

核桃楸青果皮中胡桃醌的提取工艺研究

王文泽¹, 刘洪章², 刘淑英², 蔡明友²

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以核桃楸青果皮为试材,通过单因素试验优选了青果皮青龙衣中胡桃醌的最佳提取方法和最佳提取溶剂,并用正交法验证了料液比、提取时间和提取温度对胡桃醌提取率的影响。结果表明:以乙酸乙酯为提取溶剂,冷浸法结合超声法提取胡桃醌的提取效果最佳;各因素对提取率的影响顺序为固液比>提取时间>提取温度;最佳提取工艺为料液比 1:20 g/mL,提取时间为 40 min,提取温度为 25℃。

关键词:核桃楸;青果皮;胡桃醌;高效液相色谱(HPLC)

中图分类号:TQ 351.01⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0153-05

核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim)属胡桃科胡桃属落叶乔木,别名山核桃、楸子树。胡桃楸的青果皮在中药中被称为青龙衣,青龙衣含有较高的活性物质胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)。Chao等^[1]研究发现,胡桃醌有特异的抑制作用,有望用于体外转录研究;通过水溶液培养液毒性测试,证明了胡桃醌对某些植物有潜在的毒理作用^[2];它在培养液中表现出毒性,具有抗病毒、抗细菌、抗真菌活性功效^[3]。胡桃醌的毒性活动模型包括醌基和酚基官能团对亲核试剂的电子反应活性,以及具有能够承受氧化还原能力的醌基和酚基^[4]。在胡桃醌提取工艺方面,前人已有过部分研究,但对提取方法及提取溶剂的单因素、正交实验及运用超声法提取胡桃醌尚鲜见研究。为有效利用核桃楸资源,充分开发青龙衣的活性成分,现对核桃楸青果皮中胡桃醌的提取工艺进行了优化研究,以确定其最佳提取工艺条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于2011年立秋当天对采自吉林省敦化地区的核桃楸果实自然阴干,剥皮后将皮粉碎过20~30目筛备用。

1.2 试验方法

1.2.1 含量测定方法的建立 色谱条件:色谱柱为迪马C18柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm),流动相为甲醇:水(55:45),水相用磷酸调pH为3.34(磷酸:水为1:500),

流速为1.0 mL/min,检测波长为250 nm,柱温为30℃^[5-6]。对照品溶液制备:精确称取胡桃醌对照品5.00 mg,置于50 mL容量瓶中,加入甲醇溶解定容,摇匀,即得100 μg/mL胡桃醌对照品溶液。供试品溶液的制备:分别将各浓缩浸膏用甲醇溶解转移至10 mL容量瓶中,以甲醇定容,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

1.2.2 线性关系考察 按1.2.1色谱条件分别取对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL置于10.0 mL容量瓶中,依次各取20.0 μL进样,以峰面积积分值(Y)为纵坐标,胡桃醌质量(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=2.54X-1$, $R=0.9979453$ 。结果表明,胡桃醌在0.05~1.20 μg范围内线性关系良好。

1.2.3 方法学考查 精密度试验:精密吸取配制好的浓度为0.25 mg/mL的对照品溶液20.0 μL,重复进样6次,测定峰面积,其RSD为1.43%,精密度良好(图1A)。重复性试验:取同一批青龙衣药材作为样品,平行制备6份供试品溶液,在1.2.1色谱条件下进样分析,测定峰面积。结果表明,胡桃醌平均质量分数为0.147%,RSD为1.51%。稳定性试验:取新制备的同一份供试品溶液,分别在室温放置0、1、4、8、12、24 h进样,测定峰面积,得RSD为0.62%(n=6),结果表明,供试品在24 h内稳定。加样回收率试验:精密称取已知含量的胡桃楸树皮6份,每份2.5 g,分别精密加入一定量的胡桃醌对照品,按照供试品溶液的制备方法进行测定并计算回收率,结果表明,胡桃醌的平均回收率为98.82%,RSD为1.97%(n=6)。

1.2.4 提取方法比较试验 索氏提取法:准确称取青龙衣粉末1.0 g,置于500 mL索氏提取器烧瓶中,精确加入95%乙醇50.0 mL,热回流2次(水浴温度85℃),每

