

超声辅助提取甘青虎耳草总黄酮工艺及其抑菌作用

崔 玮¹, 李玉兰^{2,3}, 杨爱梅^{3,*}

(1.河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000; 3.张掖铁路学校, 甘肃 张掖 734012;

3.兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘 要:目的: 研究甘青虎耳草(*Saxifraga tangutica* Engl.)总黄酮的提取工艺及其抑菌作用。方法: 用正交试验超声波辅助乙醇提取总黄酮; 用琼脂扩散法和肉汤倍比稀释法研究不同质量浓度总黄酮提取物对 6 种供试菌的抑菌作用。结果: 方差分析得各因素影响的顺序为提取次数>乙醇体积分数>超声时间>料液比, 最佳工艺为提取 50℃、超声功率 100W、乙醇体积分数 80%、料液比 1:25(g/mL)、超声时间 35min、提取 4 次, 在此条件下提取率达 81.73mg/g; 抑菌试验显示总黄酮提取物对细菌均有抑制作用, 对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌的最小杀菌质量浓度分别为 0.156、0.313、0.625mg/mL; 对酵母菌的抑制作用较弱; 对霉菌没有抑制作用。结论: 本实验结果可为甘青虎耳草总黄酮提取工艺的确定及在抑菌方面的应用提供实验依据。

关键词: 甘青虎耳草; 总黄酮; 超声波; 提取工艺; 抑菌

Ultrasonic-Assisted Extraction and Antibacterial Activity of Total Flavonoids from Whole Plants of *Saxifraga tangutica* Engl.

CUI Wei¹, LI Yu-lan^{2,3}, YANG Ai-mei^{3,*}

(1. College of Agricultural Technique and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, China 2. School of Zhangye Railway, Zhangye 734012, China; 3. College of Life and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective: To investigate the extraction and antioxidant activity of total flavonoids from whole plants of *Saxifraga tangutica* Engl. Methods: Orthogonal array design was employed to optimize extraction conditions. The antibacterial effect of total flavonoid extract at different concentrations on 6 strains was evaluated by agar diffusion and broth dilution methods. Results: According to the results of analysis of variance, four extraction parameters could be ranked in decreasing order of their effect on extraction efficiency as follows: extraction number > ethanol concentration > ultrasonic treatment time > material-to-liquid ratio. The optimal extraction conditions were ethanol concentration of 80%, material-to-liquid ratio of 1:25 (g:mL), ultrasonic treatment time of 35 min, repeated ultrasonic treatment number of 4, ultrasonic power of 100 W and extraction temperature of 50 °C. Under these conditions, the extraction efficiency of total flavonoids was 81.73 mg/g. Total flavonoids from whole plants of *Saxifraga tangutica* Engl. had inhibitory effect on all tested strains. The minimum inhibitory concentrations were 0.156, 0.313 mg/mL and 0.625 mg/mL against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, respectively. The anti-yeast activity was weak. No inhibitory effect on mold was found. Conclusion: This study can provide experimental references for further development and utilization of *Saxifraga tangutica* Engl.

Key words: *Saxifraga tangutica* Engl.; total flavonoids; ultrasonic treatment; extraction process; antibacterial activity
中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)12-0108-06

甘青虎耳草(*Saxifraga tangutica* Engl.)是虎耳草科(*Saxifragaceae*)虎耳草属的多年生常绿草本植物, 别名耳朵红、老虎耳等, 分布于青海、甘肃、西藏及四川

的石渠、色达、壤塘、德格、巴塘等县。甘青虎耳草为常用藏药, 其味苦性凉, 清热, 治肝、胆热症和创伤^[1], 还可治急性中耳炎、风热咳嗽以及具有抑

收稿日期: 2011-05-11

基金项目: 兰州理工大学优秀青年教师资助计划项目(Q200808)

作者简介: 崔玮(1969—), 男, 副教授, 硕士, 主要从事动物和人体解剖生理研究。E-mail: zhangyecw@163.com

* 通信作者: 杨爱梅(1976—), 女, 副教授, 博士, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: yangaime@163.com

