

Detection and Analysis of Vitamin B and Melatonin in Main Walnut Cultivars in Yunnan Province

Shuxiang Geng^{1,2*}, Delu Ning^{1,2#}, Yongjie Li^{1,2}, Haiyun Chen^{1,2}, Yanli Zhang^{1,2}, Liangjun Xiao^{1,2}

¹Yunnan Academy of Forestry, Kunming Yunnan

²Woody Oil Engineering Technology Research Center of Yunnan Province, Kunming Yunnan

Email: gsx05@126.com, #ningdelu@163.com

Received: Feb. 4th, 2017; accepted: Feb. 20th, 2017; published: Feb. 24th, 2017

Abstract

The vitamin B and melatonin content in walnut kernel were studied by using HPLC in 23 main producing areas of Yunnan as raw material. Results show higher content of walnut in vitamin B, vitamin B₆ and nicotinamide. The content of nicotinamide was between 0.816 - 2.933 g/g, and the difference was not significant; vitamin B₆ content was in 0.064 - 1.326 g/g, and the difference was significant. The determination of melatonin in antioxidant substances showed that the content of melatonin in the kernel of Yunnan walnut was higher; the content was in the range of 10.48 - 15.09% ng/g; the highest content could reach 15.09% ng/g, far higher than the foreign 2.5 - 4.5 ng/g. This research can lay foundation for the development of deep processing of walnut industry in Yunnan.

Keywords

Walnut, Vitamin B, Melatonin, HPLC

云南省核桃维生素B及褪黑激素的检测分析

耿树香^{1,2*}, 宁德鲁^{1,2#}, 李勇杰^{1,2}, 陈海云^{1,2}, 张艳丽^{1,2}, 肖良俊^{1,2}

¹云南省林业科学院, 云南 昆明

²云南省木本油料工程技术研究中心, 云南 昆明

Email: gsx05@126.com, #ningdelu@163.com

收稿日期: 2017年2月4日; 录用日期: 2017年2月20日; 发布日期: 2017年2月24日

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 耿树香, 宁德鲁, 李勇杰, 陈海云, 张艳丽, 肖良俊. 云南省核桃维生素 B 及褪黑激素的检测分析[J]. 食品与营养科学, 2017, 6(1): 43-50. <https://doi.org/10.12677/hjfn.2017.61007>

摘要

以云南23个主产区核桃仁为原料,采用HPLC对核桃仁中的维生素B及褪黑激素含量进行分析研究。结果检测到核桃仁中含量较高的维生素B有烟酰胺与维生素B₆,其中烟酰胺含量在0.816~2.933 μg/g之间,差异不显著;维生素B₆含量在0.064~1.326 μg/g之间,差异显著。抗氧化物质中褪黑激素测定结果显示云南主栽核桃品种仁中褪黑激素含量较高,含量范围在10.48~15.09% ng/g,最高含量可达15.09% ng/g,远远高于国外的2.5~4.5 ng/g。本研究的开展可为云南核桃的精深加工产业的发展奠定基础。

关键词

核桃, 维生素B, 褪黑激素, 高压液相色谱

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

核桃除了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,还含有丰富的维生素,其中烟酰胺又为维生素 B₃(或称维生素 PP)——现称烟酸,烟酸在体内转化为烟酰胺。烟酰胺功能是辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分,参与体内脂质代谢,组织呼吸的氧化过程和糖类无氧分解的过程。维生素 B₆ 是 B 族维生素的一种,又名抗皮炎维生素,在食物中分布较广,同氨基酸代谢有密切关系,是脱羧酶的辅酶。此为一种水溶维生素,在烹饪过程中易损失。维生素 B₆ 主要作用在人体的血液、肌肉、神经、皮肤等。功能有抗体的合成、消化系统中胃酸的制造、脂肪与蛋白质利用(尤其在减肥时应补充)、维持钠/钾平衡(稳定神经系统)。目前对维生素 B 涉及含量测定的研究相对较多,报道的其他含量测定方法有多种,如荧光分光光度法[1]和高效液相色谱法[2] [3] [4] [5] [6]等,未见核桃仁中维生素 B 测定的报道。本文此次采用高效液相色谱法同时测定维生素 B 及褪黑激素。