第一作者简介:王文泽(1988-),女,硕士研究生,研究方向为果树天然产物化学。E-mail:wdx0883@126.com。

责任作者:刘洪章(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为果树天然产物化学。E-mail:lh999@126.com。

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20100254)。

收稿日期:2013-03-13

次 1 h, 过滤, 提取液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 50 mL 三角瓶中低温冷藏备用, 按照 1.2.1 色谱条件进行分析 (图 1B)。冷浸法: 准确称取青龙衣药材粉末 1.0 g, 精确加入 95% 乙醇 15.0 mL, 密封, 冷浸 24 h 后过滤, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10.0 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 50.0 mL 三角瓶中低温冷藏备用, 按照 1.2.1 色谱条件进行分析 (图 1C)。超声法: 准确称取青龙衣粉末 1.0 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 精确加入 95% 乙醇 15.0 mL, 密封, 超声处理 40 min (功率 40 KHz, 温度 25℃), 过滤, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10.0 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 50.0 mL 三角瓶中低温冷藏备用, 按照 1.2.1 色谱条件进行分析 (图 1D)。

1.2.5 提取溶剂的比较试验 准确称取青龙衣样品粉末 6 份, 每份 1.0 g。分别按料液比 1:15 加入甲醇、乙醇、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、丙酮, 密封, 超声 40 min (功率 40 KHz, 温度 25℃), 过滤, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 500 mL 三角瓶中低温冷藏备用。将上述不同溶剂提取的浸膏分别用甲醇溶解转移至 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇定容后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 运用 HPLC 法测定各提取物中胡桃醌的含量, 比较并优选最佳提取溶剂。

1.2.6 单因素对提取率影响的研究 料液比对核桃楸青龙衣中胡桃醌提取率的影响: 称取 1.0 g 核桃楸青龙衣样品粉末, 分别加入 10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 mL 的经 1.2.5 选择的最佳提取溶剂, 密封, 超声处理 40 min (功率 40 kHz, 温度 25℃), 过滤, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 50 mL 三角瓶中低温冷藏备用, 用于高效液相色谱, 根据测得浓度计算相应的胡桃醌提取率。提取时间对核桃楸青龙衣中胡桃醌提取率的影响: 称取 1.0 g 核桃楸青龙衣样品粉末, 加入 15.0 mL 经 1.2.5 选择的最佳提取溶剂, 密封, 分别超声处理 10、20、30、40、50 min (功率 40 KHz, 温度 25℃), 过滤, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 50 mL 三角瓶中低温冷藏备用, 用于高效液相色谱, 根据测得浓度计算相应的胡桃醌提取率。提取温度对核桃楸青龙衣中胡桃醌提取率的影响: 称取 1.0 g 核桃楸青龙衣样品粉末, 加入 15.0 mL 经 1.2.5 选择的最佳提取溶剂, 密封, 分别超声处理 40 min (功率 40 KHz), 温度分别为 15、20、25、30、35℃, 过滤, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏后用甲醇溶解, 于 10 mL 容量瓶中定容, 之后转移至 50 mL 三角瓶中低温冷藏备用, 用于高效液相色谱, 根据测得浓度计算相应的胡桃醌提取率。

1.2.7 正交实验设计 由各单因素试验确定的参数适宜范围, 进行 3 因素 3 水平正交实验, 因素水平设计见表 1, 相同条件平行做 3 次之后, 舍去不合理数据, 取平均值。

表 1 正交因素及水平设计

Table 1 The factors and levels design of orthogonal test

水平	因素		
	A 料液比 /g : mL	B 提取时间 /min	C 提取温度 /℃
1	1 : 15.0	20	25
2	1 : 17.5	30	30
3	1 : 20.0	40	35

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对胡桃醌得率的影响

由图 1 可知, 索氏提取法提取液中检测到的胡桃醌含量极低, 分析其原因, 是由于根据醌类化合物的理化性质, 游离的醌类化合物一般都具有升华性, 而胡桃醌属于小分子萘醌, 具有挥发性, 能随水蒸气蒸馏, 所以推测温度过高胡桃醌会随溶剂挥发而损失, 这可能是导致索氏提取法提取青龙衣浸膏中检测不到胡桃醌的关键所在。超声法和冷浸法提取液中胡桃醌含量没有显著性差异, 但是从提取时间角度考虑超声法所用时间短、提取效率高, 优于冷浸法, 更适合试验研究需要。因此选择冷浸法结合超声法对胡桃醌最佳提取工艺进行研究。

