

复合酶辅助超声提取西藏芜菁总黄酮工艺优化及抗氧化活性分析

张丽静¹, 付 勋¹, 张文会², 陈 锋², 扎 罗², 范 蓓¹, 李淑英¹, 卢 聪¹, 王凤忠^{1,*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193;

2. 西藏自治区农牧科学院农产品开发与食品科学研究所, 西藏拉萨 850000)

摘要:以西藏芜菁为原料, 研究复合酶辅助超声法提取芜菁中总黄酮的最佳工艺条件及其抗氧化活性。以总黄酮得率为考察指标, 通过 Plackett-Burman 实验筛选出对得率影响最显著的三个因素: 复合酶配比、料液比及超声功率。随后通过响应面法优化芜菁总黄酮的提取工艺, 同时通过 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除实验评估了芜菁总黄酮的抗氧化活性。结果表明, 复合酶辅助超声法提取芜菁总黄酮的最佳工艺条件为: 复合酶配比为 1.9:1 g/g, 复合酶用量为 2%, 料液比为 1:38 g/mL, 乙醇浓度为 75%, 酶解温度为 50 ℃, 酶解时间为 55 min, 超声功率为 204 W, 超声时间为 60 min, 在此条件下总黄酮得率达到最大值 1.458%。抗氧化实验结果表明芜菁总黄酮对 DPPH 自由基清除的 IC₅₀ 为 185.6 μg/mL, 对 ABTS⁺ 自由基清除的 IC₅₀ 为 164.3 μg/mL, 说明芜菁总黄酮具有体外抗氧化活性。综上, 本研究得到了复合酶辅助超声法提取芜菁总黄酮的最佳工艺条件, 且提取到的芜菁总黄酮具有较强的抗氧化活性, 为西藏芜菁的开发及利用提供了一定的科学依据。

关键词: 芜菁, 总黄酮, 复合酶辅助超声法, 响应面法, 抗氧化活性

Enzyme-assisted Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from *Brassica rapa* L. Optimization and Its Antioxidant Activity Analysis

ZHANG Lijing¹, FU Mai¹, ZHANG Wenhui², CHEN Feng², ZHA Luo²,
FAN Bei¹, LI Shuying¹, LU Cong¹, WANG Fengzhong^{1,*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. Institute of Agricultural Product Development and Food Science, Tibet Academy of
Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lasa 850000, China)

Abstract: In this study, the extraction of total flavonoids in Tibetan turnip by enzyme-assisted ultrasonic technology and its antioxidant activity were studied. We used the yield as an indicator, and the Plackett-Burman experiment was conducted to screen out the three factors that had the most significant effect on yield: Compound enzyme ratio, material-liquid ratio and ultrasonic power. The extraction of total flavonoids in turnip was then optimized by response surface methodology. While the antioxidant activities of total flavonoids were evaluated by DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging experiments. The results showed that the optimal conditions for the extraction of total flavonoids from turnip are: The compound enzyme ratio was 1.9:1 g/g, the compound enzyme dosage was 2%, the material-liquid ratio was 1:38 g/mL, the ethanol concentration was 75%, the enzymolysis temperature was 50 ℃, the enzymolysis time was 55 min, the ultrasonic power was 204 W, and the ultrasonic time was 60 min. Under these conditions, the maximum yield of total flavonoid was 1.458%. The results of anti-oxidation experiment showed that the IC₅₀ of DPPH free radical scavenging was 185.6 μg/mL, and was 164.3 μg/mL of ABTS⁺ free radical scavenging, which indicated the total flavonoids of turnip had antioxidant activity *in vitro*. In summary, this study showed the conditions for the extraction of total flavonoids in turnips by enzyme-assisted ultrasonic method, and the total flavonoids had strong antioxidant activity, which would provide scientific basis for the future development and utilization of Tibetan turnips.

Key words: *Brassica rapa* L.; total flavonoids; enzyme assisted ultrasonic extraction; response surface method; antioxidant activity

收稿日期: 2020-04-29

作者简介: 张丽静 (1989-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工及功能食品开发, E-mail: zhanglijing@126.com。

* 通信作者: 王凤忠 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工及功能产品开发, E-mail: wangfengzhong@sina.com。

基金项目: 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程 (125161015000150013); 西藏自治区科技重大专项: 区域特色农产品加工技术与产品开发 (XZ201901NA04)。

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2021)06-0174-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020040345

引文格式:张丽静,付励,张文会,等.复合酶辅助超声提取西藏芜菁总黄酮工艺优化及抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2021,42(6):174-180.

