

● 中药研究 ●

引用:赵河,方良子,邹笃准,舒骏,陈佳伟,左丰琪,张海潮,张万祥,蔡萍,秦优. 基于 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术对不同加工方式槟榔抗氧化活性的研究[J]. 湖南中医杂志,2024,40(6):158-161.

基于 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术 对不同加工方式槟榔抗氧化活性的研究

赵河^{1,2},方良子^{1,2},邹笃准^{1,2},舒骏^{1,2},陈佳伟³,左丰琪³,张海潮^{1,2},张万祥^{1,2},蔡萍¹,秦优¹

(1. 湖南省中医药研究院中药资源研究所,湖南长沙,410013;

2. 湖南中医药大学,湖南长沙,410208;

3. 湖南中医药高等专科学校,湖南株洲,412012)

[摘要] 目的:采用 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术对不同加工方式槟榔的抗氧化活性成分进行研究。方法:通过不同溶剂提取槟榔中的活性物质,并比较不同加工方式的槟榔抗氧化能力。利用 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术对不同加工方式的槟榔抗氧化活性物质进行筛选鉴定。结果:槟榔甲醇提取部位的抗氧化活性最强;鲜果的抗氧化活性能明显高于青果和烟果;鲜果和青果的主要抗氧化活性成分为儿茶素及其二倍体,烟果的主要抗氧化成分为 5-羟甲基糠醛。结论:提出了一种槟榔中抗氧化活性物质的快速鉴定方法,且不同加工方式槟榔抗氧化活性成分存在差异性。

[关键词] 槟榔;抗氧化;DPPH;HPLC-Q-TOF-MS

[中图分类号]R285.5 **[文献标识码]**A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2024.06.037

槟榔(*areca catechu* L.)为棕榈科植物槟榔的干燥果皮,广泛分布在南亚、东南亚。其以中药名为大腹皮收录于《中国药典》,功能行气宽中、利水消肿,用于湿阻气滞、脘腹胀闷、水肿胀满、脚气浮肿、小便利等^[1]。现代研究显示槟榔具有多药理活性,包括兴奋胃肠道平滑肌、促进胃动力^[2]、促进纤维蛋白溶解、杀绦虫等^[3]。此外,在东南亚热带和亚热带国家中,槟榔也被作为日常食物,大约 4000 万人在食用槟榔^[4]。

按加工方式,槟榔可分为鲜果槟榔、青果槟榔及烟果槟榔。鲜果槟榔顾名思义即为槟榔皮经过晒干或晾干而成的干燥果皮。青果槟榔因加工所用的槟榔干果为青果,表皮呈青灰色,在深加工过程中均遵循青果生产标准,故在槟榔行业内称为青果槟榔^[5]。烟果槟榔是指槟榔鲜果在加工成槟榔干果的过程中,利用烟熏的办法进行加工得到的一

种槟榔^[6]。海南当地将青果称为白果,将烟果称为黑果。

目前,对槟榔抗氧化活性的研究多是针对一类化合物,如总多酚类成分^[7]、总黄酮类成分^[8]、槟榔籽及花的提取物^[9]等,而对具体的抗氧化活性成分物质研究较少,尤其是结合快速的活性物质筛选与鉴定方法的研究。DPPH-HPLC-Q-TOF 技术具有高选择性、高灵敏度等特性,能够快速筛选并鉴定出中药材或食品中的抗氧化活性成分^[10]。因而,本研究采用 DPPH 抗氧化活性检测法对不同加工方式槟榔抗氧化能力进行对比,继而采用 DPPH-HPL-Q-TOF 技术对其抗氧化活性成分进行快速筛选与鉴定,明确槟榔不同加工方式的抗氧化活性物质。

1 仪器与试剂

1290 Series 型高效液相色谱系统(安捷伦科技公

基金项目:湖南省教育厅科研项目(19A365);湖南省创新平台与人才计划—2021 年省优秀博士后创新人才项目(2021RC2101);湖南省中医药科研计划项目[C2022040(A2022005-1),C2022044(A2022005-5)]

第一作者:赵河,男,硕士,研究方向:中药制剂与中药资源综合开发

通信作者:秦优,女,博士后,副研究员,研究方向:中药分析,E-mail:qinyou2018@163.com

司),配四元泵,在线脱气伐,柱温箱,DAD 检测器;6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS/MS(安捷伦科技公司);月旭 AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240 型电子分析天平(METTLER)。甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国 TEDIA 公司);水为怡宝纯净水[华润怡宝饮料(中国)有限公司];1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH,分析纯,美国 Sigma 公司);其余试剂为分析纯。实验所用的 3 种不同加工方式槟榔样品均购于海南省安定市,分别为鲜果槟榔(S1-6)、青果槟榔(S7-12)、烟果槟榔(S13-18),经湖南省中医药研究院刘浩助理研究员鉴定均为棕榈科植物槟榔的干燥果皮。

