

正交实验优化卷柏类黄酮提取工艺及其体外抗氧化作用

张 浩^{1,2}, 叶 嘉^{1,2}, 郝立华³, 郑云普³, 董田玉¹, 吴子龙^{1,2}

(1. 邯郸学院 生命科学与工程学院, 河北 邯郸 056005; 2. 河北省高校冀南太行山区资源植物应用技术研发中心, 河北 邯郸 056005; 3. 河北工程大学 水利水电学院, 河北 邯郸 056038)

摘 要:以冀南山区的卷柏为试材,通过单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交实验优化类黄酮提取工艺参数,并对其抗氧化活性进行检测,探究卷柏类黄酮提取的最佳工艺及其体外抗氧化效果。结果表明:在最优工艺条件乙醇体积分数 60%、料液比 1:15 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、浸提时间 30 min、浸提温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 时,类黄酮的提取率为 15.7%。卷柏提取液具有较好清除超氧负离子自由基的能力,当浸提物溶液浓度为 3.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,超氧阴离子清除率达到最大值 69.4%。结果不仅为进一步优化类黄酮提取工艺参数提供数据参考,而且还为深入理解卷柏抗氧化机理和合理高效利用药用植物资源提供参考依据。

关键词:卷柏;类黄酮;抗氧化活性;正交实验设计;超氧负离子

中图分类号:TS 261.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0134-06

黄酮类化合物(简称类黄酮)是一类三元环色素的总称^[1],泛指 2 个具有酚羟基的苯环通过中央 3 碳原子相互连接而成的一系列分子物质^[2-3]。通常认为,植物体内的黄酮类化合物以黄酮和黄酮醇为主,约占类黄酮总量的 70%~80%,另有少量异黄酮、双氢黄(醇)和双黄酮等分子形式^[4-5]。类黄酮具有结构和功能特征多样性,广泛存在于茎皮、种子、蔬菜和水果中,不仅是人类膳

食摄入过程中必不可少的组成部分,也是许多中草药中重要的有效成分^[6]。作为脂质过氧化抑制剂、自由基清除剂、抗氧化剂、二价阳离子螯合剂^[6],类黄酮在抗菌消炎、抗过敏、抑制脂肪氧化酶活性、减缓肿瘤形成等方面起着非常重要的生理作用^[7-10]。据报道,目前在已发现的 61 种黄酮类化合物中,有 11 种具有抗突变作用,且多种类黄酮物质对致癌物诱导动物模型的恶性肿瘤具有显著的抑制功能^[11-12]。

卷柏(*Selaginella tamariscina* Spring)属卷柏科卷柏属,为常见的药用蕨类植物^[13-14]。据文献记载,卷柏主要具有抗癌、止血、抑菌、解痉、降低血脂和胆固醇等多种药理作用^[15],且植物体内发挥药效的主要成分为类黄酮,具有较强的抗氧化活性,可以有效清除体内的氧自由基^[16-18]。近年来的相关研究结果表明,卷柏浸提液中含有苏铁双黄酮、穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、异柳杉双黄酮和柳杉双黄酮等多种黄酮类化合物^[17]。因此,卷柏以其提取物具有的高效清除氧自由基

第一作者简介:张浩(1983-),男,硕士,讲师,研究方向为系统与进化植物学。E-mail:zhanghao_55@163.com.

责任作者:郝立华(1981-),女,硕士,讲师,研究方向为植物生理生态学。E-mail:haolihua_000@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金青年资助项目(31400418);河北省科技计划资助项目(12272502);邯郸市科学技术研究与发计划资助项目(1323108093-9);河北省自然科学基金青年基金资助项目(C2014109013);河北省高校冀南太行山区资源植物应用技术研发中心资助项目;河北省高等学校科学技术研究资助项目(ZD2017302);邯郸学院校级科研资助项目(15217,15105)。

