

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.09

响应面法优化琼辣蓼总黄酮提取 工艺及其抗氧化活性研究

赵雅媚, 盛琳, 王宁, 任守忠*

(海南医学院药学院, 海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海口 571199)

[收稿日期] 2019-07-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2019)11-0049-08 [中图分类号] S859.3

[摘要] 为优化海南辣蓼总黄酮的提取工艺条件并探讨总黄酮体外抗氧化活性, 采用热回流提取海南辣蓼总黄酮, 以提取液中总黄酮的百分含量为考察指标, 在单因素试验基础上, 运用 Box-Behnken 设计(BBD) 对影响提取工艺的因素液料比、提取时间及乙醇体积分数进行分析, 应用响应面法优选最佳提取工艺; 采用清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 自由基和羟基自由基的方法, 对最佳工艺所得总黄酮进行抗氧化活性评价。结果表明: 海南辣蓼总黄酮的最佳提取工艺条件为: 液料比 1:15、提取时间 60 min、乙醇体积分数 48%, 在此条件下总黄酮提取率为 10.101%。总黄酮对羟基自由基和 DPPH 自由基的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 2.95 mg/mL 和 0.46 mg/mL。该方法优选的工艺合理, 操作简便, 试验周期短, 且提取的海南辣蓼总黄酮具有良好的抗氧化活性, 为琼辣蓼的深入开发利用提供了实验依据。

[关键词] 琼辣蓼; 总黄酮; 提取工艺; 抗氧化; 响应面法

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Polygonum hydropiper* by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

ZHAO Ya-mei, SHENG Lin, WANG Ning, REN Shou-zhong*

(School of Pharmacy, Hainan Medical University, Hainan Key Laboratory for Research and Development of Tropical Medicinal Plants, Haikou 571199, China)

Abstract: To optimize the extract condition of total flavonoids in *Polygonum hydropiper* by response surface methodology and study its antioxidant activity *in vitro*, the total flavonoids of *Polygonum hydropiper* was extracted by hot reflux method. Taking the percentage content of total flavonoids as the evaluation index, The factors: the solid-liquid ratio, extraction time and ethanol concentration that affect extraction process were analyzed by Box-Behnken design on the basis of single factor experiment, and response surface method was used to optimize

基金项目: 国家自然科学地区基金资助项目(81760788); 全国中医药创新骨干人才培训项目

作者简介: 赵雅媚, 硕士, 从事中药药理研究。

通讯作者: 任守忠。E-mail: 540877323@qq.com

extraction technology. Antioxidant activity of total flavonoids *in vitro* was valued by DPPH and hydroxyl free radical scavenging activity assay. The optimum extraction conditions was as follows: solid – liquid ratio 1:15, extraction time 60 min, and under the optimal condition, the extraction rate of total flavonoids was 10.101%. The experiments showed that the half inhibitory concentration (IC_{50}) of hydroxyl radical and DPPH radical was 2.95 mg/mL, 0.46 mg/mL respectively. The optimal extraction technology was verified as reasonable, feasible and short test cycle, and total flavonoids have good antioxidant effects *in vitro*, which provides experimental basis for the further development and utilization of *Polygonum hydropiper*.

Key words: *Polygonum hydropiper*; total flavonoids; extraction process; antioxidant activity; response surface methodology

辣蓼 (*Polygonum hydropiper* Linn.) 为蓼科 (Polygonaceae) 蓼属 (*Polygonum*) 植物辣蓼的干燥全草, 具有除湿、杀虫、祛风、化滞之功效^[1]。研究表明, 蓼属植物的化学成分中均含有大量具有生物活性的次生代谢产物黄酮类化合物, 能够祛风利湿、止痛散瘀、消肿解毒, 主要用于治疗风湿寒性关节痛、肠胃炎、疮疖、寒痢、腹泻等疾病^[2-3]。挥发油、黄酮类及萜类是辣蓼的主要成分, 其中总黄酮的含量最高。张国英^[4]利用系统预实验方法对辣蓼的化学成分进行了检测, 主要有芦丁、槲皮素、金丝桃苷、山柰酚、异鼠李素等 5 个黄酮类化合物, 其有强抗氧化活性, 清除人体内部自由基等作用^[5]。随着对黄酮研究的深入, 从植物中提取分离总黄酮的方法已有大量文献报道, 但有关琼辣蓼中黄酮类化合物的提取及工艺优化方面的文献较少。

