

核桃青皮褐变对提取物组成及抑菌活性的影响

金洛仪¹, 武金钰¹, 姜润东¹, 张根林¹, 修志龙², 党艳艳^{1*}

(1. 石河子大学 化学化工学院 绿色过程省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆 石河子 832003;
2. 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 采用两相盐析萃取法提取青核桃削皮获得核桃青皮的有效成分, 依次使用石油醚(PE)、二氯甲烷(DCM)、乙酸乙酯(EA)和正丁醇(*n*-BuOH) 4 种溶剂进行萃取分离获取组分 1~4。采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱联用仪对组分 1~4 的组成成分进行了鉴定, 通过对 3 种受试菌大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的抑菌实验, 考察了褐变和未褐变核桃青皮对提取物组成及抑菌活性的影响, 通过网络药理学和分子对接研究方法, 分析了提取物组成成分与抑菌活性的相关性, 探究了核桃青皮主要抑菌成分及其作用途径。结果表明, 组分 2 (DCM 萃取组分)和组分 3 (EA 萃取组分)的抑菌活性受核桃青皮褐变影响不显著 ($P>0.05$), 而组分 1 (PE 萃取组分)和组分 4 (*n*-BuOH 萃取组分)的抑菌活性受核桃青皮褐变影响显著 ($P<0.05$); 与未褐变核桃青皮相比, 核桃青皮褐变后组分 1 对 3 种受试菌的抑菌活性分别下降了 100.00%、36.58%和 39.53%, 而组分 4 的抑菌活性分别增加了 128.49%、53.33%和 78.50%; 核桃青皮褐变后抑菌活性的降低与醌类化合物(2-羟基-1,4-萘醌、2-羟基-1,4-萘醌、1,4-萘醌和氢醌)、黄酮类化合物(槲皮素五乙酸酯, 柚皮素和异槲皮素)及甾体类化合物(薯蓣次皂苷 A 和 3,5-二羟基胆甾-6-酮)含量的减少相关, 而抑菌活性的增强与醌类生物[四羟基苯醌、甲基萘醌和 2-(十六烷基氨基)萘-1,4-二酮]和生物碱(Minovincinine)含量的增加相关; 组分 1 和组分 4 的组成成分主要是通过凋亡过程的负调控、相同蛋白质结合和酶结合等途径发挥抑菌作用。

关键词: 核桃青皮; 褐变; 抑菌活性; 网络药理学; 分子对接; 食品化学品

中图分类号: TQ28 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 06-1331-10

Effects of green husk browning on components and antibacterial activity of extracts from walnut

JIN Mingyi¹, WU Jinyu¹, JIANG Rundong¹, ZHANG Genlin¹, XIU Zhilong², DANG Yanyan^{1*}

(1. State Key Laboratory Incubation Base for Green Processing of Chemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China; 2. School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract: Active ingredients of walnut green husk were extracted by two-phase salt precipitation extraction method, sequentially using petroleum ether (PE), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), and *n*-butanol (*n*-BuOH) as solvents to obtain fraction 1~4 through extraction and separation. The compound compositions of the fractions were identified by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole electrostatic field orbital trap mass spectrometer. Antibacterial experiments against *E. coli*, *S. aureus*, and *B. subtilis* were conducted to analyze the influence of browning and non-browning of walnut green husk on the fractions and antibacterial activity of the extracts. The correlation between extract compositions and antibacterial activities was analyzed by network pharmacology and molecular docking methods, and the main antibacterial components and their mechanisms in walnut green husks were explored. The results showed that while the antibacterial activities of fraction 2 (DCM extract) and fraction 3 (EA extract) were insignificantly affected by browning of walnut green husk ($P>0.05$), those of fraction 1 (PE extract) and fraction 4 (*n*-BuOH extract) were significantly influenced ($P<0.05$). Compared with those of non-browning

收稿日期: 2024-06-27; 定用日期: 2024-07-29; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240514

基金项目: 新疆兵团重点领域科技攻关计划项目(2020AB026, 2022AB008); 兵团指导性科技计划项目(2022ZD066)

作者简介: 金洛仪(1999—), 女, 硕士生, E-mail: jmy1713@163.com. 联系人: 党艳艳(1981—), 女, 教授, E-mail: dyysz@126.com.

walnut green husk, the antibacterial activities of fraction 1 against *E. coli*, *S. aureus*, and *B. subtilis* decreased by 100.00%, 36.58%, and 39.53% against the tested bacteria, while those of fraction 4 increased by 128.49%, 53.33%, and 78.50%, respectively. The reduced antibacterial activity after browning of walnut green husk was correlated with decreased content of quinone compounds (2-hydroxy-1,4-benzoquinone, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone and hydroquinone), flavonoid compounds (quercetin pentaacetate, naringenin and isoquercetin), and steroid compounds (prsapogemin A and 3,5-dihydroxycholestan-6-one), whereas enhanced antibacterial activity was associated with increased content of quinone derivatives [tetrahydroxyquinone, menaquinone and 2-(hexadecylamino)naphthalene-1,4-dione] and alkaloids (minovincinine). Fraction 1 and fraction 4 mainly exerted antibacterial effects through negative regulation of apoptosis processes, binding to the same proteins, and enzyme binding pathways.

Key words: walnut green husk; browning; antibacterial activity; network pharmacology; molecular docking; food chemicals

核桃果仁富含不饱和脂肪酸和蛋白质等营养物质,而核桃加工过程中的主要副产物为核桃青皮,质量约占加工量的 50%~60%^[1]。据估算,仅 2022 年中国产生鲜核桃青皮 1480 万 t^[2],作为废弃物被丢弃会造成资源浪费和环境污染问题。因此,如何提高农林废弃物的资源化利用已成为重要的研究方向^[3]。近年来,出于对防腐剂安全性的考虑,消费者更趋向于使用天然来源的抗菌剂。研究发现,核桃青皮中含有萘醌、多酚和黄酮等活性成分,具有良好的抑菌^[4]、抗癌^[5]和抗氧化^[6]等作用,对枯草芽孢杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌等都具有良好的抑制活性,具有成为天然抑菌剂的潜力^[7]。然而,核桃青皮极易发生褐变,其外表会在剥离 24 h 内从绿色变为黄绿色,最后呈现褐色,而褐变会改变核桃青皮中多酚类化合物和萘醌类化合物的含量,降低其提取物的抗氧化活性^[8]。目前,天然产物的提取主要集中在如何提高有效成分的含量^[9]。天然产物提取物的组成和含量的改变,显著影响其生物活性^[10]。目前,关于核桃青皮褐变对提取物组成及其抑菌活性的影响鲜见报道,对核桃青皮提取物中具体的抑菌成分及其作用机制尚不明确。

本文拟采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱(UHPLC-Q-Exactive)联用仪,通过网络药理学和分子对接等研究方法,分析核桃青皮褐变前后提取物成分的差异,分析提取物组成与抑菌活性的相关性,探究核桃青皮主要抑菌成分及其作用途径,以期核桃青皮的高值资源化利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

青核桃于 2022 年 7~8 月采自新疆阿克苏地区,低温(0~5 °C)运输到实验室,密封保存于-20 °C 冰箱内,备用。

胰蛋白胨、酵母提取物,英国 OXOID 公司;琼脂粉,北京索莱宝科技有限公司;硫酸铵、碳酸钠、

氯化钠,天津市盛奥化学试剂有限公司;无水乙醇、石油醚(PE)、二氯甲烷(DCM)、乙酸乙酯(EA)、正丁醇(*n*-BuOH),天津市富宇精细化工有限公司;福林酚、硝酸铝,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,以上试剂均为分析纯。实验用水均为纯水。

