

响应面优化细叶杜香提取工艺及抗氧化活性研究

谢洋,李鹏,隋新,付东,张晓臣*

黑龙江省科学院高新技术研究院,哈尔滨 150068

摘要:研究细叶杜香抗氧化物质的最佳提取工艺及提取物的抗氧化性能。在单因素试验基础上,选择提取时间、提取温度及料液比为影响因子,应用 Box-Behnken 中心组合法进行 3 因素 3 水平试验设计,以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除率为响应值,进行响应面分析,并研究提取物的体外抗氧化活性。结合实际操作,得到最佳提取条件为提取时间 3.3 h、提取温度 69 °C、料液比为 1:23,在该条件下提取液的 DPPH 自由基清除率为 $84.37 \pm 0.17\%$,接近预测值。抗氧化物质得率为 4.68 ± 0.24 g/100 g,总黄酮含量为 236.17 ± 2.16 mg/g,多酚含量为 73.97 ± 3.18 mg/g。抗氧化活性实验结果表明,细叶杜香提取物具有较好的抗氧化活性。

关键词:细叶杜香;溶剂提取;响应面法;抗氧化活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)3-0475-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.3.017

Study on optimization of extraction conditions of *Ledum palustre* L. by response surface methodology and its antioxidant activities

XIE Yang, LI Peng, SUI Xin, FU Dong, ZHANG Xiao-chen*

Institute of Advanced Technology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, 150068, China

Abstract: This study was to investigate the optimum extraction conditions of antioxidant components from *Ledum palustre* L. and antioxidation of the extraction. Based on the results of the single-factor tests, three factors, i. e., extraction time, solid-liquid ratio and extraction temperature were screened out, which were then used as the factors in Box-Behnken center composite design. Response surface methodology (RSM) analysis was carried out with the scavenging rates of the extracts toward 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical as the response values. Besides, the antioxidant activity *in vitro* of *Ledum palustre* L. extraction was evaluated. Results showed that the optimum extraction conditions by RSM were as follows: extraction time of 3.3 h, extraction temperature of 69 °C and solid-liquid ratio of 1:23. Under these conditions, the average DPPH radical scavenging rate was $84.37 \pm 0.17\%$ which was close to the predicted results. The yield of the antioxidant components was 4.68 ± 0.24 g/100 g, and content of the total flavonoid and polyphenol was 236.17 ± 2.16 mg/g and 73.97 ± 3.18 mg/g, respectively. The results of antioxidation experiment indicated that the *Ledum palustre* L. extracts showed good antioxidant activity.

Key words: *Ledum palustre* L.; solvent extraction; response surface methodology; antioxidant activity

细叶杜香(*Ledum palustre* L.),别名白山苔、喇叭茶、狭叶杜香等,小型常绿灌木,杜鹃花科杜香属植物,主要分布于欧洲北部和中部,亚洲北部及北美洲^[1,2]。在我国,细叶杜香主要分布在大兴安岭地区,其分布面积约占大兴安岭林地面积的 70%^[3],资源十分丰富。

杜香药用植物在原苏联现代医学中被称为杜香草,在十九世纪俄国本草中记载了杜香的医疗作用,

即用带叶与花的嫩枝制成浸剂或酊剂治疗支气管炎、风湿性关节炎及百日咳^[4]。经过多年的研究发现,细叶杜香含有多种活性成分,如精油、黄酮、三萜、多糖、多酚、香豆素^[5-7]等,具有止咳、平喘、化痰、抗菌消炎、增强免疫力^[8,9]等药理作用,可以应用于化妆品、化工、食品及医药等多个领域。据文献报道,俄罗斯及韩国的研究者们已经将杜香提取物添加到食品中制作功能食品,如饮料、冰激淋、酸奶、罐头、面条等。可见,杜香具备成为新型食品功能因子来源的潜力^[10]。随着人们对自由基与健康、疾病的关系认识的发展,具有抗氧化功能的天然产物得到

