

# 油橄榄叶不同溶剂超声提取物的抑菌和抗氧化活性及其主要成分分析

吴遵秋<sup>1</sup>, 姜友军<sup>1</sup>, 陈华萍<sup>1</sup>, 杨泽身<sup>2</sup>, 黄乾明<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>四川农业大学理学院, 雅安 625014; <sup>2</sup>凉山州中泽新技术开发有限责任公司, 西昌 615000

**摘要:** 采用不同溶剂对油橄榄叶进行超声波辅助提取, 分析各溶剂提取物的抑菌、抗氧化活性和主要成分。结果显示: 各溶剂提取物的抑菌与抗氧化活性强弱顺序基本一致, 80% 甲醇提取物的抑菌和抗氧化活性最强, 其次为 80% 乙醇提取物, 乙酸乙酯提取物的抗氧化活性最弱, 而水提取物的抑菌活性最弱; 不同溶剂提取物等比例混合物的抑菌活性无明显增强。LC-MS 分析显示: 五种溶剂提取物共得九种主要成分, 水和醇提取的成分较多, 丙酮和乙酸乙酯提取的成分较少, 各溶剂提取物均含橄榄苦苷和 Ligstroside 两种成分, 水提取物和醇提取物中各特有两种主要成分。

**关键词:** 油橄榄叶; 不同溶剂; 抑菌活性; 抗氧化活性; LC-MS 分析

中图分类号: Q946.8; Q505

文献标识码: A

## Assessment of Main Phenolics, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Different Solvents Extracts by Ultrasound-assisted Method from Olive Leaves

WU Zun-qiu<sup>1</sup>, JIANG You-jun<sup>1</sup>, CHEN Hua-ping<sup>1</sup>, YANG Ze-shen<sup>2</sup>, HUANG Qian-ming<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; <sup>2</sup>Liang Shan Zhong

Ze New Technology Development Co., Ltd, Xichang 615000, China

**Abstract:** The dry powder of olive leaves were extracted by ultrasonic assisted with five solvents to obtain different components, and analyzed main phenolics, antimicrobial and antioxidant activities of components. The results showed that there was a similar sequence to antibacterial and antioxidant activities of different solvent extracts. The 80% methanol extract was the strongest on antibacterial and antioxidant activities, followed by 80% ethanol extract. Antioxidant activities of the ethyl acetate extract was the weakest, antibacterial activities of the water extract was the weakest. There were not significant enhancement for antibacterial activities from the mixtures of different components. LC-MS analysis showed that five solvent extracts had a total of nine main components, these components of water, methanol and ethanol extraction had more compounds. The water extract and the alcohol extract had unique two main components, respectively.

**Key words:** olive leaves; different solvents; antimicrobial activities; antioxidant activities; LC-MS

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 为木犀科木犀榄属常绿乔木, 其油橄榄果榨出的橄榄油具高营养价值且对人体健康有利<sup>[1-3]</sup>。每年修剪的油橄榄叶大约是油橄榄果产量的 10%<sup>[4]</sup>, 主要用于动物饲料或被燃烧掉。然而, 油橄榄叶具有丰富的生物活性酚类物质且与油橄榄果中的物质类似甚至含量更高<sup>[5,6]</sup>, 如橄榄苦苷等<sup>[7,8]</sup>。地中海地区人们很久以前就用油橄榄叶提取物来治疗感冒和发烧<sup>[9]</sup>; 油橄

榄叶中酚类物质具有抗肿瘤、抗癌作用<sup>[10]</sup>, 此外还有广泛的抑菌和抗氧化作用如橄榄苦苷、芦丁、咖啡酸等及其一定比例混合物显示强的体外活性<sup>[11]</sup>, 具有联合抗菌和抗真菌作用<sup>[12]</sup>。虽然油橄榄叶中一些单酚的抑菌和抗氧化活性有所报道, 但是油橄榄叶不同溶剂提取物的体外活性及其主要成分未见相关报道。

在此, 我们采用不同溶剂对油橄榄叶进行超声波辅助提取, 获得不同溶剂提取物; 采用滤纸片法比较各溶剂提取物的体外抑菌活性, 稀释法获得最低抑菌浓度 (MIC); 通过对 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力来判断各溶剂提取物的体外抗氧化活性; 结

合液相色谱-质谱法(LC-MS)分析各提取物中主要的化学成分。以期进一步发现和研究油橄榄叶中高活性天然酚类物质,有利于油橄榄叶副产品能够被广泛用于开发功能性食品及保健药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

