

不同产地核桃隔膜、种皮及壳中黄酮含量的比较

冯 荣¹, 庞克坚², 唐 辉¹, 刘新豫¹, 李慧芳¹

(1. 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 石河子大学 药学院, 新疆 石河子 832002;

2. 和田维吾尔药业有限责任公司, 新疆 和田 838000)

摘 要:采用超声提取法提取不同产地核桃不同部位总黄酮,以木犀草苷为对照品,采用 HPLC 法和比色法测定提取物中木犀草苷和总黄酮含量,比较不同产地核桃隔膜、种皮及壳中木犀草苷及总黄酮的含量差异,为药用核桃的道地性及药用部位提供依据。结果表明:不同产地核桃中木犀草苷含量为长治>和田>阿克苏>塔里木>大理>秦岭,总黄酮含量为大理>秦岭>和田>塔里木>长治>阿克苏。核桃不同组织部位中木犀草苷的分布为种皮>壳>隔膜,不同组织部位中总黄酮的分布为壳>种皮>隔膜。表明,不同产地核桃的黄酮成分含量有差别,山西核桃木犀草苷含量最高,但总黄酮含量最低;云南核桃总黄酮含量最高,但木犀草苷含量很低。核桃种皮中木犀草苷及总黄酮含量要高于隔膜中的,核桃种皮可能和隔膜有相似的药理活性,同样具有很好的药用价值。

关键词:核桃壳;核桃隔膜;核桃种皮;木犀草苷;黄酮

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)15-0027-04

核桃的食用及药用价值很高,中医学普遍认为核桃性温、味甘、无毒,有健胃、补血、润肺、养神等功效^[1]。核

桃隔膜作为新疆维吾尔族特色药物具有补肾壮阳、固涩生津的作用^[2],王国军等^[3]采用优化后超声工艺提取核桃隔膜总黄酮,并证实核桃隔膜总黄酮对雄性昆明小鼠的肾虚有很好的改善作用。余旭亚等^[4]比较了核桃仁与核桃油中总黄酮的含量,核桃仁、核桃油及核桃粕中总黄酮含量分别为 0.47%、0.27%、0.20%。荣瑞芬等^[5]测定了每 100 g 核桃仁皮、去皮核桃仁中分别含有 1.038、0.083 g 总酚,0.744、0.419 g 总黄酮。张春梅

第一作者简介:冯荣(1991-),女,硕士研究生,研究方向为药物分析学。E-mail:409007049@qq.com.

责任作者:唐辉(1967-),女,博士,教授,研究方向为药物分析及新药研究。E-mail:th_pha@shzu.edu.cn.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2008ZJ14)。

收稿日期:2016-04-18

Effect of Soil Ammonia Volatilization of Different Nitrogen Treatments on Seed Germination and Early Seedling Growth of the Radish

WANG Qingfang, YUAN Weiling, DENG Xiaohui, GAN Caixia, CUI Lei

(Institute of Economic Crop, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract: Radish was used as test material, in the case of urea fertilizer, soil ammonia volatilization and the effect of the ammonia toxicity on seed germination percentage and early seedling growth with the application of urease inhibitors NBPT, PPD and HQ were studied, to provide reference for nitrogen use efficiency for field. The results showed that application of urease inhibitors significantly reduced soil ammonia volatilization, promoted seed germination and early seedling growth of radish. NBPT was the most effective inhibitor, followed by PPD and HQ. Root growth of the radish was more seriously inhibited by ammonia volatilization than shoot growth, suggesting that the roots of the radish were more sensitive to ammonia toxicity than the shoots. Therefore, application of urease inhibitors, reducing rate of urea applied at sowing significantly alleviated ammonia toxicity of the radish to some extent, improved the germination rate of the radish and promoted its growth.

