

## 环糊精辅助提取黄花菜总黄酮工艺优化及其抗氧化活性研究

郝丹丹<sup>1</sup>, 付复华<sup>1,2</sup>, 苏东林<sup>1,2</sup>, 陈嘉序<sup>1</sup>, 申丹<sup>1</sup>, 彭小雨<sup>3</sup>, 潘丽娜<sup>3</sup>, 李威<sup>3</sup>,  
汪家琦<sup>3</sup>, 肖智雄<sup>4</sup>, 李涛<sup>1,2\*</sup>, 李高阳<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>湖南大学生物学院隆平分院 长沙 410125

<sup>2</sup>湖南省农产品加工研究所 长沙 410125

<sup>3</sup>澳优乳业(中国)有限公司 长沙 410200

<sup>4</sup>湖南新发食品有限公司 湖南衡阳 421600)

**摘要** 以湖南省祁东县黄花菜为原料,超声结合环糊精水溶液辅助提取总黄酮。在单因素实验的基础上,采用响应面设计试验优化提取工艺。在最优条件下,比较添加和不添加环糊精所得提取液的总黄酮得率和抗氧化效果的差异。结果表明,超声辅助环糊精水溶液提取黄花菜中总黄酮的最优工艺为:羟丙基- $\beta$ -环糊精添加量 26 mg/mL,液固比 31:1(mL/g),超声功率 490 W。此条件下提取液中的总黄酮含量为(9.26 $\pm$ 0.07) mg/g,与预测值 9.28 mg/g 相近,说明优化的提取工艺稳定可靠,可操作性及重复性强。与水溶液提取相比,添加环糊精后总黄酮的提取率从 0.791%提至 0.926%,同时体外抗氧化试验(FRAP、ABTS、DPPH)也显示后者具有更优的抗氧化活性。这说明环糊精辅助提取总黄酮是一种有效、易操作、绿色环保的提取技术。

**关键词** 黄花菜;总黄酮;环糊精;工艺优化;抗氧化

**文章编号** 1009-7848(2024)10-0281-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.026

黄花菜(*Hemerocallis citrina* Baroni, *H. citrina*)又名金针菜、忘忧草,属百合科萱草属多年生草本植物,其花可食用,为我国新资源食品,富含黄酮、胡萝卜素、氨基酸和多糖等营养成分。黄花菜鲜甜味美,荤素俱佳,属于典型的高蛋白、低热量、维生素及矿物质含量丰富的蔬菜,与香菇、木耳、冬笋一起被誉为中国干菜中的四大珍品<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是黄花菜中最重要的一类活性成分,具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、抗抑郁<sup>[4]</sup>、促睡眠<sup>[5]</sup>、护肝<sup>[6]</sup>、神经保护作用<sup>[6]</sup>等多种生物活性。黄酮类化合物作为一种安全无毒的天然抗氧化剂,一直是天然药物化学领域的研究热点<sup>[7]</sup>,有很好的应用价值和开发前景。

黄酮类化合物的传统提取方式主要包括化学溶剂提取、水蒸气提取和索式提取等,虽被广泛应用,但存在提取效率低,污染严重或活性成分容易

被破坏等不足。近年来,出现许多新兴提取技术,主要有酶促提取<sup>[8]</sup>、天然低共熔溶剂提取<sup>[9]</sup>、脉冲电场提取<sup>[10]</sup>、微波辅助提取<sup>[11]</sup>等,克服了许多传统提取技术的缺点,在缩短提取时间的同时,还提高了提取率。

环糊精提取<sup>[12]</sup>也是近年来兴起的新提取技术之一,其通过与植物中活性成分的结合作用,将其可以很好地保护起来,免受光和氧化降解,并通过分子包封提供具有控制释放特性的主体、客体超分子复合物,不仅提高了活性成分的水溶性、热稳定性和生物利用度,还达到更好的提取效果<sup>[13-15]</sup>。Favre 等<sup>[16]</sup>以  $\beta$ -环糊精为基础,采用响应面法优化青椒浆果中总多酚的提取工艺,并评估其抗氧化和抗糖基化性能,结果表明环糊精提取技术获得的天然提取物具有更高的抗氧化活性,且在 70 °C 和 80 °C 时能有效减少羟甲基糠醛(糖基化标记物)的形成。Andreja 等<sup>[17]</sup>用传统方法和环糊精辅助方法制备红三叶草地上的部分提取物,比较水提取物和乙醇提取物中总酚含量、类黄酮含量和抗氧化活性,结果表明所有用环糊精制备的样品均显示总酚含量与 DPPH 测定值有很强的相关性,说明环糊精是一种可靠、绿色的提取方式,用

**收稿日期:** 2023-10-25

**基金项目:** 湖南省农业科技创新资金(2022CX133);湖南省创新平台与人才计划项目(2019TP2066)

**第一作者:** 郝丹丹,女,硕士生

**通信作者:** 李高阳 E-mail: lgy7102@163.com

李涛 E-mail: litao209404@163.com

该技术可获得丰富的、具有高抗氧化活性的红三叶草花提取物。Xie 等<sup>[18]</sup>研究了环糊精对桑果花青素回收的影响以及花青素的热稳定性,结果表明 $\beta$ -环糊精提取工艺能显著提高花青素的回收率,且 $\beta$ -环糊精的加入提高了花青素在提取过程中的热稳定性。值得注意的是环糊精辅助提取技术无需去除提取剂<sup>[13,19]</sup>,是一种绿色环保、廉价高效的提取技术。

本文采用响应面法优化超声结合环糊精水溶液辅助提取黄花菜总黄酮的工艺,评价该工艺下总黄酮提取物的抗氧化活性,旨在获得抗氧化活性更强的黄花菜提取物,为食品和制药工业中天然活性物质的绿色高效提取提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