响应曲面设计方法是一种综合试验设计和数学建模的优化方法^[6], 具有试验次数少、精度高、预测值精准的优点, 已广泛应用于中医药领域^[7-8]。但采用响应面法优化琼辣蓼中总黄酮的回流提取工艺目前未见文献报道。鉴于此, 本实验通过比较水提法和醇提法, 根据其试验结果采用较优的提取方法提取琼辣蓼中的总黄酮, 以提取液中总黄酮的百分含量为指标, 通过单因素实验考察乙醇体积分数、液料比、提取时间对总黄酮含量的影响, 以响应面法对提取工艺进行优化, 以期得到一种简单、安全、高效的辣蓼中总黄酮的最佳提取工艺, 并探讨总黄酮体外抗氧化活性, 为进一步拓宽琼辣蓼总黄酮的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 辣蓼经海南医学院药学院曾年开教授鉴定为琼辣蓼, 采自海南省昌江县; 芦丁对照品购于海南诣高仪器有限公司; 二苯基苦味酰基苯肼 (DPPH), 东京化成株式会社, >97.0%; 谷胱甘肽 (GSH), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, ≥98%; 2,6 - 二叔丁基 - 4 - 甲基苯酚 (BHT), 上海麦克林生化科技有限公司, AR; 水杨酸, 硫酸亚铁, 浓过氧化氢等均为西陇科学股份有限公司; 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯, 水为蒸馏水。

1.2 仪器 UV - 1800PC 紫外分光光度仪 (上海凤凰光学科仪有限公司); HC - 150T2 型粉碎机 (永康市绿可食品机械有限公司); HH - 2 数显恒温水浴箱 (金坛市白塔新宝仪器厂); ML - 204 万分之一天平 (梅特勒 - 托利多仪器有限公司); RE - 2000B 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器有限公司); DS - 5510DTH 超声波清洗器 (上海生析超声仪器有限公司)

1.3 实验方法

1.3.1 提取方法比较 准确称取粉碎后的药材粗粉 5 g, 共 6 份。其中三份蒸馏水回流提取, 加入 25 倍量蒸馏水, 水浴加热回流提取 30 min, 放冷, 过滤, 滤渣分别再次加入 10 倍量蒸馏水继续回流, 重复两次后抽滤, 合并三次滤液, 滤液收集于 100 mL 容量瓶中, 最后定容至刻度; 另三份乙醇回流提取, 加入 25 倍量 70% 乙醇, 水浴加热回流提取 30 min, 放冷, 过滤, 滤渣分别再次加入 10 倍量 70% 乙醇继

续回流,重复两次后抽滤,合并三次滤液,滤液收集于 100 mL 容量瓶中,最后定容至刻度。

1.3.2 总黄酮提取液制备 将辣蓼 55 ℃ 干燥至恒重,粉碎,过 40 目筛,准确称取粗粉适量,加入适量乙醇,热回流提取,过滤,滤渣加乙醇继续回流提取,重复两次,抽滤,合并三次滤液收集于 100 mL 容量瓶中,定容。

1.3.3 标准曲线制备 精密称取芦丁对照品 10.0 mg,用 60% 乙醇超声溶解,定容至 50 mL,备用。分别吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 上述溶液,置于 10 mL 量瓶中,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法显色^[9],于 510 nm 处测定吸光度。以吸光度值为纵坐标、芦丁浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.3.4 总黄酮含量测定 精密量取 1.3.1、1.3.2 项下提取液适量,置 10 mL 量瓶中,按 1.3.3 项下方法依次加入 5% 亚硝酸钠(NaNO₂)、10% 硝酸铝、4% 氢氧化钠显色,定容,于 510 nm 处测定吸光度。根据标准曲线计算总黄酮的含量。

1.3.5 单因素试验

1.3.5.1 乙醇体积分数的选择 准确称量药材辣蓼粗粉 3 份于圆底烧瓶中,分别加入 50 倍量 40%、50%、60%、70% 乙醇,浸泡 30 min,于 80 ℃ 加热回流提取 30 min,放冷,过滤,药渣分别再次加入 20 倍量 40%、50%、60%、70% 乙醇继续回流提取,重复两次后抽滤,合并三次滤液,滤液收集于 100 mL 容量瓶中,分别用 40%、50%、60%、70% 乙醇分多次洗涤,最后定容至刻度,摇匀。精密移取提取液溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,按 1.3.3 项方法测定吸光度,根据回归方程,计算各提取液中总黄酮含量。

