

玉米须总黄酮抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析

杨生辉^{1,2}, 陈海亮³, 王文琴³, 张喜峰^{3*}, 罗光宏^{1,2*}

¹河西学院 甘肃省微藻工程技术研究中心; ²甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室;

³河西学院 农业与生物技术学院, 张掖 734000

摘要: 研究玉米须总黄酮抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。采用内部沸腾法提取玉米须总黄酮, 优化其工艺条件, 并对其进行分析。在单因素实验基础上, 采用 Plackett-Burman 法对 7 个相关因素进行评价, 筛选出具有显著性差异的 4 个因素, 并对其进行响应面优化。结果表明, 内部沸腾法提取玉米黄酮最佳条件为解析时间 16 min, 解析剂浓度 73%, 提取时间 20 min, 提取温度为 61 °C, 总黄酮提取得率为 $4.75 \pm 0.69\%$; 玉米须黄酮对晚期糖基化终产物、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶具有一定抑制效果, 呈现浓度依赖性, IC_{50} 分别为 467.90、73.07、151.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性与黄酮含量呈正相关(相关系数分别为 0.83、0.90 和 0.87; $P < 0.05$), 该研究结果可为潜在天然产物抑制剂开发提供理论依据。

关键词: 内部沸腾法; 玉米须; 乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性; 总黄酮

中图分类号: R91; RS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)7-1230-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.7.016

Antiglycation activity, acetylcholine esterase and α -glucosidase inhibitory activity of total flavonoids from corn silk

YANG Sheng-hui^{1,2}, CHEN Hai-Jing³, WANG Wen-qin³, ZHANG Xi-feng^{3*}, LUO Guang-hong^{1,2*}

¹Gansu Engineering Technology Research Center for Microalgae, Hexi University;

²Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu;

³College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, China

Abstract: To study the antiglycation activity, acetylcholine esterase and α -glucosidase inhibitory activity of total flavonoids from corn silk. Seven parameters potentially influencing the extraction yield of total flavonoids were screened through Plackett-Burman design to determine the significant variables. Then, factors effecting on extraction yield were further optimized using Box-Behnken design to predict optimum extraction conditions. Satisfactory yield of total flavonoids ($4.75 \pm 0.69\%$) was achieved using the optimal conditions. 16 min of desorption time, 73% of ethanol indesorption solvent, 20 min of extraction time, and 61 °C of extraction temperature were selected and applied for effective extraction. It also exhibited the certain antiglycation, inhibitory activity against acetylcholine esterase and α -glucosidase in a concentration-dependent manner with IC_{50} of 467.90, 73.07, and 151.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Antiglycation activity, acetylcholine esterase and α -glucosidase activity inhibitory activity were positively correlated with the content of total flavonoids, whose correlation coefficients are 0.83, 0.90 and 0.87 respectively, $P < 0.05$. It can provide a theoretical basis for the development of natural inhibitors.

Key words: internal boiling method; corn silk; acetylcholine esterase and α -glucosidase activity inhibitory activity; total flavonoids

近年来, 国内外学者研究发现黄酮类化合物除

具有较好抗氧化作用外, 同时具有显著抗糖基化、 α -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶抑制活性。如高良姜素、芹菜素、桑色素、芦丁、蓝莓中黄酮类物质、沙棘籽渣黄酮等对晚期糖基化终产物(advanced glyca-

收稿日期: 2019-02-25 接受日期: 2019-06-10

基金项目: 甘肃省高校协同创新团队项目(2017C-17)

* 通信作者 E-mail: curiouslyxad@163.com

tion end products, AGEs) 具有较高抑制作用^[1-3]; 杨梅、菊花、艾纳香叶等黄酮对 α -葡萄糖苷酶的活性具有显著抑制效果^[4,5]; 柴胡黄酮、大蒜黄酮是乙酰胆碱酯酶较好的抑制剂^[6,7]; 这可为人们预防和治疗糖尿病、阿尔茨海默病等提供理论依据, 为新型天然抑制剂开发提供参照依据。因此, 对天然产物中功能成分进行活性评价, 已成为当前研究热点之一。

甘肃河西走廊由于其独特的光照优势, 已撑起了中国玉米制种的“半壁江山”。玉米采摘过后, 大部分玉米须以废弃物形式直接处理, 附加值较低; 黄酮类化合物作为玉米须中主要有效成分之一, 具有抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤、抗肥胖和神经保护作用等多种药理活性^[8-10]。

目前, 有关玉米须黄酮提取方法主要有乙醇提取法、闪式提取法、超声波辅助提取、超声波双酶法、微波辅助等^[11-13], 上述方法或者存在提取溶剂使用量较大、需要专用设备及操作步骤繁琐; 或者能耗较高、难以实现工业化生产等缺陷; 内部沸腾法是一种快速提高有效成分传质效果的提取方法, 具有操作简单、得率较高、无需专用设备等优点^[14]。目前对玉米须黄酮抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和葡萄糖苷酶抑制活性研究报道相对较少, 另外, 受品种、产地、生长周期等差异的影响, 黄酮含量及其功能活性也不同。

