

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.08.008

王纪辉, 耿阳阳, 胡伯凯, 等. 核桃分心木多酚物质响应及组成与抗氧化能力探究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(8): 83-94.

# 核桃分心木多酚物质响应及组成与 抗氧化能力探究

王纪辉<sup>1,2</sup>, 耿阳阳<sup>1,2</sup>, 胡伯凯<sup>1,2</sup>, 刘亚娜<sup>1,2</sup>,  
张时馨<sup>1,2</sup>, 曾亚军<sup>1,2</sup>, 杨光<sup>3</sup>1. 贵州省核桃研究所, 贵阳 550005; 2. 贵州省林业科学研究院, 贵阳 550005;  
3. 贵州阳光食品有限公司, 贵州 毕节 551600

**摘要:** 采用多元二次回归方程对辅以超声处理提取核桃分心木多酚工艺条件进行优化, 分析多酚组成并评价其抗氧化性, 为核桃分心木开发利用提供技术支持. 以干燥分心木为原料, 在单因素试验基础上解析多酚响应变化规律, 并选择料液比、处理时间、乙醇浓度和处理温度 4 个因素进行曲面响应试验, 确定多酚超声辅助提取的较佳工艺条件; 采用高效液相色谱对分心木中多酚类物质种类进行鉴定并定量分析; 以超氧阴离子和羟基自由基的清除率为评价指标, 对多酚的抗氧化性进行研究; 对分心木超声处理前后的微观结构经扫描电镜进行观察. 结果表明: 分心木多酚提取较佳工艺参数为料液比 1:80 g/mL, 处理时间 21 min, 乙醇浓度 48%, 处理温度 61 °C, 基于该条件进行试验得出分心木多酚得率为 74.72±1.85 mg/g; 分心木中鉴定出 4 种多酚单体, 其中儿茶素、芦丁质量分数较高, 没食子酸质量分数次之, 槲皮素质量分数最低; 分心木多酚对超氧阴离子和羟基自由基的清除能力剂量依赖性较强. 抗坏血酸(Vc)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)和分心木多酚均能清除超氧阴离子和羟基自由基, 清除能力由大到小依次为 Vc、分心木多酚、BHT; 超声处理能显著破坏分心木表面组织, 其结构较为松散、塌陷. 结果可为研究开发天然的抗氧化剂提供理论基础, 在拓宽核桃分心木加工利用途径的同时也为提取农产品副产物中生物活性成分提供参考.

**关键词:** 泡核桃; 分心木; 多酚; 抗氧化性

中图分类号: TS255.1 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)08-0083-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Analyzing Polyphenols Response and Exploring Composition and Antioxidant Ability of Walnut *Diaphragma Juglandis* Fructus

WANG Jihui<sup>1,2</sup>, GENG Yangyang<sup>1,2</sup>, HU Bokai<sup>1,2</sup>,  
LIU Yana<sup>1,2</sup>, ZHANG Shixin<sup>1,2</sup>, ZENG Yajun<sup>1,2</sup>, YANG Guang<sup>3</sup>

收稿日期: 2021-10-27

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2022]重点 014 号); 贵州省木本粮油加工科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2020]5003); 贵州省林业局林业科学技术研究项目(黔林科合 J 字[2019]13 号).

作者简介: 王纪辉, 助理研究员, 主要从事木本粮油加工研究.

通信作者: 曾亚军, 博士研究生, 副研究员.

1. Guizhou Institute of Walnut, Guiyang 550005, China;
2. Guizhou Academy of Forestry, Guiyang 550005, China;
3. Guizhou Sunshine Food Company Limited, Bijie Guizhou 551600, China

**Abstract:** Ultrasonic assisted extraction of polyphenol from walnut *diaphragma juglandis* fructus was optimized by multivariate quadratic regression equation, polyphenol composition was analyzed and antioxidant activity of polyphenol in *diaphragma juglandis* fructus was evaluated to provide technique support for the development and utilization of *diaphragma juglandis* fructus polyphenol. The dry *diaphragma juglandis* fructus was used as the raw material, the response change of *diaphragma juglandis* fructus polyphenol was analyzed on the basis of single factor experiment, and the four influencing parameters including solid to liquid ratio, treatment time, ethanol concentration and treatment temperature were selected for surface response test to optimize for the better process conditions for ultrasonic-assisted extraction of walnut *diaphragma juglandis* fructus polyphenol. The types of polyphenol were identified and analyzed by high performance liquid chromatography. The antioxidant properties of *diaphragma juglandis* fructus polyphenol were investigated with the scavenging rate of superoxide anion and hydroxyl radical as indicators. The microstructure of fructus before and after the extraction was observed by scanning electron microscope. Better processing conditions for ultrasonic assisted *diaphragma juglandis* fructus polyphenol extraction obtained by multivariate quadratic regression equation design analysis were as follows: 1 : 80 g/mL of solid-liquid ratio, 21 min of treatment time, 48% of ethanol concentration and 61 °C of treatment temperature. The polyphenol yield under this condition was  $(74.72 \pm 1.85)$  mg/g. Four kinds of polyphenols were identified, among which the catechin anrutinum mass fractions were higher, gallic acid mass fraction was second high, and quercetin mass fraction was the lowest. The dose dependence of *diaphragma juglandis* fructus polyphenol scavenging capacity of superoxide anions and hydroxyl radicals was significant. Vc, BHT and *diaphragma juglandis* fructus polyphenol could scavenge superoxide anions and hydroxyl radicals, the scavenging capacity was  $Vc > \text{diaphragma juglandis fructus polyphenol} > BHT$ . Ultrasound treatment could significantly destroy *diaphragma juglandis* fructus surface tissue to make its structure relatively loose and collapsed. The results of this study could provide a theoretical basis for the research and development of natural antioxidants, and broaden the processing and utilization of walnut *diaphragma juglandis* fructus, also provide reference for the extraction of bioactive components from by-products of agricultural products.

