

槟榔籽提取物对血管紧张素转化酶（ACE）活性的抑制作用研究

于鑫^{1,2}, 唐敏敏^{2,3}, 罗家欣^{2,4}, 宋菲^{2,3}, 朱婷婷⁴, 陈华^{2,3}, 赵松林^{2,3*}

1. 华中农业大学食品科学与技术学院, 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. 海南省槟榔工程技术研究中心, 海南文昌 571339; 4. 海南热带海洋学院食品科学与工程学院 海南三亚 572022

摘要: 以嫩果期槟榔籽为研究对象, 采用 75%乙醇浸提制得槟榔籽提取物 (areca nut extract, ANE), 再分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次对总提取物进行萃取, 依次得到嫩果期槟榔籽 75%乙醇提取物的石油醚部位 (PE-ANE)、乙酸乙酯部位 (EAC-ANE)、正丁醇部位 (BU-ANE)、水部位 (W-ANE) 的萃取部分。通过体外抑制血管紧张素转化酶 (ACE) 活性抑制试验测定槟榔提取物各极性部位对高血压的抑制潜力; 通过酶动力学实验分析 ACE 抑制活性最好的极性部位对 ACE 活性的抑制作用类型; 测定不同极性部位蛋白质、总糖及多酚的总含量, 并分析其与 ACE 半抑制浓度 (IC_{50}) 之间的相关性; 最后对 4 种不同极性部位萃取物中的多酚组分进行初步定量。结果表明: 嫩果期槟榔籽提取物各极性部位均具有一定的 ACE 抑制活性, 其中 EAC-ANE 的 ACE 抑制活性最好。酶动力学实验表明, EAC-ANE 对 ACE 活性的抑制作用类型为竞争与非竞争的混合型抑制。相关性分析表明, 各极性部位 ACE 的 IC_{50} 值与多酚、总糖及蛋白质含量均呈显著负相关, 且与多酚含量之间具有极强相关性 ($r=-0.912$)。在 4 个极性部位中定量了儿茶素、L-表儿茶素、原花青素 B₂、原儿茶酸、槲皮素等多种多酚组分, 且 EAC-ANE 中的相关多酚组分含量最高。综上所述, 槟榔提取物具有一定的降血压潜力, 且乙酸乙酯萃取部位最好, 多酚含量与各萃取部位的 ACE 抑制活性具有极强的相关性, 可初步推断多酚是槟榔提取物中抑制 ACE 活性的重要物质。

关键词: 槟榔提取物; 血管紧张素转化酶; 抑制作用; 酶动力学

中图分类号: R285 文献标识码: A

Inhibitory Effects of Areca Nut Extract on the Activity of Angiotensin Converting Enzyme

YU Xin^{1,2}, TANG Minmin^{2,3}, LUO Jiabin^{2,4}, SONG Fei^{2,3}, ZHU Tingting⁴, CHEN Hua^{2,3}, ZHAO Songlin^{2,3*}

1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 2. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China; 3. Hainan Betel Nut Engineering Technology Research Center, Wenchang, Hainan 571339, China; 4. College of Food Science and Engineering, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572022, China

Abstract: In this study, 75% ethanol solution was used to prepare the total extracts of arecanut nut (ANE). Then different fractions of the extracts were prepared by fractionating with petroleum ether (PE-ANE), ethyl acetate (EAC-ANE), *n*-butanol (BU-ANE) and water (W-ANE) in turn. The inhibition of hypertension from ANE was determined by angiotensin converting enzyme (ACE) activity inhibition assay *in vitro*. The inhibitory was evaluated with the fraction displaying the best ACE inhibitory activity by the enzyme kinetic method. In addition, the contents of total polyphenols, total sugar and total protein in each fraction of ANE were determined. The correlation between the contents of the compositions and ACE inhibitory activities was analyzed. Finally, phenolic components in the four fractions were ana-

收稿日期 2022-09-26; 修回日期 2023-01-04

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 322RC791); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2022XDNY205)。

作者简介 于鑫 (1999—), 女, 学士, 研究方向: 槟榔加工。*通信作者 (Corresponding author): 赵松林 (ZHAO Songlin), E-mail: 13807610690@126.com。

lyzed. The results showed that all the fractions of ANE at different polar parts exhibited ACE inhibitory activity, and EAC-ANE displayed the best. Enzyme kinetics tests showed that the inhibitory effect of EAC-ANE from tender areca on ACE was a mixed type of competitive inhibition and non-competitive inhibition. The correlation analysis showed that the IC_{50} value of the ACE inhibitory activity of each polar part of ANE was significantly negatively correlated with the content of polyphenols and total sugar. And the absolute value of the correlation coefficient between the IC_{50} value of ACE inhibitory activity and the polyphenol content reached a very strong correlation ($r=-0.912$). And a variety of polyphenol components such as catechin, L-epicatechin, procyanidin B₂, procatechuic acid, and quercetin were identified in the four different polar parts, and the content of polyphenol components in EAC-ANE was the highest. In conclusion, ANE has a certain blood pressure lowering potential, and the ethyl acetate extraction site is the best, and the polyphenol content has a strong correlation with the ACE inhibitory activity of each extract. It can be preliminarily inferred that polyphenols may be the main substances that inhibit the activity of ACE in ANE.

