

玉米须总黄酮含量检测络合显色体系的比较

徐晓伟¹, 李柱刚^{2*}, 李晓娟^{3*}, 王珣³, 赵伟³, 冷春旭³, 赵曦³, 陆杰³, 韩浩¹

(1. 黑龙江大学农业微生物技术教育部工程研究中心, 生命科学学院, 黑龙江省寒区植物基因与生物发酵重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080) (2. 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 黑龙江哈尔滨 150028) (3. 黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 黑龙江省南瓜育种与深加工工程技术研究中心, 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150028)

摘要: 采用紫外可见分光光度法建立最适合玉米须总黄酮 (Corn Silk Total Flavonoids, CSTF) 含量检测的络合显色体系。实验选用体积分数 60% 乙醇为溶剂对 CSTF 进行提取, 并以不同极性溶剂对 CSTF 进行分级萃取, 最终获得正己烷 (Normal Hexane, n-Hexane)、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate Extracts, EAE) 和正丁醇 (Normal Butanol, n-BuOH) 萃取物。以玉米须中不同类型黄酮为对照品, 比较研究 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3/\text{AlCl}_3\text{-NaOH}$ 和 $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3/\text{AlCl}_3$ 四种络合显色体系下乙酸乙酯和正丁醇萃取物中总黄酮含量。同时采用高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 对乙酸乙酯和正丁醇萃取物中黄酮含量进行测定, 从而确定最适合的对照品种类和显色体系。结果表明, HPLC 法检测乙酸乙酯和正丁醇中黄酮含量分别为 83.45% 和 57.36%, 经比较研究发现, 与 HPLC 法检测总黄酮含量最接近的是以芦丁为标准品的 $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3$ 络合显色体系。综上所述, $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3$ 络合显色体系是玉米须和各萃取物总黄酮含量检测的最佳方法, 该方法检测 CSTF 提取液黄酮含量为 1.08%。该方法操作简便、准确度高, 可为玉米须黄酮类物质的开发利用和质量管控提供依据。

关键词: 玉米须; 黄酮; 分光光度法; 络合显色; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2024)01-296-303

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0106

Comparison of Complex Chromogenic Systems for the Detection of Total Flavonoid Content in Corn Silk

XU Xiaowei¹, LI Zhugang^{2*}, LI Xiaojuan^{3*}, WANG Xun³, ZHAO Wei³, LENG Chunxu³, ZHAO Xi³, LU Jie³, HAN Hao¹

(1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Plant Genetic Engineering and Biological Fermentation Engineering for Cold Region, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China) (2. Institute of Tillage and Cultivation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150028, China) (3. Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Engineering Technology Research Center of Pumpkin Breeding and Deep Processing of Heilongjiang, Harbin 150028, China)

引文格式:

徐晓伟, 李柱刚, 李晓娟, 等. 玉米须总黄酮含量检测络合显色体系的比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1): 296-303.

XU Xiaowei, LI Zhugang, LI Xiaojuan, et al. Comparison of complex chromogenic systems for the detection of total flavonoid content in corn silk [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 296-303.

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 黑龙江省重点研发计划指导类项目 (GZ20210161); 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目 (CZKYF2021-2-B009)

作者简介: 徐晓伟 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学分析, E-mail: xuxiaowei2h@163.com

通讯作者: 李柱刚 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 作物资源开发与利用, E-mail: lizhugang@163.com; 共同通讯作者: 李晓娟 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 作物资源开发与利用, E-mail: lixiaojuan@haas.cn

Abstract: UV-visible spectrophotometry was employed to establish the most suitable complex chromogenic system for detecting corn silk total flavonoids (CSTF). CSTF extraction was performed using 60% ethanol as the solvent, and fractional extraction was undertaken using different polar solvents, which gave the normal hexane (n-hexane), ethyl acetate and normal butanol (n-BuOH) extracts. Using different types of corn silk flavonoids as reference standards, comparisons were made with the total flavonoid content of the ethyl acetate and n-BuOH extracts under the $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3/\text{AlCl}_3\text{-NaOH}$ and $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3/\text{AlCl}_3$ complex chromogenic systems. High-performance liquid chromatography (HPLC) was also performed on the flavonoid content of the ethyl acetate and n-BuOH extracts to identify the most suitable reference standard and chromogenic system. The flavonoid content of the ethyl acetate and n-BuOH extracts detected by HPLC was 83.45% and 57.36%, respectively. The comparative results indicated that the $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3$ complex chromogenic system with rutin as the reference standard was the closest to the CSTF detected by HPLC. In conclusion, the $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3$ complex chromogenic system was the best method for quantifying the total flavonoid content in corn silk and in each extract, and the flavonoid content of CSTF extract detected using this method was 1.08%. Therefore, this is a simple and accurate technique that can serve as a basis for the development, utilization and quality control of corn silk flavonoids.

