

胶束絮凝反溶剂重结晶法纯化落叶松木中二氢槲皮素工艺优化

刘艳坤^{1,2}, 霍志伟^{1,2}, 蔡宏达^{1,2}, 张文杰^{1,2}, 杨帆^{1,2}, 赵修华^{1,2*}

¹东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨

²森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2026年4月16日; 录用日期: 2026年4月28日; 发布日期: 2026年5月26日

摘要

为解决二氢槲皮素工业化纯化效率低、环境污染大、成本高的问题, 本研究以落叶松木粉为原料, 构建绿色胶束絮凝-反溶剂重结晶集成纯化工艺, 重点优化工艺参数并明确纯化核心机制。通过筛选表面活性剂与絮凝剂组合, 确定茶皂素与壳聚糖为最优组合, 絮凝率达85.3%, 絮凝后二氢槲皮素纯度为27.8%; 以重结晶纯度和收率为响应值, 采用单因素实验结合响应面法优化关键参数, 确定最佳工艺为乙醇与水体积比1:10、结晶温度16°C、结晶时间48 h, 此条件下二氢槲皮素一次重结晶纯度达94.88%, 收率为38.92%。通过Zeta电位和荧光探针技术验证了胶束絮凝的电荷中和与疏水包载协同作用机制, 为该工艺的工业化应用提供理论支撑。本方法简化了分离步骤, 减少有害有机溶剂使用, 兼具环保性与经济性, 为二氢槲皮素的规模化纯化提供了可行方案, 也为天然产物绿色的纯化技术提供了新思路。

关键词

二氢槲皮素, 落叶松, 胶束絮凝, 反溶剂重结晶, 工艺优化, 纯化机制

Optimization of Purification Process of Dihydroquercetin from Larch by Micellar Flocculation Anti-Solvent Recrystallization

Yankun Liu^{1,2}, Zhiwei Huo^{1,2}, Hongda Cai^{1,2}, Wenjie Zhang^{1,2}, Fan Yang^{1,2}, Xiuhua Zhao^{1,2*}

¹College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

²Forest Plant Ecology Key Laboratory of the Ministry of Education, Harbin Heilongjiang

Received: April 16, 2026; accepted: April 28, 2026; published: May 26, 2026

*通讯作者。

文章引用: 刘艳坤, 霍志伟, 蔡宏达, 张文杰, 杨帆, 赵修华. 胶束絮凝反溶剂重结晶法纯化落叶松木中二氢槲皮素工艺优化[J]. 药物化学, 2026, 14(2): 188-204. DOI: 10.12677/hjmce.2026.142019

Abstract

To address the challenges of low efficiency, high environmental pollution, and high cost in the industrial purification of dihydroquercetin, this study developed an integrated purification process combining green micellar flocculation and anti-solvent recrystallization using larch wood powder as the raw material. The process parameters were optimized, and the core purification mechanism was elucidated. By screening combinations of surfactants and flocculants, tea saponin and chitosan were identified as the optimal pair, achieving a flocculation rate of 85.3% and a dihydroquercetin purity of 27.8% after flocculation. Using recrystallization purity and yield as response values, single-factor experiments combined with response surface methodology were employed to optimize key parameters. The optimal conditions were determined as an ethanol-to-water volume ratio of 1:10, a crystallization temperature of 16°C, and a crystallization time of 48 hours. Under these conditions, the purity of dihydroquercetin after a single recrystallization reached 94.88%, with a yield of 38.92%. The synergistic mechanism of charge neutralization and hydrophobic encapsulation in micellar flocculation was verified through Zeta potential and fluorescence probe techniques, providing theoretical support for the industrial application of this process. This method simplifies the separation steps, reduces the use of harmful organic solvents, and is both environmentally friendly and economically viable. It offers a feasible solution for the large-scale purification of dihydroquercetin and provides new insights into green purification technologies for natural products.

Keywords

Dihydroquercetin, Larch, Micellar Flocculation, Anti-Solvent Recrystallization, Process Optimization, Purification Mechanism

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ, 又称花旗松素, Taxifolin), 主要来源于松科植物西伯利亚落叶松(*Larix sibirica*)、兴安落叶松(*Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen.)和花旗松(*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)等[1]。二氢槲皮素[2]是一种具有抗氧化[3]、抗炎及抗肿瘤活性的天然黄酮类化合物[4], 在食品与制药领域具有重要应用价值[5] [6]。近年来, DHQ (来自落叶松)已被欧盟批准为新型食品成分, DHQ 被授权既可作为食品成分使用, 也可作为添加剂使用, 并被纳入俄罗斯国家药典。它广泛应用于制药、功能性食品和化妆品, 市场需求不断增长[7]。市面常见工业化生产 DHQ 的核心原料为落叶松的木材与树皮, 生产方式发展近乎成熟, 通过微波辅助提取法、超声辅助法、超临界流体提取法, 还有生物合成等先进手段进行生产[8]-[10]。目前其绿色高效纯化技术仍是制约规模化应用的瓶颈[11], 传统柱层析法虽能实现高纯度分离, 却存在操作繁琐、耗时久、成本高, 依赖大量有机溶剂对工厂安全性等级要求高且环境污染大的问题[12], 难以满足工业化生产需求。

近年来, 表面活性剂[13]辅助提取与絮凝技术的结合为简化纯化流程提供了新思路, 胶束絮凝技术因具有选择性富集、操作简便的优势, 成为天然产物初步纯化的研究热点; 例如, 杨帆等利用茶皂素胶束体系显著提升了 DHQ 提取效率, 并通过絮凝法初步去除杂质[14], 避免了繁琐的层析分离[15]。类似地, 李璐瑶用壳聚糖絮凝技术从山楂果叶中纯化总黄酮, 收率提高 15%, 且工艺稳定性良好[16]。这些研究凸

显了胶束絮凝技术在目标产物选择性富集中的潜力。反溶剂重结晶法则以溶剂消耗低、纯化效率高的特点，在天然产物精制中得到广泛应用。但现有研究多聚焦于单一工艺的参数优化，对胶束絮凝与反溶剂重结晶的耦合工艺研究不足，且缺乏对耦合工艺关键参数的系统优化及絮凝纯化核心机制的明确验证。Sun 等通过优化乙醇-水体系的反溶剂比例，成功将山楂中黄酮纯度提升至 90%以上，且无需柱层析步骤[17]。

然而，现有研究多聚焦于单一工艺参数的优化，对多技术联用及协同机制的系统性研究仍显不足。例如，胶束絮凝与反溶剂重结晶的耦合工艺在 DHQ 纯化中的应用尚未深入探索，且关键参数(如表面活性剂-絮凝剂组合、结晶动力学)的调控机制仍需进一步阐明。基于此，本研究以俄罗斯落叶松木粉为原料，构建胶束絮凝-反溶剂重结晶纯化工艺，为优化该工艺的关键参数，提升 DHQ 的纯化效率和产品结晶纯度，并验证胶束絮凝的纯化机制，为省去柱层析步骤、实现 DHQ 的绿色生产工业化及纯化提供技术支撑和理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