收稿日期:2017-07-10

(O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 $DPPH\cdot$),减轻或消除对 DNA 的氧化损伤,抑制脂质过氧化等药用功能而备受科学界的广泛关注^[19-23]。与此同时,鉴于植物体内黄酮类化合物的药用功效价值及其附带的经济效益,研究者已经成功开发出众多植物黄酮类药物和保健品^[22-24],且在国内外市场上产生巨大的热购潮。尽管如此,利用浸提法获得植物类黄酮物质的工艺还并不成熟和完善,故在一定程度上造成类黄酮提取效率较低,目前已经成为制约植物黄酮类产品大量生产的主要因素^[15,18]。我国卷柏类植物资源丰富,遍布全国各省市及自治区^[13],且卷柏植物体内含有多种类黄酮物质,成为未来提取植物类黄酮的理想选择^[17]。然而,许多影响卷柏提取率的因素及其抗氧化机理还并不清楚^[15-16],尚需逐步摸索和深入探讨,进一步优化其提取工艺,增加类黄酮提取效率,将会为合理高效利用卷柏植物资源提供理论依据和数据参考。以卷柏为试材,以总类黄酮提取率为评价指标,优化黄酮类化合物的提取工艺,并对类黄酮抗氧化活性进行研究,旨在为促进药用卷柏植物资源合理开发及高效利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试卷柏植物采自位于冀南山区的武安国家森林公园,样品采集后仔细去除杂草,立即放入低温箱内保存,并迅速运回实验室,低温冷藏保存,待用。

1.2 试验方法

1.2.1 浸提液提取过程

将采集回来的卷柏样品洗净,放入鼓风干燥箱,设置温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,烘干时长为 48 h。将烘干好的样品用粉碎机粉碎成粉末,并过土壤筛(孔径 60 目)。将 2.0 g 卷柏粉末用 20 mL 70% 的乙醇溶解后,放入超声波清洗器中,以超声波法提升黄酮的提取效果,温度设置为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,时间 50 min。将上述溶液中的颗粒不溶物过滤掉,得到澄清的提取液。

1.2.2 单因素试验设计

乙醇浓度试验:在设定温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间

50 min,料液比 $1:20\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的条件下,提取次数 1 次,乙醇浓度分别用 60%、65%、70%、75%、80%、85% 的条件下,探究乙醇浓度对提取率的影响。料液比试验:在设定温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 50 min,乙醇浓度 70%,提取次数 1 次,料液比分别为 $1:5$ 、 $1:10$ 、 $1:15$ 、 $1:20$ 、 $1:25$ 、 $1:30\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的条件下,探究料液比对提取率的影响。提取时间试验:在设定温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,料液比 $1:20\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乙醇浓度 70%,提取次数 1 次,提取时间分别为 20、30、40、50、60、70 min 条件下,探究提取时间对提取率的影响。提取温度试验:在设定提取时间 50 min,料液比 $1:20\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乙醇浓度 70%,提取次数 1 次,提取温度分别为 60、65、70、75、80、85 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,探究提取温度对提取率的影响。

1.2.3 正交实验优化

根据上述得到的单因素试验结果,确定类黄酮提取的正交实验因素和水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,优化类黄酮提取工艺,3 次重复。

1.2.4 芦丁标准曲线制作及类黄酮含量测定

精确称取干燥恒重的芦丁对照品 25 mg,于 100 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇定容。分别取上述溶液 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL 置于 10 mL 容量瓶内,对应加入 2.4、2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.0 mL 蒸馏水,使各容量瓶内试剂最终的体积相同。分别向各个容量瓶内加入 0.3 mL 5% NaNO_2 溶液并摇匀,静置 6 min 后,再加 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液并摇匀。当溶液静置 6 min 后加入 4 mL 4% NaOH 溶液,利用 70% 乙醇定容,摇匀后静置 12 min。然后,在波长 510 nm 处进行比色,绘制标准曲线。对照标准曲线,将所得数值带入 $y=14.034x-0.0109$ 得到样品中黄酮含量。

1.2.5 体外抗氧化活性测定

采用邻苯三酚自氧化法,在波长 325 nm 处每间隔 30 s 测定 1 次吸光值,连续测定 4 min,求得吸光值的变化速率 $A_{\text{自}}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $A_{\text{样}}\cdot\text{min}^{-1}$,其中 $A_{\text{自}}$ 表示邻苯三酚自氧化后的吸光度值, $A_{\text{样}}$ 表示样品氧化后的吸光度值。

清除率按下式进行计算:清除率(%) = $(V_0 - V_{\text{样}})/V_0 \times 100$,式中: V_0 为不加样品液时的反应速率(邻苯三酚的自氧化速率), $V_{\text{样}}$ 为加入样

