

# 栓皮栎橡子壳多酚的体外抗氧化与抑菌活性研究

魏园园<sup>1</sup>, 侯盼盼<sup>1</sup>, 梁宗瑶<sup>1</sup>, 任维维<sup>1</sup>, 李珉梦<sup>1</sup>, 高鹏程<sup>2</sup>, 张建新<sup>1</sup>, 段旭昌<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 为开发橡子壳功能成分, 采用溶剂萃取、化学定性、光谱分析及体外清除自由基、抑菌试验探索了秦巴山区栓皮栎橡子壳多酚的功能特性。结果表明: 橡子壳可提取 4.39% 的粗多酚, 经乙酸乙酯、正丁醇和水萃取分离可得到 3 类萃取物, 经紫外光谱和红外光谱分析表明均含有酚羟基、羰基、芳烃 C=C 骨架、C-H 键和 C-O-C 键结构, 为多酚类物质; HPLC 分析表明乙酸乙酯萃取物以鞣花酸为主, 含有 4 种多酚, 正丁醇萃取物中含阿魏酸、鞣花酸、没食子酸、表没食子酸儿茶素、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、原儿茶酸、咖啡酸、表儿茶素没食子酸酯、山奈酚等 11 种酚类物质, 水萃取物以阿魏酸含量最高, 含 4 种多酚; 体外清除 DPPH 能力为 Vc>水萃取物>正丁醇萃取物>粗提物>乙酸乙酯萃取物, 清除 ABTS<sup>+</sup> 能力为 Vc>正丁醇萃取物>水萃取物>乙酸乙酯萃取物>粗提物, 清除 ·OH 能力为 Vc>水萃取物>粗提物>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物; 粗提物及溶剂萃取物均对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、大肠杆菌和沙门氏菌具有不同程度抑制活性, 抑菌能力为乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>粗提物>水萃取物。证明橡子壳多酚含量高, 种类多, 具有较强抗氧化和广谱抑菌活性。

**关键词:** 栓皮栎; 橡子壳多酚; 自由基清除; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2019)09-190-197

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.024

## *In Vitro* Antioxidative and Antibacterial Activities of Polyphenols in

### *Quercus variabilis* Bl. Acorn Shell

WEI Yuan-yuan<sup>1</sup>, HOU Pan-pan<sup>1</sup>, LIANG Zong-yao<sup>1</sup>, REN Wei-wei<sup>1</sup>, LI Min-meng<sup>1</sup>, GAO Peng-cheng<sup>2</sup>,  
ZHANG Jian-xin<sup>1</sup>, DUAN Xu-chang<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. College of Natural Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In order to develop the functional ingredients from acorn shell, the functional characteristics of polyphenols in *Quercus variabilis* Bl. acorn shell from the Qinba Mountain area in China were investigated by solvent extraction, chemical qualitative analysis, spectral analysis, *in vitro* free radical scavenging assay and antibacterial activity analysis. The results showed that crude polyphenol extract (up to 4.39%) could be obtained from the acorn shell. The crude extract was further separated into three fractions by ethyl acetate, *n*-butanol and water extractions, which were all proven to be polyphenols containing phenolic hydroxyl group, carbonyl group, aromatic C=C skeleton, C-H bond and C-O-C bond structure, by UV-vis and IR spectral analyses. The HPLC analysis showed that the ethyl acetate extract mainly had ellagic acid, containing 4 kinds of phenols. The *n*-butanol extract contained 11 kinds of phenols such as ferulic acid, ellagic acid, gallic acid, epigallocatechin gallate, catechin, chlorogenic acid, epicatechin, protocatechuic acid, caffeic acid, epicatechin gallate and kaempferol. The water extract had the highest content of ferulic acid, along with 4 kinds of phenols. The DPPH free radical scavenging capacity was in the order of Vc>water extract>*n*-butanol extract>crude extract>ethyl acetate extract. The ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging capacity was in the order of Vc> *n*-butanol extract>water extract>ethyl acetate extract>crude extract. The hydroxyl free radical scavenging capacity was in the order of Vc>water extract>crude extract>*n*-butanol extract>water extract. The crude extract and its derived three fractions exhibited different degrees of antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella* i.e. ethyl acetate extract>*n*-butanol extract>crude extract>water extract. These results indicated that the acorn shell is rich in polyphenols, and the polyphenols

收稿日期: 2019-02-28

基金项目: 国家林业局林业科学技术研究项目 (2016-04)

作者简介: 魏园园 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物

通讯作者: 段旭昌 (1965-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物及食品加工新技术

belong to different classes and exhibit strong antioxidant activities and broad-spectrum antibacterial activities.