原料与试剂：俄罗斯落叶松木材(牡丹江灵泰药业股份有限公司)；二氢槲皮素标准品(98%，上海麦克林生物科技股份有限公司)；甲醇(色谱纯)、无水乙醇(分析纯)、乙腈(色谱纯)、乙酸乙酯(分析纯)(湖北弗顿实业/化学试剂有限公司)；茶皂素(40%)、十二烷基磺酸钠(95%)、十二烷基硫酸钠(99%)、月桂醇醚硫酸钠(70%)、脂肪醇聚氧乙烯硫酸钠(98%) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司)；壳聚糖、氧化钙、明矾(分析纯，市售)。

仪器：Waters-2487 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司)；98-1-B 型加热套(天津市泰斯特仪器有限公司)；RE-201D 型旋转蒸发器(河南华特仪器设备有限公司)；FTT-2500T 型粉碎机(东莞市房太电器有限公司)；超高效液相色谱仪、台式高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司)；激光粒度仪(马尔文帕纳科)；流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 工艺流程

本研究核心为胶束絮凝初步纯化-反溶剂重结晶精制的耦合工艺，工艺流程图如下(图 1)。

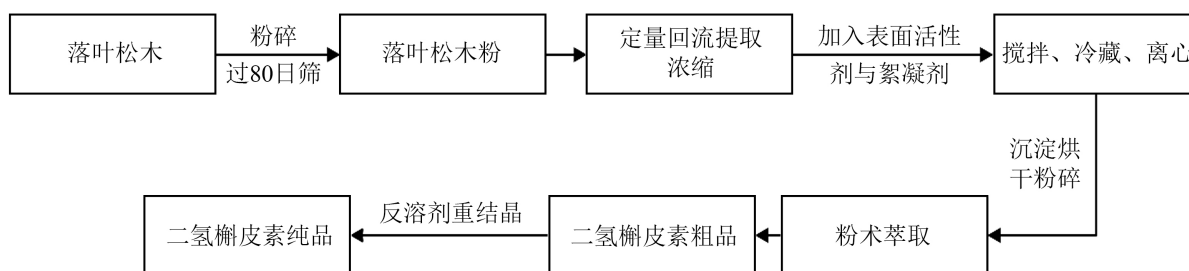


Figure 1. Process flow chart
图 1. 工艺流程图

操作要点：将落叶松木粉经粉碎机粉碎至粉末，过 80 目筛后保存备用。按质量料液比 1:8，将一定量的落叶松木粉混匀，放入烧瓶中回流提取三次。3 次提取完成后过滤，合并收集提取液，使用纯露机将提取液浓缩至规定体积，浓缩后冷藏备用。

浓缩液中加入表面活性剂与絮凝剂, 搅拌 30 min 后在 4000 r/min 转速下, 离心 10 min, 进行固液分离, 上清液使用液相色谱检测 DHQ 含量, 计算絮凝率。收集沉淀物, 放入 70℃ 烘箱内烘干, 烘干结束后使用粉碎机粉碎成干粉, 加入一定量的乙酸乙酯萃取干粉, 4000 r/min 转速下离心收集萃取液, 萃取液使用液相色谱检测, 测定萃取率。将萃取液与旋转蒸发仪中旋干溶剂, 得 DHQ 粗品, 回收的乙酸乙酯可重复使用。将 DHQ 用乙醇溶解, 加入一定比例超纯水, 搅拌 30 min, 进行固液分离, 去除杂质, 收集上清液, 上清液加入微量 DHQ 纯品作为晶种, 定向析晶, 得到 DHQ 纯品, 纯品使用液相色谱检测检测纯度。

2.2.2. HPLC 法测定二氢槲皮素条件

色谱柱为 Diamonsil C18 反相柱(250 mm × 4.6 mm); 流动相为乙腈:水:醋酸 = 30:70:0.1%; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 298 nm; 柱温为 28℃; 进样量为 10 μL [18]。

HPLC 标准曲线的建立: 精确称取 50 mg DHQ 标准品, 用甲醇定容至 50.00 mL, 得到 1000 μg/mL 的 DHQ 标准品母液。采用对半稀释法, 配得的 DHQ 标准液, 按照上述 HPLC 检测方法进行测定。建立色谱条件, 对不同浓度的对照品进行峰面积的检测, 以峰面积 Y 为纵坐标, 以 DHQ 浓度 X (mg/mL) 为横坐标, 绘制 DHQ 标准曲线, 计算回归方程。

2.2.3. 测定落叶松木中二氢槲皮素含量

将适量的落叶松树干木块放入粉碎机粉碎, 并通过 120 目筛后得落叶松木粉, 将过筛后木粉进行烘干处理。取 100 g 木粉放入烧瓶, 加入 1 L 乙醇, 进行 1 h 加热回流提取。过滤后, 将滤渣再次加入 1 L 乙醇, 重复加热回流提取四次。每次从提取液中取出 1 mL 进行 HPLC 检测, 最后计算出四次提取的 DHQ 总量[19]。

2.2.4. 二氢槲皮素提取相关计算方法

$$W\% = \frac{c1 \times D \times V}{M} \times 100\%$$

式中: W 表示提取率, %; c1 表示根据峰面积值计算出的样品中 DHQ 浓度, mg/mL; D 表示溶液稀释倍数; V 表示供试品溶液体积, mL; M 表示二氢槲皮素总量, mg。

$$N\% = \frac{M2 - c1 \times D \times V}{M2} \times 100\%$$

式中: N 表示絮凝率, %; c1 表示根据峰面积值计算出的样品中 DHQ 浓度, mg/mL; D 表示溶液稀释倍数; V 表示供试品溶液体积, mL; M2 表示二氢槲皮素提取量, mg。

$$Z\% = \frac{c2 \times D \times V}{M3} \times 100\%$$

式中: Z 表示萃取率, %; c2 表示根据峰面积值计算出的萃取样品中 DHQ 浓度, mg/mL; D 表示溶液稀释倍数; V 表示供试品溶液体积, mL; M3 表示二氢槲皮素絮凝物质量, mg。

$$X\% = \frac{c3 \times D \times V}{M4} \times 100\%$$

式中: X 表示纯度, %; c3 表示根据峰面积值计算出的粗提物中 DHQ 浓度, mg/mL; D 表示溶液稀释倍数; V 表示供试品溶液体积, mL; M4 表示称取 DHQ 粗提物质量, mg。

$$Y\% = \frac{c4 \times D \times V}{M5} \times 100\%$$

式中: Y 表示重结晶纯度, %; c4 表示根据峰面积值计算出的重结晶产物中 DHQ 浓度, mg/mL; D 表示

溶液稀释倍数；V 表示供试品溶液体积，mL；M5 表示称取 DHQ 重结晶产物质量，mg。

2.2.5. 阴离子表面活性剂的筛选与絮凝剂的筛选

通过预实验，选定了几种表面活性剂能与絮凝剂发生絮凝沉降[20][21]，本实验选取了十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠、月桂醇醚硫酸钠、茶皂素五种表面活性剂[22]-[24]，选定了壳聚糖、氧化钙、明矾为絮凝剂[25]-[27]，称取 10 g 落叶松木粉，以质量计算料液比为 1:10，提取时间为 1 h，提取次数为 3 次条件下进行提取，提取结束后加入表面活性剂和絮凝剂，表面活性剂浓度为提取液体积的 2%，絮凝剂按表面活性剂质量的 1/10 的条件下添加，测定不同絮凝剂下 DHQ 的絮凝率与纯度。

