

大豆荚壳异黄酮制备与体外抗氧化性研究

王桃云^{1,2},王莹²,钱玮²,陈鹏¹

(1. 扬州大学 生物科学与技术学院,江苏 扬州 225001;2. 苏州科技学院 化学与生物工程学院,江苏 苏州 215009)

摘要:研究大豆荚壳异黄酮(Isoflavones from soybean hull,ISH)制备与体外抗氧化性作用。通过超声回流法提取和大孔吸附树脂纯化,得到纯化的 ISH。以 VC、BHT、芦丁和槲皮素为阳性对照,测定了 ISH 的还原力;对羟基自由基、超氧阴离子自由基、烷基自由基的清除率以及抑制油脂过氧化的能力。结果表明:ISH 的还原力高于 BHT 和 VC,ISH 对这几种自由基均有一定的清除作用,ISH 的添加量在试验范围内与其抗氧化活性呈正相关。当试验量大于 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,ISH 的抗氧化性能均优于 VC、BHT、芦丁和槲皮素。

关键词:大豆荚壳;异黄酮;抗氧化活性;清除自由基

中图分类号:Q944.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)05-0913-04

Preparation and Antioxidant Activity of Isoflavones from Soybean Hull *in vitro*

WANG Tao-yun^{1,2}, WANG Ying², QIAN Wei², CHEN Peng¹

(1. College of Biological Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu;2. College of Chemical and Biological Engineering, Suzhou Science and Technology University, Suzhou 215009, Jiangsu, China)

Abstract:To study isoflavones from soybean hull (ISH) preparation the antioxidant activities of ISH *in vitro*. The ISH was extracted by method of ultrasonic and reflux extraction and purified by macroporous adsorption resin. The reduction and the scavenging capacities on hydroxyl free radical, superoxide anion radical and alkyl radical as well as inhibition of peroxide value of the ISH were detected while the VC (antiscorbutic vitamin), BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol), quercetin and rutin flavonoids were used as positive control. The result showed, the ISH had higher reduction energy than BHT and VC, and had some scavenging ability on all radical. The amount of ISH used was in direct proportion to the antioxidation. The scavenging capacities of ISH was higher than the VC, BHT, quercetin and rutin flavonoids while the dosage was more than 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Key words:Soybean hull; Isoflavones; Antioxidant activity; Scavenging capacity to radical

我国是世界上大豆生产大国,年产量达 1 500 万 t^[1],按大豆子实重量与荚壳重量比为 2:1 计算^[2],大豆荚壳的年产出量可达 750 万 t,资源量非常巨大。研究表明,大豆荚壳中富含“天然植物雌激素”-异黄酮类化合物^[3]。以大豆荚壳为异黄酮的提取材料,对大豆荚壳异黄酮的体外抗氧化作用进行研究,以期为进一步开发大豆荚壳资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

染料木素、芦丁、槲皮素、亚油酸均为 Sigma 公司色谱纯;三氯化铝、邻苯三酚、甲醇、乙醇、水杨酸、

三氯乙酸、硫代巴比妥酸、氯仿、乙酸、碘化钾、硫代硫酸钠、VC、二丁基羟基甲苯(BHT)、FeSO₄等,均为国产分析纯;猪油,市售肥猪板油煎制;大豆荚壳,10月中旬采自苏州市胥口农场。

1.2 主要仪器设备

UV-2450 紫外-可见光分光光度计岛津仪器(苏州)有限公司;RE52-A 旋转蒸发仪上海亚荣玻璃仪器厂;101-1-BS 型电热恒温鼓风干燥箱上海跃进医学器械厂;KS-C 型超声波细胞粉碎仪宁波海曙科生超声设备有限公司;FA2004N 型电子天平上海恒平科学仪器有限公司;GL-12B 型台式离心机上海飞鸽离心机厂。