褪黑激素是广泛存在于动物界,由脊椎动物的松果体分泌,能够调节肌体昼夜节律的一种吲哚类激素[7],褪黑素的基本功能就是参与抗氧化系统,防止细胞产生氧化损伤。褪黑激素可以直接清除·OH、H₂O₂、ONOO⁻、NO、LOO·、¹O₂等自由基[8],一个褪黑激素分子可以清除 2 个·OH 分子和 4 个 H₂O₂ 分子[9],褪黑激素除了具有改善睡眠、调节情绪等功能,可作为一种调节睡眠和治疗抑郁症的医疗药品[10]外,还具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫和延缓衰老等作用[11] [12],因此,富含褪黑激素的保健食品很受消费者欢迎,研发富含天然褪黑激素的食品成为欧洲及其他崇尚自然追求有机人群的迫切需求。核桃中含有一定量天然褪黑激素,本文研究云南主栽的核桃品种褪黑激素浓度的差异,为云南富含褪黑激素核桃的研发提供理论依据。

2. 材料与方

2.1. 材料及试剂

材料:核桃供试材料于 2015 年 8 月 15 日至 9 月 30 日采自云南 23 个主栽区。具体采样点见表 1。所采鲜样直接手工剥去青皮,在 40℃烘箱中烘干备用。

Table 1. Walnut samples

表 1. 供试核桃样

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
品种	云新 64	云新 303	凤庆漾泡	新×三台	云新 301	云新云林	云新 306	双江漾泡	景东漾泡
编号	10	11	12	13	14	15	16	17	18
品种	保山细香	云新高原	临沧漾泡	云新 36	新新 2 号	石屏紫金	大姚三台	漾濞漾泡	华宁大砂壳
19	20	21	22	23					
丽江漾泡	华宁大白壳	永 11 号	大麻一号	大麻二号					

试剂：甲醇、甲酸、磷酸二氢钾及乙腈为分析纯试剂、烟酰胺、维生素 B₆、褪黑激素为国产色谱纯标准品。

2.2. 实验方法

2.2.1. 核桃仁样品分析测定前处理

测核桃维生素 B 样品前处理：精确称取 2.5 g 左右的烘干样品，0℃~4℃冰浴磨碎，加入 10 ml 甲醇，80℃超声提取 15 分钟，然后摇床 150 r/min 12 h，提取液离心，残渣加入 10 ml 甲醇重复提取 2 次合并上清液，过滤，吹氮，复溶至 10 ml。取 1 ml 高速离心，待液相色谱分析。

测核桃褪黑激素样品前处理：精确称取 1 g 左右烘干样品于 25 ml 离心管中，加入 20 ml 甲醇超声提取 15 分钟，然后摇床 12 h，提取液离心，过滤，吹氮，复溶至 10 ml。取 1 ml 高速离心，分析备用。

2.2.2. 核桃维生素 B 及褪黑激素的 HPLC 色谱分析条件

核桃维生素 B 的色谱条件

色谱柱 DiamondC18 (200 mm × 3.9 mm, 5 μm) 流动相为 0.10 mol/L 磷酸二氢钾 + 2%(v/v) 乙腈水溶液 (A) 和 60% (v/v) 乙腈水溶液，检测波长烟酰胺 260 nm、维生素 B₆ 是 290 nm。

褪黑素色谱条件

ACQUITY UPLC@ HSS T3 液相色谱柱(1.8 μm, 2.1 × 100 mm) 流动相为甲醇溶液(A1)和 0.1% 甲酸水溶液，采用多级线性梯度洗脱程序(表 2)，流速 0.3 ml/min，柱温 35 ℃ 样品温度 4 ℃ 进样体积 1 μL。

褪黑素质谱条件

使用电喷雾离子源(Electron spray ionization, ESI)，正离子扫描，多反应检测(Multiple reaction monitoring MRM)；毛细管电压：3.5 kV；离子源温度：128℃；脱溶剂温度：400℃；脱溶剂气流量：600 L/h；锥孔气流量：50 L/h；碰撞气流量：0.1 L/h。

3. 结果与分析

3.1. 核桃中维生素 B 测定

3.1.1. 维生素标准曲线的制作

烟酸标准储备液(1.0 mg/mL)：准确称取在五氧化二磷干燥器中干燥的烟酸标准品(>99%) 100.0 mg，加入 75% 乙醇 25 mL 溶解，用 0.10 mol/L 盐酸溶液定容至 100 mL，于冰箱中保存，配标准溶液时以 0.05 mol/L 盐酸溶液稀释至所需浓度。