品液时的反应速率。

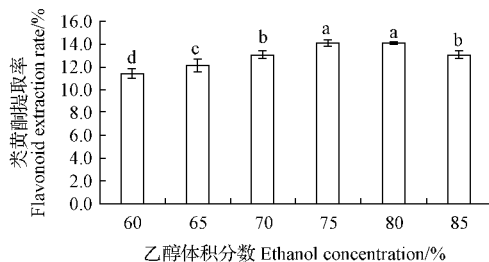
1.3 数据分析

利用 Excel 软件统计各参数的平均值和标准误差并作图,数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计检验分析。

2 结果与分析

2.1 乙醇体积分数对类黄酮提取率的影响

由图 1 可知,乙醇体积分数显著影响类黄酮的提取率($P<0.05$)。类黄酮的提取率随乙醇体积分数的增加而升高,当乙醇体积分数为 75% 时,类黄酮的提取率效果最好,达到 14.1%。当乙醇体积分数为 60%、65%、70% 和 85% 时,其类黄酮提取率均显著低于乙醇体积分数为 75% 时的提取效率($P<0.05$)。因此,选择 75% 作为乙醇提取黄酮类化合物的最佳体积分数。



注:不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$),下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$), the same below.

图 1 乙醇体积分数对类黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on extraction yield of flavonoid

2.2 料液比对类黄酮提取率的影响

由图 2 可知,料液比对类黄酮提取率的影响达到极显著水平($P<0.05$)。类黄酮的提取率随料液比的增加先升高后降低,当料液比为 1:15 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,类黄酮的提取率达到 13.3%,提取效果最佳。进一步对相关数据统计分析后发现,料液比为 1:5、1:10、1:25、1:30 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时类黄酮提取率均显著低于 1:15 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的提取率($P<0.05$)。故选择 1:15 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为提取类黄酮的最佳料液比。

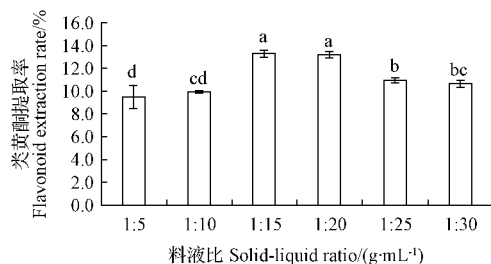


图 2 料液比对类黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio on extraction yield of flavonoid

2.3 浸提时间对类黄酮提取率的影响

由图 3 可知,浸提时间同样会对类黄酮提取率产生显著的影响($P<0.05$)。类黄酮的提取率随着浸提时间的延长而升高,当浸提时间为 60 min 时,类黄酮的提取率达到最大值 13.5%,即浸提 60 min 条件下的类黄酮提取产量最佳。统计结果显示,浸提时间低于 60 min 的类黄酮提取率均显著降低($P<0.05$)。因此,选择 60 min 作为提取黄酮类化合物的最佳浸提时间。

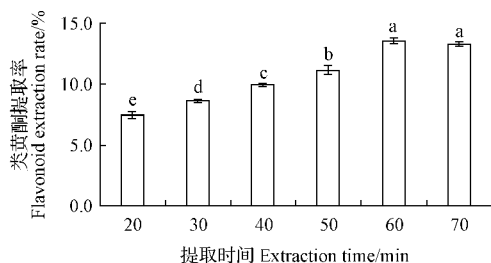


图 3 浸提时间对类黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effects of extraction time on flavonoid yield

2.4 浸提温度对类黄酮提取率的影响

由图 4 可知,浸提温度显著影响类黄酮的提取率($P<0.05$)。类黄酮的提取率随浸提温度的增加先升高而后降低,浸提温度达到 65 $^{\circ}\text{C}$ 时类黄酮的提取率为 15.4%。统计检验结果显示,浸提温度低于或高于 65 $^{\circ}\text{C}$ 的类黄酮提取率均显著降低($P<0.05$)。因此,选择 65 $^{\circ}\text{C}$ 作为提取黄酮类化合物的最佳浸提温度。

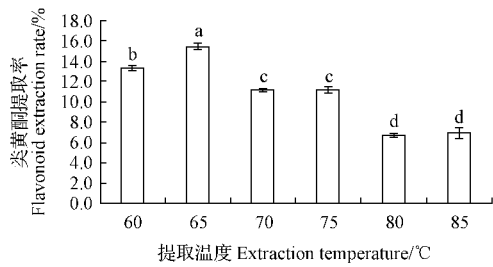


图 4 浸提温度对类黄酮提取率的影响
Fig. 4 Effects of extraction temperature on flavonoid extraction rate

