

核桃楸树皮中胡桃醌提取工艺优化

王雨萌, 时东方, 李赛男, 张语迟, 刘春明

(长春师范大学 中心实验室, 吉林 长春 130032)

摘 要:以核桃楸树皮为试材,采用正交实验的方法对核桃楸树皮进行提取,并用 HPLC 技术对其化学成分进行检测,应用标准曲线法计算胡桃醌的含量。结果表明:从核桃楸树皮中提取胡桃醌的最佳工艺料液比 1:12 g/mL,乙醇浓度 95%,回流提取 2 次,每次回流 50 min。

关键词:核桃楸树皮;高效液相色谱法;胡桃醌;正交实验

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)05-0141-04

核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.)属胡桃科胡桃属落叶乔木,又名胡桃、小核桃等,是东北著名的三大硬阔之一,是我国东北林区珍贵的用材树种,也是我国重要的药源植物^[1]。雌花序 4~10 朵花,花期 5—6 月。果序具 4~10 个果,果期 8—9 月^[2]。坚果长椭圆形,顶端锐尖,果皮厚,种仁小。核桃楸树皮又名楸树皮(*Juglandis mandshuricae* Cortex),具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用。树皮中主要含有胡桃醌、双胡桃醌、双氢槲皮素、阿福豆甙、槲皮素等化学成分^[3]。研究表明,胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)是从核桃楸中提取分离出来的一种活性物质,具有抑菌和抗癌的作用^[4]。因此研究核桃楸树皮中胡桃醌的提取工艺,对其在农业、医学等方面的应用具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试核桃楸树皮于 2012 年采于吉林省白山市地区,自然阴干后将叶粉碎过 20~30 目筛,备用。

试剂:胡桃醌购于阿法埃莎(天津)有限公司,纯度 99%;甲醇为色谱纯;其它试剂均为分析纯。

仪器:KDM 型控温电热套购于鄞城华鲁电热仪器有限公司;KQ-250E 型超声波清洗器购于昆山市超声仪器有限公司;Heidolph 大型旋转蒸发仪;Waters e2695 高效液相色谱仪。

第一作者简介:王雨萌(1989-),女,硕士研究生,研究方向为天然药物化学。E-mail:dongfang1107@163.com。

责任作者:刘春明(1964-),女,博士,教授,现主要从事天然药物化学等研究工作。

基金项目:吉林省发改委资助项目(2013C002);吉林省教育厅资助项目(吉教科合字[2012]第 225 号);长春师范学院自然科学基金资助项目(长师院自科合字[2012]第 05 号)。

收稿日期:2014-11-13

1.2 试验方法

1.2.1 制备胡桃醌标准溶液 准确称取胡桃醌标准品 2 mg,用甲醇将其溶解,然后定容到 25 mL 容量瓶中,即得到含量为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的胡桃醌标准溶液。

1.2.2 绘制胡桃醌标准曲线 分别吸取胡桃醌标准溶液 0.250、0.375、0.500、0.625、0.750 mL,置于 10 mL 标有 1~5 号的容量瓶中;加入甲醇定容至刻度,摇匀,静置。分别取 10 μL 依次进样,进行 HPLC 检测(图 1)。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,标准回归曲线方程: $A=41\,579c+152\,931(R=0.9815)$ 。胡桃醌浓度在 0.0200~0.0600 mg/mL 范围内线性关系良好(表 1)。

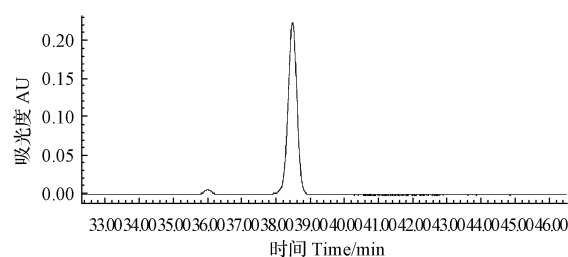


图 1 胡桃醌标品的色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatogram of the juglone

表 1 胡桃醌标准曲线的绘制结果

Table 1 The result of the standard curve of the juglone

编号	1	2	3	4	5
标品浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.250	0.375	0.500	0.625	0.750
峰面积 A	230 571	275 793	323 709	379 594	386 564

