

响应面法优化核桃青皮黄酮的超声提取工艺研究

李红娟, 樊金拴, 郑涛, 赵韵美, 苏锐, 高智辉

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以核桃青皮为试材,选取超声功率、乙醇体积分数、超声温度、超声时间和静置时间、料液比 6 个因子做单因素试验,在此基础上应用 Box-Behnken 法进行 4 因素 3 水平的正交实验设计,采用响应面法优化了核桃青皮黄酮的超声提取工艺。结果表明:在 200 W 功率,料液比 1:20 g/mL 的条件下,得到核桃青皮黄酮的超声辅助提取最佳工艺为:乙醇体积分数 62%、超声温度 51℃,每次 31 min、静置萃取 6.5 min,核桃青皮黄酮提取率可达到 1.080%,验证值为 1.077%。该回归模型高度显著,具有良好的预测能力。

关键词:核桃青皮;黄酮;超声辅助提取;响应面分析

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)14-0132-05

核桃青皮,又名青龙衣,为核桃的未成熟外果皮。其味苦、涩,性平,有毒,可消肿止痒^[1]。古代多以其清热解毒、祛风疗癣、止痛止痢功效入药^[2]。现代研究发现,核桃青皮具有抗菌、抗氧化、杀虫杀螨、抗癌等活性^[3-9]。核桃青皮化学成分复杂,主要含有萜类化合物、黄酮类化合物、芳基庚烷类化合物,同时还含有甾体、萜类、脂肪酸、多糖、维生素 B、维生素 C 等成分^[10-14]。其黄酮类化合物主要包括槲皮素、山奈醇、7-甲基二氢山奈酚(即樱花亭)、金丝桃苷、芦荭苷、胡桃苷等^[15-16]。黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎和免疫调节、抗病毒、解毒护肝和细胞保护、抗菌等多种生物活性^[17-19]。由于采用有机溶剂提取的成本高、安全性低、耗时费事,使其在实际应用中受到限制;水浸提法虽然成本低,但是干扰杂质多,提取率低。超声波辅助提取是利用超声波辐射压强产生的骚动效应、空化效应和热效应来加速物质的扩散溶解,从而有效提高化合物提取的得率和含量的一种技术,具有简便、快速和安全等特点^[20]。响应面分析法是采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来达到参数优化的目的^[21-22]。与传统数理统计方法相比,响应面法使得参数间的交互作用通过有限次试验评估成为可能,成为降低成本优化工艺的一种有效方法。

该试验以核桃青皮为试材,在单因素试验基础上,

利用响应面分析法对其黄酮超声提取工艺条件进行了优化,旨在为核桃黄酮的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试核桃青果于 7 月 3 日采自西北农林科技大学苗圃,将青果置于 4℃ 冰箱冷藏保存备用。无水乙醇、石油醚、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

UV-3100 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);XMTD 电热恒温水浴锅(北京科伟实验仪器设备厂);DZX-6090B 真空干燥箱(上海福玛实验设备有限公司);分析天平 SHIMADZU AU220(苏州丰盛电子科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 核桃青皮黄酮含量的测定 用芦丁标准品通过亚硝酸钠-硝酸铝法^[23-24]制备工作曲线。精确称取 120℃ 干燥至恒重的芦丁标准品 16.53 mg,用 50% 的乙醇定容至 100 mL,摇匀,得芦丁标准溶液 0.165 mg/mL。精密吸取 0、2、4、6、8、10、12 mL 标准溶液,分别置于 25 mL 容量瓶中,然后各加入 1 mL 5% NaNO₂ 溶液,摇匀,静置 6 min,再分别加入 1 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀,静置 6 min 后各加入 5 mL 4% NaOH 溶液混匀,用 50% 乙醇定容,静置 15 min 后,在波长 510 nm 处测其吸光度。芦丁标准曲线回归方程为 $A = 8.5919C - 0.0062$ (C 为芦丁质量浓度(mg/mL), A 为吸光度), $R = 0.9993$,线性范围 0~0.07936 mg/mL。同法测定样品提取液中黄酮的吸光度,通过回归方程计算核桃青皮黄酮的含量。

1.2.2 核桃青皮黄酮提取方法 准确称取 5.0 g 冷藏的新鲜核桃青皮研磨成匀浆,置具塞三角瓶中,加入 80 mL 石油醚 80℃ 回流脱脂 1.5 h。过滤,用石油醚浸

第一作者简介:李红娟(1983-),女,硕士研究生,研究方向为植物资源利用。E-mail:lihongjuan8573@163.com.

