

縮送
小組

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
計畫名稱：綠豆莢抗氧化成分之純化與作用機制
及其應用性

計畫編號：NSC 87-2314-B-041-002

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：杜平惠

嘉南藥理學院 食品衛生系

中文摘要

本研究主要探討綠豆莢甲醇萃取物(methanolic extract of mung bean hulls, MEMBH)之抗氧化性。結果顯示MEMBH對亞麻油酸具有極強的抗氧化作用。經由分離與初步純化，黃酮(flavones)為其主要抗氧化成分。在生物系統模式上，MEMBH對脂質體之氧化具有安定作用；對非脂質成分的deoxyribose及DNA有抑制氧化的作用；濃度低的MEMBH對蛋白質具有保護免於被氧化的特性。在抗氧化機制上，顯示MEMBH具有還原力與捕捉自由電子及活性氧，另外也具有螯合鐵離子的效應，這些特性足以說明其在脂質與非脂質成分的抗氧化作用。在應用上，MEMBH對大豆油具有氧化安定作用。

關鍵詞：綠豆莢甲醇萃取物，抗氧化性，黃酮，氧化破壞，氧化安定性，自由基，活性氧，螯合作用。

Abstract

The antioxidant activity of methanolic extract of mung bean hulls was investigated. MEMBH showed remarkable antioxidative effect in linoleic acid peroxidation. Further purification, flavones were identified as antioxidative compounds of MEMBH. In a liposome model system, MEMBH effectively inhibited MDA formation. For the non-lipids test, MEMBH exhibited

considerable inhibitory effect against deoxyribose and DNA oxidative damage. However, MEMBH at low concentration showed inhibitory effect on protein oxidative damage. MEMBH showed marked reducing power and effectively quenching effect on free radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. These properties seem to be important in explaining how the antioxidative activity of MEMBH on lipids and non-lipids. In addition, MEMBH can effectively retard the peroxidation of soybean oil.

Key words: methanolic extract of mung bean hulls, antioxidant activity, flavones, oxidative damage, oxidative stability, free radical, reactive oxygen, chelating effect.

前言

諸多研究認為豆科植物的莢(殼)，除了具有物理上的保護作用，對內部種子之氧化變性也具有防禦作用。因此，推測其莢應該含有類似抗氧化成分。倘若能加以處理，並探討其抗氧化性，則不僅有助於機能性成分之開發，對綠豆之經濟效益與應用價值及對人體健康之維護將更有幫助。基於此，本計畫擬以台南5號綠豆品種為樣品，探討綠豆莢甲醇萃取物(methanolic extract of mung bean hulls, MEMBH)之抗氧化性及其在細胞脂質與非脂質成分之氧化安定性上所扮演的角色。

結果與討論

一、MEMBH之抗氧化性

圖一為不同濃度的MEMBH對亞麻油酸之氧化抑制率。MEMBH之抗氧化隨著濃度之增加而增加而後100 ppm至~500 ppm之間的抗氧化性則無顯著差異($P>0.05$)，顯示100ppm的MEMBH已具有極強的抗氧化性(97.6%)。圖二為MEMBH與其它抗氧化劑對亞麻油酸之過氧化作用之影響。由圖中顯示當反應作用12天時則其活性大小為200 ppm BHA>200 ppm MEMBH=100 ppm MEMBH=200ppm TOC >100 ppm TOC >100 ppm BHA。再由圖中可看出100 ppm之MEMBH混合100 ppm Toc，則其活性大於200 ppm之Toc($P<0.05$)。顯示MEMBH對Toc具有抗氧化活性之相乘作用。

二、MEMBH之分離與純化

將MEMBH的甲醇去除，再溶於水後以不同溶劑萃取，其中以n-butanol 萃取所得產物之抗氧化活性最強，經二次TLC分離，所得區分(fraction)中，以第四與第五區分之活性最強，經初步純化證實MEMBH之主要抗氧化成分是屬於黃酮(flavones)類化合物。

三、MEMBH對脂質與非脂質成分之氧化安定作用

圖三為MEMBH對liposome與deoxyribose之氧化安定作用，由圖中可看出0.001~3.9 mg的MEMBH對liposome之氧化抑制率為7.39~67.9%；另外，在非脂質部份作用上，圖中顯示0~2.0 mg的MEMBH對deoxyribose具有0~77.0%的氧化安定作用。換言之，MEMBH對細胞之脂質體與糖類具有顯著的保護作用；在MEMBH對蛋白質作用上，由圖四可看出0.002~0.02 mg的MEMBH在蛋白質氧化抑制率皆為25%，而後隨著濃度增加，其抑制率則有明顯下降。再者，