ZHANG Lijing, FU Mai, ZHANG Wenhui, et al. Enzyme-assisted Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from *Brassica rapa* L. Optimization and Its Antioxidant Activity Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 174-180. (in Chinese with English abstract) <http://www.spagykj.com>

芜菁 (*Brassica rapa* L.) 又名元根 (西藏地区通称)、恰麻古, 属于十字花科芸苔属芜菁种, 在西藏高海拔长期作为蔬菜食用, 营养丰富, 深受广大群众喜爱^[1]。《晶珠本草》中记载, 芜菁味辛, 性温, 解诸种食物中毒。中医认为, 芜菁味甘、辛、苦, 性温, 无毒; 入胃、肝、肾三经; 具有开胃消食, 下气宽中, 止咳化痰, 利湿解毒, 温和脾胃的功效^[2-3]。现代研究表明, 芜菁中含有大量的黄酮、皂苷、糖苷、生物碱、挥发油、酚类、鞣质等生物活性成分^[4-6], 且具有抗氧化、降血脂、降血糖、抗疲劳及耐缺氧等功效^[7-12], 为开发芜菁保健食品提供了理论依据。

黄酮类化合物作为一类功能成分, 具有许多有益的生理效应与药理作用, 受到了广泛的关注^[13-15]。目前已有研究采用溶剂提取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法及超声微波协同提取法提取芜菁籽及芜菁块茎中的总黄酮^[16-19]。超声波提取法能够利用其产生的空化作用, 有效破坏组织的细胞壁, 促进胞内活性成分释放到溶剂中, 从而提高提取率, 与传统提取方法相比, 具有得率高、节能及环保等优势^[20]。酶法提取主要采用纤维素酶、果胶酶等破坏植物组织细胞, 使细胞壁疏松、破裂, 具有得率高、反应条件温和、时间短、无污染等优点^[21]。酶法超声波辅助提取法能有效结合超声提取及酶法提取的优势, 因此在活性成分的提取方面越来越受到重视, 已有研究采用该方法高效提取植物中的总黄酮成分^[21-22, 24-25]。目前, 尚无采用酶法结合超声辅助提取西藏芜菁总黄酮的工艺研究。

因此, 本试验采用复合酶辅助超声波法提取西藏芜菁中的总黄酮, 以总黄酮得率作为考察指标, 在单因素实验的基础上, 通过 Plackett-Burman 实验筛选出显著性影响因素, 进一步通过 Box-Behnken 响应面法优化实验, 确定芜菁总黄酮类的最佳提取工艺, 并对其体外抗氧化活性进行了初步研究, 为西藏芜菁进一步的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芜菁 由西藏自治区农牧科学院农产品开发与食品科学研究所提供, 采自西藏自治区昌都地区贡觉县, 经鉴定为十字花科芸苔属芜菁种芜菁 (*Brassica rapa* L.) 块茎; 芦丁对照品 美国 Sigma 公司; 抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS) 碧云天生物技术有限公司; 纤维素酶 (5×10^7 U/mg)、果胶酶 (40 U/mg) 北京索莱宝科技有限公司; 亚硝酸钠、硝酸铝等试剂 国产分析纯, 国药集团化学试剂公司。

Spectra Max 190 酶标仪 美国 Molecular Device

公司; AL204 分析天平 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; IKA 旋转蒸发仪 美国 IKA 公司; HH-1 恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器有限公司; 105-18c 真空冷冻干燥机 上海比朗仪器制造有限公司; KQ-600V 超声波清洗器 昆山舒美超声仪器有限公司; DHG-9203A 鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 芜菁总黄酮的提取 将芜菁块茎清洗干净、在 50 ℃ 条件下干燥 24 h、粉碎后过 60 目筛, 放入密封袋中备用。称取 1 g 芜菁粉末, 倒入 100 mL 锥形瓶中, 以一定的料液比添加不同体积分数的乙醇溶液, 加入一定量的复合酶 (纤维素酶和果胶酶), 加入缓冲液调节 pH, 在一定温度下进行酶解后, 沸水浴中灭酶 5 min 后冷却。随后在一定的超声功率、温度和时间条件下进行超声处理, 样液在 3000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液即为黄酮提取液。

1.2.2 单因素实验 针对八个影响酶法辅助超声提取黄酮得率的因素, 即复合酶配比、复合酶用量、乙醇浓度、料液比、酶解时间、酶解温度、超声功率、超声时间, 研究各因素对芜菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.1 复合酶比对总黄酮得率的影响 根据“1.2.2”的方法, 固定料液比为 1:35 g/mL, 复合酶的用量为提取液体积的 2.0%, 乙醇浓度为 75%, 酶解温度为 50 ℃, 酶解时间为 55 min, 超声功率为 200 W, 超声时间为 60 min, 考察纤维素酶与果胶酶的配比 (1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1 g/g) 对芜菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.2 复合酶用量对总黄酮得率的影响 在上述实验的基础上, 固定料液比为 1:35 g/mL, 乙醇浓度为 75%, 酶解温度为 50 ℃, 酶解时间为 55 min, 超声功率 200 W, 超声时间为 60 min, 考察复合酶的用量 (1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%) 对芜菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.3 料液比对总黄酮得率的影响 在上述实验的基础上, 固定酶解温度为 50 ℃, 乙醇浓度为 75%, 酶解时间为 55 min, 超声功率 200 W, 超声时间为 60 min, 考察料液比 (1:15、1:25、1:35、1:45、1:55 g/mL) 对芜菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.4 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 在上述实验的基础上, 固定酶解温度为 50 ℃, 酶解时间为 55 min, 超声功率 200 W, 超声时间为 60 min, 考察乙醇浓度 (55%、65%、75%、85%、95%) 对芜菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.5 酶解时间对总黄酮得率的影响 在上述实

