

核桃果实多酚活性 及其分离纯化研究进展

郑晓宁^{1,2}, 李俊³, 牟建楼², 陈永浩^{1,*}, 郝艳宾^{1,*}, 齐建勋¹, 董宁光¹, 张赞齐¹

(1.北京市林业果树科学研究所, 北京 100093;

2.河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001;

3.北京市园林科学研究所绿化植物育种北京市重点实验室, 北京 100102)

摘要:核桃多酚类化合物主要为酚酸和单宁类,以及少量的黄酮类,是核桃果实重要的化学组成成分。在生产中,核桃多酚往往随加工副产物被废弃,造成资源浪费。核桃多酚具有多种生物活性,且果实不同部位多酚的种类和含量差别较大。本文从核桃果实多酚的种类、含量、生物活性及分离纯化等方面进行概述,以为核桃多酚的产业化制备提供理论依据。

关键词:核桃多酚,生物活性,分离纯化,多酚组成

Research Progress on Polyphenol Activity and Separation and Purification of Walnut Fruit

ZHENG Xiao-ning^{1,2}, LI Jun³, MU Jian-lou², CHEN Yong-hao^{1,*},
HAO Yan-bin^{1,*}, QI Jian-xun¹, DONG Ning-guang¹, ZHANG Yun-qi¹

(1.Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences, Beijing 100093, China;

2.College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

3.Beijing Institute of Landscape Architecture, Beijing Key Laboratory of Greening Plants Breeding, Beijing 100102, China)

Abstract: Walnut (*Juglans regia* L.) polyphenols mainly include phenolic acids and tannins, as well as small amounts of flavonoids, which are important chemical components of walnut fruit. Polyphenols are discarded along with processing by-products in walnut production, resulting in resource waste. The phenols of walnut exhibit many bioactivities and varieties and their contents in different parts of the walnut fruit have large differences. The types, contents, biological activities, separation and purification of phenolic compounds in walnut fruits are summarized in this paper, which provides a theoretical basis for industrialization of phenols.

Key words: walnut polyphenols; bioactive properties; separation and purification; polyphenol composition

中图分类号: TS255.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)21-0351-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019120310

引文格式:郑晓宁,李俊,牟建楼,等.核桃果实多酚活性及其分离纯化研究进展[J].食品工业科技,2020,41(21): 351-358.

ZHENG Xiao-ning, LI Jun, MU Jian-lou, et al. Research Progress on Polyphenol Activity and Separation and Purification of Walnut Fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(21): 351-358. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

核桃 (*Juglans regia* L.) 又名胡桃、羌桃, 系胡桃科属植物, 是我国重要的经济林树种之一^[1]。核桃果实由外层青果皮、内层硬果壳、分心木、核桃仁以及核桃内种皮 5 部分组成。核桃果实各部分含有大量多酚类物质, 有抗氧化、神经保护、降脂、降糖、抗肿

瘤及抑菌等多种生物活性^[2], 具有很高的潜在应用价值。但由于核桃采后处理和深加工需要以及分离纯化技术的限制, 核桃多酚往往在处理过程中被废弃, 因此, 核桃多酚产品目前尚不多见^[3-5]。本文从核桃果实各部分的多酚组成、生物活性以及分离纯化等

收稿日期: 2020-12-30

作者简介: 郑晓宁 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 1519749201@qq.com。

* 通信作者: 陈永浩 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 核桃深加工研究, E-mail: cyh2010@126.com。

郝艳宾 (1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 核桃种质资源、选育和深加工研究, E-mail: jinhetaojht@263.net。

基金项目: 北京市农林科学院青年基金项目 (QNJJ201821); 北京市农林科学院创新能力建设项目 (KJCX20200201)。

表 1 多酚类化合物分类及主要结构特征
Table 1 Classification and main structural characteristics of polyphenols

类别	代表化合物	结构式	备注	类别	代表化合物	结构式
黄酮类				非黄酮类		
黄酮	黄芩素		R ₁ 、R ₂ 、R ₆ :H R ₃ 、R ₄ 、R ₅ :OH	酚酸	没食子酸	
黄酮醇	槲皮素		R ₁ 、R ₂ 、R ₄ 、R ₅ :OH R ₃ :H		咖啡酸	
黄烷酮				二苯乙烯	白藜芦醇	
黄烷醇	儿茶素			香豆素		
花色素	飞燕草素		R ₁ 、R ₂ 、R ₃ 、 R ₄ 、R ₅ :OH	单宁酸	水解单宁:鞣花酸单宁水解后产生鞣花酸, 槲单宁水解后产生没食子酸; 缩合单宁:黄烷醇衍生物	

方面进行综述,以期核桃多酚的综合利用和产业化制备提供理论依据。

1 核桃果实多酚的含量和种类分布

1.1 核桃果实多酚含量分布

核桃果实不同部位的多酚含量差别较大,多酚结果表示为毫克没食子酸当量/每克提取物(mg GAE/g)。有研究显示,核桃内种皮(490 mg/g) > 核桃壳(68.34~200 mg/g) > 核桃青皮(50.18~166.44 mg/g)^[6]。另一项研究显示核桃分心木和核桃内种皮多酚含量明显高于其他部位,结果表示为毫克没食子酸当量/每克样品(mg/g),核桃分心木(53.89 mg/g) > 核桃内种皮(14.82 mg/g) > 核桃青皮(4.05 mg/g) > 核桃壳(0.84 mg/g)^[7],两者研究中多酚含量存在明显差异,可能主要与核桃的品种有关。