**Key words:** walnut; *diaphragma juglandis* fructus; polyphenol; antioxidation

核桃分心木被乡间百姓称作胡桃衣, 又叫胡桃隔, 是一种干燥木质隔膜, 位于核桃果仁之间, 富含多酚物质<sup>[1]</sup>. 多酚不仅具有很强的抑菌、抗衰老、抗辐射等生理功效, 还能有效减少氧化应激和抑制大分子氧化<sup>[2]</sup>, 已成为食品、医药、染色等领域研究的热点课题之一<sup>[3]</sup>, 具有较高的经济价值. 我国核桃种植面积居世界首位, 然而核桃分心木却未能得到充分的开发利用. 长期以来, 核桃分心木作为废弃物丢弃, 不仅造成极大的环境污染, 更是资源的严重浪费, 因此, 若能提取核桃分心木中的多酚物质, 研究其抗氧化活性, 进一步将其应用于食品防腐保鲜等领域, 对核桃分心木的资源化利用具有重要意义<sup>[4-5]</sup>. 多酚具有酚羟基, 根据相似相溶原理, 在极性大的溶剂中溶解性较强, 比如水、乙醇、丙酮, 可溶于乙酸乙酯, 不溶于乙醚、氯仿、石油醚等<sup>[6-7]</sup>. 目前多酚提取技术主要集中在有机溶剂、离子沉淀、树脂吸附分离、超临界二氧化碳萃取、热水浸提等方法<sup>[8-9]</sup>. 利用这些技术进行提取, 存在时间长、能耗大、价格昂贵等诸多问题. 超声处理不仅可缩短提取时间, 还能减少能量浪费. 超声辅助提取的机理涉及空化作用<sup>[10]</sup>, 超声在溶液中产生空化泡, 空化泡的迅速产生和破裂会产生强有力的冲击波和二次效应<sup>[11-12]</sup>, 如局部高温高压等, 从而对

周围植物组织和细胞产生破坏<sup>[13]</sup>,可加速溶剂和细胞内溶液的对流和溶质的交换,提高提取效率<sup>[14]</sup>.

本研究拟采用超声辅助提取法从核桃分心木中提取多酚,利用超声过程中产生的机械、空化效应强化植物多酚提取效果,提高多酚的稳定性;考察料液比、处理时间、乙醇浓度、处理温度、超声功率对多酚提取效果的影响;采用多元二次回归方程优化辅以超声处理提取核桃分心木中多酚物质的工艺条件,以常见的自由基-超氧阴离子、羟基自由基为评价指标,研究分心木多酚对其清除作用;分析核桃分心木中多酚的种类及质量分数,为建立测定核桃分心木中多酚单体的高效液相色谱(HPLC)检测方法提供参考依据<sup>[15]</sup>.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

核桃青果:以泡核桃 30%青果皮颜色由绿变黄或略开裂,坚果发育到固有形状达到采收成熟度时即为果实成熟期,采收地点为贵州省息烽县西山镇猪场村.

福林酚(分析纯),上海源叶生物科技有限公司;无水乙醇、甲醇(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司;浓盐酸(分析纯),重庆川东化工集团有限公司;无水碳酸钠(分析纯),天津市永大化学试剂有限公司;BHT(分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;L(+)-抗坏血酸、三(羟甲基)氨基甲烷、焦性没食子酸、水杨酸(分析纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;30%过氧化氢、硫酸亚铁(分析纯),成都金山化学试剂有限公司.

### 1.2 仪器与设备

MS104TS 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;L5S 紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;3-18R 台式高速冷冻离心机,湖南可成仪器设备有限公司;LGJ-22 系列冷冻干燥机,四环福瑞科仪科技发展北京有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;EM-30 台式扫描电镜,COXEM;ETD-900M 小型离子溅射仪,北京意力博通技术发展有限公司;U3000 高效液相色谱仪,赛默飞公司.

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 核桃分心木样品制备

核桃青果采收后脱去青皮于 45 °C 烘箱中烘干,而后破壳取出分心木粉碎过 60 目筛备用.

#### 1.3.2 影响因素试验

以乙醇-水溶液作为提取剂,分别选取料液比(1:20,1:40,1:60,1:80,1:100 g/mL)、处理时间(10,20,30,40,50 min)、乙醇浓度(10%,30%,50%,70%,90%)、处理温度(20,30,40,50,60 °C)、超声功率(200,250,300,350,400 W),以多酚得率为指标,研究各因素对多酚提取效果的影响.

#### 1.3.3 没食子酸标准曲线绘制

没食子酸标准品溶液:精密称取 0.01 g 没食子酸标准品,于 100 mL 容量瓶中用蒸馏水溶解并定容至刻度、摇匀,得 100 μg/mL 没食子酸对照品储备液(临用现配)<sup>[16]</sup>.

采用 Folin-Ciocalteu 比色法<sup>[16]</sup>,分别准确移取 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 没食子酸对照品储备液于 10 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容、摇匀,得浓度为 10,20,30,40,50 μg/mL 没食子酸溶液<sup>[16]</sup>.分别吸取没食子酸溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入 5 mL 10%福林酚试剂,摇匀、避光,5 min 后加入 4 mL 7.5%碳酸钠溶液,摇匀后避光反应 1 h,在 765 nm 处测定吸光度值<sup>[16]</sup>.

#### 1.3.4 多酚得率计算

参考梁杏<sup>[16]</sup>的测定方法,略有改动,称取粉碎过 60 目筛的分心木粉末 0.2 g 置于 50 mL 离心管中,按料液比 1:60 g/mL 加入提取液,置于浴槽式数控超声波清洗器中,超声功率 200 W,30 °C 提取 20 min,取出,8 000 r/min 离心 5 min,上清液为提取液.吸取 1 mL 提取液放入试管中加入蒸馏水进行一定比例稀

释后再吸取 1 mL 稀释液, 根据 1.3.3 的标准曲线方法测吸光度值, 计算多酚得率.

$$X = (c \times V \times N \times 0.001) / m$$

式中,  $X$  为样品中多酚得率(mg/g),  $c$  为样品多酚浓度( $\mu\text{g/mL}$ ),  $V$  为提取液总体积(mL),  $N$  为稀释倍数,  $m$  为样品质量(g).

### 1.3.5 多元二次回归方程设计

在各影响因素试验的基础上, 选取料液比、处理时间、乙醇浓度、处理温度 4 个因素, 以多酚得率为指标, 运用多元二次回归方程模型进行试验设计, 设计方案见表 1.

表 1 试验因素水平表

水平	因素			
	料液比( $X_1$ )/(g · mL <sup>-1</sup> )	处理时间( $X_2$ )/min	乙醇浓度( $X_3$ )/%	处理温度( $X_4$ )/°C
-1	1 : 70	15	40	55
0	1 : 80	20	50	60
1	1 : 90	25	60	65

### 1.3.6 分心木多酚体外清除自由基试验

分心木多酚制备: 称取一定质量分心木样品, 按料液比 1 : 80 g/mL 加入 48% 乙醇水溶液, 置于浴槽式数控超声波清洗器中, 超声功率 300 W, 61 °C 下提取 21 min. 多酚提取液离心后, 将上清液在 79 °C 下进行减压浓缩, 而后进行低温冷冻干燥, 制成分心木粗多酚样品.

