

核桃粕中抗氧化和糖苷酶抑制活性成分*

高丽娟^{1,2} 何开泽^{1**} 丁彦强^{1,2} 蒲 菁¹ 王少勇³

¹中国科学院成都生物研究所, 中国科学院环境与应用微生物重点实验室 成都 610041

²中国科学院大学 北京 100049

³广元市核桃研究所 广元 628018

摘要 为了发掘核桃粕潜在的利用价值, 提取核桃粕的化学成分, 测定其抗氧化活性和糖苷酶抑制活性并进行活性跟踪。结果显示, 95%乙醇提取物具有一定的生物活性, 抗氧化能力用DPPH法测定自由基清除率来表示, 测得IC₅₀为1.482 8 mg/mL, 抑制糖苷酶的能力用 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性表示, 测得IC₅₀分别为6.679 8 mg/mL和0.357 2 mg/mL。为了得到活性物质的最大提取效率, 分别选用95%乙醇、纯水、70%乙醇、60%丙酮4种溶剂提取样品, 并从提取率、抗氧化活性、糖苷酶抑制活性等方面进行评估, 最后选用70%乙醇为最佳提取溶剂。对70%乙醇粗提物进一步分相萃取, 结合柱色谱、薄层色谱结晶等分离方式, 从乙酸乙酯相中得到化合物Y-10-1, 其清除自由基IC₅₀为0.037 2 mg/mL, 抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶IC₅₀分别为0.017 9 mg/mL和0.617 3 mg/mL。抗氧化活性和糖苷酶抑制活性分别以维生素C和阿卡波糖作为阳性对照, 测得阳性对照的抗氧化IC₅₀为0.100 2 mg/mL, α -淀粉酶抑制IC₅₀为1.462 mg/mL, α -葡萄糖苷酶抑制IC₅₀为0.165 1 mg/mL。经比较, Y-10-1的抗氧化活性和 α -淀粉酶抑制活性均优于阳性对照。经液相和质谱鉴定, 基本确定Y-10-1为没食子酸。本研究说明Y-10-1具有潜在的使用和开发价值。(图5 表8 参23)

关键词 核桃粕; 抗氧化活性; 糖苷酶抑制活性

CLC Q949.735.6

The antioxidant and glycosidase inhibitory activities of walnut dreg extracts*

GAO Lijuan^{1,2}, HE Kaize^{1**}, DING Yanqiang^{1,2}, PU Qiang^{1,2} & WANG Shaoyong³

¹Key Laboratory of Environment and Applied Microbiology, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³Guangyuan Institute of Walnut, Guangyuan, 628018, China

Abstract In order to study the potential value of the walnut dregs. The walnut dregs were extracted with 95% ethanol and its anti-oxidant and glycosidase inhibitory activities were measured. The antioxidant activities were measured by analyzing the scavenging rate of DPPH radical activities, showing an IC₅₀ of 1.482 8 mg/mL. The IC₅₀ of α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities was 6.679 8 mg/mL and 0.357 2 mg/mL, respectively. In order to choose the best extracting agent, the extraction efficiency, anti-oxidant and glycosidase inhibitory activities were determined and analyzed for 95% ethanol extracts, water extracts, 70% ethanol extracts and 60% acetone extracts. As a result, 70% ethanol extract was selected and further separated by bioactivity-guided isolation with different agents and chromatography techniques, to obtain a crystallized compound Y-10-1 with an antioxidant activity IC₅₀ of 0.037 2 mg/mL, IC₅₀ of α -amylase and α -glucosidase of 0.017 9 mg/mL and 0.617 3 mg/mL, respectively. The IC₅₀ of antioxidant activity and glycosidase (α -amylase and α -glucosidase) inhibitory activity of positive control (Vitamin C and Acarbose) was 0.100 2 mg/mL, 1.462 mg/mL and 0.165 1 mg/mL, respectively. Y-10-1 showed higher antioxidant activity and α -amylase inhibitory activity than the positive control, and was identified as gallic acid based on HPLC and Mass spectrogram.

Keywords walnut dreg; antioxidant activity; glycosidase inhibitory activity

我国是世界第一大核桃生产国。核桃作为我国极具特色的生物资源, 其中含有丰富的脂肪酸、蛋白质、维生素、碳水化合物以及矿物质元素等^[1], 保健功能非常突出, 长期以来, 人们一直把核桃作为一种滋补品来食用。核桃虽然具有很高的营养价值, 但目前对该资源的开发仅局限于获取核桃仁作

为相关食品的制作原料, 导致该资源存在利用率小、开发深度不够、废弃物利用程度低等问题, 使得整体综合价值未得到充分利用, 未能形成高价值产业链。

核桃粕是以核桃仁为原料制备核桃乳后的副产物, 其中仍含有大量的营养成分, 但目前大都作为动物饲料利用, 或者直接扔掉, 其价值没有得到充分利用。本研究对核桃粕体外抗氧化和糖苷酶抑制活性同时进行分析, 并从中分离得到具有抗氧化和糖苷酶抑制作用的化合物, 以期对核桃加工副产物更深层次的利用寻找新的途径。