**Key words:** *Quercus variabilis* Bl.; acorn shell polyphenols; scavenging free radical; antibacterial activity

人体自由基的积累和细菌病毒感染是引起人体健康损伤的重要因素<sup>[1]</sup>。自由基可以引起人体脂质、蛋白质、酶等活性物质的氧化,损伤细胞膜、线粒体、染色体,引起DNA突变,导致细胞变异和人体衰老,因此清除人体过量自由基,降低细菌病毒感染是延缓人体衰老,保证人体健康的重要措施之一,因此关于清除人体自由基和具有抗氧化抗菌的保健药物的筛选与开发已成为研究热点<sup>[1,2]</sup>。而研究证明植物多酚类物质具有良好的清除人体自由基和抑菌杀菌的功能<sup>[3]</sup>。

栓皮栎(*Quercus variabilis* Bl.)是壳斗科栎属植物的一种,果实称为橡子,果壳含有丰富的多酚类功能成分,具有抗衰老、抗癌、抑菌、消炎等作用<sup>[4-8]</sup>。Rakić等<sup>[9]</sup>研究证明,橡子中的酚类物质对大肠杆菌和霉菌有一定抑制作用。Shon等<sup>[10]</sup>研究证明,橡子提取物能抑制3T3-L1细胞的脂肪形成。橡子多酚还可预防高血糖症和阿尔茨海默病<sup>[11]</sup>。橡子多酚具有较好清除自由基和抗氧化活性,可修复实验小鼠的受损器官,显著提高小鼠血清中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性<sup>[12]</sup>。张盼等<sup>[13]</sup>研究表明橡子多酚对草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, SF)卵巢细胞系SF9的生长具有抑制作用,橡子多酚的生理活性已成为橡子开发的研究热点。但关于栓皮栎橡子壳多酚的研究报道甚少。

我国秦巴山区栓皮栎橡树资源丰富,橡子主要用于橡子淀粉生产,生产过程产生大量的橡子壳<sup>[14-17]</sup>,为开发橡子壳资源,发挥其使用价值,本研究以秦巴山区栓皮栎橡子壳为试材,采用乙醇超声波提取,乙酸乙酯、正丁醇、水萃取,通过紫外光谱、红外光谱、HPLC分析及体外清除自由基试验和抗菌试验研究了栓皮栎橡子壳多酚成分的组成、抗氧化、抗菌特性,为栓皮栎橡子壳多酚的开发利用提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

栓皮栎橡子:由陕西省柞水县橡香绿色食品有限公司提供,采至陕西秦岭山区的柞水县,经西北农林科技大学吴振海、杨荣慧两位植物分类学教授鉴定,确认为栓皮栎橡子。

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特菌和阪崎杆菌由西北农林科技大学食品科学与工程学院微生物研究室提供。

没食子酸、槲儿茶素、原儿茶酸、表没食子酸儿茶素、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、咖啡酸、表儿茶素没食子酸酯、阿魏酸、鞣花酸、槲皮素、山奈酚标准品均购自中国标准物质研究所;乙酸和甲醇为色谱纯,其他所用试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UVmini-1240紫外分光光度计,上海荆和分析仪器有限公司;Vetex70傅里叶变换红外光谱仪,德国布鲁克公司;LC-20A高效液相色谱分析仪,日本岛津公司;DZF-6020真空干燥箱,上海海向仪器设备厂;BXM-30R高压蒸汽灭菌锅,上海圣科仪器设备有限公司;HS-100C恒温摇床,上海和呈仪器有限公司;DH-360电热恒温培养箱,北京科伟有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 栓皮栎橡子壳多酚的提取与分离

采收的栓皮栎橡子运回实验室,洗净经55℃热风干燥,取其果壳,用植物组织粉碎机粉碎,过25目筛后于-20℃冰箱保存备用。称取一定质量橡子壳粉,置于锥形瓶中,添加橡子壳粉质量5倍体积的40%乙醇溶液,封口,于40℃的超声波仪中提取1h,抽滤后,将滤渣以同样方式重复提取2次,合并滤液,于50℃真空旋转蒸发器中浓缩至膏状,用膏状物体积2倍的石油醚萃取3次,除去脂类物质,然后真空冷冻干燥,得橡子壳粗提物样品,计算提取率。

将橡子壳粗提物溶于蒸馏水中配制成10%溶液,放置于分液漏斗,依次用3倍体积的乙酸乙酯、正丁醇连续分别萃取三次,每次萃取10min,分别收集乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相、和水萃取相,然后分别于50℃真空旋转蒸发器中浓缩至膏状,真空冷冻干燥,得乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物,计算得率,备用。

#### 1.3.2 栓皮栎橡子壳萃取物多酚的鉴定

##### 1.3.2.1 栓皮栎橡子壳多酚的化学定性鉴定

经分离的栓皮栎橡子壳多酚的乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物分别用水配置成250μg/mL溶液,用于以下方法的化学定性鉴定<sup>[17,18]</sup>。

三氯化铁试验:取各萃取物试样溶液1mL于3支试管中,分别滴加1~2滴1%三氯化铁乙醇溶液,若溶液呈现蓝色或蓝黑色,说明样品中含有水解单宁,若溶液呈现绿色或墨绿色,说明样品含有缩合单宁。

香草醛-盐酸试验:用 0.1 g 香草醛配制成 10 mL 香草醛-盐酸溶液。取各萃取物试样溶液 1 mL 于 3 支试管中,分别滴加少量香草醛-盐酸溶液,观察溶液颜色变化,溶液若呈粉红色,则证明样品中含多酚物质。

氯化钠-明胶试验:用 1 g 明胶溶于 50 mL 60 °C 热水中,加入 10 g NaCl,用蒸馏水定容至 100 mL,配成氯化钠-明胶溶液。取各萃取物试样溶液 1 mL 于 3 支试管中加入少量氯化钠明胶溶液,看溶液是否有白色沉淀,如产生白色沉淀,证明样品中含酚类或缩合单宁物质。

