

HPLC 法分析玉米须多酚及其抗氧化活性研究

李 强, 任 虹*, 王友升, 李 婷

(北京工商大学食品学院, 北京市食品风味化学重点实验室, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心,
食品质量与安全北京实验室, 北京 100048)

摘 要: **目的** 分析玉米须多酚成分及其抗氧化活性。**方法** 采用 Folin-Ciocalteu 法测定玉米须中总多酚含量, 利用 HPLC 法分析玉米须多酚成分; 采用抗氧化能力指数(ORAC)法测定玉米须多酚的抗氧化活性。**结果** 玉米须中总多酚含量为 1.26 mg/g, 含有儿茶素、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、根皮苷、槲皮素等多种多酚类物质, 且具有一定的抗氧化活性, 其平均 ORAC 值为 469.6 $\mu\text{mol TE/g}$ 。**结论** 玉米须富含具有抗氧化活性的多酚成分, 为玉米须进一步开发利用提供依据。

关键词: 玉米须; 多酚; 抗氧化活性

Study on phenolics composition of corn silk and its antioxidant activity *in vitro*

LI Qiang, REN Hong*, WANG You-Sheng, LI Ting

(Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Food Science College of Beijing Technology & Business University, Beijing 100048, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the phenolics composition of corn silk and its antioxidant activity *in vitro*. **Methods** Folin-Ciocalteu method was used to evaluate the amounts of total phenolics of corn silk. Phenolics composition of corn silk was analyzed by HPLC and the antioxidant activity was evaluated by ORAC method. **Results** The amount of phenolics in corn silk was 1.26 mg GAE/g. HPLC analysis revealed that 6 phenolic acids (including catechinic acid, chlorogenic, caffeic acid, ferulic acid, phlorizin, and quercetin) were detected. Antioxidant activity assay showed that phenolics of corn silk had an effective antioxidant activity and the average ORAC value was 469.6 $\mu\text{mol TE/g}$. **Conclusion** Corn silk is rich in polyphenols with antioxidant activity.

KEY WORDS: corn silk; phenolics; antioxidant activity

1 引 言

玉米须(corn silk)是禾本科玉蜀黍属植物玉米(*Zea mays* L.)在成熟收获季节的雌花花柱和柱头^[1]。作为玉米生产中的副产物, 玉米须来源丰富, 价格低

廉, 易于采集, 是一种有待全面开发利用的药用资源。现代药理研究证明玉米须有显著的利尿、降血糖、抑菌、增强免疫、抗氧化、抗癌等功效^[2-6]; 临床上, 玉米须广泛用于高血压、胆道结石、糖尿病等多种疾病的临床治疗^[7]。目前, 国内外学者对其化学成分进行

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题(2011AA060701)

Fund: Supported by High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2011AA060701)

*通讯作者: 任虹, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物化学。E-mail: renhong@th.btbu.edu.cn

*Corresponding author: REN Hong, Associate Professor, Beijing Technology & Business University, NO.11, Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China. E-mail: renhong@th.btbu.edu.cn

了大量研究,发现玉米须中含有植物甾醇、多糖、生物碱、黄酮及其苷类、有机酸、挥发油、微量元素以及多种维生素等多种成分^[8]。虽然目前对玉米须的临床应用及其功能组分研究较多,但玉米须中多酚物质的组成成分及其抗氧化活性鲜有报道。本文采用Folin-Ciocalteu法测定玉米须中总多酚含量,采用高效液相色谱(HPLC)法分析了玉米须中多酚类物质的种类,并利用ORAC法检测其抗氧化活性,为更好地开发利用玉米须资源提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

玉米须购自安徽省亳州市常富药业销售有限公司;维生素E、荧光素钠(FL)、2,2-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH)、多酚标准品(咖啡酸、绿原酸、没食子酸、山萘酚、原儿茶素、阿魏酸、表儿茶素、儿茶素、槲皮素、根皮苷)、三氟乙酸购自北京迪朗生化科技有限公司;Folin-Ciocalteu试剂购自北京化学试剂公司;盐酸、氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯,购自北京汇海科仪科技有限公司。

2.2 仪器与设备

恒温水浴锅(上海一科仪器公司);旋转蒸发仪(上海亚荣仪器厂);SPECTRA MAX190连续波长酶标仪(Molecular Devices);高效液相色谱仪(Waters 2695液相色谱仪);GEMINI EM微孔板荧光酶标仪(Molecular Devices)。

