

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.006

## 洋葱醇提取物总多酚含量及其抗氧化活性研究\*

李佩儒<sup>1</sup>,周春阳<sup>1</sup>,张译<sup>1</sup>,林勇<sup>2</sup>,李莎莎<sup>1</sup>,刘慧<sup>1</sup>,杨春艳<sup>1△</sup>

(1. 川北医学院药学院·川北医学院药物研究所,四川南充 637100; 2. 川北医学院预防医学系,四川南充 637100)

**摘要:**目的 建立洋葱醇提取物总多酚含量测定方法和评价洋葱醇提取物体外抗氧化活性。方法 以没食子酸为标准品,采用福林酚法测定洋葱醇提取物总多酚含量,采用2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法评价洋葱醇提取物的抗氧化活性。结果 洋葱总多酚含量测定的最佳显色条件为显色温度60℃,显色时间60min,福林酚体积0.6mL,10%碳酸钠体积0.75mL;没食子酸质量浓度在1.2~5.0mg/L( $R^2=0.9995$ )范围内与吸光度值线性关系良好,平均回收率为113.71%,RSD为3.50%( $n=6$ );洋葱总多酚平均含量为29.9088mg/g,RSD为5.1694%( $n=6$ );洋葱醇提取物对ABTS自由基的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )值为(187.7±0.08)mg/L,而阳性对照芦丁对ABTS和DPPH自由基的 $IC_{50}$ 值为(12.87±0.21)mg/L和(10.29±0.17)mg/L。结论 该方法操作简便、灵敏度高且准确可靠,适用于测定洋葱总多酚的含量。

**关键词:**洋葱;总多酚;含量;正交试验;抗氧化活性

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)09-0021-04

### Study on Total Polyphenol Content of the Ethanol Extract from *Allium Ceba* and Its Antioxidant Activity

LI Peiru<sup>1</sup>, ZHOU Chunyang<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, LIN Yong<sup>2</sup>, LI Shasha<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, YANG Chunyan<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Institute of Material Medica, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637100; 2. Department of Preventive Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637100)

**Abstract:** Objective To establish a method for the determination of total polyphenol content (TPC) of the ethanol extract from *Allium cepa* and to evaluate the antioxidant activity *in vitro* of the ethanol extract from *Allium cepa*. Methods Gallic acid was used as the standard. The TPC of the ethanol extract from *Allium cepa* was determined by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity of the ethanolic extract from *Allium cepa* was evaluated by using ABTS and DPPH methods. Results The optimum conditions for the determination of TPC of *Allium cepa* were as follows: the chromogenic temperature was 60℃, the chromogenic time was 60min, the volume of folin-ciocalteu was 0.6mL, and the volume of 10% sodium carbonate solution was 0.75mL. Gallic acid showed good linearity in the range of 1.2~5.0mg/L ( $R^2=0.9995$ ), the average recovery rate was 113.71% with RSD of 3.50% ( $n=6$ ). The average TPC of *Allium cepa* was 29.9088mg/g with RSD of 5.1694% ( $n=6$ ). The  $IC_{50}$  value of ethanolic extract from *Allium cepa* against ABTS free radical was (187.7±0.08)mg/L, while the  $IC_{50}$  values of positive control rutin against ABTS and DPPH free radicals were (12.87±0.21)mg/L and (10.29±0.17)mg/L. Conclusion The method is simple, sensitive, accurate and reliable, which is suitable for the determination of TPC of *Allium cepa*.

**Key words:** *Allium cepa*; total polyphenol; content; orthogonal test; antioxidant activity

洋葱 *Allium cepa* L., 别名玉葱、葱头等, 为百合科(Liliaceae)葱属 *Allium* 草本植物, 洋葱种植和食用已有5000多年历史。现代化学成分研究表明, 其含有多酚、甾体皂苷、有机硫化物(organosulfur compounds, OSCs)、多糖等次级代谢产物<sup>[1-4]</sup>, 具有降血糖、调血脂、抗血栓、抗动脉硬化、防治冠状动脉粥样硬化性心脏病和糖尿病等多方面的生理保健功能<sup>[5-9]</sup>。多酚类物质最重要的功能是抗氧化和清除自由基<sup>[10]</sup>。因此, 本研究中采用福林酚法测定洋葱总多酚含量, 采用单因素试验和正交试验优化最佳显色条件, 并采用2,2'-联氮双(3-乙

