2014-02-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2014.00087 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 *Chin J Appl Environ Biol* 2014, **20** (1): 87-92

核桃青皮提取物的抗菌和抗氧化活性*

张卫星[1,2] 何开泽[1**] 蒲 蔷[1]
[1]中国科学院成都生物研究所 成都 610041
[2]中国科学院大学 北京 100049

摘 要 用不同极性的试剂提取核桃青皮成分, 用牛津杯法测定各成分抗菌能力, 并从总酚含量、DPPH自由基清除能力、还原能力3个方面测定抗氧化能力. 结果显示, 核桃青皮不同提取物对不同病源菌有不同的抗菌活性, 其中乙酸乙酯提取相和氯仿相对试验细菌的抗菌活性较强, 乙酸乙酯相和氯仿相对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌作用MIC分别为6.25/6.25、6.25/1.56、3.13/3.13、6.25/3.13 mg/mL; 极性较小的石油醚相对试验真菌有明显抗菌活性, 石油醚相对青霉菌、绿霉菌、白色念珠菌的抗菌作用MIC分别为3.13、6.25、6.25 mg/mL; 同时, 核桃青皮各提取相也有不同程度的抗氧化能力, 乙酸乙酯相和氯仿相总酚含量(以没食子酸的相当值GAE表示)、清除自由基能力EC_{50}、还原能力EC_{50}分别为193.52/174.64 mg/g、14.05/26.11 μg/mL、34.70/44.60 μg/mL, 乙酸乙酯相和氯仿相抗氧化能力远远高于其他各相. 研究证明核桃青皮提取物有着较好的抗菌和抗氧化活性, 具有资源化利用前景. 图4 表5 参21

关键词 核桃青皮; 提取物; 抗菌活性; 抗氧化活性
CLC Q949.9 : Q949.720.6

Antimicrobial and antioxidant activities of extracts from walnut green husks*

ZHANG Weixing[1,2], HE Kaize[1**] & PU Qiang[1]
[1] *Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences*, Chengdu 610041, China
[2] *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China

Abstract This research aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of walnut green husks, and to explore possible ways to efficiently utilize the bioresource. After walnut green husks were extracted by different reagents, the antimicrobial capacity of the extracts was measured by Oxford Cup method; the antioxidant capacity was assessed by total phenolic content, reducing power assay and scavenging effects on DPPH (2,2-diphe-nyl-1-picrylhydrazyl) radicals. All extracts showed different antimicrobial activities against Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram positive (*Staphyloccocus aureus*, *Bacillus subtilis*) bacteria, and fungi (*Canidia albicans*, *Penicillium italicum*, *Peniicilbum digitatum*, *Phytophthora capsici*). The walnut green husks extracted with ethyl acetate and chloroform showed the highest activities against bacteria tested, with minimum inhibitory concentrations (MIC) against the four bacteria about 6.25/6.25, 6.25/1.56, 3.13/3.13, 6.25/3.13 mg/mL, respectively. On the other hand, antifungal substances existed in petroleum ether extracts, with MIC against *Penicillium italicum*, *Peniicilbum digitatum* and *Canidia albicans* about 3.13, 6.25 and 6.25 mg/mL respectively. The total phenol contents in ethyl acetate and chloroform extracts were about 193.52 and 174.64 mg GAEs/g respectively their EC_{50} of scavenging DPPH radical activity about 14.05 and 26.11 μg/mL, EC_{50} of reducing power about 34.70 and 44.60 μg/mL. The antioxidant activities of the extracts with other solvents were much lower than those extracted with ethyl acetate and chloroform. Our research showed that walnut green husk contains antibacterial and antioxidant material in its ethyl acetate and chloroform extracts, and antifungal material in its petroleum ether extracts.

Keywords walnut green husk; extracts; antimicrobial activity; antioxidant activity

核桃(*Juglans regia* Linn.)是一种传统经济树种, 在我国栽培历史悠久, 资源丰富, 分布广泛, 我国栽培的核桃品种约有40余种, 全国24个省(区)都有栽培和分布, 其面积和产量均居世界首位[1]. 核桃产品已经在多个领域得到广泛应用, 如核桃干果营养价值高, 是食品、食用油脂领域的优质原料, 青核桃、硬壳、树皮、树叶、树根等在装饰和制药工业上也有相关应用研究[2-5]. 核桃青皮(Walnut green husk)又称青龙衣, 为核桃外部一层厚厚的绿色果皮, 青皮产量一般都高于干果产量, 是核桃的主要副产品, 而目前青皮尚未得

