

几种云南核桃内种皮黄酮及多酚含量的测定^{*}

张春梅¹, 陈朝银², 林玉萍¹, 樊启猛¹, 张天财², 赵声兰^{1△}

(1. 云南中医学院, 云南昆明 650500; 2. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

摘要: **目的** 测定云南三种核桃内种皮的总黄酮及总多酚含量。**方法** 以核桃内种皮为原料, 芦丁为对照品, 用比色法测定核桃内种皮的总黄酮含量; 以没食子酸为对照品, 用 Folin-Ciocalteu 比色法测定核桃内种皮的多酚含量。**结果** 芦丁在 0~0.1mg/mL、没食子酸在 0~50μg/mL 范围内, 吸收值与浓度均呈良好的线性关系。云南麻果核桃、米甸核桃和草果核桃内种皮的黄酮类化合物含量分别为 15.48%、17.33%和 15.23%, 酚类化合物含量分别为 57.58%、31.25%和 24.01%。**结论** 测定的三种云南核桃内种皮含有丰富的黄酮类化合物和多酚类化合物, 且含量随品种的不同而不同, 其中麻果核桃内种皮的多酚含量高达 57.58%, 具有深入研究和开发利用价值。

关键词: 核桃内种皮; 黄酮类; 多酚类; 含量; 测定

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)02-0010-04

核桃又名胡桃、羌桃, 为胡桃科胡桃属(*Juglans* L.)植物, 与扁桃、腰果、榛子并列为世界著名的四大干果, 是优良的果木兼用树种, 近年发展势头强劲。我国核桃种植面积和产量居全球之首, 云南又居全国第一^[1]。核桃仁既是食物成分表中的普通食物^[2], 又是我国药典收载的中药^[3], 是典型的药食两用佳品^[4]。核桃仁是高能量和高蛋白食物, 是传统木本粮油, 其药用功效多与富含的多酚和黄酮成分有关^[5-6]。许多黄酮、多酚类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗动脉粥样硬化、抑菌、降血糖、降血脂、抗衰老、抗辐射、改善血液循环、提高免疫力、降血压、防止肥胖、改善记忆等多方面的功效^[7-8], 是近年研发的热点。酚类化合物具有涩味, 不同品种的核桃仁的色泽及苦涩味不同, 表明其多酚和黄酮含量不同^[9]。核桃仁多酚和黄酮主要集中在种皮^[10], 多酚以没食子酸含量最高, 黄酮则以芦丁含量最高^[11]。核桃乳、核桃蛋白肽、鲜核桃仁等核桃制品的生产加工中, 通常要去除核桃内种皮以增加口感和护色, 因此核桃制品的生产过程中将产生较大的内种皮。目前, 这些内种皮作为废弃物丢弃, 不仅造成资源的极大浪费, 而且污染环境, 需加以开发利用。本文以几种云南核桃内种皮为原料, 以芦丁为对

照品, 用比色法测定黄酮类化合物含量, 以没食子酸为对照品, 用福林酚 Folin-Ciocalteu 比色法测定多酚类化合物含量, 为核桃内种皮的开发利用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

材料: 核桃为产自云南的麻果核桃(漾濞)、草果核桃(大姚三台)和米甸核桃(祥云米甸)。新鲜核桃, 破壳取仁, 趁鲜分离出核桃内种皮, 干燥, 备用。

试剂: 甲醇、浓盐酸、浓磷酸、双氧水、硫酸锂、钼酸钠、钨酸钠、硫酸锂、碳酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为国产分析纯。没食子酸对照品、芦丁对照品均为国产标准品。

1.2 仪器与设备

UV759S 型紫外-可见分光光度计: 上海精科; 电子天平: 先行者™(OHAUS), 奥豪斯仪器(上海)有限公司; 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂)。

2 实验方法

2.1 黄酮类化合物的测定

黄酮类化合物的测定采用硝酸铝比色法^[12]。

2.1.1 芦丁对照品溶液及供试品溶液的制备

精密称取干燥恒重的芦丁对照品 20mg, 甲醇溶

^{*} 基金项目: 国家科技支撑计划项目(NO:2011BAD46B03), 云南省科技计划项目(NO:2009EB081、2011AB006)