1.2.3 色谱条件 色谱柱:SunFire™ C18 反相色谱柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm);检测波长:250 nm;流动相:甲醇-磷酸水溶液($V_{\text{甲醇}}=29\%\sim 65\%$);流速:0.8 mL/min;进样量:10 μL ;柱温:室温。

1.2.4 供试品溶液的制备 准确称取核桃楸树皮粉末 20 g,加入 200 mL 95%乙醇溶液,放入超声波清洗器中超声 3 次,每次 30 min,过滤,合并提取液。将提取液进

行旋蒸,除去乙醇溶剂,保留水溶液。用移液管移取 2 mL 旋蒸后溶液,用甲醇定容到 5 mL 容量瓶中,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.2.5 优化提取方法 回流提取法:精确称取 20 g 核桃楸树皮粉末,置于 500 mL 圆底烧瓶中,向圆底烧瓶中加入 200 mL 75%乙醇,加热回流 3 次,每次 50 min,过滤,将滤液进行旋蒸,保留浓缩液。移取浓缩液 2 mL,用甲醇定容到 5 mL 容量瓶中,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按照 1.2.3 色谱条件进行分析(图 2)。超声法:精确称取 20 g 核桃楸树皮粉末,置于 500 mL 烧杯中,向烧杯中加入 200 mL 75%乙醇,密封,将烧杯放入超声清洗器中超声提取 30 min,过滤,将滤液进行旋蒸,保留浓缩液。移取浓缩液 2 mL,用甲醇定容到 5 mL 容量瓶中,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按照 1.2.3 色谱条件进行分析(图 3)。冷浸法:精确称取 20 g 核桃楸树皮粉末,置于 500 mL 烧杯中,向烧杯中加入 200 mL 75%乙醇,密封,冷浸 12 h 后过滤,将滤液进行旋蒸,保留浓缩液。移取浓缩液 2 mL,用甲醇定容到 5 mL 容量瓶中,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按照 1.2.3 色谱条件进行分析(图 4)。

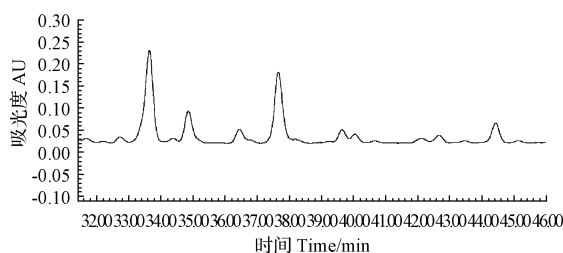


图 2 回流法提取胡桃醌的色谱图

Fig. 2 The HPLC chromatogram of the juglone that extracted by heat-reflux extraction

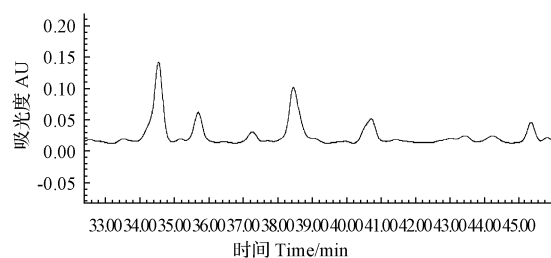


图 3 超声法提取胡桃醌的色谱图

Fig. 3 The HPLC chromatogram of the juglone that extracted by ultrasound extraction

1.2.6 优化提取溶剂浓度 根据 1.2.4 试验结论得出,采用回流提取法进行提取。准确称取 3 份核桃楸树皮粉末各 20 g,分别置于 3 个 500 mL 圆底烧瓶中,分别向烧瓶中加入 60%、75%、95%乙醇各 200 mL,回流 30 min,过滤并将滤液进行旋蒸,保留浓缩液。移取浓缩液 2 mL,用甲醇定容到 5 mL 容量瓶中,进样前用 0.45 μm

