

밀싹으로부터 플라보노이드성분의 초음파 추출 : 중심합성계획모델을 이용한 최적화

이승범 · 왕효정 · 홍인권[†]

단국대학교 화학공학과
(2018년 7월 2일 접수, 2018년 7월 20일 심사, 2018년 8월 3일 채택)

Ultrasound-assisted Extraction of Total Flavonoids from Wheat Sprout: Optimization Using Central Composite Design Method

Seung Bum Lee, Xiaozheng Wang, and In Kwon Hong[†]

Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea
(Received July 2, 2018; Revised July 20, 2018; Accepted August 3, 2018)

초 록

초음파 추출공정을 이용하여 밀싹으로부터 유효성분을 추출하고, 중심합성계획모델을 이용하여 추출공정을 최적화하였다. 중심합성계획모델의 반응치로는 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 설정하고, 독립변수인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기에 따른 주효과도와 교호효과도를 해석하였다. 추출수율의 경우 주정/초순수의 부피비와 초음파 조사세기가 상대적으로 큰 영향을 미쳤으며, 플라보노이드성분 함량의 경우에는 추출시간의 영향이 가장 크게 나타났다. 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 모두 고려한 결과 최적조건은 추출시간(17.00 min), 주정/초순수의 부피비(50.25 vol%), 초음파 조사세기(551.70 W)이며, 이때 예측 추출수율은 28.43 wt%, 예측 플라보노이드성분 함량은 29.99 µg QE/mL dw를 얻을 수 있었다. 실험을 통해 유효성분 추출수율(28.73 wt%), 플라보노이드성분 함량(29.65 µg QE/mL dw)의 실험값을 얻을 수 있었으며, 이를 예측값과 비교했을 때 오차율은 각각 1.05, 1.13%이다.

Abstract

The process of extracting active ingredients from wheat sprout using ultrasound assisted method was optimized with a central composite design model. The response value of the central composite design model established the extraction yield and the total flavonoids content, main effects and interactive effects were analyzed depending on independent variables such as the extraction time, volume ratio of ethanol to ultrapure water, and ultrasonic irradiation power. The volume ratio of ethanol to ultrapure water and ultrasonic irradiation power were relatively large for the extraction yield and the extraction time was most significantly affected the total flavonoids, Considering both the extraction yield and total flavonoids content, the optimal extraction conditions were as follows: the extraction time of 17.00 min, volume ratio of ethanol to ultrapure water of 50.25 vol%, ultrasonic irradiation power of 551.70 W. In this case, the extraction yield and total flavonoids content were 28.43 wt% and 29.99 µg QE/mL dw, respectively. The actual experimental extraction yield and total flavonoids content under this condition were 28.73 wt% and 29.65 µg QE/mL dw, respectively with respective error rates of 1.05 and 1.13%.

Keywords: total flavonoids, wheat sprout, central composite design, ultrasound-assisted extraction

1. 서 론

플라보노이드(flavonoid)는 비타민 P라고 불리며, 항상 비타민 C와 함께 존재하는 식물의 대사산물이다. 플라보노이드는 많은 생물 활성 물질을 포함되어 있는 항산화물질로 항바이러스 기능과 혈관이 경화되는 것을 예방하고 혈당수치를 낮추는 기능을 가지고 있다[1-2]. 이러한 플라보노이드성분은 밀싹, 은행잎, 녹차잎, 칩뿌리 등 주로 식물 중에 함유되어 있다. 이 중 밀싹(wheat sprout)은 다량의 폴리페놀과

플라보노이드가 함유되어 있어 산화 억제 효과, 항산화 작용, 발암성 물질에 대한 억제 효과 등이 있다고 알려져 있다[3-5]. 최적화란 최대의 이윤을 얻기 위하여 시스템, 프로세스의 성능을 향상시키는 것으로 전통적으로 요인변수들 중에서 한 변수를 제외한 나머지 변수를 고정시켜 그 경향성을 파악하는 실험을 대부분 사용해왔다. 하지만 이 방법은 시간소모가 많고 최적 조건을 찾기 위해 많은 수의 실험이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하기 위해서는 실험계획법을 이용하여야 한다. 실험계획법이란 최소한의 실험으로 최대의 정보를 얻을 수 있는 방법으로 반응변수에 영향을 주는 유의한 요인효과들을 찾고 최적화하는 방법이다. 실험계획법 중 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 실험인자들의 수준을 변동시켜 어떠한 조합이 가장 최적의 결과를 도출하는지를 결

[†] Corresponding Author: Dankook University,
Department of Chemical Engineering, Gyeonggi 16890, Korea
Tel: +82-31-8005-3544 e-mail: khong@dankook.ac.kr

