管,加入 2000 μL 提取液 A(75% 甲醇含 1% 乙酸)涡旋 30 s 后冰水浴超声 60 min 后,12000 r/min 离心 15 min;取 1500 μL 上清液氮气吹干,加入 1500 μL 提取液 B(50% 甲醇含 0.1% 甲酸)复溶;涡旋 30 s 后冰水浴超声 15 min,12000 r/min 离心 15 min;取上清于 2 mL 进样瓶上机检测。

色谱条件:色谱柱:ACQUITY ULC BEH C_{18} 色谱柱(1.7 $\mu\text{m} \times 21 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$);柱温箱温度设为 40 $^{\circ}\text{C}$,自动进样器温度设为 8 $^{\circ}\text{C}$,进样体积为 2 μL 。液相色谱流动相,A:0.1% 甲酸水溶液;B:100% 乙腈;总流速为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$;流动相 B 梯度洗脱程序为:0~0.50 min,0%~10%;0.51~15.00 min,10%~60%;15.01~18.00 min,60%~98%;18.01~20.00 min,98%~10%。

质谱参数:数据采集时,以多反应监测(MRM)模式进行质谱分析。离子源参数如下:离子喷雾电压,+5000/-4500 V;气帘气压力,35 Psi;温度,500 $^{\circ}\text{C}$;离子源气体压力 1,55 Psi;离子源气体压力 2,60 Psi。

1.2.3 抗氧化能力的测定

1.2.3.1 DPPH 清除率测定 参照文献^[25],在暗处反应 20 min 后用酶标仪在波长 492 nm 处测吸光值。以甲醇作为空白对照,以 V_C 溶液作为阳性对照,按照以下公式计算清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为样品与 DPPH 反应后的吸光值, $A_{\text{对照}}$ 为样品本身的吸光值, $A_{\text{空白}}$ 为 DPPH 本身的吸光值。

1.2.3.2 ABTS⁺自由基清除率测定 参照文献^[25],取 10 μL 不同浓度的样品与 200 μL 0.1 mmol/L 的

ABTS 自由基工作液添加到 96 微孔板中,用酶标仪测在 734 nm 处测吸光值。以甲醇作为空白对照, V_C 溶液作为阳性对照,按照以下公式计算清除率:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为样品与 ABTS 反应后的吸光值, $A_{\text{对照}}$ 为样品本身的吸光值, $A_{\text{空白}}$ 为 ABTS 本身的吸光值。

1.2.3.3 还原力测定 参照文献^[26],取 1 mL 样品,先后向其中加入 2.5 mL pH6.6 的磷酸盐缓冲液,2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液,混匀,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸以及 0.5 mL 0.1% 三氯化铁,混匀,静置 10 min,于 700 nm 测吸光值,以超纯水为空白调零, V_C 溶液为阳性对照,吸光值越高,表明抗氧化效果越好。

1.2.4 α -葡萄糖苷酶活力抑制试验 参照文献^[27],取 0.4 mL 浓度为 0.04 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液(由 0.1 mol/L 的 pH6.8 磷酸盐缓冲溶液稀释配制而成)和不同浓度的样品于试管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,然后加入 0.2 mL 物质的量浓度为 0.5 mmol/L 的 pNPG 溶液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min 后加入 0.5 mL 物质的量浓度为 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应。室温静置 5 min 后,于波长 405 nm 处测吸光值。如表 1 所示,以适当浓度的阿卡波糖溶液作为阳性对照,以磷酸盐缓冲溶液作为空白调零。每组作 3 次平行重复,取平均值,按照以下公式计算清除率:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_0}\right) \times 100$$

式中: A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 分别表示空白对照管、样品管、样品对照管、对照管的吸光值。

表 1 α -葡萄糖苷酶活力抑制试验反应体系

Table 1 Experimental reaction system of α -glucoside enzyme vitality inhibition experimental reaction system

组别	酶溶液 (mL)	抑制剂 (mL)	PBS (mL)	pNPG (mL)	Na_2CO_3 (mL)
样品管	0.4	0.4	0	0.2	0.5
样品对照管	0	0.4	0.4	0.2	0.5
对照管	0.4	0	0.4	0.2	0.5
空白对照管	0	0	0.8	0.2	0.5

