

基于Box-Behnken设计-响应面法和反向传播神经网络优化核桃青皮萘醌的提取工艺



高洁¹, 马婧怡²

1. 新疆医科大学第五附属医院药学部 (乌鲁木齐 830000)

2. 珠海市人民医院 (暨南大学珠海临床医学院) 药物临床试验机构办公室 (广东珠海 519000)

【摘要】目的 在以乙醇体积分数、料液比、提取温度为影响因素的单因素试验基础上, 优化核桃青皮萘醌的提取工艺, 并考察核桃青皮萘醌提取物体外抗氧化活性。**方法** 采用醇提取法, 应用 Box-Behnken 设计-响应面法和反向传播神经网络模拟优化提取工艺。测定核桃青皮萘醌提取物对羟自由基 ($\text{HO}\cdot$)、超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^-\cdot$) 和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH \cdot) 的清除能力。**结果** 最佳提取条件为乙醇体积分数为 40%、料液比为 1:30 (g/mL)、提取温度 70 °C、提取时间 2 h, 得到萘醌提取量 (20.182 ± 1.851) mg/g。质量浓度 0.1 g/L 的核桃青皮萘醌提取物溶液对 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{O}_2^-\cdot$ 和 DPPH \cdot 的清除率分别为 16.09%、67.28% 和 73.00%。**结论** 优化后的核桃青皮萘醌提取工艺稳定、可行。核桃青皮萘醌提取物表现出较好的抗氧化活性。

【关键词】 核桃青皮; 萘醌; 提取工艺优化; Box-Behnken 设计-响应面法; 神经网络; 体外抗氧化

Extraction process optimization of naphthoquinone from Walnut green husk based on Box-Behnken design-response surface methodology and back propagation neural network

GAO Jie¹, MA Jingyi²

1. Department of Pharmacy, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

2. Office of Drug Clinical Trial Institutions, Zhuhai People's Hospital (ZhuHai Clinical Medical College of Jinan University), Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Corresponding author: MA Jingyi, Email: mjydg@163.com

【Abstract】Objective To optimize the extraction process of naphthoquinone from Walnut green husk with ethanol volume fraction, solid-liquid ratio and extraction temperature as the influencing factors on the basis of a single factor test, and study the in vitro antioxidant activity of the extract. **Methods** The alcohol extraction method was used to extract naphthoquinone from Walnut green husk, and extraction process was optimized by Box-Behnken design-response surface methodology and back propagation neural network simulation. The scavenging capacity of naphthoquinone from Walnut green husk on hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$), superoxide anion radical

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202403014

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2021D01C442)

通信作者: 马婧怡, 硕士, 主管药师, Email: mjydg@163.com

($O^{2\cdot-}$) and 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radical (DPPH \cdot) were determined. **Results** The optimal extraction condition was as follows: ethanol volume fraction of 40%, solid-liquid ratio of 1:30 (g/mL), extraction temperature of 70 °C, extraction time of 2 h, and the extraction amount of naphthoquinone obtained was (20.182±1.851) mg/g. The scavenging rates of 0.1 g/L naphthoquinone extract on HO \cdot , $O^{2\cdot-}$ and DPPH \cdot were 16.09%, 67.28% and 73.00%, respectively. **Conclusion** The extraction process of naphthoquinone from Walnut green husk is stable and feasible. The naphthoquinone extract from Walnut green husk exhibits good antioxidant activity.

【Keywords】 Walnut green husk; Naphthoquinone; Extraction process optimization; Box-Behnken design-response surface methodology; Neural network; *In vitro* antioxidant

核桃属植物已经具有两千多年的栽培历史，也是现在世界上最广泛的果树栽培作物之一，核桃树体及其枝叶、雄花序、青皮、核仁、核壳等均具有开发利用价值，但目前开发力度不够，资源利用率较低^[1]。

核桃青皮是核桃壳外一层厚厚的绿色果皮，约占整个果实的 60%^[2]，具有抗氧化、强去自由基性能，还表现出抗癌、抗病毒、治疗皮肤病、抑菌、抗凝血、杀虫、镇痛等多种临床效应^[3-5]。在中医验方中，核桃青皮又叫“青龙衣”^[6]。核桃青皮提取物含多种活性化学成分，包括萘醌类、多酚类、萜类、多糖类等，还检测出多种矿物质、维生素等^[7-9]。其中萘醌类化合物是从中分离得到的主要化学成分，具有一定的过氧化氢清除能力^[10]。然而，提取时常混杂有糖类、氨基酸类等物质，导致提取难度大、萘醌类成分纯度低。Box-Behnken 设计-响应面法用于研究多变量系统中变量之间的相互作用，利用 Box-Behnken 设计并通过试验得到一定数据，采用多元二次方程来拟合因素和效应值之间的函数关系，通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数，该方法精密度高、试验次数少、模型预测性能好，因此在多因素优化试验中得到了广泛应用^[11-14]。反向传播 (back-propagation, BP) 神经网络是一种按误差逆传播算法训练的多层前馈网络，广泛应用于提取工艺研究中^[15-17]。遗传算法模拟物竞天择的生物进化过程，对已构建的神经网络进行全局搜索与优化，进而获得最优解^[18]。

