

# 槟榔籽总酚提取工艺优化与抗氧化活性试验\*

韩林 张海德 李国胜 卢声慧 盛灵芝

(海南大学食品学院,海口 570228)

**【摘要】** 为了探索槟榔籽中总酚提取的最佳工艺参数,在单因素试验的基础上以提取温度、提取时间和液料比为试验因素,以总酚含量为响应值,采用三因素五水平的响应面分析法进行试验。结果表明,3个因素对槟榔籽总酚提取含量的影响大小顺序为:提取温度、液料比、提取时间;槟榔籽中总酚提取的最佳工艺参数为:提取温度 58℃、提取时间 4 h、液料比 47 mL/g,总酚含量的预测值为 148.09 mg/g,验证值为 146.63 mg/g。试验证明,响应面法对槟榔籽中总酚提取条件的优化是可行的,可用于实际预测。抗氧化活性试验表明,槟榔籽提取物具有较强清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基能力,其  $EC_{50}$  值分别为 145.62  $\mu\text{g/mL}$  和 139.38  $\mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:** 槟榔籽 总酚 提取 响应面法 抗氧化活性

**中图分类号:** S38; R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)04-0134-06

## Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activities of Total Phenol from Betel Nut Seed

Han Lin Zhang Haide Li Guosheng Lu Shenghui Sheng Lingzhi

(College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

### Abstract

Optimization of the extraction technology for total phenol from betel nut seed was carried out. On the basis of one factor tests, the method of response surface analysis with 3 factors including extracting temperature, time and solvent-material ratio on the content of total phenol was adopted. The optimal extracting conditions are as follows: extraction temperature 58℃; extraction time 4 h; solvent-material ratio 47 mL/g. The predicted value and measured value of total phenol is 148.09 mg/g and 146.63 mg/g, respectively. The results indicate that the obtained mode developed by response surface methodology is feasible for practical prediction. The experiments of antioxidant activity show that the betel nut seed extract presents the strong antioxidant activities to the DPPH and ABTS radical, and the  $EC_{50}$  is 145.62  $\mu\text{g/mL}$  and 139.38  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

**Key words** Betel nut seed, Total phenol, Extraction, Response surface methodology, Antioxidant activity

### 引言

槟榔(*Areca catechu* L.)为棕榈科槟榔属植物,主要分布在海南、台湾、广东和广西等地。槟榔果是槟榔的果实,含有多种活性物质,如槟榔碱、槟榔次碱和鞣质等。槟榔果中的鞣质主要为缩合鞣质,与

槟榔碱结合存在。近期一些研究发现,槟榔果具有许多功效,例如抗细菌、真菌、病毒和抗老化<sup>[1]</sup>,降低胆固醇<sup>[2-3]</sup>,抗氧化作用<sup>[4]</sup>等。槟榔籽作为槟榔果的种子,是槟榔咀嚼物加工的废弃物。本文以槟榔籽为原料,采用响应面法对其总酚的提取工艺进行优化,同时对提取物进行抗氧化活性测定,为槟榔

加工副产物的综合利用和高附加值产品的开发提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

槟榔采摘自海南大学儋州校区植物园,海南品种,破壳取槟榔籽,干燥后备用。儿茶素、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),均购自Sigma公司;2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS),购自Amersco公司;过硫酸钾、高氯化铁、铁氰化钾、三氯乙酸、无水乙醇等均为分析纯。

### 1.2 仪器

UV-2450型紫外可见分光光度计;HH-8型数显恒温水浴锅;HB12-44型粉碎机;CP225D型分析天平;101-1-BS型电热恒温鼓风干燥箱;LABCONCO型真空冷冻干燥器;Hettich 32R型冷冻离心机。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 总酚的测定

##### (1) 标准曲线的制作

配制0.1 g/L的儿茶素标准溶液,分别移取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL的标准溶液,加入1.0 mL的Folin-酚显色剂,3 min后加入1.0 mL浓度为1 mol/L的碳酸钠水溶液,用蒸馏水定容至10.0 mL,混合均匀后,室温下避光放置1 h,用紫外可见分光光度计在波长725 nm处测定吸光度<sup>[5]</sup>。以吸光度对浓度进行线性回归分析,求得回归方程为: $y = 69.232x + 0.0443$ ,  $R^2 = 0.9976$ 。研究表明,儿茶素浓度在此范围内与吸光度具有良好的线性关系。