收稿日期 Received: 2015-03-25 接受日期 Accepted: 2015-06-24

*国家科技支撑计划项目(2011BAC-09B04-04-04)资助 Supported by the Sci-tech Pillar Project of China (2011BAC-09B04-04-04)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hekz@cib.ac.cn)

1 材料与方法

1.1 材料

核桃粕, 广元天煌山核桃食品有限公司提供, 是以核桃仁为原料制备核桃乳后的副产物。

1.2 试剂

α -淀粉酶购自美国Sigma公司, 配制为30 U/mL; α -葡萄糖苷酶美国Sigma公司, 用蒸馏水配成75 U/mL; 阿卡波糖购自拜耳医药保健有限公司, 配成实验用浓度2.5 mg/mL; 1%淀粉溶液可溶性淀粉用0.2 mol/L, pH = 6.4的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液溶解, 置于沸水浴加热5 min, 冷至室温, 加蒸馏水至终浓度1% (m/V), 备用; 2%麦芽糖溶液, 用0.2 mol/L, pH = 6.8磷酸缓冲液配制; 碘溶液, 0.5 g I_2 与5.0 g KI溶于50 mL蒸馏水, 置于棕色瓶中保存, 用前按1:200稀释, 备用; 葡萄糖测定试剂盒购自长春汇力生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 核桃粕提取物以及萃取物的制备 提取: 称取适量核桃粕, 45 °C烘干, 破碎, 过20目筛, 得到核桃粕粉, 提取溶剂反复提取, 合并滤液, 旋蒸, 45 °C烘干至恒重。萃取: 用水溶解核桃粕提取物, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取3遍以上, 直到萃取液变清为止, 合并萃取液, 旋蒸, 得到萃取相。

1.3.2 活性成分的分离提取 2.5 kg的核桃粕经过70%乙醇提取、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇四相萃取, 得到乙酸乙酯相75 g, 第一次过硅胶柱色谱柱 (450 mm × 75 mm), 二氯甲烷: 甲醇 (1:0 - 0:1) 梯度洗脱, 合并相同部分, 硅胶柱色谱柱 (380 mm × 18 mm) 二次分离, 正己烷: 乙酸乙酯: 乙酸 (5:5:1-0:10:1) 梯度洗脱, 合并相同部分, 薄层层析, 刮板, 洗脱, 结晶处理。

1.3.3 抗氧化活性的测定 通过DPPH法体外测定自由基清除率, 以评估核桃粕抗氧化能力^[2]。

配置0.015 mol/L的DPPH溶液, 避光-20 °C保存, 用前稀释20倍用 ($A \approx 0.8$), 现配现用, 取样品溶液 (1 mg/mL) 10 μ L与290 μ L的DPPH溶液混合, 置于96孔板酶标板中, 温室下避光反应30 min, 在517 nm处测定反应液的吸收值, 平行测定3次, 以80%乙醇做空白对照, 维生素C作为阳性对照。

DPPH-清除率计算公式:

$$P = [1 - (A_e - A_s)/A_c] \times 100\%$$

式中, A_e 为样品加入DPPH溶液的吸光值, A_s 为未加DPPH样品溶液的吸光值, A_c 为空白对照的吸光值。

1.3.4 糖苷酶抑制活性的测定 通过测定 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性来确定糖苷酶的体外生物活性^[3]。

α -淀粉酶抑制活性的测定: 参考文献[3], 取0.1 mL α -淀粉酶溶液, 加0.1 mL的样品, 40 °C反应15 min后, 取0.5 mL加入5 mL 0.1 mol/L HCl中终止反应, 从终止反应的溶液中取0.5 mL加入5 mL碘溶液中显色, 在660 nm处测定吸光度。其中, 空白对照以蒸馏水代替酶液和样品溶液; 阳性对照以2.5 mg/mL阿卡波糖代替样品; 阴性对照: 以蒸馏水代替样品。计算公式: α -淀粉酶抑制率 = $[1 - (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}})/A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定: 参考文献[3], 取2%麦芽糖溶液20 μ L, 加样品20 μ L, 37 °C预孵5 min后, 加酶溶液

20 μ L, 放置37 °C反应60 min。取出, 沸水浴10 min终止反应, 3 000 r/min离心10 min后取上清液用葡萄糖测定试剂盒测定葡萄糖的含量。其中, 空白对照以蒸馏水代替酶液和样品溶液; 阳性对照以2.5 mg/mL阿卡波糖代替样品; 阴性对照: 以蒸馏水代替样品。计算公式: 释放葡萄糖量 $C = (A_{\text{样}} - A_{\text{空}})/A_{\text{标}} \times C_{\text{标}}$; α -葡萄糖苷酶抑制率 = $(C_{\text{阴}} - C_{\text{样}})/C_{\text{阴}} \times 100\%$ 。

