

核桃粕乙醇提取物降脂活性的谱效关系

王祖坤, 马雅鸽, 杨婧娟, 张希, 赵声兰

(云南中医药大学中药学院, 云南昆明 650500)

摘要: 研究了核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物的HPLC指纹图谱与降脂作用的谱效关系, 为确定核桃粕提取物降脂物质基础提供依据。建立9组核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物(S1~S9)HPLC指纹图谱; 采用1mM/L游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA)诱导HepG2细胞24 h建立脂肪变性模型, 造模成功后考察S1~S9对脂肪变性HepG2细胞的降脂作用; 运用灰色关联度法分析共有峰与降脂的谱效关系和降脂活性成分群。结果表明, S1~S9的HPLC图谱相似度0.31~0.96区间, 筛选到15个共有峰, 乙酸乙酯萃取物(S5)和大孔树脂纯化物(S8)降脂作用最强($p < 0.001$), 对降脂作用药效贡献大的前6个峰分别为14、6、12、10、13、11, 其中14号峰关联度最大且大于0.9, 其余5个峰关联度均大于0.85。核桃粕提取物发挥降脂作用是多种成分共同作用的结果。glansreginin A、(4S)-4-羟基- α -四氢萘酮-4-O- β -D-(6'-O-4"-羟基苯甲酰基)吡喃葡萄糖苷、(2E,4E)-8-羟基-2,7-二甲基-2,4-癸二烯-1,10-二酸6'-O- β -D-葡萄糖基吡喃糖基酯、glansreginin B、芦丁、槲皮素3-阿拉伯糖苷或槲皮素3-木糖苷对应的物质是核桃粕提取物中的主要降脂活性成分。

关键词: 脱脂核桃粕; HepG2 细胞; 降脂; 谱效关系; 提取物

文章编号: 1673-9078(2020)07-105-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.0027

Spectrum-Activity Relationship of Lipid-Lowering Ethanolic Extracts from Defatted Walnut Meal

WANG Zu-kun, MA Ya-ge, YANG Jin-juan, ZHANG Xi, ZHAO Shen-lan

(College of traditional Chinese medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: The spectrum-activity relationship between HPLC fingerprints and lipid-lowering effects of an ethanol extract, and its liquid-liquid extract and purified product (by macroporous resin), from the defatted walnut meal was studied, to provide a basis for determining the foundation material of their lipid-lowering effects. The HPLC fingerprints (S1~S9) of these extracts and purified products of defatted walnut meal were acquired; A free fatty acid (FFA) was added to HepG2 cells at 1 mM/L and treated for 24 h, to establish a model of steatosis. After the model was successfully established, the lipid-lowering effects of S1~S9 samples on steatosis in HepG2 cells were examined; The gray correlation method was used to analyze the spectrum-activity relationship between the common spectral peaks and the lipid-lowering effects of the active ingredient group. Results showed that among the 15 common peaks screened from the similarity range of 0.31~0.96 in the HPLC spectra of S1~S9, the ethyl acetate extract (S5) and the purified product of macroporous resin (S8) had the greatest lipid-lowering effects ($p < 0.001$). The first 6 peaks corresponding to the fractions that made a relatively high contribution to the lipid-lowering effect were peak 14, 6, 12, 10, 13, and 11, respectively. The correlation coefficient of peak 14 was the highest (higher than 0.9), with those of the remaining 5 peaks all higher than 0.85. The lipid-lowering effect of the extract from walnut meal resulted from the combined action of multiple constituents. The substances corresponding to glansreginin A, (4S)-4-hydroxy- α -tetralone-4-O- β -D-(6'-O-4"-hydroxybenzoyl)-glucopyranoside, (2E,4E)-8-

引文格式:

王祖坤,马雅鸽,杨婧娟,等.核桃粕乙醇提取物降脂活性的谱效关系[J].现代食品科技,2020,36(7):105-112

WANG Zu-kun, MA Ya-ge, YANG Jin-juan, et al. Spectrum-activity relationship of lipid-lowering ethanolic extracts from defatted walnut meal [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 105-112

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760735); 云南省科技厅-云南中医药大学联合专项(2017FF116-016, 2019FF002-006); 云南省生物科技重大科技专项(2018ZF013)

作者简介: 王祖坤(1992-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药、民族药及天然产物活性及机制

通讯作者: 赵声兰(1962-), 女, 教授, 研究方向: 药食资源研究与开发利用

hydroxy-2,7-dimethyl-2,4-decadiene-1,10-dioic acid 6'-O- β -D-glucopyranosyl ester, ginseng B, rutin, and quercetin 3-arabinoside or quercetin 3-xyloside were identified as the main lipid-lowering active components in the extracts from the defatted walnut meal.

