

# 响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究

张黎明<sup>1</sup>, 李瑞超<sup>1</sup>, 郝利民<sup>1,2</sup>, 田爱莹<sup>1</sup>, 鲁吉珂<sup>2,3</sup>, 张建春<sup>2</sup>

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(2. 总后勤部军需装备研究所, 北京 100010) (3. 郑州大学生命科学学院, 河南郑州 450001)

**摘要:** 采用响应面法优化云南丽江产玛咖叶总黄酮的提取条件。在单因素试验基础上, 选择乙醇体积分数、提取温度、料液比为影响因子, 应用 Box-Benhnken 中心组合法进行 3 因素 3 水平试验设计, 以玛咖叶总黄酮得率为响应值, 进行响应面分析, 并比较玛咖叶总黄酮的体外抗氧化活性。结果表明, 玛咖叶总黄酮的最佳提取条件为乙醇体积分数 65%、提取温度 64 °C、料液比 29:1 (mL/g), 在此条件下, 玛咖叶总黄酮的得率可达到(2.49±0.02)%。同时建立了乙醇溶液提取玛咖叶总黄酮的二次数学模型, 对目标产物提取具有良好的预测作用。玛咖叶总黄酮体外清除羟自由基、1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH·) 自由基和超氧阴离子自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别 0.605、0.165、0.425 mg/mL, 其清除 3 种自由基的能力均高于相同浓度的 2, 6-二叔丁基对甲酚 (BHT), 但低于 L-抗坏血酸。

**关键词:** 抗氧化活性; 提取; 黄酮; 玛咖叶; 响应面分析法

文章编号: 1673-9078(2014)4-233-239

## Response Surface Methodology for Optimization of Extracting Total Flavonoids from Maca Leaves and Antioxidant Evaluation

ZHANG Li-ming<sup>1</sup>, LI Rui-chao<sup>1</sup>, HAO Li-min<sup>1,2</sup>, TIAN Ai-ying<sup>1</sup>, LU Ji-ke<sup>2,3</sup>, ZHANG Jian-chun<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjing 300457, China) (2. The Research Center of China-Hemp Materials, The Quartermaster Equipment Institute of General Logistics Department of People's Liberation Army, Beijing 100027, China) (3. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** Response surface methodology (RSM) was employed to optimize the extraction conditions of total flavonoids from Maca leaves collected from Lijiang (Yunnan province). Based on single-factor tests, Box-Benhnken center composite experiment was carried out with three factors, including alcohol concentration, extraction temperature, solid-to-solvent ratio. RSM was used to determine the effect of prime factors on the yield of flavonoids. Besides, the antioxidant activity in vitro of flavonoids from maca leaves was evaluated. Results showed that the optimum extraction conditions by RSM were ethanol concentration 65%, extraction temperature 64 °C, and solid-to-liquid ratio 29:1 (mL/g). Under these conditions, the extraction yield of total flavonoids was (2.49±0.02) %, which was close to the measured value. Thus, the fitted quadratic regression model was valid. The IC<sub>50</sub> of the obtained total flavonoids against hydroxyl, superoxide anion and DPPH radicals were 0.605, 0.425 mg/mL and 0.165 mg/mL, respectively. The scavenging impact of the three radicals was more effective than that of 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) at the same concentration, but lower than vitamin C.

**Key words:** antioxidant activity; extraction; flavonoids; *Lepidium Meyenii* Walp. leaves; response surface methodology

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp) 为十字花科独行菜属一年生或两年生草本植物, 原产于海拔 3500~4500

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 全军科研项目 (AX110C002), 总后给养勤务科研任务

作者简介: 张黎明 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物研究与开发

通讯作者: 郝利民 (1969-), 男, 博士, 教授, 高工, 研究方向: 军用功能食品与食品生物技术

的秘鲁安第斯山区<sup>[1-2]</sup>。玛咖是一种药食同源性植物, 2000 多年以来一直是生活在安第斯山印加人的主要食物之一, 有“秘鲁人参”和“南美人参”的美称。现代研究表明玛咖含有丰富的营养和药用成分, 主要包括玛咖烯、玛咖酰胺、玛咖生物碱、芥子油苷、异硫氰酸酯和甾醇等<sup>[3-4]</sup>。玛咖具有抗氧化、抗疲劳、提高性功能、促进生长、缓解更年期综合症等功效<sup>[5-6]</sup>。黄酮类化合物是植物中广泛存在的一类活性物质, 具