了研究者们的关注。张乔会等^[11]研究证明了杜香多糖具有良好的抗氧化活性及热稳定性;李雪等^[12]研究发现杜香叶多糖体外抗氧化活性和抗肝癌细胞增殖活性呈现出量效关系趋势。

响应面优化法是一种有效的统计和优化方法,能够用较少的实验次数对提取工艺进行较全面的分析,且优化结果更加准确,已广泛应用于天然产物提取领域^[13]。目前以响应面法优化细叶杜香抗氧化物质的提取工艺尚未见报道。本研究以 DPPH 自由基清除率来确定提取物抗氧化效果,在单因素试验基础上,应用响应面优化了提取工艺,得到了细叶杜香抗氧化物质的得率、总黄酮及多酚含量,并以叔丁基对苯二酚为参照研究了其 DPPH 自由基清除能力及铁氰化钾还原能力。

1 材料与仪器

1.1 植物来源

细叶杜香枝叶于 2017 年 4 月采自黑龙江省加各达齐市,经哈尔滨工业大学王振宇教授鉴定为杜鹃花科杜香属细叶杜香。

1.2 试剂

无水甲醇、无水乙醇、异丙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇、二氯甲烷、三氯甲烷、铁氰化钾、磷酸氢钠、磷酸氢二钠、叔丁基对苯二酚(TBHQ)均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;DPPH、芦丁分析标准品(95%)、没食子酸分析标准品(99%)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 仪器

UV-2600 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),HAD-E-201D 旋转蒸发器(北京恒奥德仪器仪表有限公司),BS110s 电子分析天平(德国 Sartorius 公司),PPV-CTRL1-CE 平行合成反应仪(东京理化器械株式会社),HBM-103 流水式粉碎机(瀚博机电有限公司)。

2 实验方法

2.1 提取溶剂的筛选

将干燥后的细叶杜香粉碎后过 60 目筛为样品,分别取 5.0 g 样品加入反应瓶中,再分别加入 100 mL 无水乙醇、60% 乙醇、30% 乙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇、异丙醇、二氯甲烷、三氯甲烷、水,瓶口接冷凝装置,置于 60 °C 的平行反应器中,搅拌浸提 5 h,过滤,测定其 DPPH 自由基清除率。

2.2 抗氧化效果测定方法

本试验采用 DPPH 自由基清除能力来确定抗氧

化效果。将 2.1 实验所得的多种提取物用甲醇稀释至一定浓度后,取 3 mL 于具塞试管中,加入 3 mL DPPH 甲醇溶液(DPPH 浓度为 2×10^{-4} mol/L),摇匀,30 min 后用分光光度计在 517 nm 处测定吸光度 A_a ;同时测定 3 mL 稀释好的提取液加入 3 mL 甲醇混合后的吸光度 A_b ;以及 3 mL DPPH 溶液加入 3 mL 甲醇混合后的吸光度 A_0 。按上述方法测定其 DPPH 清除率。对自由基清除率的计算方法如式(1)。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_a - A_b}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

2.3 单因素实验

2.3.1 提取时间

称取细叶杜香叶粉末 5.0 g 加入反应瓶中,料液比为 1:30,置于平行反应器中,瓶口接冷凝装置,提取温度为 70 °C,提取时间分别为 1、3、5、7、10 h,提取次数 1 次,过滤,测定 DPPH 自由基清除率。

2.3.2 提取温度

称取细叶杜香叶粉末 5.0 g 加入反应瓶中,料液比为 1:30,置于平行反应器中,瓶口接冷凝装置,提取温度分别为 40、50、60、70、80、90 °C,提取时间 3 h,提取次数 1 次,过滤,测定 DPPH 自由基清除率。