清除自由基试验: 准确称取分心木多酚样品、抗坏血酸(Vc)及 2, 6-二叔丁基对甲酚(BHT)各 0.25 g, 用 48% 乙醇溶解定容至 50 mL 配成 5 mg/mL 溶液备用.

#### 1.3.6.1 对超氧阴离子清除作用

参考杨喆等<sup>[17]</sup>的测定方法, 略有改动, 向具塞试管中分别加入 0.05 mol/L pH 值为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 2.3 mL, 浓度为 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 mg/mL 的多酚待测液 1.0 mL, 5 mmol/L 邻苯三酚溶液 1 mL, 混合均匀于室温下准确反应 20 min 后立即加入 2 滴浓盐酸终止反应, 在 420 nm 处测定吸光度值(A). 以相同浓度的 Vc 和 BHT 溶液代替多酚待测液, 作为阳性对照. 计算公式为

$$C_{\text{超氧阴离子}} = (A_0 - (A - A_1)) / A_0 \times 100$$

式中,  $C_{\text{超氧阴离子}}$  为超氧阴离子清除率(%),  $A$  为多酚待测液吸光度值,  $A_0$  为以超纯水代替多酚样液并测定空白吸光度值,  $A_1$  为以超纯水代替邻苯三酚溶液并测定本底吸光度值.

#### 1.3.6.2 对羟基自由基清除作用

采用水杨酸法, 取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mg/mL 核桃分心木多酚样液 1.5 mL, 依次加入 6 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液 2 mL, 6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2 mL, 6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 2 mL, 37 °C 水浴反应 30 min 后, 在波长 510 nm 处测定吸光度值(A), 以相同浓度的 Vc 和 BHT 溶液代替多酚待测液, 作为阳性对照<sup>[18]</sup>. 计算公式为

$$C_{\text{羟基自由基}} = (A_0 - (A - A_2)) / A_0 \times 100$$

式中,  $C_{\text{羟基自由基}}$  为羟基自由基清除率(%),  $A_2$  为以超纯水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液并测定本底吸光度值.

### 1.3.7 分心木多酚物质高效液相色谱分析

#### 1.3.7.1 样品溶液的制备

取分心木粉末 3.0 g, 置于 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 70% 的乙醇水溶液, 置于浴槽式数控超声波清洗器中, 于 50 °C, 300 W 下, 提取 20 min, 重复提取 2 次, 合并提取液. 提取液经 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液在 79 °C 下减压浓缩至膏状后用 5 mL 70% 乙醇定容至 5 mL, 即为多酚提取液, 置 -4 °C 冰箱中冷藏备用<sup>[19]</sup>(可保存 7 d); 多酚提取液用 0.22  $\mu\text{m}$  亲水滤膜过滤, 置于 1.5 mL 进样瓶中.

### 1.3.7.2 检测条件

CAPCELL PAK C18 色谱柱, 流动相为 0.8% 乙酸溶液(A 相)、色谱甲醇(B 相), 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 流速 0.9 mL/min. 对照品: 没食子酸、儿茶素、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、表儿茶素、丁香醛、对香豆素、阿魏酸采用洗脱程序 1, 芦丁、杨梅素、胡桃醌、槲皮素采用洗脱程序 2. 洗脱程序 1 为柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 波长 280 nm(洗脱梯度: 0~10 min, 10%~20%B; 10~30 min, 20%~50%B; 30~40 min, 50%B; 40~41 min, 50%~100%B; 41~50 min, 100%B; 50~51 min, 100%~10%B; 51~60 min, 10%B); 洗脱程序 2 为柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 波长 251 nm(洗脱梯度: 0~10 min, 10%~40%B; 10~25 min, 40%~60%B; 25~35 min, 60%~80%B; 35~36 min, 80%~100%B; 36~46 min, 100%B; 46~47 min, 100%~10%B; 47~57 min, 10%B).

### 1.3.8 微观结构观察

采用 SEM 对分心木粉末超声前后进行表观形貌观察, 在样品台贴上双面胶, 在双面胶上均匀放置少量样品, 吹去多余样品, 喷金处理, 再利用 SEM 进行扫描观察、拍照.

### 1.3.9 数据处理

采用 EXCEL2007 进行数据整理, 运用 ORIGIN9.1 进行制图, 采用 SPSS19.0 软件对试验数据进行 ANOVA 分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 影响因素试验

#### 2.1.1 料液比对分心木多酚提取效果的影响

由图 1 可知, 分心木多酚得率随料液比增大呈先增加后降低的趋势; 料液比为 1:80 g/mL 时, 分心木多酚得率达到最高, 为  $72.87 \pm 1.02$  mg/g; 料液比为 1:20 g/mL 时, 多酚得率最低, 为  $66.29 \pm 0.24$  mg/g. 最高点较其他梯度多酚得率增加幅度为 9.93%(1:20 g/mL), 6.98%(1:40 g/mL), 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ), 3.02%(1:60 g/mL), 1.77%(1:100 g/mL), 差异无统计学意义( $p > 0.05$ ). 这可能是因为增加溶剂, 颗粒可扩散空间增大, 有效接触面积增加提高传质推动力, 料液比继续加大非多酚物质溶出引起多酚得率下降<sup>[20]</sup>. 过高的溶剂体积会增大后续提纯等试验过程的工作量, 故在后续试验中选择料液比 1:80 g/mL 进行处理.

#### 2.1.2 处理时间对分心木多酚提取效果的影响

由图 2 可知, 分心木多酚得率随处理时间延长呈先升高后下降的趋势; 10~30 min 分心木多酚得率表现为增加, 上升幅度为 2.25%(10~20 min), 0.09%(20~30 min), 差异无统计学意义( $p > 0.05$ ); 30~50 min 多酚得率逐渐降低, 下降幅度为 1.37%(30~40 min), 1.49%(40~50 min), 差异无统计学意义( $p > 0.05$ ). 30 min 时, 多酚得率最大, 为  $70.11 \pm 0.65$  mg/g, 较其余时间梯度多酚得率差异无统计学意义( $p > 0.05$ ). 这说明延长处理时间可增加多酚溶出量, 但时间过长, 溶剂对物料的作用达到平衡加之氧化原因致使多酚得率下降<sup>[21]</sup>. 20 min 时, 多酚得率也较高, 为  $70.05 \pm 0.43$  mg/g. 考虑到耗能问题, 在后续试验中选择 20 min 进行处理.