菌、抗病毒、抗炎和抗肿瘤等药理作用^[2-4]。现代药理研究表明黄酮具有抗氧化、抗癌、抑菌等多种生物活性及药理作用,对人类的肿瘤、衰老和农业病虫害的防治具有重要意义^[5-6]。刘世旺^[7]、钮绪燕^[8]、陈娇^[9]等分析了虎耳草(*Saxifraga stolonifera* Meerb)乙醇提取物有抑菌作用。本实验以芦丁为对照品,通过单因素和正交试验,研究超声波辅助提取甘青虎耳草总黄酮工艺和对6种不同菌株的抑菌效果,为甘青虎耳草的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

甘青虎耳草全株购自青海塔尔寺藏医院,植物标本由兰州大学生命科学院张国梁教授鉴定为 *Saxifraga tangutica* Engl., 粉碎,过80目筛,60℃烘烤至质量恒定后,备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisia*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、玉米大斑菌(*Exserohilum turcicum*) 河西学院微生物实验室。

芦丁标准品 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心;无水乙醇、石油醚、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、氯化钠、牛肉膏和蛋白胨均为国产分析纯。

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;电子分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;电热干燥箱 上海申光仪器仪表有限公司;JY92-II型超声波细胞破碎仪 宁波新芝科学仪器厂;旋转蒸发器 RE-52 上海精宏实验设备有限公司;LD4-2A型低速离心机 北京医用离心机厂;SW-CT-2D型洁净工作台 苏州智净净化设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线制作

精确称取105℃常压干燥至质量恒定的芦丁标准品10.0mg,加无水乙醇适量,超声振荡溶解,定容50mL,即得芦丁对照品标准溶液(0.20mg/mL)。精密量取对照品标准溶液0.00(空白对照)、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00mL,分别置于1~9号10mL容量瓶中,加入5%亚硝酸钠溶液0.3mL,放置6min,再加入10%硝酸铝溶液0.3mL,放置6min,加入4%氢氧化钠溶液4mL,加水定容至刻度,摇匀,静置10min,在511nm波长处测其吸光度,以质量浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $A = 10.858C + 0.0016$, $r = 0.9997$,在0.011~0.088mg/mL范围内呈良好的线性关系。

1.2.2 总黄酮的提取和测定

取甘青虎耳草粉末150g,置500mL锥形瓶中以料液比1:2加入石油醚脱脂2h,重复至石油醚层几近无色,回收石油醚,干燥备用。

精密称取脱脂的虎耳草粉末1.000g,置50mL锥形瓶中,用不同体积分数的乙醇超声波辅助水浴提取一定时间,将提取液旋蒸至干后,用相应体积分数的乙醇溶解,定容于50mL容量瓶中待测。精密量取待测提取液1.0mL于10mL容量瓶中,按1.2.1节方法显色后,在511nm波长处测定吸光度,计算总黄酮的提取率。

$$\text{总黄酮提取率}(\text{mg/g}) = \frac{(0.0921A - 0.0001) \times \text{测定液稀释倍数} \times \text{提取液总体积}}{\text{提取物质量}}$$

1.2.3 总黄酮提取单因素和正交试验

拟定乙醇体积分数、料液比、提取时间、温度和提取次数进行单因素试验。在单因素试验基础上确定正交试验工艺参数,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,经方差分析确定甘青虎耳草总黄酮提取的最佳工艺。

1.2.4 抑菌实验

1.2.4.1 总黄酮供试液制备

称取50g脱脂的虎耳草粉,按照最佳工艺得到提取液,醇沉法除多糖后,制得粗黄酮粉。精确称取20mg粗黄酮粉,用60%乙醇定容至50mL。按1.2.1节方法显色后,在511nm波长处测定吸光度,按总黄酮液列公式计算:

$$\text{总黄酮纯度}(\%) = \frac{(0.0921A - 0.0001) \times \text{测定液稀释倍数} \times \text{提取液总体积}}{\text{粗黄酮粉质量}}$$

计算得总黄酮纯度为26.35%,用30%的乙醇配制总黄酮为10、5、2.5、1.25mg/mL的供试液备用^[10]。

1.2.4.2 菌悬液制备

将供试菌种分别接种于固体培养基上活化培养后,在无菌操作条件下,用麦氏比浊法,取活化后的菌落(霉菌取孢子)与无菌生理盐水配成菌悬液浓度0.5McFarland单位的标准接种物(即 1×10^6 CFU/mL),再用无菌生理盐水按10倍稀释法将标准接种物配成 1×10^6 CFU/mL的菌悬液^[11]。