2013年3月从西昌油橄榄种植基地采集油橄榄叶,蒸馏水清洗,室温自然阴干,50℃烘24h至恒重,粉碎过筛粒径<0.42mm,4℃储存备用。

菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。

主要试剂:超纯水(实验室自制);甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、牛肉膏、蛋白胨和琼脂粉均为分析纯购于成都科龙化学试剂厂;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)和2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)均购于上海晶纯生化科技股份有限公司;乙腈和乙酸为色谱纯购于Sigma公司。

### 1.2 主要仪器

UV-2102PCS紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SB3200D超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司,频率:40KHz,超声功率:180W);SW-CJ-2FD超净工作台(上海仪器厂);YYQ-SG41-280高压蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司);GHP-9050隔水式恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);HZQ-F100振荡培养箱(哈尔滨东联有限公司);(Waters Acquity UPLC-Quattro Premier XE Mass Spectrometer)液相色谱-质谱联用仪(Waters公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 油橄榄叶不同溶剂提取物的制备

称取油橄榄叶粉末4.00g,加入100mL提取溶剂(水、80%甲醇、80%乙醇、丙酮和乙酸乙酯),摇匀、避光静置3h,超声波提取40min,4000rpm离心8min,收集上清液。取一半上清液浓缩至膏状,用相应的溶剂溶解定容2.5mL,使其质量浓度为0.8g/mL,4℃储存,供抑菌实验使用。另一半上清液直接定容至100mL,质量浓度为0.02g/mL,4℃储存,供抗氧化实验使用。

#### 1.3.2 油橄榄叶不同溶剂提取物的抑菌活性

##### 1.3.2.1 抑菌活性测定

采用滤纸片法<sup>[13]</sup>评价油橄榄叶不同溶剂提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用。牛肉膏蛋白胨固体培养基培养,取100μL菌悬液( $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL)均匀涂布在培养基表面,静置15min,将吸有10μL提取液的灭菌滤纸圆片(直径为6mm)贴于涂布好菌液的培养基上,静置15min置于37℃培养18h。观察并测量各抑菌圈直径d(包含滤纸片直径,mm)。以相应提取溶剂作为空白对照,根据抑菌圈直径大小来判定各溶剂提取物的抑制活性。将两个、三个或四个不同溶剂提取物等比例混合,并进一步分析各混合物抑菌活性。

##### 1.3.2.2 最低抑菌浓度(MIC)测定

参考已报道方法<sup>[14]</sup>,取50mL锥形瓶,加入4mL液体培养基,灭菌、冷却,无菌条件下加入100μL不同溶剂提取物(配制浓度梯度分别为:0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125g/mL)。在160rpm振荡培养24h,目测判断最低抑菌浓度。

##### 1.3.3 油橄榄叶不同溶剂提取物的抗氧化活性

###### 1.3.3.1 DPPH自由基清除

移取一定体积的油橄榄叶不同溶剂提取液于试管中,加入2mL0.2mg/mL DPPH乙醇溶液,室温静置、避光反应30min,测 $A_{517}^{[15]}$ 。

$$\text{DPPH 自由基清除率}\% = \frac{A_0 - A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

$A_0$ :溶剂代替样品吸光值; $A_1$ :样品与DPPH溶液反应的吸光值; $A_2$ :样品的吸光值。

###### 1.3.3.2 ABTS自由基清除

移取一定体积的油橄榄叶不同溶剂提取液于试管中,加入2mLABTS工作液(7mmol/L ABTS乙醇溶液和140mmol/L  $K_2S_2O_8$ 水溶液等比例混合,在室温、避光、静置过夜12~16h,形成ABTS自由基储备液。使用时用80%乙醇将储备液稀释到在734nm波长处吸光值为 $0.7 \pm 0.02$ 的工作液(备用),现配现用<sup>[16]</sup>),暗反应6min于734nm处测吸光度。

$$\text{ABTS 自由基清除率}\% = \frac{A_0 - A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

$A_0$ :溶剂代替样品吸光值; $A_1$ :样品与ABTS工作液反应的吸光值; $A_2$ :样品的吸光值。

##### 1.3.4 油橄榄叶不同溶剂提取物紫外-可见光谱分析

分别取不同溶剂提取液进行紫外-可见光谱分

析,丙酮和乙酸乙酯提取液先于蒸发皿 40 ℃ 水浴蒸干,再用 80% 甲醇溶解。以相应溶剂作为参比液,在 200 ~ 700 nm 进行光谱扫描。

### 1.3.5 不同溶剂提取物主要成分分析

采用 LC-MS 对油橄榄叶不同溶剂提取物进行分析,以期获得各提取液中主要成分。

液相色谱条件:采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 × 100 mm, 1.7 μm);柱温 30 ℃,流速 0.25 mL/min,波长 280 nm,进样量 1 μL。流动相:A 液为 0.5% 乙酸,B 液为乙腈,采用梯度洗脱:90% A 与 10% B 洗脱 2 min;70% A 与 30% B 洗脱 8 min;60% A 与 40% B 为 3 min;50% A 与 50% B 维持 2 min;10% A 与 90% B 洗脱 3 min。

