

马牙七总黄酮提取工艺及其抗氧化活性、稳定性研究

陈静¹, 王维², 侯少平³, 奚军伟^{1*}

1. 陕西省药品不良反应监测中心, 陕西 西安 710065; 2. 陕西省药品和疫苗检查中心, 陕西 西安 710065;
3. 陕西国际商贸学院, 陕西 西安 712046

摘要 目的: 优化马牙七总黄酮提取工艺并研究其抗氧化活性及其稳定性。方法: 采用 Plackett - Burman 试验筛选关键因子, 再经 Box - Behnken Design 响应面设计得到最佳工艺; 通过测定羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除作用及铁离子还原能力评价马牙七总黄酮的抗氧化活性, 经 SPSS 软件分析马牙七总黄酮提取物浓度和不同抗氧化活性的相关性, 并考察温度、光照和 pH 对抗氧化活性稳定性的影响。结果: 马牙七总黄酮最佳提取工艺为提取功率 140 W, 乙醇浓度 65%, 温度 70 °C, 提取时间 30 min, 马牙七总黄酮得率为 (4.6085 ± 0.0317) mg/g。马牙七总黄酮提取物对羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除作用及铁离子最大还原能力分别为同浓度 Vc 的 64.16%、55.67%、95.97% 和 50.49%。相关性分析表明, 马牙七总黄酮提取物浓度与羟自由基的清除率相关性最显著。抗氧化稳定性试验表明, 马牙七总黄酮提取物应在低温 (25 °C 以下)、避光及中性条件下保存。结论: 该工艺稳定可行, 马牙七总黄酮提取物具有很高的抗氧化活性。

关键词 马牙七; 总黄酮; 抗氧化; 相关性; 稳定性

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 2392 (2026) 07 - 0025 - 08

DOI: 10.19664/j.cnki.1002 - 2392.260136

马牙七, 别称九子连、大仙茅, 为兰科植物流苏虾脊兰 (*Calanthe fimbriata* Franch.) 和剑叶虾脊兰 (*Calanthe davidii* Franch.) 的假鳞茎及根^[1], 主要分布于陕西、甘肃等地区, 其为“太白七药”之一, 性凉, 味辛、苦, 具有清热解毒、祛瘀止痛的功效^[2], 民间常用来治疗因炎症引起的牙痛、喉咙肿痛等症状^[3]。最新研究^[4-6]表明, 马牙七提取物具有一定的抑菌、抗氧化等作用, 为进一步研究其活性, 本研究主要探讨马牙七总黄酮提取物最佳提取工艺及其抗氧化活性, 为马牙七药用资源利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

马牙七, 采自太白山红河谷, 原植物经陕西国际商贸学院雷国莲教授鉴定为兰科植物流苏虾脊兰 (*Calanthe fimbriata* Franch.)。

甲醇 (批号: 20230312, 分析纯)、乙醇 (批号:

20230408, 分析纯)、亚硝酸钠 (批号: 20230711, 分析纯)、硝酸铝 (批号: 20231005, 分析纯)、三氯化铁 (批号: 20230518, 分析纯)、硫酸亚铁 (批号: 20230416, 分析纯) 等, 生产厂家为国药集团化学有限公司; 抗坏血酸 (批号: O11HS197212)、DPPH (1,1 - 二苯基苦基苯肼, 批号: S28J12M138964)、ABTS [2,2 - 联氮 - 二 (3 - 乙基 - 苯并噻唑 - 6 - 磺酸) 二铵盐, 批号: N04HS199908] 等试剂, 生产厂家为上海源叶生物科技有限公司, 试验用水为纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

RE - 2000A 旋转蒸发仪, 上海亚荣科学仪器有限公司; DLSB - 5/20B 低温冷却循环泵, 郑州长城科工贸有限公司; SHB - III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; SQP 万分之一天平, 北京赛多利斯; YP202N 电子天平, 上海精科仪器有限公司; DZ - 1BCIV 真空干燥箱, 天津泰斯特仪器有限公司; WPL - 30BE 恒温培养箱, 天津泰斯特仪器有限公司; TU - 1810 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 芦丁标准曲线的制备

称取芦丁对照品 50 mg, 用甲醇将其配制成

收稿日期: 2024 - 09 - 03 修回日期: 2026 - 02 - 25

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2018ZX19721005 - 004 - 007)

作者简介: 陈静 (1983 -), 女, 主管药师, 从事药品监管相关工作。

* 通信作者: 奚军伟 (1979 -), 男, 副主任药师, 从事药品监管相关工作。

0.2 mg/mL 的标准溶液,分别量取 1、2、3、4、5、6 mL 标准溶液至 10 mL 容量瓶中定容,得到不同梯度浓度的标准溶液^[7-8],按药典中 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法,在波长 510 nm 处分别测定吸光度 A ,以浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $y = 0.004x + 0.1389$, $R^2 = 0.9995$,线性关系在 0.02 ~ 0.12 mg/mL 有效。

