

# 중심합성계획모델을 이용한 밀싹으로부터 플라보노이드성분의 추출공정 최적화

이승범\* · 왕효정\* · 유봉호†

단국대학교 공과대학, \*단국대학교 화학공학과  
(2018년 3월 13일 접수, 2018년 4월 9일 심사, 2018년 5월 1일 채택)

## Optimization of Total Flavonoids Extraction Process from Wheat Sprout using Central Composite Design Model

Seung Bum Lee\*, Xiaozheng Wang\*, and Bong-Ho Yoo†

College of Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea  
\*Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea  
(Received March 13, 2018; Revised April 9, 2018; Accepted May 1, 2018)

### 초 록

플라보노이드성분 함량이 높은 밀싹을 이용하여 유효성분을 추출하고, 중심합성계획모델을 이용하여 추출공정을 최적화하였다. 중심합성계획모델의 반응치로는 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 설정하고, 독립변수인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도에 따른 주효과도와 교호효과도를 해석하였다. 추출수율의 경우 추출시간과 추출온도가 상대적으로 큰 영향을 미쳤으며, 플라보노이드성분 함량의 경우에는 추출시간의 영향이 가장 크게 나타났다. 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 모두 고려한 결과 최적추출조건은 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(50.00 vol%), 추출온도(54.41 °C)이었으며, 이때 추출수율은 30.14 wt%, 플라보노이드성분 함량은 35.37 µg QE/mL dw이었다. 이 조건의 실제 실험결과 추출수율(29.92 wt%), 플라보노이드성분 함량(35.32 µg QE/mL dw)으로 오차율은 각각 0.39%, 0.74%이었다. 이는 두 개의 반응치를 동시에 분석하는 다중분석 종합분석임에도 높은 정확도를 나타낸 것으로 본 연구에서의 최적화과정 신뢰도가 우수한 것으로 사료된다.

### Abstract

Effective ingredients were extracted using wheat sprout with high levels of flavonoids, and the extraction process was optimized with a central composite design model. The response value of the central composite design model establishes the extraction yield and the content of the flavonoids. The main and interactive effects were then analyzed depending on independent variables such as the extraction time, the volume ratio of alcohol to ultrapure water, and the extraction temperature. The extraction time and temperature were relatively large for the extraction yield. For the total flavonoids, the extraction time was most significantly affected. Considering both the extraction yield and the content of the total flavonoids, optimal extraction conditions were as follows: the extraction time (2.44 h), volume ratio of alcohol to ultrapure water (50.00 vol%), extraction temperature (54.41 °C). Under these condition, the extraction yield was 30.14 wt% and the content of the total flavonoids was 35.37 µg QE/mL dw. From the actual experimental result, the extraction yield under this condition was 29.92 wt% and the content of the total flavonoids was 35.32 µg QE/mL dw, which had an error rate of 0.39% and 0.74%, respectively. This is a multi-analysis comprehensive analysis that analyzes two simultaneous values of responses, but is considered to be highly accurate and also provides an excellent reliability of the optimization process in this study.

**Keywords:** total flavonoids, wheat sprout, central composite design, extraction yield

## 1. 서 론

플라보노이드성분(total flavonoids)은 phenylalanine으로부터 합성되는 식물색소이며, 채소나 과일에서 흔히 보이는 벤조 Y 피론 구조를

특징으로 하는 폴리페놀 화합물의 큰 무리를 구성한다. 또한 플라보노이드는 radical scavengers로서의 높은 약리활성 때문에 인체의 건강에도 매우 중요하다[1-2]. 폴리페놀성분이 풍부한 과일이나 채소를 많이 섭취할수록 각종 질환 및 암 발생률을 줄일 수 있다는 연구결과가 발표되었으며, 최근에 과일이나 채소에 함유된 플라보노이드성분의 건강증진기능(health promoting functions)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3-8]. 이러한 플라보노이드성분은 은행잎, 녹차잎, 칩뿌리, 밀싹 등 주로 식물 중에 함유되어 있다. 이 중 밀싹(wheat sprout)은 전 세계적으로 재배되는 작물로 농작이 쉬우며 풍부한 영양분을 포함