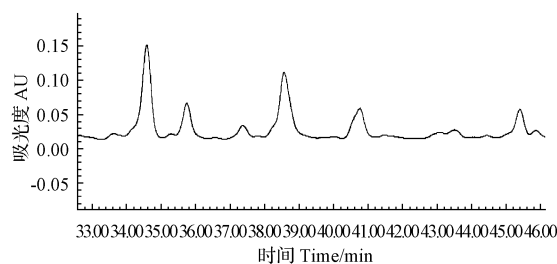


图 4 冷浸法提取胡桃醌的色谱图

Fig. 4 The HPLC chromatogram of the juglone that extracted by the cold-soaked extraction

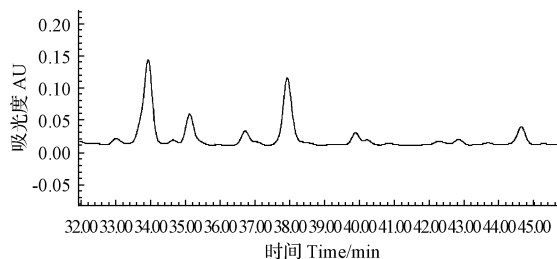


图 5 60%乙醇提取胡桃醌的色谱图

Fig. 5 The HPLC chromatogram of the juglone that extracted by 60% ethanol

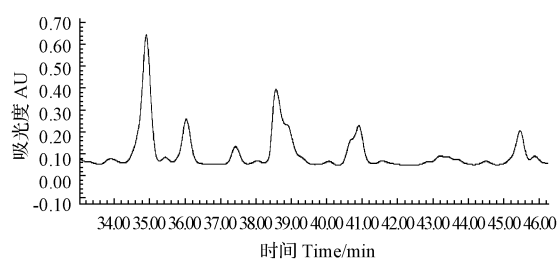


图 6 95%乙醇提取胡桃醌的色谱图

Fig. 6 The HPLC chromatogram of the juglone that extracted by 95% ethanol

微孔滤膜过滤,按照 1.2.3 色谱条件进行分析(图 5、2、6)。

1.2.7 正交实验设计 在提取过程中,提取方法、溶剂浓度、料液比等因素都会影响到提取核桃楸中胡桃醌的提取率,因此,用正交实验^[5]来优化提取工艺,用 $L_9(3^4)$ 正交表优化提取工艺条件(表 2)。

表 2 正交实验因素和水平

Table 2 The levels and the factors of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	A	B	C	D
	提取方法	溶剂浓度/%	料液比/(g·mL ⁻¹)	提取次数
1	回流法	60	1:8	1
2	超声法	75	1:10	2
3	冷浸法	95	1:12	3

2 结果与分析

2.1 优化提取方法结果

根据标准曲线方程,计算得到 3 种提取方法中胡桃

酞的含量依次为 664.050、603.140、565.005 $\mu\text{g/g}$, 由此可以选择回流提取法。

2.2 优化提取溶剂浓度结果

根据标准曲线方程, 计算得到 3 种不同浓度提取溶剂提取的胡桃酞的含量依次为 551.930、664.050、752.745 $\mu\text{g/g}$, 由此可以选择 95% 乙醇作为提取剂。

2.3 正交实验结果

由表 3 可知, 各因素对提取工艺的影响顺序为 $A > C > D > B$, 即提取方法 $>$ 料液比 $>$ 提取次数 $>$ 溶剂浓度。由试验数据结果分析得出, 提取胡桃酞最佳水平组合为 $A_1 B_3 C_3 D_2$ 。即提取方法为回流提取法, 提取溶剂浓度为 95%, 料液比为 1:12 g/mL, 提取次数为 2 次。

按最佳提取工艺进行 3 次验证试验, 测得胡桃酞的含量分别为 729.39、729.36、729.28 $\mu\text{g/g}$ 。由此可证, 正交实验优化的最佳提取工艺是可行的。

表 3 核桃楸树皮正交实验结果

Table 3 The results of the orthogonal test of the *Juglans mandshurica* Maxim

试验号	A 提取方法	B 溶剂浓度/(g·mL ⁻¹)	C 料液比	D 提取次数	胡桃酞含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	回流法	60	1:8	1	696.26
2	回流法	75	1:10	2	529.26
3	回流法	95	1:12	3	729.31
4	超声法	60	1:10	3	134.72
5	超声法	75	1:12	1	344.78
6	超声法	95	1:8	2	319.40
7	冷浸法	60	1:12	2	607.87
8	冷浸法	75	1:8	3	511.76
9	冷浸法	95	1:10	1	404.22
k_1	672.61	479.62	509.14	481.75	
k_2	266.30	482.90	377.07	506.51	
k_3	507.95	484.31	560.65	458.60	
R	406.31	4.69	183.58	47.91	