Key words: pressed degreased walnut meal; HepG2 cells; lipid-lowering effect; spectrum-activity relationship; extract

核桃系胡桃科 (Juglandaceae) 胡桃属 (*Juglans* Linn)、山核桃属 (*Carya*)、缘核桃属 (*Annamocarya*) 等乔木植物的果实, 又称胡桃、羌桃, 与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名的“四大干果”^[1]。本草新编记载核桃润血脉、利三焦、补气养血、温肺润肠, 有治燥调血之功, 我国药典收载核桃仁, 甘, 温, 用于肾阳不足, 腰膝酸软, 阳痿遗精, 肺肾不足, 虚寒喘嗽, 肠燥便秘等症状^[2,3]。云南是核桃主产大省, 已成为极具云南高原特色, 在全国乃至世界有影响、有竞争力的产业^[4,5]。核桃粕是核桃取油后的副产物, 保留着核桃仁除脂肪外的主要营养成分^[6]。目前核桃粕的开发主要集中在蛋白质^[7,8], 其药用相关研发较少。高脂血症是指血浆中的脂蛋白谱异常, 一般特指总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 升高, 伴或不伴高密度脂蛋白 (HDL-C) 降低和 (或) 低密度脂蛋白 (LDL-C) 升高^[9], 是脑卒中、心脏猝死、高血压、糖尿病、脂肪肝及肥胖的重要因素。研究表明核桃粕提取物对谷氨酸钠诱导的肥胖小鼠和3T3-L1脂肪细胞具有较强的降脂作用^[10], 能显著调节肝脏和血清中脂质水平以及下调参与胆固醇吸收的蛋白质 (ABCG5/8和NPC1L1) 表达^[11]。中药谱效关系是以指纹图谱为基础, 将指纹图谱中特征的化学成分变化与中药的药效结合起来, 阐明与药效相关的活性成分^[12]。本研究首先制备核桃粕乙醇提取物, 然后利用不同溶剂萃取及大孔树脂制备不同溶剂萃取物和大孔树脂纯化物, 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》建立核桃粕不同提取物的指纹图谱筛选出共有峰并评价其相似度, 研究其对脂肪变性HepG2细胞的降脂作用, 运用灰色关联度法分析HPLC指纹图谱中共有峰与降脂药效TG、TC的关联度, 为确定核桃粕提取物降脂作用的物质基础及核桃粕资源的高值化开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱系统, 安捷伦科技有限公司; CO₂ 培养箱, 赛默飞世尔科技公司; 倒置显微镜, 尼康; INFINITE M200 PRO酶标仪, 瑞士TECAN公司; 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; ES-315全自动

高压灭菌锅, 日本TOMY公司; 电热恒温水浴锅, 上海医疗器械五厂; 冰箱、超低温冰箱, 中国海尔集团。

1.2 原料、细胞及耗材

核桃粕, 云南汇智源食品有限公司; HepG2 细胞株, 中国科学院昆明细胞库。

MEM 培养液、青霉素链霉素双抗、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液, BI 公司; 棕榈酸钠、油酸钠, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DMSO, 索来宝; 没食子酸、没食子酸乙酯, 成都德斯特生物技术有限公司; 绿原酸、芦丁, 北京索来宝科技有限公司; 鞣花酸, 美仑生物; 甘油三酯 (TG) 试剂盒、总胆固醇 (TC) 试剂盒, 南京建成生物过程研究所; 非诺贝特、阿托伐他汀, 美仑生物; 甲醇为色谱纯; 哇哈哈纯净水; 蒸馏水; 石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯; 25 cm² 培养瓶、6 孔细胞培养板, 康宁公司; 0.22 μ m 微孔滤膜, Millipore 公司等。

1.3 方法

1.3.1 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物的制备

核桃粕粉碎, 过 60 目筛, 核桃粕粉用 50%乙醇回流提取, 过滤, 离心, 上清液浓缩、冷冻干燥得核桃粕乙醇提取物 (S1)。核桃粕粉用蒸馏水回流提取, 过滤, 离心, 上清液浓缩冷冻干燥得核桃粕水提取物 (S2)。取 S1 溶于水, 按照溶剂极性大小, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取后, 浓缩、冷冻干燥得石油醚萃取物 (S3)、氯仿萃取物 (S4)、乙酸乙酯萃取物 (S5)、正丁醇萃取物 (S6)、水层收集物 (S7); 核桃粕乙醇提取物用 HPD-100 大孔树脂纯化得大孔树脂纯化物 (S8)。大孔树脂纯化物经硅胶柱, 用氯仿: 甲醇 1:1 洗脱得硅胶柱纯化物 (S9)。

1.3.2 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物指纹图谱建立

1.3.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇, 0.1%甲酸水溶液; 流速: 0.8 mL/min, 进样体积 10 μ L, 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 波长: 280 nm, 梯度洗脱条件见 (表 1)。

