

核桃(*Juglandaceae*)种仁、叶、花粉抗氧化活性及成分鉴定

赵鑫丹,郝苑汝,庞俊倩,张 强*,翟梅枝*

(西北农林科技大学林学院核桃研究中心,陕西杨凌 712100)

摘 要:为综合开发核桃生物资源,研究了7种不同溶剂提取的不同种类核桃种仁、叶及其花粉提取物的抗氧化活性,并鉴定其抗氧化成分。采用DPPH和ABTS⁺自由基清除能力以及FRAP还原能力评价其抗氧化活性,并测定总酚、总黄酮含量,采用高分辨质谱仪鉴定样品抗氧化活性成分。结果表明,供试7种溶剂中60%丙酮提取物抗氧化活性较高。山核桃叶的DPPH(IC₅₀=0.156 mg/mL)和ABTS⁺(IC₅₀=0.131 mg/mL)自由基清除能力及还原能力(62.17 mg V_c/g)较其他品种核桃叶强。‘西林3号’核桃不同部位抗氧化活性测定显示,DPPH和ABTS⁺自由基清除力及FRAP还原力顺序从强到弱为:内种皮>叶>花粉>带皮种仁>去皮种仁。利用LC-MS从‘西林3号’内种皮及其核桃叶、KT-J02核桃叶、山核桃叶等4个供试样品的60%丙酮提取物中共鉴定出17种抗氧化活性成分,其中酚类9种,黄酮类8种,槲皮素和汉黄芩素为4种供试样品共有成分。山核桃叶中鉴定出13种成分,其中4种仅存在与山核桃中,即没食子酸、3-咖啡酰奎宁酸、表儿茶素没食子酸酯和对香豆酸;‘西林3号’和KT-J02核桃叶分别有1种成分仅存在于其中,为没食子酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖和儿茶素。内种皮中鉴定出6种成分,鞣花酸仅存在于内种皮中。

关键词:核桃叶,核桃内种皮,核桃种仁,抗氧化活性,成分鉴定

Antioxidant Activity and Compounds Identification of Kernels, Leaves and Pollen of Walnut(*Juglandaceae*)

ZHAO Xin-dan, HAO Yuan-ru, PANG Jun-qian, ZHANG Qiang*, ZHAI Mei-zhi*

(Walnut Research Centre, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to comprehensively develop walnut biological resources, the antioxidant activities of different walnut kernels, leaves and pollen extracted by 7 kinds of solvents were studied, and the antioxidant compounds of them were analyzed. Antioxidant activities were determined by DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging abilities and FRAP reducing ability. The total phenol and total flavonoids were determined. The antioxidant compounds of the samples were detected by high resolution mass spectrometer. The results showed that the extracts obtained by 60% acetone as solvent had higher antioxidant activity in 7 solvents. DPPH (IC₅₀ = 0.156 mg/mL) and ABTS⁺ (IC₅₀ = 0.131 mg/mL) radical scavenging power and reducing power (62.17 mg V_c/g) in pecan leaves were stronger than those of other leaves. Determination of antioxidant activity in different parts of ‘Xilin 3’ walnut showed that the order of DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging power and FRAP reducing power from strong to weak was: Pellicle > leaves > pollen > kernel > peeling kernel. A total of 17 antioxidant active compounds were identified from 60% acetone extracts of ‘Xilin 3’ pellicle and walnut leaves, KT-J02 walnut leaves, pecan leaves by LC-MS, including 9 phenols and 8 flavonoids. Quercetin and wogonin were common compounds in 4 test samples. For walnut leaves, 13 compounds were identified in the pecan leaves, 4 kinds of unique compounds, namely gallic acid, 3-caffeoyl quinic acid, epicatechin gallate and p-coumaric acid. There was one compounds for each in ‘Xilin 3’ and KT-J02 leaves, gallic acid-4-O-β-D-glucopyranose and catechin, respectively. Six components were identified in pellicle, and one unique compound was ellagic acid.

Key words: walnut leaves; walnut pellicle; walnut kernels; antioxidant activity; compounds identification

中图分类号:TS255.6

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2019)20-0054-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.009

引文格式:赵鑫丹,郝苑汝,庞俊倩,等.核桃(*Juglandaceae*)种仁、叶、花粉抗氧化活性及成分鉴定[J].食品工业科技,2019,40(20):54-60.