Key words: corn silk; flavonoids; spectrophotometry; complex chromogenic system; high-performance liquid chromatography

玉米须, 为禾本科一年生草本植物玉蜀黍 (*Zea mays*) 的花柱和柱头^[1-3]。玉米须是一味常见的中草药, 民间常作为药茶和药膳食用, 最早记载于明代中医著作《滇南本草》。现代研究发现, 玉米须含有多种生物活性成分, 如多糖、黄酮、甾醇、有机酸、皂苷^[4-7]等。其中黄酮是玉米须中最重要的活性成分之一, 有研究表明黄酮类化合物具有抗菌消炎、抗癌、抗氧化、降血糖、降血脂等作用, 是临床上治疗心血管疾病的良药, 对强心、抗心律失常、降低血清胆固醇均有疗效^[8-15]。

黄酮类化合物是玉米须质量评判的指标性成分, 因而准确测定玉米须总黄酮 (Corn Silk Total Flavonoids, CSTF) 含量具有十分重要的意义。目前总黄酮含量测定的方法主要有薄层色谱法 (Thin-Layer Chromatography, TLC)、分光光度法、HPLC法和高效液相色谱-质谱联用法 (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS) 等^[16-22]。其中 TLC 法灵敏度低。HPLC 和 HPLC-MS 准确性和灵敏度高, 但检测成本高。分光光度法操作简便、耗时短, 但很难避免复杂的成分对测定结果的干扰。如玉米须中的绿原酸, 在碱性条件下会与铝离子发生络合反应, 在常用的显色体系 $[\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}]$ 中, 可能会干扰 CSTF 含量测定结果^[21]。因而, 有必要对 CSTF 含量测定络合显色体系适用性进行研究。目前总黄酮含量检测的络合显色体系主要有三氯化铝比色法 (KAc-AlCl_3 、 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$) 和硝酸铝比色法 $[\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 、 $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3]$ ^[21-23]。HPLC 法可不受绿原酸干扰, 但直接检测 CSTF 需

要较多的对照品和预处理 (如分级萃取等) 减少杂质后检测。因此, 通过 HPLC 法筛选适合 CSTF 含量测定的络合显色体系, 既可排除绿原酸的干扰, 又可解决 HPLC 法难于直接检测 CSTF 含量的问题。迄今未见有关 CSTF 含量检测络合显色体系适用性的相关报道。

综上所述, 本实验采用溶剂法和分级萃取法依次获得 CSTF 提取物和各级萃取物, 通过比较提取物与不同对照品在不同显色体系下的光谱数据和标准曲线相关性, 排除部分不适合络合显色体系的对照品; 以分级萃取物为检测样品, 应用 HPLC 法筛选适用于 CSTF 含量测定的络合显色体系, 从而建立一种简易、快速、准确测定 CSTF 含量的分光光度法, 以期为玉米须黄酮类物质的开发利用和质量管控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米须, 本实验采购于哈尔滨市; 槲皮素、槲皮苷、木犀草素、木犀草苷、芦丁、芹菜素、表儿茶素纯度均 $\geq 98\%$, 成都曼思特生物技术有限公司; 无水乙醇、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、九水硝酸铝、三氯化铝 (结晶) 均为分析纯, 国产; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 天津星马克科技发展有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-1601 紫外分光光度计, 北京伯泰科仪器股份有限公司; KQ-600V 型超声清洗器, 昆山市超声

仪器有限公司；RE52 型旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；L-2000 高效液相色谱仪，HITACHI 日立科学仪器有限公司；DHG-9010 烘箱，上海一恒科学仪器有限公司；超纯水仪器，赛多利斯公司。

1.3 试验方法

1.3.1 玉米须分析样品的制备

1.3.1.1 制备玉米须总黄酮提取液

依据课题组前期优化的样品制备方法，精确称取干燥、粉碎的玉米须（过 60 目筛）1.00 g 置于锥形瓶中，加入体积分数为 60% 乙醇溶液，料液比 1:30 g/mL，超声提取 1.50 h，过滤并收集滤液。将过滤后剩下的滤渣重复提取二次后，将滤液合并，放置 4 °C 冰箱中保存备用。实验另重复 5 次，用于 1.3.4 中 CSTF 含量检测。

1.3.1.2 制备EAE和n-BuOH萃取物。

取干燥粉碎后玉米须 20.00 g，按 1.3.1.1 中方法提取，将滤液合并后置于 500 mL 旋蒸瓶中，减压蒸馏至无醇味，将浓缩液倒入分液漏斗中，依次采用正己烷（Normal Hexane, *n*-Hexane）、乙酸乙酯（Ethyl Acetate Extracts, EAE）和正丁醇（Normal Butanol, *n*-BuOH）、等体积萃取 2 次后合并相同萃取层，对各萃取液进行减压蒸馏，得到 *n*-Hexane 萃取物（油状）0.36 g、EAE 萃取物 0.20 g 和 *n*-BuOH 萃取物 0.37 g，置于冰箱中 4 °C 保存备用。*n*-Hexane 萃取物主要为非极性挥发油类物质，因此本研究重点讨论 EAE 和 *n*-BuOH 萃取物。

1.3.2 分光光度法不同络合显色体系的考察

1.3.2.1 不同络合显色体系最大吸收波长的确定

按如下方法制备对照品标准液，精确称取芦丁 5.00 mg，加入体积分数为 60% 乙醇定容至 25 mL，得到 0.20 mg/mL 芦丁标准溶液。分别精密称取 5.00 mg 芹菜素、槲皮素、芒柄花黄素和表儿茶素于 10 mL 容量瓶，体积分数为 60% 乙醇定容，分别得到 0.50 mg/mL 芹菜素、槲皮素、芒柄花黄素和表儿茶素标准溶液。各标准液于冰箱中 4 °C 保存备用。