核桃既是珍贵的用材树种，又是重要的药源植物^[19]。新疆盛产核桃，主要分布在和田、阿克苏等地，故核桃青皮产量可观。大部分的核桃青皮被弃之不用，既污染了环境，又浪费了资源。本研究以单因素试验为基础，采用 Plackett-

Burman 试验筛选关键因素，结合 Box-Behnken 设计-响应面法和 BP 神经网络模拟，优化核桃青皮萘醌的提取工艺，并应用自由基清除试验考察核桃青皮萘醌体外抗氧化能力^[20-21]，为核桃青皮药用价值的开发提供参考，使其附加值进一步提高。

1 材料

1.1 主要仪器

L5S 型紫外可见分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司); KDM 型调温电热套 (山东省聊城永兴仪器厂); FW-80 型高速万能粉碎机 (北京市永光明医疗器械厂); DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗器械厂); BS224S 型电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司); WP-UPT-10 型超纯水机 (四川沃特浦水处理有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

核桃青皮于 2020 年 9 月收自新疆维吾尔自治区和田地区墨玉县扎瓦乡依格孜艾日克村; 1,8-二羟基萘醌对照品 (深圳市普健生物科技有限公司, 批号: M21GB49395, 纯度 98%); 超氧阴离子自由基 ($O^{2\cdot-}$, 批号: JR240079)、羟自由基 (HO \cdot , 批号: BC1325)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH \cdot , 批号: S04IS224966) 检测试剂盒均购自 Solarbio 公司; L-抗坏血酸 (成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20220406, 纯度 98%); 其余试剂均为分析纯; 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 1,8-二羟基萘醌标准曲线考察

将 1,8-二羟基萘醌对照品在 105 °C 条件下进行干燥处理, 精密称量 5.37 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇溶解至刻度, 摇匀, 制成对照品储备

液。准确移取对照品储备液 2、3、4、5、6 mL 至 25 mL 量瓶中，加入 1 mL 5% 氢氧化钾溶液，用 60% 乙醇定容至 25 mL，摇匀，制成 5 个不同质量浓度的系列标准溶液；移取 1 mL 5% 氢氧化钾溶液，用 60% 乙醇定容至 25 mL，摇匀，作为空白对照溶液。采用紫外分光光度法，200~600 nm 全波长扫描，显示在 515 nm 处 1,8-二羟基萘醌有最大吸收峰。在 515 nm 波长处，测定上述标准溶液的吸光度值^[22-23]。以溶液质量浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/mL}$)、吸光度为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得到 1,8-二羟基萘醌的线性回归方程为 $Y=0.0305X-0.0251$, $r=0.9995$ 。1,8-二羟基萘醌在 8.592~25.776 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2 核桃青皮萘醌的提取

核桃青皮自然干燥，粉碎成粉末，过 80 目筛。称取核桃青皮粉约 10 g，按一定料液比加入一定体积分数的乙醇溶液，在一定温度下提取一定时间^[5]。按“2.1”项下方法测定核桃青皮提取液的吸光度，将吸光度值代入标准曲线计算出提取液中核桃青皮萘醌浓度，并计算核桃青皮萘醌提取量 (R)，公式如下：

$$R = \frac{c \times V \times D}{m \times 1000}$$

式中 R 为核桃青皮萘醌提取量 [$\text{mg}(\text{萘醌})/\text{g}(\text{核桃青皮粉})$]， c 为提取液中核桃青皮萘醌浓度 ($\mu\text{g/mL}$)， V 为提取液体积 (mL)， D 为稀释倍数， m 为核桃青皮粉质量 (g)。

2.3 单因素试验

考察乙醇体积分数、料液比、提取温度和提取时间对核桃青皮萘醌提取量的影响。各可变因素参数分别为：乙醇体积分数 20%、40%、60%、80%、100%，料液比 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40 (g/mL)，提取温度 40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ ，提取时间 1、2、3、4、5 h^[20, 24]。固定因素设定为乙醇体积分数 60%、料液比 1:20 (g/mL)、提取温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 3 h。

2.3.1 乙醇体积分数对萘醌提取量的影响

由图 1 可见，料液比为 1:20 (g/mL)、提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 3 h 时，随着乙醇体积分数的增大，萘醌提取量呈先增加后降低的趋势。当乙醇体积分数为 40% 时，萘醌提取量最高，为 16.020 mg/g 。原因可能是随着提取溶剂中乙醇浓度增加，溶剂极性与核桃青皮中萘醌的极性逐渐

接近，使得萘醌溶出增加；当乙醇浓度较高时，核桃青皮中萘醌的溶解减少，以及其他成分溶解增加，使得萘醌提取量降低。故选择 20%~60% 乙醇进行下一步工艺优化试验。

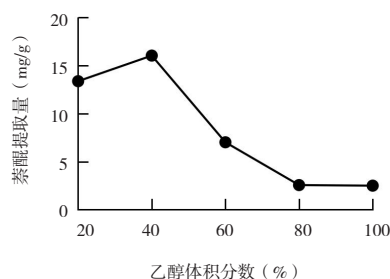


图1 乙醇体积分数对萘醌提取量的影响 ($n=3$)

Figure 1. The influence of ethanol volume fraction on the extraction amount of naphthoquinone ($n=3$)