原料:黄花菜(品种:猛子花,产地:湖南省祁东县)。

芦丁标准品(纯度 $\geq 98.0\%$ ),成都德思特生物技术有限公司;无水乙醇(分析纯级),郑州派尼化学试剂厂;甲醇(纯度 $\geq 99.5\%$ ),广东光华科技股份有限公司; $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -Cyclodextrin, $\alpha$ -CD;纯度 $\geq 98.0\%$ ),上海麦克林生化科技股份有限公司; $\beta$ -环糊精( $\beta$ -Cyclodextrin, $\beta$ -CD)、亚硝酸钠(纯度 $\geq 99.0\%$ )、硝酸铝(纯度 $\geq 99.0\%$ )、盐酸(含量 $36.0\% \sim 38.0\%$ )、六水合三氯化铁(纯度 $\geq 99.0\%$ )、硫酸亚铁(纯度 $\geq 99.0\%$ ),国药集团化学试剂有限公司; $\gamma$ -环糊精( $\gamma$ -Cyclodextrin, $\gamma$ -CD;纯度 $97\%$ )、2-羟丙基- $\beta$ -环糊精(2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin,H $\beta$ -CD;纯度 $98\%$ )、甲基环糊精(Methyl- $\beta$ -cyclodextrin,M $\beta$ -CD;纯度 $98\%$ ),上海源叶生物科技有限公司;2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ;纯度 $\geq 98.0\%$ )、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS;纯度 $\geq 98.0\%$ ),上海瑞永生物科技有限公司;过硫酸钾(纯度 $\geq 99.5\%$ ),天津市恒兴化学试剂制造有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH;纯度 $\geq 97.0\%$ ),上海化成工业发展有限公司;醋酸盐缓冲液(pH=3.6),北京雷根根技术有限公司。

### 1.2 设备与仪器

DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精

宏实验设备有限公司;RS-FS1401 型多功能粉碎机,合肥荣事达小家电有限公司;KQ-700DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;TG16-WS 离心机,湖南迈克实验仪器有限公司;BSA124S 型精密分析天平,广州市授科仪器科技有限公司;Synergy H1 多功能酶标仪,美国 BioTek 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 黄花菜总黄酮的提取 将干燥好的黄花菜样品放入多功能粉碎机进行粉碎,过 60 目筛后,准确称取黄花菜粉末 1.00 g 于 50 mL 离心管中并加入适量环糊精粉末、水混匀,置于数控超声波清洗器中,按照试验设计的温度、时间、超声功率、液固比进行提取,将提取液 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。

#### 1.3.2 提取液的总黄酮含量测定

1.3.2.1 芦丁标准曲线的绘制 将 20 mg 芦丁标准品用甲醇溶解,定容于 20 mL 容量瓶中,得到 1 mg/mL 芦丁标准品原液。将芦丁标准品原液稀释成 0,0.01,0.02,0.04,0.06,0.08,0.1,0.25,0.3 mg/mL 溶液后,定容至 10 mL 容量瓶中。按照  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  法<sup>[20]</sup>进行反应,使用多功能酶标仪测定反应液在波长 510 nm 处的吸光度,并以芦丁标准品质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。曲线方程和相关系数如下:

$$Y = 0.6853X - 0.0006, R^2 = 0.9992 \quad (1)$$

式中:Y 为吸光度,abs;X 为质量浓度,mg/mL。

1.3.2.2 测定方法 取 1 mL 提取液,稀释 10 倍后,取 0.5 mL 稀释液按照  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  法进行反应,即在稀释液中加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液混匀,于室温下静置反应 6 min 后,加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.3 mL,混匀后于室温下静置反应 6 min,加入 4%  $\text{NaOH}$  溶液,室温下静置 15 min 后,在波长 510 nm 的酶标仪中测定其吸光度。

移取黄花菜总黄酮稀释液 0.5 mL,按芦丁标准曲线方法步骤操作。根据式(2)计算<sup>[21]</sup>:

$$\text{总黄酮含量}(\text{mg/g}) = \frac{C \times N \times V}{M} \quad (2)$$

式中:C 为测定液中总黄酮含量,mg/mL;N 为稀释倍数;V 为样品体积,mL;M 为原料质量,g。

### 1.3.3 单因素实验

#### 1.3.3.1 环糊精种类对总黄酮提取效果的影响

固定超声功率 350 W, 设定提取温度 40 ℃, 提取时间 30 min, 分别添加 20 mg/mL 的  $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -CD)、 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)、 $\gamma$ -环糊精( $\gamma$ -CD)、羟丙基- $\beta$ -环糊精(H $\beta$ -CD)、甲基- $\beta$ -环糊精(M $\beta$ -CD) 溶液 10 mL。平行提取 3 组, 比较相同条件下, 不同种类的环糊精溶液对黄花菜的总黄酮含量的影响。

#### 1.3.3.2 提取温度对总黄酮提取效果的影响

固定超声功率 350 W, 添加 20 mg/mL 的 H $\beta$ -CD 溶液 15 mL, 提取时间 30 min, 设定提取温度分别为 20, 30, 40, 50, 60 ℃。平行提取 3 组, 比较相同条件下, 不同提取温度对黄花菜总黄酮含量的影响。

#### 1.3.3.3 H $\beta$ -CD 添加量对总黄酮提取效果的影响

固定超声功率 350 W, 提取温度 40 ℃, 提取时间 30 min, 分别添加 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/mL 的 H $\beta$ -CD 溶液 15 mL。平行提取 3 组, 比较相同条件下, 不同 H $\beta$ -CD 添加量对黄花菜总黄酮含量的影响。

#### 1.3.3.4 超声时间对总黄酮提取效果的影响

固定超声功率 350 W, 提取温度 40 ℃, 添加 25 mg/mL 的 H $\beta$ -CD 溶液 15 mL, 提取时间分别为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 min。平行提取 3 组, 比较相同条件下, 不同超声时间对黄花菜总黄酮含量的影响。

#### 1.3.3.5 液固比对总黄酮提取效果的影响

固定超声功率 350 W, 提取温度 40 ℃, 提取时间 40 min, 添加 25 mg/mL 的 H $\beta$ -CD 溶液 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mL。平行提取 3 组, 比较相同条件下, 不同液固比对黄花菜总黄酮含量的影响。

#### 1.3.3.6 超声功率对总黄酮提取效果的影响

设定提取温度 40 ℃, 添加 25 mg/mL 的 H $\beta$ -CD 溶液 30 mL, 超声功率分别为 280, 350, 420, 490, 520, 630, 700 W 条件下提取 40 min。平行提取 3 组, 比较相同条件下, 不同超声功率对黄花菜总黄酮含量的影响。

