

玉米须黄酮类成分提取工艺及抗氧化活性物质基础研究

马天成, 孙宇*, 刘雷(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 目的 优化玉米须总黄酮的提取工艺, 鉴定抗氧化活性馏分中的化学成分, 并进行构效关系探讨。方法 采用响应曲面法优化总黄酮提取工艺, 测定不同提取物的 DPPH, ABTS 及 FRAP 总抗氧化活性, 并进行相关性分析。采用 D101 大孔树脂柱对提取物进行分离, 采用 LC-MS 对活性馏分中的成分进行鉴定。测试黄酮单体化合物的抗氧化活性。结果 黄酮提取的最佳条件为乙醇体积分数 65%, 提取时间 78 min, 提取温度 86 °C, 总黄酮提取量为 2.35 mg·g⁻¹。利用大孔树脂分离后, 黄酮类成分主要聚集在 60% 乙醇-水洗脱馏分。总黄酮含量与抗氧化活性间存在着显著的正相关性。此外, 从活性馏分中鉴定了 7 个黄酮类成分。对其中 6 个化合物的活性进行了测试, 并进行了构效关系探讨。结论 响应曲面法能有效地优化玉米须总黄酮提取工艺。玉米须的抗氧化活性成分主要为黄酮类化合物。

关键词: 玉米须; 黄酮; 响应曲面; 抗氧化活性; 构效关系

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)22-2794-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.009

引用本文: 马天成, 孙宇, 刘雷. 玉米须黄酮类成分提取工艺及抗氧化活性物质基础研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2794-2799.

Studies on Extraction Technology and Antioxidant Activities Basis of Flavonoids from *Zea Mays* L.

MA Tiancheng, SUN Yu*, LIU Lei(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize conditions for the extraction of total flavonoids from *Zea mays* L.. To identify the structures of compounds from active fraction and to discuss the structure-activity relationship between flavonoids and antioxidant activities. **METHODS** Response surface methodology was used to optimize conditions for the extraction of total flavonoids from *Z. mays*. DPPH, ABTS and FRAP methods were used to test the antioxidant activities of different extracts. The relativities of the data were analyzed. D101 macroporous resin column was applied to isolate the extract. LC-MS was used to identify the compounds from the active fraction. The antioxidant activities of the flavonoids were tested. **RESULTS** The best extraction conditions were as follows: ethanol concentration was 65%, extraction time was 78 min and extraction temperature was 86 °C. The content of total flavonoids could reach 2.35 mg·g⁻¹. It indicated that 60% ethanol fraction had the most content of total flavonoids after eluted from macroporous resin column. There was a significant positive correlation between total flavonoids content and antioxidant activity. What's more, seven flavonoids were identified from the active fraction. The antioxidant activity of six flavonoids were tested. The structure-activity relationship was discussed. **CONCLUSION** Response surface method is effective to optimize the extraction of total flavonoids from *Z. mays*. Flavonoids are the main antioxidant ingredients of *Z. mays*. **KEYWORDS:** *Zea mays* L.; flavonoids; response surface methodology; antioxidant activities; structure-activity relationship

玉米须为传统中药, 是禾本科玉蜀黍的花柱和柱头, 是玉米花粉的雄花^[1]。化学成分研究表明, 玉米须中含有黄酮、三萜类、植物甾醇、生物碱、多糖、隐黄素、鞣质、有机酸、矿物质等多种化学成分^[2-4]。民间常用作高血压、糖尿病、高血脂等疾病的辅助治疗药物^[5-6]。现代药理学研究表明, 玉米须具有利尿排石、降血糖、降血压、抗炎、抗肿瘤、抑菌、增强免疫力等作用^[7-10]。氧化应激是导致机体损伤的重要原因之一, 黄酮类化合物是玉米须抗氧化活性的主要成分。响应面分析法

