

DOI:10.11937/bfyy.201610030

微波提取法优选海州常山叶总黄酮的提取工艺

张 颖^{1,2}, 杨 舸³

(1. 攀枝花学院 生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000; 2. 干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室, 四川 攀枝花 617000; 3. 攀枝花市食品与药品检验所, 四川 攀枝花 617000)

摘 要:以海州常山干叶粉末为试材, 采用微波技术提取总黄酮粗品, 并通过紫外-可见分光光度计测定样品液黄酮含量, 以总黄酮提取量为考察指标, 研究了料液比、乙醇浓度、提取时间和提取温度等工艺条件对提取的影响, 设计了 4 因素 3 水平正交实验, 进一步对提取海州常山叶总黄酮的工艺条件进行优化。结果表明: 提取海州常山叶总黄酮较佳的提取条件为预浸泡 2 h, 微波功率 200 W, 提取温度 60 ℃, 乙醇溶液浓度 70%, 料液比 1:35 g·mL⁻¹, 微波提取 2 次, 每次 3 min, 提取总黄酮量达 71.15 mg·g⁻¹; 微波提取技术应用于海州常山叶总黄酮的提取工艺可行, 该技术可为海州常山植物资源的开发和利用提供参考依据。

关键词:海州常山; 黄酮; 正交实验; 提取**中图分类号:**Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0118-05

海州常山(*Clerodendrum trichotomum* Thunb.) 属马鞭草科赧桐属木本植物, 分布于我国华东、华北、西南等地, 也见于日本、菲律宾等国家^[1], 是集生态造林、园林绿化、药用、食用等多种用途的优良植物^[2]。海州常山植株中富含多种生物活性物质, 如黄酮类、生物碱类、糖苷类、挥发油类等, 且多分布于叶和嫩枝等部位^[3-4]。现已证实, 黄酮类物质有利于免疫调节, 对辐射、氧化、肿瘤、炎症、病毒、真菌等具有较好的抵抗作用^[5-8]。海州常山中的黄酮类成分自 20 世纪 60 年代即在国内开始分离, 目前共发现有芹菜素、车前草苷、海常素、海州常山苷、臭梧桐素等 8 种黄酮化合物^[9-11]。溶剂法、微波法、超声波法、酶解法、超临界萃取法、双相萃取法等均适用于黄酮类物质的提取^[12-14]。

攀西地区的干热河谷气候条件非常适合海州常山生长, 多见野生, 也有人工种植。海州常山在民间被称为斑鸠菜, 其叶及嫩芽等部位食用价值高, 深受消费者青睐。关于海州常山植株有效成分的提取工艺研究尚鲜见报道, 该研究尝试把微波技术应用到海州常山叶总黄酮的提取工艺中, 利用正交实验法优选海州常山叶总黄酮提取的工艺条件, 以期海州常山植株可利用的药用和食用有效成分研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

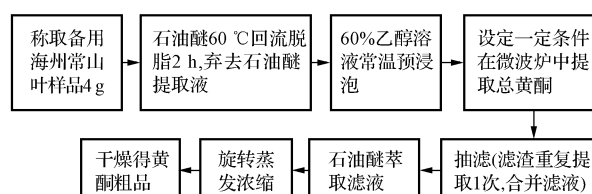
供试海州常山叶采集于攀枝花市米易县山区。选择新鲜且呈中绿叶龄叶片自然晒干后, 置入恒温干燥箱中于 60 ℃ 条件烘干至恒重, 再将叶片去除叶柄后进行粉碎, 过 60 目筛备用。

供试试剂: 芦丁标准品(纯度≥98%, 上海金穗生物科技有限公司); 石油醚(60~90 ℃ AR), 无水乙醇(AR), 硝酸铝(AR), 氢氧化钠(AR)(成都市科龙化工试剂厂); 亚硝酸钠(AR)(天津市化学试剂厂六厂三分厂)。

供试仪器: MKX-J1-3 实验室微波炉(青岛迈可威微波应用技术有限公司); HH-8 数显恒温循环水浴锅(郑州杜甫仪器厂); YP202N 分析天平(上海恒平科学仪器有限公司); HR/06/BC 粉碎机(珠海飞利浦家庭仪器有限公司); 02-2AB 电热恒温干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司); 722 型紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); AP-01 旋转蒸发器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 60M AQM-100 纯水仪(北京中西远大科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄酮类物质提取流程



第一作者简介:张颖(1981-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事生物分离与细胞工程的教学与研究等工作。E-mail: zemn@sina.com.