1.3.5 液相检测条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱, 流动相为乙腈:0.01 mol/L磷酸 (5:100), 检测波长为254 nm, 流速0.8 mL/min, 柱温25 °C, 进样量10 μ L。

1.3.6 质谱检测条件 ESI-MS数据是样品加甲醇溶解后由Bruker BioTOF-Q高分辨质谱仪测定。

1.3.7 数据处理 每个实验组测得3组平行数据, 采用Excel中的SVERAGEA和STDEV统计公式进行计算分析后, 在Excel中得出回归方程, R^2 和 IC_{50} , 并用SPSS软件对提取得率进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 95%乙醇提取物抗氧化活性以及糖苷酶抑制活性的初步测定

乙醇是最常用的亲水性有机溶剂, 初步用95%的乙醇作提取剂, 得到乙醇粗提物, 用乙醇和蒸馏水稀释为不同浓度的溶液, 分别测定其抗氧化活性以及糖苷酶抑制活性。结果 (表1) 显示, 95%乙醇核桃粕提取物均有一定的抗氧化活性和糖苷酶抑制活性, 但是这两种生物活性均比阳性对照低, 因此需要对提取溶剂进行一定的优化。

表1 核桃粕粗提物的抗氧化活性以及糖苷酶抑制活性 ($IC_{50}/\text{mg mL}^{-1}$)
Table 1 Antioxidant activity and glycosidase inhibitory activity of 95% ethanol extract ($IC_{50}/\text{mg mL}^{-1}$)

生物活性 Bio-activity	DPPH清除能力 Scavenging activity	α -淀粉酶抑制能力 α -amylase inhibitory activity	α -葡萄糖苷酶抑制能力 α -glucosidase inhibitory activity
阳性对照 Positive control	0.1002	1.462	0.1651
核桃粕粗提物 Walnut dreg extract	1.4828	6.6798	0.3572

2.2 最佳提取溶剂的选择

初步用95%乙醇作为提取剂, 证明核桃粕中含有抗氧化和糖苷酶抑制活性的化合物, 为了使活性化合物的得到最大的提取率, 分别用不同的提取剂95%乙醇、纯水、70%乙醇、60%丙酮4种溶剂提取样品, 并从提取得率、抗氧化活性、糖苷酶抑制活性以及溶剂的性质等方面进行评估, 选出最佳提取剂。

2.2.1 不同提取溶剂提取得率的测定 参考方法1.3.1, 分别用70%乙醇、纯水、60%丙酮、95%乙醇提取样品, 提取液浓缩后, 按以下方式计算提取得率。结果 (图1) 显示, 70%乙醇的提取得率优于95%乙醇和蒸馏水的提取得率, 次于60%丙酮的提取得率。经统计分析, 60%丙酮组的提取得率与其它3组有显著性差异 ($P < 0.05$), 70%乙醇组和95%乙醇组与水组之间的提取得率有显著差异 ($P < 0.05$), 而70%乙醇组与95%乙醇组无显著性差异 ($P > 0.05$)。计算公式: 提取得率 = 浸膏质量/原料质量 $\times 100\%$ 。

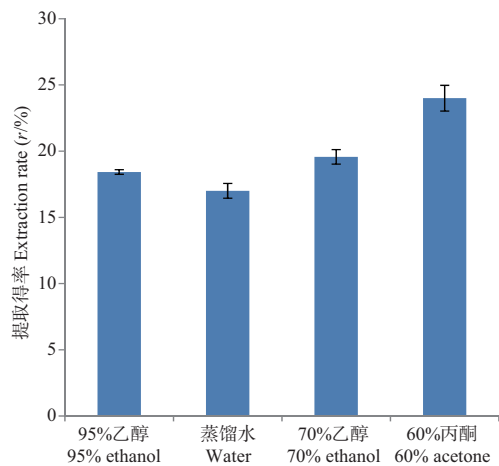


图1 4种提取剂对核桃粕的提取得率. 竖条表示标准偏差 (N=3).
Fig. 1 Extraction rate of walnut dregs with 4 extracting agents. Bars indicate standard deviation (N=3).

2.2.2 不同提取溶剂提取得到的粗提物中抗氧化活性的测定
将2.2.1中得到的样品稀释为不同浓度的乙醇溶液, 以维生素C为阳性对照, 测定其抗氧化活性, 结果(表2)证明70%乙醇提取物的抗氧化活性最高.