1.2.4.3 抑菌活性的测定

采用琼脂扩散法。参考文献[12-13]方法进行。在直径9cm的培养皿中倒入15mL灭菌的肉汤培养基,凝固后取0.1mL菌悬液均匀涂布后安放牛津杯,杯内加300μL供试液或对照液(阳性对照为1000U/mL的链霉素,空白对照为30%乙醇溶液),37℃恒温培养24h,采用交叉法测量抑菌圈直径。每组3个重复。

1.2.4.4 最低抑菌质量浓度测定

采用肉汤倍比稀释法。参考文献[14-15]方法进行。取13支灭菌试管,1号试管加1.5mL肉汤培养液,2~12号管各加1.0mL肉汤培养液,再向1号试管加0.5mL含黄酮10mg/mL供试液,然后由1~10管依次进行倍比稀释,1~10号管的供试液质量浓度依次为2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.020、0.010、0.005mg/mL。然后向1~11号试管每管加 1×10^6 CFU/mL菌悬液1.0mL,其中11号管作为阴性对照;12号管加入1.0mL供试液代替菌液作为阳性对照;13号管加入1.0mL 30%乙醇和1.0mL菌液作为溶剂对照。将13支试管置于37℃恒温培养箱中培养18~24h,然后对各管进行比浊,以确定最低抑菌质量浓度。供试管的混浊度小于阴性对照管表明有抑菌活性,混浊度与阴性对照管相同表示无抑菌活性,混浊度越大表明抑菌活性越小。将未见细菌生长的管内肉汤转接到普通琼脂培养基平皿上,再于37℃条件下培养18~24h,将琼脂平皿上未见细菌生长的药物质量浓度作为最低杀菌质量浓度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对总黄酮提取率的影响

精密称取已脱脂的虎耳草粉末1.000g,用70%乙醇为溶剂,温度50℃、超声功率100W、时间20min,提取2次。考察不同料液比1:15、1:20、1:25、1:30、1:35(g/mL)对黄酮提取率的影响。

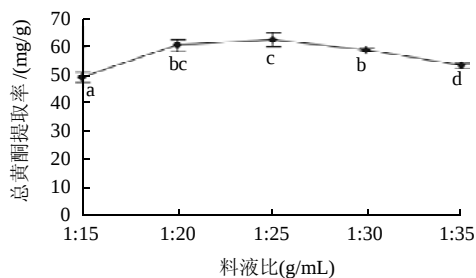


图1 料液比对总黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of material/liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

由图1可见,溶剂用量对黄酮提取率影响明显,随溶剂用量的增加而先上升后下降。料液比与总黄酮提取率的关系显著($P < 0.05$)。其中料液比为1:25时总黄酮提取率最高,为62.75mg/g,与其他因素水平差异极显著。因此,料液1:25为最佳料液比。当溶剂用量大于1:25时,黄酮提取率下降,这可能是由于在超声波

的作用下溶出黄酮的同时还能溶出更多其他物质,使浸提液黏度增大,扩散速度变慢,导致黄酮类化合物不易溶出。

2.1.2 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

料液比1:25、其余操作同2.1.1节,考察乙醇体积分数30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%对黄酮提取率的影响。

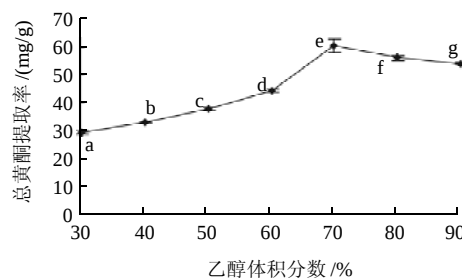


图2 乙醇质量分数对总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

由图2可见,乙醇体积分数对黄酮提取率影响明显,随乙醇体积分数的增加提取率先上升后下降。乙醇体积分数与总黄酮提取率的关系显著($P < 0.05$)。乙醇体积分数为70%时总黄酮提取率最高,为60.28mg/g。