Keywords: areca nut extract; angiotensin converting enzyme (ACE); inhibitory activity; enzyme kinetics

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.03.016

槟榔 (*Areca catechu* L.) 属棕榈科槟榔属常绿乔木, 在我国主要种植于海南和台湾等地。近些年传统槟榔干食用消费市场发展迅速, 槟榔已逐渐成为海南省的经济支柱产业。然而, 无论是卷土重来的“致癌”风波, 还是槟榔去食品化, 都使槟榔产业面临巨大挑战。另一方面, 槟榔作为四大南药之首, 具有利水、灭虫、截疟等功效^[1]。现代研究表明, 槟榔富含多酚、多糖和生物碱等物质, 这些物质具有多重活性功能。然而长期以来, 槟榔药用价值的研究和开发利用严重不足。因此, 深度系统挖掘槟榔药用价值, 对促进槟榔产业的健康可持续发展具有重要意义。

血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 是机体血压调节系统中调控血压升高的关键酶^[2-3]。多项研究表明 ACE 抑制剂可有效控制高血压疾病的发生^[4]。现临床常用的 ACE 抑制剂, 降压效果较好, 但却常伴有高钾血症、肾功能不全等严重副作用^[5-7]。相较于这些药物中的化学合成成分, 天然产物中活性成分的安全性更高, 因此寻找天然来源的 ACE 抑制剂成为众多研究者关注的焦点。

目前对槟榔的活性功能研究主要有抗氧化、抗衰老、抗炎等方面, 但槟榔降血压的相关报道较少。鉴于此, 本研究以槟榔嫩果作为供试对象, 研究槟榔提取物对 ACE 活性的抑制作用, 并初步探索其相关活性物质, 以期为槟榔药用价值的挖掘和利用提供基础研究数据, 同时为天然降血压抑制剂的开发提供原料来源。

1 材料与方法

1.1 材料

槟榔: 采自中国热带农业科学院椰子研究所

科研实验基地, 槟榔嫩果为授粉后 150 d 左右的果实。采果后, 将果实对半切开, 取出籽进行冷冻干燥后, 粉碎, 过 60 目筛, 备用。

试剂: 血管紧张素转化酶, 上海颖心实验室设备有限公司; 马脲酰-组氨酰-亮氨酸 (HHL), 上海源叶生物科技有限公司; 卡托普利, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 邻苯二甲醛 (OPA), 没食子酸、葡萄糖、牛血清蛋白 (纯度 $\geq 98\%$), 上海麦克林生化科技有限公司; 儿茶素、原花青素 B₂、槲皮素等多酚标准品, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。

仪器与设备: TYSP-200 型高速多功能粉碎机, 浙江永康市红太阳机电有限公司; THD-T1 型超声波发生器, 深圳市电科超声波有限公司; FDU-1200 型冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司; RE-5205 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; UV-1600 紫外可见分光光度计, 上海翊艺仪器有限公司; Varioskan Flash 型全自动荧光免疫分析仪, 美国 Thermo Scientific 公司; LCMS8050 型号液质联用仪, 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 槟榔提取物的制备 按照前期研究^[8]的方法制备槟榔的石油醚部位 (PE-ANE)、乙酸乙酯部位 (EAC-ANE)、正丁醇部位 (BU-ANE) 和水部位 (W-ANE) 的粉末状提取物。取少量以上部位溶于二甲基亚砜 (DMSO), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.2 ACE 活性的抑制作用研究 槟榔提取物的不同极性萃取部位对 ACE 活性抑制试验方法参考张晓峰等^[9]的方法, 并稍作改动。采用 0.05 mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 为 8.3, 含 0.05 mol/L NaCl) 配制 ACE 酶液 (0.025 U/mL) 及底物 HHL

溶液（5 mmol/L）。以 2 mL EP 管作为反应容器，依次添加 0.10 mL HHL 底物溶液、0.05 mL 样品液和 0.10 mL ACE 液，充分混匀后置于 37 ℃ 的水浴锅中反应 30 min，反应完成后加入 1.50 mL 的 0.3 mol/L NaOH 溶液及 0.10 mL 的 2% OPA 溶液（溶于无水乙醇），室温下静置 10 min，最后利用 0.20 mL 的 3 mol/L HCl 溶液终止反应。于激发波长 340 nm、发射波 455 nm 条件下，测定最终反应

液的荧光强度。同时设置空白组、空白对照组和样品对照组。卡托普利作为阳性对照（CK⁺）。根据上述反应程序及表 1 中不同组别的反应体系，分别加入相应试剂进行反应。每个样品平行试验 3 次，计算抑制率。样液的 ACE 抑制率计算公式为：ACE 抑制率=[1-(I_A-I_C)/(I_B-I_D)]×100%。式中，I_A 为样品组荧光强度；I_C 为样品对照组荧光强度；I_B 为空白组荧光强度；I_D 为空白对照组荧光强度。

表 1 ACE 活性抑制试验反应体系

Tab. 1 Reaction system of inhibition activity against on ACE					mL
试剂 Reagent	样品组 Sample group	样品对照组 Sample control group	空白组 Blank group	空白对照组 Blank control group	
HHL	0.10	0.10	0.10	0.10	
样品	0.05	0.05	0.00	0.00	
ACE	0.10	0.00	0.10	0.00	
硼酸缓冲液	0.00	0.10	0.05	0.15	
0.3 mol/L NaOH	1.50	1.50	1.50	1.50	
2% OPA	0.10	0.10	0.10	0.10	
3 mol/L HCl	0.20	0.20	0.20	0.20	

1.2.3 ACE 抑制作用的酶动力学实验 （1）抑制类型的动力学实验。酶动力学试验参考文献[10-11]中的方法，并稍作修改。固定底物 HHL 的浓度（5 mmol/L），改变 ACE 的浓度（0.0125、0.025、0.0375、0.050、0.0625 U/mL），添加 0.05 mL 不同浓度的极性部位样品液（0、1.0、2.5 mg/mL），充分混匀后于 37 ℃ 水浴反应 10 min，反应后加入 1.50 mL 的 0.3 mol/L NaOH 溶液与 0.10 mL 的 2% OPA 溶液（溶于无水乙醇），室温下静置 10 min，最后添加 0.20 mL 的 3 mol/L HCl 溶液终止反应。于激发波长 340 nm、发射波 455 nm 处测定反应体系的荧光强度，记录数据，计算酶反应速率（V，ΔA/min），以该酶浓度下，单位时间内吸光度值的变化量来表示反应速率。根据酶反应速率与酶浓度之间的变化关系，以酶浓度为横坐标、酶反应速率为纵坐标作图，分析其抑制类型是否可逆。