1.2 核桃果实多酚种类分布

依据化学结构,多酚包括黄酮类化合物和非黄酮类化合物两大类,如表 1 所示^[8-10]。核桃多酚中分离出 20 种多酚化合物,核桃中的酚类物质包括黄酮类和非黄酮类化合物,黄酮类主要为黄酮醇和黄烷醇,非黄酮类化合物主要包括水解单宁和酚酸。

1.2.1 核桃果实不同部位的单体酚种类 核桃青皮中酚类主要是黄酮类化合物和胡桃醌^[11-13]。胡桃醌

是萘醌类成分,结构式如图 1 所示。核桃壳约占核桃总重的 67%,核桃壳中组分主要为黄酮类成分,为芦丁、槲皮苷、异槲皮苷^[14]。核桃内种皮多酚以酚酸类为主,分别为没食子酸、焦性没食子酸、对羧基苯甲酸、咖啡酸和对羟基肉桂酸等。但核桃内种皮游离酚酸所占比例不超过种皮质量的 3%,这和总酚含量占种皮质量 30% 差别很大,表明酚酸大多以结合态存在,需要通过特殊处理将酚酸基团游离出来再进行测定^[15]。核桃分心木中多酚含量丰富,Liu 等^[16]在分心木中鉴定出 200 多种化合物,包括可水解单宁、酚酸和黄酮类,对 21 种多酚定量分析,主要为鞣花酸、没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、槲皮苷、紫杉叶素、槲皮素等,其中鞣花酸含量最高。核桃仁中的多酚主要是酚酸类及少量黄酮类物质,其中鞣花酸含量较为丰富^[17]。

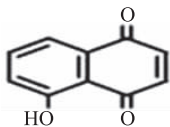


图 1 胡桃醌的结构
Fig.1 Structure of juglone

1.2.2 核桃不同部位的单体酚含量 核桃果实不同部位的单体酚不仅在种类上有差异,其含量也有较

表2 核桃果实各部分单体酚含量(mg/100 g)
Table 2 Content of monophenols in different parts of walnut fruit(mg/100 g)

项目	核桃青皮	核桃硬壳	核桃分心木	核桃内种皮	核桃仁
没食子酸	41.6 ^[18]	6.6 ^[18]	8.987~21.909 ^[16]	15.12~27.97 ^[19] , 0.406~39.573 ^[20] , 146.2 ^[18]	11.58~21.92 ^[21]
绿原酸	7.1 ^[18]	1.1 ^[18]	—	12.8~38.48 ^[19] 0.102~46.409 ^[20] , 17.6 ^[18]	2.42~7.82 ^[21]
阿魏酸	21.1 ^[18]	3.1 ^[18]	—	2.62~6.27 ^[19] , 6.1 ^[18]	0.485 ^[22]
原儿茶酸	—	1.873 ^[14]	4.428~15.404 ^[16]	—	—
丁香酸	0.43~0.58 ^[19]	/	1.144~2.676 ^[16]	132.69~444.91 ^[19]	15.19~44.59 ^[21]
咖啡酸	1.6 ^[18] , 0.48~0.67 ^[19]	0.550 ^[14]	—	4.75~6.83 ^[19] , 7.9 ^[18]	0.37~2.93 ^[19]
鞣花酸	/	—	51.837~173.364 ^[16]	/	21.73~70.47 ^[21]
儿茶素	3.34~6.46 ^[19]	/	25.119~69.332 ^[16]	6.9~17.53 ^[19]	10.92~20.02 ^[21]
芦丁	44.3 ^[18]	14.850 ^[14]	—	870.59~1292.91 ^[19] , 187.6 ^[18]	0.418 ^[22]
槲皮素	4.8 ^[18]	/	0.476~1.690 ^[16]	1.013 ^[20] , 8.0 ^[18]	0.58~1.94 ^[19]
异槲皮苷	—	15.409 ^[14]	2.089~11.668 ^[16]	—	—
槲皮苷	—	19.326 ^[14]	14.542~93.858 ^[16]	—	—
胡桃醌	291.70~345.54 ^[19]	—	—	1.42 ^[19]	—

注:/表示不含有,—表示未见报道。

大差别。核桃果实各部位分布的常见单体酚及其含量如表2所示。由表2可见,没食子酸普遍存在于核桃果实的各个部位,绿原酸、阿魏酸、咖啡酸和芦丁等也是核桃果实各部位分布较多的单体酚类。其中,核桃青皮中胡桃醌的含量最高,含量达291.70~345.54 mg/100 g,其次为芦丁、没食子酸和阿魏酸等。核桃硬壳中槲皮苷含量最高,其次为异槲皮苷、芦丁和没食子酸,但含量差异不大,在6~20 mg/100 g之间。核桃分心木中鞣花酸含量最高,但因测试品种不同,与槲皮苷、儿茶素、等单体酚一样,含量变化范围较大。核桃内种皮中芦丁含量最高,最高可达1292.91 mg/100 g,其次为丁香酸、没食子酸和绿原酸。核桃仁中鞣花酸含量最高,最高可达70.47 mg/100 g,其次为丁香酸、没食子酸和儿茶素。从单体酚总量来看,核桃内种皮的单体酚总含量最高。

2 核桃果实多酚的生物活性

多酚作为一种重要的生物活性物质,在食品、制药等领域发挥着重要作用。核桃果实多酚具有抗氧化、抗癌、抑菌、增强记忆、提高免疫、减肥和抑制黑色素生成等活性,且其不同部位的多酚活性与多酚的含量密切相关。