1.3.2 马牙七提取物中总黄酮提取率的计算

取 10 mL 提取液用甲醇定溶于 100 mL 容量瓶中,参考文献^[8]中 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法,测定溶液的吸光度,根据公式(1)计算马牙七总黄酮提取物的提取率。

$$Y = \frac{C \times V \times N}{M} \quad (1)$$

式中, Y 为黄酮提取率 (mg/g), C 为总黄酮浓度 (mg/mL), V 为溶液体积 (mL), N 为稀释倍数, M 为药材取量 (g)。

1.3.3 马牙七总黄酮提取物提取方法

1.3.3.1 提取因素筛选

采用超声辅助法提取马牙七中的总黄酮,在此过程中影响提取率的因素有超声功率(80、100、120、140、160、180 W)、提取次数(1、2、3、4、5、6 次)、超声时间(10、20、30、40、50、60 min)、超声温度(10、30、50、70、90、100 °C)、料液比(1:8、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18)、乙醇浓度(10%、30%、50%、70%、90%、100%)、溶液 pH 值(2、3、4、5、6、7),先通过最陡爬坡试验设计确定各因素的最佳取值范围,再通过 Plackett - Burman 试验设计筛选出对马牙七总黄酮提取物提取率影响显著的因素。

1.3.3.2 马牙七总黄酮提取物最佳提取工艺确定

根据“1.3.3.1”优选结果建立因素水平表,通过 BBD(Box - Behnken Design)响应面试验设计确定马牙七总黄酮提取物的最佳提取工艺。

1.3.4 马牙七总黄酮提取物抗氧化能力测定及相关性分析

1.3.4.1 对羟自由基的清除作用

将马牙七总黄酮提取物用去离子水配制成 20 mg/mL 溶液,稀释成不同倍数的样品溶液。加入 6 mmol/L 硫酸亚铁溶液、水杨酸溶液以及过氧化氢溶液各 2 mL,充分混合,在 37 °C 恒温条件下反应 1 h,在波长为 510 nm 下测定各混合液的吸光度^[9]。空白组以去离子水代替样品溶液,以维生素 C 为阳性对照。根据公式(2)计算马牙七总黄酮提取物对羟自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

公式中, A_0 为空白组吸光度; A_1 为待测溶液吸光度; A_2 为对照组的吸光度。

1.3.4.2 对 DPPH 自由基的清除作用

将马牙七总黄酮提取物用去离子水配制成不同浓度的样品溶液^[9-11]。取样品溶液与 0.2 mmol/L DPPH 溶液各 2 mL,充分混匀后,在 519 nm 处测定其吸光度。空白组以去离子水代替样品溶液,对照组以去离子水代替 DPPH 溶液,以维生素 C 为阳性对照,根据公式(2)计算马牙七总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除率。

1.3.4.3 对 ABTS 自由基的清除作用

将马牙七总黄酮提取物用去离子水配制成 2、4、6、8、10、12 mg/mL 溶液,配制 7 mmol/L ABTS⁺ 水溶液,取样品溶液与 7 mmol/L ABTS⁺ 水溶液各 2 mL,充分混匀后,在 734 nm 处测定其吸光度。空白组以去离子水代替样品溶液,对照组以去离子水代替 ABTS⁺ 水溶液,以维生素 C 为阳性对照,依照公式(2)测定不同试验组溶液的吸光度并计算马牙七总黄酮提取物对 ABTS 自由基的清除率。

1.3.4.4 铁离子还原能力的测定

参考文献^[12],取不同浓度的溶液 2 mL,分别加入 2 mL 0.2 mol/mL pH = 6.6 的磷酸盐缓冲液和 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液,振荡均匀,在 50 °C 水浴中反应 30 min,待反应完全后,加入 2 mL 10% 三氯乙酸。吸取 2 mL 的混合溶液,并加入 2 mL 纯化和 0.5 mL 的 0.1% 的三氯化铁溶液,生成蓝色沉淀,在 700 nm 波长处测定其吸光度。以维生素 C 为阳性对照组。

1.3.4.5 马牙七总黄酮与抗氧化活性相关性研究

将总黄酮提取物与不同抗氧化活性进行 pearson 相关性分析,以得到其显著性。

1.3.5 马牙七总黄酮提取物抗氧化活性稳定性研究

1.3.5.1 温度对抗氧化活性的影响

取 10 mL 浓度为 12 mg/mL 和 4 mg/mL 马牙七总黄酮提取物溶液于 5 支试管中,1 号试管放置在 4 °C 冰箱保存,2 号室温(25 °C)条件下,3 ~ 5 号试管分别放置在 40 °C、60 °C、80 °C 恒温水浴锅中,每间隔 15 min,测定 1 次羟自由基清除率,测定时应冷却至室温,共计 1.25 h,重复试验 3 次。

