

# 核桃壳多糖提取、纯化及其衍生物抗氧化活性

王文斌<sup>1</sup>, 周石洋<sup>1,2\*</sup>, 蒋文明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>重庆化工职业学院; <sup>2</sup>重庆(长寿)绿色化工与新材料产业技术研究院, 重庆 401228

**摘要:** 为了研究核桃壳多糖的结构特征及其衍生物的体外抗氧化活性, 该研究以核桃壳为原料, 采用水提醇沉法制备核桃壳多糖, 并采用化学合成法制备得到了乙酰化核桃壳多糖和磷酸化核桃壳多糖 2 个衍生物。通过对核桃壳多糖的分子量、单糖组分、分子结构特征以及衍生物体外抗氧化活性进行了全面深入的研究, 获得了一系列核桃壳多糖及其衍生物研究有意义的信息。研究结果表明, 经 DEAE-52 和 Sephadex G-100 分离纯化后获得的均一核桃壳多糖组分其分子量为  $9.45 \times 10^4$  Da, 总糖含量为 98.51%。单糖测定结果显示, 核桃壳多糖为酸性的杂多糖, 含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和半乳糖醛酸, 其各单糖组分摩尔比为 6.7 : 16.5 : 28.3 : 11.2 : 12.5 : 24.8。体外抗氧化活性实验结果表明, 核桃壳多糖及其衍生物能够表现出良好的生物活性, 特别是磷酸化修饰的多糖活性最佳。在质量浓度为 3.2 mg/mL 时, 磷酸化核桃壳多糖对超氧阴离子、羟基自由基、DPPH 自由基的清除率分别为 92.0%、96.5% 和 92.3%。

**关键词:** 多糖; 核桃壳; 衍生物; 制备; 抗氧化活性

**中图分类号:** TS255.1; TS202.3      **文献标识码:** A

## Extraction, purification and antioxidant activity of walnut shell polysaccharide and its derivatives

WANG Wen-bin<sup>1</sup>, ZHOU Shi-yang<sup>1,2\*</sup>, JIANG Wen-ming<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Chemical Industry Vocational College; <sup>2</sup>Chongqing (Changshou) Green Chemical and Material Industry Technology Research Institute, Chongqing 401228, China

**Abstract:** In order to study the structural characteristics of walnut shell polysaccharide and the antioxidant activities of its derivatives in vitro, walnut shell polysaccharide were prepared by water extraction and alcohol precipitation, and two derivatives of acetylated and phosphorylated walnut shell polysaccharide were prepared by chemical synthesis. The molecular weight, monosaccharide components, molecular structure characteristics and antioxidant activities of its derivatives were studied comprehensively and deeply, and a series of meaningful data information for the study of walnut shell polysaccharide and its derivatives were obtained. The results showed that the molecular weight of the homogeneous polysaccharide was  $9.45 \times 10^4$  Da and the total sugar content was 98.51% after DEAE-52 and Sephadex G-100 separation. The results of monosaccharide determination showed that walnut shell polysaccharide was an acidic heteropolysaccharide containing rhamnose, arabinose, galactose, glucose, xylose and galacturonic acid. The molar ratio of monosaccharide components was 6.7 : 16.5 : 28.3 : 11.2 : 12.5 : 24.8. The results of antioxidant activity in vitro showed that walnut shell polysaccharide and its derivatives showed a good biological activity, especially the phosphorylated walnut shell polysaccharide had the best activity. The scavenging rates of superoxide anion, hydroxyl free radical and DPPH free radical were 92.0%, 96.5% and 92.3% respectively when the mass concentration of walnut shell polysaccharide was 3.2 mg/mL.

**Key words:** polysaccharide; walnut shell; derivative; prepare; antioxidant activity

多糖 (polysaccharides) 为天然的大分子类化合物, 它由单糖 (十个以上) 通过糖苷键彼此连接所构成, 其理化性质与单糖不同<sup>[1-3]</sup>。多糖是除蛋白质与核酸外, 存在的一类重要

生命物质，其具有抗衰老、调节细胞的生长等复杂性的作用<sup>[4]</sup>。近年来，随着多糖研究的不断深入，作为抗氧化性药物，多糖应用已得到了广泛性<sup>[5]</sup>。自由基，其包括有羟自由基、超氧阴离子自由基等，它们能跟生物体内如、脂肪酸等许多的物质发生作用，可破坏细胞结构和功能<sup>[6-8]</sup>。因此，研究自由基的清除能力与预防某些疾病的发生具有重要意义<sup>[9]</sup>。核桃 (*Juglans regia* L.)属于胡桃科胡桃属植物，它具有抗寒、抗旱、抗病性，对土壤的肥沃程度要求低。世界各地均种植核桃，主要分布在亚洲、美洲、欧洲<sup>[10]</sup>。核桃中不饱和脂肪酸含量丰富，而饱和脂肪酸含量较少<sup>[11-14]</sup>。核桃中维生素 E 的含量也丰富，公认其是抗衰老、抗氧化的上等果品。另外，核桃中含有蛋白质、膳食纤维、胡萝卜素、多种矿物质等，由此可见核桃具有较高的营养价值<sup>[15]</sup>。核桃的主要加工是核桃仁，产品包括有核桃油、核桃仁类食品、核桃类保健品，其能充分体现了核桃的种植和加工具有巨大经济价值<sup>[16]</sup>。核桃壳为核桃取仁后的副产物，其质地坚硬，在加工核桃仁过程中一般作为废弃物弃掉或焚烧，造成资源浪费<sup>[17]</sup>。核桃壳中的化学成分主要有黄酮、多糖、皂苷、酚酸、酯类等，其具有抗菌、抗氧化等活性作用，可以开发为抗菌皂、面膜等日化产品<sup>[18-20]</sup>。为了更好地开发核桃壳多糖营养健康价值，本研究以核桃壳为原料，经过热水提取、醇沉、透析等操作步骤，制备得到了核桃壳多糖。之后再经 DEAE-52 与 Sephadex G-100 分离纯化，得到了单一组分的核桃壳多糖，并对其分子量、单糖组分、分子结构进行测定。与此同时，对核桃壳多糖进行衍生化反应，制备得到了乙酰化的核桃壳多糖和磷酸化的核桃壳多糖。体外抗氧化活性结果为今后进一步研究核桃壳多糖构效关系提供一定的理论指导。本研究可为核桃产业链的升级有着重要的实践意义<sup>[21]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

核桃壳是以市售的核桃去除核桃仁后剩下的硬壳部分（产地中国四川，为铁核桃品种）。

试剂：氯仿、正丁醇、无水乙醇（AR，20240512、20210212、20240311，成都市科隆化学品有限公司）；DEAE 纤维素 DE-52、Sephadex G-100（20240102、20240105，上海源叶生物科技有限公司）；乙酸酐（AR，20230515，重庆川东化工集团有限公司）；三聚磷酸钠、三偏磷酸钠（AR，20231102，20231205，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。

DT6 型台式离心机（常州市金坛高科仪器厂）；SCIENTZ-10N/A 型冷冻干燥机（中国宁波新芝生物科技股份有限公司）；UV-2600i 型紫外分光光度计（日本岛根岛津株式会社）、IRXross 型傅里叶变换红外光谱（德国布鲁克集团）；ICS5000 型离子色谱仪（美国赛默飞世尔科技公司）；LC-10A 型高效液相色谱仪（日本岛根岛津株式会社）；RI-10A 型示差检测器（日本岛根岛津株式会社）；SU8100 型扫描电子显微镜（日本株式会社日立制作所）；MC1000 型离子溅射仪（日本株式会社日立制作所）；AVANCE NEO 500 M 型核磁共振仪（德国布鲁克集团）。