LB 液体培养基的组成(均为质量浓度)为:10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L 氯化钠;LB 固体培养基的配制在上述基础加入 15 g/L 琼脂粉。大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌株为本实验室自行保存;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)购自上海保藏微生物有限公司。

旋转蒸发器、RT15 多点磁力搅拌器,德国 IKA 公司;YSL-3L 双层玻璃反应釜,上海秋佐科学仪器有限公司;TY-501 超级恒温循环槽,湖北图盈科技仪器设备有限公司;SPX-50B 型生化培养箱,天津市宏诺仪器有限公司;THZ-98AB 型恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司;UV-5100B 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis),上海棱光技术有限公司;Ultimate 3000 型 UHPLC-Q-Exactive 联用仪,美国赛默飞世尔科技公司;Master Touch-S30UV 型实验室纯水系统,上海和泰仪器有限公司。

1.2 制备方法

将青核桃削皮获得的核桃青皮立即采用液氮快速冷却,经研磨获得未褐变的核桃青皮粉末,记为 N-0。将青核桃削皮获得的核桃青皮,放置于室温(25 °C,相对湿度 36%~40%)下 12 h,然后采用液氮冷却,经研磨获得褐变后核桃青皮粉末记为 H-0,进行提取实验。

采用两相盐析萃取法(SOE)提取核桃青皮有效成分^[11]。两相盐析体系为 $m(\text{硫酸铵}):m(\text{无水乙醇}):m(\text{水})=19:30:51$ 。首先,分别称取褐变和未褐变的核桃青皮粉末 25 g,按照料液比(g:mL)为 1:20 加入提取反应釜中,搅拌(120 r/min)升温到 30 °C,提取 1 h。结束后,将提取液静置 30 min,分相,取上相提取液减压浓缩后,依次使用 PE、

DCM、EA 和 *n*-BuOH 进行萃取分离^[12], 每种溶剂萃取 3 次, 将所得萃取液合并, 减压浓缩。根据萃取溶剂的不同, 将减压浓缩后萃取液分别标记为组分 1~4, 其中, 以 N-0 为原料提取的组分标记为 N-1~4; 以 H-0 为原料提取的组分标记为 H-1~4。

1.3 表征与测试

1.3.1 抑菌活性测定

采用牛津杯法^[13]测定核桃青皮提取物的抑菌活性。首先, 将 *E. coli*、*S. aureus* 和 *B. subtilis* 待活化菌株接种在 LB 液体培养基中, 于 37 °C、140 r/min 条件下摇床培养 12 h; 然后, 在 LB 固体培养基中加入 100 μ L 浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 的受试菌, 涂布后放入牛津杯, 并分别加入 N-1~4 和 H-1~4 样品液, 将平板放置在 4 °C 冰箱 6 h, 待样品液扩散完成后, 将其放入恒温 (35 °C) 培养箱中培养 24 h, 测量抑菌圈直径。

1.3.2 组成成分鉴定

用 0.22 μ m 滤膜器过滤待测液并装入样品瓶后, 使用 UHPLC-Q-Exactive 联用仪进行成分鉴定。色谱条件为: Eclipse Plus C18 色谱柱 (100 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m), 柱温 30 °C, 进样量 1 μ L; 流动相 A 为质量分数 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 流速 0.60 mL/min; 梯度洗脱条件^[14]为 0~1 min (体积分数 95% 流动相 A, 下同)、1~12 min (95%~65%)、12~20 min (65%~10%)、20~25 min (10%)、25~30 min (10%~95%)。

质谱条件: 采用加热电喷雾离子源 (HESI) 模式运行; 鞘气体积流量为 40 arb, 辅助气速率 10 arb, 喷雾电压 (正离子 3.8 kV, 负离子 2.8 kV); 毛细管温度为 320 °C, 辅助气温度 300 °C。扫描范围为: 一级扫描分辨率 70000, 范围 100~1500 *m/z*; 二级扫描分辨率 17500, 起始离子 50 *m/z*。碰撞电压: 碰撞能量 (NCE) 15、30 和 45 eV。

1.4 数据处理

使用 Compound Discoverer 3.0 软件对数据进行检索, 通过与 mzCloud 数据库中的小分子谱图信息进行匹配, 鉴定核桃青皮提取物成分。

1.5 网络药理学和分子对接模拟研究

利用 Swiss target prediction 和 PubChem 数据库检索化合物的作用靶点; 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中以 “Anti-bacterial” 和 “Antibacterial” 为疾病靶点进行检索, 去除重复基因后得到有关抑菌的靶点基因信息。将上述获取的作用靶点导入 Venny2.1.0 在线网站 (<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>) 相互映射, 得到交集基因。将交集基因导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 物种设置为 “Homo sapiens”, 将所得数据输入软件 Cytoscape3.8.2 中, 通过系统中 Network analyzer 的

Analyzenetwork 功能对网络进行数字拓扑研究。根据度值从交集基因中筛选出核心靶点, 将核心靶点上传至 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 物种设定为 Homo Sapiens 获得生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF) 三方面的 Gene Ontology (GO) 基因功能。

根据核心靶点和化合物作用关系, 利用软件 Autodock 1.5.7 将化合物同关键靶点进行分子对接模拟, 验证化合物和关键靶点相互作用的可能性^[15]。

2 结果与讨论

2.1 抑菌活性结果

表 1 和图 1 为核桃青皮不同组分的抑菌活性测定结果。

表 1 核桃青皮提取物不同组分的抑菌活性
Table 1 Antibacterial activities of different components of walnut green husk extract

组 分	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>	
	抑菌圈直 径/mm	差 异 性	抑菌圈直 径/mm	差 异 性	抑菌圈直 径/mm	差 异 性
N-1	12.22±0.81	**	23.81±0.35	**	25.45±0.94	**
H-1	—		15.10±1.03		15.39±1.35	
N-2	16.21±0.48	○	25.31±1.41	○	19.82±1.89	○
H-2	16.63±1.02		25.82±1.00		19.32±1.10	
N-3	13.02±1.33	○	15.83±0.67	○	16.91±0.92	○
H-3	13.12±1.10		15.40±0.52		16.80±0.82	
N-4	13.48±1.58	**	16.37±1.34	**	14.79±1.88	**
H-4	30.80±1.13		25.10±1.58		26.40±2.18	

注: “—” 表示没有抑菌作用; “**” 表示两者差异显著 ($P < 0.05$); “○” 表示两者差异不显著 ($P > 0.05$)。

从表 1 和图 1 可以看出, N-2 和 H-2 的抑菌活性差异不显著 ($P > 0.05$), N-3 和 H-3 的抑菌活性差异也不显著 ($P > 0.05$), 表明褐变对组分 2 和组分 3 的抑菌活性影响不显著。而 N-1 和 H-1 的抑菌活性差异显著 ($P < 0.05$), N-4 和 H-4 的抑菌活性差异也显著 ($P < 0.05$), 表明褐变对组分 1 和组分 4 的抑菌活性影响显著。其中, N-1 对 *E. coli* 抑菌圈为 (12.22±0.81) mm, H-1 对 *E. coli* 无抑菌活性, 同时对 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 的抑菌效果较 N-1 分别降低了 36.58% 和 39.53%。而组分 4 出现完全相反的情况, H-4 对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *B. subtilis* 的抑菌效果分别较 N-4 增加了 128.49%、53.33% 和 78.50%。以上结果表明, 核桃青皮褐变对不同溶剂萃取组分的抑菌活性有所差异。