可以有效优化提取工艺条件, 可以建立连续变量曲面模型, 通过回归方程拟合多个响应变量和一系列试验变量之间的关系, 能快速、有效、经济地确定多试验因素的最佳组合条件^[11-14]。目前在我国只有少量的玉米须被利用, 而大部分则被丢弃, 玉米须的开发及应用具有广阔的发展空间^[15]。本实验以玉米须总黄酮的提取量为评价指标, 采用响应曲面法优化总黄酮提取工艺; 同时探讨了总黄酮含量与提取物的抗氧化活性之间关系, 旨在从体外活性和工艺参数 2 个方面进行综合评价,

基金项目: 齐齐哈尔医学院内科研基金项目(博士专项科研基金)(QY2016B-12)

作者简介: 马天成, 男, 硕士, 研究实习员 Tel: (0452)2663127 E-mail: matiancheng2@126.com *通信作者: 孙宇, 女, 博士, 助理研究员 Tel: (0452)2663371 E-mail: zsy5811321@126.com

获得高提取率和高活性提取物的工艺条件。最后对活性馏分中可能存在的黄酮类成分进行鉴定,并进行构效关系探讨,为玉米须的后续开发利用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 试药及试剂

原料玉米须 2016 年 9 月采于黑龙江省齐齐哈尔市,经齐齐哈尔医学院关宏教授鉴定为玉米(*Zea Mays* L.)的花柱;对照品:芦丁(中国食品药品检定研究院,批号:10080-201610;纯度 $\geq 98\%$);牡荆素(批号:730C021;纯度 $\geq 98\%$)、异牡荆素(批号:524B021;纯度 $\geq 98\%$)、木犀草素(批号:1215B021;纯度 $\geq 98\%$)、柚皮素(批号:518C021;纯度 $\geq 98\%$)、橙皮素(批号:1110A023;纯度 $\geq 98\%$)均购自北京索莱宝科技有限公司;香叶木素(成都曼思特生物科技有限公司,批号:MUST-18061501;纯度 99.72%);七水合硫酸亚铁、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪、无水三氯化铁均购自国药集团化学试剂有限公司;过硫酸钾购自优耐德引发剂(上海)有限公司;ABTS、DPPH 均购自东京化成工业株式会社;乙醇、冰醋酸、无水乙酸钠、L-抗坏血酸均购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器

AB Sciex Triple TOF 4600 质谱仪(美国 AB Sciex 公司);Nexera X2 超高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB135-S 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);N-1100 旋转蒸发仪(日本 Eyela 公司);Safire² 酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Elix Essential 5 UV 纯水仪(德国 Merck Millipore 公司);Centrifuge 5804R 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 27.78 mg,置于 50 mL 棕色量瓶中,使用 75%乙醇定容,摇匀,即得 $0.5556 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 准确称取 10.0 g 玉米须,置于 2.0 L 圆底烧瓶中,加入溶液 500 mL,称重,70 °C 加热提取 1.5 h,放冷,补足失重,摇匀,将提取液以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清备用。

2.1.3 显色方法 取待测溶液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中,加入 0.3 mL 的 5% NaNO_2 溶液,摇匀,反

应 6 min,再加入 0.3 mL 的 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,反应 6 min,最后加 4% NaOH 溶液 4 mL,用 75%乙醇定容,摇匀,显色 10 min,取反应液 200 μL 到酶标板中。在 510 nm 处用酶标仪测定吸光度。每个质量浓度平行测定 3 次,取平均值。按上述方法用蒸馏水代替 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, NaNO_2 和 NaOH 溶液,配制空白溶液。

2.1.4 线性范围与样品测定 分别精确移取 0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 mL “2.1.1”项下对照品溶液于 10 mL 量瓶中,用 75%乙醇溶液定容,摇匀。按“2.1.3”项下方法显色后,平行测定吸光度值。以芦丁对照品溶液质量浓度($X, \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,吸光度(Y)值为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为 $Y=3.0211X+0.0176$, $r=0.9983$,结果显示芦丁质量浓度在 $0 \sim 0.1112 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与吸光度值呈现良好的线性关系。根据回归方程计算供试品溶液的总黄酮质量浓度。