中性醋酸铅试验:取各萃取物试样溶液 1 mL 于 3 支试管中,分别加入少量 10% 醋酸铅溶液,样品如产生沉淀及颜色变化,证明样品中含有多酚类物质。

### 1.3.2.2 栓皮栎橡子壳萃取物多酚紫外光谱分析

将栓皮栎橡子壳萃取物用乙醇配制成浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  的乙醇溶液,以乙醇作为空白对照先进行紫外可见分光光度计基线校正,用紫外可见分光光度计测定各萃取物在 200~800 nm 范围的吸收光谱,与鞣酸、没食子酸多酚标准物的吸收光谱比较,分析样品的吸收光谱,判断萃取物成分组成<sup>[19]</sup>。

### 1.3.2.3 栓皮栎橡子壳萃取物多酚红外光谱分析

称取 1 mg 橡子壳萃取物,与烘干的 100 mg 溴化钾研磨混匀,在压片机上压成标准薄片,以纯的溴化钾薄片为对照进行傅里叶红外光谱仪基线校正,对含有栓皮栎橡子壳萃取物的溴化钾薄片在 4000~500  $\text{cm}^{-1}$  波数范围内进行吸收光谱扫描,测定各萃取物的红外吸收光谱图,分析橡子壳萃取物的分子结构<sup>[20]</sup>。

### 1.3.2.4 栓皮栎橡子壳萃取物多酚的 HPLC 分析

栓皮栎橡子壳萃取物的多酚组成及含量的测定参照郑菲的方法<sup>[21]</sup>,采用岛津 LC-20A 高压液相色谱分析仪进行测定。色谱条件:反相  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (4.6×250 mm);柱温 30 °C,紫外检测器,检测波长 280 nm,流动相 A 为 0.1% 乙酸,流动相 B 为甲醇。

梯度洗脱程序:0.01~10 min: 5%~14% B; 10~25 min: 14%~40% B; 25~32 min: 40%~50% B; 32~35 min: 50%~80% B; 35~55 min: 80% B; 55~65 min: 80%~5% B; 65~70 min: 5% B; 进样体积 20  $\mu\text{L}$ ; 流速 0.5 mL/min。

### 1.3.3 栓皮栎橡子壳萃取物的体外清除自由基活性试验

参照 Kusznerewicz 等<sup>[22]</sup>的方法测定各萃取物清除 DPPH· 自由基能力,参照 Wang 等<sup>[23]</sup>的方法测定萃取物清除  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  自由基能力,参考 Tsai 等<sup>[24]</sup>的方法测定萃取物清除  $\cdot\text{OH}$  自由基能力,以 Vc 作为对照,综合评价橡子壳萃取物的体外清除自由基能力和抗氧

化特性。

### 1.3.4 栓皮栎橡子壳萃取物多酚抑菌活性试验

#### 1.3.4.1 抑菌试验

用无菌移液枪分别吸取 100  $\mu\text{L}$  活菌数为  $10^6$  cfu/mL 的对数生长期的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特菌的菌悬液于四个灭菌冷却的营养琼脂培养基平皿中,用“L”形涂布法涂布均匀,室温静置 5 min,然后用 8 mm 无菌打孔器在每个接种后的平皿培养基中均匀打 4 个孔,去除孔内培养基,并编号。以无菌蒸馏水为对照,分别在每孔加入 50  $\mu\text{L}$  测试浓度为 100 mg/mL 的栓皮栎橡子壳粗多酚提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物的试验液,盖上培养皿,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h,测定各试验样品的抑菌圈大小,以抑菌圈大小判断抑菌效果<sup>[25,26]</sup>。

#### 1.3.4.2 最小抑菌浓度 (MIC) 测定

参照肖新生的倍半稀释法<sup>[27]</sup>,测定栓皮栎橡子壳粗多酚提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物的最小抑菌浓度,以最小抑菌浓度判断其抑菌强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 栓皮栎橡子壳多酚的提取分离试验结果分析

橡子壳粉经 5 倍体积 40% 乙醇于 40 °C 超声波提取 1 h,提取 3 次,过滤收集滤液浓缩后,采用石油醚脱脂,冷冻干燥,1000 g 橡子壳粉可得 43.9 g 粗提取物,提取率高达 4.39%。

粗提取物溶于水后,依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取,1.000 g 橡子壳粗提物可得到乙酸乙酯萃取物 140.9 mg,正丁醇萃取物 209.6 mg,水萃取物 646.6 mg。经计算每 1000 g 橡子壳可得乙酸乙酯萃取物 6.185 g,正丁醇萃取物 9.201 g,水萃取物 28.386 g,提取率分别为 0.62%、0.92% 和 2.80%,乙酸乙酯萃取物得率最低,正丁醇萃取物得率次之,水萃取物得率最高。

### 2.2 栓皮栎橡子壳分离萃取物的多酚鉴定结果分析

栓皮栎橡子壳分离萃取物的化学鉴定结果见表 1。由表 1 可知,乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物均含有多酚成分,且乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物以水解单宁存在较多,而水萃取物以缩合单宁存在较多。