2.3.2 料液比对萘醌提取量的影响

由图 2 可见，乙醇体积分数为 60%、提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 3 h 时，随着提取溶剂用量增加，萘醌提取量呈先增加后降低的趋势。当料液比为 1:30 (g/mL) 时，萘醌提取量最高，为 13.110 mg/g 。原因可能是随着提取溶剂用量增加，溶剂与核桃青皮的接触面积增加，使得核桃青皮中萘醌的溶出增加；当继续增加提取溶剂用量时，核桃青皮中其他成分溶解增加，影响了萘醌提取量。故选择料液比为 1:20~1:40 (g/mL) 进行下一步工艺优化试验。

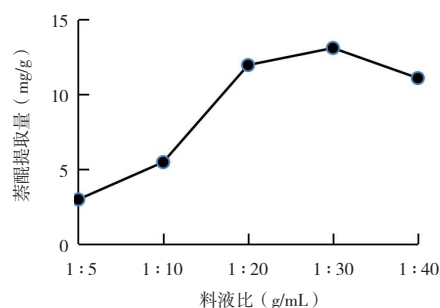


图2 料液比对萘醌提取量的影响 ($n=3$)

Figure 2. The influence of solid-liquid ratio on the extraction amount of naphthoquinone ($n=3$)

2.3.3 提取温度对萘醌提取量的影响

由图 3 可见，乙醇体积分数为 60%、料液比为 1:20 (g/mL)、提取时间为 3 h 时，随着提取温度升高，萘醌提取量越高。原因可能是温度升高会使萘醌分子扩散速率加快、溶出增加，使得萘醌提取量增加。故选择 60~80 $^{\circ}\text{C}$ 进行下一步工艺优化试验。

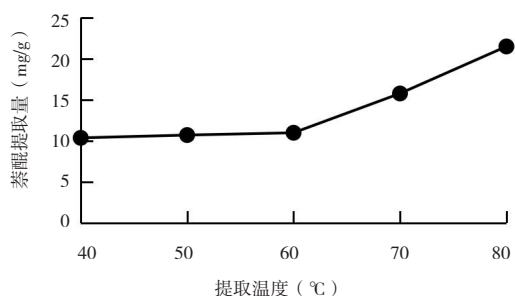


图3 提取温度比对萘醌提取量的影响 (n=3)
Figure 3. The influence of temperature on the extraction amount of naphthoquinone (n=3)

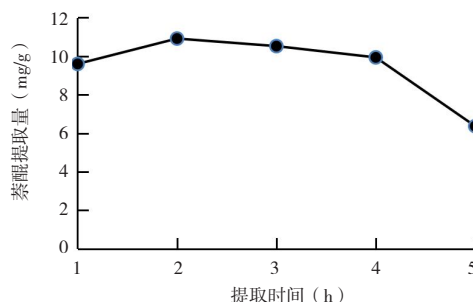


图4 提取时间比对萘醌提取量的影响 (n=3)
Figure 4. The influence of extraction time on the extraction amount of naphthoquinone (n=3)

2.3.4 提取时间对萘醌提取量的影响

由图4可见,乙醇体积分数为60%、料液比为1:20(g/mL)、提取温度为60℃时,随着提取时间延长,萘醌提取量呈先增加后降低的趋势。当提取时间2h时,萘醌提取量最高,为10.920mg/g。原因可能是随着提取时间增加,溶解越充分,使得萘醌提取量增加;当继续延长提取时间时,核桃青皮中其他成分溶解增加,影响了萘醌提取量。故选择提取时间1~3h进行下一步工艺优化试验。

2.4 Plackett-Burman试验筛选关键因素

在单因素试验考察基础上,采用Plackett-Burman试验设计,对乙醇体积分数(X₁)、料液比(X₂)、提取温度(X₃)、提取时间(X₄)进行关键因素的筛选,以核桃青皮萘醌提取量为响应值(Y),以克服单因素太多造成的试验组数较多的问题。每个因素有高低两个水平,Plackett-Burman试验设计因素及水平见表1。

Plackett-Burman试验设计方案及结果见表2。采用Design-Expert13软件对表2试验数据进行统计及结果分析,得出桃青皮萘醌提取量(Y)与乙醇体积分数(X₁)、料液比(X₂)、提取温度(X₃)、提取时间(X₄)之间的关系:
 $Y = -17.178 - 0.104X_1 + 0.06X_2 + 0.528X_3 + 0.438X_4$ 。

由表3可知,模型P<0.05,具有统计学意义。各因素对桃青皮萘醌提取量的影响程度大小为:X₃>X₁>X₂>X₄,其中X₃为极显著因素(P<0.01),X₄影响不显著(P>0.05)。故选取提取时间2h,乙醇体积分数、料液比、提取温度为Box-Behnken响应面试验中的考察因素。