2.3.3 料液比

称取细叶杜香叶粉末 5.0 g 加入反应瓶中,分别加入不同体积的异丙醇,使料液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,置于平行反应器中,瓶口接冷凝装置,提取温度为 70 °C,提取时间 3 h,提取次数 1 次,过滤,测定 DPPH 自由基清除率。

2.3.4 提取次数

称取细叶杜香叶粉末 5.0 g 加入反应瓶中,料液比为 1:30,置于平行反应器中,瓶口接冷凝装置,提取温度为 70 °C,提取时间 3 h,提取次数分别为 1、2、3、4 次,过滤,合并提取液,将提取液浓缩至相同体积,测定 DPPH 自由基清除率。

2.4 响应面优化实验

根据单因素实验结果,选取对细叶杜香异丙醇提取物 DPPH 自由基清除率影响显著的因素,对其进行优化实验。以其 DPPH 自由基清除率为响应值(Y),以提取时间(A)、提取温度(B)、液料比(C)为实验因素,利用 Design Expert 8.0.5 软件处理数据,采用 Box-Behnken 进行响应面设计,对实验结果进行回归拟合分析。

2.5 总黄酮及多酚含量测试

总黄酮测试方法参考文献^[14],多酚含量测试方法参考文献^[15]。

2.6 抗氧化活性实验

利用响应面优化得到的工艺参数进行实验,将得到的提取液进行浓缩、干燥、备用。

2.6.1 DPPH 自由基清除能力试验

配制待测样品质量浓度为 0.01 ~ 0.32 mg/mL。按 2.2 测试方法进行试验, TBHQ 为对照组。

2.6.2 还原能力试验

配制待测样品质量浓度为 0.01 ~ 0.32 mg/mL。测试方法参考文献^[16]并略有改动。分别取待测样品 1 mL 加入 2.5 mL 0.2 mol/L pH 为 6.6 的缓冲溶液和 2.5 mL (1%, w/w) 的铁氰化钾,混合均匀后于 50 °C 恒温水浴中反应 20 min,加入 2.5 mL (10%, w/w) 的三氯乙酸,离心 (3000 rpm, 10 min),取上清液 2.5 mL 加入另一试管,加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL (0.1%, w/w) 三氯化铁,10 min 后测其在

700 nm 处的吸光度, TBHQ 为对照组。

2.7 数据统计与分析

所有试验均进行重复性实验 3 次,取平均值及标准偏差作为最终的试验数据,用 Origin 9.1 及 SPSS 20.0 软件处理数据。

3 结果与分析

3.1 溶剂筛选实验结果

各种溶剂的细叶杜香提取液颜色及 DPPH 自由基清除率结果如表 1 所示。从表中可以看出,不同的提取溶剂得到的提取液从颜色到抗氧化效果都有明显的差异,其中石油醚提取液抗氧化效果最差,异丙醇提取液抗氧化效果最好。经 Duncan 极差法比较结果表明,在 0.01% 水平,以异丙醇为溶剂得到的细叶杜香提取液抗氧化效果最好,其次是无水乙醇,60% 乙醇、30% 乙醇与去离子水差异不明显,石油醚为最差;在 0.05% 水平,仍然是异丙醇提取液抗氧化效果最好,且与其他溶剂有极显著差异,因此,本试验选用异丙醇作为最佳提取溶剂。

表 1 不同溶剂的细叶杜香提取液颜色、DPPH 自由基清除率结果

Table 1 Colour and DPPH radical scavenging rates of *Ledum palustre* L. solution extracted by different solvents

