

响应面法优化小叶金露梅叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性

马筱^{1,3}, 钱佳颖², 欧阳健², 栾广祥^{1,3}, 王洪伦^{1,2*}

¹中国科学院藏药研究重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;

²中国科学院西北高原生物研究所湖州高原生物资源产业化创新中心, 湖州 313000;

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:为优化小叶金露梅叶中总黄酮的提取工艺,在单因素实验的基础上,选取乙醇浓度、料液比、提取温度为自变量,以总黄酮提取得率和抗氧化能力为响应值,进行 Box-Behnken 中心组合实验设计,采用响应面法(RSM)评估以上因素对总黄酮提取得率及抗氧化能力的影响。结果表明,小叶金露梅叶总黄酮提取的最佳工艺为乙醇浓度 51%,料液比 30:1 (mL/g),提取温度 80 °C,在此条件下总黄酮提取得率为 2.83%,对 DPPH 的清除率为 16.37%。响应面优化得到的提取工艺合理可靠,可用于小叶金露梅叶总黄酮提取过程的优化控制。

关键词:小叶金露梅;总黄酮;抗氧化;响应面法

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0092-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.015

Optimization of flavonoid extraction process of *Potentilla parvifolia* by response surface methodology combined with antioxidant activity

MA Xiao^{1,3}, QIAN Jia-ying², OUYANG Jian², LUAN Guang-xiang^{1,3}, WANG Hong-lun^{1,2*}

¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

²Huzhou Plateau Bio-resource Industrialization Innovation Center, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Huzhou 313000, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In order to optimize the extraction yield of total flavonoids in *Potentilla parvifolia* leaves, the optimal extraction process was determined. Based on the single factor experiment, ethanol concentration, material-liquid yield and extraction temperature were selected as independent variables, and the total flavonoid extraction yield and antioxidant capacity were used as the response values. The Box-Behnken center combined experimental design was carried out, and the response surface methodology (RSM) was used to evaluate the effects of the above factors on the extraction yield and antioxidant capacity of total flavonoids. The results showed that the optimum extraction conditions of total flavonoids were ethanol concentration of 51%, material-liquid yield of 30:1 (mL/g), extraction temperature of 80 °C. Under these conditions, the total flavonoids extraction yield was 2.83%, the anti-oxidant capacity was 16.37%. The extraction process optimized by RSM was reasonable and reliable. And it could be used for optimal control of flavonoid extraction process in leaves of *Potentilla parvifolia*.

Key words: *Potentilla parvifolia*; total flavonoids; anti-oxidation; RSM

小叶金露梅(*Potentilla parvifolia* Fisch.)是蔷薇科委陵菜属一种常见的落叶灌木,以叶和花入药,味微苦,性寒,是一种传统的藏药——班玛,《晶珠本草》记载班玛主治消化不良和肺病^[1,2]。现代医药

研究表明,小叶金露梅具有清暑热、益脑清心、调经、健胃、固齿、治疗妇女病等多方面的功效^[3]。小叶金露梅中分离得到的天然产物主要包括黄酮类、三萜类和鞣质类等^[4,5]。其中黄酮类化合物是一种天然活性成分,大多数具有颜色^[6],在植物中一般以游离态或成苷的形式存在^[7],具有清热解毒、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗癌、改善血管通透性等功效^[8-11],已成为国内外医学研究开发的热点。

收稿日期:2019-03-29 接受日期:2019-05-21

基金项目:国家自然科学基金(31870333);中国科学院青年创新促进会基金

* 通信作者 E-mail:hlwang@nwipb.cas.cn

目前小叶金露梅主要作为观赏植物及动物饲料种植,对其药用价值的研究较少,对小叶金露梅中总黄酮的研究也较少。因此,本文研究了影响小叶金露梅叶总黄酮提取率及抗氧化能力的各因素,并通过响应面分析法确定了最佳提取工艺,为小叶金露梅的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

小叶金露梅,2018年8月采于青海省海北州门源县,经周昌范高工鉴定植株为蔷薇科委陵菜属小叶金露梅(*Potentilla parvifolia* Fisch.),叶子干燥粉碎后过40目筛备用。