2.2.6. 单因素实验

经预实验，发现影响 DHQ 重结晶的因素主要包括：反溶剂水添加量、结晶时间、结晶温度、现利用单因素法对这三个因素进行优化，具体优化考察范围及水平设定如表 1 所示。

Table 1. Experimental parameters of single factor optimization
表 1. 单因素优化法的实验参数值

添加乙醇:水比例	结晶时间/h	结晶温度/℃
1:2	12	1
1:5	24	2
1:10	36	3
1:15	48	4
1:20	60	5

1) 反溶剂水添加量对二氢槲皮素重结晶得率的影响

称取 10 g DHQ 粗品，用 10 ml 乙醇加热充分溶解，加入 20 ml, 50 mL, 100 ml, 150 ml, 200 ml 水，(乙醇：水分别为 1:2；1:5；1:10；1:15；1:20)搅拌 30 min 离心去除析出杂质，取上清液置于 4℃ 下进行重结晶，48 h 后收集重结晶沉淀，真空干燥后计算重结晶纯度以及收率。

2) 结晶时间对二氢槲皮素重结晶得率的影响

称取 10 g DHQ 粗品，用 10 ml 乙醇对其进行溶解，充分溶解后，加入 100 ml 水，离心去除析出杂质，搅拌 30 min 取上清液置于 4℃ 下进行重结晶，结晶时间分别为 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h，真空干燥后计算重结晶纯度以及收率。

3) 结晶温度对二氢槲皮素重结晶得率的影响

称取 10 g DHQ 粗品，用 10 ml 乙醇对其进行溶解，充分溶解后，加入 100 ml 水，离心去除析出杂质，搅拌 30 min 取上清液分别置于 4℃, 8℃, 12℃, 16℃, 20℃ 进行重结晶，真空干燥后计算重结晶纯度以及收率。

2.2.7. 响应面优化实验

依据单因素试验结果，采用 Design Expert 13 软件进行三因素三水平的二响应值的响应面试验[28]，优化结晶工艺条件。设计方案及试验以 DHQ 重结晶纯度和收率为响应值，对乙醇：水体积分数、结晶温度、结晶时间三个因素进行响应面设计[29]。响应面实验因素及水平见表 2。

Table 2. Experimental factors and levels of response surface**表 2.** 响应面实验因素及水平

水平	A 乙醇:水(v:v)	B 结晶温度(°C)	结晶时间(h)
-1	1:5	12	36
0	1:10	16	48
1	1:15	20	60

2.2.8. 絮凝提取荧光检测

将提取液与 6%茶皂素溶液分别进行壳聚糖处理,各体系加入 2%壳聚糖溶液经搅拌和离心处理后收集上清液。采用激光粒度仪系统检测五组样品的 Zeta 电位:未处理提取液原液、未处理茶皂素原液、絮凝后提取液上清、絮凝后茶皂素上清及纯壳聚糖溶液,每组实验平行测定三次并计算平均值。在荧光分析阶段,预先配制 0.1 mg/mL 浓度的尼罗红与香豆素-6 乙醇溶液作为荧光探针。分别取 1 mL 上述两种染料加入 40 mL 6%茶皂素溶液中充分混匀,随后进行壳聚糖絮凝处理并收集上清。流式细胞仪检测参数设置如下:对未标记体系及其絮凝上清,分别在 480 nm 激发波长下检测 575 nm 通道荧光信号,在 468 nm 激发波长下检测 517 nm 通道本底值;对染料标记体系及其絮凝上清,对应检测 575 nm (尼罗红体系)和 517 nm (香豆素-6 体系)的荧光强度变化[15]。

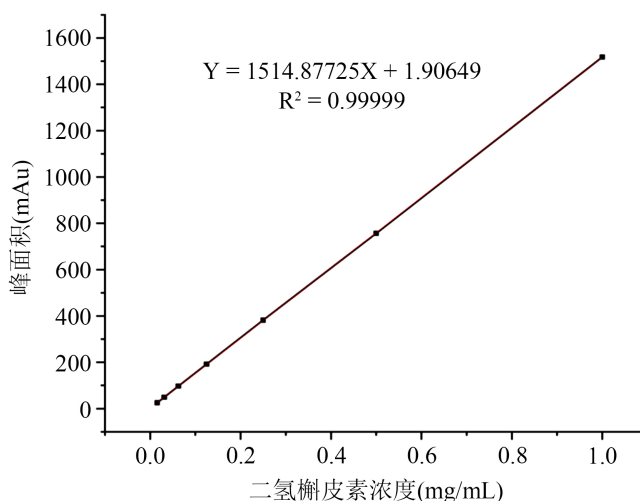
2.3. 数据处理

每组实验平行做 3 次,结果取平均值,使用 SPSS 27、Origin 2022 处理数据。采用 Design Expert 13 进行响应面试验设计及数据分析。

3. 结果与分析

3.1. 二氢槲皮素标准曲线建立

根据 HPLC 法测定 DHQ 的条件,以峰面积 Y 为纵坐标,以 DHQ 浓度 X 为横坐标,绘制 DHQ 标准曲线,如图 2 所示,标准线性回归方程及相关系数为: $Y = 1514.87725X + 1.90649$, $R^2 = 0.99999$ 。结果表明, DHQ 在 0.015625~1 mg/mL 范围内呈现出良好的线性关系,可用于后续实验分析。

**Figure 2.** Standard curve for dihydroquercetin**图 2.** 二氢槲皮素标准曲线

以烘干后的落叶松树干为原料分次提取 DHQ 总量如表 3 所示, 乙醇回流法重复四次, 100 g 原料共提取到 2.623 gDHQ, 计算得 DHQ 总含量为 2.623%, 后续实验中落叶松 DHQ 的总含量以乙醇回流法测得的 2.623%为基准计算。

Table 3. Total dihydroquercetin
表 3. 二氢槲皮素总量

次数	提取量(g)	占比(%)
第一次	1.858	70.6
第二次	0.477	18.1
第三次	0.155	5.9
第四次	0.133	5.4

3.2. 表面活性剂的筛选与絮凝剂的筛选

Table 4. Screening of surfactants and flocculants
表 4. 表面活性剂与絮凝剂的筛选

表面活性剂与絮凝剂	絮凝率(%)	纯度(%)
十二烷基磺酸钠与壳聚糖	13.8	6.5
脂肪醇聚氧乙烯硫酸钠与壳聚糖	64.2	10.5
月桂醇醚硫酸钠与壳聚糖	19.4	5.7
十二烷基硫酸钠与壳聚糖	18.3	5.4
茶皂素与壳聚糖	85.3	27.8
十二烷基磺酸钠与氧化钙	23.5	7.6
脂肪醇聚氧乙烯硫酸钠与氧化钙	22.8	9.8
月桂醇醚硫酸钠与氧化钙	33.6	12.9
十二烷基硫酸钠与氧化钙	-	-
茶皂素与壳与氧化钙	-	-
十二烷基磺酸钠与明矾	23.9	6.7
脂肪醇聚氧乙烯硫酸钠与明矾	33.8	10.5
月桂醇醚硫酸钠与明矾	18.6	8.6
十二烷基硫酸钠与明矾	-	-
茶皂素与明矾	23.5	8.26