责任作者:樊金拴(1958-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物资源利用。E-mail:fanjinshuan@163.com.

基金项目:国家林业局重点推广资助项目([2011]23)。

收稿日期:2013-03-04

洗至无色,待滤渣挥干溶剂后用适量乙醇溶液进行一定条件的超声提取,趁热抽滤,将样液定容待测。黄酮提取率=核桃青皮黄酮含量/核桃青皮质量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 核桃青皮黄酮提取工艺的单因素试验 设置单因素试验,考察超声功率、乙醇体积分数、超声温度、超声时间、静置时间、料液比 6 个因素对核桃青皮黄酮提取率的影响。超声功率对黄酮提取率的影响:准确称取样品 5 g,经回流脱脂后,按料液比 1:20 g/mL 加入体积分数 60% 的乙醇溶液,在 60℃ 条件下,以不同功率(100、200、300、400、500 W)超声提取 2 次,每次 30 min,静置萃取时间为 5 min,考察不同超声功率对黄酮提取率的影响,3 次重复。乙醇体积分数对黄酮提取率的影响:准确称取样品 5 g,经回流脱脂后,按料液比 1:20 g/mL 加入不同体积分数(10%、30%、40%、50%、60%、70%、90%)的乙醇溶液,在 60℃ 条件下,以功率 200 W 超声提取 2 次,每次 30 min,静置萃取时间为 5 min,考察不同乙醇体积分数对黄酮提取率的影响,3 次重复。超声温度对黄酮提取率的影响:准确称取样品 5 g,经回流脱脂后,按料液比 1:20 g/mL 加入体积分数 60% 的乙醇溶液,在不同温度(30、40、50、60、70℃)条件下,以功率 200 W 超声提取 2 次,每次 30 min,静置萃取时间为 5 min,考察不同超声温度对黄酮提取率的影响,3 次重复。超声时间对黄酮提取率的影响:准确称取样品 5 g,经回流脱脂后,按料液比 1:20 g/mL 加入体积分数 60% 的乙醇溶液,在 60℃ 条件下,以功率 200 W 超声提取 2 次,每次 30 min,静置萃取不同的时间(0、5、10、15、20、25 min),考察不同静置时间对黄酮提取率的影响,3 次重复。静置时间对黄酮提取率的影响:准确称取样品 5 g,经回流脱脂后,按料液比 1:20 g/mL 加入体积分数 60% 的乙醇溶液,在 60℃ 条件下,以功率 200 W 超声提取 2 次,每次 30 min,静置萃取不同的时间(0、5、10、15、20、25 min),考察不同静置时间对黄酮提取率的影响,3 次重复。料液比对黄酮提取率的影响:准确称取样品 5 g,经回流脱脂后,按不同的料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)加入体积分数 60% 的乙醇溶液,在 60℃ 条件下,以功率 200 W 超声提取 2 次,每次 30 min,静置萃取时间为 5 min,考察不同料液比对黄酮提取率的影响,3 次重复。

1.2.4 响应面法对黄酮提取工艺的优化 在单因素试验基础上,确定超声功率为 200 W,料液比 1:20 g/mL,采用 Design-Expert 8.0.5.0 软件,根据 Box-Behnken (BBD)设计原理,选取乙醇体积分数、超声温度、超声时间、静置时间 4 个影响因素,通过 4 因素 3 水平的响应面分析法,对核桃青皮黄酮的超声提取工艺进行优化,试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析试验因素及水平

Table 1 Variables and levels in the response surface design

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 超声温度/℃	C 超声时间/min	D 静置时间/min
-1	50	40	20	0
0	60	50	30	5
1	70	60	40	10

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声功率对黄酮提取率的影响 由图 1 可知,在超声功率为 200 W 时,黄酮的提取率达到最大值。当超声功率进一步增强时,提取率反而逐渐下降,可能是由于随着超声功率的增强,体系温度升高,一方面增加了提取溶剂的挥发,另一方面可能是黄酮物质的结构被破坏,最终导致提取率的降低。从能耗的角度考虑,使用低功率的超声波强度更经济合理。

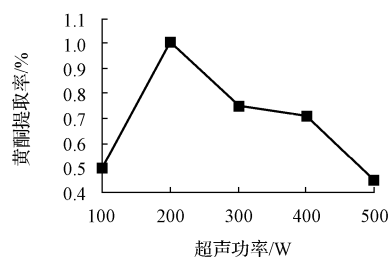


图 1 超声功率对黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on yield of flavonoids

