

菱角梗、菱角壳提取物抑菌活性及其活性成分分析

王洪斌¹, 陈云舒², 严守雷^{2,3,*}, 梅大佐⁴, 赵道华⁴, 张剑雄⁵, 王清章¹, 李 洁^{2,3}
(1. 武昌工学院食品与环境工程学院, 湖北武汉 430065;
2. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070;
3. 湖北省水生蔬菜保鲜加工工程技术研究中心, 湖北武汉 430070;
4. 湖北华贵食品有限公司, 湖北洪湖 433200;
5. 湖北天井湖农业科技服务有限公司, 湖北黄冈 438203)

摘要:采用滤纸片扩散法研究菱角梗、菱角壳乙醇提取液及其不同溶剂萃取物的抑菌活性,并考察不同温度、pH、紫外辐照对菱角梗、菱角壳乙酸乙酯萃取物抑菌活性稳定性的影响,最后,采用高效液相色谱法和超高效液质联用法对菱角梗、菱角壳乙酸乙酯萃取物中的成分进行鉴定。结果表明:菱角梗、菱角壳乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和酿酒酵母菌的最小抑菌浓度分别为0.391、0.391、3.125 mg/mL和0.098、0.195、1.563 mg/mL,抑菌效果显示,菱角壳乙酸乙酯萃取物优于菱角梗乙酸乙酯萃取物,二者萃取物均对革兰氏阳性菌具有显著抑菌作用,且效果强于革兰氏阴性菌,对真菌的抑菌作用最弱;菱角梗、菱角壳乙酸乙酯萃取物在温度20~100 ℃、pH5~9和紫外光处理10~40 min时,均表现出良好的抑菌稳定性。经鉴定,菱角梗乙酸乙酯萃取物中含量最高的是没食子酸和1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖,含量为45.87%,菱角壳乙酸乙酯萃取物中含量最高的是1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖、槲皮素-3-O-半乳糖苷和1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖,含量为57.84%。本文为菱角梗、菱角壳提取物作为抑菌剂的实际应用提供了参考。

关键词:菱角梗,菱角壳,抑菌活性

Antibacterial Activity and Component Analysis of Water Chestnut Stem and Water Chestnut Pericarp Extracts

WANG Hongbin¹, CHEN Yunshu², YAN Shoulei^{2,3,*}, MEI Dazuo⁴,
ZHAO Daohua⁴, ZHANG Jianxiong⁵, WANG Qingzhang¹, LI Jie^{2,3}

(1. School of Food and Environmental Engineering, Wuchang Institute of Technology, Wuhan 430065, China;
2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. Hubei Provincial Aquatic Vegetable Fresh-keeping Processing Engineering Technology Research Center, Wuhan 430070, China;
4. Hubei Huagui Food Co., Ltd., Honghu 433200, China;
5. Hubei Tianjinghu Agricultural Technology Service Co., Ltd., Huanggang 438203, China)

Abstract: Filter paper diffusion method was used to study the bacteriostatic activity of ethanol extracts from water chestnut stem and water chestnut pericarp and their different solvent extracts. The effects of different temperature, pH and UV irradiation on the stability of bacteriostatic activity of ethyl acetate extracts from water chestnut stem and water chestnut pericarp were also investigated. Finally, the components of ethyl acetate extracts from water chestnut stem and water chestnut pericarp was studied by HPLC and HPLC-MS to identify. The results showed that the minimum inhibitory concentrations of the extracts of water chestnut stem and water chestnut pericarp to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* were 0.391, 0.391, 3.125 mg/mL and 0.098, 0.195 and 1.563 mg/mL, respectively, the antibacterial effect showed that the ethyl acetate extract of the water chestnut pericarp was superior to the ethyl acetate extract of the water chestnut stem. Both extracts had a significant bacteriostatic effect on Gram-positive bacteria, and the effect was stronger than Gram-negative bacteria, and they had the weakest antibacterial effect on fungi. The ethyl acetate extracts of water chestnut stem and water chestnut pericarp showed good antibacterial stability when treated at 20~100 ℃, pH5~9 and ultraviolet light for 10~40 min. The content of gallic

收稿日期:2020-04-08
作者简介:王洪斌(1987-),男,硕士,讲师,研究方向:农产品保鲜加工与功能性成分,E-mail:whb879694@yeah.net。
* 通信作者:严守雷(1975-),男,博士,副教授,研究方向:水生蔬菜加工与贮藏,E-mail:yanshoulei1225@163.com。
基金项目:湖北省技术创新专项(2019ABA108)。

acid and 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose in the ethyl acetate extract of water chestnut stem was 45.87%. The content of 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose, Quercetin-3-O-galactoside and 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose in the ethyl acetate extract of water chestnut pericarp was 57.84%. This paper provides a reference for the practical application of the extracts of water chestnut stem and water chestnut pericarp as bacteriostatic agents.

Key words: water chestnut stem; water chestnut pericarp; antibacterial activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)03-0061-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040081

引文格式: 王洪斌, 陈云舒, 严守雷, 等. 菱角梗、菱角壳提取物抑菌活性及其活性成分分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(3): 61-67.