收稿日期:2019-02-27

作者简介:赵鑫丹(1995-),女,硕士研究生,研究方向:林产化学加工工程,E-mail:18309243031@163.com。

*通讯作者:翟梅枝(1963-),女,博士,教授,研究方向:植物资源利用和植物病害防治,E-mail:plum-zhai@163.com。

张强(1975-),男,博士,副教授,研究方向:植物资源加工利用,E-mail:zhangjack2003@aliyun.com。

核桃 (*Juglans regia* L.), 胡桃科 (*Juglandaceae*) 核桃属 (*Juglans*) 落叶乔木, 主要分布在我国云贵地区、西北地区、华北地区^[1]。山核桃 (*Carya cathayensis* Sarg.), 胡桃科 (*Juglandaceae*) 山核桃属 (*Carya*) 落叶乔木, 以浙江、江苏和云南三省较为集中^[2]。我国作为核桃生产大国, 种植面积及产量均居世界第一^[1]。近年来, 核桃及其副产品由于对人体健康有益而受到广泛关注。核桃中富含多酚、黄酮等抗氧化活性物, 具有抑制低密度脂蛋白氧化、抗衰老等生理活性^[3]。Bati 等^[4]研究核桃对乙醇诱导的氧化应激的保肝作用和抗氧化作用, 结果发现核桃可以通过减少脂质氧化和抑制乙醇诱导的自由基的产生达到护肝作用。Anjum 等^[5]选择不同处理后的核桃提取物进行抗增殖活性评估, 发现其对 Colo-205 人癌细胞具有清除活性。因此, 充分利用我国丰富的核桃资源, 对核桃各部位多酚、黄酮类抗氧化活性物质进行全面开发有着非常广阔的前景。

何志平等^[6]通过 DPPH 自由基清除能力、还原能力、超氧阴离子清除能力评价山核桃叶提取液的抗氧化活性, 结果表明, 当甲醇浓度不相同, 60% 甲醇溶液的提取物具有最高的 DPPH 自由基清除能力。John 等^[7]研究发现, 丙酮可以提取比甲醇和乙醇更大量的可溶性酚类物质。魏欢等^[8]通过 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除法评价核桃叶抗氧化能力, 并分析多酚含量与抗氧化能力的关系, 表明抗氧化能力与其多酚含量成正相关关系。Pereira 等^[9]采用总还原力测定、DPPH 自由基和 β -胡萝卜素亚油酸酯模型体系的清除作用, 对不同品种的核桃叶进行抗氧化活性测定, 结果显示不同品种核桃叶抗氧化活性存在差异, 进而利用 HPLC/DAD 鉴定出核桃叶中含有槲皮素 3-半乳糖苷 (26.8%)、3-咖啡酰奎宁酸 (19.7%)、对香豆酸 (1.4%) 等 10 种物质。Cosmulescu 等^[10]对 14 个不同品种核桃叶的抗氧化活性进行研究, 结果表明不同品种核桃叶间抗氧化活性存在差异。国内外研究中对不同品种核桃叶的抗氧化活性报道较多, 但并未发现将山核桃叶与核桃叶的对比研究。Akin 等^[11]对核桃不同部位抗氧化活性的研究中发现, 其抗氧化活性大小顺序为: 核桃叶 > 种仁 > 青皮。王丹等^[12]对核桃花粉的研究中发现, 核桃花粉也有很强的抗氧化活性。

本研究拟以多种溶剂提取山核桃叶和核桃叶的抗氧化活性物质, 筛选其适宜提取溶剂, 明确山核桃叶与核桃叶的抗氧化活性差异; 通过对不同属核桃叶及核桃属叶片、种仁、花粉的研究, 明确供试样品的抗氧化活性, 并鉴定其抗氧化活性成分, 为核桃资源的深度开发和在食品、保健品等领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃叶、雄花粉、种仁 采自西北农林科技大学山阳核桃试验站, 核桃叶品种见下表 1, 雄花粉和种仁品种为 ‘西林 3 号’, 11 月份采收不同品种核桃叶, 12 月采收种仁, 次年 4 月采收雄花粉; DPPH 美

国 Sigma; 芦丁 国药集团化学试剂有限公司; ABTS 合肥博美生物科技有限责任公司; TPTZ、福林酚试剂 北京索莱宝科技有限公司; 没食子酸 遵义市第二化工厂; 甲醇、甲酸 (色谱纯) 德国默克公司; 纯净水 广州屈臣氏食品饮料有限公司; 其他常规试剂 均为国产分析纯。

表 1 供试核桃叶样品情况

Table 1 Test samples information of walnut leaves

编号	品种/代号	归属	品种特点
1	KT-J02	核桃属	种仁紫色, 晚结实
2	山核桃	山核桃属	壳面光滑, 晚结实
3	‘西林 3 号’	核桃属	大果型, 早结实

Triple TOF 5600⁺ 高分辨质谱仪 AB SCIEX; UV-1800 紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; AB204-S 电子天平 瑞士梅特勒-托利多; SB-5200 DTD 超声清洗器 宁波新芝生物科技股份有限公司; SENCO R 系列旋转蒸发器 上海申生科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗氧化活性成分的提取 核桃叶于 105 ℃ 烘箱中杀青处理 15 min, 阴干, 粉碎, 过 60 目筛, 冷藏备用; 雄花粉除杂后自然风干, 装袋备用; 种仁经人工去除种皮, 获得核桃内种皮、带皮种仁和去皮种仁 3 种供试材料, 粉碎, 冷藏备用, 最后得到 7 种供试样品粉末, 即: KT-J02 核桃叶、山核桃叶、‘西林 3 号’核桃叶、‘西林 3 号’花粉、‘西林 3 号’带皮种仁、‘西林 3 号’去皮种仁和 ‘西林 3 号’内种皮。