验的基础上,固定超声功率为 200 W,超声时间为 60 min,考察酶解时间(35、45、55、65、75 min)对茺菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.6 酶解温度对总黄酮得率的影响 在上述实验的基础上,固定酶解时间为 55 min,超声功率为 200 W,超声时间为 60 min,考察酶解温度(30、40、50、60、70 ℃)对茺菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.7 超声功率对总黄酮得率的影响 在上述实验的基础上,固定超声时间为 60 min,考察超声功率(160、180、200、220、240 W)对茺菁中总黄酮得率的影响。

1.2.2.8 超声时间对总黄酮得率的影响 在上述实验的基础上,考察超声时间(40、50、60、70、80 min)对茺菁中总黄酮得率的影响。

1.2.3 Plackett-Burman 实验设计 本实验中的单因素较多,因此在单因素实验的基础上,通过 Plackett-Burman 试验设计,对 8 个单因素进行研究,每个因素取高水平 and 低水平值,响应值为总黄酮的得率,筛选出对茺菁黄酮得率有显著影响的因子,作为后续响应面实验的影响因子。实验因素及水平设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验因素及水平设计
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman

因素	水平	
	-1	1
A 复合酶配比(g/g)	1.5:1	2.5:1
B 复合酶用量(%)	1.5	2.5
C 料液比(g/mL)	1:25	1:45
D 乙醇浓度(%)	65	85
E 酶解时间(min)	45	65
F 酶解温度(℃)	40	60
G 超声功率(W)	180	220
H 超声时间(min)	50	70

1.2.4 Box-Behnken 响应面设计 在单因素及 Plackett-Burman 试验基础上,以筛选出的三个对总黄酮得率影响显著的因素复合酶配比、料液比和超声功率作为响应面实验设计的自变量,以茺菁中总黄酮得率为响应值,设计三因素三水平的 Box-Behnken 响应面优化试验。试验设计见表 2。

表 2 Box-Behnken 响应面试验因素及水平表
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken

因素	水平		
	-1	0	1
A 复合酶配比(g/g)	1.5:1	2:1	2.5:1
B 料液比(g/mL)	1:25	1:35	1:45
C 超声功率(W)	180	200	220

1.2.5 总黄酮含量的测定 参考文献[23]采用 $\text{NaNO}_2-\text{AlCl}_3$ 比色法的实验结果绘制芦丁标准曲线,检测波长为 510 nm。根据吸光值结果绘制标准曲线,线性方程为 $y=0.00823x-0.004$, $R^2=0.9992$ 。

取 5 mL 茺菁提取液,显色后,在波长 510 nm 处检测吸光值,通过标准曲线计算黄酮的含量,根据以

下公式计算黄酮得率。重复三次计算平均值。

$$\text{总黄酮得率}(\%) = \frac{C \times V \times N \times 0.01}{W} \times 100$$

式中,C 为茺菁测定样液中总黄酮浓度(mg/mL),V 为提取液体积(单位 mL);N 为稀释倍数,W 为称取的茺菁质量(g)。

1.2.6 茺菁总黄酮的抗氧化活性研究

1.2.6.1 DPPH 自由基清除实验 使用无水乙醇配制 0.5 mg/mL 的 DPPH 溶液。取不同浓度的茺菁总黄酮(50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$)加入 DPPH 溶液,选择相同质量浓度的 V_c 作为阳性对照,摇匀后在室温条件下避光静置 30 min,在 515 nm 处检测吸光值,计算 DPPH 自由基清除率^[24]:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100$$

式中, A_c 为无水乙醇加等体积 DPPH 溶液的吸光度; A_i 为样品加等体积 DPPH 溶液的吸光度; A_j 为样品加等体积乙醇溶液的吸光度。根据实验结果计算茺菁总黄酮清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值。