2 方法与结果

2.1 槟榔不同提取溶剂抗氧化活性对比研究

2.1.1 DPPH 溶液的制备 取 DPPH,精密称定,加甲醇溶解并定容于 500 ml 容量瓶,配置成浓度为 4.71 mg/100 ml 的 DPPH 溶液,于 4℃ 避光保存。

2.1.2 槟榔不同提取溶剂提取液的制备 取新鲜槟榔(S1)适量,置烘箱 55℃ 低温烘干。粉碎,过三号筛。取槟榔 60 g,平均分成 6 份,精密称定,分别加水、甲醇、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯及石油醚 50 ml,超声提取 30 min,滤过,定容于 50 ml 容量瓶,分别得到槟榔不同提取溶剂提取液。

2.1.3 槟榔不同提取溶剂提取液抗氧化能力比较 取上述样品,稀释成不同倍数,按照 1 ml 提取液与 2 ml DPPH 溶液混合,涡旋数秒钟,避光 30℃ 反应 30 min,于 517 nm 下进行紫外检测。记录最终吸光度 A₁ 和 A₂。自由基清除率(%)=(A₁-A₂)/A₁ × 100%[公式(1)]。A₁ 为空白组,即提取溶剂与 DPPH 溶液混合液的吸光值;A₂ 为不同浓度样品与 DPPH 溶液混合液的吸光值。通过上述公式,计算槟榔不同溶剂提取液自由基清除率,评估不同提取溶剂的抗氧化能力强弱,从而确定最佳提取溶剂。IC₅₀ 值为自由基清除率为 50% 时样品的浓度。维生素 C 作为阳性对照。

2.2 槟榔不同加工方式抗氧化活性对比研究

2.2.1 槟榔不同加工方式样品溶液制备 取鲜果槟榔(S1-6)、青果槟榔(S7-12)、烟果槟榔(S13-18)样品适量,低温 55℃ 烘干,粉碎,过三号筛。取不同品种槟榔,每份 10 g,分别加 50 ml 甲醇超声 30 min,

放置室温,过滤,滤液定容至 50 ml 容量瓶。

2.2.2 槟榔不同加工方式抗氧化能力比较 取上述样品溶液,稀释成不同倍数,按照 1 ml 样品提取液与 2 ml DPPH 溶液的比例进行混合,涡旋数秒钟,避光 30℃ 反应 30 min,按照公式(1)进行计算。

2.3 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术对不同加工方式槟榔抗氧化成分的筛选与鉴定

2.3.1 样品的制备 取“2.2.1”项制备的鲜果槟榔样品溶液 1 ml,平分 2 份,分别加入 0.5 ml 甲醇溶液与 0.5 ml DPPH 溶液,涡旋数秒使之充分混合,于 37℃ 避光反应 30 min,分别得到样品原液(样品溶液与甲醇混合液)与样品反应液(样品溶液与 DPPH 溶液混合液)。空白溶液即为 0.5 ml 甲醇与 0.5 ml DPPH 溶液按上法操作所得。青果槟榔和烟果槟榔制备与检测同鲜果槟榔。

2.3.2 色谱条件 月旭 AQ-C₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相甲醇(A):0.1%甲酸水,参考文献[11]设计梯度洗脱程序:0~5 min,5%~10%A;5~10 min,10%~15%A;10~15 min,15%~18%A;15~20 min,18%~20%A;20~25 min,20%~22%A;25~28 min,22%~25%A;28~32 min,25~30%A;32~37 min,30%~50%A;37~45 min,50%~55%A;45~50 min,55%~60%A。流速 0.7 ml/min,检测波长 280nm、254nm、230nm,柱温 30℃,进样量 10 μl。流动相使用前超声脱气。

2.3.3 质谱条件 电喷雾离子化,ESI 离子源,干燥气体温度 350℃,干燥气体流速 8 L/min,鞘气温度 350℃,鞘气流速 11 L/min,毛细管电压 3.5 kV,检测电压 1.0 kV,碰撞电压 150 kV,离子扫描范围 100~1000 m/z。