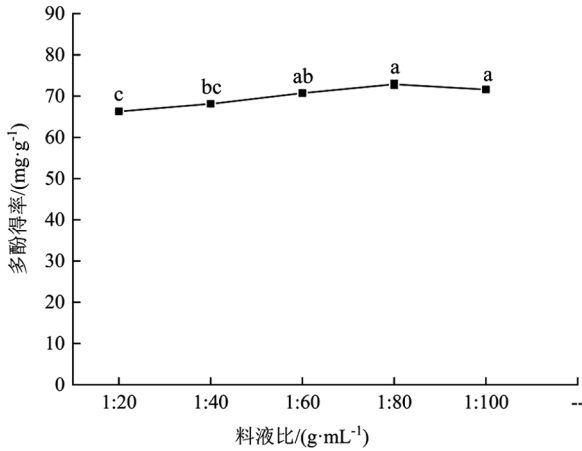
#### 2.1.3 乙醇浓度对分心木多酚提取效果的影响

由图 3 可知, 乙醇浓度在 10%~30% 范围内时, 多酚得率上升速率较快, 上升幅度为 86.23%, 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ); 乙醇浓度在 30%~70% 范围内时, 多酚得率上升速率较慢, 多酚得率间差异无统计学意义( $p > 0.05$ ); 乙醇浓度在 70%~90% 范围时, 多酚得率降低, 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ). 乙醇浓度为 70% 时, 多酚得率最高, 为  $62.98 \pm 0.87$  mg/g; 较其余梯度多酚得率增加幅度为 89.81%(10%), 10.38%(90%), 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ), 1.93%(30%), 0.93%(50%), 差异无统计学意义( $p >$

0.05). 就整体变化趋势而言, 分心木多酚得率随乙醇浓度增大逐渐增加而后趋于下降, 这可能是提取前期溶剂极性较大, 多酚溶出速率较慢, 随乙醇浓度逐渐增大, 溶剂与多酚极性较为接近, 多酚得率增加, 但乙醇浓度过高溶剂极性变弱, 样品中醇溶性杂质溶出, 多酚得率降低<sup>[22]</sup>. 综合考虑, 在后续试验中选择乙醇浓度为 50% 进行处理.

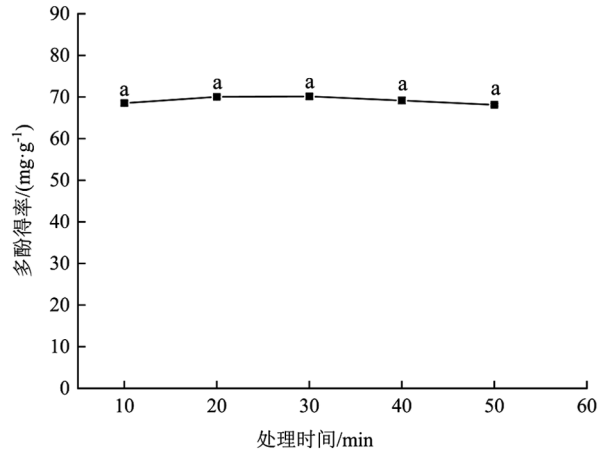
#### 2.1.4 处理温度对分心木多酚提取效果的影响

由图 4 可知, 温度对分心木多酚得率影响有统计学意义( $p < 0.05$ ). 20~60 °C 时, 多酚得率逐渐增加, 60 °C 时多酚得率最大, 为  $73.97 \pm 0.42$  mg/g. 最高点与其余温度梯度相比多酚得率提高 21.14% (20 °C), 14.05% (30 °C), 10.80% (40 °C), 4.67% (50 °C), 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ). 提高温度分子运动加快, 多酚更易从细胞内部扩散到溶剂中<sup>[23]</sup>. 考虑到高温对多酚稳定性的影响及能耗问题, 在后续试验中选择 60 °C 进行处理.



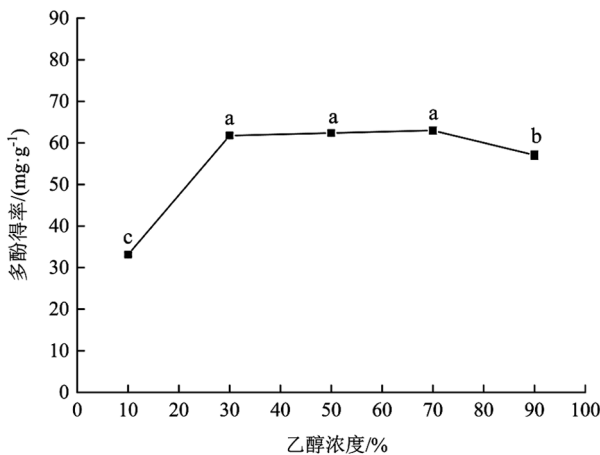
小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 差异有统计学意义.

图 1 不同料液比对多酚得率的影响



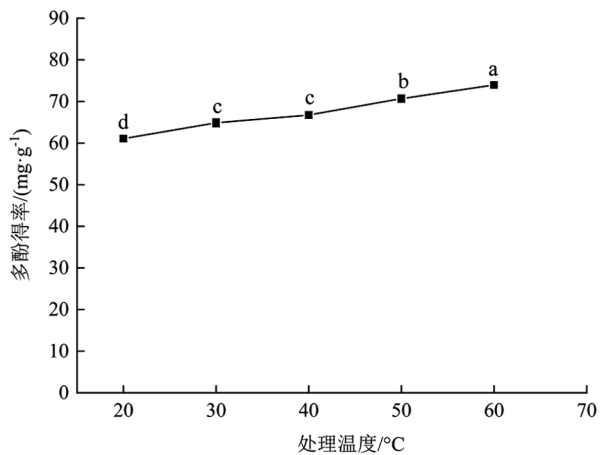
小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 差异有统计学意义.

图 2 不同处理时间对多酚得率的影响



小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 差异有统计学意义.

图 3 不同乙醇浓度对多酚得率的影响



小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 差异有统计学意义.