（2）可逆抑制类型的酶动力学实验。固定 ACE 浓度（0.025 U/mL），改变反应底物 HHL 溶液浓度（1、2、4、5、7.5 mmol/L），改变不同萃取部位样品液浓度（0、1.5、2.0 mg/mL），于 37 ℃ 水浴反应 10 min，反应完成后加入 1.50 mL 的 0.3 mol/L NaOH 溶液及 0.10 mL 的 2% OPA 溶液（溶于无水乙醇）混匀，室温下静置 10 min，最后添加 0.20 mL 的 3 mol/L HCl 溶液终止反应。于激发波长 340 nm、发射波 455 nm 处测定反应体

系的荧光强度。记录数据，计算反应体系的反应速率（V，ΔA/min），以底物浓度（S）的倒数（1/S）为横坐标、反应速率 V 的倒数（1/V）为纵坐标，绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线，分析 ACE 活性抑制作用较好的萃取部位对 ACE 呈现的抑制类型。

1.2.4 活性成分含量测定 （1）多酚含量测定。测定方法参照文献[12]中的福林酚氧化法进行。取 1 mL 一定浓度的萃取部位样品液于具塞试管中，与 5 mL 10%福林酚试剂混匀后反应 3~8 min，继续加入 5 mL 7.5%碳酸钠溶液，摇匀，室温避光条件下反应 60 min。在波长 595 nm 处测定样品溶液的吸光值。测得没食子酸标准曲线为 $y=0.0093x+0.0695$ （ $R^2=0.9992$ ），有效浓度范围为 0~100 μg/mL，对照没食子酸标准曲线计算多酚含量。

（2）总糖含量测定。测定方法参照文献[13]中的苯酚-硫酸法进行，并根据实际情况稍作修改。取 1 mL 一定浓度的萃取部位样品液于具塞试管中，与 1 mL 5%苯酚溶液混匀后尽快加入 5 mL 的浓硫酸溶液。室温静置 15 min 后，再于 30 ℃ 水浴放置 15 min，取出冷却至室温。在波长 490 nm 处测定样品溶液的吸光值。测得葡萄糖标准曲线为 $y=0.0106x-0.0409$ （ $R^2=0.9967$ ），有效浓度范围为 0~100 μg/mL，对照葡萄糖标准曲线计

算总糖含量。

(3) 总蛋白含量测定。测定方法参照文献[14]中的考马斯亮蓝法进行。取 1 mL 一定浓度的萃取部位样品液于具塞试管中, 添加 5 mL 0.01% 考马斯亮蓝试剂, 摇匀后静置 3 min, 于 40 °C 水浴 15 min, 取出后冷却至室温。在波长 595 nm 处测定样品溶液的吸光值。测得牛血清蛋白标准曲线为 $y=0.0042x-0.0172$ ($R^2=0.9940$), 有效浓度范围为 0~100 $\mu\text{g/mL}$, 对照牛血清蛋白标准曲线计算蛋白质含量。

1.2.5 多酚成分分析 采用岛津 LCMS8050 型号液质联用仪对多酚组分进行分析, 根据前期的类黄酮广靶研究结果^[10], 选取所需标准品, 配置成所需进样浓度 (1~20 $\mu\text{g/mL}$), 备用。

色谱参数: 色谱柱选用 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (1.7 $\mu\text{m} \times 21 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$); 柱温箱温度设为 40 °C, 自动进样器温度设为 8 °C, 进样体积为 2 μL 。流动相 A 为 3% 乙酸水溶液, 流动相 B 为 100% 甲醇; 总流速为 100 $\mu\text{L/min}$ 。流动相 B 梯度洗脱程序为: 0~6.00 min, 10%~30%; 6.01~10.00 min, 30%~40%; 10.01~30 min, 40%~70%; 30.01~40.00 min, 70%~10%; 40.01~55.00 min, 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, 离子喷雾电压为 +5000/-4500 V; 气帘气压力为 35 psi; 温度为 500 °C; 离子源气体压力 1 为 55 psi; 离子源气体压力 2 为 60 psi。

1.3 数据处理

采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计与分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 利用 Pearson 相关系数分析相关性。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 槟榔提取物对 ACE 活性的抑制作用

1977 年, FRIEDLANG 等^[15]建立了荧光光度法来测定 ACE 抑制剂的活性, 其原理是利用 ACE 水解产物的组氨酸部分在碱性条件下与邻苯二甲醛反应生成荧光物, 通过测定加入抑制剂前后荧光物质的吸光度差值来计算其抑制活性。槟榔提取物的不同极性部位及卡托普利 (CK⁺) 对 ACE 活性的抑制作用见图 1。由图 1 可知, PE-ANE、EAC-ANE、BU-ANE、W-ANE 四个极性部位对

ACE 活性均具有一定的抑制作用, 并且随着质量浓度的增加, 其抑制率也逐渐增加, 呈现出浓度依赖性。在试验浓度范围内, EAC-ANE 表现出较好的 ACE 抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $(1.51 \pm 0.07) \text{ mg/mL}$, 且其对 ACE 的抑制活性显著优于其他 3 个极性部位 ($P < 0.05$)。BU-ANE 和 W-ANE 的 ACE 抑制活性较弱, IC_{50} 值分别为 $(2.15 \pm 0.04) \text{ mg/mL}$ 和 $(2.19 \pm 0.07) \text{ mg/mL}$; PE-ANE 的抑制活性最弱, IC_{50} 值为 $(6.92 \pm 0.34) \text{ mg/mL}$, 但 4 个极性部位的抑制活性均低于 CK⁺, CK⁺ 的 IC_{50} 值为 $(5.53 \pm 0.32) \times 10^{-6} \text{ mg/mL}$ 。

溶剂萃取法依据“相似相溶”原理溶解样品中的可溶有机质, 实现可溶有机组分的分离与富集。在活性试验中, 该方法多用于极性相似化学成分分离及富集。王兰等^[16]对翼蓼块根提取物在乙酸乙酯、正丁醇及水 3 个萃取部位的 ACE 抑制活性进行研究, 表明, 乙酸乙酯部位对 ACE 的抑制活性为 39.76%, 显著优于其他 2 个极性部位, 且 3 种极性部位的 ACE 抑制效果也呈现浓度依赖性, 这与本研究结果类似。综上所述, 在进一步的 ACE 抑制动力学研究中, 选取抑制活性相对较好的 EAC-ANE 进行后续试验。