质谱条件:毛细管压为 2800 V;毛细管温度 250 ℃,质量范围  $m/z$  100 ~ 800 全程扫描。

### 1.4 数据处理

数据以平均值 ± SD 表示,清除率为 50% 时对应的样液浓度为半清除浓度用 IC<sub>50</sub> 表示。用 SPSS 19.0 和 Origin 9.0 软件进行数据处理和分析。Duncan 和 LSD 法来进行多重比较测试。

## 2 结果与讨论

### 2.1 油橄榄叶不同溶剂提取物抑菌活性分析

采用不同溶剂对油橄榄叶进行超声辅助提取,得到不同溶剂提取物。以相应溶剂作空白对照,比较不同溶剂提取物的抑菌活性。结果显示,各溶剂均无明显抑菌活性即  $d = 6$  mm,但各种溶剂提取物

对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均显示强抑制作用,其中,对大肠杆菌的抑制作用最强,对枯草芽孢杆菌相对较弱,抑菌圈大小和最低抑菌浓度见表 1。各溶剂提取物中,以 80% 甲醇提取物抑菌活性最强,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈大小分别为  $27.54 \pm 0.254$  mm、 $27.27 \pm 0.303$  mm 和  $10.60 \pm 0.247$  mm, MIC 分别为 0.05 g/mL、0.1 g/mL 和 0.2 g/mL。80% 甲醇提取物和 80% 乙醇提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用不存在显著性差异  $P > 0.05$ ,而对枯草芽孢杆菌有差异显著性  $P = 0.010 < 0.05$ 。80% 乙醇提取物和丙酮提取物对枯草芽孢杆菌的抑制作用不存在差异显著性  $P = 0.925 > 0.05$ 。丙酮提取物和乙酸乙酯提取物对大肠杆菌抑制作用不存在差异显著性  $P = 3.43 > 0.05$ ,但对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用存在显著性差异性 ( $P = 0.004, P = 0.002$ )。水提取物对三种菌的抑制活性相对较低 ( $7.54 \pm 0.232$  mm ≤  $d$  ≤  $13.55 \pm 0.550$  mm), MIC 均大于 0.4 g/mL,与其他各溶剂提取物之间存在显差异著性  $P < 0.001$ 。因此,抑菌活性为 80% 甲醇提取物 > 80% 乙醇提取物 > 丙酮提取物 > 乙酸乙酯提取物 > 水提取物。根据相似相溶原理,油橄榄叶中含有较多极性强的活性物质,弱极性物质较少,石油醚和正己烷提取物没有检测到抑菌活性,数据没显示。虽然水的极性较大,但一些酚类物质在水中溶解性小,所以水提取物抑菌活性较低(见表 1)。

表 1 油橄榄叶不同溶剂提取物的抑菌活性和最低抑菌浓度 ( $n = 3$ )

Table 1 Antibacterial activities and MIC of different solvent extracts from olive leaves ( $n = 3$ )

不同溶剂提取物 Different Solvent extracts	抑菌圈大小 Inhibition zone size ( $d$ /mm)			最低抑菌浓度 MIC (g/mL)		
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
I	13.55 ± 0.550 <sup>c</sup>	7.52 ± 0.195 <sup>d</sup>	7.54 ± 0.232 <sup>d</sup>	> 0.4	> 0.4	> 0.4
II	27.54 ± 0.254 <sup>a</sup>	27.27 ± 0.303 <sup>a</sup>	10.60 ± 0.247 <sup>a</sup>	0.05	0.1	0.2
III	27.51 ± 0.402 <sup>a</sup>	26.76 ± 0.456 <sup>a</sup>	9.89 ± 0.427 <sup>b</sup>	0.05	0.1	0.2
IV	25.54 ± 0.444 <sup>b</sup>	26.19 ± 0.252 <sup>b</sup>	9.92 ± 0.128 <sup>b</sup>	0.05	0.1	0.2
V	25.22 ± 0.256 <sup>b</sup>	25.28 ± 0.421 <sup>c</sup>	8.95 ± 0.559 <sup>c</sup>	0.1	0.1	0.2

注: <sup>a-d</sup> 为组间差异显著性比较 ( $P < 0.05$ ); I 代表水提取物, II 代表 80% 甲醇提取物, III 代表 80% 乙醇提取物, IV 代表丙酮提取物, V 代表乙酸乙酯提取物。

<sup>a-d</sup> expressed the significant ( $P < 0.05$ ); I expressed the water extract, II expressed the 80% methanol extract, III expressed the 80% ethanol extract, IV expressed the acetone extract, V expressed the ethyl acetate extract.