2.2 单因素考察

2.2.1 提取溶剂考察 按“2.1”项下方法,分别考察 0, 25%, 50%, 75%, 100%乙醇-水溶液对玉米须总黄酮提取效果的影响。总黄酮提取量分别为 0.83, 1.08, 1.47, 2.12, $0.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。单因素考察结果显示,75%乙醇的提取效果最好。

2.2.2 提取时间考察 按“2.1”项下方法,分别考察提取时间为 15, 30, 60, 90, 120, 150 min 对玉米须总黄酮提取效果的影响,提取量分别为 0.63, 1.08, 1.56, 1.59, 1.58, $1.60 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果显示,提取时间 $<60 \text{ min}$ 时。总黄酮的提取量随着提取时间增长而增加明显,而当提取时间 $>60 \text{ min}$ 时,总黄酮提取量基本不变,确定最佳提取时间为 60 min。

2.2.3 提取温度考察 按“2.1”项下方法,分别考察 40, 55, 70, 85, 100 °C 温度对玉米须总黄酮提取效果的影响。总黄酮的提取量分别为 0.73, 1.03, 1.52, 2.12, $2.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。实验结果显示,温度越高提取效率越高。确定最佳提取温度为 100 °C。

2.3 DPPH 试验

按文献方法^[16],以 L-抗坏血酸为阳性药。阳性药 IC_{50} 值为 $1.90 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 ABTS 试验

按文献方法^[16],以 L-抗坏血酸为阳性药,阳性药 IC_{50} 值为 $4.17 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 FRAP 试验

按文献方法^[16]，以 FeSO₄·7H₂O 为标准物质，得回归方程为 $Y=6.114 \times 10^{-4} X+0.1627$ ， $r=0.9996$ 。

2.6 响应曲面试验结果与分析

2.6.1 响应曲面试验设计、统计及结果分析 利用 Box-Behnken 对数据进行设计，采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行数据分析。通过单因素试验，选择了提取溶剂(以乙醇体积分数表示，A)、提取温度(B)、提取时间(C)3 个因素。通过 Design-Expert 软件进行数据拟合，利用响应面优化玉米须总黄酮提取量(Y_1)值。同时将不同试验组获取的总黄酮提取物配制成 10，5，2.5，1.25，0.625 g·L⁻¹ 的样品，测试其 DPPH 抗氧化活性(Y_2)和 ABTS 抗氧化活性(Y_3)，将不同试验组获取的总黄酮提取物配制成 2.5 g·L⁻¹ 的样品，测试其 FRAP 总抗氧化能力(Y_4)。试验设计方案及结果见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 1 Box-Behnken test design and results

试验号	A 提取溶剂/%	B 提取温度/℃	C 提取时间/min	Y_1 总黄酮含量/ mg·g ⁻¹	Y_2 DPPH/ g·L ⁻¹	Y_3 ABTS/ g·L ⁻¹	Y_4 FRAP / mmol·L ⁻¹
1	100	85	90	0.17	19.95	1.62	144.2
2	50	70	60	1.41	4.89	0.25	656.2
3	75	85	60	2.01	1.03	0.54	476.8
4	75	100	30	1.58	4.67	0.56	393.0
5	50	85	90	1.99	7.27	0.16	524.9
6	75	100	90	1.89	2.55	0.77	445.8
7	75	85	60	2.03	1.49	0.58	453.1
8	75	85	60	2.00	2.70	0.76	433.8
9	100	100	60	0.14	17.80	1.70	53.6
10	75	70	90	1.97	3.10	0.62	488.0
11	100	85	30	0.15	34.20	1.95	55.9
12	75	70	30	1.64	12.73	1.02	351.7
13	50	100	60	1.69	20.54	0.80	449.0
14	50	85	30	1.73	16.81	0.24	433.9
15	75	85	60	2.24	3.64	0.65	409.8
16	100	70	60	0.09	28.25	3.29	113.1
17	75	85	60	2.60	2.64	0.58	363.8

2.6.2 方差分析 采用 ANOVA 分析响应面回归参数。总黄酮含量经 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行方差分析，得到回归方程为 $Y_1=2.17-0.78A+0.023B+0.11C-0.057AB-0.061AC-7.173 \times 10^{-3}BC-1.05A^2-0.29B^2-0.11C^2$ 。方差分析结果见表 2。