由表 4 所示,对比不同表面活性剂与絮凝剂对 DHQ 的絮凝与纯度的影响,不同表面活性剂与絮凝剂的组合表现出显著的差异,茶皂素与壳聚糖的组合提取效率远高于其他组合,茶皂素的表面活性剂两亲性作用将 DHQ 包裹住,由于壳聚糖静电吸附将茶皂素絮凝更加完全,使得在絮凝物中 DHQ 含量更高,对于 DHQ 后续的纯化具有很好的优势;脂肪醇聚氧乙烯硫酸钠与壳聚糖的组合絮凝率良好,但是乙酸乙酯把表面活性剂里面的杂质也萃取了出来,萃取后的 DHQ 纯度较低。后续纯化以茶皂素壳聚糖絮凝的 DHQ 为起始纯度。

3.2.1. 反溶剂水添加量对二氢槲皮素纯度的影响

由图 3 可知随着水比例的增加(乙醇比例降低),产物纯度呈单调递减趋势。当乙醇:水添加量比例为 1:2 时,由于水的比例较小,无法将 DHQ 中的杂质充分反溶剂除去,当乙醇:水为 1:10 时,纯度达到峰值(93.8%);但当比例扩大至 1:20 时,纯度显著下降至 86.5%。当水比例增加时,杂质的溶解度降低,导致更多杂质随产物析出,纯度下降。反观 DHQ 的纯度与收率的趋势一致,当乙醇:水比例过低时,无法溶解更多的 DHQ,被当做杂质去除,水的比例过高时,又溶解了更多的 DHQ,导致收率降低。综合纯度和收率的变化规律,乙醇:水比例为 1:10 时展现出最佳平衡点,此时纯度为 93.8%,收率为 40.2%。该条件既能保证较高的产物回收效率,又可维持中等纯度水平,适用于工业化生产。

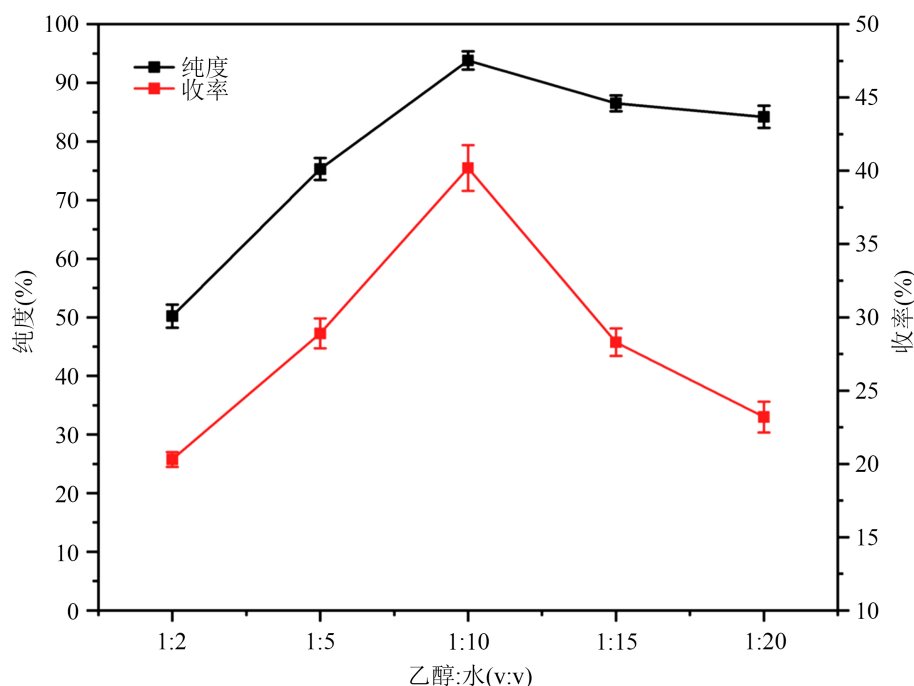


Figure 3. Effect of ethanol: water (v:v) on the purity and yield of dihydroquercetin

图 3. 乙醇:水(v:v)对二氢槲皮素纯度及收率的影响

3.2.2. 结晶温度对二氢槲皮素纯度的影响

由图 4 可知,随着结晶温度从 0℃升高至 20℃,产物纯度呈现先升高后降低的趋势。在 16℃时纯度达到峰值(93.7%),但当温度继续升高至 20℃时,纯度逐渐下降至 85.1%。这一现象可能归因于 16℃下溶质过饱和度较高,促进了选择性结晶,减少了杂质共析;而 20℃下分子热运动加剧,可能导致杂质重新溶解或破坏晶体结构,从而降低纯度。反观收率的呈现递增,随着温度的增加,收率逐渐趋于平稳。综合纯度和收率的变化规律,结晶温度为 16℃时展现出最佳平衡点,此时纯度为 93.7%,收率为 39.2%。

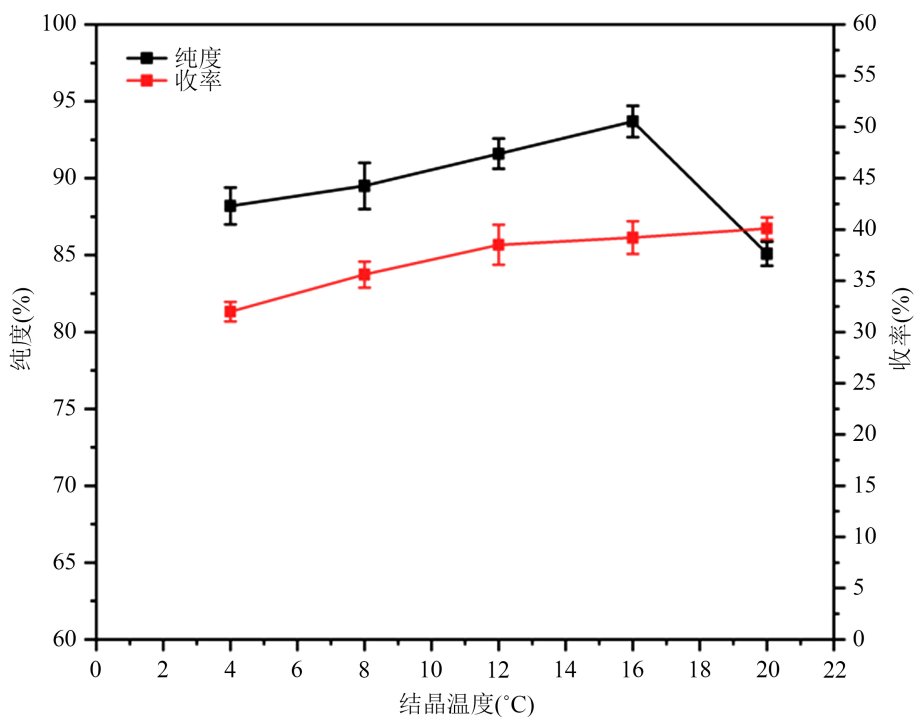


Figure 4. Effect of crystallization temperature (°C) on the purity and yield of dihydroquercetin
图 4. 结晶温度(°C)对二氢槲皮素纯度及收率的影响