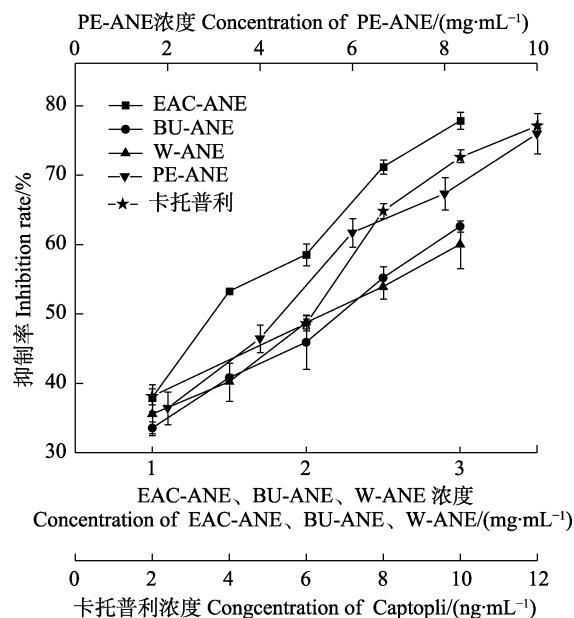


图 1 槟榔提取物不同极性部位对 ACE 活性的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effect of different polar parts of areca nut extract on ACE activity

2.2 EAC-ANE 对 ACE 活性的抑制类型

根据酶抑制剂与酶结合的作用方式及特点, 可将酶的抑制作用分为可逆抑制与不可逆抑制 2

种。当测定酶抑制作用的反应体系中不存在抑制剂时, 反应速率曲线会通过直角坐标系的原点; 当存在不可逆抑制剂时, 其反应速率曲线不会通过坐标系的原点; 当存在一定量的可逆抑制剂时, 其反应速率曲线会通过坐标系的原点, 且其反应速率的曲线斜率小于不存在抑制剂时的曲线斜率^[10, 17]。因此, 根据抑制剂的抑制动力学曲线可判别其抑制作用是否可逆。

本研究采用酶抑制动力学方法, 在测定 ACE 抑制作用的反应体系中加入 EAC-ANE (0、1.0、2.5 mg/mL), 利用固定底物 HHL 的浓度 (5 mmol/L), 不同浓度 (12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 mU/mL) 的 ACE 测定酶抑制作用, 以反应速率 (V) 对 ACE 的酶浓度进行制图。EAC-ANE 对 ACE 的抑制动力学曲线见图 2, 在 ACE 抑制作用反应体系中添加或不添加 EAC-ANE 时, 其反应速率曲线均通过直角坐标系的原点, 并且在添加 EAC-ANE 的反应体系中, 其反应速率曲线的斜率明显小于未添加 EAC-ANE 的, 随着反应体系中 EAC-ANE 浓度的升高, 曲线斜率逐渐变小。因此可知, EAC-ANE 对 ACE 活性的抑制作用属于可逆抑制。

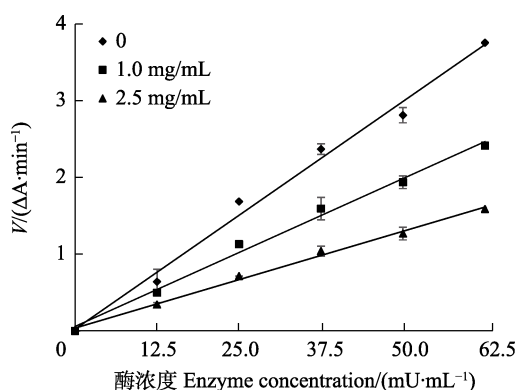


图 2 EAC-ANE 对 ACE 活性的抑制动力学曲线

Fig. 2 Kinetic curves of inhibition on ACE activity of EAC-ANE

2.3 EAC-ANE 对 ACE 活性的可逆抑制作用类型

根据抑制剂与底物的关系, 可逆抑制类型可分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合型抑制 4 种类型。其中, 混合型抑制又包括竞争与非竞争的混合型、竞争与反竞争的混合型 2 种^[18]。在 Lineweaver-Burk 的双倒数曲线图中, 随着抑制剂浓度的增加, 若反应体系的最大

反应速率 ($V_{\max}$) 不变, 米氏常数 (K_m) 增大, 表明该抑制类型属于竞争性抑制; 若 $V_{\max}$ 减小, K_m 不变, 表明该抑制类型属于非竞争性抑制; 若 $V_{\max}$ 减小, K_m 减小, 表明该抑制类型属于反竞争性抑制; 若 $V_{\max}$ 减小, K_m 增大, 表明该抑制类型属于竞争与非竞争混合型抑制; 若 $V_{\max}$ 减小, K_m 减小, 表明该抑制类型属于竞争与反竞争混合型抑制^[19-20]。

本研究通过固定反应体系中的 ACE 浓度 (25 mU/mL), 改变底物 HHL 的浓度 (1.0、2.0、4.0、5.0、7.5 mmol/L), 在 EAC-ANE 不同浓度 (0、1.5、2.0 mg/mL) 条件下, 测定反应体系的反应速率, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图 (图 3)。根据双倒数图计算出不同 EAC-ANE 浓度反应体系的 $V_{\max}$ 和 K_m (表 2)。由图 3 和表 2 可知, EAC-ANE 不同浓度的 3 个反应体系得到的 3 条直线相交于第 2 象限, 且随着 EAC-ANE 浓度的升高, 反应体系中的 $V_{\max}$ 逐渐减小, K_m 逐渐增大。参数的这种变化特征和竞争与非竞争的混合型抑制特点相符, 所以 EAC-ANE 对 ACE 活性的可逆抑制类型为竞争与非竞争的混合型抑制。