表1 Plackett-Burman试验因素水平

编码水平	X ₁ (%)	X ₂ (g/mL)	X ₃ (°C)	X ₄ (h)
-1	20	1:20	60	1
1	60	1:40	80	3

表2 Plackett-Burman试验设计方案及结果

Table 2. Plackett-Burman experiment design and results

试验号	X ₁ (%)	X ₂ (g/mL)	X ₃ (°C)	X ₄ (h)	核桃青皮萘醌提取量 (mg/g)
1	20	1:20	60	3	13.360
2	40	1:20	60	3	16.020
3	60	1:20	60	3	7.010
4	60	1:20	60	3	11.970
5	60	1:30	60	3	13.110
6	60	1:40	60	3	11.100
7	60	1:20	60	3	10.980
8	60	1:20	70	3	15.760
9	60	1:20	80	3	21.480
10	60	1:20	60	1	9.600
11	60	1:20	60	2	10.920
12	60	1:20	60	3	10.520

表3 Plackett–Burman试验方差分析
Table 3. Analysis of variance of Plackett–Burman experiment

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	121.49	4	30.37	6.54	0.016
X ₁	15.82	1	15.82	3.41	0.108
X ₂	1.31	1	1.31	0.28	0.612
X ₃	101.45	1	101.45	21.84	0.002
X ₄	0.70	1	0.70	0.15	0.710
AC	15.42	1	15.42	3.83	0.091
BC	7.76	1	7.76	1.92	0.208
A ²	90.78	1	90.78	22.51	0.002
B ²	0.29	1	0.29	0.07	0.797
C ²	0.58	1	0.58	0.14	0.716
残差	32.52	7	4.65		
失拟项	18.53	4	4.63	1.00	0.524
纯误差	13.99	3	4.66		
总和	154.01	11			

2.5 Box–Behnken响应面优化提取工艺

在 Plackett–Burman 试验基础上, 采用 Box–Behnken 试验组合原理, 设计响应面试验, 优化提取工艺。以乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 为自变量, 核桃青皮萜醌提取量 (Y) 为响应值, 设计 3 因素 3 水平的优化试验。响应面因素与水平见表 4。

响应面试验设计方案及结果见表 5。采用 Design–Expert 13 软件对核桃青皮萜醌提取工艺各因素进行回归拟合, 得回归方程 $Y=49.624+0.318A-0.659B-1.035C-0.0032AB+0.0098AC+0.014BC-0.012A^2-0.0026B^2+0.004C^2$ 。方差分析结果显示模型 $P < 0.05$, 失拟项 $P > 0.05$, 有统计学意义。模型 $R^2=0.8694$, $r=0.9324$, 模型拟合度较好, 试验误差小, 可用此模型对核桃青皮萜醌的提取工艺进行预测分析。

由表 6 可见, 因素 C、A² 对核桃萜醌提取量有显著影响 ($P < 0.05$), 因素 A、B 影响不显著, F 值显示, 各因素影响顺序为 $C > A > B$ 。在各因素交互作用中, 交互项 AB、AC、BC 影响不显著, AC 的 P 最小, 两者交互作用最显著。响应

曲面越陡, 等高线为椭圆形, 说明两个因素交互作用显著。由图 5 可见, 提取温度与乙醇体积分数对提取量影响显著, 该结果与方差分析一致。

通过 Design–Expert 13 软件分析得到核桃青皮萜醌最优提取工艺条件为乙醇体积分数 46.42%、料液比 1:23.91 (g/mL)、提取温度 71.3 °C, 在此条件下, 核桃青皮萜醌提取量为 19.772 mg/g。

2.6 BP神经网络优化

在 Box–Behnken 响应面因素水平基础上, 应用表 5 数据作为神经网络的训练及验证样本, 设计 3 层 BP 神经网络, 分别为输入层、隐藏层和输出层; 输入节点数为 3, 即乙醇体积分数、料液比、提取温度; 输出的节点数为 1, 即核桃青皮萜醌提取量。将响应面因素水平与 BP 神经网络的分析结果进行对比, 以探寻较佳提取条件。

表4 响应面因素水平

Table 4. Factors and levels of response surface method

编码水平	A (%)	B (g/mL)	C (°C)
-1	20	1:20	60
0	40	1:30	70
1	60	1:40	80

表5 响应面因素水平

Table 5. Response surface design test scheme and results

试验号	A (%)	B (g/mL)	C (°C)	核桃青皮萜醌提取量 (mg/g)
1	20	1:30	80	18.521
2	40	1:30	70	20.171
3	40	1:40	60	16.317
4	40	1:40	80	25.178

续表5

试验号	A (%)	B (g/mL)	C (°C)	核桃青皮茶鞣提取量 (mg/g)
5	60	1:20	70	16.679
6	40	1:30	70	18.274
7	40	1:30	70	20.265
8	60	1:30	60	9.369
9	20	1:40	70	15.155
10	20	1:20	70	13.537
11	40	1:20	80	21.479
12	20	1:30	60	16.778
13	40	1:20	60	18.189
14	40	1:30	70	19.054
15	40	1:30	70	23.146
16	60	1:30	80	18.967
17	60	1:40	70	15.737

表6 响应面试验方差分析

Table 6. Analysis of variance of response surface design test

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	187.80	9	20.87	5.18	0.021
A	1.31	1	1.31	0.33	0.586
B	0.78	1	0.78	0.19	0.673
C	68.99	1	68.99	17.11	0.004
AB	1.64	1	1.64	0.41	0.544
AC	15.42	1	15.42	3.83	0.091
BC	7.76	1	7.76	1.92	0.208
A ²	90.78	1	90.78	22.51	0.002
B ²	0.29	1	0.29	0.07	0.797
C ²	0.58	1	0.58	0.14	0.716
残差	28.22	7	4.03		
失拟项	14.52	3	4.84	1.41	0.362
纯误差	13.70	4	3.43		
总和	216.03	16			