### 1.3.4 响应面设计

在上述单因素实验基础上, 选择 H $\beta$ -CD 添加量、液固比、超声功率为自变量, 以提取液中总黄酮含量为响应依据, 根据 Box-Behnken 设计原理, 采用 3 因素 3 水平响应

面分析法设计试验, 优化超声提取黄花菜总黄酮工艺, 因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析的因素与水平

Table 1 Factor and levels used in response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1$ H $\beta$ -CD 添加量/(mg/mL)	15	25	35
$X_2$ 液固比/(mL/g)	20	30	40
$X_3$ 超声功率/W	280	490	700

### 1.3.5 黄花菜总黄酮的抗氧化活性测定

#### 1.3.5.1 总还原能力测定

总还原能力测定是根据 Chen 等<sup>[22]</sup>的方法并进行适当修改。为使组内形成对比, 试验对象是在最优条件下得到的添加 H $\beta$ -CD 的黄花菜总黄酮提取液和水溶液提取液样品。将 40 mmol/L 的盐酸溶液配制成浓度为 10 mmol/L 的 TPTZ 溶液, 取 2.5 mL 上述溶液, 加入 2.5 mL 20 mmol/L 的 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶液和 25 mL 300 mmol/L, pH 3.6 的醋酸盐缓冲液混合, 制备得到新鲜的 FRAP 溶液。取样品溶液 1 mL, 加入 5 mL 的 FRAP 溶液, 在 37 ℃下放置 20 min, 于波长 593 nm 处测定吸光度。采用 FeSO<sub>4</sub> 标准溶液进行标准曲线的绘制, 以试验结果样品中含有的 Fe(II) 表示。

#### 1.3.5.2 ABTS 自由基清除能力测定

ABTS 自由基清除能力测定是根据 Xiao 等<sup>[23]</sup>的方法并进行适当修改。试验对象是在最优条件下得到的黄花菜总黄酮提取液样品。配制含有 7 mmol/L ABTS 溶液的 2.45 mmol/L 过硫酸钾的 ABTS 自由基溶液, 使用前在黑暗室温环境中放置 12~16 h, 用乙醇稀释 ABTS 自由基溶液, 使其在波长 734 nm 处的吸光度为 0.70±0.02。取 0.2 mL 黄花菜提取物稀释液与 0.8 mL ABTS 自由基乙醇溶液混匀, 在室温下反应 6 min, 于波长 734 nm 处测定吸光度。为使组内形成明显对比, 在相同条件下, 测定添加和不添加 H $\beta$ -CD 的水溶液提取液的 ABTS 自由基清除能力。计算公式如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_1$  和  $A_2$  分别为稀释的提取溶液加入

ABTS 溶液和乙醇溶液在波长 734 nm 处的吸光度; $A_0$  为没有加样品溶液的 ABTS 溶液在波长 734 nm 处的吸光度。

1.3.5.3 DPPH 自由基清除能力测定 DPPH 自由基清除能力测定是根据 Xiao 等<sup>[24]</sup>的方法并进行适当修改。试验对象是在最优条件下得到的黄花菜总黄酮提取液样品。取 0.5 mL 提取物样品,加入 0.5 mL 0.4 mmol/L DPPH 甲醇溶液,振荡摇匀,在室温下放置 30 min 后,于波长 517 nm 处测定吸光度。为使组内形成明显对比,在相同条件下测定添加环糊精与不添加  $H\beta$ -CD 的水溶液提取液的 DPPH 自由基清除能力。计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (4)$$

式中: $A_1$  和  $A_2$  分别为稀释的提取溶液加入 DPPH 溶液和乙醇溶液在波长 517 nm 处的吸光度; $A_0$  为没有加样品溶液的 DPPH 溶液在波长 517 nm 处的吸光度。

#### 1.4 数据处理与分析

所有试验设置 3 组平行,使用 Excel 2016 软件对试验数据进行初步整理,Design Expert 8.0.6 设计并分析响应面试验,用 Origin 2019b 绘图,图中以标准误差作为误差棒。采用 IBM SPSS Statistics 26 软件对试验数据进行统计分析, $P < 0.05$  时表示为差异显著, $P < 0.01$  时表示为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 环糊精种类对总黄酮提取效果的影响 如图 1 所示,0 表示用水作为空白溶剂提取黄花菜中的总黄酮,相同条件下加入不同种类的环糊精与之形成对照。由图 1 可以看出,与水溶剂相比,加入不同种类的环糊精均提高了黄花菜提取物的总黄酮含量,环糊精种类为  $H\beta$ -CD 时所得提取液的总黄酮含量最高。环糊精辅助提取效果主要是由于其对提取物中天然成分的包合能力<sup>[25]</sup>。包合物的形成是 2 个关键因素的函数:客体分子相对于宿主环糊精空腔尺寸的相对大小和几何形状,以及系统不同组分(环糊精、客体 and 溶剂)之间的热力学相互作用<sup>[26]</sup>。这说明环糊精类型是影响提

取效果的关键因素之一,因为它对样品中的类黄酮具有选择性<sup>[2]</sup>。 $H\beta$ -CD 组的总黄酮含量最高,可能是因为  $H\beta$ -CD 在水中有较好的溶解性,且形成的溶剂体系与提取液中黄酮类化合物的相互作用更强,能将更多的黄酮类化合物包合起来,从而使提取液中总黄酮含量提高。因此环糊精种类选择  $H\beta$ -CD 开展后续研究。

2.1.2 提取温度对总黄酮提取效果的影响 如图 2 所示,当提取温度在 20~60 °C 范围内时,提取液中总黄酮含量呈先上升后下降的趋势,在 40 °C 获得最大总黄酮含量。这是因为温度的升高可以增强提取液体系中热力学相互作用,使提取液中总黄酮含量升高。而提取温度过高会破坏体系中的黄酮类化合物与环糊精的结合作用,因此提取温度不宜过高。天然产物的提取应在合适的温度下进行,故最佳提取温度选择 40 °C。