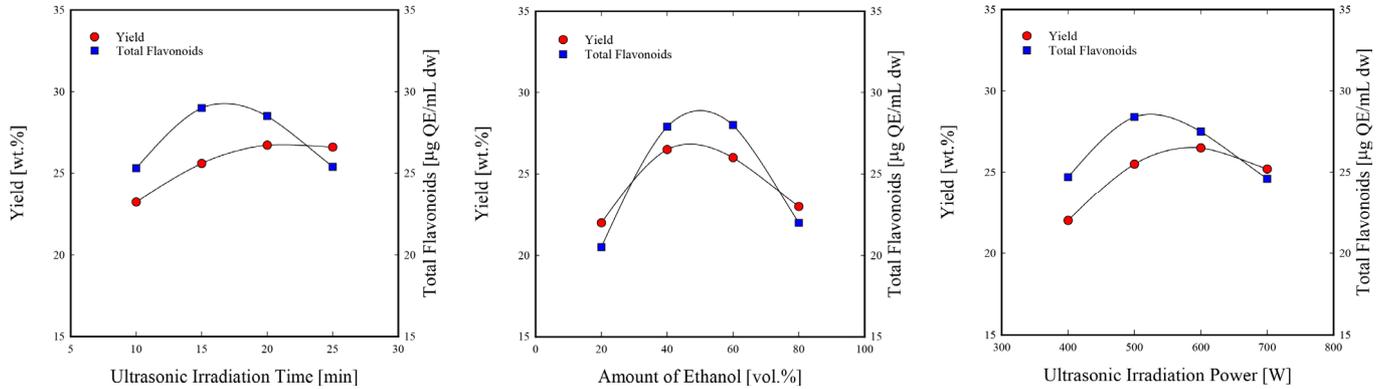


Figure 1. Extraction yield and total flavonoids of active ingredient from the wheat sprout using ultrasound-assisted extraction.

정하는 수리 통계적 분석법이다[6-8].

따라서 본 연구에서는 천연물로부터 유효성분을 추출하는 추출공정의 최적화를 위해 반응표면분석법 중 중심합성계획모델(central composite design model, CCD model)을 이용하였다. 천연물로는 밀싹을 선정하였으며, 초음파 추출공정(ultrasound-assisted extraction, UAE)을 이용하여 최적 추출조건을 알아보고자 하였다. 이를 위해 초음파 에너지를 이용하여 밀싹으로부터 플라보노이드성분을 추출하기 위한 기초실험을 진행한 후 반응표면분석법을 적용하여 최적추출조건을 결정하였다. 중심합성계획모델의 반응치(response)로는 추출수율과 플라보노이드성분 함량 등을 설정하고, 독립변수로는 추출시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기 등을 설정하였다. 이를 바탕으로 중심합성계획모델로부터 산출된 회귀방정식을 이용하여 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 동시에 최적화시키므로써 최적 추출조건을 제시하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 초음파에너지를 이용한 밀싹으로부터 유효성분의 추출

실험에 사용된 밀싹은 푸드믹서로 분쇄하여 건조한 후 추출용매 250 mL를 기준으로 준비된 12.5 g의 시료를 이용하여 추출공정을 수행하였다. 추출용매로는 초순수와 95%-주정(대한주정라이프, 95%)을 이용하였으며, 추출공정의 독립변수로는 반응치인 추출수율과 플라보노이드 함량에 영향을 미치는 추출시간(10~25 min), 주정/초순수 부피비(20~80 vol%), 초음파 조사세기(400~700 W) 등을 설정하였다. 추출을 위한 초음파 장비는 Sonics & Material Inc.사의 ultrasonic generator (VCX-600, U.S.A)를 사용하였다. 추출 후 여과된 추출물을 농축시키기 위하여 진공회전증발기(Eyela N-N type, aspirator A-3S)를 이용하였다. 기초실험으로부터 각 독립변수의 최적 추출 범위를 결정한 후 중심합성계획모델을 이용하여 최적화 과정을 수행하였다. 추출된 유효성분의 추출수율은 냉동건조장치(LP3, Jouan, France)에서 0.1 mbar, -40 °C의 조건으로 24 h 건조한 후 측정하였다.

2.2. 플라보노이드성분의 분석

밀싹으로부터 추출된 유효성분의 플라보노이드성분(total flavonoids) 분석은 자외선 분광분석기(Optizen 2120 UV, MECASYS)를 이용하여 측정하였다. 플라보노이드성분의 검정곡선을 작성하기 위해 표준물질로 quercetin (Sigma-Aldrich, Q4951)을 이용하였으며, 표준용액의 농도범위는 10~80 µg/mL이고, 자외선 파장은 415 nm에서 측정

하였다[9]. 측정된 흡광도는 검정곡선을 이용하여 quercetin equivalents (µg QE/mL dw)로 환산하였다[10-11].