1.3.5.2 光照对抗氧化活性的影响

分别取 10 mL 浓度为 12 mg/mL 和 4 mg/mL 马牙七总黄酮提取物溶液于 3 支试管中,将 A 试管置于光照环境下、B 试管置于室内、C 试管置于避光条件下,

每间隔 2 h 测定 1 次羟自由基清除率,共计 10 h,重复试验 3 次。

1.3.5.3 pH 值对抗氧化活性的影响

分别取 4 mL 浓度为 12 mg/mL 和 4 mg/mL 马牙七总黄酮提取物溶液于 3 支试管中,分别加入 1 mL pH 值为 1、3、5、7、9 磷酸缓冲液。混合,于 25 ℃ 恒温水浴,15 min 后,测定羟自由基清除率,重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 28.0 进行 Pearson 相关性

分析与绘图,Minitab 21.0 完成 Plackett – Burman 及响应面数据分析, $P < 0.05$ 为显著水平。

2 结果

2.1 马牙七总黄酮提取物最佳提取工艺

2.1.1 最陡爬坡试验结果

经预试验确定各因素总的取值范围,设计最陡爬坡试验,结果如表 1,选取第 4 组数据作为各因素的试验定点,通过 1.25 倍原则,计算出各因素的低水平值,Plackett – Burman 试验设计因素水平表见表 2。

表 1 最陡爬坡试验结果

序号	料液比	提取次数	提取时间/min	pH 值	温度/℃	乙醇浓度/%	提取功率/W	总黄酮得率($\bar{x} \pm s$)/(mg/g)
1	1:8	1	10	2	10	10	80	2.893 3 ± 0.063 4
2	1:10	2	20	3	30	30	100	3.412 0 ± 0.007 3
3	1:12	3	30	4	50	50	120	3.806 0 ± 0.011 8
4	1:14	4	40	5	70	70	140	4.375 2 ± 0.049 5
5	1:16	5	50	6	90	90	160	2.928 0 ± 0.006 8
6	1:18	6	60	7	100	100	180	1.753 3 ± 0.008 8

表 2 Plackett – Burman 试验设计因素水平表

水平/因素	料液比	提取次数	提取时间/min	pH 值	温度/℃	乙醇浓度/%	提取功率/W
1	1:14	4	40	4	70	70	140
-1	1:12	3	30	3	50	50	120

2.1.2 Plackett – Burman 试验设计结果

Plackett – Burman 试验是基于二水平的部分实验设计,是在不考虑主效应及因素间的交互作用条件下筛选影响显著的因素。试验设计 12 组数据,结果如表 3。回归方程为:总黄酮得率 = 123.189 – 0.145 8 料液比 – 0.048 0 次数 + 0.190 1 时间 – 0.049 2 pH + 0.332 2 温度 + 0.278 4 乙醇浓度 + 0.342 1 提取功率,表 4 中方差分析结果中,模型 P 值 < 0.05 ,标准差 S 值

为 0.208 825,表明模型显著且拟合度较高, R^2 值为 96.19%,调整后的 R^2 值为 89.52%,二者相差 6.67%,表明模型解释度较高。其中提取功率、乙醇浓度、温度和提取时间 P 值均 < 0.05 ,表明这 4 种因素对马牙七总黄酮提取物提取率影响显著,亦如图 1 结果所示。因此选取提取功率、乙醇浓度、温度和提取时间作为响应面设计的因素。

表 3 Plackett – Burman 试验设计结果

序号	料液比	提取次数	提取时间/min	pH 值	温度/℃	乙醇浓度/%	提取功率/W	总黄酮得率($\bar{x} \pm s$)/(mg/g)
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	3.521 3 ± 0.001 7
2	1	1	1	-1	1	1	-1	3.392 0 ± 0.001 6
3	-1	1	1	1	-1	1	1	3.980 6 ± 0.002 6
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2.696 0 ± 0.006 3
5	-1	-1	1	1	1	-1	1	4.090 7 ± 0.002 6
6	1	1	-1	1	1	-1	1	3.242 4 ± 0.004 9
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.776 9 ± 0.002 8
8	-1	1	1	-1	1	-1	-1	3.562 6 ± 0.002 3
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	4.836 9 ± 0.004 3
10	-1	-1	-1	1	1	1	-1	3.620 3 ± 0.009 9
11	1	-1	1	1	-1	1	-1	3.098 3 ± 0.004 4
12	1	-1	1	-1	-1	-1	1	3.287 7 ± 0.008 0