表 1 栓皮栎橡子壳多酚分离组分化学定性试验结果

Table 1 Chemical qualitativetest results of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenol separation fractions

定性试验	试验现象		
	乙酸乙酯萃取物	正丁醇萃取物	水萃取物
三氯化铁试验	蓝黑色	蓝黑色	无变化
香草醛-盐酸试验	粉红色	粉红色	粉红色
氯化钠-明胶试验	无变化	无变化	白色沉淀
中性醋酸铅试验	棕色沉淀	棕色沉淀	黄色沉淀
鉴定结论	含多酚(水解单宁)	含多酚(水解单宁)	含多酚(缩合单宁)

表 2 栓皮栎橡子壳多酚分离组分红外光谱峰波数结构解析归类

Table 2 The absorption peak wave numbers structures analytical classification of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenol separation fractions infrared spectrum

分离组分	波数/cm <sup>-1</sup>						
乙酸乙酯相	3427	2932	1698	1614, 1516, 1453	1337	1271, 1213, 1034	814, 669
正丁醇相	3409	2927	1716	1615, 1519, 1450	1354	1216, 1043	669
剩余水相	3392		1731	1614, 1520, 1447	1354	1212, 1038	669
集团归属	$\nu$ O-H	$\nu$ C-H	$\nu$ C=O	$\nu$ Ar (C=C)	$\beta$ C-H	$\nu$ C-O-C	$\gamma$ C-H

栓皮栎橡子壳萃取分离物的紫外光谱分析结果见图 1。由图 1 可知, 乙酸乙酯、正丁醇、水萃取物分别在 190 nm 和 274 nm、198 nm 和 273 nm、213 nm 和 273 nm 处有较强的两个特征吸收峰。对照品没食子酸、鞣酸分别在 202 nm 和 251 nm、201 nm 和 263 nm 处有强的特征吸收峰。栓皮栎橡子壳萃取分离物的紫外光谱均在 190~300 nm 范围内有两个紫外特征吸收峰, 由于各成分组成不同, 分子结构差异, 导致特征吸收峰位置略有差异, 但与没食子酸、鞣酸标准对照品的吸收形状基本一致, 只是峰位置有一定偏移, 因此可以判定栓皮栎橡子壳的乙酸乙酯、正丁醇、水萃取物中均含有与没食子酸、鞣酸相类似的分子结构, 也就是说栓皮栎橡子壳的乙酸乙酯、正丁醇、水萃取物中均含有多酚类物质。

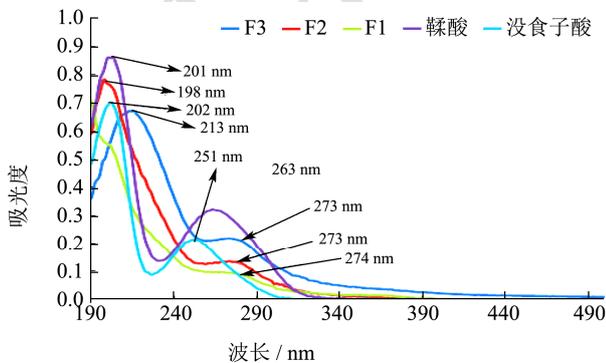


图 1 栓皮栎橡子壳多酚分离组分紫外光谱扫描图

Fig.1 The UV spectrum of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenol separation fractions

注: F1-乙酸乙酯萃取物, F2-正丁醇萃取物, F3-水萃取物。  
栓皮栎橡子壳萃取分离物的红外吸收光谱测定结

果见图 2, 峰分型结果见表 2。由图 2 和表 2 可知, 在 4000~500 cm<sup>-1</sup> 波数范围内, 栓皮栎橡子壳的乙酸乙酯萃取物有 12 个吸收峰, 分子中有羟基 O-H 伸缩振动吸收、C-H 伸缩振动吸收、-C=O 键伸缩振动吸收、芳烃 C=C 骨架伸缩振动吸收、C-H 面内弯曲振动吸收、C-O-C 键伸缩振动吸收及 C-H 面外弯曲振动吸收。正丁醇萃取物有 10 个吸收峰, 分子中有酚羟基 O-H 伸缩振动吸收、C-H 伸缩振动吸收、-C=O 键伸缩振动吸收、芳烃 C=C 骨架伸缩振动吸收、C-H 面内弯曲振动吸收、C-O-C 键伸缩振动吸收及 C-H 键面外弯曲振动吸收。水萃取物有 9 个吸收峰, 分子中有酚羟基 O-H 伸缩振动吸收、-C=O 键伸缩振动吸收、芳烃 C=C 骨架伸缩振动吸收、C-H 面内弯曲振动吸收、C-O-C 键的伸缩振动吸收及 C-H 面外弯曲振动吸收。

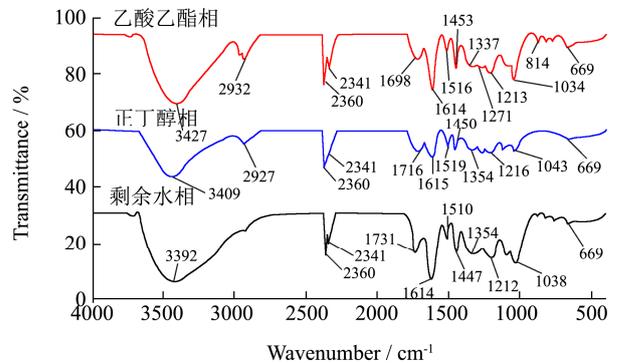


图 2 栓皮栎橡子壳多酚分离组分红外光谱图

Fig.2 IR spectrum of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenols separation fractions