3. 결과 및 고찰

3.1. 반응표면분석법의 독립변수 설정

밀싹으로부터 플라보노이드성분을 추출하기 위한 추출공정의 독립변수를 설정하기 위해 기초실험을 진행하였다. 초음파 추출공정의 독립변수로는 추출시간(10~25 min), 주정/초순수 부피비(20~80 vol%), 초음파 조사세기(400~700 W) 등을 선택하였으며, 넓은 범위의 실험변수의 결과로부터 반응표면분석법에 적용할 독립변수범위를 설정하였다.

Figure 1은 초음파에너지를 이용한 독립변수에 따른 유효성분의 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 나타낸 그림이다. 추출시간이 증가함에 따라 추출수율은 증가하는 경향을 나타내었으나 20 min 이상에서는 추출량의 변화가 거의 나타나지 않았다. 또한 플라보노이드성분은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 추출과정 중 추출시간이 증가함에 따라 추출량은 증가하나 추출물 중 플라보노이드성분 함량은 거의 일정하게 추출되므로써 추출물 중 플라보노이드성분 함량은 상대적으로 감소하기 때문에 사료된다. 주정/초순수 부피비에 따른 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 측정된 결과 주정의 농도가 증가함에 따라 추출수율과 플라보노이드성분 함량 모두 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 초음파 조사세기 변화에 따른 추출수율과 플라보노이드성분 함량의 변화 역시 추출시간과 마찬가지로 추출수율은 초음파 조사세기가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 플라보노이드성분 함량은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다[12]. 따라서 본 연구에서는 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 모두 고려하여 반응표면분석법에 적용할 독립변수의 범위를 추출시간(15~20 min), 주정/초순수의 부피비(40~60 vol%), 초음파 조사세기(500~600 W)로 좁게 설정한 후 반응표면분석법의 최적화과정을 진행하였다.

3.2. 초음파에너지를 이용한 추출수율 최적화

본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 밀싹의 추출공정의 추출조건을 최적화하였다. 반응표면분석법은 통계학적인 특성과 수학적 기술을 결합하여 여러 조건에 따른 최적화된 공정을 제시한다[13]. 추출공정에 중요한 독립변수로 고려되는 인자에 대한 실험범위는 추출시간(15~20 min), 주정/초순수의 부피비(40~60 vol%), 초음파 조사세기(500~600 W)를 사용하였다. 독립변수에 영향을 받는 반응치는 유

Table 1. Basic Experiment Setup of Ultrasound-assisted Extraction

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	Std. No.	Run No.	Point type	Block	Time (min)	EtOH (vol%)	Power (W)
1	10	1	-1	1	25.40896	50	550
2	1	2	1	1	12	35	450
3	19	3	0	1	17	50	550
4	15	4	0	1	17	50	550
5	16	5	0	1	17	50	550
6	14	6	-1	1	17	50	718.1793
7	20	7	0	1	17	50	550
8	4	8	1	1	22	65	450
9	9	9	-1	1	8.591036	50	550
10	2	10	1	1	22	35	450
11	11	11	-1	1	17	24.77311	550
12	13	12	-1	1	17	50	381.8207
13	12	13	-1	1	17	75.22689	550
14	3	14	1	1	12	65	450
15	6	15	1	1	22	35	650
16	5	16	1	1	12	35	650
17	8	17	1	1	22	65	650
18	7	18	1	1	12	65	650
19	18	19	0	1	17	50	550
20	17	20	0	1	17	50	550

효성분의 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 추출공정의 최적 조건을 찾기 위해 중심합성계획모형에 따라 설계된 Table 1과 같이 20개의 조건에 대하여 각 실험을 진행하였다.

Table 1의 독립변수에서 실험을 진행한 후 각각의 결과를 반응표면분석법으로 최적화하여 독립변수에 따른 추출수율과 플라보노이드성분 함량에 대한 회귀방정식을 얻었다. 중심합성계획법에 따라 설계된 초음파 추출공정의 추출수율에 대한 반응표면분석 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = -89.0 + 3.221y_1 + 1.015y_2 + 0.2361y_3 - 0.08779y_1^2 - 0.00975y_2^2 - 0.000212y_3^2 - 0.00350y_1y_2 - 0.000175y_1y_3 + 0.000025y_2y_3$$

여기서 Y는 반응표면분석법에서 반응치로 설정한 유효성분의 추출수율이고, 독립변수인 y_1, y_2, y_3 는 각각 추출시간, 주정/초순수의 부피비, 초음파 조사세기이다.

Figure 2는 반응표면분석법을 이용하여 얻은 회귀방정식을 이용하여 초음파에너지를 이용한 추출공정의 추출수율에 독립인자의 영향을 3차원 그래프와 등고선도로 나타내었다. 일정한 초음파 조사세기에서 추출시간과 주정/초순수의 부피비가 증가함에 따라 유효성분의 추출수율은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 일정한 주정/초순수의 부피비에서 추출시간과 초음파 조사세기에 대한 추출수율의 경향 역시 같은 경향성을 나타내었다. 또한 일정한 추출시간에서 주정/초순수의 부피비와 초음파 조사세기에 대한 추출수율의 경향성도 증가하다 감소하였다.