维生素 B₆ 标准储备液(200 ug/mL)：准确称取吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛标准品(>99%) 各 20.0 mg，用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中，配标准溶液时以蒸馏水稀释至所需浓度。

高压液相色谱分析表明，在云南主产区的 23 个核桃仁中维生素 B 主要为烟酰胺和维生素 B₆。其中

烟酰胺的保留时间为 8.15 (min), 线性方程为 $Y = 2627.4X - 40.453$, 回归系数 $R^2 = 0.9926$, 烟酰胺质量浓度为 0.1~2 $\mu\text{g/mL}$, 质量浓度与吸光度值呈良好的线性关系。维生素 B₆ 的保留时间为 2.04 (min), 线性方程为 $Y = 65111X + 1084.7$, 回归系数 $R^2 = 0.9986$, 维生素 B₆ 质量浓度为 0.2~2 $\mu\text{g/mL}$, 质量浓度与吸光度值呈良好的线性关系, 如图 1 所示。

Table 2. Multilevel linear gradient elution program
表 2. 多级线性梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A%	流动相 B%
0.0	5.0	95.0
0.5	5.0	95.0
10.0	100	0.0
12.0	100.0	0.0
12.5	5.0	95.0

标准样品	出峰时间(min)	浓度(ug/ml)	出峰面积
烟酰胺	8.15	2	5123
		1	2967
		0.5	1079
		0.2	479
		0.1	234
维生素 B ₆	2.04	2	132,673
		1	64,014
		0.5	31,703
		0.2	15,539
		0.1	8917

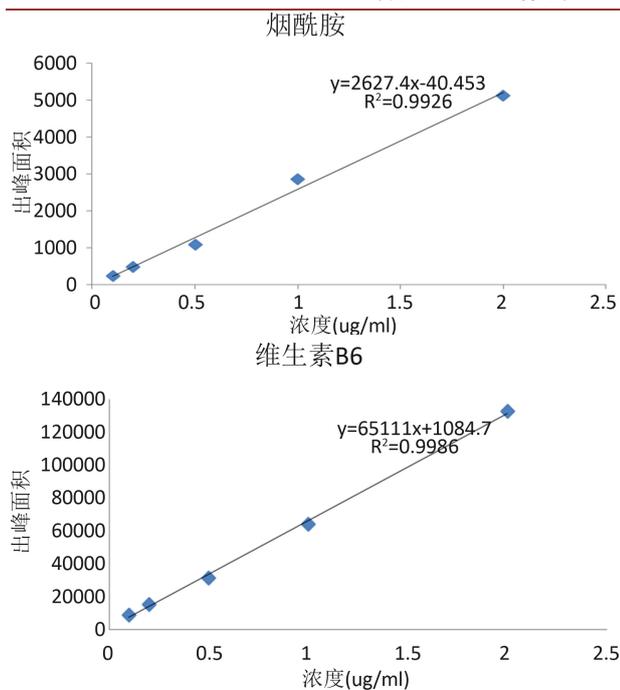


Figure 1. The standard curve of nicotinamide and vitamin B₆
图 1. 烟酰胺、维生素 B₆ 标准曲线

图 2 中, 保留时间 2.05 min 处为烟酰胺, 保留时间 2.28 min 处为维生素 B₆。

3.1.2. 褪黑激素标准曲线的制作

褪黑激素线性方程为 $Y = 1530X + 300.02$, 回归系数 $R^2 = 0.9997$, 褪黑激素质量浓度为 1~20 ng/mL, 质量浓度与吸光度值呈良好的线性关系, 如图 3 所示。其色谱图图 4 中保留时间 5.83 min 处为褪黑激素。

