

## 微波辅助骨碎补黄酮的提取及抗氧化活性研究

祁小妮<sup>1</sup>, 王俊龙<sup>1</sup>, 李振亮<sup>1</sup>, 党金宁<sup>1</sup>, 张志琪<sup>2\*</sup>

(1. 甘肃民族师范学院 化学与生命科学系, 甘肃 甘南 747000; 2. 陕西师范大学 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室 化学化工学院, 陕西 西安 710062)

**摘要:** 采用微波辅助结合响应曲面优化 (RSM) 法, 对骨碎补黄酮提取中的原料质量浓度、微波功率及微波时间等工艺参数进行了优化, 为骨碎补黄酮的定量提取提供了理论依据。考察了骨碎补黄酮清除羟基自由基 (OH·) 和过氧负离子自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) 的能力。结果表明, 骨碎补黄酮的最佳提取条件为: 原料质量浓度 0.03 g/L、微波功率 400 W、微波时间 10 min, 在此条件下, 骨碎补黄酮的提取率最高, 达 5.57%; 抗氧化活性实验结果表明, 当提取的骨碎补黄酮的质量浓度分别为 2.5 和 3.5 g/L 时, 骨碎补黄酮对 OH· 及 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 的清除率分别为 10.12% 和 35.71%。通过响应曲面确定了提取率与影响因素之间的二次多项函数模型。

**关键词:** 骨碎补; 黄酮; 微波辅助; 抗氧化活性; 中药现代化技术

**中图分类号:** TQ461 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2018) 07-1170-07

## Microwave-assisted Extraction and Antioxidant Activities of Flavonoids from *Drynaria Rhizome*

QI Xiao-ni<sup>1</sup>, WANG Jun-long<sup>1</sup>, LI Zhen-liang<sup>1</sup>, DANG Jin-ning<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-qi<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry and Life Sciences, Gansu Normal University for Nationalities, Gannan 747000, Gansu, China; 2. Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China)

**Abstract:** A microwave-assisted extraction procedure of flavonoids from *drynaria rhizome* was developed by response surface methodology (RSM) with alcohol as solvent. The effects of mass concentration of raw material, microwave power and microwave time on the extraction yield of flavonoids were investigated. The antioxidant activities of the resultant flavonoids were estimated by the scavenging rate against hydroxyl radical and peroxy radical. The results showed that the best extraction conditions of flavonoids were obtained as follows: mass concentration 0.03 g/L, microwave power 400 W, and microwave time 10 min. Under these extraction conditions, the maximum extraction yield of flavonoids was achieved (5.57%). The evaluation of antioxidant activity suggested that the flavonoids exhibited significant antioxidant activities. When the mass concentration of flavonoids was 2.5 g/L, the maximum hydroxy radical scavenging rate was 10.12%, and when the mass concentration of flavonoids reached 3.5 g/L, the maximum scavenging rate for peroxy radical was 35.71%. The above experimental results showed that the extraction yield was determined by RSM and quadratic multinomial function model between influence factors, which could provide a theoretical basis for the quantitative extraction of flavonoids from *drynaria rhizome*.

**Key words:** *drynaria rhizome*; flavonoids; microwave-assisted; antioxidant activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

**Foundation item:** Higher Education Institution Research Project of Gansu Province (2016A-093)

收稿日期: 2017-04-27; 定用日期: 2017-10-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170358

基金项目: 甘肃省高等学校科研项目资助 (2016A-093)

作者简介: 祁小妮 (1987—), 女, 讲师, 硕士, E-mail: xiaoniqiyjs@126.com。联系人: 张志琪 (1958—), 男, 教授, 博士, E-mail: zqzhang@snnu.edu。

骨碎补 (*Drynaria rhizome*) 为水龙骨科植物槲蕨 [*Drynaria fortunei*(Kunze)J.Sm] 及中华槲蕨 [*Drynaria baronii*(Christ) Diels] 的干燥根茎<sup>[1]</sup>。由于在临床上其经常用于跌打损伤病症的治疗,因此得名骨碎补。骨碎补的化学成分以二氢黄酮和糖苷类化合物为主<sup>[2]</sup>。在中西医临床上其对症治疗肾亏阴虚、耳鸣耳聋、牙齿掉落、跌打损伤及骨裂骨折等病症<sup>[3]</sup>。然而,有关骨碎补中黄酮的有效提取及相应产品的综合开发利用还处在起步阶段。