超声辅助提取活性成分: 准确称取 1 g 供试样品粉末与 10 mL 提取溶剂 (60% 乙醇、100% 乙醇、60% 甲醇、100% 甲醇、60% 丙酮、100% 丙酮和蒸馏水) 混合, 50 ℃ 超声处理 30 min 后, 7 000 r/min 离心 5 min, 得 7 种溶剂提取上清液。提取液质量浓度以每毫升提取液中核桃叶干粉的添加质量来计算。

浸膏的制备: 准确称取 10 g KT-J02 核桃叶、山核桃叶、‘西林 3 号’核桃叶和 ‘西林 3 号’内种皮与 100 mL 60% 丙酮 混合, 50 ℃ 超声处理 30 min 后, 过滤, 收集上清液, 残渣在相同条件下再提取两次, 合并上清液, 60 ℃ 减压浓缩、烘干得浸膏, 浸膏粉碎成干粉, 备用。

1.2.2 提取溶剂的筛选 体外评价物质抗氧化活性的方法有很多, 与其他方法相比, DPPH 法简单快速, 是目前最常用的抗氧化性评价方法^[13]。本试验通过测定不同溶剂提取物在相同浓度下的 DPPH 自由基清除率评价其抗氧化活性, 从而筛选出最佳提取溶剂。将 1.2.1 中得到的 KT-J02 核桃叶、山核桃叶、‘西林 3 号’核桃叶上清液稀释 400 倍, 进行 DPPH 抗氧化活性测定。

1.2.3 不同品种核桃叶的抗氧化活性研究 将 60% 丙酮提取得到的 KT-J02 核桃叶、山核桃叶、‘西林 3 号’核桃叶上清液进行抗氧化活性测定。采用 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺ 自由基清除能力测定和 FRPA 还原力评价其抗氧化活性。

1.2.4 ‘西林3号’核桃不同部位的抗氧化活性研究 将60%丙酮提取得到的花粉、内种皮、去皮种仁和带皮种仁上清液进行抗氧化活性测定。采用DPPH自由基清除能力、ABTS⁺自由基清除能力测定和FRPA还原力评价其抗氧化活性。

1.2.5 抗氧化活性测定方法

1.2.5.1 DPPH自由基清除能力测定 采用付晶晶等^[14]的方法,稍加修改。用无水乙醇配制0.1 mmol/L的DPPH溶液,将2 mL样品溶液及2 mL DPPH溶液加入到同一试管中,摇匀,室温下静置30 min后测定其吸光度 A_s ,同时测定2 mL DPPH溶液与2 mL无水乙醇混合后的吸光度 A_c ,以及2 mL样品溶液与2 mL无水乙醇混合后的吸光度 A_b 。重复3次,以0.002~0.01 mg/mL V_c 做阳性对照,计算 IC_{50} 。

DPPH自由基清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除能力测定 采用黄尚荣等^[15]的方法,稍加修改。ABTS储备液(7 mmol/L)与过硫酸钾(终物质的量浓度2.45 mmol/L)按1.0:0.5比例混合,混合液于室温下暗处反应12~16 h产生ABTS⁺自由基。ABTS⁺自由基溶液使用前用无水乙醇稀释至734 nm处的吸光度为 0.700 ± 0.020 。1 mL不同质量浓度的样品中加入4 mL ABTS⁺自由基溶液,30 ℃条件下反应6 min后于734 nm波长下测吸光度,为 A_1 。1 mL无水乙醇代替样品,吸光值为 A_0 。重复3次,以0.003~0.015 mg/mL V_c 做阳性对照,求 IC_{50} 。

ABTS⁺自由基清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.5.3 FRPA还原力测定 采用朱攀攀等^[16]的FRAP法,稍加修改。取1 mL样品加入到10 mL离心管中,再加入3 mL FRAP反应试剂(0.1 mol/L pH3.6 醋酸缓冲液、10 mmol/L TPZ(溶于40 mmol/L 盐酸)、20 mmol/L 氯化铁以体积比10:1:1混合)。黑暗处理30 min,在593 nm处测定其吸光度。同样,用1 mL对应溶剂与3 mL FRAP溶液混匀作空白对照,空白校零。重复3次, V_c 为标准品,制作标准曲线,得到吸光度(y)与 V_c 含量(x)之间的回归方程, V_c 浓度在0.002~0.01 mg/mL之间线性良好,回归直线方程 $y = 62.3x - 0.027$ ($R^2 = 0.9992$)。

1.2.6 总酚和总黄酮含量测定 将1.2.1得到的KT-J02核桃叶、山核桃叶、‘西林3号’核桃叶、花粉、带皮种仁、去皮种仁和内种皮上清液进行总酚和总黄酮含量测定。总酚和总黄酮含量测定总酚含量采用李巨秀等^[17]的福林酚法。没食子酸浓度在0~1 mg/mL之间线性良好,回归直线方程: $y = 12.143x + 0.0391$ ($R^2 = 0.9994$)。总黄酮含量采用王丹^[18]的硝酸铝-亚硝酸钠法。芦丁浓度在0~1 mg/mL之间线性良好,回归直线方程为 $y = 1.0036x + 0.0217$ ($R^2 = 0.9993$)。

1.2.7 抗氧化成分鉴定 液质联用分析抗氧化成分:准确称取1 mg浸膏干粉,用1 mL甲醇(色谱级)

