

冯 迟,王舒雅,高 俊,等. 核桃楸青果皮中胡桃醌的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):340-342.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.099

# 核桃楸青果皮中胡桃醌的提取工艺

冯 迟,王舒雅,高 俊,杨紫薇,雍晓雨,周 俊,刘晓宁,郑 涛  
(南京工业大学生物与制药工程学院/南京工业大学生物能源研究所,江苏南京 211816)

**摘要:**以核桃楸青果皮为原料,以固液比、超声温度、超声时间和超声功率为考察因素,通过单因素试验优选核桃楸青果皮中胡桃醌的最佳提取方法,通过  $L_9(3^4)$  正交试验对提取过程进行优化,结果表明,超声辅助提取为最佳提取方法,其最佳工艺条件:提取溶剂为 90% 乙醇溶液,固液比 1 mg : 18 L,超声温度 30 ℃,超声时间 30 min,超声功率 200 W,此时胡桃醌的提取率为 1.72 mg/g。

**关键词:**胡桃醌;核桃楸青果皮;正交试验;超声辅助提取

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0340-03

核桃楸(*Juglans mandshurica*)为胡桃科胡桃属落叶乔木,是我国珍贵的药源植物。核桃楸青果皮中含有较多的活性物质胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)<sup>[1]</sup>。核桃成熟期间,大量核桃楸青果皮被当作垃圾堆放于地头、沟边或田间,对环境造成极大污染,如果能对核桃楸青果皮中的有效物质进行有效利用,则在保护环境的同时还能增加果农的收入,具有显著的经济效益和社会效益。现代药用研究表明,胡桃醌具有很好的镇痛、抗肿瘤和抑癌作用,胡桃醌进入细胞体具有抗真菌细胞毒素和抗滤过性病原体的性质<sup>[2-3]</sup>。本试验以胡桃醌提取率为评价指标,对胡桃醌的提取方法及其工艺进行优化,旨在为核桃楸青果皮及其药用价值的充分利用提供依据<sup>[4-6]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

核桃楸果实,购自吉林省通化市(长白山林区);对照品为胡桃醌,纯度≥97%,由 Sigma 公司生产;甲醇为色谱纯,由 J&K 化学有限公司生产;去离子水自制;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

Agilent 1260LC 高效液相色谱仪,配置 G1311-B 四元泵、G1311-B 自动进样器、G1316-A 柱温箱、G1314-F 紫外检测器,由美国 Agilent 公司生产;Milli-Q 纯水仪,由美国 Millipore 公司生产;KQ-250DE 型数控超声波清洗器,由江苏省昆山市超声仪器有限公司生产;Allegra X-30R 型离心机,由美国 Beckman Coulter 公司生产。

### 1.3 原料的预处理

因胡桃醌为小分子萘醌,于 45 ℃ 左右易升华,所以采用

真空冷冻干燥方法,先将核桃楸青果皮用真空冷冻干燥机进行干燥,再将核桃楸青果皮进行粉碎,过 60~80 目筛,即得试验所需原料<sup>[7]</sup>。

### 1.4 分析方法

通过全波长扫描,胡桃醌在 250 nm 处有特征吸收峰,采用高效液相色谱法检测样品中胡桃醌含量(图 1)<sup>[8]</sup>。色谱条件为:Agilent ODS-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温 25 ℃;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL;流动相 A 相为超纯水溶液,B 相为甲醇溶液,流动相配比为 A : B=35 : 65<sup>[9]</sup>。

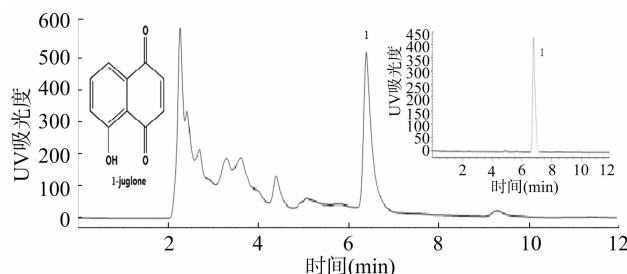


图1 胡桃醌乙醇提取高效液相色谱(HPLC)