1.3 数据处理

所有试验数据均为 3 次平行试验,测试结果以平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。用 Excel 2019 软件和 SPSS 26.0 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 生物活性物质含量分析

2.1.1 生物活性物质总含量 由表 2 可知,PSE 的总多酚含量为(127.29 $\pm$ 5.16) mg/g,总黄酮含量较高,为

表 2 槟榔废弃籽中总多酚、总黄酮和原花青素的含量

Table 2 Total polyphenols, total flavonoids and progesterone content in processed betel nut seeds

指标	总多酚(mg没食子酸/g提取物)	总黄酮(mg芦丁/g提取物)	原花青素(mg儿茶素/g提取物)
含量	127.29±5.16	421.84±13.82	87.83±6.60

(421.84±13.82) mg/g, 而且含有一定的原花青素, 其含量为(87.83±6.60) mg/g。

由于提取方法的不同, 所得样品中的槟榔生物活性成分的含量也有所不同。张丹等^[28]以海南 9 月份的新鲜槟榔果为试验材料, 用 70% 的乙醇提取后又分别萃取了其乙酸乙酯部位和正丁醇部位, 槟榔提取物乙酸乙酯部位总多酚含量(7.47±0.047) mg/g 和总黄酮含量(121.25±1.25) mg/g 均大于正丁醇部位的总多酚含量(4.91±0.034) mg/g 和总黄酮含量(34.07±0.88) mg/g, 均小于本试验 PSE 的总多酚含量(127.29±5.16) mg/g 和总黄酮含量(421.84±13.82) mg/g。而唐敏敏等^[29]通过对成熟槟榔果的槟榔籽研究得出, 总多酚和原花青素的含量从大到小依次为: 正丁醇部位>乙酸乙酯部位>乙醇提取物>水相>石油醚部位, 总黄酮含量从大到小依次为: 乙酸乙酯部位>水相>正丁醇部位>乙醇提取物>石油醚部位。

另外, 不同的加工方法对活性物质的影响也有所不同。袁源等^[25]对经过不同炙法加工方式的槟榔果皮进行了研究, 结果表明: 经过不同炙法加工后总黄酮的含量、总酚和鞣质的含量均高于空白组(获得新鲜果皮后不进行任何加工, 只低温烘干而来), 其中空白组总黄酮含量为(3.76±0.62) mg/g, 总酚含量为(3.91±0.78) mg/g。总黄酮含量以姜炙法得到的样品

最高, 其含量为(6.96±0.36) mg/g, 酒炙法次之, 其含量为(5.50±0.47) mg/g, 干炙法和甘草炙法稍好, 其含量分别为(4.29±0.81)和(4.12±0.93) mg/g。总酚含量也以姜炙法得到的样品最高, 其含量为(8.54±0.69) mg/g, 其他加工方法所得提取物的总酚含量从高到低依次是酒炙法, 其含量为(7.53±0.41) mg/g, 干炙法, 其含量为(5.18±0.32) mg/g, 甘草炙法, 其含量为(4.77±0.62) mg/g。鞣质含量的趋势与总黄酮和总酚一致。

2.1.2 黄酮类化合物组分相对含量测定 黄酮类化合物(flavonoids)又名类黄酮, 泛指 2 个芳香环(A 环和 B 环)通过中央 3 个碳原子联接而成的一系列化合物, 基本骨架为 C₆-C₃-C₆。黄酮类化合物分为二氢黄酮(2H-flavanones)、黄酮(flavones)、异黄酮(isoflavones)、黄酮醇(flavonols)、黄烷醇(flavanols)和花色素六大类(anthoyanidins)^[30-31]。对多种细菌、真菌、病原体等致病微生物有抑制作用^[32], 同时具有扩张血管、降糖降脂、美白等功效, 有较高的实用开发价值^[33]。由表 2 可知, 总黄酮的含量最高, 为明确 PSE 中各黄酮类化合物组分的相对含量, 本实验筛选了 86 种黄酮类化合物作为标准品, 对 PSE 中的黄酮类化合物组分进行靶向定性鉴定。结果表明, 从 PSE 中共鉴定出 44 种黄酮类化合物, 表 3 列出了