有抗癌防癌、抗菌杀菌、改善心血管功能、延缓衰老、降血脂血压等功效。2001年玛咖首次在我国云南省丽江、会泽、曲靖等地引种,至2010年底全国种植面积达194.4 hm<sup>2</sup>,玛咖产量838.7 t<sup>[7]</sup>。玛咖已成为当前功能食品研究的热点,以玛咖为主要原料的保健食品受到了各国消费者的广泛青睐。2011年,我国卫生部批准玛咖作为新资源食品。目前国内外对玛咖茎进行了大量的研究,如Campos等<sup>[8]</sup>对玛咖中芥子油苷、总酚和抗氧化物质的提取方法进行了研究,结果表明,同时提取这类化合物的最佳条件为,乙醇体积分数58%,料液比1:10(g/mL),在70℃下提取90 min。周晓明等<sup>[9]</sup>对新疆产玛咖根茎中的黄酮进行了提取工艺的研究,确定最佳提取工艺为乙醇浓度70.3%、料液比1:27(g/mL)、超声时间28.4 min,此工艺条件下玛咖总黄酮的提取率为2.113%。但是对玛咖叶的开发利用却鲜见报道。本实验旨在探讨乙醇-水浸提玛咖叶总黄酮的提取工艺,并采用响应面法优化工艺条件,同时采用体外实验测定其抗氧化活性,以期对玛咖资源的保护和综合利用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

玛咖叶2012年11月采集于总后勤部军需装备研究所玛咖种植基地(云南丽江),干燥,粉碎,过60目筛,细粉装入自封袋备用;D101大孔吸附树脂,天津市海光化工有限公司;芦丁对照品(批号:100080-200707)中国药品食品生物制品检定所;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、L-(+)-抗坏血酸(Vc)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯级。

TU-1810紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;DZKW-4电子恒温水浴锅,南昌市恒顺化验设备制造有限公司;离心机(LD4-2A),北京医用离心机厂;分析天平(PB203-N型),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;高速万能粉碎机(FW100型),天津市泰斯特仪器有限公司;SHZ-D(II)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 玛咖叶总黄酮的测定<sup>[10]</sup>

标准曲线的绘制:准确称取干燥芦丁标准样品10 mg并置于50 mL容量瓶中,然后用80%乙醇定容,摇匀,既得浓度为0.2 mg/mL的标准溶液,待用。准

确吸取芦丁标准液0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于7个比色管中,分别加入5% NaNO<sub>2</sub>溶液0.3 mL,摇匀,静置6 min后分别加入10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液0.3 mL,摇匀,静置6 min后加入4% NaOH溶液4.0 mL,再用80%乙醇定容至10 mL,摇匀,静置15 min后,以第一支试管溶液为空白参比,用紫外分光光度计在510 nm下测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),浓度(μg/mL)为横坐标(X),得到标准曲线方程:Y=9.3982X+0.0257, R<sup>2</sup>=0.9991。

样品中黄酮含量测定:准确移取1.0 mL的样品液于比色管中,按上述标准曲线的绘制方法测定吸光度。根据标准回归方程计算黄酮质量。总黄酮得率按照式(1)计算:

$$\text{黄酮得率}/\% = CV/M \times 100\% \quad (1)$$

注:C为提取液浓度,g/mL,V为提取液原始体积,mL;M为所取玛咖叶粉末质量,g。

#### 1.2.2 玛咖叶总黄酮提取工艺流程

玛咖叶(干燥)→粉碎→溶剂与物料混合→不同条件下浸提→离心→浓缩→干燥→黄酮提取物

#### 1.2.3 玛咖叶总黄酮提取条件单因素试验

##### 1.2.3.1 乙醇体积分数

准确称取玛咖叶粉末0.5 g,固定提取温度50℃,料液比为20:1(mL/g),提取时间60 min,提取次数1次,考察乙醇体积分数为30%、40%、50%、60%、70%条件下玛咖叶总黄酮得率。

##### 1.2.3.2 提取温度

准确称取玛咖叶粉末0.5 g,乙醇体积分数用1.2.3.1中选出的结果,固定料液比为20:1(mL/g),提取时间60 min,提取次数1次,考察提取温度为40℃、50℃、60℃、70℃、80℃条件下玛咖叶总黄酮得率。

##### 1.2.3.3 料液比

准确称取玛咖叶粉末0.5 g,乙醇体积分数用1.2.3.1中选出的结果,提取温度用1.2.3.2中选出的结果,固定提取时间60 min,提取次数1次,考察料液比(mL/g)为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50条件下玛咖叶总黄酮得率。

##### 1.2.3.4 提取时间

准确称取玛咖叶粉末0.5 g,乙醇体积分数用1.2.3.1中选出的结果,提取温度用1.2.3.2中选出的结果,料液比(mL/g)用1.2.3.3中选出的结果,固定提取次数1次,考察提取时间为30、60、90、120、150 min条件下考察玛咖叶总黄酮得率。

