

分蘖洋葱黄酮体外抗氧化活性研究

何 畅¹, 王景会², 李 达², 高岩松², 苏 颖^{2*}, 谢春阳^{1*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院农产品加工研究所, 长春 130033)

摘 要:以分蘖洋葱黄酮提取物为研究对象,测定其对DPPH自由基、超氧阴离子自由基、羟基自由基、ABTS⁺自由基、亚硝酸盐自由基的清除能力以及还原能力等指标,研究了其体外抗氧化活性。结果表明:分蘖洋葱黄酮提取物对DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基、ABTS⁺自由基、亚硝酸盐自由基具有显著的清除能力,其最大清除率分别为89.35%、76.12%、85.43%、76.26%、72.11%,而且具有较好的还原能力。该研究可为分蘖洋葱资源的开发利用提供依据。

关键词:分蘖洋葱;黄酮;抗氧化活性

中图分类号:S633.2

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2020)06-0135-05

Antioxidant Activity of Flavonoids from Tillering Onion in Vitro

HE Chang¹, WANG Jinghui², LI Da², GAO Yansong², SU Ying^{2*}, XIE Chunyang^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Institute of Agricultural Products Processing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The antioxidant activity of flavone extract from tillering onion in vitro was studied by measuring its scavenging ability and reducing ability of DPPH free radical, superoxide anion free radical, hydroxyl free radical, ABTS⁺ free radical and nitrite free radical. The results showed that the flavone extract from tillering onion had significant scavenging activity on DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide anion radical, ABTS⁺, nitroso radical, with the maximum scavenging rates of 89.35%, 76.12%, 85.43%, 76.26%, 72.11%, respectively, and had good reducing ability. This study can provide a basis for the development and utilization of tillering onion resources.

Key words: Tillering onion; Flavone; Antioxidant activity

分蘖洋葱(*Allium cepa* var. *aggregatum*)为多年生鳞茎植物,旧属百合科葱属^[1],按植物学分类独立为葱科。其鳞茎基部极易分蘖成簇生一起的数个分小鳞茎,故称为“分蘖”^[2]。其含有黄酮类化合物、含硫化合物、苯丙素化合物、酚类化合物等多种有效成分^[3]。黄酮类成分有多种生物活性,在食品、保健品、医药和化妆品等领域广泛应用^[4]。黄酮通过抑制自由基产生、直接清除自由基、激活机体抗氧化等体系来发挥抗氧化作用^[5]。

目前,已有学者研究酶法^[6-7]、溶剂提取法^[8]、超声波辅助法^[9-10]等方法提取植物中黄酮类化合物,有关分蘖洋葱黄酮类化合物抗氧化活性的报

道还很少。本实验针对超声波法提取分蘖洋葱中的总黄酮研究其体外抗氧化活性,意在探明分蘖洋葱中总黄酮的抗氧化活性及应用前景,为分蘖洋葱资源充分利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

DPPH购于西安沃尔森生物科技有限公司;芦丁、抗坏血酸(Vc)、N-1-萘乙二胺盐酸盐、邻菲罗啉、无水对氨基苯磺酸、三氯化铁、30%过氧化氢、焦性没食子酸、氯化亚铁、无水乙醇、ABTS、Tris等均为分析纯,购于天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

干燥箱(101A-2ET),上海阳光实验仪器有限公司;摇摆式高速中药粉碎机(DFY-500),温岭市林大机械有限公司;恒温水浴锅(HH-2),常州朗越仪器制造有限公司;紫外分光光度计(Cary50),美国VARIN公司;旋转蒸发器(RE52AA),上海亚荣生化仪器厂;循环水真空泵(SHB-B₉),郑州长

收稿日期:2019-01-07

基金项目:吉林省农业科学院创新工程项目(CXGC2018DC004)

作者简介:何 畅(1993-),女,在读硕士,研究方向:食品加工与安全。

通讯作者:苏 颖,女,博士,副研究员,E-mail: suyng1@163.com
谢春阳,男,硕士,副教授,E-mail: xiechunyang@163.com