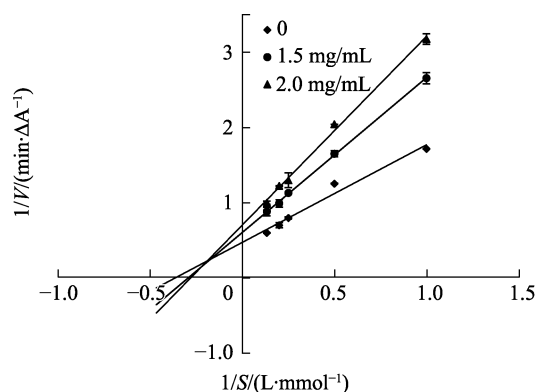


图 3 EAC-ANE 对 ACE 活性抑制作用的

Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 3 Lineweaver-Burk curve of inhibition on ACE activity by EAC-ANE

2.4 槟榔提取物中 3 种化学物质含量

槟榔中的成分复杂, 主要有槟榔碱、油脂、多糖、蛋白质、矿物质、粗纤维和一些酚类物质等成分^[21]。槟榔提取物不同极性部位的多酚、总糖、蛋白质含量如表 3 所示, EAC-ANE 中的多酚含量以及 W-ANE 中的蛋白质和总糖含量显著高于其他极性部位中的相应化学成分含量, 且 EAC-ANE 中的多酚含量相较于多酚含量排在第 2

表 2 EAC-ANE 对 ACE 活性的抑制动力学参数
Tab. 2 Kinetic parameters of inhibition on ACE activity of EAC-ANE

样品 Sample	浓度 Concentration/(mg·mL ⁻¹)	方程 Equation	R ²	V _{max} /(ΔA·min ⁻¹)	K _m /(mmol·L ⁻¹)
CK	0	y=1.3021x+0.4683	0.973	2.14	2.78
EAC-ANE	1.5	y=2.0658x+0.6014	0.999	1.66	3.43
EAC-ANE	2.0	y=2.5174x+0.6998	0.996	1.43	3.60

位的 BU-ANE 高出 34%。

此外，张丹等^[22]对槟榔不同极性部位的多酚含量进行测定发现，槟榔乙酸乙酯部位的总多酚高于正丁醇部位。且在其他植物如翼蓼块根、荔枝的提取物中乙酸乙酯部位的多酚含量也显著高于石油醚、正丁醇以及水部位^[16, 23]。这均与本研究结果类似。从上述结果可以看出，与其他极性物质相比，槟榔多酚经乙酸乙酯萃取后能够获得更高的提取效率，这可能是由于多酚物质的极性与乙酸乙酯极性相近，在乙酸乙酯中更易提取。

表 3 槟榔提取物各极性部位的多酚、总糖和蛋白质含量
Tab. 3 Contents of polyphenols, polysaccharide and protein at various polarity fraction of areca nut extract μg/mg

样品 Sample	多酚 Polyphenol	总糖 Total sugar	蛋白质 Protein
PE-ANE	50.00±1.08 ^d	22.35±1.50 ^d	63.46±3.23 ^d
EAC-ANE	647.49±3.78 ^a	304.00±11.26 ^c	125.81±0.95 ^c
BU-ANE	428.49±5.38 ^b	460.60±12.46 ^b	187.71±7.01 ^b
W-ANE	347.49±5.52 ^c	481.35±8.51 ^a	210.09±5.04 ^a

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

2.5 化学物质含量的相关性分析

槟榔嫩果提取物不同极性部位的 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值与多酚、总糖、蛋白质含量的相关性分析如表 4 所示。皮尔逊相关系数大小与相关性强度之间的关系认为，相关系数（ r ）越接近于 1 或-1，相关度越强， r 越接近 0，相关度越弱。当 r 的绝对值在 0.80 以上，表示有强相关性；在 0.60~0.79 之间，表示有中等相关性；在 0.30~0.59 之间，表示有弱相关性；而在 0.30 以下时，则表示二者无相关性^[24]。由表 4 可知，槟榔提取物的不同极性部位对 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值与 3 种活性物质含量均呈极显著负相关，但相关性强度有所差异，不同极性部位对 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值与多酚含量、总糖含量呈强相关性，而与蛋白质含量则呈中等相关性。由此说明，多酚可能是槟榔提取物中 ACE 抑制活性的主要作用物质，并且多糖也发挥了一定的 ACE 活性抑制作用。

植物多酚和多糖具有 ACE 抑制活性，这与已有的多项研究结果一致，如苦杏仁叶^[25]、黑加仑^[26]和猕猴桃^[27]中的多酚提取物，红毛藻^[11]、牡蛎^[28]、咖啡渣^[29]以及一些坚果^[30]中的多糖提取物均可表现出 ACE 抑制活性，从而达到降血压的效果。

表 4 槟榔提取物不同极性部位对 ACE 的 IC₅₀ 与活性物质含量的相关性分析

Tab. 4 Correlation analysis between IC₅₀ of ACE and content of active substances in different polar parts of areca nut

指标 Index	IC ₅₀	多酚 Polyphenol	总糖 Total sugar	蛋白质 Protein
IC ₅₀	1			
多酚	-0.912**	1		
总糖	-0.873**	0.608*	1	
蛋白质	-0.766**	0.446	0.977**	1

注：*表示显著相关（ $P<0.05$ ）；**表示极显著相关（ $P<0.01$ ）。
Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$); ** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).