##### 1.2.3.5 提取次数

准确称取玛咖叶粉末0.5 g,乙醇体积分数用

1.2.3.1 中选出的结果, 提取温度用 1.2.3.2 中选出的结果, 料液比 (mL/g) 用 1.2.3.3 中选出的结果, 提取时间用 1.2.3.4 中选出的结果, 考察提取次数为 1 次, 2 次, 3 次条件下玛咖叶总黄酮得率。

#### 1.2.4 响应面法优化总黄酮提取工艺条件

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 采用 3 因素 3 水平的三元二次响应面分析方法, 优化玛咖叶总黄酮的提取工艺。在单因素试验的基础上, 自变量的试验水平分别以 -1、0、1 进行编码 (见表 1), 共设计 15 个试验点, 其中 1~12 为析因点; 自变量取值在各因素所构成的三维顶点; 13~15 是零点, 为区域的中心点, 中心试验重复 3 次, 用来估计试验误差。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素和水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiment design

因素	编码水平		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> (乙醇体积分数/%)	50	60	70
X <sub>2</sub> (提取温度/°C)	50	60	70
X <sub>3</sub> [料液比/(mL/g)]	25:1	30:1	35:1

#### 1.2.5 玛咖叶总黄酮的抗氧化活性实验

按照响应面分析确定的玛咖叶总黄酮提取最佳条件进行提取, 提取液离心 (4000 r/min) 10 min, 取上清液, 经 D101 大孔树脂纯化<sup>[10]</sup>、乙醇洗脱 (体积分数 70%), 所得洗脱液回收乙醇溶剂后冷冻干燥即得玛咖叶总黄酮粉末。配制适宜质量浓度溶液进行抗氧化活性实验。

##### 1.2.5.1 羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除活性的测定

参照 Smironff 等<sup>[11]</sup>的方法并加以改进。在 10 mL 比色试管中依次加入 6 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液 2.0 mL、不同质量浓度的待测液 2.0 mL、6 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 2.0 mL, 摇匀静置 10 min, 再加入 6 mmol/L 的水杨酸溶液 2.0 mL, 摇匀, 静置 30 min 后于 510 nm 处测其吸光度; 做 3 次平行实验, 取平均值。阳性对照用 L-抗坏血酸和 BHT 同法操作。清除率计算公式为:

$$\text{清除率 } Y/\% = [1 - (D_i - D_j)/D_0] \times 100 \quad (2)$$

注: D<sub>0</sub> 为空白对照; D<sub>i</sub> 为某质量浓度黄酮类组分的吸光度; D<sub>j</sub> 为无水杨酸时的吸光度。

##### 1.2.5.2 DPPH 自由基清除活性的测定

参考文献<sup>[12]</sup>, 配制 DPPH 自由基溶液 0.2 mmol/L, DPPH 自由基乙醇溶液在 517 nm 处有紫色基团特征吸收峰。将玛咖叶总黄酮溶液按一定的浓度稀释, 以 L-抗坏血酸和 BHT 做对照。实验分为样品组、对照组和空白组, 加入样品和 DPPH 自由基溶液后, 用涡旋振荡器充分混匀, 避光反应 30 min, 517 nm 处测定吸光度。做 3 次实验平行实验, 取平均值。清除率计算式为:

$$\text{清除率 } Y/\% = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100 \quad (3)$$

注: A<sub>i</sub> 为样品 (2 mL) + DPPH 溶液 (2 mL) 的吸光度; A<sub>j</sub> 为样品 (2 mL) + 无水乙醇 (2 mL) 的吸光度; A<sub>0</sub> 为 DPPH 溶液 (2 mL) + 无水乙醇 (2 mL) 的吸光度。

##### 1.2.5.3 超氧阴离子自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 清除活性的测定

采用邻苯三酚自氧化法<sup>[13]</sup>。取 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液 4.5 mL, 置于 20 °C 水浴中预热 20 min, 分别加入 0.1 mL 不同浓度样品溶液和 5 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL, 混匀后于 25 °C 水浴中反应 5 min, 加入 10 mol/L HCl 溶液 1 mL 终止反应, 320 nm 处测定吸光度 A<sub>i</sub>, 空白对照组以相同体积的去离子水代替样品。做 3 次平行实验, 取平均值。阳性对照用 L-抗坏血酸和 BHT 同法操作。清除率计算式为:

$$\text{清除率 } Y/\% = [(K_0 - K_i)/K_0] \times 100 \quad (4)$$

注: K<sub>0</sub> 为空白的吸光度; K<sub>i</sub> 为样液测定的吸光度。

#### 1.2.6 统计学分析

试验数据以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。采用 Microsoft Office Excel 2007 数据分析工具进行处理, 并用 Duncan 多重比较 (SSR 法) 检验各处理平均数之间的差异显著性 (P < 0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙醇-水浸提取条件选择