독립변수의 주효과도와 교호효과도를 확인하기 위해 각 독립변수의 증감에 따른 추출수율의 변화를 Figure 3에 나타내었다. 본 연구에서 산출된 최적조건인 추출시간(17.0 min), 주정/초순수의 부피비(50.3 vol%), 초음파 조사세기(551.7 W)를 기준으로 기초실험으로부터 선정된 각 독립변수 범위의 10%를 증가 또는 감소시켜 회귀방정식으로부터 계산하였다. 추출시간의 경우 최적추출시간 17.0 min을 기준으로 ± 0.2 min, 주정/초순수의 부피비의 경우에는 최적조건인 50.3 vol%을 기준으로 ± 2.0 vol%, 초음파 조사세기의 경우 최적초음파 조사세기인 551.7 W를 기준으로 ± 10.0 W를 설정하였다. 모든 독립변수의 경우 추출수율에 대한 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 추출시간에 비해 주정/초순수의 부피비와 초음파 조사세기가 상대적으로 큰 영향을 미치는 독립변수인 것을 알 수 있었다[14].

3.3. 초음파에너지를 이용한 플라보노이드성분 함량 최적화

반응표면분석법 중 중심합성계획법에 따라 설계된 초음파 추출공정의 플라보노이드성분 함량에 대한 반응표면분석 회귀방정식은 다음과 같다.

$$F = -109.0 + 4.01y_1 + 1.146y_2 + 0.2702y_3 - 0.0832y_1^2 - 0.00917y_2^2 - 0.000208y_3^2 - 0.0045y_1y_2 - 0.00162y_1y_3 - 0.000225y_2y_3$$

Figure 4는 회귀방정식을 이용하여 계산된 독립인자에 따른 유효성분의 플라보노이드성분 함량을 3차원 그래프와 등고선도로 나타낸 그림이다. 일정한 초음파조사세기에서 추출시간과 주정/초순수의 부피비가 증가함에 따라 밀씩으로부터 추출된 유효성분의 플라보노이드

