

# 超声辅助乙醇提取核桃青皮总黄酮及纯化工艺

冯茜, 王宇欣, 卜鑫瑞, 张椰莉, 李娜\*

(太原师范学院生物科学与技术学院, 山西 晋中 030619)

**摘要:**核桃是重要的林业经济树种。随着核桃产量逐年上升,核桃青皮常被当作废弃资源,将核桃青皮变废为宝备受关注。本研究探究了核桃青皮总黄酮的最佳提取及纯化工艺,对比了不同提取溶剂及提取方法对总黄酮提取率的影响,通过 Box-Behnken 试验优化提取条件,对提取所得核桃青皮总黄酮样品进行纯化,分别分析了上样质量浓度、上样流速、乙醇体积分数和洗脱流速对总黄酮纯化效果的影响。实验结果表明:核桃青皮总黄酮的最佳提取方法为超声辅助乙醇提取法;最佳提取条件为乙醇体积分数 50.52%,超声温度 80.19 °C,超声时间 47.01 min,核桃青皮总黄酮提取率达 52.45%。为符合实际工艺操作,以乙醇体积分数 51%、超声温度 80 °C、超声时间 47 min 对最佳提取工艺进行验证,得出核桃青皮总黄酮提取率为 52.53%,与模型预测结果基本吻合( $P < 0.05$ )。采用 AB-8 大孔树脂对总黄酮纯化的效果最佳,且在上样质量浓度 4 mg/mL、上样流速 3 BV/h、乙醇体积分数 70%、洗脱流速 2 BV/h 的条件下,总黄酮纯化效果最佳,样品回收率为 84.45%,总黄酮纯度为 81.10%。本研究可为核桃青皮总黄酮的提取纯化提供科学依据和技术支持,为核桃青皮的资源再利用提供新思路。

**关键词:**核桃青皮;黄酮提取;响应面优化;大孔树脂纯化

中图分类号:O629

文献标志码:A

文章编号:2096-1359(2024)06-0106-08

## Ultrasound-assisted ethanol extraction and purification of flavonoids from walnut peel

FENG Qian, WANG Yuxin, BU Xinrui, ZHANG Yeli, LI Na\*

(College of Biological Science and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, China)

**Abstract:** Walnut is a traditional economic tree species in China. With the continuous increase of walnut production, the accumulation of walnut peel has gradually increased. Most of the walnut peel is discarded as agricultural waste, which not only causes a great waste of resources, but also causes pollution to the environment. Therefore, it has received much attention for turning walnut peel into treasure. The effects of different extraction solvents and different extraction methods on the extraction rate of flavonoids were compared to explore the optimal extraction and purification process of flavonoids from walnut peel. The extraction conditions were optimized using Box-Behnken experimental design, and the effects of loading mass concentration, loading flow rate, ethanol volume fraction and elution flow rate on the purification efficiency were explored. The results showed that the optimal flavonoids extraction method was ultrasonic-assisted ethanol extraction. The results of single factor experiment showed that the extraction rate of flavonoids from walnut peel was the highest when ethanol volume fraction was 50%, ultrasonic time was 45 min and ultrasonic temperature was 80 °C. The optimal extraction conditions were ethanol volume fraction of 50.52%, ultrasonic temperature of 80.19 °C and ultrasonic time of 47.01 min. In this condition, the extraction rate of flavonoids was 52.45%. For the convenience of practical operation, the optimal extraction process was verified by ethanol volume fraction of 51%, ultrasonic temperature of 80 °C and ultrasonic time of 47 min, and the extraction rate of flavonoids from walnut peel was 52.53%, which was basically consistent with the software design results. Among the results of D3520, D101, HPD-600, AB-8 and DM130 macroporous resins on the adsorption and desorption rates of flavonoids from walnut peel, AB-8 macroporous resin exhibited the best purification efficiency on flavonoids. The results of dynamic adsorption experiment show that the best purification conditions of flavonoids were loading mass concentration of 4 mg/mL, loading flow rate of 3 BV/h, ethanol volume fraction of 70%, and elution flow rate of 2 BV/h. The purity of flavonoids after purification was 81.10%. This study was aimed at providing scientific basis and technical support for the extraction and purification of total flavonoids from walnut peel, solving the problem of

收稿日期:2024-04-02

修回日期:2024-05-27

基金项目:山西省自然科学基金(202103021223316)。

作者简介:冯茜,女,研究方向为天然产物开发与应用。通信作者:李娜,女,副教授。E-mail:jyyykl@163.com

resource waste and environmental pollution caused by the increase of walnut production year by year, and providing new ideas for the reuse of walnut peel in agriculture, food, medicine and other fields.