2.5 正交实验及最优提取类黄酮工艺

由表 1 可知,影响类黄酮提取效果的主次因

素顺序为 D>C>B>A;再由 K 值确定其正交实验的最优组合为 A₁B₃C₂D₃,即乙醇体积分数 60%、料液比 1:15 g·mL⁻¹、浸提时间 30 min、浸提温度 70℃。

为了验证上述所得类黄酮最佳提取工艺的可靠性,在最优条件下提取类黄酮 3 次,得到平均类黄酮提取率为 15.7%。因此说明采用正交实验得到的类黄酮提取工艺最优条件的数据可靠,可以广泛应用于生产实践。另外,利用 SPSS 18.0 软件进一步对试验结果进行方差分析(表 2),液料比(P<0.05)、提取时间(P<0.05)、提取温度(P<0.05)的影响均在 0.05 水平上差异显著,而乙醇体积分数的影响并不显著(P>0.05)。

表 1 L₉(3⁴) 正交实验设计及结果
Table 1 L₉(3⁴) orthogonal array design and experimental results

试验号 Numbers	A 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	B 料液比 Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)	C 提取时间 Extraction time/min	D 提取温度 Extraction temperature/℃	提取率 Extraction rate/%
1	1(70)	1(1:10)	1(50)	1(60)	10.48
2	2(75)	2(1:15)	2(60)	1	10.63
3	3(80)	3(1:20)	3(70)	1	10.56
4	1	2	3	2(65)	11.26
5	2	3	1	2	11.21
6	3	1	2	2	11.45
7	1	3	2	3(70)	13.93
8	2	1	3	3	12.94
9	3	2	1	3	11.18
K ₁	11.89	11.63	10.96	10.56	
K ₂	11.59	11.02	12.00	11.31	
K ₃	11.06	11.90	11.59	12.20	
R	0.83	0.88	1.04	1.64	

表 2 正交实验方差分析结果
Table 2 Analysis of variance for the orthogonal array design

方差来源 Variations	偏差平方和 Sum of square	自由度 Freedom	F 值 F values	显著性 Significance
A 乙醇浓度 Ethanol concentration	2.83	2	1.72	ns
B 料液比 Solid-liquid ratio	7.48	2	4.53	*
C 提取时间 Extraction time	6.85	2	4.12	*
D 提取温度 Extraction temperature	12.53	2	7.59	**
误差 Errors	14.86	18		

注:ns, 差异不显著;*, 差异显著水平为 P<0.05; **, 差异显著水平为 P<0.01。
Note:ns, indicates no significance; *, indicates significant difference P<0.05; **, indicates significant difference P<0.01.

2.6 类黄酮的抗氧化性

由图 5 可知,当卷柏浸提物浓度较低时(1.5 mg·mL⁻¹),类黄酮对超氧阴离子的清除率仅为 37.5%。随着浸提物浓度的增加,在 1.5~3.0 mg·mL⁻¹ 范围内,超氧阴离子的清除效率

逐渐升高,当浸提物溶液浓度为 3.0 mg·mL⁻¹ 时,超氧阴离子清除率达到最大值 69.4%。而后,超氧阴离子的清除率随着浸提物浓度的升高呈现降低的趋势。单因素方差分析的结果显示,卷柏类黄酮浓度显著影响超氧阴离子的清除率

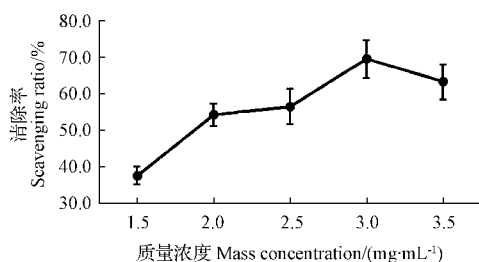


图5 类黄酮对超氧阴离子的清除作用

Fig. 5 Scavenging effects of flavonoid on superoxide anion

($P < 0.05$),并在 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度时,类黄酮清除超氧阴离子的效率达到最大值。