本实验以玉米须为原材料, 在单因素实验基础上, 利用 Plackett-Burman 设计对影响内部沸腾法提取玉米须总黄酮的显著因素进行筛选, 采用最陡爬坡实验结合响应面实验设计, 优化玉米须总黄酮提取最佳工艺条件, 研究其抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制效果, 并对其与总黄酮含量相关性进行分析, 为功能性食品中潜在抑制剂开发应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

玉米须采摘于张掖甘州区, 经清洗、阴干、粉碎、密封保存备用。

亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、牛血清白蛋白、葡萄糖、氨基胍(AG)、阿卡波糖等试剂均为分析纯。芦丁标准品、4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、 α -葡萄糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)DTNB)、碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)购于成都德思特生物技术有限公司;

723PC 紫外分光光度计 上海现科分光仪器有限公司;DKB-501 超级恒温水浴槽 扬州市三发电子有限公司;DHZ-D(III) 循环水真空泵 巩义市京华仪器有限公司;微型植物试样粉碎机 河北省黄烨市中兴仪器有限公司;LS55 荧光分光光度计 PE 公司; Nicolet iS50 红外光谱仪 美国 Thermo Scientific。SpectraMax 190 光吸收型酶标仪 美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 内部沸腾提取法

准确称取 1.0 g 玉米须粉末, 加入一定浓度一定体积的乙醇解吸剂(浓度为 50%、60%、70%、80%、90%) 润湿一段时间后, 使解吸剂充分渗透进入玉米须组织细胞, 并使总黄酮从吸附状态中溶解下来; 然后加入高于解吸剂沸点的一定浓度的乙醇提取剂(浓度为 15%、25%、35%、45%、55%), 置于恒温水浴槽中提取一段时间(5、10、20、30、40 min), 然后真空抽滤, 得到滤液。经减压浓缩后得到黄酮提取物; 测定总黄酮含量, 计算其提取得率。

1.2.2 传统醇提法

称取 1.0 g 玉米须粉末, 加入 40 mL 80% 乙醇, 70 °C 水浴提取 60 min, 然后真空抽滤, 得到滤液。重复提取两次, 合并滤液, 测定总黄酮含量, 计算总黄酮提取得率。

1.2.3 芦丁标准曲线的绘制及总黄酮提取得率的计算

参考文献方法^[15]制作标准曲线, 以吸光度值 A 为纵坐标, 含量 C 为横坐标, 拟合得线性方程 $A = 0.01185C + 0.00254$ ($R^2 = 0.995$), 其中 C 为总黄酮含量(mg/mL), A 为相应的吸光度值。

取总黄酮提取液 0.5 mL, 加入质量分数为 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 混匀后静置 6 min, 再加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 混匀静置 6 min, 加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL, 蒸馏水定容至 10 mL, 混匀静置 15 min 后, 在 510 nm 处测定其吸光度。代入标准曲线回归方程可得浓度 C , 按照公式(1) 计算总黄酮提取得率。

$$\text{总黄酮提取得率 } Y(\%) = \frac{\text{提取液中黄酮质量}(g)}{\text{玉米须粉末质量}(g)} \quad (1)$$

1.2.4 Plackett-Burman (PB) 实验设计

在前期单因素实验的基础上, 选取解析时间(A)、解析剂体积(B)、解析剂浓度(C)、提取时间(D)、提取温度(E)、提取剂体积(F)、提取剂浓度

(G)这7个因素为自变量,以总黄酮提取得率为因变量,每个因子取高(+1)和低(-1)2个水平,采用

Design-Expert 8.0.6.1 软件进行 Placken-Burman 实验设计,实验因素、水平及编码见表1。

表1 Placken-Burman 实验设计因素水平范围
Table 1 Factors and levels in the Placken-Burman design

代码 Code	因素 Factor	低水平(-1) Low level	高水平(+1) High level
A	解吸时间 Desorption time (min)	5	25
B	解吸剂体积 Volume of desorption agent (mL)	3	5
C	解吸剂浓度 Concentration of desorption agent (%)	60	80
D	提取时间 Extraction time (min)	10	30
E	提取温度 Extraction temperature (°C)	50	70
F	提取剂体积 Volume of extracting reagent (mL)	15	25
G	提取剂浓度 Concentration of extracting reagent (%)	35	45

1.2.5 最陡爬坡实验

根据 Placken-Burman 实验结果,确定影响黄酮提取得率的显著影响,进行最陡爬坡实验,设计步长,靠近最大提取得率区域。

1.2.6 响应面设计实验

根据最陡爬坡结果,采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对显著因素进行 Box-Behnken 响应面实验设计,以获得内部沸腾法提取最佳工艺。

1.2.7 玉米须黄酮提取物定性检测

1.2.7.1 玉米须黄酮提取物全波长扫描

准确称取黄酮提取物 10 mg,加入 0.1% AlCl₃ 溶液 15 mL,用体积分数为 70% 乙醇定容至 50 mL,利用紫外-可见分光光度计在 200 ~ 600 nm 处进行扫描。

1.2.7.2 玉米须黄酮提取物红外光谱检测

将干燥后玉米须黄酮提取物与 KBr 按照质量比 1:200 比例混合研磨,制成一定厚度透明片,扫描 32 次,分辨率为 4 cm⁻¹,在红外光谱 4 000 ~ 500 cm⁻¹ 波数范围内扫描检测。