乙醇体积分数、料液比、提取温度、时间和次数对玛咖叶总黄酮得率影响的结果如图 1 所示。由图 1A 可知, 随着乙醇体积分数的增大, 玛咖叶黄酮得率呈先升后降的趋势。当乙醇体积分数为 60% 时, 总黄酮得率最高。说明玛咖叶中中等极性的黄酮苷类物质含量较高。当乙醇体积分数大于 60% 时, 溶剂的极性降低, 导致某些黄酮苷的溶解度下降, 并且会增加脂溶性杂质如叶绿素等溶出量, 给后续的分选纯化步骤造成不便。料液比对总黄酮得率的影响结果 (图 1B), 当料液比从 10:1 增加到 30:1 (mL/g) 时, 总黄酮得率有显著增加; 继续提高料液比对玛咖叶黄酮得率无显著影响。提取溶剂过少导致提取液浓度较高, 固液两相浓度梯度小, 使总黄酮不能完全溶出; 而溶剂过多会造成资源浪费并对后续分离纯化步骤不利。提取温度对玛咖叶总黄酮得率的影响结果 (图 1C), 当提取温度从 40 °C 增加到 60 °C 时, 总黄酮得率随着温度的升高而升高, 在 60 °C 时达到最大值; 温度进一步升高, 黄酮得率明显下降。这可能是由于过高的温度会使玛咖叶中的黄酮类化合物氧化变性。提取时间对玛咖叶总黄酮得率的影响结果 (图 1D), 在 90 min 内, 总黄酮得率随着提取时间的延长而增加, 提取时间为

90 min 使得率达到最大。继续延长提取时间对黄酮得率影响不显著 ( $P < 0.05$ )。提取次数对总黄酮得率的影响结果(图 1E), 2 次提取后, 玛咖叶总黄酮的得率为 2.46%, 再增加提取次数黄酮得率无显著提高 ( $P < 0.05$ )。综合以上因素, 确定进行响应面分析的各因素考察范围为乙醇体积分数 50~70%、料液比为 25:1~30:1 (mL/g) 和提取温度 50~70 °C。固定提取时间 90 min, 提取次数 2 次。

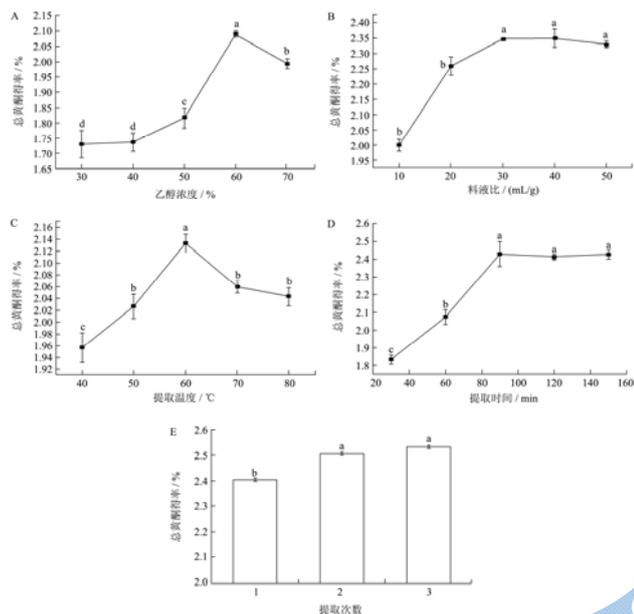


图 1 乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取温度(C)、提取时间(D)和提取次数(E)对总黄酮得率的影响

Fig.1 Effects of alcohol concentration (A), solid-to-solvent ratio (B), extraction temperature (C), time (D) and extraction times (E) on extraction yield of total flavonoids

注: 同一曲线或柱形图中不同的小写字母表示经邓肯氏新复极差检验差异显著 ( $P < 0.05$ ), 试验数据以平均值±标准差表示 ( $n=3$ )。

## 2.2 玛咖叶总黄酮提取工艺优化

### 2.2.1 回归模型的建立及方差分析

根据 1.2.3 节单因素试验结果, 采用乙醇体积分数 ( $X_1$ ), 提取温度 ( $X_2$ ) 和料液比 ( $X_3$ ) 3 因素 3 水平设计 Box-Benhnken 试验中心组合试验。响应面分析方案与结果见表 2。利用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合, 获得以总黄酮得率为响应值的回归方程:

$$Y = 2.44 + 0.11X_1 + 0.11X_2 - 0.075X_3 + 0.14X_1X_2 + 0.020X_1X_3 + 0.040X_2X_3 - 0.15X_1^2 - 0.20X_2^2 - 0.088X_3^2$$