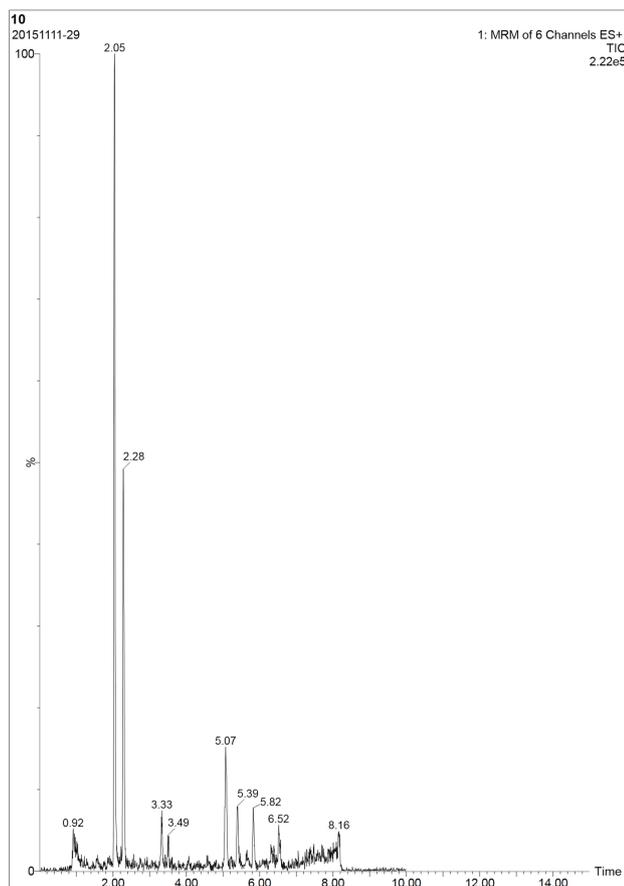


Figure 2. The standard chromatogram of vitamin B₆

图 2. 维生素 B₆ 标准色谱图

浓度(ng/ml)	出峰面积
1	1857
2.5	4043
5	8221
10	15287
20	30999

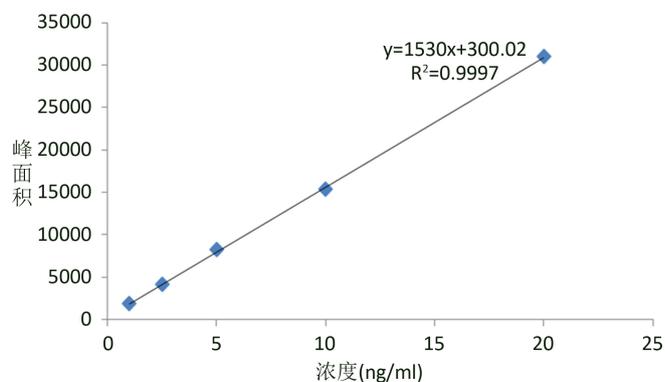


Figure 3. The standard curve of melatonin

图 3. 褪黑激素标准曲线

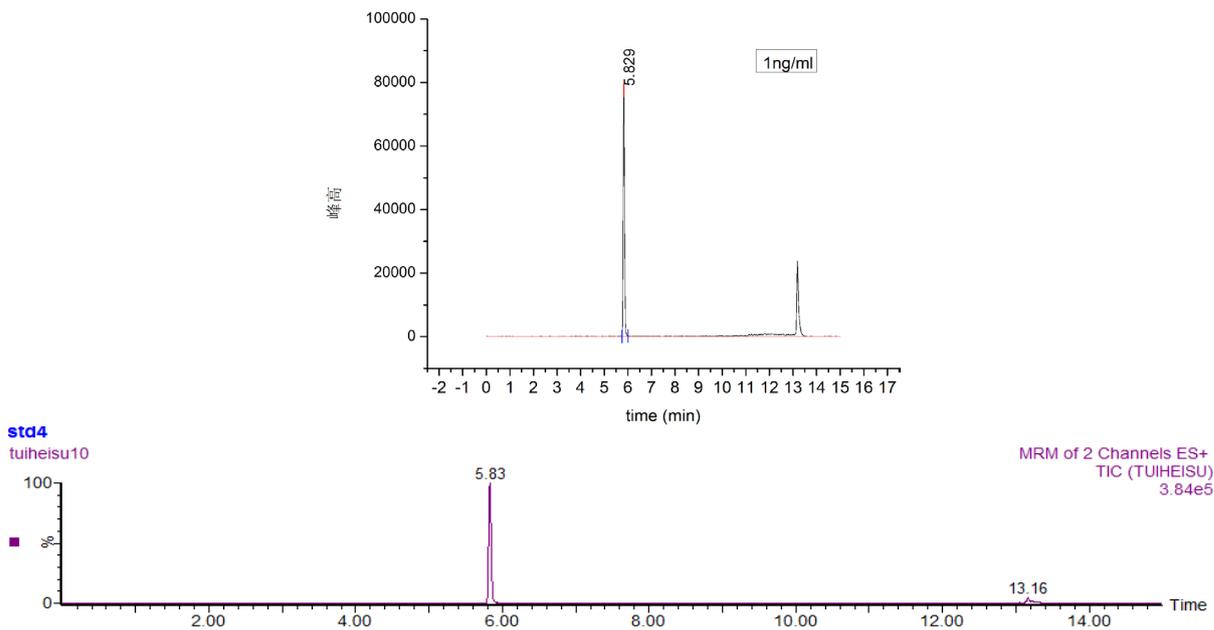


Figure 4. The standard chromatogram of melatonin

图 4. 褪黑色素标准色谱图

Table 3. Results of determination of nicotinamide, vitamin B₆ and melatonin

表 3. 烟酰胺、维生素 B₆ 及褪黑激素测定结果

编号	烟酰胺(μg/g)	编号	维生素 B ₆ (μg/g)	编号	褪黑激素(ng/g)
12	0.816	13	0.064	11	10.48
21	0.95	16	0.187	3	11.36
10	0.964	20	0.214	10	11.38
9	0.98	17	0.226	5	11.6