##### (2) 样品测定

用移液枪精密移取50  $\mu$ L提取液,按标准曲线制作方法加入Folin-酚显色剂和碳酸钠水溶液,用蒸馏水定容至10.0 mL,混匀后置于暗处反应1 h,用紫外可见分光光度计在波长725 nm处测定吸光度,计算各样品中总酚的含量

$$C = \frac{m}{M} \quad (1)$$

式中  $m$ ——提取液中总酚的含量,mg

$M$ ——槟榔籽的质量,g

#### 1.3.2 总酚的提取

##### (1) 提取时间

称取1.00 g 槟榔籽粉末(20~40目),加入40 mL体积分数为70%乙醇,在50℃条件下分别浸提1、2、3、4、5 h,过滤,定容至40 mL,分别测定其总酚的含量。

##### (2) 提取温度

称取1.00 g 槟榔籽粉末(20~40目),放入盛有40 mL体积分数为70%乙醇溶液的锥形瓶中,分别于30、40、50、60、70℃水浴浸提4 h,过滤,定容至40 mL,分别测定其总酚的含量。

##### (3) 液料比

称取1.00 g 槟榔籽粉末(20~40目),分别加入20、30、40、50、60 mL提取溶剂,在50℃条件下浸提4 h,过滤,分别定容至原始体积,测定其总酚的含量。

##### (4) 响应面法试验设计

在单因素试验的基础上,以提取时间、提取温度和液料比3个因素为考察对象,采用响应面分析并设计试验,以获取最佳工艺参数。

#### 1.3.3 抗氧化活性的测定

在响应面试验得到的最佳提取工艺条件下对槟榔籽中的总酚进行提取,真空冷冻干燥后配制成不同浓度的样品溶液进行抗氧化活性测定。

##### (1) 清除DPPH自由基

准确移取3.9 mL质量浓度为25.61 mg/L的DPPH溶液,加入0.1 mL体积分数为70%的乙醇溶液,混匀,在波长517 nm处测吸光度 $A_c$ 。将槟榔籽提取物配制成50、100、150、200  $\mu$ g/mL的不同质量浓度,分别准确移取0.1 mL不同浓度的样品溶液,加入3.9 mL DPPH溶液(质量浓度为25.61 mg/L),混合均匀,室温避光反应30 min后于波长517 nm处测定吸光度 $A_i$ 。同时测定3.9 mL体积分数为70%的乙醇溶液中加入0.1 mL不同浓度样品溶液的吸光度 $A_j$ <sup>[6]</sup>。DPPH清除率为

$$S = \left( 1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right) \times 100\% \quad (2)$$

##### (2) 清除ABTS自由基

ABTS与一定浓度的过硫酸钾在暗处反应12~16 h,经活性氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 $ABTS \cdot^+$ ,然后加入提取物,若该提取物具有抗氧化活性,则会与 $ABTS \cdot^+$ 发生反应而使反应体系褪色<sup>[7]</sup>。取5.0 mL浓度为7 mmol/L的ABTS溶液,加入88.0  $\mu$ L浓度为140 mmol/L的过硫酸钾,在室温下置于暗处反应12~16 h,形成ABTS自由基储备液。在波长734 nm处,用体积分数为70%的乙醇将ABTS自由基储备液稀释至吸光度为 $0.70 \pm 0.02$ ,备用。准确移取0.1 mL不同质量浓度(50、100、150、200  $\mu$ g/mL)的样品溶液,加入3.9 mL  $ABTS \cdot^+$ 溶液,混匀,在室温下反应6 min,于波长734 nm处测定吸光度 $A_E$ <sup>[8-9]</sup>。同时移取3.9 mL  $ABTS \cdot^+$ 溶液,加入0.1 mL体积分数为70%的乙醇

溶液于波长 734 nm 处测定吸光度  $A_B$ 。ABTS 自由基清除率为

$$I = \frac{A_B - A_E}{A_B} \times 100\% \quad (3)$$

### (3) 还原力测定

在 2.5 mL pH 值为 6.6 的磷酸盐缓冲液中加入不同质量浓度 (50、100、150、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的样品溶液 2.5 mL 和质量分数 1% 的铁氰化钾溶液 2.5 mL, 混合均匀后在 50 $^{\circ}\text{C}$  下恒温 20 min, 冷却, 再加入 2.5 mL 质量分数 10% 的三氯乙酸溶液, 然后以 3000 r/min 离心分离 10 min, 取上层清液 5 mL, 加蒸馏水 5 mL 和质量分数 0.1%  $\text{FeCl}_3$  溶液 1.0 mL, 在波长 700 nm 处测定吸光度<sup>[10]</sup>。