2.2 化学成分鉴定结果

图 2 为组分 1 的总离子色谱图。表 2 为 N-1 和 H-1 的质谱 (MS) 分析鉴定结果。图 3 为组分 1 成分的差异分析热图。

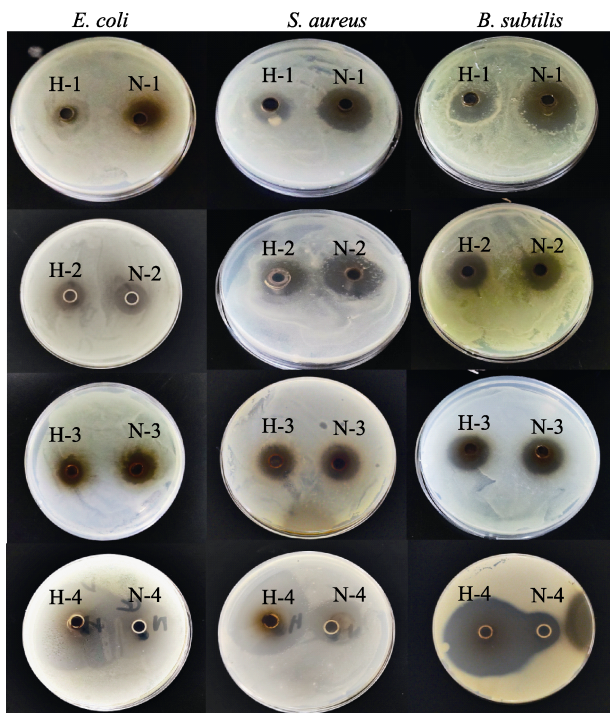
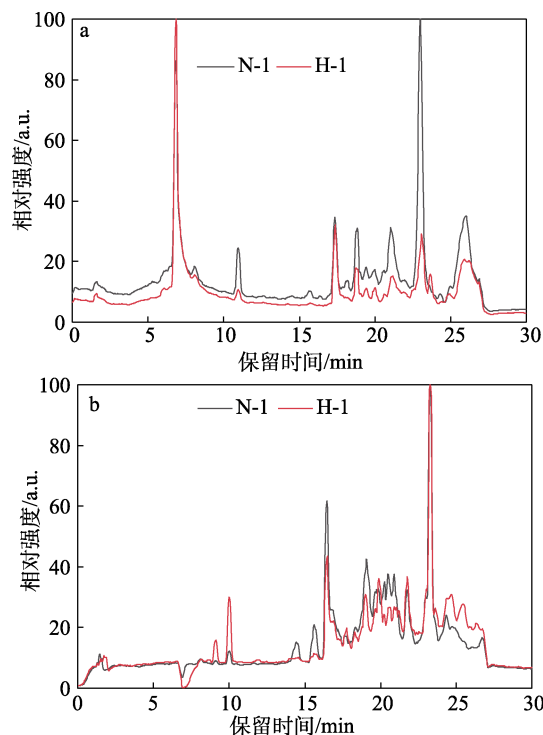


图 1 核桃青皮提取物不同组分的抑菌照片

Fig. 1 Antibacterial photos of different components of walnut green husk extract



a—正离子模式；b—负离子模式
图 2 组分 1 的总离子色谱图

Fig. 2 Total ion chromatograms of fraction 1

表 2 组分 1 的 MS 成分鉴定结果

Table 2 MS identification results of fraction 1 compounds

序号	保留时间/min	选择离子	m/Z		相对误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	鉴定结果	N-1	H-1	鉴定依据
			理论值	测定值						
1	2.527	[M+H] ⁺	162.1155	163.1228	-0.87	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	1-甲基-2-(3-吡啶基)吡咯烷	+	-	mzCloud
2	11.763	[M+H] ⁺	512.0939	513.1012	-3.04	C ₂₅ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素五乙酸酯	+	-	mzCloud
3	12.600	[M+H] ⁺	369.1940	370.2014	0.19	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	紫堇碱	-	+	mzCloud
4	12.818	[M+H] ⁺	272.0679	273.0752	-1.93	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素	+	-	mzCloud
5	14.515	[M+H] ⁺	124.0160	125.0233	0.02	C ₆ H ₄ O ₃	2-羟基-1,4-苯醌	+	-	mzCloud
6	15.264	[M+H] ⁺	578.1415	579.1488	-1.55	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素 B2	+	-	mzCloud
7	15.701	[M+H] ⁺	158.0369	159.0438	1.36	C ₁₀ H ₆ O ₂	1,4-萘醌	+	+	mzCloud
8	16.421	[M+H] ⁺	174.0309	175.0389	-4.19	C ₁₀ H ₆ O ₃	2-羟基-1,4-萘醌	+	+	mzCloud
9	17.204	[M+H] ⁺	372.1563	373.1636	-2.58	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	牛蒡子苷元	+	-	mzCloud
10	17.565	[M+H] ⁺	110.0373	111.0442	4.70	C ₆ H ₆ O ₂	氢醌	+	-	mzCloud
11	17.851	[M+H] ⁺	464.0955	465.1028	0.07	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮素	+	-	mzCloud
12	18.954	[M+H] ⁺	722.4206	723.4279	-4.83	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₂	薯蓣次皂苷 A	+	-	mzCloud
13	19.395	[M+H] ⁺	280.1306	281.1379	-1.66	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	秋堆心菊内酯	+	+	mzCloud
14	20.076	[2M+ACN+H] ⁺	198.0316	438.0974	-0.16	C ₁₂ H ₆ O ₃	萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	+	+	mzCloud
15	20.223	[M+H] ⁺	298.0836	299.0909	-1.53	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮	-	+	mzCloud
16	20.339	[M+H] ⁺	246.1250	247.1323	-2.21	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	化合物 a	+	+	mzCloud
17	23.171	[M+H] ⁺	418.3443	419.3516	-0.83	C ₂₇ H ₄₆ O ₃	3,5-二羟基胆甾-6-酮	+	-	mzCloud
18	23.303	[M+H] ⁺	456.3601	457.3669	-0.36	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	齐墩果酸	+	+	mzCloud
19	24.522	[M+H] ⁺	409.2973	410.3046	-1.91	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂	藜芦胺	-	+	mzCloud
20	24.633	[M+H-H ₂ O] ⁺	256.2401	239.2369	-0.27	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	+	-	mzCloud
21	26.578	[M+H] ⁺	295.1209	296.1282	0.41	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	木番荔枝碱	-	+	mzCloud
22	26.692	[M+H] ⁺	337.3338	338.3412	-1.75	C ₂₂ H ₄₃ NO	芥酸酰胺	-	+	mzCloud

注：“+”表示检测出该化合物；“-”表示未检测到该化合物；“化合物 a”为(3S,3aS,5aS,9bS)-3,5a,9-三甲基-3a,4,5,9b-四氢-3H-苯并[g][1]苯并呋喃-2,8-二酮。下同。