WANG Hongbin, CHEN Yunshu, YAN Shoulei, et al. Antibacterial Activity and Component Analysis of Water Chestnut Stem and Water Chestnut Pericarp Extracts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(3): 61-67. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

菱角 (*Trapa bispinosa* Roxb.) 属菱科, 是一种一年生自由漂浮的植物^[1]。原产于欧洲和亚洲的温和地域, 在中国主要种植于南方, 特别是太湖地区和长江下游的珠江三角洲^[2]。成熟的菱角外果皮坚硬, 内有白色果实, 口感甘甜^[3-5], 菱角中含有淀粉、膳食纤维、必需氨基酸、多酚、多糖等物质具有抗癌、抗肿瘤和抗氧化等一系列生物活性^[6-8], 因此菱角作为一种药食两用的果实一直以来受到中国人的青睐。

农产品加工过程中会产生大量副产物, 这些副产物中很多都含有丰富的酚类物质, 并被证明是酚类抗氧化剂的有效来源^[9-10]。菱角壳是菱角加工进程中的主要副产物, 约占菱角总量的 25%^[11-12]。各种研究发现, 菱角壳提取物具有降血糖^[13-14]、保护肝脏细胞^[15-16]、抗癌^[17]等作用, 这都归因于菱角壳中含有生物碱、酚酸类、萜类和甾体、多糖类、黄酮类以及苯丙素类等活性物质^[18-19]。有研究人员^[9]从菱角壳中提取了抑菌活性物质, 发现其中主要发挥抑菌作用的成分为没食子酸以及阿魏酸, 并且对革兰氏阳性菌有良好的抑制效果, 然而, 对菱角壳提取物的抑菌稳定性以及成分鉴定方面的研究较少。同样作为菱角加工过程中的副产物, 菱角梗中的多糖被证明具有良好的抗氧化活性^[20]。但菱角梗引发科学界关注的最神奇之处在于, 其可以在炎炎夏日保持多日不腐, 而菱角梗提取物的抑菌活性及成分分析情况鲜有报道。

目前对于菱角加工生产过程中产生的大量副产物——菱角梗和菱角壳, 只有极少一部分用作中药材, 大部分仍然是作为垃圾丢弃, 这造成了极大的资源浪费。本实验选择菱角梗和菱角壳为材料制备天然抑菌剂, 全面系统地研究这些抑菌物质的抑菌活性以及成分, 为其作为抑菌剂在各种食品保鲜中的实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菱角梗和菱角壳 选材于湖北省洪湖市的二角菱; 供试微生物金黄色葡萄球菌 (AB 99002)、蜡样芽孢杆菌 (AB 2011085)、枯草芽孢杆菌 (AB 90008)、大肠杆菌 (AB 208270)、铜绿假单胞菌 (AB 93066)、酿酒酵母 (AY 92003) 由中国典型培养物保藏中心提供; 培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基、营养肉汤培

养基 北京路桥技术有限公司; 所用试剂 均为分析纯。

SPX-250B 型生化培养箱 天津市泰斯特仪器有限公司; SB-5200DNT 超声波清洗仪 宁波新芝生物科技股份有限公司; UV-1800 紫外-可见分光光度计 日本岛津有限公司; ME104 电子天平 梅特勒-托多利仪器上海有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; RE52 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 安捷伦 1260 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司; Q-Exactive 超高效液相色谱质谱仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乙醇提取液的制备 新鲜菱角梗、菱角壳经洗净整理后, 在日光下晒干, 切分成 1 cm 长度, 粉碎后, 用 60 目筛进行处理, 得到的粉末低温冷藏备用。

称取一定量的菱角梗、菱角壳粉末, 料液比 1:30 (g:mL), 提取剂 95% 乙醇溶液, 水浴温度 50 °C, 在功率 500 W、振动频率 40 kHz 条件下超声波辅助提取 20 min, 采用布氏漏斗抽滤, 得滤液^[21-22]。将上述步骤重复 2~3 次, 把滤液合并后即可得到乙醇提取液。

1.2.2 各溶剂萃取物的制备 将 1.2.1 中获得的提取液, 在温度 45 °C 的条件下, 使用真空旋转蒸发器回收全部提取剂, 得到乙醇提取物粉末。乙醇提取物粉末用 10 倍量蒸馏水悬浮, 依次用等体积的有机试剂石油醚、乙酸乙酯、正丁醇^[23]萃取, 各萃取液在温度 45 °C 的条件下, 使用真空旋转蒸发器回收全部萃取剂, 得到各萃取部分粉末。

1.2.3 菌种活化 待测细菌于营养肉汤培养基中 37 °C 下培养 24 h, 使用前在相同培养条件下的试管斜面上活化培养 24 h, 待测真菌于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA) 上于 28 °C 下培养 48 h, 使用前在相同培养条件下在试管斜面上活化培养 48 h, 抑菌实验前制备菌悬液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。