基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法评价洋葱醇提取物的抗氧化活性。现报道如下。

#### 1 仪器与试剂

##### 1.1 仪器

UV-1750型紫外分光光度计(日本岛津公司); FA2004型电子天平(0.0001g, 上海良平仪器仪表有限公司); KQ-300DE型台式数控超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司); HH-9型数显恒温水浴锅(金坛市国旺实验仪器厂)。

\*基金项目:2017年四川省大学生创新创业训练计划项目[201706340080];四川省教育厅重点项目[18ZA0208];四川省南充市科技项目(市校科技战略合作专项)[NSMC20170446];川北医学院博士科研启动基金[CBY16-QD09];川北医学院药学一流学科群建设专项[2018]。

第一作者:李佩儒,男,大学本科,研究方向为药学,(电子信箱)1205932503@qq.com。

△通信作者:杨春艳,女,博士研究生,副研究员,研究方向为天然药物化学,(电子信箱)yangaccn@163.com。

## 1.2 试药

洋葱(市售);没食子酸(成都市科龙化工试剂厂,批号为20120227);芦丁(成都曼斯特生物科技有限公司,批号为 MUST-16111111);DPPH(美国 Sigma 公司,批号为 034K1071);ABTS(Aladdin 公司,批号为 201406);水为自制超纯水;钨酸钠(上海中秦化学试剂有限公司,批号为20161227),钼酸钠(天津市化学试剂四厂,批号为 20141119),硫酸锂(天津市巴斯夫化工有限公司,批号为 20160409)等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总多酚含量测定

#### 2.1.1 溶液制备

称取干燥的没食子酸 10.00 mg,精密称定,加蒸馏水适量,超声溶解,放冷,以蒸馏水定容至 100 mL,制成每 1 mL 含 0.1 mg 没食子酸的溶液,得对照品溶液,4 ℃ 冰箱保存备用。

取鲜洋葱(市售)于 60 ℃ 恒温鼓风干燥箱中干燥,粉碎;取洋葱粉 217.5 g,以 70% 乙醇(料液比为 1:10)溶解,超声波辅助提取法(UAE)提取 3 次(每次 30 min),得洋葱醇提取物 163.5 g,4 ℃ 冰箱保存备用;取洋葱醇提取物 0.14 g,加水溶解并定容至 100 mL,抽滤,得供试品溶液,4 ℃ 冰箱保存备用。

称取钨酸钠 8 g 和钼酸钠 2 g 置圆底烧瓶中,用 56 mL 蒸馏水溶解,加入 4 mL 85% 磷酸溶液和 8 mL 浓盐酸,文火回流 10 h,然后加入 1.2 g 硫酸锂及 6 mL 氢氧化钠,加热沸腾 15 min 至亮黄色,不得带微蓝和绿色。冷却,移入 100 mL 容量瓶中,定容,贮于棕色瓶中,得福林试剂,4 ℃ 冰箱保存备用。

#### 2.1.2 检测波长选择

精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 0.4 mL,置 5 mL 容量瓶中,加入 1 mL 水,摇匀,加入福林试剂 0.5 mL,摇匀,放置 1 min;加入 10% 碳酸钠溶液 1 mL,加水稀释至刻度,充分摇匀后置 60 ℃ 恒温水浴锅中反应 60 min,以相应的提取溶剂为空白溶剂,于 550~850 nm 波长范围内扫描,记录紫外光谱图。结果见图 1。洋葱醇提取物和没食子酸对照品溶液与福林试剂反应后均在 760 nm 波长处有稳定的最大吸收峰,故确定检测波长为 760 nm。

#### 2.1.3 方法学考察

线性关系考察:将 2.1.1 项下所配溶液稀释 5 倍,精密吸取对照品溶液 0.30, 0.50, 0.70, 0.90, 1.10, 1.25 mL,分别置 5 mL 容量瓶中,各加 1 mL 水摇匀,再加 0.5 mL 福林试剂,充分摇匀,加入 1.0 mL 10% 碳酸钠溶液,混匀,以蒸馏水稀释至刻度。分别在 60 ℃ 下水浴 60 min,于 760 nm 波长处测定各吸光度值。以吸光度

