

不同溶剂浸提下核桃果实不同部位多酚物质 响应及其组成

王纪辉^{1,2}, 耿阳阳^{1,2}, 刘亚娜^{1,2}, 张时馨^{1,2}, 胡伯凯^{1,2},
梁 美^{1,2}, 谭化美^{1,2}, 何佳丽^{1,2}

(1. 贵州省核桃研究所, 贵州 贵阳 550005)

(2. 贵州省林业科学研究院, 贵州 贵阳 550005)

[摘要] 研究不同溶剂浸提核桃分心木及核桃壳多酚物质含量变化及组成, 为核桃副产物利用提供技术支撑. 基于超声效应辅以不同溶剂浸提解析核桃分心木和核桃壳中多酚含量变化规律; 其次通过 HPLC (high performance liquid chromatography) 鉴定分心木及壳中多酚物质组成, 而后通过 SEM (scanning electron microscope) 观察分心木及壳的微观结构. 通过多元二次回归方程模型优化出分心木和核桃壳多酚提取较佳条件为: 料液比 1:59 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、处理时间 31 min、甲醇浓度 67% (V/V)、处理温度 61 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 250 W, 甲醇浸提分心木多酚得率为 $(72.7 \pm 1.57) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 建立的多元二次回归方程为 $Y = 71.12 - 0.079X_1 + 0.36X_2 - 0.13X_3 + 0.40X_4 - 0.91X_1X_2 - 0.17X_1X_3 - 0.31X_1X_4 - 0.45X_2X_3 + 0.23X_2X_4 - 0.60X_3X_4 - 2.10X_1^2 - 1.42X_2^2 - 0.68X_3^2 - 1.35X_4^2$; 料液比 1:85 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、处理时间 29 min、处理温度 61 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 250 W, 水浸提分心木多酚得率 $(58.06 \pm 1.62) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 得到的回归方程为 $Y = 53.96 + 2.19X_1 - 2.31X_2 + 1.25X_4 - 1.08X_1X_2 + 0.66X_1X_4 - 0.62X_2X_4 - 2.68X_1^2 - 5.76X_2^2 - 2.91X_4^2$; 料液比 1:60 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、处理时间 31 min、甲醇浓度 67% (V/V)、处理温度 61 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 300 W, 甲醇浸提核桃壳多酚得率为 $(20.04 \pm 1.32) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 得到的回归方程为 $Y = 19.58 + 0.047X_1 + 0.35X_2 - 0.096X_3 + 0.55X_4 - 0.42X_1X_2 - 0.39X_1X_3 + 0.038X_1X_4 - 0.52X_2X_3 + 0.27X_2X_4 - 0.35X_3X_4 - 1.74X_1^2 - 1.28X_2^2 - 0.59X_3^2 - 1.21X_4^2$; 料液比 1:90 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、处理时间 37 min、处理温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 250 W, 水浸提核桃壳多酚得率达 $(15.43 \pm 1.18) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 建立的回归方程为 $Y = 13.77 + 0.45X_1 - 2.18X_2 + 0.36X_4 - 1.08X_1X_2 - 0.42X_1X_4 + 0.13X_2X_4 - 0.29X_1^2 - 3.20X_2^2 + 0.22X_4^2$. HPLC 从分心木中鉴定出 2 种共有单体酚: 没食子酸和儿茶素, 没食子酸在水浸提下含量较高, 儿茶素在甲醇浸提下含量较高; 核桃壳中也鉴定出 2 种共有单体酚: 没食子酸和香草酸, 水浸提下没食子酸含量高于甲醇浸提, 而香草酸含量在甲醇和水浸提下相差不大; 分心木中多酚得率明显高于核桃壳, 甲醇水溶液提取效果明显优于纯水浸提; 超声效应能够显著破坏分心木和核桃壳表面组织结构, 促使多酚更多、更快地释放出来, 进入浸提溶剂.

[关键词] 超声效应, 溶剂, 核桃果实, 多酚, 组成

[中图分类号] TS255.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2022)03-0035-11

Polyphenols Response and Composition of Walnut Fruit at Different Parts Under Different Solvents Immersion

Wang Jihui^{1,2}, Geng Yangyang^{1,2}, Liu Yana^{1,2}, Zhang Shixin^{1,2},
Hu Bokai^{1,2}, Liang Mei^{1,2}, Tan Huamei^{1,2}, He Jiali^{1,2}

(1. Guizhou Institute of Walnut, Guiyang 550005, China)

(2. Guizhou Academy of Forestry, Guiyang 550005, China)

Abstract: Studying the change polyphenols content of walnut *diaphragma juglandis* fructus and walnut shell to provide technical support for the utilization of walnut by-products. Analyzing the change and composition of polyphenols different parts of walnut fruit based on ultrasound effect by different solvent extraction. Secondly, the composition of polyphenols was

收稿日期: 2021-10-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3186030247)、贵州省林业局青年人才基金项目 (黔林科合 J 字 [2019] 13 号)、贵州省核桃工程技术研究中心 (黔科合平台人才 [2019] 5202 号)、贵州省木本粮油加工科技创新人才团队 (黔科合平台人才 [2020] 5003)、贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2022] 重点 014 号)。