表 1 色谱洗脱条件

Table 1 Chromatographic elution conditions		
时间/min	甲醇/%	0.1 甲酸水溶液/%
0	2	98
2	2	98
7	5	95
10	8	92
15	8	92
20	10	90
30	10	90
35	15	85
40	20	80
45	25	75
50	30	70
55	35	65
65	50	50
80	50	50

1.3.2.2 供试品溶液的制备

精密称定 S1~S9 提取物 0.1 g, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加 30% 甲醇超声至完全溶解, 放冷, 0.45 μ m 滤膜过滤, 取滤液进行 HPLC 分析。

1.3.2.3 建立指纹图谱

将 S1~S9 样品 HPLC 色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版软件, 以样品 S1 的图谱为参照图谱, 采用中位数法, 按 Mark 峰进行多点校正, 自动匹配生成对照指纹图谱, 并进行相似度分析。

1.3.3 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物对脂肪变性 HepG2 细胞的降脂活性

1.3.3.1 脂肪变性 HepG2 细胞模型的建立

HepG2 细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 待细胞处于对数生长期, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 5×10^5 个/mL 细胞密度接种于 6 孔板, 放入 CO₂ 培养箱中, 待细胞长至 80% 左右, 随机分为正常组、模型组和 11 个给药组, 每组设三个复孔。正常组给予正常培养液, 模型组、给药组给予 1 mM/L 游离脂肪酸 (油酸: 棕榈酸=2:1, 摩尔比) 诱导液培养 24 h 即可建立脂肪变性 HepG2 细胞模型^[13,14]。

1.3.3.2 分组及给药

造模成功后, 给药组分为非诺贝特组 (10 mmol/mL)、辛伐他汀组 (10 mmol/mL)、S1~S9 试药物组 (100 μ g/mL), 正常组、模型组每孔给予正常培养液 2 mL, 试药物组每孔给予 2 mL 相应 S1~S9 药物。细胞给药 24 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 用细胞刮刀收集细胞于 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C、2000

r/min 条件下离心 3 min, 弃去上清液留细胞沉淀, 按试剂盒说明书测定各组 TG、TC 含量。

1.3.4 统计学分析

实验数据用 (Mean $\pm$ SD) 表示, 采用 Graph Pad prism 5.0 统计软件分析处理, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $p < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 指纹图谱分析

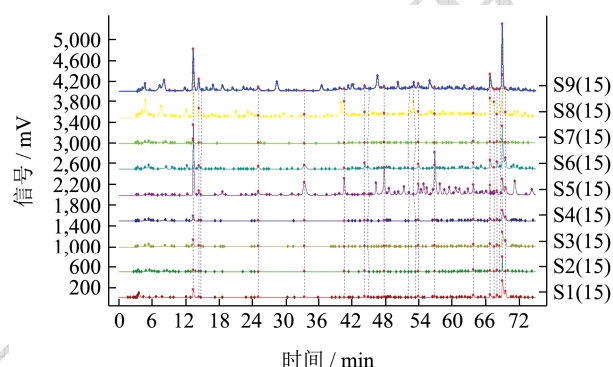


图 1 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物 S1~S9 指纹图谱

Fig.1 Fingerprints S1~S9 of ethanol extract and its liquid-liquid extracts and isolates of the macroporous resin from the defatted walnut meal

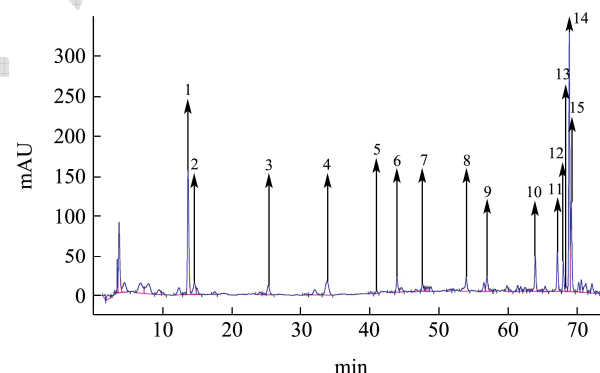


图 2 核桃粕乙醇提取物 (S1) HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of ethanol extract from the defatted walnut meal (S1)

S1~S9 指纹图谱相似度见 (表 2), 相似度 0.31~0.96, 表明核桃粕不同提取物间化学成分差异较大, 可为后续谱效研究提供数据基础; 自动匹配共得到 20 个共有峰, 从中选取峰形、分离度、特征性较好的 15 个特征峰 (图 2) 进行后续分析。15 个共有峰峰面积比和相对峰面积见 (表 3), 平均峰面积比大小顺序为 14>1>11>15>10>9>4>8>2>12>7>5>6>3>13, 其中峰 14 平均峰面积比最高且为 13.05%, 峰 13 平均峰面积比最低且为 0.82%。峰 14 平均峰面积比最大, 故