根据已有的文献报道,提取黄酮类化合物的研究方法较多,如,刘晓娇<sup>[4]</sup>等人考察了商洛产粗榧叶中总黄酮的提取工艺和抗氧化活性,结果表明,采用正交实验得出黄酮提取率与提取因素之间的非线性关系,虽然确定了最佳的黄酮提取因素组合,但是仍存在考察不彻底、不全面等缺点,对两两因素之间的交互作用不能通过正交实验给出明确的结果;李彩霞<sup>[5]</sup>等、王明艳<sup>[6]</sup>等人分别研究了“黑美人”土豆黄酮和毛冬青根黄酮的提取工艺,尽管二者都采用了响应曲面法对因素与提取率之间的二次函数模型进行优化,得到了最佳的因素水平组合,但是,提取率仍然较低,分别为 1.03%、0.419%。由于微波辐射能够加速有效物质的快速溶出,可以间接提高黄酮的提取效率,因此,采用微波辅助提取黄酮类化合物,有望提高黄酮的提取效率。李志平<sup>[7]</sup>等人采用微波辅助法提取柿叶黄酮,提取率最高达 25.1%;马燕燕<sup>[8]</sup>等人以及赵文红<sup>[9]</sup>等人分别采用响应面优化酶法和热水法提取柿叶黄酮,最高提取率分别为 2.47%和 6.12%;另外,卢润双<sup>[10]</sup>等人采用微波辅助法提取山楂黄酮的提取率最高,为 8.02%。霍红<sup>[11]</sup>等人采用乙醇提取柿叶黄酮的提取率为 4.31%。所以,采用微波辅助提取黄酮,比热水提取和乙醇提取等其他方法的提取效率高。

因此,为了提高黄酮的提取率,且能够全面分析提取因素之间的交互作用,避免正交实验出现的因素分析不全等问题。本文采用微波辅助结合响应曲面优化法,对骨碎补黄酮提取中的原料质量浓度、微波功率及微波时间进行了优化,以期能够得出最佳的因素水平组合,获得较高的提取效率。考察了骨碎补黄酮在人工模拟的体外环境下对自由基的清除能力,以说明其抗氧化活性,为骨碎补黄酮功能产品的研发提供实验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与amp;仪器

骨碎补:购自于甘南中药材大药房,乙醇、亚

硝酸钠、正丁醇、乙醚、硝酸铝、氢氧化钠、丙酮、维生素 C、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢(质量分数 30%)、邻苯三酚、Tris-盐酸、浓盐酸,以上均为试剂纯,购于兰州龙腾盛世化学试剂有限公司;芦丁:生化试剂,购于国药集团化学试剂有限公司。

UV1600-双光束紫外-可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 骨碎补黄酮提取工艺的单因素实验设计

在微波功率和微波时间确定的基础上,考察不同的原料质量浓度(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/L)对黄酮提取率的影响;在微波功率和原料质量浓度确定的基础上,考察微波时间(4、6、8、10、12 min)对提取率的影响;在微波时间和原料质量浓度确定的基础上,考察微波功率(160、320、400、480、640 W)对提取率的影响。

#### 1.2.2 骨碎补黄酮的提取实验

取粉碎的骨碎补 5 g,加入乙醇作为提取溶剂,得到料液比为 0.03 g/L 的提取体系。将体系摇匀静置 24~48 h 后,在微波功率 400 W、时间 10 min 条件下,提取骨碎补黄酮。提取完成后,利用循环水浴真空泵快速抽滤,将乙醇通过旋转蒸发回收,固体加入蒸馏水搅拌 30 min 左右,离心或静置,取上层清液,留存备用<sup>[12]</sup>。其他料液比、微波功率和微波时间下骨碎补黄酮的提取实验方法同上。