**Keywords:** walnut peel; flavonoids extraction; response surface optimization; macroporous resin purification

核桃 (*Juglans mandshurica* Maxim), 属胡桃属胡桃科, 是一种树身高大的落叶乔木, 广泛种植于山西、陕西、河北等地, 是中国传统的林业经济树种<sup>[1]</sup>。山西地处黄土高原, 多为丘陵地带, 气候干燥, 土壤呈中性至微碱性, 尤其适宜发展核桃经济林。核桃青皮是核桃的外果皮, 在核桃未成熟时, 果皮呈青色; 随着胡桃果实逐渐成熟, 外部青色果皮由于外界各种因素, 逐渐变黯, 干燥后从果实上脱落下来<sup>[2]</sup>。核桃青皮味苦、辛、涩, 性微寒, 不仅能排除体内热邪、病邪, 还能改善眼部疲劳, 镇痛, 治疗痢疾泻肚等疾病<sup>[3-4]</sup>。此外, 核桃青皮在抗菌、抗炎、抗癌等方面也表现出药理活性<sup>[5-6]</sup>。已有研究表明, 核桃青皮中含有萘醌类、黄酮类、萜类、二芳基庚烷类、酚酸类等成分<sup>[7]</sup>。目前, 随着核桃产量的持续增加, 核桃青皮的积累量也逐渐增大, 而绝大部分核桃青皮被作为农业废弃物而随意丢弃, 不仅造成资源的极大浪费, 还对环境造成了污染。因此, 将核桃青皮变废为宝成为目前核桃产业发展亟待解决的关键问题。

黄酮类化合物是天然产物之一, 通常具有 C<sub>6</sub>—C<sub>3</sub>—C<sub>6</sub> 结构<sup>[8-9]</sup>, 在植物界分布广泛。随着国内外研究的不断深入, 发现黄酮类化合物种类繁多, 且具有抗菌<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、清除自由基<sup>[12]</sup> 以及抗癌等功效, 被广泛应用于食品、药品、化妆品等行业<sup>[13]</sup>。如今, 提取黄酮类化合物的方法多样, 如水热提取、有机溶剂提取、碱提酸沉、超声波萃取等, 其中有机溶剂提取最为常用<sup>[14]</sup>。Krongrawa 等<sup>[15]</sup> 采用此方法从小花山柰根茎中提取甲氧基黄酮, 总产率达 16.95%。由于大孔树脂具有理化性质稳定、容易再生、可用寿命长、操作简单、价格低等优点, 被广泛用于黄酮类化合物的分离与纯化中。孙嘉莉等<sup>[16]</sup> 利用 AB-8 大孔树脂纯化沙棘果皮渣总黄酮, 纯度由 9.78% 提高到 50.20%; 穆莎茉莉等<sup>[17]</sup> 利用 HPD100 大孔树脂纯化蓖麻叶总黄酮, 纯度达到 56.34%。

本研究以核桃青皮为原材料, 探究不同提取方法对核桃青皮总黄酮提取率的影响, 在单因素实验基础上, 利用响应面优化法得出最佳提取工艺; 并通过静态吸附和动态吸附实验筛选出纯化总黄酮效果最佳的大孔树脂, 得出最佳纯化工艺, 以期核桃青皮总黄酮的提取纯化以及进一步开发提供

技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料与仪器

核桃青皮, 2023 年 9 月 15 日 (白露节气后 7 d) 采收自山西省长治市沁县, 自然晒干。芦丁标准品 (纯度 ≥ 95%)、AB-8 等树脂 (具体性质见表 1), 购自北京索莱宝科技有限公司; 亚硝酸钠等均为分析纯, 天津市大茂化学试剂厂。

表 1 试验所用大孔树脂性质

Table 1 Properties of macroporous resins used in experiments

型号	性质	孔径/mm
D101	非极性	7.0 ~ 10.0
D3520	非极性	8.5 ~ 9.0
AB-8	弱极性	12.0 ~ 16.0
HPD-600	极性	8.0
DM130	弱极性	9.0 ~ 10.0

VIS-720N 型可见分光光度计 (北京北分瑞利分析仪器有限公司); G-18A 型超声清洗机 (东莞市歌能清洗设备有限公司); RE-5205 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Alpha 1-2 LD plus 型冻干机 (北京科伟永兴仪器有限公司); BORO3.3 型玻璃层析柱 (上海五相仪器仪表有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 黄酮标准曲线的制备

准确称取 20 mg 芦丁标准品, 并精确配制成质量浓度为 0.8 mg/mL 的芦丁标准溶液。在 6 只 25 mL 的容量瓶中依次加入 0, 0.15, 0.30, 0.60, 0.90 和 1.20 mL 芦丁标准溶液, 加入无水乙醇定容至 2.40 mL 后用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 显色法<sup>[18]</sup> 测定吸光度值, 3 次后取平均值。以总黄酮浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标建立标准曲线, 回归方程为  $y = 2.3779x + 0.0154$ , 决定系数  $R^2 = 0.999$ 。以此方法进行核桃青皮总黄酮测定。

#### 1.2.2 核桃青皮总黄酮的不同提取方法

分别称取过 100 目 (孔径为 0.15 mm) 分子筛后的干燥核桃青皮粉末 10.0 g, 固定料液比为 1:10 (g:mL), 依次利用乙醇冷浸提取法 (体积分数 45% 乙醇, 20 °C, 65 min)、水冷浸提取法 (蒸馏水, 20 °C, 65 min)、乙醇热回流提取法 (体积分数 45%