以峰 14 为参照峰, 相对峰面积在 0.003~4.11 区间, 说明不同的提取方法导致各核桃饼粕提取物之间化学成分含量差异较大。

表 2 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物 S1~S9 指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity evaluation S1~S9 of ethanol extract and its liquid-liquid extracts and isolates of the macroporous resin from defatted

walnut meal										
样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	对照
S1	1									
S2	0.79	1								
S3	0.86	0.84	1							
S4	0.82	0.84	0.96	1						
S5	0.53	0.41	0.56	0.56	1					
S6	0.82	0.74	0.92	0.90	0.68	1				
S7	0.73	0.93	0.82	0.85	0.31	0.69	1			
S8	0.70	0.64	0.69	0.71	0.55	0.70	0.64	1		
S9	0.73	0.81	0.73	0.75	0.46	0.70	0.80	0.73	1	
对照	0.84	0.80	0.87	0.88	0.78	0.90	0.76	0.86	0.86	1

表 3 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物 S1~S9 共有峰峰面积比和相对峰面积

Table 3 The common peak area ratio and relative peak area of S1~S9 ethanol extract and its liquid-liquid extracts and isolates of the

macroporous resin from the defatted walnut meal											
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	平均值
1	峰面积比/%	7.42	4.61	6.31	9.75	12.05	8.76	3.75	11.26	10.13	8.23
	相对峰面积	0.63	0.23	0.57	0.69	4.11	1.20	0.17	1.07	0.58	1.03
2	峰面积比/%	1.28	0.98	1.34	1.80	0.77	1.21	1.35	3.06	3.58	1.71
	相对峰面积	0.11	0.05	0.12	0.13	0.26	0.17	0.06	0.29	0.21	0.15
3	峰面积比/%	0.94	0.54	0.99	1.22	1.09	1.75	0.48	0.41	1.52	0.99
	相对峰面积	0.08	0.03	0.09	0.09	0.37	0.24	0.02	0.04	0.09	0.12
4	峰面积比/%	2.04	1.11	2.29	2.64	5.38	3.50	0.53	1.51	0.29%	2.14
	相对峰面积	0.17	0.06	0.21	0.19	1.84	0.48	0.02	0.14	0.02	0.35
5	峰面积比/%	0.50	0.54	0.62	0.37	3.77	0.56	0.83	6.62	0.37	1.58
	相对峰面积	0.04	0.03	0.06	0.03	1.29	0.08	0.04	0.63	0.02	0.24
6	峰面积比/%	1.44	2.22	1.44	1.31	0.45	2.37	1.16	1.36	0.88	1.40
	相对峰面积	0.12	0.11	0.13	0.09	0.15	0.33	0.05	0.13	0.05	0.13
7	峰面积比/%	0.99	1.42	0.99	0.91	6.71	0.81	1.50	0.35	0.55	1.58
	相对峰面积	0.08	0.07	0.09	0.06	2.29	0.11	0.07	0.03	0.03	0.32
8	峰面积比/%	2.08	1.69	2.36	1.41	2.76	3.04	1.69	1.07	1.97	2.01
	相对峰面积	0.18	0.08	0.21	0.10	0.94	0.42	0.08	0.10	0.11	0.25
9	峰面积比/%	1.60	2.20	1.71	2.19	9.61	1.81	0.30	0.25	0.55	2.25
	相对峰面积	0.14	0.11	0.16	0.16	3.28	0.25	0.01	0.02	0.03	0.46
10	峰面积比/%	2.64	3.72	2.67	2.82	2.40	2.87	2.77	0.47	0.57	2.33
	相对峰面积	0.22	0.19	0.24	0.20	0.82	0.39	0.12	0.04	0.03	0.25
11	峰面积比/%	3.09	1.99	3.11	3.60	1.74	3.61	2.87	3.93	4.23	3.13
	相对峰面积	0.26	0.10	0.28	0.26	0.59	0.50	0.13	0.37	0.24	0.30
12	峰面积比/%	1.7	2.86	1.89	2.05	1.13	2.23	2.08	0.07	0.20	1.59
	相对峰面积	0.15	0.14	0.17	0.15	0.39	0.31	0.09	0.01	0.01	0.16

转下页

接上页

13	峰面积比/%	0.71	1.27	0.96	0.99	0.52	1.39	0.84	0.61	0.05	0.82
	相对峰面积	0.06	0.06	0.09	0.07	0.18	0.19	0.04	0.06	0.01	0.08
14	峰面积比/%	11.83	19.97	11.01	14.08	2.93	7.29	22.40	10.52	17.37	13.05
	相对峰面积	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	峰面积比/%	5.32	1.57	5.92	5.98	1.90	3.67	0.99	0.43	0.39	2.91
	相对峰面积	0.45	0.08	0.54	0.42	0.65	0.50	0.04	0.04	0.02	0.31

