

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.04.029

青冈栎果壳提取物体外抗氧化及 α -葡萄糖苷酶、乙酰胆碱酯酶抑制能力研究

In vitro antioxidant, α -glucosidase and acetylcholinesterase inhibitory activities of the shell extracts from *Cyclobalanopsis glauca*

茹月蓉¹ 杨金梅¹ 沈文杰² 王军民¹

RU Yue-rong¹ YANG Jin-mei¹ SHEN Wen-jie² WANG Jun-min¹

郭磊¹ 范方宇¹ 沙小梅² 王振兴^{1,2}

GUO Lei¹ FAN Fang-yu¹ SHA Xiao-mei² WANG Zhen-xing^{1,2}

(1. 西南林业大学生命科学学院, 云南 昆明 650224; 2. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022)

(1. College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China;

2. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

摘要:以羟基自由基清除能力、2-联苯基-1-苦基胍基(DPPH)自由基清除能力、超氧阴离子清除能力和 2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除能力为指标,评估青冈栎果壳提取物(*Cyclobalanopsis glauca* Shells Extract, CGSE)的体外抗氧化活性;采用荧光底物法评估 CGSE 的 α -葡萄糖苷酶抑制能力;采用改良的 Ellman 法评估 CGSE 的乙酰胆碱酯酶抑制能力。结果表明:CGSE 具有较好的抗氧化能力,其清除羟基自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基和超氧阴离子的 IC_{50} 值分别为 (273.43 ± 9.55) , (8.31 ± 0.08) , (26.43 ± 0.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $(1\ 662.37 \pm 30.71)$ $\mu\text{g Trolox}/\text{g} \cdot \text{DW}$ 。CGSE 抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 (24.81 ± 1.99) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 显著优于对照药物阿卡波糖;CGSE 还具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制能力,其 IC_{50} 值为 (422.29 ± 25.26) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词:青冈栎;果壳;体外抗氧化; α -葡萄糖苷酶;乙酰胆碱酯酶

Abstract: The antioxidant activity, hypoglycemic potential, and Alzheimer's therapeutic potential of *Cyclobalanopsis glauca* Shells were investigated in this study. The hydroxyl radical scav-

enging ability, DPPH radical scavenging ability, superoxide anion radical scavenging ability, and ABTS radical scavenging ability were used as an indicator for evaluating the *in vitro* antioxidant activity of *Cyclobalanopsis glauca* Shells Extract (CGSE). Then the α -glucosidase inhibitory ability of CGSE was evaluated by the fluorimetry assay, and the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory ability of CGSE was evaluated by the modified Ellman method. Experimental results showed that CGSE had strong antioxidant activity, their IC_{50} values of hydroxyl radical scavenging activity, DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and superoxide anion scavenging activity were (273.43 ± 9.55) , (8.31 ± 0.08) , (26.43 ± 0.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$, and $(1\ 662.37 \pm 30.71)$ $\mu\text{g Trolox}/\text{g} \cdot \text{DW}$, respectively. The IC_{50} values toward α -glucosidase of CGSE was (24.81 ± 1.99) $\mu\text{g}/\text{mL}$, which were significantly higher than that of positive control acarbose. CGSE also showed a certain AChE inhibitory ability with the IC_{50} value of (422.29 ± 25.26) $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Keywords: *Cyclobalanopsis glauca*; shells; *in vitro* antioxidant; α -glucosinase; acetylcholinesterase

青冈栎果实是壳斗科青冈属乔木青冈栎(*Cyclobalanopsis glauca*)的种子,由果仁和果壳组成。青冈栎果仁富含淀粉、油脂、蛋白质、多酚等营养物质和活性成分^[1-2],民间常用作淀粉、酿酒原料或动物饲料,亦可药用作为收敛剂,是一种具有较高开发价值的绿色食品资源^[3]。

青冈栎除用于园林绿化和木材利用外,其大量的树叶、树皮、树根和果实尚未得到开发利用。研究发现,青

基金项目:云南省农业基础研究联合专项青年项目(编号:2017FG001[-078]);云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2016ZZX150);云南省重大科技专项计划(编号:2018ZG004)