乙醇, 80 °C, 65 min)、水热回流提取法(蒸馏水, 80 °C, 65 min)、超声辅助乙醇提取法(体积分数 45% 乙醇, 80 °C, 65 min, 120 W)、超声辅助水提取法(蒸馏水, 80 °C, 65 min, 120 W) 6 种方法进行提取。使用 6 层棉纱过滤, 在 5 000 r/min 下离心 10 min, 测定上清液吸光度值, 并根据公式(1)计算总黄酮提取率( $Y$ )。

$$Y = \frac{C \times N \times V}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $C$ 为所测定核桃青皮提取液总黄酮的质量浓度, mg/mL; $N$ 为稀释倍数; $V$ 为提取液体积, mL; $M$ 为称取的粉末质量, g。

### 1.2.3 核桃青皮总黄酮提取单因素试验

以核桃青皮总黄酮提取率为考察指标, 分别研究乙醇体积分数(10%, 30%, 50%, 70%和 90%, 固定超声温度 60 °C、超声时间 40 min)、超声温度(50, 60, 70, 80 和 90 °C, 固定乙醇体积分数 50%、超声时间 40 min)以及超声时间(25, 35, 45, 55 和 65 min, 固定乙醇体积分数 50%、超声温度 60 °C) 3 种因素对核桃青皮总黄酮提取率的影响。

### 1.2.4 Box-Behnken 实验设计及响应面分析

根据 Box-Behnken 实验设计原理, 选择乙醇体积分数( $A$ )、超声温度( $B$ )、超声时间( $C$ ) 3 种影响因素, 以总黄酮提取率( $Y$ )为响应值, 设计 3 因素 3 水平响应面实验, 乙醇体积分数分别为 30%, 50% 和 70%, 超声温度分别为 70, 80 和 90 °C, 超声时间分别为 35, 45 和 55 min。

### 1.2.5 核桃青皮总黄酮纯化工艺

1) 大孔树脂预处理: 将 5 种大孔树脂分别置于体积分数 95% 的乙醇溶液中浸泡 24 h 使其完全膨胀, 用去离子水清洗至无醇味; 将处理后的大孔树脂依次置于质量分数 5% HCl 和 4% NaOH 溶液中浸泡 2 h, 用去离子水清洗至流出液呈中性, 作为湿树脂备用<sup>[19]</sup>。

2) 静态吸附试验: 分别称取预处理后的 5 种大孔树脂 2 g 于锥形瓶中, 依次加入 2 mg/mL 的总黄酮溶液 10 mL, 置于恒温振荡培养器吸附 24 h 后, 测定溶液中总黄酮含量, 依据公式 2、3 计算 5 种大孔树脂的吸附量  $Y_1$  和吸附率  $Y_2$ 。利用 70% 乙醇溶液 10 mL 进行解吸附, 并根据公式(4)计算解吸率  $Y_3$ 。

$$Y_1 = \frac{C_0 - C_1}{m} \times V_1 \quad (2)$$

$$Y_2 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$Y_3 = \frac{C_2}{C_0 - C_1} \times \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \quad (4)$$

式中: $C_0$ 为核桃青皮总黄酮的初始质量浓度, mg/mL; $C_1$ 为吸附平衡时青皮总黄酮的质量浓度, mg/mL; $C_2$ 为解吸液中总黄酮的质量浓度, mg/mL; $m$ 为树脂的质量, g; $V_1$ 为加入样液的体积, mL; $V_2$ 为加入解析液的体积, mL。

3) 动态吸附试验: 称取 25 g 预处理后的 AB-8 树脂进行湿法装柱(高×内径为 60 cm×2.5 cm), 平衡 12 h 后分别考察上样液质量浓度(1, 2, 4 和 6 mg/mL)、上样流速(2, 3, 4 和 5 BV/h)、乙醇体积分数(50%, 60% 和 70%) 和洗脱流速(1, 2, 3 和 4 BV/h) 对吸附效果的影响。

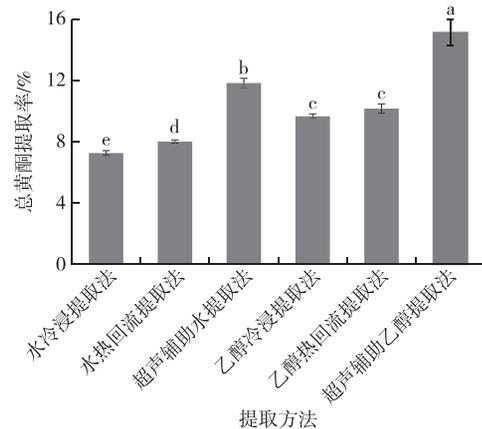
## 1.3 数据统计

采用 SPSS 27 与 Design-Expert. V8.0.6.1 进行数据处理, 并采用 Origin 2022 软件进行绘图; 试验结果以“平均值±标准差”表示; 差异显著水平为  $P < 0.05$ , 差异极显著水平为  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取方法对核桃青皮总黄酮提取率的影响

不同的提取方法对核桃青皮总黄酮的提取效果不同, 表现为: 超声辅助提取法>热回流提取法>冷浸提取法, 醇提法>水提法(图 1)。其中, 提取效果最佳的方法是超声辅助乙醇提取法, 且与其他 5 种方法差异极显著( $P < 0.01$ )。可能是由于超声波通过机械效应、剪切效应以及空化效应使细胞破裂, 孔隙率增加, 溶剂和材料之间接触表面积增加, 提取率升高<sup>[20]</sup>; 此外, 黄酮类化合物因其性质更易溶于有机溶剂中。因此, 在后续实验中选择超声辅助乙醇提取法。