表 4 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物共有峰 UPLC-ESI-MS 分析

Table 4 UPLC-ESI-MS analysis for common peaks of ethanol extract and its liquid-liquid extracts and isolates of the macroporous resin from the defatted walnut meal

No.	RT/min	MW/(g/mol)	Identification	Reference
1 ¹⁾²⁾	13.57	170	没食子酸	[16,17]
2 ¹⁾	14.62	484	1,6-二没食子酰基-葡萄糖或 2,6-二没食子酰基-葡萄糖	[16]
3 ¹⁾	24.75	484	1,6-二没食子酰基-葡萄糖或 2,6-二没食子酰基-葡萄糖	[16]
4 ¹⁾	33.04	634	没食子酰基-鞣花酰基-葡萄糖	[16,18]
5 ¹⁾	39.78	786	二没食子酰基-鞣花酰基-葡萄糖	[16]
6 ¹⁾	43.56	444	(4S)-4-羟基- α -四氢萘酮-4-O- β -D-(6'-O-4"-羟基苯甲酰基)吡喃葡萄糖苷	[19]
7 ²⁾	47.27	354	绿原酸	[15]
8 ¹⁾	53.48	247	未知	
9 ¹⁾²⁾	56.55	198	没食子酸乙酯	[20]
10 ¹⁾	63.77	566	Glansreginin B	[21]
11 ¹⁾	66.91	434	槲皮素 3-阿拉伯糖苷或槲皮素 3-木糖苷	[22]
12 ¹⁾	67.81	404	(2E,4E)-8-羟基-2,7-二甲基-2,4-癸二烯-1,10-二酸 6'-O- β -d-葡萄糖基吡喃糖基酯	[21]
13 ²⁾	68.33	610	芦丁	[15]
14 ¹⁾	68.76	593	Glansreginin A	[21]
15 ¹⁾²⁾	69.63	302	鞣花酸	[15]

注：1)代表根据质谱、参考文献确定的物质；2)代表根据对照品确定的物质。

2.2 共有峰的鉴定

按照 2.2.1 进行 UPLC-ESI-MS 分析，在负离子模式下采集不同核桃粕提取物中 13 个特征峰的质谱信息，并对这 13 个特征峰进行定性分析，结合混合对照品（图 3）及相关文献初步推断出 15 种化合物，结果见（表 4）。峰 1、2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15 对应的物质分别是没食子酸、1,6-二没食子酰基-葡萄糖或 2,6-二没食子酰基-葡萄糖、1,6-二没食子酰基-葡萄糖或 2,6-二没食子酰基-葡萄糖、没食子酰基-鞣花酰基-葡萄糖、二没食子酰基-鞣花酰基-葡萄糖、(4S)-4-羟基- α -四氢萘酮-4-O- β -D-(6'-O-4"-羟基苯甲酰基)吡喃葡萄糖苷、绿原酸、没食子酸乙酯、Glansreginin B、槲皮素 3-阿拉伯糖苷或槲皮素 3-木糖苷、(2E,4E)-8-羟基-2,7-二甲基-2,4-癸二烯-1,10-二酸 6'-O- β -d-葡萄糖基吡喃糖基酯、芦丁、Glansreginin A、鞣花酸，这与文献报道核桃粕提取物中含有的物质成

分是一致的^[10,11,15]。

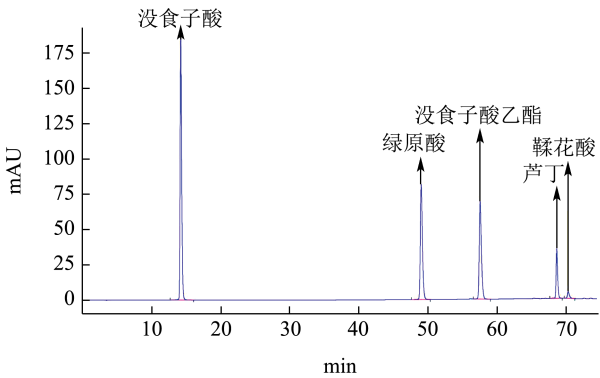


图 3 没食子酸、绿原酸、没食子酸乙酯、芦丁、鞣花酸混合对照品 HPLC

Fig.3 HPLC of mixed reference standard for gallic acid, chlorogenic acid,ethyl gallate, rutin and ellagic acid