收稿日期:2008-11-02

作者简介:王桃云,(1973-)男,讲师,在读博士研究生,现主要从事天然产物研究与开发。E-mail:wangtaoyun@mail.usts.edu.cn。

通讯作者:陈鹏,教授,博士生导师。

1.3 方法

1.3.1 样品液制备 取大豆荚壳洗净,烘干,粉碎后过 100 目筛,粉末于 40℃干燥至恒重。称取 500 g 豆荚干粉,加入 200 mL 75% 乙醇,在 25℃、超声功率为 200 W、超声 15 min,然后在 80℃回流提取 4 h, 5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,重复提取 2 次,将 2 次上清液合并,旋转蒸发浓缩至原体积的 1/4。与等体积石油醚混匀分层,弃上相,将所得的下相倒入烧杯中,用保鲜膜封口,于零下 4℃保存静置 24 h 后,以 5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,将上清液浓缩至原体积的 1/5,待用。

1.3.2 样品液中的 ISH 纯化 选用 AB-8 型大孔吸附树脂对所得 ISH 进行纯化,称取适量树脂,酸碱预处理过后。以 70% 乙醇装柱、平衡,调 pH 至 6.0。缓慢上样,用 4 倍体积去离子水洗去多糖、蛋白质等杂质。以 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇进行梯度洗脱。将所有含 ISH 的洗脱液合并,旋转蒸发浓缩至所需的浓度,待用。

1.3.3 ISH 最佳吸收波长的确定 考虑到不同的异黄酮类化合物具有不同的最佳吸收波长,要准确地对总异黄酮进行定量,就必须找到标准品(染料木素)和 ISH 溶液共同的最佳吸收波长。

经过多次试验,发现采用 1% 三氯化铝比色法可以找到标准品与 ISH 样液共同的最佳吸收波长,而且 1% 三氯化铝比色法的稳定性也很好。具体操作如下:分别精密量取染料木素标准品和已制备好的 ISH 样品溶液各 1.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,分别加入 1% 三氯化铝 4.0 mL,再加 95% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 10 min,用紫外分光光度计在 200~800 nm 范围内进行扫描,得光谱图。

1.3.4 ISH 标准曲线制备 精密称取染料木素 3.4 mg,用 95% 乙醇配制成浓度为 6.8 μg·mL⁻¹ 的标准品待测液。

精密量取已制备的标准品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL,按 1.3.3 所述方法,在 270 nm 下测定吸光度并记录数据,绘制吸光度值 Y-浓度 X 的标准曲线。

1.3.5 ISH 还原力的测定 取 2.5 mL 不同浓度的 ISH、BHT 和 VC 的乙醇溶液,按 Yen 所述方法^[4]测定吸光值,吸光值越大则还原力越强。

1.3.6 ISH 对羟基自由基(·OH)清除率的测定 按朱宇旌等所述方法^[5],测定 ISH 对羟基自由基的清除率。以水杨酸-乙醇 2 mL,9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 2 mL,不同浓度的 ISH(或 VC、槲皮素)溶液 2 mL 为本底吸收。

·OH 清除率的计算公式为:

清除率 = [A₀ - (A_x - A_{xo})]/A₀ × 100%,式中 A₀ 为空白对照液的吸光度;A_x 为加入黄酮溶液后的吸光度;A_{xo} 为不加 H₂O₂、ISH(或 VC、槲皮素)溶液本底的吸光度。

1.3.7 ISH 对超氧阴离子自由基(O₂⁻)清除率的测定 取适量 ISH(或 VC、BHT)配置成浓度分别为 2.0、5.0、8.0、11.0、14.0 μg·mL⁻¹ 的待测液。按莫开菊等所述方法^[6],对对照液和样品液进行配置。

将配制好的对照液和待测样液分别加样于具塞比色皿中,迅速摇匀后每隔 10 s 用紫外-可见分光光度计在 320 nm 下测定相应吸光度值,至吸光度值稳定为止(10 mmol·L⁻¹ HCl 溶液为参比)。清除率计算公式为:

O₂⁻ 清除率 = (P₀ - P)/P₀ × 100%,式中 P₀ 为邻苯三酚的自氧化法速率;P 为加入 ISH(或 VC、槲皮素)溶液后邻苯三酚自氧化法速率,单位均为吸光度每分钟的增值。