1.2.8 玉米须黄酮抗糖基化能力评价

采用牛血清白蛋白-葡萄糖模拟体系评价非酶促反应过程中 AGEs 形成情况,取浓度为 0.15 mol/L 的牛血清白蛋白和葡萄糖溶液各 1 mL,分别加入 PBS 溶剂配置浓度为 100 ~ 500 μg/mL 玉米须黄酮各 1 mL,采用同浓度的 AG 代替玉米须黄酮作为阳

性对照,37 °C 条件下水浴 8 天后,测定不同浓度玉米须黄酮对牛血清白蛋白-葡萄糖模拟体系中 AGEs 抑制效果。按公式(2)计算玉米须黄酮对牛血清白蛋白-葡萄糖模拟体系 AGEs 相对抑制率。

$$\text{相对抑制率}(\%) = \frac{F_{\text{对照}} - F_{\text{样品}}}{F_{\text{对照}} - F_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (2)$$

$F_{\text{样品}}$ 为加入样品提取液且水浴的反应液的荧光值;

$F_{\text{对照}}$ 为不添加样品但水浴的牛血清白蛋白-葡萄糖模拟体系的荧光值;

$F_{\text{空白}}$ 为不添加样品也不水浴的牛血清白蛋白-葡萄糖模拟体系的荧光值。

1.2.9 玉米须黄酮对乙酰胆碱酯酶抑制活性的测定

参照文献的方法略作改动^[16]。采用 PBS 缓冲溶液配置浓度为 20 ~ 120 μg/mL 黄酮样品溶液;在 96 孔板上加入 50 μL PBS 和 25 μL 样品溶液,再加入浓度为 1.0 μg/mL 乙酰胆碱酯酶,4 °C 反应 20 min 后,依次加入浓度为 0.3 mg/mL ATCI 和 0.59 mg/mL DTNB 各 25 μL 和 125 μL,在 37°C 孵育反应 20 min 后,以石杉碱甲为阳性对照,在 405 nm 处测定吸光值,按照公式(3)计算乙酰胆碱酯酶活性抑制率。

$$\text{乙酰胆碱酯酶活性抑制率}(\%) = \frac{(A_{\text{空}} - A_{\text{空底}}) - (A_{\text{样}} - A_{\text{样底}})}{A_{\text{空}} - A_{\text{空底}}} \times 100 \quad (3)$$

$A_{\text{空}}$ 为 PBS 缓冲液代替样品组中的样品液的吸

光值;

$A_{\text{空底}}$ 为 PBS 缓冲液代替空白组中的酶溶液的吸光值;

$A_{\text{样底}}$ 为 PBS 缓冲液代替样品组中的酶溶液的吸光值;

1.2.10 玉米须黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制活性能力评价

玉米须黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定方法参照文献^[17]略作修改,取 100 μL α -葡萄糖苷酶(酶活力 0.35 U/mL)50 μL ,加入不同浓度(100 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)玉米须黄酮 50 μL ,混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,再加入浓度为 1.5 mmol/L PNDP 100 μL 反应 20 min,加入浓度为 1 mol/L 碳酸钠溶液 1 mL 终止反应,在 400 nm 处测定吸光值, α -葡萄糖苷酶活

性抑制率计算公式(4)如下:

$$\text{酶活抑制率}(\%) = (1 - \frac{A_s - A_b}{A}) \times 100 \quad (4)$$

A_s 为加入样品的反应液的吸光值;

A_b 为不加样品的反应液的吸光值;

A 为加入样品但不加酶的反应液的吸光值。

1.3 数据处理及分析

所有实验均重复三次,以平均值 \pm 标准差表示;黄酮含量与抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性相关性分析采用 Pearson 法。

2 结果与分析

2.1 Placken-Burman 实验设计影响因素水平

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件设计 Placken-Burman 实验方案,结果见表 2。

表 2 Placken-Burman 实验设计结果
Table 2 Results of Placken-Burman design

实验号 Run numbers	各因素水平 Factor levels							总黄酮提取率 Y Yields of total flavonoids(%)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	3.79 \pm 1.02
2	-1	1	1	-1	1	1	1	3.36 \pm 0.94
3	1	-1	1	1	-1	1	1	4.19 \pm 0.69
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	3.56 \pm 0.75
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	3.71 \pm 1.04
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	3.65 \pm 0.86
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	3.49 \pm 0.96
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	3.78 \pm 1.24
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	3.90 \pm 1.34
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	3.91 \pm 0.76
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	4.16 \pm 0.49
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.61 \pm 0.79

2.2 Placken-Burman 实验显著因素的确定

表 3 影响因素方差分析结果
Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for testing the effects of factors

变异来源 Source	均方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	参数评估 Parameters evaluation
模型 Model	0.67	7	0.096	11.27	0.017	3.76
A	0.19	1	0.19	22.84	0.008 8	0.13
B	0.023	1	0.023	2.76	0.172	-0.044
C	0.15	1	0.15	17.87	0.013 4	0.11
D	0.16	1	0.16	19.35	0.011 7	0.12
E	0.079	1	0.079	9.37	0.037 6	-0.081
F	1.79E-03	1	1.79E-03	0.21	0.670	-0.012
G	0.055	1	0.055	6.49	0.063 5	-0.068