由圖一，圖三與圖四而言，MEMBH對油脂氧化作用與對蛋白質氧化作用模式有明顯的差異。對DNA之氧化保護作用而言，0.02~8.0 mg MEMBH對2'-dG氧化為8-OH-2'-dG之抑制性為37-45.9%(圖五)，顯示MEMBH亦具有保護DNA免於被氧化之作用，對照高濃度的Toc有促進DNA氧化作用而言，本模式更能彰顯出MEMBH對DNA之氧化保護作用的重要性。

四、MEMBH之抗氧化作用機制

表一為不同含量的MEMBH之還原力，顯示MEMBH隨其含量之增加，其還原力有增加趨勢，兩者線性關係為 $y=0.542625 x + 0.0132$ ($r^2=0.97$, $P<0.05$)，顯示彼此之間有很好之線性關係。再者，還原力與抗氧化性之間的相關線性關係為 $y=7.200999 x + 89.43694$ ($r^2=0.87$, $P<0.05$)。顯示MEMBH之還原力對彼等抗氧化力具有顯著的貢獻。圖六為MEMBH對自由基之捕捉性及其與抗氧化活性之關係。MEMBH捕捉自由電子之效應乃隨其所添加量增加而增加，兩者之間亦具有很好的相關性($r^2=0.93$, $P<0.05$)。換言之，MEMBH具有free-radical inhibitors，也具有primary antioxidants的角色。圖七為MEMBH對 Fe^{2+} 之螯合作用，0.02~8.0 mg MEMBH對 Fe^{2+} 之螯合作用為0.16~99.1%，再與EDTA作比較，顯示4.0 mg MEMBH其螯合力約等於0.2 mg EDTA。圖八-A為MEMBH對 H_2O_2 之作用性。0.001~0.2mg之MEMBH其對 H_2O_2 之捕捉率為16.6~87.1%。圖八-B為MEMBH對氫氧自由基之捕捉率，可看出0.02~29 mg之捕捉率為12.9~82.6%。氫氧自由基在生物系統中是一種反應性極強的自由基，它幾乎可以破壞細胞內之糖類，蛋白質，氨基酸，磷脂質，DNA鹼基與有機酸。再者 Fe^{2+} 與 H_2O_2 作用產生的Fenton reaction亦是產生hydroxyl

radical的主要途徑。由本研究結果可得知，由於MEMBH具有還原力，捕捉自由基與活性氧及螯合金屬離子的特性，以致於彼等能有效地抑制脂質氧化，並且保護deoxyribose, protein與DNA鹼基免於被氧化破壞。

五、MEMBH在食用油脂氧化安定上之應用。

圖九顯示100ppm的MEMBH與100 ppm的Toc與100 ppm BHA對大豆油皆有很好之氧化安定作用。圖十為MEMBH與其它抗氧化劑對大豆油在60 °C貯存其氧化後所形成TBARS之抑制情形。由此顯示，MEMBH在此系統反應10天後，其抑制TBARS之作用優於Toc與BHA。另外，表二為MEMBH與其它抗氧劑對大豆油在180 °C貯存時之氧化安定影響。由表中可看出在此高溫模式系統中，MEMBH對大豆油之氧化安定作用仍然優於Toc與BHA。由此證實，MEMBH在大豆油之應用上具有很強的抗氧化特性。

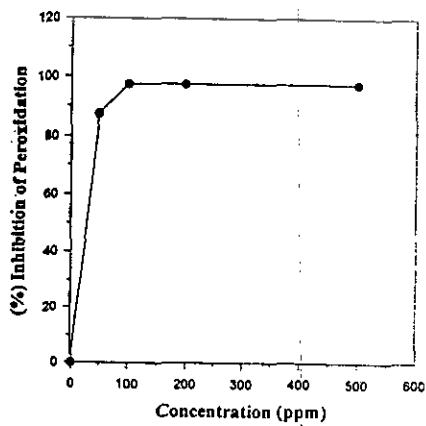
結論

綜合上述可知黃酮為MEMBH中主要抗氧化成分，且由於MEMBH具

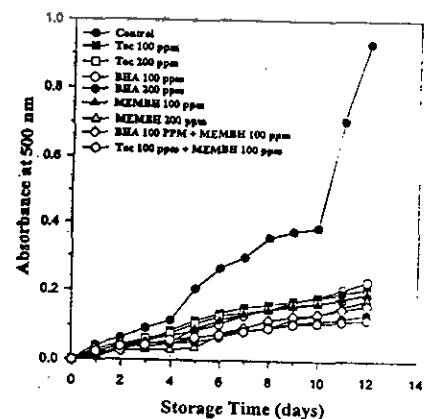
有極強的還原力及兼具捕捉自由基電子與活性氧及螯合金屬離子的功能，故不僅對脂質成分具有抗氧化作用，對細胞非脂質成分之氧化破壞亦具有保護作用，另外，彼等在大豆油之應用上也具有氧化安定的特性。由這些特性可認為綠豆英極具利用價值。