† Corresponding Author: Dankook University,  
College of Engineering, Gyeonggi 16890, Korea  
Tel: +82-31-8005-3464 e-mail: bongho@dankook.ac.kr

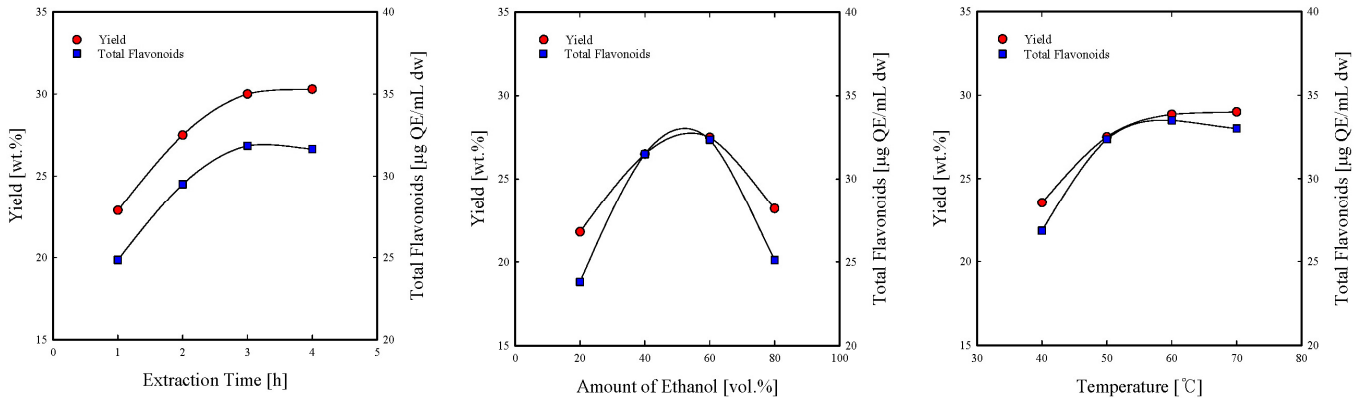


Figure 1. Extraction yield and total flavonoids of active ingredient from the wheat sprout.

하고 있다는 장점을 가지고 있어 차세대 대표 영양식물로 손꼽히고 있다. 또한 성장이 끝난 밀보다 성장이 끝나지 않은 밀싹에서 더 높은 플라보노이드 성분과 영양소를 함유하고 있어, 싹을 이용한 추출 최적화 연구가 활발히 진행되고 있다[9-10].

천연물로부터 유효성분을 추출하는 추출공정의 최적화를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM) 중 중심합성계획모형(central composite design model, CCD model)을 이용하였다. 중심합성계획모형은 실험을 바탕으로 경향성을 분석해 회귀방정식을 유도하고 목표값에 최적화 시키는 분석방법이다. 이는 상호 작용을 독립 변수의 효과 정의뿐만 아니라 변수 사이의 주효과도를 최적화할 수 있다[11-13]. 따라서 본 연구에서는 천연물로 밀싹을 이용하여 플라보노이드성분을 추출하고 중심합성계획모형을 이용하여 추출공정을 최적화하고자 하였다. 중심합성계획모형의 반응치(response)로는 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 설정하고, 독립변수인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도에 따른 주효과도와 교호효과도를 해석하였다. 이를 바탕으로 중심합성계획모형으로부터 산출된 회귀방정식을 이용하여 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 동시에 최적화 시킴으로써 최적 추출조건을 제시하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 밀싹으로부터 플라보노이드성분의 추출