通讯作者: 耿阳阳, 在读博士, 副研究员, 研究方向: 木本粮油加工. E-mail: 780797880@qq.com

identified by HPLC, and then the microstructure was observed by SEM. Walnut *diaphragma juglandis* fructus and shell polyphenols extraction conditions were optimized by Multivariate Quadratic Regression Equation Model. The better extraction conditions were as follows: solid to liquid ratio 1:59 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), treatment time 31 min, methanol concentration 67%, treatment temperature 61 $^{\circ}\text{C}$, ultrasound power 250 W. At this time, under methanol extraction the polyphenol yield of *diaphragma juglandis* fructus was $(72.7 \pm 1.57) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The regression equation was established: $Y = 71.12 - 0.079X_1 + 0.36X_2 - 0.13X_3 + 0.40X_4 - 0.91X_1X_2 - 0.17X_1X_3 - 0.31X_1X_4 - 0.45X_2X_3 + 0.23X_2X_4 - 0.60X_3X_4 - 2.10X_1^2 - 1.42X_2^2 - 0.68X_3^2 - 1.35X_4^2$; solid to liquid ratio 1:85 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), treatment time 29 min, treatment temperature 61 $^{\circ}\text{C}$, ultrasound power 250 W. At this time, under water extraction polyphenol yield of *diaphragma juglandis* fructus was $(58.06 \pm 1.62) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The regression equation was established: $Y = 53.96 + 2.19X_1 - 2.31X_2 + 1.25X_3 - 1.08X_1X_2 + 0.66X_1X_4 - 0.62X_2X_4 - 2.68X_1^2 - 5.76X_2^2 - 2.91X_4^2$. Solid to liquid ratio 1:60 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), treatment time 31 min, methanol concentration 67%, treatment temperature 61 $^{\circ}\text{C}$, ultrasound power 300 W. At this time, under methanol extraction polyphenol yield of walnut shell was $(20.04 \pm 1.32) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The regression equation was established: $Y = 19.58 + 0.047X_1 + 0.35X_2 - 0.096X_3 + 0.55X_4 - 0.42X_1X_2 - 0.39X_1X_3 + 0.038X_1X_4 - 0.52X_2X_3 + 0.27X_2X_4 - 0.35X_3X_4 - 1.74X_1^2 - 1.28X_2^2 - 0.59X_3^2 - 1.21X_4^2$; solid to liquid ratio 1:90 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), treatment time 37 min, treatment temperature 55 $^{\circ}\text{C}$, ultrasound power 250 W. At this time, under water extraction polyphenol yield of walnut shell was $(15.43 \pm 1.18) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The regression equation was established: $Y = 13.77 + 0.45X_1 - 2.18X_2 + 0.36X_3 - 1.08X_1X_2 - 0.42X_1X_4 + 0.13X_2X_4 - 0.29X_1^2 - 3.20X_2^2 + 0.22X_4^2$. Through the HPLC analysis, under methanol and water extraction, two common kinds of monophenol identified in *diaphragma juglandis* fructus were gallic acid and catechin, gallic acid content was higher in water extraction and catechin content was higher in methanol extraction. Two common kinds of monophenol identified in the walnut shell were gallic acid and vanillic acid, gallic acid content was higher than methanol extraction, while the vanillic acid content is not much different between methanol and water extraction. The polyphenol yield was significantly higher in *diaphragma juglandis* fructus than walnut shell, the extraction effect of methanol solution is significantly better than that of pure water extraction. Scanning electron microscope of the surface of *diaphragma juglandis* fructus and walnut shell proved that ultrasound effect can significantly damage the surface tissue structures of *diaphragma juglandis* fructus and walnut shell, to promote the polyphenols to release more and faster, and dissolve into the extraction solution.

Key words: ultrasound effect, solvent, walnut fruit, polyphenols, composition

核桃被称之为胡桃、羌果,是胡桃科核桃属植物,与杏仁、榛子、腰果被称为“世界四大干果”^[1]。核桃不仅口感香醇,而且营养物质含量丰富。此外,核桃药用价值也非常高^[2],具有延缓衰老、软化血管等多种生物活性功能,所以也被称为“万岁子”、“长寿果”,深受消费者喜爱^[3]。在人类疾病病原探究上,自由基损害愈来愈引发人们的关注,随之而来的是各种类抗氧化剂成为食品保鲜及卫生保健的一部分,而植物中天然抗氧化剂在未来食品行业发展领域,其地位将会越来越突出^[4]。核桃分心木、核桃壳是核桃加工的副产物,其中含有丰富的多酚类物质,如原花青素、芦丁、儿茶素、槲皮素等^[5-6]。多酚化合物具有清除机体内自由基,缓解氧化损伤,预防和治疗许多氧化应激相关疾病的功效^[7-8]。以膳食多酚作为原料开发食品和药品,具有来源广泛、安全可靠、功效显著等优势^[9]。本研究从核桃分心木及壳中提取多酚类物质,不仅能够变废为宝,还能够提高核桃的附加值,开发利用前景极为广阔^[10]。

提取植物多酚常用的方法主要有索氏抽提法、浸提法和渗滤法等,新兴方法则以酶解法、螯合剂辅助提取法、加压液体萃取法和超临界流体萃取法等为主,但以上方法存在耗时耗能、提取成本较高等技术缺陷^[11],而非热加工技术超声波辅助提取法是利用超声波产生的空穴效应和热效应,加速溶质的扩散和溶解,能够很大限度地减少提取时间和能量的浪费^[12]。目前对核桃副产物多酚的研究也有报道,但超声辅助不同溶剂浸提下核桃果实不同部位多酚成分的响应变化尚缺乏报道^[13]。本研究以核桃副产物分心木、核桃壳为原料,考察料液比、处理时间、甲醇浓度、处理温度、超声功率对核桃副产物多酚得率的影响,利用超声效应来强化核桃副产物多酚提取效果,在单因素试验基础上,利用多元二次回归方程模型优化基于超声效应提取核桃果实副产物多酚提取工艺,以期有效提取其总多酚,为核桃果实副产物综合利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃青果:以泡核桃(*Juglans sigillata*) 30%青果皮颜色由绿变黄或略开裂时,坚果发育到固有形状达到采收成熟度时,即为果实成熟期。采收地点为贵州省息烽县西山镇猪场村。

多酚单体标准品(色谱级)、福林酚(分析纯),购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇(分析纯),购自天津市富宇精细化工有限公司;无水碳酸钠(分析纯),购自天津市永大化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

MS104TS 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;KQ-500DE 浴槽式数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;Research plus 单道固定量程移液器,Eppendorf;L5S 紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;3-18R 台式高速冷冻离心机,湖南可成仪器设备有限公司;XH-C 旋涡混合器,金坛市白塔新宝仪器厂;101-2A 型电热鼓风干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司;JSP-100 型高速多功能粉碎机,浙江永康市金穗机械制造有限公司;EM-30 台式扫描电镜,COXEM;ETD-900M 小型离子溅射仪,北京意力博通技术发展有限公司;U3000 高效液相色谱仪,赛默飞。

1.3 试验方法

1.3.1 核桃分心木及核桃壳样品制备

核桃青果采收后脱去青皮于 45 ℃ 烘箱中烘干,分心木和壳分离粉碎后过 60 目筛备用。

1.3.2 影响因素试验

以甲醇、水溶液作为提取剂,分别选取料液比(1:20、1:40、1:60、1:80、1:100)、处理时间(10、20、30、40、50 min)、甲醇浓度(10%、30%、50%、70%、90%, V/V)、处理温度(20、30、40、50、60 ℃)、超声功率(200 W、250 W、300 W、350 W、400 W),以多酚得率作为评价指标,考察各因素对核桃果实不同部位多酚提取效果的影响。

1.3.3 没食子酸标准曲线绘制及多酚得率测定

参考梁杏^[14]的测定方法,略有改动,采用 Folin-Ciocalteu 比色法,称取粉碎过 60 目筛的核桃分心木及核桃壳粉 0.2 g,按设定的料液比加入浸提液进行仪器辅助浸提 20 min,取出,8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液为提取液。吸取 1 mL 提取液放入试管中加入蒸馏水进行一定比例稀释后再吸取 1 mL 稀释液,根据上述标准曲线方法测吸光度值,计算多酚得率。

$$\text{多酚得率}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{c \times V \times N \times 0.001}{m},$$

式中, c 为样品多酚浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; V 为提取液总体积, mL; N 为稀释倍数; m 为样品质量, g。