$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3\text{-NaOH}$ 络合显色反应体系参照丁嘉信等^[24]的方法进行该体系下络合显色反应。准确移取 CSTF 提取液和稀释后各标准液 1 mL，依次加入质量分数 5% NaNO_2 溶液 0.30 mL，振荡

摇匀，静置 5 min，加入质量分数 10% $\text{Al(NO}_3)_3$ 溶液 0.30 mL，6 min 后加入 1 mol/L NaOH 4.00 mL 摇匀，静置反应 15 min，以体积分数 60% 乙醇定容，并作为参比溶液，在 300~600 nm 下进行连续波长扫描，绘制 CSTF 提取液和各标准液在该显色体系下光谱图，并确定最大吸收波长，将 0.30 mL 质量分数 10% 的 $\text{Al(NO}_3)_3$ 溶液换成质量分数 10% 的 AlCl_3 溶液重复该实验。

$\text{KAc-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3$ 络合显色反应体系参照徐兰英等^[23]方法进行该体系下络合显色反应。准确移取 CSTF 提取液和稀释后各标准液 0.30 mL，依次加入 0.10 mol/mL $\text{Al(NO}_3)_3$ 溶液 2 mL，静置 6 min，再加入 1 mol/mL KAc 溶液 3 mL，静置 15 min，以体积分数 60% 乙醇定容，并作为参比溶液，在 250~600 nm 下进行连续波长扫描，绘制 CSTF 提取液和各标准液在该显色体系下光谱图，并确定最大吸收波长。将 2 mL 0.10 mol/mL 的 $\text{Al(NO}_3)_3$ 溶液换成 0.10 mol/mL 的 AlCl_3 溶液重复该实验。

1.3.2.2 不同络合显色体系标准曲线的绘制

$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3\text{-NaOH}$ 络合显色反应体系：分别准确移取 1.3.2.1 中五种标准溶液 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 置于 10 mL 容量瓶中定容。按照 1.3.2.1 中 $\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3\text{-NaOH}$ 络合显色反应体系方法操作步骤制备待检测溶液，以体积分数 60% 乙醇作为参比溶液，在最大吸收波长下检测吸光度，以质量浓度 (x) 为横坐标，吸光度 (y) 为纵坐标绘制标准工作曲线。将 0.30 mL 质量分数 10% 的 $\text{Al(NO}_3)_3$ 溶液换成质量分数 10% 的 AlCl_3 溶液重复该实验。

$\text{KAc-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3$ 络合显色反应体系：分别准确移取 1.3.2.1 中五种标准品溶液 0.00、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL 置于 10 mL 容量瓶中定容。按照 1.3.2.1 中 $\text{KAc-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3$ 络合显色反应体系方法操作步骤制备待检测溶液，以体积分数 60% 乙醇作为参比溶液，在最大吸收波长下检测吸光度，以质量浓度为 (x) 轴，吸光度为 (y) 轴绘制标准工作曲线。将 2 mL 0.10 mol /L $\text{Al(NO}_3)_3$ 溶液换成 0.10 mol /L AlCl_3 溶液重复该实验。

1.3.2.3 不同络合显色体系EAE和n-BuOH萃取液中总黄酮含量测定

准确称取 5.00 mg EAE 和 *n*-BuOH 萃取物，置

于 10 mL 容量瓶, 体积分数为 60% 乙醇定容, 得到 EAE 和 n-BuOH 待测液, 4 °C 保存待用。

NaNO₂-Al(NO₃)₃/AlCl₃-NaOH 络合显色反应体系: 将 EAE 和 n-BuOH 待测液稀释一定倍数, 按照 1.3.2.1 中方法反应后在 510 nm 下测其吸光度。将吸光值带入 NaNO₂ 法的标准工作曲线中计算总黄酮含量。

KAc-Al(NO₃)₃/AlCl₃ 络合显色反应体系将 EAE 和 n-BuOH 待测液稀释一定倍数, 按照 1.3.2.1 中方法反应后在 418 nm 下测其吸光度。将吸光值带入 KAc 法的标准工作曲线中计算总黄酮含量。

1.3.3 HPLC法测定EAE和n-BuOH萃取液中总黄酮含量

1.3.3.1 HPLC色谱条件

参照谢彩侠等^[25]方法的色谱条件测定 EAE 和 n-BuOH 萃取液中总黄酮含量。菲罗门反相 C₁₈ 色谱柱 (4.60 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.20% 体积分数磷酸水溶液, 梯度: 0~100 min, 40%~60% 体积分数甲醇, 45~85 min, 60%~70% 体积分数甲醇, 85~100 min, 70%~70% 体积分数甲醇; 流速: 0.80 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

1.3.3.2 HPLC工作曲线的建立

准确称取芦丁、芹菜素、木犀草素、槲皮素、木犀草苷、异红草苷、异鼠李素、表儿茶素和芒柄花黄素 5.00 mg, 甲醇溶解定容至 10 mL, 配置成 0.50 mg/mL 标准工作液, 将各标准品梯度稀释 (浓度范围见表 3), 经 HPLC 检测后, 以 9 种标准品的质量浓度 (x) 为横坐标 - 峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准工作曲线。