1.2.4 抑菌活性检测 抑菌实验采用滤纸片扩散法^[24-26]。样品利用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解, 采用二倍稀释法配制系列质量浓度 (mg/mL) 的待测样品液。准确吸取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于平皿培养基上, 在培养基上等间距平铺 4

片已灭菌直径为 6 mm 的滤纸片,其中 3 片滴加 10 μ L 经 0.22 μ m 无菌滤头处理的样品液,根据实验目的不同,设置空白对照时,另 1 片滴加等量的 DMSO;设置阳性对照时,另一片滴加阳性对照液,阳性对照液为 10.0 μ g/mL 的氨苄青霉素(Ampicillin)或 1.0 mg/mL 的两性霉素 B(Amphotericin B)。细菌于 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h,真菌于 28 $^{\circ}$ C 下培养 48 h,采用十字交叉法量取抑菌圈直径(包括滤纸片直径)。观察菌落生长情况,存在抑菌圈的最低样品液浓度即为最小抑菌浓度(minimum antimicrobial concentration, MIC)(mg/mL)。菱角梗、菱角壳乙醇提取物的抑菌活性测定过程中,设置阳性对照;菱角梗、菱角壳各溶剂萃取物的抑菌活性测定过程中,设置空白对照和阳性对照。

1.2.5 乙酸乙酯萃取物抑菌稳定性检测 取三种典型腐败微生物大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、酿酒酵母菌作为供试菌种,考察温度、pH、紫外光处理对乙酸乙酯萃取物抑菌稳定性的影响,各处理如下:将浓度为 50 mg/mL 的萃取物溶液,分别在 20、40、60、80、100 $^{\circ}$ C 水浴温度下处理 30 min,检测抑菌活性;利用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 0.1 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH,得到 pH 分别至 5、6、7、8、9 浓度为 50 mg/mL 的萃取物溶液,检测抑菌活性;使浓度为 50 mg/mL 的萃取物溶液在 30 W 的紫外灯下分别照射 10、20、30、40 min,检测抑菌活性。

1.2.6 乙酸乙酯萃取物的纯化 根据抑菌实验结果,选择活性最强的乙酸乙酯萃取物,采用 HP-20 大孔树脂^[27]进行初步纯化,上样质量为 10 g,柱体积为 590 mL(47 cm $\times$ 4 cm),采用体积分数 0~100% 的甲醇溶液进行洗脱,得到各洗脱组分。将检测得到的洗脱活性组分再上 Sephadex LH-20 凝胶柱(85 cm $\times$ 1 cm),依次用不同浓度的甲醇液(体积分数 0~100%)洗脱,得到进一步的纯化品,用于后期的结构鉴定分析。

1.2.7 超高效液质联用法和高效液相色谱法条件 超高效液质联用法(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS)条件:色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8 μ m);流动相:A,水;B,甲醇;洗脱程序:0~15 min,0~100% B;15~20 min,100% B;20~25 min,100%~0B;流速 300 μ L/min,进样量 1.0 μ L,柱温 40 $^{\circ}$ C。质谱条件:电喷雾电离(ESI),检测离子为负离子;分辨率 70000,扫描范围 m/z 140~2000;鞘气、辅助气流速分别为 35、15 L/min,电离电压

-3.2 kV,离子参数管温度 320 $^{\circ}$ C,离子源温度 200 $^{\circ}$ C,数据扫描模式 Full MS-ddMS²。

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)条件参考文献方法^[28-29]:色谱柱,Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);流动相:A,乙腈;B,0.1% 甲酸水;洗脱程序:0~3 min,2% A;3~30 min,2%~30% A;30~35 min,30%~70% A;35~39 min,70% A;39~41 min,70%~2% A;41~45 min,2% A。流速 0.8 mL/min,进样量 10 μ L,柱温 40 $^{\circ}$ C。