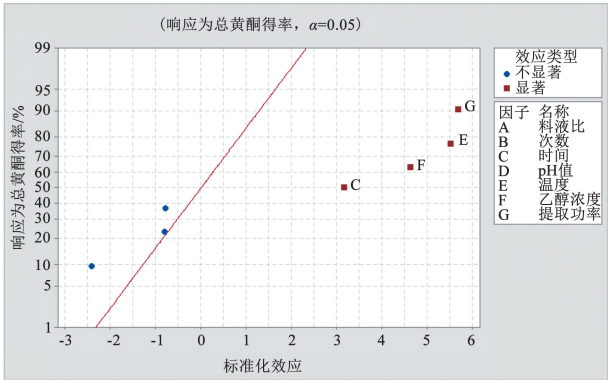


图 1 Plackett – Burman 试验设计结果标准化效应图

表 4 Plackett – Burman 试验设计结果方差分析

来源	自由度	平方和	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	7	4.404 58	0.629 23	14.43	0.011
料液比	1	0.255 07	0.255 07	5.85	0.073
提取次数	1	0.027 70	0.027 70	0.64	0.470
时间	1	0.433 84	0.433 84	9.95	0.034
pH 值	1	0.029 01	0.029 01	0.67	0.460
温度	1	1.323 92	1.323 92	30.36	0.005
乙醇浓度	1	0.930 37	0.930 37	21.34	0.010
提取功率	1	1.404 68	1.404 68	32.21	0.005
误差	4	0.174 43	0.043 61		
合计	11	4.579 01	–		

$R^2 = 96.19\%$ $R^2_{adj} = 89.52\%$ $S = 0.208\ 825$

2.1.3 BBD(Box – Behnken Design) 响应面试验结果

根据“2.1.1”结果可得出提取功率、乙醇浓度、温度和提取时间 4 因素 3 水平的取值,见表 5,字母 A、B、C、D 分别代替以上因素。试验设计 5 个中心点,共 29 组,见表 6,得到的回归方程为:总黄酮得率 = $3.66 + 0.44A + 0.17B + 0.16C + 0.19D + 0.007\ 5AB - 0.007\ 5AC - 0.42AD + 0.46BC + 0.14BD - 0.31CD + 0.13A^2 - 0.29B^2 - 0.29C^2 + 0.017D^2$ 。如表 7 响应面结果方差分析所示,模型 *P* 值 < 0.01,结果极显著,失拟性 *P* 值 > 0.05,不显著,表示该模型显著; R^2 值为 0.909 0, R^2_{adj} 为 0.817 9,二者相差 0.991 1 < 0.2,表明试验方程预测误差小,拟合度高;变异系数为 6.34,数值较小,信噪比为 11.786 > 4,说明试验精密度高,重复性好。4 种影响因素 *P* 值均 < 0.05,对总黄酮得率的影响显著,大小顺序为 A(提取功率) > D(提取时间) > B(乙醇浓度) > C(温度),其中 AD、BC 和 CD 交互作用明显。

表 5 响应面设计因素水平表

水平/因素	A/W	B/%	C/℃	D/min
1	140	70	70	40
0	130	60	60	35
–1	120	50	50	30

表 6 响应面试验设计及结果

序号	因素				总黄酮得率 ($\bar{x} \pm s$) / (mg/g)
	A/W	B/%	C/℃	D/min	
1	–1	–1	0	0	2.751 9 ± 0.006 0
2	1	0	0	–1	4.696 5 ± 0.004 5
3	1	0	–1	0	3.632 0 ± 0.003 8
4	–1	0	0	–1	2.865 1 ± 0.004 8
5	0	0	–1	–1	2.494 0 ± 0.006 0
6	1	1	0	0	4.324 4 ± 0.010 5
7	0	0	0	0	3.581 2 ± 0.002 7
8	0	1	0	1	3.804 8 ± 0.014 9
9	0	1	1	0	3.693 4 ± 0.005 2
10	–1	0	1	0	3.234 4 ± 0.005 3
11	0	–1	0	–1	3.090 2 ± 0.005 7
12	0	–1	0	1	3.177 6 ± 0.006 3
13	0	0	1	–1	3.693 5 ± 0.006 7
14	0	1	–1	0	2.670 2 ± 0.003 1
15	–1	0	–1	0	2.954 9 ± 0.003 9
16	0	–1	1	0	2.664 2 ± 0.005 6
17	0	0	–1	1	3.760 9 ± 0.001 6
18	–1	1	0	0	3.294 5 ± 0.005 3
19	–1	0	0	1	3.853 0 ± 0.005 7
20	0	0	0	0	3.487 6 ± 0.005 0
21	0	0	0	0	3.806 1 ± 0.017 7
22	0	0	0	0	3.951 1 ± 0.010 2
23	0	0	1	1	3.732 5 ± 0.003 2
24	1	0	0	1	4.006 3 ± 0.021 7
25	0	0	0	0	3.452 0 ± 0.003 7
26	1	–1	0	0	3.754 1 ± 0.005 0
27	0	–1	–1	0	3.468 6 ± 0.004 2
28	0	1	0	–1	3.173 1 ± 0.004 9
29	1	0	1	0	3.881 5 ± 0.001 0