基金项目:攀枝花学院校级资助项目(2014YB34)。

收稿日期:2015-12-16

1.2.2 标准曲线制作 精密称取芦丁标准品 10 mg (105 °C干燥至恒温),用适量 60%乙醇溶液溶解芦丁后水浴条件放冷,并定容至 100 mL,即得浓度为 0.1 mg · mL⁻¹的芦丁标准溶液。用电子天平分别称取 5 g NaNO₂、10 g Al(NO₃)₃、5 g NaOH 加入去离子水分别稀释定容至 100 mL容量瓶中,即得 5%的 NaNO₂、10%的 Al(NO₃)₃、5%的 NaOH 溶液。用移液管精密移取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的芦丁标准品溶液,分别置于 10 mL 比色管中,依次在 6 个比色管中各加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀静置 5 min 后分别加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀静置 5 min,然后加 5% NaOH 溶液 4 mL,最后用 60%乙醇稀释至刻度,摇匀静置 10 min^[15],在吸收波长 510 nm 下测定吸光值。绘制标准曲线时,以空白校正零点,溶液质量浓度 $x(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,吸光值 y 为纵坐标,得到回归方程,见图 1。

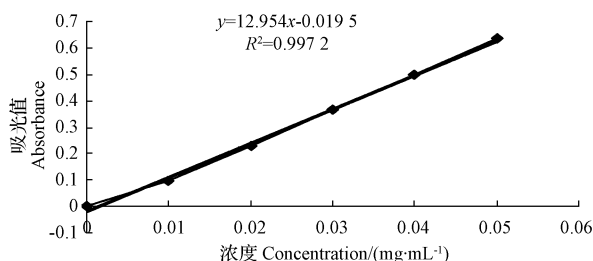


图1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Standed curve of rutin

1.2.3 粗品总黄酮提取量计算方法 称取 10 mg 干燥的黄酮粗品,用 60%乙醇溶液溶解定容至 100 mL。用量筒取 4 mL 待测粗品溶液,置于 10 mL 的比色管中,依次加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀静置 5 min,之后分别加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀静置 5 min,然后加 5% NaOH 溶液 4 mL,最后用 60%乙醇稀释至刻度,摇匀静置 10 min,以空白校正零点,用可见分光光度计于 510 nm 处检测其吸光度。根据测得的吸光度数据及标准曲线,计算黄酮粗提物中的黄酮提取量:吸光度 $A=12.954X-0.0195$;总黄酮提取量 $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{M_{\text{粗}} \times (X \times N \times V_{\text{样}} / W_{\text{样}} \times 10^3)}{M_{\text{料}}}$;其中, X 表示样品溶液中

黄酮浓度 $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$; N 表示稀释倍; $M_{\text{粗}}$ 表示粗产品干重(g); $M_{\text{料}}$ 表示用于提取的海州常山叶粉干重(g); $V_{\text{样}}$ 表示定量体积(mL); $W_{\text{样}}$ 表示称取的粗产品质量(mg)。

1.2.4 单因素试验 预浸泡处理对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响:称取原料 4 g,设定料液比 1:15 g · mL⁻¹,提取温度 70 °C,微波功率 100 W,乙醇溶液浓度 60%,分别在常温条件下预浸泡 0、1、2、4、6 h 后,进行微波提取 2 min,每组 3 个平行试验,研究预浸泡处理对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响。微波功率对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响:称取原料 4 g,设定料液比 1:

15 g · mL⁻¹,提取温度 70 °C,用 60%乙醇溶液分别在 100、200、300、400、500 W 不同功率条件下提取 2 min,每组 3 个平行试验,研究微波功率对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响。提取时间对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响:称取原料 4 g,设定料液比 1:15 g · mL⁻¹,提取温度 70 °C,微波功率 100 W,用 60%乙醇溶液分别提取 1、2、3、4、5 min,每组 3 个平行试验,研究提取时间对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响,因微波提取是间歇式提取,提取时间的记录不包括停止间隔时间。提取剂浓度 (V/V) 对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响:称取原料 4 g,设定料液比 1:15 g · mL⁻¹,提取温度 70 °C,微波功率 100 W,分别用 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇溶液提取 2 min,每组 3 个平行试验,研究提取剂浓度对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响。料液比对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响:称取原料 4 g,微波功率 100 W,提取温度 70 °C,分别采用 1:10、1:15、1:20、1:30、1:40 g · mL⁻¹ 的料液比条件(W/V),用 60%乙醇溶液提取 2 min,每组 3 个平行试验,研究料液比对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响。提取温度对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响:称取原料 4 g,设定料液比 1:15 g · mL⁻¹,微波功率 100 W,用 60%乙醇溶液分别在 40、50、60、70、80 °C 条件下提取 2 min,每组 3 个平行试验,研究温度对海州常山叶总黄酮提取工艺的影响。