表2 4种核桃粕粗提物的抗氧化活性
Table 2 Antioxidant activity of walnut dreg extracts with 4 extracting agents

提取相 Extract	回归方程 Regression equation	R ²	清除DPPH能力 Scavenging capacity (IC ₅₀ /mg mL ⁻¹)
维生素C Vitamin C	y = 3.7064x + 0.1285	0.9968	0.1002
95%乙醇提取物 95% ethanol extract	y = 0.2471x + 0.1336	0.9980	1.4828
水提取物 Water extract	y = 0.2377x + 0.0935	0.9985	1.7101
70%乙醇提取物 70% ethanol extract	y = 0.5583x + 0.1031	0.9991	0.7109
60%丙酮提取物 60% acetone extract	y = 0.3204x + 0.1210	0.9991	1.1829

2.3 不同提取溶剂提取得到的粗提物中糖苷酶抑制活性的测定

将2.2.1得到的样品稀释为不同浓度的水溶液, 分别测定其α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的抑制活性, 以阿卡波糖为阳性对照, 结果见表3、表4和图2. 70%乙醇提取物的α-淀粉酶抑制活性最高, 而α-葡萄糖苷酶抑制活性略低于95%乙醇提取物, 但都高于其他提取物的抑制活性.

综合结果显示, 70%乙醇提取物的提取得率略低于60%丙酮提取物的提取得率, 而在生物活性方面除了α-葡萄糖苷酶抑制活性略低于95%乙醇提取物, 其它活性均优于其他提取物的活性. 从提取溶剂成本、溶剂毒性、提取得率、抗氧化性以及糖苷酶抑制活性等方面综合考虑, 选择70%乙醇为最佳提取剂.

2.4 不同萃取相中抗氧化活性的测定分析

将70%乙醇浸膏稀释为水溶液, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇4种溶剂萃取, 得到萃取相, 将其稀释为不同

表3 4种核桃粕提取物中α-淀粉酶的抑制活性
Table 3 Inhibitory activity of α-amylase of walnut dreg extracts with 4 extracting agents

提取相 Extract	回归方程 Regression equation	R ²	α-淀粉酶抑制活性 α-amylase inhibitory activity (IC ₅₀ /mg mL ⁻¹)
阿卡波糖 Acarbose	y = 0.0329x + 0.4519	0.9990	1.462
95%乙醇提取物 95% ethanol extract	y = 0.0737x + 0.0077	0.9990	6.6798
水提取物 Water extract	y = 0.0260x + 0.0086	0.9996	18.9
70%乙醇提取物 70% ethanol extract	y = 0.0679x + 0.3413	0.9999	2.3373
60%丙酮提取物 60% acetone extract	y = 0.1067x + 0.0234	0.9987	4.4667

表4 4种核桃粕提取物中α-葡萄糖苷酶的抑制活性
Table 4 Inhibitory activity α-glucosidase of walnut dreg extracts with 4 extracting agents

提取相 Extract	回归方程 Regression equation	R ²	α-葡萄糖苷酶抑制活性 α-glucosidase inhibitory activity (IC ₅₀ /mg mL ⁻¹)
阿卡波糖 Acarbose	y = 0.9710x + 0.3397	0.9902	0.1651
95%乙醇提取物 95% ethanol extract	y = 1.2921x + 0.0384	0.9994	0.3572
水提取物 Water extract	y = 0.0576x + 0.3357	0.999	2.8524
70%乙醇提取物 70% ethanol extract	y = 1.0698x + 0.1079	0.9991	0.3665
60%丙酮提取物 60% acetone extract	y = 0.4182x + 0.1833	0.999	0.7573

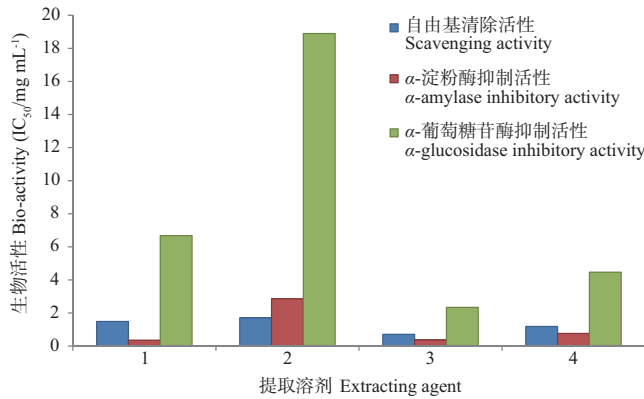


图2 4种核桃粕提取物的生物活性. 1: 95%乙醇提取物; 2: 水提取物; 3: 70%乙醇提取物; 4: 60%丙酮提取物.
Fig. 2 Bio-activity of walnut dregs extracts with 4 extracting agents. 1: 95% ethanol extracts; 2: water extracts; 3: 70% ethanol extracts; 4: 60% acetone extracts.

浓度的乙醇溶液, 测定其抗氧化活性. 由表5可见, 石油醚相的抗氧化活性IC₅₀为82.769 2 mg/mL, 几乎没有抗氧化活性, 其它萃取相均有一定的抗氧化活性, 其中氯仿相的抗氧化活性略低于其他萃取相.