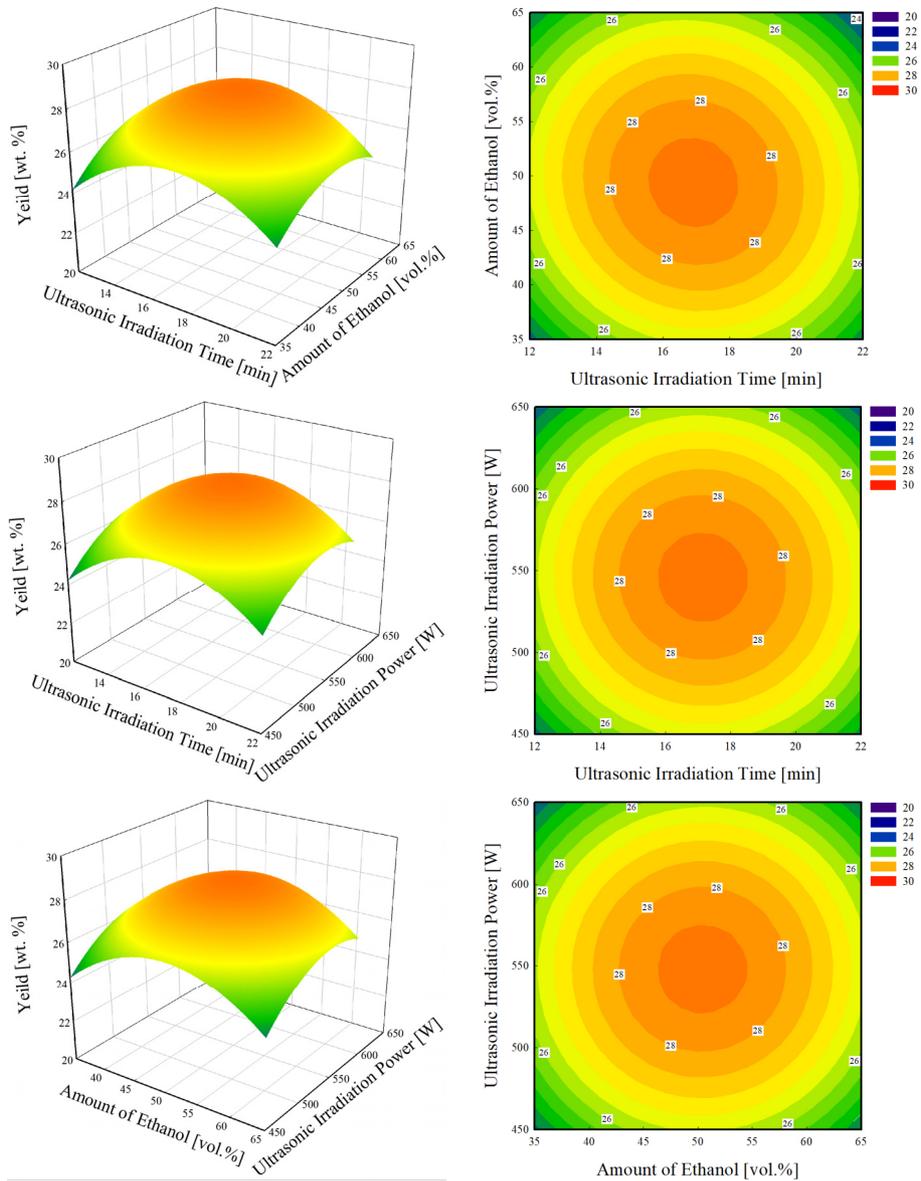


Figure 2. Response surface for yield of the wheat sprout at constant values as a function of time, ethanol concentration and power in UASE.

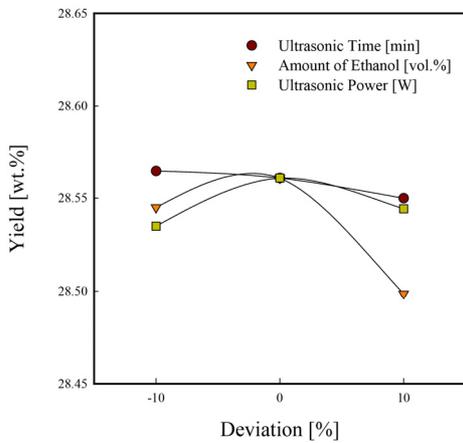


Figure 3. Perturbation plot for the effect of variables on extraction yield.

성분 함량은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 일정한 주정/초순수의 부피비에서 추출시간과 초음파 조사세기에 대한 플라보노이드 성분 함량의 경향 역시 같은 경향성을 나타내었다. 또한 일정한 추출시간에서 주정/초순수의 부피비와 초음파 조사세기에 대한 플라보노이드 성분 함량의 경향성도 증가하다 감소하였다. 독립변수에 따른 플라보노이드 성분 함량에 대한 주효과도와 교호효과도를 확인하기 위해 각 독립변수의 증감에 따른 추출수율의 변화를 Figure 5에 나타내었다. 추출시간과 주정/초순수의 부피비의 경우 최적조건을 기준으로 증가하는 경향을 나타내었으나 최적조건 이후 증가율이 감소하였다. 또한 초음파 조사세기의 경우 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 밀색으로부터 플라보노이드 성분을 추출하는 추출공정의 경우 변화폭이 가장 큰 추출시간이 가장 중요한 독립변수인 것을 알 수 있었다[15].