上述回归方程的方差分析结果见表 3。由表 3 的 ANOVA 分析可知: 模型  $P = 0.0007 < 0.001$  (极显著), 失拟项  $P = 0.7862 > 0.05$  (不显著), 说明方程对实验有

较好的拟合性, 实验误差较小。相关系数  $R^2 = 0.9832$  和调整系数  $Adj.R^2 = 0.9530$  也表明模型拟合程度较好, 且总变异中只有 4.7% 不能用此模型解释。1.99% 的变异系数 (CV) 说明模型的重现性很好, 该模型可用于优化玛咖叶总黄酮提取的工艺条件。

表 2 玛咖叶总黄酮得率响应面方案及结果

Table 2 Design and results of RSM for the extraction of total flavonoids

试验编号	实际值			Y (总黄酮得率/%)
	$X_1$ (乙醇体积分数/%)	$X_2$ (提取温度/°C)	$X_3$ [料液比/(mL:g)]	
1	50	50	30:1	2.03
2	70	50	30:1	1.95
3	50	70	30:1	1.94
4	70	70	30:1	2.42
5	50	60	25:1	2.18
6	70	60	25:1	2.38
7	50	60	35:1	1.98
8	70	60	35:1	2.26
9	60	50	25:1	2.13
10	60	70	25:1	2.31
11	60	50	35:1	1.91
12	60	70	35:1	2.25
13	60	60	30:1	2.49
14	60	60	30:1	2.38
15	60	60	30:1	2.45

表 3 响应面回归模型 ANOVA 分析结果

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model analysis of variance table

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.56	9	0.063	32.52	0.0007	***
$X_1$	0.097	1	0.097	50.16	0.0009	***
$X_2$	0.10	1	0.10	52.46	0.0008	***
$X_3$	0.045	1	0.045	23.32	0.0048	**
$X_1X_2$	0.078	1	0.078	40.62	0.0014	**
$X_1X_3$	$1.600 \times 10^{-3}$	1	$1.600 \times 10^{-3}$	0.83	0.4043	
$X_2X_3$	$6.400 \times 10^{-3}$	1	$6.400 \times 10^{-3}$	3.32	0.1218	
$X_1^2$	0.086	1	0.086	44.49	0.0011	**
$X_2^2$	0.15	1	0.15	78.45	0.0003	***
$X_3^2$	0.028	1	0.028	14.65	0.0123	*
残差	$9.650 \times 10^{-3}$	5	$1.930 \times 10^{-3}$			
失拟项	$3.450 \times 10^{-3}$	3	$1.150 \times 10^{-3}$	0.37	0.7862	
纯误差	$6.200 \times 10^{-3}$	2	$3.100 \times 10^{-3}$			
总和	0.57	14				

$R^2 = 0.9832$      $Adj.R^2 = 0.9530$   
CV% = 1.99

注: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

从各个因素的显著性水平差异可知,对玛咖叶总黄酮得率的影响次序为:提取温度  $X_2 >$  乙醇体积分数  $X_1 >$  料液比  $X_3$ 。乙醇体积分数  $X_1$ 、提取温度  $X_2$ 、提取温度的二次项  $X_{22}$  对总黄酮得率的影响都达到了极显著水平 ( $P < 0.001$ );料液比  $X_3$ 、乙醇体积分数和提取温度的交互项  $X_1X_2$ 、乙醇体积分数的二次项  $X_{12}$  对总黄酮的得率有非常显著 ( $P < 0.01$ ) 的影响;料液比的二次项  $X_{32}$  显著 ( $P < 0.05$ ) 影响总黄酮得率。

### 2.2.2 响应面分析及最佳工艺研究

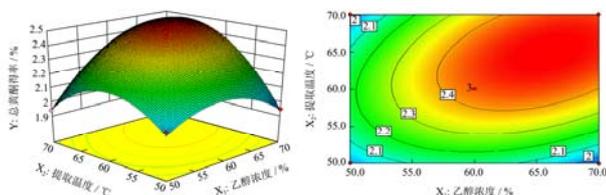


图2 乙醇体积分数和提取温度对得率的响应面分析  
Fig.2 RSM analysis for interactive effects of alcohol concentration and extraction temperature