2.5 不同萃取相中糖苷酶抑制活性的测定

将各萃取相稀释为不同溶度的水溶液, 测定其糖苷酶抑制活性, 结果(表6, 表7, 图3)显示, 石油醚相的α-淀粉酶IC₅₀为67.68 mg/mL, 抑制活性很小, 几乎没有α-淀粉酶抑制活性. 阳性对照的α-淀粉酶IC₅₀为1.462 mg/mL, α-葡萄糖苷酶IC₅₀为

表5 不同萃取相中的抗氧化活性
Table 5 Antioxidant activity of different extract phases

提取相 Extract	回归方程 Regression equation	R^2	清除DPPH能力 Scavenging capacity ($IC_{50}/mg\ mL^{-1}$)
维生素C Vitamin C	$y = 3.7064x + 0.1285$	0.9968	0.1002
石油醚相 Petroleum ether extract	$y = 0.0052x + 0.0696$	0.9941	82.7692
氯仿相 Chloroform extract	$y = 0.1643x + 0.2455$	0.9996	1.5490
乙酸乙酯相 Ethyl acetate extract	$y = 1.1239x + 0.1655$	0.9958	0.2976
正丁醇相 <i>n</i> -Butanol extract	$y = 1.6827x + 0.1872$	0.9999	0.1859
萃余相 Raffinate extract	$y = 0.1462x + 0.0946$	0.9987	2.7729

表6 不同萃取相中 α -淀粉酶的抑制活性
Table 6 Inhibitory activity of α -amylase in different extract phases

提取相 Extract	回归方程 Regression equation	R^2	α -淀粉酶抑制活性 α -amylase inhibitory activity ($IC_{50}/mg\ mL^{-1}$)
阿卡波糖 Acarbose	$y = 0.0329x + 0.4519$	0.999	1.462
石油醚相 Petroleum ether extract	$y = 0.0075x - 0.0076$	0.9999	67.68
氯仿相 Chloroform extract	$y = 0.3211x - 0.0062$	0.9998	1.5764
乙酸乙酯相 Ethyl acetate extract	$y = 0.3609x - 0.026$	0.9997	1.4575
正丁醇相 <i>n</i> -Butanol extract	$y = 0.5632x + 0.0791$	0.9978	0.7473
萃余相 Raffinate extract	$y = 0.0329x + 0.0284$	0.9995	14.3343

表7 不同萃取相中 α -葡萄糖苷酶的抑制活性
Table 7 Inhibitory activity of α -glucosidase in different extract phases

萃取相 Extraction phase	回归方程 Regression equation	R^2	α -葡萄糖苷酶抑制活性 α -glucosidase inhibitory activity ($IC_{50}/mg\ mL^{-1}$)
阿卡波糖 Acarbose	$y = 0.9710x + 0.3397$	0.9902	0.1651
石油醚相 Petroleum ether extract	$y = 0.0958x - 0.0832$	0.9998	6.0877
氯仿相 Chloroform extract	$y = 0.1344x + 0.3447$	0.9993	1.1555
乙酸乙酯相 Ethyl acetate extract	$y = 0.7653x + 0.3374$	0.9998	0.2125
正丁醇相 <i>n</i> -Butanol extract	$y = 1.9354x + 0.2919$	0.9995	0.1075
萃余相 Raffinate extract	$y = 0.2207x + 0.3875$	0.9999	0.5097

0.165 1 mg/mL, 在其他萃取相中, 正丁醇相的糖苷酶抑制活性均优于阳性对照, 乙酸乙酯相的 α -淀粉酶抑制活性优于阳性对照。

2.6 乙酸乙酯相的进一步分离纯化

结合反复柱色谱、薄层色谱、结晶等分离方式, 从乙酸乙酯萃取物中分离得到结晶化合物Y-10-1。其在丙酮中性状为无色针状结晶, 液相检测出峰时间为8.5 min, TCL薄层板上254 nm处显示暗斑(甲苯:甲酸乙酯:甲酸 = 6:12:1, R_f 为0.48), 2%三氯化铁显色阳性, 初步表明该晶体是一种多酚类化合物。Y-10-1的自由基清除率以及糖苷酶抑制率详见表8。经测

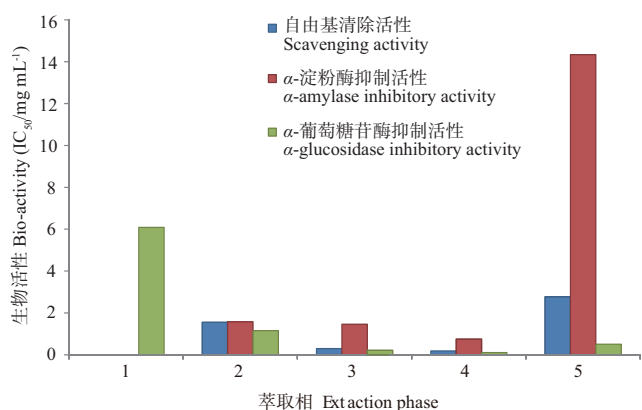


图3 不同萃取相的生物活性。1: 石油醚相; 2: 氯仿相; 3: 乙酸乙酯相; 4: 正丁醇相; 5: 萃余相。石油醚相中的自由基清除活性和 α -淀粉酶抑制能力太低, 未能检出。

Fig. 3 Bio-activity in different extract phases. 1: Petroleum ether extracts; 2: Chloroform extracts; 3: Ethyl acetate extracts; 4: *n*-Butanol extracts; 5: Raffinate extracts. Scavenging activity and α -amylase inhibitory activity were too low to detect in the petroleum ether extracts.