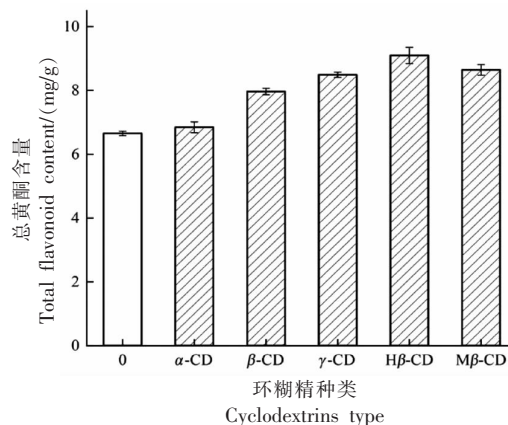


图 1 环糊精种类对总黄酮提取效果的影响

Fig.1 Effect of cyclodextrins type on the yield of total flavonoids

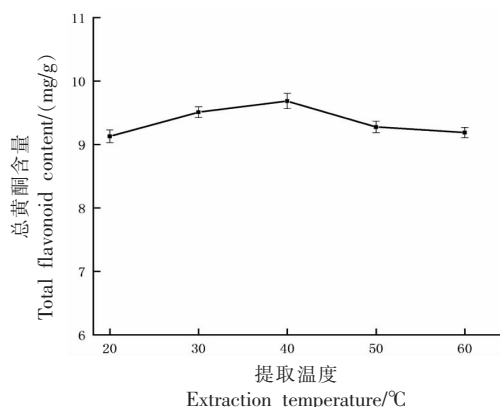


图 2 提取温度对总黄酮提取效果的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the yield of total flavonoids

### 2.1.3 H $\beta$ -CD 添加量对总黄酮提取效果的影响

由图3可以看出,在水溶液中 H $\beta$ -CD 添加量范围为 0~30 mg/mL 时,黄花菜提取液中总黄酮含量呈先上升后下降的趋势,并在添加量为 25 mg/mL 时,总黄酮含量最高。这是因为在一般情况下,当提取介质中环糊精浓度越高时,从样品中提取的效率越高。而当环糊精与提取液中的化合物结合程度达到饱和时,由于黄酮类化合物的溶解性,额外增加环糊精含量不会导致提取液中总黄酮含量升高<sup>[27]</sup>。为使提取效果显著,选择 15, 25, 35 mg/mL 为响应面设计环糊精添加量因素的 3 个水平。

2.1.4 超声时间对总黄酮提取效果的影响 考察了超声时间在 10~70 min 黄花菜提取液中总黄酮含量,结果如图4所示。在该范围内,提取量虽略有上升,但差异并不显著,可能是当提取过程非常接近固液平衡时,扩散速度降低。当提取时间为

40 min 时,提取物中总黄酮含量最高。值得注意的是,在 50~70 min 提取时间区间,总黄酮含量出现了缓慢上升的趋势,这是因为超声波产生空化气泡,能够造成组织损伤和细胞破坏,从而有利于目标化合物从基质中释放<sup>[28]</sup>,然而随着超声时间的延长,结合的化合物又被空化作用打破。考虑到能耗和提取效果综合因素,选择提取时间为 40 min。

2.1.5 液固比对总黄酮提取效果的影响 由图5可以看出,在液固比为 10:1~40:1 的范围内,提取液的总黄酮含量先上升后下降,且在液固比为 30:1 时,总黄酮含量最大。这是因为液固比的增大可以增大溶剂与提取物的接触面积,而溶剂用量过大时,多余的提取剂将提取液稀释,传质速率减小<sup>[29]</sup>,溶剂与物质分子之间的相互作用减弱。为使提取效果显著,选择 20:1, 30:1, 40:1 为响应面设计液固比因素的 3 个响应水平。

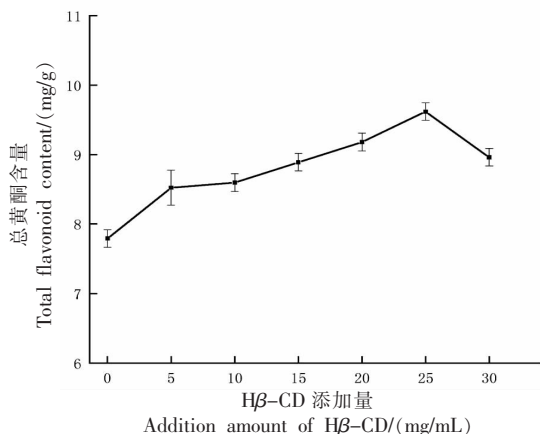


图3 H $\beta$  的添加量对总黄酮提取效果的影响  
Fig.3 Effect of addition amount of H $\beta$ -CD on the yield of total flavonoids

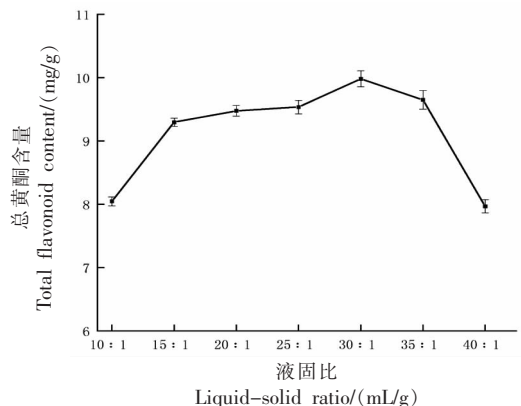


图5 液固比对总黄酮提取效果的影响  
Fig.5 The effect of liquid-solid ratio on the extraction rate of total flavonoids

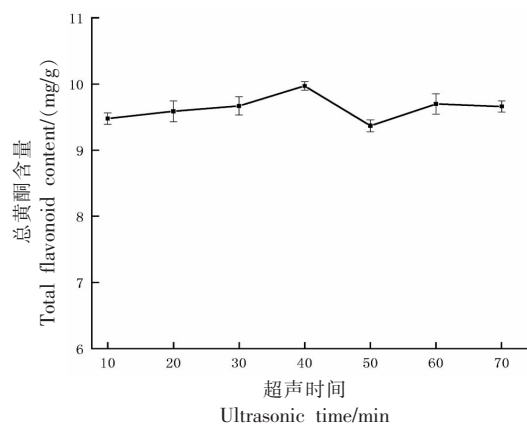


图4 提取时间对总黄酮提取效果的影响  
Fig.4 Effect of extraction time on the yield of total flavonoids