1.3.5.2 液料比的选择 准确称量药材辣蓼粗粉 3 份于圆底烧瓶中,分别加入 8、10、15、20 倍量 70% 乙醇,浸泡 30 min,于 80 ℃ 水浴中加热回流,分别提取 30 min,放冷,过滤,滤渣分别再次加入 8 倍量 70% 乙醇继续回流,重复两次后抽滤,合并三次滤液,滤液收集于 100 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇分多次洗涤,最后定容至刻度,摇匀。精密移取提取液溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,按 1.3.3 项

方法测定吸光度,根据回归方程,计算各提取液中总黄酮含量。

1.3.5.3 提取时间的选择 准确称量药材辣蓼粗粉 3 份于圆底烧瓶中,分别加入 50 倍量 70% 乙醇(V/V),于 80 ℃ 水浴中加热回流,分别提取 120、90、60、30 min 放冷,过滤,滤渣分别再次加入 20 倍量 70% 乙醇继续回流,重复两次后抽滤,合并三次滤液,滤液收集于 100 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇分多次洗涤,最后定容至刻度,摇匀。精密移取提取液溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,按 1.3.3 项方法测定吸光度,根据回归方程,计算各提取液中总黄酮含量。

1.3.6 提取工艺优化 在单因素实验筛选的基础上,对乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取时间(C)3 个因素,每个因素选择的 3 个水平,分别以 -1、0、1 进行编码。应用 Design - Expert 8.0.6 软件,选用 Box - Behnken 响应面设计模型,设计三因素三水平中心组合试验条件,并对实验结果进行响应面分析,确定最佳工艺条件(表 1)。

表 1 Box - Behnken 试验因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Box - Behnken

水平 levels	因素 Factors		
	X ₁ 乙醇体积分数 Ethanol concentration/%	X ₂ 液料比 Solid - Liquid ratio/(g/mL)	X ₃ 提取时间 Extracting time/min
-1	40	10	30
0	50	15	60
1	60	20	90

1.3.7 抗氧化活性

1.3.7.1 DPPH 自由基的清除测定 分别向试管中加入不同浓度样品溶液 2 mL,再分别加入 2 mL 0.06 mg/mL DPPH 溶液,涡旋混匀,避光放置 30 min,以无水乙醇代替 DPPH,同法操作,作为空白调零,在 517 nm 处测吸光度值 A₁。以无水乙醇代替 DPPH,同法操作,用无水乙醇调零,测其在 517 nm 处的吸光度值 A₀。2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚

(BHT) 为阳性对照, 平行测定 3 次。按下式计算 DPPH 自由基的清除率。

清除率 = $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。A₁: 样品组吸光度值; A₀: 对照组吸光度值。

1.3.7.2 羟基自由基的清除测定 分别向试管中加入不同浓度样品溶液 1 mL, 再依次加入 0.3 mL 9 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液, 0.3 mL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液, 用去离子水补齐至 6 mL, 摆匀后加入 0.3 mL 8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液启动反应, 在 37 ℃ 保温 10 min, 以去离子水代替 H₂O₂ 溶液, 同法操作, 作为空白调零, 在 527 nm 处测吸光值 A₁。以去离子水代替样品溶液, 同法操作, 用去离子水调零, 测 527 nm 处的吸光值 A₀。谷胱甘肽(GSH) 为阳性对照, 平行测定 3 次。按下式计算清除率。清除率 = $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。A₁: 样品组吸光度值; A₀: 对照组吸光度值。

1.4 数据处理 用 SPSS18.0 软件进行数据分析, 绘图采用 Origin 8.5 软件, 响应面分析用 Design - Expert 8.0.6 软件。

2 结果与分析

2.1 提取方法结果比较 由图 1 可知, 酒提法提取液中的总黄酮百分含量, 可达到 5.014%, 明显高于水提法的 1.923%, 酒提法的提取效果更好。因此, 以下研究采用醇提法。

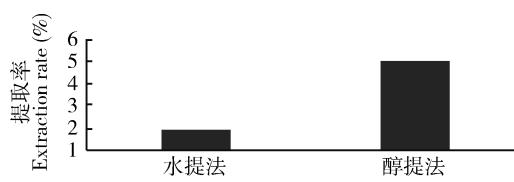


图 1 提取方法对总黄酮含量的影响

Fig 1 Effects of extracting method on total flavonoids content

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响 由图 2 可知, 当乙醇体积分数由 40% 升高至 50% 时, 提取液中总黄酮的提取率逐渐增加, 当继续升高到 60% 时, 提取效果反而下降。因此, 选择乙醇体积分数为 50% 作为响应面法优化试验的中心点。