실험에 사용된 밀싹은 푸드믹서로 분쇄하여 건조한 후 추출용매 500 mL를 기준으로 준비된 20.0 g의 시료를 이용하여 추출공정을 수행하였다. 추출용매로는 초순수와 95%-주정(대한주정라이프, 95%)을 이용하였으며, 추출공정의 최적화 과정에서 반응표면분석법의 독립변수로는 추출시간(1~4 h), 주정/초순수 부피비(20~80 vol%), 추출온도(40~70 °C) 등을 설정하였다. 기초실험으로부터 각 독립변수의 최적 추출 범위를 결정한 후 반응표면분석법 중 중심합성계획모형을 이용하여 최적화 과정을 수행하였다. 이때 반응치로는 추출된 유효성분의 수율과 플라보노이드 함량(total flavonoids)을 선정하였다. 추출된 유효성분의 수율은 냉동건조법(freeze drying method)을 이용하여 측정하였다. 밀싹으로부터 추출된 유효성분은 여과과정 거친 후 진공증류를 통해 농축하여 -10 °C로 6 h 동안 1차 동결한다. 동결된 시료는 냉동건조장치(LP3, Jouan, France)에서 0.1 mbar, -40 °C의 조건으로 24 h 건조하여 수율을 측정하였다.

### 2.2. 플라보노이드성분의 분석

밀싹으로부터 추출된 유효성분의 플라보노이드성분 분석은 자외선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 플라보노이드성분의 검정곡선을 작성하기 위해 표준물질로 quercetin (Sigma-Aldrich, Q4951)을 이용하였으며, 자외선 파장은 415 nm에서 측정하였다[2].

냉동 건조한 시료 1 mL (1 mg/mL)에 질산알루미늄(aluminum nitrate)과 아세트산 칼륨(potassium acetate)을 혼합하여 분석시료를 제조하고 암실에서 40 min간 방치한 후 자외선 분광광도계를 이용하여 정량하였다. 측정된 흡광도는 검정곡선을 이용하여 quercetin equivalents (µg QE/mL dw)로 환산하였다[14-15].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 반응표면분석법의 독립변수 설정

밀싹으로부터 플라보노이드성분을 추출하기 위한 추출공정의 독립변수를 설정하기 위해 본 연구에서는 기초실험을 진행하였다. 추출공정의 독립변수로는 추출시간(1~4 h), 주정/초순수 부피비(20~80 vol%), 추출온도 (40~70 °C) 등을 선택하였으며, 넓은 범위의 실험변수로부터 밀싹 중 유효성분의 추출수율과 플라보노이드성분 분석을 통해 반응표면분석법에 적용할 독립변수범위를 설정하였다.

Figure 1은 독립변수에 따른 유효성분의 추출수율과 플라보노이드 성분 함량을 나타낸 그림이다. 추출시간이 증가함에 따라 유효성분의 추출수율은 증가하는 경향을 나타내었으나 3 h 이상에서는 추출량의 변화가 거의 나타나지 않았다. 또한 플라보노이드성분은 추출시간이 증가하면 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 추출과정 중 추출시간이 증가함에 따라 추출량은 증가하나 추출물 중 플라보노이드 성분 함량은 거의 일정하게 추출됨으로써 추출수율은 증가하나 추출물 중 플라보노이드성분 함량은 감소하기 때문에 사료된다. 주정/초순수 부피비에 따른 밀싹 중 유효성분의 추출수율과 플라보노이드 성분 함량을 측정된 결과 주정의 농도가 증가함에 따라 추출수율과 플라보노이드성분 함량 모두 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 추출온도 변화에 따른 추출수율과 플라보노이드성분 함량의 변화 역시 추출시간과 마찬가지로 추출수율은 추출온도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 플라보노이드성분 함량은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 추출온도가 증가하면 추출량은 증가하나 밀싹 중 추출되는 플라보노이드성분 함량은 거의 일정하게 추출되기 때문에 사료된다. 따라서 본 연구에서는 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 모두 고려하여 반응표면분석법에 적용할 독립변수