#### 1.2.3 骨碎补黄酮含量测定方法

采用比色法<sup>[13]</sup>进行黄酮含量的测定,具体步骤参照文献[14-15]:准确量取 1 mL 样品液于 50 mL 容量瓶中,加入体积分数为 60%的乙醇至 6 mL,加入质量分数为 5%的 NaNO<sub>2</sub>溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加入质量分数为 10%的 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加入质量分数为 4%的 NaOH 溶液 10 mL,最后用体积分数为 60%的乙醇溶液定容,并摇匀,静置 15 min。以不含黄酮的空白试剂作为对照,以芦丁为标准品,在 510 nm 下测定芦丁标准品及样品的吸光度,以吸光度为纵坐标,以芦丁质量浓度为横坐标绘制标准曲线,然后根据芦丁标准曲线求得黄酮的提取率。黄酮提取率计算公式如下。

$$\text{黄酮提取率}/\%=(\rho \times V \times D)/m \times 100$$

式中: $\rho$ 为提取液中骨碎补黄酮的质量浓度, g/L; $V$ 为提取液的体积, mL; $D$ 为稀释倍数; $m$ 为原料干重, g。

#### 1.2.4 骨碎补黄酮响应曲面实验设计方案

以单因素实验为基础,选择最优的单因素作为响应曲面优化的基础影响因素,根据 Box-Behnken 设计<sup>[16]</sup>结合中心实验组合原理<sup>[17]</sup>,确定骨碎补黄酮提取率与影响因素之间的水平组合,实验设计结果

如表 1 所示。

表 1 实验因素及水平  
Table 1 factors and levels of test

	水平		
	-1	0	1
A 原料质量浓度/(g/L)	0.01	0.03	0.05
B 微波功率/W	320	480	640
C 微波时间/min	8	10	12

### 1.2.5 骨碎补黄酮抗氧化活性测定

#### 1.2.5.1 羟基自由基(OH·)清除能力测定

参考 Fenton 反应体系模型<sup>[18-20]</sup>, 在 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液中(乙醇作为溶剂), 加入 9 mmol/L FeSO<sub>4</sub>, 再加入 8.8 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 生成具有强氧化活性的反应体系。然后, 加入不同质量浓度的骨碎补黄酮溶液, 与显色剂水杨酸竞争羟基自由基, 从而使反应体系的吸光度减小。采用固定反应时间法, 在相同体积的反应体系中加入不同质量浓度的骨碎补黄酮溶液, 用蒸馏水作为空白试剂, 在波长 510 nm 处测吸光度, 以羟基自由基的清除率为抗氧化活性指标<sup>[21-22]</sup>, 以同质量浓度的维生素 C 作为阳性对照, 骨碎补黄酮对羟基自由基的清除率按下式计算。

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A_1 - A_2)/A_3] \times 100$$

式中: A<sub>1</sub> 为加入骨碎补黄酮溶液后溶液的吸光度; A<sub>2</sub> 为以蒸馏水代替显色剂水杨酸的吸光度; A<sub>3</sub> 为以蒸馏水代替骨碎补黄酮的空白组的吸光度。

#### 1.2.5.2 过氧负离子自由基(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)清除能力测定

根据黄酮清除过氧负离子自由基的原理, 结合已有的文献报道<sup>[23-24]</sup>, 采用邻苯三酚(焦性没食子酸)在自身氧化过程中产生的过氧负离子自由基作为反应体系的目标靶物质。具体操作为: 取 8 支具塞的 10 mL 比色管, 贴上标签, 首先加入 4.5 mL、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2), 再分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/L 不同质量浓度的黄酮溶液各 1 mL, 混匀, 25 °C 静置 10 min, 加入反应试剂焦性没食子酸 0.1 mL、继续加入浓盐酸(12 mol/L) 0.1 mL, 终止反应。在特征吸收波长(330 nm)处测定不同质量浓度溶液的吸光度。以不加焦性没食子酸的实验组作为空白, 以不加黄酮的反应组作为对照。骨碎补黄酮对 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 的清除率按下式计算。

$$\text{清除率}/\% = (A_0 - A_i)/(A_0 - A) \times 100$$

式中: A<sub>0</sub> 为对照组的吸光度; A 为空白组的吸光度; A<sub>i</sub> 为加入黄酮的实验组吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 芦丁标准曲线绘制