## 1.2 方法

### 1.2.1 核桃壳多糖的提取

取干燥后的核桃壳 20 g，置于粉碎机中充分粉碎。将粉碎后的核桃壳放置到 250 mL 的烧杯内，加入 150 mL 水常温浸泡 12 h。浸泡完成后，将其倒入至 1 000 mL 的圆底烧瓶中，再加 500 mL 的水后，90 °C 提取 4 h。抽滤收集水溶液，滤渣用 500 mL 水继续浸提 4 h，重复 2 次。合并滤液，减压浓缩至 200 mL，再加 80 mL 的氯仿与 20 mL 的正丁醇，常温下搅拌 30 min 来进行多糖的除蛋白处理。待除蛋白操作完成后，离心，收集上清液，进行透析操作处理。透析后的核桃壳多糖溶液中加入 500 mL 无水乙醇，醇沉 12 h 后，离心。将沉淀冷冻干燥，得到精制的核桃壳多糖。

### 1.2.2 核桃壳多糖的纯化

#### 1.2.2.1 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱层析法分离纯化

将核桃壳多糖配制成 30 mg/mL 的溶液，溶液经 DEAE-52 (3 cm×50 cm) 柱层析。苯酚-硫酸法来检测核桃壳多糖分布，绘制其洗脱曲线，收集核桃壳多糖的峰洗脱液，经浓缩、冷冻干燥后，得到纯化后的核桃壳多糖样品。柱分离条件：上样 2 mL，上样完毕后以蒸馏水和 0.5 mol/L NaCl 梯度进行洗脱，洗脱液的流速控制为 1 mL/min，收集洗脱液时控制为 3 min/管，收集 60 管。

#### 1.2.2.2 Sephadex G-100 凝胶柱分离纯化

将经 DEAE-52 纯化后的核桃壳多糖配制成 10 mg/mL 的溶液，溶液经 Sephadex G-100 (2 cm×60 cm) 柱层析，苯酚-硫酸法来跟踪检测核桃壳多糖含量，绘制其洗脱曲线，收集核桃壳多糖的峰洗脱液，经浓缩、冷冻干燥后，得到均一组分的核桃壳多糖样品 (walnut shell polysaccharide, WSP)。柱分离条件：上样量为 2 mL，上样完毕成用蒸馏水来进行洗脱，洗脱液的流速控制为 1 mL/min，收集洗脱液时控制为 3 min /管，收集 60 管。

### 1.2.3 核桃壳多糖衍生物的制备

#### 1.2.3.1 乙酰化核桃壳多糖的制备

准确称取纯化后的 WSP 1 g，置于 100 mL 的圆底烧瓶内，加入 15 mL 的蒸馏水使其完全溶解。用 10% 的氢氧化钠溶液调节 WSP 溶液的 pH 值，使其保持在 8.5~9.0。向多糖溶液中滴加 1.5 mL 乙酸酐，并不断磁力搅拌反应液。待乙酸酐滴加完成之后，升高温度到达 45 °C，在恒温中继续采用磁力搅拌反应液 2 h。该反应完成后，以 2 mol/L 的盐酸调整多糖反应液的 pH 值至 7.0，进行透析操作处理。向透析过的多糖反应液中加入 200 mL 无水乙醇，静置 12 h 后，离心。将沉淀冷冻干燥，得到乙酰化核桃壳多糖 (acetylated walnut shell polysaccharide,

AWSP)。

#### 1.2.3.2 磷酸化核桃壳多糖的制备

向 100 mL 的圆底烧瓶内加入 5 g 三聚磷酸钠与 1 g 三偏磷酸钠固体，再加 10 mL 的蒸馏水，以磁力搅拌方式使其充分地溶解。室温条件，分批加入 1 g 纯化的 WSP。待 WSP 加入完成后，升高温度到达 460 °C，在恒温中继续采用磁力搅拌反应液 5 h。反应完成后，以 2 mol/L 的盐酸调整多糖反应液的 pH 值至 7.0，再进行透析操作处理。向透析过的多糖反应液中加入 200 mL 无水乙醇，静置 12 h 后，离心。将沉淀冷冻干燥，得到磷酸化核桃壳多糖 (phosphorylated walnut shell polysaccharide, PWSP)。

#### 1.2.4 紫外光谱分析

将纯化后的 WSP 配制成 100 µg/mL 的溶液，置于在 200~600 nm 的波长范围内采用全波长扫描。

#### 1.2.5 红外光谱分析

分别将 1.0 mg 干燥的均一组分的 WSP 与 KBr 混合压片于 4000~500 cm<sup>-1</sup> 红外光谱仪扫描。

#### 1.2.6 分子量测定

精密称量不同分子量的寡糖，分别加入蒸馏水配置成 5 mg/mL 的标准溶液，以 12000 转/min 来离心 10 min，取上清液后用 0.22 µm 的微孔进行滤膜过滤。然后，将滤液置于 2.0 mL 的进样瓶内，备用。采用高效凝胶渗透色谱法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 测定不同分子量寡糖的标准曲线。按照同样步骤配置纯化后的 WSP 溶液，其浓度为 5 mg/mL 多糖溶液，再采用 HPGPC 法测定多糖样品的分子量及其纯度。色谱柱：BRT105-104-102 的串联凝胶柱 (8 mm× 300 mm)；流动相：0.05 mol/L 的 NaCl 溶液；流速：0.6 mL/min；柱温：40 °C；进样量：20 µL；检测器：RI-10A 的示差检测器。

#### 1.2.7 单糖组分测定

取 16 种单糖标准品，配置成一定浓度的混合标准溶液<sup>[8]</sup>。准确称得 10 mg 纯化后的 WSP 样品倒入安瓿瓶内，加 2 mL 的三氟乙酸溶液 (3 mol/L)，升高温度到 120 °C 水解 3 h。待 WSP 样品水解完成后，加入 5 mL 水混匀。吸取 50 µL 混匀后的样品溶液，再加入 950 µL 去离子水，12000 r/min 离心 5 min，取上清液进行样品的单糖组分分析。色谱柱：PA20 (3 mm×150 mm)；流动相：A 为 H<sub>2</sub>O；B 为 15 mmol/L NaOH；C 为 15 mmol/L NaOH-100 mmol/L NaOAc；洗脱梯度：0~26 min，A 相/B 相/C 相 (95 : 5 : 0, V/V)，26~42 min A 相/B 相/C 相 (85 : 5 : 10, V/V)，42~42.1 min，A 相/B 相/C 相 (85 : 5 : 10, V/V)，42.1~52 min，

A相/B相/C相(60:0:40, V/V); 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5  $\mu$ L; 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 检测器: 电化学检测器。

### 1.2.8 扫描电镜分析

称取 10 mg 纯化后的 WSP 样本, 均匀地铺平在导电碳膜上, 再置于离子溅射仪样品舱中, 进行喷金 40 s。取出 WSP 样品后, 放置到扫描电子显微镜的观察室, 加速电压为 2 kV, 进行多糖样品外部形貌观察<sup>[8]</sup>。

### 1.2.9 总糖含量测定

以苯酚-硫酸法<sup>[9]</sup>来测定 WSP 及其衍生物总糖的含量, 于 490 nm 处检测样品的吸光度。

### 1.2.10 核磁共振分析

用核磁共振仪记录 WSP 及其衍生物样品的核磁共振谱。将样品溶于 D<sub>2</sub>O 中配置浓度为 40 mg/mL, 在 25  $^{\circ}$ C 下记录 1D NMR 谱。