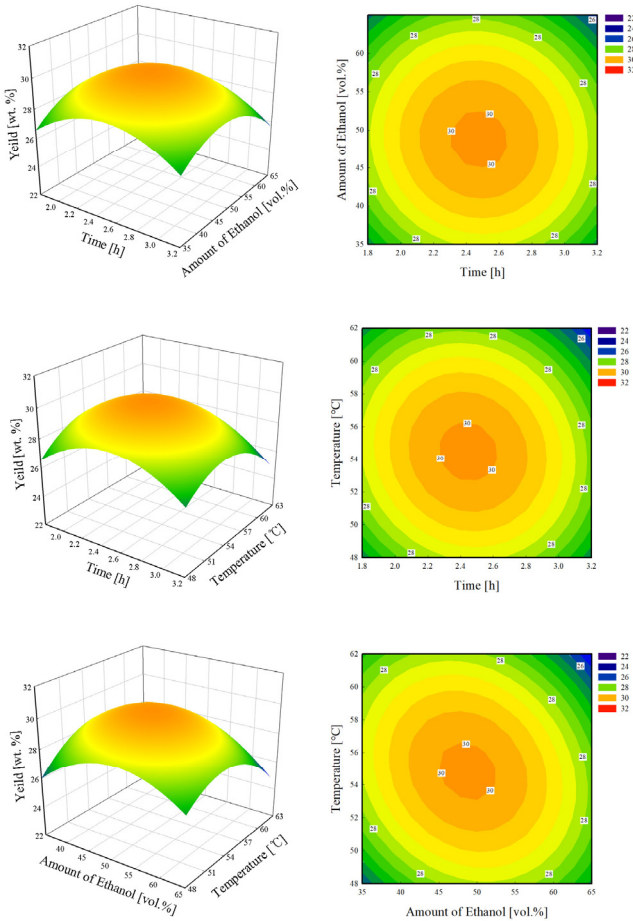


Figure 2. Response surface for yield of the wheat sprout at constant values as a function of time, ethanol concentration and temperature.

의 범위를 추출시간(2.0~3.0 h), 주정/초순수의 부피비(40~60 vol%), 추출온도(50~60 °C)로 좁게 설정한 후 반응표면분석법의 최적화과정을 진행하였다.

3.2. 반응표면분석법을 이용한 추출수율 최적화

본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 밀짚의 추출공정의 추출조건을 최적화하였다. 반응표면 분석법은 통계학적인 특성과 수학적 기술을 결합하여 여러 조건에 따른 최적화된 공정을 제시한다[16]. 추출공정에 중요한 독립변수로 고려되는 인자에 대한 실험범위는 추출시간(2.0~3.0 h), 주정/초순수의 부피비(40~60 vol%), 추출온도(50~60 °C)를 사용하였다. 독립변수에 영향을 받는 반응치는 유효성분의 추출수율과 플라보노이드성분 함량을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 중심합성계획법에 따라 설계된 추출공정의 추출수율에 대한 반응표면분석 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = -161.9 + 23.5x_1 + 1.226x_2 + 4.876x_3 - 3.936x_1^2 - 0.00849x_2^2 - 0.04044x_3^2 - 0.0155x_1x_2 - 0.0638x_1x_3 - 0.00631x_2x_3$$

여기서 Y는 반응표면분석법에서 반응치로 설정한 유효성분의 추출수율이고, 독립변수인  $x_1, x_2, x_3$ 는 각각 추출시간, 주정/초순수의 부피비, 추출온도이다.

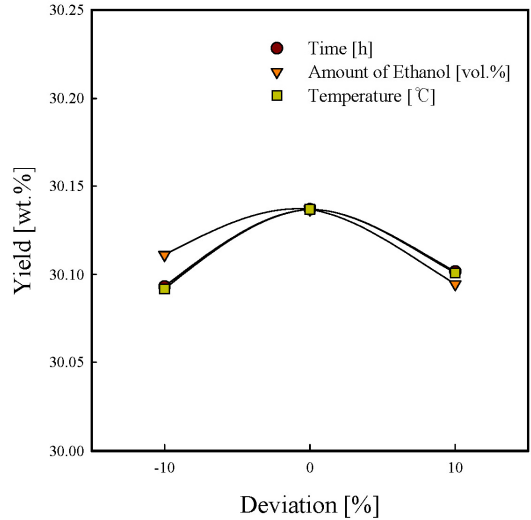


Figure 3. Perturbation plot for the effect of variables on extraction yield.