1.1.2 试剂

芦丁标准品(上海源叶生物科技有限公司),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, Sigma),分析纯无水乙醇(天津市永大化学试剂有限公司),超纯水。

1.1.3 仪器

BSI10S 分析天平(北京赛多利斯有限公司),紫外分光光度计(Cary 50 UV-Vis-NIR, Varian),K3 酶标仪(Labserv K3, Thermo Fisher)。

1.2 方法

1.2.1 绘制标准曲线

精密称取干燥至恒重的芦丁标准品 10.0 mg,用 75% 乙醇溶解定容至 50 mL,使储备液浓度为 0.2 mg/mL。准确吸取该溶液 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,用 75% 乙醇定容,摇匀,按照紫外分光光度法于 360 nm 下测吸光值(A),75%乙醇做空白对照,以吸光值(A)对浓度(C)进行线性回归得曲线方程: $A = 0.06416 + 26.7966C$, $r = 0.9999$,线性范围为 2 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 响应面实验因素及水平

Table 1 Response surface experimental factors and levels

水平 Level	因素 Factor		
	提取温度 Extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	料液比 Ratio of material to liquid (mL/g)
-1	60	50	20:1
0	70	60	25:1
1	80	70	30:1

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

1.2.2 乙醇提取单因素实验

称取 1.0 g 小叶金露梅叶粉末,在设定的实验条件下(考察乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间和提取次数五个因素)乙醇浸提,提取液减压抽滤,再重复提取一次,将两次提取液合并后定容至 100 mL,即得样品溶液。

分别吸取样品溶液 1.0 mL,用 75% 乙醇定容至 25 mL,按标准曲线方法测定吸光值,计算含量、得率。

1.2.3 抗氧化能力测定

精确称取 2.5 mg DPPH,避光充分溶解于 50 mL 无水乙醇中,得到浓度为 0.05 mg/mL 的 DPPH 溶液,备用。

将待测液稀释一定倍数后分别吸取 10 μL 于 96 孔板中,每个样品 3 个重复,空白孔加入等量无水乙醇,然后每孔加入 190 μL DPPH 乙醇溶液,室温避光反应 30 min,在波长 517 nm 处测定各孔吸光度值,按公式计算 DPPH 清除率,抗氧化能力以对自由基 DPPH 的清除率表示。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_{30}}{A_c} \times 100$$

式中, A_0 :样品孔 0 min 吸光值; A_{30} :样品孔 30 min 吸光值; A_c :空白孔的吸光值

1.2.4 响应面实验

由单因素实验结果可知,提取时间为 30 min、提取次数为 2 次时总黄酮提取率已经接近最大值,所以响应面实验没有对提取时间和提取次数优化,而是在提取 30 min 和提取 2 次的条件下,以提取温度($^{\circ}\text{C}$)、乙醇浓度(%)、料液比(mL/g)3 个因素为自变量,以总黄酮提取率(%)和抗氧化能力(%)为响应值设计三因素三水平响应面分析实验,因素水平见表 1。

2.1.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

称取样品 1.0 g,控制反应条件为料液比 20:1、

提取温度 60 ℃、提取 2 次,每次提取 30 min,考察乙醇浓度分别为 0、40%、60%、80%、100% 时对总黄酮提取得率及抗氧化能力的影响。由图 1A 可知,随着乙醇浓度增加总黄酮提取得率逐渐增加,当乙醇浓度为 80% 时达到最大,之后增大乙醇浓度总黄酮提取得率逐渐降低。这可能是由于乙醇浓度过高

时一些脂溶性杂质溶出量增多,而使得总黄酮提取得率降低。由图 1B 可知,总黄酮对 DPPH 自由基的清除率先上升后下降的趋势,在乙醇浓度为 50% 时,小叶金露梅叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除率最高。因此,综合总黄酮对 DPPH 自由基的清除率,在其他条件确定时,乙醇最佳浓度为 50%。

