

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.04.017

无刺枸骨果实化学成分及其抗氧化和抑菌活性研究

余新松, 翟大才, 胡宗浩, 滕芸芸, 朱雯培, 李士壮, 柏晓辉*

(黄山学院生命与环境科学学院, 安徽 黄山 245041)

摘要: [目的] 探究无刺枸骨果实的化学成分及功能, 为种质资源的开发利用提供基础。[方法] 利用正丁醇、乙酸乙酯和石油醚等萃取剂对无刺枸骨果实成分进行萃取, 并采用 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 法、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法和滤纸片抑菌法测定其萃取物的抗氧化与抑菌活性; 结合气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术对正丁醇萃取物的化学组分进行鉴定。[结果] 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物对 ABTS 和 DPPH 自由基均有明显的清除作用, 且清除率与萃取物浓度间呈线性正相关。抑菌试验结果表明: 正丁醇提取物对于所有菌株均具有极显著的抑菌作用, 且是 3 种萃取剂中抑菌作用最强的; 而乙酸乙酯萃取物对于枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和变形杆菌也具有极显著抑菌作用; 石油醚萃取物对枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和变形杆菌抑制作用显著。结合 GC-MS 与 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 本文首次证实无刺枸骨果实含有抗氧化与抑菌活性的药用成分——绿原酸。[结论] 本研究首次采用多种萃取剂对无刺枸骨果实成分进行萃取和鉴定, 并通过试验证明其萃取物具有显著的抗氧化和抑菌活性, 该结果为无刺枸骨果实资源的开发利用提供了数据支持。

关键词: 无刺枸骨果实; 萃取物; 化学组分; 抗氧化活性; 抑菌作用

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)04-0135-08

无刺枸骨 (*Ilex cornuta* var. *fortunei*), 是冬青属 (*Ilex* L.) 植物枸骨 (*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.) 的自然变种, 是一种常绿小乔木或灌木, 其叶形奇特, 球形核果入秋成熟转红, 鲜艳夺目, 是一种良好的观赏树种^[1]。枸骨在我国长江下游各省均有分布, 且其根、树皮、叶与果实等均可入药, 具有益肾、活络强筋等功效, 可用于治疗风湿性关节酸痛、腰肌劳损等病症^[2]。此外, 有文献报道, 无刺枸骨具有降血脂、抗生育和抑菌等作用^[3], 但具体作用机制不明。

目前, 关于无刺枸骨的研究主要集中在无刺枸骨快速繁殖与扦插技术^[4-5]、嫁接与造型技术^[6], 无

刺枸骨叶片结构对环境温度的适应^[7]、枸骨和无刺枸骨不同光强下光合能力比较^[8], 无刺枸骨不同部位齐墩果酸和熊果酸的含量分析^[1]及果实总黄酮的提取及稳定性研究^[3]等, 对无刺枸骨果实化学成分的研究较少, 而对其果实抗氧化和抑菌活性研究仍处于空白阶段。本文以无刺枸骨果实为对象, 采用多种极性不同的溶剂分别对其果实的活性物质进行萃取, 并采用 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法、滤纸片抑菌法检测其活性物质的抗氧化活性与抑菌活性; 同时结合 GC-MS (气相色谱-质谱联用) 技术对抗氧化及抑菌活性显著的正

收稿日期: 2020-04-13 修回日期: 2020-05-26

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点研究项目 (KJ2019A0614, KJ2019A0611, 2006kj231B); 安徽省自然科学基金项目 (1908085QC124); 国家林木种质资源共享服务平台 (2005DKA21003); 国家林业和草原局 (KJZXZZ2019011); 国家大学生创新创业训练项目 (201810375032, 201810375049, 201910375048); 生态与健康技术中心平台项目 (kyp201809)

* 通讯作者: 柏晓辉, 男, 副教授, 主要从事病原微生物耐药机制、特境微生物的筛选鉴定与代谢产物的生物活性研究. Tel: 0559-2546552. E-mail: bxh@hsu.edu.cn

丁醇萃取物化学组成进行分析鉴定, 以期为无刺枸骨果实资源的综合利用与开发提供数据支持。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

1.1.1 仪器设备 高压蒸汽灭菌锅 (SQ510C 型, 重庆雅马拓科技公司)、恒温培养箱 (ZGP-2050 型, 上海智城分析仪器公司)、超净工作台 (ZHJH-C1106B 型, 上海智城分析仪器公司)、紫外可见分光光度计 (UV754N 型, 上海精密科学仪器公司)、气相色谱-质谱联用仪 (Agilent 7890 A-5975C 型, 美国 Agilent 公司)。