栓皮栎橡子壳的乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物的红外吸收除在 C-O-C 吸收峰有差异外, 其

他波数附近具有相同的吸收,说明乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物具有大体相似的分子结构,分子中均都含有酚羟基、羰基、芳烃 C=C 骨架、C-H 键和 C-O-C 键等结构,结合化学鉴定及紫外光谱分析可确定栓皮栎橡子壳的乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物均为多酚类物质<sup>[28]</sup>。

本研究用了 13 个多酚标准品,采用 HPLC 外标定量法测定了栓皮栎橡子壳分离萃取物的多酚组成及含量,试验结果见图 3、图 4 和表 3。由图 3 看出,13 种多酚标准品的峰分离效果较好,可用于样品的成分鉴定及定量分析。

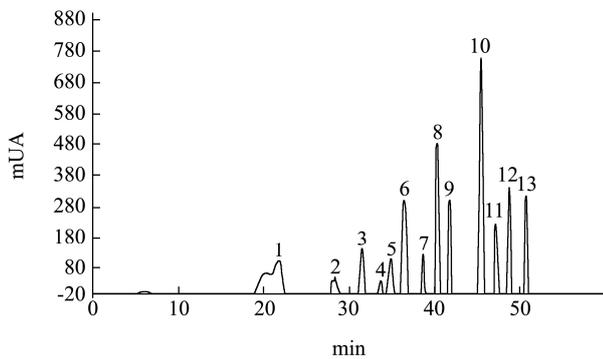


图 3 13 种多酚标准品的 HPLC 色谱图

Fig.3 The HPLC chromatogram of 13 polyphenol standards

注: 1.没食子酸 2.槲儿茶素 3.原儿茶酸 4.表没食子酸儿茶素 5.儿茶素 6.绿原酸 7.表儿茶素 8.咖啡酸 9.表儿茶素没食子酸酯 10.阿魏酸 11.鞣花酸 12.槲皮素 13.山奈酚。

由表 3 可知,栓皮栎橡子壳的乙酸乙酯萃取物中检测到没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸 4 种多酚,以鞣花酸含量最高,没食子酸、儿茶素次之,原儿茶酸含量最低;正丁醇萃取物中检测到没食子酸、原儿茶酸、表没食子酸儿茶素、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、咖啡酸、表儿茶素没食子酸酯、阿魏酸、鞣花酸、山奈酚 11 种酚类物质,其中阿魏酸含量最高,山奈酚含量最低。水相萃取物中检测到没食子酸、阿魏酸、鞣花酸、槲皮素 4 种多酚,其中阿魏酸含量最高,没食子酸、鞣花酸含量次之,槲皮素含量最低。说明不同的多酚类物质具有不同的极性,用不同极性的溶剂萃取可以得到不同的栓皮栎橡子壳多酚,由于

正丁醇极性适中,萃取栓皮栎橡子壳得到的多酚含量种类最多,最丰富,含量也较高,乙酸乙酯极性较低,对鞣花酸、没食子酸、儿茶素、原儿茶酸萃取效果较好,水的极性较大,对阿魏酸、没食子酸、鞣花酸、槲皮素萃取效果较好。因此要获得不同的栓皮栎橡子壳多酚物质,可以采用不同极性的溶剂加以萃取分离。

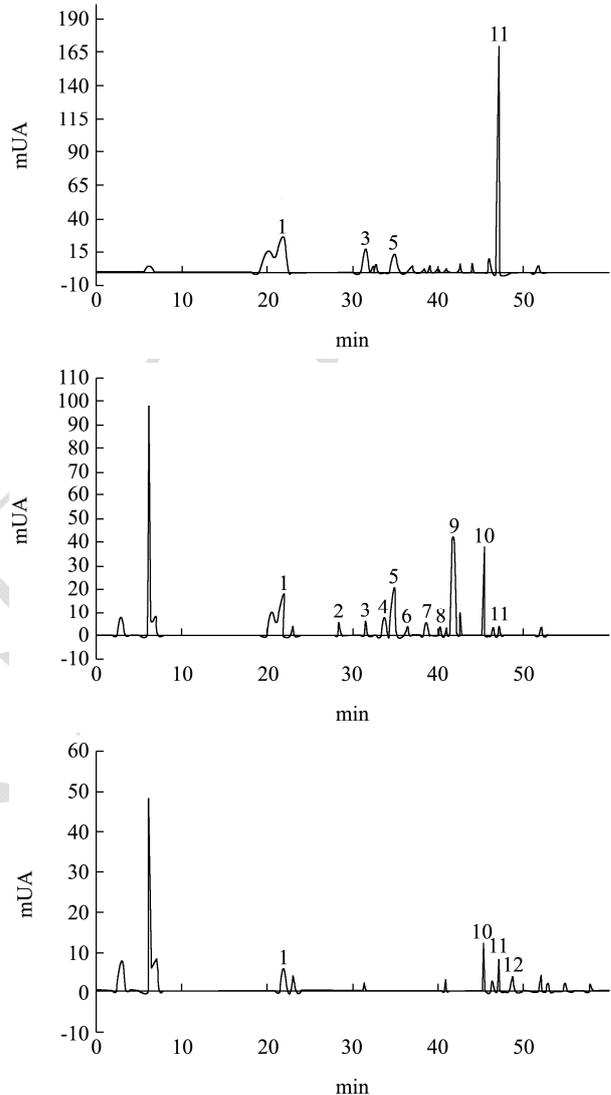


图 4 乙酸乙酯相、正丁醇相、水相萃取物的 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC Chromatogram of F1, F2, F3