收稿日期: 2013-03-05 修回日期: 2013-03-30

作者简介: 张春梅(1989~), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药资源开发与利用。

△通信作者: 赵声兰, Email: zhaoshenglan@163.com

解并定容至 100mL,得 0.2mg/mL 芦丁对照溶液。

精密称取 1g 干燥的核桃内种皮,甲醇回流提取 3 次,合并 3 次滤液,定容至 100mL,取 5mL 用甲醇定容至 25mL,得供试品溶液。

2.1.2 芦丁标准曲线的绘制

分别精密吸取芦丁对照品溶液 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 于 10mL 具塞试管中,各补加甲醇至 5mL,摇匀,分别加入 5%的亚硝酸钠溶液 0.5mL,摇匀,放置 6 min,加入 10%的硝酸铝溶液 0.5mL,放置 6 min,加入 4%氢氧化钠溶液 4mL,摇匀,放置 15min 后,用紫外可见分光光度计在 510nm 波长处测定吸光度,以芦丁对照品溶液的浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标作图,得芦丁标准曲线。

2.1.3 样品黄酮含量的测定

取 2.1.1 制得的供试品溶液 1mL 于 10mL 具塞试管中,加甲醇至 5mL,按 2.1.2 方法测定供试品溶液的吸光度,通过芦丁标准曲线计算样品的黄酮含量。

2.2 多酚类化合物的测定

多酚类化合物的测定采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[13]。

2.2.1 Folin-Ciocalteu 试剂配制

Folin-Ciocalteu 原液:称取 20g 钨酸钠和 5.0g 钼酸钠于圆底烧瓶中,用 140mL 蒸馏水溶解,加入 85%的 10mL 浓磷酸及 20mL 浓盐酸,充分混匀,以小火回 10h,稍冷后加入 3g 硫酸锂及 15mL 双氧水,加热沸腾(开口沸)至亮黄色,不带绿色为止,冷却。移至 250mL 容量瓶中,蒸馏水定容,装入棕色瓶,于 4℃条件下保存。

10% Folin-Ciocalteu 试剂:取 20mL 上述福林酚试剂加水定容至 200mL,现配现用。

2.2.2 没食子酸对照品溶液及样品供试品溶液的制备

没食子酸对照品储备液(100ug/mL):称取 0.0051g 没食子酸对照品,于 50mL 容量瓶中用水溶解并定容至刻度,摇匀,得 100ug/mL 没食子酸对照品储备液,临用现配。

没食子酸对照品工作液:用移液管分别移取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 的没食子酸对照品储备液于 10mL 容量瓶中,分别用蒸馏水定容至刻度,摇匀,得浓度分别为 10, 20, 30, 40, 50ug/mL 的没食子酸工作液。

样品供试品溶液:取干燥的核桃内种皮 0.20 g,加入 60%的乙醇(第 1、2 次提取加 20mL,第 3 次提取加 10mL),55℃回流提取 3 次,每次 30min,过滤,合并滤液并用蒸馏水定容至 50mL,用移液管精确量取上述样品溶液 1.0mL 用蒸馏水定容至 100mL,摇匀,得样品供试品溶液溶液。

2.2.3 没食子酸标准曲线的绘制

分别精密吸取上述没食子酸工作液 1mL,加入 10mL 的具塞试管内,加入 5.0mL 10%的 Folin-Ciocalteu 试剂,充分摇匀,5 min 后,加入 7.5 %碳酸钠溶液 4.0mL(前后时间间隔不超过 8 min),混匀,加水定容,30℃下避光放置反应 1h,在 765nm 处测吸光度。以吸光度为纵坐标,没食子酸溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2.2.4 核桃样品多酚的含量测定

取 2.2.2 制备的样品供试品溶液 1mL 于 10mL 具塞试管中,加 5.0mL 10%的 Folin-Ciocalteu 试剂,按 2.2.3 方法测定样品供试品溶液的吸光度,通过没食子酸标准曲线计算样品的多酚含量。

2.3 方法学考察

2.3.1 硝酸铝比色法测定黄酮类化合物的方法学考察^[13]

稳定性试验:取 2.1.1 制备的核桃内种皮供试品溶液,按 2.1.2 方法,供试品溶液与显色剂反应 15min,分别放置不同时间后,测定其吸光度。

重现性试验:按 2.1.1 方法,同一核桃内种皮样品制备供试品溶液 5 份,按 2.1.2 方法测定,通过芦丁的标准曲线分别计算黄酮含量,并计算测定结果的 RSD。

精密度试验:取 2.1.1 制备的同一核桃内种皮供试品溶液,按 2.1.2 方法平行测定 6 次。

加标回收试验:取已知黄酮类化合物含量的样品 5 份,分别加入不同量的芦丁对照品,按 2.1.1 及 2.1.2 方法测定,计算加标回收率。

2.3.2 Folin-Ciocalteu 比色法测定多酚类化合物的方法学考察^[14]

稳定性试验:取 2.2.2 制备的核桃内种皮供试品溶液,按 2.2.3 方法,供试品溶液与 Folin-Ciocalteu 反应 1h,室温放置 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5h 测定其吸光度。