### 1.2.11 抗氧化活性测定

#### 1.2.11.1 DPPH 自由基清除率测定

用无水乙醇溶解 DPPH 配制成 0.2 mmol/L 的溶液, 用去离子水分别溶解 WSP 及其衍生物配制为质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mg/mL 的样品溶液。取 2 mL 的 DPPH 溶液置于试管内, 分别加入 2 mL 不同质量浓度的 WSP 及其衍生物溶液, 振荡混匀, 室温下避光放置 30 min 后, 在波长为 517 nm 处测定各样品的吸光度<sup>[10]</sup>。按公式 (1) 计算自由基清除率 ( $R$ )。

$$R = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中,  $A_0$ : 空白对照组吸光度值;  $A_1$ : 样品溶液的吸光度值。

#### 1.2.11.2 羟基自由基清除率的测定

用去离子水溶解 WSP 及其衍生物配制成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mg/mL 的溶液。用 10 mL 干净的纳氏比色管, 向其依次加 1 mL 不同质量浓度的样品溶液, 1 mL 的 6 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液, 1 mL 的 6 mmol/L 水杨酸溶液。最后, 加 1 mL 的 6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液进行反应, 摇匀, 于 37  $^{\circ}$ C 的水浴中反应 1 h。在波长为 510 nm 处测定各样品的吸光度<sup>[4]</sup>, 按公式 (1) 计算清除率。

#### 1.2.11.3 超氧阴离子自由基清除率的测定

用去离子水溶解 WSP 及其衍生物配制成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mg/mL 的溶液。分别吸取 1 mL 的各质量浓度的样品溶液, 然后分别加 4.0 mL 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L pH=8.0), 混匀后于 25  $^{\circ}$ C 水浴中预热 20 min。加 0.4 mL 的邻苯三酚溶

液 (2.5 mmol/L)，混匀后室温反应 3 min。最后，加入 1.0 mL 的 HCl (2 mol/L) 终止该反应。在波长为 325 nm 处测定各样品的吸光度<sup>[4]</sup>，按公式 (1) 计算清除率。

#### 1.2.11.4 还原能力的测定

用去离子水溶解 WSP 及其衍生物配制成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mg/mL 的溶液。取不同质量浓度的样品溶液 1 mL，加 2.5 mL 的磷酸缓冲液 (pH 6.6) 和 5.0 mL 质量浓度为 1% 的  $K_3Fe(CN)_6$  溶液，混匀。将混合液于 50°C 中保温 20 min，再加 2.5 mL 质量浓度为 10% 的三氯乙酸溶液，终止该反应。用 3000 转/min 离心机进行离心 5 min，取 2.5 mL 上清液，加 2.5 mL 的蒸馏水与 0.5 mL 质量浓度为 0.1% 的  $FeCl_3$  溶液，混匀，静置 30 min，在波长为 700 nm 处测定各样品的吸光度<sup>[4]</sup>，计算同公式 1。

#### 1.2.12 数据分析

所有实验重复 3 次，数据以平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用 SPSS 26 统计软件进行方差分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 核桃壳多糖的提取及收率和总糖的测定

在提取粗多糖过程中，研究中对提取工艺进行了优化，即料液比为 1:25 (核桃壳:水)，浸提温度 90 °C，提取时间 4 h。在最优的 WSP 提取工艺条件下，其多糖提取率可达 3.51% (见表 1)。在粗 WSP 精制过程中，以 Sevage 法来去除粗多糖中的蛋白质和核酸成分，以透析法来去除粗多糖中混有的小分子化合物，以此方法来获得精制的 WSP。精制后的 WSP 再经过 DEAE-52 和 Sephadex G-100 纯化，纯化后的 WSP 以苯酚-硫酸法测定总糖含量，其总糖含量为 98.51%。

表 1 WSP 及其衍生物的总糖含量和收率

Table 1 Total sugar content and yield of WSP and its derivatives

样品名称 Sample name	测定项目 Detection item	
	产率 Yield (%)	总糖 Total sugar (%)
WSP	3.51 ± 0.20	98.51 ± 0.93
AWSP	90.36 ± 0.35	94.29 ± 1.03
PWSP	46.93 ± 0.22	85.37 ± 1.21

## 2.2 核桃壳多糖的紫外和红外分析

紫外分光光度计法在 280 nm 处看有无吸收峰来判断多糖中是否含有蛋白质存在, 以及在 260 nm 处看有无吸收峰来判断多糖中是否含有核酸存在, 而在 620 nm 处看有无吸收峰来判断多糖中是否有色素存在。由图 1 可以看出, WSP 全波长 (200~800 nm) 紫外分光光度计扫描结果显示, 在 260 nm 处没有出现核酸的特征峰, 在 280 nm 处没有出现蛋白的特征峰, 在 620 nm 处也没有出现色素的特征峰, 因此可以推断出纯化后的 WSP 基本不含蛋白、色素等杂质。以红外光谱分析 WSP 的结构, 可鉴定其存在的多糖构型、官能团、取代基等。图 2 为 WSP 红外光谱分析结果, 从该图可以其具有多糖类物质的特征吸收峰。在  $3448\text{ cm}^{-1}$  出现一种宽峰是 O-H 伸缩的振动峰,  $2932\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰是 C-H 伸缩的振动峰, 表明 WSP 中存在分子内与分子间的氢键。在  $1637\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰为 C=O 伸缩振动, 说明 WSP 中有羰基的存在。在  $1443\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰为 C-H 变角的振动, 在  $1333\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰为 -COOH 的 C=O 对称伸缩的振动峰, 在  $1024\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰是 C-O 所伸展的振动峰。在  $894\text{ cm}^{-1}$  处有吸收峰, 则可以推断出 WSP 的构型为  $\beta$ -糖苷键。WSP 红外光谱分析与其单糖组分分析相一致。