2.1.2 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响 由图 2 可以看出,黄酮提取率随乙醇体积分数的增加呈先升后降的趋势,在 60% 时达到最大值。乙醇浓度过高,导致溶剂挥发增大,同时一些醇溶性的杂质溶出增加,干扰黄酮类化合物的浸出,从而导致提取率的下降。

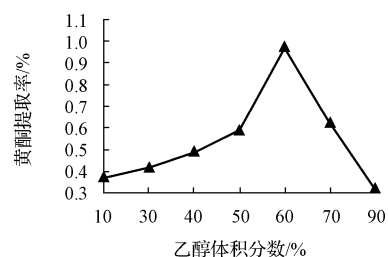


图 2 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of volume fraction of ethanol on yield of flavonoids

2.1.3 超声温度对黄酮提取率的影响 由图 3 可知,随着超声温度的提高,黄酮提取率也逐渐增加,当温度超过 50℃ 时,又逐渐下降。这可能是由于温度过高,溶剂的挥发量增加,同时高温也可能导致黄酮物质的结构发生改变,稳定性降低,提取率随之降低。

2.1.4 超声时间对黄酮提取率的影响 由图 4 可知,

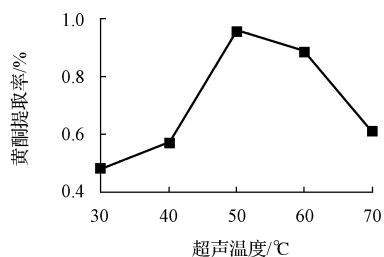


图3 超声温度对黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic temperature on yield of flavonoids

随着超声处理时间的延长,黄酮提取率先上升,超过30 min后又降低。可能是由于长时间的超声处理,导致溶液温度升高,影响了黄酮物质的稳定性。因此,最佳的超声时间为30 min。

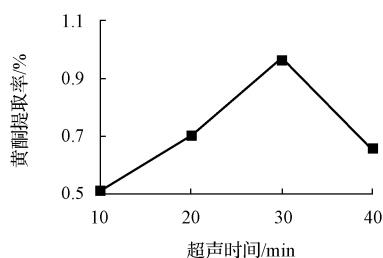


图4 超声时间对黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic time on yield of flavonoids

2.1.5 静置时间对黄酮提取率的影响 从图5可以看出,静置时间为5 min时,黄酮提取率达到最大值,之后随着静置时间的增加,黄酮提取率呈下降趋势,且变化波动较小。

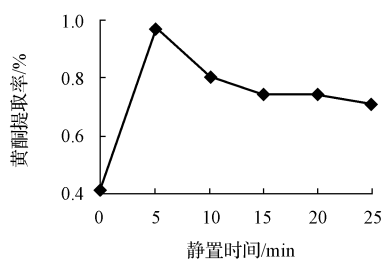


图5 静置时间对黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of standing time on yield of flavonoids

2.1.6 料液比对黄酮提取率的影响 从图6可以看出,黄酮提取率随溶剂用量的增加呈先升、后降渐趋于缓慢的变化过程。这是由于当溶剂用量适当时,有效成分已基本溶出,溶剂用量增加过大,增加了后续操作的困难,从考虑经济能耗方面,采用1:20的料液比合适。

2.2 响应面分析法优化核桃青皮黄酮提取工艺条件

在单因素试验基础上,选定乙醇体积分数(%)、超声温度(°C)、超声时间(min)和静置时间(min)为自变量,按照 Box-Behnken 设计原理(BBD)的试验方案进行4因素3水平试验,试验结果见表2。该研究共有29个试验点,其

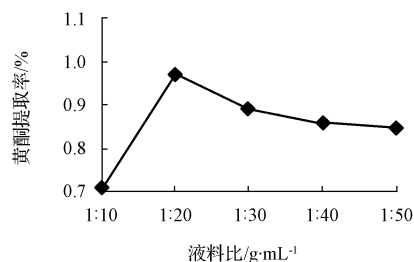


图6 液料比对黄酮提取率的影响

Fig. 6 Effect of solid-liquid ratio on yield of flavonoids

中中心点有5个,用于估计试验误差。由软件分析,得到的回归方程为: $Y = 1.0668 + 0.05066A + 0.0083333B + 0.0355C + 0.046667D - 0.00225AB - 0.019AC - 0.03425AD + 0.00425BC - 0.002BD - 0.02625CD - 0.10365A^2 - 0.08415 \times B^2 - 0.11965C^2 - 0.06315D^2$ 。