油橄榄叶不同溶剂提取物均显示强的抑菌活性,为探究不同溶剂提取物的混合物是否有更好抑

制效果,将两个、三个或四个不同溶剂提取物等量合并分析其抑菌活性,结果如表 2 所示。在两种不

同溶剂提取物的混合物中,以甲醇提取物-乙醇提取物二者的混合物抑菌活性最强,活性最低的为水提取物-乙酸乙酯提取物的混合物及水提取物(丙酮提取物的混合物);同水提取物相混合的混合物的抑菌活性与其他各溶剂提取物相比较有所降低, $d$  差值  $\leq 5.00$  mm;除与水提取物混合的混合物外,其他几个溶剂提取物的混合物的抑菌活性与各溶剂提取物相比, $d$  差值  $\leq 2.00$  mm。在三种不同溶剂提取物的混合物中,抑菌活性最强的为甲醇-乙醇-丙酮三者各提取物的混合物,与 80% 甲醇提取物相比,对三种细菌的抑菌作用高约 0~3 mm,而最弱的为水-丙酮-乙酸乙酯三者各提取物的混合物;与水提取物混合的混合物的抑菌活性与各溶剂提取物相比, $d$  差值  $\leq 3.00$  mm;除与水提取物混合的混合物外,其他几个溶剂提取物的混合物的抑菌活性与各溶剂提取物相比, $d$  差值  $\leq 1.50$  mm。对于四个不同溶剂提取物的等比例混合物,抑菌活性最强的为甲醇-乙

醇-乙酸乙酯-丙酮四者各提取物的混合物,最弱的为水-乙醇-乙酸乙酯-丙酮各提取物的混合物;与水提取物混合的混合物的抑菌活性与各溶剂提取物相比有所降低, $d$  差值  $\leq 4.00$  mm;除与水提取物混合的混合物外,其他几个溶剂提取物的混合物其抑菌活性与各溶剂提取物活性相比, $d$  差值  $\leq 0.01$  mm。

综上分析显示,不同溶剂提取物混合物的最高抑菌活性与 80% 甲醇提取物的抑菌活性相当,说明混合物对细菌的抑菌活性并没有明显增强或不存在明显协同作用。而混合物最低抑菌活性强于水提取物的活性,混合物抑菌活性受水提取物影响较大,与水提取物的混合物的抑菌活性都相对较低,含乙酸乙酯提取物次之,可能是被稀释原因。各溶剂提取物对大肠杆菌抑制作用最强,其次为金黄色葡萄球菌,对枯草芽孢杆菌抑制作用最弱。

表 2 不同溶剂提取物的混合物的抑菌活性( $n=3$ )

Table 2 Antibacterial activities of the mixtures from different solvent extracts( $n=3$ )

混合物序号 Mixture	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> (d/mm)	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (d/mm)	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> (d/mm)
1	27.56 $\pm$ 0.309 ~ 22.35 $\pm$ 0.347	26.75 $\pm$ 0.202 ~ 21.10 $\pm$ 0.153	9.97 $\pm$ 0.438 ~ 6.14 $\pm$ 0.035
2	28.08 $\pm$ 0.751 ~ 24.07 $\pm$ 0.521	27.64 $\pm$ 0.247 ~ 21.84 $\pm$ 0.390	9.81 $\pm$ 0.510 ~ 6.37 $\pm$ 0.140
3	27.53 $\pm$ 0.273 ~ 22.94 $\pm$ 0.392	26.72 $\pm$ 0.382 ~ 22.46 $\pm$ 0.821	7.83 $\pm$ 0.585 ~ 6.31 $\pm$ 0.114

注:序号 1 代表两个不同溶剂提取物的混合物,序号 2 代表三个溶剂提取物的混合物,序号 3 代表四个溶剂提取物的混合物。

No. 1 was the mixture of two solvent extracts, No. 2 was the mixture of three solvent extracts, No. 3 was the mixture of four solvent extracts.