收稿日期 Received: 2013-05-27 接受日期 Accepted: 2013-06-18
* "十二五"国家科技支撑项目(2011BAC09B04)资助 Supported by the the Sci-tech Pillar Project of the Twelfth Five-year Plan of China (2011BAC09B04)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hekz@cib.ac.cn)

到有效的利用，一般都是作为废弃物堆放在田间、地头或沟边，不仅会造成资源的极大浪费，还会严重污染生态环境. 为了充分利用核桃青皮这一资源，已有学者对核桃青皮提取物的除草、杀虫以及抗肿瘤等药用活性方面作了一些零星研究[6]，但尚不够深入系统. 在民间有将核桃青皮沤腐后用作农药使用的例子. 因而我们尝试研究核桃青皮的抗菌活性，同时初步评价其抗氧化活性，以促进核桃青皮资源得到更好的有效开发利用.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物材料 核桃采自四川广元，成熟后剥取核桃青皮，放置50 ℃下烘干至恒重，烘干后粉碎过90目筛，得核桃青皮粉，备用.

1.1.2 供试菌种和试剂 *Escherichia coli* JM109购自华美公司，*Staphyloccocus aureus* ATCC6538株购自四川大学华西医院医检室，*Candida albicans* ATCC10231购自四川大学华西医院医检室，铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*、枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*为本实验室保存；意大利青霉菌*Penicillium italicum* Wehmer、柑桔绿霉菌*Penicillium difitatum* Sacc、辣椒疫霉菌*Phytophthora capsici* Leonian由中国科学院成都生物研究所谭红研究员课题组提供. 青莲霉素购自Gibco公司，两性霉素B购自Amresco公司.

1.2 抗菌活性测定

1.2.1 待测样品的制备 称取核桃青皮粉以无水甲醇为提取溶剂，料液比为1:15，65 ℃下回流提取3次，每次2 h，合并提取液减压浓缩成浸膏状至恒重. 称取少部分核桃青皮提取浸膏用适当溶剂配成浓度为200 mg/mL待测液（即1 mL试样含200 mg核桃青皮粉末的提取物）. 倍比稀释为200、100、50、25、12.5、6.25、3.13 mg/mL，备用. 剩余部分用丙酮-水（1:1）完全溶解，依次分别用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取，将萃取液减压浓缩成浸膏至恒重，用相应溶液配成浓度为100 mg/mL溶液，备用. 做抗菌试验时用相应溶剂作为空白对照，细菌与真菌分别采用青链霉素和两性霉素B作为阳性对照.

1.2.2 抗菌活性测定 采用牛津杯法测定样品抗菌活性. 取25 μL培养好的细菌悬液与20 mL冷却至50 ℃的培养基充分混匀，倒入9 cm培养皿中制成带菌平板，带菌平板含菌浓度约10^8（细菌）或10^6（真菌）个/mL. 将直径为0.8 cm的牛津杯平放在带菌平板上，加入待测样品150 μL，以相应溶剂作为对照，重复3次. 置于37 ℃（细菌）、25 ℃（真菌）培养箱内培养24 h（细菌）、72 h（真菌），用十字交叉法测量抗菌圈直径.

1.3 抗氧化活性测定

1.3.1 样品总酚含量测定 以没食子酸作为标准品，样品总酚含量以GAE（没食子酸的相当值）表示. 吸取1 mL样品液，加入1 mL Fohn-Ciocalteu试剂，充分混匀后加入2 mL 15%碳酸钠，用蒸馏水定容至10 mL，在40 ℃下保温20 min后，在760 nm 测吸光度值，以1 mL相应溶剂替代样品作空白对照. 用没食子酸标准品做标准曲线计算样品中总酚含量.

样品总酚含量测定公式：$\mathrm{GAE}\left(\mathrm{mg\ mL^{-1}}\right)=\frac{X_1\times V_1\times V_2}{W}$

式中，X_1—根据标准曲线算得的样品浓度值（mg/mL），V_1—样品液稀释倍数，V_2—样品液总体积（mL），W—原料干重（g）.

1.3.2 提取物还原能力测定 采用普鲁士兰法[7]测定提取物的还原能力. 取不同浓度的样品溶液0.5 mL，加入0.2 mol/L pH 6.6的磷酸盐缓冲液和1% $K_3[Fe(CN)_6]$溶液各2.5 mL并混合均匀，混合液50 ℃保温20 min 后加入2.5 mL 10%的三氯乙酸溶液，混合后以3 000 r/min离心10 min. 取上清液2.5 mL，加2.5 mL蒸馏水和1 mL 0.1%的$FeCl_3$，混合均匀，10 min后测定700 nm 吸光度.