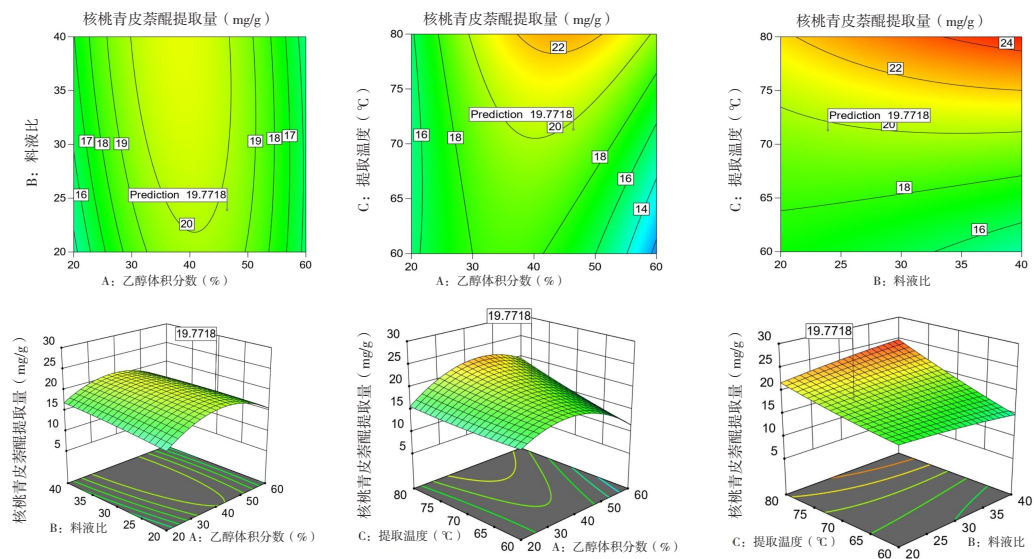


图5 各因素交互作用响应面曲线图和等高线图

Figure 5. Response surface curve and contour map of the interaction of each factor

应用 SPSS 26.0 软件进行神经网络模型训练发现隐含层的个数为 10 时, 预测值与实测值非常相近, 神经网络结构见图 6。实测值与 BP 神经网络预测值回归分析相关系数 $R^2=0.913$, 见图 7。

将响应面预测值和 BP 神经网络预测值分别与实测值进行比较, 结果见表 7, 神经网络预测值与实测值的差值明显小于响应面预测值与实测值的差值。

在 SPSSPRO (Scientific Platform Serving for Statistics Professional) 软件中运用遗传算法预测出核桃青皮萘醌最大提取量为 20.259 mg/g, 相

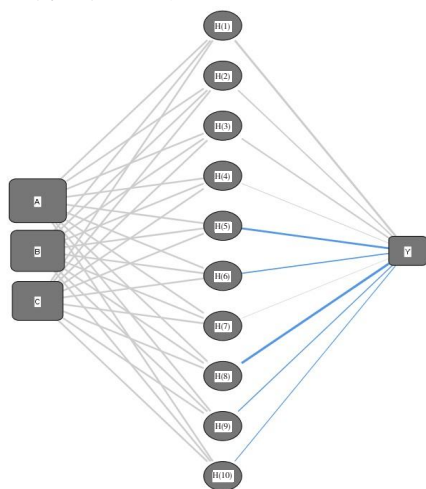


图6 神经网络结构

Figure 6. Neural network structure

应的提取工艺条件为乙醇体积分数 39.20 %、料液比 1 : 28.89 (g/mL)、提取温度 71.3 °C。

2.7 最优工艺验证

综合响应面实验和 BP 神经网络模拟分析结果, 以及考虑工业化控制, 确定核桃青皮萘醌最优提取工艺条件为乙醇体积分数 40%、料液比 1 : 30 (g/mL)、提取温度 70 °C。在上述提取条件下平行试验 3 次, 测得核桃青皮萘醌提取量为 (20.182 ± 1.851) mg/g, 即核桃青皮中萘醌含量为 2.02%。预测值与实测值相近, 表明模型具有良好的预测性, 可用于核桃青皮萘醌提取工艺研究。

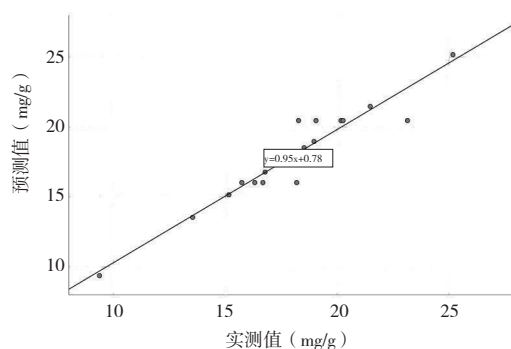


图7 核桃青皮萘醌提取量实测值与BP神经网络预测值回归分析

Figure 7. Regression analysis of the measured extraction value and BP neural network prediction value of naphthoquinone

表7 响应面实验和BP神经网络分析误差比较

Table 7. Comparison of errors between response surface design test and BP neural network simulation