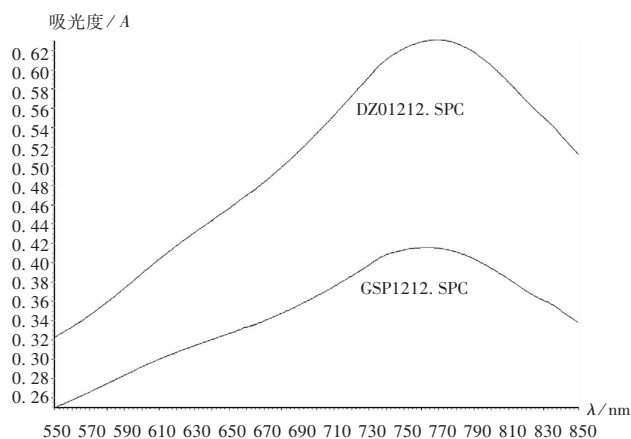


图1 对照品(DZ01212)和洋葱醇提取物(GSP1212)紫外吸收光谱图

值(A)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(C)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 0.1166X + 0.0962$ ,  $R^2 = 0.9995$  ( $n = 6$ )。结果表明,没食子酸质量浓度在 1.2~5.0 mg/L 范围内与吸光度值线性关系良好。

稳定性试验:分别取同一供试品溶液 0.4 mL,按照洋葱总多酚含量测定的最佳显色条件,显色后室温下放置,分别于 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 时测定吸光度。结果显色后 2 h 内总多酚含量为 30.6061 mg/g,  $RSD$  为 0.1149% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液在室温下 2 h 内稳定。

精密度试验:分别精密吸取同一对照品溶液 0.4 mL,共 5 份,分别置 5 mL 容量瓶中,按洋葱总多酚含量测定的最佳显色条件,测定吸光度。结果含量为 30.6407 mg/g,  $RSD$  为 0.1378% ( $n = 5$ ),表明仪器精密度良好。

重复性试验:分别称取洋葱粉末 1.0 g,平行 16 份,精密称定,依法制备供试品溶液,按洋葱总多酚含量测定的最佳显色条件,测定吸光度。结果洋葱总多酚平均含量为 29.9088 mg/g,  $RSD$  为 5.1694% ( $n = 6$ ),表明方法重复性良好。

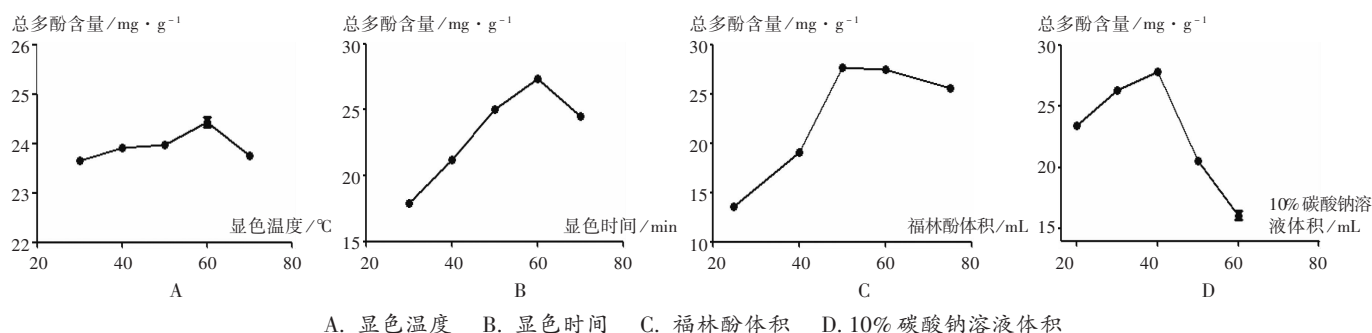
加样回收试验:分别取洋葱粉末 6 份,精密称取每份 1.0 g,各加入一定量的没食子酸对照品,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,测定没食子酸含量,计算加样回收率。结果见表 1。