Keywords: radish; ammonia volatilization; urease inhibitors; seed germination; early seedling growth

等^[6]比较了3种云南核桃中黄酮及多酚含量,云南麻核桃内种皮、云南米甸核桃内种皮、云南草果核桃内种皮酚类含量分别为57.58%、31.25%、24.01%,黄酮化合物的含量分别为15.48%、17.33%、15.23%。周晔^[7]比较测定了不同品种核桃内种皮总多酚及总黄酮的含量,张鹏飞等^[8]比较了不同品种核桃鲜样种皮及干样种仁(带种皮)中总酚的含量。但是目前关于核桃隔膜道地性及不同组织部位中黄酮分布的相关研究尚鲜见报道。该试验就以上问题做了主要研究,通过HPLC及比色法测定了不同产地核桃隔膜、种皮及壳中木犀草苷及总黄酮的含量差异,初步探究了核桃的道地性及不同组织部位的药用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为山西长治、新疆和田、新疆阿克苏、新疆塔里木、云南大理和陕西秦岭核桃,食用乙醇(浓度>90%)、乙腈和甲醇(色谱级,Fisher公司)、木犀草苷标准品(上海融禾医药科技有限公司,纯度>99%,批号:130116)。岛津UV-2600紫外可见分光光度计,上海科导SK5200HP超声清洗器,BP211D型电子分析天平(德国Staotious),Agilent 1100高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 试验方法

取不同产地的核桃隔膜、核桃种皮及核桃壳粉碎后过80目筛,采用课题组前期研究方法^[9]优化提取总黄酮,60%乙醇、料液比1:20 g·mL⁻¹、30℃超声30 min,循环提取3次,合并提取液旋蒸干燥,称重,放置在干燥器中备用,计算总黄酮得率,得率对比见图1。总黄酮得率(%)=提取物质量/原料质量×100。采用HPLC法测定各提取物中木犀草苷的含量,采用比色法测定提取物中总黄酮的含量。

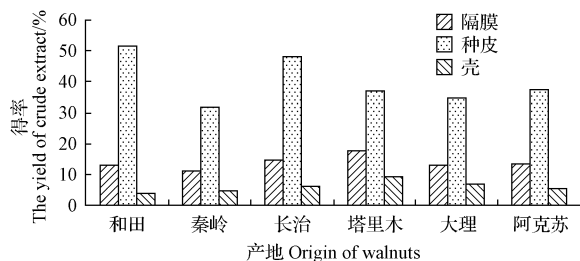


图1 得率对比

Fig. 1 The yield of crude extract figure

1.3 项目测定

1.3.1 供试品中木犀草苷含量的测定 1)HPLC条件的建立:色谱条件为Waters C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)和0.2%甲酸水(B)梯度洗脱(0~10 min:14%~24% A,10~20 min:24%~39% A),

检测波长254 nm;温度25℃;流速1.0 mL·min⁻¹;进样量20 μL。色谱见图2。2)木犀草苷标准曲线的绘制:精密称取木犀草苷1.16 mg用甲醇定容至10 mL,分别配制浓度为11.60、34.80、58.00、81.20、116.00 μg·mL⁻¹的对照品。使用HPLC检测后,绘制标准曲线方程:Y=53.475X+198.51 (r=0.999 5)。表明木犀草苷浓度在11.60~116.00 μg·mL⁻¹的浓度范围内线性关系良好。3)精密度的试验:取浓度为29.00 μg·mL⁻¹的木犀草苷溶液连续进样6次,比较其峰面积,RSD值为1.78%,表明精密度良好。4)重复性试验:从浓度为116.00 μg·mL⁻¹的溶液中分别平行移取0.4 mL溶液6次,分别用甲醇定容至10 mL,检测峰面积,计算RSD值为3.24%,表明可重复性好。5)稳定性试验:取浓度为29.00 μg·mL⁻¹的对照品溶液分别在1、3、5、7、9、11、24 h进样,HPLC分析检测,计算RSD值为3.34%,表明样品在24 h内稳定,方法的稳定性良好。6)加样回收率试验:精密称取约10 mg左右的样品用甲醇定容至10 mL,测定木犀草苷含量,分别往样品溶液中加入浓度为58.00 μg·mL⁻¹的对照品溶液2 mL,测定溶液中木犀草苷含量。计算加样回收率平均值为100.4%,RSD值为5.13%,表明该方法准确可靠。