### 1.3.4 统计学分析

使用 SAS 9.0 软件对数据进行统计学分析, 每组试验均重复 3 次, 试验数据表示为平均值  $\pm$  标准偏差。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 提取时间

提取时间对槟榔籽中总酚提取含量的影响如图 1 所示。提取液中总酚的含量随提取时间的增加而显著升高, 到 4 h 时达到最大值; 然后随提取时间增加其含量稍有下降, 原因可能是加热提取时间过长, 对总酚有一定的破坏作用。综合考虑, 提取时间以 3~5 h 为宜。

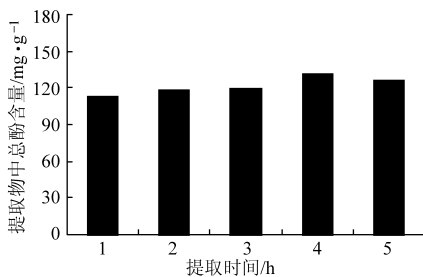


图 1 提取时间对总酚含量的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on the total phenols extracted from betel nut seed

#### 2.1.2 提取温度

提取温度对槟榔籽中总酚提取含量的影响如图 2 所示。提取液中总酚的含量随温度的上升而增加, 当温度达到 40 $^{\circ}\text{C}$  后, 其增加量不显著。考虑到温度过高对总酚稳定性的影响, 本试验的提取温度选择 40~60 $^{\circ}\text{C}$  为宜。

#### 2.1.3 液料比

不同液料比对槟榔籽中总酚提取含量的影响如图 3 所示。随着液料比的不断加大, 提取液中总酚

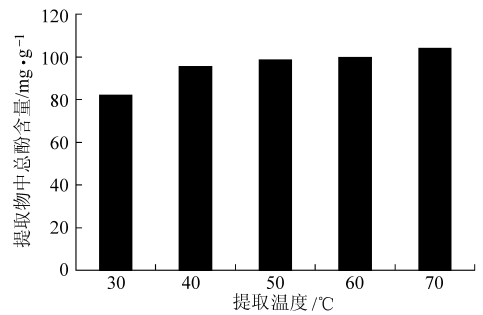


图 2 提取温度对总酚含量的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on the total phenols extracted from betel nut seed

的含量也显著加大, 当液料比为 50 mL/g 时总酚含量最大, 因此选择 30~50 mL/g 作为槟榔籽中总酚提取的液料比。

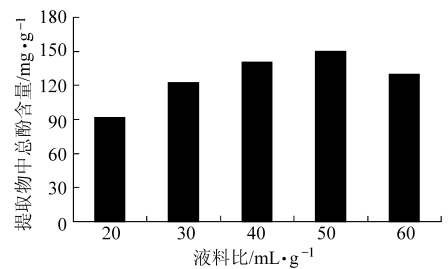


图 3 液料比对总酚含量的影响

Fig. 3 Effect of ratio of solvent to material on the total phenols extracted from betel nut seed

### 2.2 响应面法试验

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 综合单因素试验影响结果, 选取提取温度、提取时间和液料比 3 个因素, 采用三因素五水平的响应面分析方法<sup>[11]</sup>, 因素的水平编码如表 1 所示, 响应面分析方案及试验结果如表 2 所示。分析软件使用 SAS 9.0, 自编程序。

表 1 槟榔籽总酚提取响应面分析因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of central composite test on extraction of total phenols from betel nut seed

水平	因素		
	提取温度 $x_1/^{\circ}\text{C}$	提取时间 $x_2/\text{h}$	液料比 $x_3/\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
-1.68	33.2	2.32	23.2
-1	40.0	3.00	30.0
0	50.0	4.00	40.0
1	60.0	5.00	50.0
1.68	66.8	5.68	56.8

利用 SAS 9.0 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合, 得到总酚的含量对提取温度、提取时间和液料比的二次多项回归模型为

$$Y = 142.68 + 10.08X_1 + 10.65X_2 + 14.61X_3 - 12.20X_1^2 - 13.17X_1X_2 - 8.55X_2^2 + 1.81X_1X_3 - 11.27X_2X_3 - 17.80X_3^2 \quad (4)$$