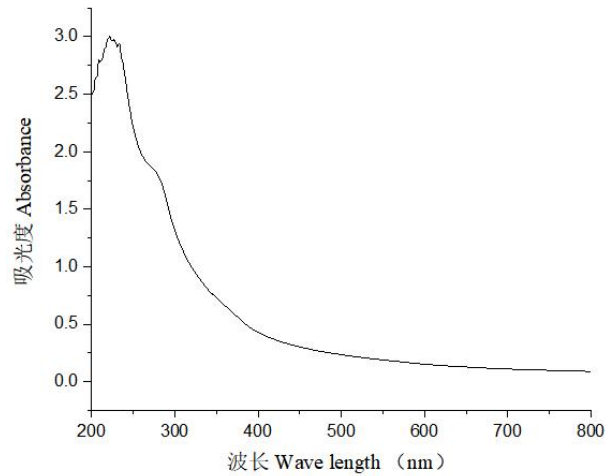


图 1 WSP 的紫外分析

Fig.1 UV analysis of WSP

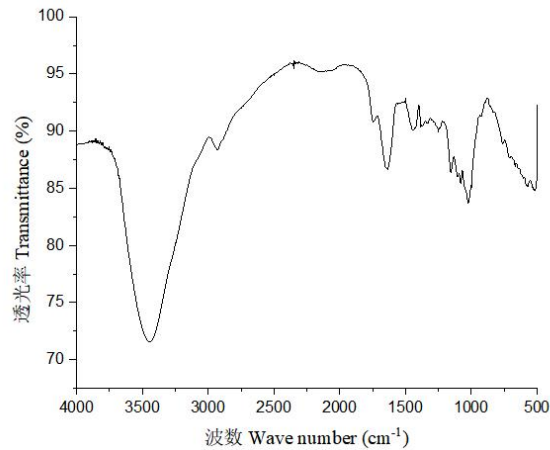


图2 WSP 的红外分析

Fig.2 IR analysis of WSP

### 2.3 核桃壳多糖的分子量、单糖组成及 SEM 分析

WSP 经分离纯化得到均一多糖组分后，采用 HPGPC 测定其分子量及其纯度。WSP 分子量测定结果显示（见图 3），其色谱图中主要有一个峰，其峰值时间为 37.4 min，通过计算得到 WSP 的分子量为  $9.45 \times 10^4$  Da。从分子量测定色谱图中可以看出，其他杂质峰较少，可以说明纯化后的 WSP 纯度较高，通过峰面积比计算可得该多糖的纯度为 94.46%。植物多糖中单糖的组成往往与其生物活性密切相关，因此了解植物多糖的单糖组成是多糖研究中必不可少的步骤。目前植物多糖中单糖的测定主要采用离子色谱法、高效毛细管电泳法、高效液相色谱法、气相色谱法等。本研究中，采用离子色谱法对纯化后的 WSP 进行单糖组分及其含量测定。从 WSP 的单糖组分测定的离子色谱图可以看出（见图 4），主要有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、半乳糖醛酸所构成的杂多糖，各个单糖组分摩尔比为 6.7 : 16.5 : 28.3 : 11.2 : 12.5 : 24.8。从单糖组分及其含量来看，WSP 中半乳糖醛酸占比较大，该多糖属于酸性糖。WSP 的 SEM 分析结果表明（见图 5），在 500 倍镜下，多糖样品呈现颗粒状和块状的结构；在 2000 倍镜下可见多糖样品表面具有颗粒状的聚集物，紧密堆积在一起，这有可能是由于样品分子间相互作用较强所致；在 5000 倍镜下，可见多糖样品表面较为光滑，表面堆积了大量的片状物或球状物。



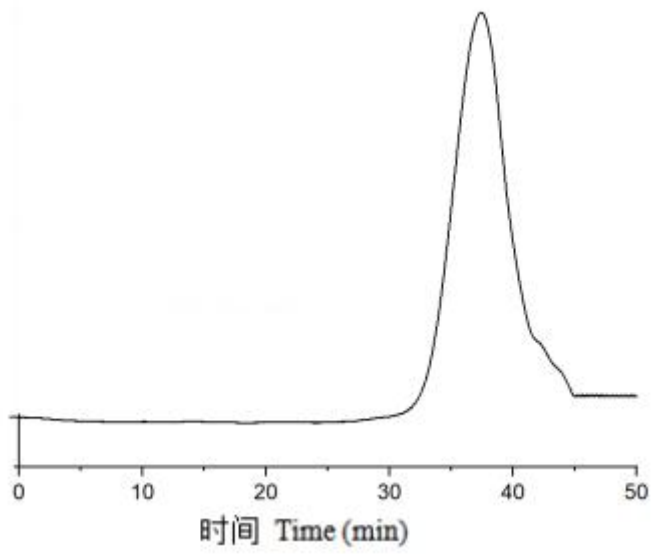


图 3 WSP 的 HPGPC 色谱图

Fig.3 HPGPC chromatogram of WSP

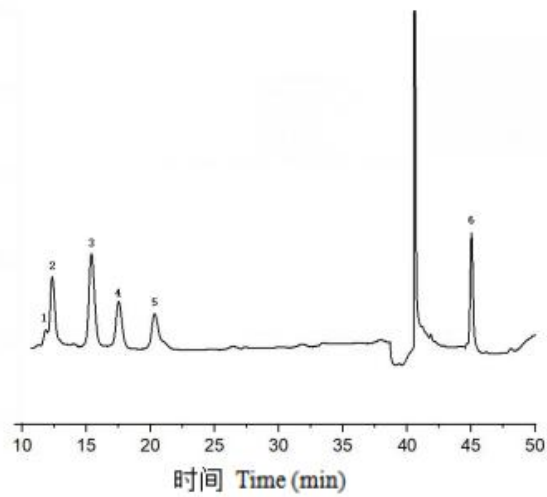


图 4 WSP 的离子色谱图

Fig.4 Ion chromatogram of WSP

注：1~6 分别代表鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和半乳糖醛酸。

Note: 1-6 represent rhamnose, arabinose, galactose, glucose, xylose and galacturonic acid, respectively.

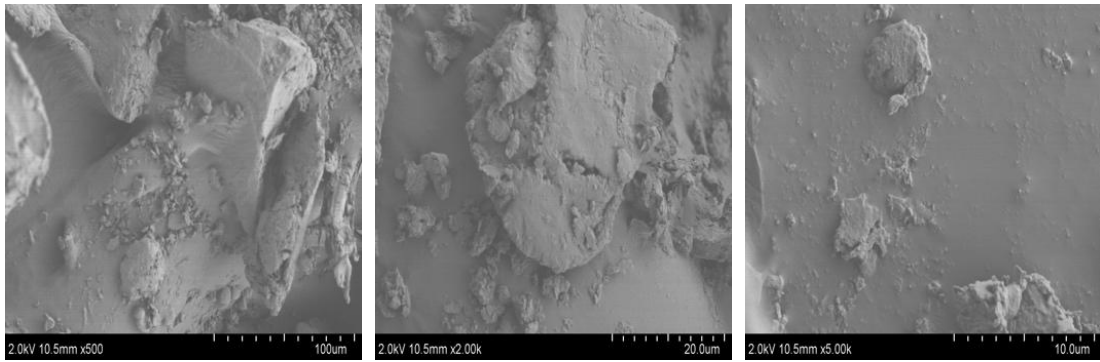


图 5 WSP 的 SEM 图

Fig.5 SEM images of WSP

#### 2.4 核桃壳多糖 1D NMR 分析

1D NMR 波谱主要包括  $^{13}\text{C}$  NMR 和 DEPT 135, 可用于归属糖残基中碳和氢的化学位移。为了研究 WSP 分子结构, 本研究对其进行了 1D NMR 表征。WSP 的 1D NMR 表征结果显示, 在图 6 中  $^{13}\text{C}$  NMR 化学位移  $\delta$  170.8 处有明显的信号峰, 该峰为羰基信号峰 (C6), 结合 WSP 组分数据可以推测出该峰为半乳糖醛酸的羧基信号峰。WSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 图谱中  $\delta$  99.7、100.4 和 104.6 三个异头碳 C1 的信号中, 在 100 以上的有 2 个较强的吸收峰, 在  $\delta$  100 以下的只有一个弱吸收峰, 说明 WSP 中的异头碳构型 2 种为  $\beta$  型, 一种为  $\alpha$  型, 说明该糖含有 3 种糖残基。WSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 图谱中  $\delta$  60.8 ~ 78.7 的信号为 C2~C5 的碳信号峰。在  $^{13}\text{C}$  NMR 图谱中, 化学位移  $\delta$  16.7 处出现了碳信号, 说明 WSP 中有鼠李糖的存在, 分析结果与单糖组分分析结果一致。与此同时, WSP 的 1D 表征中的 DEPT 135 结果显示 (见图 7), 在  $\delta$  99.9~107.7 (C1)、68.2~83.9 (C4、C5) 处出现的是正信号峰,  $\delta$  60.8~63.0 (C2、C3) 处出现了负信号峰。