1.2.6.2 ABTS⁺ 自由基清除率 实验使用总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS⁺)检测茺菁总黄酮的抗氧化活性,在 96 孔板中加入 20 μL 过氧化物酶工作液,空白组中加入 10 μL PBS 溶液,样品组中加入 10 μL 不同浓度茺菁总黄酮(50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$),选择 V_c 作为阳性对照,标准曲线组中加入 10 μL 不同浓度的 Trolox 标准溶液;轻轻混匀后每孔加入 ABTS⁺ 工作液 170 μL ,混匀后在室温下孵育 5 min,在 414 nm 处测定吸光值,计算出样品的抗氧化活性。根据实验结果计算茺菁总黄酮清除 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 值。

1.3 数据处理

所有实验重复三次,取平均值并计算标准误差。使用 Graphpad prism 6 软件处理单因素实验结果及抗氧化实验结果,使用 Minitab 17 软件设计及分析 Plackett-Burman 实验,使用 Design Expert 8.0 软件设计及分析响应面实验。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 复合酶比对总黄酮得率的影响 由图 1 实验结果可知,随着纤维素酶添加比例的增加,茺菁总黄酮的得率表现出先增加后缓慢减少的趋势。纤维素酶较少时,细胞壁的破坏不完全,随着纤维素酶比例的增加,总黄酮的溶出度增加,得率逐渐增加至最大值 0.95%。继续增加纤维素酶的比例时,总黄酮得率呈缓慢下降趋势。可能由于纤维素酶过量,使得部分纤维附着在茺菁颗粒表面,影响了黄酮的浸出^[25],使得黄酮得率略微减少,因此选择纤维素酶和果胶酶的配比为 2:1 g/g。

2.1.2 复合酶用量对总黄酮得率的影响 由图 2 实验结果可知,随复合酶用量的增加,茺菁总黄酮得率呈现先增加后平稳的趋势,当复合酶用量达到 2.0% 时,总黄酮得率达到最大值 1.14%。继续增加复合酶的用量时,总黄酮得率呈现平稳趋势。可能的原

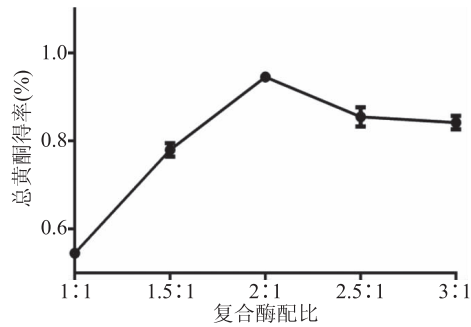


图1 复合酶比对茺菁总黄酮得率的影响
Fig.1 Effect of complex enzyme ratio on the extraction of total flavonoids from turnips

因是随着复合酶用量的增加,能够有效破坏细胞壁,促进总黄酮的溶出,得率逐渐增加;当复合酶的用量超过2.0%后,随着复合酶用量的增加,底物浓度无法使酶达到饱和状态,导致酶的作用受到了抑制,因此总黄酮得率不再增加^[26]。根据实验结果,选择2.0%作为复合酶的用量。

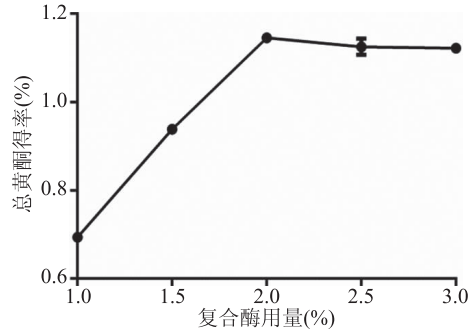


图2 复合酶用量对茺菁总黄酮得率的影响
Fig.2 Effect of complex enzyme dosage on the extraction of total flavonoids from turnips

2.1.3 料液比对总黄酮得率的影响 实验结果由图3可知,随着料液比的增大,茺菁总黄酮的得率为先增加而后逐渐下降的趋势。随着料液比的增大,溶剂逐渐增多,黄酮的溶出增多,且酶解作用增加,当料液比为1:35 g/mL时得率达最大值1.04%。继续增加料液比,反而会减少酶与底物的浓度,影响酶解效果,且为后续的浓缩提取增加困难^[27]。因此选择的料液比为1:35 g/mL。

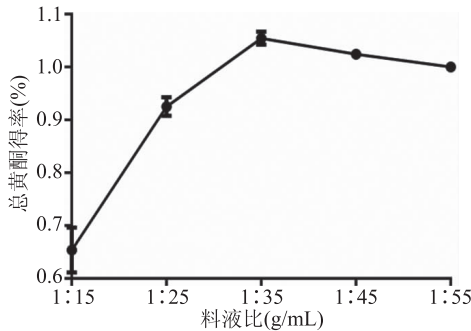


图3 料液比对茺菁总黄酮得率的影响
Fig.3 Effect of material to liquid ratio on the extraction of total flavonoids from turnips