## 2.2 油橄榄叶不同溶剂提取物的抗氧化活性

### 2.2.1 不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除活性

通过对 DPPH 自由基的清除率来评价不同溶剂提取物的体外抗氧化活性,结果如图 1 所示。在研究质量浓度范围内,随着质量浓度的增加,对 DPPH 自由基的清除能力增强。80% 甲醇提取物和 80% 乙醇提取物在质量浓度为 0.600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时达最大

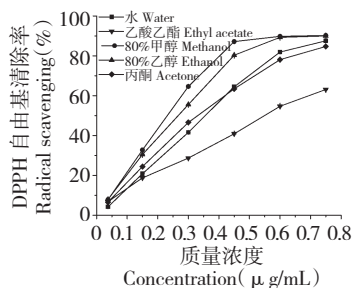


图 1 不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 1 Scavenging capacity of different solvent extracts on DPPH radical

清除,分别为 90.20% 和 89.99%,  $\text{IC}_{50}$  为 0.244  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.271  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。水提取物和丙酮提取物对 DPPH 自由基的清除效率相当,在研究浓度范围内最大清除率为 84.72% 和 87.53%,  $\text{IC}_{50}$  为 0.361  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.341  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基清除能力相对最弱,最大清除率为 63.09%,  $\text{IC}_{50}$  为 0.565  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.2.2 不同溶剂提取组分对 ABTS 自由基的清除活性

不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除能力如图 2 所示,80% 甲醇提取物和 80% 乙醇提取物的清除能力最强,在质量浓度为 0.225  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时清除率开始趋于稳定,最大清除率为 98.80% 和 99.13%,  $\text{IC}_{50}$  为 0.078  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.091  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。丙酮提取物对 ABTS 自由基清除能力次之,质量浓度为 0.300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时清除率开始趋于稳定,  $\text{IC}_{50}$  为 0.136  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。水提取物和乙酸乙酯提取物对 ABTS 自由基

清除能力相当,在浓度为 0.375  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时清除率大于 90%;浓度为 0.750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时清除率分别为 98.40% 和 97.85%,  $\text{IC}_{50}$  为 0.183  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.198  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

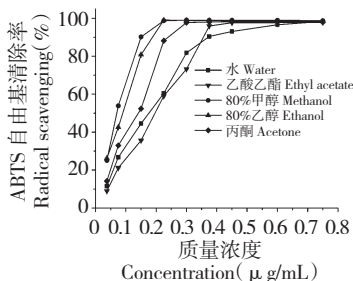


图2 不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 2 Scavenging capacity of different solvent extracts on ABTS radical

综上,五种溶剂提取物均表现出强的体外抗氧化活性。80% 甲醇提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性最强,其次为 80% 乙醇提取物,水提取物抗氧化活性能力与丙酮提取物相当,且强于乙酸乙酯提取物,即 80% 甲醇提取物 > 80% 乙醇提取物 > 丙酮提取物 > 水提取物 > 乙酸乙酯提取物。

### 2.3 紫外-可见光谱分析

采用紫外-可见分光光度计法对不同溶剂提取物进行 200 nm ~ 700 nm 扫描,结果如图 3 所示。在紫外区 210 nm ~ 300 nm 处各溶剂提取物有两个明显吸收峰,分别在 230 nm 和 280 nm 附近,表明不同溶剂提取物都含有两个双键的共轭体系和苯环的特征吸收,初步认为此处吸收峰的物质在各提取物的体外活性中可能扮演着重要角色。330 nm 处甲醇提取物和乙醇提取物的吸收峰稍强于其他溶剂提取物,表明含有多个共轭体系的物质其种类或含量高于其他溶剂提取物。初步断定水、80% 甲醇、80% 乙