2.4 方法学考查

2.4.1 精密度试验 准确吸取配制好的浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液 10 μL , 在 1.2.3 色谱条件下进样分析, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 其 RSD 为 4.4%, 精密度良好。

2.4.2 重复性试验 准确称取 6 份同一核桃楸树皮样品粉末 10 g, 按 1.2.4 平行制备供试品溶液 6 份, 在 1.2.3 色谱条件下进样分析, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 其 RSD 为 8.7%, 精密度良好。

2.4.3 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、2、4、6、8、10、12、24 h 进样, 在 1.2.3 色谱条件下进样分析, 测定峰面积, 得 RSD 为 5.7% ($n=6$),

结果表明, 供试品在 24 h 内稳定。

2.4.4 加样回收率试验 准确称取 6 份同一核桃楸叶样品粉末 10 g, 分别加入一定量的胡桃酞对照品, 按 1.2.4 平行制备供试品溶液 6 份, 在 1.2.3 色谱条件下进样分析, 重复进样 6 次, 测定峰面积, RSD 为 3.6%, 精密度良好。

3 结论与讨论

通过对核桃楸中胡桃酞的提取的研究, 采用高效液相色谱法^[6]检测目标化合物胡桃酞的含量, 发现不同提取方法所得胡桃酞的含量相差较大, 回流提取法效果最佳, 而冷浸提取法效果最差。而不同乙醇浓度对胡桃酞的提取的影响中 95% 的乙醇提取效果最佳。该试验设计了针对提取方法(A)、溶剂浓度(B)、料液比(C)和提取次数(D)4 因素的正交实验。试验结果表明, 提取方法为回流提取法, 提取溶剂乙醇的浓度为 95%, 料液比为 1:12 g/mL, 提取次数为 2 次, 每次提取 50 min 为提取核桃楸中胡桃酞的最佳提取工艺。

由于胡桃酞有抗菌、抗癌、杀虫等作用, 所以核桃楸树皮作为重要的植物源药用材料, 不论在医学还是农业方面都有着重要的意义。并且随着核桃木市场的不断扩大, 这就使得加工废弃物——核桃楸树皮被大量产出。所以核桃楸树皮合理利用问题具有很强的现实性和迫切性^[7]。因此优化胡桃酞的提取条件, 对于应用核桃楸树皮有着至关重要的作用^[8]。

参考文献

- [1] 雷涛, 孟繁钦, 吴宜艳. 核桃楸皮鞣质含量测定[J]. 实验室科学, 2012, 15(1): 88-90.
- [2] 孙墨珑. 核桃楸的杀虫活性及活性成分研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [3] Liu J X, Meng M, Li C, et al. Simultaneous determination of three diarylheptanoids and an α -tetralone derivative in the green walnut husks (*Juglans regia* L.) by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1190: 80-85.
- [4] 王文泽, 刘洪章, 刘淑英, 等. 核桃楸青果皮中胡桃酞的提取工艺研究[J]. 北方园艺, 2013(15): 153-157.
- [5] 方薇, 王一男, 蔡小燕, 等. 正交试验优选核桃楸皮中有效成分的提取工艺[J]. 山东大学学报(理学版), 2013, 48(11): 23-26.
- [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酞含量[J]. 中药材, 2003, 26(11): 793.
- [7] 侯栋, 高哲, 何童森, 等. HPLC 测定核桃青皮中胡桃酞的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 70-72.
- [8] 程力惠, 黄晓文. 核桃楸树皮中胡桃酞提取方法及其工艺研究[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(4): 33-35.