2.1.4 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 实验结果由

图4可知,随着乙醇浓度的增加,细胞内外的浓度差加大,有利于黄酮的浸出,得率逐渐增加,在乙醇浓度为75%时达到最高,继续增加乙醇的浓度,会使醇溶性色素和亲脂性杂质溶出量增加,此类成分与黄酮类物质竞争与乙醇-水分子结合^[26],从而导致黄酮的得率有所降低,因此选择浓度为75%的乙醇进行茺菁总黄酮的提取。

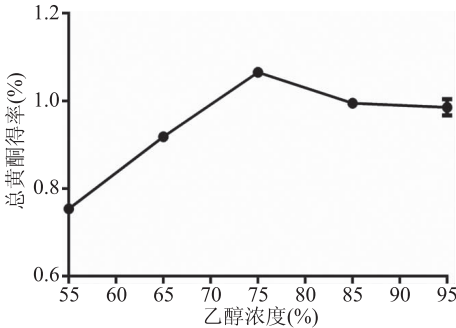


图4 乙醇浓度对茺菁总黄酮得率的影响
Fig.4 Effect of ethanol concentration on the extraction of total flavonoids from turnips

2.1.5 酶解时间对总黄酮得率的影响 实验结果由图5可知,随着酶解时间的延长,酶被充分激活,酶解作用逐渐增加,茺菁黄酮的得率也逐渐增加,随后保持平稳。酶解时间为55 min时黄酮的得率为1.0%。超过55 min后,酶解效率基本稳定,黄酮得率保持不变,因此将酶解时间设置为55 min。

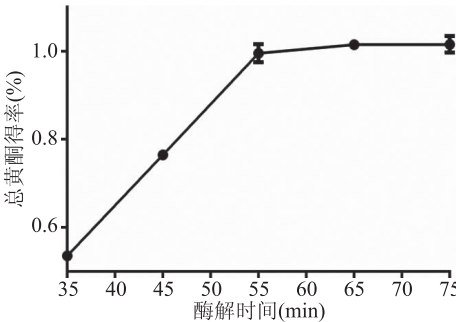


图5 酶解时间对茺菁总黄酮得率的影响
Fig.5 Effect of enzymolysis time on the extraction of total flavonoids from turnips

2.1.6 酶解温度对茺菁总黄酮得率的影响 实验结果由图6可知,随着酶解温度的增加茺菁黄酮的得率呈现先增加后缓慢降低的趋势。在低温条件下,酶的活力尚未被完全激发,随温度的升高,酶的活性逐渐升高,反应速率增加,酶解温度为50℃时,黄酮的得率最大为0.97%,而当温度超过50℃时,酶解效率降低,总黄酮得率减少。因此选择50℃作为酶解温度。

2.1.7 超声功率对总黄酮得率的影响 实验结果由图7可知,茺菁黄酮的得率随着超声功率的增加而增大,当超声功率超过200 W后,在强大机械振动作用下,提取剂流动加快,导致超声波的停留时间减小,同时空化总用增强后产生的大量无用空化泡会增加超声波的散射衰减,导致黄酮的得率逐渐降低^[25],因此选择的超声功率为200 W。

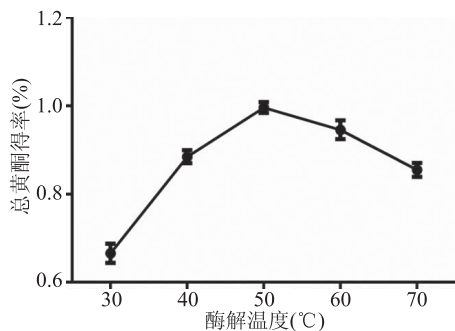


图6 酶解温度对茺菁总黄酮得率的影响

Fig.6 Effect of enzymolysis temperature on the extraction of total flavonoids from turnips

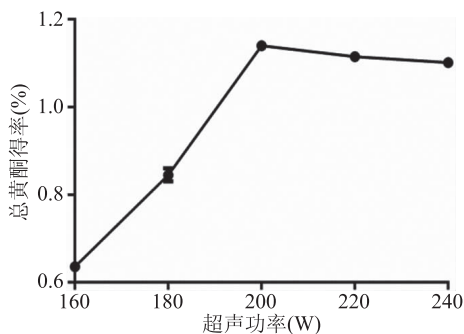


图7 超声功率对茺菁总黄酮得率的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic power on the extraction of total flavonoids from turnips

2.1.8 超声时间对茺菁总黄酮得率的影响 实验结果由图8可知,茺菁黄酮的得率随着超声时间的延长呈现先增加后保持平稳的趋势。当超声时间达到60 min时,黄酮的得率达到最大,为1.05%。60 min后,黄酮得率基本保持不变。随着超声时间的延长提取成本也会增加,60 min即可充分提取出茺菁中的总黄酮,因此将超声时间设置为60 min。