超声辅助溶解,得供试样品溶液。将样品与流动相在0.22 μm 滤膜下过滤,流动相超声脱气。之后样品进样,进样量为20 μL 。色谱条件:Waters C_{18} 柱(2.1 $\times$ 150 mm, 2.5 μm);流动相A:甲酸(0.1%),B:甲醇,梯度洗脱条件^[19]如表2所示。质谱条件为:离子源ESI,采用负离子检测模式;扫描范围:60~800 m/z。采用Analyst TF 1.7.1和Peakview (Version 1.2, AB SCIEX)软件进行质谱分析,根据国内外相关文献[20~35],进行图谱对比,进而对其成分进行鉴定。

表2 LC-MS洗脱条件

Table 2 Gradient elution program used in LC-MS analysis

时间(min)	0	30	33	35
流动相体积分数(%)	A 70	50	20	20
	B 30	50	80	80

1.3 数据处理

采用SPSS 25.0软件进行统计分析,计算 IC_{50} 值,Duncan法进行显著性分析,Pearson法进行相关性分析,Origin 9.1软件作图。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的筛选

由图1可知,3种核桃叶提取物对DPPH自由基均有不同程度的清除作用。在7种不同溶剂提取物中,KT-J02核桃叶60%丙酮提取物的DPPH自由基清除率最大,为73.5%,与其他溶剂提取物的清除率差异显著($P < 0.05$);60%甲醇提取物的清除率位居第二,这与Rorabaugh等^[36]的研究结果一致;60%乙醇提取物、100%乙醇提取物、100%甲醇提取物和水提取物的清除率间差异不显著;100%丙酮提取物的清除率最小,为13.9%,仅为60%丙酮提取物清除率的20%。‘西林3号’核桃叶的60%丙酮提取物,其DPPH自由基清除率仍为最大,且与其他6种提取物的清除率差异性显著($P < 0.05$)。对于山核桃叶而言,60%丙酮提取物的DPPH自由基清除率仅次于60%甲醇提取物的,两者差异不显著,但显著高于其他5种溶剂提取物的清除率($P < 0.05$)。综合考虑认为,60%丙酮溶液为核桃叶抗氧化活性物质的适宜提取溶剂。

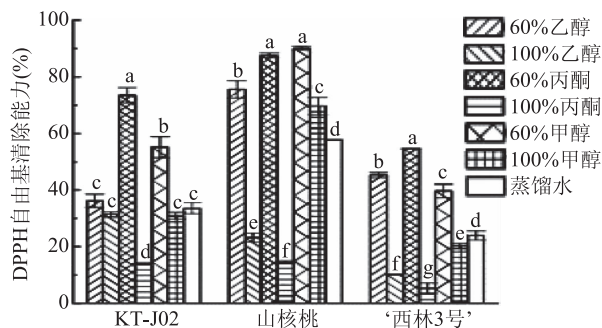


图1 不同提取物的DPPH自由基清除能力

Fig.1 DPPH radical scavenging capacity of different extracts

注:同组字母不同表示差异性显著($P < 0.05$)。

2.2 不同品种核桃叶的抗氧化活性

采用DPPH、ABTS⁺自由基清除能力和还原能力

对3种核桃叶60%丙酮提取物进行抗氧化活性分析,结果见表3。

表3 不同品种核桃叶提取物抗氧化活性

样品名称	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基	还原能力 (mg V _c /g)
	清除能力	清除能力	
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)	
KT-J02	0.283	0.199	41.68
山核桃	0.156	0.131	62.17
西林3号	0.421	0.229	35.47
V _c	0.004	0.011	ND

注:ND表示未检测;表4同。

从表3中可以看出,山核桃叶与核桃叶的抗氧化活性存在差异,自由基清除能力及还原能力依次为:山核桃>KT-J02>‘西林3号’,表明山核桃叶的抗氧化活性要优于核桃叶。3种核桃叶DPPH和ABTS⁺自由基清除能力IC₅₀分别为0.156~0.421和0.131~0.229 mg/mL,还原能力为35.47~62.17 mg V_c/g。与对照(V_c)相比,3种核桃叶提取物的抗氧化能力均低于V_c的抗氧化能力。付晶晶等^[14]对核桃叶抗氧化活性进行研究,发现DPPH和ABTS⁺自由基清除能力IC₅₀分别为0.108 mg/mL和0.115 mg/mL,可能由于所采核桃叶的月份不同,导致其抗氧化活性物质含量存在差异。鉴于山核桃和KT-J02(紫仁核桃)种植范围小,生物产量低,而‘西林3号’为普通核桃,资源量大,故选取‘西林3号’核桃种仁及花粉进行抗氧化活性深入研究。

2.3 ‘西林3号’核桃不同部位的抗氧化活性研究

‘西林3号’核桃花粉及种仁的DPPH和ABTS自由基清除能力及还原能力见表4。

表4 ‘西林3号’核桃雄花粉及种仁抗氧化活性

样品	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基	还原能力 (mg V _c /g)
	清除能力	清除能力	
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)	
花粉	0.490	0.742	6.77
内种皮	0.009	0.021	157.52
带皮种仁	0.525	1.688	1.38
去皮种仁	3.842	4.669	0.46
V _c	0.004	0.011	ND