1.3.3.3 测定EAE和n-BuOH萃取液中玉米须黄酮含量

分别准确移取 1 mL 1.3.3.3 中配制的 EAE 和 n-BuOH 待测液, 0.22 μm 滤膜过滤后进样, 待测液按 1.3.3.1 中色谱条件进行分析, 所得峰面积代入 1.3.3.2 建立的标准工作曲线计算玉米须黄酮含量。

1.3.4 KAc-Al(NO₃)₃络合显色法测定CSTF含量的计算

以芦丁为对照品, 采用 KAc-Al(NO₃)₃ 络合显色体系与 1.3.1.1 中制备的 5 份 CSTF 提取液进行络合反应, 检测总黄酮含量。

总黄酮含量计算公式如下:

$$X = \frac{A \times B}{M \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

X—CSTF 含量, %;

A—标准工作曲线计算得到总黄酮的质量浓度, mg/mL;

B—稀释体积倍数, mL;

M—样品的质量, g。

1.4 数据处理

采用 Excel 2019 软件对试验 1.3.2 和 1.3.3 数据进行统计和分析, 所有实验数据均重复测定 3 次取平均值。

2 结果与讨论

2.1 不同络合显色体系CSTF光谱分析

将 CSTF 提取液和各标准品于不同络合显色体系下进行反应, 根据不同体系显色区域分别在 300~600 nm 和 250~600 nm 波长范围进行扫描。图 1a 和图 1b 为 NaNO₂ 显色体系下 Al(NO₃)₃ 和 AlCl₃ 的显色结果, 如图 1a 和图 1b 所示, CSTF 和芦丁在波长 500 nm 左右均有最大吸收值, 槲皮素、芹菜素、表儿茶素和芒柄花黄素在波长 450~600 nm 之间均无最大吸收, 因此, 不同铝盐对 NaNO₂ 显色体系的影响不大, 由此表 1 中仅列出 NaNO₂ 显色体系下 Al(NO₃)₃ 部分的光谱数据。由表 1 可知, 在 NaNO₂ 显色体系下, CSTF 与对照液芹菜素、槲皮素、表儿茶素和芒柄花黄素的吸收波长相差较大, 分别是 122、140、162 和 200 nm, 与对照液芦丁的最大吸收波长最为接近, 仅相差 14 nm, 因而根据光谱数据排除槲皮素、芹菜素、表儿茶素和芒柄花黄素, 芦丁为 NaNO₂ 显色体系下最适对照品。

图 1c 和图 1d 为 KAc 显色体系下 Al(NO₃)₃ 和 AlCl₃ 的显色结果, 如图 1c 和图 1d 所示, CSTF 和芦丁在波长 400 nm 左右均有最大吸收值, 槲皮素和芒柄花黄素在波长 450 nm 左右均有最大吸收, 芹菜素和表儿茶素在波长 400~600 nm 之间均无最大吸收, 因此, 不同铝盐对 KAc 显色体系的影响不大, 由此表 1 中仅列出 KAc 显色体系下 AlCl₃ 部分的光谱数据。由表 1 可知, 在 KAc 显色体系下, CSTF 与对照液槲皮素、表儿茶素和芒柄花黄素的吸收波长相差分别为 107、94 和 126 nm, 因而根据光谱数据可知槲皮素、表儿茶素和芒柄花黄素作为对照品测定 CSTF 含量是不适合的。