2.2.2 液料比对黄酮提取率的影响 由图 3 可知, 随着液料比倍数的增加, 辣蓼中总黄酮的提取率逐渐提高, 当液料比为 1:15 时, 总黄酮的提取率达到最大值, 之后随液料比增大而下降。因此, 考虑到提取率和节约溶剂减少损耗两方面的因素, 选择液料比 1:15 作为响应面法优化试验的中心点。

2.2.3 提取时间对黄酮提取率的影响 由图 4 可知, 在 30 ~ 60 min 内, 随着提取时间的延长, 辣蓼总黄酮提取率逐渐升高; 提取时间超过 60 min 后, 继续延长提取时间, 提取率变化不显著, 且黄酮类化合物长时间处于高温环境下, 易被氧化破坏。因此, 提取时间以 60 min 作为响应面法优化试验的中心点。

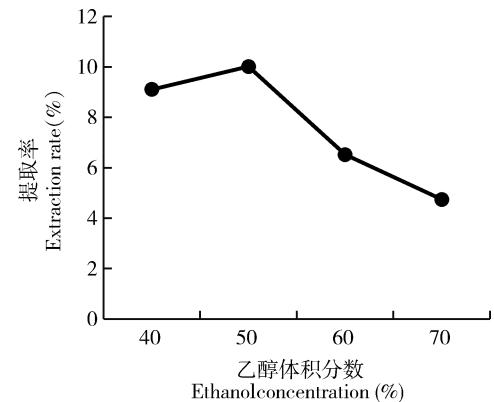


图 2 乙醇体积分数对琼辣蓼总黄酮提取率影响

Fig 2 Effects of Ethanol concentration on extraction rate of flavonoids

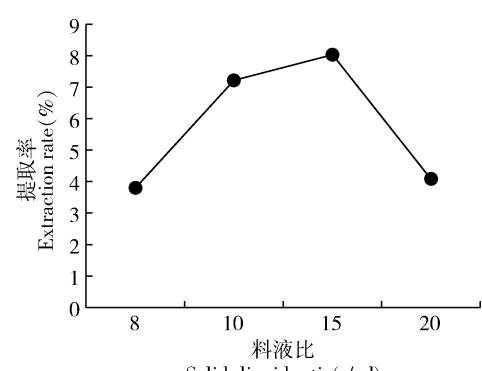


图 3 料液比对琼辣蓼总黄酮提取率的影响

Fig 3 Effects of Solid - liquid ratio on extraction rate of flavonoids

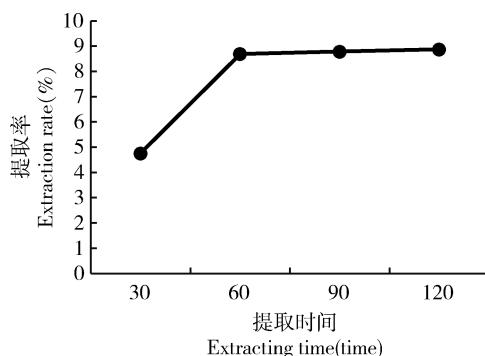


图 4 提取时间对琼棘蓼总黄酮提取率的影响

Fig 4 Effects of Ethanol? time on extraction rate of flavonoids

2.3 响应面实验结果

2.3.1 响应面实验结果与分析 以琼棘蓼中总黄酮得率为响应值,经回归拟合后,得到如下回归方程: $Y=9.25-0.12 \times A+0.32 \times B+0.52 \times C-0.47 \times AB+0.36 \times AC+0.10 \times BC-0.52 \times A^2-0.23 \times B^2+0.14 \times C^2$,对方程进行方差分析,结果见表 2 ~ 表 3。