作者简介:茹月蓉,女,西南林业大学在读硕士研究生。

通信作者:王振兴(1984—),男,西南林业大学助理研究员,硕士。

E-mail: wangzhenxingfood@163.com

收稿日期:2020-03-05

冈栎树叶提取液具有较强的抗氧化能力、抗癌、抗疲劳作用^[4],其树根提取液具有抗疲劳和抗癌活性^[5];青冈栎果实具有较强的抗癌活性^[6],其种子提取物具有较强的清除 ABTS 自由基和 DPPH 自由基能力^[7],说明青冈栎资源具有很高的开发潜力。作为青冈栎的主要副产物,青冈栎果壳约占果实重量的 20%~40%,但其活性成分和功能性质尚未见报道。

课题组前期采用超声波辅助乙醇提取了青冈栎果壳中活性成分,发现提取物具有较强的铁还原能力和氧自由基吸收能力。但对于其他方面的功能活性并未作研究,且抗氧化能力涉及到多种反应特征和机理,单一的方法不能准确全面地表征样品的抗氧化能力^[8]。试验拟以羟基自由基、DPPH 自由基、超氧阴离子、ABTS 自由基清除能力为指标,评价青冈栎果壳提取物的体外抗氧化能力;以抑制 α -葡萄糖苷酶的能力为指标,评估其体外降血糖能力;以抑制乙酰胆碱酯酶的能力,评估其防治阿尔兹海默症的能力。为进一步开发利用青冈栎资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

青冈栎果实:江苏省宿迁市沭阳县;

乙醇、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)(ABTS)、抗坏血酸(V_C)、奎诺二甲基丙烯酸酯(trolox)、氢氧化钠、过氧化氢、硫酸亚铁、过硫酸钾、盐酸等:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl)、水杨酸、邻苯三酚、甘氨酸:北京索莱宝科技有限公司;

阿卡波糖、加兰他敏、4-甲基伞形酮- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-MUG)、酿酒酵母 α -葡萄糖苷酶、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)、硫代乙酰胆碱、电鳗乙酰胆碱酯酶(AChE):西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 仪器与设备

循环水真空泵:SH2-D(III)型,邦西仪器科技有限公司;

电子天平:AX224ZH 型,奥豪斯仪器(常州)有限公司;

紫外-可见分光光度计:722N 型,上海菁华科技仪器有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-6 型,上海力辰邦西仪器仪器有限公司;

酶标仪:SynergyH1 型,美国伯腾仪器有限公司;

超声波清洗器:SG5200HDT 型,上海冠特超声仪器有限公司;

旋转蒸发仪:N-1001 型,日本东京理化器械有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 青冈栎果壳提取物的制备 青冈栎果实晒干后取壳,粉碎,过 60 目筛,45 °C 恒温箱中烘干至恒重。准确称取青冈栎果壳粉末,按料液比 1:30 (g/mL)加入 40% 的乙醇水溶液,240 W 下超声提取 20 min,过滤,残渣重复提取 2 次,合并上清液,4 000 r/min 离心 30 min,弃去沉淀,再将上清液反复抽滤至澄清透亮,得青冈栎果壳提取液。将提取液于 50 °C 下真空旋干,得青冈栎果壳提取物(CGSE)。

1.3.2 CGSE 的体外抗氧化能力测定

(1) 清除羟基自由基的能力:参照文献^[9]的方法并稍作改进,取 2 mL 不同浓度的 CGSE 溶液,与 2 mL $FeSO_4$ (9 mmol/L)和 2 mL 水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/L)混合均匀,再加入 2 mL H_2O_2 (8.8 mmol/L),迅速摇匀后,37 °C 水浴 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,测定 510 nm 处吸光值。以等量 40% 乙醇替代 CGSE 溶液作空白,等量 95% 乙醇替代水杨酸-乙醇溶液作对照, V_C 代替 CGSE 溶液作阳性对照,所有试验重复 3 次,按式(1)计算羟基自由基的清除率。

$$R = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R ——清除率,%;

A ——试验组的吸光值;

A_0 ——对照组的吸光值;

A_1 ——空白组的吸光值。

(2) 清除 DPPH 自由基的能力:参照文献^[10]的方法并稍作改进,取 2 mL 不同浓度的 CGSE 溶液与 2 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L)于试管中混匀,避光反应 20 min,测定 517 nm 处吸光值。以等量 40% 乙醇替代 CGSE 溶液作空白,等量 95% 乙醇替代 DPPH 溶液作对照, V_C 代替 CGSE 溶液作阳性对照,所有试验重复 3 次,按式(1)计算清除率。