图 4 不同处理温度对多酚得率的影响

#### 2.1.5 超声功率对分心木多酚提取效果的影响

由图 5 可知, 超声功率对分心木多酚得率影响有统计学意义( $p < 0.05$ ). 在 200~300 W 时, 多酚得率增加幅度为 33.58%, 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ); 在 300~350 W 时, 多酚得率下降幅度为 23.77%, 差异有统计学意义( $p < 0.05$ ); 在 350~400 W 时, 多酚得率出现略微上升. 超声功率为 300 W 时, 多酚得率达到最高点, 为  $73.36 \pm 0.45$  mg/g, 较其余梯度多酚得率差异有统计学意义( $p <$

0.05)。可能的原因是超声功率加大,空化作用增强,加速了细胞破碎,多酚得率提高,之后一些极性相同杂质的溶出阻碍了多酚渗出。超声功率过大,产生较强的声波,介质质点将吸收的声能大部分转变进而生成热能,致使样品组织温度出现升高,部分难溶的酚类物质得以溶出<sup>[24]</sup>。综合考虑,在后续试验中选择超声功率为 300 W 进行处理。

## 2.2 分心木多酚提取回归模型结果

在影响因素试验结果的基础上,确定超声功率为 300 W,以料液比( $X_1$ )、处理时间( $X_2$ )、乙醇浓度( $X_3$ )和处理温度( $X_4$ ) 4 个因素为自变量,以多酚得率为特征目标物,采用多元二次回归方程模型进行试验,结果见表 2 和表 3。

表 2 回归方程的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	55.61	14	3.97	14.13	<0.000 1
$X_1$	0.32	1	0.32	1.13	0.306 4
$X_2$	2.27	1	2.27	8.08	0.013 1
$X_3$	0.11	1	0.11	0.39	0.541 3
$X_4$	4.01	1	4.01	14.27	0.002 0
$X_1X_2$	1.76	1	1.76	6.24	0.025 5
$X_1X_3$	0.62	1	0.62	2.19	0.160 9
$X_1X_4$	0.02	1	0.02	0.06	0.817 1
$X_2X_3$	1.09	1	1.09	3.88	0.068 9
$X_2X_4$	0.30	1	0.30	1.08	0.317 2
$X_3X_4$	0.50	1	0.50	1.77	0.204 9
$X_1^2$	29.29	1	29.29	104.15	<0.000 1
$X_2^2$	17.05	1	17.05	60.62	<0.000 1
$X_3^2$	4.15	1	4.15	14.76	0.001 8
$X_4^2$	14.04	1	14.04	49.92	<0.000 1
残差	3.94	14	0.28		
失拟值	0.87	10	0.09	0.11	0.997 4
净误差	3.07	4	0.77		
总和	59.55	28			

表 3 回归方程的拟合分析

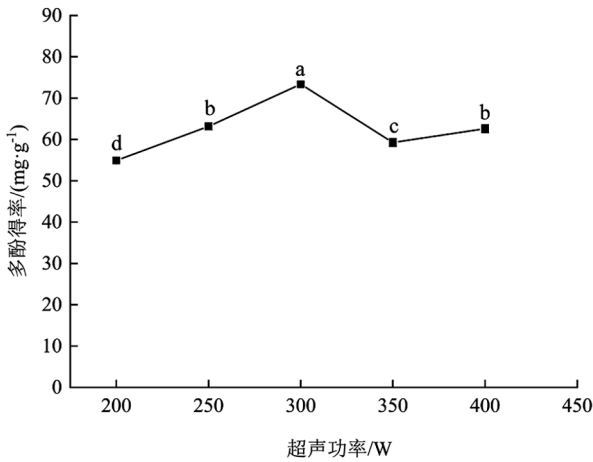
名称	变异系数/%	系数	校正系数	预测系数	信噪比
值	0.72	0.933 9	0.867 8	0.835 5	13.126

从表 2 和表 3 可以看出,多元二次回归方程的失拟值  $p=0.997 4>0.05$ 。多元二次回归方程系数  $R^2=0.933 9$ ,说明该模型用于预测核桃分心木多酚得率是可行的;方程模型的变异系数为 0.72%,仅有总变异的 0.72%不能用该模型进行解释,表明该模型重复性较好;多元二次回归方程的校正系数(0.867 8)与预测系数(0.835 5)较为接近,说明该模型拟合程度较优;信噪比为  $13.126>4$ ,说明该模型有足够强的信号对分心木多酚得率进行预测,试验误差小。对该模型进行回归分析可知, $X_2$ 、 $X_4$  对分心木多酚得率影响有统计学意义( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ); $X_1X_2$  的交互作用对多酚得率影响也有统计学意义( $p<0.05$ ); $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  及  $X_4^2$  对多酚得率的影响有统计学意义( $p<0.01$ )。

通过多元二次回归方程模型预测分析,得到分心木多酚最佳提取条件为料液比 1:80 g/mL,处理时间 21 min,乙醇浓度 48%,处理温度 61 °C,理论提取率为 75.86 mg/g.采用理论优化提取条件,验证预测结果的准确性,得到多酚得率平均值为  $74.72 \pm 1.85$  mg/g,与理论值相比,相对误差较小,说明该模型对模拟、预测分心木多酚得率可行,提取的技术参数可靠.

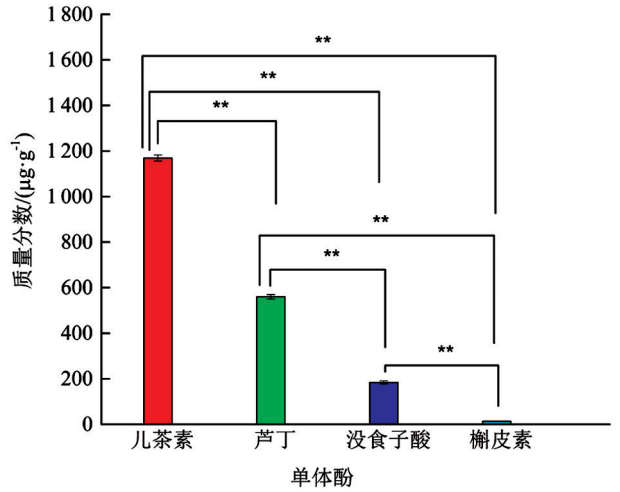
### 2.3 分心木单体酚种类及质量分数

由图 6 可知,HPLC 从分心木中鉴定出儿茶素、芦丁、没食子酸、槲皮素共 4 种单体酚,其中儿茶素质量分数最高、芦丁次之、没食子酸较低、槲皮素最低.儿茶素质量分数较芦丁、没食子酸及槲皮素 3 种单体酚分别高 2.09 倍,6.35 倍,89.92 倍,差异有统计学意义( $p < 0.01$ );芦丁与没食子酸、槲皮素相比,质量分数分别高 3.04 倍,43.08 倍,差异有统计学意义( $p < 0.01$ );没食子酸较槲皮素而言,质量分数高 14.15 倍,差异有统计学意义( $p < 0.01$ ).



小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 差异有统计学意义.

图 5 不同超声功率对多酚得率的影响



\*\* 表示  $p < 0.01$ , 差异有统计学意义.