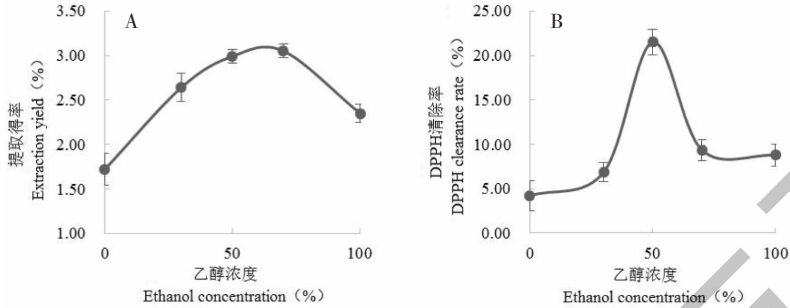


图 1 不同乙醇浓度下总黄酮提取得率及 DPPH 清除率

Fig. 1 Extraction yield of total flavonoids and DPPH clearance rate under different ethanol concentration

注:A. 乙醇浓度对总黄酮提取得率的影响;B. 乙醇浓度对 DPPH 清除率的影响。Note: A. Effect of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids; B. Effect of ethanol concentration on DPPH clearance rate.

2.1.2 料液比对总黄酮提取得率的影响

称取样品 1.0 g,固定乙醇浓度 50%、提取温度 60 ℃、提取两次,每次提取 30 min,考察料液比分别为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 时对提取得率及抗氧化能力的影响。由图 2A 可知,随着提取溶剂量的增加,总黄酮提取得率呈先增加而后减少的趋势,在料液比为 20:1 时总黄酮提取得率达到最大值。

这是因为当提取溶剂与提取材料充分接触后,再增加提取剂量不会促进黄酮的提取。由图 2B 可知,在料液比为 10:1 时,小叶金露梅叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除率最大,随着料液比的增加清除率略有下降,清除率总体都大于 10%。因此,在其他条件一定时,20:1 为最佳料液比。

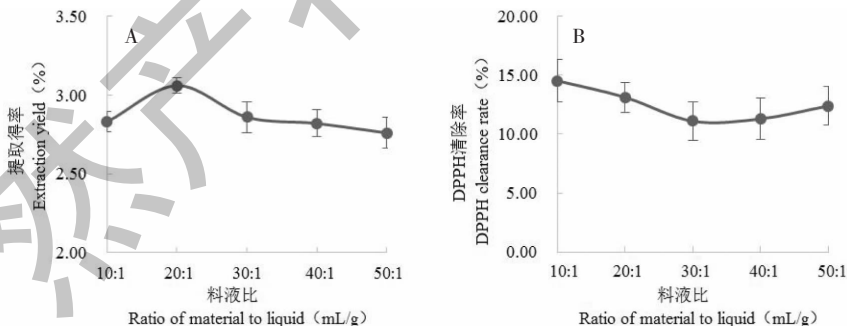


图 2 不同料液比下总黄酮提取得率及 DPPH 清除率

Fig. 2 Extraction yield of total flavonoids and DPPH clearance rate under different ratio of material to liquid

注:A. 料液比对总黄酮提取得率的影响;B. 料液比对 DPPH 清除率的影响。Note: A. Effect of ratio of material to liquid on extraction yield of total flavonoids; B. Effect of ratio of material to liquid on DPPH clearance rate.

2.1.3 提取温度对总黄酮提取得率的影响

称取样品 1.0 g,设定反应条件为乙醇浓度 50%、料液比为 20:1,提取两次,每次 30 min,考察提取温度(20、40、60、80、100 ℃)对总黄酮提取得率及 DPPH 清除率的影响。由图 3A 可知,随着提取

温度的增加,总黄酮的提取得率逐渐升高,提取温度在 60 ℃ 时,总黄酮提取得率最高,随后温度升高总黄酮提取得率逐渐降低。这是由于温度的升高可以加速黄酮类化合物的溶解速度,使其更容易被提取;而温度过高使得黄酮类化合物被氧化。由图 3B 可