(3) 清除超氧阴离子的能力:参照文献^[11]的方法并稍作改进,采用邻苯三酚自氧化生成超氧阴离子。取 245 μ L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 50 mmol/L)、50 μ L CGSE 溶液和 5 μ L 邻苯三酚溶液(60 mmol/L),迅速混匀,37 °C 水浴 6 min,测定 325 nm 处的吸光度,每隔 30 s 读数一次,至 300 s 止。以 Tris-HCl 缓冲液为对照,蒸馏水为空白组, V_C 做阳性对照。采用 Trolox 代替 CGSE 溶液测定标准曲线并计算相同吸光值下样品的当量浓度,即 Trolox 当量(TE),用 μ g TE /g DW 表示。所有试验重复 3 次。

(4) 清除 ABTS 自由基的能力:参考文献^[12]的方法并稍作改进,取 0.2 mL 不同浓度的 CGSE 溶液与 3.8 mL ABTS 工作液,混匀,避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸

光值。以40%乙醇替代CGSE溶液作空白,等量95%乙醇替代ABTS溶液作对照, V_c 代替CGSE溶液作阳性对照,所有试验重复3次,按式(1)计算清除率。

1.3.3 CGSE抑制 α -葡萄糖苷酶的能力 参考文献[13]的方法并稍作改进,在黑色96孔酶标板中加入50 μ L合适浓度的CGSE溶液和50 μ L 4-MUG溶液,充分混匀,然后加入20 μ L α -葡萄糖苷酶溶液(0.1 U/mL),室温下避光反应20 min,加入100 μ L甘氨酸-NaOH溶液终止反应,振荡30 s,在激发波长355 nm,发射波长460 nm下测定荧光强度,利用荧光底物4-MUG的荧光衰减程度来判断 α -葡萄糖苷酶的抑制能力,以40%乙醇代替CGSE溶液作为空白,PBS代替 α -葡萄糖苷酶溶液的反应作为对照,以阿卡波糖为阳性对照。所有试验重复3次,按式(2)计算抑制率。

$$R = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1 - A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R ——抑制率,%;

A ——试验组的荧光强度;

A_0 ——对照组的荧光强度;

A_1 ——空白组的荧光强度。

1.3.4 CGSE抑制乙酰胆碱酯酶的能力 参考文献[13]

的方法并稍作改进,依次加入50 μ L CGSE溶液、125 μ L DTNB(3 mmol/L)、25 μ L乙酰胆碱酯酶(0.2 U/mL)于酶标板中,室温下反应15 min,再加入25 μ L硫代乙酰胆碱溶液,反应10 min后立即加入20 μ L 0.4% SDS终止反应。测定405 nm处吸光值。以加兰他敏作为阳性对照,PBS溶液代替乙酰胆碱酯酶为对照,40%乙醇代替CGSE溶液为空白。所有试验重复3次,按式(2)计算抑制率。

1.4 数据分析

采用Origin 8.5软件绘图,并对结果进行比较分析,所有试验均平行3次,结果以(平均值 \pm 标准偏差)表示。

2 结果与分析

2.1 CGSE的体外抗氧化能力

2.1.1 清除羟基自由基的能力 由图1可知,CGSE与 V_c 清除羟基自由基的能力均随浓度的增加而增大;CGSE清除羟基自由基的 IC_{50} 值为(273.43 \pm 9.55) μ g/mL,与商用抗氧化剂 V_c 尚有一定差距($P < 0.05$)。

2.1.2 清除DPPH自由基的能力 由图2可知,CGSE与 V_c 的变化趋势基本一致。当质量浓度 < 20 μ g/mL时,CGSE和 V_c 对DPPH自由基的清除能力均随浓度的增大先增强后趋于稳定。当质量浓度为20 μ g/mL时,对DPPH自由基的清除能力最强,达89.64%, V_c 的清除率

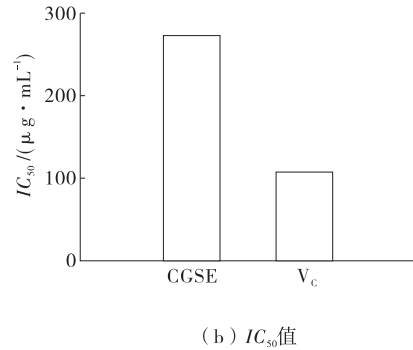
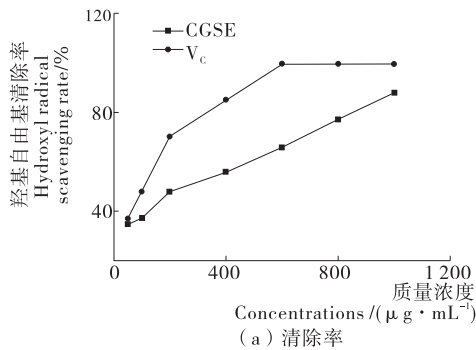