參考文獻

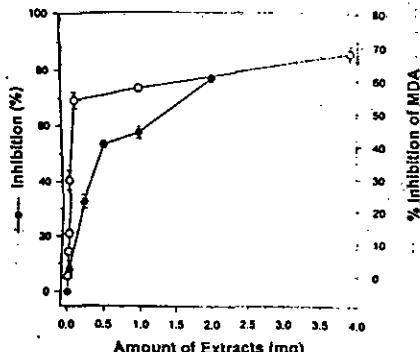
- Aruoma, O.I., Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, Ed. Chem. Toxic. 62: 671-683 (1994).
- Antosiewicz J., J. Popinigis, J., Wozniak, M., Damiani, E., Carloni, P., and Greci, L., Effect of indolinic and quinolinic quinoxyls on protein and lipid peroxidation of rat liver microsomes, Free Radical Biology & Medicine 18, 913-917 (1995).
- Yen, G.C., Chen, H.Y., and Peng, H.H., Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts, J. Agric. Food Chem. 45, 30-34 (1997).



圖一 不同濃度綠豆英萃取物對亞麻油酸氧化作用之影響
Figure 1. Effect of different concentrations of MEMBH on inhibition of linoleic acid peroxidation.

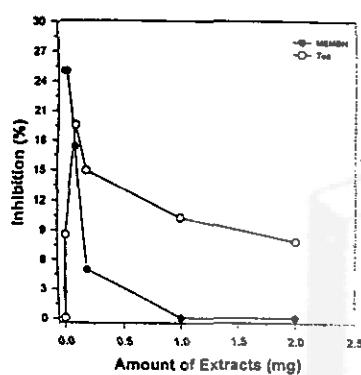


圖二 綠豆英萃取物, BHA 與 tocopherol 對亞麻油酸之抗氧化性
Figure 2. Antioxidant activity of MEMBH, butylated hydroxyanisole (BHA) and tocopherol (Toc) on inhibition of linoleic acid peroxidation



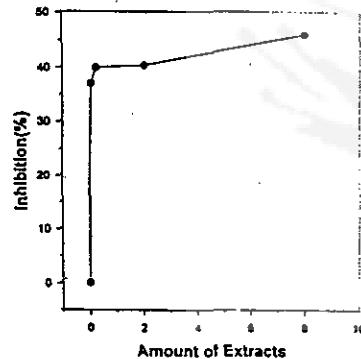
圖三 紅茶莢果茶取物對脂質過氧化之抗氧化性(+)及抑制全血漿脂質過氧化之活性(○)

Figure 3. Antioxidant activity of MEMBH in a liposome model system (+) and its inhibitory effect on denatured myeloperoxidase damage (○).



圖四 紅茶莢果茶取物對蛋白質膜之損傷作用(○)

Figure 4. Inhibitory effect of MEMBH on protein membrane damage.



圖五 紅茶莢果茶取物對2'-deoxyguanosine 無化作用之抑制作用
Figure 5. Inhibitory effect of MEMBH on 2'-deoxyguanosine mutagenic damage.

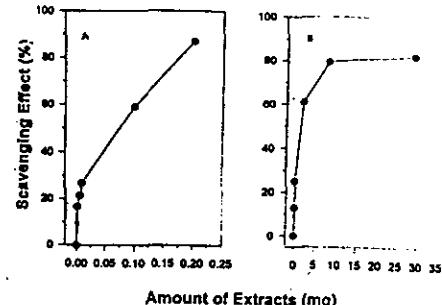
A-一 紅茶莢果茶取物之還原力
Table I Reducing power of methanolic extract of mung bean hulls

| Amount (mg) | Reducing power ^a |
|----------------------------|-----------------------------|
| 0.03 | 0.054±0.000 ^b |
| 0.1 | 0.059±0.005 ^b |
| 0.15 | 0.087±0.003 ^b |
| 0.2 | 0.115±0.000 ^b |
| 0.3 | 0.178±0.003 ^b |
| 0.4 | 0.241±0.011 ^b |
| 0.6 | 0.304±0.002 ^b |
| 0.7 | 0.367±0.001 ^b |
| 0.8 | 0.493±0.003 ^b |
| Ascorbic acid ^b | 0.398±0.03 ^b |

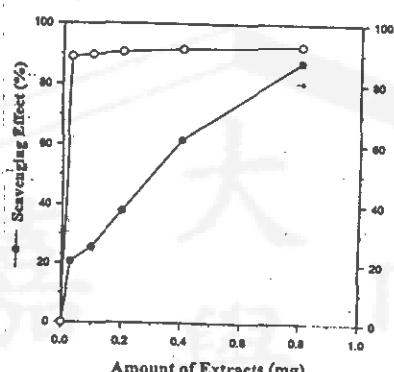
^aThe reducing power of extracts was determined by absorbance at 700 nm with a spectrophotometer.