结合表4和表3中‘西林3号’核桃叶的抗氧化活性,自由基清除能力及还原能力依次为:内种皮>叶>花粉>带皮种仁>去皮种仁。内种皮的抗氧化作用最强,其ABTS⁺自由基清除能力已经高达V_c的52.4%,DPPH自由基清除能力为V_c的44.4%,还原能力是V_c的15.7%。对种仁来说,内种皮DPPH和ABTS⁺自由基清除能力分别是带皮种仁的58倍、80倍,是去皮种仁的427倍、222倍;还原能力是带皮种仁的114倍,是去皮种仁的343倍。万政敏等^[37]的研究表明,核桃仁中对人体有益的多酚类物质主要

集中在内种皮上,而在去皮种仁中酚酸类物质的种类和含量都明显减少,黄酮类物质的含量也明显减少。核桃种仁营养价值丰富,主要含有蛋白质、脂肪酸等物质,核桃中不饱和脂肪酸含量超过60%,而内种皮是核桃中多酚类物质的主要集中部位,可有效地防止核仁中的油脂氧化酸败^[38]。因此,食用带皮核桃种仁能够摄取更多抗氧化活性物质,更好地清除人体内自由基,更有利于预防心血管疾病、抑制癌细胞增殖等。

2.4 总酚、总黄酮含量

供试7个样品总酚、总黄酮含量如表5所示,总酚、总黄酮含量与抗氧化活性相关性分析如表6所示。

表5 不同核桃供试样品总酚和总黄酮含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	Table 5 Contents of total phenol and flavonoids of different walnut test samples($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	总酚 (mg 没食子酸/g)	总黄酮 (mg 芦丁/g)
KT-J02 核桃叶	18.81 ± 0.10 ^c	149.78 ± 2.33 ^b
山核桃叶	31.50 ± 0.10 ^b	156.20 ± 1.99 ^a
叶	17.94 ± 0.16 ^c	74.06 ± 0.30 ^d
花粉	9.90 ± 0.53 ^d	6.91 ± 0.10 ^e
‘西林3号’ 内种皮	129.98 ± 2.38 ^a	103.06 ± 1.44 ^c
带皮种仁	1.46 ± 0.03 ^e	0.73 ± 0.06 ^e
去皮种仁	1.36 ± 0.02 ^e	-

注:同列字母不同表示差异显著(P<0.05);-代表未检测到该成分。

从表5可看出,供试7个样品中均含有酚类成分,含黄酮类成分的样品有6个,去皮种仁中不含黄酮类成分。3个核桃叶样品中,总酚和总黄酮含量均为山核桃>KT-J02>‘西林3号’。

不同部位的‘西林3号’核桃样品总酚、总黄酮含量内种皮>叶>花粉>带皮种仁>去皮种仁。内种皮总酚和总黄酮含量均最高,分别为(129.98 ± 2.38) mg 没食子酸/g和(103.06 ± 1.44) mg 芦丁/g,其总酚含量是位居第二的核桃叶的7.2倍,总黄酮含量是核桃叶的1.4倍。‘西林3号’核桃种仁中总酚和总黄酮含量内种皮>带皮种仁>去皮种仁,内种皮的总酚含量分别是带皮种仁和去皮种仁的89倍、96倍,其总黄酮含量是带皮种仁的141倍,去皮种仁不含黄酮类成分,表明种仁的酚类和黄酮类物质主要集中于内种皮中。

由表6可见,总酚含量和总黄酮含量与DPPH自由基清除能力、ABTS⁺自由基清除能力和FRAP还原能力均存在正相关。总酚含量与三者的相关系数分别为0.882、0.970和0.983,相关系数均大于0.8,相关性很强。总黄酮含量与DPPH自由基清除能力相关系数为0.909,相关性很强;但与ABTS⁺自由基清除能力和FRAP还原能力相关系数仅为0.782和0.742,相关系数均小于0.8,相关性不强。这说明总酚、总黄酮含量影响抗氧化活性,但可能由于其作用机理不同,所以影响程度不同。

表6 总酚、总黄酮含量与抗氧化活性相关性分析

Table 6 Correlation analysis of total phenols, total flavonoids and antioxidant activity

相关系数	DPPH 自由基清除能力	ABTS ⁺ 自由基清除能力	FRAP 还原能力
总酚	0.882	0.970	0.983
总黄酮	0.909	0.782	0.742

2.5 抗氧化活性成分鉴定分析

核桃样品的高分辨质谱见图2。依据相对保留时间、质谱图,根据国内外相关文献[20-35]进行比对、推断其结构。抗氧化活性成分鉴定结果见表7。

从表7可知,4个供试样品共鉴定出17种活性物质,其中多酚类物质9种,黄酮类物质8种。不同样品中的活性物质既有相同成分,又有不同成分。山核桃叶中鉴定出13种活性物质:酚类5种,黄酮类8种;KT-J02和‘西林3号’核桃叶中各鉴定出11种活性物质:酚类3种,黄酮类8种;且3种核桃叶中的黄酮类物质完全相同,但酚类物质不尽相同;表明山核桃叶要比核桃叶所含酚类物质更为丰富。‘西林3号’内种皮中鉴定出6种活性物质:酚类4种,黄酮类2种,且鞣花酸为核桃内种皮特有成分。结合表6相关性分析可知,抗氧化活性不仅与总酚、总黄酮含量有关,还与其所含物质种类有关。