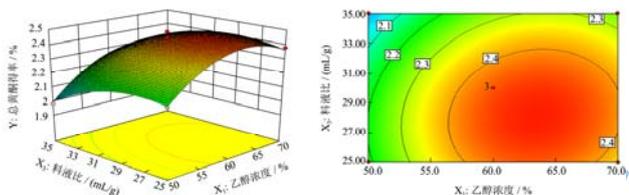


图3 乙醇体积分数和料液比对得率的响应面分析  
Fig.3 RSM analysis for interactive effects of alcohol concentration and solid-to-solvent ratio

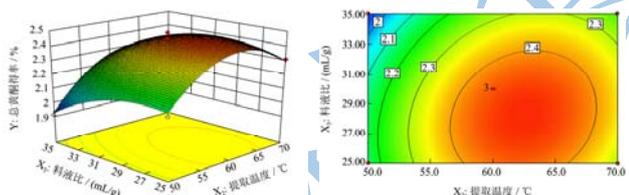


图4 提取温度和料液比对得率的响应面分析  
Fig.4 RSM analysis for interactive effects of extraction temperature and solid-to-solvent ratio

根据回归方程得出不同因子的响应面和等高线结果见图2-4。3D响应面图和二维等高线图可以将回归模型生动的表现出来。从该图可以较明显的分析出多个自变量对响应值的影响,而且还可以分析出响应值对不同自变量变化的敏感程度。在响应面图中,曲面越陡峭,则该因素对响应值的影响越显著。同时,在控制两个自变量之外的因素不变的前提下,两个有交互的两个自变量对响应值的影响也可以从响应面图的曲面上看出。等高线图与响应面图相对应,等高线图随着响应面图的变化而变化,其曲线越接近中心,则对应的响应值也就越大。等高线图形状接近圆形,

表明两个自变量间的交互效应较弱,若等高线的形状接近椭圆形,表明两个自变量间交互作用较强。

图2表示乙醇体积分数和提取温度的交互作用对得率的影响。从图2可以看出,乙醇体积分数、提取温度对得率的影响都是明显的,因为曲面比较陡峭。同时,它们的交互作用也是明显的,等高线是椭圆形。当乙醇体积分数比较低时,得率随提取温度的提高变化的并不明显;当乙醇体积分数在64~66%之间时,得率随着温度的变化而显著提高,且能达到最大值。图3表示乙醇体积分数和料液比的交互作用对得率的影响。由该图可知,虽然乙醇体积分数和料液比对得率的影响是明显的,但它们的交互作用却是不明显的  $P = 0.4043$ ,响应面图曲面陡峭,等高线图接近圆形。从等高线图中还可看出,保持乙醇体积分数不变,料液比太高不利于总黄酮的提取。当料液比为28:1 (mL/g)时,得率可达到最大值。图4表示提取温度和料液比的交互作用对得率的影响。从图4可以看出,提取温度高于65°C时,得率降低。同时,从图3和图4还可以看出,乙醇体积分数和料液比的交互作用与提取温度和料液比的交互作用相比,后者对得率的作用比前者显著,前者更接近圆形,  $P$  值为0.4043和0.1218。

通过软件 Design-Expert 8.0 软件分析得玛咖叶总黄酮的最佳提取条件:当乙醇体积分数为65.45%、提取温度64.40°C、料液比28.67:1 (mL/g)、提取时间90 min、提取次数2次时,玛咖叶总黄酮得率预测可达到最大值2.50%。为实际操作方便,将上述最优提取条件简化为乙醇体积分数为65%、提取温度64°C、料液比29:1 (mL/g)、提取时间90 min、提取次数2次后进行3次重复试验,玛咖叶总黄酮得率平均值为  $(2.49 \pm 0.02)\%$ ,与预测值接近,说明了此响应面法得到的回归模型具有一定的可靠性。

## 2.3 玛咖叶总黄酮的抗氧化活性分析

### 2.3.1 对·OH的清除效果

不同浓度下玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和BHT对·OH的清除率如图5所示。由图5可知,随着玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和BHT质量浓度的增加,对·OH的清除率均逐渐增大,当质量浓度为1.2 mg/mL时,玛咖叶总黄酮和L-抗坏血酸对·OH的清除率接近且达到最大,其清除分别为率91.06%和99.86%;而在该浓度下BHT的清除率只有50.11%;玛咖叶黄酮、L-抗坏血酸清除·OH的  $IC_{50}$  分别为0.605 mg/mL和0.393 mg/L, BHT清除·OH的  $IC_{50}$  约为1.2 mg/mL。可见,玛咖叶总黄酮对·OH的清除活性比L-抗坏血酸弱,但