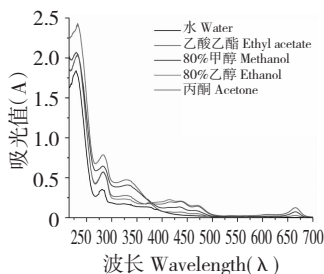


图3 不同溶剂提取物紫外-可见光谱图

Fig. 3 UV-visible spectrum analysis of different solvent extracts

醇、丙酮和乙酸乙酯提取物中含有共同的物质或者结构类似的物质,这些物质在各溶剂提取物的抑菌和抗氧化活性中可能起着重要作用。

### 2.4 不同溶剂提取物主要物质分析

采用 LC-MS 法分析不同溶剂提取物的主要成分。五种溶剂共提取到九种主要成分,如图 4 和表 3 所示。水和醇提取物中所含物质的种类高于乙酸乙酯和丙酮提取物。80% 甲醇、80% 乙醇、乙酸乙酯和丙酮提取物在保留时间 9.42 min 处都有一个明显且强的吸收峰,丙酮提取物种此物质峰面积最大为 197924  $\text{AU} \cdot \text{min}$ ,其次为 80% 甲醇 194272  $\text{AU} \cdot \text{min}$ (见表 3),水提取物在 9.42 min 也有弱的吸收峰,面积仅为 1930  $\text{AU} \cdot \text{min}$ 。经质谱分析确定该吸收峰所对应的物质为橄榄苦苷 (Oleuropein)<sup>[17-19]</sup>,如图 5a 所示, $m/z$  539.30 为  $[\text{M} - \text{H}]^-$  离子峰, $m/z$  538.81 为  $[\text{M} - 2\text{H}]^-$  离子峰, $m/z$  575.26 为  $[\text{M} + \text{Cl}]^-$  离子峰。橄榄苦苷在油橄榄叶中含量最高,分布于油橄榄整棵树<sup>[8]</sup>,因其邻苯二酚的稳定结构一直被认为是一种活性很强的物质<sup>[20]</sup>。因此在油橄榄叶中 80% 甲醇、80% 乙醇、乙酸乙酯和丙酮提取物的抑菌和抗氧化活性主要是橄榄苦苷的作用。丙酮提取物中橄榄苦苷含量最高,其次为 80% 甲醇提取物和 80% 乙醇提取物,但其活性低于醇提取物,说明各溶剂提取物的抑菌和抗氧化活性除了橄榄苦苷外还有其他物质的共同作用。虽然水提取物的抑菌活性相对其他几个溶剂提取物较弱,但抗氧化活性与丙酮提取物相当且强于乙酸乙酯提取物,结合图 4a 和表 3 得知,水提取物除橄榄苦苷外还有几种含量相对较多的物质如 Oleoside 及其异构体<sup>[17]</sup>、橄榄酸糖苷及其异构体<sup>[21]</sup>、橄榄苦苷二葡萄糖体<sup>[17]</sup>、Ligstroside<sup>[22]</sup>、脱乙酰-10-羟基橄榄苦苷甘元<sup>[23]</sup>和 10-羟基橄榄苦苷<sup>[24]</sup>,最后两者为水提取物中独有的物质。这些物质中的某一种或几种共同作用,使水提取物呈现出强的抗氧化活性。去甲基橄榄苦苷<sup>[22]</sup>和木犀草素-7-葡萄糖苷<sup>[17,19]</sup>为醇提取物特有。乙酸乙酯提取物和丙酮提取物除了橄榄苦苷外,仅 Ligstroside 含量相对较多。油橄榄叶不同溶剂提取物抑菌和抗氧化活性受到提取物质中功能基团如 B-环苯邻二酚、3-羟基功能基团、2,3-双键共轭的 4-氧代功能基团、物质含游离羟基的数目和位置和混合物基团的相互作用的影响<sup>[25]</sup>。

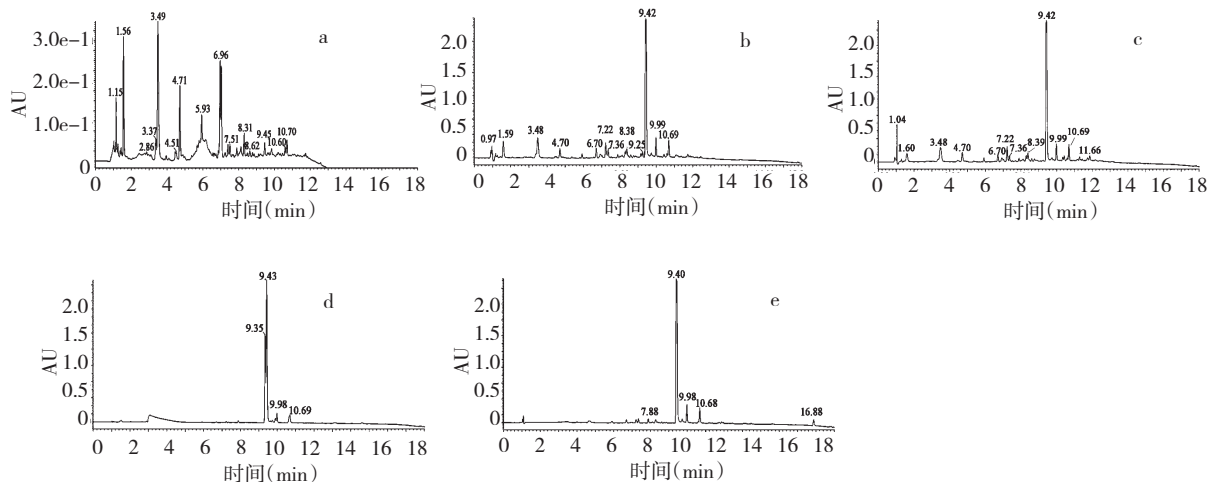


图4 油橄榄叶不同溶剂提取物液相色谱图,a为水提取物;b为80%甲醇提取物;c为80%乙醇提取物;d为乙酸乙酯提取物;e为丙酮提取物

Fig. 4 Liquid Chromatography of different solvent extracts from olive leaves, graph a expressed the liquid chromatogram of water extract; graph b expressed 80% methanol extract; graph c expressed 80% ethanol extract; graph d expressed ethyl acetate extract; graph e expressed acetone extract.