知,随着温度的升高,总黄酮对 DPPH 自由基的清除率逐渐增大。因此,在其他条件一定的情况下,总黄

酮的最佳提取温度为 60 ℃。

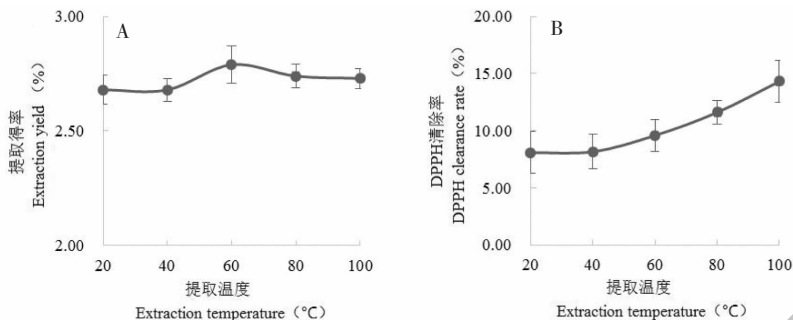


图3 不同提取温度下总黄酮提取得率及 DPPH 清除率

Fig. 3 Extraction yield of total flavonoids and DPPH clearance rate under different extraction temperature

注:A. 提取温度对总黄酮提取得率的影响;B. 提取温度对 DPPH 清除率的影响。Note:A. Effect of extraction temperature on extraction yield of total flavonoids;B. Effect of extraction temperature on DPPH clearance rate.

2.1.4 提取时间对总黄酮提取得率的影响

称取样品 1.0 g,控制反应条件为乙醇浓度 50%、提取温度 60 ℃,料液比为 20:1,分别提取 15、30、45、60、75 min,考察提取时间对总黄酮提取得率及抗氧化能力的影响。由图 4A 可知,提取 30 min 时总黄酮提取得率最高,随后时间延长提取得率变

化不大。这可能是因为提取一定时间时,黄酮类化合物已基本提出。由图 4B 可知,随提取时间的增加抗氧化能力逐渐提高,且总体都高于 10%。综合总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力,在其他条件确定时,30 min 为黄酮提取的最佳时间。

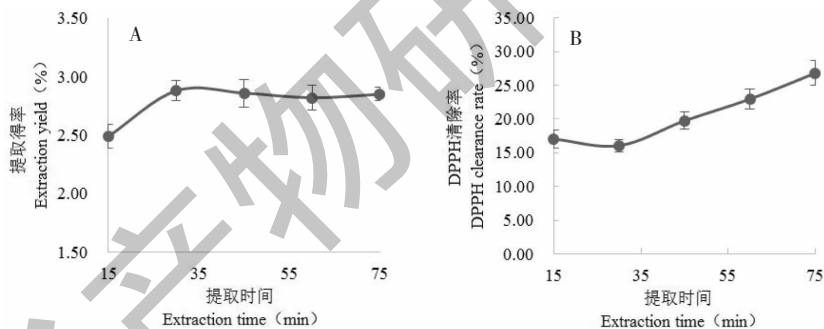


图4 不同提取时间下总黄酮提取得率及 DPPH 清除率

Fig. 4 Extraction yield of total flavonoids and DPPH clearance rate under different extraction time

注:A. 提取时间对总黄酮提取得率的影响;B. 提取时间对 DPPH 清除率的影响。Note:A. Effect of extraction time on extraction yield of total flavonoids;B. Effect of extraction time on DPPH clearance rate.

2.1.5 提取次数对总黄酮提取得率的影响

称取样品 1.0 g,设定为乙醇浓度 50%、料液比为 20:1、提取温度 60 ℃、提取 30 min,分别提取 1、2、3、4、5 次,考察提取次数对总黄酮提取得率及 DPPH 清除率的影响。由图 5A 可知,提取 2 次时总黄酮提取得率已接近最大,随后增加提取次数对总黄酮提取得率的影响不大;由图 5B 可知,在提取 2 次时总黄酮对 DPPH 自由基的清除率较高,随后清除率逐渐降低,提取 5 次时清除率最大。考虑到时间及经济成本,综合总黄酮对 DPPH 清除率,在其他条

件确定时,2 次为黄酮提取的最佳次数。

2.2 响应面优化小叶金露梅叶总黄酮提取工艺

响应面分析法(response surface methodology, RSM),是利用合理的实验设计并通过实验得到一定数据,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[12,13]。与传统的正交实验设计法相比,RSM 具有实验次数少、周期短、回归方程精确度高等优点^[14],已广泛地应用于各类条件优化实验。然而,利用响