1.1.2 试剂 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 与 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 购于东京化成株式会社, 均为分析纯; 无水乙醇、甲醇、正丁醇、乙酸乙酯、石油醚、过硫酸钾等试剂购于上海国药集团, 均为分析纯; 酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉和维生素 C 等生化试剂购于上海生工有限公司。

1.1.3 实验材料 实验所用的无刺枸骨成熟期果实 (凭证标本采集号-03; 采集人: 余新松; 鉴定人: 方建新; 采集地点: 安徽屯溪; 采集时间: 2019 年 12 月 4 日) 采集于黄山学院校园内。

本文抑菌实验所用菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和变形杆菌 (*Proteus bacillus vulgaris*), 以上菌株保存于黄山学院微生物学实验中心且均购自于中国典型培养物保藏中心。抑菌实验所用固体培养基为 LB (Luria-Bertani) 平板培养基, 其配制方法参考文献 [9]。

1.2 实验方法

1.2.1 无刺枸骨果实成分的提取 将采集的新鲜无刺枸骨果实去果梗后粉碎至糊状, 称取 20.0 g 糊状果实于 500 mL 圆底烧瓶中, 加入 200 mL 甲醇并于 60 °C 恒温萃取 3 h; 过滤后收集上清液, 并向滤渣中再加入新甲醇 200 mL 后重复提取 2 次; 将 3 次提取液合并后于旋转蒸发仪内 60 °C 真空蒸干得到甲醇粗提物, 收集并称质量后用 100 mL 双蒸水重悬甲醇粗提物, 再按 1:1 等体积比依次加入 100 mL 正丁醇、乙酸乙酯和石油醚进行萃取, 各萃取溶剂分别重复 3 次, 收集 300 mL 各萃取相溶

剂后于旋转蒸发仪内 60 °C 减压旋干并称质量; 最后用无水乙醇分别将上述萃取物配制成 10 mg·mL⁻¹ 溶液, 保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 无刺枸骨果实萃取物对 ABTS 自由基的清除能力 参考文献 [10] 方法检测并改进无刺枸骨果实萃取物清除 ABTS 自由基的能力, 方法如下: 按体积比 1:1 分别移取 2.45 mmol·L⁻¹ K₂S₂O₈ 溶液与 7 mmol·L⁻¹ ABTS 溶液混匀并避光反应 12 h; 用甲醇将反应后 ABTS 液稀释至 λ_{734 nm} 吸光值为 0.68~0.72 待用。分别移取无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物不同浓度溶液 200 μL 于 2 mL 上述甲醇稀释后的 ABTS 溶液中, 混匀后于暗处室温反应 6 min 测其吸光值 A_x。以相同方法测定 200 μL 甲醇与 2 mL 反应后的 ABTS 溶液反应后的吸光值 A₀; 同时, 测定 100 μL 不同浓度的无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物溶液与 2 mL 甲醇反应后的吸光值 A_y, 每组重复测定 3 次。以 Vc 为阳性对照, 采用上述方法测定其清除 ABTS 自由基的能力, 重复 3 次。按公式 (1) 计算清除 ABTS 自由基的清除率 (Y), 取其平均值进行分析。

$$Y = (1 - (Ax + Ay) / A_0) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 无刺枸骨果实萃取物对 DPPH 自由基的清除能力 参考文献 [11] 方法并适当改善检测无刺枸骨果实萃取物清除 DPPH 自由基的能力, 方法如下: 分别移取经无水乙醇稀释的无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物溶液 100 μL 于 0.06 mmol·L⁻¹ DPPH-乙醇 (95%) 溶液中配制成一系列不同浓度的溶液, 混匀并避光反应 20 min 后于 λ_{517 nm} 处测定吸光值 B_x。同时, 吸取 100 μL 无水乙醇至 DPPH-乙醇 (95%) 溶液中作为对照组, 测定其吸光值 B₀。以 Vc 为阳性对照, 采用上述方法测定其清除 DPPH 自由基的能力, 重复 3 次。按公式 (2) 计算清除 DPPH 自由基的清除率 (Z), 取平均值进行分析。

$$Z = (1 - B_x / B_0) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 无刺枸骨果实萃取物的抑菌活性 参考文献 [9] 方法检测无刺枸骨果实萃取物对不同受试菌的抑菌活性, 方法如下: 将活化后的受试菌枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和变形杆菌培养至 λ_{600 nm} 处吸光值为 0.25~0.35, 吸取 100 μL 上述菌液于 LB 固体培养基上涂