3 讨论

卷柏不仅为一种常见的园艺观赏植物,同时也是重要的药用植物资源^[15]。据民间医药史料记载,卷柏植物主要用于收敛止血剂^[17];而现代药理研究证实,卷柏还具有抑菌、抗癌、降血脂等多种药理效果^[16]。相关研究结果认为,卷柏提取液具有药理活性主要是由于其植物体内含有黄酮类化合物^[15-18],但受提取工艺技术水平限制,导致从卷柏植物体提取类黄酮的产量较低^[21],成为卷柏植物化学成分分析和新药研发等方面亟待解决的关键技术瓶颈^[22]。该研究以乙醇为提取剂,利用超声波辅助提取的方法,探讨了乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取温度对卷柏黄酮类化合物的提取效率,通过正交实验得到类黄酮提取的最优工艺参数为乙醇体积分数 60%、料液比 $1:15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、浸提时间 30 min、浸提温度 70°C 。值得注意的是,单因素试验结果中类黄酮提取率均随乙醇体积分数、料液比、提取温度的增加先升高后降低,表明类黄酮提取工艺中的 3 个参数在设定范围内存在明显最佳值,故当乙醇浓度、料液比、提取温度低于最佳值时,造成细胞壁破坏和分散程度低,浸提物提取不充分;反之,当各参数高于最佳值时,又可能造成对类黄酮分子结构破坏和活性成分降解,最终导致类黄酮提取效率降低。另需指出的是,该研究根据统计分析结果发现,乙醇体积分数 75%与 80%、料液比 $1:15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $1:20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、提取时间 60 min 与 70 min 的类黄酮提取率最高,且组间差异不显

著,综合考虑到实际生产中的材料成本和工作人员开支,并以节约高效为目的,选择乙醇体积分数 75%、料液比 $1:15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、浸提时间 60 min 作为开展正交实验的基本条件。

众所周知,氧自由基是生物体内重要的一类活性自由基^[10,19],包括超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、羧自由基($\text{ROO}\cdot$)、二氧化氮自由基($\text{NO}_2\cdot$)、一氧化氮自由基($\text{NO}\cdot$)等多种分子形式^[3,10]。通常而言,机体内的自由基能够进行正常的生理代谢,但过多的自由基极易造成机体损害^[11],尤其是当机体在正常或者病变状态时,整个系统处于失衡的状态^[12],自由基会使体内大分子物质发生氧化反应^[10],对细胞结构造成破坏,导致机体损伤^[4,8],从而引起衰老和慢性疾病^[11]。人体内存在一定数量的超氧阴离子自由基(O_2^-),在其不发生化学反应时不会对人体产生伤害^[11],但与羟基($-\text{OH}$)结合后的产物会导致细胞 DNA 损坏,从而破坏人类机体功能^[12,24]。该研究结果显示,卷柏提取液中的类黄酮具有较强清除超氧负离子自由基的能力,随着提取液质量浓度的提高,其清除自由基的能力显著增强($P < 0.05$)。

4 结论

利用乙醇提取卷柏黄酮类化合物的最佳工艺为乙醇体积分数 75%、料液比 $1:15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、浸提时间 30 min、浸提温度 70°C 。此条件下卷柏类黄酮提取率为 13.93%,经 3 次实测验证该最佳工艺条件下类黄酮的平均提取率为 15.7%,比预估值提高约 2 个百分点。故该研究中得到的类黄酮提取工艺最优条件数据可靠,可以广泛应用于生产实践。另外,卷柏提取液具有较好清除超氧负离子自由基的能力,且该清除能力随着提取液质量浓度的提高而增强,当浸提物溶液浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,超氧阴离子清除率达到最大值 69.4%。

参考文献

- [1] 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(9):1534-1544.
- [2] 许晖,孙兰萍,张斌,等. 花生壳黄酮类化合物的研究进展[J]. 农产品加工,2008(3):11-15.