1.2.8 UPLC-MS 和 HPLC 分析 菱角梗、菱角壳的乙酸乙酯萃取物经 UPLC-MS 检测,通过人工谱图解析及文献对比,确定了样品中的各种化学物质,最后利用 HPLC 法,通过标准品对已知物质进行定量检测。

1.3 数据处理

所有实验至少重复三次,数据结果取平均值,采用 Origin 8.0 进行单因素方差分析与图表制作。

2 结果与分析

2.1 菱角梗、菱角壳乙醇提取物的抑菌活性分析

菱角梗、菱角壳乙醇提取物在浓度为 50 mg/mL 时对几种典型腐败微生物的生长有明显的影响,结果见表 1。

由表 1 可知,菱角壳乙醇提取物的抑菌活性强于菱角梗乙醇提取物,且两者均表现出一定的抑菌规律:对革兰氏阳性菌抑菌能力>对革兰氏阴性菌抑菌能力>对真菌抑菌能力。

2.2 菱角梗、菱角壳各溶剂萃取物的抑菌活性分析

菱角梗、菱角壳中各极性萃取物对四种典型腐败菌(金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、酿酒酵母菌)的抑菌活性结果见图 1 和图 2。由图 1 和图 2 可知,在同一浓度下(50 mg/mL),菱角梗和菱角壳各极性萃取物对四种典型腐败菌的抑菌作用趋势一致,菱角梗各极性萃取物对腐败菌抑菌能力由强到弱为(除大肠杆菌):乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物或石油醚萃取物>水萃取物,菱角壳各极性萃取物对腐败菌抑菌能力由强到弱为:乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>石油醚萃取物>水萃取物。可得出结论:发挥主要抑菌能力的活性成分主要集中在中等极性的乙酸乙酯萃取物中,因此,在后续分析及分离鉴定实验中,重点分析菱角梗的乙酸乙酯萃取物(ethyl acetate extract of water chestnut stem,EAS)和菱角壳的乙酸乙酯萃取物(ethyl acetate extract of

表 1 菱角梗、菱角壳乙醇提取物的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of water chestnut stem and water chestnut pericarp ethanol extract

样品	抑菌圈直径(mm)					
	金黄色葡萄球菌	蜡状芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	铜绿假单胞菌	酿酒酵母
菱角梗	14.88 $\pm$ 0.05	11.50 $\pm$ 0.07	12.08 $\pm$ 0.05	9.17 $\pm$ 0.52	8.07 $\pm$ 0.13	8.17 $\pm$ 0.06
菱角壳	16.42 $\pm$ 0.98	15.35 $\pm$ 0.81	15.19 $\pm$ 0.78	13.17 $\pm$ 0.75	12.83 $\pm$ 1.30	11.27 $\pm$ 0.42
氨苄青霉素	24.91 $\pm$ 1.13	21.87 $\pm$ 0.99	23.83 $\pm$ 1.16	19.83 $\pm$ 1.37	17.37 $\pm$ 1.21	-
两性霉素 B	-	-	-	-	-	11.95 $\pm$ 0.64