1.3.3 自由基清除能力测定 采用DPPH法[8]测定样品清除自由基能力. 用无水乙醇配制浓度为1×10^{-4} mol/L的DPPH 溶液，避光保存备用. 分别取不同浓度的样品溶液0.3 mL和DPPH溶液2.7 mL于具塞试管中，充分混合，30 min后测定波长517 nm处的吸光度A_S；同时，测0.3 mL样品溶液和2.7 mL无水乙醇的混合液的吸光度A_0；以及0.3 mL无水乙醇和2.7 mL DPPH溶液的混合液吸光度A_{DPPH}. 平行测定3次，计算吸光度. 以无水乙醇作对照，TBHQ作标准抗氧化剂. 对DPPH的清除率计算公式为：

$$P=\frac{A_{DPPH}-(A_S-A_0)}{A_{DPPH}}\times100\%$$

式中，A_{DPPH}—2.7 mL DPPH溶液＋0.3 mL 1:1的丙酮和水混合液的吸光度；A_0—2.7 mL无水乙醇＋0.3 mL样品溶液的吸光度；A_S—2.7 mL DPPH溶液＋0.3 mL样品溶液的吸光度.

1.4 核桃青皮抑制真菌活性成分分离

采用硅胶柱层析技术分离核桃青皮活性成分. 通过薄层色谱技术筛选核桃青皮提取物分离条件，筛选RF值为0.2-0.3左右时所用展开剂作为柱层析洗脱剂；运用柱层析技术分离样品，并用试管逐个收集并将在薄层板上位置相同的收集管合并、在50 ℃减压浓缩成浸膏至恒重，将收集的样品配置成浓度为50 mg/mL，用牛津杯法逐个检测抗菌活性；然后，通过TLC生物自显影技术[9-10]进行活性位点定位，将具有明显活性的样品用不同溶剂系统进行点板，确定活性成分在薄层板上的位置，并确定分离目标活性物质的最佳洗脱剂；而后根据TLC生物自显影技术确定下来的活性成分的特征（如紫外吸收、显色反应等），再用上述洗脱剂进行柱层析，收集活性成分得到相对简单的活性成分，进而用高效液相色谱检测已分离样品的纯度.

2 结果与分析

2.1 样品抗菌活性

2.1.1 核桃青皮提取物抑制细菌活性 在供试样品质量浓度为50 mg/mL时，核桃青皮甲醇提取物各萃取相对几种病原菌的抑制效果和最小抑制浓度见表1. 可以看出，核桃青皮甲醇提取物不同萃取相在50 mg/mL时对试验细菌均有一定的抗菌效果，乙酸乙酯相和氯仿相对试验细菌的抗菌活性较强，对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌作用MIC分别为6.25/6.25、6.25/1.56、3.13/3.13、6.25/3.13 mg/mL. 比较核桃青皮不同萃取相对试验细菌的抗菌能力MIC和50 mg/mL时的抗菌圈直径，结果发现除氯仿相对铜绿假单胞菌的抗菌能力略高于相同条件下氯仿相对其他革兰氏阳性细菌外，核桃青皮各提取相对于试验革兰氏阳

性细菌的抗菌效果比对革兰氏阴性细菌的抗菌效果要好. 同时, 青莲霉素对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌圈在1.8-2.1 cm的浓度分别为25、25、25、1.56 IU/mL.

2.1.2 **核桃青皮提取物抑制真菌活性** 在供试样品质量浓度为50 mg/mL时, 核桃青皮甲醇提取物各萃取相对几种有害真菌的抑制效果和最小抑制浓度见表2.

由表2可以看出, 核桃青皮石油醚相、氯仿相对意大利青霉菌、柑桔绿霉菌、白色念珠菌均具有一定的抗菌活性, 对疫霉菌没有抗菌活性. 其中, 石油醚相对意大利青霉菌、柑桔绿霉菌、白色念珠菌的抗菌效果最好, 对疫霉菌无活性; 氯仿相对青霉菌、绿霉菌、白色念珠菌有微弱抗菌活性, 对疫霉菌无活性. 石油醚相对青霉菌、绿霉菌、白色念珠菌的抗菌能力MIC分别为3.125、6.25、6.25 mg/mL. 核桃青皮中对待试真菌有抑制活性的成分主要分布在极性较小的萃取相中, 石油醚相在50 mg/mL时对以上待试真菌有着明显的抗菌活性, 氯仿相对待试真菌也有一定的抑制作用, 但远不如石油醚相, 其他提取相未检测出抗菌活性. 同时, 以两性霉素B作为阳性对照, 发现25mg/mL石油醚提取物对柑桔青、绿霉菌、白色念珠菌抑菌能力与200 μg/mL两性霉素B相当.