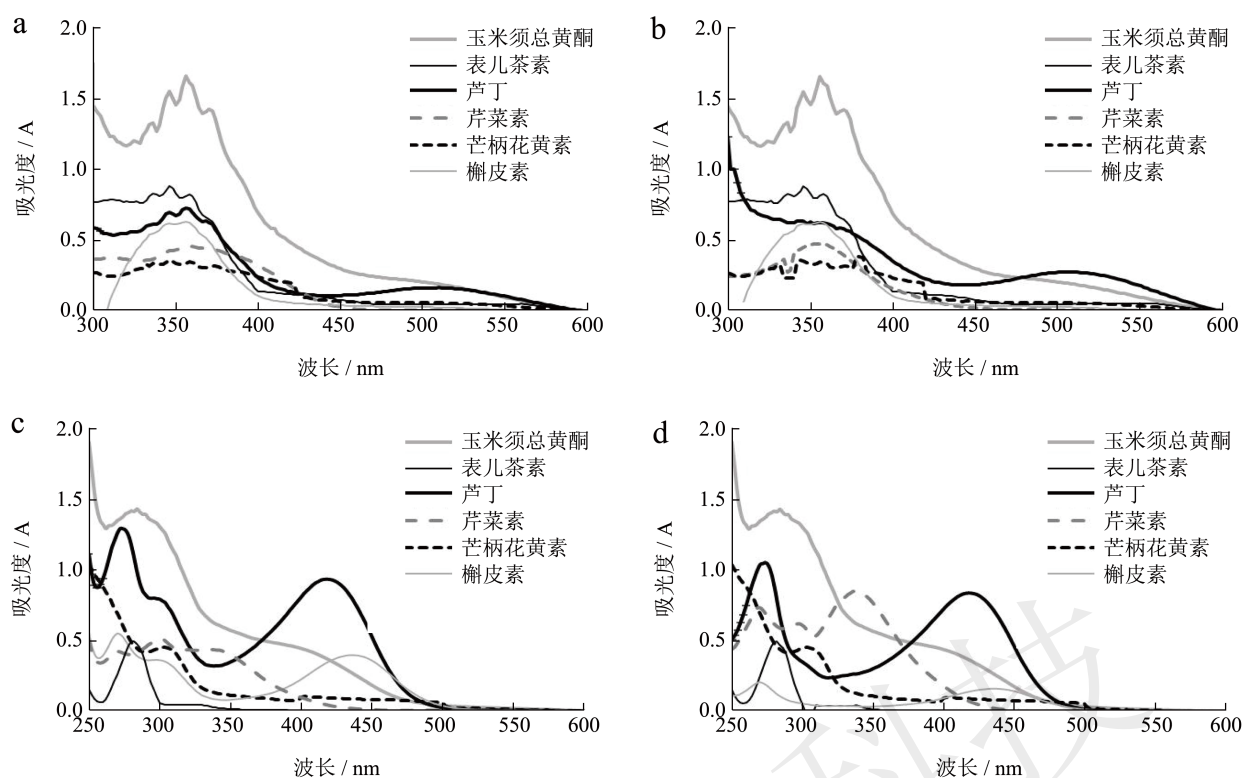


图1 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ (a)、 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$ (b)、 $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3$ (c) 和 KAc-AlCl_3 (d) 反应体系的紫外-可见光谱图

Fig.1 UV-visible spectrogram of $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ (a), $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$ (b), $\text{KAc-Al}(\text{NO}_3)_3$ (c), and KAc-AlCl_3 (d) reaction systems

表1 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 和 KAc-AlCl_3 反应体系的最大吸收波长 (nm)

Table 1 The maximum absorption wavelength of $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ and KAc-AlCl_3 reaction systems (nm)

名称	黄酮类型	$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$		KAc-AlCl_3	
		最大吸收波长	最大波长差	最大吸收波长	最大波长差
CSTF	总黄酮	496		376	
芦丁	黄酮糖苷	510	14	418	42
芹菜素	黄酮	374	122	338	38
槲皮素	黄酮醇	356	140	269	107
表儿茶素	黄烷醇	334	162	282	94
芒柄花黄素	异黄酮	296	200	250	126

2.2 不同络合显色体系标准曲线的绘制

表2为5种对照品在两种络合显色反应体系下的标准工作曲线数据。由表2可知,芦丁在两种体系

下均呈现良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.99$); 芹菜素在以 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 为铝离子进行络合反应的体系中, 线性关系良好 ($R^2 \geq 0.99$); 表儿茶素在 NaNO_2 反应体系中, 线性关系良好 ($R^2 \geq 0.99$); 芒柄花黄素在 KAc 反应体系中, 线性关系良好 ($R^2 \geq 0.99$)。将线性关系良好的对照品及相应络合显色体系用于接下来分光光度法测定 EAE 和 $n\text{-BuOH}$ 萃取液中总黄酮含量。

2.3 EAE和n-BuOH萃取液中总黄酮含量的测定

2.3.1 HPLC测定EAE和n-BuOH萃取液中总黄酮含量

2.3.1.1 HPLC工作曲线的建立

将芦丁、表儿茶素、木犀草苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、芒柄花黄素、异红草苷、异鼠李素分别进行2倍梯度稀释,以标准品的浓度 (x) 为横坐标,峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准工作曲线,实验数据和浓度范围见表3。结果表明标准工作曲线线性关系良好 ($R^2 \geq 0.99$)。

表 2 芦丁、芹菜素、槲皮素、表儿茶素和芒柄花黄素对照品在NaNO₂和KAc显色体系的标准工作曲线

Table 2 Standard working curve of Rutin, Apigenin, Quercetin, Epicatechin and Anthocyanin under different reaction systems

名称	NaNO ₂ -Al(NO ₃) ₃ -NaOH		NaNO ₂ -AlCl ₃ -NaOH		KAc-Al(NO ₃) ₃		KAc-AlCl ₃		C/(μg/mL)
	回归方程	R ²	回归方程	R ²	回归方程	R ²	回归方程	R ²	
芦丁	y=1.16x-0.011 5	0.999 7	y=1.111 6x-0.007 4	0.999 9	y=3.069x+0.017 2	0.999 7	y=3.220 8x-0.007 4	0.999 9	7~250
芹菜素	y=11.284x+0.124 5	0.998 0	-	-	y=15.065x-0.048 9	0.999 5	-	-	7~250
槲皮素	-	-	-	-	-	-	-	-	7~250
表儿茶素	y=1.117 5x+0.119 6	0.992 3	y=1.199 6x+0.080 5	0.999 0	-	-	-	-	7~250
芒柄花黄素	-	-	-	-	y=6.024x+0.296 5	0.990 8	y=8.808 4x+0.260 7	0.994 1	7~250