- [3] 董晓宁,赵海福,赵强,等.中草药提取物抗氧化作用及其机理研究进展[J].中兽医医药杂志,2014(1):25-29.
- [4] 陈梅霞,苏洁,张玥莉,等.银杏叶提取物与银杏黄酮对高脂血症大鼠血脂水平影响的比较研究[J].中国新药杂志,2014(7):833-838.
- [5] 李洪玉,孙静芸.竹叶化学成分研究[J].中药材,2003,26(8):562-563.
- [6] 罗金岳,陈小燕.从箬竹叶中提取茶多酚的研究[J].林产化工通讯,2003,37(6):15-19.
- [7] 张英,吴晓琴,俞卓裕.竹叶黄酮和内酯的季节性变化规律研究[J].林业化学与工业,2002(22):65-69.
- [8] 周荣汉.药用植物化学分类学[M].上海:科学技术出版社,1988:123-141.
- [9] 黄文,王益.竹叶提取物抑菌特性的研究[J].林产化学与工业,2002(22):68-70.
- [10] 庞战军,周玖,陈媛.自由基医学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2000:7-217.
- [11] CAYUELA M M. Oxygen free radicals and human disease[J]. Biochimie,1995,77:147-161.
- [12] MARNETT L J. Oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage[J]. Toxicology,2002,181:219-222.
- [13] 中国植物志编辑委员会.中国植物志(第一卷)[M].北京:科学出版社,1959.
- [14] 牛玉璐,赵建成.河北茅荆坝自然保护区蕨类植物资源的调查研究[J].衡水学院学报,2007(1):1-4.
- [15] 毕跃峰,郑晓珂,史社坡,等.卷柏属植物化学成分与药理活性[J].国外医药(植物药分册),2002(3):97-100.
- [16] 黎莉,陈科力,朱田密,等.卷柏属7种药用植物的提取物抑制黄嘌呤氧化酶的活性研究[J].中药材,2007(4):445-447.
- [17] 张红伟,孙晓飞,田景奎.卷柏属植物黄酮类成分研究概况[J].亚太传统医药,2007(10):63-65.
- [18] 张红梅,景颖,张国刚,等.卷柏中双黄酮类化学成分及卷柏属该类化合物的核磁共振特征[J].中南药学,2011(6):419-423.
- [19] SLOLEY B D, URICHUK L J, MORLEY P, et al. Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves[J]. Pharm Pharmacol,2000,52:451.
- [20] CHEN X Y, LIU P. Molecular biology and genetic engineering of plant secondary metabolism[J]. Life Science,1996(2):8211.
- [21] 哈森其木格.分光光度法测定蒙药卷柏中总黄酮含量[J].光谱实验室,2005(2):445-448.
- [22] 郑晓珂,侯庆伟,李民,等.卷柏总黄酮提取工艺研究[J].中国新药杂志,2011(16):1509-1513.
- [23] 赵昕,吴子龙,张浩,等.减压法提取中华卷柏总黄酮的研究[J].北方园艺,2011(15):217-219.
- [24] 林丹英,尤婷婷,黄锁义.茺蒿总黄酮提取及对羟自由基清除作用[J].中国野生植物资源,2007(26):57-59.

Optimization of Extraction Process and *in vitro* Antioxidant Activities of Flavonoid From *Selaginella tamariscina*

ZHANG Hao^{1,2}, YE Jia^{1,2}, HAO Lihua³, ZHENG Yunpu³, DONG Tianyu¹, WU Zilong^{1,2}

(1. School of Life Science and Engineering, Handan University, Handan, Hebei 056005; 2. Research Center for Plant Resources Applied Technology in Jinan Mountain at University of Hebei Province, Handan, Hebei 056005; 3. School of Water Conservancy and Hydropower, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038)

Abstract: In order to investigate the optimal process parameters for extracting flavonoids from *Selaginella tamariscina* and its antioxidant activities, single factor experiments and an orthogonal array design $L_9(3^4)$ were performed in combination to optimize process parameters for the extraction of flavonoids from *Selaginella tamariscina*. Meanwhile, the scavenging effects of flavonoids on the superoxide anion were also examined in the current study. The results showed that the extraction yield of flavonoids was 15.7% with the optimal parameters that the ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time, and extraction temperature were 60%, 1:15 g·mL⁻¹, 30 minutes, and 70 °C, respectively. Moreover, it was found that the extraction from *Selaginella tamariscina* characterized by high antioxidant ability for scavenging the superoxide anion with the maximum scavenging ratio at the extraction concentration of 3.0 mg·mL⁻¹. These results not only provided data for further optimizing the extraction parameters of flavonoids from *Selaginella tamariscina*, but also had important significance for understanding the antioxidant mechanisms and high efficiency utilization of plant resources.

Keywords: *Selaginella tamariscina* Spring; flavonoids; antioxidant activity; orthogonal array design; superoxide anion