1.3.4 核桃分心木和壳多酚物质高效液相色谱分析

1.3.4.1 样品溶液的制备

取核桃分心木和壳粉末 1.0 g 置于 250 mL 锥形瓶中,分别加入 100 mL 90% 甲醇水溶液(V/V)、100 mL 70% 甲醇水溶液(V/V) 及相同体积的蒸馏水,置于浴槽式数控超声波清洗器中,50 ℃、250 W 下提取 30 min,重复提取 2 次,合并提取液。提取液经 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液于 65 ℃ 减压浓缩至膏状后分别用 5 mL 90% 甲醇(V/V)、5 mL 70% 甲醇(V/V) 及 5 mL 蒸馏水定容至 5 mL,即为多酚提取液,置于-4 ℃ 冰箱中冷藏备用(可保存 7 d)^[15]。多酚提取液用 0.22 μm 亲水滤膜过滤,置于 1.5 mL 进样瓶中。

1.3.4.2 检测条件

色谱柱为 CAPCELL PAK C18 色谱柱,流动相为 0.8% 乙酸溶液(A 相)、色谱甲醇(B 相),进样量 5 μL ,流速 0.9 mL/min。对照品:没食子酸、儿茶素、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、表儿茶素、丁香醛、对香豆素、阿魏酸采用洗脱程序 1,芦丁、杨梅素、胡桃醌、槲皮素采用洗脱程序 2。其中洗脱程序 1 为柱温 30 ℃,波长 280 nm(洗脱梯度:0~10 min:10%~20%B,10~30 min:20%~50%B,30~40 min:50%~50%B,40~50 min:50%~10%B,50~60 min:10%~10%B)。洗脱程序 2 为柱温 25 ℃,波长 251 nm(洗脱梯度:0~10 min:10%~40%B,10~25 min:40%~60%B,25~35 min:60%~80%B,36~45 min:100%~100%B,47~57 min:10%~10%B)。

1.3.5 微观结构观察

采用 SEM 对核桃分心木及核桃壳粉末超声前后进行表观形貌观察,在样品台贴上双面胶,在双面胶上均匀放置少量样品,吹去多余样品,喷金处理,再利用 SEM 进行扫描观察、拍照。

1.3.6 数据处理

采用 EXCEL2007 进行数据整理,运用 ORIGIN9.1 进行制图,采用 SPSS19.0 软件对试验数据进行 ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 核桃分心木和壳多酚提取单因素试验

2.1.1 料液比对分心木和壳多酚提取效果的影响

由图 1 可知,料液比和不同溶剂提取对分心木及壳多酚得率影响显著($P<0.05$,下同),甲醇溶液与水浸提分心木多酚得率最高值相比增加 4.40%,甲醇较水浸提分心木多酚得率最低值显著上升 12.35%;最高点甲醇与水浸提壳相比多酚得率显著增加 23.66%,反之显著提高 64.24%.

当料液比为 $20\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,多酚得率较低,随着料液比逐渐增大,甲醇溶液和水浸提下,分心木和壳多酚得率均呈先增加后下降的趋势变化,当料液比为 $80\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,甲醇和水浸提下,分心木多酚得率较高,分别为 $60.95\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $58.38\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;当料液比为 $60\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,甲醇浸提下,壳多酚得率较大为 $13.80\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;水浸提下,料液比为 $80\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时壳多酚得率仅为 $11.16\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 这可能是由于溶剂较少时溶液的粘度大,分子的扩散速率低^[16],影响了物料中多酚的溶解,导致多酚不能完全溶出,造成多酚得率较低^[17-18];随着溶剂的增加,溶液逐渐被稀释,阻碍效果减弱,细胞内外多酚含量形成浓度差,酚类物质扩散加快^[19],多酚的溶出量上升,提取率增加;而当溶剂过多时多酚得率下降,可能是物料与溶剂量的比例达到一种饱和状态,多糖、色素等其它物质溶出,出现反渗透^[20].

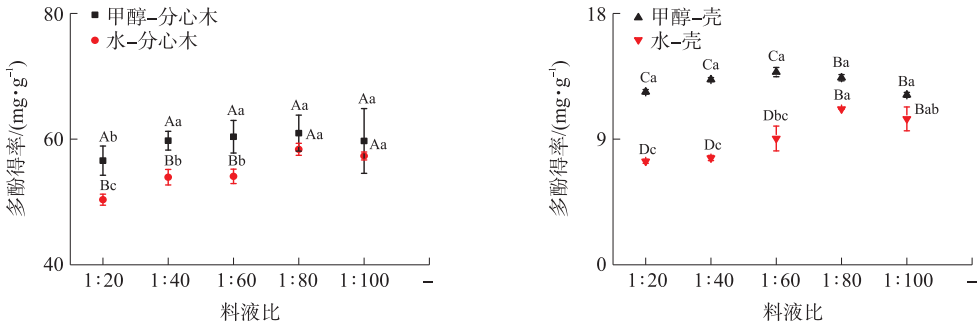


图 1 料液比对多酚提取效果的影响

Fig. 1 Effect of solid to liquid ratio on the extraction effect of polyphenols

注:图中不同小写字母表示组内差异性显著($P<0.05$),不同大写字母表示组间差异性显著($P<0.05$),图 2 至图 5 同。

2.1.2 处理时间对分心木和壳多酚提取效果的影响

由图 2 可知,甲醇浸提分心木和核桃壳及水浸提分心木、核桃壳多酚得率在 30~40 min 达到平衡. 当处理时间从 10 min 增加至 40 min 时,甲醇-分心木、甲醇-壳、水-壳多酚得率也相应增加,处理时间为 40 min 时,多酚得率较大,分别为 $64.90\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $16.90\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $10.00\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;当处理时间大于 40 min,多酚得率又逐渐下降;水-分心木多酚得率在 10~30 min 表现为逐渐增加,30 min 较高,为 $51.07\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;浸提时间过短多酚得率低,可能是由于原料中多酚还未完全溶解、渗透、扩散,导致溶液中多酚含量较低,而浸提时间过长可能会引起多酚发生氧化反应,致使多酚得率下降^[21];不同溶剂浸提相比而言,最高点甲醇与水浸提分心木相比多酚得率增加显著为 27.08%,反之显著升高 25.37%;最高点甲醇与水浸提核桃壳相比多酚得率增加显著,增加幅度为 69.0%,反之显著提高 121.82%.