1.2.5 正交实验 该研究用试验微波炉为开放式系统,温度一定时微波功率会自动调节,因此以温度作为工艺参数比微波功率更准确,结合其它的相关研究^[16-20],根据单因素确定微波功率 200 W,选择提取温度、乙醇浓度、提取时间和料液比为海州常山叶总黄酮提取工艺研究考察因素,每因素拟定 3 个水平,运用 L₉ (3⁴) 正交表(表 1),研究海州常山叶总黄酮的最佳提取工艺条件。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平 Level	因素 Factors			
	A 提取温度 Extraction temperature/°C	B 提取时间 Extraction time/min	C 提取剂浓度 Extractant concentration/%	D 料液比 Material-liquid ratio /(g · mL ⁻¹)
1	50	2.5	50	1:25
2	60	3.0	60	1:30
3	70	3.5	70	1:35

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 预浸泡处理 由图 2 可知,原料经过提取剂一定时间的常温浸泡后提取得到总黄酮量高于不经过提取剂常温浸泡处理的结果。当预浸泡时间超过 2 h 后,总黄酮提取量变化不大,故选择提取剂预浸泡 2 h 后进行微波提取。

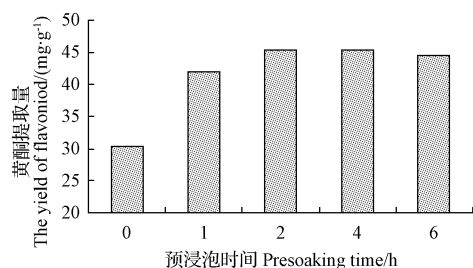


图2 乙醇预浸泡与总黄酮提取量

Fig. 2 Presoaking and the yield of total flavonoid

2.1.2 微波功率的选择 由图3可知,在一定范围内,功率增大,总黄酮提取量随之提高,微波功率达200 W提取效果最好,随后提取量反而减少。微波功率增加后会使得加热速率变大,渗透扩散等作用加快,有利于植物材料中黄酮对微波能的吸收,使目标成分更容易被溶出,提取量增大。微波功率过大,温度变化快,可能会导致黄酮结构降解,甚至引起爆沸现象。故微波功率选择200 W。

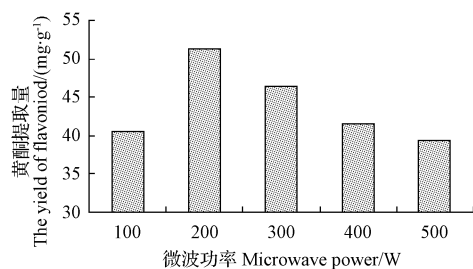


图3 微波功率与总黄酮提取量

Fig. 3 Microwave power and the yield of total flavonoid

2.1.3 提取时间的选择 由图4可知,在一定范围内,黄酮提取量随提取时间的增加而提高。3 min时提取量最高,随后提取时间越长,提取量反而降低。可能原因是微波长时间的作用导致黄酮结构分解,且容易造成其它成分浸出。故提取时间选择3 min为佳。