芦丁标准曲线见图 1。

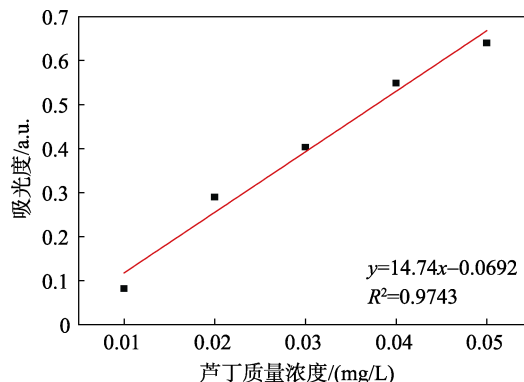


图 1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Standard curve of Rutin

黄酮类化合物的测定以芦丁为标样, 根据芦丁标准品质量浓度与对应吸光度绘制标准曲线, 计算骨碎补黄酮的含量。通过线性回归方程可知, 芦丁标准品的线性范围为 0.01~0.05 mg/L。吸光度与质量浓度之间具有较好的线性关系( $R^2=0.9794$ )。

### 2.2 单因素实验结果分析

#### 2.2.1 原料质量浓度对骨碎补黄酮提取率的影响

按照 1.2.2 节方法进行实验, 考察了不同原料质量浓度对骨碎补黄酮提取率的影响, 结果见图 2。

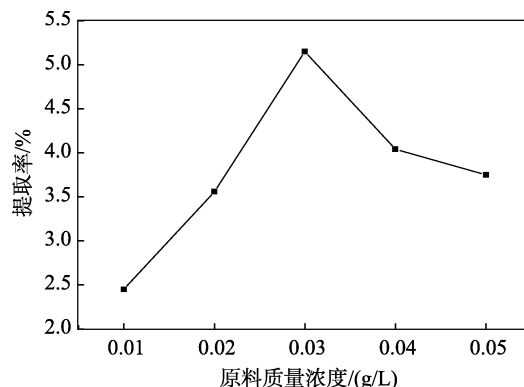


图 2 原料质量浓度对黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of mass concentration of raw material on the extraction yield of flavonoids

从图 2 可以看出, 当原料质量浓度从 0.01 g/L 增加至 0.03 g/L 时, 总黄酮的提取率增加明显, 在原料质量浓度为 0.03 g/L 时达到最大值, 为 5.42%, 继续增加原料的质量浓度, 黄酮的提取率反而减小。原因可能是, 在其他操作条件一定时, 适当增大原料质量浓度有利于黄酮溶出, 但是继续加大原料质量浓度, 微波内加热作用和超声波空化作用反而降低, 即细胞膜和细胞壁破碎效果减弱, 黄酮溶出减

少, 黄酮收率下降, 这与山豆根黄酮的提取及抗氧化抑菌活性研究结果一致<sup>[25]</sup>。所以, 确定最佳的原料质量浓度为 0.03 g/L。

2.2.2 微波功率对骨碎补黄酮提取率的影响

按照 1.2.2 节方法进行实验, 考察了不同微波功率对骨碎补黄酮提取率的影响, 结果见图 3。

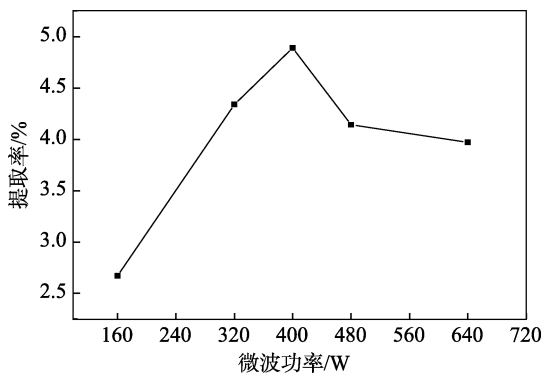


图 3 微波功率对骨碎补黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of microwave power on on the extraction yield of flavonoids

由图 3 可知, 骨碎补黄酮的提取率与微波功率之间存在明显的量效关系, 当微波功率增加到 400 W 时, 黄酮的提取率最大, 为 4.82%, 随着微波功率的逐渐增大, 黄酮提取率反而减小。原因可能是, 随着微波功率的增大, 微波的内加热效应显著增强, 细胞壁和细胞膜破碎效果增大, 黄酮类化合物迅速离开细胞并溶解到水中, 当微波功率过高时, 过大的微波辐射能量可能会破坏化合物结构<sup>[26]</sup>, 导致黄酮提取率下降, 故微波功率以 400 W 为宜。