图1 CGSE对羟基自由基的清除率

Figure 1 The hydroxyl radicals scavenging ability of CGSE

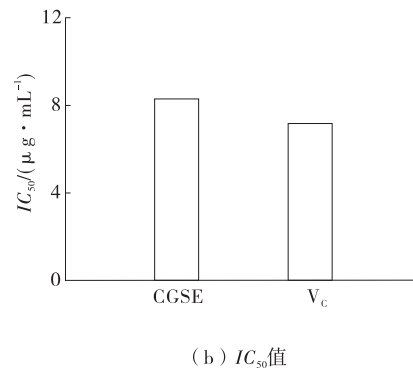
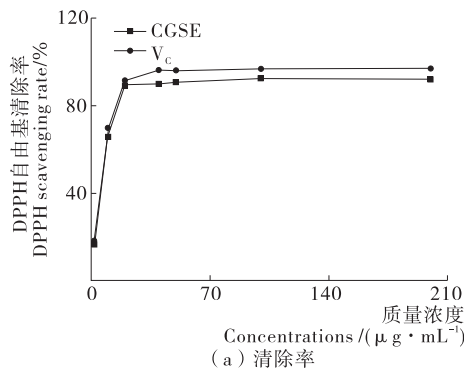


图2 CGSE对DPPH自由基的清除率

Figure 2 The DPPH scavenging ability of CGSE

为 91.12%。CGSE 的 IC_{50} 值为 $(8.31 \pm 0.08) \mu\text{g}/\text{mL}$ ，与 V_c 无显著性差异 ($P > 0.05$)，表明 CGSE 具有较强的清除 DPPH 自由基能力。

2.1.3 清除超氧阴离子自由基的能力 由图 3 可知，CGSE 清除超氧阴离子能力为 $(1\ 662.37 \pm 30.71) \mu\text{g Trolox}/\text{g} \cdot \text{DW}$ ，略高于 V_c ($P > 0.05$)，表明

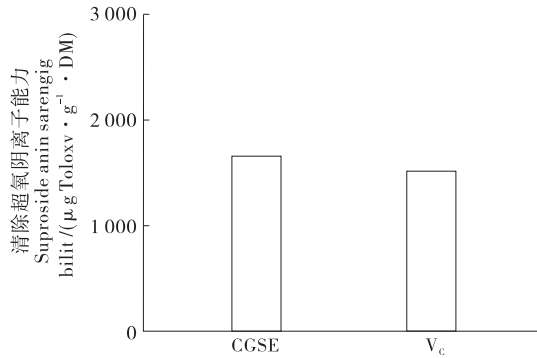


图 3 CGSE 清除超氧阴离子的能力

Figure 3 The superoxide anion scavenging ability of CGSE

CGSE 具有较强的抑制邻苯三酚自氧化能力。

2.1.4 清除 ABTS 自由基的能力 由图 4 可知，CGSE 和 V_c 对 ABTS 自由基的清除率随浓度的增大而增大。当样品质量浓度为 $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时，CGSE 的清除率高达 98.37%，高于 V_c 。CGSE 的 IC_{50} 值为 $(26.43 \pm 0.14) \mu\text{g}/\text{mL}$ ，显著低于 V_c ($P < 0.05$)。表明 CGSE 具有比 V_c 更强的清除 ABTS 自由基的能力。

2.2 CGSE 对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力

由图 5 可知，CGSE 与阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力均随浓度的增加而增大；CGSE 抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 $(24.81 \pm 1.99) \mu\text{g}/\text{mL}$ ，显著低于对照物样品阿卡波糖 ($P < 0.01$)，表明 CGSE 具有较强的抑制 α -葡萄糖苷酶的能力。

2.3 CGSE 对乙酰胆碱酯酶的抑制的能力

由图 6 可知，CGSE 抑制乙酰胆碱酯酶的能力随浓度的增加而增大，但弱于对照药物加兰他敏。CGSE 抑制乙酰胆碱酯酶的 IC_{50} 值为 $(422.29 \pm 25.26) \mu\text{g}/\text{mL}$ ，显著高于加兰他敏 ($P < 0.01$)。