试验号	实测值	响应面预测值	神经网络预测值	响应面绝对误差	神经网络绝对误差
1	18.521	19.234	18.375	0.713	-0.146
2	20.171	21.184	19.942	1.013	-0.228
3	16.317	16.924	16.281	0.607	-0.036
4	25.178	26.464	24.699	1.029	-0.479
5	16.679	15.354	16.625	-1.325	-0.054
6	18.274	21.184	18.140	2.910	-0.134
7	20.265	21.184	20.032	0.919	-0.233
8	9.369	10.414	9.681	1.045	0.311
9	15.155	18.174	15.178	3.019	0.022
10	13.537	16.154	13.640	2.617	0.103
11	21.479	22.924	21.185	1.445	-0.294
12	16.778	16.414	16.719	-0.364	-0.059
13	18.189	18.984	18.060	0.795	-0.129
14	19.054	21.184	18.881	2.131	-0.173
15	23.146	21.184	22.768	-1.962	-0.377
16	18.968	21.074	18.799	2.107	-0.168
17	15.737	14.814	15.730	-0.923	-0.007

2.8 核桃青皮萜醌提取物体外抗氧化试验

在经响应面试验优化得到的核桃青皮萜醌类成分提取条件下,制备核桃青皮萜醌提取液,减压浓缩至干。

分别精密称取核桃青皮粉 12.5 mg、核桃青皮萜醌提取物 2.5 mg、阳性对照 L-抗坏血酸 2.5 mg,置于 25 mL 量瓶中,乙醇定容后得质量浓度为 0.5 g/L 核桃青皮粉溶液、0.1 g/L 核桃青皮萜醌提取物溶液和 0.1 g/L L-抗坏血酸溶液。测定其对 HO·、O²⁻· 和 DPPH· 的清除能力^[25],平行测定 3 次。自由基清除率计算公式如下:

$$\text{各自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

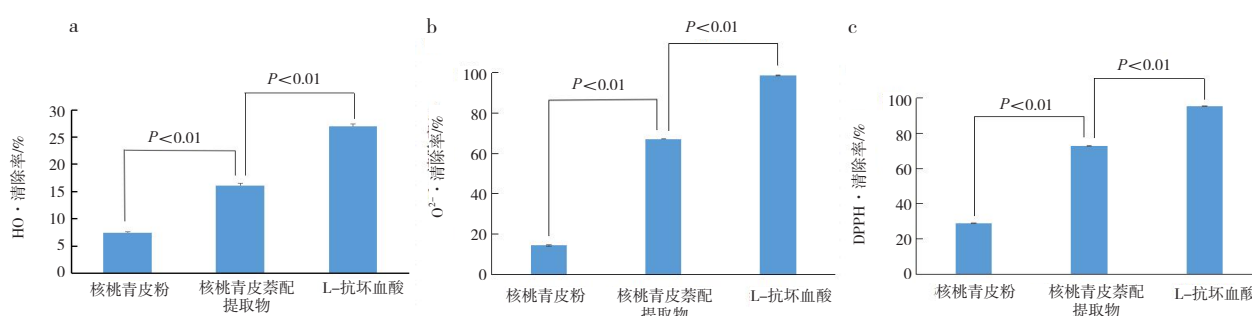


图8 不同样品对各自由基清除率 (n=3)

Figure 8. Radical scavenging rates of different samples (n=3)

3 讨论

本研究以核桃青皮为原材料,将药材粉碎,采用醇提取法,考察乙醇体积分数、料液比、提取温度和提取时间对核桃青皮萜醌提取量的影响。Plackett-Burman 试验结果显示提取时间对桃青皮萜醌提取量无显著影响,故选取了乙醇体积分数、料液比和提取温度这 3 个因素开展进一步响应面考察。Box-Behnken 设计-响应面法建立的数学模型具有预测性好、可对多因素多水平分析的特点。应用 Box-Behnken 设计-响应面法优化提取工艺,并对方差结果进行分析,结果显示各因素影响顺序为提取温度>乙醇体积分数>料液比。BP 神经网络分析结果显示其预测值与实测值的差值明显小于响应面试验预测值与实测值的差值。综合响应面试验和 BP 神经网络模拟分析结果,以及考虑工业化控制,确定核桃青皮萜醌最优提取工艺条件为乙醇体积分数 40%、料液比 1:30 (g/mL)、提取温

度 70 ℃、提取时间 2 h,在此条件下核桃青皮萜醌提取量为 20.182 mg/g,即核桃青皮中萜醌含量为 2.02%。预测值与实测值相近,表明模型具有良好的预测性,可用于核桃青皮萜醌提取工艺研究。

自由基具有强氧化性,当机体自由基过量或失衡,便可损害机体的组织和细胞,进而引起慢性疾病及衰老效应。核桃青皮萜醌体外抗氧化试验结果表明,其具有一定的清除自由基能力。质量浓度为 0.1 g/L 的核桃青皮萜醌提取物溶液对 HO·、O²⁻· 和 DPPH· 的清除率分别为 16.09%、67.28%、73.00%,虽然低于同质量浓度的 L-抗坏血酸溶液,但高于 5 倍质量浓度的核桃青皮粉溶液,表现出较好的抗氧化活性。