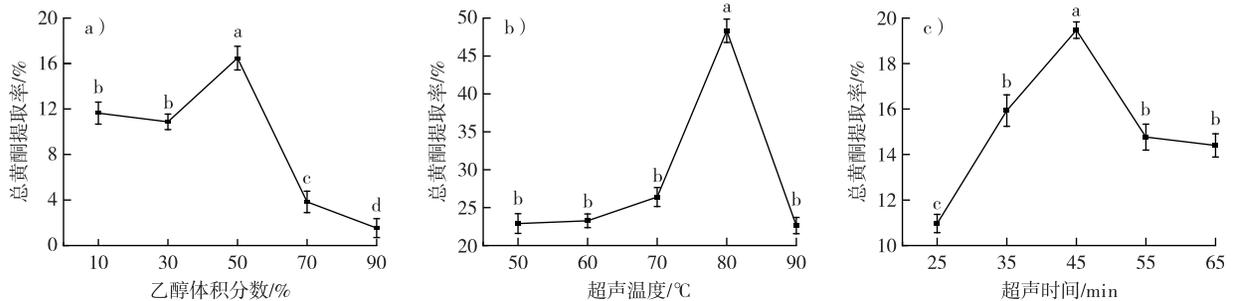
注: 图中不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 1 不同提取方法对总黄酮提取率的影响  
Fig. 1 Effects of different extraction methods on the extraction rate of flavonoids

## 2.2 乙醇体积分数、超声温度和超声时间对总黄酮提取率的影响

当乙醇体积分数为30%时,总黄酮提取率相比10%时有所下降,但无显著差异(图2a);当乙醇体积分数为50%时,总黄酮提取率达到最高,且与其他乙醇体积分数下的提取率差异显著( $P < 0.05$ )。随超声温度的增加,总黄酮提取率呈现先升高后降低的趋势(图2b),在80℃时提取率最高,差异显著( $P < 0.05$ ),这可能是由于超声温度过

高,导致溶液中部分黄酮发生分解、氧化等反应,且伴随着C—O键和C—C键的断裂产生CO、CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O等而挥发,总黄酮提取率降低<sup>[21]</sup>。在超声时间为45 min时,总黄酮提取率最高(图2c),且差异显著( $P < 0.05$ );当超过45 min时,总黄酮提取率下降可能是因为超声时间过长导致总黄酮结构被破坏,从而影响了核桃青皮总黄酮的提取率<sup>[22]</sup>。因此,提取效果最佳的条件为:乙醇体积分数50%,超声温度80℃,超声时间45 min。



注:图中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图2 乙醇体积分数、超声温度和超声时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol volume fraction, ultrasonic temperature and ultrasonic time on the extraction rate of flavonoids

## 2.3 响应面法优化核桃青皮总黄酮提取工艺的试验结果

### 2.3.1 响应面试验结果及其显著性分析

响应面优化实验方案及结果见表2。该结果拟合的二次回归方程为: $Y = 51.93 - 1.15A + 0.96B + 5.16C + 1.50AB + 7.32AC - 3.10BC - 6.82A^2 - 9.97B^2 - 13.13C^2$ 。由方差分析(表3)可知,模型 $P$ 值低于

0.000 1,说明模型具有显著性差异;失拟项为0.097 7,大于0.05,不显著,表明试验误差小。其中,差异极显著( $P < 0.01$ )的为一次项 $C$ 、二次项 $AC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ ,差异显著( $P < 0.05$ )的为二次项 $BC$ 。结果表明,超声时间这一因素对总黄酮提取率具有显著的影响。

### 2.3.2 模型准确性分析

模型的准确性分析见图3a,模型实际值与预测值偏差较小,证明本次模型拟合准确性高;核桃青皮总黄酮响应值的残差正态分布概率图见图3b,各响应值合理分布在直线双侧,表明方差高度吻合;17组模型响应值与学生化内残差的结果见图3c,数值均为 $[-3, 3]$ ,说明模型预测值与实际观测值接近,拟合效果较好;模型中每个响应值的参数估计值差异量值见图3d,每个响应值对估计系数的影响程度较小;杠杆值均处于样本空间中心,且小于1,证实模型中无有效偏差存在(图3e);第7组与第10组库克距离大于1,为离群点,在拟合二次多项式模型环节,应被剔除(图3f),但结合图3a~e综合分析得出,第7组与第10组实验值为强影响点而非异常点,因此予以保留,其余15组实验值的库克距离均在确定范围内。本次回归分析结果表明:核桃青皮总黄酮提取工艺模型具有较高的准确度。

