

文章编号: 1004-4353(2020)01-0061-04

青楷槭皮热水提取物的抗氧化性和抗菌性研究

张鑫, 孙方丹, 宋雨阳, 金铁岩*

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 为研究青楷槭皮热水提取物的抗氧化性和抗菌性,利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和铁离子的还原能力评价了青楷槭皮热水提取物的抗氧化性,并选用变形链球菌(3289)、金黄色葡萄球菌(4220)和大肠杆菌(1924)对热水提取物的抗菌性进行了研究.结果表明:青楷槭皮热水提取物具有良好的抗氧化性,且抗氧化性与提取物浓度呈明显量效关系.在测定浓度范围内,青楷槭皮热水提取物对 DPPH 的清除率可达 95.56%,对 ABTS 的清除率可达 94.76%,对铁离子还原力吸光值可达 2.60;青楷槭皮热水提取物的乙酸乙酯和水层仅对大肠杆菌(1924)具有抗菌性,最小抑菌浓度(MIC)分别为 128 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$.以上实验结果可为开发利用青楷槭资源提供参考.

关键词: 青楷槭皮; 热水提取物; 抗氧化性; 抗菌性

中图分类号: TQ28

文献标志码: A

Antioxidant and antibacterial activity of hot water extract from *Acer tegmentosum* Maxim bark

ZHANG Xin, SUN Fangdan, SONG Yuyang, JIN Tieyan*

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In order to discuss the antioxidant and antibacterial activity of hot water extract from *Acer tegmentosum* Maxim bark, the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and Ferric-reducing power is used to evaluate the antioxidant activity of hot water extract from *Acer tegmentosum* Maxim bark, and *Streptococcus mutans* (3289), *Staphylococcus aureus* (4220) and *Escherichia coli* (1924) is used to investigate the antibacterial activity of hot water extract. The results show that the hot water extract exhibit evident antioxidant effect, in addition there was a significant dose effect relationship between antioxidant activity and extract concentration. Within the range of measured concentration, DPPH and ABTS scavenging rate, Ferric-reducing power of hot water extract reach 95.56%, 94.76% and 2.60, respectively. The ethyl acetate and water layer of hot water extract have antibacterial activity only to *E. coli* (1924), further the minimum inhibitory concentration (MIC) is 128 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The above experimental results can provide references for the development and utilization of *Acer tegmentosum* Maxim resources.

Keywords: *Acer tegmentosum* Maxim bark; hot water extract; antioxidant activity; antibacterial activity

青楷槭(*Acer tegmentosum* Maxim)属于槭树科、落叶乔木^[1],主要产于中国长白山和俄罗斯远东地区^[2].青楷槭在民间常被用于治疗创伤性

出血、脓肿、皮炎等^[3-4].目前,从青楷槭中已分离出多种具有生物活性的成分,如黄酮、木质素等^[5-8].研究表明,黄酮类化合物对由酒精引起的

收稿日期: 2019-10-15

* 通信作者: 金铁岩(1968—),男,博士,副教授,研究方向为食品发酵.

肝损伤具有保护作用^[9]. 目前为止, 未见有关青楷槭皮热水提取物的抗氧化性和抗菌性的报道. 基于此, 本文研究青楷槭皮热水提取物的抗氧化性和抗菌性, 为开发和利用青楷槭皮提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青楷槭采集于珲春市密江镇下洼子村, 由延边大学张华老师鉴定; 福林试剂、芦丁、单宁酸、抗坏血酸(Vc)、DPPH、ABTS, 上海源叶生物科技有限公司生产; 过硫酸钾、氯化铁、碳酸钠、铁氰化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、三氯乙酸、乙酸乙酯、石油醚、二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯, 科密欧化学试剂有限公司生产.

1.2 仪器与设备

U-3900 紫外可见分光光度计, 日立天美公司; QFST-250SQ 索式提取仪, 浙江普托仪器有限公司; KDN-08A 凯式定氮仪, 上海明嘉电子有限公司; MA45 红外水分测定仪, 深圳市分析仪器制造有限公司; SH-1000 酶标仪, 天美科技有限公司.

1.3 实验细菌及培养基

Staphylococcus aureus (金黄色葡萄球菌) 4220; *Streptococcus mutans* (变形链球菌) 3289; *Escherichia coli* (大肠杆菌) 1924; MHB 肉汤培养基; BHI 脑心浸出液培养基.