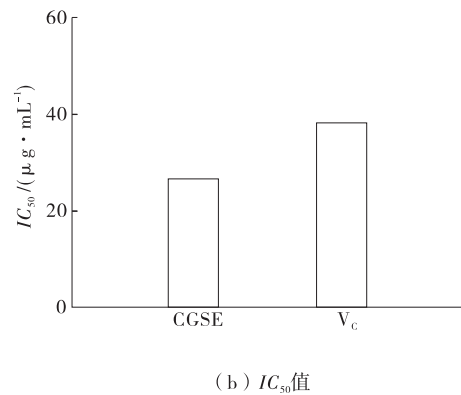
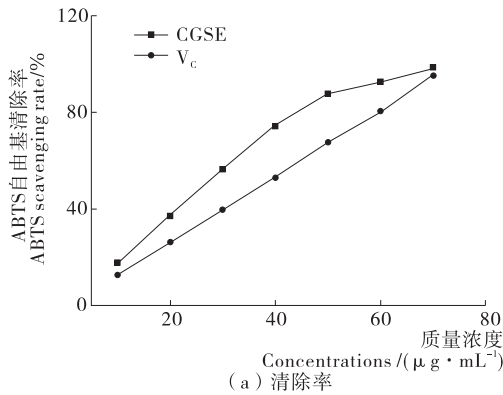


图 4 CGSE 对 ABTS 自由基的清除率

Figure 4 The $ABTS^+$ scavenging ability of CGSE

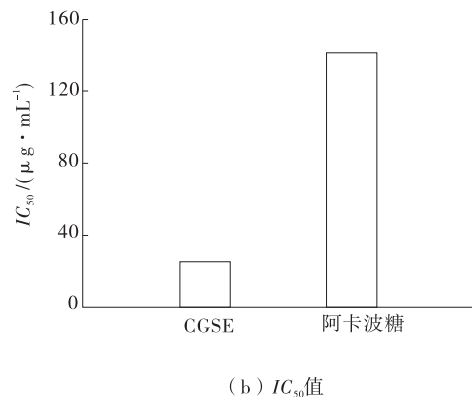
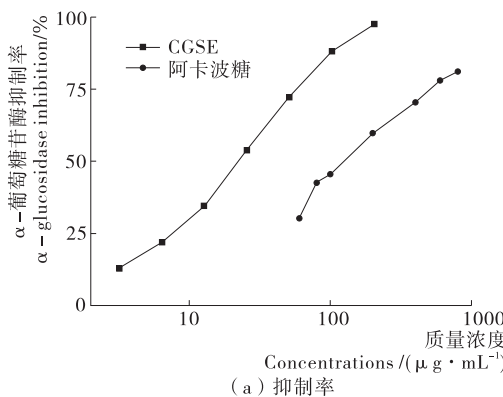