图 2 响应面设计结果等高线及曲面图中,从等高线椭圆程度和 3D 曲面陡峭程度来判断各因素交互作用及对总黄酮得率的影响,图示结果与方差分析结果吻合。图 2 结果可以得出提取功率的最佳取值范围为 130 ~ 140 W,乙醇浓度的最佳取值范围为 60% ~ 70%,温度的最佳取值范围为 60 ~ 70 ℃,提取时间的

最佳取值范围为 30 ~ 40 min。响应面设计得到的最佳工艺为:提取功率 139.99 W,乙醇浓度 63.85%,温度 69.05 ℃,提取时间 30.62 min,总黄酮得率为 4.724 51 mg/g,根据实验实际操作性,将工艺优化为

提取功率 140 W,乙醇浓度 65%,温度 70 ℃,提取时间 30 min,进行 3 次平行试验进行验证,总黄酮得率为 (4.608 5 ± 0.031 7)mg/g,与理论值比较接近,表明该工艺数据可靠。

表 7 响应面设计结果的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14	6.79	0.49	9.98	<0.000 1	* *
A	1	2.37	2.37	48.73	<0.000 1	* *
B	1	0.36	0.36	7.42	0.016 5	*
C	1	0.30	0.30	6.26	0.025 4	*
D	1	0.46	0.46	9.39	0.008 4	* *
AB	1	0.000 225	0.000 225	0.004 361	0.946 7	
AC	1	0.000 225	0.000 225	0.004 361	0.946 7	
AD	1	0.71	0.71	14.70	0.001 8	* *
BC	1	0.84	0.84	17.23	0.001 0	* *
BD	1	0.078	0.078	1.61	0.224 7	
CD	1	0.38	0.38	7.78	0.014 5	*
A ²	1	0.11	0.11	2.20	0.159 8	
B ²	1	0.55	0.55	11.25	0.004 7	* *
C ²	1	0.54	0.54	11.15	0.004 9	* *
D ²	1	0.001 93	0.001 93	0.04	0.844 9	
残差	14	0.68	0.049			
失拟性	10	0.49	0.049	1.04	0.531 0	
纯误差	4	0.19	0.047			
总差	28	7.47	—			

注: * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ 。

2.2 马牙七总黄酮提取物抗氧化能力测定结果

2.2.1 对羟自由基的清除作用

羟自由基具有很强的活泼性,其更易于同体内的大分子物质发生作用而破坏组织的整体结构与功能,从而影响人体正常的新陈代谢^[9]。从图 3 结果可知,在一定范围内,随浓度增大,马牙七总黄酮提取物对羟自由基的清除能力逐渐增大,当提取物浓度在 12 mg/mL 时,其对羟自由基的清除能力为同浓度 Vc 的 64.16%,表明马牙七总黄酮提取物对羟自由基具有一定的清除能力。

2.2.2 对 DPPH 自由基的清除作用

DPPH 自由基在人体内比较稳定,但含量过多也会引起肿瘤、心脑血管等疾病^[9],清除 DPPH 自由基主要通过氢原子和单电子转移来实现^[13]。从图 4 结果可知,在一定范围内,随浓度增大,马牙七总黄酮提取物对 DPPH 自由基清除能力逐渐增强,当提取物浓度在 12 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基的清除率是同浓

度下 Vc 的 55.67%,表明马牙七总黄酮提取物对 DPPH 自由基也具有一定的清除能力。

2.2.3 对 ABTS 自由基的清除作用

ABTS 自由基的清除主要依靠氢原子转移使体系的吸光度降低,与提取物中的黄酮类和多酚类物质的含量有关^[14]。图 3 中,马牙七总黄酮提取物对 ABTS 自由基的清除与其浓度成正效应,提取物浓度在 12 mg/mL 时,其对 ABTS 自由基的清除率是同浓度下 Vc 的 95.97%,这表明马牙七总黄酮提取物对 ABTS 自由基具有很高的清除能力。

2.2.4 铁离子还原能力的测定结果

对马牙七总黄酮提取物铁离子还原能力的测定也是考察其抗氧化能力的重要方法之一。马牙七总黄酮提取物铁离子还原能力与其浓度也有明显的量效关系,在 1 ~ 6 mg/mL 范围内,其还原能力的最大值为同浓度下 Vc 的 50.49%,这表明马牙七总黄酮提取物具有一定的还原性。