布均匀,放置直径6 mm 无菌滤纸片,分别吸取10 μL 无刺枸骨果实甲醇粗提物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物滴加于纸片中央;以无水乙醇为空白对照,将以上LB固体培养基于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养12 h,测量并记录抑菌圈的大小,重复3次,以其均值进行分析。

1.2.5 无刺枸骨果实正丁醇萃取物 GC-MS 分析
依据文献[12-13]的方法并改进,采用HP-5 MS 石英毛细管柱(30 m \times 250 μm \times 0.25 μm)为色谱柱对无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物进行GC-MS分析,萃取物进样量为0.5 μL ;以纯度99.999%氦气作为载气,流速设置为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱箱采取程序梯度升温:起始温度设置为50 $^{\circ}\text{C}$,先以4 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升至150 $^{\circ}\text{C}$ 后保持1 min,再以1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升至220 $^{\circ}\text{C}$ 后维持1 min,最后以3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升至260 $^{\circ}\text{C}$ 后维持5 min,共运行50 min。

采用电子轰击(EI)离子源,70 eV电子能量;设置离子源为230 $^{\circ}\text{C}$,四极杆为150 $^{\circ}\text{C}$;扫描质量数范围 m/z 为50.0~500.0,质谱数据库选择为标准谱库NIST08。

1.2.6 无刺枸骨果实正丁醇萃取物 UPLC-Q-TOF/MS 分析 参考文献[14-16]中的方法并适当修改测定正丁醇萃取物的成分,具体参数简述如下:取1 μL 待测样品注入UPLC仪器中,设置流速为0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;采用ACQUITY HSS T3(2.1 mm \times 100 mm,1.8 μm)色谱柱,柱温恒定为30 $^{\circ}\text{C}$;流动相分别为0.1%甲醇水溶液(A)和乙腈(B);

洗脱程序设置为:0~10 min,5% B;10~20 min,20% B;20~28 min,40% B;28~38 min,60% B;38~43 min,100% B;43~46 min,100% B;46~50 min,5% B。采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式;离子源温度设为100 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气(N_2)温度为400 $^{\circ}\text{C}$;毛细管电压设为2.0 kV,锥孔电压为40 V;锥孔气(N_2)流量设为50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$;利用氩气作为碰撞气,碰撞能量为6 V和20~30 V。

2 结果与分析

2.1 无刺枸骨果实萃取物的抗氧化活性

2.1.1 无刺枸骨果实萃取物对 ABTS 自由基的清除作用 将无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚等萃取物稀释为一系列浓度梯度,检测其对ABTS自由基的清除作用。图1表明:无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯与石油醚萃取物对ABTS自由基的清除作用均与萃取物浓度呈正相关,即ABTS自由基清除率随萃取物浓度增加而增大,当正丁醇、乙酸乙酯、石油醚萃取物浓度分别为0.075、0.125、0.625 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对ABTS自由基清除率分别为99.68%、99.95%、53.21%。阳性对照 V_c 浓度(X)与ABTS自由基清除率(Y)的线性回归方程为: $Y=20783.00X+5.94$ ($R^2=0.9711$)。无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯、石油醚萃取物及 V_c 对ABTS自由基清除作用的 ED_{50} 值分别为0.0336、0.0540、0.5591、0.0021 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

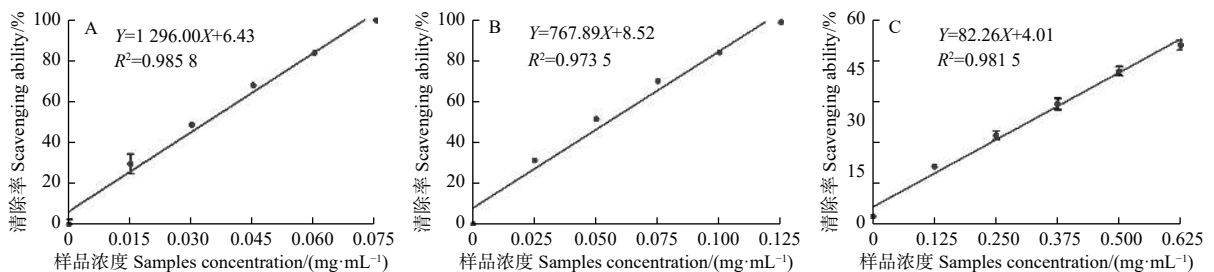


图1 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇(A)、乙酸乙酯(B)和石油醚(C)萃取物对ABTS自由基的清除作用。

Fig. 1 Free radical scavenging assays of the 1-butanol (A), ethyl acetate (B), and petroleum ether (C) extraction from the crude methanol extract of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* against ABTS

