

槟榔提取物对 DPPH 自由基的清除作用研究

张海德, 黄玉林, 范燕忠

(海南大学食品学院, 海南 儋州 571737)

摘 要: 采用氯仿、乙醇、水作溶剂从槟榔中依次提取三种部位提取物, 用清除 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)能力的方法在两种溶剂系统(乙醇和乙酸乙酯)中评价了提取物的清除自由基作用。结果表明, 在乙醇和乙酸乙酯溶剂中三种槟榔提取物都有清除 DPPH 自由基的能力, 等浓度槟榔提取物清除 DPPH 的能力大小依次为: 乙醇提取物>水提取物>氯仿提取物。

关键词: 槟榔提取物; 自由基; 1,1-二苯基苦基苯肼

Study on DPPH Radical Scavenging Ability of Raw Betel Nut Extract

ZHANG Hai-de, HUANG Yu-lin, FAN Yan-zhong

(College of Food Science, Hainan University, Danzhou 571737, China)

Abstract: Three extracts of raw betel nut were extracted by chloroform, ethanol and water orderly, and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging abilities were studied in two solvents (ethanol and ethyl acetate) separately. Results showed that the extracts of raw betel nut have the DPPH free radical scavenging abilities in ethanol and ethyl acetate solvent, and the order of the abilities these extracts at the same concentration is: ethanol extract > aqueous extract > chloroform extract.

Key words: betel nut extract; free radical; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

中图分类号: TS255.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)08-0074-04

槟榔果(*Areca catechu* L.)为棕榈科植物槟榔的种子, 槟榔果含槟榔油、槟榔碱、儿茶素、胆碱等, 有止泻治痢、消炎去肿、除痰息喘、泻气消水、杀虫去积等作用^[1], 适当嚼食能预防和治疗某些疾病。对槟榔活性成分的评价, 目前集中在抑制对胆固醇与甘油三酸酯的吸收, 降低血脂浓度^[2]; 抗炎作用, 抑制微生物生长作用^[3]等方面的研究。在其抗氧化、清除自由基方面的研究少见报道。

1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)是一种稳定的有机自由基, 以分光光度法测定加入待测样品后的吸光度的分析法, 是一种筛选自由基清除剂的简便方法, 在国内外有着广泛的应用^[4-5], 但尚未见文献报道将其用于评价槟榔提取物清除自由基的能力。本实验采用清除 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)有机自由基法研究了槟榔不同溶剂提取物的清除自由基作用, 其结果可为开发槟榔天然抗氧化产品提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

槟榔 海南大学海南热带植物园; 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) Sigma 公司; 氯仿、乙醇(95%)等试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

索氏提取器; HH-S_{21A} 数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂; RE52CS-2 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市英峪予华仪器厂; B-260 恒温水浴锅 上海亚荣生化仪器厂; 真空冷冻干燥器 美国 LABCONCO 公司; UV-2450 紫外及可见分光光度计 日本岛津公司; CP225D 微量天平 德国 Sartorius 公司。

1.3 槟榔仁有效成分的提取

称取一定量的槟榔仁(过 20 目筛), 加入 10 倍量的氯仿在 86℃ 水浴中回流 10h, 得氯仿提取液; 氯仿提取后的残渣加入 10 倍量的乙醇在 90℃ 水浴中回流 10h, 得乙醇提取液; 乙醇提取后的残渣加 10 倍量的蒸馏水在 40℃ 水浴中搅拌提取 2h, 真空抽滤后得水提取液。将氯仿、

收稿日期: 2008-05-21

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2007BAD76B03); 海南省自然科学基金项目(80519)

作者简介: 张海德(1970-), 男, 副教授, 博士, 主要从事热带农产品加工研究。E-mail: zhanghaide@163.com

乙醇和水的提取液分别旋转蒸发浓缩(40℃), 再经真空冷冻干燥(-50℃、0.012mbar), 得到固体物质, 备用。

1.4 有机自由基 DPPH 清除能力的测定^[6-7]