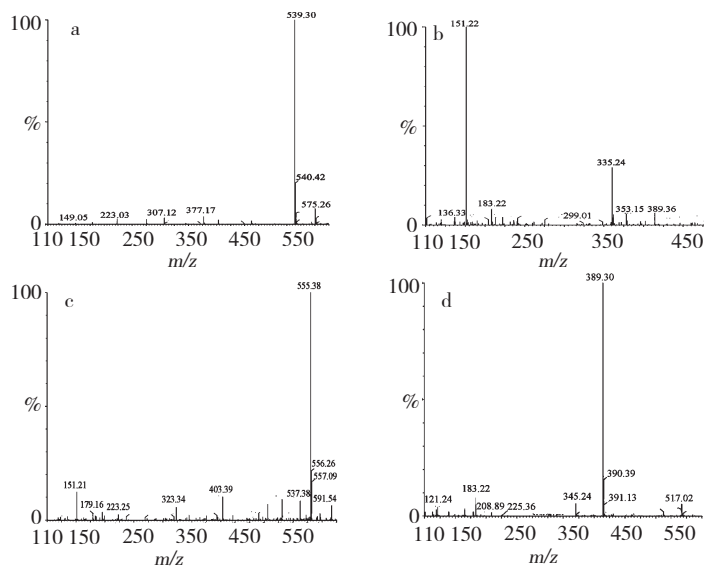


图5 主要吸收峰质谱图,a为橄榄苦苷质谱图,b为脱乙酰-10-羟基橄榄苦苷元质谱图,c为10-羟基-橄榄苦苷质谱图,d为Oleoside的质谱图

Fig. 5 MS spectrums of major peaks, a was the mass spectra of oleuropein; b was the mass spectra of deacetyl-10-hydroxy oleuropein aglycone; c was the mass spectra of 10-hydroxy oleuropein; d was the mass spectra of oleoside

表3 油橄榄叶不同溶剂提取物中主要物质

Table 3 Main substances of different solvent extracts from olive leaves

化合物 Compound	溶剂提取物 Solvent extracts	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Peak area (AU · min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	碎片峰 Fragment (m/z)
Oleoside and isomers	I	1.56、3.55	12896、25806	389.27、389.30	375、345、183、 227、343、209
	II	1.59、3.55	19968、21939	389.22、389.17	
	III	1.60、3.55	15678、-	389.24、389.27	



橄榄酸糖苷及异构体 Elenolic acid glucoside and isomers	I	3.43、4.71	3271、10505	403.29、403.32	375、359、371、223、179
	II	3.45、4.70	1074、10043	403.19、403.19	
	III	3.40、4.70	-、10369	403.26、403.31	
脱乙酰-10-羟基橄榄苦苷元 Deacetyl-10-hydroxy-oleuropein aglycone	I	5.93	15364	335.24	183、151、197、136
	I	6.96	22712	555.44	537、394、323
10-羟基-橄榄苦苷 10-hydroxy oleuropein	I	8.31	3167	701.46	539、403、377
	II	8.38	9389	701.35	
	III	8.39	9223	701.35	
	IV	8.29	4713	701.40	
橄榄苦苷二葡萄糖苷 Oleuropein diglucose	I	9.45、9.91	1930、954	539.40、539.29	377、307、275、223、179、153、149、101
	II	9.42、9.99	194272、16120	539.30、539.30	
	III	9.42、9.99	183399、13417	539.34、539.35	
	IV	9.40、9.98	197924、15198	539.33、539.32	
	V	9.43、9.98	137233、7317	539.31、539.33	
去甲基橄榄苦苷 Demethyl-oleuropein	II	6.70	9061	525.28	389、345、319
	III	6.70	6783	525.32	
	II	7.22	16113	447.21	377、287、285、137
木犀草素-7-葡萄糖苷 Luteolin-7-glucoside	III	7.22	13451	447.25	
	I	10.70	1175	523.41	361、291、259
Ligstroside	II	10.69	15295	523.31	
	III	10.69	14546	523.33	
	IV	10.68	14517	523.37	
	V	10.69	10563	523.37	

注: I 代表水提取物, II 代表 80% 甲醇提取物, III 代表 80% 乙醇提取物, IV 代表丙酮提取物, V 酯代表乙酸乙酯提取物。

Note: I expressed the water extract, II expressed the 80% methanol extract, III expressed the 80% ethanol extract, IV expressed the acetone extract, V expressed the ethyl acetate extract.