2.2 不同提取溶剂对胡桃醌提取效果的影响

从图 2 可以看出, 6 种溶剂中提取效果较好的有乙酸乙酯和丙酮 2 种, 其中乙酸乙酯对胡桃醌的提取率最高, 为 0.490%±0.002%, 与乙醚、乙醇和氯仿等其它溶剂组比较有显著性差异 ($P<0.01$)。但由于丙酮具有强挥发性, 且有剧毒, 考虑到安全因素, 提取溶剂应选择为乙酸乙酯; 另外, 丙酮的沸点比乙酸乙酯相对较高, 胡桃醌受热易于挥发, 并易分解, 综合考虑, 提取溶剂选择乙酸乙酯。

2.3 料液比对胡桃醌提取率的影响

由图 3 可知, 随着料液比的增加, 胡桃醌的提取率呈上升趋势。分析其原因, 是由于随着溶剂的增加, 单位体积溶剂对胡桃醌的溶解能力也增加, 但当溶剂量增加到 1:15 g/mL 时, 提取率的增加幅度逐渐减小, 说明材料中可溶解的胡桃醌成分已充分溶出, 若再增加溶剂量, 只会增加试验成本, 因此选择以 1:15、1:17.5、1:20 g/mL 为最佳料液比条件做正交实验。

2.4 提取时间对胡桃醌提取率的影响

从图 4 可以看出, 随着提取时间的增加, 提取率呈逐渐上升的趋势, 当提取 30 min 时提取率达最高值, 为 0.403%, 而后有所下降。分析其原因, 可能是由于超声