1.4.1 有机自由基 DPPH 的吸收光谱测定

称取 DPPH 试剂 12.80mg, 用乙醇和乙酸乙酯分别溶解, 转入 50ml 容量瓶中, 并定容至刻度, 摇匀得浓度为 256.1mg/L DPPH 储备液(约 6.5×10^{-4} mol/L), 置于冰箱中冷藏备用。使用前用乙醇和乙酸乙酯分别稀释至浓度为 25.61mg/L(约 6.5×10^{-5} mol/L), 室温下静置 10min 后放入紫外可见分光光度计(UV-2450)中扫描其吸收光谱(分别用乙醇和乙酯乙酯做参比溶液), 得出溶液的最大吸收波长。

1.4.2 清除 DPPH 的动力学监测

向 3.9ml DPPH 溶液(25.61mg/L)中分别加入 0.1ml 不同浓度(乙醇配制)的样品溶液, 反应总体积为 4.0ml, 在最大吸收峰的波长处测定随时间变化的吸收值的动力学趋势, 每 60s 取值 1 次直到相应的曲线达到稳定水平时, 记录吸收值(A_1), 同时分别测定 3.9ml DPPH 溶液(25.61mg/L)中加入 0.1ml 乙醇的吸收值(A_0)和 3.9ml 乙醇中加入 0.1ml 不同浓度样品的吸收值(A_2), 每个浓度重复 3 次。DPPH 清除率按下式计算。

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

1.4.3 在固定反应时间测反应体系的吸光度

按 1.4.2 方法, 分别加入不同浓度的槟榔氯仿、乙醇和水提取物, 体系在室温下反应一定时间(30min)后, 在 517nm 处测定各吸光度(A_1 、 A_2 、 A_0), 每个浓度重复 3 次, 按 1.4.2 方法计算 DPPH 清除率。

2 结果与分析

2.1 DPPH 的吸收光谱

每个 DPPH 分子在溶液中可生成一个稳定的含氮自由基, 具有典型紫色, 当它与提供 1 个电子的自由基清除剂作用时, 生成无色产物, 使溶液的典型紫色变浅。观察 DPPH 溶液在 400~600nm 波长区间的扫描光谱, 发

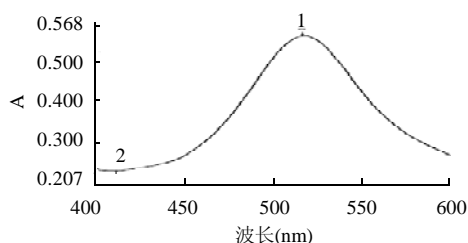


图1 DPPH 的吸收光谱(乙醇体系)

Fig.1 Absorption spectrum of DPPH(ethanol system)

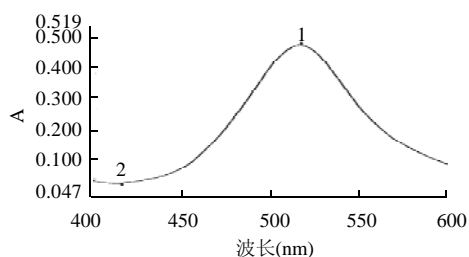


图2 DPPH 的吸收光谱(乙酸乙酯体系)

Fig.2 Absorption spectrum of DPPH(ethyl acetate system)

现在 517nm 处(A_{517})有最大吸收, 如图 1 和图 2 所示。

由图 1 和图 2 均可以看出, 有机自由基 DPPH 溶液在 517nm 处有特征吸收峰, 所以本实验用反应体系在波长 517nm 的吸光度来表示其 DPPH 含量的变化。

2.2 不同溶剂的槟榔提取物对 DPPH 自由基清除速率的影响

取浓度都为 0.025mg/ml 的氯仿、乙醇和水提取的三种槟榔提取物, 按 1.4.2 方法测定它们在乙醇和乙酸乙酯溶液中对 DPPH 自由基清除速率的影响。

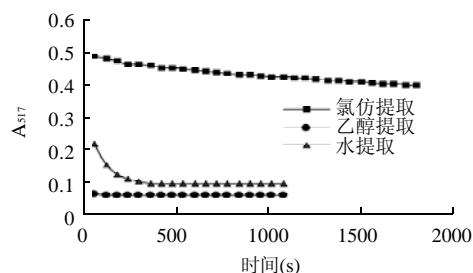


图3 不同溶剂的提取物对 DPPH 自由基清除率的影响(乙醇体系)