定, Y-10-1是一种具有抗氧化活性和糖苷酶抑制作用的化合物, 其中抗氧化活性和糖苷酶抑制活性均优于阳性对照。

表8 Y-10-1的自由基清除率以及糖苷酶抑制活性 ($IC_{50}/mg\ mL^{-1}$)
Table 8 Antioxidant activity and glycosidase inhibitory activity of Y-10-1 ($IC_{50}/mg\ mL^{-1}$)

生物活性 Bio-activity	DPPH清除能力 Scavenging activity	α -淀粉酶抑制能力 α -amylase inhibitory activity	α -葡萄糖苷酶抑制能力 α -glucosidase inhibitory activity
阳性对照 Positive control	0.1002	1.462	0.1651
Y-10-1	0.0372	0.0179	0.6173

2.7 Y-10-1的液相和质谱检测结果

Y-10-1的液相和质谱检测结果见图4。液相检测说明Y-10-1是单体化合物, 从质谱图可以看出, Y-10-1的ESI-MS m/z [M-H]⁻分子峰为169, 表明该化合物的分子量为170, 分子式为C₇H₆O₅, 经查阅文献, 推测该化合物为没食子酸。

为了更证明推测的正确性, 进一步与没食子酸标准品进行液相和质谱测定比较。

2.8 标准品没食子酸的液相和质谱检测结果

液相和质谱检测条件同Y-10-1的液相和质谱检测条件, 结果(图5)结果证明Y-10-1的液相检测结果和质谱测定结果与标准品没食子酸^[18]完全一致, 并且性状也相同, 基本确定Y-10-1为没食子酸。

3 讨论

核桃作为一种经济作物^[4], 全身都是宝, 直接食用核桃仁具有抗衰老、抗氧化、抗癌、预防心脑血管病、预防糖尿病的作用^[5-7], 另外, 核桃青皮含有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、杀虫除草的成分^[8-10], 可以作为开发植物农药的天然来源; 核桃壳^[11]是生产木炭和活性炭的原料之一, 也可用来培育菌菇; 而核桃根、枝、皮、叶有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、除草的作用^[12-14]。目前国内外对核桃树整体都有深入的研究, 但是对核桃加工副产物(核桃粕)的研究却很少。现阶段国内外还没有针对核

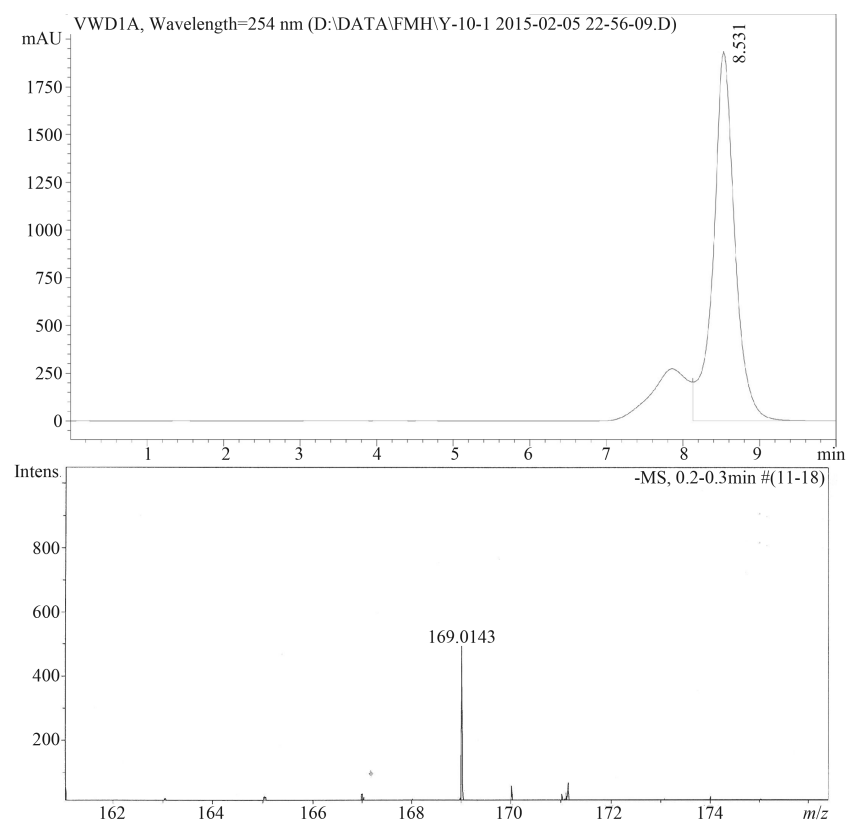


图4 活性化合物Y-10-1的HPLC图谱和质谱图谱.