2.2 样品抗氧化活性

2.2.1 **核桃青皮各提取相总酚含量** 绘制没食子酸标准曲线并建立回归方程, 没食子酸标准曲线见图1.

经计算, 回归方程为: $y = 0.1186x + 0.0648$; $R^2 = 0.9993$. 式中, x—样品质量浓度(单位: μg/mL), y—吸光度.

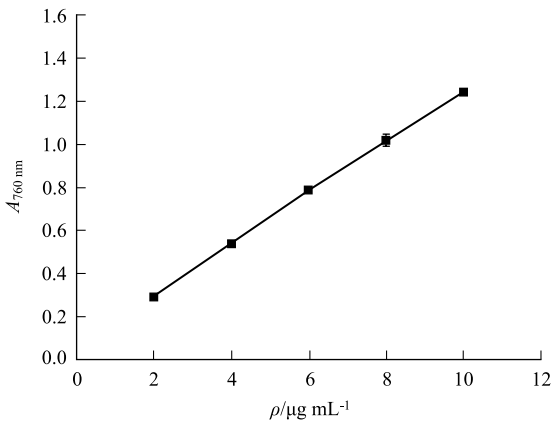


图1 没食子酸标准曲线.

Fig. 1 Gallic acid standard curve.

如表3所示, 核桃青皮各提取相均有不同程度的总酚含量. 其中, 乙酸乙酯相总酚含量最高, 氯仿相次之, 乙酸乙酯相和氯仿相总酚含量远远高于其他各相, 乙酸乙酯相和氯仿相总酚含量(以没食子酸的相当值GAE表示)分别为193.52和174.64 mg/g.

2.2.2 **核桃青皮各提取相清除自由基能力** 不同极性溶剂提取物和TBHQ清除自由基能力EC_{50}如表5所示, 不同质量浓度的样品清除自由基能力变化趋势如图2所示. 在清除DPPH自由基实验中, 抗氧化剂对DPPH自由基的清除能力表现为它们提供氢质子的能力[11]. 从图2中可以看出, 随着样品浓度的

表1 核桃青皮甲醇提取物各萃取相的抗细菌能力

Table 1 Antibacterial capacity of different extracts from walnut green husks

MIC/mg mL^{-1} (50 mg/mL抗菌能力 Antibacterial ability)	大肠杆菌 *Escherichia coli*	铜绿假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*	枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*	金黄色葡萄球菌 *Staphyloccocus aureus*
甲醇粗提物 Methanol extracts	25 (++)	12.5 (+++)	6.25 (++++)	25 (++)
石油醚 Petroleum ether extracts	(-)	3.13 (++++)	3.125 (+++)	12.5 (+++)
氯仿相 Chloroform extracts	6.25 (++++)	1.56 (+++++)	3.13 (+++++)	3.13 (++++)
乙酸乙酯 Ethyl acetate extracts	6.25 (++++)	6.25 (+++++)	3.13 (+++++)	6.25 (+++++)
正丁醇 *n*-Butanol extracts	12.5 (++)	12.5 (++++)	12.5 (+++)	25 (+++)
萃余相 Raffinate extracts	(-)	50 (+)	100 (-)	50 (+)

(-): 无抗菌活性, 抗菌圈直径<0.8 cm; (+): 弱抗菌活性, 抗菌圈直径0.8-1.0 cm; (++): 中等抗菌活性, 抗菌圈直径1.0-1.2 cm; (+++): 高抗菌活性, 抗菌圈直径1.2-1.4 cm; (++++): 强抗菌活性, 抗菌圈直径1.4-1.6 cm; (+++++): 较强抗菌活性, 抗菌圈直径>1.6 cm; 标准偏差 ± 0.5 mm.

(-): No antimicrobial activity, inhibition zone < 0.8 cm; (+): Slight antimicrobial activity, inhibition zone 0.8-1.0 cm; (++): Moderate antimicrobial activity, inhibition zone 1.0-1.2 cm; (+++): High antimicrobial activity, inhibition zone 1.2-1.4 cm; (++++): Strong antimicrobial activity, inhibition zone 1.4 -1.6 cm; (+++++): Very strong antimicrobial activity, inhibition zone > 1.6 cm. Standard deviation: ± 0.5 mm.