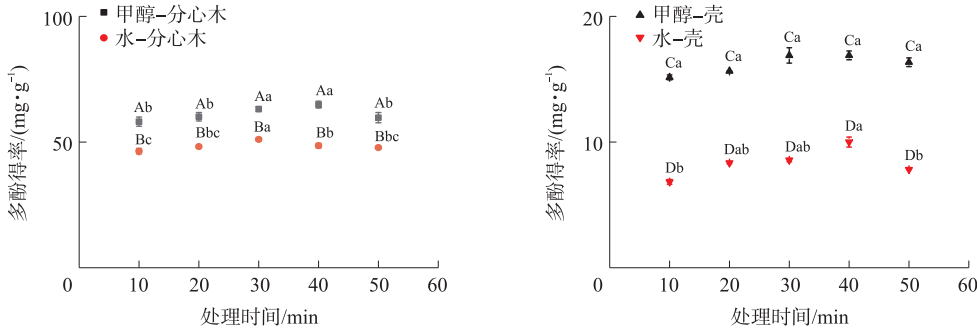


图 2 处理时间对多酚提取效果的影响

Fig. 2 Effect of treatment time on the extraction effect of polyphenols

2.1.3 甲醇浓度对分心木和壳多酚提取效果的影响

由图3可知,甲醇浸提分心木和壳多酚得率在甲醇浓度为70%时,达到动态平衡。核桃果实不同部位多酚得率差异显著($P<0.05$,下同),最高点甲醇浸提分心木多酚得率较核桃壳是其4.31倍,反之是其4.58倍,且均达到显著性差异水平。在甲醇浓度为10%~70%时,分心木和壳多酚得率呈线性递增,甲醇浓度为70%时,达到较大值 $57.78\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $13.68\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,随着甲醇浓度继续增加,多酚得率的变化不显著,说明此时物质扩散已达平衡状态。根据“相似相溶”原理,核桃多酚的极性与70%甲醇极性相似,所以在甲醇浓度为70%时进行提取较为适合,随着甲醇浓度的增大,多酚与溶剂极性相差较大、蛋白质变性,阻止结合酚溶出^[22-23],此外醇溶性杂质、色素成分溶出引起胞外脂溶性物质浓度增大抑制细胞内多酚物质渗出^[24],而且醇溶性杂质提取程度增大会引起杂质与多酚竞争关系加剧,从而导致多酚得率降低^[25]。

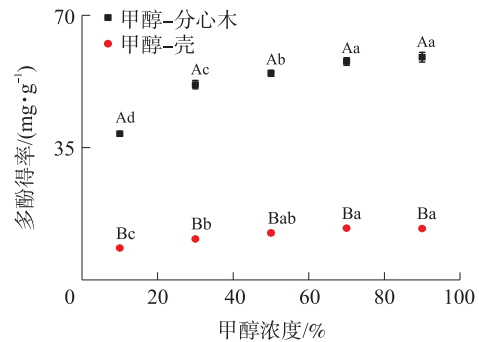


图3 甲醇浓度对多酚提取效果的影响

Fig. 3 Effect of methanol concentration on the extraction effect of polyphenols

2.1.4 处理温度对分心木和壳多酚提取效果的影响

由图4可知,处理温度和不同溶剂浸提对分心木及核桃壳多酚得率影响显著($P<0.05$,下同),其中最高点甲醇浸提分心木多酚得率是水浸提分心木的1.35倍,反之是其1.48倍,均呈显著性差异。最高点甲醇浸提核桃壳较水浸提壳,多酚得率增加显著,增幅为27.37%,反之上升64.22%。多酚得率随着浸提温度的升高而不断提高,在20~60℃温度范围内,随着浸提温度的升高,多酚得率呈线性递增显著。不同溶剂浸提下,核桃分心木及核桃壳多酚得率均在60℃出现峰值,分别达 $72.73\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $53.72\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $16.66\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $13.08\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。主要是由于处理温度升高会提高传质效率、分子运动加剧,可以加速多酚类物质的渗透、扩散等,使其更容易被提取出来^[26]。

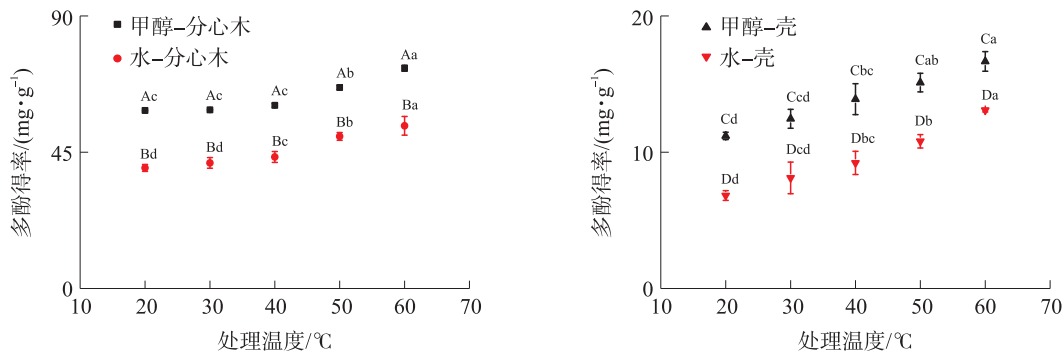


图4 处理温度对多酚提取效果的影响

Fig. 4 Effect of treatment temperature on the extraction effect of polyphenols

2.1.5 超声功率对分心木和壳多酚提取效果的影响

由图5可知,随着超声功率的增大,甲醇-分心木、甲醇-壳、水-壳多酚得率在前中期先升高后下降,在提取后期出现略微上升,分别在250 W 多酚得率较高为 $70.44\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、300 W 达到峰值 $17.34\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、250 W 出现峰值 $11.81\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;水-分心木多酚得率呈先升高后下降趋势走向,250 W 时多酚得率较大 $46.27\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;甲醇、水浸提分心木及壳多酚得率在250 W~300 W 达到动态平衡,这是因为低功率不能使基质完全破碎,故多酚溶出不完全;较大超声功率意味更大能量输入,产生更强有力的穿透效应,植物组织结构被破坏,多酚更易释放^[27];而高功率产生的瞬时高温可能会使多酚分解,加之氢键遭到破坏,蛋白质及多糖大分子溶出,进而导致多酚得率下降^[28]。至于提取后期多酚得率变化,可能是氢键断裂后小部分结合型酚类的溶出所引起^[29]。