注:“-”表示未检测。

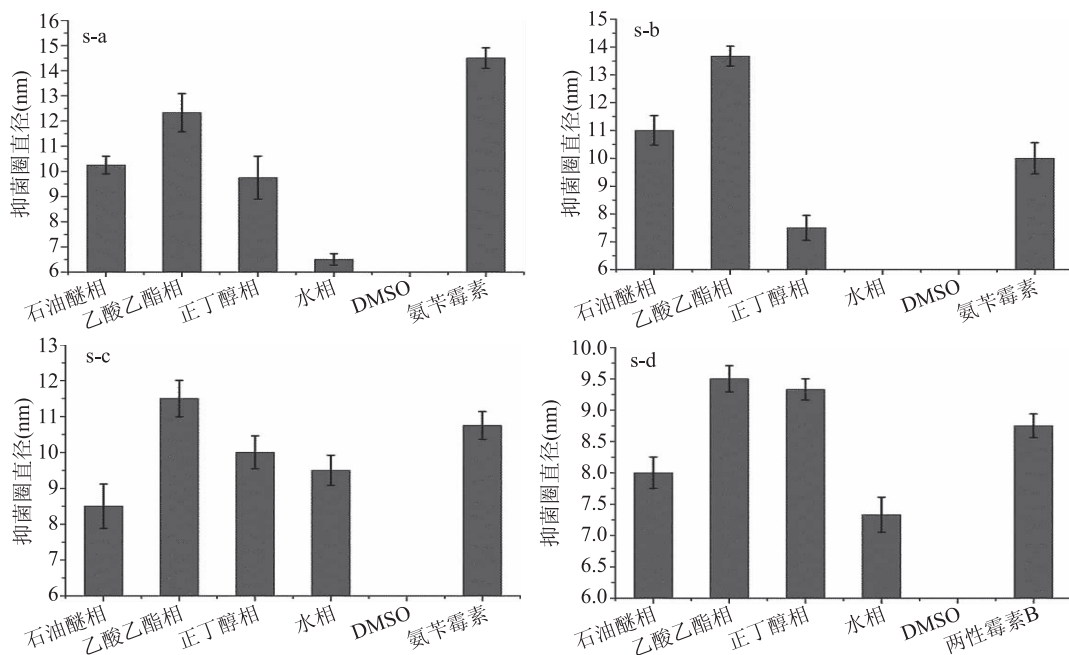


图1 菱角梗各溶剂提取物的抑菌活性

Fig.1 Antibacterial activity of solvent extracts from water chestnut stem

注:s-a:金黄色葡萄球菌;s-b:蜡样芽孢杆菌;s-c:大肠杆菌;s-d:酿酒酵母菌。

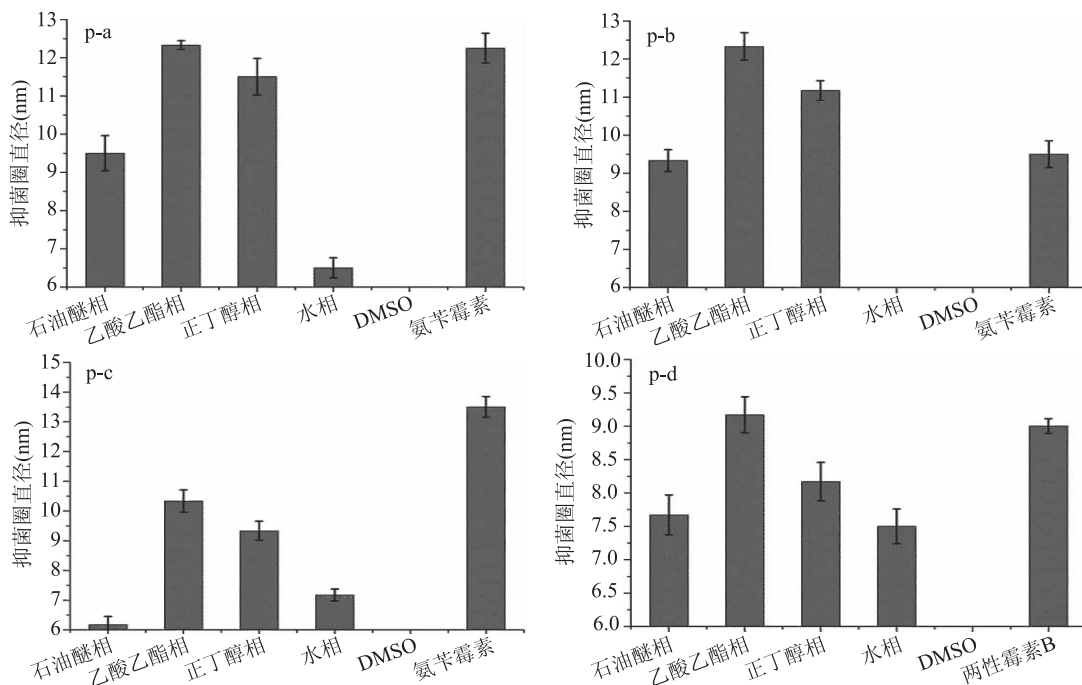


图2 菱角壳各溶剂提取物的抑菌活性

Fig.2 Antibacterial activity of solvent extracts from water chestnut pericarp

注:p-a:金黄色葡萄球菌;p-b:蜡样芽孢杆菌;p-c:大肠杆菌;p-d:酿酒酵母菌。

water chestnut pericarp, EAP)。

2.3 EAS、EAP 的最小抑菌浓度

对 EAS、EAP 的最小抑菌浓度进行测定,结果如表 2。EAS、EAP 对 3 种供试菌的抑菌能力由大到小分别为:金黄色葡萄球菌 $\geq$ 大肠杆菌 $>$ 酿酒酵母菌,该结果与前述抑菌活性筛选的结果一致,表明 EAS、EAP 对革兰氏阳性菌的抑菌作用优于革兰氏阴性菌,对真菌的抑制作用最不明显。另外,从结果也可看出,EAP 的 MIC 值明显低于 EAS 的,说明整体来

看,EAP 的抑菌能力强于 EAS。

2.4 EAS、EAP 的抑菌稳定性分析

将 EAS、EAP 进行不同温度、不同 pH 和不同时间的紫外照射处理,对其抑菌稳定性进行分析。由图 3(A)可知,在不同温度处理后,EAS 对三种微生物抑菌能力未出现明显变化,均表现较好的热稳定性。由图 3(B)可知,经过不同 pH 调节处理,EAS 对大肠杆菌的抑菌性能波动较大,具体表现为碱性条件下,抑菌性能明显下降;而对金黄色葡萄球菌和酿

表 2 EAS、EAP 的最小抑菌浓度

样品	MIC (mg/mL)		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	酿酒酵母菌
EAS	0.391	0.391	3.125
EAP	0.098	0.195	1.563

酒酵母菌而言,抑菌作用较稳定。因此,酸性环境下更有利于 EAS 抑菌活力的发挥。由图 3(C)可知,经过不同时间紫外线照射处理后发现,紫外线照射时间 30 min 可明显促进 EAS 对大肠杆菌的抑菌作用;当照射时间 20 min, EAS 对金黄色葡萄球菌的抑菌能力最强;而紫外线照射处理对酿酒酵母的抑菌作用几乎没有影响。总体来说, EAS 在使用过程中暴露在紫外线下时间不宜超过 30 min。