Fig. 4 The HPLC atlas and mass spectrogram of active component Y-10-1.

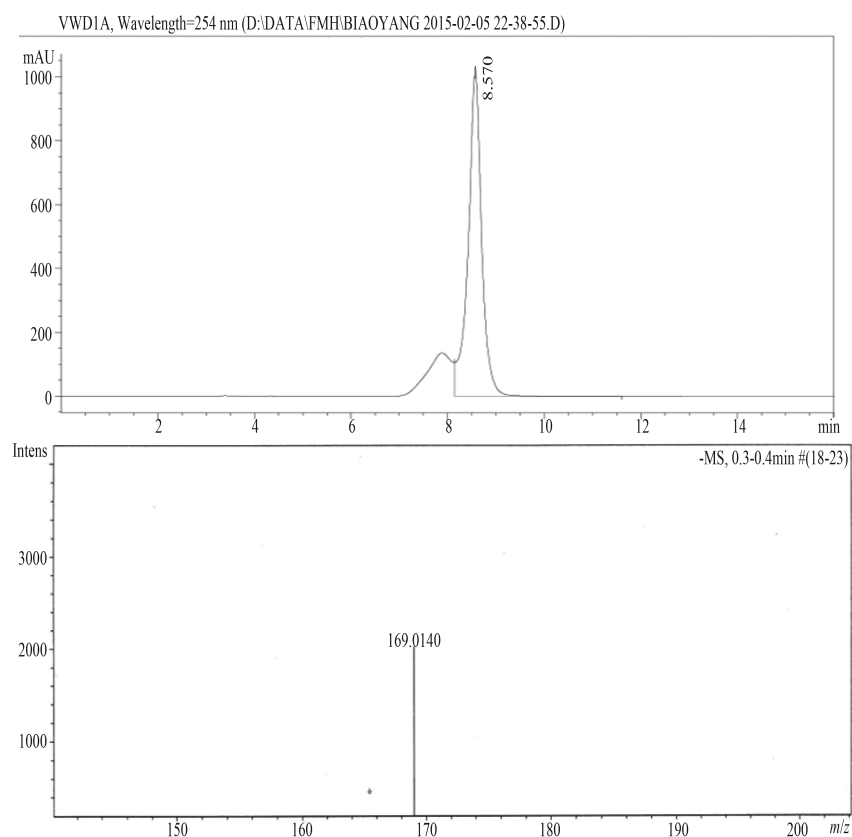


图5 标准品没食子酸的HPLC图谱和质谱图谱.

Fig. 5 The HPLC atlas and mass spectrogram of gallic acid standards.

桃粕开发抗氧化和降血糖保健产品的相关研究。如今众多研究对象皆为榨油后残渣,主要是针对抗氧化多肽的研究。比如,Gu M等人对脱脂核桃粕进行酶水解,进而对抗氧多肽进行研究,最后分离鉴定得到14种抗氧化多肽^[15]。李艳伏等人研究了核桃粕木瓜蛋白酶水解液中的抗氧化多肽,验证了木瓜蛋白酶解核桃粕蛋白的酶解最佳时间为210 min,水解液中抗氧化活性多肽分子质量(M_r)集中在607-1321之间^[16]。

本文首次对核桃粕体外抗氧化和糖苷酶抑制活性同时进行分析,并从中分离具有抗氧化和糖苷酶抑制作用的化合物,初步鉴定为没食子酸。据多项文献报道,多酚类物质存在于核桃仁、种皮、壳以及青皮中^[17-20],没食子酸是植物中常见的一种有机酸,由于其良好的抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等活性,已被广泛的应用于医疗、美容、工业等方面。目前已有关于其糖苷酶抑制活性的研究^[21-22],但还需进一步通过动物实验深入发掘其降血糖效果和降糖作用机制。另外,日本近畿大学的研究人员发现,鞣花酸作为一种多酚物质,能抑制与Ⅱ型糖尿病有关激素的分泌,以达到预防糖尿病的功效^[23]。这种多酚物质同时也存在于核桃中,这些多酚化合物的存在可能是核桃粕具有抗氧化和降血糖的原因之一,有望用于开发抗氧化和预防糖尿病的保健功能性食品。

从“三农”角度来看,合理利用核桃废弃物,不仅可以提高核桃的种植效益和加工效益,而且积极响了国家“十二五”规划中强调的“加快社会主义新农村建设”和“绿色发展,建设资源节约型、环境友好型社会”的要求。同时为开发植物类健康产品提供了新的可行途径。