表 2 回归模型方差分析表

Tab. 2 Variance analysis for established regression model

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	10.33	9	25.48	0.000 2
A	4.91	1	109.14	<0.000 1
B	4.353×10^{-3}	1	0.097	0.764 9
C	0.10	1	2.26	0.176 3
AB	0.013	1	0.29	0.607 2
AC	0.015	1	0.33	0.581 5
BC	2.058×10^{-4}	1	4.57×10^{-3}	0.948 0
A ²	4.63	1	102.78	<0.000 1
B ²	0.35	1	7.83	0.026 6
C ²	0.053	1	1.17	0.314 9
残差	0.32	7		
失拟项	0.078	3	0.44	0.739 1
纯误差	0.24	4		
总误差	10.64	16		

由表 2 可知，实验选用的模型差异极显著($P=0.0002$)，表明模型对提取工艺影响极其显著；该模型 $R^2=0.9704$ ，失拟项不显著($P=0.7391>0.05$)，表明对试验拟合程度良好，试验误差较小。经 Design-Expert 8.0.6 软件对 DPPH，ABTS 及 FRAP 抗氧化活性结果数据进行方差分析，选用的模型差异皆极显著($P<0.001$)，表明模型对提取工艺影响极显著；失拟项皆不显著，表明拟合程度良好，试验误差较小。因此，以上模型可以对不同条件下的试验结果进行预测。

2.6.3 响应面分析 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对玉米须总黄酮含量进行二次多元回归拟合，固定 3 个变量中的 2 个为中值，把应变量与另 2 个因素拟合为三维曲面图，以拟合目标函数为数学模型，绘制因变量曲面图，3D 响应曲面图见图 1。通过软件分析，确定玉米须总黄酮最佳提取工艺条件，即提取溶剂为 65.17% 乙醇-水，温度 86.07℃，提取 78.34 min。

2.6.4 验证试验 通过对实验数据的综合分析，结合实际生产的便利性，选择乙醇体积分数为 65%，提取温度为 86℃，提取时间为 78 min 为最优工艺。利用最佳工艺进行 3 次验证试验，玉米须总黄酮的提取量可达 2.36 mg·g⁻¹，与模型预测值 2.35 mg·g⁻¹ 偏差较小；DPPH 活性的 IC_{50} 值为 1.08 g·L⁻¹，与模型预测值 1.03 g·L⁻¹ 偏差较小；ABTS 活性的 IC_{50} 值为 0.27 g·L⁻¹，与模型预测值 0.30 g·L⁻¹ 偏差较小；FRAP 活性值为 522.10 mmol·L⁻¹，与模型预测值 507.04 mmol·L⁻¹ 偏差较小。

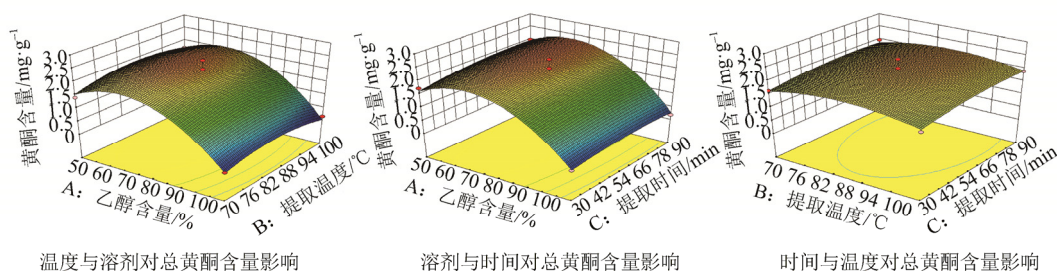


图1 总黄酮含量与提取各因素间的交互作用

Fig. 1 Interaction among the content of total flavonoids and extraction factors

2.7 总黄酮的纯化

2.7.1 总黄酮的提取与纯化 取“2.6.4”项下总黄酮提取最佳工艺得到的提取液。将提取液加水，利用旋转蒸发仪进行浓缩。待浓缩至无醇味，将提取液上 D101 大孔树脂柱。分别用 0, 30%, 60%, 95%乙醇-水溶液进行洗脱，得到 4 个馏分，蒸干备用。