从表 2 可以看出, N-1 共鉴定出 17 个化合物, 其中 11 个化合物〔黄酮类化合物: 槲皮素五乙酸酯、柚皮素、异槲皮素; 醌类化合物: 2-羟基-1,4-苯醌、氢醌; 甾体类化合物: 薯蓣次皂苷 A、3,5-二羟基胆甾-6-酮; 以及其他化合物: 1-甲基-2-(3-吡啶基)吡咯烷、原花青素 B2、牛蒡子苷元和棕榈酸〕在 H-1 中未检出; H-1 共鉴定出 11 个化合物, 其中 5 个化合物(紫堇碱、藜芦胺、木番荔枝碱、5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮和芥酸酰胺)在 N-1 中未检出。

从图 3 可以看出, H-1 中醌类化合物(2-羟基-1,4-苯醌、2-羟基-1,4-萘醌、1,4-萘醌和氢醌)的含量有所下降, 但醌类衍生物萘并[2,3-*b*]呋喃-4,9-二酮的含量上升; 萜类化合物 a 含量下降, 而秋堆心菊内酯和齐墩果酸含量增加。H-1 较 N-1 新增 3 种生物碱(紫堇碱、藜芦胺、木番荔枝碱), 表明核桃青皮褐变会影响生物碱的代谢途径^[16]。

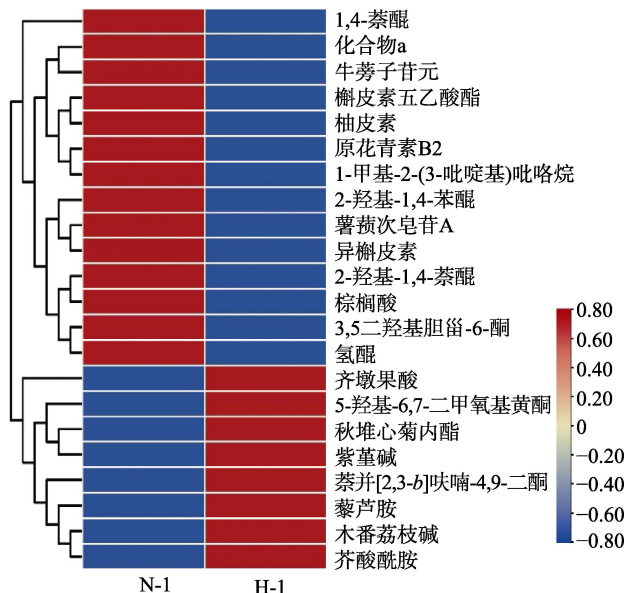


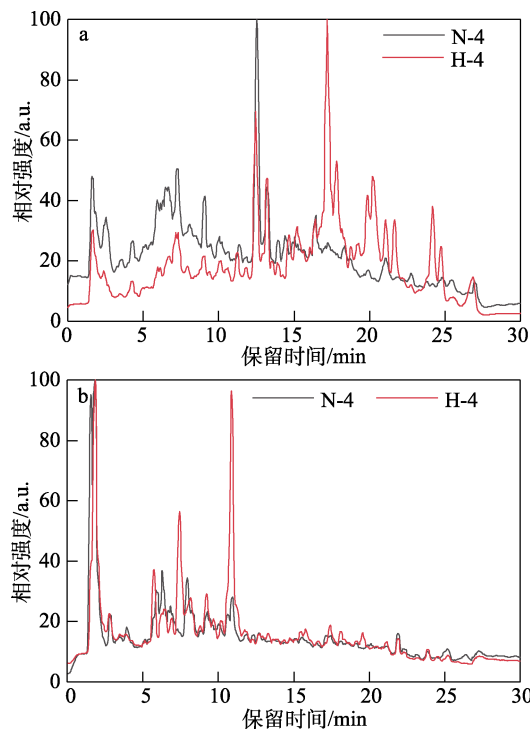
图 3 褐变前后组分 1 成分的差异分析热图

Fig. 3 Heat map of difference analysis of fraction 1 compounds before and after browning

由以上结果可知, 核桃青皮褐变后组分 1 抑菌

活性的下降与醌类化合物(2-羟基-1,4-苯醌、2-羟基-1,4-萘醌、1,4-萘醌和氢醌)、黄酮类化合物(槲皮素五乙酸酯、柚皮素和异槲皮素)和甾体类化合物(薯蓣次皂苷 A 和 3,5-二羟基胆甾-6-酮)含量的下降相关。

图 4 为组分 4 的总离子色谱图。表 3 为 N-4 和 H-4 的 MS 鉴定结果。图 5 为组分 4 成分的差异分析热图。



a—正离子模式; b—负离子模式

图 4 组分 4 的总离子色谱图

Fig. 4 Total ion chromatograms of fraction 4

从表 3 可以看出, N-4 共鉴定出 16 个化合物, 其中 5 个化合物(DL-谷氨酸、Boc-L-谷氨酸、阿魏酸、化合物 c 和积雪草酸)在 H-4 中未检出; H-4 共鉴定出 17 个化合物, 其中 6 个化合物(4-羟基-3-甲氧基苯甲醛、丁二酸、芸香糖、四羟基苯醌、甲基萘醌和水杨酸)在 N-4 中未检出。

表 3 组分 4 的 MS 成分鉴定结果
Table 3 MS identification results of fraction 4 compounds

序号	保留时间/min	选择离子	相对分子质量(<i>m/z</i>)		相对误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	鉴定结果	N-4	H-4	鉴定依据
			理论值	测定值						
1	0.513	[M+H] ⁺	152.0471	153.0543	-1.01	C ₈ H ₈ O ₃	4-羟基-3-甲氧基苯甲醛	-	+	mzCloud
2	1.61	[M+H] ⁺	247.1053	248.1126	-1.01	C ₁₀ H ₁₇ NO ₆	Boc-L-谷氨酸	+	-	mzCloud
3	1.814	[M+H] ⁺	117.0788	118.0861	-0.72	C ₅ H ₁₁ NO ₂	L-缬氨酸	+	+	mzCloud
4	2.843	[M+H] ⁺	118.0267	119.0338	1.47	C ₄ H ₆ O ₄	丁二酸	-	+	mzCloud
5	2.858	[M+H] ⁺	170.0212	171.0284	-1.86	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸	+	+	mzCloud
6	2.874	[M+FA-H] ⁻	326.1207	371.1188	-1.57	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₀	芸香糖	-	+	mzCloud
7	5.97	[M+H] ⁺	136.0521	137.0594	-1.82	C ₈ H ₈ O ₂	对甲氧基苯甲醛	+	+	mzCloud
8	6.365	[M+H] ⁺	198.0523	199.0596	-2.43	C ₉ H ₁₀ O ₅	丁香酸	+	+	mzCloud