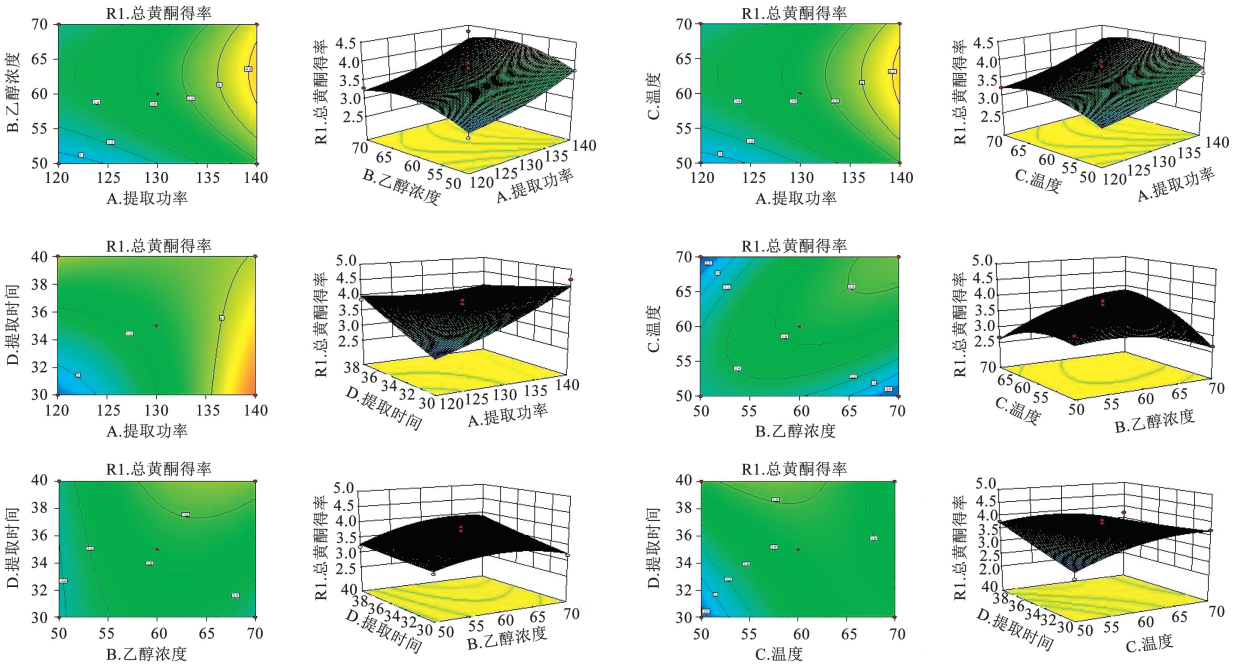
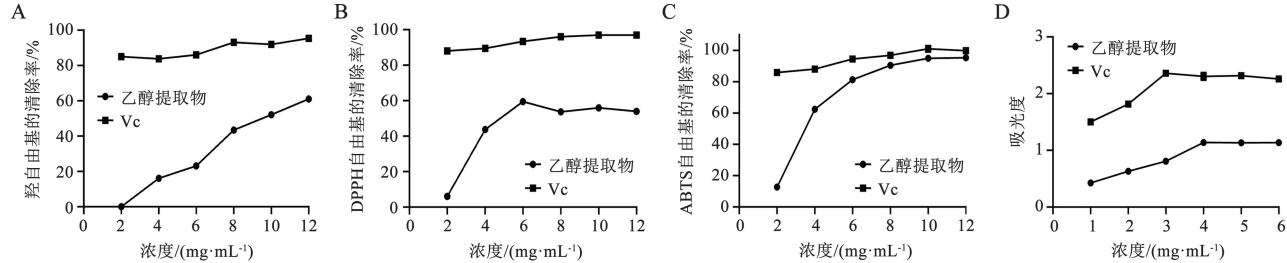


图 2 响应面设计结果等高线及曲面图



注: A. 羟自由基的清除率; B. DPPH 自由基的清除率; C. ABTS 自由基的清除率; D. 铁离子还原能力。

图 3 马牙七总黄酮提取物抗氧化活性

2.2.5 相关性分析

采用 Pearson 相关分析考察马牙七总黄酮提取物浓度与不同抗氧化活性的相关性,结果表明,马牙七总黄酮提取物浓度与不同抗氧化活性均呈正相关,其中显著性强弱顺序依次为:羟自由基的清除率 > ABTS 自由基的清除率 > DPPH 自由基的清除率 > 铁离子还原能力。