不同因素对玉米须黄酮影响显著性不同,由表3可知,模型 $P=0.017 < 0.05$,说明此模型可用于筛选玉米须黄酮提取条件相关因素,其中解析剂体积(B)、提取剂体积(F)、提取剂浓度(G)三个因素对玉米须黄酮得率影响不显著($P > 0.05$);因此,确定

解析剂体积为4 mL,提取剂体积为20 mL,提取剂浓度为40%;解析时间(A)、解析剂浓度(C)、提取时间(D)、提取温度(E)四个因素对玉米须黄酮得率影响显著($P < 0.05$),因此,以上四个因素参数确定为最陡爬坡实验参数。

表4 最陡爬坡实验设计及结果

Table 4 Design and results of steepest ascent experiment

序号 No.	解析时间 Desorption time (min)	解析剂浓度 Concentration of desorption agent (%)	提取时间 Extraction time (min)	提取温度 Extraction temperature (°C)	总黄酮提取得率 Y Yields of total flavonoids (%)
1	5	60	10	50	3.84 ± 0.78
2	10	65	15	55	4.46 ± 1.06
3	15	70	20	60	4.69 ± 0.89
4	20	75	25	65	4.70 ± 0.91
5	25	80	30	70	4.71 ± 0.69

2.3 最陡爬坡实验

由表4可知,当解析时间为25 min,解析剂浓度为70%,提取时间20 min,提取温度为60 °C时,玉米须黄酮的得率达到最大值,继续延长时间和提高浓度和温度,得率增加差异不显著($P > 0.05$)。因此,确定3号实验组合为响应面优化实验0水平值。

2.4 Box-Behnken 实验设计及结果

根据最陡爬坡确定的实验因素中心点,采用

Box-Behnken 实验设计对内部沸腾法提取总黄酮的条件:解析时间(X_1)、解析剂浓度(X_2)、提取时间(X_3)、提取温度(X_4)进行4因素3水平的响应面优化,其设计及结果见表5。

以总黄酮的提取得率 $Y(\%)$ 为响应值,根据表6的实验结果,用 Design-Expert 软件进行多元回归分析,经回归拟合后,自变量对响应值的影响可用以下回归方程表示:

表5 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 5 Design and results of Box-Behnken experiment

实验号 Run No.	X_1	X_2	X_3	X_4	总黄酮提取得率 Y Yields of total flavonoids (%)
1	-1(20)	-1(65)	0(20)	0(60)	3.48 ± 0.46
2	1(30)	-1	0	0	3.05 ± 0.73
3	-1	1(75)	0	0	3.96 ± 0.67
4	1	1	0	0	4.52 ± 0.83
5	0(25)	0(70)	-1(15)	-1(55)	2.85 ± 0.36
6	0	0	1(25)	-1	2.45 ± 0.45
7	0	0	-1	1(65)	2.45 ± 0.44
8	0	0	1	1	3.76 ± 0.38
9	-1	0	0	-1	1.96 ± 0.31
10	1	0	1	-1	3.15 ± 0.42
11	-1	0	0	1	2.86 ± 0.49
12	1	0	0	1	3.47 ± 0.53
13	0	-1	-1	0	3.04 ± 0.44
14	0	1	-1	0	3.79 ± 0.27

续表 5 (Continued Tab. 5)

实验号 Run No.	X_1	X_2	X_3	X_4	总黄酮提取得率 Y Yields of total flavonoids (%)
15	0	-1	1	0	3.49 ± 0.39
16	0	1	1	0	3.19 ± 0.67
17	-1	0	-1	0	2.39 ± 0.76
18	1	0	-1	0	3.05 ± 0.48
19	-1	0	1	0	2.96 ± 0.35
20	1	0	1	0	3.19 ± 0.46
21	0	-1	0	-1	2.15 ± 0.38
22	0	1	0	-1	2.89 ± 0.29
23	0	-1	0	1	2.89 ± 0.34
24	0	1	0	1	3.84 ± 0.47
25	0	0	0	0	4.69 ± 0.38
26	0	0	0	0	4.57 ± 0.60
27	0	0	0	0	4.56 ± 0.51
28	0	0	0	0	4.67 ± 0.46
29	0	0	0	0	4.76 ± 0.39

$$Y = 4.65 + 0.23X_1 + 0.34X_2 + 0.12X_3 + 0.3X_4 + 0.25X_1X_2 - 0.11X_1X_3 - 0.14X_1X_4 - 0.26X_2X_3 + 0.052X_2X_4 + 0.43X_3X_4 - 0.69X_1^2 - 0.41X_2^2 - 0.87X_3^2 - 0.87X_4^2$$

回归方程可行度统计见表 6, R^2 为 0.914 3, R^2_{Adj} 为 0.828 5, 说明此回归方程具有良好的拟合性; 信噪比为 10.803, 大于 4, 说明模型具有较高可信度, 因此, 实验拟合方程可用于响应面实验设计。