续表 3

序号	保留时间/min	选择离子	相对分子质量(<i>m/z</i>)		相对误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	鉴定结果	N-4	H-4	鉴定依据
			理论值	测定值						
9	6.889	[M+FA-H] ⁻	194.0569	239.0553	-4.92	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸	+	-	mzCloud
10	7.749	[M+H] ⁺	138.1041	139.1115	-1.99	C ₉ H ₁₄ O	异佛尔酮	+	+	mzCloud
11	9.798	[M+FA-H] ⁻	250.1410	295.1392	-2.19	C ₁₁ H ₂₂ O ₆	化合物 b	+	+	mzCloud
12	9.947	[M+H] ⁺	147.0531	148.0603	-0.27	C ₅ H ₉ NO ₄	DL-谷氨酸	+	-	mzCloud
13	10.016	[M+FA-H] ⁻	522.2092	567.2073	-1.64	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	化合物 c	+	-	mzCloud
14	10.686	[M+H] ⁺	326.0993	327.1066	-2.39	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	草木犀苷	+	+	mzCloud
15	10.852	[M+H] ⁺	134.0214	135.0286	-0.85	C ₄ H ₆ O ₅	苹果酸	+	+	mzCloud
16	14.456	[M+H] ⁺	172.0006	173.0079	-0.75	C ₆ H ₄ O ₆	四羟基苯醌	-	+	mzCloud
17	18.888	[M+H] ⁺	512.3637	513.3709	-3.39	C ₃₆ H ₄₈ O ₂	甲基萘醌	-	+	mzCloud
18	18.967	[M+H] ⁺	138.0316	139.0389	-0.44	C ₇ H ₆ O ₃	水杨酸	-	+	mzCloud
19	20.839	[M+H] ⁺	397.2981	398.3046	0.29	C ₂₆ H ₃₉ NO ₂	化合物 d	+	+	mzCloud
20	22.168	[M+H] ⁺	354.1934	355.2007	-2.41	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	Minovincinine	+	+	mzCloud
21	25.999	[M+H] ⁺	488.3516	489.3589	3.00	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	积雪草酸	+	-	mzCloud
22	26.286	[M+H] ⁺	439.2922	440.2995	-2.59	C ₂₄ H ₄₁ NO ₆	Sanctolide A	+	+	mzCloud

注：“化合物 b”为(S)-2-甲基-1-丁醇-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷；“化合物 c”为落叶松脂醇-4-*O*-葡萄糖苷；“化合物 d”为 2-(十六烷基氨基)萘-1,4-二酮；FA 代表甲酸根。下同。

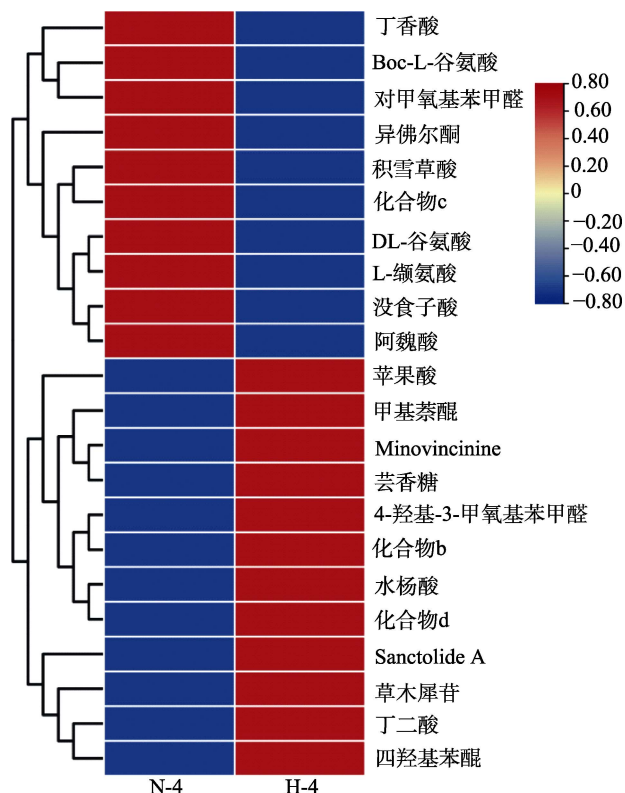


图 5 褐变前后组分 4 成分的差异分析热图

Fig. 5 Heat map of difference analysis of fraction 4 compounds before and after browning

从图 5 可以看出，H-4 中酚酸类化合物（没食子酸、丁香酸和阿魏酸）含量下降，但苹果酸和水杨酸含量上升；生物碱（Minovincinine）含量增加；醌类衍生物（四羟基苯醌、甲基萘醌和化合物 d）含量增加。孙国东等^[17]研究也发现类似结果，即核

桃青皮褐变后萘醌类化合物含量下降，萘醌类衍生物含量上升。

由以上结果可知，核桃青皮褐变组分 4 抑菌活性的增强与醌类衍生物（四羟基苯醌、甲基萘醌和化合物 d）和生物碱（Minovincinine）含量的增加相关。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 靶点预测

图 6 为组分 1 和组分 4 的化合物靶点与抗菌基因韦恩图。通过 Swiss target prediction 和 PubChem 数据库检索组分 1 和组分 4 中化合物的靶点，分别得到 2838 和 1467 个靶点，从 GeneCards 数据库中 得到抗菌基因 2582 个。从图 6 可以看出，组分 1 和组分 4 的化合物靶点通过 Venny 网站相互映射作出的 Venn 图中，分别获得 848 个和 521 个交集基因。

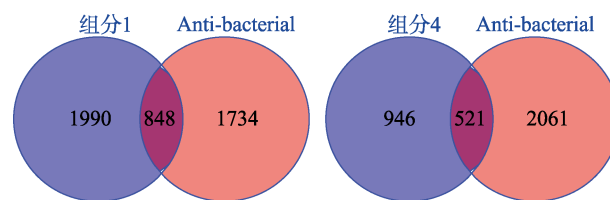


图 6 化合物靶点与抗菌基因韦恩图

Fig. 6 Venny diagram of compound targets and antibacterial genes

2.3.2 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络拓扑分析及核心靶点的筛选

图 7 为组分 1 和组分 4 的化合物交集基因的蛋白相互作用网络。从图 7 可以看出，组分 1 中共存在 809 个节点、33413 条边，以“Closeness= 6.08×10^{-4} 、

Betweenness=860.6601 和 Degree=200”为条件, 筛选出 62 个核心靶点、1818 条边。组分 4 中共存在 508 个节点、15671 条边, 以“Closeness= 9.76×10^{-4} 、Betweenness=535.835 和 Degree=100.697”为条件, 筛选出 79 个核心靶点、2575 条边。