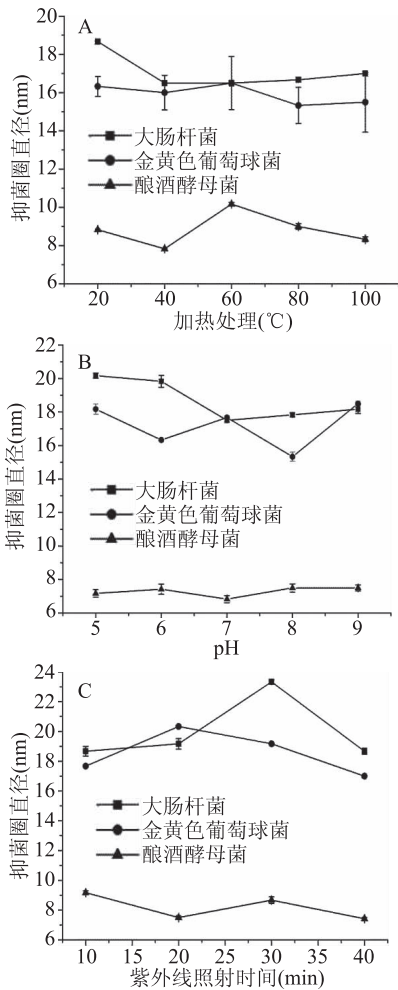


图 3 各处理条件对 EAS 抑菌稳定性的影响

Fig.3 Effects of various treatment conditions on antibacterial stability of ethyl acetate extract of water chestnut stem

由图 4(A)可知,加热处理对 EAP 抑菌能力的影响,呈现先增强后减弱的趋势,60 °C 下处理 30 min 时对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌能力达到峰值,温度高于 60 °C 抑菌能力明显降低;加热处理对酿酒酵母的抑菌活性几乎无影响,与菱角梗的结果类似。由图 4(B)可知,pH 高于 5 时,EAP 对金黄色

葡萄球菌的抑菌活性出现较明显的下降,之后随着 pH 的升高,保持较好的抑菌稳定性,而对大肠杆菌和酿酒酵母菌的抑菌能力无明显变化,较 EAS 而言, EAP 表现出更好的酸碱稳定性。由图 4(C)可知,不同时间的紫外线照射处理时,EAP 对金黄色葡萄球菌抑菌活性有略微的影响,当照射时间超过 20 min 后,对大肠杆菌和酿酒酵母菌的抑菌活性有略微下降。但总体而言紫外线照射对 EAP 的抑菌活性影响不大。

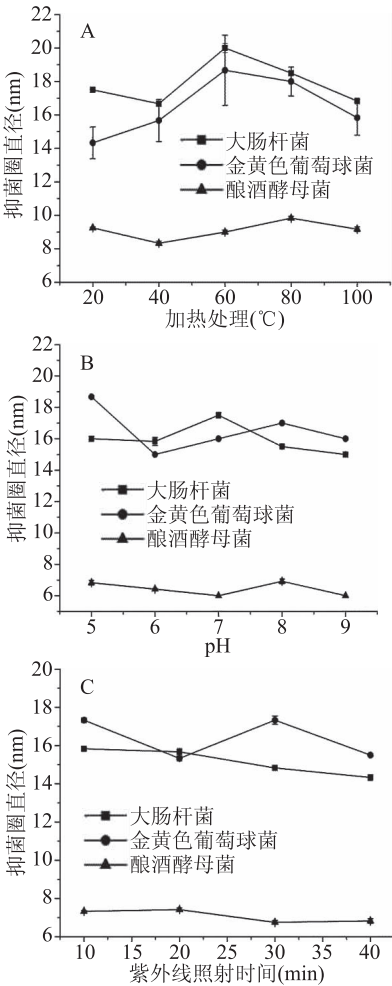


图 4 各处理条件对 EAP 抑菌稳定性的影响

Fig.4 Effects of various treatment conditions on antibacterial stability of ethyl acetate extract of water chestnut pericarp

2.5 菱角梗、菱角壳抑菌成分化学结构鉴定

从 EAS 中鉴定出 10 种化合物(见表 3),在高效液相色谱图(见图 5A)中的峰归属编号为 1~10 号,其中化合物 1~4、6~10 为没食子酸及其衍生物,化合物 5 为黄酮类化合物。EAS 中没食子酸最为丰富,含量 27.22%,其次为 1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖,含量 18.65%。有学者在研究中发现,没食子酸会以剂量依赖性方式引起细菌内膜严重收缩和不规则形态,从而表现出抑菌作用^[30],这可能就是菱角梗抑菌成分可以达到抑菌效果的原因。

从 EAP 中鉴定出 9 种化合物(见表 4),在高效液相色谱图(见图 5B)中的峰归属编号为 11~19,其中化合物 11~15 与 EAS 的化合物 1、3、4、5、7 分别重

表3 EAS的UPLC-MS和UPLC鉴定结果

Table 3 UPLC-MS and UPLC identification results of ethyl acetate extract of water chestnut stem