3.2.3. 结晶时间对二氢槲皮素纯度的影响

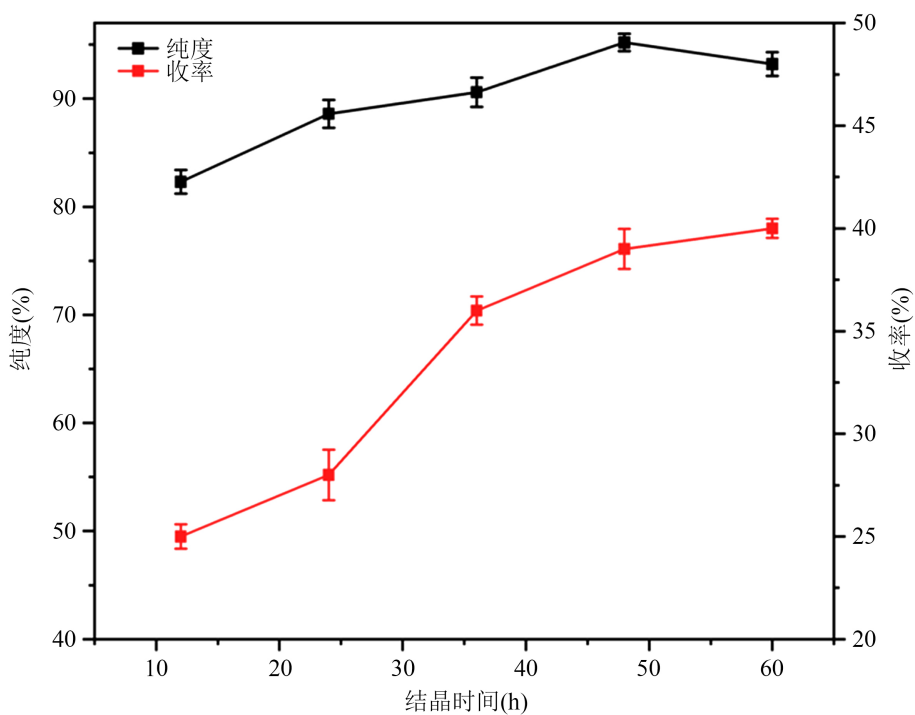


Figure 5. Effect of crystallization time (h) on the purity and yield of dihydroquercetin
图 5. 结晶时间(h)对二氢槲皮素纯度及收率的影响

由图 5 可知, 产物纯度随时间的延长显著提高, 从初始的 82.3% (10 h) 升至峰值 95.2% (50 h)。然而, 当结晶时间超过 50 h 后, 纯度逐渐下降, 60 h 时降至 93.2%。这一现象可能归因于: 短时间结晶时, 溶质分子未充分有序排列, 杂质易混入晶体; 适当延长结晶时间(50 h)可促进选择性结晶, 提升纯度; 但过度延长(>50 h)可能导致部分晶体重新溶解或杂质二次析出, 从而降低纯度。反观收率的趋势一直在随着时间上升, 初期结晶时间对提高收率至关重要, 但达到一定时间后, 体系接近结晶平衡, 延长时间的效益降低。综合纯度和收率的变化规律, 结晶时间在 50 h 时展现出最佳平衡性, 此时纯度为 95.2%, 收率为 39.2%。

3.3. 响应面实验

Box-Behnken 设计方案及试验结果固定液料比为 10:1 (m/g), 以 DHQ 重结晶纯度和收率为响应值, 对乙醇体积分数、pH 和结晶时间 3 个因素进行响应面设计, 试验设计及结果见表 5。

Table 5. Response surface experimental design and results

表 5. 响应面设计及结果

序号 Serial number	A 乙醇:水(v:v)	B 结晶温度(°C)	C 结晶时间(h)	纯度(%)	收率(%)
1	0	0	0	94.9	40.6
2	-1	0	-1	78.6	26.9
3	-1	0	1	76.4	38.8
4	1	1	0	84.7	30.7
5	0	0	0	94.5	38.8
6	1	-1	0	84.2	38.3
7	0	0	0	96.3	37.7
8	1	0	1	85.4	38.7
9	0	1	1	92.1	31.2
10	0	0	0	94.6	25.5
11	-1	-1	0	78.8	32.9
12	0	-1	-1	92.8	36.5
13	-1	1	0	75.3	27.4
14	0	-1	1	91.3	28.2
15	0	0	0	93.8	27.2
16	0	1	-1	91.7	39.2
17	1	0	-1	83.6	29.9

设计方案及试验以 DHQ 重结晶纯度和收率为响应值, 对乙醇:水体积分数、结晶温度、结晶时间三个因素进行响应面设计。选择乙醇:水(1:5、1:10 和 1:15 v:v), 结晶温度(12°C、16°C 和 20°C), 结晶时间为

(36、48 和 60 h), 设计了 17 组试验, 包括 5 次重复, 以 DHQ 纯度及收率为响应变量, 确定最优化制备工艺并验证。

利用 DesignExpert13 软件将试验数据进行回归分析, 结果见表 4、表 5。拟合的 DHQ 纯度(Y1)及收率(Y2)二次多项回归方程。

$$Y1 = 94.82 + 3.6A - 0.4125B - 0.1875 - 1AB - 1AC + 0.475BC - 12.52250A^2 - 1.54750B^2 - 12.52250C^2.$$

$$Y2 = 38.92 - 1.625A - 1.0125B + 3.3125C - 0.6AB + 1.2AC + 0.775BC - 7.797A^2 - 3.37250B^2 - 0.4725C^2.$$

由表 6 与表 7 可知, 以 DHQ 纯度为响应值的模型, 其 P 值小于 0.0001, 表明模型高度显著; 失拟项 P 值为 0.4142 (>0.05), 表明失拟项不显著, 模型拟合良好。一次项中, A 对纯度的影响高度显著 ($P < 0.0001$), 而 B、C 的影响不显著。AB 与 AC 对纯度影响显著 ($P < 0.05$), 二次项中, A^2 对纯度的影响高度显著 ($P < 0.0001$), B^2 的影响极显著 ($P < 0.01$), C^2 的影响显著 ($P < 0.05$)。该模型的 $R^2 = 0.9946$, 调整 $R^2 = 0.9876$, 表明响应值变化的 99.46% 能用此模型解释, 模型拟合度极高; 变异系数为 1.35%, 置信度高。综上所述, 该模型能够充分预测结晶工艺参数与纯度之间的内在关系。