2.1 抗氧化活性

2.1.1 体外抗氧化活性

2.1.1.1 化学方法评价 植物中总酚含量与抗氧化活性具有正相关性^[23],核桃果实多酚抗氧化活性主要表现为清除体内自由基^[24]。周晔^[15]利用 DPPH、ABTS、铁还原法研究核桃种皮多酚含量与活性之间的相关性,结果显示抗氧化活性与总酚含量之间呈正相关,相关系数分别为0.9092、0.9184、0.8973。刘丽金^[25]对核桃果实不同部位总酚酸进行含量测定及

体内外抗氧化活性研究,得出多酚含量由多到少顺序为核桃内种皮>核桃分心木>核桃青皮>核桃硬壳,核桃内种皮多酚含量最高,其抗氧化效果也优于其他部分。此外,核桃果实多酚的抗氧化作用可以延长油脂的贮藏期,如山核桃果皮醇提物能够有效延缓花生油和菜籽油过氧化值和酸价的上升,从而延长油脂货架期^[26]。

2.1.1.2 细胞学方法评价 核桃果实多酚较多采用化学分析法来分析抗氧化性,细胞水平和动物实验中的相关研究较少。细胞分析法可以观察抗氧化物质在细胞内的吸收和代谢情况,具有生物相关性。较大浓度的粗提物在小脑颗粒神经元(CGNs)中显示出细胞毒活性,核桃仁提取物和核桃壳提取物的半有效细胞毒性浓度(EC₅₀)分别为4.6和1.8 mg/mL,壳提取物具有更大的细胞毒性作用。将CGNs与H₂O₂(0.35 μmol/L)孵育,会导致细胞活力降低60%;随着核桃仁提取物浓度增加(0.01~0.2 mg/mL),CGNs细胞生存率增加,核桃仁提取物浓度为0.2 mg/mL时可将CGNs细胞活力维持在93%±4%,表明核桃仁提取物(0.2 mg/mL)可以保护H₂O₂诱导的细胞死亡^[27]。

2.1.2 体内抗氧化活性 生物体内大分子的氧化反应是一个错综复杂的过程,由于体内外环境存在较大差异,食物及药物进入到机体内需经过一系列复杂过程和反应才能最终发挥作用。因此,进行体内抗氧化是必要的实验,体内抗氧化活性研究主要采用小鼠实验,张泽生等^[28]研究表明,核桃内种皮多酚提取物可减轻D-半乳糖诱导的小鼠氧化损伤,提高小鼠血清、肝脏、脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,表现出良好的体内抗氧化活性。

2.2 抗癌活性

植物多酚的抗癌活性主要表现在抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡及细胞因子的产生。植物多酚的抗癌活性与单体酚存在相关性,例如鞣花酸已被体外、体内实验证明具有对结肠直肠癌、肝癌、肺癌等的抗增殖作用^[29]。核桃提取物中的抗癌活性与胡桃醌、鞣皮苷有关。核桃青皮提取物中的胡桃醌对人早幼粒细胞白血病(HL-60)细胞可产生抗增殖作用,这与诱导细胞凋亡的早期阶段有关,当纯胡桃醌和核桃青皮提取物浓度为1 $\mu\text{mol/L}$, HL-60 细胞生长受到抑制,对健康的成纤维细胞无毒性;而在较高浓度10 $\mu\text{mol/L}$ 下, HL-60 细胞和健康细胞的存活率下降,说明高浓度的提取物对细胞具有毒性,但胡桃醌对 HL-60 细胞凋亡的机理尚不清楚^[30]。核桃分心木的乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物对癌细胞的抑制作用最强,且凋亡率较高,表明体外抗肿瘤活性的机制可能是通过对细胞的抗增殖活性诱导细胞凋亡实现的,此外,在核桃分心木的正丁醇部位分离出鞣皮苷,该成分具有抗肿瘤活性,鞣皮苷可通过抗癌细胞的抗增殖达到抗肿瘤效果^[31-32]。

2.3 抑菌活性

核桃多酚对细菌和真菌抑制能力不同,可能与核桃品种和提取所用溶剂有关。核桃多酚的抑菌活性为其在食品保鲜中的应用提供了理论依据。

2.3.1 对细菌的抑制作用 多酚的抑菌能力与黄酮化合物有关,黄酮分子中 $\text{C}_4=\text{O}$ 和 C_5-OH 、 C_7-OH 是抗菌活性的首要基团, C_3-OH 基团也具有一定抗菌活性^[33]。核桃青皮提取物对革兰氏阳性菌抑菌效果更好, Oliveira 等^[34]对葡萄牙种植的核桃青皮水提取物多酚的抗菌活性进行研究,表明金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为0.1 mg/mL ,抑菌能力为金黄色葡萄球菌>蜡样芽孢杆菌>枯草芽孢杆菌,而在浓度100 mg/mL 时,对大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌等革兰氏阴性菌和白色念珠菌、新生隐球菌等真菌均无抑制活性。唐春雨等^[35]将核桃青皮乙醇提取物和胡桃醌(0.3 mg/mL)进行微生物生长抑制测定,两者对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈和铜绿假单胞菌均有抑制作用,且核桃青皮提取物的抑制效果优于胡桃醌。