2.1.2 无刺枸骨果实萃取物对 DPPH 自由基的清除作用 分别取无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚等萃取物稀释为一系列梯度,检测其对DPPH自由基的清除作用。图2可知:无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙

酯与石油醚萃取物对DPPH自由基的清除作用均与萃取物浓度呈正相关,且随着萃取物浓度增加,DPPH清除率显著增大。当正丁醇、乙酸乙酯、石油醚萃取物浓度分别为0.125、0.25、1.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对DPPH自由基清除率分别为90.83%、

98.15%、75.50%。阳性对照 V_c 浓度 (X) 与 DPPH 自由基清除率 (Y) 的线性回归方程为： $Y=18\ 986.00X+4.49$ ($R^2=0.987\ 3$)。无刺枸骨果实甲醇

粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯、石油醚萃取物及 V_c 对 ABTS 自由基清除作用的 ED_{50} 值分别为 0.054 3、0.096 4、0.774 1、0.002 4 $mg\cdot mL^{-1}$ 。

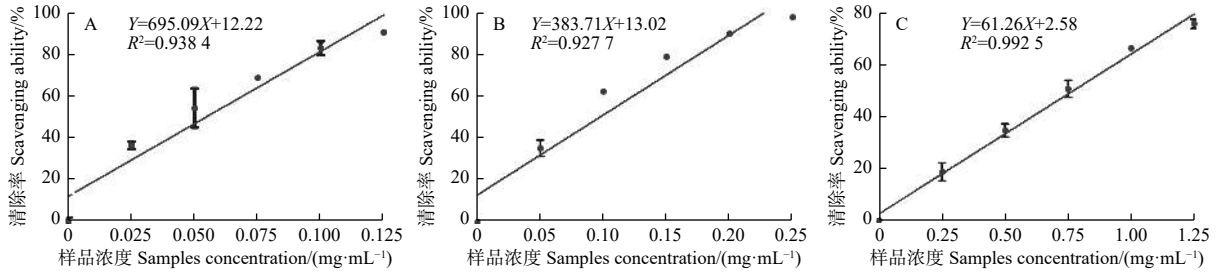


图2 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇(A)、乙酸乙酯(B)和石油醚(C)萃取物对DPPH自由基的清除作用

Fig. 2 Free radical scavenging assays of the 1-butanol (A), ethyl acetate (B), and petroleum ether (C) extraction from the crude methanol extract of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* against DPPH

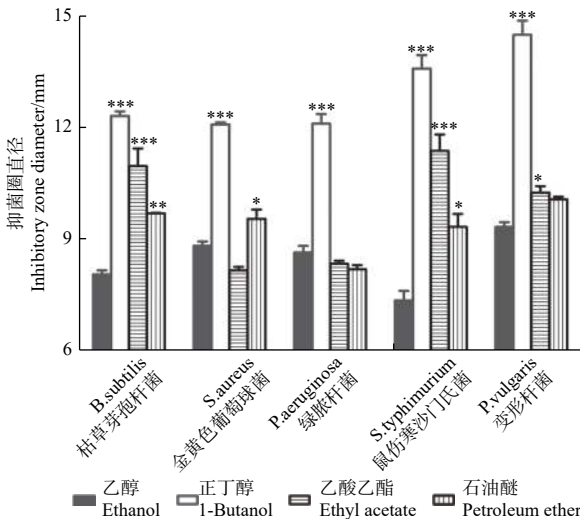
2.2 无刺枸骨果实萃取物的抑菌作用

以滤纸片抑菌法检测无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌与变形杆菌的抑菌活性。图3结果表明：正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物对上述5种受试菌均有抑制作用。与对照乙醇相比，正丁醇萃取物的抑菌效果最显著，对5种受试菌的抑制作用顺序为：鼠伤寒沙门氏菌>变形杆菌>枯草芽孢杆菌>绿脓杆

菌>金黄色葡萄球菌，抑菌圈减去同条件下乙醇对照的均值分别为 6.20、5.15、4.24、3.45、3.24 mm；乙酸乙酯萃取物对枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和变形杆菌有显著抑制作用，对金黄色葡萄球菌与绿脓杆菌无显著抑制作用；石油醚萃取物对枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌有显著抑制作用，对绿脓杆菌和变形杆菌无显著的抑制作用。

2.3 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物化学成分分析

2.3.1 无刺枸骨果实甲醇粗提物的正丁醇萃取物 GC-MS 分析 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物抗氧化活性和抑菌效果最好，故采用 GC-MS 技术对其进行化学组成分析，总离子流结果见图4。通过与标准谱库 NIST08 的质谱峰比对比分



注：*、**、***分别表示各种萃取物与乙醇对同一种受试菌抑菌活性的显著性 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 。

Notes: *, **, and *** indicate the significance of the antibacterial activity of various extracts and ethanol on the same test bacteria with $P<0.05$, $P<0.01$, and $P<0.001$, respectively.