表2 中心组合试验设计与结果

Table 2 Design and results of the Box-Behnken experiment

试验号	A 乙醇体积 分数/%	B 超声温度 /°C	C 超声时间 /min	D 静置时间 /min	Y 黄酮提取率 /%
1	0	1	0	-1	0.878
2	1	0	-1	0	0.873
3	0	0	0	0	1.052
4	-1	0	-1	0	0.739
5	-1	0	1	0	0.846
6	0	0	0	0	1.069
7	0	0	1	-1	0.897
8	1	1	0	0	0.933
9	0	1	0	1	0.972
10	1	0	1	0	0.904
11	0	-1	0	1	0.959
12	0	0	0	0	1.079
13	0	0	0	0	1.063
14	1	0	0	-1	0.945
15	0	-1	-1	0	0.822
16	0	0	-1	1	0.921
17	0	-1	0	-1	0.857
18	-1	0	0	1	0.932
19	0	1	1	0	0.921
20	0	0	1	1	0.935
21	0	1	-1	0	0.835
22	-1	1	0	0	0.834
23	1	0	0	1	0.968
24	0	-1	1	0	0.891
25	0	0	0	0	1.071
26	0	0	-1	-1	0.778
27	-1	-1	0	0	0.818
28	1	-1	0	0	0.926
29	-1	0	0	-1	0.772

由表3可知, $P < 0.0001$,表明模型方程回归显著,结果可靠。同时模型的失拟性 $P = 0.8806$,不显著,表明模型的误差小。模型的决定系数(R^2)为0.9965,说明自变量与响应值之间关系显著。综上所述,此模型对试验结果的拟合性良好,利用回归方程对试验进行分析和预测是合理的。方差分析的结果表明,乙醇体积分数、超

声温度、超声时间和静置时间都是影响黄酮提取率的极显著因素($P < 0.01$)。4个因素的交互作用中,乙醇体积分数与超声时间、乙醇体积分数与静置时间、超声时间与静置时间之间的交互作用对黄酮提取率的影响为极显著($P < 0.01$),其它交互作用均不显著($P > 0.05$)。根据二元回归方程的各系数绝对值的大小可判断4个因素对黄酮提取率的影响顺序^[25]为乙醇体积分数>静置时间>超声时间>超声温度。将上述回归方程中不显著项($P > 0.05$)删除,简化调整后得到新模型 $P < 0.0001$,失拟性为0.9044,失拟不显著。模型的决定系数($R^2 = 0.9961$)降幅很小,可信度高。简化后回归方程:
 $Y = 1.0668 + 0.050667A + 0.00833333B + 0.0355C + 0.046667D - 0.019AC - 0.03425AD - 0.02625CD - 0.10365A^2 - 0.08415B^2 - 0.11965C^2 - 0.06315D^2$ 。

表3 回归方程方差分析结果

Table 3 Variance analysis of regression equation for the yield of flavonoids

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.240	14	0.017	288.24	<0.0001
A	0.031	1	0.031	521.62	<0.0001
B	8.333×10^{-4}	1	8.333×10^{-4}	14.11	0.0021
C	0.015	1	0.015	256.07	<0.0001
D	0.026	1	0.026	442.51	<0.0001
AB	2.025×10^{-5}	1	2.025×10^{-5}	0.34	0.5675
AC	1.444×10^{-3}	1	1.444×10^{-3}	24.45	0.0002
AD	4.692×10^{-3}	1	4.692×10^{-3}	79.45	<0.0001
BC	7.225×10^{-5}	1	7.225×10^{-5}	1.22	0.2873
BD	1.600×10^{-5}	1	1.600×10^{-5}	0.27	0.6108
CD	2.756×10^{-3}	1	2.756×10^{-3}	46.67	<0.0001
A ²	0.070	1	0.07	1179.98	<0.0001
B ²	0.046	1	0.046	777.76	<0.0001
C ²	0.093	1	0.093	1572.40	<0.0001
D ²	0.026	1	0.026	438.01	<0.0001
残差	8.268×10^{-5}	14	5.906×10^{-5}		
失拟项	4.220×10^{-3}	10	4.220×10^{-5}	0.42	0.8806
误差项	4.048×10^{-3}	4	1.012×10^{-4}		
总和	0.24	28			