Figure 2는 반응표면분석법을 이용하여 얻은 회귀방정식을 이용하여 추출수율에 독립인자의 영향을 3차원 그래프와 등고선도로 나타내었다. 일정한 추출온도에서 추출시간과 주정/초순수의 부피비가 증가함에 따라 밀짚으로부터 추출된 유효성분의 추출수율은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 일정한 주정/초순수의 부피비에서 추출시간과 추출온도에 대한 추출수율의 경향 역시 같은 경향성을 나타내었다. 또한 일정한 추출시간에서 주정/초순수의 부피비와 추출온도에 대한 추출수율의 경향성도 증가하다 감소하였다. 이로부터 본 연구에서 설정한 반응표면분석법의 독립변수범위의 중간영역에서 가장 높은 추출수율을 나타내었다.

반응표면분석법으로부터 산출된 회귀방정식을 통해 추출공정 독립변수의 주요효과, 교호효과도, 적합성 결여 등을 판단할 수 있다. 본 연구의 주요효과인 추출시간, 주정/초순수의 부피비, 반응온도가 반응치인 추출수율에 영향을 끼치는 정도를 수치화 하면 추출시간 : 주정/초순수의 부피비 : 추출온도 = 19.17 : 1.0 : 3.98의 비율로 나타났다. 또한 교호효과도인 (추출시간 × 주정/초순수의 부피비) : (추출시간 × 추출온도) : (주정/초순수의 부피비 × 추출온도)의 비율은 2.46 : 10.11 : 1.0로 나타났다. 독립변수의 주요효과를 확인하기 위해 각 독립변수의 증감에 따른 추출수율의 변화를 Figure 3에 나타내었다. Figure 3은 본 연구에서 산출된 최적조건인 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(50.0 vol%), 추출온도(54.41 °C)를 기준으로 기초실험으로부터 선정된 각 독립변수 범위의 10%를 증가 또는 감소시켜 회귀방정식으로부터 계산하였다. 추출시간의 경우 최적추출시간 2.44 h을 기준으로 ± 0.1 h, 주정/초순수의 부피비의 경우에는 최적조건인 50.0 vol%을 기준으로 ± 2.0 vol%, 추출온도의 경우 최적추출온도인 54.41 °C를 기준으로 ± 1.0 °C로 설정하였다. 모든 독립변수의 경우 추출수율에 대한 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 추출시간과 추출온도가 주정/초순수의 부피비에 비해 상대적으로 큰 영향을 미치는 독립변수인 것을 알 수 있었다.

3.3. 반응표면분석법을 이용한 플라보노이드성분 함량 최적화

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

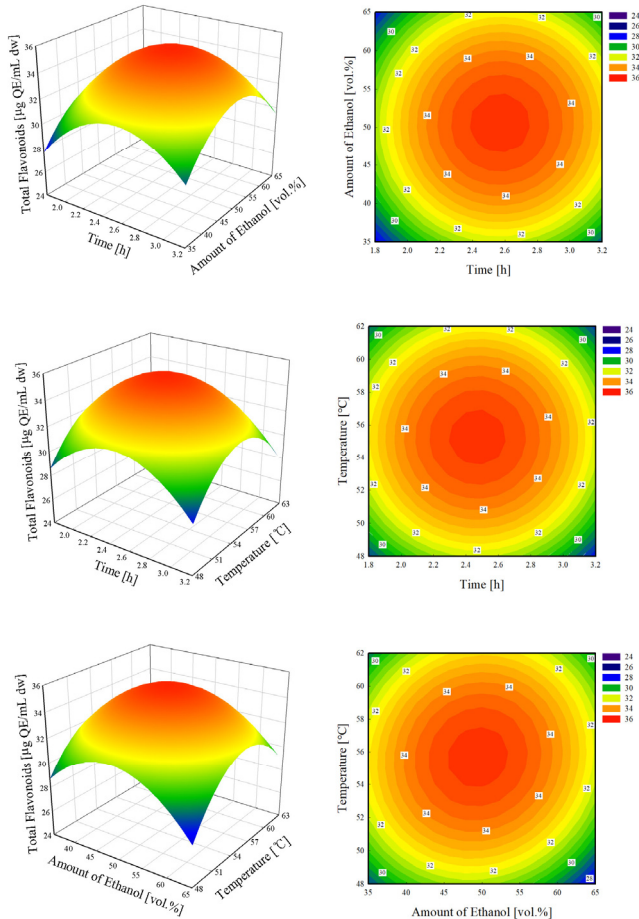


Figure 4. Response surface for total flavonoids of the wheat sprout at constant values as a function of time, ethanol concentration and temperature.