11	1.044	18	0.449	16	11.69
13	1.046	19	0.46	15	11.9
22	1.146	1	0.484	12	12
23	1.155	21	0.527	22	12.01
8	1.156	4	0.581	19	12.16
19	1.195	23	0.609	21	12.36
3	1.241	2	0.65	9	12.57
18	1.252	12	0.68	8	12.59
6	1.265	6	0.705	2	12.75
20	1.312	15	0.709	14	12.81
7	1.382	11	0.808	4	13.1
16	1.439	5	0.825	20	13.22
15	1.467	10	0.845	13	13.32
5	1.475	8	0.883	7	13.36
17	1.55	14	0.903	17	13.77
4	1.621	3	1.158	1	14.11
14	1.915	7	1.163	23	14.43
2	2.116	9	1.305	18	14.59
1	2.933	22	1.326	6	15.09

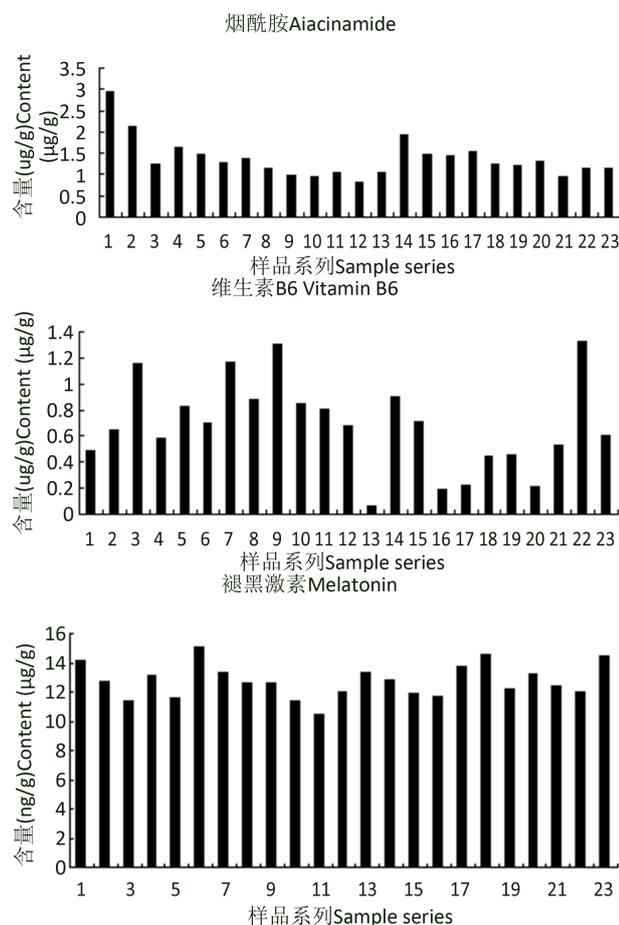


Figure 5. Nicotinamide, vitamin B₆ and melatonin histogram
图 5. 烟酰胺、维生素 B₆ 及褪黑激素的柱状图

3.1.3. 核桃仁中烟酰胺、维生素 B₆ 及褪黑激素测定结果(升序排列)

