

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2313-B-041-009

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：杜平惠 嘉南藥理科技大學 食品衛生系

計畫參與人員：晏文潔，張璣文，吳明娟 嘉南藥理科技大學 食品衛生系

中文摘要

本研究探討花生膜之抗氧化性及其對生物分子氧化傷害之影響。以數種不同溶劑萃取花生膜，顯示乙醇之萃取液（ethanolic extracts of peanut testa, EEPT）有較多量之產率及最大的對亞麻油酸之抗氧化性。經由矽膠管柱層析（以 CH_2Cl_2 與 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 漸增極性沖提），共分離出 18 區分，屬於極性較高的沖提物則有較高之抗氧化活性，其中第 17 區分有最大之產量及顯著之活性（67.5% 大於 tocopherol 之 62.0%）。在生物分子氧化傷害影響上，顯示 EEPT 對 liposome 有顯著之氧化安定作用，對 protein、去氧核糖與 DNA 之氧化破壞亦具有顯著之氧化性保護作用。在作用機制上，顯示 EEPT 不僅含有多酚類化合物且具有還原性與捕捉自由基與活性氧之能力，對鐵離子亦有螯合特性。這些特性足以說明 EEPT 對生物分子具有氧化安定之作用。

關鍵詞：花生膜，抗氧化性，氧化性破壞，自由基，多酚類化合物，活性氧。

英文摘要

The antioxidant activity of peanut testa and its effect on the oxidative damage of biological molecule were investigated. Among the organic solvent extraction,

ethanolic extracts of peanut testa (EEPT) produced the highest yield and exhibited the greatest inhibition of linoleic acid peroxidation. The EEPT was separated into eighteen fractions by silica gel column chromatography. Fraction 17 showed the highest yield and marked antioxidant activity (67.5% greater than that of tocopherol, 62.0%). EEPT showed significantly oxidative stability on the liposome model system. Also, EEPT exhibited inhibitory effect against protein, deoxyribose and DNA oxidative damage. EEPT contained phenolic compounds and showed marked reducing ability and effectively quenching effect on free radical, and active oxygen as well as chelating effect on iron ion. These properties may explain how the antioxidant activity of EEPT arises.

Keywords: peanut testa, antioxidant activity, oxidative damage, free radical, phenolic compound, active oxygen.

前言

諸多研究認為豆類植物的莢（殼）或種子上的皮或膜（testa），除了具有物理性的保護作用，對內部種子之氧化反應也具有抑制功能。因此，推測其莢或膜應該含有類似抗氧化成分。花生（*Arachis hypogaea* L.）

屬於豆類植物，過去文獻已證實花生殼或已脫除膜之花生仁具有抗氧化性，然而有關花生膜是否具有抗氧化性卻未有文獻報告。坊間有些花生製品來自於花生仁的製造，對於這些花生膜之處理，不外乎是丟棄燒燬或作飼料用，倘若能對花生膜加以有效處理，並探討其抗氧化性，則不僅有助於機能性成分之開發，對彼等之經濟效益與應用價值及對人體健康之維護將有很大幫助。基於此，本計畫乃以花生為樣品探討其膜之抗氧化性，並探討其對生物分子氧化傷害之影響。

結果與討論

一、不同溶劑萃取花生膜之制備及其抗氧化性之比較

表一為花生膜以不同溶劑所得萃取率及抗氧化性。由表中可看出乙醇之萃取量最高，其次依序為甲醇，丙酮，乙酸乙酯，正己烷。再由其對亞麻油酸反應 22hr 之氧化抑制率之表現，可看出乙醇萃取物之抑制率為 $69 \pm 0.1\%$ ，其次為甲醇萃取物 ($66.7 \pm 2\%$)，而丙酮，乙酸乙酯與正己烷則顯示極微的抑制率。乙醇是為良好之花生膜萃取之溶劑，且其萃取物對亞麻油酸的氧化性亦有較顯著抑制。另外，由圖一可看出亞麻油酸之氧化安定性亦隨著花生膜乙醇萃取物 (ethanolic extracts of peanut testa, EEPT) 含量之增加而增加，很顯然地，EEPT 具有很強之抗氧化性。因此，選定乙醇萃取物作為本研究進一步試驗之樣品。

二、花生膜抗氧化成分之分離，純化與鑑定

將 EEPT (458.3g) 以 CH_2Cl_2 與 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 漸增極性之溶劑沖提，並以矽膠管柱層析