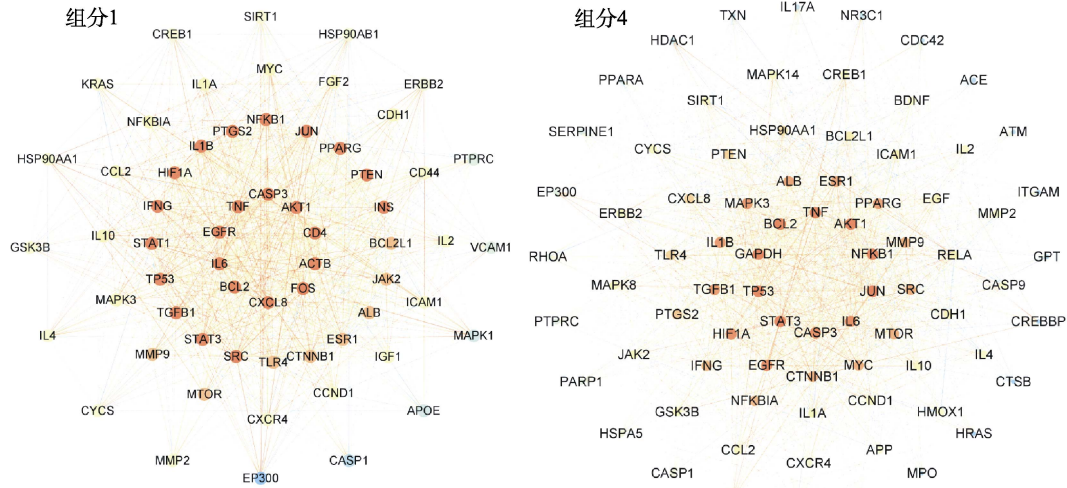


图 7 组分 1 和组分 4 的核心靶点
Fig. 7 Core targets of fraction 1 and fraction 4

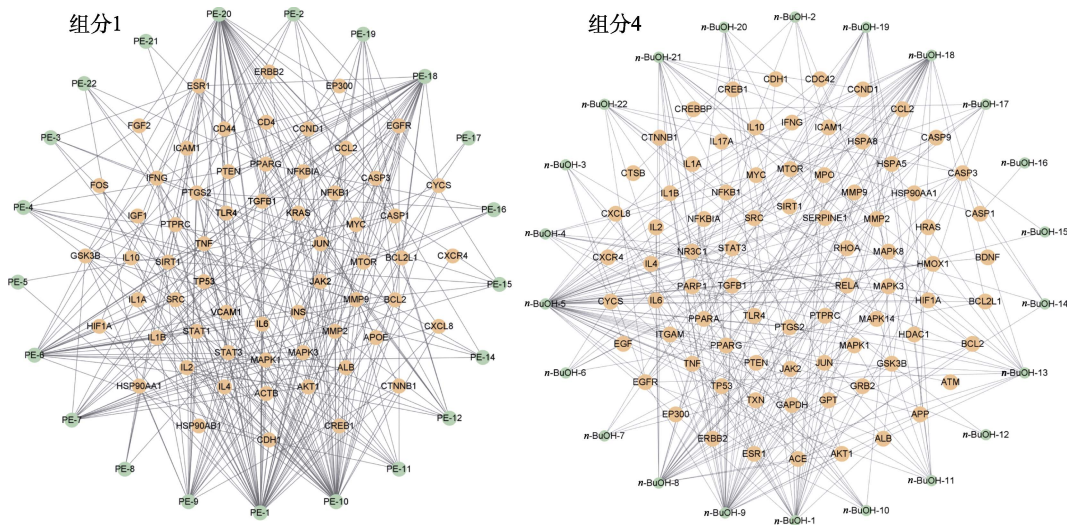


图 8 “活性成分-核心靶点”网络图
Fig. 8 Network diagram of "active ingredient-core target"

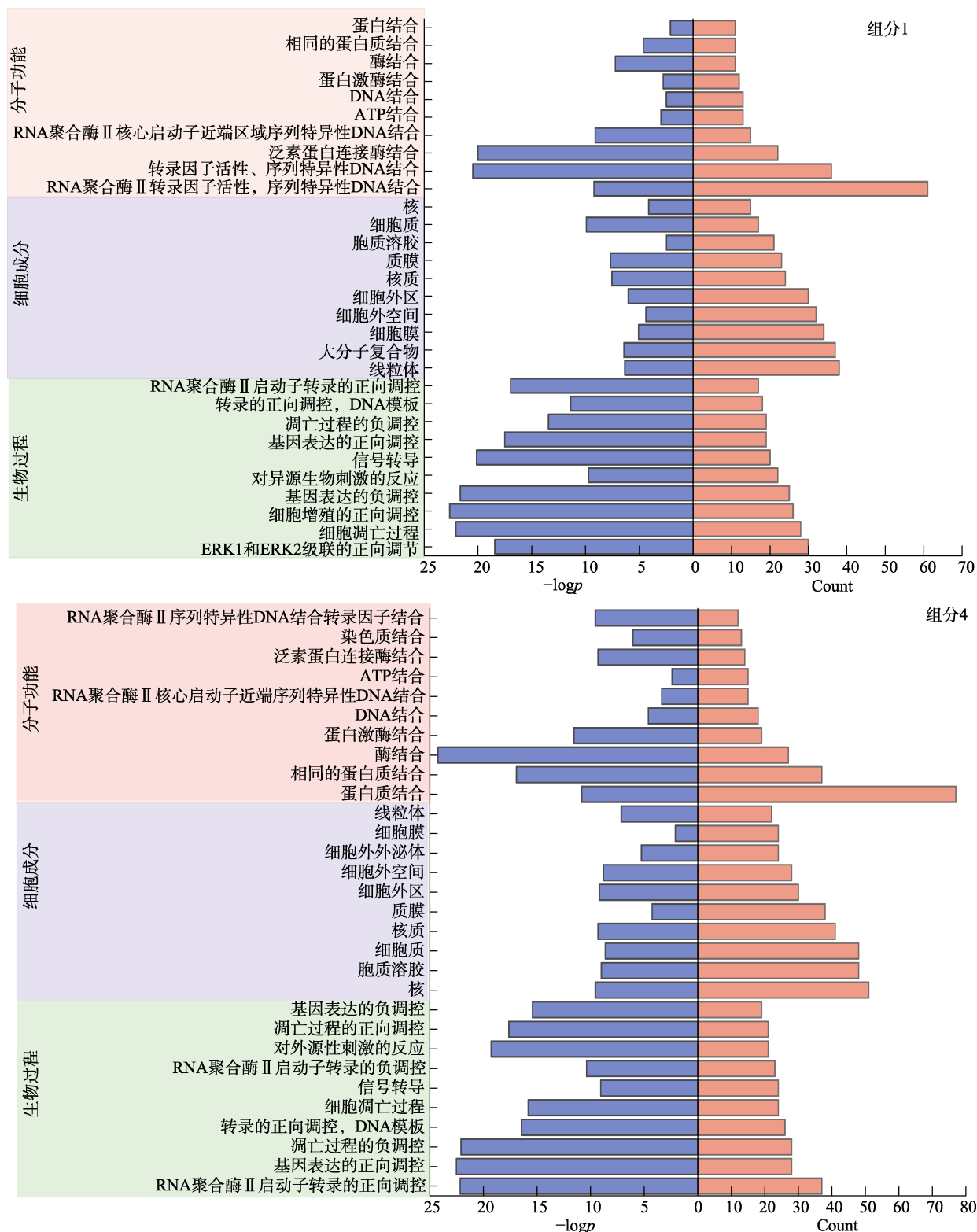
2.3.3 GO 分析

图 9 为组分 1 和组分 4 的核心靶点 GO 分析直线图。

将筛选后的核心靶点导入 DAVID 数据库中进行 GO 分析, 组分 1 得到 660 个 BP 条目、73 个 CC 条目、89 个 MF 条目; 组分 4 得到 730 个 BP 条目、75 个 CC 条目、111 个 MF 条目。以 Count 为条件降序排列, 取 $P < 0.05$ 的前 10 个条目作 GO 分析直线图。从图 9 可以看出, 组分 1 和组分 4 的化合物抑菌作用机制较为相似, 但仍有部分差异。组分 1 中

图 8 为使用 Cytoscape 软件构建的组分 1 和组分 4 的“活性成分-核心靶点”网络图。从图 8 可以看出, 组分 1 和组分 4 的化合物均表现出多个活性成分对应 1 个靶点, 或 1 个活性成分作用多个靶点, 这说明活性成分与抑菌靶点之间存在效应特性。

化合物的抑菌作用机制与凋亡过程的负调控、转录的正向调控、DNA 模板和基因表达的正向调控等生物过程有关, 同时包含大分子复合物、细胞质和质膜等细胞组分参与, 涉及相同的蛋白质结合、酶结合和蛋白激酶结合等分子功能。而组分 4 中化合物的抑菌作用机制与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正向调控、基因表达的正向调控和凋亡过程的负调控等生物过程有关, 同时包含核、核质、线粒体和细胞膜等细胞组分参与, 涉及酶结合、相同的蛋白质结合和 DNA 结合等分子功能。