2.3 方法

2.3.1 玉米须多酚物质的提取

称取0.5 g磨碎后的玉米须,用10 mL 80%甲醇和1 mL 1 mol/L HCl在28℃水浴下萃取2 h,过滤悬浮液,收集滤液,将残渣再用10 mL 80%甲醇萃取两次,三次滤液混合,40℃下旋蒸,去除有机溶剂,得到多酚的粗提液,备用。

2.3.2 玉米须多酚总含量的测定

2.3.2.1 标准曲线的绘制

配制1.0 g/L没食子酸标准液,分别取标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL于10 mL容量瓶中,加蒸馏水定容至10 mL,此时各浓度分别为0、20、40、60、80、100、120 μg/mL。吸取不同浓度的没食

子酸标准液20 μL于96微孔板中,各加入140 μL水,再加入10 μL Folin-Ciocalteu试剂,30 μL碳酸钠溶液,将微孔板置于酶标仪中,25℃避光反应2 h,于760 nm波长下测其吸光度。以吸光度为纵坐标,没食子酸质量浓度为横坐标制作标准曲线。

2.3.2.2 玉米须多酚总含量的测定

将2.3.1中提取的玉米须样品配置成浓度为1 mg/mL的甲醇水溶液,取20 μL于96微孔板中,按照2.3.2.1方法测定样品多酚含量,各加入140 μL水,再加入10 μL Folin-Ciocalteu试剂,30 μL碳酸钠溶液,将微孔板置于酶标仪中,25℃避光反应2 h,于765 nm波长下测其吸光度,根据标准曲线计算总酚含量。

2.3.3 HPLC分析多酚化合物^[9]

色谱条件:反相色谱 ZORBAX SB-C18分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),室温。流动相中溶剂A为三氟乙酸(pH2.5),溶剂B为无水甲醇,梯度洗脱:90%~50%溶剂B(0~20 min),50%~60%溶剂B(20~30 min),60%~100%溶剂B(30~40 min),流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL,柱温30℃,280 nm下检测。

2.3.4 ORAC法测定玉米须多酚提取物抗氧化活性^[10-12]

2.3.4.1 磷酸盐缓冲液的制备

精密称取磷酸氢二钠10.61 g、磷酸二氢钠1.23 g溶解,定容至500 mL,即得75 mmol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液。

2.3.4.2 FL溶液的制备

精密称取FL 37.6 mg,以磷酸盐缓冲液溶解,制成10 mmol/L的FL溶液,记为FL母液a。精密吸取FL母液a 50 μL置于50 mL容量瓶中,用磷酸盐缓冲液定容,得到 10×10^{-3} mmol/L溶液,记为FL母液b;FL母液a、b均于4℃冷藏。实验时精密吸取FL母液b 500 μL置于50 mL容量瓶中,以磷酸盐缓冲液定容至刻度,即得 10×10^{-5} mmol/L的稀释液。

2.3.4.3 AAPH溶液的制备

精密称取AAPH 271.1 mg,以磷酸盐缓冲液溶解并定容至10 mL,即得浓度为100 mmol/L的AAPH溶液。

2.3.4.4 Trolox溶液的制备

精密称取Trolox 2.50 mg,以甲醇溶解并定容至

10 mL, 即得 1 mmol/L 的 Trolox 溶液。实验时分别吸取 1 mmol/L Trolox 甲醇溶液 400、300、200、100、0 μL 于 5 mL 容量瓶中, 以磷酸盐缓冲液定容, 配成浓度分别为 8×10^{-5} 、 6×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、0 mol/L 的 Trolox 溶液。

2.3.4.5 Trolox 标准曲线的建立

在黑色 96 孔板各微孔中分别加入不同浓度的 Trolox 溶液 20 μL 后添加缓冲液 20 μL 及 FL 20 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下预置 5 min 后, 用多道移液器迅速在各孔中加入 AAPH 140 μL 启动反应, 并将微孔板置于荧光分析仪中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm 进行连续测定, 每 2 min 测定一次各孔荧光值 (F_n), 直至荧光衰减至基线。ORAC 实验需要设定两种对照, 即没有添加自由基的 FL 荧光自然衰减对照 (-AAPH)和没有抗氧化剂存在时的自由基作用对照 (+AAPH)。