表 3 PSE 中的类黄酮组分相对含量

Table 3 Relative contents of flavonoids in PSE

序号	化合物名称	分子式	保留时间(min)	质荷m/z	相对含量(%)
1	Cianidanol儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	3.64	290.94	77.27
2	L-Epicatechin表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	4.49	291.3	8.53
3	Procyanidin B1原花青素B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	2.95	579.5	4.66
4	Procyanidin B2原花青素B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	4.03	578.992	3.45
5	Rutin芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5.68	610.974	1.10
6	Ononin刺芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	8.19	431.4	0.71
7	Tangeretin桔皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	14.38	372.781	0.64
8	Isorhamnetin异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	10.58	317.085	0.45
9	Liquiritin甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	6.06	416.984	0.43
10	Chalconaringenin柑橘查耳酮	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.14	272.913	0.23
11	Nobiletin川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	13.18	403.4	0.23
12	Quercetin槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	8.88	300.89	0.20
13	Diosmetin香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	10.37	301.3	0.20
14	Apigenin-7-glucoside芹貳元-7-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6.98	432.967	0.20
15	Naringenin柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.11	273.3	0.19
16	Pinocembrin松属素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	13.62	257.3	0.18
17	Taxifolin花旗松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	6.31	304.802	0.13
18	Genkwanin芫花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	13.58	284.943	0.11
19	Eriocitrin圣草次苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	5.85	595.003	0.11
20	Isoliquiritigenin异甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	11.29	256.927	0.11
21	总计				99.11

20 种相对含量大于 0.10% 的黄酮类化合物,其中儿茶素的含量最高,为 77.27%,其次为表儿茶素(8.53%)、原花青素 B1(4.66%)、原花青素 B2(3.45%)等。原花青素又称缩合单宁,其基本组成单元被称为单倍体,一般指儿茶素和表儿茶素^[34],已有研究表明这些物质具有多种药理活性,是天然的自由基清除剂和抗氧化剂,具有抗衰老、抗辐射、抗肿瘤、抗癌变,预防心脑血管疾病,预防动脉粥样硬化等功能^[35-36]。

2.2 抗氧化能力

2.2.1 对 DPPH 自由基的清除作用 由图 1 可以看出,在实验浓度范围内,PSE 对 DPPH 自由基的清除能力与浓度呈正相关,即随着浓度的增加而增强。从总体上看,在任何一个相同浓度下,阳性对照 V_C 的清除能力均强于 PSE。当浓度范围是 0~1000 $\mu\text{g/mL}$ 时,PSE 的 DPPH 自由基清除率随浓度急剧增大,随后再增加浓度,清除自由基的能力基本不变。当浓度范围是 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,PSE 和 V_C 清除 DPPH 自由基的能力相差越来越大,然后随着浓度的增加,两者清除效率的差距逐渐变小,最终趋于不变。PSE 的 DPPH 自由基清除能力(IC_{50} 值为 (310.10 ± 0.62) $\mu\text{g/mL}$)弱于阳性对照组 V_C (IC_{50} 值为 (177.53 ± 0.89) $\mu\text{g/mL}$),约是 V_C 的二分之一,且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

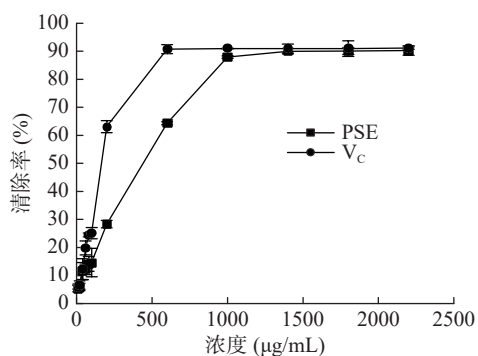


图 1 PSE 和 V_C 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1 Ability to scavenge DPPH radicals of PSE and V_C

