

MC-Transaction on Biotechnology, 2013, Vol. 5, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

豆科種子的種皮及種仁乙醇萃取物於體外清除自由基的研究

吳慧中、王志玄、蔡復淳、梁致遠*

銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

取黑豆、黃豆、紅豆及綠豆等常見且不同顏色的豆類為材料，劃分種皮及種仁，以乙醇萃取後比較體外清除自由基的能力。結果顯示，黑豆種皮的總多酚、還原力、清除 DPPH 自由基及 SOD 活性都遠優於黃豆、紅豆及綠豆等的種皮及種仁。種仁的抗氧化能力，普遍低於種皮。種皮的抗氧化活性綜合評比，黑豆種皮最高，綠豆種皮的抗氧化能力略優於紅豆種皮，黃豆種皮最低。

關鍵字：黑豆、種皮、種仁、抗氧化

通訊作者：梁致遠[liang121@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2012-11-30 接受：2013-1-25

緒 論

活性氧物種(Reactive oxygen species, ROS)包括超氧陰離子($O_2^{\bullet-}$)、羥基自由基($\bullet OH$)、過氧化氫(H_2O_2)和過氧化自由基($ROO\bullet$)，可使核酸、蛋白質、脂質或 DNA 氧化，可開啟退化性的疾病。

超氧自由基(superoxide radical)是氧化與還原反應的中間產物，具毒性，能形成羥基自由基及過氧化氫化合物(hydroperoxide)，造成細胞受損、發炎、動脈粥狀硬化及老化^[1, 2]。超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)廣泛存於生物體中的金屬酶，能催化超氧自由基轉為 H_2O_2 及 O_2 ，進而清除細胞所產生的超氧自由基。超氧歧化酶可防止膜脂質的氧化，達到保護的效果^[3]。

抗氧化劑能夠捕獲自由基。多酚類化合物是植物二次代謝產物，是天然植物中萃取的多羥基酚類衍生物，近年廣受歡迎。在傳統的藥用植物已有報導酚類化合物和抗氧化呈正相關^[4]。還原力表示其捐贈電子的能力，能和自由基反應，變成穩定的代謝物，終止自由基的反應鏈^[5]。清除自由基的能力及還原力可測得抗氧化

活性。

大豆俗稱黃豆(*Glycine max* (L.) Merr.)，是豆科(*Fabaceae*)大豆屬(*Glycine*)的草本植物。以大豆種皮的顏色分類，如黃色種皮的黃豆、黑色種皮的黑豆(black soybean) [6]。《本草拾遺》記載，黑豆能「明目鎮心，溫補。久服，好顏色，變白不老」。黑豆種皮為黑色，富含花青素類(anthocyanin)化合物，在黑豆種皮色素的研究多集中在化學結構及特性，花青素的生理活性的統研究較少 [7]。Takanori 等人 [8] 以體外試驗初步得出黑豆種皮的花青素對脂質過氧化系有較強的抑制作用，徐等人 [9] 以化學模擬體系比較體外抗氧化作用，認為黑豆種皮具有較強的抗氧化能力。Choung 等人 [10] 以層析法分離黑豆，指出黑豆主要的花青素種類為 delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside 及 petunidin-3-glucoside，黑豆中總花青素的量在 1.58-20.18 mg/g。

綠豆(*Vigna radiata*)及紅豆(*Vigna angularis*)都是屬豆科(*Fabaceae*)虹豆屬(*Vigna*)植物。Duh 等人 [11] 以甲醇萃取綠豆種皮進行抗氧化試驗，指出綠豆種皮甲醇萃取物在抑制亞麻油酸過氧化的能力，高於 BHA，在還原及清除 DPPH 自由基，也有良好的抗氧化效果。Amarowicz 等人 [12] 將紅豆，蠶豆，豌豆等 7 種豆類以 80% 丙酮萃取，發現紅豆的抗氧化能力和總酚類含量都為最高。

本研究選取豆科植物中不同顏色的豆類，目的是討論不同顏色的豆類間抗氧化能力的差異，進而比較種皮(seed coat)及種仁(seed kernel)之間清除體外自由基的能力，以期作為豆類保健食品開發的基礎。