模型的方差分析(表3)表明,此模型的复相关系数  $R^2$  为 0.9295,响应面回归模型达到极显著水平( $P=0.0010 < 0.01$ ),说明该二次模型能够拟合真实的试验结果,试验误差小<sup>[12]</sup>。表4的分析结果表明,在所选的各因素水平范围内,对结果影响的大小顺序为:提取温度、液料比、提取时间。其中, $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_3^2$ 对Y的影响极显著, $X_1^2$ 、 $X_1X_2$ 对Y的影响显著,而 $X_2^2$ 、 $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$ 对Y的影响不显著。

表2 槟榔籽总酚提取响应面试验设计方案及结果

Tab.2 Experimental design and result of central composite test on extraction of total phenols from betel nut seed

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	总酚含量 $Y/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	144.63
2	1	1	-1	127.34
3	1	-1	1	144.87
4	1	-1	-1	117.54
5	-1	1	1	136.58
6	-1	1	-1	127.79
7	-1	-1	1	124.10
8	-1	-1	-1	93.39
9	1.68	0	0	142.04
10	-1.68	0	0	124.57
11	0	1.68	0	145.90
12	0	-1.68	0	128.00
13	0	0	1.68	137.99
14	0	0	-1.68	117.42
15	0	0	0	136.47
16	0	0	0	146.06
17	0	0	0	143.43
18	0	0	0	143.78

表3 回归模型的方差分析

Tab.3 Analysis of variance of the regression model

回归模型	自由度	平方和	复相关系数	F值	P值
线性	3	2071.625352	0.6382	24.13	0.0002
平方	3	640.485347	0.1973	7.46	0.0105
交互	3	304.996196	0.0940	3.55	0.0674
模型	9	3017.106895	0.9295	11.71	0.0010

从提取温度与提取时间响应面和等高线图(图4a)可以看出其交互效应显著,提取温度对槟榔

表4 二次多项式回归模型系数的显著性检验结果

Tab.4 Regression coefficients of predicted quadratic polynomial model

参数	自由度	估计值	标准差	T值	P值
截距	1	-349.347646	84.890209	-4.12	0.0034
$X_1$	1	6.533368	1.853486	3.52	0.0078
$X_2$	1	69.88857	17.147563	4.08	0.0036
$X_3$	1	7.19237	1.714756	4.19	0.0030
$X_1^2$	1	-0.043233	0.015065	-2.87	0.0208
$X_1X_2$	1	-0.466538	0.189152	-2.47	0.0389
$X_2^2$	1	-3.030979	1.506492	-2.01	0.0790
$X_1X_3$	1	0.006401	0.018915	0.34	0.7438
$X_2X_3$	1	-0.399363	0.189152	-2.11	0.0677
$X_3^2$	1	-0.063066	0.015065	-4.19	0.0031

籽中总酚提取含量的影响比提取时间大,表现为等高线呈椭圆形。由图4b和图4c可以看出,提取温度与液料比之间,以及提取时间与液料比之间的交互效应不显著。

由SAS分析得到响应值最大时,提取温度、提取时间、液料比对应的编码值分别为  $X_1 = 0.453996$ 、 $X_2 = -0.015802$ 、 $X_3 = 0.438489$ ,对应的槟榔籽中总酚提取的最佳条件为:提取温度  $57.6^\circ\text{C}$ ,提取时间 3.9 h,液料比  $47.4 \text{ mL/g}$ ,总酚含量的理论值为  $148.09 \text{ mg/g}$ 。

为了验证响应面法的可行性,选择提取温度为  $58^\circ\text{C}$ ,提取时间为 4 h,液料比为  $47 \text{ mL/g}$ 对槟榔籽中总酚进行提取验证试验。3次平行试验得到实际平均总酚含量为  $146.63 \text{ mg/g}$ ,与理论值相比,其相对误差约为 0.99%。因此,响应面法对槟榔籽中总酚提取条件的优化是可行的,具有实际应用价值。

### 2.3 抗氧化活性的测定

槟榔籽提取物的抗氧化活性试验结果如表5所示。从表可以看出,槟榔籽提取物对DPPH自由基和ABTS自由基均有一定的清除能力,且随质量浓度的增加而增强,其 $\text{EC}_{50}$ 值分别为  $145.62 \mu\text{g/mL}$ 和  $139.38 \mu\text{g/mL}$ 。并且,提取物质量浓度与DPPH自由基清除率和ABTS自由基的清除率之间具有较好的线性关系, $R^2$ 分别为 0.9121和 0.9918。