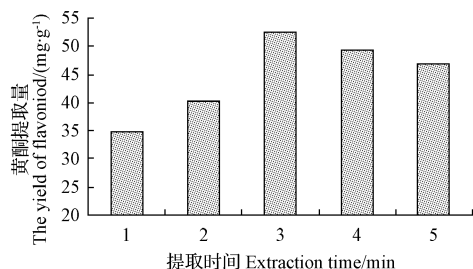


图4 提取时间与总黄酮提取量

Fig. 4 Extraction time and the yield of total flavonoid

2.1.4 提取剂浓度的选择 由图5可知,在一定范围内随着提取剂乙醇的浓度增大,总黄酮提取量相应增大。当乙醇浓度高于70%时,提取量呈减小趋势。提取剂浓

度过高,可能导致其它生物成分也一并溶出;也可能由于较高的乙醇浓度引起胞内蛋白质变性,影响总黄酮的溶出。故选择提取剂浓度60%较佳。

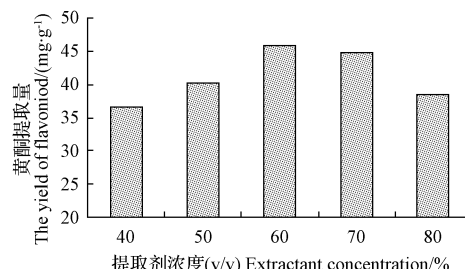


图5 提取剂浓度与总黄酮提取量

Fig. 5 The concentrations of the extractant and the yield of total flavonoid

2.1.5 料液比的选择 由图6可知,在其它条件不变的情况下,料液比增大,总黄酮提取量随之增高,料液比达1:30 g·mL⁻¹时提取效果最好。料液比增加到1:40 g·mL⁻¹,提取量略有下降。适当的料液比可以使黄酮物质以一定的浓度差浸出,溶剂增加到一定程度时也会浸出其它物质。料液比太低,提取不充分;料液比太高,因其它成分溶出而导致黄酮浸出效率变低,也可能导致微波热能负荷增大,溶剂竞争吸收微波能量改变提取的温度环境,不利于黄酮的浸出,同时影响后续浓缩等操作,增大工艺成本。故选择提取总黄酮的料液比为1:30 g·mL⁻¹为宜。

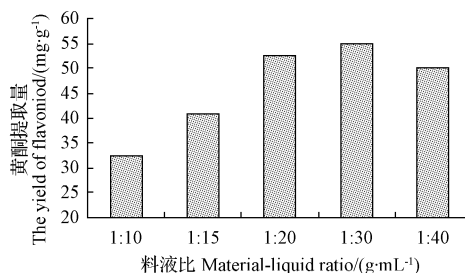


图6 料液比与总黄酮提取量

Fig. 6 Material-liquid ratio and the yield of total flavonoid

2.1.6 温度的选择 当提取温度逐渐上升时,总黄酮提取量也随之上升,60℃时提取量最高,达到52.06 mg·g⁻¹。而当温度由60℃上升至80℃的过程中,提取量反而下降。低温条件会影响黄酮物质在提取剂中的溶解度,温度升高同时溶解度提高,因此提取量增大。而温度过高时,可能会导致黄酮的生物活性结构改变,从而影响黄酮的实际提取量。故提取总黄酮的温度条件选择60℃。

2.2 正交实验

由正交实验结果可知(表2),试验组中第4组工艺条件组合得到的总黄酮提取量最高,可达

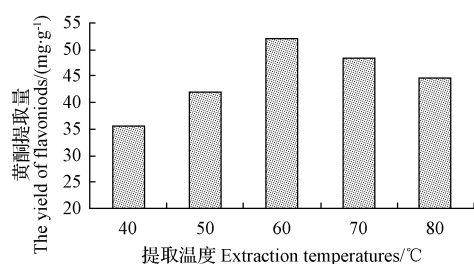


图7 提取温度与总黄酮提取量

Fig. 7 Extraction temperatures and the yield of total flavonoid 70.22 mg·g⁻¹. 4个工艺因素对海州常山叶总黄酮提取量的影响效果依次为温度>料液比>乙醇浓度>提取时间。通过方差分析(表3),提取温度和料液比2个因素的 F 值均大于临界值,说明料液比和温度在 $\alpha=0.05$ 水平上对海州常山叶总黄酮提取量的影响显著,具有统计学意义。而提取时间和乙醇浓度在 $\alpha=0.05$ 水平上对总黄酮提取量的影响不显著。

表2 正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal experiments					
试验组 Experimental group	A	B	C	D	黄酮提取量 The yield of flavonoid/(mg·g ⁻¹)
1	50	2.5	50	1:25	43.06
2	50	3.0	60	1:30	53.46
3	50	3.5	70	1:35	55.07
4	60	2.5	60	1:35	70.22
5	60	3.0	70	1:25	62.93
6	60	3.5	50	1:30	68.54
7	70	2.5	70	1:30	64.17
8	70	3.0	50	1:35	65.55
9	70	3.5	60	1:25	57.01
K1	50.530	59.150	59.050	54.333	
K2	67.230	60.647	60.230	62.057	
K3	62.243	60.207	60.723	63.613	
R	16.700	1.497	1.673	9.280	