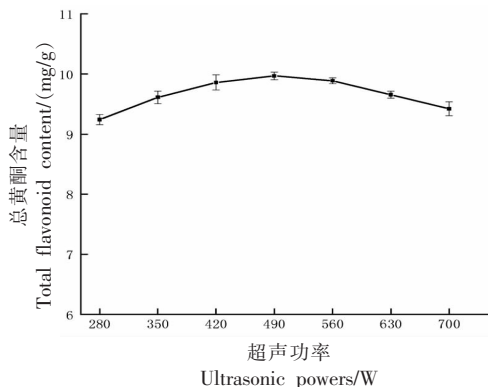


图6 超声功率对总黄酮提取效果的影响  
Fig.6 The effect of ultrasonic powers on the extraction rate of total flavonoids

2.1.6 超声功率对总黄酮提取效果的影响 由图6可知,在超声功率为280~700 W区间时,提取液的总黄酮含量先上升后下降,且在超声功率为490 W时有最大总黄酮含量。超声功率的改变可引起空化效应变化,功率过低时,提取不够充分;而功率过高时,会导致空化效应过于剧烈,破坏化学键,引起类黄酮结构的变化,导致其得率降低。为使提取效果显著,选择280,490,700 W为响应面设计超声功率因素的3个响应水平。

## 2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验设计与结果及方差分析 响应面试验结果如表2所示。运用Design Expert 8.0.6软件进行二次多元回归拟合,得到二次多元回归方程:

$$Y = 4.56524 + 1.22000X_1 + 0.18933X_2 + 5.07937 \times$$

$$10^{-4}X_3 - 6.00000 \times 10^{-3}X_1X_2 - 3.57143 \times 10^{-5}X_1X_3 + 1.66667 \times 10^{-5}X_2X_3 - 0.19375X_1^2 - 2.86250 \times 10^{-3}X_2^2 - 9.92063 \times 10^{-7}X_3^2$$

由表3可知,此模型的P值为0.0001,响应面回归模型十分显著,失拟项( $P=0.8122>0.05$ )不显著,说明非试验因素对试验结果的影响不大。模型确定系数 $R^2=0.9957$ , $R_{\text{pred}}^2=0.9812$ ,校正确定系数 $R_{\text{adj}}^2=0.9901$ 与 $R^2$ 接近,说明模型有充分的准确性和通用性,变异系数 $CV=0.23$ ,说明该模型稳定、可靠。因此该模型方程在试验范围内,能够适用于预测超声波结合环糊精辅助提取黄花菜总黄酮含量的分析预测。

从表3还可以看出,因素A,B,AB,BC, $A^2$ , $B^2$ , $C^2$ 的P值小于0.05表示其对响应值的影响显著;因素C,AC的P值大于0.05,影响不显著。

表2 Box-Behnken 试验结果

Table 2 The results of Box-Behnken experiment

试验 编号	$X_1$ H $\beta$ -CD 添 加量/(mg/mL)	$X_2$ 液固比/ (mL/g)	$X_3$ 超声功 率/W	Y 总黄酮 含量/(mg/g)	试验 编号	$X_1$ H $\beta$ -CD 添 加量/(mg/mL)	$X_2$ 液固比/ (mL/g)	$X_3$ 超声功 率/W	Y 总黄酮 含量/(mg/g)
1	15	20	490	8.56	10	25	40	280	9.02
2	35	20	490	8.79	11	25	20	700	8.79
3	15	40	490	8.91	12	25	40	700	9.06
4	35	40	490	8.9	13	25	30	490	9.25
5	15	30	280	8.98	14	25	30	490	9.27
6	35	30	280	9.1	15	25	30	490	9.27
7	15	30	700	8.98	16	25	30	490	9.31
8	35	30	700	9.07	17	25	30	490	9.25
9	25	20	280	8.89					

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
	0.69	9	0.076	179.40	< 0.0001	显著
A (H $\beta$ -CD 添加量)	0.023	1	0.023	54.38	0.0002	
B (液固比)	0.092	1	0.092	217.53	< 0.0001	
C (超声功率)	$1.012 \times 10^{-3}$	1	$1.012 \times 10^{-3}$	2.38	0.1666	
AB	0.014	1	0.014	33.88	0.0006	
AC	$2.250 \times 10^{-4}$	1	$2.250 \times 10^{-4}$	0.53	0.4905	
BC	$4.900 \times 10^{-3}$	1	$4.900 \times 10^{-3}$	11.53	0.0115	
$A^2$	0.16	1	0.16	371.90	< 0.0001	
$B^2$	0.35	1	0.35	811.78	< 0.0001	
$C^2$	$8.059 \times 10^{-3}$	1	$8.059 \times 10^{-3}$	18.96	0.0033	
残差	$2.975 \times 10^{-3}$	7	$4.250 \times 10^{-4}$			
失拟项	$5.750 \times 10^{-4}$	3	$1.917 \times 10^{-4}$	0.32	0.8122	不显著
绝对误差	$2.400 \times 10^{-3}$	4	$6.000 \times 10^{-4}$			

注:  $P < 0.01$ , 差异极显著;  $P < 0.05$ , 差异显著。

2.2.2 响应面分析 图 7 能反映在试验范围内两因素的交互作用,同时第 3 个因素固定在 0 水平。由图 7 可知,响应面 3D 图均开口向下,且有最高点,说明响应值随各个因素值的升高而增大,达到最大值后减小,H $\beta$ -CD 添加量和液固比的交互作用是最显著的。当超声功率保持在 0 水平时,其相互关系如图 7a 所示,这说明 H $\beta$ -CD 添加量和液固比两因素之间相互影响,证明两者之间存在明显的二次关系。如图 7b 所示,当液固比保持在 0 水平时,超声功率对提取的总黄酮含量影响有显著的二次关系,表明在水溶液中 H $\beta$ -CD 添加量较低时,总黄酮含量出现先增大后减小的现象。图 7c 的结果表明,当 H $\beta$ -CD 添加量保持在 0 水平时,液固比与超声功率之间相互影响,两因素之间存在明显的二次关系,当超声功率一定时,黄花菜中提取的总黄酮含量随液固比的变化呈先增大后减小的趋势。