溶剂 Solvent	提取液颜色 Colour of <i>Ledum palustre</i> L. solution	DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rates (%)	显著差异性 Significant difference	
			0.01	0.05
异丙醇 Isopropanol	深绿色 Bottle green	83.24 ± 0.21	A	a
无水乙醇 Absolute ethyl alcohol	深绿色 Bottle green	82.05 ± 0.17	B	b
60% 乙醇 60% Ethanol	褐色 Brownness	80.50 ± 0.20	C	c
30% 乙醇 30% Ethanol	红褐色 Reddish-brown	80.35 ± 0.27	C	cd
去离子水 Deionized water	橙红色 Orange red	80.01 ± 0.16	CD	de
正丁醇 1-Butanol	黄棕色 Yellow brown	79.73 ± 0.15	D	e
丙酮 Acetone	深绿色 Bottle green	78.85 ± 0.29	E	f
乙酸乙酯 Ethyl acetate	深绿色 Bottle green	78.47 ± 0.19	E	f
三氯甲烷 Trichloromethane	黄棕色 Yellow brown	31.68 ± 0.18	F	g
二氯甲烷 Dichloromethane	黄棕色 Yellow brown	23.83 ± 0.14	G	h
石油醚 Petroleum ether	黄绿色 Yellow green	14.65 ± 0.12	H	i

注:采用 Duncan 极差法进行显著性检验,相同大写字母表示在 0.01% 水平差异不显著,相同小写字母表示在 0.05% 水平不显著。

Note: Duncan's Multiple Range Test. The same capital letter is not significant at 0.01% level, and the same small letter is not significant at 0.05% level.

3.2 单因素实验结果与分析

3.2.1 提取时间

提取时间对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响结果如图 1 所示。从图中可以看出,抗氧化效果随着随着提取时间由 1 h 增加到 3 h 时,提取物的 DPPH 自由基清除率有明显的上升。随着时间的延长,提取物 DPPH 自由基清除率开始下降,到 7 h 后又开始增加,这可能是由于提取时间的延长会

导致热敏性物质的分解,但随着提取时间的增加又有新的抗氧化物质溶出使 DPPH 自由基清除率增加。考虑到提取时间过长会增加能耗,因此选择 2、3、4 h 三个时间为响应面设计的三个水平。

3.2.2 提取温度

提取温度对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响结果如图 2 所示。从图中可以看出,在提取温度由 40 °C 增加至 60 °C 时,随着提取温度的增

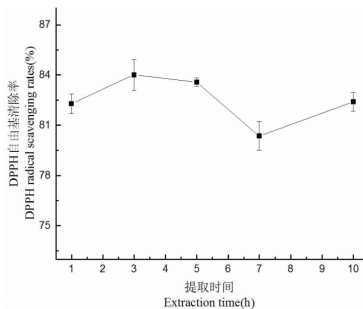


图1 提取时间对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on DPPH radical scavenging rates from *Ledum palustre* L. extract

加 DPPH 自由基清除率明显增加,在提取温度为 60~70 °C 时自由基清除率变化不明显,随后随着温度的增加自由基清除率降低,这可能是由于温度升高导致热敏性物质分解造成的。因此,选择 55、65、75 °C 为响应面设计的三个水平。

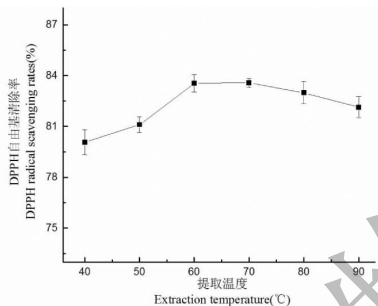


图2 提取温度对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on DPPH radical scavenging rates from *Ledum palustre* L. extract

3.2.3 料液比

料液比对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响结果如图 3 所示。从图中可以看出,在料液比为 1:20 时 DPPH 自由基清除率达到最高,而后随着液料比的增加清除率降低,这可能是因为料液比的增加造成了部分抗氧化物质的分解,引起了

DPPH 自由基清除率的下降。因此,选择料液比为 1:10、1:20、1:30 为响应面设计的三个水平。

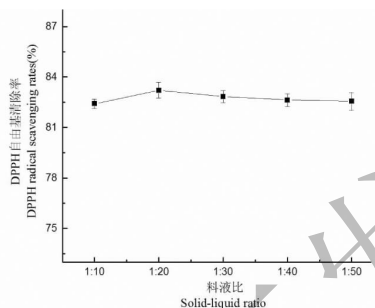


图3 料液比对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on DPPH radical scavenging rates from *Ledum palustre* L. extract