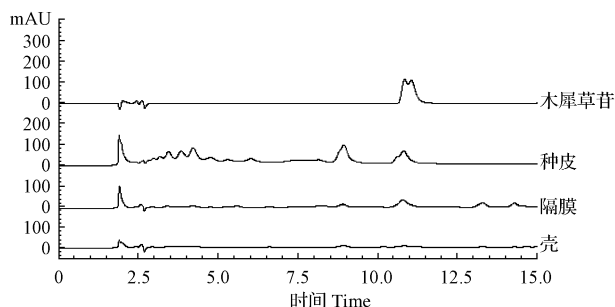


图2 木犀草苷对照品和不同组织部位色谱图

Fig. 2 HPLC figure of the test samples

1.3.2 比色法测定总黄酮含量 1)对照品溶液的制备:精密称取木犀草苷对照品8.02 mg用甲醇定容至10 mL容量瓶中,作为木犀草苷对照品储备液,于4℃冰箱中贮存备用。2)供试品溶液的配制:分别精密称取不同产地不同组织部位的总黄酮提取物约10 mg,用甲醇定容至10 mL备用。3)显色溶液的配制:精密移取木犀草苷对照品溶液或样品溶液各2 mL,至25 mL容量瓶中,加5%亚硝酸钠溶液0.70 mL,摇匀后静置5 min,再加10%硝酸铝溶液1.20 mL,摇匀静置12 min,最后加12.0 mL 4%氢氧化钠溶液振摇后用水定容至25 mL,静置5 min即得显色溶液。4)测定波长的选择:移取对照品溶液和不同产地提取物样品溶液各2 mL,按显色溶液的方法配制,在200~800 nm波长范围分别扫描显色前和显色后的谱图,选择510 nm处为固定波长,记录该波长下各显色溶液的吸光度值。5)标准曲线的绘制:精密移取不同

体积对照品原液分别配制浓度为 100.5、201.0、301.5、402.0、502.0、595.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对照品按照显色溶剂的方法配制,在 510 nm 下测定不同浓度的吸光度值,并根据浓度和吸光度值的关系进行线性回归,线性方程为 $Y=0.0014X+0.0437$ ($r=0.9992$)。6)精密度试验:取同一浓度供试品溶液,按显色溶液配制后测定吸光度值,重复 6 次,RSD 为 1.03%。7)重复性试验:称取同批次供试品约 10 mg 6 份,甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,按显色溶液配制后测定吸光度值,RSD 值为 1.74%,表明重复性良好。8)稳定性试验:取重复性试验后得显色溶液分别在显色 10、20、30、40、50、60 min 测定显色溶液的吸光度值,其 RSD 值为 9.04%,表明样品在 60 min 内稳定,该方法稳定可行。9)加样回收率试验:精密移取已知总黄酮含量的样品溶液 1.0 mL,至 25 mL 容量瓶中,分别加入浓度为 100.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 0.5 mL,按显色溶液方法配制,并根据加样回收率公式计算,回收率平均值为 100.2%,RSD 值为 3.06%。

2 结果与分析

2.1 不同部位木犀草苷的含量测定

分别精密称取约 10 mg 左右供试品用甲醇定容到 10 mL。并根据木犀草苷标准曲线方程计算木犀草苷的含量(表 1),根据提取物木犀草苷含量求算不同产地核桃中木犀草苷在不同组织部位的分布。由图 3 可知,不同产地隔膜中木犀草苷含量:大理>塔里木>秦岭>长治>和田>阿克苏;不同产地种皮中木犀草苷含量:长治>和田>阿克苏>塔里木>秦岭>大理;不同产地壳中木犀草苷含量:大理>秦岭>和田>长治>塔里木>阿克苏。

表 1 不同产地不同部位提取物中木犀草苷及总黄酮的含量($n=3$)

Table 1 The content of Luteolin-7-O- β -D-glucoside and total flavonoids in walnut extracts from different parts and different regions($n=3$)