材料與方法

材料

1. 豆的來源：

黑豆、黃豆、綠豆及紅豆購自桃園市商業市場。

2. 豆的劃分：

黑豆及黃豆以鐵鎚輕敲，將黑豆或黃豆種皮剝出，以此劃分為種皮及種仁。綠豆及紅豆以刀片或剪刀輕刮種皮，以此劃分為種皮或種仁。種皮及種仁經冷凍乾燥、磨碎及通過 60 mesh 篩網，並於-20°C 冰箱保存。

3. 藥品：

核黃素(riboflavin)、L-甲硫胺酸(L-methionine)、硝基藍四氮唑、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀、Folin-Ciocalten 試劑、碳酸鈉、沒食子酸 (gallic acid)、赤血鹽

(potassium ferricyanide)、三氯化鐵(ferric chloride)、DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、均為Sigma公司產品，95%乙醇為台灣菸酒公司產品。本實驗使用Milli-Q system 製作的超純水作為溶劑。

4. 儀器：

分光光度計 (PerkinElmer Lambda35 UV/Vis spectrometer)。

實驗方法

1. 置備乙醇萃取樣品 (Preparation of ethanol extract solution)

經冷凍乾燥後的各種豆的種皮或種仁，以一克種皮或種仁添加 5 mL (70%、40%、20%)不同pH的乙醇至離心管中，經vortex振盪，再以超音波振盪20分鐘，以4°C，3,000 rpm 離心10分鐘，收集上清液，再以以5 mL乙醇，經vortex振盪，再以超音波振盪20分鐘，以4°C，3,000 rpm 離心10分鐘，收集兩次上清液並定量至10 mL，做總多酚測試，以決定最適萃取條件。萃取的樣品作總多酚、清除DPPH自由基及還原力活性等實驗。

2. 總多酚分析(Determination of total phenolics)

以修改 Folin-Ciocalteu 方法^[13]測試，取250 μL的乙醇萃取液及同體積的Folin-Ciocalten 試劑混合5分鐘後，再加500 μL 20 %碳酸鈉及4 mL的水，在常溫下反應25分鐘後，以25 °C，5,000 rpm離心10分鐘，以分光光度計於730 nm偵測吸光度。以沒食子酸 (gallic acid) 製作檢量線，計算樣品之總多酚濃度(以μg/mL表示)。

3. 還原力活性(Reducing power activity)

使用K₃Fe(CN)₆-FeCl₃方法進行還原力的分析^[14]。取200 μL乙醇萃取液，加入同體積的磷酸鈉緩衝溶液(0.2 M, pH 6.6)及1%赤血鹽(potassium ferricyanide)，混合液在50°C下孵育20分鐘，迅速將測定樣品置於0°C冰浴5分鐘。加入同體積10%三氯醋酸溶液 (trichloroacetic acid)，3,000 rpm 離心10分鐘。上清液與蒸餾水及0.1%三氯化鐵(ferric chloride)以5：5：1混合均勻，反應10分鐘，以分光光度計於700 nm偵測吸光度。吸光度越高，表示還原能力越強。

4. 清除1,1-Diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力(Capacity of scavenging DPPH radical)

取 100 μL 不同濃度之乙醇萃取液，加入新鮮配製之 0.16 mM DPPH 甲醇溶液 1.2 mL 於 1.5 mL 升之試管中，混合均勻，在避光室溫下靜置 30 分鐘後，測 517 nm 之吸光度^[15]。

清除 DPPH 自由基能力(%) = $[1 - (A_{517 \text{ nm, sample}}/A_{517 \text{ nm, blank}})]$

(以mg/mL所具有之清除DPPH自由基能力表示)。

5. SOD活性的測試(Superoxide radical scavenging activity)

取種皮及種仁以50 mM的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)配製為0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、4、6、8、10 mg/mL，超音波震盪30分鐘後，以3,000 rpm、4°C 離心10分鐘，取上清液為粗酶液。

SOD的活性測試則參考Beauchamp 與 Fridovich的方法^[16]經修飾而成，取109.3 mg L-甲硫胺酸加入73.23 mL 50 mM的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)，待其充分溶解後再加10 mg的硝基藍四氫唑(NBT)，充分溶解成A液。以4.4 mg核黃素加至100 mL磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)，充分溶解成B液。藥品皆新鮮配製。分析測定時，取1.53 mL的B液入A液成為反應液。