1.3.8 ISH 对烷基自由基清除率的测定 按胡迎芬等^[7]所述方法,对 ISH 清除烷基自由基进行测定,烷基自由基清除率的计算公式为:

烷基自由基清除率 = (A₀ - A_i)/A₀ × 100%,式中 A₀ 为空白组吸光度;A_i 为加样品液组的吸光度。

1.3.9 ISH 抑制油脂氧化效果测定 油脂过氧化值(POV)测定方法:按 GB/T 5538-1995 的方法测定。POV 值计算公式为:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 1\,000}{M}$$
 式中: X 为样品的过氧化值,meq·kg⁻¹; V₁ 为样品消耗硫代硫酸钠标准溶液体积,mL; V₂ 为试剂空白消耗硫代硫酸钠标准溶液体积,mL; C 为硫代硫酸钠标准溶液的浓度, mol·L⁻¹; M 为样品质量,g。

按赵爱云等^[8]所示方法测定 POV 值,进而比较不同抗氧化剂的抗氧化活性。

2 结果与分析

2.1 ISH 最佳吸收波长的确定

由 1.3.2 所述方法对染料木素和大豆荚壳异黄酮进行测定,所得光谱扫描结果如图 1 和图 2 所示。

由图 1 和图 2 可知,染料木素的最佳吸收波长是 270 nm,而 ISH 溶液的最佳吸收波长是 272 nm,两者非常接近,因此选定 270 nm 为测定 ISH 含量的最佳吸收波长。

2.2 染料木素标准曲线

按 1.3.4 所述方法,得标准曲线如图 3 所示。

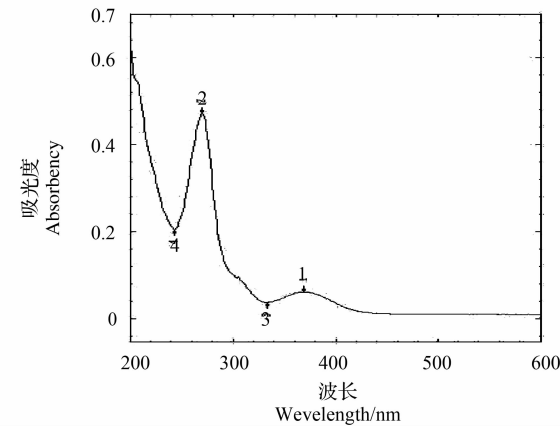


图1 染料木素吸收光谱图
Fig.1 Spectrogram of the Genistein

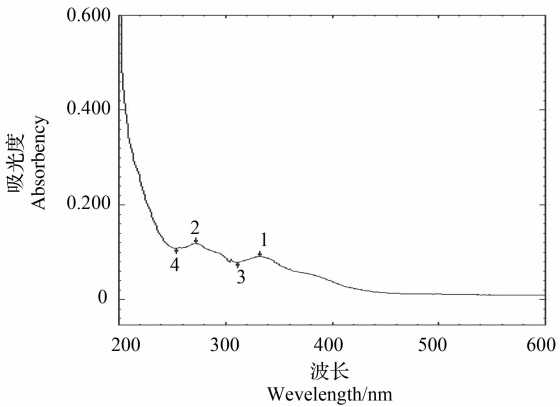


图2 大豆荚壳异黄酮吸收光谱图
Fig.2 Spectrogram of the ISH

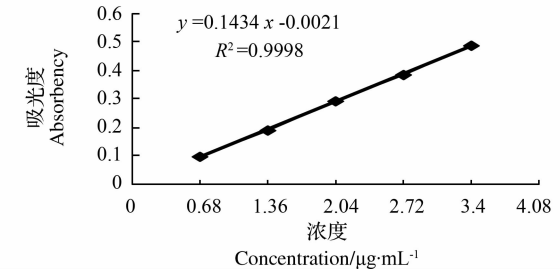


图3 染料木素标准曲线
Fig.3 Standard curve of Genistein

由图3可知,得回归方程 $Y = 143.38X - 0.0021$, $R^2 = 0.9998$,该标准曲线在 $0.68\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 到 $3.4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系。

2.3 ISH还原力的测定

按1.3.6所述方法,得不同浓度下ISH、BHT和VC的还原力,如图4所示。

由图4可知,在浓度为 $2\sim10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,ISH的还原力要大于相同浓度下的BHT和VC。