表2 核桃青皮甲醇提取物各萃取相抗真菌能力

Table 2 Antifungal capacity of different extracts from walnut green husks

MIC/mg mL^{-1} (50 mg/mL抗菌能力 Antibacterial ability)	白色念珠菌 *Canidia albicans*	意大利青霉菌 *Penicillium italicum*	柑桔绿霉菌 *Penicillium digitatum*	辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici*
甲醇粗提物 Methanol extracts	12.5 (+++)	50 (+)	100 (-)	(-)
石油醚 Petroleum ether extracts	6.25 (+++)	3.125 (+++++)	6.25 (+++++)	(-)
氯仿相 Chloroform extracts	25 (++)	25 (+)	6.25 (+++++)	(-)
乙酸乙酯 Ethyl acetate extracts	(-)	(-)	(-)	(-)
正丁醇 *n*-Butanol extracts	(-)	(-)	(-)	(-)
萃余相 Raffinate extracts	(-)	(-)	(-)	(-)

(-): 无抗菌活性, 抗菌圈直径<0.8 cm; (+): 弱抗菌活性, 抗菌圈直径0.8-1.0 cm; (++): 中等抗菌活性, 抗菌圈直径1.0-1.2 cm; (+++): 高抗菌活性, 抗菌圈直径1.2-1.4 cm; (++++): 强抗菌活性, 抗菌圈直径1.4-1.6 cm; (+++++): 较强抗菌活性, 抗菌圈直径>1.6 cm; 标准偏差 ± 0.5 mm.

(-): No antimicrobial activity, inhibition zone < 0.8 cm; (+): Slight antimicrobial activity, inhibition zone 0.8-1.0 cm; (++): Moderate antimicrobial activity, inhibition zone 1.0-1.2 cm; (+++): High antimicrobial activity, inhibition zone 1.2-1.4 cm; (++++): Strong antimicrobial activity, inhibition zone 1.4 -1.6 cm; (+++++): Very strong antimicrobial activity, inhibition zone > 1.6 cm. Standard deviation: ± 0.5 mm.

增加（10-50 μg/mL），各极性溶剂提取物DPPH自由基清除率也相应增加（石油醚相从4.46%增加到22.02%，氯仿相从25.54%增加到71.35%，乙酸乙酯相从40.70%增加到93.89%，正丁醇相从8.0%增加到33.46%，萃余相从0.88%增加到4.49%）. 各极性试剂萃取相对于DPPH清除能力EC_{50}如表4所示（石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相、萃余相EC_{50}分别为108.97、26.11、14.05、75.48、641.79 μg/mL）. 与同等条件下的TBHQ相比较，乙酸乙酯相DPPH清除率略高于TBHQ的清除率，氯仿相DPPH清除率略低于TBHQ清除率，其他提取相远低于TBHQ清除率. 以TBHQ作为对照，TBHQ清除DPPH能力EC_{50}为19.75 μg/mL.

表3 核桃青皮不同提取物总酚含量

Table 3 Total phenol content of different extracts from walnut green husks

提取相 Extracts	回归方程 Regression equation	R^2	总酚含量 Total phenol content (GAEs) (w/mg /g^{-1})
甲醇粗提物 Methanol extracts	$y = 0.0042x + 0.0957$	0.9997	41.56
石油醚提取物 Petroleum ether extracts	$y = 0.0054x + 0.0238$	0.9995	37.35
氯仿提取物 Chloroform extracts	$y = 0.0192x + 0.092$	0.9993	174.64
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts	$y = 0.0219x + 0.0896$	0.9953	193.52
正丁醇提取物 *n*-Butanol extracts	$y = 0.0069x + 0.0353$	0.9999	52.52
萃余提取物 Raffinate extracts	$y = 0.9961x + 0.0027$	0.9998	10.20
标准品 Standards	$y = 0.1186x + 0.0648$	0.9993	GAEs

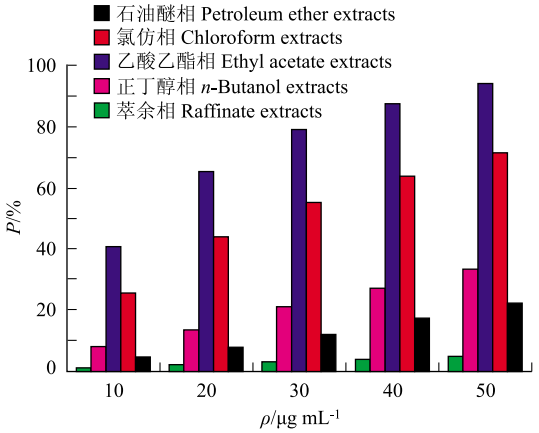


图2 核桃青皮不同提取相不同浓度时清除DPPH自由基能力变化趋势.