表2 Box-Behnken 试验方案和测试结果

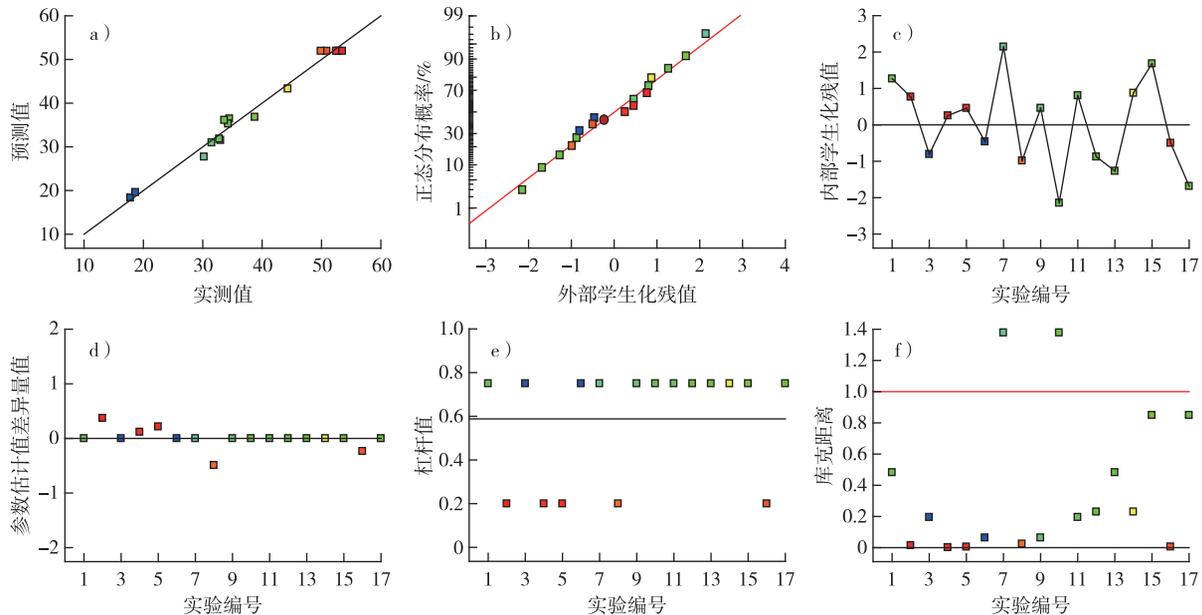
Table 2 Box-Behnken experimental scheme and test results

试验号	乙醇体积分数/%	超声温度/°C	超声时间/min	总黄酮提取率/%
1	30	70	45	38.77
2	70	70	45	32.99
3	30	90	45	34.28
4	70	90	45	34.50
5	30	80	35	34.28
6	70	80	35	17.81
7	30	80	55	31.50
8	70	80	55	44.33
9	50	70	35	18.67
10	50	90	35	30.22
11	50	70	55	33.64
12	50	90	55	32.78
13	50	80	45	52.88
14	50	80	45	52.46
15	50	80	45	53.53
16	50	80	45	50.90
17	50	80	45	49.89

表3 响应面方差分析结果  
Table 3 Response surface variance analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1 977.25	9	219.69	40.82	< 0.000 1**
A(乙醇体积分数)	10.57	1	10.57	1.96	0.203 8
B(超声温度)	7.41	1	7.41	1.38	0.279 0
C(超声时间)	212.95	1	212.95	39.57	0.000 4**
AB	8.96	1	8.96	1.67	0.237 8
AC	214.60	1	214.60	39.88	0.000 4**
BC	38.46	1	38.46	7.15	0.031 8*
A <sup>2</sup>	195.87	1	195.87	36.40	0.000 5**
B <sup>2</sup>	418.94	1	418.94	77.85	< 0.000 1**
C <sup>2</sup>	725.81	1	725.81	134.87	< 0.000 1**
残差	37.67	7	5.38		
失拟项	28.69	3	9.56	4.26	0.097 7
纯误差	8.98	4	2.25		
总和	2 014.92	16			

注: \* 表示差异显著( $0.01 \leq P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。



a) 模型实测值与预测值; b) 残差正态分布概率图; c) 模型中响应值的内部学生化残值;  
d) 模型中响应值的参数估计值差异量值; e) 模型中响应值的杠杆值; f) 模型中响应值的库克距离。

图3 Box-Behnken 模型准确度测试

Fig. 3 Box-Behnken model accuracy test

### 2.3.3 响应面曲面图分析

各因素的交互效应对核桃青皮总黄酮提取率影响较大。以曲面弯曲弧度越大,形状与椭圆形越相似,表明交互效应越显著为依据可知,乙醇体积分数与超声时间、超声温度与超声时间的交互效应较为明显,与方差分析结果相吻合(图4)。模型预测得到提取核桃青皮总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇体积分数 50.52%,超声温度 80.19 °C,超声时间 47.01 min,在此条件下,核桃青皮总黄酮提取率为 52.45%。为符合实际工艺操作,对最佳提取工艺进行验证,以乙醇体积分数 51%,超声温度 80 °C,

超声时间 47 min 进行验证,得出核桃青皮总黄酮提取率为 52.53%,与软件预测结果基本吻合,适用于提取核桃青皮总黄酮。

### 2.4 大孔树脂类型对吸附效果的影响

大孔树脂类型对吸附效果的影响结果见表4,5种大孔树脂对核桃青皮总黄酮的吸附量与吸附率无显著差异( $P < 0.05$ ),分别达到 0.34 mg/g 和 97.2% 以上;而解吸效果最佳的是 AB-8 大孔树脂,且 AB-8 对总黄酮的解吸率相比其他4种树脂差异显著( $P < 0.05$ )。因此,选择 AB-8 作为纯化核桃青皮总黄酮的大孔树脂。

