

超声处理核桃仁及其提取物的抗氧化性分析

李笑笑, 张文斌*, 杨瑞金 (江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的]提取活性较高的核桃多酚,提高核桃的利用价值。[方法]采用添加0.05 mol/L盐酸的70%乙醇溶液超声辅助的方法处理核桃仁, Folin-Ciocalteu法测定总酚含量,并测定其清除自由基能力及铁离子还原能力表征抗氧化活性。[结果]4次超声提取(65℃, 10 min)的核桃多酚提取液多酚含量为(12.03±0.16) mg/g,核桃仁中的多酚残留量为0.38 mg/g,低于碱处理后的核桃仁多酚残留量。此外,核桃多酚提取物在清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基能力及铁离子还原能力均高于叔丁基对苯二酚(TBHQ)、V_C和V_E。[结论]酸化乙醇超声处理核桃仁不仅可以有效去除核桃多酚,还为食品工业提供了高活性的天然抗氧化剂。

关键词 核桃仁;多酚;抗氧化活性;超声提取

中图分类号 TS201.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)19-090-04

Ultrasonic Extraction of Walnut (*Juglans regia* L.) Kernel and Analysis of the Oxidation Resistance of the Extracts

LI Xiao-xiao, ZHANG Wen-bin*, YANG Rui-jin (College of Food, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective] To extract polyphenols from *Juglans regia* L. with relatively high activity, and to enhance the utilization value of *J. regia*. [Method] Ultrasonic extraction was applied directly to process *J. regia* kernel by adding 70% ethanol containing 0.05 mol/L hydrochloric acid. The total phenol content was measured by Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was evaluated using free radicals scavenging capacity and iron ion reducing ability. [Result] As for the four times ultrasonic extraction (65℃, 10 min) of *J. regia* extracting solution, polyphenols content was (12.03±0.16)mg/g walnut kernel; The remained polyphenols in the kernel was 0.38 mg/g walnut kernel, which was lower than that in walnut kernel treated with conventional alkali soaking method. Compared with t-butyl hydroquinone (TBHQ) and vitamin C, walnut polyphenol extract showed superior antioxidant capacity in terms of scavenging free radicals and reducing iron ion. [Conclusion] Direct ultrasonic extraction of walnut kernel not only removed polyphenols with high efficiency but also provided potential antioxidant additive for food industry.

Key words Walnut kernels; Polyphenols; Antioxidant activity; Ultrasonic extraction

核桃又名胡桃(*Juglans regia* L.),具有较高的营养价值和保健功能。我国是世界上核桃栽培面积和产量最高的国家,具有巨大的资源优势^[1]。核桃仁中除含有丰富的不饱和脂肪酸、优质蛋白质和少量的碳水化合物外,还含有丰富的具有生理活性的多酚类物质。多酚类物质是高质量抗氧化剂^[2],能很好地保护心脏机能健康,预防心脏功能疾病^[3-4]。Škerget M等^[5]研究表明,核桃仁中对人体有益的多酚类物质主要集中在种皮部分,而在无种皮的核桃仁中酚酸类物质的种类和含量都显著减少。去种皮是核桃深加工工艺流程中的第1个关键步骤,吴世兰等^[6]对传统核桃仁碱液去皮过程中营养成分动态变化的研究表明:碱液去皮后,不仅核桃仁颜色不佳,核桃仁的营养成分明显降低,并且碱液去皮工艺产生了大量的工业废水,远远超过了国家2级污水排放标准,所以碱液去皮工艺还存在诸多不足,新的去皮工艺还有待开发研究。随着人们生活水平的提高和思想观念的转变,植物多酚因其天然环保的特性而备受人们青睐。植物多酚被证实具有清除自由基、抵抗紫外辐射、抗胁迫以及消除镇痛等多种抗氧化活性的功能^[7-8]。目前,植物源天然抗氧化剂的研究与开发已成为当今功能食品与添加剂领域的重要发展方向^[9]。笔者以酸化乙醇处理核桃仁,可以提取出活性较高的核桃多酚,提高了核桃的利用价值,并且使核桃种皮变废为宝,做到经济效益、社会效益和环境效益

统一。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 核桃仁,乌鲁木齐亚心红商贸有限公司;95%乙醇、盐酸、丙酮、无水碳酸钠、吐温-80、氯仿、三氯乙酸、三氯化铁、铁氰化钾、过硫酸钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠等,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;Folin-Ciocalteu试剂、叔丁基对苯二酚(TBHQ)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、胡萝卜素、V_E,Sigma公司。