城科工贸有限公司;电子天平(HX1002T),慈溪天东衡器厂;冷冻干燥机(FD-1PF),北京德天佑科技发展有限公司;超声波提取机(SY-1000E),北京弘祥隆生物技术股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 分蘖洋葱总黄酮的提取及含量测定

1.3.1.1 总黄酮的提取

参考刘超等^[11]提取黄酮方法并加以修改。提取:称取干燥的分蘖洋葱干粉20 g,加入80%乙醇400 mL,浸泡12 h后进行超声波提取,提取条件为超声时间50 min、超声功率220 W,提取结束后过滤,减压浓缩,浓缩至较小体积后加入石油醚进行脱脂处理,去除叶绿素。用分液漏斗将大部分石油醚弃除后旋转蒸发,蒸掉石油醚后经真空冷冻干燥,得到分蘖洋葱黄酮粗提物。纯化:利用AB-8大孔树脂进行纯化,将干燥的提取物用50℃热水溶解浸膏,放入50 mL容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度;缓慢将溶液放入大孔树脂中,静置0.5 h。加蒸馏水洗至无白色浑浊。加2倍体积的70%乙醇^[12],收集洗脱液,减压浓缩,真空冷冻干燥,即得到分蘖洋葱黄酮纯化物。

1.3.1.2 总黄酮含量的测定

黄酮含量测定采用硝酸铝法^[13]。在510 nm处测定其吸光度,按照回归方程计算出样品溶液中总黄酮的含量。

1.3.2 分蘖洋葱总黄酮体外抗氧化活性试验

1.3.2.1 总黄酮对DPPH自由基的清除能力

参照Wang等^[14]的方法并略做修改。测定不同浓度样品溶液对DPPH自由基的清除活性,在517 nm处测定吸光度。以抗坏血酸作为对照,计算清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=[1-(A_1-A_0)/A_2]\times 100$$

式中: A_0 为样品自身吸光度; A_1 为样品与DPPH自由基作用后的吸光度; A_2 为DPPH自由基溶液吸光度。

1.3.2.2 总黄酮对羟基自由基的清除能力

利用Fenton反应原理,通过邻二氮菲-亚铁法测定,参照方玉梅^[15]的测定方法。

1.3.2.3 总黄酮对超氧阴离子的清除能力

采用邻苯三酚自氧化法,参考张黎明等^[16]的测定方法。取4.5 mL 50 mmol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH值8.2)于试管中,25℃水浴20 min,加入不同浓度梯度黄酮样品溶液各0.1 mL,迅速加入0.4 mL 25 mmol/L邻苯三酚溶液,25℃反应5 min,立即加入1 mL 10 mol/L HCl溶液终止反应,325 nm处

测定吸光度(A_1)。对照组(A_2)以70%乙醇或蒸馏水代替黄酮溶液;空白组(A_0)以10 mmol/L HCl代替邻苯三酚溶液。以Vc作为阳性对照。

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%)=[1-(A_1-A_0)/A_2]\times 100$$

1.3.2.4 总黄酮对ABTS⁺自由基的清除能力

①ABTS储备液(7.4 mmol/L)取ABTS 0.384 g,加蒸馏水100 mL。②过硫酸钾储备液(2.6 mmol/L)取过硫酸钾3.784 g,加蒸馏水100 mL。③分别取20 mL ABTS储备液与过硫酸钾,按照1:1体积比混合均匀,静置12~16 h^[17]。在734 nm处用无水乙醇调至吸光值为0.70±0.02,即为ABTS工作液(现配现用)。2.0 mL ABTS工作液与0.2 mL不同受试液混合,常温避光静置6 min,以无水乙醇调零,在734 nm处测吸光度,记为 A_1 ;取0.2 mL无水乙醇代替黄酮样品溶液,记为 A_0 。以Vc溶液作为对照,按公式计算ABTS⁺自由基清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%)=[1-(A_1/A_0)]\times 100$$