对响应面实验结果进行方差分析, 由表 7 可知, 该回归模型 $P < 0.001$, 说明模型极显著。一次项 X_2

表 6 模型可信度分析

Table 6 Reliability analysis model

可信度分析项 Reliability analysis	统计结果 Statistical result
得率均值 Mean (%)	3.38
变异系数 C. V. (%)	9.87
相关系数平方 R^2	0.91
修正相关系数平方 R^2_{Adj}	0.83
拟相关系数平方 R^2_{Pred}	0.51
信噪比 Signal to Noise Ratio	10.80

表 7 Box-Behnken 实验结果的回归分析

Table 7 Regression analysis of Box-Behnken experiment results

来源 Source	总和 Sum of squares	自由度 Df	均方差 Mean square	F 值 F value	P 值 (Pr < F) P value	显著性 Statistical significance
模型 Model	16.63	14	1.19	10.67	< 0.000 1	**
X_1	0.66	1	0.66	5.95	0.028 6	*
X_2	1.39	1	1.39	12.52	0.003 3	**
X_3	0.18	1	0.18	1.62	0.224 3	
X_4	1.22	1	1.22	10.92	0.005 2	**
X_1X_2	0.25	1	0.25	2.2	0.160 2	
X_1X_3	0.046	1	0.046	0.42	0.529 8	
X_1X_4	0.084	1	0.084	0.76	0.399 5	**

续表 7 (Continued Tab. 7)

来源 Source	总和 Sum of squares	自由度 Df	均方差 Mean square	F 值 F value	P 值 (Pr < F) P value	显著性 Statistical significance
X_2X_3	0.28	1	0.28	2.47	0.138	
X_2X_4	0.011	1	0.011	0.099	0.757 7	
X_3X_4	0.73	1	0.73	6.56	0.022 6	*
X_1^2	3.07	1	3.07	27.56	0.000 1	**
X_2^2	1.07	1	1.07	9.63	0.007 8	**
X_3^2	4.87	1	4.87	43.74	< 0.000 1	**
X_4^2	7.89	1	7.89	70.85	< 0.000 1	**
残差 Residual	1.56	14	0.11			
失拟 Lack of fit	1.53	10	0.15	21.41	0.004 8	
误差 Pure error	0.029	4	7.15E-03			
总和 Cor. total	18.19	28				

注:“**”表示差异极显著($P < 0.01$),“*”表示差异显著($P < 0.05$),以下同。

Note:“**”represented extremely significant difference ($P < 0.01$),“*” represented significant difference ($P < 0.05$),The same as in the following tables.

和 X_4 、交互项 X_1X_4 、二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对得率的影响达到极显著水平;一次项 X_1 和交互项 X_3X_4 对得率的影响达到显著水平;各个因素对玉米须黄酮得率影响大小顺序为:解析剂浓度 > 提取温度 > 解析时间 > 提取时间;

由响应面图 1 结果可知,当固定其中两个因素时,响应面总黄酮的得率随着剩余两个因素逐渐增加呈现先上升后下降趋势,存在最大值。

2.5 优化条件验证实验

采用 Design-Expert 8.0.6.1 数据处理软件分析获得提取玉米黄酮最佳条件:解析时间 16.45 min,解析剂浓度 73.30%,提取时间 19.80 min,提取温度为 60.50 °C。在实际操作过程中,对优化条件进行修正,即解析时间 16 min,解析剂浓度 73%,提取时间 20 min,提取温度为 61 °C,在此条件下,重复三次实验,玉米须黄酮平均提取得率为 $4.75 \pm 0.69\%$,与预测值 4.77% 基本吻合,证实了所建模型的高度准确性,说明响应面优化内部沸腾提取玉米须黄酮工艺条件是可行的。

2.6 与传统醇提法的比较

由表 8 可知,采用内部沸腾法提取玉米须黄酮,解吸及提取的时间合计为 36 min,比醇提法缩短 14 min。说明内部沸腾法通过解析剂作用可提高黄酮化合物传质效果;将提取所用乙醇折算为 95%,内部沸腾法只需 11.47 mL,醇提法需要 67 mL;这是因为黄酮的溶解取决于解吸过程,而内部沸腾法解吸过程的乙醇用量较少,因而乙醇总用量大为降低;内

部沸腾法的总黄酮提取得率比醇提法提高了 2.27%。这主要是内部沸腾产生时,细胞内部产生气泡,体积发生膨胀,强化传质效果,有利于有效成分的提取。综上所述,内部沸腾法明显优于传统醇提法。

2.7 玉米须黄酮提取物定性检测

由图 2 可知,玉米须黄酮粗提与 $AlCl_3$ 溶液反应后形成新的络合物,在 220 ~ 280 nm 之间出现吸收峰 I,在 300 ~ 400 nm 之间出现吸收峰 II,因此,可推断提取物主要为黄酮类化合物。