2.7.2 总黄酮含量的测定 将“2.7.1”项中得到的馏分分别取一定量配制成适当质量浓度，按照“2.1”项下方法测定每个馏分中总黄酮的百分含量。结果见表 3。

2.7.3 抗氧化活性测试 取“2.7.1”项中得到的馏分，测试每个馏分的 DPPH、ABTS 抗氧化活性。将“2.7.1”项中得到的馏分取适量配置成 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，测试每个馏分的 FRAP 总抗氧化能力。结果见表 3。

表3 各馏分总黄酮含量及抗氧化活性

Tab. 3 Total flavonoids contents and antioxidant activities of the fractions

馏分	总黄酮含量/%	DPPH 活性 IC_{50} 值/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	ABTS 活性 IC_{50} 值/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	FRAP/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
总馏分	3.18	1.03	0.40	319.75
0%乙醇馏分	0.13	32.62	6.01	0
30%乙醇馏分	2.24	1.22	0.36	498.09
60%乙醇馏分	8.54	0.73	0.50	877.06
95%乙醇馏分	0.89	>100	14.1	0

2.7.4 总黄酮含量与抗氧化活性相关性分析 将表 3 中数据导入 SPSS 17.0 软件中，采用 Pearson 相关系数法进行双变量相关分析，分析玉米须总黄酮含量和抗氧化活性的相关性。结果表明玉米须总黄酮含量与 DPPH 和 ABTS 实验中的 IC_{50} 值具有显著负相关性($P < 0.01$)，而与 FRAP 总抗氧化值具有显著正相关性($P < 0.01$)。即玉米须总黄酮含量与抗氧化活性间存在着显著的正相关性。

2.8 活性馏分的黄酮类成分鉴定

2.8.1 LC-MS 的分析条件 色谱条件：色谱柱为

Phenomenex 柱($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$)；流动相 A 为 0.1%甲酸-水，流动相 B 为 0.1%甲酸-乙腈；柱温： $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ；流速： $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；进样量： $1 \mu\text{L}$ ；梯度洗脱条件见表 4。

表4 UPLC 流动相梯度洗脱条件

Tab. 4 Elution conditions of UPLC

时间/min	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	A/%	B/%	梯度曲线
0.01	0.3	80	20	6
4.00	0.3	50	50	6
8.00	0.3	30	70	6
18.00	0.3	0	100	6

质谱条件：采用正离子扫描模式，离子喷雾电压 5.5 KV ；离子源温度： $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ；去簇电压(DP)： 100 V 和碰撞能量(CE)： 10 eV 。氮气为雾化气和辅助气：雾化气 55 psi ，辅助气 55 psi ，气帘气 35 psi 。ESI 正离子模式下进行全扫描，积累时间为 250 ms 。IDA 采用标准：每个分析物， $>100 \text{ cps}$ 的 15 个最强的碎片离子在 $100 \sim 1200 \text{ amu}$ 进行子离子扫描，累积时间为 100 ms 。碰撞电压差为 15 eV ，动态背景扣除 DBS 开启。自动校准系统(CDS)对 MS 和 MS/MS 自动进行调谐和校正。数据获取和处理分析采用 PeakView®2.1 软件，MasterView 软件。工作站：Analyst®TF 1.7.1 软件。

2.8.2 活性馏分的分析 将总提物及 D101 大孔树脂洗脱馏分进液质进行分析。

2.8.3 方法学验证 仪器精密度试验：取“2.7.1”项下同一 60%乙醇洗脱馏分作为供试品溶液，按照“2.8.1”项下条件连续进样 6 次，1~7 号峰保留时间和峰面积 RSD 值分别 $<0.49\%$ 和 2.87% ，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一样品，按“2.7.1”项下方法平行制备 6 份 60%乙醇洗脱馏分作为供试品溶液，按照“2.8.1”项下条件进样测定，1~7 号峰保留时间和峰面积 RSD 值分别 $<0.61\%$ 和 4.69% ，表明方法重复性良好。