表1 洋葱总多酚加样回收试验结果( $n = 6$ )

| 称样量<br>(mg) | 样品含量<br>(mg) | 加入量<br>(mg) | 测得量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | $\bar{X}$<br>(%) | $RSD$<br>(%) |
|-------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------------|--------------|
| 1.0014      | 29.9267      | 10.1        | 41.7526     | 117.09     | 113.71           | 3.50         |
| 1.0008      | 29.9088      | 10.2        | 41.8292     | 116.87     |                  |              |
| 1.0011      | 29.9178      | 10.0        | 41.2510     | 113.33     |                  |              |
| 1.0005      | 29.8999      | 10.1        | 41.2061     | 111.94     |                  |              |
| 1.0004      | 29.8968      | 10.2        | 40.7872     | 106.77     |                  |              |
| 1.0012      | 29.9208      | 10.1        | 41.6612     | 116.24     |                  |              |

### 2.2 单因素试验

精密量取供试品溶液 0.4 mL,按 1.2.2 项下方法



显色,采用单因素优化法分别对体系中福林酚体积(0.25, 0.40, 0.50, 0.60, 0.75 mL), 10% 碳酸钠体积(0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 mL), 显色温度(30, 40, 50, 60, 70 °C), 显色时间(30, 40, 50, 60, 70 min)对总多酚含量测定的影响进行考察(以上试验均平行测定3次)。结果见图2。

由图2A可见,洋葱醇提物的吸光度值随反应温度升高呈先升后降的变化趋势,当反应温度为60 °C时,洋葱醇提物的吸光度值最大,反应温度超过60 °C后,吸光度值逐渐降低,说明多酚类化合物在高温下不稳定。因此,确定最佳的显色温度为60 °C。

由图2B可见,多酚类物质与显色剂反应需要一个过程,显色反应60 min内,洋葱醇提物吸光度值明显增大,显色反应迅速;反应60 min后,洋葱醇提物吸光度值逐渐下降。因此,确定最佳显色时间为60 min。

由图2C可见,随着福林试剂用量的增加,洋葱醇提物的吸光度值呈先升后降的趋势,当福林试剂用量为0.5 mL时,吸光度值达最大值。因此,确定福林试剂的最佳用量为0.5 mL。

由图2D可见,10%碳酸钠溶液是福林酚比色法中反应的缓冲液,能为显色剂与酚类环境提供碱性环境,使多酚与显色剂反应后在碱性环境下显蓝色。可见,洋葱醇提物的吸光度值随碳酸钠溶液加入量的增加而升高,但当加入量超过1.0 mL时,吸光度值迅速降低。因此,确定10%碳酸钠溶液的最佳加入量为1.0 mL。

### 2.3 正交试验

在单因素试验基础上以显色温度(因素A)、显色时间(因素B)、福林酚体积(因素C)、10%碳酸钠溶液体积(因素D)为考察因素,测定洋葱醇提物中总多酚的含量,优化洋葱醇提物总多酚含量测定的显色条件。设计正交实验,其因素水平见表2。

表2 洋葱总多酚含量测定  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表

| 水平 | 因素 A(°C) | 因素 B(min) | 因素 C(mL) | 因素 D(mL) |
|----|----------|-----------|----------|----------|
| 1  | 50       | 50        | 0.4      | 0.75     |
| 2  | 60       | 60        | 0.5      | 1.00     |
| 3  | 70       | 70        | 0.6      | 1.25     |

由表3及表4可见,洋葱总多酚含量测定的最佳显色条件为:显色温度60 °C,显色时间60 min,福林酚体积0.6 mL,10%碳酸钠溶液体积0.75 mL。方差分析结果见表3。