23 个核桃仁样中烟酰胺、维生素 B₆ 及褪黑激素测定结果显示(见表 3), 烟酰胺含量为 0.816~2.933 $\mu\text{g/g}$, 最低 0.816 $\mu\text{g/g}$ 为 12 号样(临沧漾泡), 最高 2.933 $\mu\text{g/g}$ 为 1 号样(云新 64)。维生素 B₆ 含量范围 0.064~1.326 $\mu\text{g/g}$, 最低 0.064 $\mu\text{g/g}$ 为 13 号样(云新 36), 最高 1.326 $\mu\text{g/g}$ 为 22 号样(大麻一号)。褪黑激素为 10.48~15.09 ng/g , 最低 11 号(云新高原)为 10.48 ng/g , 最高 6 号样(云新云林)15.09 ng/g 。

3.1.4. 核桃仁中烟酰胺、维生素 B₆ 测定结果柱状图分析

由烟酰胺、维生素 B₆ 及褪黑激素的柱状图(见图 5)看出, 烟酰胺含量稍高的核桃品种为 1、2、14 号样, 含量分别为 2.933 $\mu\text{g/g}$, 2.116 $\mu\text{g/g}$, 1.915 $\mu\text{g/g}$, 含量略有差异, 由维生素 B₆ 柱状图可看出, 维生素 B₆ 含量稍高的核桃品种为 7、9、22 号样, 含量分别为 1.163 $\mu\text{g/g}$, 1.305 $\mu\text{g/g}$, 1.326 $\mu\text{g/g}$ 含量差异显著。由褪黑激素柱状图可看出, 23 个品种核桃样褪黑激素含量没有明显差异。

4. 讨论

所收集的云南主栽区核桃试样中, 结果检测到核桃仁中含量较高的维生素 B 有烟酰胺与维生素 B₆, 其中烟酰胺含量在 0.816~2.933 $\mu\text{g/g}$ 之间, 差异不显著; 维生素 B₆ 含量在 0.064~1.326 $\mu\text{g/g}$ 之间, 差异显著。抗氧化物质中褪黑激素测定结果显示云南主栽核桃品种仁中褪黑激素含量较高, 含量范围在 10.48~15.09% ng/g , 最高含量可达 15.09% ng/g , 远远高于国外的 2.5~4.5 ng/g 。开展本研究可为云南核桃

资源的精深加工奠下一定的理论基础。

基金项目

云南省林业厅木本油料创新项目“云南主栽核桃品种品质评价”([2014] CX06)及“云南核桃遗传资源调查编目”([2014] CX01)的部分研究内容。

参考文献 (References)

- [1] 钟文英, 黄斌, 陈琳, 等. 荧光共振能量转移淬灭法测定维生素 B 的含量[J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(6): 527-533.
- [2] Brian, J.P. and Elizabeth, L.F. (2011) Rapid Determination of Vitamin B₂ (Riboflavin) in Plasma by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, **412**, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.037>
- [3] 惠白. 维生素 B₂片含量及含量均匀度测定方法的研究[J]. 中国药品标准, 2010, 11(3): 222-224.
- [4] 王其献, 藏恒昌. 离子对反相高效液相色谱法同时测定脑力静胶囊中维生素 B₁、B₂、B₆ 的含量[J]. 安徽医药, 2008, 12(12): 1156-1157.
- [5] 谢子立, 阚家义, 吴小英, 等. HPLC 法测定维生素 B₂ 注射液的含量及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(4): 694-697.
- [6] 刘羽, 刘燕, 王贺, 等. HPLC 法测定复方维生素注射液(4)中 4 种成分的含量[J]. 安徽医药, 2009, 13(8): 895-897.
- [7] Reiter, R.J. and Tan, D.X. (2002) Melatonin: An Antioxidant in Edible Plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **957**, 341-344. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02938.x>
- [8] Reiter, R.J., Tan, D.X., Burkhardt, S. and Manchester, L.C. (2001) Melatonin in Plants. *Nutrition Reviews*, **59**, 286-290. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07018.x>
- [9] Pieri, C., Momni, F., Marra, M., Marcheselli, F. and Recchioni, R. (1995) Melatonin Is an Efficient Antioxidant. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **20**, 159-165. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(94\)00593-V](https://doi.org/10.1016/0167-4943(94)00593-V)
- [10] 梁竹, 魏玮, 陶利. 褪黑素在治疗睡眠障碍中的研究进展[J]. 解放军药学报, 2014, 30(1): 82-85.
- [11] 陈少雅. 褪黑素的抗肿瘤活性研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2001, 35: 1-3.
- [12] 武翠, 徐金先. 褪黑素对免疫功能的影响[J]. 饲料研究, 2006(9): 25-27.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjfn@s@hanspub.org