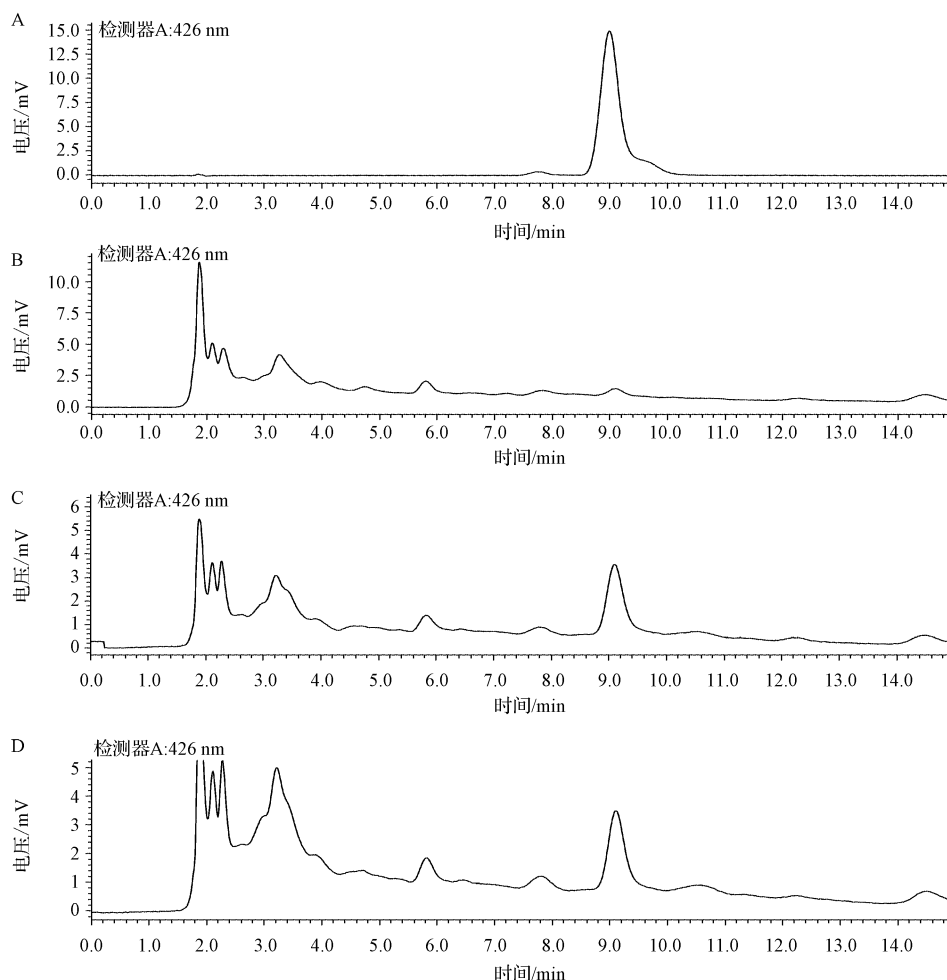


图1 不同提取方法提取的色谱图比较

注:A:对照;B:索氏法;C:冷浸法;D:超声法。

Fig. 1 Comparison of chromatogram by different extraction methods

Note: A; Julone reference substance; B; Soxhlet extraction; C; Quench extraction; D; Ultrasonic extraction.

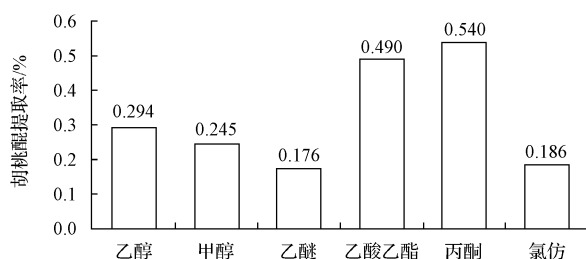


图2 不同提取溶剂对胡桃醌提取率的影响

Fig. 2 Effect of different extraction solvents on julone extraction rate

促使材料中的胡桃醌溶解在提取剂中,但是若超声时间过长,胡桃醌类成分结构会发生变化。因此选择提取时间为20、30、40 min进行正交实验。

2.5 提取温度对胡桃醌提取率的影响

由图5可知,随提取温度的升高,胡桃醌在提取剂中的溶解度增加,从而使提取率增加,当提取温度为

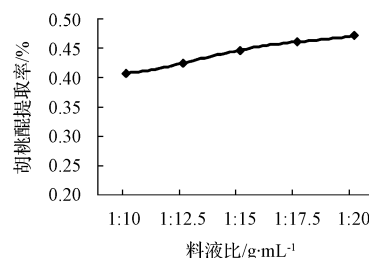


图3 不同料液比对胡桃醌提取率的影响

Fig. 3 Effect of different solid-liquid ratio on julone extraction rate
30℃时,胡桃醌得率达最高,为0.494%。根据胡桃醌的性质来看,温度升高会加速小分子胡桃醌的升华,因此30℃之后,胡桃醌产率降低,因此,30℃是提取胡桃醌的最佳温度。

2.6 正交优化实验结果

由表2可以看出,各因素对胡桃醌提取率的影响顺序依次为料液比>提取时间>提取温度。结合对正交

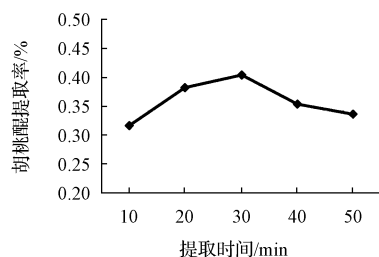


图4 不同提取时间对胡桃醌得率的影响

Fig. 4 Effect of different extracting time on juglone extraction rate

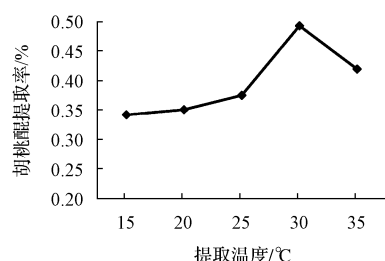


图5 不同提取温度对胡桃醌得率的影响

Fig. 5 Effect of different extraction temperature on juglone extraction rate

实验数据的分析可以得出,胡桃醌最佳提取工艺组合为 $A_3B_3C_1$,即料液比 1 : 20 g/mL,提取时间为 40 min,提取温度 25°C。为考察上述优选提取工艺的稳定性,按该工艺条件进行验证试验 3 次,测定核桃楸青龙衣中胡桃醌平均提取率为 0.404%。