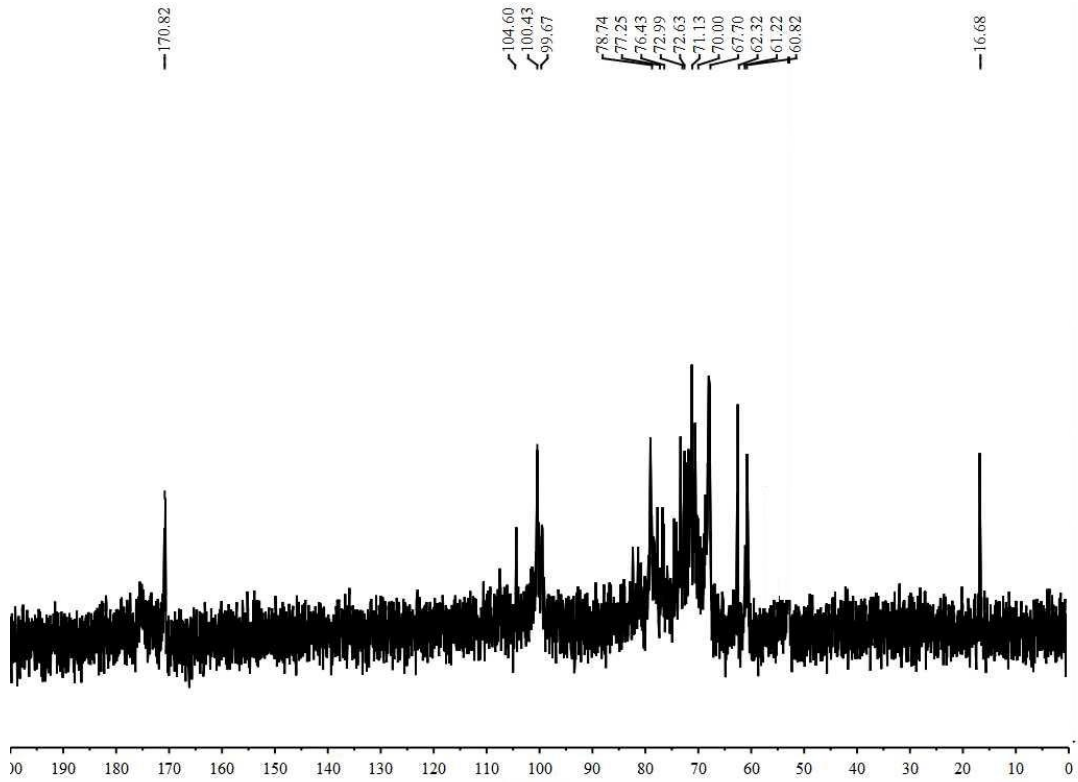


图 6 WSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱

Fig.6  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of WSP

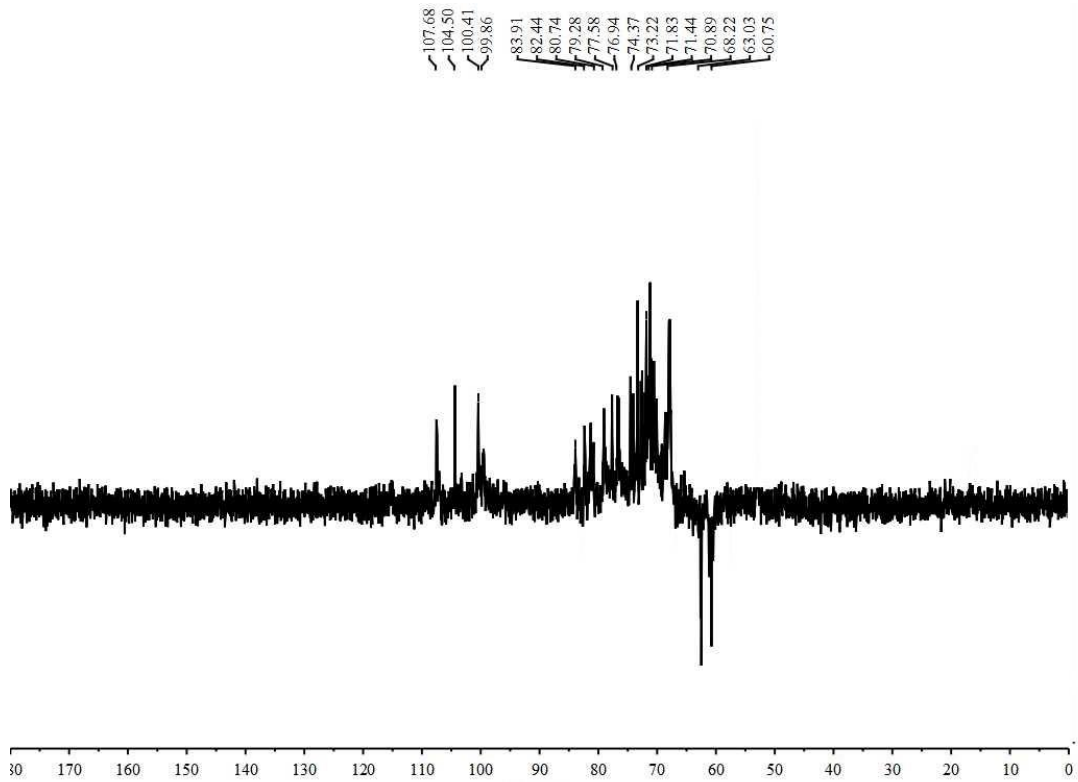


图 7 WSP 的 DEPT 135 谱

Fig.7 DEPT 135 spectrum of WSP

## 2.5 核桃壳多糖衍生物的 $^{13}\text{C}$ NMR 和 $^{31}\text{P}$ NMR 分析

有研究表明<sup>[22-24]</sup>, 多糖经过结构修饰后其活性有一定程度的提高, 特别是乙酰化和磷酸化多糖的活性提高比较明显。为了进一步研究 WSP 构效关系, 本研究对其进行多糖的衍生化, 包括制备了 AWSP 和 PWSP, 其 WSP 衍生物的收率分别为 90.36%和 46.93% (见表 1)。从 WSP 衍生物产率来看, 乙酰化多糖明显高于磷酸化, 这跟制备条件、反应试剂均有关系, 从而也说明了 WSP 磷酸化相对较难。乙酰化反应是以乙酸酐为酰化反应试剂, 反应活性高, 而磷酸化反应是以三聚磷酸钠和三偏磷酸钠为磷化试剂, 其活性较低, 从而出现了磷酸化反应收率低于乙酰化反应。在此基础, 又对 WSP 衍生物中的总糖含量进行了检测, 因为总糖含量会影响其生物活性。同样以苯酚-硫酸法测定多糖衍生物的总糖含量, 其测定结果显示 AWSP 和 PWSP 总糖含量分别为 94.29%和 85.37%, 相比 WSP, 其总糖含量有所下降。WSP 衍生物总糖含量下降可能是因为反应过程中导致多糖结构的破坏, 从而导致总糖的损失。为了确证 WSP 衍生化是否成功, 研究中对其 AWSP 和 PWSP 进行了  $^{13}\text{C}$  NMR 和  $^{31}\text{P}$  NMR 表征。从图 8 可以看出, 与 WSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 相比, 在化学位移 $\delta$  181.1 处有明显的峰, 该处峰为乙酰基团中羰基的特征峰。而在化学位移 $\delta$  52.9 处的峰, 为乙酰基团中甲基的特征峰。WSP 经过乙酰化后, 与 WSP 相比其他碳原子的化学位移基本保持不变。图 9 和图 10 分别为 PWSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 和  $^{31}\text{P}$  NMR。从图 9 可以看出, 与 WSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 相比, 其化学位移变化较小, 有所差异在于羰基峰偏向高场, 化学位移为 $\delta$  173.3, 而 C1 的化合物也稍微走向低场, 化学位移为 $\delta$  102.6。为了验证磷酸化, 又对 PWSP 进行了  $^{31}\text{P}$  NMR 表征, 从图 10 可以看出, WSP 中有三个位置被磷酸根所取代, 并且在 $\delta$  24.6 处有明显的峰, 这说明该处最容易被磷酸基团所修饰, 而其他两处修饰较难。从 WSP 衍生化 NMR 测定结果表明, 乙酰化和磷酸化是成功修饰的。