取0.05 mL的黑豆種皮及種仁的粗酶液至含3 mL反應液的玻璃試管中，於4,000 Lux螢光燈下進行20分鐘光照還原反應，以分光光度計在560 nm偵測吸光值。不加粗酶液的照光試管為對照組，以抑制硝基藍四氫唑光化還原50%為一個活性單位。

百分抑制率： $(A_0-A)/A_0 \times 100\%$

式中： A_0 為對照組試管吸光值；A 為測定試管吸光值。

單位重量SOD活性的計算公式：

$$\text{SOD活性(U/g)} = \frac{\text{百分抑制率}}{50\%} \times \frac{\text{稀釋倍率}}{\text{測定管粗酶液體積(0.05mL)}}$$

結 果

以不同 pH 及不同濃度的乙醇萃取黑豆種皮及種仁，藉由總多酚的測定，找出最適萃取條件。圖 1 是以 pH3、pH7 和 pH11，以及 20%、40%和 70%的乙醇作為萃取液，進行總多酚試驗。由圖 1，以 70% pH3 乙醇萃取黑豆種皮的總多酚為 57,220 μg GAE/g 的效果最好，其次是 pH7、70%乙醇萃取條件。萃取黑豆種仁，進行總多酚試驗，以 pH7、70%乙醇萃取黑豆種仁的總多酚為 6,400 μg GAE/g 效果最好，其次是 pH3、70%乙醇的條件。由圖一，萃取液中的酒精濃度至 70%，對黑豆種皮及種仁的總多酚萃取量最多，而 pH 值的影響不若酒精濃度，因此在本研究中，以 70%乙醇做為後續測定抗氧化能力的萃取條件。

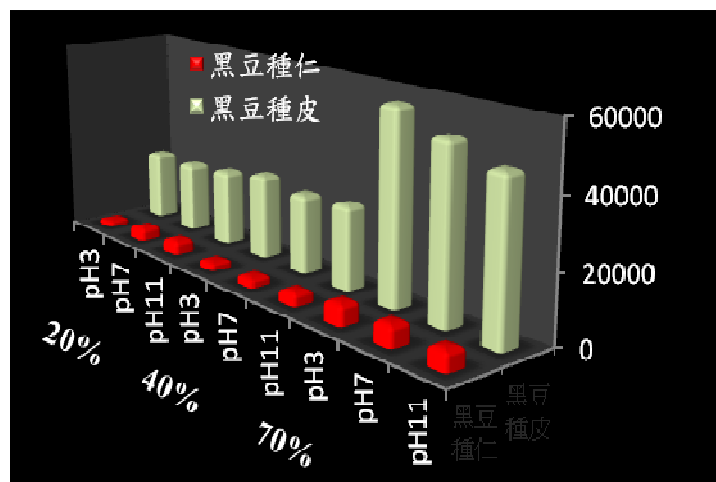


圖 1、不同濃度的乙醇萃取黑豆種皮及種仁的總多酚含量

圖 2 是以 70% 乙醇作為萃取液，各種顏色的豆類之種皮及種仁的總多酚含量。由圖 2，黑豆種皮的總多酚含量最高，是其他豆的種皮及種仁總多酚含量的十倍以上。種皮的總多酚量以黑豆為最高，其次為紅豆及綠豆，但紅豆及綠豆彼此差異不大，黃豆最少。種仁的總多酚的含量一般普遍不多，以黑豆種仁及黃豆種仁的含量為最。