各微孔不同时间点的绝对荧光值 F_n 与 -AAPH 空白荧光强度相比, 折算成相对荧光强度 f_n , 以相对荧光强度采用近似积分法计算荧光熄灭曲线下面积 (AUC), 其计算公式简化为:

$$\text{AUC}=2\times(f_0+f_1+\dots+f_{n-1}+f_n)-f_0-f_n \tag{1}$$

抗氧化剂作用下的荧光衰退曲线下面积与无抗氧化剂存在时自由基作用的荧光衰退曲线下面积之差 (Net AUC)为抗氧化剂的保护面积, 其计算公式为:

$$\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{+\text{AAPH}} \tag{2}$$

以 Trolox 溶液浓度为横坐标, 以 Net AUC 为纵坐标, 绘制标曲线。

2.3.4.6 抗氧化活性 ORAC 值的测定

按 2.3.4.5 所述的方法进行测定和计算, 玉米须多酚的 ORAC 值以 Trolox 当量表达, 即将玉米须多酚 Net AUC 代入 Trolox 的线性方程进行计算, 所得结果与 Trolox 进行比较, 得出玉米须多酚 ORAC 值。

3 结果与分析

3.1 玉米须中多酚总含量

没食子酸质量(x)与吸光度(y)之间的关系为 $y = 0.0034x + 0.0151$, 相关性良好。根据此方程, 可通过测定玉米须多酚提取液的吸光度而得知其提取量。结果表明, 玉米须总多酚含量为 1.26 mg/g, 同时, 用溶剂分级萃取, 测定各提取物中多酚含量, 氯仿提取物中总多酚含量较高, 为 0.671 mg/g, 乙酸乙酯中含量较低, 为 0.111 mg/g, 如表 1 所示。

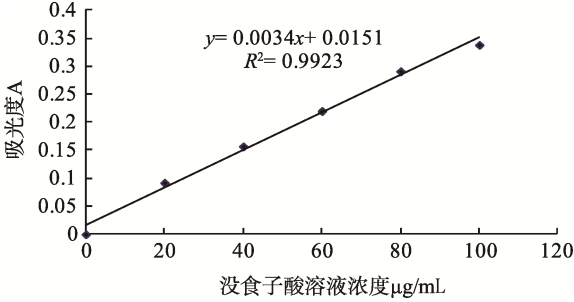


图 1 多酚标准曲线

Fig. 1 The linear relationship between A and gallic acid concentration

表 1 玉米须多酚总含量

Table 1 The amounts of total phenolics of corn silk	
玉米须甲醇提取物	多酚含量 mg/g
氯仿提取物	0.671±0.134
乙酸乙酯提取物	0.111±0.058
正丁醇提取物	0.478±0.102

3.2 玉米须多酚成分分析

采用 HPLC 方法分析测定玉米须多酚成分, 选择 10 种多酚标准品(咖啡酸、绿原酸、没食子酸、山萘酚、原儿茶素、表儿茶素、阿魏酸、儿茶素、槲皮素、根皮苷)溶液在 2.3.2 条件下进行分析, 结果表明, 玉米须粗提物在保留时间 10.17、11.76、14.04、18.43、21.83 和 26.71 min 出峰, 与多酚标准品液相图谱比较, 其中含有儿茶素、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、根皮苷和槲皮素, 如图 2 所示。陈智毅等^[13]在甜玉米须中还检测出槲皮素、绿原酸、香草酸、芦丁、表儿茶素以及没食子酸等多酚成分。玉米须中多酚类物质的含量与产地、品种及采收时期等多因素有关, 萃取溶剂不同, 得到的成分也不同。

3.3 抗氧化活性分析

由图 3 可知, 随着 Trolox 溶液浓度的增加, 荧光衰退逐渐减缓, 且 Trolox 溶液浓度与曲线下面积之间具有较好的线性关系。Trolox 线性回归方程为 $y=0.35x-0.9036$, $R^2=0.9902$, 在浓度为 20~80 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好。将玉米须多酚 Net AUC 代入 Trolox 的线性方程进行计算, 得玉米须多酚 ORAC 值为 469.6 $\mu\text{mol TE/g}$ 。方敏等^[14]采用铁离子还原/抗氧化力测定(FRAP)法测定干燥玉米须 80%乙醇提取液的 FRAP 值为 304.35 $\mu\text{mol/L}$ 。刘璐等^[15]从玉米须