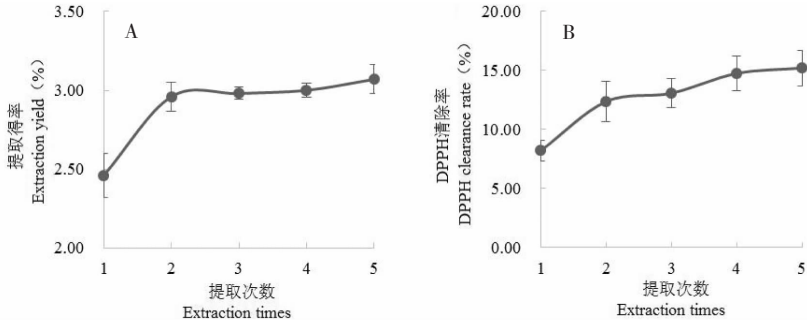


图5 不同提取次数下总黄酮提取得率及 DPPH 清除率

Fig. 5 Extraction yield of total flavonoids and DPPH clearance rate under different extraction times

注:A. 提取次数对总黄酮提取得率的影响;B. 提取次数对 DPPH 清除率的影响。Note:A. Effect of extraction times on extraction yield of total flavonoids;B. Effect of extraction times on DPPH clearance rate.

应面法来优化提高小叶金露梅叶中总黄酮提取得率的报道还比较少见。

本实验以提取温度、乙醇浓度、料液比为影响因素,以小叶金露梅叶总黄酮提取得率和抗氧化能力为响应值进行响应面分析实验,分析得到以下实验方案及结果(表2)。

使用 Design expert 8.0.6 软件对表2中实验结

果进行多项拟合回归,得到以总黄酮提取得率为响应值和以抗氧化能力为响应值的回归方程:总黄酮提取得率 = $2.26 - 6.25 \times 10^{-3}A - 0.066B + 1.000 \times 10^{-2}C - 0.045AB + 0.037AC - 0.063BC + 0.23A^2 + 0.046B^2 + 0.15C^2$; 抗氧化能力 = $10.43 + 0.94A - 0.14B + 0.27C - 0.59AB - 0.075AC + 3.69A^2 - 1.62B^2 + 1.94C^2$ 。

表2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

实验编号 No.	A 提取温度 Extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 料液比 Ratio of material to liquid (mL/g)	总黄酮提取得率 Total flavonoid extraction yield (%)	抗氧化能力 Antioxidant capacity (%)
1	0	0	0	2.32	10.29
2	-1	0	-1	2.67	14.87
3	-1	1	0	2.47	11.52
4	-1	-1	0	2.50	11.13
5	1	-1	0	2.68	14.64
6	0	1	-1	2.48	10.69
7	1	1	0	2.47	12.69
8	1	0	1	2.67	17.09
9	0	0	0	2.21	10.44
10	0	0	0	2.16	10.23
11	1	0	-1	2.48	16.45
12	0	0	0	2.26	10.77
13	-1	0	1	2.71	15.81
14	0	0	0	2.34	10.43
15	0	-1	-1	2.50	10.5
16	0	-1	1	2.55	10.77
17	0	1	1	2.28	11.03

对表 2 中实验数据进行方差分析,结果见表 3 表 4。由表 3 可知,黄酮提取率的回归方程模型显著($P < 0.05$),方程失拟项不显著($P = 0.204 4$), $R^2 = 0.872 9$,表明该回归模型可充分拟合实验数据。各项的方差分析表明, A^2 、 C^2 对小叶金露梅叶中总黄酮提取率有显著影响。变异系数(CV)反应模型的置信度,其值越低,模型的置信度越高。黄

酮提取得率实验的 CV 为 3.73%,说明该实验置信度高,模型方程能较好地反应真实的实验值,可用此模型分析相应值变化。由表 4 可知,抗氧化能力回归模型的回归系数 $R^2 = 0.987 1$, $P < 0.000 1$,说明模型极显著,失拟项 $P = 0.056 6$,不显著。CV 为 3.16%,说明该回归模型可信度较高。由表 4 还可知, A 、 AB 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对抗氧化能力的影响差异显著。