1.2 仪器设备 RV10型旋转蒸发仪,广州仪科实验技术有限公司;101-1-B型电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医疗器械厂;KQ5200DE型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;SZC-101型脂肪测定仪,上海纤检仪器有限公司;TGL-16M型冷冻离心机,上海卢液离心机仪器有限公司;A11型研磨机,德国IKA公司;UV-1100紫外/可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;DELTA320型pH计,上海梅特勒公司;M5型酶标仪,美国Molecular Devices公司。

1.3 方法

1.3.1 核桃种皮多酚的超声提取。挑选大小均一、颗粒饱满的核桃仁,按照1:5的料液比,将核桃仁放入用0.05 mol/L盐酸酸化的70%乙醇溶液中,65℃条件下,超声提取10 min,将提取液取出后迅速冷却,再重复提取3次,将4次的提取液合并,过滤2次后保存于-80℃备用。

1.3.2 碱脱皮方法。根据刘森的方法^[10]略作修改,按照1:5的料液比将干净的核桃仁加入到浓度0.9%的氢氧化钠溶液中,浸泡温度78℃,期间不断搅拌,浸泡5 min后取出并迅速

基金项目 国家自然科学基金项目(31401635);国家“863”计划研究项目(2013AA102014)。

作者简介 李笑笑(1989-),女,河南巩义人,硕士研究生,研究方向:食品加工与配料。*通讯作者,副教授,从事食品加工与配料研究。

收稿日期 2016-04-18

用流水冲洗干净。

1.3.3 核桃仁残留多酚的提取。准确称取 2 g 分别经上述 2 种方法处理的核桃脱脂样品于离心管中,加入 20 mL 的 80% 丙酮,将管盖拧紧并混匀,然后超声 30 min,超声期间加入冰块保持低温,每隔 2 min 取出涡旋混匀,超声之后 6 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,所有提取过程再重复 2 次,合并 3 次的提取液,45 °C 旋蒸后冷冻干燥,粉末用 70% 甲醇定容至 2 mL,保存于 -80 °C 待用。每个样品共提取 3 份^[11]。

1.3.4 核桃多酚含量的测定^[12]。采用 Folin - Ciocalteu 法进行测定,移取 100 μL 核桃多酚提取液于 10 mL 比色管中,加入 500 μL Folin - Ciocalteu 试剂及 2.5 mL Na₂CO₃ 溶液 (20%, W/V),蒸馏水定容。室温避光静置 1 h 后测定反应液在波长 725 nm 处的吸光值。以同体积的标准溶液代替样品溶液进行测定,制作标准曲线,最终结果表示为 1 g 核桃仁相当于没食子酸的毫克数 [(mg(没食子酸)/g(核桃仁))]

1.3.5 DPPH 自由基清除能力的测定^[13-14]。将处理过的核桃多酚提取液样品,以 TBHQ、V_C、V_E 为对照,用 95% 乙醇配制成质量浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/mL 的溶液。取上述各溶液 0.1 mL,加入 3.9 mL 60 μmol/L DPPH(乙醇配制),充分混匀,37 °C 保温 60 min。以 95% 乙醇为空白对照,在波长 517 nm 处测定其吸光值,样品吸光值记做 A_C,空白对照记做 A_i,求清除率(RSA_{DPPH})。

$$RSA_{DPPH}(\%) = \frac{A_C - A_i}{A_C} \times 100\%$$

1.3.6 ABTS 自由基清除能力的测定^[15]。取 7 mmol/L ABTS 乙醇溶液 50 mL 和 5 mmol/L 过硫酸钾乙醇溶液 50 mL,混合,室温避光静置 12 h,作为反应贮备液,然后用 70% 乙醇稀释,使其吸光值在波长 734 nm 处为 0.70 ± 0.02;将处理过的核桃多酚提取液样品,以 TBHQ、V_C、V_E 为对照,用 70% 乙醇配成浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/mL 的溶液。取各样品溶液 0.1 mL,加入 3.9 mL 反应贮备,混合,室温避光 6 min,在 734 nm 波长处测其吸光值(A_s),以 70% 乙醇溶液作为对照(A_C),则其 ABTS 的清除率(RSA_{ABTS})。

$$RSA_{ABTS} = \frac{A_C - A_s}{A_C} \times 100\%$$

1.3.7 铁离子还原能力的测定^[16]。将处理过的核桃多酚提取液样品,用蒸馏水配成浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/mL 的溶液。各取 2 mL,加入 2 mL 0.2 mol/mL pH 6.6 磷酸盐缓冲溶液和 2 mL 1% 铁氰化钾溶液,充分混匀,50 °C 水浴 20 min;取出待测样,加入 2 mL 10% 三氯乙酸溶液;得到的反应混合液,于 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 4 mL,加入 4 mL 蒸馏水和 0.8 mL 0.1% 三氯化铁溶液,振荡混合均匀,在 700 nm 波长处测定其吸光值。