从表7可看出,3种核桃叶和‘西林3号’内种皮共有成分为槲皮素和汉黄芩素。3种核桃叶的共有成分为9种,即:5-咖啡酰奎宁酸、槲皮素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-半乳糖苷、槲皮素-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-阿拉伯糖苷、槲皮素、芦丁和汉黄芩素。山核桃叶独有成分4种,即没食子酸、3-咖啡酰奎宁酸、表儿茶素没食子酸酯和对香豆酸;没食子酸

-4-O-β-D-吡喃葡萄糖仅存在于‘西林3号’核桃叶中,儿茶素仅存在于KT-J02核桃叶中。Pereira等^[9]在核桃叶中也鉴定出5-咖啡酰奎宁酸、槲皮素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-半乳糖苷和槲皮素-3-阿拉伯糖苷,与本研究一致,同时Pereira等^[9]还在核桃叶中鉴定出3-咖啡酰奎宁酸、对香豆酸、3-对香豆酰奎宁酸、4-对香豆酰奎宁酸、槲皮素-3-戊糖苷衍生物和槲皮素-3-木糖苷,而本试验中仅在山核桃叶中鉴定出3-咖啡酰奎宁酸和对香豆酸,仅在核桃属叶片中鉴定出对香豆酰奎宁酸。槲皮素-3-戊糖苷衍生物和槲皮素-3-木糖苷未发现。这可能是由于所研究核桃品种、生长环境及采摘月份不同,导致其所含抗氧化活性物质不同。在核桃内种皮中独有成分仅1种,为鞣花酸。王克建等^[39]在研究中也发现核桃仁中含有丰富的多酚类物质,其主要是鞣花单宁。鞣花酸有良好的抗癌、保肝作用,因此对于核桃内种皮中鞣花酸的开发利用有待进一步研究。

3 结论

核桃叶提取物抗氧化能力较强,但不同品种及不同溶剂提取物的抗氧化性差异较大。在供试品种中,山核桃叶抗氧化活性强于核桃叶,60%丙酮为适宜提取溶剂。

‘西林3号’核桃各部位总酚和总黄酮含量依次为内种皮>叶>花粉>带皮种仁>去皮种仁,核桃种仁中抗氧化活性成分主要集中在内种皮上,表明食用带皮核桃种仁能够摄取更多抗氧化活性物质,清除人体内自由基,更有利于预防心血管疾病、抑制癌细胞增殖等。

内种皮和3个核桃叶样品共鉴定出17种活性物质,其中多酚类9种,黄酮类8种。4个样品既有共有成分,也有独有成分。对这些抗氧化成分的研究

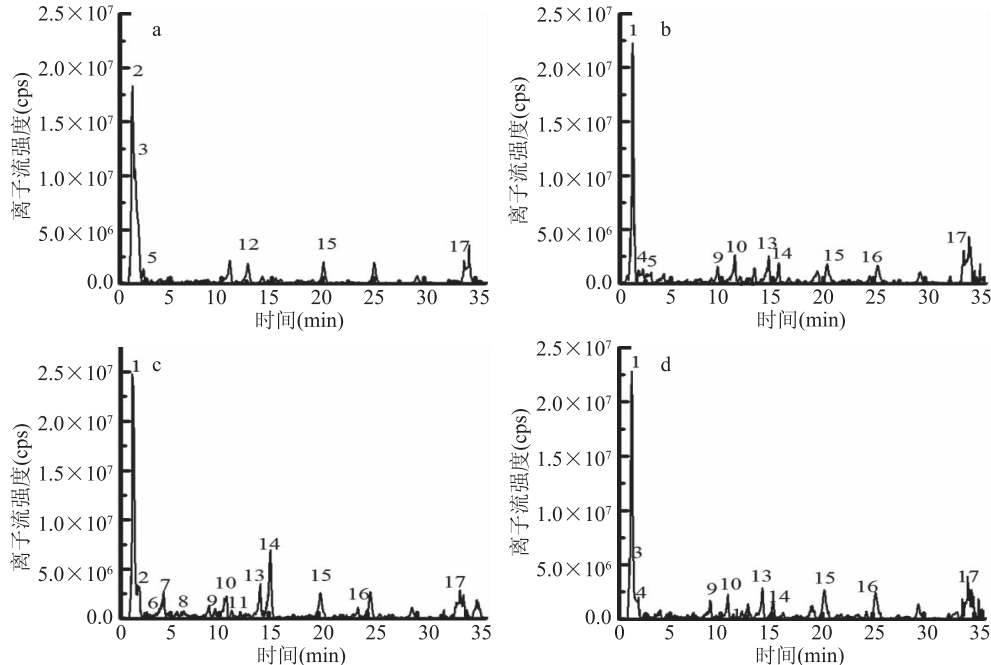


图2 核桃抗氧化活性成分鉴定总离子流图

Fig.2 Total ion chromatogram of antioxidant compounds of walnut

注:a:‘西林3号’内种皮,b:‘KT-J02’核桃叶,c:山核桃叶,d:‘西林3’核桃叶。

表7 各样品中化学成分的鉴定分析
Table 7 Identification and analysis on chemical constituents of different samples