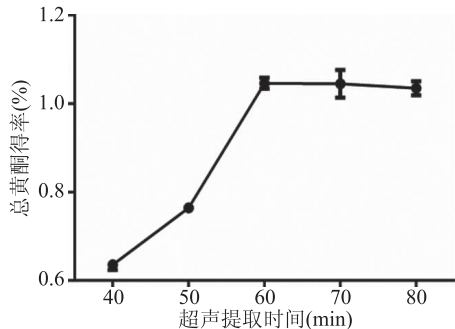


图8 超声提取时间对茺菁总黄酮得率的影响

Fig.8 Effect of ultrasonic time on the extraction of total flavonoids from turnips

2.2 Plackett-Burman 实验结果分析

Plackett-Burman 实验设计及响应值结果见表3,使用 Minitab 软件对实验数据进行回归分析和显著性检验,各因素的显著性结果见表4。实验结果由表4可知,八个因素中的因素A(复合酶比例)、C(料液比)、G(超声功率)对总黄酮的得率影响显著($P < 0.05$),因此,选择这三个因素进行响应面优化实验。复合酶用量、乙醇浓度、酶解温度、酶解时间、超声时

间5个因素对总黄酮的得率影响不显著,因此在后续优化实验中将这5个因素设定为单因素实验确定的最佳条件,即:复合酶用量2%,乙醇浓度75%,酶解时间55 min,酶解温度50℃,超声时间60 min。

表3 Plackett-Burman 实验各因素水平及响应值

Table 3 Levels of various factors and response results of Plackett-Burman

实验号	A	B	C	D	E	F	G	H	得率(%)
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.94
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.76
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1.05
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.02
5	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0.89
6	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.73
7	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.65
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.97
9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.82
10	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1.17
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1.09
12	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.88

表4 各因素的显著性检验

Table 4 Significance test of each factor

模型	回归系数	标准偏差	T 值	P 值	显著性
A	0.0975	0.018	5.43	0.012	*
B	-0.0258	0.018	-1.44	0.246	
C	-0.0575	0.018	3.20	0.049	*
D	0.0192	0.018	1.07	0.364	
E	-0.0308	0.018	-1.72	0.185	
F	0.0375	0.018	2.09	0.128	
G	-0.0692	0.018	-3.85	0.031	*
H	0.0192	0.018	1.07	0.364	

注: * 表示影响显著($P < 0.05$)。

2.3 Box-Behnken 响应面实验结果分析

响应面设计及实验结果见表5。根据表5结果,建立茺菁黄酮得率对自变量复合酶配比(A)、料液比(B)和超声功率(C)的二次多项回归模型。利用 Design Expert 8.0 软件对数据进行二次多元回归拟合,结果如表6所示。得到的回归方程如下:

$$Y = 7.08531 - 0.0175A - 0.089375B - 0.052063C + 0.01AB - 0.00375AC + 0.000175BC + 0.215A^2 + 0.0006125B^2 + 0.000134375C^2$$

据表6回归方程方差分析可知,失拟项 P 值 = 0.1245 > 0.05,表明失拟因素不显著,拟合度较好。回归模型的显著系数 $R^2 = 0.9683$,模拟调整系数 $R^2_{Adj} = 0.9446$,表明回归模型可靠。

实验结果由表6可知,对茺菁总黄酮得率的影响从大到小的三个因素依次为:复合酶配比(A)、超声功率(C)、料液比(B),其中复合酶配比(A)、料液比(B)对得率的影响极显著($P < 0.01$),超声功率(C)、复合酶配比(A)与料液比(B)的交互作用也对得率有显著影响($P < 0.05$)。

回归模型预测的茺菁总黄酮的最佳提取工艺为:

表6 回归方程方差分析结果
Table 6 Analysis of variance of regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	5.288	0.573	17.86	<0.0001	**
A	1	0.237	0.237	17.564	0.0073	**
B	1	0.311	0.311	14.251	0.0045	**
C	1	0.458	0.458	15.779	0.0381	*
AB	1	0.104	0.104	3.124	0.0206	*
AC	1	0.562	0.562	1.765	0.2268	
BC	1	0.491	0.491	1.533	0.2561	
A ²	1	0.039	0.039	12.241	0.0001	**
B ²	1	0.058	0.058	18.04	0.0038	**
C ²	1	0.0312	0.0312	9.82	0.7639	
失拟项	3	0.022	0.0074	2.83	0.1245	
纯误差	4	0.2051	0.0912			
总和	16	5.42				
		$R^2=0.9683$		$R^2_{Adj}=0.9446$		

注: * 表示影响显著($P<0.05$), ** 表示影响极显著($P<0.01$)。

表5 Box-Behnken 响应面试验设计与结果
Table 5 Design and results of
Box-Behnken response surface analysis