注: a: 乙酸乙酯相萃取物; b: 正丁醇相萃取物; c: 水相萃取物。

表 3 栓皮栎橡子壳萃取分离物的 13 种多酚的 HPLC 定量分析结果

Table 3 The 13 polyphenol HPLC quantitative analysis results of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell separation fractions

标准品	保留时间/min	标准曲线	R <sup>2</sup>	乙酸乙酯萃取物/(mg/g)	正丁醇萃取物/(mg/g)	水萃取物/(mg/g)
没食子酸	21.974	y=82985x+95953	0.9958	51.520	4.309	0.397
槲儿茶素	28.462	y=6536x+3582.7	0.9959	-	-	-
原儿茶酸	31.567	y=44490x+53281	0.9958	21.255	0.415	-

转下页

接上页

表没食子酸儿茶素	33.796	y=6015.3x+8750.1	0.9958	-	3.516	-
儿茶素	34.881	y=19516x+24482	0.9958	27.660	2.386	-
绿原酸	36.533	y=60036x+77269	0.9953	-	1.730	-
表儿茶素	38.716	y=21849x+31009	0.9956	-	0.560	-
咖啡酸	40.352	y=96806x+177279	0.9948	-	0.357	-
表儿茶素没食子酸酯	41.825	y=55164x+55801	0.9969	-	0.184	-
阿魏酸	45.473	y=105721x+309836	0.9912	-	11.617	4.332
鞣花酸	47.141	y=37543x+65212	0.9936	126.305	5.736	0.343
槲皮素	48.770	y=51057x+51930	0.9962	-	-	0.056
山奈酚	50.717	y=54669x+72571	0.9959	-	0.067	-

注: -表示未检测到。

表 4 栓皮栎橡子壳提取分离物的体外清除自由基试验结果

Table 4 Free radical scavenging test results *in vitro* of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenol separation fractions

样品	清除 DPPH· IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	清除 ABTS <sup>+</sup> · IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	清除·OH IC <sub>50</sub> /(mg/mL)
粗提物	6.517±0.018	40.543±0.505	0.560±0.008
乙酸乙酯萃取物	7.288±0.041	38.253±0.098	0.997±0.009
正丁醇萃取物	6.410±0.045	35.369±0.133	0.618±0.025
水萃取物	5.489±0.039	36.710±0.218	0.535±0.007
Vc	3.309±0.006	34.906±0.048	0.218±0.185

表 5 栓皮栎橡子壳多酚的抑菌圈直径试验结果

Table 5 Inhibition zone test results of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenol separation fractions

样品/菌种	抑菌圈直径/cm			
	金黄色葡萄球菌 (G+)	单增李斯特菌 (G+)	大肠杆菌 (G-)	沙门氏菌(G-)
粗提物	2.03±0.02	1.92±0.10	1.04±0.003	1.00±0.05
乙酸乙酯萃取物	2.44±0.06	2.22±0.07	1.62±0.12	1.33±0.04
正丁醇萃取物	2.13±0.07	2.01±0.02	1.13±0.04	1.01±0.04
水萃取物	1.80±0.04	1.74±0.05	1.02±0.05	0.94±0.06
无菌水	-	-	-	-

注: -表示无抑菌圈出现。

### 2.3 栓皮栎橡子壳多酚分离物的体外清除自由基活性试验结果分析

栓皮栎橡子壳多酚分离物的体外清除自由基活性试验结果见表 4。由表 4 可知, 栓皮栎橡子壳粗提物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物及对照品 Vc 对 DPPH·清除率的 IC<sub>50</sub> 值分别为 6.517、7.288、6.41、5.489、3.309 μg/mL, 清除能力大小依次为 Vc>水萃取物>正丁醇萃取物>粗提物>乙酸乙酯萃取物, 对 ABTS<sup>+</sup>·清除率的 IC<sub>50</sub> 值分别为 40.543、38.253、35.369、36.71、34.906 μg/mL, 清除能力大小依次为 Vc>正丁醇萃取物>水萃取物>乙酸乙酯萃取物>粗提物, 对羟基自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.560、0.997、0.618、0.535、0.218 mg/mL, 清除能力依次为 Vc>水萃取物>