交互作用分析回归方程经优化后,固定任意2个因素在零水平,通过响应面图可以比较直观的反映各因素间的交互作用,见图7~9。

由图7可知,乙醇体积分数和超声时间的等高线排列紧密,表明交互作用对黄酮提取率的影响显著。在一定范围内,随着乙醇体积分数、超声时间的增加,黄酮提取率先是呈上升趋势,当超过一定值后,反而下降。这与单因素分析的结果相一致。

由图8可知,乙醇体积分数和静置时间的响应面坡度较陡,等高线排列紧密,且趋于椭圆形,表明其交互作用对黄酮提取率的影响显著。乙醇体积分数在较低水平时,静置时间的响应抛物线曲线的最高点也在较低水平;随着乙醇体积分数的增加,静置时间的响应抛物线曲线的最高点也随之增加。在乙醇体积分数60%~65%,

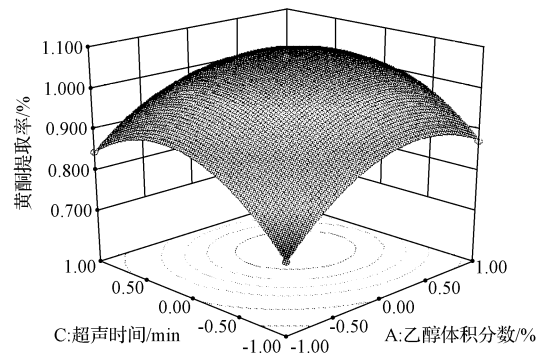


图7 乙醇体积分数和超声时间对黄酮提取率的影响

Fig. 7 Response surface of the effect of ethanol concentration and ultrasonic time on the yield of total flavonoids

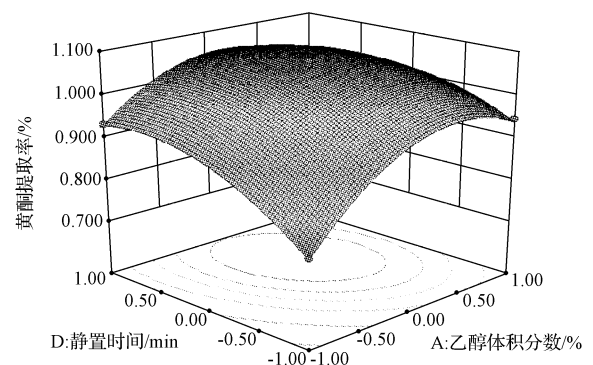


图8 乙醇体积分数和静置时间对黄酮提取率的影响

Fig. 8 Response surface of the effect of ethanol concentration and standing time on the yield of total flavonoids

静置时间5~8 min范围内,响应值较大。

由图9可知,超声时间和静置时间的交互作用显著。随着超声时间的增加,静置时间的响应抛物线最高点向高水平方向移动。超声时间在25~35 min,静置时间5~8 min范围内,响应值较大。

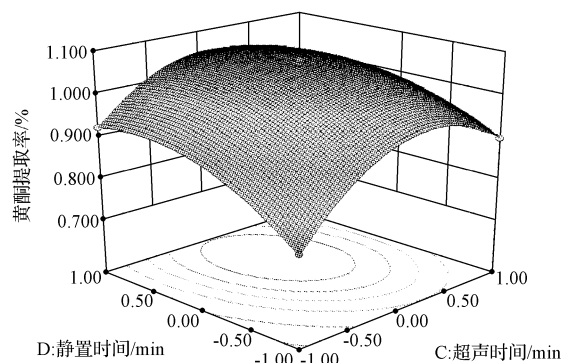


图9 超声时间和静置时间对黄酮提取率的影响

Fig. 9 Response surface of the effect of ultrasonic time and standing time on the yield of total flavonoids

2.3 模型的验证

在试验条件范围内,通过软件分析,得到的最佳工艺条件为乙醇体积分数61.9%、超声温度50.5℃、超声

时间 31 min、静置时间 6.5 min。考虑到实际操作的便利,将条件修正为乙醇体积分数 62%、超声温度 51℃、超声时间 31 min、静置时间 6.5 min,在此修正条件下,实际测得提取率为 1.077%,实际值比理论预测值低 0.003%。因此,采用 RSM 法优化得到的工艺条件参数准确可靠。

3 结论与讨论

该试验以核桃青皮为原料,对其黄酮的超声提取工艺进行了优化,对提高核桃资源的综合利用具有较大的现实意义。采用响应面分析法优化核桃青皮黄酮的提取工艺,在功率为 200 W,超声 2 次的情况下,得到最佳工艺条件为乙醇体积分数 62%、超声温度 51℃、超声时间 31 min、静置时间 6.5 min,此条件下核桃青皮黄酮实际提取率达 1.077%。