1.3.8 抗脂质过氧化能力的测定。取 0.2% β - 胡萝卜素氯仿溶液 0.5 mL、10% 亚油酸氯仿溶液 0.2 mL、20% 吐温 - 80 氯仿溶液 10 mL,混合均匀,40 °C 旋干后,加入 100 mL 去离子水,剧烈振荡 5 min,形成乳状液;取 45 mL 上述乳状液和 4 mL 0.2 mol/L pH 6.84 磷酸缓冲液充分混合后,取 200 μL,加入 10 μL 60 μg/mL 样品溶液,混匀,放入酶标仪中,37 °C 恒温孵育 1 h,并在 470 nm 波长处测其吸收值,每隔 10 min 读数 1 次。

试验以纯乙醇代替样品溶液作为空白对照组,E₀ 和 C₀ 分别表示反应起始(0 min)时样品组和对照组的吸光值,E_t 和 C_t 分别代表样品组在任意间隔为 10 min 时刻的吸光值,计算其抗氧化能力(AA)。

$$AA(\%) = \frac{1 - (E_0 - E_t)}{C_0 - C_t} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 不同处理方法对核桃种皮颜色的影响 从图 1 可以明显看出,经过 4 次酸化乙醇超声处理之后,在烘干之前,核桃种皮颜色基本接近于核桃仁,非常白净,烘干之后颜色也较碱处理之后的浅。核桃多酚在 0.9% 氢氧化钠溶液中呈深褐色,用碱处理之后,虽然立即用大量的清水处理,仍然会有部分残留,烘干之后由于氧化呈现如图 1 ~ 4 所显示的颜色,而这部分已经褐变氧化的核桃多酚会对后续制备的核桃乳的色泽产生影响。



注:1. 核桃原料;2. 酸化乙醇超声提取 4 次后未烘干的核桃仁;3. 酸化乙醇超声提取 4 次烘干后的核桃仁;4. 碱液脱皮处理烘干后的核桃仁。

Note:1. Raw material of walnut; 2. Walnut kernels without baking after four times of acidic ethanol ultrasonic extraction; 3. Walnut kernels with baking after four times of acidic ethanol ultrasonic extraction; 4. Walnut kernels with baking after alkali peeling treatment.

图 1 不同处理方法及阶段的核桃仁颜色

Fig. 1 Colors of walnut kernels by different treatment methods

2.2 不同处理方法对核桃总酚含量的影响 由图 2 可见,核桃多酚在碱性条件下是不稳定的,在酸性和中性条件下非

常稳定。碱处理之后的,绝大部分的核桃多酚都已经溶解在碱液中,但是测定出总酚含量只有 0.51 mg/g。酸化乙醇提取的多酚含量为 14.85 mg/g,提取率为 96.6%,远高于碱法提取的,且前者在多酚残留量上也稍微低于后者。

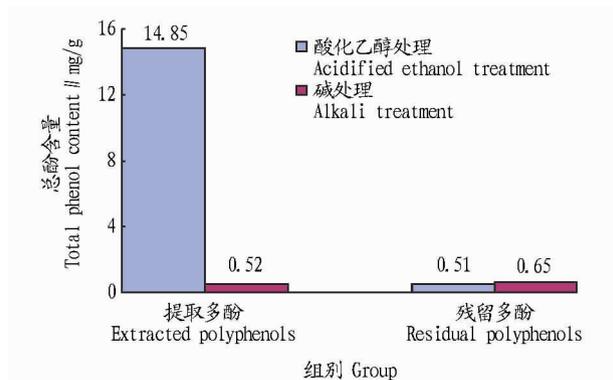


图2 不同处理方式的总酚含量

Fig.2 The total phenol contents in different treatments

2.3 对 DPPH 自由基清除能力 由于 DPPH 自由基是一个稳定的自由基,且该分析方法简单快速,自 1958 年被提出以来^[17],便广泛被国内外用于定量测定生物试样和食品的抗氧化能力^[18]。DPPH 自由基醇溶液为紫色,在有自由基清除剂存在时,DPPH 上的单电子会因为配对而使溶液的颜色渐渐变浅,特征吸收波长为 517 nm。