### 1.5 胡桃醌标准曲线的建立

精确称取胡桃醌标准品 4.00 mg,用甲醇溶解于 10 mL 容量瓶中,定容<sup>[10]</sup>,作为标准品贮备液;精确量取标准品储备液,用甲醇稀释配制浓度为 0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 25、0.003 125 mg/mL 的标准品溶液;分别用 0.22 μm 滤膜过滤,进行 HPLC 检测,每个浓度重复进样 3 次<sup>[11]</sup>。以胡桃醌浓度( $X_{\text{Juglone}}$ )为横坐标,以胡桃醌峰面积积分值( $Y_{\text{Juglone}}$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程  $Y_{\text{Juglone}} = 99.053 X_{\text{Juglone}} - 0.237 15$  ( $r^2 = 0.999 4$ ),胡桃醌在 0.006 25~0.3 mg/mL 范围内线性关系良好。

### 1.6 提取方法的比较

**1.6.1 索式提取法** 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,置于 500 mL 索氏提取器烧瓶中,加入 20 mL 乙醇溶液,热回流 2 次,水浴温度为 80 ℃,每次 30 min;离心,取上清液,用 0.22 μm 滤膜过滤;HPLC 检测。

**1.6.2 冷浸法** 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,加入 20 mL 乙醇溶液,密封,置于避光处冷浸 12 h;离心,取上清

收稿日期:2015-04-02

基金项目:国家“973”计划(编号:2013CB733502);江苏省青年自然科学基金(编号:BK20130931、BK20130932)。

作者简介:冯 迟(1991—),男,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事植物活性成分分离及天然药物提取研究。E-mail:fcfighting@njtech.edu.cn。

通信作者:郑 涛,博士,教授,主要从事生物燃气、植物药研究与开发、微生物燃料电池研究。E-mail:zhengtao@njtech.edu.cn。

液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.6.3 超声辅助提取法 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 乙醇溶液,密封,超声辅助提取 30 min(超声温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、功率 250 W);离心,取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.7 单因素试验

1.7.1 乙醇浓度对胡桃醌提取率的影响 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,依次加入浓度为 80%、85%、90%、95%、100%的乙醇溶液 20 mL,超声提取 30 min(超声温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 250 W);离心,取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.7.2 固液比对胡桃醌提取率的影响 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,以 1 g : 12 mL、1 g : 14 mL、1 g : 16 mL、1 g : 18 mL、1 g : 20 mL 的固液比加入 90% 乙醇溶液,超声提取 30 min(超声温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 250 W);离心,取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.7.3 超声温度对胡桃醌提取率的影响 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,以 1 g : 16 mL 的固液比加入 90% 乙醇溶液,在超声功率 250 W 条件下,依次以 20、25、30、35、40  $^{\circ}\text{C}$  的超声温度反应 30 min;离心,取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.7.4 超声时间对胡桃醌提取率的影响 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,以 1 g : 16 mL 的固液比加入 90% 乙醇溶液,在超声功率 250 W、超声温度 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下,依次超声反应 10、20、30、40、50 min;离心,取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.7.5 超声功率对胡桃醌提取率的影响 准确称取绝干核桃楸青果皮样品 1.0 g,以 1 g : 16 mL 的固液比加入 90% 乙醇溶液,在 30  $^{\circ}\text{C}$  超声温度条件下,依次以超声功率 150、175、200、225、250 W 反应 30 min;离心,取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤;HPLC 检测。

1.8 正交试验设计

运用超声法提取,以固液比(A)、超声温度(B)、超声时间(C)、超声功率(D)为考察因素,进行 4 因素 3 水平  $L_9(3^4)$  正交试验(表 1) [12]。

表 1 正交试验因素及水平设计

水平	A:固液比 (g : mL)	B:超声温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	C:超声时间 (min)	D:超声功率 (W)
1	1 : 14	25	20	175
2	1 : 16	30	30	200
3	1 : 18	35	40	225

2 结果与分析

2.1 提取方法的比较

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萜醌,具有挥发性,温度过高时胡桃醌会随溶剂挥发而损失,导致提取率最低。由图 2 可知,索氏提取法对胡桃醌的提取率相对最低;超声提取法所用时间短、提取效率相对最高,优于冷浸法。