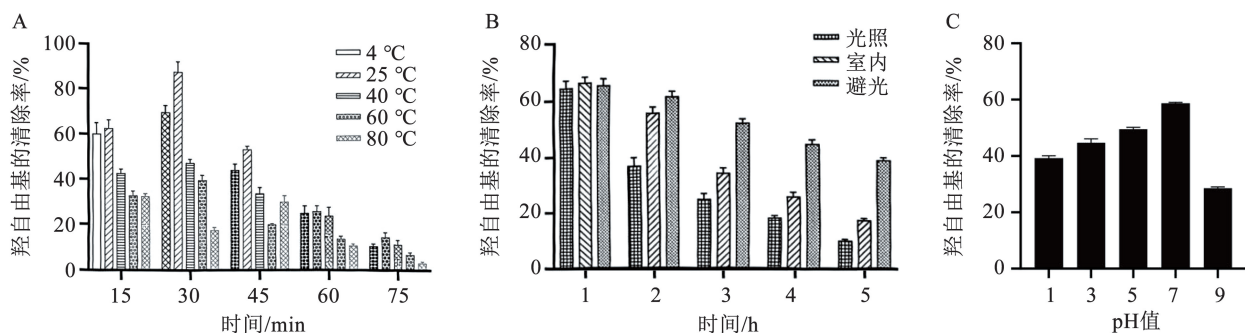
2.3 马牙七总黄酮提取物抗氧化活性稳定性测定结果

由图 4A 可知,在低温环境中,马牙七总黄酮提取物的抗氧化活性被抑制,在 25 ℃ 时,活性均最高,而后随温度升高其抗氧化活性呈下降趋势;同一温度随时

间的增加其抗氧化活性逐渐降低,尤其在 45 min 后活性急剧下降,在温度为 80 ℃,加热时间为 75 min 时,其抗氧化活性接近于 0,结果表明,温度对马牙七总黄酮提取物的抗氧化活性影响较为显著,温度越高,加热时间越长,抗氧化活性越低。

图 4B 的结果表明,在光照条件下,随时间增加马牙七总黄酮提取物的抗氧化活性呈下降趋势,说明马牙七总黄酮提取物对光敏感,须避光保存。

由图 4C 可知,pH 值 1 ~ 7 范围内,马牙七总黄酮提取物对羟自由基的清除率逐渐增加,由此可见,马牙七总黄酮提取物在中性条件下的抗氧化活性比较稳定。



注:A. 温度对羟自由基清除率稳定性的影响;B. 光照对羟自由基清除率稳定性的影响;C. pH 值对羟自由基清除率稳定性的影响。

图4 马牙七总黄酮提取物抗氧化活性稳定性

3 结论

试验基于 Plackett – Burman 和 Box – Behnken Design 响应面设计,得到马牙七总黄酮最佳提取工艺为提取功率 140 W,乙醇浓度 65%,温度 70 °C,提取时间 30 min;通过对羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除作用及铁离子还原能力的测定,表明马牙七总黄酮提取物具有较强的抗氧化活性,由于总黄酮提取物除黄酮类物质外还有其他活性成分,总黄酮提取物浓度与不同抗氧化活性相关性的进一步分析,表明马牙七总黄酮是其主要的抗氧化物质之一;抗氧化稳定性试验表明,温度对马牙七总黄酮提取物的抗氧化活性影响较为显著,其中性条件下的抗氧化活性比较稳定,对光敏感,须避光保存。

马牙七为秦岭地区特有的药材之一,至今尚未有其总黄酮提取工艺及活性方面的研究,提取工艺设计方法主要有正交设计法^[15]、单因素 – 响应面法^[16]和 Plackett – Burman 联合 Box – Behnken Design 响应面设计^[17]等,响应面设计由于考虑各因子的相互作用,其设计结果往往由于正交设计^[18],通过 Plackett – Burman 试验筛选出关键因素,再经 Box – Behnken Design 响应面设计得到最佳工艺,可减少试验次数^[19],也可弥补由于单因素 – 响应面法中由于单因素选取不当引起的响应面模型不显著等问题^[8]。抗氧化活性的评价表明,马牙七总黄酮提取物对 ABTS 自由基的清除作用最强,但从相关性分析来看,其对 ABTS 自由基的清除作用的显著性低于对羟自由基的清除作用,进一步说明相关性分析的必要性。本研究结果为马牙七资源的合理利用及深度开发提供理论依据。

参考文献:

[1] 宋小妹,刘海静. 太白七药研究与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:28 – 29.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第 10 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:3243 – 3244.