表3 正交试验结果

| 试验号   | 因素 A(°C) | 因素 B(min) | 因素 C(mL) | 因素 D(mL) | 吸光度     |
|-------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| 1     | 1        | 1         | 1        | 1        | 0.455 4 |
| 2     | 1        | 2         | 2        | 2        | 0.501 1 |
| 3     | 1        | 3         | 3        | 3        | 0.441 7 |
| 4     | 2        | 1         | 2        | 3        | 0.426 6 |
| 5     | 2        | 2         | 3        | 1        | 0.628 5 |
| 6     | 2        | 3         | 1        | 2        | 0.442 0 |
| 7     | 3        | 1         | 3        | 2        | 0.565 2 |
| 8     | 3        | 2         | 1        | 3        | 0.316 2 |
| 9     | 3        | 3         | 2        | 1        | 0.562 5 |
| $k_1$ | 0.466 0  | 0.482 0   | 0.405 0  | 0.549 0  |         |
| $k_2$ | 0.499 0  | 0.482 0   | 0.497 0  | 0.503 0  |         |
| $k_3$ | 0.481 0  | 0.482 0   | 0.545 0  | 0.395 0  |         |
| R     | 0.033 0  | 0.031 0   | 0.140 0  | 0.154 0  |         |

表4 方差分析表

| 方差来源 | 离差平方和 | 自由度 | F比    | F值    | P值    |
|------|-------|-----|-------|-------|-------|
| A    | 0.002 | 2   | 0.114 | 0.524 | 0.656 |
| B    | 0.000 | 2   | 0     | 0     | 1.000 |
| C    | 0.031 | 2   | 1.771 | 8.147 | 0.109 |
| D    | 0.037 | 2   | 2.114 | 9.724 | 0.093 |
| 误差   | 0.070 | 8   |       |       |       |

### 2.4 抗氧化活性研究

参考文献[11]方法进行洋葱醇提取物的抗氧化活性试验。结果见图3。可见,在一定质量浓度范围内,洋

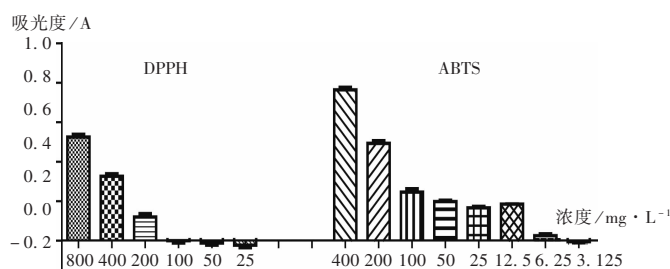


图3 洋葱醇提物抗氧化活性

葱醇提物的抗氧化能力具有浓度依赖性。其中,洋葱醇提物对 ABTS 自由基的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值为  $(187.7 \pm 0.08) \text{ mg/L}$ , 而阳性对照芦丁对 ABTS 和 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  值为  $(12.87 \pm 0.21) \text{ mg/L}$  和  $(10.29 \pm 0.17) \text{ mg/L}$ 。

### 3 讨论

多酚(polyphenols)包括黄酮、酚酸、芪类和木质素等,是植物界中最丰富的次级代谢产物<sup>[12]</sup>。福林酚法是利用在碱性条件下,多酚类化合物可以将磷钨钼酸还原成蓝色的原理,颜色深浅与多酚含量呈正相关,可用分光光度计进行测定<sup>[13]</sup>。多酚类物质的抗氧化功能与多酚的结构有关,酚羟基中的邻位酚羟基极易被氧化<sup>[14]</sup>,是良好的抗氧化剂。酚羟基可提供活泼氢,使自由基灭活,本身被氧化形成含有邻二酚结构的自由基而具有较高的稳定性<sup>[15]</sup>。

洋葱研究较多的为黄酮,而对多酚的研究相对较少。其中,SIRACUSA 等<sup>[16]</sup>报道洋葱总多酚的含量为  $123.5 \text{ mg/kg}$ (鲜重),且其主要成分为槲皮素 3,4'-二-O-葡萄糖苷,槲皮素 4'-O-葡萄糖苷等。此外,唐远谋等<sup>[17]</sup>采用微波辅助提取法(MAE),得到洋葱总多酚的含量为  $12.45 \text{ mg/g}$ 。另外,陈晨等<sup>[18]</sup>研究了鲜切洋葱贮藏期间多酚成分的变化。本研究中采用 UAE 法提取洋葱多酚,并采用正交试验法优化其含量测定方法。结果表明,洋葱醇提物具有一定的抗氧化能力,且其抗氧化能力在一定浓度范围内具有浓度依赖性。