DNA 为脱氧核糖核酸；ATP 为腺苷三磷酸

图 9 组分 1 和组分 4 的 GO 分析图

Fig. 9 GO analysis diagrams of fraction 1 and fraction 4

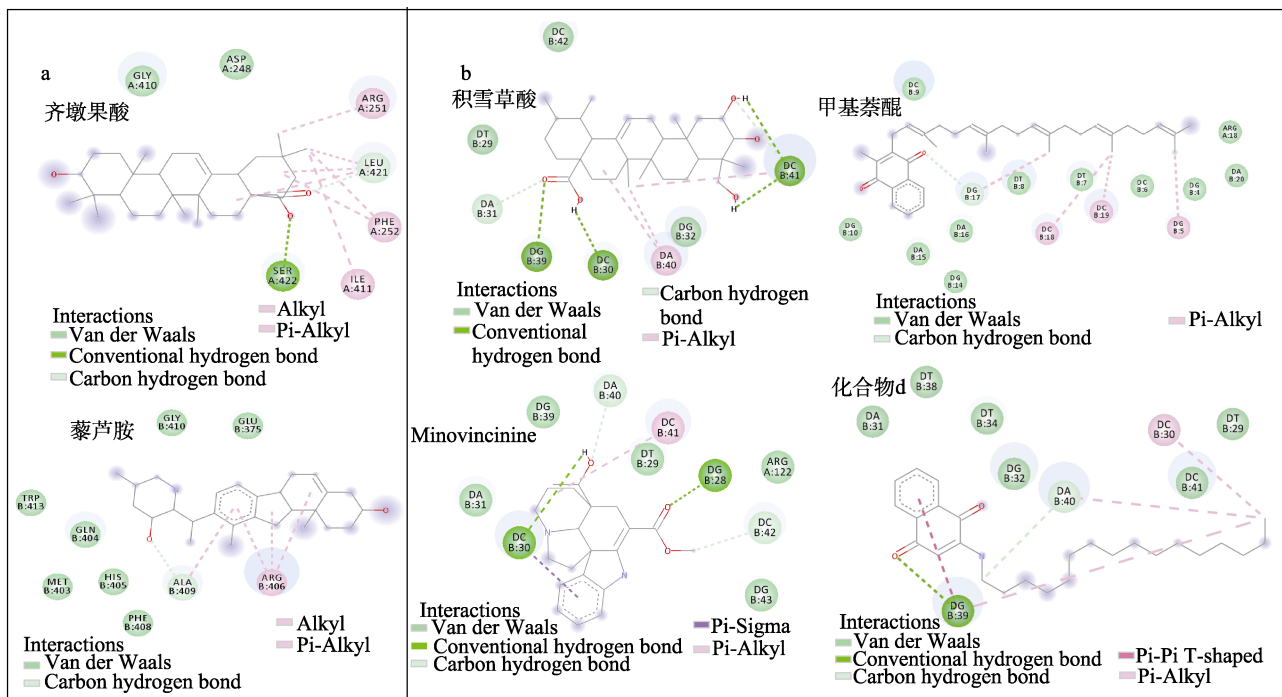
2.4 分子对接计算

图 10 为分子对接可视化分析图。根据“化合物-核心靶点”图的度值，选择 EGFR 关键靶点^[18]同组分 1 中化合物进行分子对接模拟，PARP1 关键靶点同组分 4 中化合物进行分子对接模拟，结果如表 4 和表 5 所示。

从图 10a 和表 4 可以看出，各化合物同靶蛋白结合能均 < 0 kcal/mol，说明组分 1 中化合物均能同靶蛋白相结合。组分 1 褐变前蒽类化合物齐墩果酸同 EGFR 靶蛋白结合能最低，齐墩果酸与氨基酸残基 SER-422 形成氢键，与 GLY-410 和 ASP-248 形成

范德华力, 与 ARG-251、PHE-252 和 ILE-411 形成 Alkyl 键, 与 LEU-421 形成 C—H 键。组分 1 褐变后藜芦胺同 EGFR 靶蛋白结合能最低, 藜芦胺与氨基酸残基 GLN-404、HIS-405 和 PHE-408 等残基形成范德华力, 与 ALA-409 形成 C—H 键, 与 ARG-406

形成 Alkyl 键。根据褐变前后化合物结合能的变化可知, 齐墩果酸、化合物 a、薯蓣次皂苷 A 和 3,5-二羟基胆甾-6-酮是组分 1 的主要抑菌物质。褐变后组分 1 的抑菌活性下降与薯蓣次皂苷 A 和 3,5-二羟基胆甾-6-酮的消失有关。



a—组分 1; b—组分 4

图 10 分子对接可视化分析图

Fig. 10 Molecular docking visual analysis diagram

表 4 组分 1 中化合物分子对接结合能

Table 4 Molecular docking binding energy of fraction 1 compounds

序号	化合物	结合能/(kcal/mol)	N-1	H-1
1	藜芦胺	-6.61	-	+
2	齐墩果酸	-6.31	+	+
3	化合物 a	-5.95	+	+
4	薯蓣次皂苷 A	-5.78	+	-
5	3,5-二羟基胆甾-6-酮	-5.73	+	-
6	萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	-5.67	+	+
7	木番荔枝碱	-5.58	-	+
8	1-甲基-2-(3-吡啶基)吡咯烷	-5.33	+	-
9	1,4-萘醌	-5.29	+	+
10	2-羟基-1,4-萘醌	-5.12	+	+
11	秋堆心菊内酯	-4.95	+	+
12	紫堇碱	-4.63	-	+
13	柚皮素	-4.57	+	-
14	5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮	-4.21	-	+
15	槲皮素五乙酸酯	-4.03	+	-
16	氢醌	-3.97	+	-
17	牛蒡子苷元	-3.74	+	-
18	2-羟基-1,4-萘醌	-3.00	+	-
19	原花青素 B2	-2.64	+	-
20	棕榈酸	-2.39	+	-
21	异槲皮素	-2.09	+	-
22	芥酸酰胺	-1.20	-	+

注: 1 cal=4.19 J。下同。

表 5 组分 4 中化合物分子对接结合能

Table 5 Molecular docking binding energy of fraction 4 compounds

序号	化合物	结合能/(kcal/mol)	N-4	H-4
1	积雪草酸	-13.35	+	-
2	甲基萘醌	-13.10	-	+
3	Minovincinine	-11.08	+	+
4	化合物 d	-9.97	+	+
5	Sanctolide A	-9.76	+	+
6	阿魏酸	-8.65	+	-
7	草木犀苷	-8.34	+	+
8	异佛尔酮	-8.05	+	+
9	4-羟基-3-甲氧基苯甲醛	-7.59	-	+
10	化合物 c	-7.57	+	-
11	对甲氧基苯甲醛	-7.50	+	+
12	Boc-L-谷氨酸	-7.26	+	-
13	化合物 b	-7.13	+	+
14	没食子酸	-6.67	+	+
15	丁香酸	-6.65	+	+
16	水杨酸	-6.60	-	+
17	L-缬氨酸	-6.00	+	+
18	四羟基苯醌	-5.82	-	+
19	DL-谷氨酸	-5.63	+	-
20	苹果酸	-5.50	+	+
21	芸香糖	-5.35	-	+
22	丁二酸	-5.16	-	+