许多研究表明<sup>[13-14]</sup>,抗氧化活性与还原力之间普遍存在相关性,可通过测定还原力来表示抗氧化活性的强弱,吸光度越高,还原能力越强。由表5可知,槟榔籽提取物具有一定的还原能力,与自由基清除率相似,随提取物质量浓度的增加而增强。

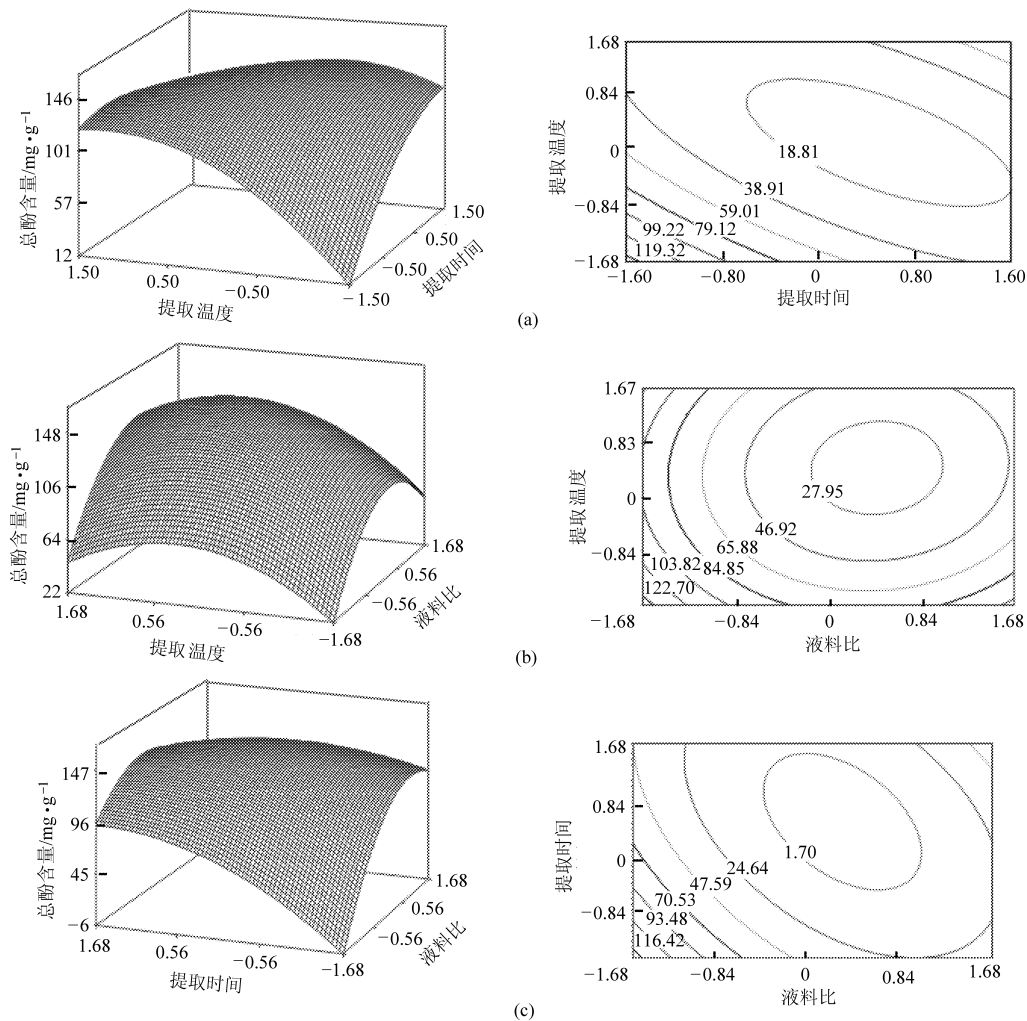


图4 因素交互作用对总酚含量影响的响应面与等高线

Fig.4 Response surface and contour for effects of interaction of various factors on response value of total phenolic content from betel nut seed