$$F = -241.4 + 35.7x_1 + 1.314x_2 + 7.23x_3 - 7.20x_1^2 - 0.01506x_2^2 - 0.0680x_3^2 + 0.007x_1x_2 + 0.005x_1x_3 + 0.004x_2x_3$$

Figure 4는 회귀방정식을 이용하여 계산된 독립인자에 따른 추출된 유효성분의 플라보노이드성분 함량을 3차원 그래프와 등고선도로 나타낸 그림이다. 일정한 추출온도에서 추출시간과 주정/초순수의 부피비가 증가함에 따라 밀싹으로부터 추출된 유효성분의 플라보노이드 성분 함량은 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 일정한 주정/초순수의 부피비에서 추출시간과 추출온도에 대한 플라보노이드성분 함량의 경향 역시 같은 경향성을 나타내었다. 또한 일정한 추출시간에서 주정/초순수의 부피비와 추출온도에 대한 플라보노이드성분 함량의 경향성도 증가하다 감소하였다. 또한 회귀방정식으로부터 독립변수가 반응치인 플라보노이드성분 함량에 미치는 영향을 수치화하면 추출시간 : 주정/초순수의 부피비 : 추출온도 = 27.17 : 1.0 : 5.50의 비율로 나타났다. 또한 교호효과도인 (추출시간 × 주정/초순수의 부피비) : (추출시간 × 추출온도) : (주정/초순수의 부피비 × 추출온도)의 비율은 1.75 : 1.25 : 1.0로 나타났다. 독립변수에 따른 플라보노이드성분 함량에 대한 주효과도를 확인하기 위해 각 독립변수의 증감에 따른 추출수율의 변화를 Figure 5에 나타내었다. 추출시간과 주정/초순수의 부피비의 경우 최적조건을 기준으로 증가하는 경향을 나타내었

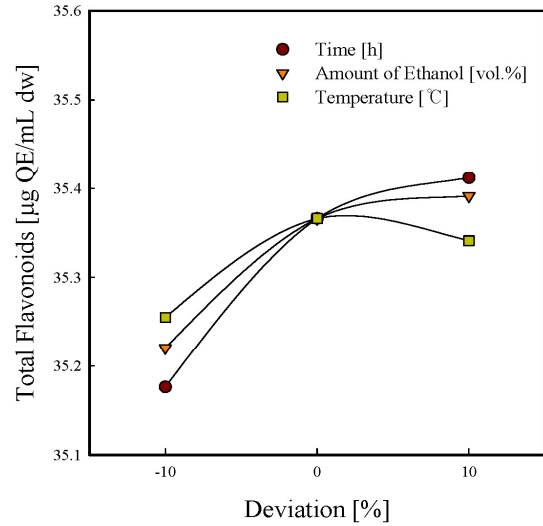


Figure 5. Perturbation plot for the effect of variables on total flavonoids.

으나 최적조건 이후 증가율이 감소하였다. 또한 추출온도의 경우 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 밀 싹으로부터 플라보노이드성분을 추출하는 추출공정의 경우 변화폭이 가장 큰 추출시간이 가장 중요한 독립변수인 것을 알 수 있었다.