Fig.3 Effects of extracts by different reagents on rate of scavenging DPPH(ethanol system)

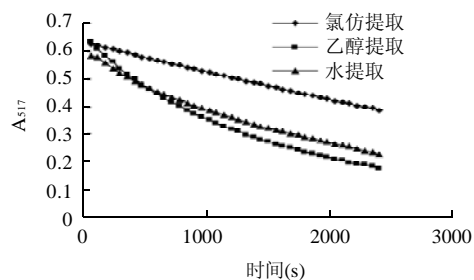


图4 不同溶剂的提取物对 DPPH 自由基清除率的影响(乙酸乙酯体系)

Fig.4 Effects of extracts by different reagents on rate of scavenging DPPH(ethyl acetate system)

样品溶液与 DPPH 溶液反应一段时间后, 其吸收值均有不同程度的下降, 表明采用氯仿、乙醇和水作溶剂的槟榔提取物均具有明显的清除自由基作用。在乙醇和乙酸乙酯两体系中清除 DPPH 自由基的速率存在明显的差别, 从图 3 中可以看出, 样品在乙醇体系中反应速率快, 约在反应进行 5~20min 后, 吸收值基本达到稳

定水平;同时可以看出,槟榔三种溶剂提取物的反应速率依次为:乙醇提取物>水提取物>氯仿提取物。从图4可以看出,样品在乙酸乙酯体系中反应速率比较缓慢,反应40min后才基本达到稳定水平,吸收值仍有下降的曲势;但可看出三种提取物的反应速率大小顺序基本同乙醇体系。样品在乙醇体系中比在乙酸乙酯体系中清除DPPH自由基的速率快。我们认为,造成溶剂体系对DPPH自由基清除速率的不同可能与样品所用溶剂(乙醇)有关,在计算DPPH清除率时应当要扣除溶剂的影响。

2.3 不同浓度槟榔提取物对DPPH自由基清除速率的影响

取相同溶剂、不同浓度的槟榔提取物,按1.4.2方法测定它们在乙醇和乙酸乙酯溶液中对DPPH自由基清除速率的影响。

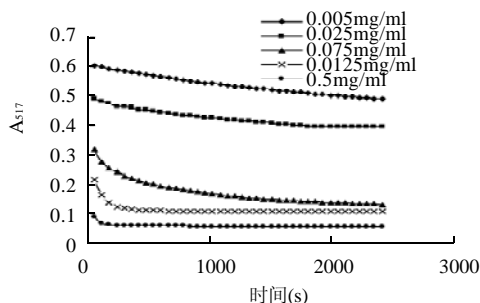


图5 氯仿提取物浓度对DPPH自由基的清除速率影响(乙醇体系)
Fig.5 Effects of concentration of chloroform extract on rate of scavenging DPPH free radical(ethanol system)

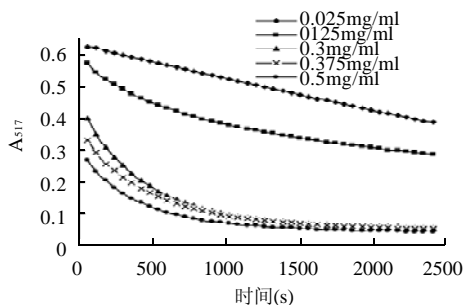


图6 氯仿提取物浓度对DPPH自由基清除速率的影响(乙酸乙酯体系)
Fig.6 Effects of concentration of chloroform extract on rate of scavenging DPPH free radical(ethyl acetate system)

从图5中可以看出,在较稀浓度即用量为0.005mg/ml时,反应速率比较缓慢,反应40min后未达到稳定水平,吸收值仍有下降的曲势。但在较高浓度即用量为0.125~0.5mg/ml时,反应速率较快,约在反应进行10~15min后,吸收值基本达到稳定水平。从图6中可以看出,在较稀浓度(0.025~0.125mg/ml)即用量较小时,反应速率比较缓慢,反应40min后未达到稳定水平,吸收值仍有下降的曲势。但在较高浓度(0.125~0.5mg/ml)即用量较大时,反应速率较快,约在反应进行20min后,吸收值基本达到稳定水平。研究表明,样品浓度对