表 3 响应面分析法对总黄酮提取率的 ANOVA 分析

Table 3 ANOVA analysis of extraction rate of total flavonoids by response surface methodology

方差来源 Variance source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	0.41	9	0.045	5.13	0.021 2	*
A	3.125×10^{-4}	1	3.125×10^{-4}	0.035	0.856 2	
B	0.035	1	0.035	3.97	0.086 5	
C	8.000×10^{-4}	1	8.000×10^{-4}	0.091	0.772 2	
AB	8.100×10^{-3}	1	8.100×10^{-3}	0.92	0.370 2	
AC	5.625×10^{-3}	1	5.625×10^{-3}	0.64	0.451 2	
BC	0.016	1	0.016	1.77	0.225 3	
A^2	0.22	1	0.22	24.34	0.001 7	**
B^2	8.909×10^{-3}	1	8.909×10^{-3}	1.01	0.348 8	
C^2	0.093	1	0.093	10.51	0.014 2	*
残差 Residual	0.062	7	8.836×10^{-3}			
失拟项 Lack of fit	0.039	3	0.013	2.34	0.215 2	不显著
纯误差 Pure error	0.022	4	5.620×10^{-3}			
总离差 Cor total	0.47	16				

注: * 差异显著, $P < 0.05$; ** 差异极显著, $P < 0.01$ 。回归系数 $R^2 = 0.868 4$, $R^2_{adj} = 0.699 2$ 。

Note: * significant difference, $P < 0.05$; ** very significant difference, $P < 0.01$. regression coefficients $R^2 = 0.868 4$, $R^2_{adj} = 0.699 2$.

表 4 响应面分析法对抗氧化能力的 ANOVA 分析

Table 4 ANOVA analysis of antioxidant capacity by response surface methodology

方差来源 Variance source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	92.89	8	11.61	76.57	<0.000 1	**
A	7.11	1	7.11	46.86	0.000 1	**
B	0.15	1	0.15	1.02	0.343 1	
C	0.60	1	0.60	3.95	0.082 0	
AB	1.37	1	1.37	9.03	0.017 0	*
AC	0.022	1	0.022	0.15	0.710 1	
A^2	57.18	1	57.18	377.08	<0.000 1	**
B^2	11.08	1	11.08	73.07	<0.000 1	**
C^2	15.81	1	15.81	104.25	<0.000 1	**
残差 Residual	1.21	8	0.15			
失拟项 Lack of fit	1.04	4	0.26	5.92	0.056 6	不显著
纯误差 Pure error	0.18	4	0.044			
总离差 Cor total	94.10	16				

注: * 差异显著, $P < 0.05$; ** 差异极显著, $P < 0.01$ 。回归系数 $R^2 = 0.987 1$, $R^2_{adj} = 0.974 2$ 。

Note: * significant difference, $P < 0.05$; ** very significant difference, $P < 0.01$. Regression coefficients $R^2 = 0.987 1$, $R^2_{adj} = 0.974 2$.

响应面图形是各实验因子与响应值所构成的三维空间曲面图,可形象地描述各因素之间的相互作用^[15]。若相应曲面坡度越陡峭,说明因素对响应值的影响越大;反之曲面越平缓,则说明该因素对响应值的影响越小^[16]。从图6可以看出,乙醇浓度和料液比交互作用较大,在乙醇浓度50%,料液比30:1时,提取得率最大;图7表明提取温度对抗氧化能力的影响最大。这也与表3、表4的分析结果吻合。

通过 Design expert 8.0.6 软件分析计算出小叶

金露梅叶总黄酮理论最佳提取工艺:乙醇浓度51.12%,料液比30:1,提取温度80℃,在此条件下模型预测总黄酮提取得率为2.86%,抗氧化能力为16.56%。但考虑到实际操作的便利,故将提取工艺调整为乙醇浓度51%,料液比30:1,提取温度80℃。根据此条件进行了3次平行实验,结果小叶金露梅叶中总黄酮的平均提取得率为2.83%,抗氧化能力为16.37%,与模型预测值基本一致,说明实验结果与模型拟合良好。