民间洋葱常用于防治动脉硬化症<sup>[19]</sup>,而氧化应激在动脉粥样硬化病变的发生发展中起着非常重要的作用<sup>[20]</sup>。因此,本研究为洋葱在保健食品、药品领域中的进一步开发利用提供了参考。

### 参考文献:

- [1] ARSHAD MS, SOHAIB M, NADEEM M, et al. Status and trends of nutraceuticals from onion and onion by-products: A critical review [J]. Cogent Food & Agriculture, 2017(3): 1280254.
- [2] MA YL, ZHU DY, THAKUR K, et al. Antioxidant and antibacterial evaluation of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 92-101.
- [3] ABDELRAHMAN M, ALI H, EL-SAYED M, et al. Isolation and characterization of Cepa2, a natural alliospiroside A, from shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) with anticancer activity [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017(116): 167-173.
- [4] WANG ZD, LI LH, XIA H, et al. Optimisation of steam distillation extraction oil from onion by response surface methodology and its chemical composition [J]. Natural Product research, 2017, 32(1): 112-115.

- [5] 欧学兰, 杨春艳, 魏锦秋, 等. 洋葱精油对 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(7): 698-704.
- [6] VILAHUR G, BADIMON L. Antiplatelet properties of natural products [J]. Vascular pharmacology, 2013, 59(3-4): 67-75.
- [7] VIDYAVATI HG, MANJUNATHA H, HEMAVATHY J, et al. Hypolipidemic and antioxidant efficacy of dehydrated onion in experimental rats [J]. Journal of Food Science and Technology, 2010, 47(1): 55-60.
- [8] MITRA J, SHRIVASTAVA SL, RAO PS. Onion dehydration: A review [J]. Journal of Food Science and Technology, 2012, 49(3): 267-277.
- [9] KIM J, KIM JS, PARK E. Cytotoxic and antiinflammatory effects of onion peel extract on lipopolysaccharide stimulated human colon carcinoma cells [J]. Food and Chemica Toxicology, 2013(62): 199-204.
- [10] 尹文清, 宋鑫明, 陈光英, 等. 青梅叶中多酚含量测定及抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(5): 283-286.
- [11] YANG C, LI F, DU B, et al. Isolation and Characterization of New Phenolic Compounds with Estrogen Biosynthesis-Inhibiting and Antioxidation Activities from *Broussonetia papyrifera* Leaves [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94198.
- [12] TEJADA S, PINYA S, Bibiloni M, et al. Cardioprotective Effects of the Polyphenol Hydroxytyrosol from Olive Oil [J]. Current Drug Targets, 2017(18): 1477-1486.
- [13] 彭茹洁, 汪佳丹, 韩伟. 植物多酚提取、分离纯化及其分析研究进展 [J]. 制药装备, 2016, 22(5): 21-29.
- [14] YANG CY, HA W, LIN Y, et al. Polyphenols Isolated from *Xanthoceras sorbifolia* husks and their anti-tumor and radical-scavenging activities [J]. Molecules, 2016, 21(12): 1694.
- [15] 陈继英, 郭嘉林, 张存彦, 等. 茶多酚的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 11-13.
- [16] SIRACUSA L, AVOLA G, PATANÈ C, et al. Re-evaluation of traditional Mediterranean foods. The local landraces of 'Cipolla di Giarratana' (*Allium cepa* L.) and long-storage tomato (*Lycopersicon esculentum* L.): quality traits and polyphenol content [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013(93): 3512-3519.
- [17] 唐远谋, 焦士蓉, 刘佳, 等. 洋葱总多酚的提取工艺及其酶抑制作用初探 [J]. 中国调味品, 2011, 36(11): 25-29.
- [18] 陈晨, 胡文忠, 张瑞东, 等. 鲜切洋葱贮藏期间多酚成分及抗氧化活性的变化 [J]. 营养学报, 2016, 38(6): 596-600.
- [19] 赵法及. 洋葱和大蒜预防动脉粥样硬化症 [J]. 国外医学: 参考资料卫生学分册, 1979, 1: 20-22.
- [20] YANG L, XIAN D, XIONG X, et al. Proanthocyanidins against oxidative stress: from molecular mechanisms to clinical applications [J]. BioMed Research International, 2018(2018): 8584136.

(收稿日期: 2018-09-25)