峰号	化学成分	分子式	KT-J02 核桃叶	山核桃叶	‘西林3号’ 核桃叶	‘西林3号’ 内种皮
1	5-咖啡酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	+	+	+	-
2	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	-	+	-	+
3	没食子酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	-	-	+	+
4	对香豆酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	+	-	+	-
5	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	+	-	-	+
6	3-咖啡酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	+	-	-
7	表儿茶素没食子酸酯	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	-	+	-	-
8	对香豆酸	C ₉ H ₈ O ₃	-	+	-	-
9	槲皮素-3-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	+	+	+	-
10	槲皮素-3-半乳糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	+	+	+	-
11	槲皮素-3-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	+	+	+	-
12	鞣花酸	C ₁₄ H ₆ O ₈	-	-	-	+
13	槲皮素-3-阿拉伯糖苷	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	+	+	+	-
14	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	+	+	+	-
15	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	+	+	+	+
16	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	+	+	+	-
17	汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	+	+	+	+

注：“+”表示此样品含有该物质，“-”表示此样品不含该物质。
可以为食品、保健品等的开发提供参考。

参考文献

[1] 李忠新.中国核桃产业发展研究[M].北京:中国轻工业出版社,2016:1.

[2] 姚小华,常君,王开良.中国薄壳山核桃[M].北京:科学出版社,2014:86-87.

[3] 史金凤,林玉萍,陈朝银,等.核桃仁酚性成分及其生物活性研究进展[J].中成药,2018,40(6):1360-1364.

[4] Bati B, Celik I, Dogan A. Determination of hepatoprotective and antioxidant role of walnuts against ethanol-induced oxidative stress in rats[J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2014, 71(2): 1-8.

[5] Anjum S, Gani A, Ahmad M, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of walnut extract (*Juglans regia* L.) processed by different methods and identification of compounds using GC/MS and LC/MS technique [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(1): 1-9.

[6] 何志平,庞林江,茅林春,等.山核桃叶提取物的抗氧化活性比较[J].食品与机械,2011,27(3):45-48.

[7] John J A, Shahidi F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) [J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2(3): 196-209.

[8] 魏欢,颜小捷,杨建文,等.核桃叶多酚含量的测定和抗氧化能力研究[J].广西植物,2018,38(5):596-601.

[9] Pereira J A, Oliveira I, Sousa A, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars [J]. Food & Chemical Toxicology, 2007, 45(11): 2287-2295.

[10] Cosmulescu S, Trandafir I. Anti-oxidant activities and total phenolics contents of leaf extracts from 14 cultivars of walnut (*Juglans regia* L.) [J]. Journal of Horticultural Science and

Biotechnology, 2012, 87(5): 504-508.

[11] Akin M, Arabaci G, Saki N. Total phenols, antioxidant potential and tyrosinase inhibitory activity of walnut (*Juglans regia* L.) leaf, husk and seed [J]. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25(16): 9337-9340.

[12] 王丹,翟梅枝,毛光瑞,等.核桃花粉提取物的抗氧化性研究[J].食品工业科技,2014,35(16):137-139.

[13] 王晓宇,杜国荣,李华.抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J].食品与生物技术学报,2012,31(3):247-252.

[14] 付晶晶,肖海芳,宋元达.金银花等6种植物提取物总黄酮含量与抗氧化性相关性研究[J].食品与机械,2017,33(6):159-163.

[15] 黄尚荣,杨雪娜,张露,等.龙眼皮原花青素提取工艺优化及其抗氧化活性测定[J].食品科学,2014,35(10):68-75.

[16] 朱攀攀,马亚琴,窦华亭,等.超声局部效应对咖啡酸稳定性及抗氧化性的影响[J].食品科学,2015,36(23):12-17.

[17] 李巨秀,张小宁,李伟伟.不同品种石榴花色苷、总多酚含量及抗氧化活性比较研究[J].食品科学,2011,32(23):143-146.

[18] 王丹.核桃花粉化学和营养成分提取及抗氧化活性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.

[19] Amaral J S, Seabra R M, Andrade P B, et al. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves [J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 373-379.

[20] 施怀生,毕小凤,史宪海. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用分析黄芪根及其茎叶中黄酮和皂苷类成分[J].世界中西医结合杂志,2018,13(3):357-365.

[21] 郭晓敏,程捷恺,张明,等. UHPLC/MSn 质谱树技术与Q/TOF联用在利舒康胶囊成分鉴定中的应用[J].中草药,2017,48(10):1944-1956.

[22] 马悦,赵乐凤,吕子燕,等.高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析桑葚中黄酮类和多酚类物质[J].质

谱学报,2017,38(1):45-51.