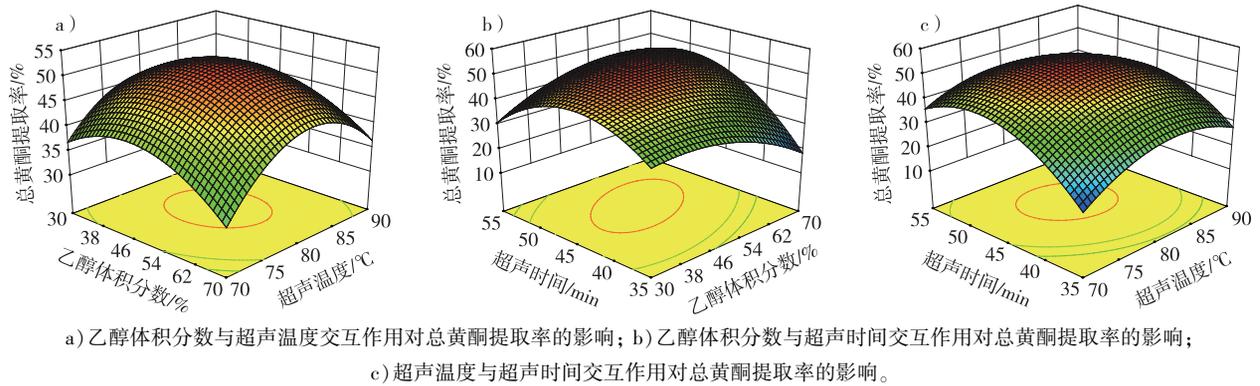


图 4 各因素交互作用对总黄酮提取率影响的响应面分析

Fig. 4 Response surface analysis of the interaction of various factors on the extraction rate of flavones

表 4 5 种大孔树脂静态吸附结果

Table 4 Static adsorption results of five macroporous resins

指标	树脂类型				
	D3520	D101	HPD-600	AB-8	DM130
吸附量/(mg·g <sup>-1</sup> )	0.340±0.03	0.342±0.11	0.347±0.06	0.345±0.04	0.349±0.17
吸附率/%	97.20±1.04	97.80±0.83	99.00±0.2	98.40±0.59	99.60±0.74
解吸率/%	64.6±0.71d	56.2±0.3e	66.50±0.09c	68.10±0.57a	67.20±0.18b

注:表中不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.5 各因素对吸附效果的影响

上样液质量浓度对总黄酮的吸附效果见图 5A。随着上样液浓度的增加,AB-8 大孔树脂的吸附量逐渐增加,这是因为在一定范围内,上样液的质量浓度越高,样液中所含的核桃青皮总黄酮的质

量浓度越高,导致大孔树脂的吸附量变大。但上样液质量浓度为 1 和 2 mg/mL 时,泄漏点出现较晚;上样液质量浓度为 6 mg/mL 时,泄漏点出现较早且吸附量增长缓慢。为节约实验材料,在随后的实验中,选择上样液质量浓度为 4 mg/mL。