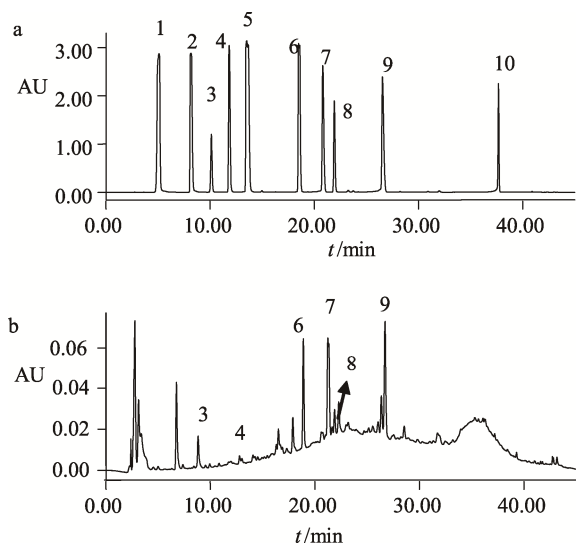


图 2 玉米须多酚 HPLC 图谱(a 为 10 种多酚标准品的液相色谱图, b 为玉米须乙醇提取液的液相色谱图, 1 没食子酸, 2 原儿茶酸, 3 儿茶素, 4 绿原酸, 5 表儿茶素, 6 咖啡酸, 7 阿魏酸, 8 根皮苷, 9 槲皮素, 10 山萘酚)

Fig. 2 The HPLC chromatogram of phenolics extract from corn silk(a showing the separation of standard phenolic compounds, b showing the separation of phenolics compounds in corn silk. 1 gallic acid, 2 protocatechuic acid, 3 catechinic acid, 4 chlorogenic acid, 5 epicatechin, 6 caffeic acid, 7 ferulic acid, 8 phlorizin, 9 quercetin, 10 kaempferol)

乙醇提取物对猪油的抗氧化性、对 DPPH 自由基的清除作用、对 Fe^{3+} 的还原能力三个方面系统分析了玉米须乙醇提取物的抗氧化活性。结果表明: 添加玉米须乙醇提取物的猪油比未添加玉米须多酚提取物的猪油氧化缓慢; 玉米须多酚对 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 0.057 mg/mL, 高于 BHT 的 IC_{50} (0.17 mg/mL); 同浓度下, 玉米须提取物对 Fe^{3+} 的还原能力强于 BHT。

4 结 论

本实验采用 Folin-Ciocalteu 方法测定玉米须多酚含量, 高效液相色谱法检测玉米须多酚物质的成分, 并采用 ORAC 抗氧化活性体外评价法对玉米须甲醇提取物的抗氧化活性进行了研究。研究结果表明, 玉米须甲醇提取物中总多酚含量为 1.26 mg/g, 含有儿茶素、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、根皮苷、槲皮素及山萘酚等多种多酚类物质, 其平均 ORAC 值为 469.6 $\mu\text{mol TE/g}$, 说明玉米须具有较好的体外抗氧化活性。多酚是一类广泛存在于玉米等植物体内的多元酚化合物, 其酚羟基极易被氧化, 对 AAPH 等自

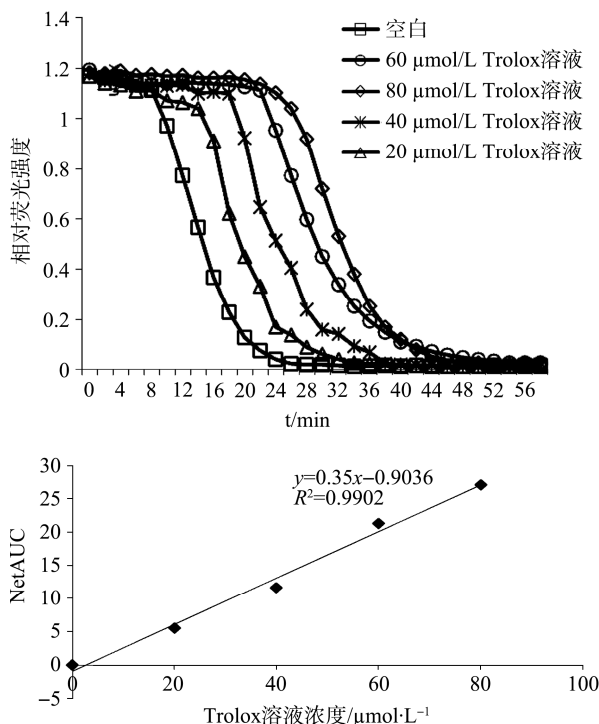


图 3 不同浓度 Trolox 溶液的荧光衰退曲线(A)和 Trolox 标准曲线(B)

Fig. 3 Effect of Trolox on FL fluorescence decay curve in different concentrations (A), the linear relationship between NetAUC and Trolox concentration (B)