Fig. 2 Trends for DPPH scavenging capacities of different extracts from walnut green husks in different concentration.

2.2.3 **核桃青皮各提取相还原能力** 一般情况下，样品的还原能力与抗氧化活性之间有显著的相关性[12]，根据1.3.2的测定方法，在波长700 nm 处测定的吸光值越大，则表明样品的还原能力越强，样品提取物、TBHQ的还原能力EC_{50}如表6所示，不同质量浓度的样品还原能力如图3所示. 由图3可以看出，样品具有良好的还原能力，并且随着质量浓度的增加，其还原力也随之增加，其中乙酸乙酯相和氯仿相还原能力增加较为明显（图5）. 各提取相还原能力均低于TBHQ还原力（石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相、萃余相EC_{50}分别为279.16、44.60、34.70、127.40、613.27 μg/mL，如表5所示），乙酸乙酯相和氯仿相还原能力略低于TBHQ还原能力，其他各相还原能力远低于TBHQ还原能力. 相同条件下TBHQ还原能力约为15.97 μg/mL.

表4 清除DPPH自由基能力

Table 4 DPPH free radical scavenging capacity of different extracts from walnut green husks

提取相 Extracts	回归方程 Regression equation	R^2	清除DPPH能力 DPPH scavenging capacity (EC_{50}/μg mL^{-1})
甲醇粗提物 Methanol extracts	$y = 0.9941e^{-0.013x}$	0.9805	50.56
石油醚提取物 Petroleum ether extracts	$y = -0.0049x + 1.0491$	0.9982	108.97
氯仿提取物 Chloroform extracts	$y = 0.9896e^{-0.025x}$	0.9972	26.11
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts	$y = 1.1159e^{-0.055x}$	0.989	14.05
正丁醇提取物 n-Butanol extracts	$y = -0.0068x + 1.0284$	0.999	75.48
萃余提取物 Raffinate extracts	$y = -0.0008x + 1.0286$	0.998	641.79
标准品 Standards	$y = -0.0262x + 1.0326$	0.9993	19.75 (TBHQ)

表5 核桃青皮不同提取相还原能力

Table 5 Reducing power of different extracts from walnut green husks

提取相 Extracts	回归方程 Regression equation	R^2	还原能力 Reducing power (EC_{50}/μg mL^{-1})
甲醇粗提物 Methanol extracts	$y = 0.2572x + 0.0177$	0.9985	166.56
石油醚提取物 Petroleum ether extracts	$y = 0.1508x + 0.0462$	0.9987	279.16
氯仿提取物 Chloroform extracts	$y = 0.9977x - 0.0461$	0.9998	44.60
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts	$y = 1.2524x - 0.0064$	0.9985	34.70
正丁醇提取物 *n*-Butanol extracts	$y = 0.3437x - 0.0187$	0.9993	127.40
萃余提取物 Raffinate extracts	$y = 0.0687x + 0.0449$	0.9996	613.27
标准品 Standards	$y = 0.4595x - 0.0327$	0.9993	15.97 (TBHQ)

2.3 核桃青皮石油醚提取物抗菌能力进一步研究

2.3.1 **核桃抗菌活性成分的进一步分离** 根据2.1.2实验结果并结合实际生产生活中抗真菌药物的巨大价值，以白色念珠菌为指示菌，对核桃青皮石油醚提取物进一步分离. 经过筛选，以石油醚和乙酸乙酯溶剂体系为洗脱剂梯度柱层析可分离出具有明显抗菌活性的成分. 对分离成分TLC生物自显影，发现以石油醚:乙酸乙酯20:1进行展开时，存在1和2两个明显的抗菌活性位点如图4所示.

2.3.2 **TLC生物自显影2号活性位点抗菌活性成分分析** 如图4所示，2号位点用TLC生物自显影技术检测出明显的抗菌活性，2号位点薄层色谱在365 nm紫外照射下显蓝色，254 nm

紫外照射显淡灰色，与10%硫酸乙醇溶液不显色，与高锰酸钾溶液不显色，与磷钼酸不显色，与碘不显色，与Marquis试剂显洋红色，与浓硫酸显淡黄色，与Fröhde试剂不显色，与Salkowsk反应显橙色. 2号提取物不溶于水，易溶于石油醚、氯仿、乙酸乙酯中，其乙酸乙酯溶液为无色透明溶液.