图3 无刺枸骨果实萃取物对不同受试菌的抑菌作用

Fig. 3 Antibacterial activity of the solvent extraction of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* against the different tested bacteria

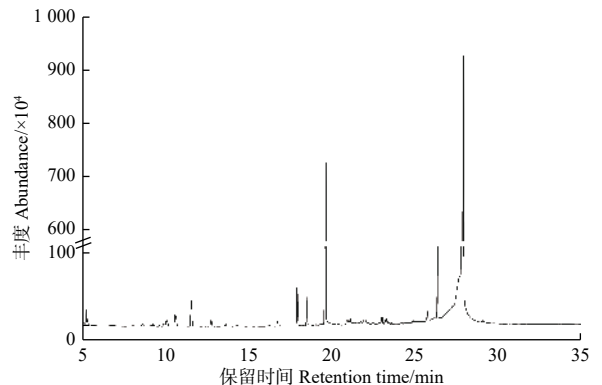


图4 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物 GC-MS 总离子流

Fig. 4 The total ion chromatogram of the 1-butanol extraction from the crude methanol extract of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* by GC-MS

析,结合峰面积归一法分析其各组分的相对含量(表1)。由图4和表1可知:无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物中共分离出色谱峰35个,经鉴定后得到14个化合物(表1),占正丁醇萃取物总量的83.15%,其相对含量高于1.00%的化合物依次为N1-(叔丁基)-2-(2-[2-(叔丁基

氨基)碳硫基]胍基]亚乙基)胍-1-碳硫酰胺(48.63%)、丁醛二丁基乙缩醛(25.53%)、1-丁氧基-2-乙基-1-己烯(2.37%)、丁酸丁酯(1.67%)和丙位癸内酯(1.04%),这5种组分占总化合物的79.24%。

表1 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物的GC-MS鉴定结果

Table 1 The chemical constituents of the 1-butanol extraction from the crude methanol extract of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* by GC-MS

编号 No.	保留时间 Retention time/min	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content/%
1	5.261	2-甲基-1-丁醇 2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	0.84
2	8.602	糠醛 Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	0.25
3	9.266	3-庚醇 3-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	0.12
4	9.891	异丁酸丁酯 Butyl isobutyrate	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.20
5	10.075	丁酸异丁酯 Isobutyl butyrate	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.52
6	10.603	2-乙基己醛 2-Ethylhexanal	C ₈ H ₁₆ O	0.94
7	11.552	丁酸丁酯 Butyl butyrate	C ₈ H ₁₆ O ₂	1.67
8	12.753	2-乙基己烯醛 2-Ethylhexenal	C ₈ H ₁₄ O	0.38
9	16.745	叔丁醚 Di-tert-butyl ether	C ₈ H ₁₈ O	0.21
10	17.938	1-丁氧基-2-乙基-1-己烯 1-Butoxy-2-ethyl-1-hexene	C ₁₂ H ₂₄ O	2.37
11	18.503	丙位癸内酯 γ -Decalactone	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1.04
12	19.664	丁醛二丁基乙缩醛 Butyraldehyde dibutyl acetal	C ₁₂ H ₂₆ O ₂	25.53
13	25.771	1,1,3,3-四丁氧基-2-丙酮 1,1,3,3-tetrabutoxy-2-propanone	C ₁₉ H ₃₈ O ₅	0.45
14	27.948	N1-(叔丁基)-2-(2-[2-[(叔丁基氨基)碳硫基]胍基]亚乙基)胍-1-碳硫酰胺 N1-(tert-Butyl)-2-(2-[2-[(tert-butylamino)carbothioyl]hydrazono]ethylidene)hydrazine-1-carbothioamide	C ₁₂ H ₂₄ N ₆ S ₂	48.63

2.3.2 无刺枸骨果实甲醇粗提物的正丁醇萃取物

UPLC-Q-TOF/MS分析 利用UPLC-Q-TOF/MS同时对无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物化学组成进行定性分析,其总离子流结果见图5,推测和鉴定出化合物共10种(表2)。从表2可知:鉴定出的10种化合物含有2种乙酰胺、2种酯类、3种羧酸、2种酮类和1种酰胺。