由图 3 可知,在 1643.56 cm^{-1} 具有 C=O 伸缩振动峰,且在 1383.70 、 1325.77 cm^{-1} 处具有黄酮类化合物的特征吸收峰,在 1043.80 、 1085.75 cm^{-1} 具有较强的 C-O 键振动吸收峰, 2978.08 cm^{-1} 具有 C-H 伸缩振动吸收峰。推测该提取物含有不饱和酮类成分,此结论与赵文竹结论一致^[18],说明粗提取中主要为黄酮类物质。

2.8 玉米须黄酮对晚期糖基化终产物抑制效果

由图 4 可知,随着样品质量浓度逐渐增加,两种方法提取的黄酮均对模拟体系中形成 AGEs 抑制率呈现逐渐升高的趋势;抑制能力大小依次为内部沸腾法 > 醇提法,但上述方法对 AGEs 抑制效果均低于阳性对照 AG;由回归方程计算可知,内部沸腾法、醇提法获得的黄酮对 AGEs 半数抑制浓度分别为 467.9 、 $514.4\text{ }\mu\text{g/mL}$,说明晚期糖基化终产物抑制效果与提取方法有关,提取后部分杂质多少可能影响其对 AGEs 抑制效果。

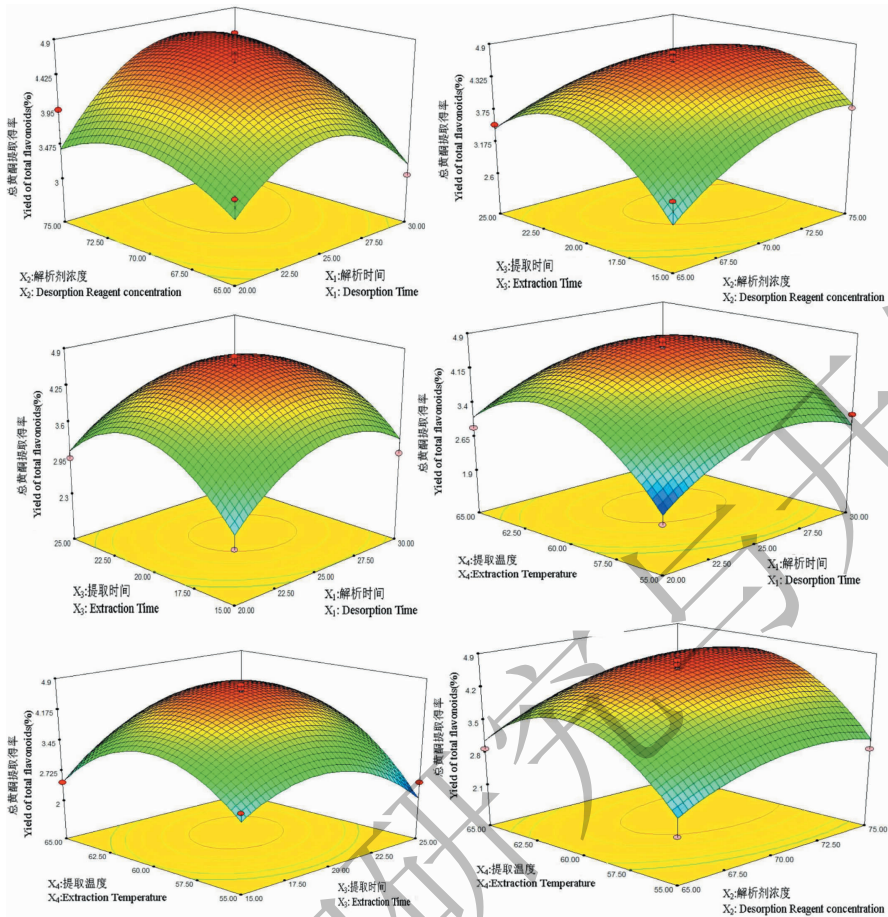


图 1 交互作用对总黄酮得率影响的响应面图

Fig. 1 Response surface plots for effects of different factors on the yield of total flavonoids

表 8 不同提取方法的比较

Table 8 Comparison of different extraction methods

提取方法 Extraction methods	提取时间 Extraction time (min)	95% 乙醇用量 95% alcohol amount (mL)	总黄酮得率 Y Yields of total flavonoids (%)
醇提法 Alcohol extraction	60	67	2.48 ± 0.48
内部沸腾法 Internal boiling method	36	11.47	4.75 ± 0.69