表2 正交实验结果

Table 2 The results of the orthogonal test

处理号	A 料液比 /g : mL	B 提取时间 /min	C 提取温度 /°C	提取率 /%
1	1 : 15	20	25	0.357
2	1 : 15	30	30	0.338
3	1 : 15	40	35	0.381
4	1 : 17.5	20	30	0.339
5	1 : 17.5	30	35	0.339
6	1 : 17.5	40	25	0.382
7	1 : 20	20	35	0.386
8	1 : 20	30	25	0.396
9	1 : 20	40	30	0.389
K_1	0.359	0.361	0.378	
K_2	0.353	0.358	0.355	
K_3	0.390	0.384	0.369	
R	0.037	0.026	0.023	

3 讨论与结论

目前胡桃醌单体有 2 种常用的获取方式,1 种为以萘酚类化合物为原料进行合成^[8]而获取,如 5,8-二羟基-1-四氢萘酮中间体合成法、萘硝化氧化合成法、萘磺化氧化合成法等,但由于大量使用有毒催化剂、合成步骤复杂、产品合成时间长、收率低、经济成本高等原因而未被广泛应用;另 1 种为提取分离法。由于胡桃醌在温度过高时化学结构不稳定,大量提取过程中损耗过多,同时

由于提取过程中需要大量试剂,考虑到经济成本,并不适合于大量制备胡桃醌。该试验采用超声提取硅胶柱层析法制备胡桃醌,不仅避开了胡桃醌高温不稳定的难题,而且制备步骤简单,经济成本低。

该试验中,由于涉及到在超声过程中有温度加热,胡桃醌会有部分升华或分解,导致结果误差;另外,旋转蒸发器减压过程中也会促使胡桃醌升华,因此在单因素与正交实验中均做 3 组平行试验以减小误差。另外,由于液相色谱在进样过程中间隔时间较短,为 15 min,样品极有可能出峰不完全,导致下一次进样之后偶尔会有峰的叠加和漂移,致使出现数据差异。因此,该试验中,适当舍弃不合理的数据,并且同一样品平行进样 2 次,以确定胡桃醌含量。

在提取工艺方面,前人已有过部分研究,李富荣等^[9]已采用 Waters symmetry shield TM RP18 色谱柱通过 HPLC 法测定了胡桃醌的含量,初步形成了胡桃醌的测定方法;胡国军等^[10]曾运用超声法直接对青龙衣中胡桃醌的提取工艺进行过优化而未作单因素优化,其因素选用的是溶剂种类、溶剂量和提取时间。程力惠等^[11]对核桃楸树皮中胡桃醌的提取方法以及工艺进行过优化,因素选择较少。该试验结果表明,以冷浸结合超声法,以乙酸乙酯为提取溶剂,胡桃醌最佳提取工艺为:料液比 1 : 20 g/mL,提取时间为 40 min,提取温度为 25°C,则胡桃醌平均提取率为 0.404%。

参考文献

- [1] Chao S H, Arno L, David H. Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(3): 767-773.
- [2] Hejl A M, Koster K L. Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*) [J]. Chem Ecol, 2004, 30: 453-471.
- [3] Inbaraj J J, Chignell C F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes [J]. Chem Res Toxicol, 2004, 17, 55-62.
- [4] Rath M C, Pal H, Mukherjee T. One-electron transfer reactions of some hydroxyl naphthoquinones; Solvent and substitution effect as studied by pulse radiolysis [J]. Chem Soc, 1996, 92: 1891-1897.
- [5] 曲中原, 邹翔, 胡国军, 等. 青龙衣中胡桃醌提取工艺研究[J]. 中药学报, 2008, 36(4): 30-32.
- [6] 索绪斌, 高奎滨, 张云凌, 等. 高效液相色谱法测定青龙衣中胡桃醌含量[J]. 中药材, 2003, 26(11): 793.
- [7] 匡海学. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 77.
- [8] 李聪, 张明晓, 陈雯. 胡桃醌的合成研究[J]. 精细化工中间体, 2010, 40(6): 11-15.
- [9] 李富荣, 史卫峰, 程国良, 等. HPLC 法测定青龙衣中胡桃醌的含量[J]. 药物研究, 2007, 4(12): 164-165.
- [10] 胡国军, 曲中原, 邹翔, 等. 正交设计优选青龙衣中胡桃醌提取工艺 [C]. 2008 年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集, 2008: 2629-2633.
- [11] 程力惠, 黄晓文. 核桃楸树皮中胡桃醌提取方法及其工艺研究[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(4): 33-35.