DPPH自由基的清除速率有明显的影 响,当样品浓度低时所需反应的时间就长,速率变化慢,但样品达到一定浓度后,所需反应的时间短(10~15min),速率变化快,吸收值易达到稳定水平。

2.4 槟榔提取物对DPPH自由基的清除率

取相同浓度(0.025mg/ml)的槟榔氯仿、乙醇和水提取物,在DPPH系统中反应30min后,按1.4.3方法测定它们在乙醇和乙酸乙酯体系中的吸光值,并计算其对DPPH自由基的清除率,结果如图7所示。

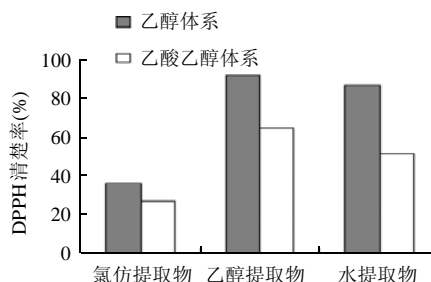


图7 不同溶剂提取物对DPPH自由基清除率的影响
Fig.7 Effects of extracts by different reagents on rate of scavenging DPPH free radical

从图7可以看出,氯仿、乙醇和水提取物在乙醇和乙酸乙酯体系中清除DPPH自由基的能力有明显的差异,相同溶剂的提取物在乙醇体系中所测得的DPPH清除率均比乙酸乙酯体系中的DPPH清除率高,其中均以乙醇提取物清除率最高,水提取物的清除率次之,最后才是氯仿提取物。分析可得,可能是不同溶剂对抗氧化物质的提取具有选择性,进而造成其对DPPH自由基的清除率不同。同时从图5、图6也可以看出,在较稀浓度即用量较少时,提取物对DPPH清除率随用量增加而增加,当用量超过0.25mg/ml时,清除率趋于恒定,不再增加。

3 结 论

3.1 研究了槟榔不同部位提取物在乙醇和乙酸乙酯两种体系中对DPPH自由基清除速率的影响,结果表明,其清除速率在乙醇体系中比在乙酸乙酯体系中快;在乙醇体系中提取物与DPPH的反应速率大小依次为:乙醇提取物>水提取物>氯仿提取物。

3.2 研究了不同浓度的槟榔提取物对DPPH自由基清除速率的影响,结果表明,样品浓度对DPPH自由基的清除速率有明显的影 响,当样品浓度低时所需反应的时间就长,速率变化慢,但样品达到一定浓度后,所需反应的时间短(10~15min),速率变化快,吸收值易达到稳定水平。

3.3 研究了不同溶剂的槟榔提取物对 DPPH 自由基的清除率, 结果表明, 相同溶剂的提取物在乙醇体系中所测得的 DPPH 清除率均比乙酸乙酯体系中的 DPPH 清除率高, 其中又以乙醇提取物的清除率最高, 水提取物的清除率次之, 最后才是氯仿提取物。同时, 在较稀浓度即用量较少时, 提取物对 DPPH 清除率随用量增加而增加, 当用量超过 0.25mg/ml 时, 清除率趋于恒定, 不再增加。

以上研究表明, 槟榔提取物具有清除自由基能力, 其有效成分目前虽然还未确定(有待进一步研究), 但是, 其结果将为槟榔天然抗氧化产品的开发提供依据。

参考文献:

- [1] 刘家福. 食品词典[M]. 上海: 上海辞书出版社, 1991: 536-537.
- [2] 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 & Metabolism*, 2001, 45 (6): 279-284.
- [3] ONGCO D C, TALAUE M, CRUZ L J, et al. MICs (Minimum inhibitory concentration) of betel oil against common clinical pathogens[J]. *Acta Manilana*, 1999, 47: 118-121.
- [4] COTELLEN N, BERNIER J L, CATTEAU J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, 20(1): 35-43.
- [5] SUN T, HO C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(4): 743-749.
- [6] BRANDWILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 1995, 28: 25-30.
- [7] TSIMOGIANNIS D, OREOPOULOU V. Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3V,4V-hydroxy-substituted flavonoids[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2004(5): 523-528.