式中: A_0 (空白样):0.2 mL无水乙醇和2.0 mL ABTS⁺工作液; A_1 (样品):0.2 mL样品溶液和2.0 mL ABTS⁺工作液。

1.3.2.5 总黄酮对亚硝酸盐的清除能力

参考钟方丽等^[18]的方法并稍做改动。制备0.5 mg/mL的样品溶液,将样品溶液按0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL分别加入具塞试管中。以蒸馏水代替样品作空白对照,同时以Vc为阳性对照。分别向其中加入50 mg/L NaNO₂溶液1 mL,37℃恒温30 min,加入浓度为0.4%对氨基苯磺酸2.0 mL,混匀,静置5 min,再加入1.0 mL浓度为0.2%盐酸萘乙二胺溶液,混匀后加70%的乙醇定容,静置15 min后分别在540 nm处测其吸光度,测定的各浓度溶液的吸光度记为 A_1 ,用蒸馏水代替样品,操作方法同上,所测得的吸光度为 A_0 ,以Vc为对照,按照公式计算清除率。

$$\text{亚硝酸盐自由基清除率}(\%)=[(A_0-A_1)/A_0]\times 100$$

1.3.2.6 总黄酮的还原能力

取10 mL具塞试管,依次加入2.5 mL pH为6.6的磷酸盐缓冲液溶液(0.2 mol/L)、2.5 mL不同浓度样品溶液、2.5 mL 1%铁氰化钾溶液,混合均匀,于50℃恒温水浴中保持20 min,取出迅速冷却至室温,再向具塞试管中加入2.5 mL 10%三氯化铁溶液,混匀并离心(3 000 r/min, 10 min)。吸取上清液4 mL于另一支10 mL具塞试管中,依次加入4 mL蒸馏水、1 mL 0.1%三氯化铁溶液,混合均匀,10 min后在700 nm处测定吸光度^[19],以Vc溶液

为对照,所测吸光度越大,还原能力越强^[20]。

2 结果与分析

2.1 分蘖洋葱总黄酮含量的测定

根据标准品芦丁浓度和吸光度绘制标准曲线,如图1所示,得吸光度A与浓度c(mg/mL)的回归方程 $A=9.3454c-0.0084$, $R^2=0.9992$ 。在510 nm处测定分蘖洋葱黄酮溶液的吸光度,根据回归方程得到总黄酮的浓度。

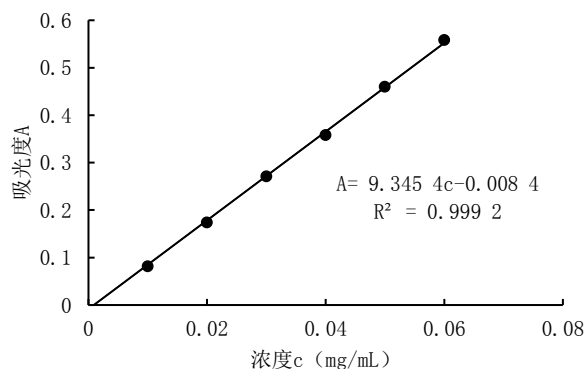


图1 芦丁标准曲线

2.2 总黄酮对DPPH自由基的清除能力

DPPH自由基在有机溶剂中是一种稳定的自由基,可用来评价产品中活性氮(RNS)^[21]。因此,通过517 nm处吸光度的测定来评价自由基的清除情况。由图2可知,在0.01~0.10 mg/mL浓度范围内,随着浓度的增大,分蘖洋葱总黄酮和V_c对DPPH自由基的清除能力均增强,当浓度大于0.07 mg/mL后,分蘖洋葱总黄酮对DPPH自由基的清除能力开始高于V_c,当浓度为0.1 mg/mL时,总黄酮对DPPH自由基的清除率可达到89.35%,高于V_c清除率88.17%,说明分蘖洋葱总黄酮具有较强清除DPPH自由基的能力。