2.3.2 对真菌抑制作用 核桃多酚的抗菌活性主要来源于胡桃醌^[36]。核桃青皮提取物表现一定的抗真菌能力,如王刚霞^[37]研究了核桃青皮中胡桃醌的提取,将提取物制成不同浓度的溶液,随着浓度增加,对真菌的抑制作用增强,抑菌效果与胡桃醌含量呈正相关,当核桃青皮提取物浓度为20 mg/mL 时,匍枝根霉、青霉菌、灰葡萄孢、镰刀菌、交链孢属菌丝生长抑制率可分别达到88.14%、92.07%、90.61%、91.99%和91.71%,本文未对标准品胡桃醌对5种真菌的抑制率进行测定,且抗菌性可能为核桃青皮提取物其他成分的协同作用。许紫峻等^[38]研究核桃青皮提取物对霉菌的作用,结果显示70%乙醇提取物抑菌效果最强,将此提取物配成1%提取液时,抑菌圈直径可达(23.6 $\pm$ 0.3) mm ;当核桃青皮提取物浓度为1%~10%时,抑菌率可达29%~62.4%。

2.4 增强记忆

核桃仁富含不饱和脂肪酸、蛋白质、多酚和矿物质,因此被认为是一种营养丰富的“健脑食品”^[39]。核桃仁种皮多酚可能在核桃仁增强记忆和认知功能方面发挥重要作用。史丹丹^[40]研究了核桃仁种皮多酚对高胆固醇血症小鼠记忆功能的影响,发现与高脂膳食组相比,多酚组的小鼠在迷宫实验中表现出更好的记忆能力,且小鼠的血清内脂质水平降低、大脑中氧化应激反应减少,这可能是因为核桃内种皮多酚通过调节机体内的抗氧化水平来改善小鼠的记忆能力。

2.5 提高免疫

植物多酚可以增强免疫力。Liu 等^[41]研究了核桃多酚提取物(WPE)对体外杀螟硫磷(FNT)诱导的脾淋巴细胞免疫毒性的影响,表明 WPE 通过抑制氧化应激来保护脾淋巴细胞免受 FNT 诱导的免疫毒性并改善免疫功能。核桃仁提取物可缓解4-戊基苯酚(PP)和3-甲基-4-硝基苯配(PNMC)诱导的脾淋巴细胞的免疫毒性,其机制是通过抑制脂质过氧化反应,减少 ROS(活性氧)的产生,提高抗氧化酶的活性,恢复细胞内的抗氧化水平,减弱 PP 和 PNMC 引起的脾淋巴细胞的氧化损伤^[42]。核桃内种皮多酚可提高小鼠机体的免疫活性,表现为增加脏器指数、增强淋巴细胞的增殖率、维持免疫抑制小鼠的血液平衡、增加免疫抑制小鼠的免疫球蛋白含量、增强乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)的活力^[43]。

2.6 减肥

核桃青皮和内种皮中的多酚具有一定的减肥作用。胰脂肪酶是一个重要的脂肪酶,可将50%~70%的食物脂肪水解为甘油二酯、单甘油酯、甘油和脂肪酸被人体吸收^[44],因此抑制胰脂肪酶活性是预防肥胖的有效途径之一。史丹丹^[40]对肥胖小鼠灌胃核桃内种皮多酚,发现核桃内种皮多酚可以使小鼠体重、肝脏指数、脂质水平降低,且随着多酚浓度(50~350) $\mu\text{g/mL}$ 的增加,胰脂肪酶活性抑制率增加,当多酚浓度为300 $\mu\text{g/mL}$ 时,胰脂肪酶活性抑制率达到75.36%,为核桃多酚治疗肥胖提供参考。肥胖与肠道菌群密切相关^[45],研究发现高脂膳食组增加了厚壁菌门相对丰度,减少了拟杆菌门相对丰度,而核桃青皮提取物组却相反。另外,高脂膳食组改变了肠道菌群结构,降低了细菌多样性,而青皮提取物组可通过调节肠道菌群来降低小鼠的体重增加和脂肪堆积^[46]。

2.7 抑制黑色素生成

在黑色素细胞内,酪氨酸在酪氨酸酶作用下逐渐被氧化为多巴和多巴醌,经重排与一系列代谢过程聚合为5,6-二羟基吲哚、吲哚醌,最终形成黑色素。多酚可作为酪氨酸酶的底物类似物,可与游离酶结合,抑制黑色素生成。B16黑色素瘤细胞是一种筛选黑色素合成的肿瘤细胞,结构与人体黑色素的结构相似^[47]。朱亚新^[48]以没食子酸为标准品,制备的核桃内种皮多酚为43.2%,对酪氨酸酶的半抑制浓度(IC_{50})为3.74 mg/mL ,核桃内种皮提取物浓度为

20 mg/mL,基本完全抑制酪氨酸酶的活性,这可能与多酚的纯度有关^[49-50]。此外,以 B16 黑色素瘤细胞为受试细胞,研究核桃提取物对黑色素形成的影响,结果表明核桃青皮、核桃壳与核桃种皮多酚提取物对黑色素合成均有一定抑制效果,其中核桃种皮提取物对黑色素合成的抑制效果最强,这主要通过抑制酪氨酸酶活性降低黑色素的合成量。