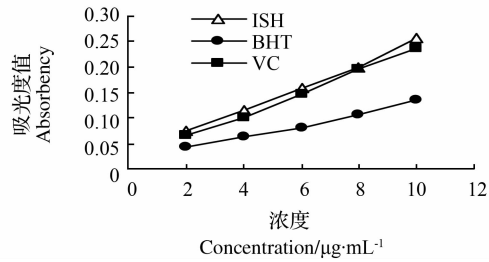


图4 ISH、BHT和VC的还原力
Fig.4 Reduction energy of ISH,BHT and VC

2.4 ISH对·OH的清除率

按1.3.6所述方法,得不同浓度下ISH、VC和槲皮素对·OH的清除率,如图5所示。

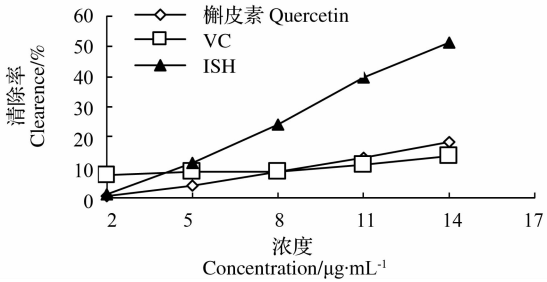


图5 ISH、VC、槲皮素对·OH的清除率
Fig.5 Scavenging capacities on (·OH) of ISH, VC and quercetin flavonoids

由图5可知,ISH对Fenton体系产生的·OH具有明显的清除作用,在试验范围内其添加量与·OH清除率呈正相关。在浓度为 $2\sim5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,ISH对·OH清除作用与VC、槲皮素相当;当浓度大于 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,相同浓度下,当ISH对·OH的清除率达到51%时,VC和槲皮素对·OH的清除率分别只有14%和18%;ISH对·OH的清除作用明显优于VC和槲皮素。

2.5 ISH对O₂⁻清除率

按1.3.7所述方法,得不同浓度下ISH、VC、BHT对O₂⁻清除率,结果如图6所示。

从图6可知,ISH、芦丁和槲皮素对碱性条件下邻苯三酚产生的O₂⁻均有不同程度的清除作用,其清除率随着其浓度的增加而增大。当抗氧化剂浓度范围在低于 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,ISH对O₂⁻的清除率与芦丁和VC基本相近,随着浓度的增大,ISH对O₂⁻的清除作用要明显优于芦丁和槲皮素。

2.6 ISH对烷基自由基的清除率

按1.3.8所述方法,得不同浓度下ISH、VC和芦丁对烷基自由基的清除率,结果如图7所示。

由图7可知,ISH对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系有明显的抑制作用,在试验浓度范围内,

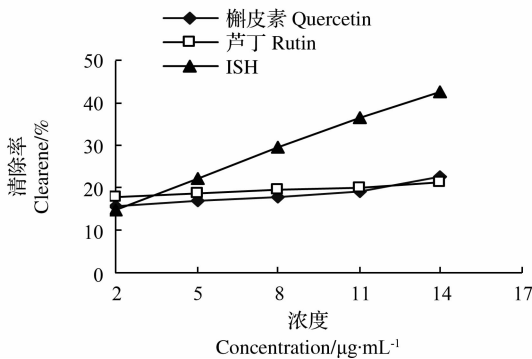


图6 ISH、芦丁、槲皮素对O₂⁻的清除率

Fig.6 Scavenging capacities on O₂⁻ of ISH, quercetin and rutin flavonoids

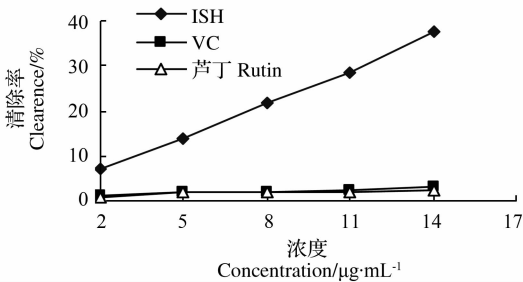


图7 ISH、VC、芦丁对烷基自由基的清除率

Fig.7 Scavenging capacities on alkyl radical of ISH, VC and rutin flavonoids

ISH 对烷基自由基的清除率随 ISH 浓度的增加而显著增大;而 VC 和芦丁对烷基自由基的清除作用很弱。相同条件下,ISH 对烷基自由基的清除能力明显强于芦丁和 VC。