### 3.4. 종합만족도 평가

본 실험에서의 유효성분의 추출수율 및 플라보노이드성분 함량을 각각 중심합성계획모형을 통해 최적화를 시킨 결과 추출수율의 경우 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(49.75 vol%), 추출온도(54.41 °C)에서 개별 최댓값(30.14 wt%)을 가지고, 플라보노이드성분 함량의 경우에는 추출시간(2.54 h), 주정/초순수의 부피비(51.78 vol%), 추출 온도(54.88 °C)에서 개별 최댓값(35.68 µg QE/mL dw)을 나타내었다. 두 반응치를 모두 고려할 경우 최적조건은 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(50.00 vol%), 추출온도(54.41 °C)로 산출되며 이때 추출수율은 30.14 wt%, 플라보노이드성분 함량은 35.59 µg QE/mL dw 을 얻을 수 있었다. 이 값들은 더 높은 정확성과 개별적으로 더 큰 값을 갖는 개별분석과의 차이가 매우 작기 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 100%라는 점을 근거로 뒷받침할 수 있다. 따라서 중심합성계획모형의 종합 최적화 예상값의 변수조건인 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(50.00 vol%), 추출온도(54.41 °C)를 바탕으로 실험을 진행해보았을 때, 유효성분 추출수율(29.92 wt%), 플라보노이드성분 함량(35.32 µg QE/mL dw)의 실험값을 얻을 수 있었으며, 이를 예상 이론치와 비교했을 때 오차율은 각각 0.39, 0.74%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.



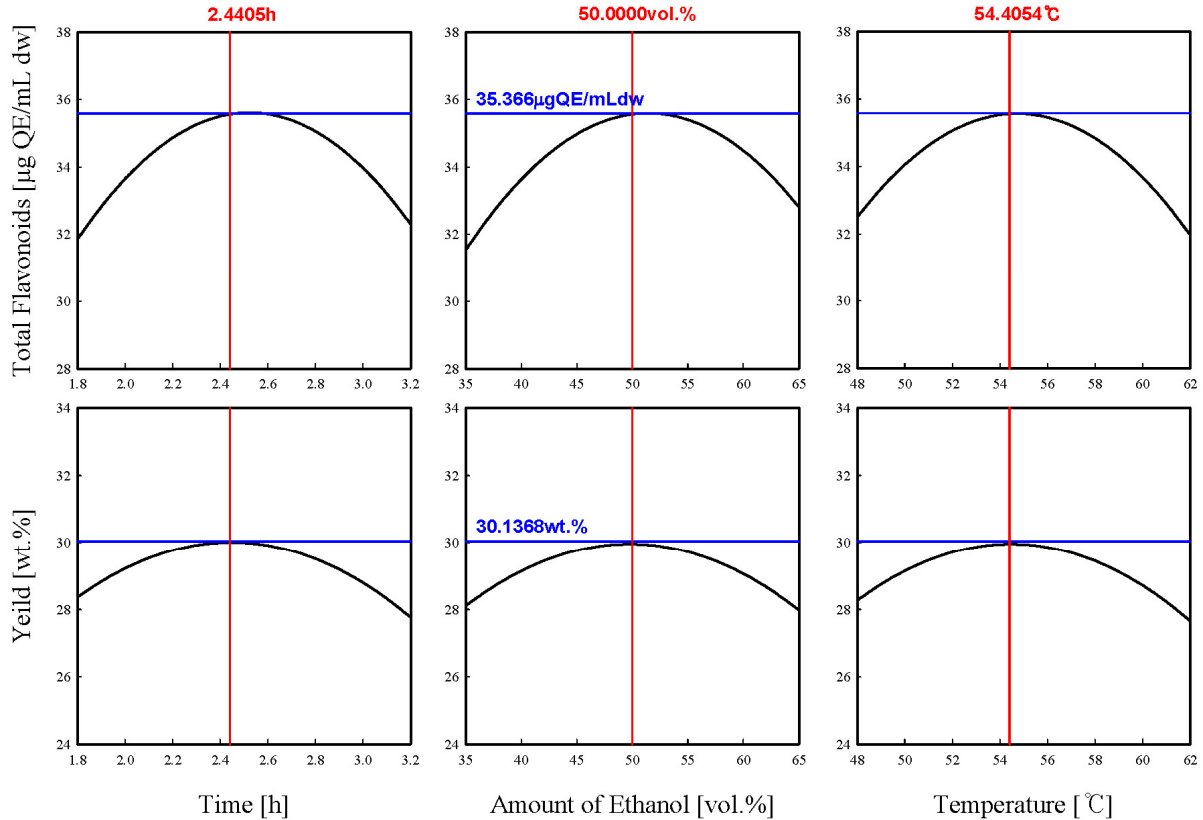


Figure 6. Optimization graph of response surface for yield and total flavonoids of the wheat sprout.