Table 6. Analysis of variance for dihydroquercetin purity regression model
表 6. 二氢槲皮素纯度回归模型方差分析

类型	变差平方和	自由度	平均方差	F	Pr > F	显著性差异
Model	813.36	9	90.37	142.46	< 0.0001	***
A	103.68	1	103.68	163.44	< 0.0001	***
B	1.36	1	1.36	2.15	0.1864	-
C	0.2813	1	0.2813	0.4434	0.5268	-
AB	4.00	1	4.00	6.31	0.0403	*
AC	4.00	1	4.00	6.31	0.0403	*
BC	0.9025	1	0.9025	1.42	0.2718	-
A^2	660.27	1	660.27	1040.84	< 0.0001	***
B^2	10.08	1	10.08	15.90	0.0053	**
C^2	7.09	1	7.09	11.17	0.0124	*
Residual	4.44	7	0.6344			-
Lack of fit	1.05	3	0.3508	0.4142	0.7525	-
Pure error	3.39	4	0.8470			
Cor total	817.80	16				

Table 7. Reliability analysis of response surface fitting regression equation fit statistics
表 7. 响应面拟合回归方程可信度分析

项目	值
Std.Dev	1.18
Mean	86.94
C.V.%	1.35
R ²	0.9946
Adj R ²	0.9876
Pred R ²	0.9729
Adeq Precision	31.2387

由表 8 与表 9 可知, 以 DHQ 收率为响应值的模型, 其 P 值小于 0.0001, 表明模型高度显著; 失拟项 P 值为 0.5858 (>0.05), 表明失拟项不显著, 模型拟合良好。一次项中, A、C 对收率的影响高度显著(P < 0.0001), B 的影响极显著(P < 0.01)。三个因素对收率的影响由大到小的顺序为 C、A、B。AC 交互影响显著(P < 0.05)二次项中, A²、B² 对收率的影响高度显著(P < 0.0001), C² 的影响不显著。该模型的 R² = 0.9856, 调整 R² = 0.9671, 表明响应值变化的 98.56% 能用此模型解释, 模型拟合度较高; 变异系数为 2.89%, 置信度较高。综上所述, 该模型能够有效预测和分析 DHQ 的收率。

Table 8. Analysis of variance for dihydroquercetin yield models
表 8. 二氢槲皮素收率模型方差分析

类型	变差平方和	自由度	平均方差	F	Pr > F	显著性差异
Model	448.20	9	49.80	53.26	<0.0001	***
A	21.13	1	21.13	22.59	0.0021	***
B	8.20	1	8.20	8.77	0.0211	*
C	87.78	1	87.78	93.88	<0.0001	***
AB	1.44	1	1.44	1.54	0.2546	-
AC	5.76	1	5.76	6.16	0.0421	*
BC	2.40	1	2.40	2.57	0.1530	-
A ²	256.00	1	256.00	273.78	<0.0001	***
B ²	47.89	1	47.89	51.21	0.0002	***
C ²	0.9400	1	0.9400	1.01	0.3494	-
Residual	6.55	7	0.9351			
Lack of fit	1.76	3	0.5858	0.4894	0.7082	-
Pure error	4.79	4	1.20			
Cor total	454.74	16				

Table 9. Reliability analysis of response surface fitting regression equation Fit Statistics
表 9. 响应面拟合回归方程可信度分析

项目	值
Std.Dev	0.9670
Mean	33.44
C.V.%	2.89
R ²	0.9856
Adj R ²	0.9671
Pred R ²	0.9217
Adeq precision	17.8083

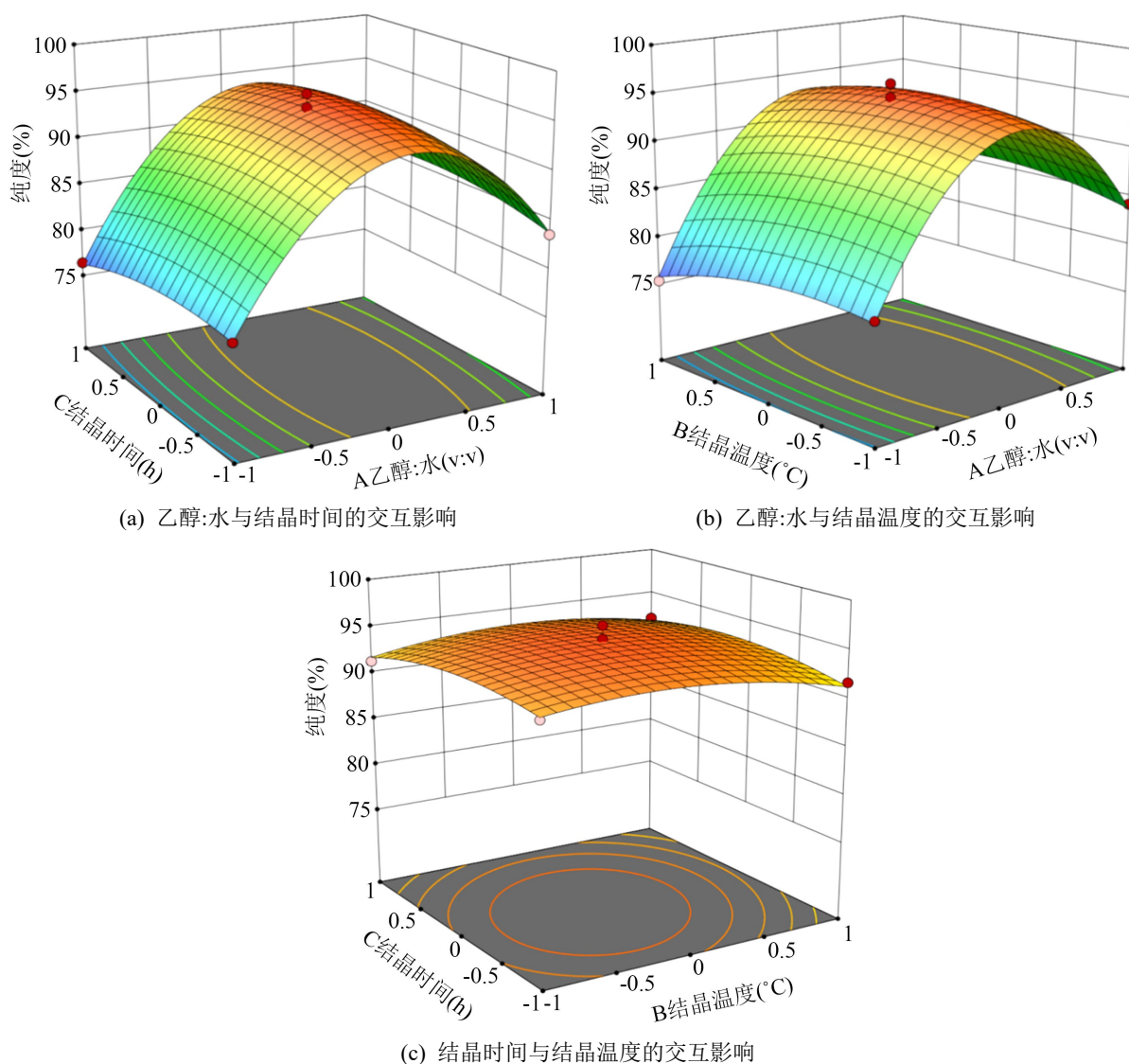


Figure 6. Response surface diagram of three factors interacting with dihydroquercetin purity
图 6. 三因素交互影响二氢槲皮素纯度的响应面图