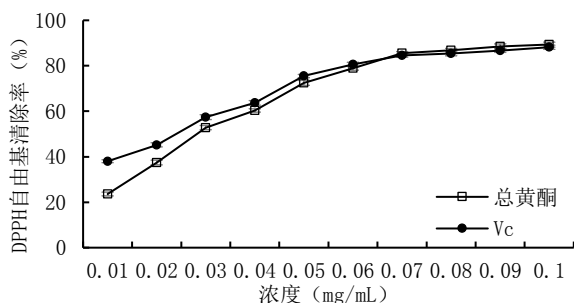


图2 V_c和分蘖洋葱总黄酮对DPPH自由基的清除作用

2.3 总黄酮对羟基自由基的清除能力

羟基自由基是已知的最活泼的活性氧自由基,也是毒性最大的氧自由基。可以通过多种方

式与人体机体内发生多种分子层面上的作用。当加入抗氧化样品后,抗氧化物质便会与邻二氮菲竞争·OH,从而降低有色产物的生成量^[22]。由图3可知,在0.05~0.45 mg/mL浓度范围内,随着浓度的增大,分蘖洋葱总黄酮和V_c对羟基自由基的清除能力均增强,当浓度为0.45 mg/mL时,总黄酮对羟基自由基的清除率可达到76.12%,低于V_c对羟基自由基的清除率85.07%,但仍然表现出较强的清除羟基自由基的能力。

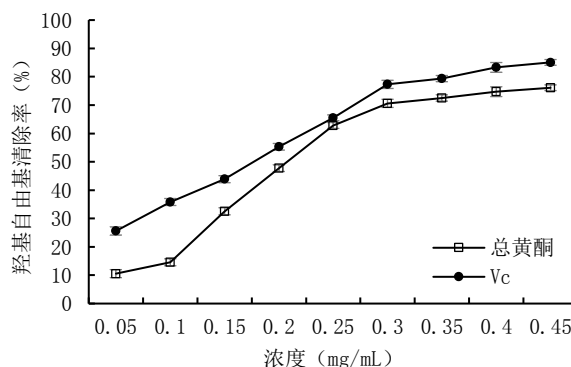


图3 V_c和分蘖洋葱总黄酮对羟基自由基的清除作用

2.4 总黄酮对超氧阴离子的清除能力

超氧阴离子在活性氧(ROS)的形成中起重要作用,可诱导脂质、蛋白质及DNA中的氧化损伤,因此可通过测定抗氧化剂对超氧阴离子的清除能力来判断抗氧化剂的抗氧化能力^[23]。由图4可知,在0.05~0.45 mg/mL浓度范围内,随着浓度的增大,分蘖洋葱总黄酮和V_c对超氧阴离子的清除能力均增强,当浓度为0.45 mg/mL时,总黄酮对超氧阴离子的清除率可达到85.43%,低于V_c对超氧阴离子的清除率93.93%,但分蘖洋葱总黄酮仍然表现出很好的清除超氧阴离子的能力。

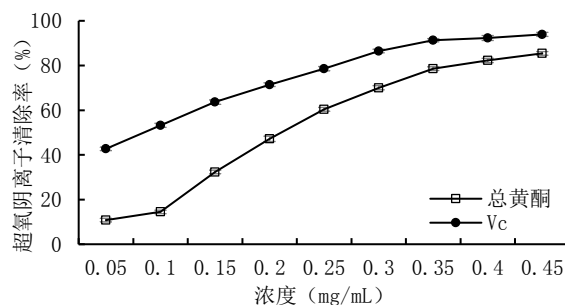


图4 V_c和分蘖洋葱总黄酮对超氧阴离子的清除作用

2.5 总黄酮对ABTS⁺自由基的清除作用

ABTS⁺清除实验基于评价抗氧化剂在体外清除稳定ABTS⁺自由基的能力^[24]。由图5可知,在0.01~0.1 mg/mL浓度范围内,随着浓度的增大,分蘖洋葱总黄酮和V_c溶液对ABTS⁺自由基的清除能力均增强,当清除率为50%时,分蘖洋葱总黄酮和V_c的浓