由图 3 可知,清除 DPPH 自由基能力由强到弱的顺序为核桃多酚 > TBHQ ≈ V_C > V_E。4 种物质清除 DPPH 自由基的能力均与浓度成正比,酸化乙醇提取的核桃多酚表现出较高的清除自由基的能力。浓度 20 μg/mL 核桃多酚清除 DPPH 自由基的能力高于 100 μg/mL 的 V_E,与 60 μg/mL 的 TBHQ 和 V_C 相当。核桃多酚、TBHQ、V_C、V_E 对 DPPH 自由基的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 59.91、136.60、165.02、223.76 μg/mL。

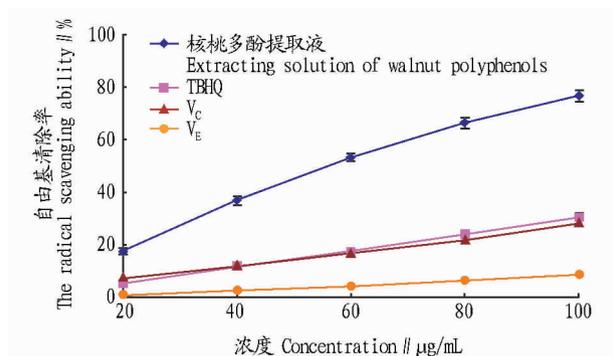


图3 不同浓度的核桃多酚、TBHQ、V_C、V_E 溶液对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.3 DPPH radical scavenging ability of walnut polyphenols, TBHQ, V_C and V_E at different concentrations

2.4 对 ABTS 自由基清除能力 ABTS 法是用来测定总抗氧化能力的方法,在氧化剂的作用下,ABTS 会被氧化成绿色的 ABTS·⁺,而抗氧化剂与该自由基配对后,溶液颜色变浅,在波长 734 nm 下的吸光值下降,故可以采用比色法的测定结果来衡量自由基清除情况,从而评价抗氧化剂的抗氧化效果。

由图 4 可得,清除 ABTS 自由基能力由强到弱的顺序为核桃多酚 > TBHQ ≈ V_C > V_E,与 DPPH 测定的排序结果一致,4 种物质清除 ABTS 自由基的能力与浓度成正比,酸化乙醇提取的核桃多酚仍然表现出最高的清除自由基的能力,不同浓度的 V_E 清除 ABTS 自由基的能力变化不大。在一定浓度范围内,随着浓度的增加,各个抗氧化剂之间的抗氧化能力差异增大。核桃多酚、TBHQ、V_C、V_E 对 ABTS 自由基的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 55.82、87.84、93.77、185.93 μg/mL。

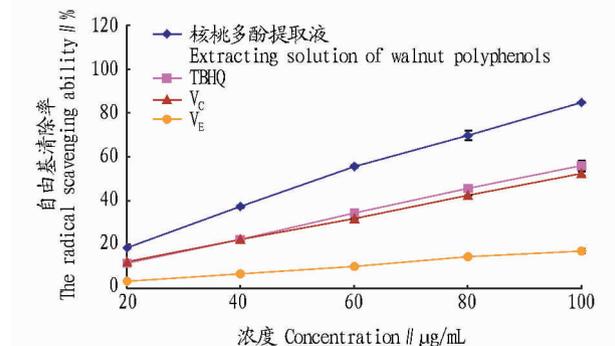


图4 不同浓度的核桃多酚、TBHQ、V_C、V_E 溶液对 ABTS 自由基的清除效果

Fig.4 ABTS radical scavenging ability of walnut polyphenols, TBHQ, V_C and V_E at different concentrations