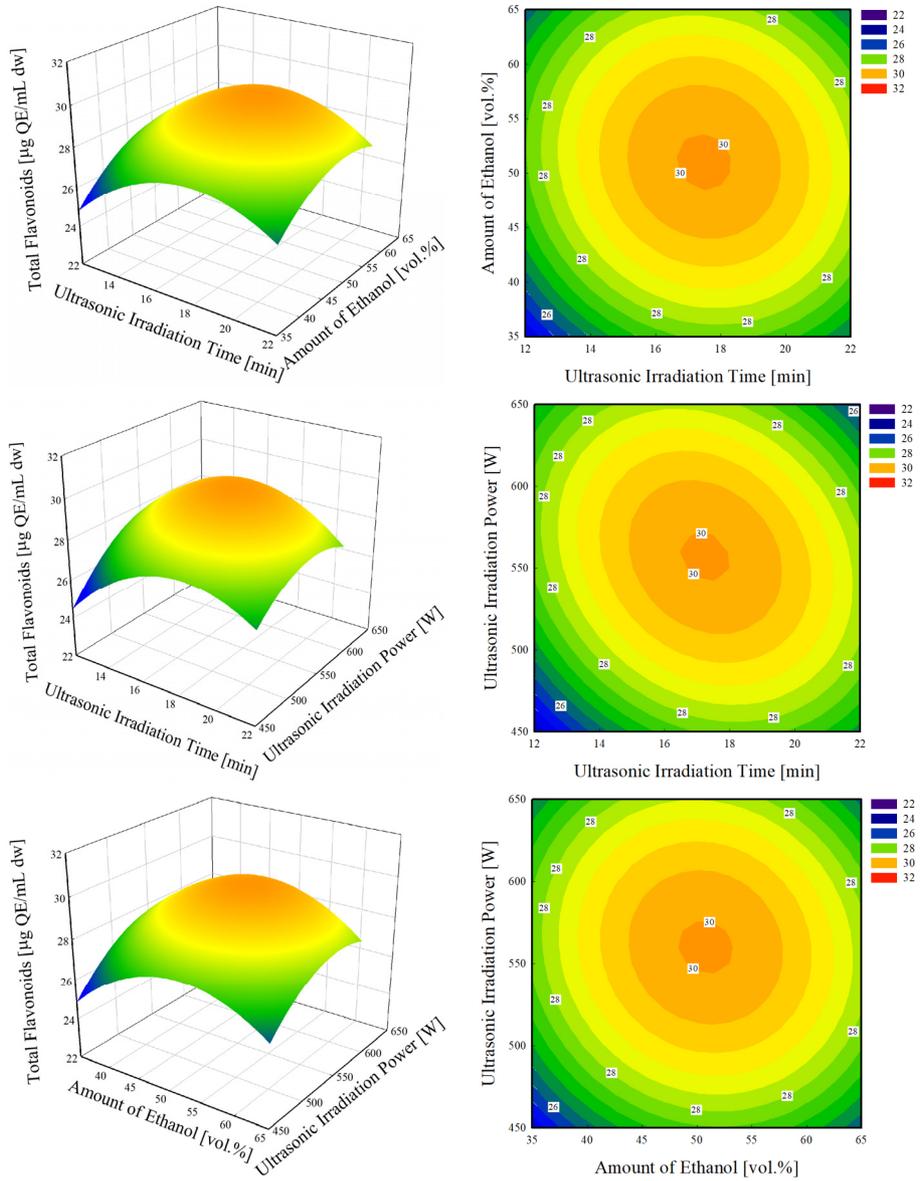


Figure 4. Response surface for total flavonoids of the wheat sprout at constant values as a function of time, ethanol concentration and power in UAE.

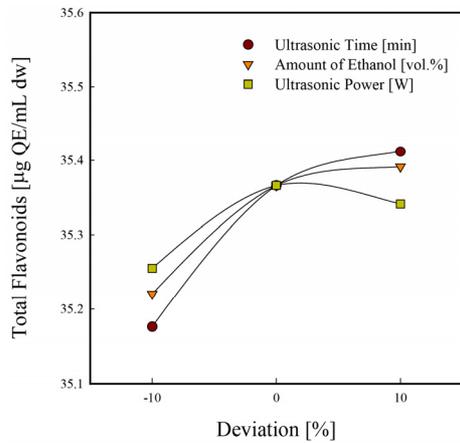


Figure 5. Perturbation plot for the effect of variables on total flavonoids.

3.4. 종합만족도 평가

중심합성계획모형에 의해 수행된 실험결과를 바탕으로 계산된 2차 회귀방정식을 이용하여 실험값과 회귀방정식 예측값을 비교하여 Figure 6에 나타내었다. 추출수율과 플라보노이드성분 함량 모두 실험값과 회귀방정식에서 예측한 값이 유사한 결과를 나타내었다. 평균 오차율은 추출수율과 플라보노이드성분 함량에 대해 각각 2.40%와 5.62%를 나타내었다.

Figure 7은 초음파 추출공정을 이용한 밀싹으로부터 유효성분을 추출하기 위한 각 독립변수에 따른 추출수율과 플라보노이드성분 함량의 종합만족도를 나타낸 그림이다. 유효성분의 추출수율 및 플라보노이드성분 함량을 각각 중심합성계획모형을 통해 최적화를 시킨 결과 추출수율의 경우 추출시간(16.74 min), 주정/초순수의 부피비(49.75 vol%), 초음파 조사세기(551.70 W)에서 개별 최댓값(28.43 wt%)을 가지고, 플라보노이드성분 함량의 경우에는 추출시간(17.25 min), 주정/초순수의 부피비(51.27 vol%), 초음파 조사세기(555.10 W)에서 개별

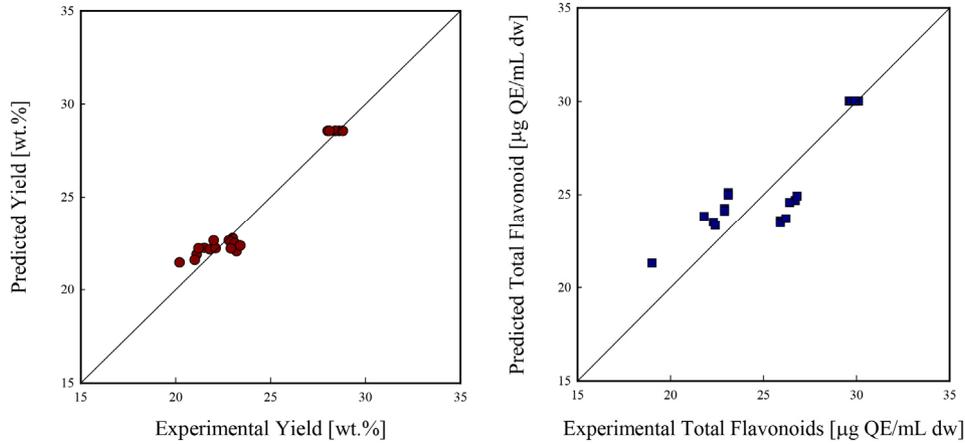


Figure 6. Scatter plot of extraction yield and total flavonoids content from wheat sprout in UASE process.