粗提物>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物, 从清除这三种自由基的 IC<sub>50</sub> 浓度分析, 对羟基自由的清除能力最强, 其次是 DPPH·, 对 ABTS<sup>+</sup>·清除能力最弱。经综合比较, 栓皮栎橡子壳多酚分离物清除自由基的能力均不如 Vc, 但与 Vc 的清除能力相差不大。由于栓皮栎橡子壳不同溶剂提取物的成分差异, 对不同自由基表现出不同的清除能力, 但 IC<sub>50</sub> 值均较低, 说明栓皮栎橡子壳多酚对不同的自由基均表现出较强的清除能力, 具有较强的抗氧化能力。

### 2.4 栓皮栎橡子壳多酚分离物的抑菌活性试验结果分析

栓皮栎橡子壳多酚分离物抑菌试验结果见表 5、表 6。由表 5 的抑菌圈大小分析可知, 栓皮栎橡子壳

多酚的分离物对金黄色葡萄球菌 (G+)、单增李斯特菌 (G+)、大肠杆菌 (G-) 和沙门氏菌 (G-) 的抑菌强弱均为金黄色葡萄球菌>单增李斯特菌>大肠杆菌>沙门氏菌, 而且乙酸乙酯萃取物的抑菌效果最强, 正丁醇萃取物的抑菌效果次之, 粗提物的抑菌效果再次之, 水萃取物的抑菌效果最弱, 从表 6 的最小抑菌浓度试验结果分析, 乙酸乙酯萃取物的抑菌浓度最低, 其次是正丁醇萃取物, 再次之是粗提物, 水萃取物抑

菌浓度最高, 说明水相萃取物抑菌活性最弱, 正丁醇萃取物和粗提取物抑菌活性次之, 乙酸乙酯萃取物抑菌活性最强, 这与抑菌圈的试验结果相一致。栓皮栎橡子壳多酚物质对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌的抑菌效果优于对大肠杆菌、沙门氏菌的抑菌效果, 说明栓皮栎橡子壳多酚具有广谱抑菌作用, 对革兰氏阳性菌的抑菌效果优于对革兰氏阴性菌的抑菌效果, 而且抑菌浓度较低, 可作为某些食品的防腐剂使用。

表 6 栓皮栎橡子壳多酚分离组分的最小抑菌浓度试验结果

Table 6 Minimum inhibitory concentration test results of the *Quercus variabilis* Bl. acorn shell polyphenol separation fractions

样品/菌种	最小抑菌浓度/(mg/mL)			
	金黄色葡萄球菌	单增李斯特菌	大肠杆菌	沙门氏菌
粗提物	2.50	2.50	10.00	10.00
乙酸乙酯萃取物	1.25	1.25	5.00	5.00
正丁醇萃取物	1.25	1.25	10.00	10.00
水萃取物	5.00	5.00	10.00	10.00

### 3 结论

3.1 栓皮栎橡子壳含有丰富的多酚类物质, 可提取高达 4.39%的粗多酚, 经乙酸乙酯、正丁醇、水萃取分离, 分别得到 0.62%的乙酸乙酯萃取物, 0.92%的正丁醇萃取物和 2.8%的水萃取物。

3.2 栓皮栎橡子壳多酚分离组分的成分组成各不相同, 分子中均含有酚羟基、羰基、芳烃 C=C 骨架、C-H 键和 C-O-C 键结构。乙酸乙酯萃取物以鞣花酸为主, 含有没食子酸、儿茶素和少量原儿茶酸 4 种多酚, 正丁醇萃取物含有阿魏酸、鞣花酸、没食子酸、表没食子酸儿茶素、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、原儿茶酸、咖啡酸、表儿茶素没食子酸酯、山奈酚等 11 种多酚, 水萃取物以阿魏酸含量为主, 含少量没食子酸、鞣花酸、槲皮素 4 种多酚。栓皮栎橡子壳的正丁醇萃取物中的多酚含量和种类最为丰富。

3.3 栓皮栎橡子壳的多酚分离组分对 DPPH·自由基、ABTS<sup>+</sup>·自由基、·OH 自由基在体外均有较强的清除能力, 其对·OH 自由的清除能力最强, 其次是 DPPH·自由基, 对 ABTS<sup>+</sup>·自由基清除能力最弱, 说明栓皮栎橡子壳多酚具有很好的抗氧化性能, 其清除自由基能力和抗氧化能力虽然不如 Vc, 但与 Vc 能力相当。

3.4 栓皮栎橡子壳的多酚分离组分对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、大肠杆菌和沙门氏菌均具有不同程度抑制作用, 对 G+菌的抑制作用强于 G-菌, 其中乙酸乙酯萃取物抑菌效果最好, 正丁醇萃取物和粗提物的抑菌效果次之, 水萃取物抑菌效果最差。说明栓皮栎橡子壳多酚具有广谱抑菌活性, 可作为某些保健品防腐剂使用。