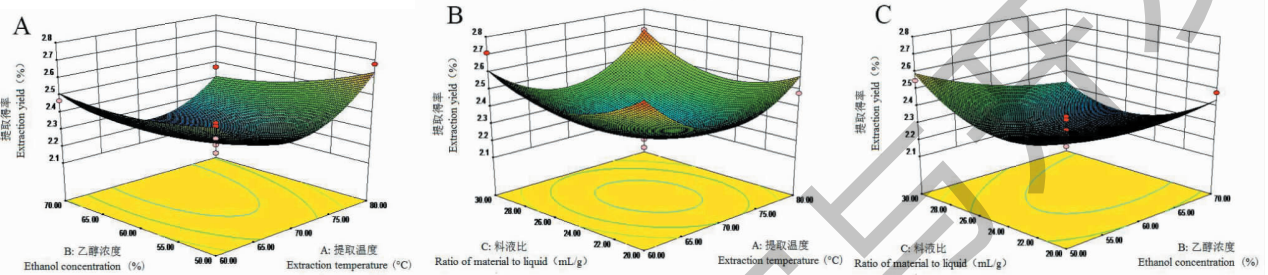


图6 各因素交互作用对小叶金露梅叶总黄酮提取得率影响的响应面图

Fig. 6 Response surface diagram of the interaction of various factors on the extraction yield of total flavonoids in leaves of *Potentilla parvifolia*

注:A. 提取温度(℃)与乙醇浓度(%);B. 提取温度(℃)与料液比(mL/g);C. 乙醇浓度(%)与料液比(mL/g)。Note:A. Extraction temperature (°C) and ethanol concentration (%);B. Extraction temperature (°C) and material to liquid ratio (mL/g);C. Ethanol concentration (%) and material to liquid ratio (mL/g).

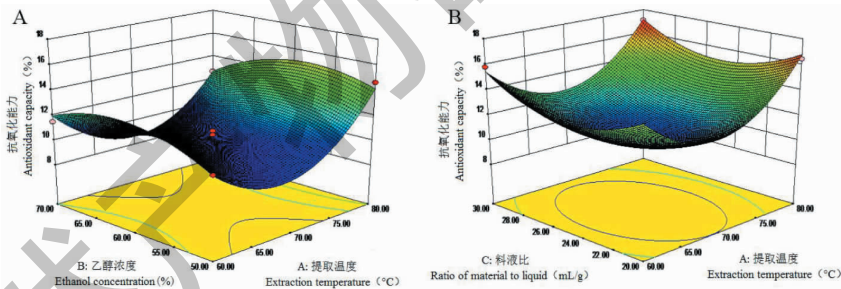


图7 各因素交互作用对小叶金露梅叶总黄酮抗氧化能力影响的响应面图

Fig. 7 Response surface diagram of the interaction of various factors on the antioxidant capacity of total flavonoids in leaves of *Potentilla parvifolia*

注:A. 提取温度(℃)与乙醇浓度(%);B. 提取温度(℃)与料液比(mL/g)。Note:A. Extraction temperature (°C) and ethanol concentration (%);B. Extraction temperature (°C) and material to liquid ratio (mL/g);C. Ethanol concentration (%) and material to liquid ratio (mL/g).

3 结论

本实验以青藏高原小叶金露梅叶为研究对象,从总黄酮提取得率和抗氧化能力两个方面对提取工艺进行优化,通过响应面法分析得到提取小叶金露梅叶中总黄酮的最佳工艺:乙醇浓度51%,料液比30:1,提取温度80℃。在此条件下小叶金露梅叶中总黄酮提取得率为2.83%,抗氧化能力为16.37%,与预测值基本一致,说明该优化方法合理可靠,为小叶金露梅

中总黄酮的进一步研究开发提供了理论依据。

参考文献

- 1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Qinghai Flora (青海植物志) [M]. Qinghai People's Publishing House, 1987. 160.
- 2 Yang YC. Tibetan Medicine (藏药志) [M]. Qinghai People's Publishing House, 1991.
- 3 Sun YX, Zeng Y, Zhang QR, et al. Inhibition of *Potentilla*