实验号	A	B	C	得率(%)
1	-1	-1	-1	0.56
2	1	-1	-1	1.08
3	-1	1	-1	0.92
4	1	1	-1	1.26
5	-1	-1	1	0.75
6	1	-1	1	1.14
7	-1	1	1	0.98
8	1	1	1	1.37
9	-1	0	0	0.87
10	1	0	0	1.14
11	0	-1	0	0.76
12	0	1	0	0.92
13	0	0	-1	0.71
14	0	0	1	0.98
15	0	0	0	0.76

复合酶配比为 1.935: 1 g/g;料液比为 1: 37.54 g/mL,超声功率为 204 W,得率 1.489%,其他条件选择单因素实验的最佳值。为方便实际操作,设定提取条件为复合酶配比为 1.9: 1 g/g;料液比为 1: 38 g/mL,超声功率为 204 W,进行三次平均实验,平均得率为 1.458%,与预测值相差 2.08%,表明该模型的可靠性高,可用于茺菁总黄酮的提取。相比海力茜·陶尔大洪等^[28]通过乙醇水溶液回流提取茺菁总黄酮得率为 0.28%;马菁等^[29]采用微波技术提取茺菁总黄酮的得率为 0.64%,有了明显的提升。

2.4 茺菁总黄酮抗氧化活性研究

2.4.1 茺菁总黄酮清除 DPPH 自由基活性 研究通过 DPPH 自由基清除实验对茺菁总黄酮的抗氧化活性进行研究,实验结果如图 9 所示。可以看出,不同浓度茺菁总黄酮与 DPPH 自由基清除率存在着量效

关系,随着总黄酮浓度的增高,DPPH 自由基清除率也逐渐升高。同一浓度条件下,阳性对照 V_c 清除 DPPH 自由基的效果明显优于茺菁总黄酮。计算得到茺菁总黄酮提取物对 DPPH 自由基的半数清除率 IC₅₀ 值为 185.6 μg/mL。由此可见,茺菁总黄酮能够清除 DPPH 自由基,表现出抗氧化活性。

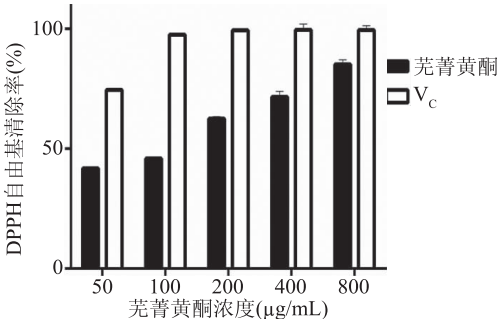


图9 茺菁总黄酮的 DPPH 自由基清除活性
Fig.9 DPPH free radical scavenging capacity
of total flavonoids from turnips

2.4.2 茺菁总黄酮清除 ABTS⁺ 自由基活性 研究实验结果由图 10 可知,ABTS⁺ 自由基的清除率随着茺菁总黄酮浓度的增加而增大,二者存在量效关系。计算得出茺菁总黄酮提取物的 IC₅₀ 值为 164.3 μg/mL。与阳性对照 V_c 相比,茺菁总黄酮对 ABTS⁺ 自由基的清除活性较低。由此可见,茺菁总黄酮对 ABTS⁺ 自由基具有一定的清除能力,具有体外抗氧化活性。

3 结论

本研究对酶法超声辅助提取茺菁黄酮中的影响因素进行了筛选实验,得到对黄酮得率影响显著的三个因素,通过响应面法建立茺菁总黄酮提取工艺的回归方程,得到最佳提取条件为:复合酶配比 1.9: 1 g/g,复合酶用量 2%,料液比 1: 38 g/mL,乙醇浓度 75%,酶解温度 50 ℃,酶解时间 55 min,超声功率 204 W,超声时间 60 min,总黄酮得率为 1.458%。体外抗氧化活性实验结果表明,茺菁总黄酮对 DPPH

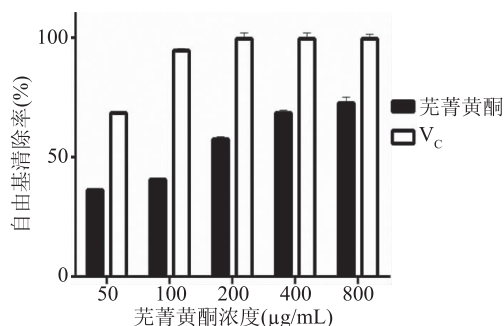


图10 芜菁总黄酮的 ABTS⁺ 自由基清除能力

Fig.10 ABTS⁺ free radical scavenging capacity of total flavonoids from turnips

和 ABTS⁺ 自由基具有一定清除能力,具有体外抗氧化活性,IC₅₀分别为 185.6 及 164.3 μg/mL。本研究为西藏芜菁在食品、药品及保健品领域作为天然抗氧化剂进行开发提供了依据,后续还需开展进一步的研究,以开发西藏芜菁的潜在应用价值。