稳定性试验：取同一“2.7.1”项下 60%乙醇

洗脱馏分作为供试品溶液,按“2.8.1”项下条件,在0,2,4,8,12,24 h进行检测,1~7号峰保留时间和峰面积RSD值分别<0.78%和4.75%,表明样品供试品溶液在24 h内稳定。

2.8.4 活性馏分中黄酮的鉴定 对黄酮含量较高、抗氧化活性较强的60%乙醇洗脱馏分中的黄酮类成分进行结构鉴定。60%乙醇洗脱馏分的基峰离子流图见图2。对对照品牡荆素、异牡荆素、木犀草素、柚皮素、橙皮素和香叶木素的二级质谱裂解规律进行解析。该6个化合物的结构式见图3。

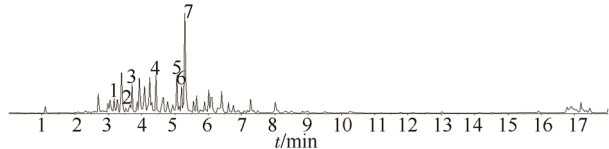


图2 大孔树脂60%乙醇洗脱馏分BPC图
Fig. 2 BPC figure of 60% ethanol fraction eluted by macroporous resin

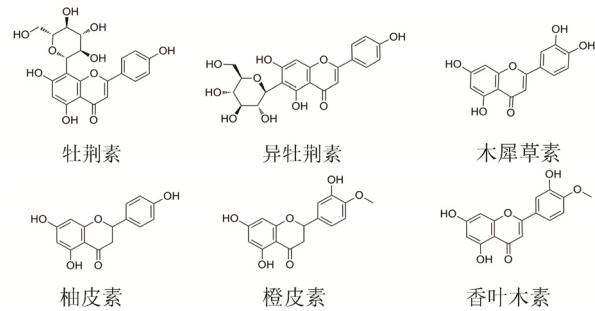


图3 对照品化学结构式
Fig. 3 Chemical structural formula of reference substance

牡荆素和异牡荆素的MS谱图显示了 $[M+H]^+$ m/z 433。在MS/MS谱图中,它们存在相似的二级离子碎片。由于羟基的存在,会发生中性 H_2O 分子丢失,而产生碎片离子 m/z 433,415,397和379。B环断裂及C环CO的丢失,会产生 m/z 337和313的碎片离子。B环断裂及分子的脱水会产生 m/z 323的碎片离子。分子脱糖产生 m/z 271的碎片离子。

木犀草素MS谱显示了 $[M+H]^+$ m/z 287。在MS/MS谱图中,由于B环上存在邻位羟基,因此容易发生中性 H_2O 分子丢失,而产生碎片离子 m/z 269,C环上进一步脱去1分子CO产生碎片离子 m/z 241。此外C环裂解后得到的碎片离子 m/z 153和135。

柚皮素MS谱显示了 $[M+H]^+$ m/z 273。在MS/MS谱图中,C环裂解后产生碎片离子 m/z 153和147。

橙皮素MS谱显示了 $[M+H]^+$ m/z 303。MS/MS谱图中,C环裂解后产生碎片离子 m/z 177和145。

推测该化合物可能为柚皮素。
香叶木素MS谱显示了 $[M+H]^+$ m/z 301。它产生掉 CH_3 和CO的碎片离子 m/z 286和258。
对60%乙醇水洗脱馏分中的黄酮类成分进行鉴定。通过PC软件PeakView®2.2,MasterView对数据进行处理,对比数据库TCM MS/MS Library中数据,对该馏分的成分结构进行预测。确定了7个黄酮类化合物的结构,见表5。
峰1的 $[M+H]^+$ m/z 463.1223。它脱1分子糖得到碎片离子 m/z 301.0692,它产生掉 CH_3 和CO的碎片离子 m/z 286.0447和258.0507。推测该化合物可能为香叶木素-葡萄糖苷。