核桃青皮的开发利用已开始受到关注,但核桃青皮萜醌提取物的抗氧化性、对于炎症因子影响的研究较少,进一步研究其药用活性成分和作用机理,对于更好地开发和利用核桃青皮药用价值具有重要的意义。

参考文献

- 1 李志美. 核桃的开发利用 [J]. 林业调查规划, 2004, 29(4): 199–201. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3168.2004.z1.071.
- 2 耿树香, 宁德鲁, 陈海云, 等. 不同品种核桃青皮中主要功能性成分含量测定及分析 [J]. 西部林业科学, 2018, 47(5): 57–63. [Geng SX, Ning DL, Chen HY, et al. Determination and analysis of main functional ingredients in Walnut green husk of different varieties[J]. Journal of West China Forestry Science, 2018, 47(5): 57–63.] DOI: 10.16473/j.cnki.xblykx1972.2018.05.010.
- 3 潘富赟, 张培正. 核桃青皮的综合应用及开发前景 [J]. 中国食物与营养, 2010, 12: 21–24. [Pan FY, Zhang PZ. Comprehensive application and development prospect of Walnut green husk[J]. Food and Nutrition in China, 2010, 12: 21–24.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-9577.2010.12.006.
- 4 仲军梅, 刘玉梅. 核桃青皮的开发利用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 396–399. [Zhong JM, Liu YM. Status of development and utilization for green husk of Walnut[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(19): 396–399.] DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.19.078.
- 5 马婧怡, 沈静, 张万鑫, 等. 核桃青皮流浸膏对银屑病小鼠皮肤屏障功能的影响及机制研究 [J]. 环球中医药, 2020, 13(1): 13–17. [Ma JY, Shen J, Zhang WX, et al. Effect of Walnut green skin extract on skin barrier function of psoriasis mice and its mechanism[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2020, 13(1): 13–17.] DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2020.01.003.
- 6 付晓, 宴千茜, 田树革. 维药核桃青皮的生药学研究 [J]. 化学与生物工程, 2023, 40(7): 40–44. [Fu X, Yan QX Tian SG. Pharmacognosy study of Walnut green husk[J]. Chemistry & Bioengineering, 2023, 40(7): 40–44.] DOI: 10.3969/j.issn.1672-5425.2023.07.009.
- 7 杨巧婷, 郭兆宽, 李江瑞, 等. 核桃青皮的主要化学成分研究综述 [J]. 广州化工, 2018, 46(6): 12–15, 29. [Yang QT, Guo ZK, Li JR, et al. Review on main chemical constituents of Walnut green husk[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2018, 46(6):12–15, 29.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-9677.2018.06.006.
- 8 娄丽, 杨霞, 朱佳敏. 核桃青皮主要活性物质及提取工艺研究进展 [J]. 贵州科学, 2020, 38(2): 17–20. [Lou L, Yang X, Zhu JM. Research progress on the main active substances and extraction technology of Walnut green husk[J]. Guizhou Science, 2020, 38(2):17–20.] DOI: 10.3969/j.issn.1003-6563.2020.02.005.
- 9 Vieira V, Pereira C, Abreu RMV, et al. Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: a source of bioactive phytochemicals[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 137: 111189. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111189.
- 10 图尔贡江·伊力亚则, 孙宇, 倪慧, 等. 核桃青皮的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(1): 77–81. [Yiliyaze TEGJ, Sun Y, Ni H, et al. Research progress of Walnut green husk[J]. Modern Chinese Medicine, 2015, 17(1): 77–81.] DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.2015.1.020.
- 11 邓亚伟, 刘明松, 李欣浓, 等. 基于 Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 优选经典名方三化汤挥发油 β -环糊精包合工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2669–2676. [Deng YW, Liu MS, Li XN, et al. Screen the volatile oil β -cyclodextrin infused process of the classic prescription recipe sanhua decoction based on Plackett-Burman combined with Box-Behnken[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(19): 2669–2676.] DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223429.
- 12 李洁, 石晓峰, 叶倩女, 等. Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 68–74. [Li J, Shi XF, Ye QY, et al. Optimization of the ultrasonic extraction process of the seed coat from *Paeoniarockii* (S. G. Haw. et. Laeuner) T. Hanget. T. J. Li by Plackett-Burman design combined with Box-Behnken response surface method[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(1): 68–74.] DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.008.
- 13 胡准, 俞小梅, 余梦, 等. Box-Behnken 设计 - 响应面法优选香青兰中挥发油的提取工艺 [J]. 中国药师, 2022, 25(6): 1007–1011. [Hu Z, Yu XM, Yu M, et al. Extraction process optimization of volatile oil from *Dracocephalum moldavica* L. by Box-Behnken design response surface methodology[J]. China Pharmacist, 2022, 25(6): 1007–1011.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.06.011.
- 14 郭忠静, 徐新军, 赵志敏, 等. 狗脊总酚酸的提取工艺优化及抗氧化活性 [J]. 中国药师, 2024, 27(1): 8–16. [Guo ZJ, Xu XJ, Zhao ZM, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of total phenolic acids from