進行分離。各沖提溶劑為 CH_2Cl_2 ， $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{EtOH}$ (10 : 1)， $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{EtOH}$ (5 : 1)，與 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$ (4 : 1)，所得區分 (Fraction, Fr.) 各為 Fr.1~10，Fr.11~Fr.16，Fr.17 與 Fr.18，共為 18 個區分。表二為 EEPT 進行沖提後各區分之產量及其抗氧化活性，由表中顯示 1mg 之各區分之抗氧化活性大於 1mg 之 tocopherol (62.1%) 者，分別為 Fr.13 (67.2%)，Fr.14 (82.2%)，Fr.17 (67.5%) 與 Fr.18 (98.6%)，其產量分別為 2.80g，0.46g，16.539g 與 12.162g。由此顯示花生膜之具有抗氧化性，乃大部分由此五區分之貢獻，有關於這五區分之抗氧化成分之純化與鑑定，目前仍繼續進行中。

三、對大分子氧化傷害之影響

圖二為 EEPT 對 liposome 之氧化安定作用，可看出在 0.01~10mg 之 EEPT，其對 liposome 之氧化有顯著之安定作用，且隨濃度之增加而增加。其中 10mg 之 EEPT 對 liposome 之氧化安定性 (60.4%) 與 10mg 之 Toc (55.1%) 並無顯著上之差異 ($P > 0.05$)。圖三為 EEPT 對蛋白質氧化作用之影響。顯示 0.1~100 μg 之 EEPT 對蛋白質之氧化保護作用為 17.2~27.2%，顯然在微量之 EEPT 對蛋白質之氧化作用即具有保護性。圖四為 EEPT 對去氧核糖氧化作用之影響，其中 1mg 之 EEPT 具有 89.2% 之氧化保護作用，顯示 EEPT 對去氧核糖亦有顯著之保護作用。在對 DNA 氧化保護作用而言，EEPT 在 0.01~0.08mg 濃度範圍其對 DNA 氧化傷害具有保護作用 (data not shown)，且隨濃度之增加其保護效應亦隨之增加。由上述可知，EEPT 對脂質與非脂質成分之氧化均具有保護作用。

四、花生膜抗氧化作用機制

圖五 EEPT 之多酚化合物含量，結果顯示隨著 EEPT 含量之增加，其多酚化合物之含量亦隨之增加，其中 1.0mg 之 EEPT 含有 0.103mg 之多酚化合物，再者由圖六中之抗氧化活性與多酚類含量之關係($r=0.995$)，可看出其所含的多酚化合物對 EEPT 抗氧化有顯著之貢獻。圖七為 EEPT 對 DPPH 之捕捉性，以 0.01~10mg 而言，其捕捉性隨添加量之增加而增加，其中 0.1mg 之 EEPT 其捕捉性即已高達 90.1% 與 0.1mg 之 tocopherol (90.4%) 無顯著上之差異 ($P>0.05$)，顯示 EEPT 為自由基之抑制劑。圖八為 EEPT 之還原力，顯示在 0~10mg 之範圍，其還原力隨添加量之增加而增加。圖九為 EEPT 對 Fe^{2+} 之螯合作用，顯示隨添加量之增加，其對 Fe^{2+} 螯和作用亦有增加趨勢。另外由表三可看出 EEPT 對氮氣自由基亦具有顯著捕捉性。

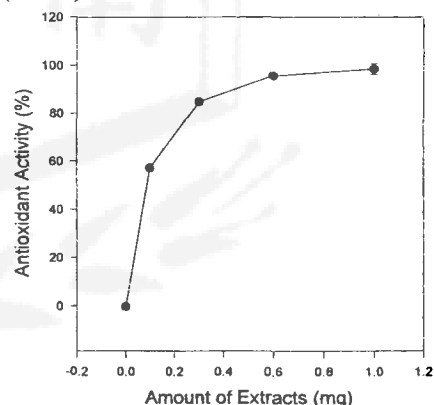
結論

綜合上述可知，花生膜對脂質與非脂質系統皆具有顯著之抗氧化性。過去文獻只提出花生仁與花生殼皆具有抗氧化性，惟欠

缺花生膜是否具有抗氧化性之報告。本研究顯示花生膜具有抗氧化作用之結果恰可完整地彌補這方面之缺陷。另本結果亦可供學術界或食品工業界之參考與應用。

參考文獻

- Yi, O.S., A.S. Meyer, and E.N. Frankel, Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. *Journal of American Oil Chemical Society*. 74, 1301-1307 (1997).
- Duh, P.D., P.D. Du and G.C. Yen, Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1055-1061 (1999).



圖一 不同含量之花生膜乙醇萃取物之抗氧化性

Fig. 1. The antioxidant activity of different amounts of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT).