- parvifolia on alpha-glucosidase and aldose reductase [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2016, 7: 586-589.
- 4 Murata T, Selenge E, Sukanuma K, et al. Chromone acyl glucosides and an ayanin glucoside from *Dasiphora parvifolia* [J]. Phytochem Lett, 2013, 6: 552-555.
 - 5 Yuan ZZ, Suo YR, Hao XY, et al. Triterpenic acids from *Potentilla parvifolia* and their protective effects against okadaic acid induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y cells [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41: 885-890.
 - 6 Wang JN, Huang YH, Mu ZM, et al. Research progress on flavonoid of the plant secondary metabolites [J]. Sci Seric (蚕业科学), 2007, 33: 499-505.
 - 7 Yang L. Advance in flavonoids on ruminant nutrition [J]. J Dom Ani Ecol (家畜生态学报), 2019, 40(2): 8-12.
 - 8 Huang YJ, Li F, Li DP. Research progress of flavonoids in the intervention of diabetic retinopathy [J/OL]. Food Sci (食品科学), 2019.
 - 9 Yang X, Tan WX, Wang TT, et al. Screening of anticancer activity of *Gleditsia Sinensis* flavonoids and coumarins of active ingredients [J]. China Conti Med Ed (中国继续医学教育), 2017, 9: 215-217.
 - 10 Chen D, Fang LH, Du GH. Research progress of flavonoids a-
~~~~~  
(上接第 168 页)
  - 47 Gao DH. Lutein alleviates atherosclerosis risk factors in rats on high-fat diet [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学), 2012: 15-23.
  - 48 Wang SH, et al. Effect of marigold extract added to diet on serum biochemical indexes antioxidant capacity and immune performance of broilers [J]. Chin J Anim Nutr (动物营养学报), 2016, 28: 2476-2484.
  - 49 Grcevic M, et al. Effects of dietary marigold extract on lutein content, yolk color and fatty acid profile of omega-3 eggs [J]. J Sci Food Agri, 2019, 99: 2292-2299.
  - 50 Liu JB, et al. Studies on bioactive flavone from *Tagetes* root against watermelon Fusarium wilt [J]. J Shanxi Agri Univ: Nat Sci (山西农业大学学报: 自科版), 2008, 28(1): 37-39.
  - 51 Yasukawa K, et al. Effects of flavonoids from french marigold (Florets of/r, *Tagetes patula*/r, L.) on acute inflammation Model [J]. Int J Inflam, 2013, 3(9): 1-5.
  - 52 Irakli C, et al. Constituents of French Marigold (*Tagetes patula* L.) flowers protect Jurkat T-cells against oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016(1): 1-10.
  - 53 Zhang Y, et al. Anti-cancer activity of two flavonoids in leaf and stem of *Tagetes erecta* L. [J]. Chin J Exper Tradi Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 233-237.
  - 54 Lu H. Study on separation and anticancer activity of compounds from *Tagetes erecta* L. residue [D]. Tianjin: Tianjin University (天津大学), 2016.
  - 55 Gimena PO, et al. Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93, 383-390.
  - 56 Gong Y, et al. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue [J]. Fitoterapia, 2012, 83: 481-489.
  - 57 Wang XG, et al. Research progress of marigold, a insecticidal plant [J]. J Xi'an United Univ (西安联合大学学报), 2002, 5(2): 5-10.
  - 58 Kanagy MN, et al. The possible role of marigold roots and  $\alpha$ -terthienyl in mediating host-finding by steinernematid nematodes [J]. Nematologica, 1996, 42: 220-231.
  - 59 Yang ZM, et al. Integrated control effect of tobacco root-knot nematode disease by *Tagetes erecta* and *Verticillium chlamydosporium* [J]. J Anhui Agri Sci (安徽农业科学) 2018, 46: 160-162.
  - 60 Wang S, et al. Study on insecticidal activity of marigold [C]. Proceedings of the Chinese chemical society conference (中国化学会会议论文集). 2014: 87-88.
  - 61 Wang HL, et al. Effect of antibacterial films of tagetes  $\alpha$ -terthienyl on chilled pork preservation [J]. Food Sci Tech (食品科技), 2018, 43: 147-150.