2.6 槟榔提取物多酚组分定量分析

液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）技术具有灵敏度高、选择性强、适用范围广等诸多优点，广泛应用于食品、药品和环境中化学成分的定位与定量分析^[8]。根据相关性试验结果，槟榔提取物中多酚含量与 ACE 抑制活性之间具有极强的相关性。因此通过前期类黄酮广靶研究^[8]选择原花青素、原儿茶酸、儿茶素、异鼠李素等 33 种多酚标准品对槟榔多酚提取物中的具体组分进行定量分析，与标准品色谱图峰面积对照分析后，从中得到含量较高的 14 种多酚组分（表 5）。从 4 种极性部位中定量

到儿茶素、L-表儿茶素、原花青素 B₂、原儿茶酸、槲皮素等多种多酚组分。14 种多酚组分含量在不同极性部位中存在一定差异,其中 EAC-ANE 中的各多酚组分含量最高,共计 14 192.42 ng/mg,其次是 BU-ANE 和 W-ANE, PU-ANE 中的多酚组分含量最低。在 EAC-ANE 中,儿茶素含量最高,为 3956.89 ng/mg,其次是 L-表儿茶素和原花青素 B₂,含量分别为 3341.86、3130.05 ng/mg。原儿茶醛仅在 EAC-ANE 中定量到,而其他 3 个极性部位由于含量太少或者无,并未定量到绝对含量。

ANWARUL 等^[31]已证明了在槟榔粗提物中检

测出的儿茶素成分具有一定的降血压效果。同时在其他天然产物中的表儿茶素^[32]、原花青素^[33]、槲皮素^[34]、异鼠李素^[34]、绿原酸^[35]等多种多酚类化合物也均被证明具有显著的 ACE 抑制活性的作用。而在本研究的 EAC-ANE 中,这些组分含量较高,这也可能是 EAC-ANE 的 ACE 抑制活性最好的原因。综上所述,ACE 的抑制活性与多酚含量高度相关,槟榔提取物中的多酚组分可以被证明是抑制 ACE 活性的主要成分,且多酚组分中含量最高的儿茶素、L-表儿茶素、原花青素 B₂ 很有可能是抑制 ACE 活性的关键化合物。

表 5 槟榔不同极性部位萃取物中多酚组分含量
Tab. 5 Contents of specific components in extracts of different polar parts of areca nut

序号 No.	化合物 Compound	含量 Content/(ng·mg ⁻¹)			
		PU-ANE	EAC-ANE	BU-ANE	W-ANE
1	儿茶素 cianidanol	0.19	3956.89	532.40	127.14
2	L-表儿茶素 L-epicatechin	152.77	3341.86	672.97	336.18
3	原花青素 B ₂ procyanidin B ₂	108.72	3130.05	473.13	248.53
4	原儿茶酸 protocatechuic acid	145.52	752.84	431.94	782.86
5	槲皮素 quercetin	113.65	616.31	170.76	166.35
6	原儿茶醛 protocatechualdehyde	—	375.61	—	—
7	紫杉叶素 taxifolin	—	343.72	112.40	—
8	没食子酸 gallic acid	—	320.54	303.96	303.55
9	香豆酸 cumaric acid	94.27	312.31	140.20	138.75
10	芦丁 rutin	105.20	268.88	258.46	174.30
11	异鼠李素 isorhamnetin	85.88	250.04	118.23	115.40
12	山奈酚-3-o-芸香糖苷 kaempferol-3-o-rutinosid	101.94	181.85	160.19	153.84
13	木犀草素 luteolin	104.17	174.24	155.20	154.60
14	柚皮素 naringenin	89.85	167.29	133.63	132.95
总计		1102.15	14192.42	3663.46	2834.45

注:—表示未检出。
Note: — indicates undetected.

3 讨论

目前对降血压活性方面的研究大部分均集中于海洋生物肽、豆类多肽以及一些果蔬植物的活性提取物中^[36],但国内外针对槟榔的降血压活性研究却十分匮乏。INOKUCHI 等^[37]通过动物体内试验,发现槟榔种子的鞣质提取物能通过抑制自发性高血压大鼠的血管紧张素转化酶,从而达到降血压的效果。但并未进行体外试验研究该提取物中的主要化学成分及其作用机理。ANWARUL 等^[31]研究表明,在槟榔粗提物中检测出的儿茶素成分可通过舒张血管而达到一定的降血压效果。但也并未说明儿茶素类成分是否对血压调控关键

酶——血管紧张素转化酶具有一定的抑制活性。项目组前期试验表明,槟榔籽中含有大量的多酚类物质,其提取率可达 40%以上,提取物的多酚含量超过 80%^[38]。槟榔提取物具有一定的抑制 ACE 活性作用,但并未见其在抑制 ACE 酶动力学方面的相关报道。

本研究发现,槟榔嫩果提取物的 4 种不同极性部位对 ACE 活性均具有一定的抑制效果,且具有浓度依赖性。EAC-ANE 的抑制效果最为显著,IC₅₀ 值为(1.51±0.07)mg/mL。PARK 等^[39]曾报道竹笋提取物对 ACE 的半抑制质量浓度约为 6 g/L,而本研究中 EAC-ANE、BU-ANE、W-ANE 的 IC₅₀

值均显著低于前者。在对4种极性部位中的多酚、总糖、蛋白质3种物质含量的测定中发现, EAC-ANE中的多酚含量显著高于其他3个极性部位。不同极性部位ACE抑制活性的 IC_{50} 值与蛋白质、总糖、多酚含量均呈极显著负相关, 与多酚、总糖含量呈强相关性, 且与多酚含量呈极强相关性。在不同极性部位中定量得到14种含量较高的多酚组分, 其中儿茶素、L-表儿茶素和原花青素 B_2 在EAC-ANE中含量最高。已有研究证明这3种物质具有一定的降血压效果, 同时本研究定量出的其他多酚成分中的部分化合物也已被证明具有抑制ACE活性的作用。

综上所述, 本研究已初步证明EAC-ANE具有较好的ACE抑制效果, 并且槟榔提取物中的多酚含量与ACE抑制效果之间存在密切联系。槟榔是丰富的天然多酚来源, 这一研究成果为以天然植物多酚成分制备ACE抑制剂, 以及槟榔药用价值的开发提供了一定的研究基础。但本研究中还未确定槟榔多酚组分中发挥关键作用的单体化合物及其抑制ACE活性的作用方式和体内降血压效果。后续的研究中将继续对这些问题进行更深层次的探索。而多糖与ACE酶的作用方面也将另行研究。