产地	部位	木犀草苷含量百分比	相对标准偏差 RSD/%	总黄酮含量百分比	相对标准偏差 RSD/%
和田	隔膜	25.45 \pm 0.33	1.28	27.83 \pm 0.82	0.83
	种皮	28.31 \pm 0.39	1.39	22.59 \pm 0.71	2.96
	壳	26.45 \pm 0.36	1.36	45.45 \pm 0.71	3.16
秦岭	隔膜	23.45 \pm 0.22	0.96	28.31 \pm 0.71	1.57
	种皮	30.69 \pm 0.37	1.22	21.16 \pm 0.72	2.52
	壳	31.87 \pm 0.10	0.30	34.50 \pm 1.09	3.38
长治	隔膜	32.91 \pm 0.35	1.08	28.55 \pm 0.41	3.16
	种皮	49.87 \pm 0.35	0.69	12.35 \pm 0.42	1.44
	壳	28.41 \pm 0.33	1.14	54.26 \pm 0.41	3.34
塔里木	隔膜	33.15 \pm 0.49	1.46	32.83 \pm 0.43	0.76
	种皮	30.28 \pm 0.40	1.31	22.59 \pm 0.71	1.26
	壳	27.04 \pm 0.28	1.02	40.45 \pm 0.71	3.16
大理	隔膜	18.57 \pm 0.36	1.96	26.64 \pm 0.42	1.77
	种皮	27.44 \pm 0.24	0.89	24.73 \pm 0.71	1.55
	壳	41.79 \pm 0.15	0.37	50.45 \pm 0.71	2.89
阿克苏	隔膜	18.59 \pm 0.40	2.16	34.74 \pm 1.24	1.42
	种皮	45.59 \pm 0.48	1.04	14.25 \pm 0.41	3.56
	壳	31.06 \pm 0.24	0.76	27.83 \pm 0.82	2.89

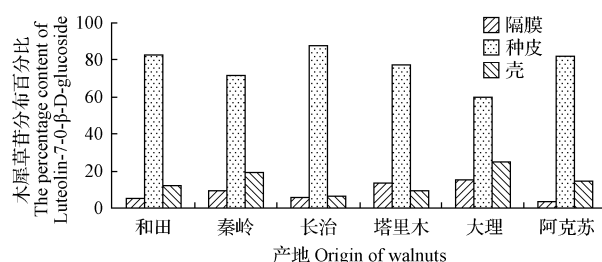


图 3 木犀草苷在核桃不同组织部位的分布

Fig. 3 Walnut different tissue distribution of Luteolin-7-O- β -D-glucoside

中木犀草苷含量:大理>秦岭>阿克苏>和田>塔里木>长治;核桃不同组织部位中木犀草苷的分布:种皮>壳>隔膜。

2.2 供试品中总黄酮的测定

分别精密称取约 10 mg 不同产地的核桃隔膜,种皮及核桃壳的提取物各 3 份至 10 mL 容量瓶中甲醇定容后备用,按照总黄酮标准曲线计算不同组织部位总黄酮含量(表 1),不同部位总黄酮分布见图 4,不同产地核桃中总木犀草苷及总黄酮含量比较见图 5。可以看出,不同产地隔膜中总黄酮含量:塔里木>长治>阿克苏>大理>秦岭>和田;不同产地种皮中总黄酮含量:阿克苏>长治>塔里木>和田>秦岭>大理;不同产地壳中总黄酮含量:大理>秦岭>和田>长治>塔里木>阿克苏;核桃不同部位中总黄酮分布:壳>种皮>隔膜。

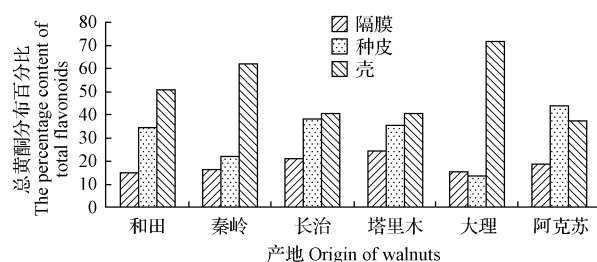


图 4 核桃不同组织部位总黄酮的分布

Fig. 4 Walnut different tissue distribution of total flavonoids

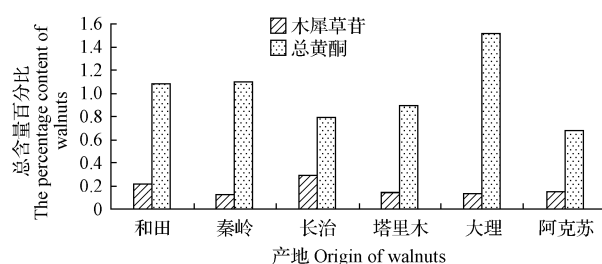


图 5 不同产地核桃中总木犀草苷及总黄酮含量对比

Fig. 5 Different origin of walnut Luteolin-7-O- β -D-glucoside and total flavonoids content contrast