表 3 9 种主要玉米须黄酮的HPLC标准曲线数据表

Table 3 Linear regression data of nine main flavonoids in corn silk

名称	黄酮类型	回归方程	R ²	C/(μg/mL)
芦丁	黄酮糖苷	y=24.053x+41.474	0.999 9	7~250
表儿茶素	黄烷醇	y=18.086x+80.487	0.999 8	7~250
木犀草苷	黄酮糖苷	y=13.489x+47.363	0.999 8	7~250
槲皮素	黄酮醇	y=33.229x+55.328	0.999 9	7~250
芹菜素	黄酮	y=37.431x-13.879 3	0.999 1	7~250
芒柄花黄素	异黄酮	y=66.450x+93.549	0.999 4	7~250
异红草苷	黄酮糖苷	y=34.223x-95.556	0.999 4	7~250
异鼠李素	黄酮醇	y=41.684+10.178 7	0.999 6	7~250
木犀草素	黄酮	y=50.799+16.735 0	0.997 9	7~250

2.3.1.2 HPLC检测分离9种玉米须黄酮

将EAE和n-BuOH待测液通过0.22 μm滤膜后按照1.3.3.1的方法进行检测,检测结果如图2所示。将图谱中待测液与标准品的保留时间比较可知,峰1为异红草苷,RT:3.64 min,峰2为木犀草苷,RT:3.92 min,峰3为表儿茶素,RT:32.52 min,峰4为芦丁,RT:53.30 min,峰5为槲皮素,RT:59.19 min,峰6为木犀草素,RT:66.18 min,峰7为芹菜素,RT:81.78 min,峰8为异鼠李素,RT:82.36 min,峰9为芒柄花黄素,RT:85.36 min。九种黄酮的峰型和分离度均良好。EAE和n-BuOH待测液检测结果如图2b和2c所示,在EAE萃取物和n-BuOH萃取物中,含量最高的为异红草苷。将各物质峰面积代入标准曲线计算含量,数据结果如表4所示,EAE和n-BuOH中主要黄酮总含量分别为83.45%和57.36%。

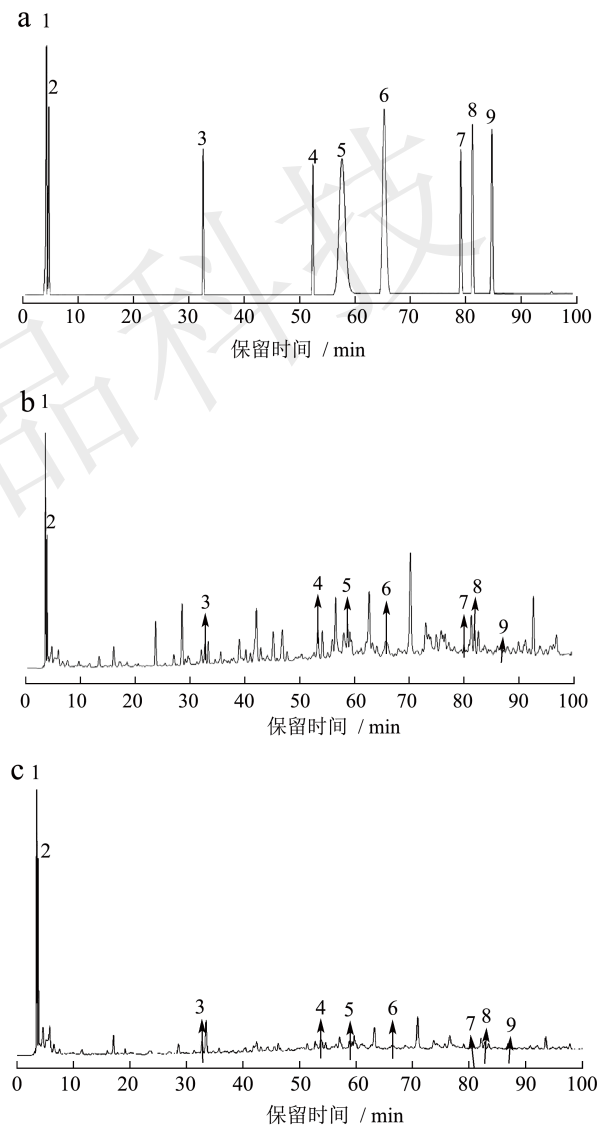


图 2 9 种玉米须黄酮的 HPLC 色谱图 (a)、EAE 萃取物的 HPLC 色谱图 (b) 和 n-BuOH 萃取物 HPLC 色谱图 (c)

Fig.2 Chromatogram of nine main flavonoids in corn silk (a), chromatogram of the ethyl acetate extract (b), chromatogram of the n-BuOH (c)

表 4 EAE和n-BuOH萃取液中HPLC法测定9种黄酮的含量

Table 4 The contents of nine kinds of flavonoids in EAE and n-BuOH extracts determined by HPLC

名称	异红草苷 /($\mu\text{g/g}$)	木犀草苷 /($\mu\text{g/g}$)	表儿茶素 /($\mu\text{g/g}$)	芦丁 /($\mu\text{g/g}$)	槲皮素 /($\mu\text{g/g}$)	木犀草素 /($\mu\text{g/g}$)	芹菜素 /($\mu\text{g/g}$)	异鼠李素 /($\mu\text{g/g}$)	芒柄花黄素 /($\mu\text{g/g}$)	总黄酮含量/%
EAE 萃取物	396 147	254 040	31 132	55 301	23 112	19 958	6 960	42 200	5 660	83.45
n-BuOH 萃取物	320 348	206 523	9 378	9 254	6 679	3 442	3 860	9 427	4 730	57.36