3.2.4 提取次数

提取次数对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响结果如图 4 所示。从图中可以看出,随着提取次数增加,DPPH 自由基清除率逐渐增加,提取 4 次时清除率最高,但是增加幅度较少,综合考虑溶剂及能源消耗,选择提取次数为 1 次。

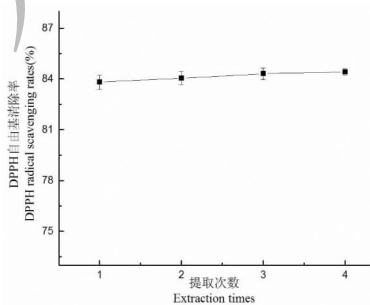


图4 提取次数对细叶杜香提取物 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 4 Effect of extraction times on DPPH radical scavenging rates from *Ledum palustre* L. extract

3.3 响应面实验结果与分析

3.3.1 响应面分析方案及试验结果

根据单因素实验结果,响应面试验因素水平及编码如表 2 所示,设计方案及结果如表 3 所示。

表 2 响应面试验因素水平及编码

Table 2 Factors and levels in RSM

水平 Levels	因素 Factors		
	A(提取时间) Extraction time (h)	B(提取温度) Extraction temperature (°C)	C(料液比) Solid-liquid ratio
-1	2	55	1:10
0	3	65	1:20
1	4	75	1:30

表3 响应面试验及结果
Table 3 Design and results of RSM

序号 No.	A	B	C	Y: DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rates(%)
1	0	0	0	84.34
2	0	0	0	84.27
3	0	0	0	84.31
4	0	1	1	84.19
5	-1	1	0	83.68
6	0	-1	-1	83.02
7	-1	-1	0	82.73
8	1	0	1	84.18
9	-1	0	1	83.54
10	1	0	-1	84.05
11	1	-1	0	83.16
12	0	0	0	84.38
13	-1	0	-1	83.38
14	1	1	0	83.96
15	0	-1	1	83.21
16	0	1	-1	83.89
17	0	0	0	84.24

3.3.2 二次回归模型拟合及方差分析

利用 Design Expert. 8.0.5 软件对表3 试验数据

进行回归分析,获得回归模型方差分析及显著性结果如表4 所示。

表4 回归模型方差分析及显著性结果

Table 4 Analysis of variance and significance in regression model

来源 Source	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型	4.40	9	0.49	53.88	< 0.000 1	**
A	0.51	1	0.51	56.20	< 0.000 1	**
B	1.62	1	1.62	178.50	< 0.000 1	**
C	0.076	1	0.076	8.38	0.023 2	*
AB	5.625E-003	1	5.625E-003	0.62	0.456 9	○
AC	2.250E-004	1	2.250E-004	0.025	0.879 3	○
BC	3.025E-003	1	3.025E-003	0.33	0.581 8	○
A ²	0.54	1	0.54	59.38	0.000 1	**
B ²	1.36	1	1.36	160.49	< 0.000 1	**
C ²	0.11	1	0.11	12.29	0.009 9	**
残差误差 Residual	0.064	7	9.076E-003			
失拟项 Lack of Fit	0.051	3	0.017	5.56	0.065 4	○
纯误差 Pure Error	0.012	4	3.070E-003			
总和 Cor Total	4.36	16				

拟合度 $R^2 = 0.985 8$ 校正拟合度 $Adj R^2 = 0.967 5$

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ○ 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: **, * indicated extremely significant difference, significant difference, respectively. ○ represented not significant.