度分别为0.055、0.032 mg/mL。当浓度为0.1 mg/mL时,总黄酮对ABTS⁺自由基的清除率可达到76.26%,低于V_c的清除率88.13%,但分蘖洋葱总黄酮仍然表现出较强的清除ABTS⁺的能力。

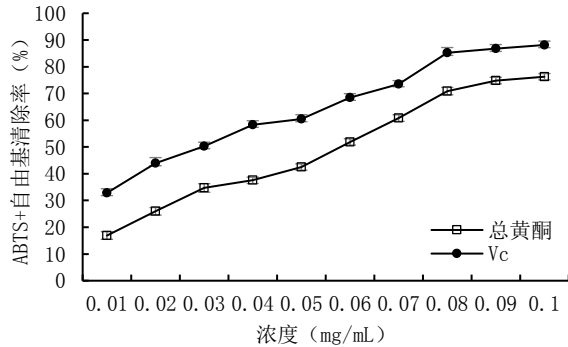


图5 V_c和分蘖洋葱总黄酮对ABTS⁺自由基的清除作用

2.6 总黄酮对亚硝酸盐的清除作用

亚硝酸盐可以使生物机体内的血红蛋白转变成高铁血红蛋白进而使生物体中毒。还有外界微生物和自身酶类对蔬菜中的蛋白质、氨基酸和多肽等活性物质产生降解,从而产生胺类物质。胺类物质与亚硝酸盐容易合成N-亚硝基化合物,这类物质具有强致癌性。亚硝酸盐含量关系着产品的食用安全性,分蘖洋葱总黄酮对其清除能力对提升产品安全品质有重要意义^[25]。由图6可知,在0.01~0.1 mg/mL浓度范围内,随着浓度的增大,分蘖洋葱总黄酮和V_c对亚硝酸盐的清除能力均增强,当清除率为50%时,分蘖洋葱总黄酮和V_c的浓度分别为0.055、0.047 mg/mL,当浓度为0.1 mg/mL时,总黄酮对亚硝酸盐的清除率可达到72.11%,低于V_c的清除率82.70%,但分蘖洋葱总黄酮仍然表现出较强的清除亚硝酸盐的能力。

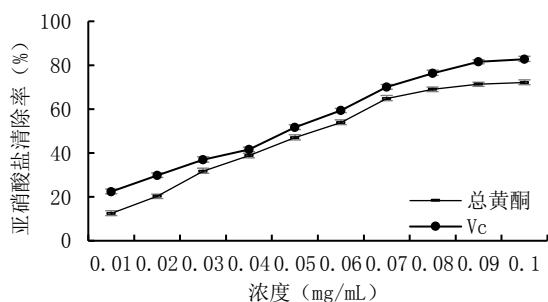


图6 V_c和分蘖洋葱总黄酮对亚硝酸盐的清除作用

2.7 总黄酮的还原能力

还原能力是表征物质在氧化还原反应中给出电子自身发生氧化的能力^[26],是酚类抗氧化作用的重要机制^[27]。由图7可知,在0.05~0.5 mg/mL浓度范围内,随着浓度的增大,分蘖洋葱总黄酮

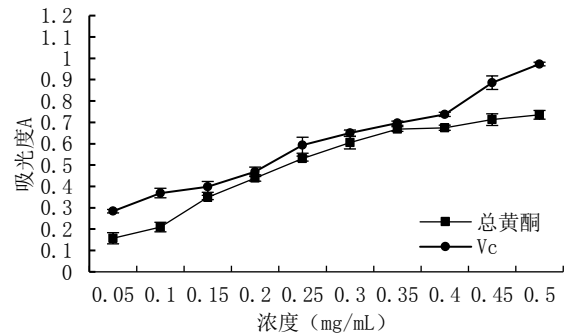


图7 V_c和分蘖洋葱总黄酮的还原能力

和V_c还原能力均增强。当样品浓度为0.5 mg/mL时,V_c吸光度达到1.0左右,而黄酮的吸光度为0.7左右,说明在还原能力方面,分蘖洋葱黄酮低于V_c,但仍然表现出很强的还原能力。