2.1.3 提取次数对总黄酮提取率的影响

料液比1:25、其余操作同2.1.1节,考察提取次数1、2、3、4、5次对黄酮提取率。

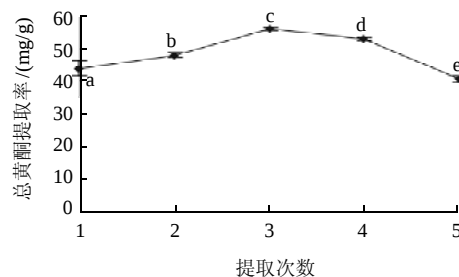


图3 提取次数对总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of repeat extraction number on the extraction rate of total flavonoids

由图3可知,提取次数对总黄酮提取率的影响显著,随提取次数的增多,总黄酮提取率先上升后下降,提取次数与总黄酮提取率的关系极显著($P < 0.05$)。提取次数为3次时,黄酮提取率最高,为55.92mg/g,与其他各次的差异显著($P < 0.05$)。

2.1.4 超声时间对总黄酮提取率的影响

料液比为1:25、其余操作同2.1.1节,考察超声时间为15、20、25、30、35、40min对黄酮提取率的影响。

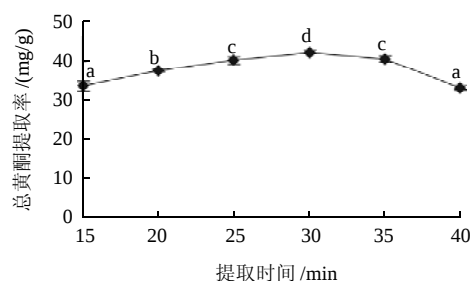


图4 超声时间对总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment time on the extraction rate of total flavonoids

由图4可见,提取时间对总黄酮提取率的影响明显,随提取时间的增加,总黄酮提取率先上升后下降,提取时间与总黄酮提取率的关系显著($P < 0.05$),提取时间30min时总黄酮提取率最高为42.35mg/g。

2.1.5 温度对总黄酮得提取率的影响

料液比1:25、其余操作同2.1.1节,考察提取温度30、40、50、60、70℃对总黄酮提取率的影响。

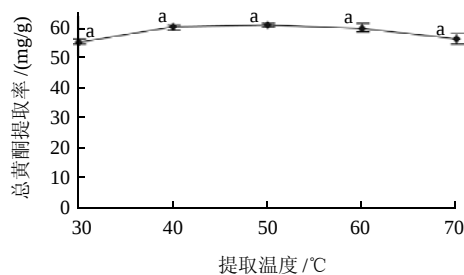


图5 提取温度对总黄酮提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

由图5可见,提取温度对总黄酮提取率的影响不明显,差异不显著($P > 0.05$),但50℃时总黄酮提取率最高为60.12mg/g,故选取50℃进行正交试验。

2.2 正交试验结果

根据单因素试验结果,选取乙醇体积分数、料液比、超声提取时间和提取次数进行四因素三水平正交试验,因素水平见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 甘青虎耳草总黄酮提取工艺正交试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal array design

水平	因素			
	A 体积分数/%	B 料液比(g/mL)	C 时间/min	D 提取次数
1	60	1:20	25	2
2	70	1:25	30	3
3	80	1:30	35	4

表2 $L_9(3^4)$ 甘青虎耳草总黄酮提取工艺正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal array design matrix and experimental results

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率/(mg/g)
1	1	1	1	1	51.00
2	1	2	2	2	64.95
3	1	3	3	3	72.57
4	2	1	2	3	76.81
5	2	2	3	1	61.10
6	2	3	1	2	62.29
7	3	1	3	2	76.52
8	3	2	1	3	79.57
9	3	3	2	1	60.74
K_1	62.90	68.11	64.29	57.61	
K_2	66.73	68.54	67.50	67.92	
K_3	72.28	65.76	70.12	76.38	
R	9.38	3.28	5.84	18.76	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

因素	偏差平方和	自由度	F比	$F_{0.05}$ 值	显著性
A	133.345	2	3.791	6.940	
B	19.066	2	0.542	6.940	
C	51.274	2	1.458	6.940	
D	529.805	2	15.064	6.940	*
误差	70.34	2			