2.3.2 分光光度法不同络合显色体系测定EAE和n-BuOH萃取液中总黄酮含量

在 NaNO_2 和 KAc 络合显色体系下, 相应波长范围内, 对 EAE 和 n-BuOH 中总黄酮含量进行检测分析, 检测结果如表 5 所示。其中, 以芦丁为对照品, NaNO_2 体系下, EAE 总黄酮测定值达到 153.74% 和 138.03%, n-BuOH 总黄酮测定值达到 184.03% 和 160.18%; KAc 体系下, AlCl_3 法中 EAE 和 n-BuOH 萃取液中总黄酮测定值达到 105.84% 和 112.48%, 与实际值偏离较大。有文献报道络合反应发生在黄酮类 B 环的邻二酚羟基部位^[26], 而玉米须中的非黄酮物质绿原酸同样具有邻二酚羟基结构, 与黄酮类物质一样可发生络合显色反应, 这可能就是以上反应体系下总黄酮测定值偏大的原因。任顺诚等^[27]比较了黄酮类测定方法, 同样认为 $\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 不适合测定玉米须黄酮含量。

表 5 分光光度法检测EAE和n-BuOH萃取液中总黄酮含量

Table 5 Spectrophotometric determination of Total Flavonoids in EAE and n-BuOH extracts

对照品	方法	EAE 总黄酮 含量/%	n-BuOH 总黄酮 含量/%
芦丁	$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法	184.03	153.74
	$\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$ 法	160.18	138.03
	$\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 法	87.03	61.82
	KAc-AlCl_3 法	112.48	105.84
芹菜素	$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法	38.23	19.63
	$\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 法	29.65	15.96
表儿茶素	$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法	72.20	64.64
	$\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$ 法	68.36	52.58
芒柄花黄素	$\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 法	19.27	10.39
	KAc-AlCl_3 法	18.34	9.47

由表 4 可知, HPLC 测定的 EAE 和 n-BuOH 中黄酮物质总含量分别为 83.45% 和 57.36%。该结果比任顺诚等^[27]采用 HPLC 法测定结果偏大, 这是由于分析样品, 样品处理方法, 液相分析条件,

以及外标参考不同导致, 任顺诚仅采用槲皮素作外标。在 EAE 和 n-BuOH 中肯定还存在其他黄酮类物质, 因此无论采用 NaNO_2 或 KAc 两种络合显色体系测定的黄酮含量都应大于 83.45% 和 57.36%。由表 5 可知, 与 HPLC 法结果较接近的是以芦丁为参照物, $\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 体系下测得的总黄酮含量。推测含有邻二酚羟基的非黄酮类物质在 $\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 显色体系反应中无吸收波长, 所以对显色结果无影响。以黄酮类芹菜素、黄烷醇类表儿茶素和异黄酮类芒柄花黄素为参照物的显色体系与 HPLC 法检测结果差别较大, 推测可能由于它们均为黄酮苷元类物质, 而玉米须中 n-BuOH 和 EAE 提取物主要为黄酮苷类物质, 二者结构存在一定差异所导致。因此, 选定以芦丁为标准品的 $\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 法为 CSTF 含量测定的最佳方法。

2.4 CSTF含量的测定

以芦丁为标准品, 采用 $\text{KAc-Al(NO}_3)_3$ 法测定 CSTF 含量, 连续测定 5 次, 平均值为 1.08%, 相对标准偏差 0.035%。

表 6 芦丁为对照品的KAc-Al(NO₃)₃法测定总黄酮含量Table 6 KAc-Al(NO₃)₃ method determination of total flavonoids

称样质量 /g	总黄酮 含量/%	平均值 /%	相对标准 偏差/%
1.00	1.12	1.08	0.04
1.00	1.10		
1.00	1.09		
1.00	1.06		
1.00	1.02		

3 结论

实验建立了一种简单、准确的玉米须中总黄酮类物质含量测定的方法。通过比较以不同类型黄酮为参照物(芦丁、芹菜素、槲皮素、表儿茶素、芒柄花黄素), 不同显色体系 [$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3\text{-NaOH}$ 和 $\text{KAc-Al(NO}_3)_3/\text{AlCl}_3$] 中各个样品的总黄酮

含量, 最终通过 HPLC 法筛选得出以芦丁为对照品的 KAc-Al(NO₃)₃ 法是最适合的显色体系, 并考察了该体系下玉米须提取液总黄酮含量。该方法排除了含有邻二酚羟基结构物质的干扰, 准确度高, 重现性好, 操作简便, 实验结果为其它植物中黄酮类物质含量的准确测定提供了参考依据。同时, 为玉米须中黄酮类化合物的深入研究和在不同研究领域的进一步开发利用提供参考依据。