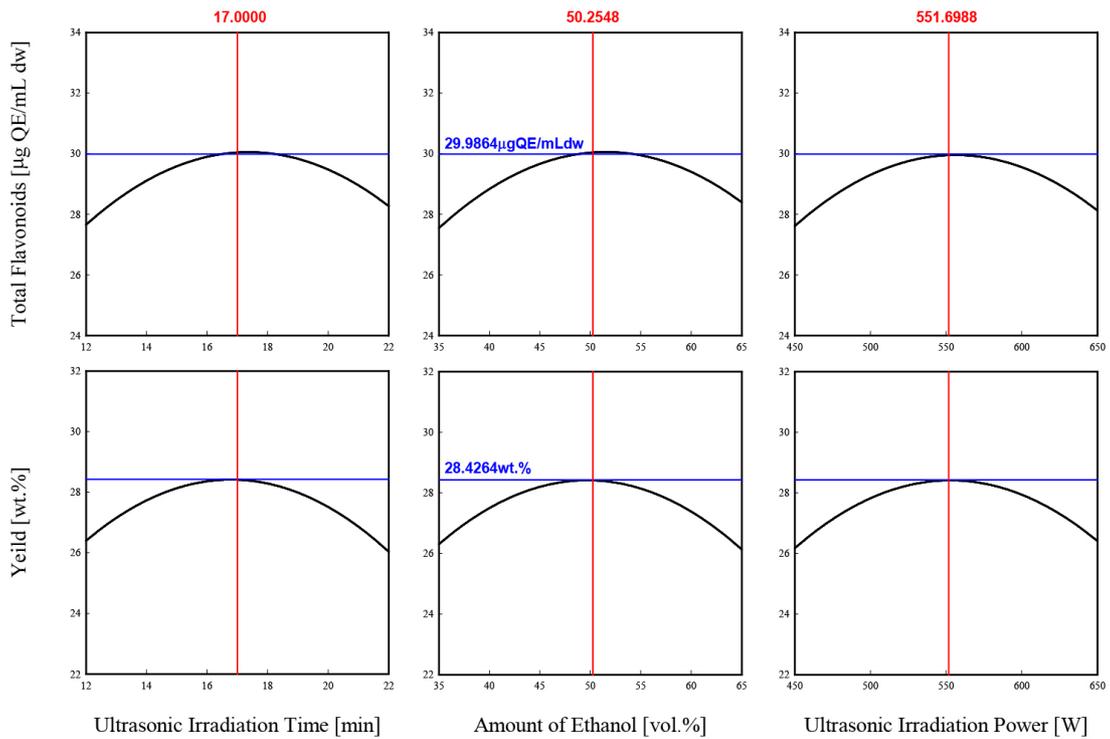


Figure 7. Optimization graph of response surface for yield and total flavonoids of the wheat sprout in UASE.

최댓값(30.01 µg QE/mL dw)을 나타내었다. 두 반응치를 모두 고려할 경우 최적조건은 추출시간(17.00 min), 주정/초순수의 부피비(50.25 vol%), 초음파 조사세기(551.70 W)로 산출되며 이때 추출수율은 28.43 wt%, 플라보노이드성분 함량은 29.99 µg QE/mL dw를 얻을 수 있었다. 이 값들은 더 높은 정확성과 개별적으로 더 큰 값을 갖는 개별분석과의 차이가 없기 때문에, 종합분석에 있어서 적합한 결과를 얻을 수 있는 실험이라고 판단할 수 있다. 이는 두 반응치가 서로 연관성이 있고, 뚜렷한 경향성을 보이는 것으로 분석할 수 있다. 이는 개별 또는 종합분석의 종합만족도가 모두 95% 이상이라는 점을 근거로 뒷받침할 수 있다. 따라서 중심합성계획모델의 종합 최적화 예상값의 변수조건인 추출시간(17.00 min), 주정/초순수의 부피비(50.25 vol%), 초음파 조사세기(551.70 W)를 바탕으로 실험을 진행해보았을 때, 유효성분 추출수율(28.73 wt%), 플라보노이드성분 함량(29.65 µg