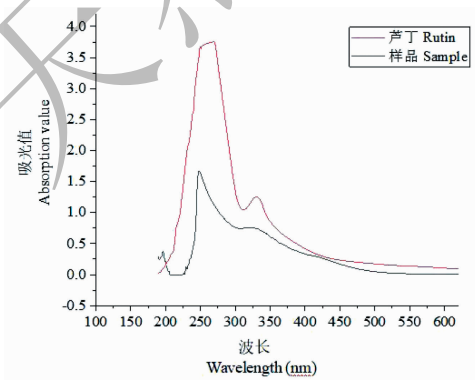


图 2 玉米须黄酮三氯化铝显色图谱

Fig. 2 The full wave scanning of flavonoids from corn silk

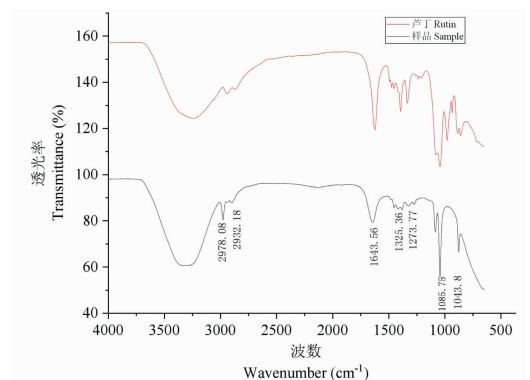


图 3 玉米须黄酮红外光谱

Fig. 3 Infrared spectrum of flavonoids

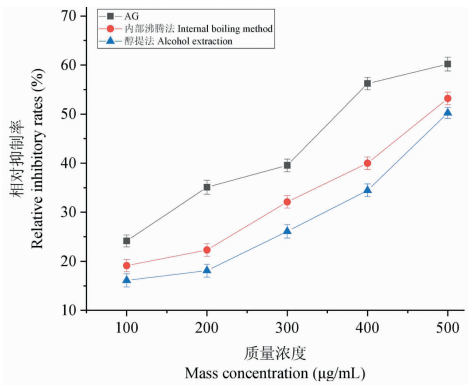


图4 玉米须黄酮对晚期糖基化终产物抑制影响

Fig. 4 Glycation inhibition rates of flavonoids samples in BSA - glucose model

2.9 玉米须黄酮对乙酰胆碱酯酶活性抑制率测定

由图5可知,当玉米须黄酮质量浓度为20 μg/mL时,内部沸腾法和醇提法提取的黄酮对乙酰胆碱酯酶活性抑制率分别为16.93% ± 1.25%、12.10% ± 1.19%。随着样品质量浓度逐渐增加,质量浓度与乙酰胆碱酯酶抑制活性之间呈现浓度依赖性,当浓度为120 μg/mL时,两种方法抑制率分别可达72.86% ± 1.68%、61.29% ± 1.47%, IC₅₀分别为73.07、80.03 μg/mL;阳性对照石杉碱甲对乙酰胆碱酯酶活性抑制率可达94.60% ± 1.38%,其比两种方法提取黄酮对酶活抑制效果显著($P < 0.05$)。

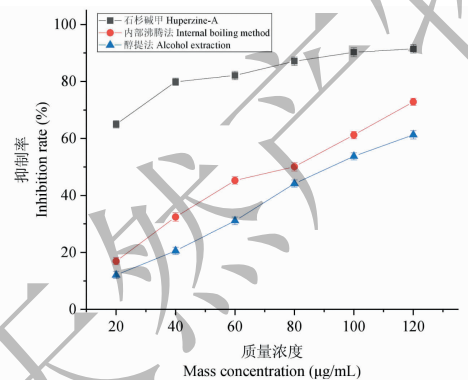


图5 玉米须黄酮对乙酰胆碱酯酶抑制活性

Fig. 5 Inhibitory effects of the flavonoids samples on the activity of acetylcholine esterase

2.10 玉米须黄酮对α-葡萄糖苷酶活性抑制率测定

位于小肠黏膜刷状缘α-葡萄糖苷酶主要用于水解低聚糖类底物非还原性末端断开α-1,4糖苷键,形成游离的葡萄糖被小肠上皮细胞吸收。因此,

抑制α-葡萄糖苷酶活性可有效延缓葡萄糖的释放,降低餐后高血糖。目前,α-葡萄糖苷酶抑制活性的测定已被广泛用于评价生物活性化合物的体外降血糖活性。

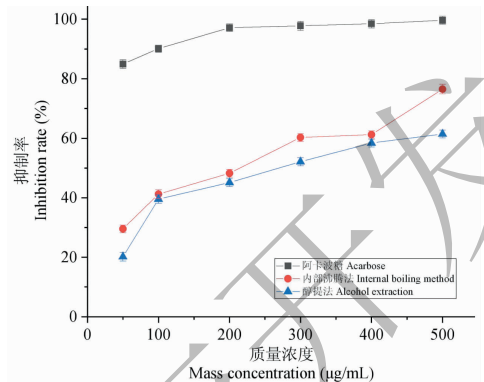


图6 玉米须黄酮α-葡萄糖苷酶抑制活性

Fig. 6 Inhibitory effects of the flavonoids samples on the activity of α-glucosidase

玉米须黄酮和阿卡波糖对α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用如图6所示,阳性对照阿卡波糖及两种方法提取的黄酮对α-葡萄糖苷酶抑制活性呈现剂量依赖性的影响。随着样品质量浓度逐渐增加,样品对α-葡萄糖苷酶抑制活性逐渐增大;在浓度为500 μg/mL时,两种方法提取玉米须黄酮和阿卡波糖对其抑制率分别为76.50% ± 1.41%、61.45% ± 1.29%、99.65% ± 1.34%。说明内部沸腾法提取黄酮对α-葡萄糖苷酶活性的抑制效果优于醇提法;因此,该结果表明玉米须黄酮可能是功能性食品中α-葡萄糖苷酶的潜在抑制剂。王占一等^[17]研究了石榴幼果总黄酮对α-葡萄糖苷酶抑制作用,质量浓度为1.50 mg/mL时,其抑制率可达63.9%,且抑制效果低于阳性对照阿卡波糖;此结论与本实验结果具有相似性。