2.3 降脂活性

S1~S9 对脂肪变性 HepG2 细胞的降脂作用见图 4，与模型组比较，S1、S3、S4、S6 能均能显著地减

少脂肪变性 HepG2 细胞内 TG 含量 ($p<0.05$), S2、S5、S7、S8、S9 均能极显著地降低减少脂肪变性细胞内 TG 蓄积 ($p<0.001$), 其中 S5、S8 对 TG 的降低率最高, 分别为 68.37%、66.32%; 除正丁醇萃取物 (S6) 外, 样品 S4 能显著地减少脂肪变性细胞内 TC 含量 ($p<0.05$), S1、S2、S3、S5、S7、S8、S9 能极显著地降低脂肪变性细胞内的 TC 含量 ($p<0.001$), S5、S8 对 TC 的降低率最大, 分别为 58.24%、51.22%; 核桃粕乙酸乙酯萃取物 (S5) 和大孔树脂纯化物 (S8) 降脂作用最强。

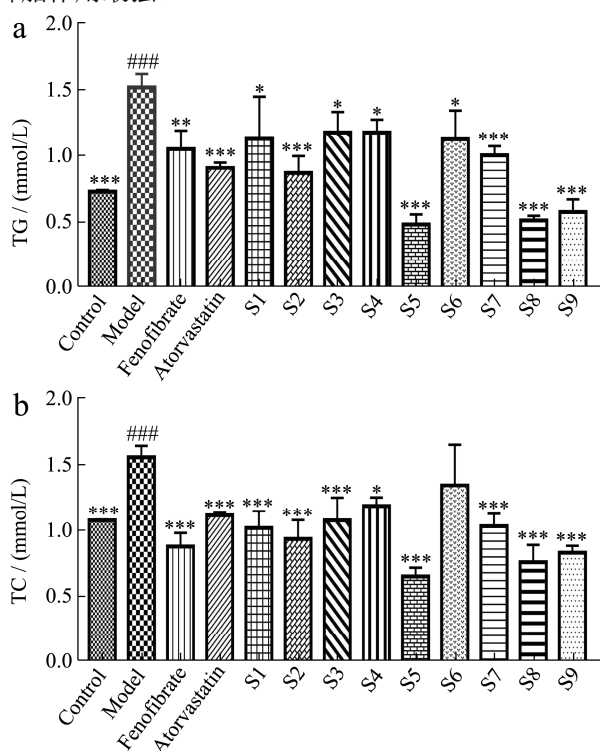


图4 核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物对 HepG2 细胞 TG、TC 的影响

Fig.4 Effects of Ethanol extract and its liquid-liquid extracts and isolates of the macroporous resin from the defatted walnut meal on TG and TC in HepG2 cells

注: 与正常对照组相比, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$; 与模型组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

2.4 HPLC 图谱与降脂作用的灰色关联分析

灰色关联分析方法, 是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度, 亦即“灰色关联度”, 作为衡量因素间关联程度的一种方法^[23,24]。

①为了便于比较, 采用均值法进行数据的无量纲化处理, 将不同提取物S1~S9各共有峰面积作为比较数列 (记为 X_0), 不同提取物对应的药效作为参考数列 (记为 X_i)。

②依据下式计算绝对差序列:

$$oi(k) = |X_0(k) - X_i(k)|$$

③计算关联系数:

$$Loi(k) = \frac{\min \min \Delta oi(k) + \rho \max \max \Delta oi(k)}{\Delta oi(k) + \rho \max \max \Delta oi(k)}$$

式中: $\min \min \Delta oi(k)$ 为二级最小差, $\max \max \Delta oi(k)$ 为二级最大差, ρ 取 0.5。

④将各个共有峰 (X_0) 对应各关联系数求其平均值, 得各共有峰关联度。运用灰色关联度法将共有峰和降脂活性指标TG和TC进行关联度分析, 关联度大小顺序见 (表4)。由关联度大小可知, 各特征峰所代表化学成分降低 TG 贡献大小峰号顺序为 14>6>12>10>13>11>15>2>8>1>3>4>9>7>5, 降低 TC 贡献大小的峰号顺序为 14>6>11>12>13>10>2>3>8>15>1>4>9>7>5, 对降脂作用药效贡献大的前6个峰分别为14、6、12、10、13、11且关联度值均大于0.85, 其中峰14对降脂药效的关联度值均大于0.9。UPLC-ESI-MS分析初步鉴定出峰14、6、12、10、13、11对应的物质分别为Glansreginin A、(4S)-4-羟基- α -四氢萘酮-4-O- β -D-(6'-O-4"-羟基苯甲酰基)吡喃葡萄糖苷、(2E,4E)-8-羟基-2,7-二甲基-2,4-癸二烯-1,10-二酸 6'-O- β -d-葡萄糖基吡喃糖基酯、Glansreginin B、芦丁、槲皮素3-阿拉伯糖苷或槲皮素3-木糖苷。峰14为Glansreginin A, Glansreginin A是核桃中重要的成分且通过抗炎发挥神经保护作用^[25], 核桃粕提取物主要含有Glansreginin A、没食子酸乙酯、鞣花酸等物质, 能抑制胆固醇结石对小鼠肝脏损害, 明显调节肝脏和血液中的脂质水平^[11]。13号峰鉴定为芦丁, 芦丁可以有效降低高脂饮食模型小鼠和脂肪变性HepG2细胞中的脂质水平, 调节脂肪分解和形成关键基因的表达^[26]。