2.4 结果

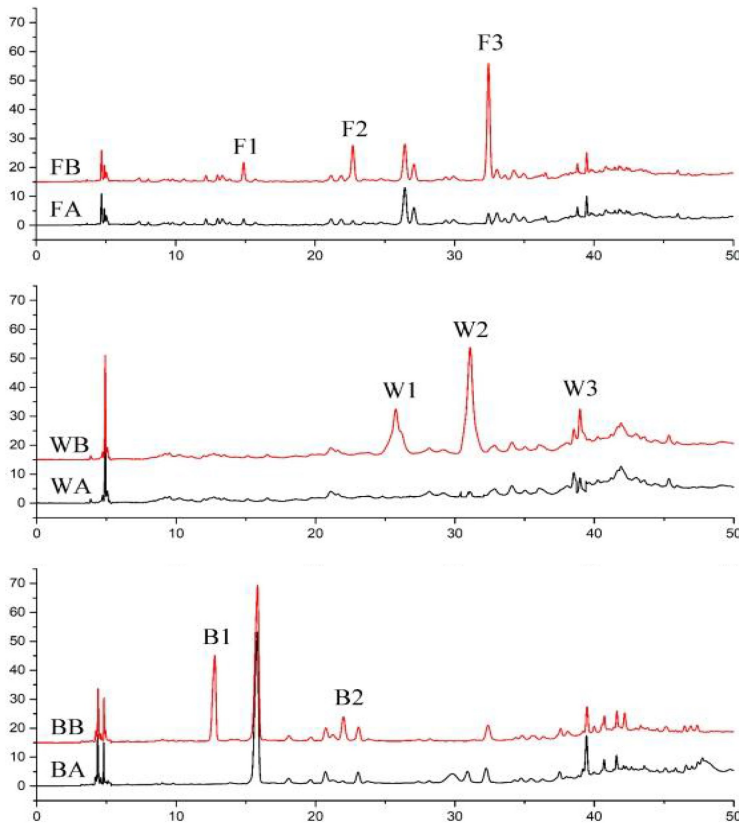
2.4.1 槟榔不同提取溶剂抗氧化活性比较 通过对鲜果槟榔不同提取溶剂提取液 IC₅₀ 值可知,甲醇提取液的抗氧化活性明显高于乙醇、水、正丁醇、乙酸乙酯、石油醚。石油醚提取液未能成功测定其清除率。(见表 1)

表 1 槟榔不同提取溶剂抗氧化活性对比结果

提取溶剂	IC ₅₀ 值/mg · ml ⁻¹	提取溶剂	IC ₅₀ 值/mg · ml ⁻¹
水	1.73±0.21	正丁醇	21.63±0.33
甲醇	0.66±0.10	乙酸乙酯	26.38±0.47
乙醇	0.79±0.13	石油醚	未检测出
维生素 C	0.03±0.02		

2.4.2 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术对不同加工方式槟榔抗氧化成分的筛选与鉴定 通过 DPPH-HPLC 对其抗氧化成分进行快速筛选,并采用 Q-TOF-MS 技术所筛选的抗氧化成分进行鉴定(见图 1、表 2)。结果可知,不同加工方式槟榔抗氧化成分有所区别,本次实验从不同加工方式槟榔中共筛选出 7 种抗氧化成分。鲜果(新鲜槟榔)特有的抗氧化成分是苯丙氨酸、儿茶素及其二聚体;青果槟榔特有的抗氧化成分为儿茶素及其二聚体;烟果槟榔特有的抗氧化成分是 5-羟甲基糠醛。鲜果和青果槟榔抗氧化成分差异不大,均含有儿

茶素、儿茶素异构体及儿茶素二聚体,而这几个成分在烟果槟榔中均未检测到。烟果槟榔特有的抗氧化成分是 5-羟甲基糠醛,与鲜果和青果的化学成分差较大,这或许与槟榔的加具有有一定联系。鲜果槟榔和青果槟榔的干燥方式均为晾干^[12]。而烟果槟榔在加工成槟榔干果的过程中,则是利用烟熏的办法将其熏干^[13]。因而可以推导,在熏制过程中儿茶素、儿茶素异构体及儿茶素多聚体被破坏,同时其他物质在这个过程中产生了新的化合物。故不同加工方式对槟榔的抗氧化物质影响比较大。



注:FB—鲜果原液,FA—鲜果反应液;WB—青果原液,WA—青果反应液;BB—烟果原液,BA—烟果反应液。

图 1 DPPH-HPLC 对不同加工方式槟榔抗氧化活性物质的筛选结果

表 2 不同加工方式槟榔差异性抗氧化成分 HPLC-Q-TOF-MS 分析结果

Peak No.	tR/min	离子峰归属	m/z (偏差)	MS2	波长/nm	分子式	名称	鲜果	烟果	青果
B1	12.374	M+H	145.0490 (2.91)	127.0382,99.0440,71.0496	298	C ₆ H ₈ O ₄	3-Hydroxyadipic acid 3,6-lactone	-	+	-
F1	14.241	M+H	166.0857 (3.38)	120.0806,103.0543	268	C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸*	+	-	-
B2	20.348	M+H	127.0386 (3.31)	109.0280,71.0136,53.0394	218,276	C ₆ H ₆ O ₃	5-羟甲基糠醛*	-	+	-
F2	22.899	M+H	579.1489 (1.38)	427.1019,409.1011,291.0910	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素二聚体	+	-	-
W1	26.178	M+H	579.1492 (1.18)	427.1013,409.0890,291.0836	233,279	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素 B1*	+	-	+
W2&F3	31.416	M+H	291.0864 (0.18)	273.0758,249.0760,207.0639, 161.0517,139.0333,123.0461	226,278	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素*	+	-	+
W3	39.323	M+H	291.0863 (0.61)	207.0652,161.0529,139.0386,123.0436	238,278	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素*	+	-	+