Lin 等^[37]评价了产于海南槟榔果的种子清除 DPPH 自由基能力,结果显示,当提取物浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 DPPH 自由基的清除率为 60.37%。而本试验的 PSE 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 DPPH 自由基的清除率为 28.34%。由此可以看出,槟榔废弃籽虽然清除 DPPH 自由基能力相对较弱,但是仍然拥有一定的清除能力。张丹等^[28]研究结果表明,新鲜槟榔籽乙酸乙酯部位和正丁醇部位均有一定的 DPPH 自由基清除能力, IC_{50} 值分别为 14.60 和 44.32 $\mu\text{g/mL}$,均强于本试验 PSE 的 DPPH 自由基清除能力(IC_{50} 值为 310.10 $\mu\text{g/mL}$)。

由以上结果可以看出,不同的提取方法和不同的萃取部位均会对槟榔的清除 DPPH 自由基的能力产生不同程度的影响。新鲜槟榔在被加工成食用槟榔的过程中需要经过多个加工环节,而杀青、发籽等

工艺的高温和浸泡的工艺条件对槟榔籽中的抗氧化成分造成了流失或分解,从而使 PSE 的抗氧化作用相对减弱。

2.2.2 对 $ABTS^+$ 自由基的清除作用 由图 2 可以看出,在实验浓度范围内,PSE 对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力与浓度呈正相关,即随着浓度的增加而增强。从总体上看,在任何一个相同浓度下,阳性对照 V_C 的清除能力均强于 PSE。当浓度范围是 0~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,PSE 对 $ABTS^+$ 自由基清除率均随浓度的增大而急剧增大,随后再增加浓度,清除率几乎不变,当浓度是 600 $\mu\text{g/mL}$ 时,PSE 对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力几乎达到 100%。PSE 的 $ABTS^+$ 自由基清除能力(IC_{50} 值为 (150.10 ± 11.57) $\mu\text{g/mL}$)弱于阳性对照组 V_C (IC_{50} 值为 (64.12 ± 2.55) $\mu\text{g/mL}$),约是 V_C 的二分之一,且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

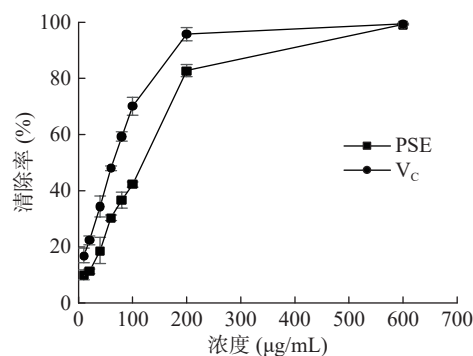


图 2 PSE 和 V_C 对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力

Fig.2 Ability to scavenge $ABTS^+$ radicals of PSE and V_C

Lin 等^[37]对产于海南槟榔果的种子清除 $ABTS^+$ 自由基能力进行了研究,当浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,PSE 对 $ABTS^+$ 自由基的清除率为 42.20%。本实验结果表明,当提取物浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 $ABTS^+$ 自由基的清除率为 45.27%,与本实验 PSE 对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力差异不大。由此可见,加工后的槟榔籽与鲜果的槟榔籽相比,对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力几乎没有减弱。而且,加工后的槟榔籽对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力(IC_{50} 值为 (150.10 ± 11.57) $\mu\text{g/mL}$)相比于对 DPPH 自由基的清除能力(IC_{50} 值为 310.10 $\mu\text{g/mL}$)较强。

2.2.3 还原 Fe^{3+} 的能力 还原能力与抗氧化活性有一定的相关性,因此还原能力的测定常用于评价抗氧化剂活性,而且这种方法的测定结果反映的不是针对某一种自由基的清除效果,而是被测物的总抗氧化能力,已经被应用于测定多种抗氧化物质^[38]。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。由图 3 可以看出,在实验浓度范围内,PSE 的还原能力总体低于 V_C ,但是两者相差不大,尤其是 200~2200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内。由图 3 可以看出,在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓

度范围内,随浓度的增加,两者的还原能力相差较大, V_C 的还原能力明显强于PSE,但是当浓度超过200 $\mu\text{g/mL}$ 时,在浓度相同的条件下,两者的还原能力差距变小,且随后差距基本维持不变。这个结果与DPPH以及ABTS自由基的清除能力测定结果相同,进一步说明了测定结果的可靠性。

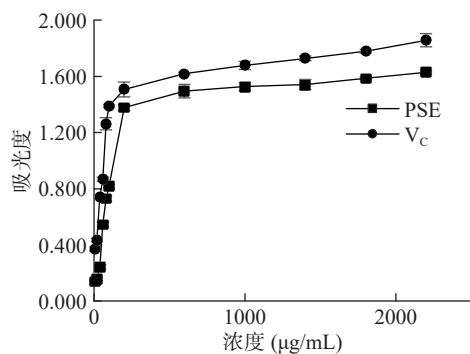


图3 PSE和 V_C 的还原能力

Fig.3 Reducing power of PSE and V_C

2.3 对 α -葡萄糖苷酶活力的抑制作用

由图4可知,PSE和阳性对照阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的活性均有抑制作用,PSE的抑制能力(IC_{50} 值为 $(90.10 \pm 1.89) \mu\text{g/mL}$),强于阳性对照阿卡波糖(IC_{50} 值为 $(453.60 \pm 4.02) \mu\text{g/mL}$)两者的降血糖能力具有显著差异($P < 0.05$)。另外,在实验浓度范围内,PSE和阳性对照阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随着浓度的增大而增大。

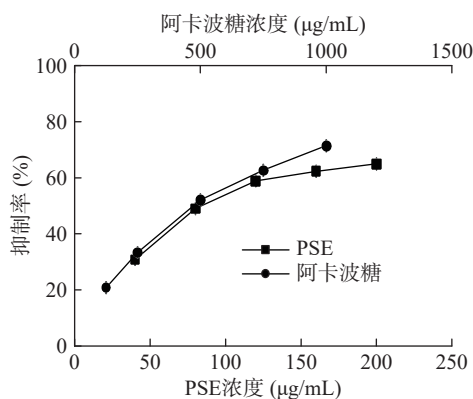


图4 PSE和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

Fig.4 Inhibition of PSE and acarbose on α -glucosidase activity

宋菲等^[39]对新鲜槟榔的种子进行了酶活力抑制试验,结果表明,槟榔籽提取物和阳性对照阿卡波糖的 IC_{50} 值分别为 (1.50 ± 0.31) 和 $(710 \pm 0.09) \mu\text{g/mL}$ 。由此可见,虽然相对于未加工的新鲜槟榔籽来说,加工后的槟榔籽对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用有所减弱,但是仍然具有一定的抑制作用,有开发成为降血糖药物的潜能。

3 讨论

槟榔原果的主要成分为31.1%的酚类,18.7%的多糖,14.0%的脂肪,10.8%的粗纤维,9.9%的水分,3.0%的灰分和0.5%的生物碱^[40],槟榔中的多酚

类物质主要是黄酮醇,包括10%的儿茶素,2.5%的表儿茶素和12%的无色花青素,其余的是不同聚合度的黄酮类化合物。槟榔经过加工其组分会发生不同程度的变化^[41]。本次试验研究结果表明,食用槟榔加工废弃籽富含总多酚、总黄酮、原花青素等多种活性物质,其含量受提取材料、提取方法以及加工方式的影响,含有大量的黄酮类化合物,其中儿茶素的相对含量高达77.27%。经过初步检测,PSE中各生物碱的含量为槟榔碱: $(13.75 \pm 0.04) \text{ mg/g}$;槟榔次碱: $(3.82 \pm 0.82) \text{ mg/g}$;去甲基槟榔碱: $(4.82 \pm 0.07) \text{ mg/g}$;去甲基槟榔次碱: $(3.98 \pm 0.10) \text{ mg/g}$ 。而槟榔生物碱是否对废籽提取物的生物活性产生影响,是正面的还是负面的,需要体内试验进一步研究。本试验测定出槟榔废弃籽具有一定的抗氧化能力,能够对DPPH自由基和 ABTS^+ 自由基在一定程度上进行清除,对 Fe^{3+} 具有一定的还原能力,而且还表明槟榔废弃籽具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制能力,其对 α -葡萄糖苷酶活力抑制的 IC_{50} 值为 $(90.10 \pm 1.89) \mu\text{g/mL}$,显著($P < 0.05$)强于阳性对照阿卡波糖,槟榔废弃籽具有被开发为治疗糖尿病药物的潜力。综上所述,对食用槟榔废弃籽进行回收,进而再加工利用是十分必要的,且对环境保护有重要意义。然而对于槟榔废弃籽的抗氧化和降血糖的具体机制还需要进一步探索。