强于 BHT 的清除活性。

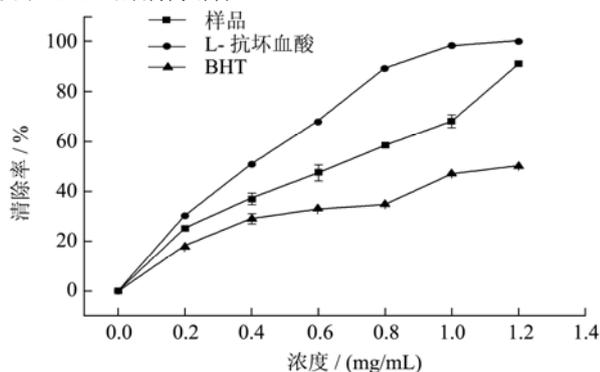


图5 玛咖叶总黄酮对羟自由基的清除效果

Fig.5 Scavenging capacity of total flavonoids extracted from Maca leaves for hydroxyl free radicals

### 2.3.2 对 DPPH 自由基的清除效果

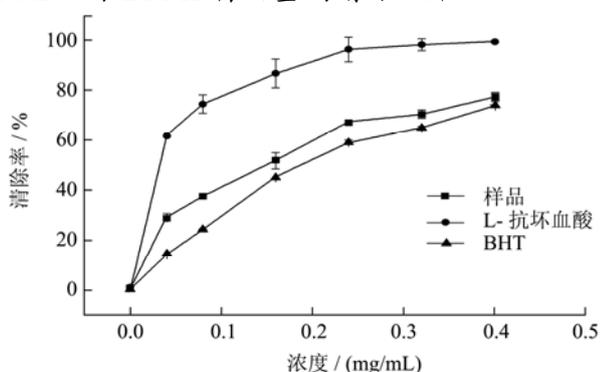


图6 玛咖叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.6 Scavenging capacity of total flavonoids extracted from Maca leaves for DPPH free radicals

玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 对 DPPH 自由基的清除率如图 6 所示。图 6 表明，随着玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 质量浓度的增加，对 DPPH 自由基的清除率均呈上升趋势。当最大实验质量浓度为 0.4 mg/mL 时，玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 对 DPPH 自由基的清除率达到 99.80%，77.33%和 73.91%。玛咖叶黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 清除 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.165，0.028 和 0.203 mg/L，因此，玛咖叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力比 L-抗坏血酸弱，但强于 BHT。

### 2.3.3 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除效果

玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除率如图 7 所示。图 7 表明，玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除率同样随质量浓度的升高而增大。当质量浓度为 0.2 mg/mL 时，L-抗坏血酸对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除率已达到 94.74%；而玛咖叶总黄酮和 BHT 的清除率为 35.91%和 26.23%。当质量浓度大于 0.2 mg/mL 时，玛咖叶总黄酮的清除率上升较快，达到最高质量浓度（1.2 mg/mL）时，对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除率为

92.39%，而 BHT 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除率只有 61.98%。玛咖叶总黄酮、L-抗坏血酸和 BHT 清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.425 mg/mL，0.105 mg/mL 和 0.806 mg/mL。可见，玛咖叶总黄酮清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 基的能力也是比 L-抗坏血酸弱，强于 BHT。

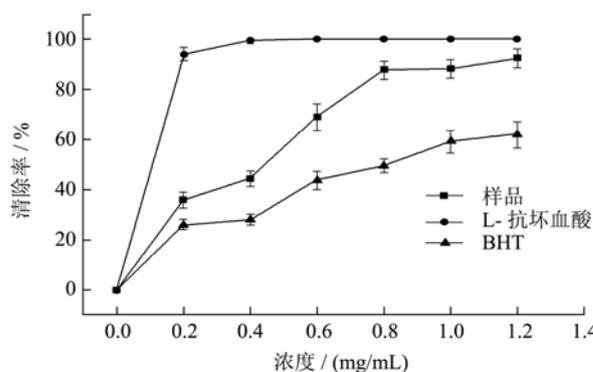


图7 玛咖叶总黄酮对超氧阴离子自由基的清除效果

Fig.7 Scavenging capacity of total flavonoids extracted from Maca leaves for superoxide anion free radicals

综上所述，玛咖叶总黄酮对·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>、DPPH 自由基均具有较强的抑制作用，其抑制率随质量浓度的增加而增大、具有一定的量效关系、抑制效果优于等质量浓度的BHT溶液，但比L-抗坏血酸的抑制效果差。造成这种结果的原因是，黄酮类物质是多羟基化合物，且大部分具有一定程度的共轭结构，具有较好的抗氧化性。而实验所用的玛咖叶总黄酮的纯度并非足够高，还有一定的杂质影响实验结果。下一步实验应对玛咖叶总黄酮提取物进行纯化和分离，进一步确定其中的抗氧化有效成分结构。从IC<sub>50</sub>比较，玛咖叶总黄酮对于3种自由基清除能力从高到低的顺序为DPPH自由基 > O<sub>2</sub><sup>-</sup> > ·OH，表明玛咖叶总黄酮对不同的自由基的清除能力不同。这是由于黄酮类化合物对自由基清除作用的强弱与其结构有关<sup>[14]</sup>，羟基的数量、位置直接影响其抗氧化活性，黄酮类化合物是通过酚羟基与O<sub>2</sub><sup>-</sup>作用，认为B环4'-OH和母核上Δ<sup>2(3)</sup>双键是清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>的主要部位，而B环邻二羟基则是清除·OH的关键功能基团，如果4'-OH甲基化后则清除羟自由基活力下降。