注:*.差异显著。

由表2可知:影响甘青虎耳草中总黄酮提取率的因素依次为 $D > A > C > B$,即提取次数>乙醇体积分数>超声时间>料液比;最佳工艺为 $A_3B_2C_3D_3$,即选用80%乙醇、料液比1:25(g/mL)、在50℃条件下提取35min、提取4次。由表3可知,提取次数对甘青虎耳草黄酮提取率具有显著影响($P < 0.05$)。

2.3 验证实验

在最佳条件下进行3次重复实验,总黄酮平均提取率为81.73mg/g,大于正交试验中最大提取率,因此可得最优水平可靠且该工艺稳定可行。

2.4 抑菌活性测定

如表4所示,甘青虎耳草总黄酮对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌和啤酒酵母有抑制作用。质量浓度较低(1.25mg/mL)时,对细菌已表现明显的抑菌效果,抑菌圈直径>14.00mm,而对啤酒酵母的抑菌圈直

表4 不同质量浓度甘青虎耳草黄酮的抑菌作用

Table 4 Inhibitory activity of total flavonoids from *Saxifraga tangutica* Engl. at various concentrations on bacteria

mm

供试菌株	供试液质量浓度/(mg/mL)			阳性对照(链霉素 1000U/mL)	空白对照(30%乙醇溶液)
	1.25	2.50	5.0		
金黄色葡萄球菌	10.83 ± 0.35	13.35 ± 0.64	31.80 ± 2.44	22.37 ± 0.85	—
枯草杆菌	9.31 ± 0.71	13.41 ± 1.14	26.19 ± 1.48	15.61 ± 0.67	—
大肠杆菌	6.71 ± 0.82	9.42 ± 0.40	17.88 ± 1.14	16.05 ± 0.48	—
啤酒酵母	—	2.57 ± 0.60	4.13 ± 0.37	3.50 ± 0.35	—
米曲霉	—	—	—	—	—
玉米大斑菌	—	—	—	—	—

注：表中抑菌圈直径为3次试验的平均值；—表示无抑菌圈。

表5 甘青虎耳草黄酮的最低抑菌质量浓度

Table 5 Minimum inhibitory concentration of total flavonoids from *Saxifraga tangutica* Engl.

菌种	质量浓度/(mg/mL)										溶剂对照	阴性对照	阳性对照
	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	0.020	0.010	0.005			
金黄色葡萄球菌	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
枯草杆菌	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
大肠杆菌	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

注：+++ 表示清澈；++ 表示较清澈；+ 表示较混浊；- 表示混浊。

径<7.00mm；对细菌的抑制作用随着质量分数的增加而增强。提取物对供试菌株的抑制效果顺序为金黄色葡萄球菌>枯草杆菌>大肠杆菌>啤酒酵母，对米曲霉和玉米大斑菌没有抑菌作用。

2.5 最低抑菌质量浓度测定

由表5可知，甘青虎耳草黄酮对3种供试菌的抑菌活性大小顺序为金黄色葡萄球菌>枯草杆菌>大肠杆菌，对3种菌的最低抑菌质量浓度分别为0.078、0.078、0.156mg/mL，即对革兰氏阳性菌的抑菌活性大于革兰氏阴性菌。

2.6 最低杀菌质量浓度的测定

表6 甘青虎耳草黄酮的最低杀菌质量浓度

Table 6 Minimum bactericidal concentration of total flavonoids from *Saxifraga tangutica* Engl.