利用 Design-Expert 8.0.5 软件进行多元回归拟合,得到二次多项回归方程为: $Y = 84.31 + 0.25 \times A + 0.45 \times B + 0.098 \times C - 0.038 \times A \times B - 7.500E-003 \times A \times C + 0.027 \times B \times C - 0.36 \times A^2 - 0.57 \times B^2 - 0.16 \times C^2$

由方差分析可以看出:模型 $P < 0.0001$,表明该回归模型极显著;失拟项 $P > 0.05$,说明该模型拟合度好;拟合度 $R^2 = 0.9858$,表明回归方程对 Y 的预测值与实际值有较好的相关性,该模型能解释

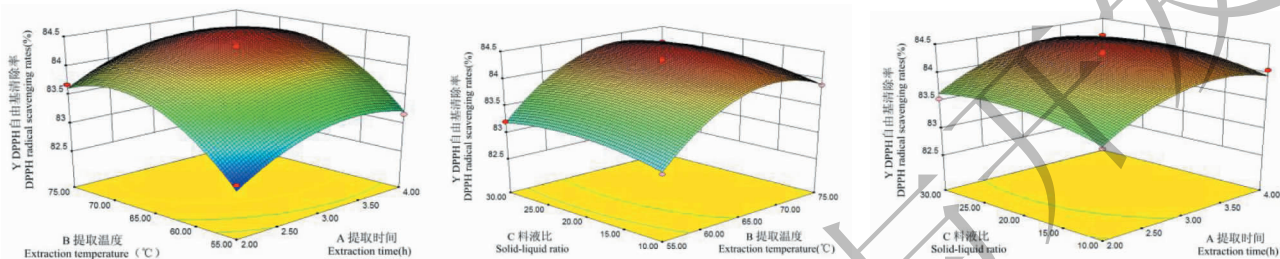


图5 各交互作用对细叶杜香提取液 DPPH 自由基清除率影响的响应面图

Fig. 5 Response surface plots showing interaction of the factors on DPPH radical scavenging rates from *Ledum palustre* L. extract

3.3.3 验证实验及结果

经优化后,得到的最佳提取工艺参数为提取时间 3.33 h、提取温度 68.94 °C、料液比为 1:23.26,此时 DPPH 自由基清除率预测值为 84.45%。为方便实际操作,修正工艺参数为提取时间 3.3 h、提取温度 69 °C、料液比为 1:23,经过三次重复性实验验证,DPPH 自由基清除率为 $84.37 \pm 0.17\%$,与实验预测值接近,证明回归模型较为准确可靠,重复性好。按此工艺参数进行提取,将得到的提取液进行浓缩、干燥后,计算出细叶杜香抗氧化物质的得率为 4.68 ± 0.24 g/100 g 原料。

3.4 总黄酮及多酚含量

芦丁标准溶液的拟合方程 $Y = 0.55186X + 0.0019$, $R^2 = 0.9998$,线性关系良好。

没食子酸的拟合回归方程为 $Y = 0.56529X - 0.00237$, $R^2 = 0.9995$,线性关系良好。

经计算,细叶杜香提取物中总黄酮含量为 236.17 ± 2.16 mg/g 芦丁当量,多酚含量为 73.97 ± 3.18 mg/g 没食子酸当量。经报道,多酚及黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗衰老等作用,因为其结构中的邻位酚羟基很容易被氧化成醌类结构^[17]。可见,提取物中总黄酮及多酚含量较高,可能是其具有较好抗氧化活性的原因。

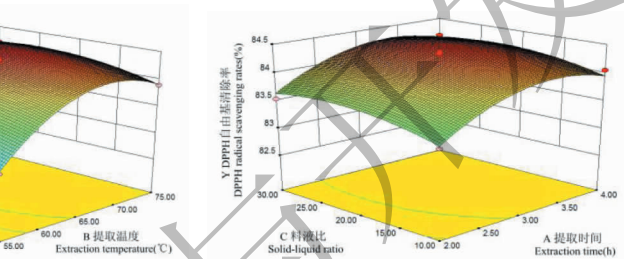
3.5 抗氧化活性试验结果与分析

3.5.1 DPPH 自由基清除能力

细叶杜香抗氧化提取物和 TBHQ 对 DPPH 自由

基清除率影响结果如图 5 所示。一般来说,在响应面图中响应面坡度越陡峭则响应值越敏感。从图中可以看出提取温度与提取时间及料液比的曲线均较陡峭,说明提取温度对 DPPH 自由基清除率影响最为显著。