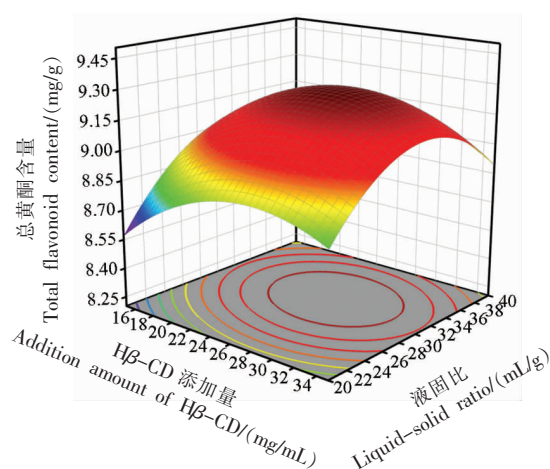
### 2.3 最优提取条件验证试验

通过模型预测超声辅助环糊精水溶液提取黄花菜总黄酮含量,最优工艺条件为:H $\beta$ -CD 添加量 26.1 mg/mL,液固比 31.71 mL/g,超声功率 475.52 W,总黄酮含量的预测值为 9.28 mg/g。考虑到实际情况对上述条件进行修正,最终的优化条件为 H $\beta$ -CD 添加量 26 mg/mL,液固比 31:1 (mL/g),超声功率 490 W,在此条件下进行 3 次平行试验,结果总黄酮含量为(9.26 $\pm$ 0.07) mg/g,这与响应面预测值 9.28 mg/g 的相对误差为 0.014,说明优化后的提取工艺稳定、可靠,用该模型对 H $\beta$ -CD 水溶液提取黄花菜总黄酮的提取工艺进行优化具有实际可操作性及重复性。

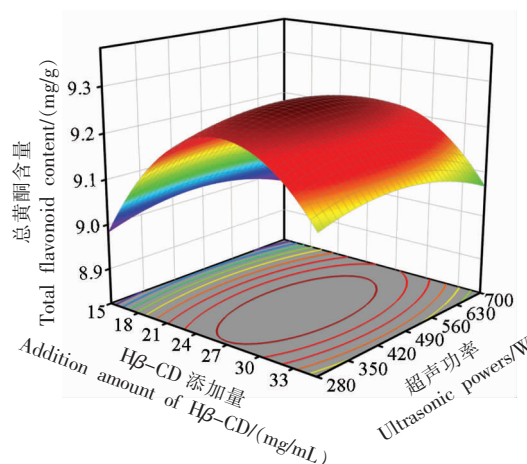
此外,在最优提取条件下测定了不添加环糊精,即水作为提取溶剂时黄花菜提取液中总黄酮含量为(7.91 $\pm$ 0.04)mg/g,使用提取率计算公式<sup>[30]</sup>比较发现添加 H $\beta$ -CD 后黄花菜总黄酮提取率从 0.791%提高至 0.926%。因此,环糊精辅助提取技术是一种绿色、简便的提取技术,能有效提高黄花菜提取物中总黄酮含量。

### 2.4 黄花菜总黄酮的抗氧化活性测定

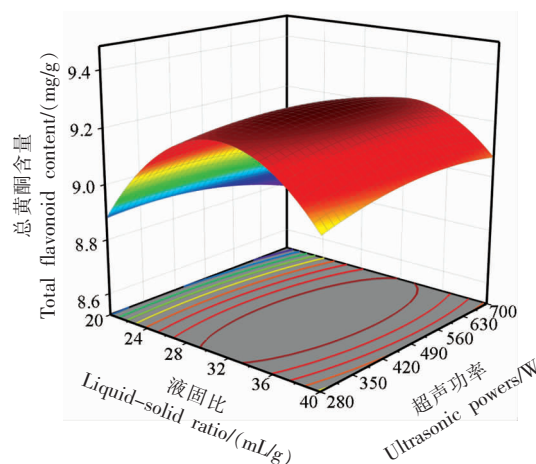
表 4 列出了相同条件下的黄花菜水提取物与 H $\beta$ -CD 溶液提取物的抗氧化活性比较结果。



(a)H $\beta$ -CD 添加量与液固比



(b)H $\beta$ -CD 添加量与超声功率



(c)液固比与超声功率

图 7 各因素交互作用的响应面结果图

Fig.7 Plots of response surface results for different factor interactions

表4 黄花菜水提物和H $\beta$ -CD提取物抗氧化活性比较Table 4 Comparison of antioxidant activity between water extract and H $\beta$  cyclodextrin extract of *H. citrina*

组别	FRAP/(mmol/L FeSO <sub>4</sub> )	ABTS <sup>+</sup> ·/%	DPPH/%
水溶液	0.124 ± 0.005 <sup>a</sup>	62.87 ± 0.99 <sup>a</sup>	52.16 ± 0.47 <sup>a</sup>
H $\beta$ -CD 水溶液	0.177 ± 0.012 <sup>b</sup>	70.90 ± 0.32 <sup>b</sup>	53.31 ± 0.52 <sup>b</sup>

注:同列不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

2.4.1 总还原能力 FRAP 分析法用于抗氧化剂和植物提取物的总抗氧化活性的常规分析,反映了抗氧化剂的还原能力大小<sup>[31]</sup>。用酶标仪读取各孔吸光度,以标准品浓度为纵坐标,吸光度为横坐标绘制标准曲线。得到线性方程为  $Y = 0.1258X + 0.0028$ , 相关系数  $R^2 = 0.9985$ 。以水溶液为对照组,将3次平行提取试验的测定结果代入方程,得到水溶液与H $\beta$ -CD水溶液提取液的抗氧化能力结果,如表4所示,即提取液抗氧化能力分别与0.124,0.177 mmol/L的FeSO<sub>4</sub>抗氧化能力相当。另外,SPSS分析结果显示  $P < 0.01$ ,说明差异极显著。