图 6 分心木中单体酚种类

### 2.4 分心木多酚体外清除自由基试验结果

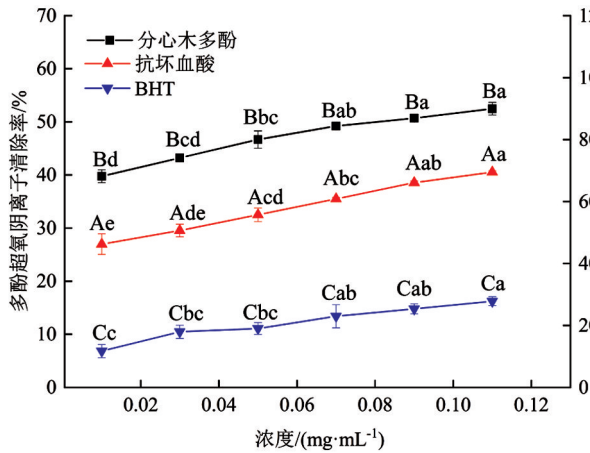
#### 2.4.1 超氧阴离子清除效果

由图 7 可知,分心木多酚、抗坏血酸及 BHT 均对超氧阴离子有较好的清除作用.清除效果均随浓度增大呈上升趋势,由大到小依次为抗坏血酸、分心木多酚、BHT.分心木多酚浓度为 0.11 mg/mL 时,对超氧阴离子清除率达 52.47%;抗坏血酸浓度为 0.03 mg/mL 时,对超氧阴离子清除率达 50.64%.BHT 在设定浓度范围内对超氧阴离子清除率未达到 50.00%;当浓度为 0.11 mg/mL 时,其 BHT 清除率最大,也仅为 27.82%.最高点时,抗坏血酸较分心木多酚清除率提高 32.44%,分心木多酚较 BHT 清除率提高 88.58%,差异有统计学意义( $p < 0.05$ ).

#### 2.4.2 羟基自由基清除效果

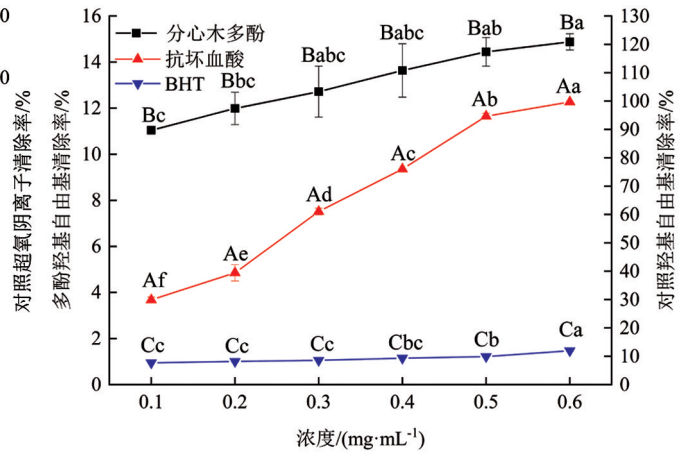
由图 8 可知,分心木多酚、抗坏血酸及 BHT 对羟基自由基均有一定的清除作用.三者对羟基自由基清除效果均随浓度增大表现为逐渐增加的趋势,由大到小依次为抗坏血酸、分心木多酚、BHT.分心木多酚和 BHT 对羟基自由基清除作用均不是很明显,清除率均在 20% 以下.分心木多酚和 BHT 浓度为 0.6 mg/mL 时,对羟基自由基清除率分别为 14.88% 和 11.93%.抗坏血酸浓度为 0.3 mg/mL 时,对羟基自由基清除率已经达到 61.04%.浓度为 0.6 mg/mL 时,抗坏血酸较分心木多酚羟基自由基清除率提高 570.05%,差异有统计学意义( $p < 0.05$ );分心木多酚与 BHT 相比,清除率提高 24.73%,差异有统计学意义( $p < 0.05$ ).





小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 组内差异有统计学意义; 大写字母不同表示  $p < 0.05$ , 组间差异有统计学意义。

图 7 清除超氧阴离子效果

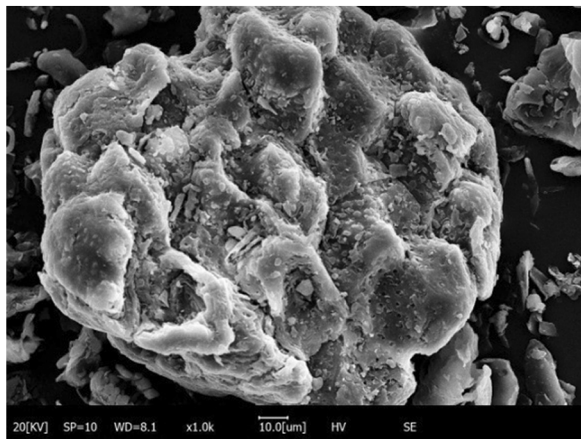


小写字母不同表示  $p < 0.05$ , 组内差异有统计学意义; 大写字母不同表示  $p < 0.05$ , 组间差异有统计学意义。

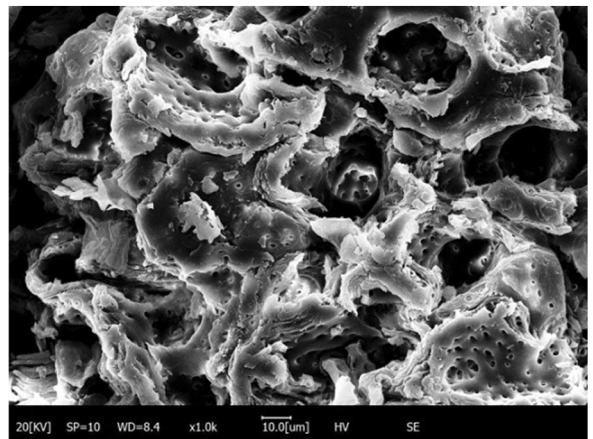
图 8 清除羟基自由基效果

## 2.5 超声处理对分心木粉微观结构的影响

超声处理对分心木粉微观结构影响很大(图 9)。对照组分心木粉呈不规则块状结构, 表面较为平整、光滑且有一定的小孔附着其上, 结构质地较为紧密; 处理组分心木粉形状不规则、组织结构较为松散, 呈不规则、凹陷、折叠起皱的球形, 表明超声过程中产生的机械、空化及湍流等复合效应能破坏植物组织结构, 可将细胞膜网状结构撕裂, 导致其结构出现坍塌, 有利于多酚物质渗透、扩散进入提取溶液中, 强化了植物多酚的提取效果。