参考文献

- [1] 贾哲,韩婷,刘欢,等.基于多元统计分析的食用槟榔及药用槟榔主要化学成分的含量对比研究[J].中华中医药杂志,2017,32(11):384. [JIA Zhe, HAN Ting, LIU Huan, et al. Comparative analysis of the determination of principal chemical components in edible betel nut and semen arecae based on multivariate statistical analysis[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017, 32(11): 384.]
- [2] 罗泉.槟榔产业与环境保护协调发展的可行性分析[J].东方企业文化,2015(9):231. [LUO Xiao. Feasibility analysis of coordinated development of betel nut industry and environmental protection[J]. Oriental Enterprise Culture, 2015(9): 231.]
- [3] 孙慧洁,龚敏.海南槟榔种植、加工产业发展现状及对策研究[J].热带农业科学,2019,39(2):94. [SUN Huijie, GONG Min. Current development status and countermeasures of arecanut planting and processing industry in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2019, 39(2): 94.]
- [4] 刘小靖,王鹏龙,项嘉伟,等.以中医药思维理解“食用槟榔”与“药用槟榔”[J].中草药,2021,52(1):248-254. [LIU Xiaojing, WANG Penglong, XIANG Jiawei, et al. Dispute between “edible Areca catechu” and “medicinal Areca catechu” under thinking of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(1): 248-254.]
- [5] 黄丽云,张玉锋,杨耀东,等.槟榔纤维研究进展[J].中国热带农业,2020(2):76-80. [HUANG Liyun, ZHANG Yufeng, YANG Yaodong, et al. Research on the areca nut fiber[J]. China Tropical Agriculture, 2020(2): 76-80.]
- [6] 黄群,高晓婷,简小鹏.槟榔保鲜及深加工工艺研究进展[J].食品工业,2021,42(2):251-254. [HUANG Qun, GAO Xiaoting,