为更立体地反映自变量间的交互作用对响应值的影响,对3D响应面图进行分析。由图6与图7可知AC与AB交互作用影响显著,其余不显著由图6(a)可知,乙醇:水的影响大于结晶温度的影响,随着乙醇水的量不断增加,呈现出先升高后降低的趋势,当比例为1:10时DHQ纯度最高,随着水的增加可能是由于水的增大,杂质也跟着析出,影响了纯品DHQ的纯度。结晶温度也呈现先上升后下降的趋势,当温度为16℃时结晶效果相对其他温度下较好,由图6(b)可知结晶时间对纯度的影响是缓慢上升并缓慢下降,可能是由于结晶时间过长,杂质混入晶体。由图6(c)可知结晶温度与结晶时间的交互影响效果不明显。

由图6与图7可知AC交互作用影响显著,其余不显著由图7可知,乙醇:水的比例与结晶时间对收率影响都较大,呈现出先升高后降低的趋势,当水的比例过少时,无法将DHQ杂质反溶剂除去,水的比例过大时,DHQ又过多的溶解在了水中无法析出,当比例为1:10时DHQ收率最高。结晶时间对DHQ的影响也很大,结晶时间短时,DHQ析出的量过少,结晶时间过长时,致使杂质也转移到DHQ晶体中。

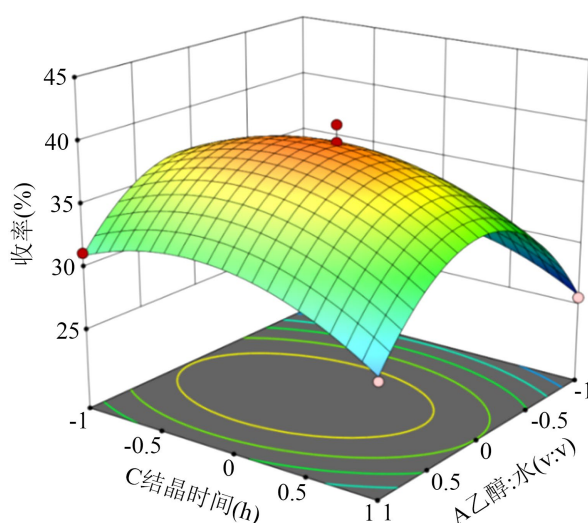


Figure 7. Response surface diagram of the interaction of two factors on dihydroquercetin yield

图7. 两因素交互影响二氢槲皮素收率的响应面图

验证试验结果通过回归方程模型拟合分析,预测得到的最优工艺参数为乙醇:水比例为1:10、结晶温度为16℃、结晶时间为48 h,预测得到的纯度为94.5%收率为38.8%,再次工艺下的此工艺条件下得到的实际DHQ纯度为 $94.88 \pm 0.3\%$ 收率为 $38.92 \pm 0.3\%$,这与理论预测基本一致,说明该响应面模拟拟合的工艺条件准确可靠。

3.4. 絮凝提取荧光结果

电位特性分析:由表10数据可知,原始提取液与茶皂素溶液均呈现负电性,而壳聚糖溶液的正电特征。经过量壳聚糖絮凝处理后,两体系上清液电位均逆转为正值,证实壳聚糖通过电荷中和效应与带负电胶体颗粒产生静电吸附,引发茶皂素胶束的聚集沉降,该现象作用效果示意图详见图8。

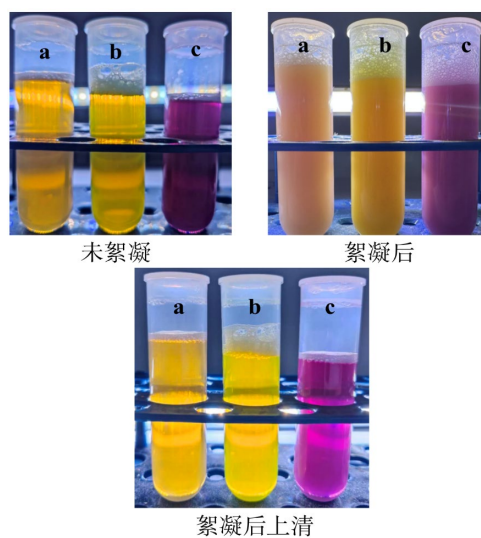
荧光强度数据分析:由图8与表11数据可知,尼罗红标记体系经絮凝后荧光信号衰减率达93.6% ($32,988 \rightarrow 2120$),香豆素-6标记体系强度降低90.9% ($231,811 \rightarrow 21,207$)。由于茶皂素胶束内核的疏水特性能够有效包载尼罗红与香豆素-6,当壳聚糖通过电荷作用引发胶束絮凝时,荧光探针随胶束结构共同沉降,导致液相荧光强度显著下降。该作用机制可类推至DHQ的纯化过程:在壳聚糖介导的絮凝体系中,茶皂素胶束通过疏水作用携带目标产物脱离溶液相,结合离心分离实现有效富集。

Table 10. Zeta potential test results**表 10.** Zeta 电位检测结果

样品	Zeta 电位/mV
提取液	-2.06
8%茶皂素溶液	-1.40
2%壳聚糖溶液	2.31
絮凝后提取液上清	0.36
絮凝后茶皂素上清	0.57

Table 11. Fluorescence intensity of different samples**表 11.** 絮凝前后不同样品的荧光强度

样品	575 nm 荧光强度	515 nm 荧光强度
未絮凝未染色茶皂素溶液	65	1320
絮凝后茶皂素上清	63	1115
未絮凝尼罗红-茶皂素溶液	32,988	3990
絮凝后尼罗红-茶皂素上清 真空封口包装机	2120	569
未絮凝香豆素-6-茶皂素溶液	123	231,811
絮凝后香豆素-6-茶皂素上清	26	21,207

**Figure 8.** Fluorescence staining diagram of tea saponin. (a) Unstained; (b) Coumarin-6; (c) Nile red**图 8.** 茶皂素荧光染色图。(a) 未染色；(b) 香豆素-6 染色；(c) 尼罗红染色