核桃粕为核桃取油后的副产物, 课题组的前期研究表明核桃粕乙醇提取物具有显著降脂作用^[27], 可改善 2 型糖尿病模型大鼠肝脏脂肪变性, 改善肝脏脂质积累并提高肝脏抗氧化能力, 可极显著地降低大鼠血清和肝脏中 TG、TC 蓄积, 改善肝脏和胰腺的病理损伤, 对高脂高糖高胆固醇诱导的 2 型糖尿病大鼠有良好的预防作用^[27]。核桃粕乙醇提取物成分复杂, 有效成分难以明确, 运用谱效学方法将特征峰与药效进行关联分析, 可找出对药效贡献最大的活性成分或成分群。游离脂肪酸常作为脂肪变性 HepG2 细胞模型的诱导液^[28,29], 脂肪变性 HepG2 细胞模型被广泛的应用于体外降脂实验中。本研究通过建立核桃粕乙醇提取物及其萃取物和大孔树脂纯化物的指纹图谱, 利用脂肪变性 HepG2 细胞模型研究其降脂活性, 运用谱效学方法研究降脂活性成分, 为确定核桃粕提取物降脂物质基础及核桃粕高值化开发奠定基础。

表5 共有峰与降脂药效关联度

Table 5 Grey correlation between each common peak and

lipid-lowering effects			
TG		TC	
峰号	关联系数	峰号	关联系数
14	0.94	14	0.96
6	0.89	6	0.90
12	0.88	11	0.89
10	0.87	12	0.88
13	0.87	13	0.88
11	0.87	10	0.87
15	0.85	2	0.86
2	0.85	3	0.85
8	0.85	8	0.84
1	0.84	15	0.84
3	0.84	1	0.84
4	0.82	4	0.81
9	0.77	9	0.76
7	0.77	7	0.76
5	0.74	5	0.73

3 结论

核桃粕乙醇提取物中的乙酸乙酯萃取物(S5)和大孔树脂纯化物(S8)降脂活性高,14号峰对TG、TC关联度最高,是核桃粕提取物中主要的降脂活性成分,14号峰鉴定为Glansreginin A。峰14、6、12、10、13、11的关联度均大于0.85,故核桃粕提取物发挥降脂作用是多种成分共同作用的结果,其中Glansreginin A、(4S)-4-羟基- α -四氢萘酮-4-O- β -D-(6'-O-4"-羟基苯甲酰基)吡喃葡萄糖苷、(2E,4E)-8-羟基-2,7-二甲基-2,4-癸二烯-1,10-二酸6'-O- β -d-葡萄糖基吡喃糖基酯、Glansreginin B、芦丁、槲皮素-3-阿拉伯糖苷或槲皮素-3-木糖苷是主要的降脂活性成分,Glansreginin A是核桃中特有的成分值得深入研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1996:31
Chinese Botany Editorial Board, Chinese Academy of Sciences. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1996: 31
- [2] 陈士铎.本草新编[M].北京:中国中医药出版社,1996:733
CHEN Shi-duo. New Materia Medica [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 1996: 733
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:279
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 279
- [4] 李娅,余红红.基于全产业链视角的云南省核桃产业国内竞争力分析[J].林业经济问题,2018,38(5):38-43
LI Ya, YU Hong hong. Analysis on the domestic competitiveness of walnut industry in Yunnan Province from the perspective of whole industry chain [J]. Issues of Forestry Economics, 2018, 38(5): 38-43
- [5] 耿树香,宁德鲁,陈海云,等.云南主栽核桃品种功能成分综合评价[J].南京林业大学学报(自然科学版),2019,43(2):209-215
GENG Shu-xiang, NING De-lu, CHEN Hai-yun, et al. Comprehensive evaluation and analysis of nutrient contents of the main walnut varieties in Yunnan [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2019, 43(2): 209-215
- [6] Gu M, Chen H, Zhao M, et al. Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 213-220
- [7] Li T, Wu C, Liao J, et al. Application of protein hydrolysates from defatted walnut meal in high-gravity brewing to improve fermentation performance of lager yeast [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019
- [8] 邸红艳,马海乐,王洋,等.超声辅助提取核桃粕蛋白的工艺研究[J].现代食品科技,2019,35(7):164-172
DI Hong-yan, MA Hai-le, WANG Yang, et al. Ultrasound-assisted extraction of the proteins from walnut meal [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 164-172
- [9] El-Tantawy W H, Temraz A. Natural products for controlling hyperlipidemia: Review [J]. Arch Physiol Biochem, 2019, 125(2): 128-135
- [10] Liang X, Chen D, Cao L, et al. Effects of pressed degreased walnut meal extracts on lipid metabolism in postnatally monosodium glutamate-induced mice and 3T3-L1 preadipocytes [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 31: 89-96
- [11] Ren S, Yan X, Ma J, et al. Defatted walnut powder extract reduces cholesterol gallstones formation in C57BL/6 mice by downregulating the levels of ABCG5/8 in the liver and NPC1L1 in the intestine [J]. Journal of Functional Foods,