峰序号	化合物	保留时间 (min)	分子式	[M-H] ⁻ (m/z)	[2M-H] ⁻ (m/z)	[M/2-H] ⁻ (m/z)	ESI(-)- MS ²	含量 (%)
1(11)	没食子酸	9.367	C ₇ H ₆ O ₅	169.01	339.03	n.d.	125	27.22
2	2,3-二-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	17.455	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.08	967.16	241.03	331 313 211 169 125	2.57
3(12)	1,2,3-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	18.383	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.08	1271.18	317.03	519 465 313 169 125	1.75
4(13)	没食子酸甲酯	20.149	C ₈ H ₈ O ₅	183.03	367.06	n.d.	168 140 124 111	5.54
5(14)	槲皮素-3-O-半乳糖苷	20.951	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.09	927.23	n.d.	301 300	1.76
6	1,3,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	21.461	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.09	1271.18	317.04	483 465 313 211 169 125	1.39
7(15)	1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	24.138	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.09	1271.18	317.04	483 465 313 211 169 125	18.65
8	6-O-二戊二酰基-1,2-二-O-半乳糖基-β-D-葡萄糖	24.741	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.10	1575.20	393.04	465 313 277 169 125	4.88
9	3-O-甲基-没食子酸甲酯	25.78	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.04	395.10	n.d.	169 140 125 111	5.13
10	1,2,3-三甘醇-6-二甘醇葡萄糖	26.866	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.11	1880.22	469.05	707 635 617 465 447 169 125	4.30

注:n.d.:未检出;表4同。

表4 EAP的UPLC-MS和UPLC鉴定结果

Table 4 UPLC-MS and UPLC identification results of ethyl acetate extract of water chestnut pericarp

峰序号	化合物	保留时间 (min)	分子式	[M-H] ⁻ (m/z)	[2M-H] ⁻ (m/z)	[M/2-H] ⁻ (m/z)	ESI(-)- MS ²	含量 (%)
11	没食子酸	9.439	C ₇ H ₆ O ₅	169.01	339.03	n.d.	125	2.31
12	1,2,3-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	17.657	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.08	1271.18	317.03	483 465 313 295 179 169 125	4.58
13	没食子酸甲酯	18.657	C ₈ H ₈ O ₅	183.03	367.06	n.d.	168 140	2.15
14	槲皮素-3-O-半乳糖苷	21.107	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.09	927.23	n.d.	301 300	12.23
15	1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	24.258	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.09	1271.18	317.04	483 465 313 211 169 125	11.68
16	1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	25.061	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₃	787.10	n.d.	393.04	716 617 465 313 169 125	33.93
17	1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	26.024	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.10	1575.20	393.04	635 617 465 313 169 125	1.72
18	1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖	26.987	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.11	1880.22	469.05	787 635 617 465 313 169 125	4.56
19	表阿夫泽林-3-O-没食子酸酯	28.004	C ₂₂ H ₁₈ O ₉	425.04	851.09	n.d.	377 273 233 207 169 125	2.80

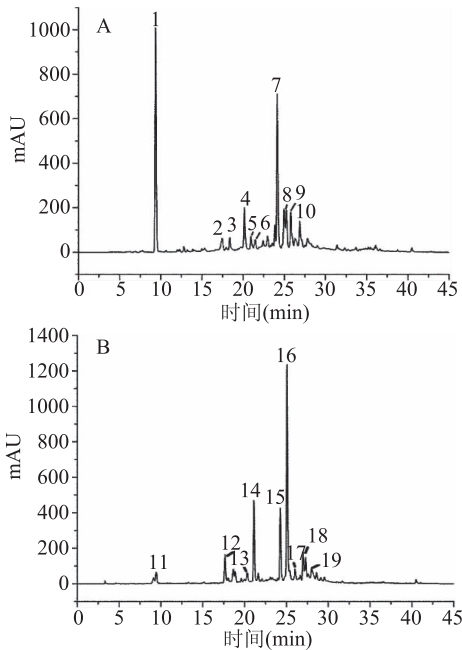


图5 EAS、EAP中抑菌成分的高效液相色谱图
Fig.5 High performance liquid chromatograms of antibacterial components in EAS and EAP

注:A:EAS中抑菌成分的高效液相色谱图;

B:EAP中抑菌成分的高效液相色谱图。

叠,化合物14、19为类黄酮类化合物,其余为没食子酸及其衍生物。EAP中含量最为丰富的为1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖,含量33.93%,其次为槲皮素-3-O-半乳糖苷和1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖,含量分别12.23%、11.68%。

3 结论

EAS和EAP都具有较强的抑菌能力,它们均对革兰氏阳性菌的抑菌作用优于革兰氏阴性菌,对真菌的抑菌作用最弱。通过比较EAS和EAP的MIC值,EAP的抑菌能力优于EAS。在抑菌稳定性研究中发现,对于EAS而言,其具有良好的热稳定性,在酸性条件下抑菌活性较强,紫外线中暴露时间不宜超过30min;对于EAP而言,避免温度高于60℃,酸碱稳定性较好,紫外线照射对抑菌能力的影响较小。利用UPLC-MS和HPLC,从EAS中鉴定出10种化合物,主要为没食子酸及其衍生物,其中没食子酸含量27.22%,1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖含量18.65%;从EAP中鉴定出9种化合物,其中最为丰富的为一种没食子酸衍生物——1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖,含量33.93%。本研究为EAS和EAP在食品保鲜加工中作为抑菌剂的利用提供了理论支持,具有实际应用的意义。

参考文献

[1]Takano A,Kadono Y.Allozyme variations and classification of *Trapa*(Trapaceae) in Japan[J].Aquatic Botany,2005,83(2):0-118.
[2]伍茶花.菱角壳化学成分及其活性研究[D].长沙:湖南中医药大学,2012.
[3]Tulyathan V,Boondee K,Mahawanich T.Characteristics of starch from water chestnut(*Trapa bispinosa* ROXB.)[J].Journal of Food Biochemistry,2005,29(4):337-348.
[4]Wang C C R,Ciou J Y,Chiang P Y.Effect of micronization on

functional properties of the water caltrop (*Trapa taiwanensis* Nakai) pericarp[J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 970-974.