参考文献

- [1] WANG P, WANG Z, SUN X, et al. Interaction effect of nitrogen form and planting density on plant growth and nutrient uptake in maize seedlings [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(5): 1120-1129.
- [2] SOARE E, CHIURCIU I A, BALAN A V, et al. World market research on maize [C] // "Agriculture for Life, Life for Agriculture" Conference Proceedings, 2018, 1(1): 216-222.
- [3] TANUMIHARDJO S A, MCCULLEY L, ROH R, et al. Maize agro-food systems to ensure food and nutrition security in reference to the sustainable development goals [J]. *Global Food Security*, 2020, 25:100327.
- [4] HU Q L, ZHANG L J, LI Y N, et al. Purification and anti-fatigue activity of flavonoids from corn silk [J]. *International Journal of Physical Sciences*, 2010, 5(4): 321-326.
- [5] 宋有洪, 吴菲, 吴玉银, 等. 玉米花丝药用价值研究进展[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(2): 12-23.
- [6] 郭志红, 周鸿立. 玉米须黄酮类化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(8): 222-225.
- [7] JIA Y, WANG Y, LI R, et al. The structural characteristic of acidic-hydrolyzed corn silk polysaccharides and its protection on the H₂O₂-injured intestinal epithelial cells [J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129691.
- [8] ABIRAMI S, PRIYALAKSHMI M, SOUNDARIYA A, et al. Antimicrobial activity, antiproliferative activity, amylase inhibitory activity and phytochemical analysis of ethanol extract of corn (*Zea mays* L.) silk [J]. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 2021, 4: 100089.
- [9] NESSA F, ISMAIL Z, MOHAMED N. Antimicrobial activities of extracts and flavonoid glycosides of corn silk (*Zea mays* L.) [J]. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2012, 1(2): 115-120.
- [10] BOEIRA C P, ALVES J S, FLORES D C B, et al. Antioxidant and antimicrobial effect of an innovative active film containing corn stigma residue extract for refrigerated meat conservation [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(9): e15721.
- [11] GUO J, LIU T, HAN L, et al. The effects of corn silk on glycaemic metabolism [J]. *Nutrition & Metabolism*, 2009, 6(1): 1-6.
- [12] ZHANG Y, WU L, MA Z, et al. Anti-diabetic, anti-oxidant and anti-hyperlipidemic activities of flavonoids from corn silk on STZ-induced diabetic mice [J]. *Molecules*, 2015, 21(1): 7.
- [13] 黄俊文, 倪贺, 阳成伟. 玉米须活性成分提取及其保健机理研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(8): 388-395.
- [14] QAISER H. Evaluation of antagonistic action of corn silk extract towards various fungal and bacterial pathogens [J]. *LGUJLS*, 2019, 3(4): 224-230.
- [15] HELMY A, EL-SHAZLY M, SELEEM A, et al. The synergistic effect of biosynthesized silver nanoparticles from a combined extract of parsley, corn silk, and gum arabic: *in vivo* antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities [J]. *Materials Research Express*, 2020, 7(2): 025002.
- [16] F FUSI, A TREZZA, M TRAMAGLINO, et al. The beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: Focus on K⁺ channels [J]. *Pharmacological Research*, 2020, 152: 104625.
- [17] ASEM NORNAIMAH, ABDUL GAPAR NUR ADILAH, ABD HAPIT NOR HUSSAINI, et al. Correlation between total phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity of Malaysian stingless bee propolis extract [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2020, 59(4): 437-442.
- [18] ZUCOLOTTO S M, FAGUNDES C, REGINATTO F H, et al. Analysis of C-glycosyl flavonoids from south american passiflora species TI analysis of C-glycosyl flavonoids from south American passiflora species by HPLC-DAD and HPLC-MS [J]. *Phytochemical Analysis*, 2012, 23(3): 232-239.
- [19] LI Y Z, ZHAO C Y, LU C, et al. Simultaneous determination of 14 bioactive citrus flavonoids using thin-layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *Food Chemistry*, 2021, 338(15): 128115.
- [20] 史颖珠, 侯建波, 谢文, 等. 液相色谱-串联质谱法测定山银花中有机酸和黄酮类化合物的含量 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 275-285.
- [21] 陈滴, 陈星, 刘昕, 等. 分光光度法测定玉米须总黄酮含量研究 [J]. *玉米科学*, 2007, 2: 147-148.
- [22] 彭磊, 刘蕊, 王丽娜, 等. 紫外分光光度法、高效液相色谱法测定玉米须中多糖及黄酮类物质的含量 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2017, 17(2): 222-224, 231.
- [23] 徐兰英, 金丽, 许引, 等. 分光光度法检测昆仑雪菊总黄酮络合显色体系适应性研究 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 247-252.
- [24] 丁嘉信, 李万忠, 李慧芬, 等. 银杏叶提取物总黄酮紫外分光光度法含量测定的适应性研究 [J]. *食品与药品*, 2012, 14(7): 260-263.
- [25] 谢彩侠, 刘蕊, 白雁, 等. 玉米须的 HPLC 指纹图谱 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(9): 64-66.
- [26] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨 [J]. *药物分析杂志*, 2002, 2: 97-99.
- [27] 任顺成, 丁霄霖. 玉米须黄酮类测定方法的研究 [J]. *食品科学*, 2004, 3: 139-142.