- Cibotii rhizoma[J]. *China Pharmacist*, 2024, 27(1): 8–16.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202310045](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202310045).
- 15 黄莉, 邹纯才, 鄢海燕, 等. 基于指纹图谱的 Box-Behnken 响应面法结合 BP 神经网络多指标优化决明子总蒽醌提取工艺[J]. *中国药学杂志*, 2023, 58(7): 619–631. [Huang L, Zou CC, Yan HY, et al. Multi-index optimization of extraction process for total anthraquinone in Cassia seed by Box-Behnken response surface method combined with BP neural network based on fingerprint[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2023, 58(7): 619–631.] DOI: [10.11669/cpj.2023.07.009](https://doi.org/10.11669/cpj.2023.07.009).
- 16 刘竹, 邹纯才, 鄢海燕, 等. 基于 Box-Behnken 响应面法与 BP 神经网络的油菜花粉总黄酮提取工艺研究[J]. *吉林医药学院学报*, 2024, 45(3): 171–180. [Liu Z, Zou CC, Yan HY, et al. Study on the extraction process of total flavonoids from Rapeseed pollen based on Box Behnken response surface methodology and BP neural network[J]. *Journal of Jilin Medical College*, 2024, 45(3): 171–180.] DOI: [10.13845/j.cnki.issn1673-2995.20231122.004](https://doi.org/10.13845/j.cnki.issn1673-2995.20231122.004).
- 17 曾祥燕, 赵良忠, 蒋盛岩. BP 神经网络优化桔子皮水溶性膳食纤维的提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(15): 258–262. [Zeng XY, Zhao LZ, Jiang SY. Optimization of extraction process of soluble dietary fiber from Orange peel based on BP neural network[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(15): 258–262.] DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2012.15.084](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2012.15.084).
- 18 王露露, 明佳佳, 杨涛, 等. 基于神经网络和响应面法对比优化富硒绿豆芽蛋白提取工艺研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 46(24): 148–155. [Wang LL, Ming JJ, Yang T, et al. Comparison and optimization of protein extraction from selenium-enriched mung bean sprouts based on an artificial neural network and a response surface method[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 46(24): 148–155.] DOI: [10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036912](https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036912).
- 19 曹丽娟, 张旭, 陈朝银, 等. 核桃青皮的化学成分及药理学作用研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(18): 4629–4633, 4663. [Cao LJ, Zhang X, Chen CY, et al. Research on the chemical components and pharmaceutical actions of Walnut green husk[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(18): 4629–4633, 4663.] DOI: [10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2016.18.002](https://doi.org/10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2016.18.002).
- 20 卢俊. 响应面优化核桃青皮总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. *饲料研究*, 2023, 9: 97–102. [Lu J. Study on response surface optimization of extraction process and antioxidant of total flavonoids from Walnut peel[J]. *Feed Research*, 2023, 9: 97–102.] DOI: [10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2023.09.020](https://doi.org/10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2023.09.020).
- 21 路振康, 吴庆智, 张建, 等. 核桃青皮提取物的多酚含量、体外抗氧化和抗菌活性评价[J]. *食品科学*, 2023, 44(3): 79–87. [Lu ZK, Wu QZ, Zhang J, et al. Evaluation of phenolic content and in vitro antioxidant and antibacterial activity of extract from green Walnut husks[J]. *Food Science*, 2023, 44(3): 79–87.] DOI: [10.7506/spkx1002-6630-20220320-236](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20220320-236).
- 22 辛国松, 曲中原, 邹翔, 等. 不同贮藏年限青龙衣中羟基萘醌的比较[J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(3): 221–223. [Xin GS, Qu ZY, Zou X, et al. Comparison of hydroxyl naphthoquinones from Qinglongyi in different storage times[J]. *Drugs & Clinic*, 2011, 26(3): 221–223.] DOI: [CNKI:SUN:GWZW.0.2011-03-026](https://doi.org/CNKI:SUN:GWZW.0.2011-03-026).
- 23 仲军梅, 徐建新, 刘玉梅. 核桃青皮中蒽醌类色素提取及稳定性[J]. *精细化工*, 2014, 31(4): 458–462. [Zhong JM, Xu JX, Liu YM. Extraction and stability of anthraquinones pigments from Walnut green husks[J]. *Fine Chemicals*, 2014, 31(4): 458–462.] DOI: [10.13550/j.jxhg.2014.092](https://doi.org/10.13550/j.jxhg.2014.092).
- 24 刘迪, 宋晓宇, 李婧, 等. 响应面法优化核桃青皮萘醌类成分提取工艺及其抗氧化性研究[J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(1): 89–92. [Liu D, Song XY, Li J, et al. Optimization of extraction technology and antioxidant activity of naphthraquinones from Walnut peel by response surface methodology[J]. *Cereals&Oils*, 2019, 32(1): 89–92.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-9578.2019.01.024](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-9578.2019.01.024).
- 25 刘猛, 吴伟源, 章检明, 等. 核桃青皮甲醇提取物的抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(13): 109–113. [Liu M Wu WY, Zhang JM, et al. Antioxidant activity of methanol extract from Walnut green husks[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(13): 109–113.] DOI: [10.12161/j.issn.1005-6521.2022.13.016](https://doi.org/10.12161/j.issn.1005-6521.2022.13.016).

收稿日期: 2024 年 03 月 03 日 修回日期: 2024 年 04 月 20 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