4. 结论

本研究成功优化了胶束絮凝反溶剂重结晶法纯化落叶松木中 DHQ 的工艺。筛选出茶皂素与壳聚糖的组合可高效絮凝目标产物,通过萃取得到的粗提物结合反溶剂重结晶技术,有效去除杂质并提升纯度。最佳工艺参数为乙醇与水体积比 1:10、结晶温度 16℃、结晶时间 48 h,在此条件下 DHQ 纯度达 94.88%,收率为 38.92%,且进一步验证了正负电荷絮凝机理。实验结果表明,该方法操作简便、成本可控,且避免了传统工艺中有害溶剂的使用,兼具环保性与经济性,未来可进一步探索该工艺在规模化生产中的稳定性及对其他天然产物的适用性,为食品与制药工业的活性成分提取纯化提供新思路。

参考文献

- [1] Filippovich, S.Y., Isakova, E.P., Bachurina, G.P. and Deryabina, Y.I. (2025) Modern Developing Directions in the Dihydroquercetin Study. *Molecules*, **30**, Article No. 4187. <https://doi.org/10.3390/molecules30214187>
- [2] 廖凯, 张智萍, 丁笠, 等. 二氢槲皮素生物合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(9): 126-140.
- [3] 张乐. 花旗松素缓解 DSS 诱导的小鼠结肠炎效果研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [4] 田军军, 顾媛媛. 二氢槲皮素生物活性及作用机制最新研究进展[J]. 黑龙江科学, 2022, 13(18): 5-8+13.
- [5] 刘文丛, 刘兴龙, 孟令全, 等. 二氢槲皮素的研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(4): 444-448.
- [6] 陈雪, 费洪新, 周忠光, 等. 二氢槲皮素药理作用的研究进展[J]. 中医药学报, 2017, 45(1): 90-92.
- [7] Jain, S. and Vaidya, A. (2023) Comprehensive Review on Pharmacological Effects and Mechanism of Actions of Taxifolin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacological Research—Modern Chinese Medicine*, **7**, Article ID: 100240. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100240>
- [8] Yu, S., Li, M., Gao, S. and Zhou, J. (2022) Engineering *Saccharomyces Cerevisiae* for the Production of Dihydroquercetin from Naringenin. *Microbial Cell Factories*, **21**, Article No. 213. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01937-8>
- [9] Thuan, N.H., Shrestha, A., Trung, N.T., Tatipamula, V.B., Van Cuong, D., Canh, N.X., et al. (2021) Advances in Biochemistry and the Biotechnological Production of Taxifolin and Its Derivatives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **69**, 848-861. <https://doi.org/10.1002/bab.2156>
- [10] Nuralin, L. (2024) Investigation of Ziziphus Jujube Seeds as a New Source of Taxifolin and Silibinin with Three Different Extraction Methods. *Microchemical Journal*, **198**, Article ID: 110137. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110137>
- [11] 杨貌端, 王维. 油脂中苯并(a)芘的快速分离测定[C]//北京食品学会. 北京食品学会 1982 年年会论文(摘要). 北京: 北京市卫生防疫站, 1982: 37-38.
- [12] Yu, X., Chen, H., Sha, Z., Hu, Y., Yan, M., Xin, J., et al. (2024) Highly Selective Separation and Purification of Lincomycin by Macroporous Adsorption Resin Column Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1735**, Article ID: 465282. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465282>
- [13] 王金山, 秦瑞, 廖鑫羽, 等. 天然来源的表面活性剂在超低渗油藏开发中的应用[J]. 当代化工, 2024, 53(6): 1277-81.
- [14] 杨帆, 霍志伟, 朱雯, 等. 超高压辅助胶束法提取落叶松中二氢槲皮素的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 175-83.
- [15] 杨帆. 落叶松中二氢槲皮素超高压辅助胶束提取与共晶药物的制备及评价[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023.
- [16] 李璐遥. 山楂果叶复合颗粒的制备工艺及质量控制研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2022.
- [17] Sun, L., Song, Y., Li, B., Guan, G. and Jiang, Y. (2020) A Modified Method for Modelling, Optimization and Control of an Anti-Solvent Crystallization Process. *Chemical Engineering Science*, **211**, Article ID: 115253. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115253>
- [18] 刘志强. 基于转录测序及 LC-MS 含量测定对银杏叶药效成分生物合成研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- [19] 逢弓一郎. 落叶松木中二氢槲皮素提取纯化工艺研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.
- [20] Santos, A.S., Oliveira, L.F.S., Marques, A.M.T., Silva, D.C.A. and Mansur, C.R.E. (2018) Evaluation of the Efficiency of Polyethylenimine as Flocculants in the Removal of Oil Present in Produced Water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **558**, 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.08.085>

- [21] Ning, B., Wang, Y., Zhang, M., Bai, Y., Wang, W. and Wang, G. (2021) Surface Adsorption and Foam Performance of Sodium Perfluoroalkyl Polyoxyethylene Ether Sulfate in Ethanol-Water Mixed System. *Journal of Molecular Liquids*, **337**, Article ID: 116393. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116393>
- [22] Yang, Z., Li, M., Yu, M., Huang, J., Xu, H., Zhou, Y., *et al.* (2016) A Novel Approach for Methylene Blue Removal by Calcium Dodecyl Sulfate Enhanced Precipitation and Microbial Flocculant GA1 Flocculation. *Chemical Engineering Journal*, **303**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.101>
- [23] de Seixas-Junior, C.H., de Carvalho, M.M., Jacumazo, J., Piazza, R.D., Parchen, G.P. and de Freitas, R.A. (2020) Interaction of Guar Gum Galactomannans with the Anionic Surfactant Sodium Lauryl Ether Sulphate. *International Journal of Biological Macromolecules*, **165**, 713-721. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.216>
- [24] Li, Z., Xu, Y., Liu, Y., Ma, K., Wang, K. and Yang, F. (2023) Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction Model of Pinus Koraiensis Seed Scales Oil Induced by Tea Saponin. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, **32**, Article ID: 100443. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100443>
- [25] Chen, F., Liu, W., Pan, Z., Wang, Y., Guo, X., Sun, S., *et al.* (2020) Characteristics and Mechanism of Chitosan in Flocculation for Water Coagulation in the Yellow River Diversion Reservoir. *Journal of Water Process Engineering*, **34**, Article ID: 101191. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101191>
- [26] Liang, C., Yang, Y., Xia, Y., Yuan, W., Chen, J., Zheng, Z., *et al.* (2022) The Optimization of Chlorella Vulgaris Flocculation Harvesting by Chitosan and Calcium Hydroxide. *Indian Journal of Microbiology*, **62**, 266-272. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01004-1>
- [27] AlMuhanna, K.J., Asiri, F., Abu-Arabi, M. and AlMansour, H. (2024) Treatment of Paper and Pulp Wastewater Using Coagulation-Flocculation with Alum: Optimization and Performance Evaluation. *Water, Air, & Soil Pollution*, **236**, Article No. 52. <https://doi.org/10.1007/s11270-024-07688-z>
- [28] 逢弓一郎, 卓小玉, 刘玉婷, 等. 星点设计-效应面法优化二氢槲皮素提取工艺[J]. 化学工程师, 2021, 35(2): 10-3+6.
- [29] 林亚美. 刺五加根超声提取工艺优化及质量评价[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023.