3 核桃果实多酚的分离与纯化

核桃多酚的提取主要是有机溶剂提取法,可结合超声辅助提取或微波辅助提取,纯化多采用大孔吸附树脂法。

3.1 核桃果实多酚的提取分离

3.1.1 前处理方式对核桃果实多酚提取率的影响 核桃青皮、壳、分心木等原料的获取方式一般不会对多酚的分离提取带来影响,但核桃内种皮由于加工、收集方式的不同,对多酚的分离提取影响较大。湿法去种皮包括水浸洗法、盐液浸渍法、碱液浸泡等方法,多酚损失较为明显。如赵聪^[51]将盐液浸渍法和碱液法获得的种皮进行多酚提取,总多酚得率分别仅为 1.532% 和 0.426%。另外,周晔^[15]比较了水泡法和液氮法获得的核桃内种皮,两者多酚得率分别为 17% 和 28%。烘烤法去除核桃内种皮,容易造成多酚结构破坏,康玮丽等^[52]采用热风烘烤-微波联用,核桃仁脱皮率达到 98.01%,未对多酚含量进行测定,但是 130 ℃ 的烘烤温度容易使得多酚损失^[53]。冻融法需要较长时间冻结,融化时部分难去除的种皮仍需反复冻结。鲁墨森等^[54]采用低温冷冻,升温融化的方法去除核桃内种皮,当冰柜温度为 -10 ℃,冰衣形成需要 12 h,此种方法的工艺参数及对种皮多酚的影响还需探讨。结合核桃加工技术,在高效获取核桃内种皮的同时减少多酚的损失和破坏,成为亟待解决的问题。

3.1.2 核桃果实多酚提取方法

3.1.2.1 传统溶剂提取法 溶剂浸提法一般以一定浓度的乙醇为提取剂,采用水浴或索氏抽提对多酚进行提取,影响因素一般是温度、时间、料液比、溶剂浓度等。该方法提取核桃果实多酚可操作性强,但提取率偏低。张春梅等^[55]提取核桃内种皮多酚,在乙醇体积分数 45%、液固比 60:1 (mL:g)、提取温度 70 ℃、提取时间 60 min,多酚得率为 25.05%。赵国建等^[56]对核桃青皮多酚提取进行研究,发现添加 EDTA 有助于多酚的溶解,在液料比 17:1,EDTA 添加量 0.3%,在 45 ℃ 水浴条件下提取 90 min,核桃青

皮多酚提取率最高,以没食子酸为标准品,多酚含量达到 26.09 mg/g。

3.1.2.2 超声辅助溶剂浸提法 相对于常规的溶剂浸提法,超声辅助提取是在有机溶剂提取的基础上增加了超声波处理,以提高多酚得率。张旭等^[57]采用超声辅助法提取核桃青皮渣中的多酚,多酚得率为 5.52%。周晔^[15]优化出核桃内种皮中酚类物质的超声波辅助提取(固定功率 100 W)的最佳工艺条件:提取温度 53 ℃,提取时间 55 min,液固比 58:1 (mL:g),所得多酚提取率为 30.79%。采用超声辅助对核桃分心木多酚提取,1 g 分心木中可得到多酚物质为 56.46 mg GAE(没食子酸当量)^[58]。超声的振化和空化作用可以使细胞破裂,进而加速溶剂进入细胞,使多酚在溶剂中的溶解度增加,有效成份的纯度得以提高。

3.1.2.3 微波辅助溶剂浸提法 同溶剂浸提法相比,微波辅助提取是在有机溶剂提取的基础上增加了微波处理以提高多酚得率。微波穿透力强、能耗低、设备简单,但微波提取时原料温度内外不均匀,易造成多酚损失。高磊^[59]采用微波辅助提取核桃青皮中多酚,确定最佳工艺为:微波功率 200 W,料液比 1:20,乙醇体积分数 65%,微波时间 70 min,提取温度 60 ℃,多酚提取量为 6.32 mg/g。此方法低于超声辅助提取法和 EDTA 助剂提取法,但比溶剂浸提法获得的多酚含量高,表明微波法虽然提高了多酚得率,但也造成了部分多酚的损失。螯合剂的添加会使得多酚得率提高,如张春暖^[60]运用螯合剂与微波双辅助法提取核桃青皮中多酚,通过螯合剂螯合提取液中与多酚结合的金属离子,从而使多酚溶解在提取液中来增加多酚提取率,在微波功率 830 W,时间 7.4 min,六偏磷酸钠 0.22% 时,提取率为 4.12%,相比只采用微波法提取率有所提高。

3.1.2.4 酶法复合超声辅助法 酶法复合超声辅助法可使多酚得率明显提高,但酶的成本和反应条件限制了该法的广泛使用,因此仍处在实验室阶段。伏慧慧等^[61]采用酶法-超声辅助连续工艺提取核桃青皮中的多酚,先进行酶解处理,然后采用超声辅助提取,多酚提取率可达 61.36%。

3.1.2.5 亚临界提取法 亚临界水提取更适用于核桃壳中有效成分的提取。张晓倩^[62]对核桃壳中多酚的提取开展了研究,亚临界水提取物中多酚得率在 120、140、160 ℃ 时低于有机溶剂法,但在 180、200、220 ℃ 时多酚得率高于有机溶剂提取物,220 ℃ 总酚得率最高,为 0.14 mg/g,有机溶剂法总酚得率为

表 3 核桃多酚提取方法对比

Table 3 Comparison of extraction methods of walnut polyphenols

提取方法	多酚得率	优缺点	核桃果实部位
溶剂浸提法	低	操作性强;时间长	核桃内种皮、青皮
超声辅助法	高	时间短,效率高;存在超声空白区	核桃内种皮、青皮、分心木
微波辅助法	较低	时间短,能耗低;原料局部温度升高	青皮
酶复合-超声	较高	提取率高;时间长	青皮
亚临界提取	低	时间较短,无毒,安全;温度高,对不耐热的生物活性成分具有一定破坏作用	核桃壳