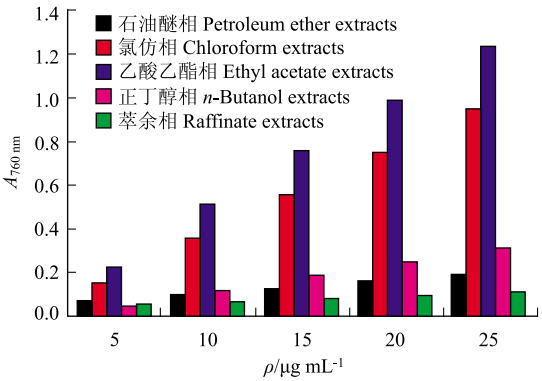


图3 核桃青皮不同提取物还原能力.

Fig. 3 Reducing power of different extracts from walnut green husks.

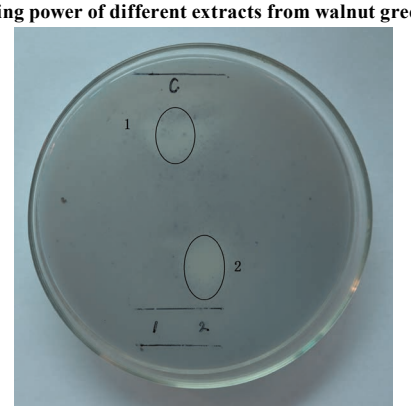


图4 核桃青皮活性部分TLC生物自显影情况.

Fig. 4 TLC bioautography of active ingredients from walnut green husks.

3 结论与讨论

本研究结果表明，核桃青皮中不仅存在着金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等供试细菌具有强抗菌作用的活性成分，而且也存在着对意大利青霉菌、柑橘绿霉菌、白色念珠菌等供试真菌也具有明显抑制作用的活性成分，对真菌具有抗菌活性的成分集中分布在石油醚萃取相中，经TLC生物自显影技术测定，显示具有两个独立抗菌活性的位点. 鉴于意大利青霉菌、柑桔绿霉菌、白色念珠菌在农业、食品、生产生活中的危害极大，因此，对核桃青皮抗真菌成分的研究具有巨大的现实意义.

比较核桃青皮提取物抗菌和抗氧化活性发现，核桃青皮乙酸乙酯相和氯仿相对细菌的抑制能力最强，对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制能力MIC分别为6.25/6.25、6.25/1.56、3.13/3.13、6.25/3.13 mg/mL；同时，铁核桃青皮乙酸乙酯相和氯仿相抗氧化能力也最强，总酚含量（GAEs）、清除DPPH能力EC_{50}、还原能力EC_{50}分别为193.52/174.64 mg/g、14.05/26.11 μg/mL、34.70/44.60 μg/mL，铁核桃青皮对细菌的抗菌能力与抗氧化能力可能存在密切的联系，对真菌的抑制能力与抗氧化能力未表现出明显的相关性. 已有不少研究表明植物多酚具有广泛的抗菌和抗氧化活性[13-15]，且生理活性对多酚的立体化学结构（构型和构象）具有严格的要求，而具有较强收敛性的多酚往往也同时具有较强的自由基清除能力，从而也具有较强的药理活性[16]. 黄酮类、单宁、鞣质等多酚类化合物具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等生理功能[17-19]，国内外已经鉴定核桃青皮的主要成分有16种，主要是鞣质、胡桃醌（Juglone）、胡桃苷（Juglanin）、α-氢化胡桃醌（α-hydrojuglone）和β-氢化胡桃醌（β-hydrojuglone）、萘茜（Naphthazarin）、没食子酸、胡核醉生物碱（$C_{10}H_6O_3$）和一些色素[20-21]，桃青皮富含单宁、黄酮类、鞣质等活性成分，本研究表明核桃青皮含有丰富的多酚，并且具有很强的抗菌和抗氧化能力，据此分析，核桃对细菌作用的有效成分可能是核桃青皮的多酚类物质或者与抗氧化活性组分密切相关.

核桃青皮石油醚提取物具有很强的抗真菌活性，本研究以白色念珠菌为指示菌，用TLC生物自显影的方法检测抗菌活性，在TLC薄层板上显示出两个具有独立抗菌作用的活性位点，并通过一些专属颜色反应确定了2号位点物质的相关性质. Marquis试剂和Fröhde试剂与生物碱显示不同的颜色反应，常作为识别生物碱的参考，实验中Marquis试剂与2号提取物显洋红色，Fröhde试剂与2号提取物不显色，说明样品可能是生物碱，同时，Salkowsk反应常用来检识萜类化合物，实验证明2号提取物发生Salkowsk反应后在氯仿层显示橙色而没有在氯仿层显示红色或蓝色，说明2号提取物不是萜类化合物.