重现性试验:按 2.2.2 方法,同一核桃内种皮样品制备供试品溶液 5 份,按 2.2.3 方法测定,通过没

食子酸标准曲线计算多酚含量,并计算测定结果的 RSD。

精密度试验:取 2.2.2 制备的同一核桃内种皮供试品溶液,按 2.2.3 方法平行测定 6 次。

加标回收率试验:取已知多酚类化合物含量的样品 5 份,分别加入不同量的没食子酸对照品,按 2.2.2 及 2.2.3 方法测定,计算加标回收率。

3 结果与分析

3.1 线性关系考察

按 2.1.2 方法测得芦丁的标准曲线,吸光度(A)与芦丁浓度(C mg/mL)的回归方程为 $A = 9.2447c - 0.0004$,回归系数 $r = 0.9998$,芦丁在浓度为 0.0~0.1mg/mL 内,浓度与吸光度呈良好的线性关系。

按 2.2.3 方法测得没食子酸的标准曲线,吸光度(y)与没食子酸浓度(x $\mu\text{g/mL}$)的回归方程为 $y = 0.0111x + 0.0014$,回归系数 $r = 0.9998$,没食子酸在浓度为 0~50 $\mu\text{g/mL}$ 内,浓度与吸光度呈良好的线性关系。

3.2 稳定性试验

分别按 2.3.1 和 2.3.2 中稳定性试验方法测定,核桃内种皮中总黄酮和总多酚含量测定稳定性的 RSD 分别为 2.66%($n=7$)和 1.22%($n=7$)。

3.3 精密度试验

分别按 2.3.1 和 2.3.2 中精密度试验方法测定,核桃内种皮中总黄酮和总多酚含量测定精密度的 RSD 分别为 0.53%($n=6$)和 0.115%($n=6$)。

3.4 重现性实验

分别按 2.3.1 和 2.3.2 中重现性试验方法测定,核桃内种皮中总黄酮和总多酚含量测定重现性的 RSD 分别为 1.51%($n=5$)和 0.399%($n=5$)。

3.5 加标回收率试验

分别按 2.3.1 和 2.3.2 中加标回收率试验方法测定,结果见表 1 和表 2,核桃内种皮中总黄酮和总多酚含量测定加标回收率试验的平均回收率分别为 102.84%和 99.86%,RSD 分别为 2.45%($n=5$)和 2.87%($n=5$)。

3.6 干扰性考察

取 5 支 10mL 具塞试管,分别加入 0.2mg/mL 的芦丁标准溶液 4mL,再分别加入浓度为 0.1mg/mL 的没食子酸标准溶液 0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL,各补加甲醇至 5mL,摇匀,按 2.1.2 方法测定黄酮(芦丁)含量,计算得 RSD 为 2.13%($n=5$)。结果表明,没食

表 1 总黄酮测定的回收率试验

本底量 / μg	加标量 / μg	总检出量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
239.60	204.55	448.80	102.27		
359.40	204.55	566.09	101.05		
479.20	204.55	685.81	101.01	100.904	1.38
359.40	409.10	762.70	98.58		
479.20	409.10	894.90	101.61		

表 2 总多酚测定的回收率试验

本底量 / μg	加标量 / μg	总检出量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
624.92	569.54	1184.46	98.24		
501.82	569.54	1095.36	104.21		
526.44	569.54	1089.98	98.95	99.86	2.87
600.3	569.54	1151.84	96.84		
674.16	569.54	1249.71	101.06		

子酸对黄酮(芦丁)含量的测定没有干扰。

3.7 三种核桃内种皮总黄酮和总多酚的含量测定

按 2.1.1 和 2.2.2 分别制备测定核桃内种皮总黄酮和总多酚含量的供试品溶液,分别按 2.1.2 和 2.2.3 测定吸光度,分别利用芦丁标准曲线和没食子酸标准曲线计算核桃内种皮总黄酮和总酚类化合物的含量,结果见表 3,不同品种核桃内种皮黄酮和酚类化合物的含量随核桃品种的不同而不同,测定的云南麻果核桃、米甸核桃和草果核桃 3 种核桃内种皮的黄酮类化合物含量分别为 15.48%、17.33%和 15.23%,酚类化合物含量分别为 57.58%、31.25%和 24.01%,其中米甸核桃内种皮的黄酮类化合物和麻果核桃内种皮中的酚类化合物含量高,分别达 17.33%和 57.58%,值得进一步的深入研究和开发利用。

表 3 3 种核桃内种皮总黄酮和总多酚含量

样品	酚类化合物含量	黄酮类化合物含量
	/%	/%
云南麻果核桃内种皮	57.58	15.48
云南米甸核桃内种皮	31.25	17.33
云南草果核桃内种皮	24.01	15.23