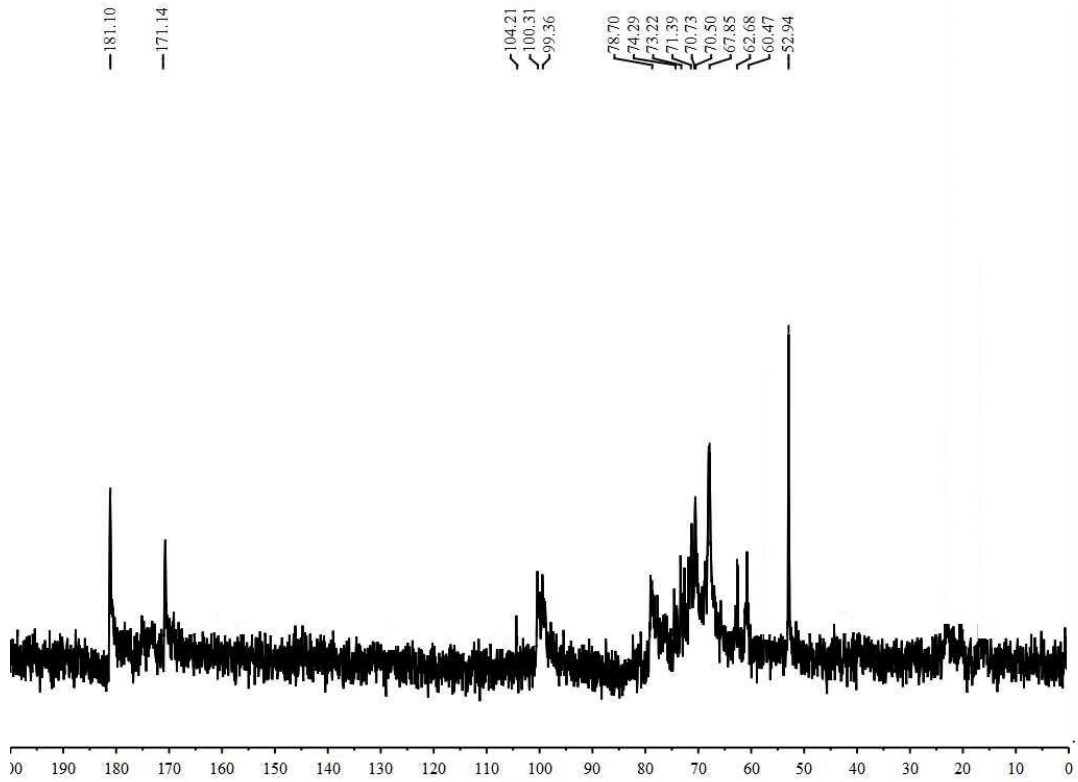


图 8 AWSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱

Fig.8  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of AWSP

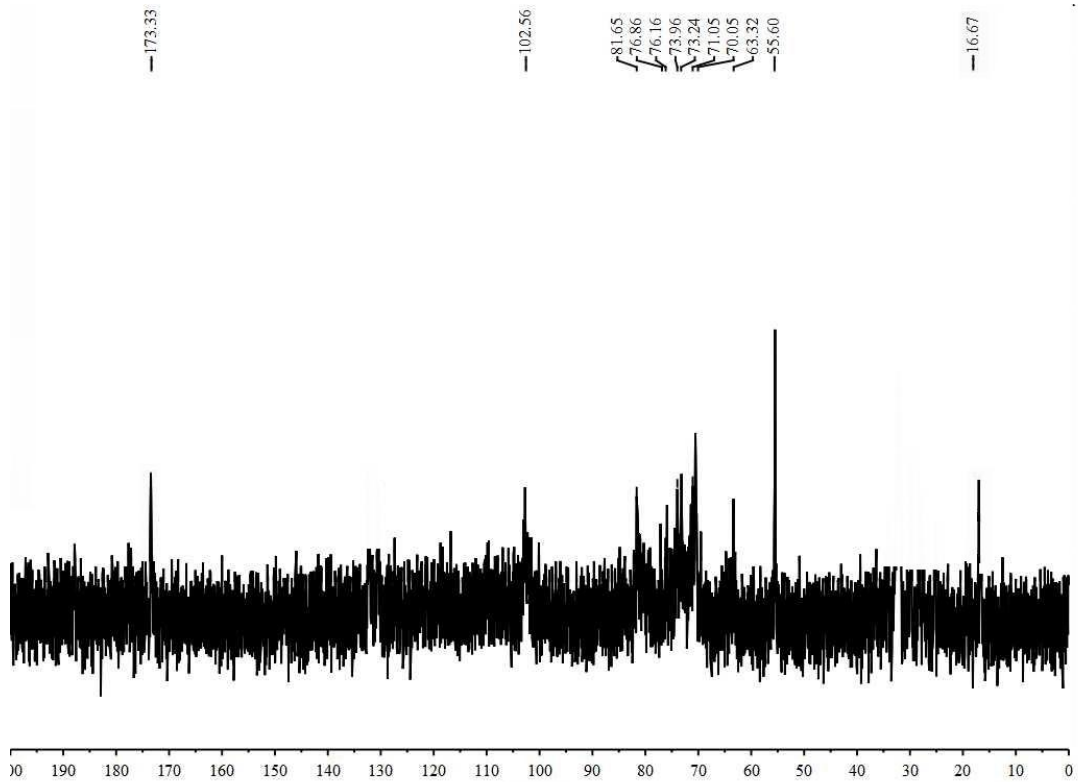


图 9 PWSP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱

Fig.9  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of PWSP

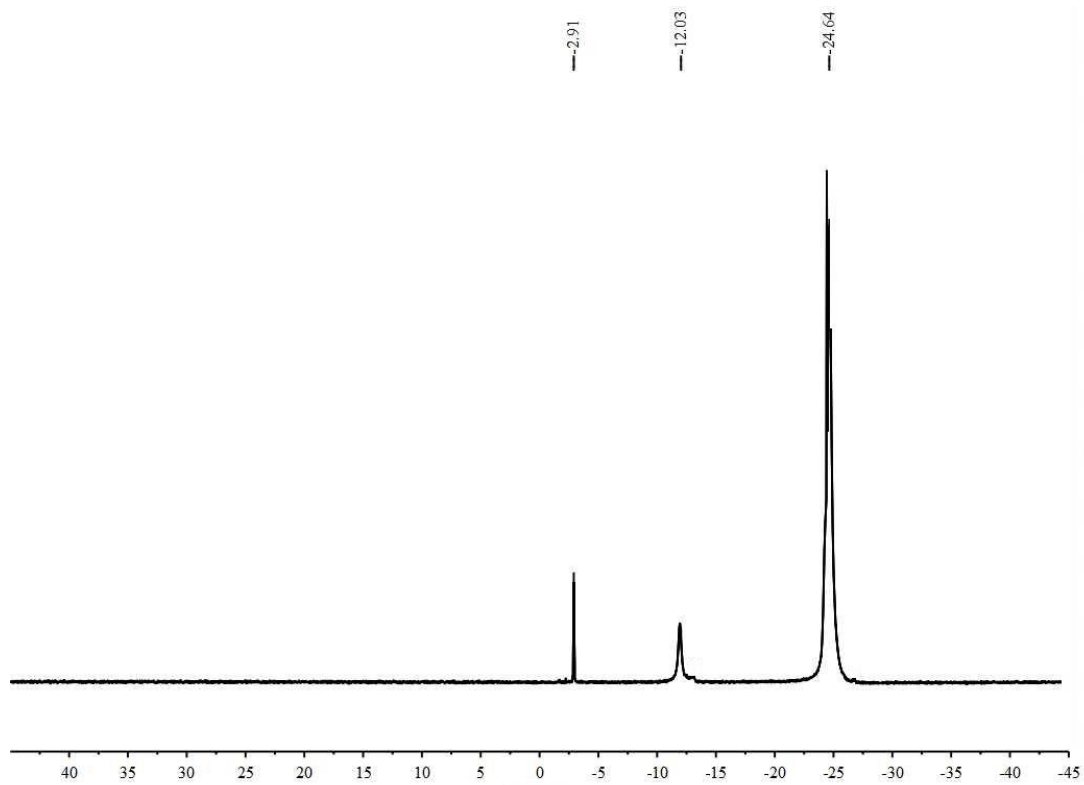


图 10 PWSP 的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱

Fig.10  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of PWSP

## 2.6 核桃壳多糖及其衍生物的体外抗氧化活性研究

本研究对 WSP 及其衍生（乙酰化多糖和磷酸化多糖）进行了体外抗氧化活性研究，包括清除超氧阴离子、羟基自由基、DPPH 自由基和还原能力的测定。体外抗氧化活性结果表明，WSP 及其衍生物具有良好的生物活性。从图 11 可以看出，V<sub>C</sub> 对 DPPH 自由基的清除率随着质量浓度的升高其变化值不大，而 WSP 及其衍生物对 DPPH 自由基的清除率存在一定质量浓度依赖性，当浓度不断提升时其清除能力会不断提升，当样品质量浓度达到 3.2 mg/mL 时，PWSP 对 DPPH 自由基的清除率（92.0%）基本上接近阳性对照品 V<sub>C</sub> 的水平。