峰2,3,4,5,6和7与对照品谱图比对,分别鉴定为牡荆素、异牡荆素、木犀草素、柚皮素、橙皮素和香叶木素。

表5 玉米须60%大孔树脂洗脱馏分化合物鉴定结果
Tab. 5 Results of identification of constituents in 60% ethanol fraction

No.	化合物名称	分子式	分子量/Da	保留时间/min	加合离子形式	误差/ppm
1	香叶木素-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄	463.1223	3.14	[M+H] ⁺	-3.0
2	牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1102	3.65	[M+H] ⁺	-2.7
3	异牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1114	3.84	[M+H] ⁺	-1.5
4	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0524	4.49	[M+H] ⁺	-9.1
5	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.0754	5.03	[M+H] ⁺	-1.3
6	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	303.0848	5.17	[M+H] ⁺	6.9
7	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0687	5.26	[M+H] ⁺	8.3

2.9 黄酮抗氧化活性构效关系探讨
测试牡荆素、异牡荆素、木犀草素、柚皮素、橙皮素和香叶木素的DPPH抗氧化活性,ABTS抗氧化活性及FRAP总抗氧化活性。FRAP活性测试,为使结果在线性范围内,选取了单体化合物浓度为 $3.9 \times 10^{-2} g \cdot L^{-1}$ 。结果见表6。

表6 6种单体化合物DPPH、ABTS及FRAP抗氧化活性结果
Tab. 6 Results of DPPH, ABTS and FRAP antioxidant activities of six compounds

化合物	DPPH 活性 IC ₅₀ 值/ $g \cdot L^{-1}$	ABTS 活性 IC ₅₀ 值/ $g \cdot L^{-1}$	FRAP/ $mmol \cdot L^{-1}$
牡荆素	14.52	2.27	0
异牡荆素	16.84	1.98	59.3
木犀草素	2.81×10^{-3}	2.32×10^{-2}	561.8
柚皮素	0.54	9.10×10^{-2}	53.1
橙皮素	>50	3.16×10^{-2}	43.9
香叶木素	18.16	0.37	0

3 讨论

利用响应曲面法对玉米须总黄酮的提取工艺参数进行优化, 并采用 DPPH, ABTS 及 FRAP 3 种方法测定了其抗氧化活性。在预试验中分别考察了乙醇体积分数、提取温度及提取时间、提取溶剂用量和提取次数对黄酮提取量的影响。由于玉米须较为蓬松, 提取溶剂用量过少无法将其浸润, 继续增大提取溶剂用量对黄酮提取量影响较小。而增加提取次数后, 黄酮提取量并没有显著增加, 考虑到节能, 试验中没有进一步对提取次数进行优化。因此, 本试验对提取过程中乙醇体积分数、提取温度及提取时间进行了进一步考察, 通过设计得到了这 3 个因素与玉米须总黄酮含量之间关系的回归模型。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对提取量进行预测分析, 并通过验证试验确定了高提取量的玉米须总黄酮提取工艺。该提取工艺稳定、可靠。此外, 将响应曲面实验结果采用 Pearson 相关系数法对总黄酮含量与抗氧化活性进行相关性分析。结果表明, 总黄酮含量与 3 种抗氧化活性间存在着显著的正相关性。这为后续玉米须总黄酮的提取开发奠定了基础, 为玉米须的药用深层次开发和利用提供了科学依据。

为了进一步研究抗氧化活性的黄酮类成分的结构, 对玉米须中的黄酮进行了进一步的分离。采用了 D101 大孔树脂柱对成分进行了分离, 得到了 4 个洗脱馏分, 测试了各馏分的总黄酮含量和其 DPPH、ABTS 活性和 FRAP 总抗氧化能力, 结果显示黄酮类成分主要聚集在 60%乙醇-水洗脱馏分。3 个抗氧化试验结果显示黄酮含量较高的馏分活性较强, 进一步说明玉米须的抗氧化活性成分主要为黄酮类化合物。对 60%乙醇水洗脱馏分中的黄酮类成分进行鉴定, 推测了 7 个黄酮类化合物的结构。它们分别为香叶木素-葡萄糖苷、牡荆素、异牡荆素、木犀草素、柚皮素、橙皮素和香叶木素, 这为今后提取分离活性成分提供了指导。