[23] 曾美玲,沈耐涛,吴赛伟,等.基于 UPLC-Triple-TOF/MS 方法的三叶青化学成分分析[J].中草药,2017,48(5):874-883.

[24] 董红娇,陈晓虎,曾锐.UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析民族药小大黄的化学成分[J].中草药,2016,47(14):2428-2435.

[25] 褚衍涛,魏文峰,霍金海,等.UPLC-Q-TOF-MS 法分析芩苈清肺浓缩丸中的化学成分[J].中成药,2016,38(6):1303-1310.

[26] 杨代晓,李一鸣,刘妍如,等.高效液相色谱-串联质谱法对贯叶连翘中 4 种黄酮醇类化合物抗氧化活性的定量研究[J].科学技术与工程,2016,16(36):122-126.

[27] 潘智然,王腾华,朱首伦,等.基于超高压液相色谱-高分辨多级质谱联用技术的中药淡竹叶化学成分分析[J].广东药学院学报,2016,32(3):301-306.

[28] 王智聪,沙跃兵,余笑波,等.超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定茶叶中 15 种黄酮醇糖苷类化合物[J].色谱,2015,33(9):974-980.

[29] 许文,傅志勤,林婧,等.HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究[J].中国中药杂志,2014,39(22):43-65.

[30] 张维冰,王智聪,张凌怡.超高效液相色谱-光电二极管阵列检测-串联四级杆质谱法测定红洋葱中黄酮醇及其糖苷类化合物[J].分析化学,2014,42(3):415-422.

[31] 张靖,丘小惠,徐文,等.基于液质联用技术的复方三芪口服液化学成分特征图谱研究[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1572-1576.

(上接第 53 页)

[16] Boutron M, Faivre J, Marteau P, et al. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: A french case-control study [J]. British Journal of Cancer, 1996, 74(1):145.

[17] 张莉丽. MgCl₂ 胁迫调控茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶合成及酶应用特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.

[18] 郭春锋. 人源性益生菌降胆固醇机制及影响因素研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011.

[19] Serrano M, Pagani R, Vallet-Reg M, et al. In vitro biocompatibility assessment of poly(ε-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts [J]. Biomaterials, 2004, 25(25):5603-5611.

[20] 吴振, 潘道东, 曾小群, 等. 嗜酸乳杆菌肽聚糖水解条件优化及抗炎活性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12):79-84.

[21] Kandler O, König H. Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of *Methanogenic bacteria* [J]. Archives of Microbiology, 1978, 118(2):141-152.

[22] Kawamoto I, Oka T, Nara T. Cell wall composition of micromonospora olivoasterospora, micromonospora sagamiensis, and related organisms[J]. Journal of Bacteriology, 1981, 146(2):527-534.

[23] 袁峥, 赵瑞香, 牛生洋, 等. 酸胁迫下嗜酸乳杆菌菌体形态的扫描电镜观察[J]. 食品工业科技, 2012(24):199-201.

[32] Lv H, Wang X, He Y, et al. Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from qinghai-tibetan plateau by HPLC-DAD-APCI/MS [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2015, 38:49-54.

[33] Wang X Q, Wei F Y, Wei Z F, et al. Homogenate-assisted negative-pressure cavitation extraction for determination of organic acids and flavonoids in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) by LC-MS/MS [J]. Separation and Purification Technology, 2014, 135:80-87.

[34] Riethmüller E, Alberti A, Töth G, et al. Characterisation of diarylheptanoid- and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD-ESI/MS [J]. Phytochem Anal, 2013, 24(5):493-503.

[35] Zhang Y, Pan J, Zhong J, et al. Virtual separation of phytochemical constituents by their adduct-ion patterns in full mass spectra [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1227:181-193.

[36] Rorabaugh J M, Singh A P, Sherrell I M, et al. English and black walnut phenolic antioxidant activity *in vitro* and following human nut consumption [J]. Food and Nutrition Sciences, 2011, 2, 193-200.

[37] 万政敏, 郝艳宾, 杨春梅, 等. 核桃仁种皮中的多酚类物质高压液相色谱分析[J]. 食品工业科技, 2007, 28(7):212-213.

[38] 王宵然. 核桃内种皮废弃物的再生利用[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.

[39] 王克建, 杜明, 胡小松, 等. 核桃仁中多酚类物质的液相/电喷雾质谱分析[J]. 分析化学, 2009, 37(6):867-872.

[24] Fang S B, Shih H Y, Huang C H, et al. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG up-regulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells [J]. Supportive Care in Cancer, 2014, 22(6):1647-1654.

[25] Leteurtre E, Gouyer V, Rousseau K, et al. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate [J]. Biology of the Cell, 2004, 96(2):145-151.

[26] Zhang Y Q, Tang X Q, Sun L, et al. Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor [J]. World Journal of Gastroenterology, 2007, 13(10):1534.

[27] Kucerovala L, Altanerova V, Matuskova M, et al. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy [J]. Cancer Research, 2007, 67(13):6304-6313.

[28] He J Y, Wu Z, Pan D D, et al. Effect of selenylation modification on antitumor activity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 165(1):344-350.

[29] Colino J, Snapper C M. Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae* [J]. The Journal of Immunology, 2003, 171(5):2354-2365.