4 讨论

膳食多酚依其结构可分为黄酮类和非黄酮类^[14]。总多酚含量的测定主要基于国家标准(GB/

T8313)茶多酚测定的福林酚 Folin-Ciocalteu 试剂氧化酚羟基,自身被还原显蓝色的比色法;总黄酮含量的测定主要基于国家标准(GB/T20574)蜂胶中总黄酮含量测定中黄酮类与三价铝络合显黄色的硝酸铝比色法,产生络合作用的条件是结构中须有 5-羟基或 3-羟基或邻二羟基。可见两种测定方法均与酚羟基有关,但硝酸铝比色法测定黄酮含量对羟基位置有特定指向,福林酚比色法测定多酚含量对羟基位置没有要求,故多酚含量的测定结果包含了黄酮类和非黄酮类的酚类化合物。

种皮约占核仁重量的 10%,可溶性固形物含量高达 60%,多酚含量达 58%^[15],我们的分析结果与此相近。荣瑞芬等^[10]测定的干核桃仁水浸溶胀剥皮干燥的种皮中总酚和黄酮类含量较低,分别为 1.038%和 0.744%,可能与水浸剥皮过程中水浸流失有关。

本文测定的 3 种云南核桃内种皮中,米甸核桃内种皮的黄酮类化合物和麻果核桃内种皮的酚类化合物含量较高,分别达 17.33%和 57.58%,有利于对核桃内种皮的开发利用,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李留春. 云南省核桃产业实现又好又快发展的理性思考[J]. 林业调查规划,2010,35(3):64-68.
- [2] 杨月欣,王光亚. 中国食物成分表[M]. 北京:北京大学医学出版社,2002.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [4] 赵声兰,陈朝银,葛锋,等. 核桃油功效成分研究进展[J].

云南中医学院学报,2010,33(12):71-74.

- [5] Anderson K J, Teuber S S, Gobeille A, et al. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation[J]. Nutr, 2001, 131:2837-2842.
- [6] Shimoda H, Tanaka J, Kikuchi M, et al. Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine; hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut [J]. J Agric Food Chem. 2008;56(12):4444-4449.
- [7] 王长远,吴洪奎,于长青,等. 黄酮类化合物研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2007,2(19):75-78.
- [8] 王雪飞,张华. 多酚类物质生理功能的研究进展[J]. 2012,2(33):211-214.
- [9] 王克建,齐建勋,胡小松,等. 多酚对核桃仁食用品质影响的初步研究[J],食品科学,2006(5):95-97.
- [10] 荣瑞芬,历重先,刘雪峥,等. 核桃内种皮营养与功能成分初步分析研究[J]. 食品科学 2008,29(11):541-543.
- [11] 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(7):212-213.
- [12] 冯薇,王文全,赵平然. 甘草黄酮含量测定方法研究[J]. 时珍国医国药,2007,11(18):2608-2610.
- [13] 田文礼,孙丽萍,董捷,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定蜂花粉中的总酚[J]. 食品科学,2007,28(2):258-260.
- [14] Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions:biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects [J]. Oxid Med Cell Longev. 2012;914273.
- [15] 王勇,吴国良,徐彦岗,等. 核桃果实中酚类物质含量变化研究[M]. 中国农学通报,2004,6:234-235.

(编辑:迟越)

Determination of the Content of Several Yunnan Walnut Kernel Pellicle Flavonoids and Polyphenols

ZHANG Chun-mei¹, CHEN Chao-yin², LIN Yu-ping¹, FAN Qi-meng¹, ZHANG Tian-cai², ZHAO Sheng-lan¹

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500;

2. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650500)

ABSTRACT: Objective To determine the content of flavonoids and polyphenols in the three walnut kernel pellicle from Yunnan different areas of. **Methods** With the walnut kernel pellicle as raw material, flavonoids in walnut kernel pellicle by colorimetric method with rutin as control, polyphenols in the walnut seed capsule was determined by Folin-Ciocalteu colorimetric method with gallic acid as the standard. **Results** Rutin in 0~0.1mg/mL, gallic acid in 0~50μg/mL range, absorption value showed a good linear relationship with concentration. The flavonoids in the Yunnan Maguo walnut, Midian walnut and Caoguo walnut kernel pellicle are 15.48%, 17.33% and 15.23%, respectively, the phenolic compounds were 57.58%, 31.25% and 24.01%. **Conclusion** The three kinds of Yunnan walnut kernel pellicle contain abundant flavonoids and polyphenolic compoundse. And polyphenols in the Maguo walnut kernel pellicle is as high as 57.58%, with the potential of research and development.

KEY WORDS: Walnut kernel pellicle; Flavonoids; Polyphenols; content