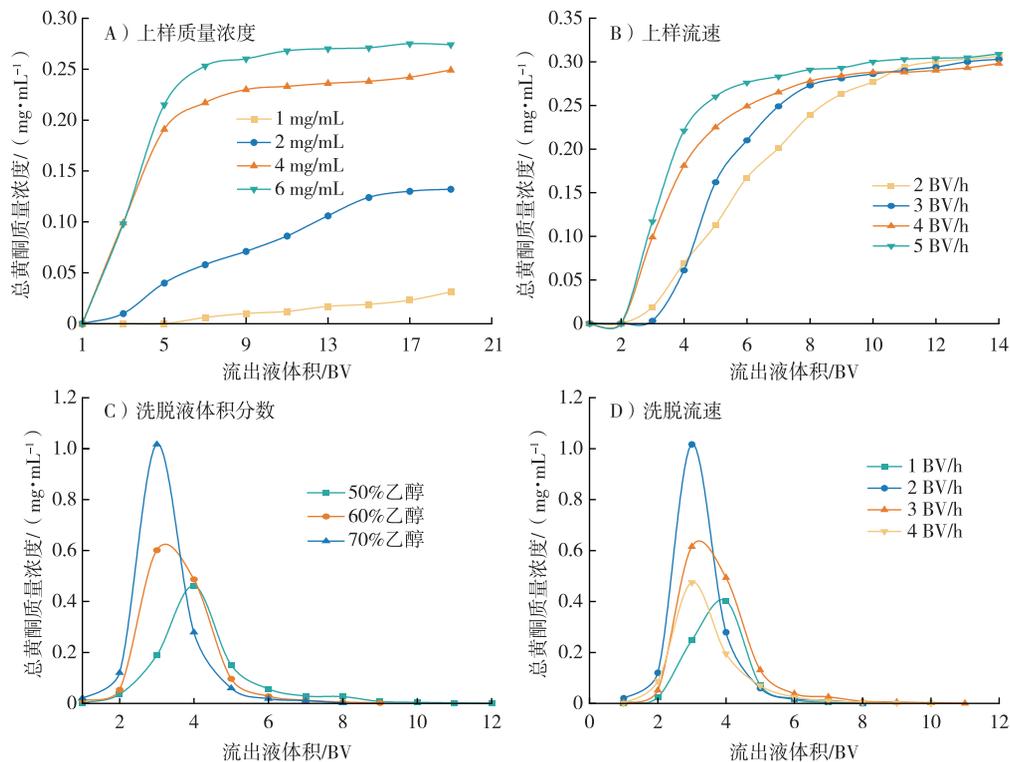


图 5 上样质量浓度、上样流速、洗脱液体积分数、洗脱流速与总黄酮质量浓度的关系

Fig. 5 Relationship between loading mass concentration, loading velocity, the volume fraction of ethanol in eluent, elution velocity and flavonoids mass concentration

上样流速对总黄酮的吸附效果见图 5B。随着上样流速增加,达到泄漏点时的流出液体积逐渐减小,达到吸附平衡的速度逐渐增加。这可能是因为流速越大,总黄酮溶液与树脂接触时间越短,导致总黄酮未被完全吸附就已流出层析柱。反之,上样流速越慢,总黄酮吸附量越大,但在吸附同时易滞留其他杂质,不利于洗脱,且速度过慢降低吸附效率。因此选择 3 BV/h 作为最佳上样流速。

乙醇体积分数对总黄酮的吸附效果见图 5C。随着乙醇体积分数的增加,洗脱剂对核桃青皮总黄酮的解吸能力增强,即乙醇体积分数越高,洗脱峰的峰值越高,并且乙醇体积分数为 70% 时的峰值比其他 2 个峰值要大得多。这可能是由于乙醇溶液的体积分数越大,洗脱液的极性越弱,根据相似相容原理,极性较弱的洗脱液容易洗脱吸附在 AB-8 大孔树脂上极性较小的核桃青皮总黄酮。根据上述结果,洗脱剂选择体积分数为 70% 的乙醇溶液最为合适。

洗脱流速对总黄酮的吸附效果见图 5D。在一定范围内,洗脱液的解吸能力随着洗脱流速的增加而逐渐降低,即洗脱峰的峰值随着洗脱流速的增加而逐渐减小。这可能是因为洗脱流速过快,当洗脱液流出层析柱时,吸附在树脂上的核桃青皮总黄酮未来得及充分溶解到洗脱液中。当洗脱流速为 1 BV/h 时,流速太慢,洗脱峰出峰缓慢且峰形较宽。当洗脱流速为 2 BV/h 时,洗脱峰出现最大值,且洗脱峰出现得很快,没有明显的拖尾,洗脱效果最好,因此选择 2 BV/h 作为最佳洗脱流速。

### 3 结论

本实验通过研究乙醇/水冷浸提取法、乙醇/水热回流提取法、超声辅助乙醇/水提取法对核桃青皮总黄酮提取率的影响,表明超声辅助乙醇提取法对总黄酮提取效果最佳。采用大孔树脂通过静态吸附与动态吸附实验,表明纯化核桃青皮总黄酮的最佳大孔树脂为 AB-8。具体结论如下:

1) 在单因素实验基础上,采用响应面法优化确定核桃青皮总黄酮的最佳提取条件为:乙醇体积分数 50.52%,超声温度 80.19 °C,超声时间 47.01 min,核桃青皮总黄酮提取率达 52.45%。

2) 为符合实际工艺操作,以乙醇体积分数 51%,超声温度 80 °C,超声时间 47 min 对最佳提取工艺进行验证,得出核桃青皮总黄酮提取率为 52.53%,与软件设计结果基本吻合。

3) 采用 AB-8 大孔树脂,在上样质量浓度 4

mg/mL、上样质量流速 3 BV/h、乙醇体积分数 70%、洗脱流速 2 BV/h 条件下,总黄酮纯化效果最佳,样品回收率为 84.45%,总黄酮纯度达 81.10%。

上述方法操作简单,原料价格低廉,适合实际生产,对核桃青皮的开发与利用具有重要意义,为核桃青皮在工业、农业、食品和医药等领域的应用提供了一定科学参考。

#### 参考文献(References):

- [1] YUE L, ZHENG M H, WANG M, et al. A general strategy to synthesis chitosan oligosaccharide-O-terpenol derivatives with antibacterial properties[J]. Carbohydrate Research, 2021, 503: 108315. DOI: 10.1016/j.carres.2021.108315.
- [2] 孟佳, 方晓璞, 史宣明, 等. 我国核桃产业发展现状、问题与建议[J]. 中国油脂, 2023, 48(1): 84-86. DOI:10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220637.
- [3] 赵国超, 周欣, 李容, 等. 青胡桃总黄酮含量测定及抗氧化活性分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(2): 357-363. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2019.02.20.
- [4] 周媛媛, 孙朝, 王思琪, 等. 核桃青皮化学成分的研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2934-2938. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.022.
- [5] 周媛媛, 孙朝, 王思琪, 等. 核桃青皮化学成分的研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2934-2938. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.022.
- [6] 周媛媛, 孙朝, 王思琪, 等. 核桃青皮化学成分的研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2934-2938. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.022.
- [7] 周媛媛, 孙朝, 王思琪, 等. 核桃青皮化学成分的研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2934-2938. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.022.
- [8] 周媛媛, 孙朝, 王思琪, 等. 核桃青皮化学成分的研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2934-2938. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.022.
- [9] 周媛媛, 孙朝, 王思琪, 等. 核桃青皮化学成分的研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2934-2938. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.022.

307. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2023.03.009.
- YANG B, YI S, LI Q, et al. Structural identification of flavonoids in sundou from bamboo shoot and molecular simulation on their binding to human serum albumin[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2023, 21(3): 301-307.
- [10] WU S C, HAN F, SONG M R, et al. Natural flavones from *Morus alba* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via targeting the proton motive force and membrane permeability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(36): 10222-10234. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01795.
- [11] XU Y, LI Y X, SA K R, et al. Coumarins and flavones with anti-inflammatory activity isolated from the branches and leaves of *Daphne retusa*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2024; 1-11. DOI: 10.1080/10286020.2024.2315212.
- [12] SANTOS R Y R R, NOGUEIRA J P, SILVA T O M, et al. Enzymatic and ultrasonic-assisted pretreatment in the extraction of bioactive compounds from *Monguba* (*Pachira aquatic* Aubl) leaf, bark and seed[J]. Food Research International, 2021, 140: 109869. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109869.
- [13] 贾娟, 陈品, 王婷婷, 等. 金花葵中黄酮的提取及纯化研究进展[J]. 中国果菜, 2024, 44(1): 42-46. DOI: 10.19590/j.cnki.1008-1038.2024.01.009
- JIA J, CHEN P, WANG T T, et al. Advances in the extraction and purification of flavonoids from *Hibiscus manihot*[J]. China Fruit & Vegetable, 2024, 44(1): 42-46.
- [14] 王梦杰, 李镐, 华会明, 等. 柿叶中黄酮类化合物及提取工艺研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(13): 4214-4222. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.034.
- WANG M J, LI G, HUA H M, et al. Research progress of flavonoids and extraction processes in persimmon leaves[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(13): 4214-4222.
- [15] KRONGRAWA W, LIMMATVAPIRAT S, SAIBUA S, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of yields and total methoxyflavone contents from *kaempferia parviflora* rhizomes[J]. Molecules, 2022, 27(13): 4162. DOI: 10.3390/molecules 27134162.
- [16] 孙嘉莉, 赵文燕, 朱东亮, 等. 沙棘果皮渣总黄酮体内降血脂活性研究[J/OL]. 食品工业科技: 1-22 [2024-04-15]. <http://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120294>.
- SUN J L, ZHAO W Y, ZHU D L, et al. Purification process of total flavonoids from sea buckthorn peel residue and its anti-pancreatic lipase[J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1-22 [2024-04-15]. <http://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120294>.
- [17] 穆莎茉莉, 袁晓霞, 李国瑞, 等. 蓖麻叶总黄酮纯化工艺优化及抗氧化研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2023, 38(6): 519-523. DOI: 10.14045/j.cnki.15-1220.2023.06.007.
- MU S M L, YUAN X X, LI G R, et al. Study on purification and antioxidant activity of total flavonoids from *Castor* leaves[J]. Journal of Inner Mongolia Minzu University (Natural Sciences), 2023, 38(6): 519-523.
- [18] 吴文滔, 赵霞, 李高宇, 等. 响应面法优化蓝鸟睡莲总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析[J/OL]. 分子植物育种: 1-21 [2024-02-22]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240221.1525.012>.
- WU W T, ZHAO X, LI G Y, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity analysis of total flavonoids from *Nymphaea 'BlueBird'* by RSM[J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-21 [2024-02-22]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240221.1525.012>.
- [19] 杜国军, 洪婉婷, 李占锋, 等. 大孔树脂吸附法纯化酸枣仁总黄酮的工艺研究[J]. 中国调味品, 2024, 49(1): 100-106. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9973.2024.01.017.
- DU G J, HONG W T, LI Z F, et al. Study on purification process of total flavonoids from *ziziphi spinosae Semen* by macroporous resin adsorption method[J]. China Condiment, 2024, 49(1): 100-106.
- [20] OROIAN M, URSACHI F, DRANCA F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from crude pollen[J]. Antioxidants, 2020, 9(4): 322. DOI: 10.3390/antiox9040322.
- [21] 林泽华. 侧柏叶黄酮和多糖分离纯化、结构表征及活性评价[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- LIN Z H. Purification and structural characterization of flavonoids and polysaccharides from *Platycladus orientalis* (L.) franco leaves and their biological activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [22] 刘威良, 高秀, 徐晴芳, 等. 超声辅助提取火棘干果总黄酮及体外抗氧化研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2024, 59(2): 304-312. DOI: 10.13432/j.cnki.jgsau.2024.02.034.
- LIU W L, GAO X, XU Q F, et al. Flavonoids extracted by ultrasonic assisted method from dried *Pyracantha Fortuneana* fruit and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2024, 59(2): 304-312.

(责任编辑 李琦)