4. 결 론

References

플라보노이드성분 함량이 높은 밀싹을 이용하여 유효성분을 추출하고, 중심합성계획모형을 이용하여 추출공정을 최적화한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 추출수율의 경우 모든 독립변수에 대해 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었으며, 추출시간과 추출온도가 주정/초순수의 부피비에 비해 상대적으로 큰 영향을 미치는 독립변수인 것을 알 수 있었다. 중심합성계획모형으로 최적화과정을 수행한 결과 추출수율의 경우 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(49.75 vol%), 추출온도(54.41 °C)에서 개별 최댓값(30.14 wt%)을 나타내었다.

2. 플라보노이드성분 함량의 경우 추출시간과 주정/초순수의 부피비에 대해 증가하는 경향을 나타내었으나 최적조건 이후 증가율이 감소하였고, 추출온도에 대해서는 최적조건을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 밀싹으로부터 플라보노이드성분을 추출하는 추출공정의 경우 변화폭이 가장 큰 추출시간이 가장 중요한 독립변수인 것을 알 수 있었다. 중심합성계획모형으로 최적화과정을 수행한 결과 추출시간(2.54 h), 주정/초순수의 부피비(51.78 vol%), 추출온도(54.88 °C)에서 개별 최댓값(35.37 µg QE/mL dw)을 나타내었다.

3. 두 반응치를 모두 고려한 결과 추출시간(2.44 h), 주정/초순수의 부피비(50.00 vol%), 추출온도(54.41 °C)에서 추출수율은 30.04 wt%, 플라보노이드성분 함량은 35.59 µg QE/mL dw를 얻을 수 있었으며, 실제 실험결과 추출수율(29.92 wt%), 플라보노이드성분 함량(35.32 µg QE/mL dw)로 오차율은 각각 0.39, 0.74%이었다.

1. A. H. Clifford and S. L. Cuppett, Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1063-1072 (2000).
2. N. C. Cook and S. Samman, Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76 (1996).
3. F. Ferreres, D. Gomes, P. Valentano, R. Goncalves, R. Pio, E. A. Chagas, R. M. Seabra, and P. B. Andrade, Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential, *Food Chem.*, **114**, 1019-1027 (2009).
4. K. Charanjit and H. C. Kapoor, Antioxidants in fruits and vegetables, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **36**, 703-725 (2001).
5. M. R. Park, C. Yoo, Y. N. Chang, and B. Y. Ahn, Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* blume and radical scavenging, *Korean J. Plant Res.*, **25**(4), 379-386 (2012).
6. N. R. Im, H. S. Kim, J. H. Ha, G. Y. Noh, and S. N. Park, Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of dicaffeoylquinic acid derivatives isolated from *Gnaphalium affine* D. DON, *Appl. Chem. Eng.*, **26**(4), 470-476 (2015).
7. 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).
8. 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).
9. A. W. Ebert, C. H. Chang, M. R. Yan, and R. Y. Yang,

- Nutritional composition of mungbean and soybean sprouts compared to their adult growth stage, *Food Chem.*, **237**, 15-22 (2017).
10. E. J. Gu, D. W. Kim, G. J. Jang, S. H. Song, and H. J. Kim, Mass-based metabolomic analysis of soybean sprouts during germination, *Food Chem.*, **217**, 311-319 (2017).
  11. 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).
  12. 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).
  13. 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).
  14. S. Beck and J. Stengel, Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L., *Phytochemistry*, **130**, 201-206 (2016).
  15. R. F. Yang, L. L. Geng, H. Q. Lu, and X. D. Fan, Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina baroni*, *Ultrason. Sonochem.*, **34**, 571-579 (2017).
  16. S. B. Lee, H. S. Jang, and I. K. Hong, Optimization of extraction process for antioxidant from persimmon leaf and thistle using response surface methodology, *Appl. Chem. Eng.*, **28**(4), 442-447 (2017).