超声处理,使得细胞破裂,加速了有效成分的溶出,具有极大优越性。该方法省时、高效、节能。但是在超声过程中可能产生自由基,从而破坏活性成分的活性。目前进行的一些研究仅停留在实验室阶段,需进一步探讨工艺放大问题。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组编. 全国中草药汇编上册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996.
- [2] 江苏新医学院·中药大辞典·下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1544.
- [3] Oliveira I, Sousa A, Ferreira I C F R, et al. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46: 2326-2331.
- [4] 翟梅枝,王磊,何文君,等. 核桃青皮乙醇提取物抑菌活性研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(12): 2542-2547.
- [5] Rahimiphnah M, Hamed M, Mirzapour M. Antioxidant activity and phenolic contents of Persian walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract[J]. Afr J Food Sci Technol, 2010, 1(4): 105-111.
- [6] 王宏虬,缪福俊,李彪,等. 核桃青皮提取物对马铃薯蚜虫与瓢虫的杀虫活性[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(7): 112-114.
- [7] 王海香,申照静,杜娟,等. 核桃青皮提取物对朱砂叶螨的毒力及相
- 关酶活性的测定[J]. 林业科学, 2008, 44(5): 70-74.
- [8] Carvalho M, Ferreira P J, Men des V S, et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48: 441-447.
- [9] Alshatwi A A, Hasan T N, Shafi G, et al. Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of *Juglans regia* L. on PC-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.
- [10] Liu J X, Di D L, Wei X N, et al. Cytotoxic diarylheptanoids from the pericarps of walnuts (*Juglans regia*) [J]. Planta Med, 2008, 74: 621-627.
- [11] 翟梅枝,晏婷,王元,等. 胡桃属植物青皮和叶的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 西北植物学报, 2011, 31(10): 2133-2138.
- [12] 李海洋,韩军岐,李志西. 核桃青皮有效化学成分提取分离研究综述[J]. 现代园艺, 2012(15): 9-11.
- [13] Cosmulescu S, Trandafir I, Achim G, et al. Phenolics of green husk in mature walnut fruits[J]. Not Bot Hort Agrobot Cluj, 2010, 38(1): 53-59.
- [14] Cosmulescu S, Trandafir I, Achim G, et al. Juglone content in leaf and green husk of five walnut (*Juglans regia* L.) cultivars[J]. Not Bot Hort Agrobot Cluj, 2011, 39(1): 237-240.
- [15] 杨金枝,陈锦屏. 核桃资源的综合开发利用[J]. 食品与药品, 2007, 9(4): 71-73.
- [16] 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.
- [17] Rong T. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols [J]. Nutrients, 2010, 2: 1231-1246.
- [18] Yao L H, Jiang Y M, Shi J, et al. Flavonoids in food and their health benefit[J]. Plant Food Hum Nutr, 2004, 59: 113-122.
- [19] Kelly E H, Anthony R T, Dennis J B. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships[J]. Nutr Biochem, 2002, 13(10): 572-584.
- [20] 唐浩国. 黄酮类化合物研究[M]. 北京:科学出版社, 2009.
- [21] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
- [22] 王永非,王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005, 14(3): 236-240.
- [23] 张守梅,许奇志,张立杰,等. 乙醇法提取枇杷叶总黄酮的研究[J]. 福建果树, 2011(2): 6-10.
- [24] 孙墨珑,宋湛谦,方桂珍. 核桃楸总黄酮的提取工艺[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(1): 38-39.

Response Surface Methodology for the Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from Walnut Green Husk

LI Hong-juan, FAN Jin-shuan, ZHENG Tao, ZHAO Yun-mei, SU Rui, GAO Zhi-hui
(Academy of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking walnut green husk as materials, six factors including ultrasonic power, ethanol concentration, ultrasonic temperature, ultrasonic time, ratio of solid to liquid and standing time were selected, on the basis of single-factor experiments, the Box-Behnken design (BBD) was used to establish a quadric regression equation for predicting the yield of flavonoids. The results showed that the ethanol volume fraction 62%, ultrasonic temperature 51℃, ultrasonic time 31 min, standing time 6.5 min was the optimization of extraction technology, which led to estimated and observed values of maximal yield of flavonoids of 1.080% and 1.077%, respectively. It suggested that the optimal extraction conditions were reliable.

Key words: walnut green husk; flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface analysis