(a) 提取温度与提取时间 (b) 提取温度与液料比 (c) 提取时间与液料比

表5 槟榔籽提取物抗氧化活性试验结果

Tab.5 Result of antioxidant activity of extraction from betel nut seed

提取物质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	DPPH 自由基清除率/%	ABTS 自由基清除率/%	还原力
50	$17.86 \pm 1.48^c$	$19.68 \pm 0.76^d$	$0.43 \pm 0.01^d$
100	$40.42 \pm 0.55^b$	$38.35 \pm 0.55^c$	$0.74 \pm 0.03^c$
150	$57.50 \pm 1.11^a$	$55.56 \pm 0.65^b$	$1.00 \pm 0.01^b$
200	$60.37 \pm 0.74^a$	$67.82 \pm 0.33^a$	$1.46 \pm 0.01^a$
线性方程	$y = 0.2892x + 7.8879$	$y = 0.3233x + 4.9383$	$y = 0.0067x + 0.0735$
$R^2$	0.9121	0.9918	0.9839
$EC_{50}$	145.62	139.38	

注:不同的小写字母表示该列数据存在显著差异( $P < 0.05$ )。

### 3 结论

(1) 通过单因素试验,确定了各因素对槟榔籽提取物中总酚含量的影响规律。选取因素水平值的理想范围进行响应面试验及回归分析,确定了最佳提取工艺参数为:提取温度 $58^{\circ}\text{C}$ 、提取时间4h、液料比47 mL/g,总酚含量的预测值为 $148.09\text{ mg/g}$ ,验证

值为 $146.63\text{ mg/g}$ ,重复性试验结果较好,可为进一步的试验研究奠定基础。

(2) 抗氧化活性试验表明,槟榔籽提取物具有较强的清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基能力,且随提取物质量浓度增加而增强,呈良好的线性关系,其 $EC_{50}$ 值分别为 $145.62\ \mu\text{g/mL}$ 和 $139.38\ \mu\text{g/mL}$ 。还原力测定试验也得出相似的结果。

## 参 考 文 献

- 1 Lee K K, Cho J J, Choi J D. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from areca catechu as a new anti-ageing agent[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2001, 23(6): 341 ~ 346.
- 2 Jeon S M, Kim H S, Lee T G, et al. Lower absorption of cholesteryl oleate in rats supplemented with *areca catechu* L. extract [J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2000, 44(4): 170 ~ 176.
- 3 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.
- 4 Guota P C, Warnakulasuriya S. Global epidemiology of areca nut usage[J]. Addiction Biology, 2002(7): 77 ~ 83.
- 5 Duan X J, Zhang W W, Li X M, et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*[J]. Food Chemistry, 2006, 95(1): 37 ~ 43.
- 6 Sun Ting, Ho C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 743 ~ 749.
- 7 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(9): 1231 ~ 1237.
- 8 Stéphanie Dudonné, Xavier Vitrac, Philippe Coutière, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays[J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(5): 1768 ~ 1774.
- 9 Fang Z X, Zhang Y H, Yuan L Á, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 884 ~ 888.
- 10 董欢欢,曹树稳,余燕影. 半枝莲、白花蛇舌草及其药对提取物抗氧化及清除自由基活性[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 782 ~ 786, 802.  
Dong Huanhuan, Cao Shuwen, Yu Yanying. Antioxidant and free radical scavenging activities of extracts from *Scutellaria barbata* D. Don, *Hedyotis diffusa* wild and their combination [J]. Natural Product Research and Development, 2008, 20(5): 782 ~ 786, 802. (in Chinese)
- 11 Wang Jing, Sun B G, Cao Y P, et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 804 ~ 810.
- 12 刘钟栋,李坤,高莉,等. 蔗糖多酯合成工艺的响应面法优化[J]. 农业机械学报, 2008, 39(2): 85 ~ 88.  
Liu Zhongdong, Li Kun, Gao Li, et al. Study on synthesis of sucrose polyester by response surface method [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(2): 85 ~ 88. (in Chinese)
- 13 Shon M Y, Kim T H, Sung N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochactaceae*) extracts [J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 593 ~ 597.
- 14 Dorman H J D, Kosar M, Kahlos K, et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars [J]. J. Agric. Food Chem., 2003, 51(6): 4563 ~ 4569.
- 15 黄阿根,董瑞建,鲁茂林,等. 茶树花多酚粗提物分离纯化及抗氧化性[J]. 农业机械学报, 2008, 39(12): 107 ~ 111.  
Huang Agen, Dong Ruijian, Lu Maolin, et al. Separation and purification of polyphenols crude extracts from tea flower (*Camellia sinensis* L O kuntze) and their antioxidative activities [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(12): 107 ~ 111. (in Chinese)