2.4.2 ABTS 自由基清除能力 以水溶液为对照组,在相同稀释倍数情况下测定其ABTS自由基清除能力。用酶标仪读取各孔吸光度值,得到黄花菜水提液与H $\beta$ -CD溶液提取液的ABTS自由基清除能力,如表4所示,即提取液的ABTS自由基清除能力分别为62.87%,70.90%。SPSS分析结果显示  $P = 0.047 < 0.05$ ,说明差异显著。

2.4.3 DPPH 自由基清除能力 以水溶液为对照组,在相同稀释倍数情况下测定其DPPH自由基清除能力。用酶标仪读取各孔吸光度值,得到水溶液与H $\beta$ -CD水溶液提取液的DPPH自由基清除能力分别为52.16%和53.31%。SPSS分析结果显示  $P < 0.01$ ,说明差异极显著。

综上所述,使用H $\beta$ -环糊精溶液能够显著提高黄花菜总黄酮提取物的体外抗氧化能力(FRAP、DPPH、ABTS),这可能与环糊精对溶质的包合作用有关<sup>[15]</sup>。

### 3 结论与讨论

本试验采用超声结合环糊精水溶液辅助提取黄花菜中的总黄酮,Box-Behnken设计方法对提取工艺进行优化,得到最佳提取条件为:H $\beta$ -CD添加量26 mg/mL,液固比31:1(mL/g),超声功率490 W。验证试验结果表明,采用该模型优化后的

黄花菜总黄酮提取工艺具有实际可操作性及重复性。在黄花菜提取物的体外抗氧化能力试验中,H $\beta$ -CD水溶液提取的总黄酮相比水溶液表现出更好的抗氧化效果,表明提取时加入适量的H $\beta$ -CD可以提高提取物的抗氧化能力。

在食品工业中,环糊精可用于保护食品敏感成分免受化学和物理因素的影响。在近20年里,环糊精的使用显著增加,以改善和保存食品补充剂中不稳定的生物活性成分<sup>[32-33]</sup>。植物材料中的氨基酸、蛋白质、脂类、挥发油、矿物质等也可以与环糊精形成包合物、配合物<sup>[25]</sup>,从而保护这些化合物免受光和氧化降解,并通过分子包封提供具有控制释放特性的主体客体超分子复合物,提高其水溶性和生物利用度<sup>[34]</sup>。因此环糊精辅助提取可作为一种绿色提取技术广泛应用于植物中天然成分提取及后续功能研究。

### 参 考 文 献

- [1] 杜秉健. 黄花菜水醇提取物的抗抑郁和促睡眠活性及综合利用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.  
DU B J. Antidepressant and hypnotic activities of hydroalcoholic extracts of *Hemerocallis citrina* and comprehensive utilization[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [2] WANG W, ZHANG X L, LIU Q L, et al. Study on extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Hemerocallis fulva* (daylily) leaves[J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2916.
- [3] SHEN W, HU X L, LI S Y, et al. Pyranochromones with anti-inflammatory activities in arthritis from *Calophyllum membranaceum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2022, 85(5): 1374-1387.
- [4] MA T C, SUN Y, WANG L D, et al. An investigation of the anti-depressive properties of phenylpropanoids and flavonoids in *Hemerocallis citrina* Baroni[J]. *Molecules*, 2022, 27(18): 5809.



- [5] 赵凯丽, 王秋亚, 王慧, 等. 黄花菜总黄酮的提取、测定方法和生物活性研究进展[J]. 山东化工, 2022, 51(11): 110–112.
- ZHAO K L, WANG Q Y, WANG H, et al. Progress on extraction, determination methods and biological activities of total flavonoids from *Hemerocallis fulva*[J]. Shandong Chemical Industry, 2022, 51(11): 110–112.
- [6] TIAN H, YANG F F, LIU C Y, et al. Effects of phenolic constituents of daylily flowers on corticosterone- and glutamate-treated PC12 cells[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 69–81.
- [7] LARIT F, LEÓN F, BENYAHIA S, et al. Total phenolic and flavonoid content and biological activities of extracts and isolated compounds of *Cytisus villosus* Pourr[J]. Biomolecules, 2019, 9(11): 732–748.
- [8] ZHANG M Y, MA W C, WANG C, et al. Optimization of enzyme-assisted extraction and purification of flavonoids from *Pinus koraiensis* nut-coated film and antioxidant activity evaluation[J]. Molecules, 2021, 26(7): 1950–1968.
- [9] ZUO J L, GENG S Q, KONG Y Z, et al. Current progress in natural deep eutectic solvents for the extraction of active components from plants[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2021, 53(1): 1–22.
- [10] YAN L G, HE L, XI J. High intensity pulsed electric field as an innovative technique for extraction of bioactive compounds—a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(13): 2877–2888.
- [11] HU Y, YAN H, YIN Y X, et al. Effect of microwave-assisted hydrothermal extraction on the bioactive compounds and antioxidant activities of dateplum persimmon juice and vinegar[J]. LWT – Food Science and Technology, 2022, 154: 112642–112652.
- [12] CAI R, YUAN Y H, CUI L, et al. Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds: Current research and future prospects[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 79: 19–27.
- [13] CRISTINA M, PATIÑO C V, PLINIO C, et al. Encapsulation of plant extract compounds using cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, electrospinning and their combinations for food purposes[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 108: 177–186.
- [14] FAVRE C L, SANTOS D C, LÓPEZ-FERNÁNDEZ P M, et al. Optimization of  $\beta$ -cyclodextrin-based extraction of antioxidant and anti-browning activities from thyme leaves by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2018, 265: 86–95.
- [15] ALBAHARI P, JUG M, RADIĆ K, et al. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction[J]. LWT – Food Science and Technology, 2018, 92: 22–31.
- [16] FAVRE C L, ROLANDELLI G, MSHICILELI N, et al. Antioxidant and anti-glycation potential of green pepper (*Piper nigrum*): Optimization of  $\beta$ -cyclodextrin-based extraction by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2020, 316: 126280–126291.
- [17] ANDREJA J K, LIUDAS I, MINDAUGAS M, et al. The effect of traditional and cyclodextrin-assisted extraction methods on *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts antioxidant potential[J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 435–456.
- [18] XIE J H, XU Y, SHISHIR M R, et al. Green extraction of mulberry anthocyanin with improved stability using  $\beta$ -cyclodextrin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(5): 2494–2503.
- [19] PICOT-ALLAIN C, MAHOMOODALLY M F, AK G, et al. Conventional versus green extraction techniques – a comparative perspective[J]. Current Opinion in Food Science, 2021, 40: 144–156.
- [20] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaOH}$  比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002(2): 97–99.
- GUO Y J, FAN L, WANG X Q, et al. Discussion about  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaOH}$  colorimetry for determination of total flavonoids[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2002(2): 97–99.
- [21] 萨茹丽, 木其尔, 王翠芳, 等. 沙葱总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化、抗菌作用[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 1–8.
- SA R L, MU Q E, WANG C F, et al. Total flavonoids from *Allium mongolicum* Regel: Optimization of extraction process and antioxidant and antibacterial effects *in vitro*[J]. Food Science, 2014, 35(24): 1–8.