表一 以不同溶劑萃取花生膜之產量及其抗氧化性

Table 1. Yield and antioxidant activity of peanut testa with various solvents

Sample	Yield (mg) ^a	Antioxidant activity(%) ^{b,c,d}
MEPT ^e	212.4	66.7 ± 2.0 ^b
EEPT	252.8	69.0 ± 0.1 ^a
AEPT	199.0	3.0 ± 2.4 ^d
HEPT	35.1	3.0 ± 0.4 ^d
EAEPT	90.4	0.3 ± 0.4 ^d
BHA		63.6 ± 3.6 ^b
Toc		18.9 ± 0.4 ^c

^a Based on 5.0g of peanut testa for each solvent (200 ml)

^b The antioxidant activity of each sample (200 ppm) was determined by thiocyanate method.

^c Values are mean ± standard of three replicate analyses.

^d Means within a column with the same superscript letters are not significantly different ($p>0.05$).

^e MEPT: methanol extracts of peanut testa; EEPT: ethanol extracts of peanut testa; AEPT: acetone extracts of peanut testa; HEPT: hexane extracts of peanut testa; EAEPT: ethylacetate extracts of peanut testa; BHA: butylhydroxy anisole; Toc: tocopherol

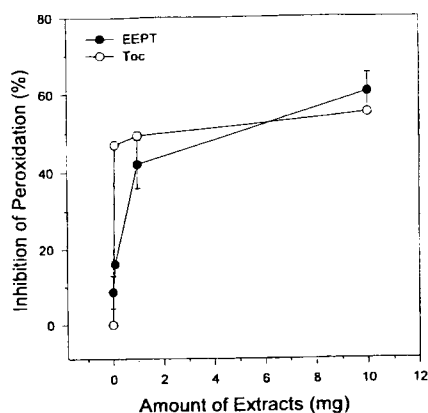
表二 花生膜乙醇萃取液經矽膠柱層析所得各區分之產量及其抗氧化性

Table 2. Yield and antioxidant activity of different fraction of ethanolic extracts from peanut testa separated on silica-gel column chromatography

Fraction ^a	Yield (g)	Antioxidant Activity (%) ^b
1	0.063	15.4 ± 1.92
2	1.087	3.4 ± 0.68
3	0.801	3.8 ± 1.13
4	4.755	3.7 ± 0.68
5	0.219	3.8 ± 0.90
6	0.314	2.8 ± 0.79
7	0.278	1.8 ± 2.14
8	1.217	4.6 ± 0.45
9	0.383	4.1 ± 2.14
10	0.039	8.2 ± 1.24
11	8.272	3.8 ± 1.80
12	1.173	56.8 ± 4.06
13	2.80	67.2 ± 1.69
14	0.46	82.2 ± 0.79
15	1.246	40.1 ± 2.59
16	14.448	4.3 ± 0.23
17	16.539	67.5 ± 2.59
18	12.162	98.6 ± 2.82
Toc		62.0 ± 1.58
BHA		90.6 ± 0.23

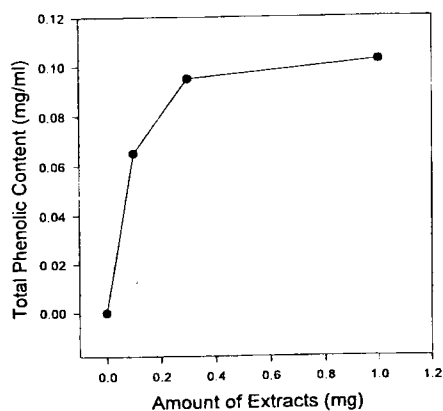
^a BHA: butylhydroxy anisole; Toc: tocopherol

^b The antioxidant activity of each sample (200 ppm) was determined by thiocyanate method.



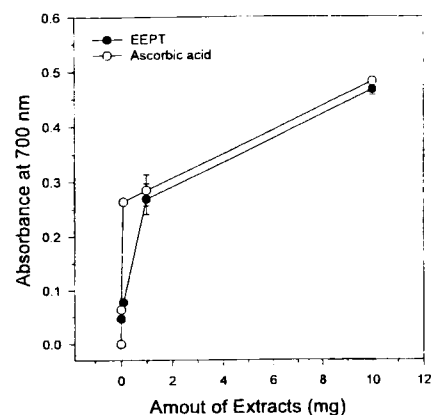
圖二 花生醇乙醇萃取物對磷脂質過氧化作用之影響

Fig. 2. The effect of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT) on liposome peroxidation. Toc: tocopherol