- JIAN Xiaopeng. Research progress on preservation and deep processing technology of areca nut[J]. The Food Industry, 2021, 42(2): 251–254.]
- [7] TANG M M, CHEN H, WANG H, et al. Anti-fatigue effects of polyphenols extracted from *Areca catechu* L. husk and determination of the main components by high performance capillary electrophoresis[J]. Bangladesh Journal of Botany, 2016, 45: 783–790.
- [8] 田雪芬. 槟榔青果不同方法提取物生物活性研究[D]. 郑州: 河南大学, 2015. [TIAN Xuefen. Study on the biological activity of different methods of extracts from betel nut and green fruit[D]. Zhengzhou: Henan University, 2015.]
- [9] SUN M, YAN D, YANG X, et al. Quality assessment of crude and processed arecae semen based on colorimeter and HPLC combined with chemometrics methods[J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(10): 1.
- [10] GUPTA A K, TUISYAN S, THAKUR N, et al. Chemistry, metabolism and pharmacology of carcinogenic alkaloids present in areca nut and factors affecting their concentration[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP, 2019, 110: 104548.
- [11] YIN X J, WEI Y X, SONG W, et al. Melatonin as an inducer of arecoline and their coordinated roles in anti-oxidative activity and immune responses[J]. Food & Function, 2020, 10(1): 8383–9292.
- [12] 刘月丽, 徐汪伟, 周丹, 等. 海南槟榔提取物抗衰老作用研究[J]. 中国热带医学, 2017, 17(2): 123–125. [LIU Yuelik, XU Wangwei, ZHOU Dan, et al. Anti-ageing effects of betel nut extract grown in Hainan[J]. China Tropical Medicine, 2017, 17(2): 123–125.]
- [13] ONO M, MINAMOTO Y, SHIBATA S, et al. Attenuating effect of arecoline and physostigmine on an impairment of mealtime-associated activity rhythm in old rats[J]. *Physiol Behav*, 1995, 57(1): 189–191.
- [14] 陈冬梅, 慕邵峰, 汪海. 激活血管内皮细胞乙酰胆碱作用靶标的抗血栓作用及其分子机制[J]. *中国药理学通报*, 2002(5): 527–531. [CHEN Dongmei, MU Shaofeng, WANG Hai. Antithrombosis through activating endothelial target for acetylcholine and its molecular mechanism[J]. *Chinese Pharm Acological Bulletin*, 2002(5): 527–531.]
- [15] LIU Feilan, CHEN Chunliang, LAI Chienchi, et al. Arecoline suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation *in vitro* and attenuates LPS-induced bone loss *in vivo*[J]. *Phytomedicine*, 2020, 69: 153195.
- [16] 熊雄, 李珂, 易书瀚, 等. 食用槟榔中槟榔碱毒性及生理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 328–335. [XIONG Xiong, LI Ke, YI Shuhan, et al. Progress on toxicity and physiological activity of arecoline in edible areca[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(20): 328–335.]
- [17] JEONG J H, JUNG H, LEE S R, et al. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(2): 338–344.
- [18] GULCIN I, BERASHVILI D, GEPIREMEN A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla panchinensis* decne[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 101(1–3): 287–293.
- [19] 韩林, 黄玉林, 张海德, 等. 槟榔籽中抗氧化成分的提取及活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 157–159. [HAN Lin, HUANG Yulin, ZHANG Haide, et al. Study on the extraction of antioxidant components from betel nut seed and evaluation of their activities[J]. Food and Fermentation Industries Editorial Staff, 2009, 35(9): 157–159.]
- [20] 宋菲, 陈开健, 唐敏敏, 等. 槟榔多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制动力学研究[J]. 热带作物学报, 2021, 42(5): 1455–1461. [SONG Fei, CHEN Kaijian, TANG Minmin, et al. Inhibition kinetics of polyphenol extracts from areca nut on α -glucosidase activity[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(5): 1455–1461.]
- [21] 张璐, 郑亚军, 李艳, 等. 槟榔籽乙醇提取物抗氧化性的研究[J]. 食品研究与开发, 37(8): 1–4. [ZHANG Lu, ZHENG Yajun, LI Yan, et al. Study on the antioxidant of ethanol extraction from areca kernel[J]. Food Research and Development, 37(8): 1–4.]
- [22] KANG W, LI C, LIU Y. Antioxidant phenolic compounds and flavonoids of *Mitragyna rotundifolia* (Roxb.) Kuntze *in vitro*[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2010, 19(9): 1222–1232.
- [23] 房一明, 初众, 谷凤林, 等. 响应面法优化海南可可豆中原花青素的提取工艺[J]. 热带作物学报, 2020, 41(4): 779–786. [FANG Yiming, CHU Zhong, GU Fenglin, et al. Optimization of extraction of procyanidin from cocoa bean of hainan using response surface methodology[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(4): 779–786.]
- [24] LEI Z, SUMNER B W, BHATIA A, et al. UHPLC-MS analyses of plant flavonoids[J]. Current Protocols in Plant Biology, 2019, 4(1): e20085.
- [25] 袁源, 刘洋洋, 龚霄, 等. 不同炙法加工对大腹皮的抗氧化性比较及成分分析[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(8): 1870–1873. [YUAN Yuan, LIU Yangyang, GONG Xiao, et al. Comparison and component analysis of anti-oxidant effects of different moss methods on pot belly skin[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2020, 31(8): 1870–1873.]
- [26] 戴梓茹, 吴远清, 张晨晓, 等. 牡蛎肽酸奶工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(5): 25–30, 54. [DAI Ziru, WU Yuanqing, ZHANG Chenxiao, et al. Process and anti-oxidative activity *in vitro* of the oyster peptide yoghurt[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(5): 25–30, 54.]
- [27] XU Y, NIU X, LIU N, et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits[J]. *Food Chemistry*, 2018, 243: 26–35.
- [28] 张丹, 李丹, 许启泰, 等. 槟榔提取物不同部位的抗氧化性比较及成分研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 102–104, 109. [ZHANG Dan, LI Dan, XU Qitai, et al. Comparative study of anti-oxidant activity and ingredient in different parts of *Areca catechu* L. extract[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 102–104, 109.]
- [29] 唐敏敏, 宋菲, 陈华, 等. 槟榔籽提取物抗炎作用及化学成分研究[J/OL]. 热带作物学报: 1–20[2021-06-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20210226.1643.008.html>. [TANG Minmin,