表 2 Box - Behnken 试验结果

Tab 2 Box - Behnken experiment result

实验号 Test number	因素及水平 Factors and levels			总黄酮 百分含量 Totalflavone Content/%
	X_1 乙醇体积 分数 Ethanol concentration /%	X_2 液料比 Solid - Liquid ratio/(g/mL)	X_3 提取时间 Extracting time/ min	
1	-1	0	-1	8.953
2	0	-1	1	9.663
3	-1	0	1	8.973
4	-1	-1	0	7.581
5	0	-1	-1	8.517
6	0	0	-1	9.249
7	0	1	1	9.984
8	0	0	0	9.155
9	1	0	-1	8.039
10	1	0	1	9.491
11	0	0	0	9.000
12	-1	1	0	9.691
13	0	0	0	9.221
14	1	-1	0	8.231
15	1	1	0	8.470
16	0	0	0	9.608
17	0	1	-1	8.426

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方差 Mean Square	F 值 F value	P 值 P value
模型 model	6.02	9	0.67	4.9	0.024
X_1	0.12	1	0.12	0.86	0.3855
X_2	0.83	1	0.83	6.09	0.0429
X_3	2.18	1	2.18	15.97	0.0052
X_1X_2	0.88	1	0.88	6.41	0.0391
X_1X_3	0.51	1	0.51	3.76	0.0938
X_2X_3	0.042	1	0.042	0.31	0.5945
X_{12}	1.13	1	1.13	8.29	0.0237
X_{22}	0.23	1	0.23	1.7	0.2332
X_{32}	0.078	1	0.078	0.57	0.4752
残差 Residual	0.96	7	0.14		
失拟项 Lack of Fit	0.75	3	0.25	5.02	0.0765
纯误差 Pure Error	0.2	4	0.05		
总和 Cor Total	6.97	16			

由表 3 可知,模型的 $P = 0.024 < 0.05$,差异显著,表明该模型拟合度良好,得到的回归方程能较好地反映各指标与各因素之间的关系。模型的失拟项的 $P \geq 0.05$,说明失拟项不显著,可利用此模型来分析和预测乙醇回流提取辣蓼中的总黄酮含量^[10]。从方差分析结果可以看出,方程中的 B, AB 对琼辣蓼总黄酮提取的影响是显著的($P < 0.05$),说明 B 因素与 A 因素对总黄酮提取含量的影响是有交互作用而不是简单线性关系;方程中 C 对琼辣蓼总黄酮的提取影响是极显著的($P \leq 0.01$)。 $A, AC, BC, B2, C2$ 对琼辣蓼总黄酮提取的影响不显著。因此,可以得出各因素对总黄酮提取率影响的大小顺序为:提取时间(C)>料液比(B)>乙醇体积分数(A)。

通过 Design - Expert 8.0.6 软件分析,由响应面及回归方程可得出琼辣蓼黄酮类成分的最优提取工艺条件为:乙醇体积分数为 47.79%,液料比为 15 倍,提取时间为 60 min,提取总黄酮百分含量预测值为 10.120%。考虑到实际实验过程中的可操作性,将优化条件修正为:乙醇体积分数 48%,液料比 15 倍,提取时间 60 min。

2.3.2 最优工艺的验证

按照修正后的工艺条件,进行验证试验($n = 3$),所得提取总黄酮的百分含量为 10.101%,与预测值接近,结果表明,该工艺稳定可行。

2.4 抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除能力

琼辣蓼总黄酮对 DPPH 自由基的清除作用如图 5 所示,从图 5 可知,在实验设置的浓度范围内琼辣蓼总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力随浓度增加而增大, IC_{50} 为 0.46 mg/mL,但清除率低于 BHT,其对 DPPH 自由基的清除能力为 BHT 的 7.8%。

2.4.2 羟基自由基清除能力

琼辣蓼总黄酮对羟基自由基清除作用如图 6 所示,从图 6 可以看出,在 1~5 mg/mL 浓度范围内,随浓度增加,清除能力增强, IC_{50} 为 2.95 mg/mL,其对羟基自由基的清除能力优于 GSH。