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis					
因素 Factor	偏差平方和 Sum of squares	自由度 df	F 值 F -value	F 临界值 Critical value	显著性 Significance
提取温度 Temperatures	440.959	2	99.405	19.000	*
提取时间 Time	3.550	2	0.800	19.000	
提取剂浓度 Concentrations	4.436	2	1.000	19.000	
料液比 Liquid-material ratio	148.191	2	33.406	19.000	*
误差 Error	4.44	2			
$F(\alpha=0.05)$					

2.3 验证试验

综合均值的选择(表2)以及工艺成本等因素,选取 $A_2B_2C_3D_3$ 工艺条件进行3次验证,黄酮提取量均值为71.15 mg·g⁻¹。可确定正交实验中海州常山叶总黄酮提取的最佳提取工艺参数为提取温度60℃,提取时间3 min,乙醇溶液浓度70%,料液比1:35 g·mL⁻¹。

3 结论

原料经过提取剂一定时间的常温浸泡后,更有利于

对微波能的吸收、破壁和渗透等作用。微波辅助提取技术用于黄酮类化合物提取时可缩短工艺时间,处理方便,有利于降低经济和环境成本。该提取技术可为海州常山植物资源的开发和利用提供研究依据。该研究考察的工艺因素有限,对提取剂种类的影响、选择性加热等问题还有待进一步研究。

通过单因素试验研究了预浸泡处理、微波功率、提取时间、乙醇浓度、料液比和提取温度等条件与海州常山叶总黄酮提取量的关系。经过分析比较设计了4因素3水平正交实验,以确定最佳的提取工艺条件。结果表明,预浸泡2 h,乙醇溶液浓度70%,微波功率200 W,料液比1:35 g·mL⁻¹,在60℃条件下微波提取2次(每次3 min),海州常山叶总黄酮提取量可达71.15 mg·g⁻¹。

参考文献

- [1] 吴征镒. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1982:186.
- [2] 李洁茹. 海州常山的应用价值及繁殖技术[J]. 中国园艺文摘,2011(9):153-154.
- [3] 闫世才,田瑄. 海州常山叶挥发性化学成分研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2003,39(3):105-106.
- [4] 郭峰,闫世才. 超临界CO₂流体萃取技术对海州常山叶挥发性化学成分研究[J]. 天水师范学院学报,2004,24(5):29-30.
- [5] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [6] 延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.
- [7] 程友斌,杨成俊,胡玉涛,等. 海州常山的化学成分与药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):325-328.
- [8] 司建志,王硕,周小雷,等. 中药黄酮类成分延缓衰老作用研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(5):734-736.
- [9] 李珊,陈巧利,姚默,等. 海州常山药学研究概况[J]. 宁夏农业科技,2012,53(11):85-86.
- [10] 陈泽乃,徐佩娟,姚天荣. 臭梧桐中海常素的波谱分析[J]. 药学报,1988,23(10):789-791.
- [11] 姚仲青,郭青. 海州常山叶的化学成分研究(I)[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):103-104.
- [12] 李凤林,李青旺,冯彩宁,等. 天然黄酮类化合物提取方法研究进展[J]. 中食品添加剂,2008(5):60-64,76.
- [13] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等. 植物中黄酮类化合物的提取方法研究概况[J]. 生物化学工程,2007,41(3):43-46.
- [14] 佟永薇. 黄酮类化合物提取方法的研究及展望[J]. 食品研究开发,2008,29(7):188-190.
- [15] 魏永生,王永宁,石玉平,等. 分光光度法测定总黄酮含量的实验条件研究[J]. 青海大学学报(自然科学版),2003,21(3):61-63.
- [16] 玉澜,张春艳. 微波辅助提取枇杷叶黄酮类化合物工艺的优化[J]. 南方农业学报,2013,44(6):1018-1021.
- [17] 范艳丽,龚媛,梁飞,等. 微波辅助法提取枸杞叶黄酮的工艺研究[J]. 中国食品添加剂,2013(4):83-89.
- [18] 孙岩,郭庆兴,童群义. 超声-微波协同萃取法提取油菜花粉中黄酮类物质[J]. 食品与发酵工业,2014(10):238-224.
- [19] 付洋,张良慧,江慎华,等. 超声-微波协同提取荷叶总黄酮工艺优化及其提取效果分析[J]. 食品工业科技,2015,36(18):261-266.
- [20] 尹鹏,郭新,梁梓,等. 正交试验法优选旱芹叶总黄酮提取工艺[J]. 南方农业学报,2015,46(6):1074-1078.