## 3 结论

3.1 采用响应面法优化了超声辅助提取玛咖叶总黄酮的工艺，最佳提取工艺条件为乙醇体积分数为65%、提取温度 64 °C、料液比 29:1 (mL/g)。在此条件下，玛咖叶总黄酮得率为 (2.49±0.02) %，与预测值 2.50% 基本一致。影响玛咖叶总黄酮得率大小的因素主次顺序为：提取温度>乙醇体积分数>料液比。其中乙醇体积分数与提取温度因素之间的交互作用显著。

3.2 玛咖叶总黄酮可以有效清除 DPPH 自由基、·OH

和  $O_2^{\cdot-}$ ，且量效关系显著，其清除自由基的能力高于 BHT；对 3 种自由基清除能力不同，由强到弱依次为 DPPH 自由基  $> O_2^{\cdot-} > \cdot OH$ 。

3.3 玛咖叶原料较丰富、总黄酮含量较高、玛咖叶总黄酮类清除自由基能力较强、黄酮化合物又具有多种生理活性功能，值得深入开发利用研究。

### 参考文献

- [1] Rondán-Sanabria G G, Finardi-Filho F. Physical-chemical and functional properties of maca root starch (*Lepidium meyenii* Walpers) [J]. Food Chemistry, 2009, 114: 492-498
- [2] Wang Y L, Wang Y C, McNeil B, et al. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions [J]. Food Research International, 2007, 40(7): 783-792
- [3] Yabar E, Pedreschi R, Chirinos R, et al. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying [J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1576-1583
- [4] 李磊,周昇昇.玛咖的食品营养与安全评价及开发前景[J].食品工业科技,2012,33(5):376-379  
LI Lei, ZHOU Sheng-sheng. Nutrition, Food Security Assessment and Development Prospects of Maca [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(5): 376-379
- [5] 杜萍,单云,孙卉,等.云南玛咖营养成分分析[J].食品科学,2010,31(24):345-347  
DU Ping, SHAN Yun, SUN Hui, et al. Nutritional Compositions in Fruit of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) Cultivated in Yunnan [J]. Food Chemistry, 2010, 31(24): 345-347
- [6] Choi, E H, Kang J, Cho J Y, et al. Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(2): 568-573
- [7] 杨少华,李国政,薛润光,等.云南玛咖产业发展现状及促进对策分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2012, 14(4): 1921-1924  
YANG Shao-hua, LI Guo-zheng, XUE Run-guang, et al. Present Situation and Promoting Strategies of Maca Industry in Yunnan Province [J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2012,14(4): 1921-1924
- [8] Campos D, Chirinos R, Barreto O, et al. Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*) [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 49: 747-754
- [9] 周晓明,闫鹏,马凯,等.响应面法优化超声波辅助提取玛咖总黄酮的工艺研究[J].新疆农业科学,2012,49(8): 1414-1420  
ZHOU Xiao-ming, YAN Peng, MA Kai, et al. Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Flavonoids from Maca by Response Surface Methodology [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2012, 49(8): 1414-1420
- [10] 张黎明,李春莲.大孔吸附树脂分离纯化山楂叶总黄酮的研究[J].林产化学与工业,2006,26(1):87-90  
ZHANG Li-ming, LI Chun-lian. Study on Separation and Purification of Total Flavones of Hawthorn Leaves by Macroporous Adsorption Resins [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2006, 26(1): 87-90
- [11] Smirnov N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060
- [12] 吴琼英,贾俊强.柚皮黄酮的超声辅助提取及其抗氧化性研究[J].食品科学,2009,30(2):29-33  
WU Qiong-ying, JIA Jun-qiang. Study on ultrasonic-assisted extraction and antioxidation of Pomelo peel flavonoids [J]. Food Science, 2009, 30(2): 29-33
- [13] WANG Hui-qin, XIE Ming-yong, FU Zhi-hong, et al. Studies on the antioxidant activity of carthamin from safflower (*Carthamus tinctorius* L) [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2003, 22(5): 98-101
- [14] Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10): 572-584