3 讨论与结论

辣蓼中主要活性成分为黄酮类成分,其中,芦

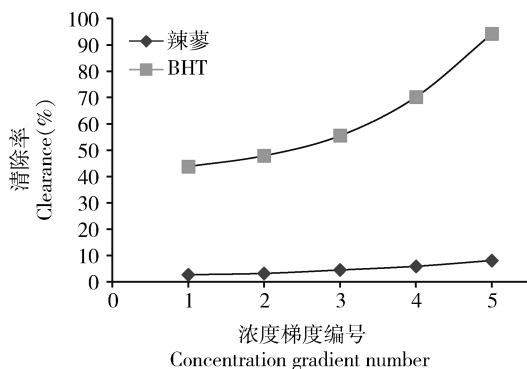


图 5 总黄酮对 DPPH 自由基的清除率

Fig 5 Scavenging capacity to DPPH free radical of flavonoids

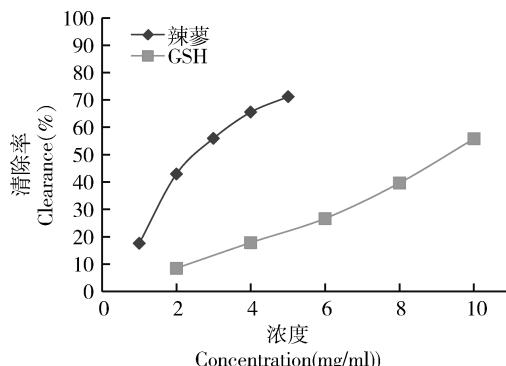


图 6 总黄酮对羟基自由基的清除率

Fig 6 Scavenging capacity to hydroxyl radical of flavonoids

丁、槲皮苷、异鼠李素等为辣蓼中含量最多的黄酮类物质。辣蓼总黄酮提取方法有浸渍法、索氏提取法、渗漉法、加热回流法、超声法等,不同提取方法各有优缺点,目前,超声法和热回流法是最常用的两种提取方法。罗文涓^[11]等采用水煎醇沉法、浸提法、超声法、超声酶解法进行辣蓼总黄酮的提取,结果表明,超声法能耗低、黄酮得率高,优于其他方法。而向蓉^[12]等采用热水、超声、加热回流、索氏法分别对辣蓼总黄酮进行提取,其中超声法和热回流法总黄酮得率相差不大,都明显高于热水和索氏法。超声提取虽能耗低,但不适用于大量药材提取,而热回流提取法不借助仪器,操作简单,既可用于少量药材提取,也可用于大量药材提取,是较为理想辣蓼总黄酮的提取方法,所以本次研究选用乙

醇热回流提取。

从辣蓼中提取黄酮类成分是后续进一步研究的基础,而优化提取工艺是提高辣蓼中黄酮类成分提取率的关键。本实验采用乙醇热回流法对琼辣蓼总黄酮进行提取,在单因素的基础上,利用响应面法建立了琼辣蓼中总黄酮提取工艺条件的二次多项数学模型,探讨了乙醇体积分数、液料比、提取时间对总黄酮提取含量的影响。结果表明:影响提取率的因素大小为提取时间>料液比>乙醇浓度,与文献一致^[13~14],经分析获得了最佳提取条件为:料液比 1:15,乙醇浓度 48%,提取时间 60 min 时,总黄酮提取率为 10.101%。在此条件下,总黄酮的提取率高于部分文献报道超声提取法^[15],这可能与药材产地、采收月份及选用部位等不同也有一定关系,何立美等报道辣蓼的产地、采收不同,其黄酮含量及类型差异很大^[16]。辣蓼总黄酮具有一定抗氧化作用,体外抗氧化活性评价试验结果表明琼辣蓼总黄酮对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和羟基自由基都有清除作用,且呈现出明显的量效关系,样品浓度越高,清除自由基的能力较强,清除率 IC₅₀ 分别为 0.46 mg/mL 和 2.95 mg/mL,其对羟基自由基的清除能力优于谷胱甘肽。本研究所优化的提取工艺简便,稳定,可行,提取率高,且所提取的总黄酮具有抗氧化活性,为琼辣蓼总黄酮的提取及抗氧化应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] 曾维爱,谭济才,谭琳,等. 辣蓼的应用及其功效[J]. 中国农学通报,2006,22(8):369~372.
Zeng W A, Tan J C, Tan L, et al. Application and Efficacy of *Polygonum hydropiper* L[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006,22(8):369~372.
- [2] 巩忠福,杨国林,严作廷,等. 蓼属植物的化学成分与药理学活性研究进展[J]. 中草药,2002,33(1):82~84.
Gong Z F, Yang G L, Yan Z T, et al. Survey of chemical constituents and bioactivity of *Polygonum* L. plants[J]. Chinese Herbal Medicine, 2002, 33(1):82~84.
- [3] 黄红泓,甄汉深. 中草药辣蓼近年来的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2013,22(1):38~40.
- [4] 张国英,曾韬. 辣蓼主要化学成分的研究[J]. 林产化学与工业,2005,(3):21~24.
Zhang G Y, Zeng T. Study on chemical constituents of *Polygonum hydropiper* Linn[J]. Chemistry Industry of Forest Products, 2005,(3):21~24.
- [5] Bors W, Heller W, Michel C, et al. Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology[M]. Cadenas E, Packer L. Handbook of Antioxidants; New York: Marcel Dekker Inc, 1996:409~466.
- [6] 刘伟,孙维峰,吴新荣. 响应面法在优化中药提取工艺中的应用[J]. 中华中医药学刊,2014,32(8):1960~1962.
Liu W, Sun W F, Wu X R. Application of Response Surface Methodology in Optimizing Extraction Technology of Traditional Chinese Medicine [J]. Chinese Archives of Tradition Chinese Medicine, 2014,32(8):1960~1962.
- [7] 李莉,张赛,何强,等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索,2015,34(8):41~45.
Li L, Zhang J, He Q, et al. Application of Response Surface Methodology in Experiment Design and Optimization [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2015,34(8):41~45.
- [8] 万丹娜,饶倩如,俞梦莹,等. Box-Behnken 设计—响应面法优化山楂的醇沉工艺[J]. 中国药房,2018,29(15):2078~2081.
Wan D N, Rao Q R, Yu M Y, et al. Optimization of Ethanol Precipitation Technology of *Crataegus pinnatifida* by using Box-Behnken Design – Response Surface Methodology [J]. Chinese Pharmacy, 2018,29(15):2078~2081.
- [9] 山楂叶. 中华人民共和国药典 2015 年版三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015.
Shan zaye. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [10] 魏娜,魏晴,杨柳,等. 响应面分析法优化海马多糖提取工艺[J]. 生物技术,2015,25(3):290~295.
Wei N, Wei Q, Yang L, et al. Response Surface Methodology for Optimizing the Extraction Process of Hippocampal Polysaccharide [J]. Biotechnology, 2015,25(3):290~295.
- [11] 罗文涓,陶俊宇,杨剑,等. 酶解—超声偶联法提取辣蓼总黄酮方法研究[J]. 畜牧与饲料科学,2017,38(6):4~6.
Luo W J, Tao J Y, Yang J, et al. Development of an enzymolysis-ultrasonic coupling method for extraction of total flavonoids from *Polygonum hydropiper*[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2017,38(6):4~6.