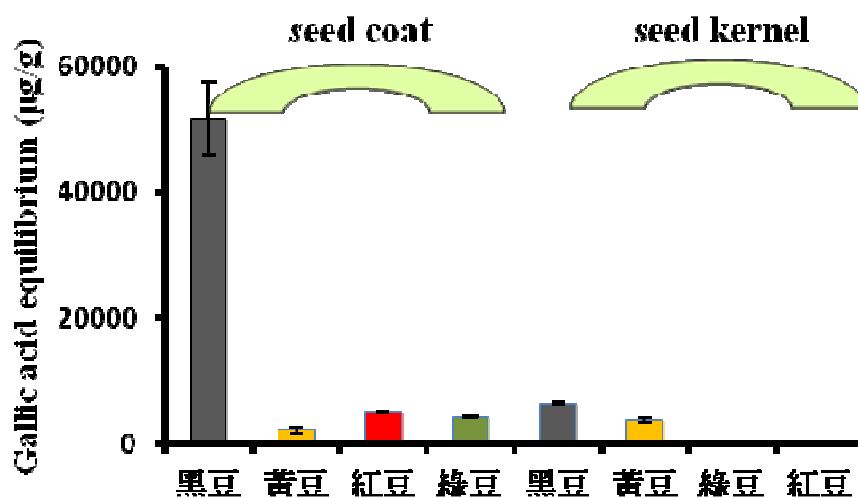


圖 2、各種豆的種仁與種皮的總多酚含量

圖 3.1 及圖 3.2 分別是各種豆類的種皮及種仁的還原力，吸光值越高，表示還原能力越強。將還原力的吸光值與各處理濃度作一比值，可算出斜率，斜率愈高，還原力愈強。表一是以斜率比較各處理的還原力，黑豆種皮的斜率可高於他種豆的 20 倍以上，遠高於他種豆的種仁及種皮。各種豆的種仁的斜率普遍為低，以黑豆種仁為最，黑豆種仁及黃豆種仁的斜率高於黃豆種皮。

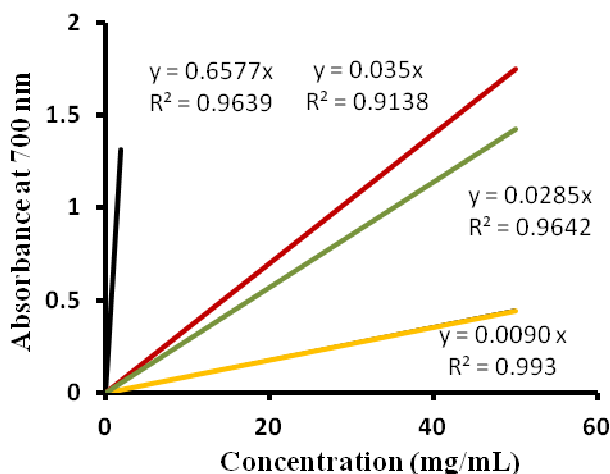


圖 3.1、各種豆的種皮還原力比較(—, —, —, — 分別代表黑豆、黃豆、紅豆及綠豆)

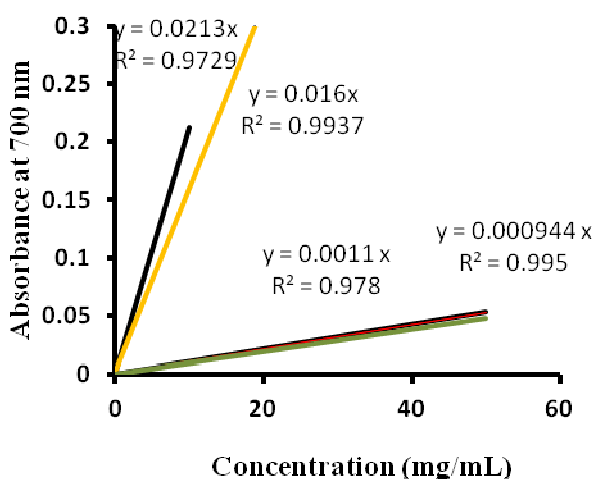


圖 3.2、各種豆的種仁還原力比較(—, —, —, — 分別代表黑豆、黃豆、紅豆及綠豆)

DPPH 是一穩定的自由基，清除 DPPH 自由基一半的濃度(IC_{50})表示清除 DPPH 自由基的能力， IC_{50} 的數值愈小，表示清除 DPPH 自由基能力愈高。黑豆種皮的 IC_{50} 為 1.24 mg/g，是所有的種皮及種仁最小者，綠豆種皮及紅豆種皮其次。種仁的 IC_{50} 普遍都高，黃豆種仁及黑豆種仁較黃豆種皮為小。本研究中，紅豆種仁及綠豆種仁無法偵測出其 IC_{50} 。