图 5 CGSE 抑制 α -葡萄糖苷酶的能力

Figure 5 The α -glucosidase inhibitory activity of CGSE

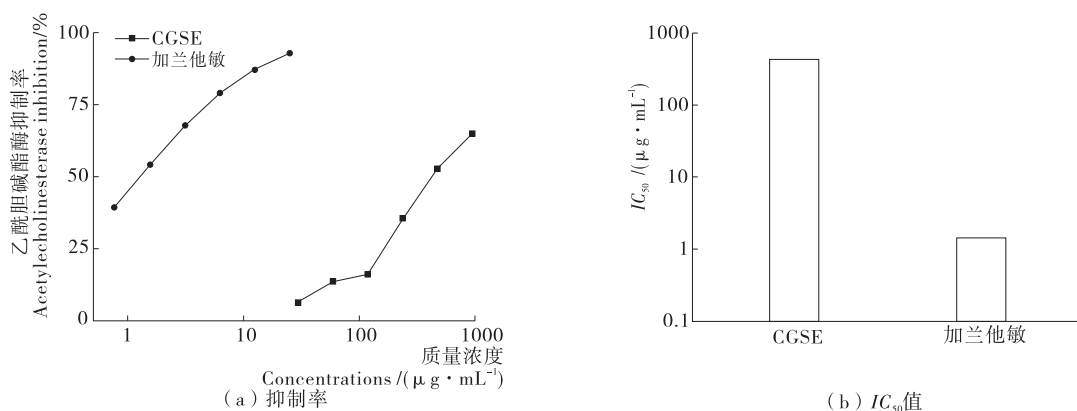


图6 CGSE抑制乙酰胆碱酯酶的能力

Figure 6 The AChE inhibitory activity of CGSE

3 结论

以超声波辅助乙醇提取法提取了青冈栎果壳提取物(CGSE),鉴于抗氧化复杂的反应特征和机理,采用了4种不同抗氧化体系来综合表征CGSE的抗氧化能力。结果表明:CGSE的清除羟基自由基的能力弱于商业抗氧化剂 V_C ;清除DPPH自由基和超氧阴离子能力与 V_C 无显著性差异;清除ABTS自由基的能力显著高于 V_C ,说明青冈栎果壳可作为优良的天然抗氧化剂使用。CGSE抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 $(24.81 \pm 1.99) \mu\text{g}/\text{mL}$,其抑制能力高于阿卡波糖,也高于麻栎椴子^[14]、麻栎叶^[15]等同类植物,说明CGSE具有较强的抑制 α -葡萄糖苷酶能力,具备开发为天然的 α -葡萄糖苷酶抑制剂的潜力;

CGSE抑制乙酰胆碱酯酶的 IC_{50} 值为 $(422.29 \pm 25.26) \mu\text{g}/\text{mL}$,高于丹参^[16]等药用植物,但离常用药物加兰他敏尚有一定差距,需进行进一步分离纯化,寻找相关活性物质,并考虑以其为母体进行结构修饰以增强其活性^[17]。后续可筛选出青冈栎果壳中具有抗氧化能力、抑制 α -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶的物质成分,并对其结构进行鉴定,研究其工作机理。

参考文献

[1] 黄建琴,徐奔鼎,王烨军,等.安徽省橡实资源及其开发利用[J].安徽林业科技,2008(增刊):27-28.
 [2] 刘仁林,王娟,廖为明.10种壳斗科植物果实主要营养成分比较分析[J].江西农业大学学报,2009,31(5):901-905.
 [3] 周磊,许敏,杨崇仁,等.壳斗科植物的化学成分及生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24(2):260-273.
 [4] 梁钧淞.青冈栎单宁分离纯化及其抗疲劳、抗肿瘤活性研究[D].桂林:广西师范大学,2012:31-45.
 [5] 曾诗媛,甘耀坤,梁钧淞,等.青冈栎根提取液对小鼠抗疲劳能力的影响[J].玉林师范学院学报,2012,33(5):56-60.
 [6] 甘耀坤,陈旭健,韦敏,等.青冈栎果实抗癌活性的实验研究[J].食品科技,2010,35(3):227-229.

[7] 王亚凤,黄永林,刘金磊,等.壳斗科植物种子的多酚类含量及抗氧化能力[J].广西科学,2016,23(2):180-183.
 [8] MANNINO G, PERRONE A, CAMPOBENEDETTO C, et al. Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals[J]. Food Chemistry, 2020, 307: 125515.
 [9] JIANG Lian, WANG Wen-jie, WEN Ping-wei, et al. Two water-soluble polysaccharides from *mung bean* skin: Physicochemical characterization, antioxidant and antibacterial activities[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: e105412.
 [10] MIRA-SÁNCHEZ M D, CASTILLO-SÁNCHEZ J, MORILLAS-RUIZ J M. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio[J]. Food Chemistry, 2020, 309: e125688.
 [11] 盛亚男,王长远,张舒,等.绿豆多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2019,35(10):193-196.
 [12] LUZARDO-OCAMPO I, RAMÍREZ-JIMÉNEZ A K, CABRERA-RAMÍREZ Á H, et al. Impact of cooking and nixtamalization on the bioaccessibility and antioxidant capacity of phenolic compounds from two sorghum varieties [J]. Food Chemistry, 2020, 309: e125684.
 [13] 张雪春,刘江,吴鑫,等.微波辅助提取蛇莓多酚及其体外抗氧化、抑制 α -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶能力研究[J].西南农业学报,2018,31(6):1171-1179.
 [14] 玄永浩,金英善,胡晓燕.麻栎椴子抗氧化及抗糖尿病活性的试验研究[J].现代农业科技,2009(17):340-341.
 [15] 罗侠,孙艳辉,刘文娟,等.麻栎叶黄酮的大孔树脂分离及其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J].食品工业科技,2012,33(24):143-146.
 [16] 周思多,王晓,冯金红,等.基于微量筛选模型的48种中草药提取物乙酰胆碱酯酶抑制活性筛选及评价[J].天然产物研究与开发,2015,27(2):328-332.
 [17] 王馨悦,陈华国,周欣.6种常见食材抗氧化及抑制乙酰胆碱酯酶活性[J].江苏农业科学,2019,47(15):208-212.