参考文献

- [1] 易书瀚, 李珂, 杨靖, 郭亦辰, 王远亮. 槟榔提取物的生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 207-212.
YI S H, LI K, YANG J, GOU Y C, WANG Y L. Present status of research on biological activity of areca nut extract[J]. Food Research and Development, 2019, 40(7): 207-212. (in Chinese)
- [2] 林木兰, 张殿镇. 血管紧张素转化酶抑制剂用于治疗高血压[J]. 国外医药·合成药·生化药·制剂分册, 1982(4): 43-46.
LIN M L, ZHANG D Z. Angiotensin converting enzyme inhibitors for the treatment of hypertension[J]. Foreign Medicine · Synthetic Drugs · Biochemical Drugs · Preparation Volume, 1982(4): 43-46. (in Chinese)
- [3] 言岩. ACE抑制剂有助于治疗高血压[J]. 国外医学情报, 1983(1): 6.
YAN Y. Angiotensin converting enzyme inhibitors for the treatment of hypertension[J]. Foreign Medical Information, 1983(1): 6. (in Chinese)
- [4] CUSHMAN D W, HONG S C, SABO E F. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme[J]. American Journal of Cardiology, 1982, 49(6): 1390-1394.
- [5] SAVITHA M N, SIDDESHA J M, SUVILESH K N, YARISWAMY M, VIVEK H K, UMASHANKAR M, VISHWANATH B S. Active-site directed peptide L-Phe-D-His-L-Leu inhibits angiotensin converting enzyme activity and dexamethasone-induced hypertension in rats[J]. Peptides, 2019, 112: 34-42.
- [6] YEUNG E, WONG F S, WANLESS I R. Rami-pril-associated hepatotoxicity[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2003, 127: 1493-1497.
- [7] JURIMA-ROMET M, HUANG H S. Comparative cytotoxicity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cultured rat hepatocytes[J]. Biochemical Pharmacology, 1993, 46(12): 2163-2170.
- [8] 唐敏敏, 宋菲, 陈华, 李瑞. 槟榔籽提取物抗炎作用及化学成分研究[J]. 热带作物学报, 2021, 42(7): 2035-2042.
TANG M M, SONG F, CHEN H, LI R. Anti-inflammatory effects and chemical constituent analysis of the ethanol extract of *Areca catechu* seeds[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(7): 2035-2042. (in Chinese)
- [9] 张晓峰, 樊剑鸣, 陈萍萍, 李里特, 辰巳英三. 腐乳ACE抑制功能的研究[J]. 中国酿造, 2008(18): 19-21.
ZHANG X F, FAN J M, CHEN P P, LI L T, TATSUMI E. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Sufu[J]. China Brewing, 2008(18): 19-21. (in Chinese)
- [10] 曹文红, 何小庆, 章超桦, 郝记明, 赵子科. 两种中国毛虾ACE抑制肽抑制类型的研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 4-7, 34.
CAO W H, HE X Q, ZHANG C H, HAO J M, ZHAO Z K. Inhibition type of two angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from *Acetes chinensis*[J]. Food and Machinery, 2013, 29(4): 4-7, 34. (in Chinese)
- [11] 宋田源, 陈艳红, 倪辉, 朱艳冰, 杜希萍, 蔡薇, 蔡慧农, 姜泽东. 红毛藻多糖对血管紧张素转换酶活性的抑制作用[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2017, 22(5): 24-30.
SONG T Y, CHEN Y H, NI H, ZHU Y B, DU X P, CAI W, CAI H N, JIANG Z D. Inhibitory effect of a polysaccharide fraction prepared from red seaweed *Bangia fusco-purpurea* on angiotensin converting enzyme[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2017, 22(5): 24-30. (in Chinese)
- [12] 扶庆权, 王海鸥, 陈守江, 王蓉蓉, 张李阳. 响应面法优化微波辅助提取黑加仑多酚工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(11): 78-86.
FU Q Q, WANG H O, CHEN S J, WANG R R, ZHANG L Y. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from blackcurrant by response surface method and analysis of antioxidant activity of the extract[J]. China Food Additives, 2017(11): 78-86. (in Chinese)