本研究虽然将其中一种抗真菌活性物质分离至在薄层板（石油醚:乙酸乙酯为20:1作为展开剂）显示单一位点，但鉴于时间、实验条件等限制，仍然没有达到可以鉴定结构的纯度，具体活性成分仍在进一步研究，期待能从核桃青皮中分离出具有强抗真菌活性的成分，同时，解决核桃青皮废弃物对环境的污染问题，从而更好地开发利用核桃青皮.

参考文献 [References]

1 高海生, 朱凤妹, 李润丰. 我国核桃加工产业的生产现状与发展趋势[J]. 经济林研究, 2008, **26** (3): 119-126 [Gao HS, Zhu FM, Li RF. Production status and development trend of walnut processing industry in China [J]. *Nonwood ForRes*, 2008, **26** (3): 119-126]

2 Stampar F, Solar A, Hudina M, Veberic R, Colaric M. Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics [J]. *Food Chem,* 2006, **95** (4): 627-631

3 Yang JA, Qiu KQ. Preparation of activated carbons from walnut shells via vacuum chemical activation and their application for methylene blue removal [J]. *Chem Eng J*, 2010, **165** (1): 209-217

4 Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferreira I, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (Juglans regia L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45** (11): 2287-2295

5 Lee KS, Li G, Kim SH, Lee CS, Woo MH, Lee SH, Jhang YD, Son JK. Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica* [J]. *J Nat Prod*, 2002, **65** (11): 1707-1708

6 潘富赟, 张培正. 核桃青皮的综合应用及开发前景. 中国食物与营养,

2010, **135** (12): 21-24 [Pan FB, Zhang PZ. Comprehensive application and development prospect of walnut green husk. *Food Nutr China*, 2010, **135** (12): 21-24]

7 Berker KI, Guclu K, Tor I, Demirata B, Apak R. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method [J]. *Food Anal Methods*, 2010, **3** (3): 154-168

8 Brandwilliams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *Food Sci Technol-Lebensmittel-Wissenschaft Technol*, 1995, **28** (1): 25-30

9 曲建博, 娄红祥, 范培红. TLC生物自显影技术在药物筛选中的应用. 中草药, 2005, **36** (1): 132-137 [Qu JB, Lou HX, Fan PH. Application of TLC-bioautography to drug screening. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2005, **36** (1): 132-137]

10 Horvath G, Jambor N, Vegh A, Boszormenyi A, Lemberkovics E, Hethelyi E, Kovacs K, Kocsis B: Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography [J]. *Flavour Fragrance J*, 2010, **25** (3): 178-182

11 Chen Y, Xie MY, Nie SP, Li C, Wang YX. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. *Food Chem*, 2008, **107** (1): 231-241

12 Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species [J]. *Fitoterapia,* 2005, **76** (2): 216-219

13 Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICFR, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45** (11): 2287-2295

14 Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds [J]. *Intern J Food Microbiol*, 2000, **56** (1): 3-12

15 Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, **51** (6): 684-691

16 宋立江, 狄莹, 石碧. 植物多酚研究与利用的意义及发展趋势. 化学进展, 2000, **12** (2): 161-170 [Song LJ, Di Y, Shi B. The significance and development trend in research of plant polyphenols. *Progr Chem*, 2000, **12** (2):161-170]

17 延玺, 刘会青, 邹永青, 任占华. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展. 有机化学, 2008, **238** (9): 1534-1544 [Yan X, Liu HQ, Zou YQ, Ren ZH. Physiological activities and research advance in synthesis of flavonoids. *Chin J Org Chem*, 2008, **28** (9): 1534-1544]

18 Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids [J]. *Intern J Antimicrob Agents*, 2005, **26** (5): 343-356

19 Yi ZB, Yu Y, Liang YZ, Zeng B. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids [J]. *Lwt-Food Sci Technol*, 2008, **41** (4): 597-603

20 Alkhawajah AM. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia* [J]. *Am J Chin Med*, 1997, **25** (2): 175-180

21 Ohta A, Sivalingam PM, Lin S, Ikekawa N, Yaginuma N, Inada Y. Isolation of naphthazarin from walnut 'Onigurumi', and its inhibitory action on oxidative phosphorylation in mitochondria [J]. *Toxicon,* 1973, **11** (3): 235-241