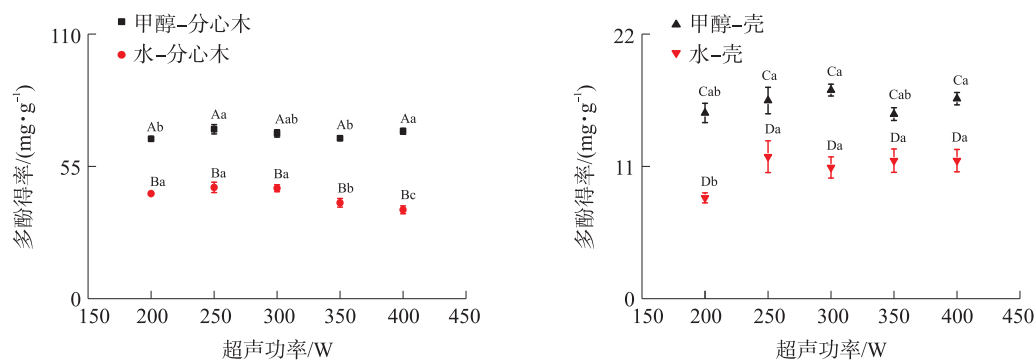


图 5 超声功率对多酚提取效果的影响

Fig. 5 Effect of ultrasound power on the extraction effect of polyphenols

2.2 核桃分心木和壳多酚提取工艺回归方程结果

在影响核桃分心木和壳多酚提取单因素试验结果的基础上,确定甲醇/水-分心木、甲醇/水-核桃壳超声功率分别为 250 W、250 W、300 W、250 W,以料液比(X_1)、处理时间(X_2)、甲醇浓度(X_3)和处理温度(X_4) 4 个因素为自变量,以多酚得率为特征目标物(Y),采用多元二次回归方程模型进行拟合,回归模型及方差分析结果见表 1 至表 5。

表 1 回归方程的方差分析(甲醇-分心木)

Table 1 Analysis of variance for regression equation (methanol-diaphragma juglandis fructus)

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	49.82	14	3.56	6.76	0.000 5
X_1	0.075	1	0.075	0.14	0.71
X_2	1.56	1	1.56	2.95	0.11
X_3	0.20	1	0.20	0.38	0.55
X_4	1.87	1	1.87	3.55	0.08
X_1X_2	3.33	1	3.33	6.32	0.025
X_1X_3	0.11	1	0.11	0.21	0.65
X_1X_4	0.39	1	0.39	0.74	0.40
X_2X_3	0.80	1	0.80	1.52	0.24
X_2X_4	0.20	1	0.20	0.38	0.55
X_3X_4	1.45	1	1.45	2.76	0.12
X_1^2	28.47	1	28.47	54.05	<0.000 1
X_2^2	13.01	1	13.01	24.70	0.000 2
X_3^2	3.02	1	3.02	5.74	0.031 2
X_4^2	11.89	1	11.89	22.57	0.000 3
残差	7.37	14	0.53		
失拟	0.88	10	0.088	0.055	1.00
净误差	6.49	4	1.62		
总和	57.20	28			

表 2 回归方程的方差分析(水-分心木)

Table 2 Analysis of variance for regression equation (water-diaphragma juglandis fructus)

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	327.05	9	36.34	14.73	0.000 9
X_1	38.41	1	38.41	15.57	0.005 6
X_2	42.64	1	42.64	17.29	0.004 3
X_4	12.45	1	12.45	5.05	0.060
X_1X_2	4.62	1	4.62	1.87	0.21
X_1X_4	1.73	1	1.73	0.70	0.43
X_2X_4	1.53	1	1.53	0.62	0.46
X_1^2	30.15	1	30.15	12.22	0.01
X_2^2	139.74	1	139.74	56.65	0.000 1
X_4^2	35.74	1	35.74	14.49	0.006 7
残差	17.27	7	2.47		
失拟	4.47	3	1.49	0.47	0.72
净误差	12.79	4	3.20		
总和	344.32	16			

表 3 回归方程的方差分析(甲醇-核桃壳)

Table 3 Analysis of variance for regression equation(methanol-walnut shell)

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	37.78	14	2.70	15.05	<0.000 1
X_1	0.026	1	0.026	0.15	0.71
X_2	1.49	1	1.49	8.32	0.012
X_3	0.11	1	0.11	0.61	0.45
X_4	3.56	1	3.56	19.88	0.000 5
X_1X_2	0.69	1	0.69	3.84	0.070
X_1X_3	0.62	1	0.62	3.44	0.085
X_1X_4	5.625E-003	1	5.625E-003	0.031	0.86
X_2X_3	1.09	1	1.09	6.09	0.027
X_2X_4	0.30	1	0.30	1.69	0.22
X_3X_4	0.50	1	0.50	2.77	0.12
X_1^2	19.59	1	19.59	109.28	<0.000 1
X_2^2	10.70	1	10.70	59.67	<0.000 1
X_3^2	2.23	1	2.23	12.46	0.003 3
X_4^2	9.47	1	9.47	52.79	<0.000 1
残差	2.51	14	0.18		
失拟	1.16	10	0.12	0.34	0.92
净误差	1.35	4	0.34		
总和	40.29	28			

表 4 回归方程的方差分析(水-核桃壳)

Table 4 Analysis of variance for regression equation(water-walnut shell)

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	90.34	9	10.04	10.16	0.002 9
X_1	1.65	1	1.65	1.67	0.24
X_2	38.15	1	38.15	38.61	0.000 4
X_4	1.04	1	1.04	1.05	0.34
X_1X_2	4.62	1	4.62	4.68	0.067
X_1X_4	0.70	1	0.70	0.71	0.43
X_2X_4	0.07	1	0.07	0.071	0.80
X_1^2	0.36	1	0.36	0.37	0.56
X_2^2	43.21	1	43.21	43.73	0.000 3
X_4^2	0.20	1	0.20	0.20	0.66
残差	6.92	7	0.99		
失拟	0.83	3	0.28	0.18	0.90
净误差	6.09	4	1.52		
总和	97.26	16			

表 5 回归模型的拟合分析

Table 5 Fitting analysis of the regression model

名称	变异系数/%	系数	校正系数	预测系数	信噪比
甲醇-分心木	1.05	0.87	0.74	0.73	9.01
水-分心木	3.23	0.95	0.86	0.73	9.85
甲醇-核桃壳	2.41	0.94	0.88	0.78	12.60
水-核桃壳	8.13	0.93	0.84	0.77	8.84

从表 1 至表 5 可以看出,多元二次回归方程模型的失拟值 *P* 为 1.00、0.72、0.92、0.90 均大于 0.05,多元二次回归方程系数 R^2 均大于 0.80,说明多元二次回归方程模型用于预测分心木和核桃壳多酚得率是可行的. 模型的变异系数均在 10%以下,表明此回归方程重复性较好. 多元二次回归方程的 R_{adj}^2 与 R_{pred}^2 较为接近,说明该数学模型拟合程度较优,并且该多元二次回归方程的信噪比均大于 4,说明该数学模型有足够强的信号对分心木和核桃壳多酚得率进行预测,试验误差小.