2.2.3 提取时间对骨碎补黄酮提取率的影响

按照 1.2.2 节方法进行实验, 考察了不同微波时间对骨碎补黄酮提取率的影响, 结果见图 4。

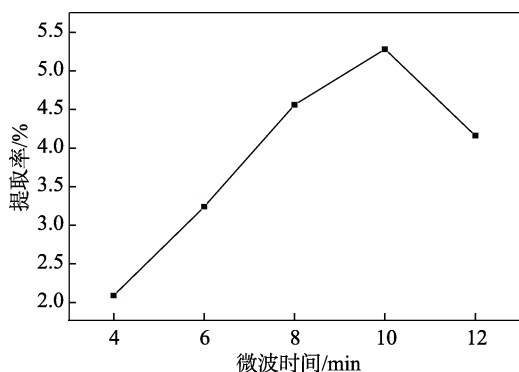


图 4 微波时间对黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of microwave time on the extraction yield of flavonoids

由图 4 可知, 在 4~10 min 内, 黄酮的提取率与微波时间呈正相关性, 浸提时间为 10 min 时, 黄酮提取率达到最大值, 为 5.27%, 之后, 随着微波时

间的延长, 提取率开始减小。原因可能是, 随着提取时间的延长, 微波辐射能量越来越大, 有利于细胞膜和细胞壁的破碎, 黄酮溶出量增强, 但是当提取时间过长时, 过大微波辐射能量可能会引发部分黄酮化合物分解, 黄酮物质可能被微波巨大的机械能所破坏<sup>[25]</sup>, 导致黄酮提取率降低, 故提取时间以 10 min 为宜。

2.3 骨碎补黄酮提取率响应曲面设计结果分析

骨碎补黄酮提取率与三因素之间的相互作用结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 设计及黄酮提取率响应值  
Table 2 Box-Behnken design and the response values for the extraction yield of flavonoids

实验号	A 原料质量浓度/(g/L)	B 微波功率 /W	C 微波时间 /min	黄酮提取率 /%
1	-1	0	1	4.48
2	0	0	0	5.40
3	1	0	1	4.85
4	0	0	0	5.53
5	0	-1	-1	5.10
6	0	1	-1	4.32
7	1	-1	0	4.31
8	1	0	-1	5.03
9	-1	-1	0	4.28
10	0	0	0	5.57
11	0	1	1	5.02
12	0	-1	1	4.45
13	0	0	0	5.50
14	-1	1	0	4.30
15	1	1	0	4.53
16	-1	0	-1	4.47
17	0	0	0	5.53

利用响应曲面分析软件, 对提取率与提取因素之间的作用方式给出了模拟函数方程:  $Y=5.39+0.15A+0.21B+0.13C+0.033AB-0.048AC+0.10BC-0.29A^2-0.75B^2-0.33C^2$ , 并对所得的数据进行显著性分析, 确定了因素对提取率影响的显著程度, 实验结果如表 3 所示。

由表 3 可以看出, 整体模型具有一定的显著性 ( $P<0.05$ ), 说明所选择的考察因素 (微波功率、微波时间、原料质量浓度) 对黄酮的提取率具有显著性影响。因此, 采用 BBD 设计结合响应曲面优化法考察骨碎补黄酮提取率与提取条件之间的函数模型具有一定的可行性。表 3 显著性结果表明, 本次实验整体标准偏差的平均值对于骨碎补黄酮的提取率影响可忽略 (失拟项  $P>0.05$ ), 同时, 也说明实验过程中黄酮实验数据测定值之间具有较小的偏差。通过各因素之间的交互作用可知, 微波功率 ( $B$ ), 原料质量浓度与微波功率 ( $AB$ ) 以及微波功率与微波功率 ( $B^2$ ) 两两因素的交互作用对骨碎补黄酮的

提取率具有极显著的影响 ( $P < 0.01$ ), 然而, 其他多因素之间的交互作用属于显著影响 ( $P < 0.05$ )。根据回归分析结果 (表 3), 利用 Design-Expert 软件对两两因素之间的交互作用给出 3D 曲面图, 结果见图 5。