[5] Ciou J Y, Lin H H, Chiang P Y, et al. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in the browning of water caltrop pericarp during heat treatment [J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 523-527.

[6] Zhao W J, Niu F L, Li J, et al. Components of volatile oil from water-caltrop and their anti-tumor effect *in vitro* [J]. 高等学校化学研究: 英文版, 2009, 25(1): 56-59.

[7] Zhu F. Chemical composition, health effects, and uses of water caltrop [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 49: 136-145.

[8] 董向东, 孟秀梅, 王晶晶, 等. 菱角多糖提取及抗氧化能力研究[J]. 农产品加工, 2017, 1(2): 14-16, 19.

[9] Yu H N, Shen S R. Phenolic composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of water caltrop pericarps extract [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 61(1): 238-243.

[10] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses [J]. Food Chemistry, 2006, 99(1): 191-203.

[11] 刘冬敏, 王建辉, 刘永乐. 菱角壳中黄酮、总酚和皂苷的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3668-3672.

[12] 卢梦, 周禹君, 李丽, 等. 菱角壳纤维咀嚼片的研制[J]. 农产品加工, 2018, 461(15): 25-26.

[13] Yasuda M, Yasutake K, Hino M, et al. Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice [J]. Food Chemistry, 2014, 165(15): 42-49.

[14] 左袁袁, 吕寒, 吴月娟, 等. 不同产地菱角壳(欧菱果壳)中总多酚含量及抗氧化活性和对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(3): 114-116.

[15] Kim Y S, Hwang J W, Han Y K, et al. Antioxidant activity and protective effects of *Trapa japonica* pericarp extracts against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage in Chang cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 64: 49-56.

[16] Wang S H, Kao M Y, Wu S C, et al. Oral administration of *Trapa taiwanensis* Nakai fruit skin extracts conferring hepatoprotection from CCl_4 - caused injury [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(8): 3686-3692.

[17] Lin Q S, Shen J H, Ning Y, et al. Inhibitory effects of water caltrop pericarps on the growth of human gastric cancer cells *in vitro* [J]. Current Pharmaceutical Design, 2013, 19(42): 7473-7478.

(上接第 60 页)

[32] 许乃银, 张国伟, 李健, 等. 基于 GGE 双标图和比强度选择的棉花品种生态区划分[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(11): 1500-1507.

[18] Huang H C, Chao C L, Liaw C C, et al. Hypoglycemic constituents isolated from *Trapa natans* L. pericarps [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(19): 3794-3803.

[19] 董晶莱, 高广春, 黄媛, 等. 菱角壳的化学成分和药理活性研究进展[J]. 嘉兴学院学报, 2014, 26(6): 68-71.

[20] Raza A, Li F, Xu X, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 94(Pt A): 335-344.

[21] 申凯, 张辉, 严碧云, 等. 菱茎多酚的提取工艺及其抗氧化、抑菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(11): 225-231.

[22] 李斌, 雷月, 孟宪军, 等. 响应面试验优化超声波辅助提取蓝靛果多酚工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 515(22): 57-63.

[23] 尹秀梅, 王思宏, 李东浩. 八宝景天乙酸乙酯提取物的抗菌活性和化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018(6): 930-935.

[24] Zaidan M R S, Rain A N, Badrul A R, et al. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method [J]. Tropical Biomedicine, 2006, 22(2): 165-170.

[25] Bahadori M B, Valizadeh H, Asghari B, et al. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18(Part A): 727-736.

[26] Carovic-Stanko K, Orlic S, Politeo O, et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa* [J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 196-201.

[27] 卢凤来, 魏欢, 王磊, 等. 大孔树脂 HP-20 和 HP-SS 分离纯化山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙(英文) [J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(4): 765-768.

[28] 贾瑞博, 李燕, 陈竞豪, 等. 灰树花多酚 HPLC 分析方法优化及组分的液质定性[J]. 食品科技, 2016(9): 278-282.

[29] 邓俊琳, 朱永清, 夏陈, 等. 绞股蓝中 6 种多酚化合物的 HPLC 检测及其醇提液的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 265-269.

[30] Lu J, Wang Z, Ren M, et al. Antibacterial effect of gallic acid against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* through damaging membrane integrity [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 17(13): 1153-1158.

[33] 董星光, 田路明, 曹玉芬, 等. 我国南方砂梨主产区主栽品种果实品质因子分析及综合评价[J]. 果树学报, 2014, 31(5): 815-822.