表 1、各種豆種皮與種仁的還原力比較

Treatments	黑豆種皮	黃豆種皮	紅豆種皮	綠豆種皮	黑豆種仁	黃豆種仁	紅豆種仁	綠豆種仁
Slope of calibrations	0.657±	0.008±	0.034±	0.028±	0.021±	0.016±	0.0011±	0.0009±
[Abs/Conc.]	0.075	0.0004	0.002	0.001	0.002	0.0006	0.0001	0.0001

表 2、各種豆的種皮及種仁的清除 DPPH 自由基能力

Treatments	黑豆種皮	黃豆種皮	綠豆種皮	紅豆種皮	黑豆種仁	黃豆種仁	紅豆種仁	綠豆種仁
IC ₅₀ (mg/g)	1.24±	260±	20.7±	16.4±	100±	91.1±	N.D.	N.D.
	0.07	9.89	3.39	0.10	21.9	12.0		

超氧歧化酶(SOD)，能催化超氧自由基轉為 H₂O₂ 及 O₂，進而清除細胞所產生的超氧自由基。各種豆的種皮及種仁的 SOD 活性如圖 4，黑豆種皮的 SOD 約為 9,195 (unit/g) 最高，其次是綠豆種皮的 2,164 (unit/g)，第三為紅豆種皮 779 (unit/g)，第四為綠豆種仁 632 (unit/g)，而黃豆種皮、黃豆種仁及黑豆種仁甚低。

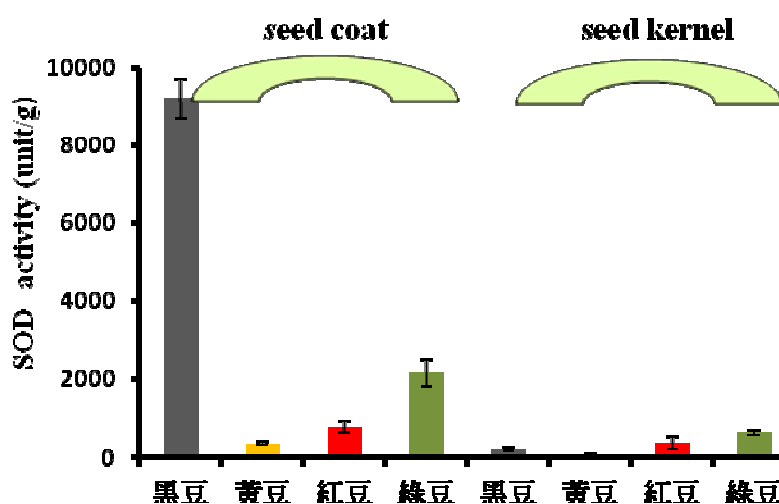


圖 4、各種豆的種皮超氧化歧解酶(SOD)的活性

討 論

以常見的不同顏色的四種豆類作為材料，劃分種皮及種仁探討其體外抗氧化的能力。本研究中，種仁的抗氧化能力，普遍低於種皮。黑豆、黃豆、紅豆及綠豆的種皮在萃取的條件下，黑豆種皮的總多酚、還原力、清除 DPPH 自由基及 SOD 活性都遠遠優於黃豆、紅豆及綠豆，可高於 20 倍以上。在種皮的抗氧化活性綜合評比下，綠豆種皮的抗氧化能力略優於紅豆種皮，而黃豆種皮最低。Xu 等人認為黑豆的抗氧化作用與其種皮所含的多酚和花青素類物質關係密切^[7]。

黑豆、黃豆、紅豆及綠豆是常見的豆類食物，此四種豆，以黑豆種皮最易溶於水，將黑豆置於手上，黑色或紫色即沾於手。以黑豆為原料的大宗產業，如製造醬油或蔭油的工廠，在製作過程中，以黑豆浸水、或以水煮黑豆，所排出的棕色液體是以廢棄物排出。以黑豆浸水洗滌及煮沸黑豆後入甕發酵成醬油的程序，這些廢

棄的水溶液可能含有黑豆種皮多酚。以某醬油廠的黑豆浸水液及黑豆煮水液的多酚類含量為例，黑豆浸水的溶液及煮沸後的黑豆水溶液的總多酚含量都高於8,000 μg GAE/mL，和數種市售的綠茶飲料比較，市售綠茶飲料總多酚含量在2,500-3,500 μg GAE/mL(未發表資料)。綠茶是富含天然的抗氧化劑^[17]，認為可抗癌和抗突變性，對心血管疾病的保護作用^[18]，黑豆浸水液或是黑豆煮水液和市售綠茶飲料相較之下，都是具有高抗氧化能力，而黑豆種皮的多酚類在對癌細胞的細胞生長週期的影響或在抗癌的研究，都值得進一步討論。