图 12 为 WSP 及其衍生物对羟基自由基的清除率随质量浓度的变化曲线，从该图中可以看出，WSP 及其衍生物对羟基自由基的清除率存在浓度依赖性，随样品质量浓度升高其清除能力不断提升，当样品质量浓度为 3.2 mg/mL 时，PWSP 对羟基自由基的清除率为最高值，清除率可达 98.2%，优于阳性对照品 V<sub>C</sub>（96.5%）。从图 13 可以看出，WSP 及其衍生物对超氧阴离子的清除率随着质量浓度的升高，其清除能力不断提升，当样品质量浓度能到达到 3.2 mg/mL 时，PWSP 的超氧阴离子清除率可达 92.3%，基本上达到阳性对照品 V<sub>C</sub> 水平。图 14

为 WSP 及其衍生物的还原能力与质量浓度的影响曲线，从该图中可以看出，当样品浓度达到最大值时，PWSP 的还原能力同 Vc 水平一致。从现有的体外抗氧化活性数据来看，AWSP 和 PWSP 存在一定的浓度依赖性。多糖结构的改变会导致其理化性质变化，影响多糖抗氧化活性，多糖磷酸化是一种有效途径<sup>[25]</sup>。PWSP 改变多糖的结构、理化性质等，从而导致抗氧化活性有所提高<sup>[26]</sup>。从体外抗氧化活性结果可以看出，WSP 及其衍生物存在一定的构效关系。WSP 经过结构修饰后，其抗氧化活性有所改变，其中乙酰化多糖的活性有一定的降低趋势，而 PWSP 有助于提高其活性，但这些 WSP 衍生物的抗氧化活性存在剂量依赖性。这构效关系也可以为其他多糖衍生化提供一定的理论依据，可以供给其他多糖研究人员参考。另外，现有的 WSP 及其衍生物体外抗氧化活性数据，可以为后续进一步研究体内活性、作用机制等提供研究基础。