- SONG Fei, CHEN Hua, et al. Anti-inflammatory effects and chemical constituent analysis of the ethanol extract of areca catechu seed extract[J/OL]. Chinese Journal of Tropical Crops: 1–20[2021-06-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20210226.1643.008.html>.]
- [30] WINKEL S B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 485–493.
- [31] 乔小燕, 马春雷, 陈亮. 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(2): 354–360, 207.
- [QIAO Xiaoyan, MA Chunlei, CHEN Liang. Plant flavonoid biosynthesis pathway and regulation of its important genes[J]. *Natural Product Research and Development*, 2009, 21(2): 354–360, 207.]
- [32] LEI X, YANG Y. Vitexin and an HMG-Co A reductase inhibitor prevent the risks of atherosclerosis in high-fat atherogenic diet fed rats[J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2020, 32(3): 2088–2095.
- [33] 谢沈阳, 杨晓源, 丁章贵, 等. 蒲公英的化学成份及其药理作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2012(S1): 141–151. [XIE S Y, YANG X Y, DING Z G, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of taraxacum mongolicum hand-mazz[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012(S1): 141–151.]
- [34] 朱月, 张海平, 侯亚男, 等. 黑果腺肋花楸原花青素的纯化及表儿茶素和原花青素 B2 含量测定[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(19): 240–244. [ZHU Yue, ZHANG Haiping, HOU Yanan, et al. Purification of black chokeberry procyanidins and determination of epicatechin and procyanidins B, by HPLC[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(19): 240–244.]
- [35] 张倩, 张民, 黄云霞, 等. 原花青素和儿茶素对小鼠辐射损伤的保护作用[J]. *中国食品添加剂*, 2014(4): 80–85. [QIAN Z, MIN Z, YUN-XIA H, et al. Effect of procyanidins and catechin on irradiation injured mice[J]. *China Food Additives*, 2014(4): 80–85.]
- [36] 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 Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(23): 6657–6662.
- [37] LIN H, HAI D Z, SHI S L, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total phenol from betel (*Areca catechu* L.) nut seed and evaluation of antioxidant activity *in vitro*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(46): 9289–9296.
- [38] 郭长江, 杨继军, 李云峰, 等. FRAP 法测定水果不同部分抗氧化活性[J]. *中国公共卫生*, 2003(7): 85–87. [GUO Changjiang, YANG Jijun, LI Yunfeng, et al. Antioxidant capacity of different parts of fruits determined by FRAP assay[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2003(7): 85–87.]
- [39] 宋菲, 张玉锋, 郭玉如, 等. 槟榔提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(13): 78–83.
- [SONG Fei, ZHANG Yufeng, GUO Yuru, et al. Inhibitory effects of areca nut extract on the activity of α -glucosidase[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(13): 78–83.]
- [40] 申秀丽, 段亮亮. 槟榔的化学成分及药理研究进展[J]. *宜春学院学报*, 2009, 31(2): 95–97. [SHEN Xiuli, DUAN Liangliang. Research on chemical composition and pharmacological of arecae[J]. *Journal of Yichun College*, 2009, 31(2): 95–97.]
- [41] 何双. 加工对槟榔功能特性影响的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2009. [HE Shuang. Studies on effect of processing on functional characteristic of areca nut extracts[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2009.]