从图 10b 和表 5 可以看出, 各化合物同靶蛋白结合能均 <0 kcal/mol, 说明组分 4 化合物均能同靶蛋白相结合。组分 4 褐变前积雪草酸、Minovincinine 和化合物 d 同 PARP1 靶蛋白结合能较低。积雪草酸分别与 DC-30、DC-41 和 DG-39 形成常规氢键, 与 DA-31 形成 C—H 键, 与 DT-29 和 DG-32 形成范德华力, 与 DA-40 形成 Pi-Alkyl; Minovincinine 分别与 ARG-122、DA-31 和 DG-43 等残基形成范德华力, 与 DG-28 和 DC-30 形成常规氢键, 与 DC-41 形成 Pi-Alkyl; 化合物 d 与残基 DG-39 相连形成常规氢键、Pi-Pi T-shaped 和 Pi-Alkyl 3 种键, 与 DT-38、DC-41 和 DA-31 等残基形成范德华力。褐变后甲基萘醌同 PARP1 靶蛋白结合能较低, 甲基萘醌与残基 ARG-18、DA-20 和 DC-6 等残基形成范德华力, 与 DG-17 形成 C—H 键, 与 DC-18、DC-19 和 DG-5 形成 Pi-Alkyl。根据褐变前后化合物结合能变化可知, 积雪草酸、甲基萘醌、化合物 d、Minovincinine 和 Sanctolide A 是组分 4 的主要抑菌物质。褐变后, 抑菌活性的增强与甲基萘醌、化合物 d、Minovincinine 和 Sanctolide A 含量的增加有关。

3 结论

本文研究了核桃青皮褐变对提取物组成及抑菌活性的影响, 结论如下:

(1) 核桃青皮褐变对不同溶剂萃取组分的抑菌活性影响存在显著差异。其中, 核桃青皮褐变对组分 2 (DCM 萃取物) 和组分 3 (EA 萃取物) 的抑菌活性影响不显著 ($P>0.05$), 但对组分 1 (PE 萃取物) 和组分 4 (*n*-BuOH 萃取物) 的抑菌活性影响显著 ($P<0.05$)。

(2) 核桃青皮褐变后抑菌活性的降低与醌类化合物 (2-羟基-1,4-萘醌、2-羟基-1,4-萘醌、1,4-萘醌和氢醌)、黄酮类化合物 (槲皮素五乙酸酯、柚皮素和异槲皮素) 以及甾体类化合物 (薯蓣次皂苷 A 和 3,5-二羟基胆甾-6-酮) 的含量下降相关; 抑菌活性的增强与醌类衍生物 (四羟基萘醌、甲基萘醌和化合物 d) 和生物碱 (Minovincinine) 含量的增加有关。

(3) 网络药理学和分子对接结果表明, 组分 1 中, 齐墩果酸、化合物 a、薯蓣次皂苷 A 和 3,5-二羟基胆甾-6-酮是主要抑菌物质; 组分 4 中, 积雪草酸、甲基萘醌、化合物 d、Minovincinine 和 Sanctolide A 是主要抑菌成分。

(4) 组分 1 和组分 4 的抑菌作用机制较为相似, 表现为凋亡过程的负调控和基因表达的正向调控等生物过程, 以及相同的蛋白质结合和酶结合等分子功能。

(5) 对于核桃青皮的资源化利用, 需要根据提取溶剂的类型, 采用物理或化学的方法对核桃青皮

原料作适当的抗褐变处理, 以防止褐变造成提取物抑菌活性的降低。

参考文献:

- [1] ASGARI K, LABBAFI M, KHODAIYAN F, *et al.* High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource: Ultrasound assisted extraction and physicochemical, structural and functional analysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152: 1274-1282.
- [2] CONG J Z (丛君钊), MIAO Q (苗齐), XU H D (徐怀德), *et al.* Effects of plant polyphenols on hair dyeing properties of walnut green husk pigment[J/OL]. *Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发)*, 2024, 1-16[2024-07-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20240701.1047.004.html>.
- [3] XIAO G (肖高), ZHENG M Z (郑明珠), MAO S Y (毛诗钰), *et al.* New anode materials for lithium batteries constructed from porous carbon derived from agricultural and forestry biomass[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2025, 42(2): 233-243.
- [4] OLIVEIRE I, SOUSA A, PEREIRA J A, *et al.* Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(7): 2326-2331.
- [5] SHAO Z Y, WANG H, REN H Y, *et al.* The anticancer effect of napabucasin (BBI608), a natural naphthoquinone[J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5678.
- [6] ZHANG D L, YE N, LI M G, *et al.* Walnut green husk extract enhances the effect of chlorine dioxide on kernel quality and antioxidant properties of fresh-eating walnuts during their shelf life[J]. *Food Chemistry*, 2023, 428: 136797.
- [7] LEI W, LI W J, LI X Y, *et al.* Antimicrobial activity and mechanisms of walnut green husk extract[J]. *Molecules*, 2023, 28(24): 7981.
- [8] LIANG R (梁蓉). Study on metabolism mechanism of phenolic substances based on the browning of walnut husks[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University (山西农业大学), 2020.
- [9] YUAN M Y (原梦瑶), KANG S H (康淑荷), CUI L J (崔璐娟), *et al.* Optimization of ultrasonic extraction process for polysaccharides from *Radix Hedysari* and their antioxidant, whitening, moisture absorption and moisturizing activities[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2025, 42(3): 577-586.
- [10] ALI S, KHAN A S, MALIK A U, *et al.* Effect of controlled atmosphere storage on pericarp browning, bioactive compounds and antioxidant enzymes of litchi fruits[J]. *Food Chemistry*, 2016, 206: 18-29.
- [11] FU X Q, ZHANG G L, DENG L, *et al.* Simultaneous extraction and enrichment of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower by an enzyme-assisted ethanol/ammonium sulfate system[J]. *Food & Function*, 2019, 10(1): 266-276.
- [12] ELKOUSY R H, SAID Z N A, ABD EL-BASEER M A, *et al.* Antiviral activity of castor oil plant (*Ricinus communis*) leaf extracts[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 271: 113878.
- [13] WANG G L, HAN Q Q, YAN X P, *et al.* Polyphenols-rich extracts from walnut green husk prevent non-alcoholic fatty liver disease, vascular endothelial dysfunction and colon tissue damage in rats induced by high-fat diet[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 87: 104853.
- [14] MEDIC A, ZAMLJEN T, HUDINA M, *et al.* Time-dependent degradation of naphthoquinones and phenolic compounds in walnut husks[J]. *Biology*, 2022, 11(2): 342.
- [15] MORRIS G M, HUEY R, LINDSTROM W, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility[J]. *Journal of Computational Chemistry* 2009, 30(16): 2785-2791.
- [16] ZHANG L, WANG Z Q, ZENG S X, *et al.* Browning mechanism in stems of fresh-cut lettuce[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134575.
- [17] SUN G D (孙国东), HUO J H (霍金海), XIE R J (谢荣娟), *et al.* Dynamic variation of components in exocarp of *Juglans mandshurica* with browning based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志)*, 2017, 42(16): 3112-3120.
- [18] DUAN Y, ZHAO L J, ZHOU Y H, *et al.* UPLC-Q-TOF-MS, network analysis, and molecular docking to investigate the effect and active ingredients of tea-seed oil against bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14(5): 1225515.