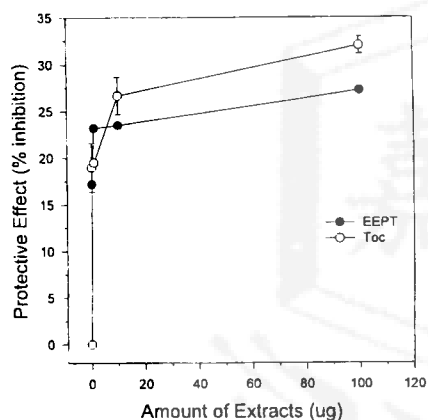
圖五 不同含量之花生醇乙醇萃取物之多酚化合物含量

Fig. 5. The total phenolic content of different amounts of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT).



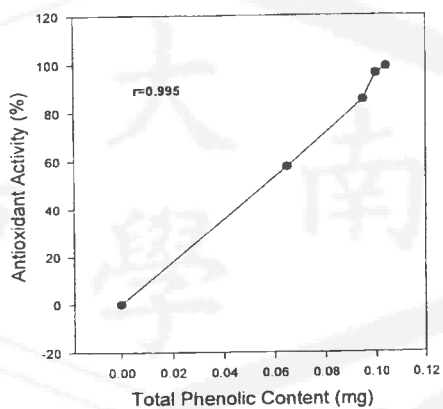
圖八 花生醇乙醇萃取物之還原力

Fig. 8. Reducing ability of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT).



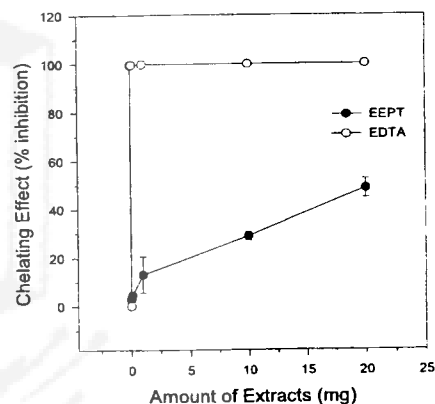
圖三 花生醇乙醇萃取物對蛋白質氧化作用之影響

Fig. 3. The effect of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT) on protein oxidative damage. Toc: tocopherol.



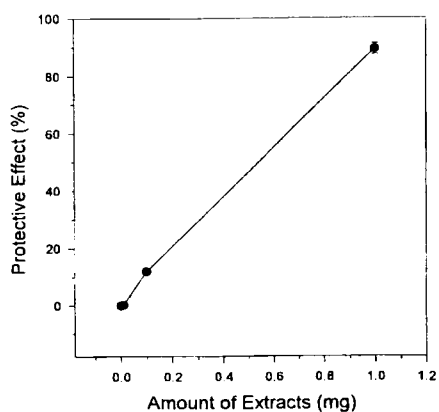
圖六 花生醇乙醇萃取物之多酚化合物含量與其抗氧化活性之關係

Fig. 6. The correlation between total phenolic content and antioxidant activity of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT).



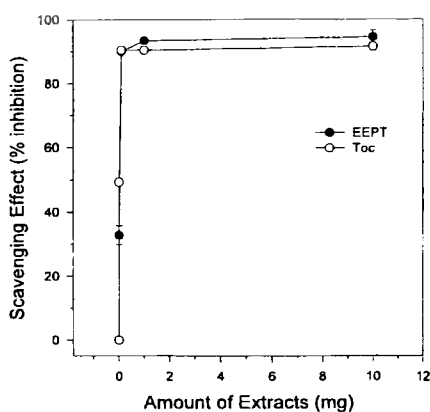
圖九 花生醇乙醇萃取物對鐵離子之螯合作用

Fig. 9. Chelating effect of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT) on iron ion. EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid



圖四 花生醇乙醇萃取物對去氧核糖氧化作用之影響

Fig. 4. The effect of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT) on deoxyribose oxidative damage.



圖七 花生醇乙醇萃取物對自由基之捕捉效應

Fig. 7. The effect of ethanolic extracts of peanut testa (EEPT) on free radical. Toc: tocopherol

表三 花生醇乙醇萃取液對氫氧自由基之捕捉性

Table 3. The Scavenging effect of ethanolic extracts from peanut testa on hydroxyl radical

Amount (mg)	Inhibition (%)	
	2,3-DHBA ^a	2,5-DHBA ^b
0	0	0
1	22.9±2.94	66.5±3.63
10	84.9±0.12	73.6±6.33

^a2,3-DHBA: 2,3-dihydroxybenzoic acid;

^b2,5-DHBA: 2,5-dihydroxybenzoic acid