注:* 化合物经标准品鉴定。

3 结 论

本研究采用 DPPH 法对不同加工方式槟榔抗氧化能力进行了对比,并采用 DPPH-HPLC-Q-TOF-MS 技术对其抗氧化成分进行快速筛选与鉴定。研究表明,不同加工方法槟榔均具有一定抗氧化活性,但不同的加工方式对槟榔的抗氧化能力及成分具有一定影响。鲜果和青果抗氧化能力相近,且二者抗氧化活性成分主要为儿茶素及其二聚体类化合物。相比而言,烟果槟榔抗氧化能力较弱,且抗氧化活性成分与前两者存在较大差异。烟果槟榔儿茶素类化合物在加工的过程中被完全破坏,本研究结果对槟榔的开发与应用具有科学指导价值。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 朱金照, 冷恩仁, 周文. 大腹皮促胃肠动力作用的机制研究[J]. 解放军医学杂志, 2000(2): 133-134.
- [3] 韩腾飞, 高昂, 巩江, 等. 大腹皮药理学研究概况[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8382, 8384.
- [4] 范海阔, 黄丽云, 唐龙祥, 等. 槟榔生产消费现状及存在的问题[J]. 安徽农业科学, 2007(13): 4044-4045.
- [5] 陈耕, 刘忠义. 食用青果槟榔加工工艺研究[J]. 食品科技,

2009, 34(8): 80-83.

- [6] 郑仕宏, 张海德, 何双, 等. Folin-Ciocalteus 法测定槟榔中多酚含量的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(6): 165-169.
- [7] 李专, 祁静, 赵松林. 槟榔壳多酚组分及抗氧化活性的测定[J]. 热带作物学报, 2012, 33(4): 717-725.
- [8] 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.
- [9] 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, 163.
- [10] YOU, QIN, LIN, et al. Screening and identification of antioxidants from *ophiocyrticeps xuefengensis* (oscomycetes) by Using DPPH-HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2018, 20(9): 887-899.
- [11] ZHAO C P, YIN S J, CHEN G I, et al. Adsorbed hollow fiber immobilized tyrosinase for the screening of enzyme inhibitors from *Pueraria lobata* extract [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021 (193): 113743.
- [12] 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.
- [13] 周文化, 李忠海, 张海德, 等. 不同槟榔果常规营养成分和槟榔碱含量分析[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 27-30.

(收稿日期: 2023-12-02)

[编辑: 韩晗]

(上接第 142 页)

- [31] 王芹丹, 陈光辉, 冯雪瑾, 等. 化痰消癆方治疗阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 40 例临床观察[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(3): 181-182.
- [32] 易晓明, 彭小娜. 鼻渊通窍颗粒配合持续气道正压通气治疗老年阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的效果研究[J]. 上海医药, 2023, 44(10): 31-34.
- [33] GOTTLIEB E, LANDAU E, BAXTER H, et al. The bidirectional impact of sleep and circadian rhythm dysfunction in human ischaemic stroke: A systematic review[J]. Sleep Med Rev, 2019, 45: 54-69.
- [34] ZHAO E, CHEN S, DU Y, ZHANG Y. Association between Sleep Apnea Hypopnea Syndrome and the Risk of Atrial Fibrillation: A Meta-analysis of cohort study[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 5215868.
- [35] LI Y. Splenic infarction associated with obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: A case report[J]. J Int Med Res, 2020, 48

(10): 300060520954691.

- [36] CONSTANTINIDIS J, ERELIADIS S, ANGOURIDAKIS N, et al. Cytokine changes after surgical treatment of obstructive sleep apnoea syndrome[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008, 265(10): 1275-1279.
- [37] SHAMSUZZAMAN AS, WINNICKI M, LANFRANCHI P, et al. Elevated creatine protein in patients with obstructive sleep apnea [J]. Circulation, 2002, 105(21): 2462-2464.
- [38] ENIZIAN P, LINNEMANN K, SCHLAAK M, et al. Obstructive sleep apnea and circadian rhythms of hormones and cytokines[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(3): 1080-1086.
- [39] SUGIYAMA A, SHIOTA S, YANAGIHARA M, et al. The role of long-term continuous positive airway pressure in the progression of obstructive sleep apnoea: A longitudinal cohort study[J]. J Sleep RES, 2021, 30(6): e1337.

(收稿日期: 2023-12-26)

[编辑: 徐琦]