98.58% 响应值的变化,实验误差小。在一次项的检验中,自变量 A 、 B 极显著,自变量 C 显著;各变量的交互项均不显著;二次项检验均达到极显著。



基清除能力结果如图 6 所示。从图中可以看出,细叶杜香抗氧化提取物具有较好的抗氧化性,且在一定范围内对 DPPH 自由基清除能力会随着质量浓度的增加而增加,其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.033 mg/mL, TBHQ IC_{50} 为 0.0097 mg/mL。

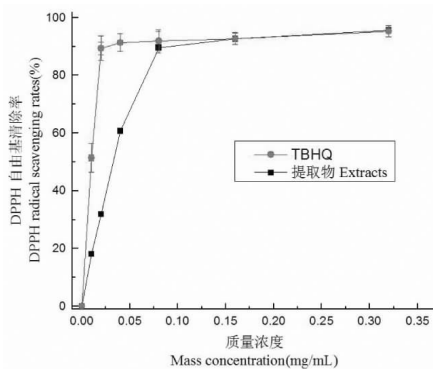


图6 细叶杜香提取物和 TBHQ 对 DPPH 自由基清除能力

Fig. 6 DPPH radical scavenging activity of *Ledum palustre* L. extracts and TBHQ

3.5.2 还原能力

还原能力的测定可以检测样品是否是良好的电子供体。还原力强的物质可以提供更多的电子,除了使三价铁离子还原为二价铁离子外,还可与自由基结合,使自由基形成稳定的物质。细叶杜香抗氧化提取物和 TBHQ 对铁氰化钾的还原能力结果如图 7 所示。从图中可以看出,在样品质量浓度为 0 ~ 0.32 mg/mL 内对铁氰化钾还原能力呈线性增加,且

线性关系良好,证明细叶杜香提取物具有一定的铁氰化钾还原能力。

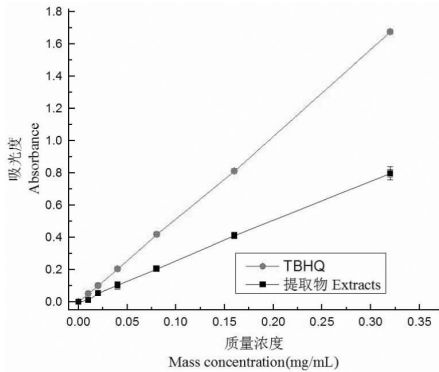


图7 细叶杜香提取物和TBHQ对铁氰化钾的还原能力

Fig.7 Reducing power of *Ledum palustre* L. extracts and TBHQ on potassium ferricyanide

4 结论

本实验首先通过溶剂筛选,利用 Duncan 极差法比较得到最佳提取溶剂为异丙醇。在单因素试验基础上采用响应面优化了细叶杜香抗氧化物质的提取工艺参数,结果表明,对细叶杜香提取液 DPPH 自由基清除率影响最大的因素是提取温度,其次是提取时间,料液比对其影响相对较小。结合实际操作,确定了最佳提取工艺条件为提取时间 3.3 h、提取温度 69 °C、料液比为 1:23,在该条件下提取液的 DPPH 自由基清除率为 $84.37 \pm 0.17\%$,抗氧化物质的得率为 4.68 ± 0.24 g/100 g,总黄酮含量为 236.17 ± 2.16 mg/g,多酚含量为 73.97 ± 3.18 mg/g。