3 讨论

现有研究表明,枸骨具有降血脂、抗生育和抑菌等作用^[3],但具体药用分子不明。为探究无刺枸骨成熟果实中的药效分子,本文首次利用不同极性的有机溶剂正丁醇、乙酸乙酯和石油醚等溶剂对其生物活性成分进行萃取,并证明其萃取物具有非常好的抗氧化性;同时,发现其抗氧化活性较好的成分主要富集在正丁醇相中。利用抑菌试验,本文证

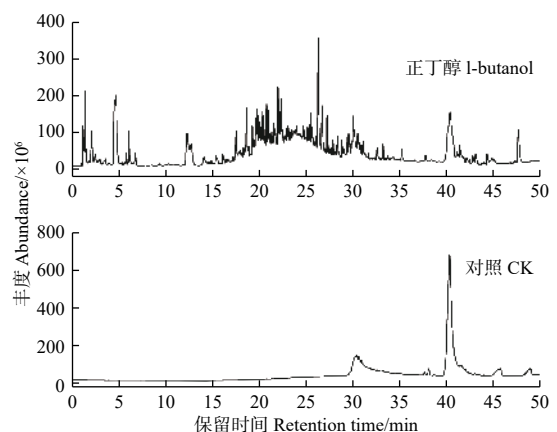


图5 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物UPLC-Q-TOF/MS总离子流

Fig. 5 The total ion chromatogram of the 1-butanol extraction from the crude methanol extract of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* by UPLC-Q-TOF/MS

表2 无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物的 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定结果

Table 2 The chemical constituents of the 1-butanol extraction from the crude methanol extract of the fructus of *I. cornuta* var *fortunei* by UPLC-Q-TOF/MS

编号 No.	保留时间 Retention time /min	实测值 Measured value	理论值 Theoretical value	碎片离子 Fragment ion	误差 Error/ $\times 10^{-3}$	分子式 Molecular formula	化合物 Chemical compound
1	2.09	330.118 7	330.118 9	312.107 9, 168.065 0, 152.069 4, 123.043 5, 105.032 3	0.2	$C_{14}H_{20}NO_8$	2-((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-4,5-二羟基-6-(((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2 <i>H</i> -吡喃-2-基)氧代)环己-2-烯-1-亚基)乙酰胺 2-((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-4,5-dihydroxy-6-(((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)cyclohex-2-en-1-ylidene)acetoneitrile
2	4.51	314.123 1	314.124 0	314.123 6, 296.112 8, 152.070 8, 135.043 8, 107.047 9	0.9	$C_{14}H_{20}NO_7$	(3,4,5-三羟基-6-羟甲基-四氢-吡喃-2-基)-氨甲酸苯甲基酯 (3,4,5-Trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yl)-carbamic acid benzyl ester
3	5.77	355.101 9	355.102 9	355.102 0, 164.041 6, 145.027 7, 135.043 1, 117.032 6	1.0	$C_{16}H_{19}O_9$	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-((3-(3,4-二羟基苯基)丙烯酸)氧代)-1,4,5-三羟基环己羧酸 (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-(((3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl)oxy)-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid
4	6.06	312.107 6	312.108 3	312.107 7, 192.064, 151.057 0, 145.049 0, 123.043 2	0.7	$C_{14}H_{17}NO_7$	(<i>R</i>)-2-(4-羟基苯基)-2-(((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2 <i>H</i> -吡喃-2-基)氧代)乙酰胺 (<i>R</i>)-2-(4-hydroxyphenyl)-2-(((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)acetoneitrile
5	18.62	369.117 6	369.118 6	305.096 4, 179.063 7, 177.053 8, 163.038 5, 145.027 3	1.0	$C_{17}H_{21}O_9$	6-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4-二羟基-6-(羟甲基)-5-甲氧基四氢-2 <i>H</i> -吡喃-2-氧基)-8-羟基-3-甲基-1 <i>H</i> -异色烯-1-酮 6-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-5-methoxytetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yloxy)-8-hydroxy-3-methyl-1 <i>H</i> -isochromen-1-one
6	20.34	611.162 0	611.161 2	611.162 5, 465.102 3, 303.053 6, 293.101 7, 145.049 2, 127.038 3	0.8	$C_{27}H_{31}O_{16}$	2-(3,4-二羟基-苯基)-5,7-二羟基-3-[(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-4-(<i>S</i>)-羟基-3-(<i>R</i>)-羟基-6-甲基-5-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-三羟基-6-羟甲基-四氢-吡喃-2-氧基)-四氢-吡喃-2-氧基]-色烯-4-酮 2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-4-(<i>S</i>)-hydroxy-3-(<i>R</i>)-hydroxy-6-methyl-5-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-tetrahydro-pyran-2-yloxy]-chromen-4-one
7	22.34	540.244 7	540.245 8	523.212 1, 346.171 9, 343.152 7, 331.153 6, 285.111 1, 281.086 5, 178.092 9	1.1	$C_{27}H_{34}N_5O_7$	1-[2-(2-[2-氨基-3-(4-羟基-苯基)-丙酰氨基]-乙酰氨基基)-乙酰氨基基]-3-苯基-丙酰-吡咯烷-2-羧酸 1-[2-(2-[2-Amino-3-(4-hydroxy-phenyl)-propionylamino]-acetyl-amino)-acetyl-amino]-3-phenyl-propionyl]-pyrrolidine-2-carboxylic acid
8	26.27	473.361 0	473.363 1	455.350 8, 437.340 6, 409.345 2, 391.334 7	2.1	$C_{30}H_{49}O_4$	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>aR</i>)-10-羟基-9-(羟甲基)-1,2,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,9,12 <i>a</i> -六甲基-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,7,8,8 <i>a</i> ,9,10,11,12,12 <i>a</i> ,12 <i>b</i> ,13,14 <i>b</i> -二十氢蒽-4 <i>a</i> -羧酸 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>aR</i>)-10-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-1,2,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,9,12 <i>a</i> -hexamethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,7,8,8 <i>a</i> ,9,10,11,12,12 <i>a</i> ,12 <i>b</i> ,13,14 <i>b</i> -icosahydricene-4 <i>a</i> -carboxylic acid
9	33.21	520.342 1	520.338 7	520.339 1, 502.328 4, 258.109 5, 185.075 7, 184.072 7	3.4	$C_{28}H_{46}N_3O_6$	(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-乙基-3-羟基-4-((<i>S</i>)-3-甲基-2-((<i>S</i>)-3-甲基-2-(3-甲基丁酰氨基)丁酰氨基)丁酰氨基)-5-苯基戊酸酯 (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-ethyl-3-hydroxy-4-((<i>S</i>)-3-methyl-2-((<i>S</i>)-3-methyl-2-(3-methylbutanamido)butanamido)butanamido)-5-phenylpentanoate
10	35.23	496.340 8	496.338 7	496.339 0, 478.328 3, 184.110 4,	2.1	$C_{26}H_{46}N_3O_6$	N-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-6-(丁基氨基)-3-羟基-1-(异丙基氨基)-5-甲基-6-羧基己烷-2-基)-4-甲氧基-3-(3-甲氧基丙氧基)苯酰胺 N-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-6-(butylamino)-3-hydroxy-1-(isopropylamino)-5-methyl-6-oxohexan-2-yl)-4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzamide

明无刺枸骨果实成分具有较好的抑菌活性，这与现有的报道相吻合^[3]。通过比较正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物的抑菌活性可发现，抑菌活性较好的生物活性成分也富集在正丁醇萃取物中，但具体的生物活性分子不明。

采用 GC-MS 与 UPLC-Q-TOF/MS 技术对正丁

醇萃取物进行分析，发现无刺枸骨果实中存在化合物 (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-((3-(3,4-二羟基苯基)丙烯酸)氧代)-1,4,5-三羟基环己羧酸，该化合物又称为绿原酸^[17]。现有研究表明，绿原酸是很多药材和中成药具有消炎利胆、抗菌解毒的主要药效分子^[17]；其具有很强的清除 DPPH 自由基能力，也具有显著的抗

菌、抗病毒作用^[17]。因此,正丁醇萃取物具有很强的抗氧化和抑菌活性可能与其含有绿原酸有关。同时,UPLC-Q-TOF/MS数据显示,无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇萃取物中的化合物比较多,值得进一步发掘。

4 结论

通过测定无刺枸骨果实甲醇粗提取物的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物对ABTS和DPPH自由基的清除能力,发现萃取物均有较好的抗氧化性,其中,正丁醇萃取物的抗氧化能力最好。抑菌试验表明,以上3种萃取物的抑菌能力为正丁醇>乙酸乙酯>石油醚。通过GC-MS和UPLC-Q-TOF/MS技术对正丁醇萃取物成分的分析,本文首次报道绿原酸是无刺枸骨果实的重要药效分子,这为无刺枸骨果实的综合开发与利用提供了数据支持。

参考文献:

- [1] 范志英. RP-HPLC测定无刺枸骨不同部位中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(2): 144-145.
- [2] 谭 辉, 马超英, 陈 熙, 等. 枸骨不同药用部位的显微特征研究[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(6): 11-14.
- [3] 何洁钰, 李敬芬. 无刺枸骨果实总黄酮的提取及稳定性研究[J]. 湖州职业技术学院学报, 2018, 16(1): 84-87.
- [4] 简大为, 范淑芳, 孙爱红, 等. 无刺枸骨快速繁殖技术研究[J]. 湖北

林业科技, 2011, 40(3): 30-32, 64.