QE/mL dw)의 실험값을 얻을 수 있었으며, 이를 예상치와 비교했을 때 오차율은 각각 1.05, 1.13%이다. 이는 두 개의 반응치를 동시에 분석하는 다중분석 종합분석임에도 불구하고 정확도가 충분히 합당했으며, 이는 반응표면분석법에 대한 추출분야의 적용도 합당하다고 판단할 수 있는 결과임을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 초음파 추출공정을 이용하여 밀싹으로부터 유효성분을 추출하고, 중심합성계획모델을 이용하여 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 최적화한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 추출수율의 경우 모든 독립변수에 대해 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 주정/초순수의 부피비와 초음

과 조사세기가 추출시간에 비해 상대적으로 큰 영향을 미치는 독립변수인 것을 알 수 있었다. 중심합성계획모델로 최적화과정을 수행한 결과 추출수율의 경우 추출시간(16.74 min), 주정/초순수의 부피비(49.75 vol%), 초음파 조사세기(551.70 W)에서 개별 최댓값(28.43 wt%)을 나타내었다.

2. 플라보노이드성분 함량의 경우 추출시간과 주정/초순수의 부피비에 대해 증가하는 경향을 나타내었으나 최적조건 이후 증가율이 감소하였고, 초음파 조사세기에 대해서는 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 밀삭으로부터 플라보노이드 성분을 추출하는 추출공정의 경우 변화폭이 가장 큰 추출시간이 가장 중요한 독립변수인 것을 알 수 있었다. 중심합성계획모델로 최적화과정을 수행한 결과 추출시간(17.25 min), 주정/초순수의 부피비(51.27 vol%), 초음파 조사세기(555.10 W)에서 개별 최댓값(30.01 µg QE/mL dw)을 나타내었다.

3. 두 반응치를 모두 고려한 결과 최적조건은 추출시간(17.00 min), 주정/초순수의 부피비(50.25 vol%), 초음파 조사세기(551.70 W)로 산출되며, 이때 예측 추출수율은 28.43 wt%, 예측 플라보노이드성분 함량은 29.99 µg QE/mL dw를 얻을 수 있었다. 실험을 통해 유효성분 추출수율(28.73 wt%), 플라보노이드성분 함량(29.65 µg QE/mL dw)의 실험값을 얻을 수 있었으며, 이를 예측값과 비교했을 때 오차율은 각각 1.05, 1.13%이다.

감 사

이 연구는 2017학년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

References

1. N. C. Cook and S. Samman, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76 (1996).
2. A. H. Clifford and S. L. Cuppett, Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1063-1072 (2000).
3. B. Tudek, B. Peryt, J. Miloszevska, T. Szymczyk, M. Przybyszewska, and P. Janik, The effect of wheat sprout extract on benzo(a)pyrene and 7,2-dimethylbenz(a) anthracene activity, *Neoplasma*, **35**(5), 515-523 (1998).
4. O. S. Aydos, A. Avcl, T. Ozkan, A. Karadag, E. Gurleyik, B. Altinok, and A. Sunguroglu, Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheat grass (*Triticum aestivum* L.) extract on CML (k562) cell line, *Turk. J. Med. Sci.*, **41**(4), 657-663 (2011).
5. G. Falcioni, D. Fedeli, L. Tiano, I. Calzuola, L. Mancinelli, V. Marsili, and G. Gianfranceschi, Antioxidant activity of wheat sprouts extract *in vitro*: Inhibition of DNA oxidative damage, *J. Food Sci.*, **67**(8), 2918-2922 (2002).
6. S. Yavari, A. Malakahmad, N. B. Sapari, and S. Yavari, Sorption properties optimization of agricultural wastes-derived biochars using response surface methodology, *Process Saf. Environ. Prot.*, **109**, 509-519 (2017).
7. A. A. D'Archivio and M. A. Maggi, Investigation by response surface methodology of the combined effect of pH and composition of water-methanol mixtures on the stability of curcuminoids, *Food Chem.*, **219**, 414-418 (2017).
8. G. I. Danmaliki, T. A. Saleh, and A. A. Shamsuddeen, Response surface methodology optimization of adsorptive desulfurization on nickel/activated carbon, *J. Ind. Eng. Chem.*, **313**, 993-1003 (2017).
9. H. S. Jeong, H. Joo, and J.-H. Lee, Antioxidant activity of dietary fibers from tubers and stalks of sweet potato and their anti-cancer effect in human colon cancer, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(5), 525-529 (2013).
10. N. C. Cook and S. Samman, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76 (1996).
11. S. Beck and J. Stengel, Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in Ginkgo biloba L., *Phytochemistry*, **130**, 201-206 (2016).
12. T. Belwal, P. Dhyani, I. D. Bhatt, R. S. Rawal, and V. Pande, Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM), *Food Chem.*, **207**, 115-124 (2016).
13. R. F. Yanga, L. L. Genga, H. Q. Lub, and X. D. Fanc, Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina* baroni, *Ultrason. Sonochem.*, **34**, 571-579 (2017).
14. S. A. Park, J. H. Ha, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Broussonetia kazinoki* SIEB extracts, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(2), 177-183 (2013).
15. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).