3 结 论

采用超声波法提取分蘖洋葱总黄酮粗提液,提取条件为乙醇浓度80%、超声时间50 min、超声功率220 W,提取结束后经AB-8大孔树脂吸附纯化得到分蘖洋葱黄酮提取物。V_c作为阳性对照,研究了分蘖洋葱黄酮对6种体外抗氧化体系的清除及还原能力。结果表明,分蘖洋葱黄酮和V_c溶液对自由基的清除能力和还原能力随着浓度的升高其抗氧化作用逐渐增强,其最大清除率分别为:DPPH自由基89.35%;羟基自由基76.12%;超氧阴离子85.43%;ABTS⁺自由基76.26%;亚硝酸盐72.11%;还具有较强的还原能力。由此可见,分蘖洋葱黄酮提取物是一种天然抗氧化剂,可以广泛应用于食品行业,该研究结果能有效扩大其产业化程度,带来良好的社会效益和经济效益。

参考文献:

- [1] 王永志,万 千,李小宇,等. OYDV衣壳蛋白表达及其单克隆抗体分析[J]. 东北农业科学, 2018, 43(2): 26-29.
- [2] 刘慎谔. 东北草本植物志(第二卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1959: 11-16.
- [3] 付学军. 洋葱功能成分及其应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [4] 赵二劳,杨 洁,赵三虎. 花生壳中黄酮类成分提取纯化工艺研究进展[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(5): 128-134.
- [5] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 220-224.
- [6] 王广慧,李士慧,梁 婷,等. 响应面优化超声波辅助复合酶法提取香菇黄酮[J]. 东北农业科学, 2018, 43(1): 45-50.
- [7] 孙彩霞,周远明,吴 昊,等. 超声复合酶法提取洋葱黄酮工艺研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(4): 36-41.
- [8] 张 强,王松华,孙玉军,等. 洋葱中黄酮类化合物体外抗氧化活性研究[J]. 农业机械学报, 2009, 40(8): 139-142.
- [9] 李 鹏. 从分蘖葱头中提取抗氧化活性成分的研究[D]. 长

- 春:长春工业大学,2013.
- [10] 贾楠,赵二劳,范建凤,等.洋葱黄酮超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2015,36(2):62-65,70.
- [11] 刘超,高炯杰.超声波辅助法提取毛葱黄酮的工艺研究[J].食品研究与开发,2015,36(18):50-54.
- [12] 雷红松.大孔吸附树脂分离纯化荷叶黄酮与生物碱研究[D].长沙:湖南农业大学,2008.
- [13] 杨玲娥,康永锋,马晨晨,等.超声波辅助提取番木瓜提取液抗氧化活性研究[J].吉林农业科学,2013,38(1):75-79.
- [14] Wang P F, Mu X P, Du J J, et al.Flavonoid content and radical scavenging activity in fruits of Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis*) genotypes [J]. Journal of Forestry Research, 2018, 29(1): 55-63.
- [15] 方玉梅,张春生,谭萍,等.金针菇黄酮类化合物的抗氧化性作用[J].食品研究与开发,2012,33(3):15-18.
- [16] 张黎明,李瑞超,郝利民,等.响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2014,30(4):233-239.
- [17] 段筱杉,张朝辉,应锐,等.海芦笋黄酮的抗氧化作用及对CCl₄致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].水产学报,2017,41(12):1946-1955.
- [18] 钟方丽,王文姣,王晓林,等.猴腿蹄盖蕨、玉竹总黄酮的体外抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2016(6):65-72.
- [19] 周宁,赵晓璐,屈潇毅,等.超声辅助提取甘蔗叶总黄酮与还原力的测定[J].应用化工,2016,45(10):1883-1886.
- [20] 包骥林,王丹,陆葵青,等.桂花黄酮类化合物体内抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2018,39(21):14-20.
- [21] Xican Li. 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO·) Radical scavenging: A New and Simple Antioxidant Assay *In Vitro*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017, 65: 6288-6297.
- [22] 谢晓凤,童莲花,童德胜,等.马齿苋总黄酮的提取及其浓缩汁抗氧化性研究[J].食品工业,2013,38(2):192-197.
- [23] Lijun Sun, Jianbao Zhang, Xiaoyun Lu, et al.Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.)leaves[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10): 2689-2696.
- [24] Qiuhui Hu, Jie Yu, Wenjian Yang, et al.Identification of flavonoids from *Flammulina velutipes* and its neuroprotective effect on pheochromocytoma-12 cells[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 274-282.
- [25] 李胜华,臧汝瑛,刘秀河,等.香辛料对蔬菜中亚硝酸盐的清除能力研究[J].山东食品发酵,2012(2):3-7.
- [26] 胡利,贾冬英,姚开,等.桑叶黄酮对亚硝酸盐的体外清除作用研究[J].中国调味品,2015,40(3):1-5.
- [27] Narumol P, Weerasak S, Patcharawee N, et al.In vitro antioxidant activity study of novel chromone derivatives[J].Chemical Biology&Drug Design, 2012, 79(6): 981-989.