### 参考文献

- [1] 汪启兵, 许凡萍, 魏超贤, 等. 人体内自由基的研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(8): 1175-1182  
WANG Qi-bing, XU Fan-ping, WEI Chao-xian, et al. Research progress on free radicals in human body [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2016, 37(8): 1175-1182
- [2] 钟秀倩, 钟俊辉. 抗氧化剂与人体保健[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(4): 53-55  
ZHONG Xiu-qian, ZHONG Jun-hui. Anti-oxidizer and human body health care [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2007, 24(4): 53-55
- [3] 赵国玲, 刘承初. 植物性食材的酚类化合物及其对机体的抗氧化保护[J]. 生物技术通报, 2009, s1: 40-45  
ZHAO Guo-ling, LIU Cheng-chu. A review on phenolic compounds from edible plants and their protective activities *in vivo* through antioxidation [J]. Biotechnology Bulletin, 2009, s1: 40-45
- [4] Moradi M T, Karimi A, Alidadi S. *In vitro* antiproliferative and apoptosis-inducing activities of crude ethyle alcohole extract of *Quercus brantii* L. acorn and subsequent fractions [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2016, 14(3): 196-202
- [5] Mortazaei S. Study antibacterial effects of hydroalcoholic extract of acorn fruit's (*Quercus branti*) against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* *in vitro* [J]. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 2016, 17(6): 98-106
- [6] Cook N C, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism,

- cardioprotective effects, and dietary sources [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 1996, 7(2): 66-76
- [7] Ishida Y, Hirota T, Sato S, et al. Discriminative analysis of free and esterified gallic acids in acorn shells by thermochemolysis-gas chromatography/mass spectrometry in the presence of organic alkalis [J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2015, 116: 114-119
- [8] Dalar A, Dogan A, Bengu A S, et al. Screening *in vivo* antioxidant and haematological properties of sumac and acorn bioactive rich extracts [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 124: 20-27
- [9] Rakić S, Povrenović D, Tešević V, et al. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 74(3): 416-423
- [10] Shon M S, Kim S K, Song J H, et al. Anti-oxidant and anti-adipogenic effects of acorn (*Quercus acutissima* CARR.) shell extracts via regulation of wnt signaling in 3T3-L1 cells [J]. Food Science & Biotechnology, 2016, 25(3): 875-882
- [11] Custódio L, Patarra J O, Alberício F, et al. Phenolic composition, antioxidant potential and *in vitro* inhibitory activity of leaves and acorns of *Quercus suber* on key enzymes relevant for hyperglycemia and Alzheimer's disease [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 64: 45-51
- [12] 张亚亭,李德海,包怡红. 橡子壳色素抗氧化活性研究[J].北京林业大学学报,2017,39(4):94-100  
ZHANG Ya-ting, LI De-hai, BAO Yi-hong. Antioxidant activity on the pigments from acorn shell [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(4): 94-100
- [13] 张盼. 橡子仁多酚提取工艺优化及功能活性评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2013  
ZHANG Pan. Optimization of acorn nutlet polyphenol extraction and evaluation of acorn nutlet polyphenol functional activities [D]. Hang Zhou: Zhejiang University, 2013
- [14] 魏练平,毛非鸿,蒋立科,等. 橡子营养成分及其加工利用的初步研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(9): 137-138  
WEI Lian-ping, MAO Fei-hong, JIANG Li-ke, et al. Study on natural nutrition composition in acorn and its application of processing [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13(9): 137-138
- [15] 张玥,谢文霁,杨可心,等. 我国橡子资源的开发利用[J]. 中国林副特产, 2014, 4: 85-88  
ZHANG Yue, XIE Wen-ji, YANG Ke-xin, et al. Development and utilization of acorn resources in our country [J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2014, 4: 85-88
- [16] 白坤,赵智星,景晓辉. 橡子资源的开发和产品加工技术[J]. 现代商贸工业, 2000, 5: 50-51  
BAI Kun, ZHAO Zhi-xing, JIANG Xiao-hui. Acorn resources development and product processing technology [J]. Modern Business Trade Industry, 2000, 5: 50-51
- [17] 邝高波. 番石榴多酚提取及抗氧化和抑菌活性研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014  
KUANG Gao-bo. Study on extraction, antioxidant activity and antimicrobial activity of guava polyphenols [D]. Zhan Jiang: Guangdong Ocean University, 2014
- [18] 董小萍. 中药品种品质与化学成分实验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003, 168-173  
DONG Xiao-ping. Quality and Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicine Varieties [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2003, 168-173
- [19] 曾盈,刘忠松,龙桑,等. 芥菜型油菜黄黑种皮多酚差异的紫外-可见光谱研究[J]. 作物学报, 2007, 33(3): 476-481  
ZENG Kui, LIU Zhong-song, LONG Sang, et al. UV-vis spectrum differences of polyphenols between yellow and black seed coats of brassica juncea [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(3): 476-481
- [20] 郝敏,白雁,谢彩侠,等. 近红外光谱法快速测定不同连翘饮片中连翘酯 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 78-82  
HAO Min, BAI Yan, XIE Cai-xia, et al. Fast determination of forsythiaside a in different forsythiae fructus by near infrared spectroscopy [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(8): 78-82
- [21] 郑菲. 橡壳壳多酚分离纯化、抗氧化及抑菌的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011  
ZHENG Fei. The research on separation and purification and antioxidant and bacteriostatic activity of polyphenols from acorn shuck [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2011
- [22] Kusznierevicz B, Piekarska A, Mrugalska B, et al. Phenolic composition and antioxidant properties of polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC postcolumn derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(7): 1755-1763
- [23] Wang X, Xie K, Zhuang H, et al. Volatile flavor compounds, total polyphenolic contents and antioxidant activities of a China ginkgo wine [J]. Food Chemistry, 2015, 182: 41-46