[3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编:上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:328 – 329.
[4] 姜祎,徐虹,李稳柱,等. 马牙七提取物体外抗菌研究[J]. 陕西中医,2015,36(8):1073 – 1074.
[5] 姜祎,徐虹,李稳柱,等. GC – MS 分析马牙七中挥发性化学成分[J]. 陕西中医,2015,36(9):1251 – 1252.
[6] 王晓梅,赵岩,王金锁,等. 太白草药马牙七的成分鉴定及抗氧化作用[J]. 中国野生植物资源,2018,37(6):32 – 34.
[7] 侯少平,侯敏娜. 陕西兴平不同品种玉米须中总黄酮含量分析[J]. 陕西农业科学,2017,63(1):17 – 18.
[8] 侯少平,侯敏娜,周蕊. PB 实验及响应面法优化山刺玫果总黄酮的提取工艺[J]. 化学与生物工程,2021,38:55 – 61.
[9] 吴翠芳,刘雅宜,李宇辉,等. 沙棘中黄酮类化合物提取及抗氧化活性[J]. 安徽科技学院学报,2024,38(1):88 – 96.
[10] 张飞,李钰景,彭春秀,等. 玫瑰花红茶发酵工艺以及水提物的非靶向代谢组学分析及体外抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业,2024,50(20):216 – 225.
[11] 李佳敏,李嘉豪,陈相忠,等. 广陈皮精油的抗氧化活性研究及其应用[J]. 广东化工,2024,51(2):38 – 41.
[12] 马孟佳,赵娟,陈鹏飞,等. 4 种不同来源花青素的稳定性及抗氧化性比较[J]. 食品研究与开发,2024,45(4):31 – 39,67.
[13] 黄嘉玲,胡瑜文,陆倩,等. 盐效应辅助水蒸气蒸馏法提取丁香精油及抗氧化活性评价[J]. 核农学报,2024,38(3):512 – 521.
[14] 张子杰,田益玲,夏君霞,等. 核桃多肽结构表征及抗氧化活性[J]. 食品科学,2024,45(9):1 – 8.
[15] 孙勤羽,董志远,李宇忠. 蒲公英总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 饲料研究,2024,47(19):91 – 95.
[16] 王晓晶,高照儿. 响应面法优化金银花总黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J]. 饲料工业,2025,46(15):126 – 133.
[17] 李利红,兰明珠,洪金明,等. Plackett – Burman Design 联合 Box – Behnken Design 优化香菇酱的工艺[J]. 食品工业,2024,45(4):79 – 86.
[18] 李斐,杨冬磊. 正交试验及响应面优化在乙烷回收中的对比[J]. 天然气与石油,2024,42(4):101 – 109.
[19] 吴颜杰,罗双群,崔胜文,等. Plackett – Burman 和 Box – Behnken 试验优化萌发藜麦黄酮超声提取工艺及其体外降血糖活性研究[J]. 食品科技,2024,49(8):238 – 246.

Study on the Extraction Process of Total Flavonoids from Mayaqi and Its Antioxidant Activity and Stability

CHEN Jing¹, WANG Wei², HOU Shaoping³, XI Junwei¹

1. Shaanxi Center for Adverse Drug Reaction Monitoring, Xi'an 710065, China;

2. Shaanxi Center for Drug and Vaccine Inspection, Xi'an 710065, China;

3. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an 712046, China

Abstract Objective: To optimize the extraction process of total flavonoids from Mayaqi and study its antioxidant activity and stability. Method: Key factors were screened by Plackett – Burman experiment, and the optimal process was obtained by Box – Behnken Design surface design; The antioxidant activity of total flavonoids of Mayaqi was evaluated by measuring the scavenging effects on hydroxyl radicals, DPPH radicals, ABTS radicals and the ability to reduce ferric ions. The correlation between the concentration of total flavonoids extract and different antioxidant activities was by SPSS software, and the effects of temperature, light and pH on the stability of antioxidant activity were investigated. Result: The optimal extraction technology for total flavonoids from Mayaqi was as follows: extraction 140 W, ethanol concentration 65%, temperature 70 °C, extraction time 30 min, and the extraction rate of total flavonoids was 4.6085 ± 0.0317 mg/g. The scavenging effects of the total flavonoids extract on Mayaqi DPPH radicals, and ABTS radicals, and the ability to reduce ferric ions were 64.16%、55.67%、95.97% and 50.49%, of the same concentration of Vc, respectively. Correlation showed that the concentration of the total flavonoids extract from Mayaqi was significantly correlated with the scavenging rate of xyl radicals. The antioxidant stability test showed that the total flavonoids extract from Mayaqi should be stored at low (below 25 °C), away from light, and in neutral conditions. Conclusion: This technology is stable and feasible, and the total flavonoids extract Mayaqi has high antioxidant activity.

Key words Mayaqi; Total flavonoids; Antioxidant; Relevance; Stability