2.5 对铁离子的还原能力 该方法主要是测定抗氧化剂的还原力^[19],还原力强,则电子供应能力强。还原力的高低可间接反映抗氧化能力强弱。

由图 5 可知,3 种样品还原力的变化趋势与代表总抗氧化能力的 ABTS 指标的变化趋势一致,还原力强弱顺序为核桃多酚 > V_C > TBHQ。在此体系中,TBHQ 的抗氧化能力稍微低于 V_C,可能是因为反应体系的差异。在铁离子的还原力测定中,以蒸馏水为溶剂,而 TBHQ 在水中的溶解度较小,随着浓度的增大,TBHQ 与 V_C 的差异越来越大。核桃多酚则随着浓度的增大,还原力极速增加,说明核桃多酚在水溶性体系中能表现出更好的抗氧化效果。

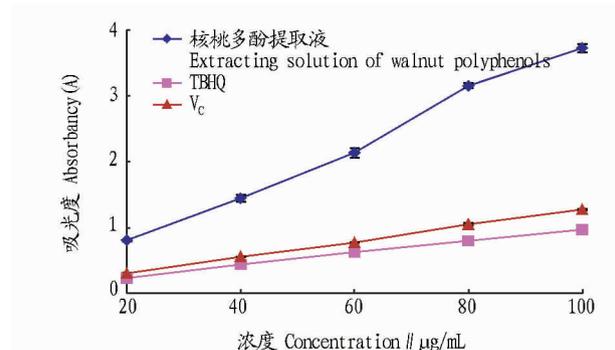


图5 不同浓度的核桃多酚、TBHQ、V_C 溶液的还原力结果

Fig.5 Ferric reducing power of walnut polyphenols, TBHQ, and V_C at different concentrations

2.6 抗油脂过氧化能力 β-胡萝卜素漂白测试体系的原理是,在一定温度下,亚油酸自动氧化产生自由基,使得 β-胡萝卜素褪色,在波长 470 nm 下,特征吸收减弱。而抗

氧化剂可以清除自由基,从而保护 β -胡萝卜素不褪色,起到保护作用。

图 6 显示,抗氧化活性顺序为 $TBHQ > V_E \approx$ 核桃多酚。这与清除 DPPH、ABTS 自由基不同,核桃多酚表现出了较差的抗氧化活性。说明由于核桃多酚的极性较强^[20],不太适用于抗油脂氧化。随着时间的推移,3 种抗氧化剂抗氧化能力在 0~20 min 内均呈现下降趋势,20~60 min 又开始升高,这可以用自由基产生的动力学理论来解释。自由基产生需要经过自由基的引发、增长和终止 3 个阶段。在引发阶段,自由基数量较少,随后迅速增加,慢慢的趋于平稳后终止,因此抗氧化能力便呈现上述趋势。

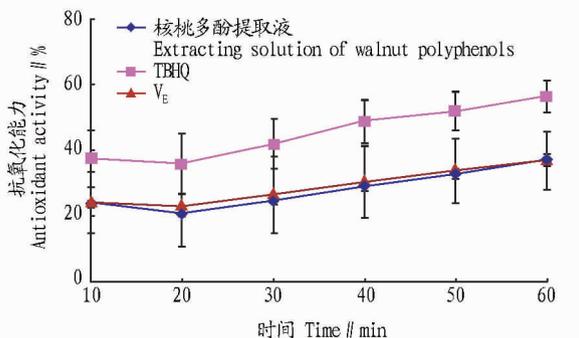


图 6 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核桃多酚、TBHQ、 V_E 溶液在 β -胡萝卜素漂白测试体系下的抗氧化能力

Fig. 6 Antioxidant activity of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ walnut polyphenols, TBHQ and V_E measured by β -carotene bleaching assay

3 结论

(1) 酸化乙醇超声辅助处理核桃仁的方法,不仅可以提取活性较高的核桃多酚,提高核桃仁的附加值,而且处理后的核桃仁多酚残留量更低,颜色更好,可为后续制备核桃乳提供更好的原材料,同时不产生工业废水,有益于环境保护。

(2) 从体外抗氧化评价体系可以看出,核桃多酚能够在极性较强的体系中表现出高于 TBHQ、 V_C 、 V_E 的抗氧化活性,其抗氧化活性与浓度成正相关。

参考文献

[1] 陈杭君,李兴飞,邵海燕,等.山核桃仁多酚组分分析及抗氧化研究[J].核农学报,2013(1):61-67.

[2] 施丽丽.河北省太行山区核桃主要栽培品种综合性状评价研究[D].保定:河北农业大学,2012.

[3] ABBOTT J A, LU R. An isotropic mechanical properties of apples[J]. Trans of the ASAE, 1996, 39(4): 1451-1459.