通过多元二次回归方程数学模型预测分析,得到甲醇提取分心木多酚较佳优化条件为料液比 1:59 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、处理时间 31 min、甲醇浓度 67%、处理温度 61 $^{\circ}\text{C}$,理论提取率为 $71.22\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;水提取分心木多

酚较佳优化条件为料液比 1:85($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、处理时间 29 min、处理温度 61 $^{\circ}\text{C}$,理论提取率为 55.00 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

甲醇提取核桃壳多酚较佳优化条件为料液比 1:60($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、处理时间 31 min、甲醇浓度 67%、处理温度 61 $^{\circ}\text{C}$,理论提取率为 19.71 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;水提取核桃壳多酚较佳优化条件为料液比 1:90($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、处理时间 37 min、处理温度 55 $^{\circ}\text{C}$,理论提取率为 15.11 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

采用理论优化提取条件,验证预测结果的准确性,得到甲醇/水-分心木和甲醇/水-壳多酚得率平均值为(72.70 ± 1.57) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、(58.06 ± 1.62) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、(20.04 ± 1.32) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、(15.43 ± 1.18) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,与理论值较为接近,相对误差较小,说明该数学模型可以较好地模拟和预测核桃分心木和壳多酚得率,从而证明提取参数的可行性.

2.3 核桃分心木和壳多酚得率

由图 6 可知,不同溶剂浸提对核桃果实不同部位多酚得率影响显著. 甲醇/水-分心木多酚得率均高于甲醇/水-壳多酚得率. 就多酚得率而言,甲醇-分心木>水-分心木>甲醇-壳>水-壳;单就从相同部位而言,甲醇水溶液较纯水提取效果好;甲醇-分心木多酚得率最高为 72.7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,比水-分心木显著提高 25.22%,是甲醇/水-壳的 3.63 倍($P<0.01$,下同)、4.71 倍;水-分心木多酚得率较高为 58.06 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,是甲醇/水-壳的 2.90 倍、3.76 倍;甲醇/水-壳多酚得率较低分别为 20.04 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、15.43 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,甲醇较水浸提显著高出 29.88%($P<0.05$).

2.4 核桃分心木和壳单体酚

由图 7 可知,甲醇、水浸提分心木和壳均检测出单体酚没食子酸,但含量有所不同. 水-分心木没食子酸含量最高为 260 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,甲醇-分心木没食子酸含量次之为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,水-壳没食子酸含量较低为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,甲醇-壳没食子酸含量最低为 9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. 水-分心木没食子酸含量与甲醇-分心木、甲醇/水-壳相比是其 5.2 倍、28.89 倍、6.5 倍. 甲醇/水-分心木均检测出儿茶素单体酚,儿茶素单体酚在甲醇-分心木中含量较高为 1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,水-分心木含量较低为 380 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. 核桃壳中没有检测出儿茶素,但检测出香草酸单体酚,甲醇/水浸提下含量差异较小.

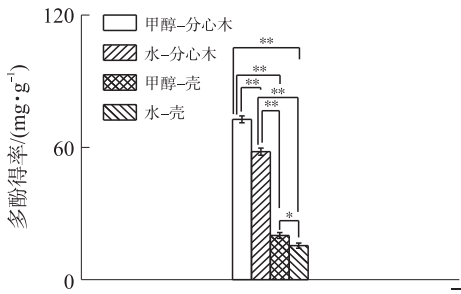


图 6 优化提取条件下多酚得率

Fig. 6 The polyphenol yield at the optimal extraction conditions

* 表示差异性显著 ($P<0.05$),
** 表示差异性极显著 ($P<0.01$)

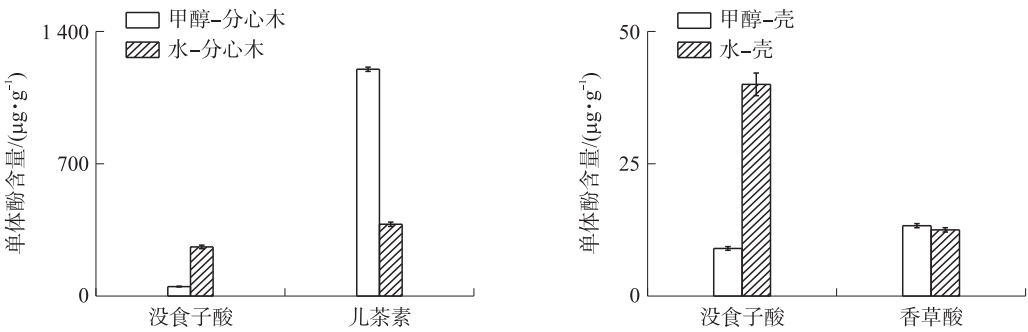


图 7 单体酚种类及含量

Fig. 7 Types and content of monophenol

2.5 超声处理对核桃分心木和壳微观结构的影响

由图 8 可知,超声效应对核桃分心木及核桃壳粉微观结构影响很大. 由图 8-a 可看出,对照组分心木表面有类似针孔的小孔附着其上,结构质地较为紧密,呈块状. 由图 8-b、8-c 可看出,处理组分心木组织结构松散、空洞,形状不规则,类似“树洞”,组织结构之间互相黏连的不紧密,表面结构发生了很大变化.

从图 8-d、8-e、8-f 可看出,对照组核桃壳形状不规则,表面不平整且有小的片状物附着上面,表面存在一定数量的小孔,但分布不均匀,且数量较少,组织之间连接的较为紧密. 处理组表面或凹陷或折叠起皱,组织结构明显较为塌陷,表明超声处理能破坏植物组织表面,促使多酚尽可能溶出.