1.4 实验方法

1.4.1 青楷槭皮热水提取物的制备 将青楷槭皮粉碎, 过孔径 180 μm 筛. 取青楷槭皮粉 200 g, 按 1:10 料液比, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴加热 6 h, 冷却过滤.

1.4.2 总酚含量的测定 采用福林酚法^[10]测定总酚含量. 称取 0.1 g 青楷槭皮粉末, 制成 1 mg/mL 的样品溶液. 吸取 2 mL 样品溶液于试管中, 加入 2 mL 10% 福林试剂, 充分摇匀后加入 1.6 mL 7.5% 碳酸钠溶液, 摇匀静置 0.5 h 后于 750 nm 处测定溶液的吸光度, 根据线性回归方程计算总酚的含量.

1.4.3 总黄酮含量的测定 采用紫外分光光度法^[11]测定总黄酮的含量. 吸取 4 mL 样品溶液 (1 mg/mL) 于试管中, 依次加入 0.5 mL 5% 亚硝

酸钠溶液和 0.5 mL 10% 硝酸铝溶液, 摇匀静置 6 min 后加入 4 mL 4% 氢氧化钠溶液, 用水加至 10 mL, 摇匀静置 10 min 后于 510 nm 处测量溶液的吸光度, 根据线性回归方程计算总黄酮的含量.

1.4.4 DPPH 清除率的测定 称取 0.003 9 g DPPH, 用无水乙醇溶解后转移入 100 mL 棕色容量瓶, 定容后制得 1×10^{-4} mol DPPH 标准溶液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存. 配制 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/mL 的样品溶液, 然后取 4 mL 不同浓度的样品溶液, 分别加入 4 mL DPPH, 混匀, 避光放置 0.5 h. 用紫外分光光度计于 517 nm 处测量溶液的吸光度 A_i , 同时测量 4 mL 无水乙醇与 4 mL 样品混合液的吸光度 A_j 以及 4 mL DPPH 与 4 mL 无水乙醇混合液的吸光度 A_c . DPPH 自由基清除率 (CL_{DPPH}) 的计算公式为

$$CL_{\text{DPPH}} = (A_i - A_j) / A_c \times 100\%. \quad (1)$$

1.4.5 ABTS 清除率的测定 取 0.2 mL 7.4×10^{-3} mol/L ABTS 置于试管中, 加入 2.6×10^{-3} mol/L 过硫酸钾 0.2 mL, 均匀混合, 在室温下黑暗静置 12 h 后用无水乙醇稀释 50 倍即制得 ABTS 工作液 (在 734 nm 下 ABTS 工作液的吸光度 $A = 0.7 \pm 0.02$). 配制 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/mL 的样品溶液. 取 2 mL 不同质量浓度的样品溶液, 加入 8 mL ABTS 工作液, 摇匀静置 6 min 后于 517 nm 处测定其吸光度 A_i ; 再用水替换空白组的样品溶液, 测定其吸光度 A_0 . ABTS 自由基清除率 (CL_{ABTS}) 的计算公式为

$$CL_{\text{ABTS}} = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100\%. \quad (2)$$

1.4.6 铁离子还原能力的测定 取磷酸二氢钠 1.74 g、磷酸氢二钠 2.7 g、氯化钠 1.7 g, 定容成 400 mL 溶液, 得到磷酸盐缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 6.6); 称取 1 g 铁氰化钾溶于 99 g 水中, 制得 0.1% 的铁氰化钾溶液. 配制 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/mL 的样品溶液. 取 5 mL 不同质量浓度的样品溶液, 加入 5 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 和 5 mL 0.1% 铁氰化钾溶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 0.5 h 后加入 5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 离心 10 min. 取 5 mL 上层清液, 加 5 mL 水和 1 mL 0.1% 氯化铁溶液, 反应 10 min 后于 700 nm 处测量溶液的吸光度, Vc 作为对照.