### 3 结论

油橄榄叶不同溶剂提取物均显示强的体外抑菌和抗氧化活性。抑菌活性大小为 80% 甲醇提取物 > 80% 乙醇提取物 > 丙酮提取物 > 乙酸乙酯提取物 > 水提取物; 抗氧化活性大小为 80% 甲醇提取物 > 80% 乙醇提取物 > 丙酮提取物 > 水提取物 > 乙酸乙酯提取物。水、80% 甲醇和 80% 乙醇提取物中化学成分多于乙酸乙酯提取物和丙酮提取物。水提取物抑菌活性较弱但抗氧化活性强, 虽然橄榄苦苷较低, 但有特殊的两种主要物质即脱乙酰-10-羟基橄榄苦苷甘元和 10-羟基橄榄苦苷, 且含量相对较高, 与其高抗氧化能力可能有紧密的关联, 有待进一步研究。醇提取物具有去甲基橄榄苦苷和木犀草素-7-葡萄糖苷两种物质。各溶剂提取物均含橄榄苦苷和 Ligstroside。各溶剂提取物的强抑菌和抗氧化能力除橄榄苦苷外还有其他物质的共同作用。

### 参考文献

- Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, *et al.* Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57:760-771.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, *et al.* The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 2005, 18: 98-112.
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotech*, 2012, 23:129-135.
- Tabera J, Guinda á, Ruiz-Rodríguez A, *et al.* Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. *J Agri Food Chem*, 2004, 52:4774-4779.
- Japón-Luján R, Luque de Castro M. Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaves. *J Agri Food Chem*, 2007, 55:4584-4588.

- 6 Ryan D, Robards K. Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 1998, 123: 31R-44R.
- 7 Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agri Food Chem*, 2009, 57: 8798-8804.
- 8 Wang ZC(王成章), Gao CX(高彩霞), Ye JZ(叶建中), *et al.* Study on Seasonal Variation of Oleuropein Content in Olive Leaves by HPLC. *Chem Ind Forest Prod(林产化学与工业)*, 2008, 28: 39-43.
- 9 El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev*, 2009, 67: 632-638.
- 10 Taamalli A, Arráez-Román D, Barrajón-Catalán E, *et al.* Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 1817-1825.
- 11 Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technol*, 2010, 101: 3751-3754.
- 12 Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, *et al.* Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) leaves. *Molecules*, 2007, 12: 1153-1162.
- 13 Chu YF(褚亚芳), Hu FL(胡福良). Antioxidant and antimicrobial activities of Honeycomb. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2011, 23: 726-729.
- 14 Qian SH(钱森和), Li RY(厉荣玉), Wei M(魏明), *et al.* Extraction and antibacterial activity of polysaccharides from *Nosyoc commune*. *Food Sci(食品科学)*, 2012, 33: 96-99.
- 15 Jia DY(贾冬英), Cao DD(曹冬冬), Yao K(姚开). DPPH Radical Scavenging Activity of *Eleocharis tuberosa* Peel Extract. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2008, 19: 745-747.
- 16 Wang FL(文飞龙), Liu ZH(刘智慧), Zha QH(查钱慧), *et al.* Study on chemical constituents of volatile oil from flowers of *prunus lannecianaby* GC-MS and their antioxidant activity. *Food Sci(食品科学)*, 2013, 34: 1-5.
- 17 Cardoso SM, Guyot S, Marnet N, *et al.* Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J Sci Food Agri*, 2005, 85: 21-32.
- 18 Obied HK, Bedgood Jr DR, Prenzler PD, *et al.* Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 2007, 603: 176-189.
- 19 Ryan D, Antolovich M, Herlt T, *et al.* Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *J Agri Food Chem*, 2002, 50: 6716-6724.
- 20 Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*, 2010, 78: 83.
- 21 Wang BC(王百川), Fu SP(付绍平), Wang D(王丹), *et al.* Characterization of phenolic compounds in domestic olive leaf by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Food Sci(食品科学)*, 2011, 32: 225-229.
- 22 Savarese M, De Marco E, Sacchi R. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem*, 2007, 105: 761-770.
- 23 Fu S, Arráez-Roman D, Segura-Carretero A, *et al.* Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 643-654.
- 24 Caruso D, Colombo R, Patelli R, *et al.* Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *J Agri Food Chem*, 2000, 48: 1182-1185.
- 25 Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, *et al.* Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*, 2000, 68: 457-462.