比较不同产地核桃中木犀草苷及总黄酮的含量可知,不同产地核桃总木犀草苷含量:长治>和田>阿克苏>塔里木>大理>秦岭;不同产地核桃总黄酮含量:大理>秦岭>和田>塔里木>长治>阿克苏。

3 讨论

该试验根据课题组前期工作结果,采用超声法提取总黄酮,比较其得率高低为种皮>隔膜>壳。

相关研究证明^[10],核桃隔膜有很好的补肾壮阳活性,而核桃种皮中木犀草苷及总黄酮的含量都大于隔膜中的含量,由此推测核桃种皮的药理活性可能和核桃隔膜的药理活性相似,可能具有很好的补肾壮阳活性,所以核桃种皮可能具有很好的研究价值,研究结果表明,核桃种皮可以考虑代替维药核桃隔膜临床药用替代品。该课题研究还发现,不同产地核桃隔膜中阿克苏地区隔膜比重较大,品质佳,总黄酮含量最高。

而核桃壳在核桃组织结构占一半的量,多用来作为吸附材料或提取色素,但是极其不易粉碎,且提取物得率低,提取过程复杂困难,因此不适合药用。

参考文献

- [1] 赵登超,王钧毅,韩传明,等.不同品种核桃仁脂肪含量及脂肪酸组成与成分分析[J].华北农学报,2009(24):295-298.
- [2] 茹克娅·沙德克.维吾尔医常用药材学(下册)[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:323.
- [3] 王国军,关丽,王幻,等.核桃隔膜不同提取物中黄酮类物质的含量测定[J].食品科技,2013,38(11):289-293.
- [4] 余旭亚,陈朝银,王洪钟,等.核桃仁与核桃油总黄酮含量比较研究[J].食品开发与研究,2002,23(6):25-26.
- [5] 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.
- [6] 张春梅,陈朝银,林玉萍,等.几种云南核桃内种皮黄酮及多酚含量测定[J].云南中医学院学报,2013,36(2):10-13.
- [7] 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.
- [8] 张鹏飞,赵志远,宋宇琴,等.核桃果实内总酚含量的分析研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2013,33(3):324-341.
- [9] 张淑兰,王国军,唐辉,等.核桃隔膜中总黄酮的提取工艺优选黄酮类物质的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):50-52.
- [10] 关丽,张淑兰,王国军,等.核桃隔膜不同极性部位对肾虚小鼠的影响[J].兵团医学,2013,38(4):41-44.

Comparison of Content of Flavonoid in Diaphragma Kernel Pellicle and Shell of *Juglans regia* From Different Areas

FENG Rong¹, PANG Kejian², TANG Hui¹, LIU Xinyu¹, LI Huifang¹

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education/School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002; 2. Xinjiang Hotan Uighur Medicine Limited Liability Company, Hotan, Xinjiang 838000)

Abstract: To compare the difference in content of flavonoids in diaphragma kernel pellicle and shell of *Juglans regia* from different regions, and determine the content of Luteolin-7-O- β -D-glucoside in three different parts of walnut. HPLC was used to establish content of Luteolin-7-O- β -D-glucoside in three extracts, and colorimetry were used to compare the content of total flavonoids in the samples. The results showed that, the content of Luteolin-7-O- β -D-glucoside in different producing area of walnut was Changzhi>Hotan>Akesu>Tarim>Dali>Qinling, the content of total flavonoids: Dali>Qinling>Hotan>Tarim>Changzhi>Akesu. The content of Luteolin-7-O- β -D-glucoside in different parts of walnut: kernel pellicle>shell>diaphragma. The content of total flavonoids: shell>kernel pellicle>diaphragma. There were some differences of contents of total flavonoids in different regions, the walnuts of Shanxi content of Luteolin-7-O- β -D-glucoside was generally higher than other regions, but the content of total flavonoids was the least. The walnuts of Yunnan content of total flavonoids was higher than other regions, but the Luteolin-7-O- β -D-glucoside was less. Kernel pellicle might had similar pharmacological activity as diaphragma of *Juglans regia*, because it contained higher flavonoids and had good medicinal value as well.

Keywords: shell of *Juglans regia*; diaphragma of *Juglans regia*; kernel pellicle of *Juglans regia*; Luteolin-7-O- β -D-glucoside; flavonoid