^bThe amount of ascorbic acid was 0.05 mg.

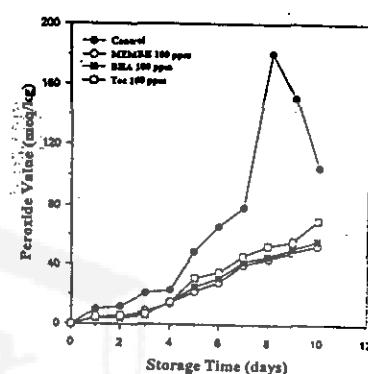
*Means within a column with different letters are not significantly different ($p>0.05$).



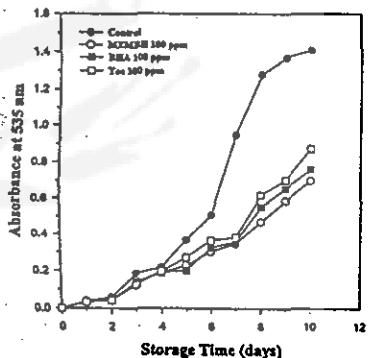
圖六 紅茶莢果茶取物對氫過氧化物及(A)及水自由基(B)之抑制作用
Figure 6. Scavenging effect of MEMBH on hydrogen peroxide (A) and hydroxyl radical (B).



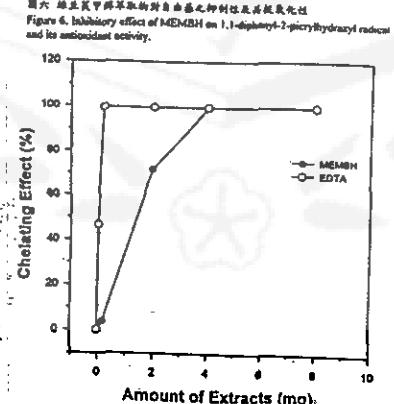
圖七 紅茶莢果茶取物的鐵離子之螯合效果
Figure 7. Chelating effect of MEMBH on ferrous ion.



圖八 紅茶莢果茶取物對大豆油過氧化物之抑制作用
Figure 8. Inhibitory effect of MEMBH on soybean oil peroxidation.



圖九 紅茶莢果茶取物對大豆油過氧化物之抑制作用
Figure 9. Inhibitory effect of MEMBH on soybean oil oxidation.



圖十 紅茶莢果茶取物對大豆油過氧化物之抑制作用
Figure 10. Oxidation of soybean oil treated with MEMBH during storage at 60°C, measured as absorbance of diisobutyl acid reactive substances.

| Treatment ^a | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 18:4 |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Fresh oil | 10.57±0.01 ^b | 4.10±0.007 ^b | 22.20±0.022 ^b | 54.51±0.007 ^b | 3.10±0.047 ^b | 0.76±0.004 ^b |
| (Dow 0) | | | | | | |
| Treated oil | 11.40±0.046 ^b | 4.12±0.014 ^b | 22.69±0.100 ^b | 54.36±0.193 ^b | 3.09±0.130 ^b | 0.81±0.020 ^b |
| (Dow 2) | | | | | | |
| MEMBH | 10.76±0.041 ^b | 4.16±0.021 ^b | 22.56±0.020 ^b | 54.18±0.023 ^b | 7.87±0.024 ^b | 0.73±0.009 ^b |
| BHA | 11.25±0.129 ^b | 4.12±0.036 ^b | 22.92±0.013 ^b | 55.01±0.125 ^b | 6.32±0.041 ^b | 0.59±0.009 ^b |
| Tec | 11.51±0.165 ^b | 4.21±0.162 ^b | 23.01±0.162 ^b | 54.81±0.042 ^b | 6.46±0.076 ^b | 0.56±0.004 ^b |

^aThe concentration of MEMBH, BHA and Tec was 100 ppm, respectively.

^bThe observations are the same as in Figure 2.

*Means with different letters in the column are significantly different ($p<0.05$).