0.09 mg/g。此外,亚临界提取物中的总糖、蛋白质和干物质得率在每个温度下均高于有机溶剂法。

3.2 核桃果实多酚的纯化

3.2.1 大孔树脂纯化 大孔树脂具有选择性吸附、吸附容量大、吸附速度快、解吸附率高及分离效果好等优点,适合用于工业化生产,也是近年来使用较为广泛的纯化方法,在苹果多酚、猕猴桃皮渣多酚、草莓多酚的纯化中均有应用^[63-65]。

核桃内种皮和核桃青皮中多酚的纯化应用了树脂吸附。影响大孔树脂吸附和洗脱的因素主要有树脂的特性、被分离化合物的特性、上样条件、洗脱条件。不同植物多酚在进行纯化时选择的树脂种类不同,在核桃多酚的纯化中采用 X-5、AB-8 树脂较多。张春梅等^[66]通过静态吸附-洗脱试验筛选 X-5 型树脂,研究了上样液质量浓度、上样量、吸附流速、洗脱液浓度和用量对核桃内种皮多酚纯度的影响,多酚纯度从 64.52% 提高至 79.64%,纯度仅提高了 15%,表明 X-5 适用于多酚的初步纯化。Zhu 等^[67]对去除核桃内种皮的废水中黄酮类物质富集纯化,选用 AB-8 树脂进行试验,对动态吸附试验进行优化,发现黄酮类化合物的回收率和纯度分别为 81.73% 和 61.35%,表明 AB-8 树脂具有很好的从核仁膜废水中富集黄酮类化合物的能力。张旭等^[68]对核桃青皮中多酚的纯化工艺进行优化,选取 AB-8 型树脂,从动态吸附-解吸角度考察多酚质量浓度、体积流速、洗脱液体积分数等对多酚纯化工艺的影响,多酚纯度由 9.26% 提高到 52.59%。

3.2.2 高效液相色谱纯化 高效液相色谱法制备的多酚纯度高,有人采用高速逆流色谱法与制备型高效液相色谱联用,从猕猴桃中分离出纯度 90% 以上的多酚单体^[69]。此纯化方法可以得到高纯度的多酚,但成本高,不适合工业化生产,主要用于多酚的定性、定量分析,在核桃分心木、内种皮、核桃仁中也有应用。Wang 等^[70]采用高速逆流色谱法与高效液相色谱法从核桃分心木中分离出 14 种化合物,为没食子酸、原儿茶酸、香草酸和二氢槲皮素等 7 种酚类化合物,其中去氢催吐罗芙木醇、(6R,9R)-9-hydroxymegastigman-4-en-3-one、(6R,9S)-9-hydroxymegastigman-4-en-3-one 是首次从胡桃属中分离的,blumenol B、槲皮苷、(4S)-4-羟基-1 四氢萘酮是首次从核桃分心木中分离得到。核桃仁中也分离出 20 种化合物,其中为鞣花单宁、没食子酸和儿茶素等 13 种多酚化合物^[71]。王克建等^[72]对红色核桃内种皮中提取物进行了分析,其中含有鞣花酸、鞣花酰基葡萄糖、没食子酰基-鞣花酰基葡萄糖、二鞣花酰基葡萄糖、二没食子酰基-鞣花酰基葡萄糖和鞣花酰基-橡碗酰基葡萄糖等鞣花单宁。Yang 等^[73]采用柱层析与高效液相色谱法在核桃青皮中分离出 5 种未知二芳基庚烷化合物的成分和 12 种已知的二芳基庚烷,采用核磁共振和 HR-ESI-MS 对 5 种未知成份结构进行鉴定。

4 核桃果实多酚研究存在的问题与展望

核桃果实中存在大量具有良好生物活性的多酚

类物质,但在核桃加工过程中,核桃青皮、核桃分心木、核桃内种皮等成为废弃物,多酚也随之损失。尽管核桃果实多酚的生物活性高,原料来源成本低,但核桃多酚产品尚不多见。这主要与核桃加工方式不利于核桃多酚的保留和分离、核桃多酚分离纯化方法不够成熟等因素有关。近年来,我国核桃产量迅速增加,为核桃果实多酚的制备和产品开发提供了充足的原料来源和市场条件。因此,将核桃果实多酚应用在保健食品、日化产品及药品中开发具有高功能活性的核桃果实多酚产品,具有一定的市场前景。

核桃果实多酚的研究热点将主要集中在:生物活性研究方面。进一步探讨单体酚和多酚混合物生物活性差异,通过体外试验、动物细胞试验和临床试验明确来自核桃果实不同部位多酚的生物活性,为开发相应的功能产品提供理论基础,分离纯化技术方面,一方面,通过结合核桃加工方式的改进,从核桃果实多酚原料收集入手,通过探索常温、干法加工技术,避免核桃果实多酚在原料来源阶段受到损失和结构破坏,另一方面,通过分离、纯化新技术的引进,探索提高核桃果实多酚得率和纯度,绿色、安全,适宜产业化生产的新技术、新工艺,将成为重要的研究方向。