表 3 响应曲面实验结果方差分析

Table 3 Response surface experiment results anova analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性标识
模型	3.69	9	0.41	4.24	0.0349	*
A	0.18	1	0.17	1.88	0.0131	*
B	0.34	1	0.34	3.57	0.0019	**
C	0.13	1	0.13	1.35	0.2839	
AB	$4.336 \times 10^{-3}$	1	$4.336 \times 10^{-3}$	0.045	0.0083	**
AC	$9.025 \times 10^{-3}$	1	$9.025 \times 10^{-3}$	0.093	0.7688	
BC	0.041	1	0.041	0.42	0.0356	*
A <sup>2</sup>	0.35	1	0.35	3.60	0.0798	
B <sup>2</sup>	2.15	1	2.15	22.20	0.0022	**
C <sup>2</sup>	0.45	1	0.45	4.67	0.0376	*
残差	0.68	7	0.097			
失拟项	0.42	3	0.14	2.22	0.2284	
纯误差	0.25	4	0.063			
总和	4.37	16				

注: \*\*代表  $P < 0.01$ , 为差异极显著; \*代表  $P < 0.05$ , 为差异显著; F 为方差分析的比值; P 为显著性。

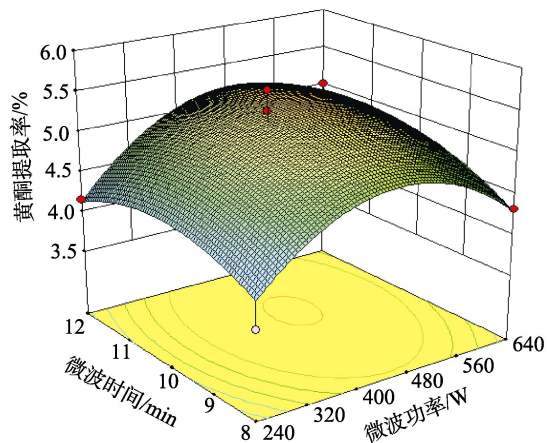


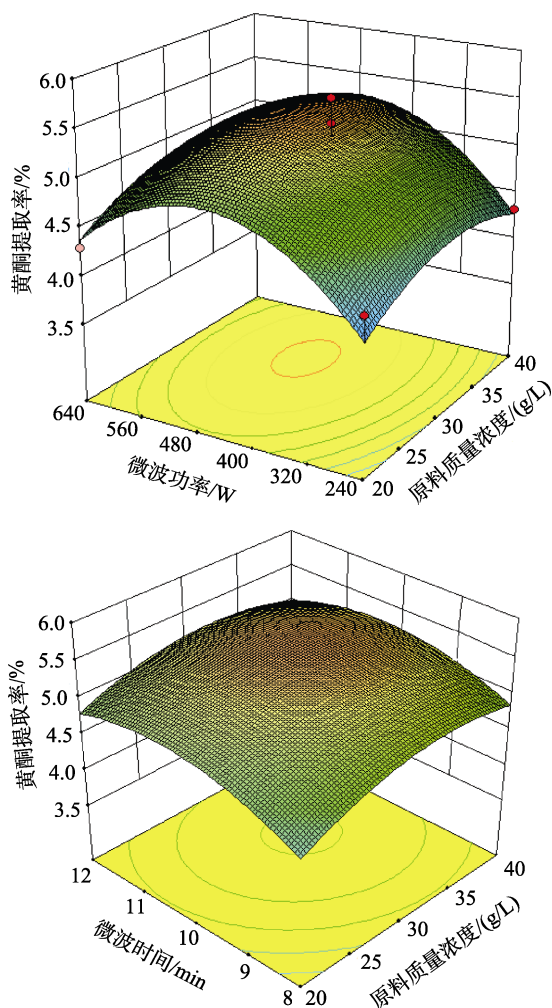
图 5 各交互作用因素对黄酮提取率的响应曲面图  
Fig. 5 Response surface plots showing the effects of the variables for the extraction yield of flavonoids

从图 5 可知, 提取率与影响因素之间具有较高的显著性, 表现为在三维空间抛物面的曲度较大, 而且开口朝下, 说明该函数模型具有极大值, 根据所建立的函数模型, 优化得出骨碎补黄酮的最佳提取条件为: 原料质量浓度 0.031 g/L、微波时间 9.7 min、微波功率 401.7 W。根据实际情况, 结合具体操作, 将优化的提取因素调整为: 微波时间 10 min、微波功率 400 W、原料质量浓度 0.03 g/L, 在调整后的提取条件下, 平行做 5 次实验, 黄酮的平均提取率最高为 5.57%。实验结果表明, 采用响应曲面优化法能够较为合理的选择提取因素, 科学客观的评价提取因素与提取率之间的相关性<sup>[27]</sup>。