参考文献

- [1] 吴征镒. 西藏植物志(第二卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1985:328.
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991:95.
- [3] 张涛, 安熙强, 程江南, 等. 维药恰玛古的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(7): 982-986.
- [4] 刘艺. 合阳蔓菁化学成分及药理活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2011.
- [5] Romani A, Vignolini P, Isolani L, et al. HPLC - DAD/MS Characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops (*Brassica rapa* L. Subsp. *Sylvestris* L.) [J]. J Agri Fod Chem, 2006; 54: 1342-1346.
- [6] Jeong J, Park H, Hyun H, et al. Effects of glucosinolates from turnip (*Brassica rapa* L.) root on bone formation by human osteoblast-like MG-63 cells and in normal young rats [J]. Phytother Res, 2015; 29: 902-909.
- [7] Xie Y, Jiang S, Su D, et al. Composition analysis and anti-hypoxia activity of polysaccharide from brassica rapa L [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 47(4): 528.
- [8] 阿克拜尔江·阿巴斯, 李冠, 王静. 新疆芜菁多糖降血糖作用的研究[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(3): 471.
- [9] 张英, 唐伟敏, 尼玛, 等. 西藏芜菁及其加工制品增强人体低氧耐受性的实验研究[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 178-182.
- [10] Reziyamu W, Jie Bai, Zhan L, et al. Biological activity of brassica rapa L. polysaccharides on RAW264.7 macrophages and on tumor cells [J]. Bioorgan Med Chem, 2020, 28(7): 115330.
- [11] Wang W, Wang X, Ye H. Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from brassica rapa L [J]. Int J Biol Macromol, 2016; 82: 979-988.

- [12] Yamamoto K, Furuya K, Yamada K, et al. Enhancement of natural killer activity and IFN- γ production in an IL-12-dependent manner by a *Brassica rapa* L [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2018, 82(4): 654-668.
- [13] 华辉, 郭用. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 食品科学, 1999, 9(4): 9-12.
- [14] Kumar S, Pandey A. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview [J]. Sci World J, 2013: 1-16.
- [15] Wen L, Jiang Y, Yang J, et al. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids [J]. Ann NY Acad Sci, 2017, 1398: 120-129.
- [16] 马合木提·买买提明, 赛力慢·哈得尔, 麦得尼亚提·霍加超声-微波协同萃取芜菁籽中总黄酮提取工艺的研究[J]. 中成药, 2013, 35(2): 417-419.
- [17] 崔琳琳, 赛春梅, 杨梦, 等. 响应曲面法优化超声辅助提取诸葛菜总黄酮的工艺及抗氧化活性研究[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(1): 53-58.
- [18] 王菁, 古娜娜·对山别克, 海力茜·陶尔大洪新疆芜菁总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(5): 92-95.
- [19] 陈文彬, 史毅, 张博文, 等. 恰玛古黄酮类化学成分及其药理活性研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2019(3).
- [20] 熊志勇, 陈惠君, 蔡阳伦, 等. 超声波协同酶法提取茶多酚工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 218-220, 224.
- [21] 刘媛洁, 张良. 响应面法优化复合酶辅助超声波提取柚子皮总黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2019(23): 143-151.
- [22] Guisheng Z, Jiayan M, Yuping T, et al. Multi-response optimization of ultrasonic assisted enzymatic extraction followed by macroporous resin purification for maximal recovery of flavonoids and ginkgolides from waste ginkgo biloba fallen leaves [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1029.
- [23] 文晶晶, 黄桂红, 韦奕, 等. 广金钱草和金钱草不同部位总黄酮含量研究[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(8): 58-60.
- [24] 何兰香, 丁科, 谢明华, 等. 酶法-超声提取黄精总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1075-1080.
- [25] 刘智峰. 酶法-超声波辅助提取香椿叶中总黄酮及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 314-319.
- [26] 苏东林, 单杨, 李高阳, 等. 酶法辅助提取柑桔皮总黄酮的工艺优化研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(4): 240-245.
- [27] 马萍, 郭增旺, 张丽媛, 等. 超声微波协同提取小米糠总黄酮工艺及其抗炎活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017(11): 1966-1975.
- [28] 海力茜·陶尔大洪, 古娜娜·对山别克恰玛古中总黄酮提取工艺[J]. 医药导报, 2014, 33(7): 935-937.
- [29] 马菁, 幸让新, 王华强, 等. 恰玛古中类黄酮的提取工艺研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 208-213.

(上接第 173 页)

氧化性[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 87-92.

[36] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.157-2016, 食品安全国家标准食品有机酸的测定[S]. 北

京: 中国标准出版社, 2016.

[37] 马瑞雪, 高天, 宋蕾, 等. 响应面法优化调理鸡排水油混合油炸工艺[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 128-134.