参考文献

- [1] 徐金良. 良种核桃丰产栽培技术[J]. 农业与技术, 2019, 39(10): 66-67.
- [2] Valavanidis A, Vlachogianni T. Chapter 8—plant polyphenols: Recent advances in epidemiological research and other studies on cancer prevention[J]. Studies in Natural Products Chemistry, 2013, 39(18): 269-295.
- [3] 杨园. 国内核桃综合深加工开发现状与前景[J]. 现代园艺, 2020, 43(1): 211-212.
- [4] 王磊元, 秦翠兰, 赵群喜. 新疆生物质资源——核桃青皮的综合利用研究现状[J]. 种子科技, 2019, 37(3): 117-119.
- [5] 杨新, 陈莉, 卢红梅, 等. 茶多酚提取与纯化方法及其功能活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 322-328, 332.
- [6] Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Tabibiazar M, et al. A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2133.
- [7] 徐蓓蓓. 核桃副产物多酚的提取及其对油脂氧化稳定性的影响[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2017.
- [8] 黄雨洋. 红松多酚分离鉴定及抗氧化抗癌功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [9] Papuc C, Goran G V, Predescu C N, et al. Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(6): 1243-1268.
- [10] 吕丹丹. 核桃多酚与蛋白质的作用方式及脱多酚对核桃蛋白功能性的影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
- [11] 杨光, 包晓玮, 陈勇, 等. 6 种酚类化合物及胡桃醌的体外

- 抑菌活性[J].动物营养学报,2018,30(9):3710-3719.
- [12] Ahmad T, Shah A J, Roberts R. Mechanisms mediating the vasodilatory effects of juglone in porcine isolated coronary artery[J]. European Journal of Pharmacol, 2020, 866: 172815.
- [13] 姚瑞祺. 植物多酚的分类及生物活性的研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2011(4): 99-100.
- [14] 何春梅, 陈冠林, 俞憬, 等. 核桃壳多酚的提取含量测定及其抗氧化活性研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(2): 153-158.
- [15] 周晔. 核桃内种皮多酚分析与抗氧化活性[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
- [16] Liu R, Zhao Z, Dai S, et al. Identification and quantification of bioactive compounds in *Diaphragma juglandis* fructus by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and UHPLC-MS/MS[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2019, 67(13): 3811-3825.
- [17] Abe L T, Lajolo F M, Genovese M I. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts[J]. Food Science and Technology, 2010, 30: 254-259.
- [18] 万政敏. 核桃青皮中多酚类物质及其抗氧化性的分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [19] 史斌斌. 铁核桃多酚类物质含量与抗氧化活性、代谢相关酶活性的关系[D]. 贵州: 贵州大学, 2017.
- [20] 耿树香, 宁德鲁, 李勇杰, 等. 云南省主栽核桃品种内种皮中多酚的检测分析[J]. 西部林业科学, 2016, 45(5): 124-127.
- [21] Figueroa F, Marhuenda J, Zafrilla P, et al. High-performance liquid chromatography-diode array detector determination and availability of phenolic compounds in 10 genotypes of walnuts[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(5): 1074-1084.
- [22] Danh C Vu, Phuc H Vo, Mark V Coggeshall, et al. Identification and characterization of phenolic compounds in black walnut kernels[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(17): 4503-4511.
- [23] Yang S, Guo K, Li J, et al. Framework formation of financial data classification standard in the era of the big data[J]. Procedia Computer Science, 2014, 30: 88-96.
- [24] 梁杏. 核桃饼粕多酚提取纯化及其抗氧化和降脂活性初步研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- [25] 刘丽金. 核桃酚酸类成分抗氧化活性的初步研究[D]. 大理: 大理大学, 2018.
- [26] 赵一丁. 山核桃内果皮酚类成分稳定性及抗油脂氧化研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.
- [27] de la Rosa L A, Vazquez-Flores A A, Alvarez-Parrilla E, et al. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 219-228.
- [28] 张泽生, 王霄然, 王田心, 等. 核桃内种皮提取物对小鼠脑损伤的改善作用[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(11): 190-194.
- [29] Ceci C, Lacal P M, Tentori L, et al. Experimental evidence of the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic activity of ellagic acid[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1756.
- [30] Soto-Maldonado C, Mauricio Vergara-Castro M, Jara-Quezada J et al. Polyphenolic extracts of walnut (*Juglans regia*) green husk containing juglone inhibit the growth of HL-60 cells and induce apoptosis[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2019, 39: 1-7.
- [31] 令狐晨. 新疆分心木体外抗肿瘤作用及其化学成分的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [32] 杨琳. 榭皮苷药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.
- [33] 谢鹏, 张敏红. 黄酮类化合物抑菌作用的研究进展[J]. 中国动物保健, 2004(12): 31-33.
- [34] Oliverira I, Sousa A, Ferreira I C F R, et al. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 2326-2331.
- [35] 唐春丽, 杨冰, 方自扬, 等. 核桃青皮提取物的抑菌和协同抑菌作用[J]. 中国药师, 2018, 21(4): 577-580.
- [36] Achatz M, Morris E K, Müller F, et al. Soil hypha-mediated movement of allelochemicals: Arbuscular mycorrhizae extend the bioactive zone of juglone[J]. Functional Ecology, 2014, 28(4): 1020-1029.
- [37] 王刚霞. 核桃青皮提取物果蔬保鲜剂的研究与应用[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2014.
- [38] 许紫峻, 汪溪远, 陈娇, 等. 核桃青皮乙醇提取物抑制霉菌作用机理初步探索[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(2): 290-296.
- [39] Liu M, Shengjie Y, Jinping Y, et al. Neuroprotective and memory-enhancing effects of antioxidant peptide from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. Natural Product Communications, 2019, 14(7): 1-13.
- [40] 史丹丹. 核桃仁种皮与核桃粕多酚生理功能的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2015.
- [41] Liu H, Wan Y, Wang Y, et al. Walnut polyphenol extract protects against fenitrothion-induced immunotoxicity in murine splenic lymphocytes[J]. Nutrients, 2018, 10(12): 1838.
- [42] 杨璐冰. 核桃多酚提取物对4-戊基苯酚和3-甲基4-硝基苯酚诱导的小鼠脾淋巴细胞免疫毒性的缓解作用[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [43] 闫国培, 刘会平, 孙娜新, 等. 核桃仁种皮多酚对免疫抑制小鼠的调节作用[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 24-29.
- [44] Han L K, Zheng Y N, Yoshikawa M, et al. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes[J]. BMC complementary and alternative medicine, 2005, 5(1): 1-10.
- [45] Chakraborti C K. New-found link between microbiota and obesity[J]. World Journal of Gastrointestinal Pathophysiol, 2015, 6(4): 110-119.
- [46] Wang X H, Chen D, Li Y L, et al. Alleviating effects of walnut green husk extract on disorders of lipid levels and gut bacteria flora in high fat diet-induced obesity rats[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 576-586.
- [47] 杜国英. 孜然提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用及对