- 2018, 48: 85-91
- [12] 李宇驰,徐妍,肖培云,等.中药谱效学的研究进展[J].时珍国医国药,2017,3:673-675
- LI Yu-chi, XU Yan, XIAO Pei-yun, et al. Spectrum-activity relationship progress of Chinese medicine [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 3: 673-675
- [13] Gomez-Lechon M J, Donato M T, Martinez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis [J]. Chem Biol Interact, 2007,165(2): 106-116
- [14] Yin J, Luo Y, Deng H, et al. Hugin Qing-zhi medication ameliorates hepatic steatosis by activating AMPK and PPAR-alpha pathways in L02 cells and HepG2 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 229-239
- [15] Luo Y, Wu W, Chen D, et al. Optimization of simultaneous microwave/ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from walnut flour using response surface methodology [J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 1999-2004
- [16] 王克建,杜明,胡小松,等.核桃仁中多酚类物质的液相/电喷雾质谱分析[J].分析化学,2009,37(6):867-872
- WANG Ke-jian, DU Ming, HU Xiao-song, et al. Identification of phenolic compounds in walnut (*Juglans regia* L) seeds by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(6): 867-872
- [17] 李平.核桃分心木水提液化学成分及抗肿瘤活性分析[D].太原:山西大学,2017
- LI Ping. Analysis of the chemical compositions and antitumor activities of water extracts from walnut diaphragm [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017
- [18] 王克建,郝艳宾,齐建勋,等.红色核桃仁种皮提取物紫外-可见光谱和质谱分析[J].光谱学与光谱分析,2009,29(6):1668-1671
- WANG Ke-jian, HAO Yan-bin, QI Jian-xun, et al. Analysis of the extraction of red pellicle of walnut (*Juglans regia* L.) by ultraviolet-visible spectra and HPLC-ESI-MS [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(6): 1668-1671
- [19] 周媛媛,王莹,宋红娟,等.青龙衣正丁醇部位化学成分研究[J].中草药,2018,49(18):4220-4225
- ZHOU Yuan-yuan, WANG Ying, SONG Hong-juan, et al. Chemical constituents of n-butanol fraction from green walnut husks of *Juglans mandshurica* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(18): 4220-4225
- [20] 景援朝,赵焕新,孙永丽,等.分心木化学成分的研究[J].食品与药品,2015,17(2):87-90
- JING Yuan-chao, ZHAO Huan-xin, SUN Yong-li, et al. Chemical constituents from diaphragm *Juglandis fructus* [J]. Food and Drug, 2015, 17(2): 87-90
- [21] Gomez-Caravaca A M, Verardo V, Segura-Carretero A, et al. Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1209(1-2): 238-245
- [22] Amaral J S, Seabra R M, Andrade P B, et al. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves [J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 373-379
- [23] Liu M, Wu Y, Huang S, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and hypolipidemic effect of *Curcuma aromatica* [J]. Biomedical Chromatography, 2018, 32(7): e4220
- [24] Liu Y, Chen X, Gao L, et al. Spectrum-effect relationships between the bioactive ingredient of *Syringa oblata* lindl. leaves and its role in inhibiting the biofilm formation of *Streptococcus suis* [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 570
- [25] Haramiishi R, Okuyama S, Yoshimura M, et al. Identification of the characteristic components in walnut and anti-inflammatory effect of glansreginin A as an indicator for quality evaluation [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2020, 84(1): 187-197
- [26] Liu Q, Pan R, Ding L, et al. Rutin exhibits hepatoprotective effects in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease by reducing hepatic lipid levels and mitigating lipid-induced oxidative injuries [J]. International Immunopharmacology, 2017, 49: 132-141
- [27] Li Y, Chen D, Zhang F, et al. Preventive effect of pressed degreased walnut meal extracts on T2DM rats by regulating glucolipid metabolism and modulating gut bacteria flora [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103694
- [28] Chung S, Hwang J T, Park J H, et al. Free fatty acid-induced histone acetyltransferase activity accelerates lipid accumulation in HepG2 cells [J]. Nutr Res Pract, 2019, 13(3): 196-204
- [29] Izdebska M, Piatkowska-Chmiel I, Korolczuk A, et al. The beneficial effects of resveratrol on steatosis and mitochondrial oxidative stress in HepG2 cells [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(12): 1442-1453