1.4.7 抗菌活性的测定 将 2 g 青楷槭皮热水

提取物溶解在水中,用等体积的石油醚和乙酸乙酯萃取3次,得到石油醚层、乙酸乙酯层和水层浸膏,然后分别用相应体积的DMSO溶解.将100 μL 培养液加入无菌96孔板中,通过双倍连续稀释法^[12]进行实验,并建立空白对照组.用酶标仪在650 nm处测量96孔板加入细菌后的吸光度,实验组的吸光度值为 A'_1 ,空白对照组的吸光度值为 A'_0 .将96孔板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养20 h后,再次测定实验组的吸光度值 A_1 和空白对照组的吸光度值 A_0 .抑菌率(IR)的计算公式为

$$IR = \left(1 - \frac{A_1 - A'_1}{A_0 - A'_0}\right) \times 100\%. \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 青楷槭皮总酚和总黄酮含量

图1为芦丁和单宁酸标准曲线.由图1可知,标准物溶液浓度与吸光度值之间具有线性相关.单宁酸标准曲线方程为 $y = 0.0011x + 0.0272$, $R^2 = 0.9953$;芦丁标准曲线方程为 $y = 0.001x - 0.0032$, $R^2 = 0.9996$.根据方程计算得青楷槭皮热水提取物的总酚和总黄酮含量分别为 $(289.02 \pm 5.72) \text{ mg/g}$, $(33.56 \pm 3.32) \text{ mg/g}$.

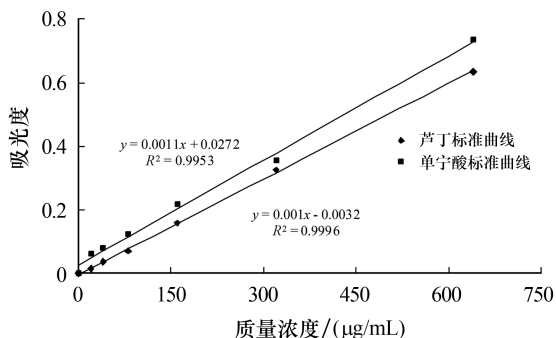


图1 芦丁和单宁酸的标准曲线

2.2 青楷槭皮热水提取物的DPPH清除能力

图2为青楷槭皮热水提取物的DPPH清除率.由图2可以看出,在测定浓度范围内,提取物的DPPH清除率随提取物浓度的增加而增加,说明青楷槭皮热水提取物的DPPH清除率与提取物浓度之间存在良好的量效关系.当浓度范围在0.01~0.5 mg/mL时,提取物对DPPH的清除率显著低于相同浓度的Vc;当浓度大于0.05 mg/mL时,提取物对DPPH的清除率与Vc接近.

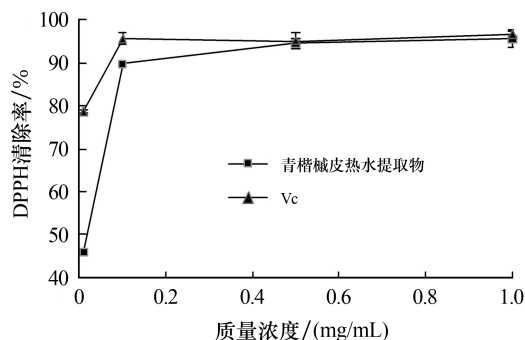


图2 青楷槭皮热水提取物的DPPH清除率

2.3 青楷槭皮热水提取物的ABTS清除能力

图3为青楷槭皮热水提取物的ABTS清除率.由图3可以看出,在测定浓度范围内,青楷槭皮热水提取物对ABTS的清除率与Vc接近.当提取物浓度超过0.1 mg/mL时,其对ABTS的清除率达到94.76%,高于青楷槭树叶提取物对ABTS的清除率(最高清除率为93.84%)^[13].

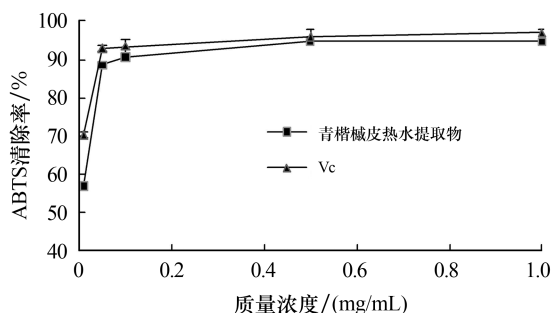


图3 青楷槭皮热水提取物的ABTS清除率

2.4 青楷槭皮热水提取物对铁离子的还原能力

图4为青楷槭皮热水提取物对铁离子的还原能力.由图4可以看出,在测定浓度范围内,随着提取物浓度的增加,其对铁离子的还原力逐渐增加,但其还原能力略低于Vc.当浓度为1 mg/mL时,铁离子还原力的吸光值达到最高,为2.60.