[4] 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]. Journal of agricultural and food chemistry, 2008, 56(12): 4444-4449.

[5] ŠKERGET M, KOTNIK P, HADOLIN M, et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities[J]. Food chemistry, 2005, 89(2): 191-198.

[6] 吴世兰,秦礼康,蒋成刚,等.核桃仁碱液去皮过程中营养成分动态变化[J].中国油脂,2013,38(2):84-87.

[7] BECKMAN C H. Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? [J]. Physiological and molecular plant pathology, 2000, 57(3): 101-110.

[8] SHAHIDI F, NACZK M. Phenolics in food and nutraceuticals[M]. New York: CRC Press, 2003.

[9] 辛清武,黄勤楼,郑嫩珠,等.食品添加剂研究概况及发展趋势[J].农业开发与装备,2015(4):25.

[10] 刘森.核桃仁水剂法取油工艺及核桃乳的研究[D].无锡:江南大学,2004.

[11] MADHUJITH T, SHAHIDI F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Journal of food science, 2005, 70(1): 85-90.

[12] 周晔.核桃仁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.

[13] MEOT-DUROS L, MAGNE C. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves [J]. Plant physiology and biochemistry, 2009, 47(1): 37-41.

[14] LABUCKAS D O, MAESTRI D M, PERELLO M, et al. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins [J]. Food chemistry, 2008, 107(2): 607-612.

[15] WONG-PAZ J E, CONTRERAS-ESQUIVEL J C, RODRÍGUEZ-HERRERA R, et al. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region [J]. Asian Pacific journal of tropical medicine, 2015, 8(2): 104-111.

[16] 赵国建,王向东,王未芳.核桃青皮多酚的抗氧化性研究[J].农产品加工·学刊,2011(2):36-39.

[17] BLOIS M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [J]. Nature, 1958, 181: 1199-1200.

[18] LOCATELLI M, TRAVAGLIA F, COISSON J D, et al. Total antioxidant activity of hazelnut skin (NocciolaPiemonte PGI): Impact of different roasting conditions [J]. Food chemistry, 2010, 119(4): 1647-1655.

[19] 房洋军,邵海燕,陈杭君.山核桃加工、贮藏前后总多酚含量及其抗氧化活性的变化[J].食品科学,2011,32(5):104-107.

[20] REGUEIRO J, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ C, VALLVERDÚ-QUERALT A, et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry [J]. Food chemistry, 2014, 152: 340-348.

(上接第 89 页)

[3] 李辉,苏翌.大蒜精油提取工艺的研究[J].农业机械,2011(20):31-34.

[4] 刘冬文,王国义,孙亚青,等.同时蒸馏萃取影响大蒜油得率的几个因素分析[J].食品工业科技,2005(2):105-106,87.

[5] 韩海旺.大蒜精油树脂的提取工艺研究[J].食品工业,2011(3):42-44.

[6] 曾哲灵,熊伟,熊涛,等.大蒜素的提取工艺研究[J].食品与发酵工业,2006(2):125-127.

[7] 李羿为,赖万东.大蒜精油的超临界 CO_2 萃取技术与有效成分分析[J].化工设计通讯,2013(3):84-89.

[8] 靳学远,董海丽,秦霞.大蒜精油的超临界 CO_2 萃取及 GC-MS 分析[J].中国农学通报,2008(11):123-126.

[9] 郭晓宇.微波辅助提取大蒜挥发油的研究[J].食品研究与开发,2014

(22):51-54.

[10] 李婷婷,郑炯.顶空-固相微萃取-气质联用分析大蒜中的挥发性成分[J].食品与发酵工业,2014(5):210-213,219.

[11] 陶宁萍,杨柳.顶空固相微萃取气质联用测定蒜油挥发性成分[J].食品工业科技,2010(3):115-119.

[12] 周江菊.顶空固相微萃取气质联用分析大蒜挥发性风味成分[J].中国调味品,2010(9):78-82.

[13] 单长松,王超,孟令儒,等.泰安大蒜与金乡大蒜挥发性风味物质成分分析[J].食品与发酵工业,2012(11):152-156.

[14] 张中义,杨晓娟,张峻松,等.发酵黑蒜中挥发性物质的 GC-MS 分析[J].中国调味品,2012,37(7):79-81,116.

[15] 周春丽,陈超,李玉萍,等.固相微萃取-气质联用鉴定新鲜大蒜风味成分[J].食品工业,2013,34(6):216-218.