- [13] 陈晖, 闫治攀, 陈方圆, 王继龙, 魏舒畅, 王碧辉. 改进差示苯酚-硫酸法测定维血宁颗粒多糖含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 84-86.
CHEN H, YAN Z P, CHEN F Y, WANG J L, WEI S C, WANG B H. Determination of polysaccharide in Weixuening Granules by improved differential phenol-sulfuric method[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2014, 21(3): 84-86. (in Chinese)
- [14] 王艾平, 周丽明. 考马斯亮蓝法测定茶籽多糖中蛋白质含量条件的优化[J]. 河南农业科学, 2014, 43(3): 150-153.
WANG A P, ZHOU L M. Determination of protein content in *Camellia oleifera* seed polysaccharides by coomassie brilliant blue method[J]. Henan Agricultural Sciences, 2014, 43(3): 150-153. (in Chinese)
- [15] FRIEDLANG J, SILVERSTEIN E. Sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme with the natural substrate angiotensin I[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1977, 68(2): 225-228.
- [16] 王兰, 郭利杰, 许明录. 翼蓼块根提取物的抗氧化活性和血管紧张素转化酶抑制活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(7): 5.
WANG L, GUO L J, XU M L. Antioxidant and ACE inhibition activity of different extracts of *Pteroxygonum giraldii* root[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(7): 5. (in Chinese)
- [17] 李波, 包怡红, 高峰, 王振宇. 红松球鳞片多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1): 63-65, 69.
LI B, BAO Y H, GAO F, WANG Z Y. Inhibitory effect of polyphenols from Korean pine cone lamella on α -amylase and α -glucosidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(1): 63-65, 69. (in Chinese)
- [18] 宋菲, 张玉锋, 郭玉如, 李瑞, 陈华, 唐敏敏. 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 F, ZHANG Y F, GUO Y R, LI R, CHEN H, TANG M M. Inhibitory effects of areca nut extract on the activity of α -glucosidase[J]. Food Research and Development, 2019, 40(13): 78-83. (in Chinese)
- [19] 肖会芝. 天然多酚对胰蛋白酶和 α -葡萄糖苷酶抑制机制的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
XIAO H Z. Comparative evaluation of natural polyphenols inhibiting α -glucosidase and trypsin[D]. Chongqing: Chongqing University, 2016. (in Chinese)
- [20] 汤海霞. 酶解绵羊乳酪蛋白制备 ACE 抑制肽及抑制机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
TANG H X. Preparation of ACE inhibitory peptide by enzymatic hydrolysis of sheep casein and evaluation of the molecular binding mechanism[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021. (in Chinese)
- [21] 祁静, 黄玉林, 陈卫军, 唐敏敏, 郑亚军, 赵松林. 槟榔酚类物质生理活性研究进展[J]. 热带作物学报, 2010, 31(6): 1050-1056.
QI J, HUANG Y L, CHEN W J, TANG M M, ZHENG Y J, ZHAO S L. Review on the physiological activity of polyphenols of betel nut[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(6): 1050-1056. (in Chinese)
- [22] 张丹, 李丹, 许启泰, 康文艺. 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 D, LI D, XU Q T, KANG W Y. Comparative study of antioxidant activity and ingredient in different parts of *Areca catechu* L. extract[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 102-104, 109. (in Chinese)
- [23] 张粹兰, 张名位, 廖森泰, 魏振承, 张雁, 唐小俊, 张瑞芬, 邓媛元. 荔枝果肉不同极性多酚提取及其抗氧化活性比较[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2011(4): 116-120.
ZHANG C L, ZHANG M W, LIAO S T, WEI Z C, ZHANG Y, TANG X J, ZHANG R F, DENG Y Y. Comparison of the content and antioxidant activities of different polarity phenolics of litchii pulp[J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2011(4): 116-120. (in Chinese)
- [24] AKOGLU H. User's guide to correlation coefficients[J]. Turkish Journal of Emergency Medicine, 2018, 18(3): 91-93.
- [25] AJIBOL A C F, ELEYINMI A F, ALUKO R E. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I converting enzyme by polar and non-polar polyphenolic extracts of *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium* leaves[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2011, 66(4): 320-327.
- [26] 何海艳, 陈雯烨, 杨爱萍, 蒋彩云, 张睿. 黑加仑多酚降血压的效果研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 97-103.
HE H Y, CHEN W Y, YANG A P, JIANG C Y, ZHANG R. Effect of blackcurrant polyphenols on lowering blood pressure[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(3): 97-103. (in Chinese)
- [27] HETTIHEWA S K, HEMAR Y, RUPASINGHE H P V. Flavonoid-rich extract of *Actinidia macrosperma* (a wild kiwifruit) inhibits angiotensin-converting enzyme *in vitro*[J]. Foods, 2018, 7: 146.
- [28] GETACHEW A T, LEE H J, CHO Y J, CHAE S J, CHUN B S. Optimization of polysaccharides extraction from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using subcritical water: structural characterization and biological activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2019, 121: 852-861.

- [29] BEN R M, KRICHEN F, GHAZALA I. Effect of extraction methods on chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of coffee residue[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 41(2): 127-168.
- [30] SILA A, BAYAR N, GHAZALA I, BOUGATEF A, ELLOUZ-GHORBEL R, ELLOUZ-CHAABOUNI S. Water-soluble polysaccharides from agro-industrial by-products: functional and biological properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 69: 236-243.
- [31] ANWARUL H G, MUHAMMAD N G, PETER J H, QAISER J, SAEED S A. Studies on the hypotensive, cardio-suppressant, vasodilator and antiplatelet activities of betel nut crude extract and its constituents[J]. *International Journal of Pharmacology*, 2006, 2(1): 33-41.
- [32] 高义霞, 呼丽萍, 袁毅君. 花牛苹果幼果多酚单体酚降血压成分的筛选[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(10): 232-236.
- GAO Y X, HU L P, YUAN Y J. Screening of antihypertensive components of polyphenol monomers from young fruits of Huanu apple[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(10): 232-236. (in Chinese)
- [33] OVASKAINEN M L, TORRONEN R, KOPONE R J, FRAGA C. Procyanidin structure defines the extent and property of angiotensin I converting enzyme inhibition[J]. *Biochimie*, 2006, 88(3/4): 359-365.
- [34] 朱福, 章茂顺, 王家良, 符宗胤. 醋柳总黄酮对兔血管紧张素转换酶的抑制作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2009(2): 95-98.
- ZHU F, ZHANG M S, WANG J L, FU Z Y. Inhibitory effect of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. on angiotensin converting enzyme from rabbit[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy*, 2009(2): 95-98 (in Chinese)
- [35] 曹晓钢, 于刚, 叶小利, 王立军, 李学刚. 中药提取物及活性部位抑制血管紧张素转化酶活性的研究[J]. *食品与药品*, 2009, 11(1): 20-23.
- CAO X G, YU G, YE X L, WANG L J, LI X J. Research on inhibition of traditional chinese medicine extracts and active fraction on angiotensin converting enzyme[J]. *Food and Drug*, 2009, 11(1): 20-23. (in Chinese)
- [36] 刘会敏, 张聪颖, 曹雨, 孔毅, 杜迎翔. 血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)现状与天然 ACEI 的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2012, 19(2): 4.
- LIU H M, ZHANG C Y, CAO Y, KONG Y, DU Y X. Status of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) and progress of the research on ACEI from natural sources[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2012, 19(2): 4. (in Chinese)
- [37] INOKUCHI J I, OKABE H, YAMAUCHI T, NAGAMATSU A, NONAKA G I, NISHIOKA I. Antihypertensive substance in seeds of *Areca catechu* L.[J]. *Life Sciences*, 1986, 38(15): 1375-1382.
- [38] SONG F, TANG M M, WANG H. UHPLC-MS/MS identification, quantification of flavonoid compounds from *Areca catechu* L. extracts and in vitro evaluation of antioxidant and key enzyme inhibition properties involved in hyperglycemia and hypertension[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 189: 115787.
- [39] PARK E J, JHON D Y. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43(4): 655-659.