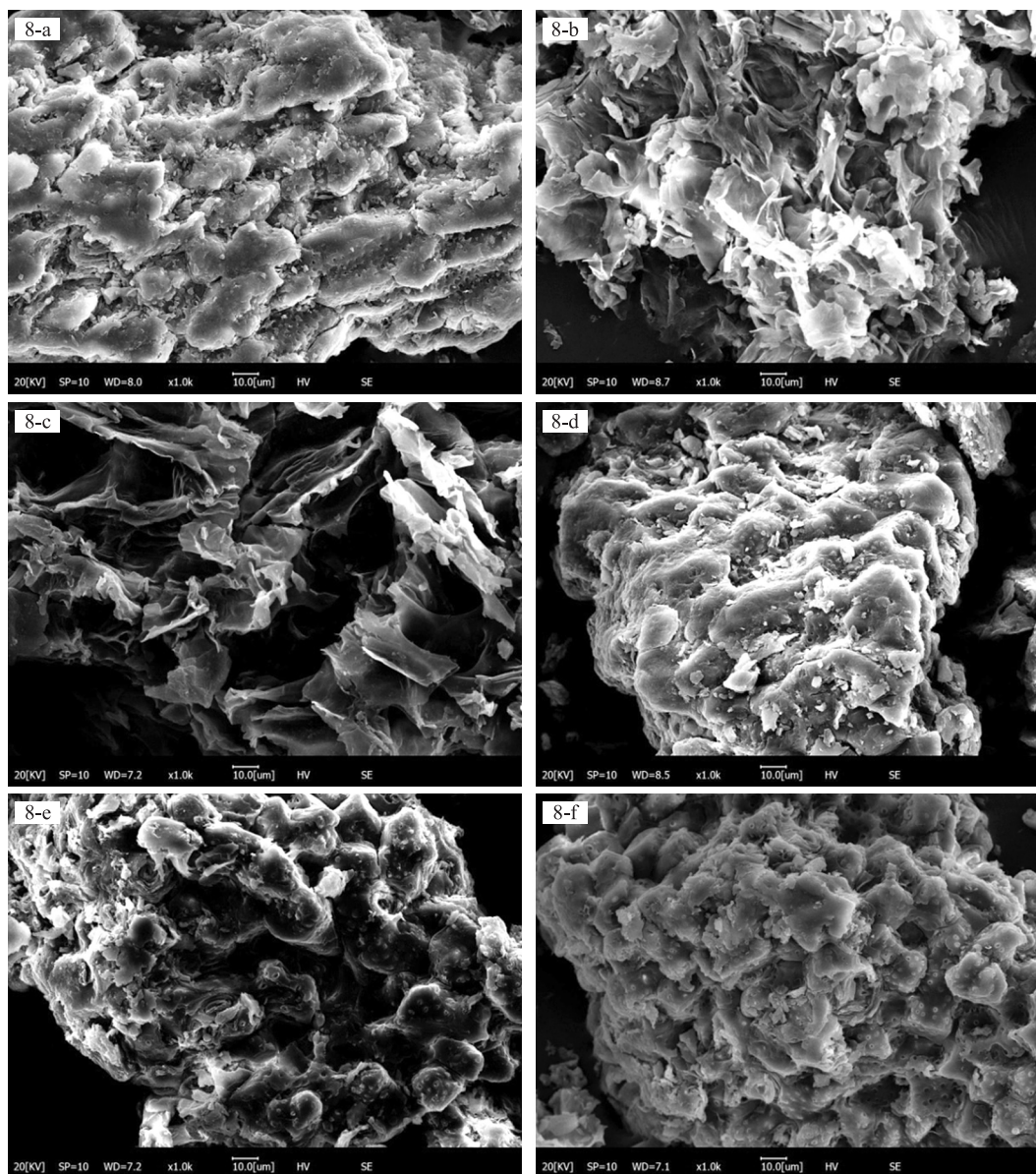
图8 核桃分心木和壳粉 SEM 图($\times 1000$)

Fig. 8 Scanning electron microscope micrographs of walnut *diaphragma juglandis* fructus and shell powders($\times 1000$)

注:8-a、8-b、8-c 为分心木,8-d、8-e、8-f 为核桃壳,其中 8-a、8-d 为对照组、8-b、8-e 为甲醇浸提、8-c、8-f 为水浸提。

3 讨论

提取植物中多酚类物质时,由于植物种类的不同或植物体的不同部位,需考虑采用不同工艺或不同的工艺参数^[30]. 为了获取高提取率、高纯度、性能优良的多酚物质,采用多元二次回归方程模型分析法优化提取工艺,以达到省时、高效的目的^[31]. 酚类化合物常聚集在植物表层,如壳、表皮等部位. 因此,对核桃壳进行开发利用,从中提取多酚类物质,而后开发制成抗氧化剂具有一定的现实意义^[32]. 何春梅等^[33]优化核桃壳多酚提取工艺,得出料液比 $1:30(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 、时间 25 min、乙醇体积分数 40%、温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,壳多酚含量为 $6.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 孙海涛等^[34]发现料液比 $1:20$ 、乙醇体积分数 50%、温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、微波功率 200 W 山核桃壳多酚提取率为 2.36%. 本研究中甲醇提取核桃壳多酚得率为 $20.04\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,水提取核桃壳多酚得率达到 $15.43\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,与何春梅等^[33]结果有一定出入,可能是提取溶剂不同,乙醇、甲醇、水分子结构不同,其极性也出现差异,引起在浸提的过程多酚溶出速率会有所不同,而且本研究中采用的核桃壳为泡核桃品种,与何春梅等^[33]所用核桃品种有差异,不同地区的物候条件如温度、湿度、海拔等均会对核桃壳中多酚物质的含量产生一定影响,贵州属于云贵高原,平均海拔较广州要高,可能高海拔地区更有利于光合作用,核桃

在生长代谢的过程中更有利于酚类物质的积累,然而具体原因有待后续学者进行跟踪研究.此外本研究中核桃壳样品粉碎后是经60目筛,而何春梅等^[33]研究所用的壳样品是过20目筛,样品颗粒大小不同,在浸提的过程中会导致多酚溶出快慢和量的多少存在不同.本团队前期研究发现乙醇、甲醇和水作为溶剂提取核桃壳多酚,乙醇作为提取溶剂时,壳多酚含量较相同浓度甲醇要高,甲醇较水浸提提取效果佳,然而本研究水浸提壳多酚得率仍然高于何春梅等^[33],这可能与样品来源不同及样品处理方式关系最大.本研究甲醇浸提核桃壳多酚得率与孙海涛等^[34]人的研究结果一致,水浸提核桃壳多酚得率低于孙海涛等^[34]人的研究结果,有机溶剂水溶液能够更好兼顾多酚物质的溶解性,这与本研究结果一致.

核桃分心木中多酚物质丰富,利用核桃分心木提取多酚,并应用于食品,可大大提高核桃资源附加值.刘静等^[35]发现料液比1:62、乙醇体积分数50%、超声50 min、温度71℃,多酚提取率为6.98%.陈冠林等^[36]得出料液比1:40、乙醇浓度30%、超声15 min、温度50℃多酚含量为56.46 mg·g⁻¹.本研究甲醇提取多酚得率为72.7 mg·g⁻¹.水提取多酚得率达到58.06 mg·g⁻¹.甲醇浸提本研究得出的多酚得率与刘静等^[35]人结果较为一致,与陈冠林等^[36]的研究结果不同,这与提取用有机溶剂不同有关,加之陈冠林等^[36]提取时有机溶剂浓度小、温度较低、时间较短,致使多酚得率低;水浸提本研究得出的多酚得率与陈冠林等^[36]结果较为一致,除提取溶剂对多酚得率产生影响外,其它因素对试验结果的影响也不容忽视,经查阅众多文献资料及本文中研究结果,60~70℃多酚物质利于溶出,而本研究采用的处理时间、处理温度均高出陈冠林等^[36]人的提取条件,保证多酚物质浸提完全.

基于超声效应辅以溶剂浸提提取核桃分心木及壳中的多酚,操作简易,具有一定的生产应用前景.在单因素试验的基础上利用多元二次回归方程对数据进行分析拟合并建立相应的数学模型,回归分析结果表明料液比和处理时间的交互作用对甲醇浸提分心木多酚得率影响显著;料液比与处理时间的一次项对水浸提分心木多酚得率有极大影响;处理时间一次项、处理时间与乙醇浓度的交互作用对甲醇浸提壳多酚得率影响显著,而处理温度一次项对其影响极显著;处理时间的一次项对水浸提壳多酚得率产生极显著性影响.利用多元二次回归方程不仅能分析各因素间交互作用对多酚得率的影响,还可优化核桃分心木及壳中的多酚提取工艺,预测出最优值,减少不必要的浪费.为更深入地了解核桃分心木及壳中的多酚效用,下一步将对提取出的多酚作用效果和化学成分等方面进行研究.