- [5] 教忠意, 张纪林, 李淑琴, 等. 基质和激素对无刺枸骨扦插成活率及其生长影响研究初报[J]. 江苏林业科技, 2007, 34(3): 5-8.
- [6] 阮学龙. 无刺枸骨树的嫁接与造型技术[J]. 安徽林业科技, 2019, 45(3): 29-31.
- [7] 李璐璐, 姜新强, 李绍翠, 等. 无刺枸骨叶片结构对自然变温的适应[J]. 中国农学通报, 2017, 33(16): 71-77.
- [8] 何理坤, 李雪芹, 金松恒. 枸骨和无刺枸骨不同光强下光合能力的比较[J]. 中国农学通报, 2011, 27(13): 37-41.
- [9] 柏晓辉, 刘孝莲, 刘 娣, 等. 一株黄精内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(3): 777-782.
- [10] 杨少辉, 宋英今, 王洁华, 等. 雪莲果体外抗氧化和自由基清除能力[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 166-169.
- [11] 贾红丽, 张丕鸿, 计巧灵, 等. 新疆阿勒泰百里香挥发油化学成分GC-MS分析及抗氧化活性测定[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 224-229.
- [12] 翟大才, 姚建林, 王文娟, 等. 红豆树叶挥发油化学成分及其抗氧化和抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(5): 814-819.
- [13] 陈道国, 张国鸣, 张 彤, 等. 沙棘浆果中酚类物质含量与自由基清除能力相关分析[J]. 林业科学研究, 2019, 32(5): 27-33.
- [14] 余新松, 姚 婷, 韩燕峰, 等. 基于GC-MS和UPLC-QTOF/MS技术的灵芝孢子粉化学成分分析[J/OJ]. 菌物学报: 1-12. <https://doi.org/10.13346/j.mycosystema.190423>.
- [15] 李辛雷, 王佳童, 孙振元, 等. 金花茶花朵和叶片UPLC-QTOF-MS分析[J]. 林业科学研究, 2018, 31(6): 83-88.
- [16] 张 蕾, 倪 穗, 李纪元, 等. 金花茶不同时期花瓣营养与生物活性成分分析[J]. 林业科学研究, 2019, 32(2): 32-38.
- [17] 张鞞灵, 马 琼. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-176.

Study on Constituents of *Ilex cornuta* var. *fortunei* Fruit and Their Antioxidant and Bacteriostatic Activity

SHE Xin-song, ZHAI Da-cai, HU Zong-hao, TENG Yun-yun, ZHU Wen-pei, LI Shi-zhuang, BAI Xiao-hui

(College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, Anhui, China)

Abstract: [Objective] To explore the chemical composition and function of the fruit of *Ilex cornuta* var. *fortunei* for the purpose of development and utilization. [Method] Firstly, 1-butanol, ethyl acetate and petroleum ether were used to extract the active components from the fruit of *I. cornuta* var. *fortunei*. Then the free radical scavenging assays against 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) coupled with the filter paper slice bacteriostasis were used to evaluate their antioxidant and bacteriostatic activities. Meanwhile, the chemical components of 1-butanol extraction were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Result] The 1-butanol, ethyl acetate and petroleum ether extracts from the crude methanol extract of the fruits of *I. cornuta* var. *fortunei* had significant scavenging effects on ABTS and DPPH free radicals, and the scavenging rate was positively correlated with the extract concentration. The results of antibacterial test showed that the 1-butanol extraction had the best antibacterial effect among all strains tested, and had the strongest bacteriostatic effect among the three extractants. The ethyl acetate extraction and the petroleum ether extract had the best antibacterial effect on *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, and *Proteus bacillus vulgaris*. Combining with GC-MS and UPLC-Q-TOF/MS technology, it was reported for the first time that the fruits of *I. cornuta* var. *fortunei* contains chlorogenic acid, a medicinal ingredient with antioxidant and antibacterial activity. [Conclusion] In this study, a variety of extractants were used for the first time to extract and identify the components of the fruits of *I. cornuta* var. *fortunei*, and the results show that the extracts have significant antioxidant and antibacterial activities..

Keywords: *Ilex cornuta* var. *fortunei*; extraction; chemical constituents; antioxidant activities; bacteriostatic activities

(责任编辑: 徐玉秀)