2.2 单因素对胡桃醌提取率的影响

2.2.1 乙醇浓度对胡桃醌提取率的影响 由图 3 可见,随乙

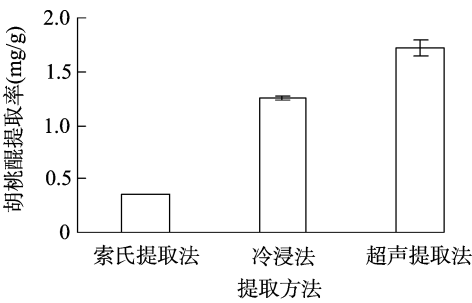


图 2 胡桃醌提取方法的比较

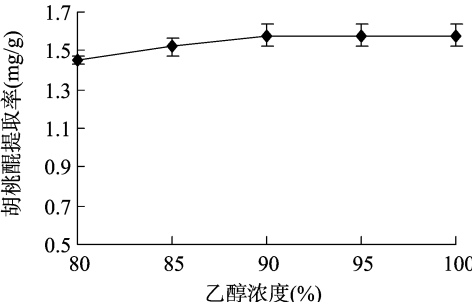


图 3 乙醇浓度对胡桃醌提取率的影响

醇浓度的增加,胡桃醌提取率逐渐增加,乙醇浓度为 80% ~ 90% 时,胡桃醌提取率增加较快,这是由于有机溶剂的增加有助于胡桃醌的溶解;当乙醇浓度进一步增加时,胡桃醌提取率增长趋势趋于平缓,基本持平。因此,90% 乙醇溶剂是最为适宜用量。

2.2.2 固液比对胡桃醌提取率的影响 由图 4 可见,固液比在 1 g : (12 ~ 16) mL 时,胡桃醌提取率随提取溶剂用量的增加而增加,这说明溶剂量增大,会直接影响胡桃醌从原料内部向外部扩散;固液比在 1 g : (16 ~ 20) mL 时,胡桃醌提取率基本持平。考虑到提取溶剂用量增加时,不仅会增加生产成本,还会增加分离纯化难度,所以固液比以 1 g : 16 mL 为宜。

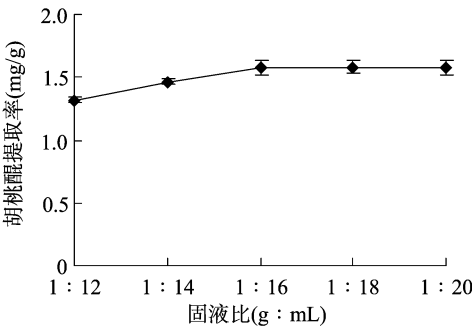


图 4 固液比对胡桃醌提取率的影响

2.2.3 超声温度对胡桃醌提取率的影响 由图 5 可见,超声温度为 20 ~ 30  $^{\circ}\text{C}$  时,胡桃醌提取率随温度上升而增加,这是由于温度升高,胡桃醌扩散系数增大,有效成分浸出速度加快,从而提取率增加较快;当超声温度为 30 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$  时,胡桃醌提取率下降,这是由于温度过高,胡桃醌结构遭到破坏。所以,超声温度以 30  $^{\circ}\text{C}$  为宜。

2.2.4 超声时间对胡桃醌提取率的影响 由图 6 可见,超声时间为 10 ~ 30 min 时,胡桃醌提取率随提取时间延长而逐渐增加,这是由于随着超声时间的延长,超声波对底物产生的搅

拌和空化作用增强,进而使溶出物质增多;超过 30 min 时,超声波会破坏提取物中部分胡桃醌的结构,从而导致提取率降低。因此,为保证有效成分结构完好且提取尽可能完全,超声时间以 30 min 为宜。

2.2.5 超声功率对胡桃醌提取率的影响 超声波作用的效果取决于单位面积输出的超声功率和所提取物的结构与性

质,不同的提取物有不同的适宜超声功率范围,超过此范围,超声作用可能对提取物结构造成损害,从而影响其提取量。由图 7 可见,胡桃醌提取率随超声功率的增加而增加;当超声功率超过 200 W,胡桃醌提取量随超声功率的增加而下降,这可能是由于高超声功率可使胡桃醌分解。所以,胡桃醌提取超声功率以 200 W 为宜。