4 结论

超声效应下核桃分心木及核桃壳多酚响应变化有所不同,但存在相似之处;甲醇水溶液浸提分心木和核桃壳多酚效果明显优于纯水浸提;运用多元二次回归方程进行分心木和核桃壳多酚提取,实际多酚得率与理论预测值较为接近.试验精确度较高,同时操作简单,且经济,可用于分心木、壳多酚提取;分心木及核桃壳组织结构在超声环境下会被破坏,从而加速了多酚的提取、强化了提取效果.希望本研究可以为食品工业中核桃副产物的利用提供理论参考.

[参考文献]

- [1] 李瑞,梁永林,阚欢,等.响应面法优化云南核桃分心木多酚提取工艺[J].西南林业大学学报(自然科学),2021,41(2):159-165.
- [2] 洪茜茜,叶永丽,张银志,等.核桃分心木化学成分及功能活性研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(7):194-202.
- [3] 王艳梅,高莉,刘梦,等.核桃隔膜化学成分定性研究[J].食品工业科技,2008(12):123-124.
- [4] 赵国建,王向东,王焕.提取方法对核桃青皮多酚提取效果的影响[J].农业工程学报,2012,28(S1):351-355.
- [5] 谢佳函,刘回民,刘美宏,等.红豆皮多酚提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].中国食品学报,2020,20(1):147-157.
- [6] SATO S, HORI Y, YAMATE J, et al. Protective effect of dietary azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats against renal interstitial fibrosis of rats induced by cisplatin[J]. Nutrition, 2005, 21(4):504-511.
- [7] GAN R Y, DENG Z Q, YAN A X, et al. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects[J]. LWT—Food science and technology, 2016, 73(11):168-177.
- [8] MUKAI Y, SUN Y, SATO S. Azuki bean polyphenols intake during lactation upregulate AMPK in male rat offspring exposed to fetal malnutrition[J]. Nutrition, 2013, 29(1):291-297.

- [9] VINSON J A, LIANG X, PROCH J, et al. Polyphenol antioxidants in citrus juices; In vitro and in vivo studies relevant to heart disease[J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2002, 505: 113–122.
- [10] PALMADURAN S A, VLASSOPOULOS A, LEAN M, et al. Nutritional intervention and impact of polyphenol on glycohemoglobin (HbA1c) in non-diabetic and type 2 diabetic subjects; Systematic review and meta-analysis[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2017, 57(5): 975–986.
- [11] MA X, WEI Q, ZHANG S, et al. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyrolytic acid[J]. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 2011, 91(2): 338–343.
- [12] 王新然. 核桃瓣膜多酚类化合物组成及生物活性分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- [13] 邢颖, 刘芳. 超声波和纤维素酶法提取核桃分心木中的黄酮、多酚及其抗氧化活性分析[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(11): 111–115.
- [14] 梁杏. 核桃饼粕多酚提取纯化及其抗氧化和降脂活性初步研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- [15] 史斌斌, 张文娥, 李雪, 等. 铁核桃叶片多酚类物质含量及其抗氧化活性[J]. *园艺学报*, 2017, 44(1): 23–32.
- [16] 李月, 纪乃茹, 李健, 等. 红毛藻多酚提取工艺优化及抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7): 156–161.
- [17] 黄浩, 秦高一鑫, 陈贵堂, 等. 响应面法优化黄芪下脚料蛋白提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(23): 170–176.
- [18] 谢蓝华, 陈佳, 张淑宜, 等. 美藤果蛋白的提取工艺及氨基酸组成分析[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5): 40–44.
- [19] JOVANOVIĆ A A, DORĐEVIĆ V B, ZDUNIĆ G M, et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques[J]. *Separation and purification technology*, 2017, 179(5): 369–380.
- [20] JOKIĆ S, VELIĆ D, BILIĆ M, et al. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans[J]. *Czech journal of food sciences*, 2010, 28(3): 206–212.
- [21] 朱霞, 刘育聪, 吴振琳, 等. 响应面法优化超声波提取核桃青皮多酚的工艺研究[J]. *食品科技*, 2014, 39(11): 207–211.
- [22] LI ZX, LI YR, LEI G, et al. Study on ultrasonic extraction of polyphenols in apple pomace and its antioxidational effects[J]. *Journal of Northwest Science-Technology University of Agriculture and Forestry*, 2005, 33(8): 131–134.
- [23] TEH S S, BIRCH E J. Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes[J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2014, 21(1): 346–353.
- [24] 刘洋坪, 王建辉, 刘冬敏, 等. 莲衣粉多酚提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. *核农学报*, 2021, 35(6): 1376–1384.
- [25] BHEBHE M, TN FÜLLER, CHIPURURA B, et al. Effect of solvent type on total phenolic content and free radical scavenging activity of black tea and herbal infusions[J]. *Food analytical methods*, 2016, 9(4): 1060–1067.
- [26] BOUSSETTA N, TURK M, TAEYE C D, et al. Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake[J]. *Industrial crops and products*, 2013, 49(8): 690–696.
- [27] 邓永, 刘东红. 超声处理对石榴皮多酚提取效果的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(1): 65–69.
- [28] D'ALESSANDRO L G, KRIIAA K, NIKOV I, et al. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry[J]. *Separation and purification technology*, 2012, 93(6): 42–47.
- [29] FALLEH H, KSOURI R, LUCCHESI M E, et al. Ultrasound-assisted extraction; effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots[J]. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 2012, 11(2): 243–249.
- [30] 周晔, 王伟, 王成章, 等. 核桃属 (*Juglans*) 植物多酚类物质研究进展[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2013, 37(5): 146–152.
- [31] 王建超, 王卿, 施文昊, 等. 响应面分析法优化枇杷叶多酚提取工艺[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(2): 384–390.
- [32] 缪福俊, 宁德鲁. 核桃多酚类物质生物活性研究进展[J]. *中国油脂*, 2021, 46(1): 48–51.
- [33] 何春梅, 陈冠林, 俞憬, 等. 核桃壳多酚的提取、含量测定及其抗氧化活性研究[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(2): 153–158.
- [34] 孙海涛, 邵信儒, 姜瑞平, 等. 超声波-微波联合提取山核桃壳多酚及其稳定性[J]. *北方园艺*, 2015(24): 135–139.
- [35] 刘静, 黄慧福, 刘继华, 等. 响应面优化核桃分心木多酚超声辅助提取工艺[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(23): 155–160, 191.
- [36] 陈冠林, 刘学文, 韩门娣, 等. 分心木多酚提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(5): 67–71.