- [22] CHEN Y L, WANG Y L, CHEN J X, et al. Bio-processing of soybeans (*Glycine max* L.) by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* YL-1 improves total phenolic content, isoflavone aglycones, and antioxidant activity[J]. RSC Advances, 2020, 10(29): 16928–16941.
- [23] XIAO Y, RUI X, XING G L, et al. Solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 enhanced antioxidant capacity and DNA damage protective effect of oats (*Avena sativa* L.)[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 58–73.
- [24] XIAO Y, WU X, YAO X S, et al. Metabolite profiling, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of buckwheat processed by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* YL-1[J]. Food Research International, 2021, 143: 110262–110274.
- [25] HĀDĀRUGĂ G N, BANDUR N G, DAVID I, et al. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes[J]. Environmental Chemistry Letters, 2019, 17: 349–373.
- [26] VALLE D E. Cyclodextrins and their uses: A review[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1033–1046.
- [27] BARBARA F, ZOVKO M K, MARIO J. Therapeutic potential of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-based extract of *Medicago sativa* in the treatment of mucopolysaccharidoses[J]. Planta Medica, 2017, 83(1/2): 40–50.
- [28] MEDINA-TORRES N, AYORA-TALAVERA T, ESPINOSA-ANDREWS H, et al. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources[J]. Agronomy, 2017, 7(3): 47–66.
- [29] 张浪, 刘亮亮, 黄思齐, 等. 菜用黄麻叶中总多酚提取及抗氧化活性研究[J]. 中国麻业科学, 2020, 42(3): 113–122.
- ZHANG L, LIU L L, HUANG S Q, et al. Study on extraction and antioxidant activity of total polyphenols in vegetable jute leaves[J]. Plant Fiber Sciences in China, 2020, 42(3): 113–122.
- [30] 习丹, 陈明, 吴文明, 等. 变叶榕根总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2023, 44(1): 53–58.
- XI D, CHEN M, WU W M, et al. Response surface optimization of ultrasound-microwave-assisted extraction of total flavonoids and the antioxidant activity of *Ficus variolosa*[J]. The Food Industry, 2023, 44(1): 53–58.
- [31] CHEN R Z, JIN C G, TONG Z G, et al. Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 187–197.
- [32] ANTONIO C, JARUPORN R, CARLOS J M, et al. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications[J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132467–132479.
- [33] LIU Y, CHEN Y N, GAO X L, et al. Application of cyclodextrin in food industry[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(10): 2627–2640.
- [34] LIMA S B, SHANMUGAM S, QUINTANS S S J, et al. Inclusion complex with cyclodextrins enhances the bioavailability of flavonoid compounds: A systematic review[J]. Phytochemistry Reviews, 2019, 18: 1337–1359.

### Optimization of Cyclodextrin-Assisted Extraction Process of Total Flavonoids from *Hemerocallis fulva* and Study on Its Antioxidant Activity

Hao Dandan<sup>1</sup>, Fu Fuhua<sup>1,2</sup>, Su Donglin<sup>1,2</sup>, Chen Jiayu<sup>1</sup>, Shen Dan<sup>1</sup>, Peng Xiaoyu<sup>3</sup>, Pan Lina<sup>3</sup>,

Li Wei<sup>3</sup>, Wang Jiaqi<sup>3</sup>, Xiao Zhixiong<sup>4</sup>, Li Tao<sup>1,2\*</sup>, Li Gaoyang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Longping Branch, College of Biology, Hunan University, Changsha 410125

<sup>2</sup>Hunan Agricultural Product Processing Institute, Changsha 410125

<sup>3</sup>Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd., Changsha 410200

<sup>4</sup>Hunan Xinfu Food Co., Ltd., Hengyang 421600, Hunan)

**Keywords** Total flavonoids were extracted from *Hemerocallis citrina* Baroni (*H. citrina*) in Qidong County of Hunan

Province by ultrasonic and cyclodextrin aqueous solution. On the basis of single factor experiment, response surface design method was used to optimize the extraction process. The total yield of flavonoids and the antioxidant effect of the extracts with and without cyclodextrin were compared under optimal conditions. The results indicate that the optimal process for the extraction of total flavonoids from *H. citrina* with ultrasound-assisted cyclodextrin in aqueous solution is: the amount of cyclodextrin added was 26 mg/mL, the liquid-solid ratio was 31:1 (mL/g) and the ultrasonic power was 490 W. The total flavonoid content of the extraction under these conditions was (9.26±0.07) mg/g, which was similar to the predicted value (9.28 mg/g), showed that the optimized extraction process was stable, reliable, practicable and repeatable. Compared with extracted by water, the extraction rate of total flavonoids increased from 0.791% to 0.926% after cyclodextrin was added. Meanwhile, the *in vitro* antioxidant tests (FRAP, ABTS, DPPH) of the latter showed superior *in vitro* antioxidant activity. Therefore, the cyclodextrin-assisted extraction of total flavonoids is an effective extraction technology that is easy to operate and environmentally friendly.

**Keywords** *Hemerocallis citrina* Baroni; total flavonoids; cyclodextrin; process optimization; antioxidant