DOI:10.11937/bfyy.201610031

HPLC 法分离测定苦豆子愈伤组织 喹诺里西啉生物碱含量及体系优化

高 媛¹, 李 鹏², 张庆宸³, 徐全智¹, 孙牧笛¹, 顾沛雯¹

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 化工学院, 宁夏 银川 750021; 3. 山东大学 药学院, 山东 济南 250100)

摘 要:以苦豆子愈伤组织为试材,采用高效液相色谱法,分离并测定苦豆子愈伤组织中氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱,建立了这5种单碱分离、测定的色谱方法。结果表明:色谱条件为 Ultimate®AQ-C18(4.6 μm ×250 mm×5 mm);流动相为 0.01 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(K₂HPO₄=5.59 g·L⁻¹,KH₂PO₄=0.41 g·L⁻¹,pH 7.5)-甲醇(50:50,V/V);检测波长为216 nm;柱温为35℃;流速为1.0 mL·min⁻¹,检测苦豆子愈伤组织中含有5种生物单碱,其中氧化槐果碱和槐定碱在苦豆子愈伤组织继代培养第4代时含量相对较高,分别为1.205 6 mg·g⁻¹和0.116 5 mg·g⁻¹,氧化苦参碱、槐果碱、苦参碱的含量略有波动,大致呈下降趋势。

关键词:苦豆子愈伤组织;HPLC;氧化槐果碱;氧化苦参碱;槐定碱;槐果碱;苦参碱

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0122-05

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)属豆科槐属植物,主要分布于我国北方的荒漠、半荒漠地区。近年研

究发现,苦豆子中富含生物碱,具有清热解毒、驱风燥湿、抗菌杀虫、抗肿瘤、免疫等多种功效,且有重要的药用价值和经济价值^[1]。据报道,从苦豆子植物中分离到20多种生物碱,主要成分为槐果碱、槐定碱、苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐胺碱、金雀花碱等,这些成分具有抗肿瘤作用。其中苦参碱和槐定碱,氧化苦参碱和氧化槐定碱,槐果碱和苦豆碱等均分别属于同分异构体,在不同条件下各成分间可能存在生物转化,分离难度^[2]。

第一作者简介:高媛(1988-),女,山东日照人,硕士研究生,研究方向为植物保护。E-mail:elfish521@163.com.

责任作者:顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,硕士生导师,现主要从事植物保护等研究工作。E-mail:gupeiwen2013@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260452)。

收稿日期:2016-02-14

Extraction Process Optimization of Total Flavonoid From *Clerodendron trichotomum* Leaves by Microwave Technology

ZHANG Ying^{1,2}, YANG Ge³

(1. College of Biological and Chemistry Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000; 2. Key Laboratory of Dry-hot Valley Characteristic Bio-Resources Development at University of Sichuan Province, Panzhihua, Sichuan 617000; 3. Panzhihua Institution for Food and Drug Control, Panzhihua, Sichuan 617000)

Abstract: Taking *Clerodendron trichotomum* leaves as material, using microwave technology to extract total flavonoid, the flavonoid contents were evaluated by ultraviolet and visible spectrophotometer. The effect of material-liquid ratios, ethanol concentration, extraction temperatures and extraction time were investigated using the yields of total flavonoid as index. The optimum extraction process conditions of total flavonoid were studied by the orthogonal design after single factor experiments. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: presoaking for 2 hours, microwave power 200 W, ethanol concentration 70%, temperature 60℃, material-liquid ratio 1:35 g·mL⁻¹, extracting by 2 times, and each time for 3 minutes, the yield of total flavonoid could reach 71.15 mg·g⁻¹. Microwave technology was feasible for flavonoid extraction, and it also could lay a foundation for further utilization of *Clerodendron trichotomum*.

Keywords: *Clerodendron trichotomum*; flavonoid; orthogonal design; extraction