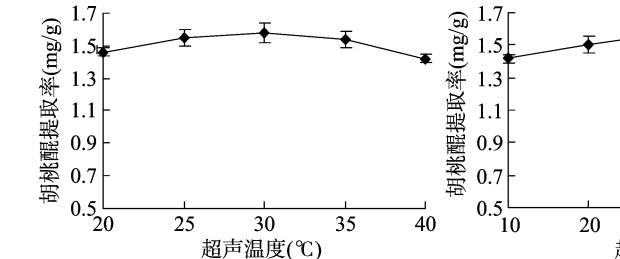


图5 超声温度对胡桃醌提取率的影响

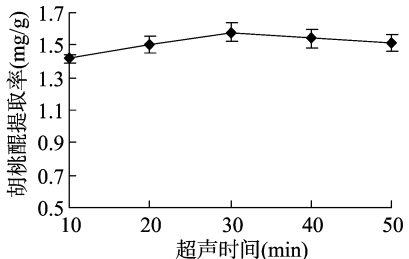


图6 超声时间对胡桃醌提取率的影响

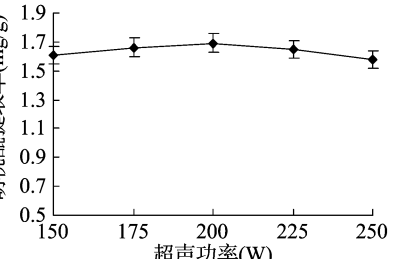


图7 超声功率对胡桃醌提取率的影响

2.3 正交试验优选最佳工艺组合

由表 2、表 3 可见,影响核桃楸青果皮中胡桃醌提取率的因素从大到小依次为固液比 > 超声功率 > 超声时间 > 超声温度,核桃楸青果皮中胡桃醌的最佳提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即固液比 1 g : 18 mL、超声温度 30 ℃、超声时间 30 min、超声功率 200 W。按正交试验优化工艺条件进行 3 次验证,测得核桃楸青果皮中胡桃醌的平均提取率为 1.72 mg/g。

表 2 核桃青皮中胡桃醌提取工艺 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	胡桃醌含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	1.45
2	1	2	2	2	1.61
3	1	3	3	3	1.54
4	2	1	2	3	1.64
5	2	2	3	1	1.55
6	2	3	1	2	1.62
7	3	1	3	2	1.70
8	3	2	1	3	1.68
9	3	3	2	1	1.63
k <sub>1</sub>	1.533	1.597	1.583	1.543	
k <sub>2</sub>	1.603	1.613	1.627	1.643	
k <sub>3</sub>	1.670	1.597	1.597	1.620	
R	0.137	0.016	0.044	0.100	

表 3 正交试验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值
固液比	0.028	2	2.333	4.460
超声温度	0.001	2	0.083	4.460
超声时间	0.003	2	0.250	4.460
超声功率	0.016	2	1.333	4.460
误差	0.05	8		

3 结论

胡桃醌为小分子萜醌,45 ℃ 左右易升华,所以索式提取法胡桃醌提取率相对最低。超声提取法由于直接作用于分子内部,提取效率高,提取率高于索氏提取法、冷浸法。本试验

对核桃楸青果皮中胡桃醌提取工艺的影响因素进行单因素试验,在此基础上设计正交试验,最终确定超声波辅助提取的最佳工艺条件:90% 乙醇溶液为溶剂、固液比为 1 g : 18 mL、超声温度为 30 ℃、超声时间为 30 min、超声功率为 200 W,此条件下胡桃醌的提取率为 1.72 mg/g,这为核桃楸青果皮中有效成分胡桃醌的开发利用提供了一个较为科学合理的理论依据。

参考文献:

[1] 曲中原,邹翔,胡国军,等. 青龙衣中胡桃醌提取工艺研究[J]. 中医药学报,2008,36(4):30-32.  
[2] 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.  
[3] 王文泽,刘洪章,刘淑英,等. 核桃楸青果皮中胡桃醌的提取工艺研究[J]. 北方园艺,2013(15):153-157.  
[4] 魏赫楠,谭红,包娜,等. 核桃青皮中胡桃醌的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):215-217.  
[5] 赵岩,刘淑萍,吕朝霞. 核桃青皮的化学成分与综合利用[J]. 农产品加工,2008(11):66-68.  
[6] 李钧,曲中原,邹翔,等. 青龙衣中胡桃醌的分离与鉴定[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2011,27(5):641-644.  
[7] 李宇,吴浩杰,周茜,等. 胡桃醌的提取条件优化与定量分析概述[J]. 现代园艺,2014(16):5-6.  
[8] Pereira J A, Oliveira I, Sousa A, et al. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(6):2103-2111.  
[9] 李青,谭红,袁鑫,等. 高效液相色谱法测定核桃青皮中胡桃醌的含量[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):259-261.  
[10] Carvalho M, Ferreira P J, Mendes V S, et al. Human Cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(1):441-447.  
[11] 孙墨珑,宋湛谦,方桂珍. 核桃楸总黄酮及胡桃醌含量测定[J]. 林产化学与工业,2006,26(2):93-95.  
[12] Wang S Y, Gao J, Chen Y L, et al. Optimisation of the ethanol-based heat reflux extraction of isoflavones from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi root [C]. 2014 3rd International Conference on Energy and Environmental Protection, 2014:180-186.