由基具有较强清除能力, 因而具有很强的抗氧化性和清除自由基的能力。文献报道玉米须具有降血压、降血脂、降血糖、抗血栓等生理作用, 与其抗氧化活性密不可分, 本实验为玉米须的有效开发和综合利用提供了依据。

参考文献

- [1] 周鸿立, 张艳, 张扬, 等. 玉米须的开发利用前景[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 508-509.
Zhou HL, Zhang Y, Zhang Y, et al. The development and utilization prospects of corn stigma [J]. Jiangsu Agric Sci, 2011, 39(3): 508-509.
- [2] Velazquez DVO, Xavier HS, Batistac JEM, et al. Zea mays L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats [J]. Phytomed., 2005, 12(5): 363-369.
- [3] Guo JY, Liu TJ, Han LN, et al. The effects of corn silk on glycaemic metabolism [J]. Nutr Met, 2009, 6: 47-52.
- [4] Liu J, Wang CN, Wang ZZ, et al. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (Zea

- mays L.) and related flavone glycosides [J]. Food Chem, 2011, 126(1): 261–269.
- [5] Zhao WZ, Yin YG, Yu ZP, *et al.* Comparison of anti-diabetic effects of polysaccharides from corn silk on normal and hyperglycemia rats [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50 (4): 1133–1137.
- [6] Wang GQ, Xu T, Bu XM, *et al.* Anti-inflammation effects of corn silk in a rat model of carrageenin-induced pleurisy [J]. Inflammation, 2012, 35 (3): 822–827.
- [7] Khairunnisa H, Puziah H, Shuhaimi M. Corn silk (stigma maydis) in healthcare: a phytochemical and pharmacological review [J]. Molecules, 2012, 17(8): 9697–9715.
- [8] 匡轩, 匡芮, 朱海涛. 玉米须的化学成分及药理保健功能[J]. 中国食物与营养, 2007, (4): 46–48.
- Kuang X, Kuang R, Zhu HT. Chemical components of corn beard and its pharmacological effects and health care functions [J]. Food Nutr China, 2007, (4): 46–48.
- [9] Mar Win-AAH, Badlishah SB, Farooq A. Effects of roasting on phenolics composition and antioxidant activity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) kernel flour [J]. Eur Food Res Technol, 2011, 233(4), 4: 599–608.
- [10] 曹亚兰, 赵谋明, 郑赛晶, 等. 以 ORAC 法为评价指标优化制备大豆抗氧化肽[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 73–76.
- Cao YL, Zhao MM, Zheng SJ, *et al.* Optimization on preparation of soybean antioxidative peptide with orac assay of evaluation [J]. Food Ferm Ind, 2011, 37(10): 73–76.
- [11] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 1015–1021.
- Xu JK, Yao XS, Li YB. Oxygen radical absorbance capacity assay and its application [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(8): 1015–1021.
- [12] 戴卉卿, 陈承瑜, 杨滨. 22 种黄酮、酚酸类化合物和 9 种中药清除 AAPH 活性考察[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2296–2302.
- Dai HQ, Chen CY, Yang B. AAPH scavenging activities of 22 flavonoids and phenolic acids and 9 extracts of Chinese materia medica [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(17): 2296–2302.
- [13] 陈智毅, 徐玉娟, 尹艳, 等. 甜玉米多酚类成分的测定[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 235–237.
- Chen ZY, Xu YJ, Yin Y, *et al.* Analysis of polyphenol composition of different parts of an ear of sweet corn [J]. Food Sci, 2010, 31(10): 235–237.
- [14] 方敏, 宫智勇, 王耀峰. 玉米须乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养, 2008, (4): 45–47.
- Fang M, Gong ZY, Wang YF. Study on antioxidative activities of corn silk of ethanol extracts in vitro [J]. Food Nutr China, 2008, 4: 45–47.
- [15] 刘璐, 廖李, 胡建中, 等. 玉米须总黄酮的抗氧化性研究[J/OL]. 食品工业科技, <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20140217.1544.013.html>.
- Liu L, Liao L, Hu JZ, *et al.* Research on antioxidant activity of total flavonoids of corn silk [J/OL]. Sci Technol Food Ind, <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20140217.1544.013.html>.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



李 强, 在读硕士研究生, 主要研究方向为天然产物化学。
E-mail: lyqiangli@163.com



任 虹, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物化学。
E-mail: renhong@th.btbu.edu.cn