抗氧化活性实验结果表明,细叶杜香提取物抗氧化性能较强,且在一定质量浓度范围内,提取物对 DPPH 自由基清除作用呈现量效关系,IC₅₀ 为 0.033 mg/mL;铁氰化钾还原能力结果表明随着提取物质量浓度增加对铁氰化钾还原能力呈线性增加。若能对其中的活性成分进行分离纯化,则能有效提高其抗氧化活性,并且为其成为应用于医药、食品、化妆品等领域的新型天然抗氧化剂提供理论依据。

参考文献

- Gretsusnikova T, Jarvan K, Orav A, et al. Comparative analysis of the composition of the essential oil from the shoots, leaves and stems the wild *Ledum palustre* L. from Estonia [J]. *Procedia Chem*, 2010, 2: 168-173.
- Egigu M, Ibrahim M, Yahya A, et al. *Cordeauxia edulis* and *Rhododendron tomentosum* extracts disturb orientation and feeding behavior of *Hylobius abietis* and *Phyllodecta laticollis* [J]. *Entomol Exp Appl*, 2011, 138: 162-174.
- Anna D, Maria L. *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palus-*

- tre*). A review of traditional use based on current research [J]. *Fitoterapia*, 2013, 85: 130-143.
- Ma XM. Study on the effective components of *Ledum palustre* L. in Daxing' an Mountain region [D]. Harbin: Northeast Forestry University(东北林业大学), 2004.
- Sameh B, Edita B, Bruno M, et al. Supercritical CO₂ extract and essential oil of aerial part of *Ledum palustre* L. chemical composition and anti-inflammatory activity [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29: 999-1005.
- Mikhailova N, Rybalko K. Chemical constitution of *Ledum palustre* [J]. *Chem Nat Compd*, 1980, 16: 131-135.
- Yang DQ, Jing JN, Wang CF, et al. Chemical constituents of flavonoids in *Ledum Palustre* L. [J]. *Infor Tradit Chin Med* (中医药信息), 2016, 33: 15-17.
- Zhao M, Wang JF, Zhang K, et al. Phenolic constituents of *Ledum palustre* and their antioxidant activity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48: 4393-4397.
- Zhang M. Phytochemical analysis of extractions from *Ledum palustre* L. and their anti-inflammatory, analgesic activities [D]. Shanghai: East China Normal University(华东师范大学), 2009.
- Jiang W, Yu YD, Zhang Y, et al. Trace elements and nutritional ingredient of *Ledum Palustre* L. from Changbai Mountain [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2013, 34: 71-74.
- Zhang QH, Wang JZ, Pang JH, et al. Antioxidative activity and physical property of polysaccharide from *Ledum palustre* L. [J]. *Food Mach* (食品与机械), 2015, 31: 206-209.
- Li X, Wang HW, Zheng DR, et al. Extraction and antioxidant, antiproliferative activities of polysaccharide from *Ledum palustre* L. leaves [J]. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2017, 37: 133-138.
- Liu Y, Yang HY, Chen YC, et al. Optimization of ethanol reflux extraction of phenylethanoid glycosides from the leaves of *Callicarpa nudiflora* by response surface methodology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 495-500.
- Zhao D. Study on anti-inflammatory activity of flavonoids from extractions of *Ledum palustre* L. [D]. Shanghai: East China Normal University(华东师范大学), 2012.
- Song ZF, Zhu F, Zhao HQ. Optimization of extraction of shell polyphenols by quadratic rotation orthogonal and antioxidant activity from the chestnut [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1021-1029.
- Karuna D, Dey P, Das S, et al. *In vitro* antioxidant activities of root extract of *Asparagus racemosus* Linn [J]. *J Tradit Complem Med*, 2018, 8: 60-65.
- Sarmistha S, Ramtej V. Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula* Retzius fruits [J]. *J Taibah Univ Sci*, 2016, 10: 805-812.