(a) 对照组



(b) 处理组

图 9 分心木粉 SEM 图(1 000×)

## 3 讨论

### 3.1 核桃分心木多酚提取工艺

多酚作为天然的植物次生代谢产物, 是能潜在促进健康的一种化合物, 因具有多种生物活性功能, 是近年核桃副产物研究的主要方向。本研究基于超声效应并结合多元二次回归方程来解析核桃分心木中多酚物质的响应变化规律和优化多酚提取工艺参数, 得出分心木多酚较优提取参数: 料液比 1 : 80 g/mL, 处理时间 21 min, 乙醇浓度 48%, 处理温度 61 °C, 在此条件下多酚得率为 74.72 ± 1.85 mg/g。李瑞等<sup>[25]</sup>优化云南核桃分心木多酚提取工艺参数为料液比 1 : 102 g/mL, 复合酶添加量 0.90%, 温度 45.33 °C, 多酚得率为 22.35 mg/g, 研究结果与本研究得出的结论存在差异, 究其原因可能是提取方法不同。李瑞

等<sup>[25]</sup>以酶法为基础进行多酚提取,提取过程中酶解植物细胞壁不彻底,引起多酚溶出较少,导致多酚得率较低.刘静等<sup>[26]</sup>优化核桃分心木多酚超声辅助提取工艺参数为料液比 1:62 g/mL,乙醇浓度 50%,超声时间 50 min,超声温度 71 °C,多酚得率为 6.98%.此外,陈冠林等<sup>[27]</sup>优化分心木多酚提取工艺,确定多酚提取的较优工艺组合为料液比 1:40 g/mL,乙醇浓度 30%,超声时间 15 min,提取温度 50 °C,多酚得率为 56.46 mg/g,较本研究结果多酚得率偏低,其原因可能是粉碎粒度不同.本研究粉碎过 60 目筛,而陈冠林等<sup>[27]</sup>研究中仅过 20 目筛,分心木样品颗粒直径较大,提取过程中乙醇溶剂浸提多酚不完全,而且所用乙醇浓度和提取温度偏低,依据相似相溶原理,乙醇和多酚均具有羟基基团,是极性物质,30%乙醇极性较强,与多酚极性相差较大,提取温度偏低,浸提过程中分子运动较弱,扩散较慢,直至浸提结束尚有部分多酚物质未渗入浸提溶剂.综上,本研究得出的较优工艺与李瑞等<sup>[25]</sup>相比,处理温度适当,多酚得率增加显著,避免了酶解细胞组织不充分的技术弊端,而且所用料液比较小,利于试验后期开展多酚纯化工作.与刘静等<sup>[26]</sup>相比,料液比、乙醇浓度和多酚得率相差不大的情况下,大大缩短了处理时间,节约了提取成本,并且本研究所采用的处理温度较为妥当,避免处理温度过高破坏了多酚物质结构后易引起其氧化.与陈冠林等<sup>[27]</sup>相比,虽然采用的提取技术参数均相对较高,但却可以提高分心木多酚得率,具有一定的优越性.

### 3.2 核桃分心木多酚抗氧化能力

自由基是未配对电子,含有 1 个或多个活性分子,通过破坏蛋白质、核酸及脂质等引发多种疾病,而抗氧化剂能有效清除体内产生的自由基,进而降低氧化应激反应以防止细胞损伤,减轻自由基对人体健康的伤害.核桃分心木中含有黄酮、酚酸类等化合物赋予其显著的抗氧化能力.本研究发现超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )均可被分心木多酚清除,羟基自由基清除能力弱于超氧阴离子,这一发现与王新然<sup>[18]</sup>研究结果一致.赵娟娟<sup>[28]</sup>发现分心木黄酮浓度为 2 mg/mL 时,对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的最大清除率分别为 36.90%,66.20%,而本研究得出分心木多酚对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  最大清除率分别为 52.47%,14.88%.综上所述可知,分心木多酚虽具有一定抗氧化能力,然而其抗氧化活性与单体酚化学结构关系密切,羟基数目的多少、羟基位置的变化及羰基结构的差异、糖苷键的不同位置等均会对多酚抗氧化能力产生影响.

### 3.3 核桃分心木多酚种类

陈冠林等<sup>[27]</sup>从核桃分心木中鉴定出 14 种单体酚,与本研究共有的单体酚为儿茶素、芦丁、没食子酸,本研究中儿茶素质量分数是陈冠林等<sup>[27]</sup>的 4.72 倍,而芦丁和没食子酸质量分数均低于陈冠林等<sup>[27]</sup>的研究结果.此外,陆胜波等<sup>[29]</sup>从泡核桃的根,枝,叶,果实(青皮、内种皮、去皮种仁)中共检测到 14 种多酚物质,与本研究共有的单体酚为儿茶素、芦丁、没食子酸和槲皮素.本研究中儿茶素质量分数高于陆胜波等<sup>[29]</sup>的研究结果;芦丁质量分数高于枝条、青皮及去皮种仁,低于根、叶及内种皮且差异较大;没食子酸质量分数低于内种皮,高于其余组织;槲皮素质量分数与去皮种仁接近,但明显低于叶和内种皮.综上所述可知,不同泡核桃组织器官单体酚的组成及质量分数是存在差异的,这可能与处理方式、品种差异及地域、气候、海拔等因素有关,多酚物质具有明显的器官特异性.

## 4 结论

通过多元二次回归方程模型对核桃分心木多酚提取工艺进行拟合,得出的优化工艺参数可靠,说明该模型可以较好地模拟和预测核桃分心木中多酚的提取效果.本研究得出的较佳工艺参数与前人研究相比,在保证多酚得率的基础上节约了提取成本.基于超声处理过程中产生的各种叠加效应强化了植物多酚的提取效果,在一定程度上克服了部分提取技术的缺陷.此外,核桃分心木酚类物质鉴定仅用高效液相色谱分析存在一定局限性,后期研究可进行液质联用、气质联用及核磁共振联用质谱等更为先进的技术.此外还应关注核桃分心木发育过程中多酚物质的合成与积累,从有关基因表达和酶活等分子水平上探索其代谢途

径和调控机理. 以细胞氧化应激模型评价天然产物的抗氧化活性是一种低成本且直观反应抗氧化损伤效果的方法. 本研究中分心木多酚对超氧阴离子、羟基自由基均可清除, 然而二者的清除效果却有所不同. 丁建英等<sup>[20]</sup>研究了枇杷叶多酚的抗氧化活性; 王鹏等<sup>[30]</sup>研究了普通枇杷与野生枇杷总黄酮、总酚及抗氧化活性; 邹灵秀等<sup>[31]</sup>研究了白藜芦醇对兔成纤维细胞氧化应激损伤的保护作用. 通过对体外清除自由基和细胞水平的研究, 可以在一定程度上反应天然产物的抗氧化效应, 从而为后续分子机制的研究提供依据. 后期可开展核桃分心木中单体酚的抗氧化能力及其构效关系的研究. 此外, 在细胞研究的基础上再通过动物试验, 在日粮中添加一定剂量的天然抗氧化剂来缓解和修复氧化应激造成的伤害, 从而为天然抗氧化剂在生产实践中的应用奠定基础.