致 謝

本文非常感謝銘傳大學生物科技系的基金支持。並感謝銘傳大學生物科技系AA402研究室的林毓峰、呂偉嘉、游志昊、胡欣凱、張曲吟、黃祥格等同學的分析及協助。

參考文獻

- [1] 黃政弘、陳惠婷、涂瑞澤：三種SOD 活性測定法之比較。大葉學報1999，8:101-109。
- [2] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987, 107:526-545.
- [3] Zimmermann R, Flohe L, Weser U, Hartmann HJ: Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. *FEBS Lett* 1973, 29:117-120.
- [4] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H: Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004, 74: 2157-2184.
- [5] Yen GC, Chen HY: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1995, 43: 27-32.
- [6] 連大進：台灣黑豆的利用與生產展望。農業世界，1995，147：9-42。
- [7] Xu JR, Zhang MW, Liu XH, Liu ZX, Zhang RF, SunL, Qiu LJ: Correlation between

antioxidation and the content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions. *Agri Sci China* 2007, 6: 150-158.

[8] Takanori T, Kaoru S, Katsumi O, Shunro K, Toshihiko O: Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris*L. *Biochem Pharmacol* 1996,52:1033-1039.

[9] 徐金瑞、張名位、劉興華、張瑞芬、孫玲：黑大豆種皮花色苷體外抗氧化活性研究。營養學報，2007，29：54-57。

[10] Choung MG, Baek IY, Kang ST, Hang WY, Shin DC, Moon HP, Kang KH: Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 5848-5851.

[11] Duh PD, Yen WJ, Du PC, Yen GC: Antioxidant activity of mung bean hulls. *JAM Oil Chem Soc* 1997, 74: 1059-1063.

[12] Amarowicz R, Troszynska A, Barylko-Pikielna N, Shahidi F: Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *J Food Lipids*, 2004, 11: 278-286.

[13] Gahler S, Otto K, Bohm V: Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J Agric Food Chem* 2003, 51: 7962-7968.

[14] Oyaizu M: Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986, 44: 307-315.

[15] Hou WC, Lin RD, Cheng KT, Hung YT, Cho CH, Chen CH, Hwang SY, Lee MH: Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine* 2003, 10: 170-175.

[16] Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assays and an assay

applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971, 44: 276-287.

[17] Tanizawa H, Toda S, Sazuka Y, Taniyama T, Hayashi T, Arichi S, Takino Y: Natural antioxidants. I. Antioxidative components of tea leaf (*Thea sinensis* L.). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1984, 32: 2011-2014.

[18] Farhoosh R, Golmovahhed G, Mohammad HHK: Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chem* 2007, 100: 231-236.

In *Vitro* Radical Scavenging Activity of Seed Coat and Seed Kernel Ethanol Extracts of Legume

Hui-Chung Wu, Jr-Shiuan Wang, Fu-Chun Tsai, and Ji-Yuan Liang*

Department of Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, (Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

Adzuki beans, black soybeans, mung beans, and soybeans are the common Legume species of different colors. The seed coat and seed kernel of these beans were evaluated to compare their in vitro radical scavenging activity. The results show that the total polyphenols, reducing power, scavenging DPPH radical activity and SOD activity of seed coat of black soybeans are far superior to the seed coat of soybeans, mung beans, adzuki beans and all seed kernel. The antioxidant capacity is generally lower in the seed kernel comparing to the seed coat. The antioxidant activity of seed coat from different Legume species, seed coat of black soybeans has the highest antioxidant capacity. The seed coat of mung beans is slight better than the adzuki beans, and the soy beans showed the lowest antioxidant activity.

Keyword: Black soy beans, Seed coat, Seed kernel, Antioxidant activity

Corresponding author: Ji-Yuan Liang [liang121@mail.mcu.edu.tw]

Received 30 Nov 2012/Accepted 25 Jan 2013

MC-Transaction on Biotechnology, 2013, Vol. 5, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.