(责任编辑:王昱)

(上接第109页)

小农户分散式生产阻碍了规模化经营进程^[10],从职业农民角度来讲,发展适度规模经营是其增收的有效方式。因此需要积极发展家庭农场和职业农民,有利于提高粮食生产效率,促进农民收入快速增长。

3.2.2 调整农业经营结构

从家庭经营收入内部的比重变化来看,牧业收入比重始终次于种植业,居于第二位。特别是2000年开始吉林省畜牧业数量和质量均有飞跃,2000~2009年牧业收入所占比重均保持在10%以上;而从牧业产值在农林牧渔总产值所占比重来看,2016年已达到38.35%,且种植业本身具有周期性和季节性,因此发展畜牧业既可以提高劳动效率,又可以延长农副产品的产业链,“农牧结合”的生产模式有利于农业的可持续发展。

3.2.3 支持非农产业发展

从兼业农民的角度来讲,需要提高非农产业的就业能力,以增加工资性收入。2017年吉林省的城镇化率上升到56.65%,这主要是人口数量的城镇化,更重要的是注重发展人口质量的城镇化,即实现人民生活水平和幸福感的城镇化。应提升城镇化的发展质量,繁荣二三产业,为农民提供更多的就业机会和初来城镇的生活补贴,保

证兼业农民转移的持久性和稳定性,实现农民的工资性收入稳步增长。

参考文献:

- [1] 王浩.基于非线性退势法的农民收入预测[J].江苏农业科学,2012,40(6):376-379.
- [2] 卢小丽,何光.基于ARMA模型的四川省农村居民收入趋势预测[J].中国农学通报,2012,28(5):110-114.
- [3] 彭婵娟.福建省农民人均纯收入的组合预测分析[J].中国农学通报,2013,29(35):152-157.
- [4] 张海燕.基于多元线性回归模型的四川农村居民收入增长分析[J].统计与决策,2010(13):88-90.
- [5] 佟光霁,张琳.基于灰色马尔科夫模型的农民收入质与量预测[J].商业研究,2012(9):135-140.
- [6] 曹跃群,周加斌,吴颖,等.基于小波变换的农民收入增长波动关系预测分析[J].华东经济管理,2009,23(5):44-48.
- [7] 吴迪,刘文明,舒坤良.吉林省自然灾害对种植业及农民收入的影响研究[J].东北农业科学,2016,41(3):104-108.
- [8] 余晓洋,田帅,刘帅.杭州市农民工工资性收入变动及其影响因素分析[J].东北农业科学,2017,42(3):50-54.
- [9] 刘文明.基于农户角度的吉林省耕地可持续利用分析[J].东北农业科学,2018,43(3):39-42.
- [10] 费红梅,刘文明,王立,等.农户土地流出处意及其影响因素分析[J].东北农业科学,2017,42(6):69-72.

(责任编辑:王丝语)