对 6 个单体化合物的抗氧化活性进行测试。DPPH 活性结果显示黄酮苷元连糖后活性下降, 连糖位置对活性结果影响不大, 连接羟基后活性加强, 连接甲氧基后活性降低, 2 位、3 位双键被还原后活性降低。ABTS 活性及 FRAP 总抗氧化活性结果同样显示连接糖或甲氧基后活性会降低。连接羟基活性增强。但 2 位、3 位双键被还原后活性增强。

REFERENCES

- [1] CHEN Y Z. The latest research on pharmacological action of chemical constituents in corn silk [J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2015(2): 141-145
- [2] ZHAO M, LIU C S, YIN T P, et al. Chemical constituents of the style of *Zea mays* L. from Yunnan [J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2013, 25(6): 846-850.
- [3] QI X L, ZHANG Y Y, ZHAO P, et al. Ent-kaurane diterpenoids with neuroprotective properties from corn silk(*Zea mays*) [J]. J Nat Prod, 2018, 81(5): 1225-1234.
- [4] LI P, LAPCIK L. The research of functional ingredients from corn silk [J]. Chem listy, 2018, 112(2): 93-97.
- [5] CHEN Y J, GAO X Z, GUAN D Y, et al. Study on the pharmacodynamic of ethanol extracts from *Ionicera japonica* in rats with hepatic fibrosis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(11): 195-199.
- [6] WANG Z K, MING M D, SHI L, et al. Quality standard of maydis Stigma [J]. China Pharm(中国药业), 2017, 26(14): 1-3.
- [7] GUO Z H, ZHOU H L. Composition and pharmacological effects of flavonoids in *Stigma maydis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(8): 222-225.
- [8] YANG J Y, LI X, XUE Y, et al. Anti-hepatoma activity and mechanism of corn silk polysaccharides in H22 Tumor-bearing mice [J]. Int J Biol Macromol, 2014(64): 276-280.
- [9] YU Y, CHENG J. Improvement of lipid metabolism of type 2 diabetes rats by *Zea mays* L. Saponin(ZMLS) through regulating tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) [J]. World Chin Med(世界中医药), 2018, 13(2): 415-419.
- [10] LV G F, QIU Z K, CHANG S Z, et al. Anti-inflammatory, analgesic and analgesic effects of total flavone from *Stigma maydis* and its effect on acute gouty arthritis [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2018, 41(2): 206-209.
- [11] ZHAO C B, WANG J, WU B, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction technology based on PB design and BBD response surface method and anti-tumor activities of polysaccharides from *Arisaema Rhizoma Preparatum* [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(9): 1139-1144.
- [12] ZHANG H X, BIRCH J, XIE C N, et al. Optimization of extraction parameters of antioxidant activity of extracts from New Zealand and Chinese *Asparagus officinalis* L root cultivars [J]. Ind Crop Prod, 2018(119): 191-200.
- [13] ZHANG L X, LI Z, LIU D Y, et al. Optimization of reflux extraction technology of hyperin in pine needle of *cedrus deodra* by response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 850-854.
- [14] LI Y C, LI X L, ZHAO M R, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction technology of canthin-6-one from bark of *ailanthus altissima* by response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 628-632.
- [15] JU J, QIAO Y, ZHOU W X, et al. Flash extraction and antibacterial effects of total flavonoids from corn silk [J]. Food Sci and Technol(食品科技), 2016, 41(3): 208-212.
- [16] MA T C, SUN Y, LIU L, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Anemarrhena asphodeloides* Bge by response surface method and their antioxidant activities [J]. J Qiqihar Med Col(齐齐哈尔医学院学报), 2018, 39(6): 621-625.

收稿日期: 2019-01-13

(本文责编: 李艳芳)