## 参考文献:

- [1] 洪茜茜, 叶永丽, 张银志, 等. 核桃分心木化学成分及功能活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 194-202.
- [2] 常君, 姚小华, 张亚波, 等. 松针刺盘孢菌侵染对薄壳山核桃不同抗性品种酶活性和酚类物质的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2022, 44(3): 52-58.
- [3] 缪福俊, 宁德鲁. 核桃多酚类物质生物活性研究进展 [J]. 中国油脂, 2021, 46(1): 48-51.
- [4] LONG G Q, WANG J, MIN D Y, et al. Research Progress on Flavonoids from the Roots of *Sophora Flavescens* Alt. and their Biological Activities [J]. Asian Journal of Traditional Medicines, 2021, 16(6): 385-397.
- [5] PANJA P. Green Extraction Methods of Food Polyphenols from Vegetable Materials [J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 23(10): 173-182.
- [6] CUJIC N, SAVIKIN K, JANKOVIC T, et al. Optimization of Polyphenols Extraction from Dried Chokeberry Using Maceration as Traditional Technique [J]. Food Chemistry, 2016, 194(3): 135-142.
- [7] AMIRABBASI S, ELHAMIRAD A H, SAEEDIASL M R, et al. Optimization of Polyphenolic Compounds Extraction Methods from Okra Stem [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15(1): 717-734.
- [8] FOGARASI M, SOCACIU M I, SÂLÂGEAN C D, et al. Comparison of Different Extraction Solvents for Characterization of Antioxidant Potential and Polyphenolic Composition in *Boletus Edulis* and *Cantharellus Cibarius* Mushrooms from Romania [J]. Molecules, 2021, 26(24): 7508.
- [9] SELVAKUMAR P, SIVASHANMUGAM P. Studies on the Extraction of Polyphenolic Compounds from Pre-consumer Organic Solid Waste [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2020, 82(10): 130-137.
- [10] SUNGPUD C, PANPIPAT W, YOON A S, et al. Ultrasonic-assisted Virgin Coconut Oil Based Extraction for Maximizing Polyphenol Recovery and Bioactivities of Mangosteen Peels [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(11): 4032-4043.
- [11] JOSÉ ALIANO GONZÁLEZ M, CARRERA C, BARBERO G F, et al. A Comparison Study between Ultrasound-assisted and Enzyme-assisted Extraction of Anthocyanins from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) [J]. Food Chemistry: X, 2021, 13(3): 100192.
- [12] MONTES L, VERDU MG, HINOJOSA I, et al. Impact of Drying on the Sodium Alginate Obtained after Polyphenols Ultrasound-assisted Extraction from *Ascophyllum Nodosum* Seaweeds [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 272(11): 118455.
- [13] FERNANDES F A N, FONTELES T V, RODRIGUES S, et al. Ultrasound-assisted Extraction of Anthocyanins and Phenolics from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Peel: Kinetics and Mathematical Modeling [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(6): 2321-2328.
- [14] BEGUM Y A, DEKA S C. Ultrasound-assisted Extracted Dietary Fibre from Culinary Banana Bract as Matrices for Anthocyanin: Its Preparation, Characterization and Storage Stability [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(6): 2354-2363.

- [15] SHENG F, HU B Y, JIN Q, et al. The Analysis of Phenolic Compounds in Walnut Husk and Pellicle by UPLC-Q-Orbitrap HRMS and HPLC [J]. *Molecules*, 2021, 26(10): 3013.
- [16] 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.
- [17] 杨喆, 万山, 张乔会, 等. 响应面法优化山杏核壳总黄酮提取工艺及其抗氧化性的研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(6): 279-284.
- [18] 王新然. 核桃瓣膜多酚类化合物组成及生物活性分析 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- [19] 史斌斌, 张文娥, 李雪, 等. 铁核桃叶片多酚类物质含量及其抗氧化活性 [J]. *园艺学报*, 2017, 44(1): 23-32.
- [20] 丁建英, 王晓飞, 张丽, 等. 枇杷叶多酚超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化性分析 [J]. *南方农业学报*, 2018, 49(2): 340-347.
- [21] JORGEE P A Z. Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Native Plants in the Mexican Desert [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015, 22(1): 474-481.
- [22] KUMAR A, RAO P S. Optimization of Pulsed-mode Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Pomegranate Peel Using Response Surface Methodology [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14(6): 3493-3507.
- [23] BOCHI V C, BARCIA M T, RODRIGUES D, et al. Polyphenol Extraction Optimisation from Ceylon Gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) Pulp [J]. *Food Chemistry*, 2014, 164(12): 347-354.
- [24] ZIVKOVIC J, ŠAVIKIN K, JANKOVIĆ T, et al. Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Pomegranate Peel Using Response Surface Methodology [J]. *Separation and Purification Technology*, 2018, 194(4): 40-47.
- [25] 李瑞, 梁永林, 阚欢, 等. 响应面法优化云南核桃分心木多酚提取工艺 [J]. *西南林业大学学报(自然科学)*, 2021, 41(2): 159-165.
- [26] 刘静, 黄慧福, 刘继华, 等. 响应面优化核桃分心木多酚超声辅助提取工艺 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(23): 155-160, 191.
- [27] 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, 95.
- [28] 赵娟娟. 分心木黄酮超声-微波协同提取及抗氧化性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(18): 70-76.
- [29] 陆胜波, 史斌斌, 张文娥, 等. 泡核桃不同器官多酚类物质组分及含量差异分析 [J]. *经济林研究*, 2020, 38(2): 104-113.
- [30] 王鹏, 刘明秀, 李晓林, 等. 普通枇杷与野生枇杷总黄酮、总酚及抗氧化活性分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(12): 33-39.
- [31] 邹灵秀, 陈谌, 杨小玲, 等. 白藜芦醇对兔成纤维细胞氧化应激损伤的保护作用研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(5): 51-56.

责任编辑 周仁惠