B16 黑色素瘤细胞内黑色素生成的影响[D].兰州:兰州理工大学,2018.

[48]朱亚新.核桃多酚对酪氨酸酶活性和黑色素合成的影响及其化妆品的试制[D].昆明:昆明理工大学,2016.

[49]刘东茹,任亚梅,伯继芳,等.根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶活性的抑制作用[J].现代食品科技,2019,35(8):107-113.

[50]关天旺,杨航,刘嘉煜,等.龙眼核多酚提取物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J].食品研究与开发,2016,37(17):15-20.

[51]赵聪.核桃种皮多酚的提纯鉴定及抗氧化活性研究[D].天津:天津科技大学,2016.

[52]康玮丽,唐军虎,敬思群.核桃仁去皮方法优化[J].食品与发酵工业,2010,36(8):127-131.

[53]夏甜天.不同加工方式对燕麦多酚活性的影响及其营养粉的创制[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2018.

[54]鲁墨森,杨娟侠.核桃仁脱种皮技术-鲜食核桃保鲜加工系列技术(II)[J].落叶果树,2009,41(2):41-43.

[55]张春梅,陈朝银,赵声兰,等.核桃内种皮多酚提取工艺及其体外抗氧化活性的初步研究[J].中国酿造,2014,33(7):130-134.

[56]赵国建,席东亮,段江莲.核桃青皮多酚提取工艺优化[J].陕西农业科学,2013,59(3):3-5.

[57]张旭,曹丽娟,赵庆宇婧,等.核桃青皮渣中多酚的超声提取工艺研究[J].食品科技,2016,41(3):218-223.

[58]陈冠林,刘学文,韩门娣,等.分心木多酚提取工艺及其抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2017,38(5):67-71.

[59]高磊,李慧芸.微波辅助提取核桃青皮中多酚的工艺研究[J].农产品加工,2017(15):26-28.

[60]张春媛.螯合剂协同微波双辅助提取核桃青皮多酚[J].绿色科技,2017(12):252-256.

[61]伏慧慧,谭梅,郭艳秋,等.回应面法优化“酶法-超声波”连续提取核桃青皮多酚[J].食品研究与开发,2015,36(7):42-47.

[62]张晓倩.核桃壳亚临界水提取物化学成分与抗氧化性的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2015.

[63]刘旻昊,齐娜,邓红,等.新疆红肉苹果多酚的纯化、组成分析与抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(12):38-44,50.

[64]段丽华.猕猴桃皮渣多酚提取与分离鉴定[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.

[65]马艳弘,李芬芳,孙纪阳,等.大孔吸附树脂纯化草莓多酚及体外抗氧化活性研究[J].江西农业学报,2019,31(5):84-90.

[66]张春梅,陈朝银,赵声兰,等.大孔吸附树脂纯化核桃内种皮总多酚的工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(17):27-30.

[67]Zhu Y, Song H, Zhang X, et al. Recovery of flavonoids from walnuts de - pellicle wastewater with macroporous resins and evaluation of antioxidant activities *in vitro* [J]. Journal of Food Process Engineering, 2017, 40(1): e12775.

[68]张旭,陈丹,曹丽娟,等.5种大孔树脂纯化鲜核桃青皮多酚工艺的比较[J].中成药,2016,38(8):1852-1855.

[69]张云,刘芳,卜范文,等.猕猴桃果实中多酚类物质的分离鉴定及抗氧化活性研究[J].食品科学,2019,40(19):104-112.

[70]Wang D, Mu Y, Dong H J, et al. Chemical constituents of the ethyl acetate extract from *Diaphragma juglandis* fructus and their inhibitory activity on nitric oxide production *in vitro* [J]. Molecules, 2018, 23(1): 72.

[71]Grace M H, Warlick C W, Neff S A, et al. Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high - speed counter - current chromatography and LC - ESI - IT - TOF - MS [J]. Food Chemistry, 2014, 158: 229-238.

[72]王克建,郝艳宾,齐建勋,等.红色核桃仁种皮提取物紫外-可见光谱和质谱分析[J].光谱学与光谱分析,2009,29(6):1668-1671.

[73]Yang H, Ma Y, Gao C, et al. Five novel diarylheptanoids from green walnut husks (*Juglans regia* L.) [J]. Fitoterapia, 2019, 134: 221-225.