不同品种金银花在盐碱地引种栽培对比研究

王玉珍

(东营职业学院 生物与生态工程学院, 山东 东营 257091)

摘要:对从不同产地引进的4个金银花品种在东营市盐碱地进行种植,研究比较了盆栽和在不同含盐量的大田种植对金银花生长和产量的影响。结果表明:盆栽试验中4个品种均有一定的耐盐性,在含盐量1.0~7.0 g/kg浓度下影响均较小,盐浓度大于7.0 g/kg会严重影响金银花生长,甚至导致死亡,4个品种中“大毛花”的耐盐程度稍微好于其它3个品种,但差异不显著;在大田栽培试验中,4个品种都能在盐碱含量3.5%以下的土壤生长,其中“四季花”产量最高,药用成分含量也最高,可以作为中草药在盐碱地推广种植。

关键词:金银花;药用;盐碱地;盆栽试验;大田试验

中图分类号:S 567 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)15-0157-03

金银花(*Lonicera japonica*)属忍冬科忍冬属木质藤本植物,绝大多数品种为匍匐型,也有少部分品种为直立型。由于金银花收获时需要大量的人力,并且匍匐型难以人工操作,因此目前生产中重点培育直立繁花型、花期集中、花朵集中、便于收获的品种。金银花于每年的4月发芽,5月末开花,花期持续2个月左右,每朵花开放时间10~15 d,采收最佳时期是花朵含苞待放、由绿变白的棒槌期。金银花药用价值较高,有清热解毒、消肿止痛、消炎利尿、润喉清嗓、抗衰防癌、轻身健体等功效;可以抑制多种病原菌的发生。目前以金银花为原料,可制成多种中药产品和保健品,如金银花茶叶、金银

花牙膏、金银花洗面奶、金银花花露水,以金银花为主要成分制成的双黄连口服液、清热解毒颗粒、健脑补肾丸等。因此金银花的销量逐年上升,价格也一路攀升,各地种植金银花的热情也有增无减。

金银花对生长环境要求不严,较耐盐碱。山东省东营市盐碱地资源丰富,具有很多闲置土地,根据市场需求和东营市盐碱地现状,在市政府和林业部门的带领下,制定了优惠政策,引入了金银花的种植。该试验从不同产地选择4种金银花在当地种植,取得了良好的效果,现总结如下,供参考。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地点设在东营市广北农场。广北农场位于山东省东营市南端,地理坐标为东经118°33'~118°45'、北纬37°13'~37°19',年平均气温12.2℃,平均降雨量

作者简介:王玉珍(1966-),女,硕士,副教授,现主要从事盐生植物的教学与盐碱地改良研究工作。E-mail:wyzlylxm@163.com.
收稿日期:2013-04-10

Study on Extraction Process of Juglone in Green Husks of *Juglans mandshurica*

WANG Wen-ze¹, LIU Hong-zhang², LIU Shu-ying², CAI Ming-you²

(1. Academy of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Academy of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking *Juglans mandshurica* green husks as test materials, the best methods to extract juglone and best extraction solvent were optimized by single factor test, and the influence of solid-liquid ratio, extraction time and temperature on extraction rates was verified through orthogonal test. The results showed that ethyl acetate was the best extraction solvent, cold soak method combined with ultrasonic was the optimum extraction method; the order of factors on the extraction rate of juglone was: solid-liquid ratio > extraction time > extraction temperature; the best extraction technology was: solid-liquid ratio 1 : 20 g/mL, extraction time 40 min, extraction temperature 25℃.

Key words: *Juglans mandshurica*; green husks; juglone; high performance liquid chromatography (HPLC)