- [12] 向蓉,何立美,陈文露,等. 辣蓼总黄酮提取工艺筛选及优化[J]. 中国兽药杂志,2019,53(2):40-43.
- Xiang R, He L M, Chen W L, et al. Screening and Optimization of Extraction of Flavonoids from *Polygonum hydropiper* [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(2):40-43.
- [13] 石跃武,刘启志,蒋红,等. 辣蓼总黄酮提取工艺及其抗菌活性[J]. 现代畜牧兽医,2017,(4):5-8.
- Shi Y W, Liu Q Z, Jiang H, et al. Extraction processand antibacterial activity on total flavonoids from *Polygonum hydropiper*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, (4):5-8.
- [14] 罗晓韵,程轩轩,杨慧文,等. 水辣蓼总黄酮的提取工艺及不同极性部位体外抑菌活性研究[J]. 中国现代中药,2017,19(6):839-841.
- Luo X Y, Chen X X, Yang W H, et al. Study on Extraction Technology of Total Flavonoids from *Polygonum hydropiper* and Antimicrobial Susceptibility of Different Polarity Fractions [J]. Modern Chinese Medicine, 2017,19(6):839-841.
- [15] 张晶,黄士文,徐绍清,等. 辣蓼总黄酮超声波辅助提取条件优化研究[J]. 中国野生植物资源,2016,35(5):25-30.
- Zhang J, Huang S W, Xu S Q, et al. Ultrasonic technology for extracting flavonoids from *Polygonum hydropiper* [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2016,35(5):25-30.
- [16] 何立美,陈玉婷,刘洪梅,等. 高效液相色谱法同时测定水辣蓼提取物中 6 种黄酮成分的含量[J]. 广东农业科学,2014,(13):94-98.
- He L M, Chen Y T, Liu H M, et al. Simultaneous determination of six kinds of flavonoid in extract of *Polygonum hydropiper* L. by HPLC [J]. Journal of Guangdong Agricultural Sciences, 2014 , (13):94-98.

(编 辑:侯向辉)