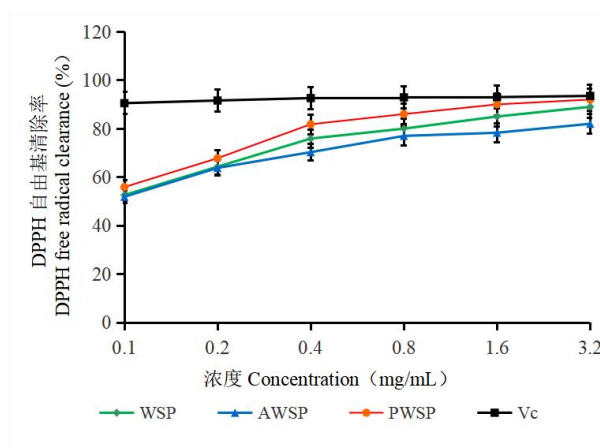


图 11 WSP 及其衍生物对 DPPH 自由基的清除率

Fig.11 DPPH free radical scavenging rate of WSP and its derivatives

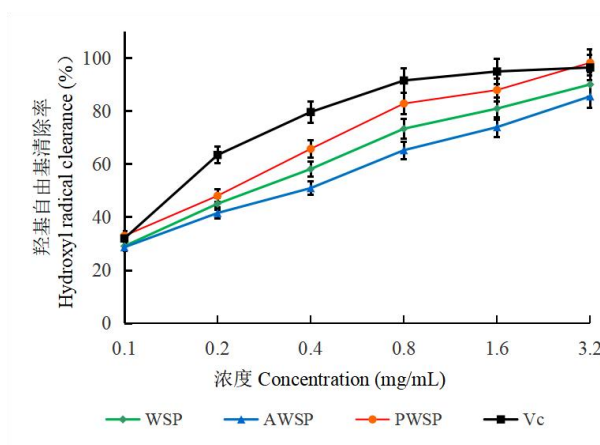


图 12 WSP 及其衍生物的羟基自由基清除率

Fig.12 Hydroxyl radical scavenging rate of WSP and its derivatives

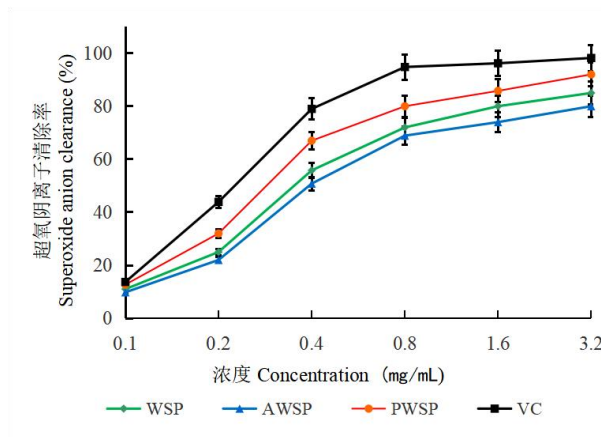


图 13 WSP 及其衍生物的超氧阴离子自由基清除率

Fig.13 Superoxide anion radical scavenging rate of WSP and its derivatives

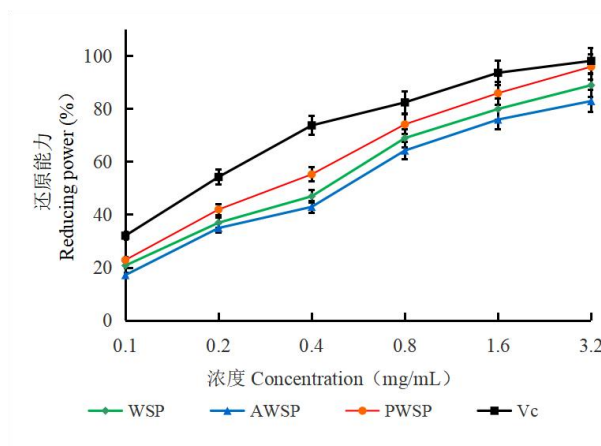


图 14 WSP 及其衍生物的还原力

Fig.14 Reducing power of WSP and its derivatives

### 3 结论

本研究以核桃壳作为原材料，采用热水提取、醇沉、透析等工艺制备得到精制 WSP。在此基础上，以 DEAE-52 和 Sephadex G-100 进一步分离得到均一组分的核桃壳纯多糖。纯化后的 WSP 经测定分子量为  $9.45 \times 10^4$  Da，而单糖组分测定结果显示 WSP 是以酸性杂多糖为主，含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和半乳糖醛酸，各单糖组分的摩尔比分别为 6.7 : 16.5 : 28.3 : 11.2 : 12.5 : 24.8。WSP 分子结构测定结果显示，多糖中含有  $\beta$ -糖苷键。WSP 分子量、单糖组分等测定，为进一步研 WSP 理化性质提供实验基础。为了探索 WSP 及其衍生物抗氧化活性，本研究用清除 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子和还原能力作为体外评价指标。体外抗氧化活性测定结果显示，WSP 及其衍生物均能表现出良好的生物活性。总的来说，本研究可以为进一步研究 WSP 结构、构效关系等提供一定的理论指导。另外，本研究为更好地开发 WSP 营养健康作用，以及对核桃相关产业链的升级与



发展具有实践性的意义。

#### 参考文献

- 1 Zheng Y,Wu S,Wang R,et al.Analysis and relationship of chemical components of various walnut(*Juglans regia* L.) Ltivars[J].J Food Meas Charact,2020,14:3605-3614.
- 2 Ros E,Izquierdo-Pulido M,Sala-Vila A.Beneficial effects of walnut consumption on human health:role of micronutrients[J].Curr Opin Clin Nutr Metab Care,2018,21:498-504.
- 3 Leung PH,Zhang QX,Wu JY.Mycelium cultivation,chemical composition and antitumor activity of a *Tolyocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*[J].J Appl Microbiolo,2006,101:275-283
- 4 Sun M,Zhao WY,Xie QP,et al.Lentinan reduces tumor progression by enhancing gemcitabine chemotherapy in urothelial bladder cancer[J].Surg Oncol,2015,24:28-34.
- 5 He N,Zhai X,Zhang X,et al.Extraction,purification and characterization of water soluble polysaccharides from green walnut husk with antioxidant and antiproliferative capacities[J].Proc Biochem,2020,88:S170-S179.
- 6 Queirós CSGP,Cardoso S,Lourenço A,et al.Characterization of walnut,almond,and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition[J].Biomass Convers Bior,2020,10:175-188.
- 7 Meng QR,Wang YQ,Chen F,et al.Polysaccharides from *Diaphragma juglandis* fructus:extraction optimization,antitumor,and immuneenhancement effects[J].Int J Biol Macromol,2018,115:835-845.
- 8 Zou LX,Liu CJ,Bi JF,et al.Effects of different treatments on functional components and antioxidant activity of *Prunus mira* Koehne[J].Food Mach(食品与机械),2019,35:145-151.
- 9 Liang QC,Zou GH,Liu S,et al.Separation,purification and anticancer activities of polysaccharides from the bark of *Juglans mandshurica*[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:1340-1345.
- 10 Sun Y,Sun TW,Wang F,et al.A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits antitumor potential and immunomodulatory effects[J].Carbohydr Polym,2013,92:577-582.
- 11 Gan QX,Wang J,Hu J,et al.Modation of apoptosis by plant polysaccharides for exerting anticancer effects:a review[J].Front Pharmacol,2020,11:792.
- 12 Luo LJ,Wu Y,Liu C,et al.Designing soluble soybean polysaccharides based nanoparticles to improve sustained antimicrobial activity of nisin[J].Carbohydr Polym,2019,225:115251.
- 13 Dehghani F,Mashhoody T,Panjehshahin M.Effect of aqueous extract of walnut septum on blood glucose and pancreatic structure in streptozotocininduced diabetic mouse[J].Iran J Pharmacol Therapeut,2012,11:10-14.
- 14 Wang GL,Zhang YL,Zhang RG,et al.The protective effects of walnut green husk polysaccharide on liver injury,vascar endothelial dysfunction and disorder of gut microbiota in high fructoseinduced mice[J].Int J Biol

- Macromol,2020,162:92-106.
- 15 Meng QR,Chen F,Xiao TC,et al.Inhibitory effects of polysaccharide from *Diaphragma juglandis* fructus on amylase and *D*-glucosidase activity,streptozotocin induced hyperglycemia model,advanced glycation endproducts formation,and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage[J].Int J Biol Macromol,2019,124:1080-1089.
  - 16 Asgari K,Labbafi M,Khodaiyan F,et al.High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource:trasound assisted extraction and physicochemical,structural and functional analysis[J].Int J Biol Macromol,2020,152:1274-1282.
  - 17 Meng QR,Li YH,Xiao TC,et al.Antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides isolated and purified from *Diaphragma juglandis* fructus[J].Int J Biolog Macromol,2017,105:431-437.
  - 18 Wang SW,Liu AJ,Li H.Preliminary study on antimicrobial activities of polysaccharide from walnut kernel pellicle against molds from yogurt[J].China Dairy Ind(中国乳业),2011,39:17-18.
  - 19 Xie JH,Tang W,Jin ML,et al.Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L.,*Zizyphus jujuba* Mill,*Plantago* spp.,and *Morus* spp.:structures and functionalities[J].Food Hydrocolloid,2016,60:148-160.
  - 20 Yang X,Zhou SW,Li H,et al.Structural characterization of Alpiniae Oxyphyllae Fructus polysaccharide 2 and its activation effects on RAW 264.7 macrophages[J].Int Immunopharmacol,2021,97:107708.
  - 21 Zhang H,Li CC,Lai PFH,et al.Fractionation,chemical characterization and immunostimulatory activity of  $\beta$ -glucan and galactoglucan from *Russula vinosa* Lindblad[J].Carbohydr Polym,2021,256:117559.
  - 22 Zhou SY,Huang GL,Chen GY.Extraction,structural analysis,derivatization and antioxidant activity of polysaccharide from Chinese yam[J].Food Chem,2021,361:130089.
  - 23 Zhou SY,Huang GL,Huang HL.Extraction,derivatization and antioxidant activities of onion polysaccharide[J].Food Chem,2022,388:133000.
  - 24 Zhou SY,Huang GL.Preparation,structure and activity of polysaccharide phosphate esters[J].Biomed Pharmacother,2021,144:112332.
  - 25 Xie LM,Shen MY,Wen PW,et al.Preparation,characterization,antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of phosphorylated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*[J].Food Chem Toxicol,2020,145:111754.
  - 26 Chen L,Huang GL.Antioxidant activities of phosphorylated pumpkin polysaccharide[J].Int J Biol Macromol,2019,125:256-261

收稿日期: 2024-08-26 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 重庆市教委科学技术研究计划项目 (KJZD-K202204502, KJQN202304501, KJQN202404513);

热带药用资源化学教育部重点实验室开放基金 (RDZH2023004)

\*通信作者 Tel: 15215100954; E-mail:zhoushiyang520@126.com