菌种	菌落数					
	2.50 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	0.313L mg/m	0.156 mg/mL	0.078 mg/mL
金黄色葡萄球菌	0	0	0	0	3	—
枯草杆菌	0	0	0	4	>5	—
大肠杆菌	0	0	0	>5	—	—

注：—表示未进行划线培养。

由表6可知，甘青虎耳草总黄酮对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌的最小杀菌质量浓度分别为0.156、0.313、0.625mg/mL。其中对金黄色葡萄球菌的最小杀菌质量浓度最小，说明对其杀灭效果最好。

3 讨论与结论

目前普遍认为空化效应、热效应和机械作用是超声技术在中药提取中的三大理论依据^[16-17]。因此超声提取具有提取速度快、提取率较高的优点并且可避免高温对活性成分的影响^[18-20]。本实验在单因素试验基础上进行正交试验，研究超声波辅助提取甘青虎耳草总黄酮的最佳工艺。从正交试验和方差分析结果可知，各因素对提取率的影响次序为提取次数>乙醇体积分数>超声时间>料液比；温度对得率影响差异不显著($P>0.05$)；确定最优组合为80%乙醇、料液比1:25(g/mL)、在超声功率100W、50℃条件下提取35min、连续提取4次，黄酮提取率达到最高，为81.73mg/g。该提取工艺具有稳定性好，时间短，操作简便，生产成本低等优点，为工业化开发甘青虎耳草黄酮资源提供实验参考。

甘青虎耳草总黄酮对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌和啤酒酵母均有抑制作用。对菌株的抑制作用随着浓度的增加而增强；抑制效果顺序为金黄色葡萄球菌>枯草杆菌>大肠杆菌>啤酒酵母。甘青虎耳草总黄酮对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌的最小杀菌质量浓度分别为0.156、0.313、0.625mg/mL。本实验为开发和利用甘青虎耳草抑菌作用提供一定依据。

参考文献：

- [1] 西北高原生物所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1991: 107.
- [2] 丁家欣, 张立石, 张玲, 等. 虎耳草提取物对前列腺癌细胞凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(12): 905-907.
- [3] CHEN Zhuo, LIU Yumei, YANG Song, et al. Studies on the chemical

- constituents of *Saxifraga stolonifera*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008, 16(3): 1337-1344.
- [4] AOYAGI Y, KASUGA A, FUJIHARA S, et al. Isolation of antioxidative compounds from *Saxifraga stolonifera*[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaki Kaishi, 1995, 42(12): 1027-1030.
- [5] 朱丹, 袁芳, 孟坤, 等. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(6): 387-389.
- [6] ALMAJANO M P, CARBÓ R, JIMÉNEZ J A L, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 55-63.
- [7] 刘世旺, 徐艳霞. 虎耳草乙醇提取物抑菌作用的研究[J]. 资源开发与市场, 2007, 23(6): 481-482.
- [8] 钮绪燕, 吴文君, 刘虎奇, 等. 虎耳草科植物杀菌活性的初步研究[J]. 西北农业学报, 1996, 5(2): 61-65.
- [9] 陈娇, 代光辉, 顾振芳, 等. 58种植物提取液对葡萄霜霉病菌的抑菌活性筛选研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 9-13.
- [10] 黎继烈, 张慧, 王卫, 等. 金橘黄酮抑菌作用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 38-40.
- [11] 史高峰, 吕玲玉, 陈学福, 等. 甘薯叶浸膏抑菌活性的研究[J]. 中成药, 2010, 32(1): 133-134.
- [12] 蒋雨, 陈安均, 于新, 等. 野菊花提取物抑菌活性[J]. 四川农业大学学报, 2010, 28(3): 329-332.
- [13] 张武岗, 李定刚, 宋毓民, 等. 紫花地丁抑菌活性成分的研究初报[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(11): 125-128.
- [14] 吴国娟, 张中文, 李焕荣, 等. 中草药对奶牛乳房炎 6 种致病菌的抑菌效果观察[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 195-198.
- [15] 童延清, 李晖. 紫花地丁、蒲公英体外抗菌作用研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9): 669-671.
- [16] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中草药, 1993, 24(10): 548-549.
- [17] 王延峰, 李延清, 郝永红, 等. 超声法提取银杏叶黄酮的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 166-167.
- [18] HUANG Wen, XUE An, NIU Hai, et al. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro[J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 1147-1154.
- [19] ZHU Xiuling, DAI Qingyuan, CAI Weirong, et al. Response surface methodology for optimizing the ultrasonic-assisted extraction of rice bran extract with both high total phenolic content and total antioxidant capacity[J]. Food Science, 2010, 31(20): 24-30.
- [20] ZHANG Guowen, HE Li, HU Mingming. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities *in vitro*[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(1): 18-25.