参考文献 [References]

- 李国和. 核桃种质资源研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007 [Li GH. Studies on Germ Plasm Resources of Walnuts [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2007]
- 张华. 柑橘果实快速高效在线抗氧化活性评价方法的建立及其应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014 [Zhang H. An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of citrus fruits and their derived products [D]. Chongqing: Southwest University, 2014]
- 何开泽, 谭健, 付田. 一种 α -糖苷酶抑制剂及其提取方法和用途, 中国, 200610020815.1 [P], 2006
- Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Thul ST. Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, **42**: 195-201
- Garcia CP, Lamarque AL, Comba A, Berra MA, Silva RA, Labuckas DO, Das UN, Eynard AR, Pasqualini ME. Synergistic anti-tumor effects of melatonin and PUFAs from walnuts in a murine mammary adenocarcinoma model [J]. *Nutrition*, 2015, **31** (4): 570-577
- Zibaenezhad M, Shamsnia S, Khorasani M. Walnut consumption in hyperlipidemic patients [J]. *Angiology*, 2005, **56** (5): 581-583
- Vadivel V, Kunyanga CN, Biesalski HK. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control [J]. *Nutrition*, 2012, **28** (11-12): 1089-1097
- 张卫星, 何开泽, 蒲蕾. 核桃青皮提取物的抗菌和抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (1): 87-92 [Zhang WX, He KZ, Pu Q. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts from walnut green husks [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (1): 87-92]
- 孙墨珑. 核桃楸的杀虫活性及活性成分研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007 [Sun ML. Insecticidal activities and active components on *Juglans mandshurica* Maxim [D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2007]
- Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentão P, Andrade PB, González-Álvarez J, Pereira JA. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, **42**: 126-132
- 颜芳. 农林废弃物山核桃蒲壳资源化利用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013 (14): 6329-6330 [Yan F. Research on utilization of *Carya sheel* as a agriculture and forestry waste [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013 (14): 6329-6330]
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICFR, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45** (11): 2287-2295
- Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, Ganai BA, Bhat KA, Anand R, Qurishi MA. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents [J]. *Phytomedicine*, 2012, **19** (13): 1185-1190
- Hosseini S, Jamshidi L, Mehrzadi S, Mohammad K, Najmizadeh AR, Alimoradi H, Huseini HF. Effects of *Juglans regia* L. leaf extract on hyperglycemia and lipid profiles in type two diabetic patients: A randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **152** (3): 451-456
- Gu M, Chen HP, Zhao MM, Wang X, Yang B, Ren JY, Su GW. Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, **60** (1): 213-220
- 李艳伏, 徐怀德, 陈金海, 李银平, 李海鹏. 木瓜蛋白酶酶解核桃粕蛋白产物抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2008, **8** (5): 8-14 [Li YF, Xu HD, Chen JH, Li YP, Li HP. Study on antioxidant activity of papain after enzymolysis walnut dregs [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2008, **8** (5): 8-14]
- Regueiro J, Sánchez-González C, Vallverdú-Queralt A, Simal-Gándara J, Lamuela-Raventós R, Izquierdo-Pulido M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2014, **152**: 340-348
- 刘传水, 太志刚, 冯四全, 方云山, 蔡乐, 丁中涛. 核桃种皮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, **37** (10): 1417-1421 [Liu CS, Tai ZG, Fang SQ, Fang YS, Cai L, Ding ZS. Study on chemical component of walnut kernel pellicle [J]. *China J Chin Mat Med*, 2012, **37** (10): 1417-1421]
- 彭友伦, 李冬梅, 刘光明. 泡核桃壳的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, **44** (12): 1534-1538 [Peng YL, Li DM, Liu GM. Study on chemical component of walnut shell [J]. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2013, **44** (12): 1534-1538]
- 周媛媛, 王栋. 青龙衣化学成分的研究[J]. 中医药信息, 2010, **27** (2): 18-20 [Zhou YY, Wang D. Studies on the chemical constituents from the pericarps of *Juglans regia* Max [J]. *Inform Trad Chin Med*, 2010, **27** (2): 18-20]
- 陆秋, 陈朝银, 赵声兰. 核桃相关多酚对 α -淀粉酶的作用研究进展[J]. 食品科学, 2014, **35** (19): 328-332 [Lu Q, Chen CY, Zhao SL. Progress in understanding of the interaction between walnut polyphenols and alpha-amylase [J]. *Food Sci*, 2014, **35** (19): 328-332]
- 张海凤, 董亚琳, 张琰. 没食子酸对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其降糖机制研究[J]. 中国药业, 2011, **20** (21): 8-10 [Zhang HF, Dong YL, Zhang Y. The research of gallic acid's α -glycosidase inhibition and the hypoglycemic mechanism [J]. *China Pharm*, 2011, **20** (21): 8-10]
- Makino-Wakagi Y, Yoshimura Y, Uzawa Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **417** (2): 880-885