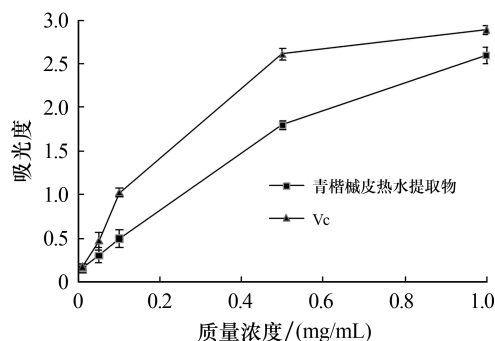


图4 青楷槭皮热水提取物的铁离子还原能力

2.5 青楷槭皮热水提取物的抗菌活性

表 1 为青楷槭皮热水提取物对不同细菌的 MIC. 由表 1 可知,提取物的石油醚层对变形链球菌(3289)、金黄色葡萄球菌(4220)、大肠杆菌(1924)均无抗菌活性,提取物的乙酸乙酯和水层对大肠杆菌(1924)有抗菌活性,其 MIC 分别为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但对变形链球菌(3289)、金黄色葡萄球菌(4220)没有抗菌活性. 该结果与 PARK 等^[14]的研究结果一致.

表 1 青楷槭皮热水提取物对不同细菌的 MIC $\mu\text{g}/\text{mL}$

菌种	石油醚	乙酸乙酯	水
<i>S.mutans</i>	>256	>256	>256
<i>S.aureus</i>	>256	>256	>256
<i>E.coli</i>	>256	128	16

注: >256 为无抗菌活性.

3 结论

本文研究表明,青楷槭皮热水提取物中的总酚和总黄酮含量分别为 $(289.02 \pm 5.72) \text{ mg/g}$, $(33.56 \pm 3.32) \text{ mg/g}$. 青楷槭皮热水提取物具有很好的抗氧化性,且其抗氧化性与提取物浓度呈明显的量效关系. 青楷槭皮热水提取物对变形链球菌(3289)、金黄色葡萄球菌(4220)没有抗菌活性,而其乙酸乙酯层和水层对大肠杆菌(1924)有抗菌性, MIC 分别为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 本文研究结果可为进一步分离和纯化青楷槭皮中的抗氧化和抗菌性物质,以及开发利用青楷槭皮提供理论依据.

参考文献:

[1] CHOI G E, HYUN K Y. Inhibitory effect of *Acer tegmentosum* Maxim extracts on *P. gingivalis* LPS-induced periodontitis[J]. Archives of Oral Biology, 2020, 109: 104529.

[2] HOU Y, JIN C, AN R, et al. A new flavonoid

from the stem bark of *Acer tegmentosum* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2019, 83: 1-3.

[3] KWON H J, KIM Y S, HWANG J W, et al. Isolation and identification of an anticancer compound from the bark of *Acer tegmentosum* Maxim [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(6): 1032-1039.

[4] YANG G, AN D, LEE M H, et al. Effect of *Acer tegmentosum* bark on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 177(6): 53-60.

[5] PARK H S, JO E, HAN J H, et al. Hepatoprotective effects of an *Acer tegmentosum* Maxim extract through antioxidant activity and the regulation of autophagy [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 239(15): 111912.

[6] 唐雯, 王建军, 徐家星, 等. 槭树科药用植物的化学成分研究进展 [J]. 北方园艺, 2012(18): 194-200.

[7] 李倩中, 刘晓宏, 苏家乐. 我国槭树科植物研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2008(6): 184-186.

[8] TUNG N H, YANG D, KIM S K, et al. Total peroxyl radical-scavenging capacity of the chemical components from the stems of *Acer tegmentosum* Maxim [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(22): 10510-10514.

[9] YU T, LEE J, LEE Y G, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128(1): 139-147.

[10] 刘阿文, 徐硕, 金铁岩. 酱露酒抗氧化及抗癌性能的研究 [J]. 延边大学学报(自然科学版), 2018, 44(2): 160-163.

[11] 胡潇文. 猴头菇成分及其生理活性的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2018.

[12] 韩立杰. 榛花粉成分及生理活性的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2014.

[13] PARKS J, SHIN E H, KIM D H, et al. Nutrition components and physicochemical properties of *Acer tegmentosum* Maxim. Leaf [J]. Culinary Science & Hospitality Research, 2016, 22(8): 27-38.

[14] PARK S Y, LEE M H, SO Y J. A study on antimicrobial and antioxidant activity of ethanol extract of *Rhus chinensis* Mill [J]. Culinary Science & Hospitality Research, 2017, 23(5): 151-158.