2.11 玉米须黄酮含量与抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和α-葡萄糖苷酶抑制能力相关性分析

采用Pearson法对玉米须黄酮含量与抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和α-葡萄糖苷酶抑制能力相关性进行了分析,从表9可知,黄酮含量与抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和α-葡萄糖苷酶抑制能力相关系数分别为0.83、0.90和0.87,且黄酮含量与乙酰胆碱酯酶抑制能力相关性极显著($P < 0.01$);其与抗糖基化和α-葡萄糖苷酶抑制能力相关性显著($P < 0.05$)。说明玉米须黄酮与抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和α-葡萄糖苷酶抑制能力具有量效依赖关系。

表9 黄酮含量与抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制能力相关性Table 9 Correlation analysis of total flavonoids and antiglycosylation ability, acetylcholine and α -glucosidase activity

指标 Index	总黄酮 Total flavonoids	抗糖基化能力 Antiglycation activity	乙酰胆碱酯酶抑制能力 Acetylcholine esterase inhibitory activity	α -葡萄糖苷酶抑制能力 α -Glucosidase inhibitory activity
总黄酮 Total flavonoids	1	-	-	-
抗糖基化能力 Antiglycation activity	0.83 *	1	-	-
乙酰胆碱酯酶抑制能力 Acetylcholine esterase inhibitory activity	0.90 **	0.65	1	-
α -葡萄糖苷酶抑制能力 α -Glucosidase inhibitory activity	0.87 *	0.41	0.16	1

3 结论

采用内部沸腾法提取玉米须黄酮,在选取影响其提取得率显著性因素基础上,采用 Box-Behnken 优化其工艺优化,当解析时间 16 min,解析剂浓度 73%,提取时间 20 min,提取温度为 61 °C,在该条件下进行实验,得到总黄酮提取得率为 $4.77 \pm 0.69\%$;与传统醇提法相比,内部沸腾法所需解吸和提取的时间为 35 min,比醇提法缩短 24 min;且所用乙醇使用量较少,得率较高。在最优条件提取黄酮基础上,对其进行全波长扫描和红外光谱定性鉴定,可知其乙醇提取物主要组成为黄酮类化合物;与醇提法相比,内部沸腾法提取的总黄酮均具有较好的抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制效果,但均不如阳性对照显著($P < 0.05$)。此结果可为玉米须总黄酮在保健食品及降血糖、防治老年痴呆等药品方面开发研究提供参考依据,而对于玉米须总黄酮化合物中何种单体成分在起作用,有待进一步深入分析。

参考文献

- Hao MM, Cui HZ, Han AZ, et al. Extraction of active substances from leaves of *Morus nigra* L. and evaluation of their inhibitory effect on α -glycosidase[J]. Food Sci(食品科学), 2018, 39(19):19-23.
- Tian Y. Study on extraction, purification and bioactivities of flavonoids in blueberry[D]. Harbin:Northeast Agricultural University(东北农业大学), 2012.
- Zhuang XY. Effect of flavonoids from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. on advance glycation end products formation and AGEs-induced endothelial cell dysfunction [D]. Shanghai:East China Normal University(华东师范大学), 2011.
- Feng J, Zhang FR, Yang XH, et al. Phytochemicals of three

- kinds of se-enriched compositae flowers and their effects on activity of α -glucosidase[J]. Mol Plant Breeding(分子植物育种), 2019, 17:2341-2349.
- Hu YL, Ya N, Li X, et al. Study on the flavonoids in *Blumea balsamifera* DC. and their antioxidant activity as well as α -glucosidase inhibitory activity[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:1898-1903.
- Zheng YJ. Extraction, separation and pharmacological activity assay of garlic's functional components via molecular imprinting technique[D]. Qingdao:Ocean University of China(中国海洋大学), 2012.
- Li YQ, Zhou FC, Gao F, et al. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57:11463-11468.
- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk[J]. Turk J Biol, 2008, 32(1):43-49.
- Chen S, Chen H, Tian J, et al. Enzymolysis-ultrasonic assisted extraction, chemical characteristics and bioactivities of polysaccharides from corn silk[J]. Carbohydr Polym, 2014, 101:332-341.
- Chaittianan R, Chayopas P, Rattanathongkom A, et al. Anti-obesity potential of corn silks; relationships of phytochemicals and antioxidation, anti-pre-adipocyte proliferation, anti-adipogenesis, and lipolysis induction[J]. J Funct Foods, 2016, 23:497-510.
- Bai JH, Zhao Y, Guo XX, et al. Study on microwave-assisted extraction of flavonoids from com silk[J]. Chin Agr Sci Bulletin(中国农学通报), 2010, 26(2):71-73.
- Li FL, Xu L. Flavonoids extraction from maize silk and its function on blood sugar control[J]. China Food Addit(中国食品添加剂), 2009, 3:121-124.
- Fang M, Zhan CG, Gong ZY. Extraction and antioxidant activities of total flavonoids from corn silk[J]. Food Sci(食品科学), 2009, 18:206-208.