Optimize of Extraction Technology of Juglone from *Juglandis mandshuricae* Cortex

WANG Yu-meng, SHI Dong-fang, LI Sai-nan, ZHANG Yu-chi, LIU Chun-ming
(The Central Laboratory, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130032)

油用牡丹丹皮液对青椒丙二醛含量及抗氧化酶活性的影响

赵 奇, 李玉华, 杨玉珍, 王国霞

(郑州师范学院 生命科学院, 河南 郑州 450044)

摘 要:以青椒为试材,采用超声波、水煮、蒸馏3种方法提取的油用牡丹丹皮液来处理贮藏期青椒,对青椒丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性进行研究。结果表明:与对照相比,丹皮液处理提高了抗氧化酶SOD、POD、CAT的活性,减少了MDA的积累。说明丹皮液处理通过调节抗氧化酶体系活性调节活性氧代谢,能减轻青椒膜脂过氧化伤害,利于青椒储藏。

关键词:油用牡丹;丹皮提取液;青椒;抗氧化酶

中图分类号:S 565.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0144-04

青椒属茄科辣椒属一年生或多年生草本植物,果肉厚而脆嫩,维生素C含量丰富,风味独特^[1],是群众一年四季喜欢的蔬菜之一。青椒生产季节性较强,淡旺季差价大,旺季腐烂损耗严重,淡季供求紧张^[2-3]。为了延长青椒收获后的货架期,研究者尝试了保鲜袋处理^[4]、温度条件处理^[5-6]、保鲜剂处理^[7]等多种方法,但是在实际应用时因操作性、经济成本、安全性等问题限制了其应用。

牡丹根皮被称为丹皮,除医药价值外,吴晓慧等^[8]研究证实了丹皮有抑菌和抗氧化的生物学效果。贾小丽等^[9]、崔霞等^[10]研究证实了用丹皮提取物处理草莓和黄瓜取得了较好的保鲜效果,除此之外,尚鲜见其它果蔬品种中相应的研究报道,油用牡丹根皮的此类应用鲜见报道。油用牡丹因其较高的营养价值,近几年在河南省逐年扩大种植面积,在种植区有丰富的边角料。该研

究选择油用牡丹根皮提取液来处理青椒,通过对青椒MDA及保护酶活性的研究,拟从细胞膜保护酶水平上揭示丹皮液处理下的青椒储藏衰老机理,以期对丹皮的综合开发和青椒的储藏提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油用牡丹丹皮由郑州师范学院黄河滩实习基地提供,为油用牡丹—丹凤移栽时剪掉的根;青椒采购于郑州毛庄蔬菜批发市场。果实为无机械伤、无病虫害、果柄果蒂新鲜饱满的绿熟果。

1.2 试验方法

用蒸馏、水煮、超声波3种方法制备油用牡丹丹皮液,分别浸泡青椒10 min,设置蒸馏水为对照。捞出青椒,装入0.03 mm厚聚氯乙烯薄膜袋内,用打孔器处理5个透气孔,8℃温度储藏,每隔3 d取样测定。每个处理设置3次重复,每个重复30个果。选择剥离好的丹皮,28℃烘箱烘干,用电动粉碎机粉碎备用。3种丹皮液制备方法见表1。

1.3 项目测定

1.3.1 丙二醛(MDA)含量的测定 参照赵世杰等^[11]的方法适当修改。取适量果肉组织,加入4 mL 10%三氯

作者简介:赵奇(1979-),女,硕士,讲师,现主要从事生理生化与生物技术等研究工作。E-mail:zhq_612@163.com.

基金项目:河南省科技计划资助项目(142102110178);郑州市科技计划资助项目(141PPTGG426);郑州师范学院博士基金支撑资助项目(2012080)。

收稿日期:2014-11-10

Abstract: Taking tree bark of *Juglandis mandshuricae* Cortex as the test material and the factors about the extraction by set up $L_9(3^4)$ orthogonal test was optimized. The content of juglone was calculated by HPLC technique combined with the method called standard curve. The results showed that optimum extraction conditions of juglone from *Juglandis mandshuricae* Cortex was solid-liquid ratio of 1 : 12 g/mL, the ethanol concentration of 95%, extracted two times, each time the reflux of 50 min.

Keywords: tree bark of *Juglandis mandshuricae* Cortex; high performance liquid chromatography; juglone; orthogonal test