#### 2.4 骨碎补黄酮抗氧化活性结果分析

按照 1.2.5 节的方法进行实验, 考察了骨碎补黄酮对羟基自由基和过氧负离子自由基的抗氧化活性, 实验结果见图 6 和图 7。

由图 6、图 7 可知, 骨碎补黄酮能够清除一定浓度的自由基, 且清除自由基的活性与骨碎补黄酮浓度有关。骨碎补黄酮对羟基自由基和过氧负离子自由基的清除能力随着黄酮质量浓度的增加而增强。当骨碎补黄酮质量浓度分别增加到 2.5 g/L (图 6) 和 3.5 g/L (图 7) 时, 溶液中骨碎补黄酮质量浓度达到饱和, 对羟基自由基的清除能力达到极限值 (10.12%) (图 6), 对过氧负离子自由基清除能力达到最大值, 为 35.71% (图 7)。以维生素 C 作为阳性对照, 当维生素 C 质量浓度分别增加到 2.5 g/L (图 6) 和 3.5 g/L (图 7) 时, 其对羟基自由基及过氧自由基的清除率分别为 76.8% 和 85.6%。从图 6、7 中可以看出, 骨碎补黄酮的抗氧化活性远小于还原力较强的维生素 C, 这与山楂核总黄酮的抗氧化活性研究结果相似<sup>[28]</sup>, 所以, 骨碎补黄酮化合物可以应用于食品、药品及化工产品, 作为天然的抗氧化剂。



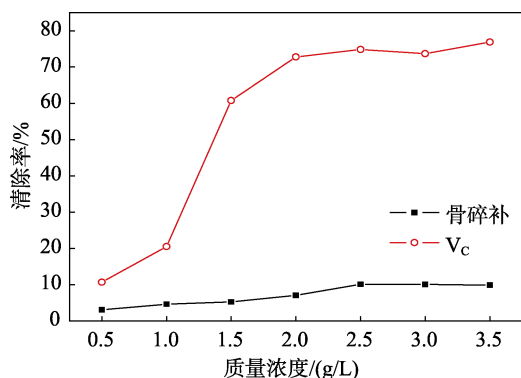


图6 骨碎补黄酮对羟基自由基的清除率

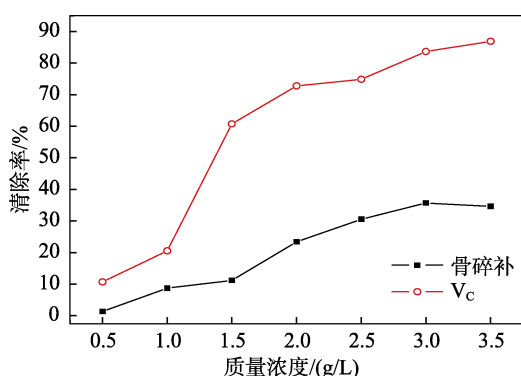
Fig. 6 Scavenging rate of flavonoids from *drynaria rhizome* for hydroxide radical

图7 骨碎补黄酮对过氧负离子自由基的清除率

Fig. 7 Scavenging rate of flavonoids from *drynaria rhizome* for peroxyl radical

### 3 结论

确定了骨碎补黄酮提取的最佳工艺参数, 并探究了其体外抗氧化活性。通过响应曲面优化法, 建立了骨碎补黄酮提取因素与提取率之间的数学模型, 在此基础上优化得到骨碎补黄酮提取因素的最优组合为: 原料质量浓度 0.03 g/L、微波功率 400 W、微波时间 10 min, 骨碎补黄酮的提取率高达 5.57%。抗氧化实验结果表明, 提取的骨碎补黄酮对羟基自由基及过氧负离子自由基的最大清除率分别为 10.12% 和 35.71%, 其清除能力与黄酮的质量浓度呈明显的量效关系。

### 参考文献:

[1] Chang Deyou (常德有), Dong Fuhui (董福慧). Summary of the study of Gusuibu[J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine (吉林中医药), 2006, 26(6): 61-62.

[2] Li Mengguang (李孟广), li xiaodong (李晓东), Cai Fengqing (蔡逢庆), et al. The effect of ironing on the content and dissolution rate of hesperidin in Gusuibu[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials (中草药), 1992, 15(3): 28-29.