2.7 ISH 抑制油脂氧化效果

按 1.3.9 所述方法,得不同时间和 ISH、VC、BHT 作用下油脂的 POV 值,结果如图 8 所示。

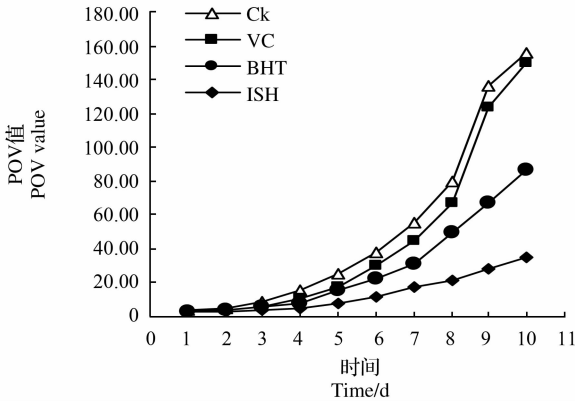


图8 ISH、VC、BHT 对油脂氧化的抑制作用

Fig.8 Inhibition of POV value of ISH、VC、BHT

由图 8 可知,加入抗氧化剂 ISH、VC 和 BHT

后,猪油的 POV 随时间延长而增加的程度都比对照低,表明 ISH、VC 和 BHT 都对油脂有一定的抗氧化作用。相同条件下,ISH 作用下猪油的 POV 要比分别在 VC 和 BHT 作用下的猪油的 POV 低,因此,ISH 的抑制油脂氧化作用要优于 VC 和 BHT。

3 结论

体外试验结果表明,ISH 有较强的清除羟基自由基、超氧阴离子自由基、烷基自由基以及抑制油脂过氧化的能力;当浓度大于 5 μg·mL⁻¹ 时,ISH 的抗氧化性能均优于 VC、BHT、芦丁和槲皮素,且都有较好的剂量依赖性。

ISH 具有较强的抗氧化能力,其来源丰富,且属于天然产物,将其作为抗氧化剂开发将会有广阔的前景。

参考文献

[1] 龙开胜,陈利根,顾忠盈,等.我国大豆产业发展的现状、危机与对策[J]. 乡镇经济,2009,(3):16-19. (Long K S,Chen L G,Gu Z Y,et al. Situation,crisis and countermeasures of soybean industry development in China[J]. Rural Economy,2009,(3):16-19.)

[2] 薛丽华,章建新,闫晓红,等.大豆荚壳生长与粒数和粒重的关系研究[J]. 新疆农业大学学报,2008,31(4):16-19. (Xue L H,Zhang J X,Yan X H,et al. A study on relationship between growth and seed number and seed weight of soybean pod[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University,2008,31(4):16-19.)

[3] 赵卫星,任子君,孙治强,等.大豆荚壳总类黄酮提取及纯化研究[J]. 江西农业大学学报,2008,30(5):328-332. (Zhao W X,Ren Z J,Sun Z Q,et al. A Study on extraction and purification of total flavonoids from soybean hull[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2008,30(5):328-332.)

[4] He Y,Shahidi F. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1997,45:4262-4265.

[5] 朱宇旌,张勇,王纯刚,等.红三叶黄酮抗氧化性研究[J]. 食品科技,2006(4):78-81. (Zhu Y J,Zhan G Y,Wang C G,et al. Study on the anti-oxidizing action of flavonoids extracted from red clover[J]. Food Science and Technology,2006(4):79-81.)

[6] 莫开菊,柳圣,程超.生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2006,27(9):110-115. (Mo K J,LIU S,Cheng C. Study on antioxidant activity of the ginger flavonoid[J]. Food Science,2006,27(9):110-115.)

[7] 胡迎芬,胡博路,孟洁,等.月季花抗氧化作用的研究[J]. 食品工业科技,2000,21(4):24-26. (Hu Y F,Hu B L,Meng J,et al. Study on the antioxidant action of Chinese rose[J]. Science and Technology of Food Industry,2000,21(4):24-26.)

[8] 赵爱云,刘宗国,王燕娜.山楂提取物对猪油抗氧化作用研究[J]. 中国粮油学报,2008,23(2):114-116. (Zhao Ai Y,Liu Z G,Wang Y N. Antioxidation activity of hawthorn ethanolic extract[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,2008,23(2):114-116.)