[3] Zhou Tongshui (周铜水), Zhou Ronghan (周荣汉), Liu Xiaodong (刘晓东), et al. Effects of Gusuibu on the healing of experimental fractures in rats[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials (中草药), 1994, 25(5): 249-251.

[4] Liu Xiaojiao (刘晓娇), Li Bin (李彬), Wang Juan (王娟), et al. Extraction process and antioxidant activity of total flavonoids of *Cephalotaxus sinensis* leaves from Shangluo[J]. Journal of Northwest Forestry University (西北林学院学报), 2017, 32(2): 225-229.

[5] Li Caixia (李彩霞), Gao Haining (高海宁), Jiao Yang (焦扬), et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids from "Black Beauty" potatoes[J]. Food Science (食品科学), 2013, 34(4): 88-93.

[6] Wang Mingyan (王明艳), Lu Jiafeng (鲁加峰), Song Ying (宋瑛), et al. Optimization of extraction conditions for flavonoids from Pubescent holly roots by response surface methodology[J]. Food Science (食品科学), 2011, 32(18): 81-84.

[7] Li Zhiping (李志平), Yin Dulin (尹笃林), Li Hui (李辉), et al. Microwave-assisted method extraction and adsorption stripping of macropore adsorbent of flavonoids in *Diospyros Kaki Leaf*[J]. Journal of Jishou University(Natural Sciences Edition)吉首大学学报(自然科学版), 2006, 27(1): 110-113.

[8] Ma Yanyan (马燕燕), Lu Xiaoxiang (鲁晓翔). Microwave-assisted method extraction and adsorption stripping of macropore adsorbent of flavonoids in *Diospyros Kaki Leaf*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学), 2010, 38(19): 10251-10254.

[9] Zhao Wenhong (赵文红), Zhao Xuan (赵翻), Bai Weidong (白卫东), et al. Research on the extraction technology of total flavonoids from Persimmon leaf with the optimal enzymatic method of response surface [J]. Journal of Shaanxi University of Science (陕西科技大学学报), 2007, 25(5): 54-58.

[10] Lu Runshuang (卢润双), Zhang Junjing (张俊瑾), Li Manxiu (李满秀). Study on the microwave extraction of flavones from Hawthorn and its antioxidant property[J]. Journal of Jinzhong University (晋中学院学报), 2010, 27(3): 69-73.

[11] Huo Hong (霍红), Li Nan (李楠), Pang Ming (庞明). Study on extraction process of hawthorn flavonoids[J]. Heilongjiang Science and Technology Information (黑龙江科技信息), 2011, 16: 38-39.

[12] Dong Jiangtao (董江涛), Li Yan (李燕), Xu Huiqiang (徐慧强), et al. Optimization of microwave-assisted extraction process of total flavonoids from Persimmon on leave using response surface methodology[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2010, 22(4): 521-526.

[13] Zou Liang (邹亮), Zhao Gang (赵钢), Zhou Nong (周浓), et al. Research progress on the extraction and separation techniques of flavone from Tartary buckwheat[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学), 2009, 37(27): 13235-13237.

[14] Peng Jin (彭晶), Yang Ying (杨颖), Niu Fuge (牛付阁), et al. Optimization of enzymatic extraction of flavonoids from Galangal rhizomes (*Alpinia galanga*) [J]. Food Science (食品科学), 2013, 34(14): 169-172.

[15] Zhang Liming (张黎明), Li Ruichao (李瑞超), Hao Limin (郝利民), et al. Response surface methodology for optimization of extracting total flavonoids from Maca leaves and antioxidant evaluation[J]. Modern Food Science and Technology (现代食品科技), 2014, 30(4): 233-239.

[16] Qi Xiaoni (祁小妮), Ma Xiaohong (马晓红), Li Zhenliang (李振亮), et al. Optimization of flavonoids extraction technology from *Salvia miltiorrhiza* by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. Journal of Southern Agriculture (南方农业学报), 2016, 47(11): 1926-1931.

[17] Zhu C P, Liu X L. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92: 1197-1202.

[18] Prakash Maran J, Manikandan S, Thirugnanasambandham K, et al. Box-behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92: 604-611.

[19] Chen Lihua (陈莉华), Zeng Yi (曾毅), Li Chao (李超), et al. Ultrasonic-assisted ethanol extraction of flavonoids from Kiwifruit root and their antioxidant activity[J]. 精细化工, 2013, 30(4): 447-450.