

大豆豆渣粗提物清除 DPPH 自由基活性及其协同效应的研究

葛飞^{1,2}, 桂琳³, 陶玉贵¹, 朱龙宝¹, 黄寅¹

(1. 安徽工程科技学院 生物化学工程系, 安徽 芜湖 241000; 2. 微生物发酵安徽省工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241000; 3. 皖南医学院 微生物和免疫学教研室, 安徽 芜湖 241000)

摘要:用二苯代苦味肼基自由基(DPPH)-TLC法和酶标仪法对大豆豆渣石油醚、乙酸乙酯、丙酮、乙醇粗提物的自由基清除活性进行了定性和定量分析,考察了抗氧化剂维生素C、柠檬酸对大豆豆渣乙醇粗提物清除DPPH自由基活性的协同效应。结果表明:大豆豆渣不同极性粗提物均有一定的自由基清除活性,其中乙醇粗提物的自由基清除活性最强,在浓度为 $10.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,于 37°C 下保温 15 min 时,对 $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DPPH自由基的清除率可达 76.48% ;维生素C和柠檬酸对大豆豆渣乙醇粗提物均能产生一定的协同效应,且维生素C的协同作用强于柠檬酸。

关键词:豆渣提取物;DPPH;抗氧化;协同作用

中图分类号:TS202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)01-0113-05

DPPH Radical Scavenging Activity of Extract from Soybean Residue and Coordination Effect

GE Fei^{1,2}, GUI Lin³, TAO Yu-gui¹, ZHU Long-bao¹, HUANG Yin¹

(1. Department of Biochemical Engineering, Anhui University of Science and Technology, Wuhu 241000; 2. Anhui Engineering Technology Research Center of Microbial Fermentation, Wuhu 241000; 3. Department of Microbiology and immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract:To study the DPPH radical scavenging activity of the extracts from soybean residue and the coordination effect with other antioxidants, DPPH-TLC and DPPH-Microplate assays were used to determine the free radical scavenging activities of the petroleum ether, ethyl acetate, acetone and ethanol extracts from soybean residue. The results revealed that these extracts all had free radical scavenging activities. The DPPH radical scavenging activity of the ethanol extracts was much higher than that of petroleum ether, ethyl acetate and acetone extracts. At concentration of $10.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the ethanol extract from soybean residue could reach 76.48% of $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DPPH radicals after incubating at 37°C for 15 minutes. At the same time, coordination of DPPH radical scavenging activity of the ethanol extract from soybean residue with Vc and citric acid was studied. Vc and citric acid could intensify DPPH radical scavenging activity of ethanol extract from soybean residue. Vc exhibited stronger synergistic effect than that of citric acid.

Key words: Extract from soybean residue; 1-Dphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Antioxidation effect; Coordination effect

我国是大豆主产国之一,而豆渣是大豆加工中的主要副产物,约占全豆干重的 $15\% \sim 20\%$,产量极为丰富,多用作饲料或肥料,甚至作为废物被丢弃,既污染环境又造成了资源的浪费^[1-3],因此进一步加大对大豆豆渣综合利用的研究有重要意义。

随着氧自由基和抗氧化剂理论和研究工作的深入,特别是在发现一些人工抗氧化剂存在毒性后,如

BHT、BHA及TBHQ对人体有较多的副作用^[4-5],天然抗氧化剂越来越受到人们的重视。豆渣中含有丰富的抗氧化活性物质,如黄酮、异黄酮、多肽、皂角苷、绿原酸等^[1],其抗氧化物质的安全性相对较高,因此具有进一步深度开发价值。

近年来,研究人员发现某些复合抗氧化剂的抗氧化活性高于各组分在添加浓度下的活性之和,即组分间存在协同作用^[6-7],目前协同作用已成为抗

收稿日期:2009-08-21

基金项目:安徽省高校自然科学基金资助项目(KJ2009B071);安徽工程科技学院引进人才科研启动基金资助项目(2007YQ005);芜湖市科技计划资助项目(2008505)。

第一作者简介:葛飞(1978-),男,博士,现主要从事微生物应用及其开发方面的研究。E-mail:gerrylin@126.com。

氧化剂研究领域中的热点之一。胡圣尧等对紫草籽中黄酮类化合物的抗氧化活性及其与常见抗氧化剂的协同效应进行了研究,发现超临界萃取后的紫草籽粗黄酮有一定的自由基清除能力,并与维生素 C、柠檬酸有一定的协同效应^[8];潘文洁等对咖啡渣提取物抗氧化性及其协同效应进行了研究,认为从咖啡渣中提取抗氧化性物质并与维生素 C 共同使用可替代 BHT^[9]。目前,对大豆豆渣的营养成分及其有效成分提取工艺方面的研究较多,但还未见对豆渣不同极性提取物清除 DPPH 自由基活性比较及其与常见抗氧化剂协同效应的报道。现采用二苯代苦味肼基自由基(DPPH) - TLC 法和 DPPH 酶标仪法对大豆豆渣不同极性提取物的自由基清除活性进行了定性和定量研究,并分析了自由基清除活性最强的豆渣乙醇粗提取物与维生素 C 和柠檬酸的协同效应,以期对豆渣提取物的进一步应用及天然抗氧化剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

豆渣:实验室自制;维生素 C、柠檬酸均为药品级,购于上海国药集团。

1.2 主要仪器和试剂

酶标仪(Tecan SUNRISE 瑞士产);旋转蒸发仪(SENCO R-501 上海产);电子天平(AE200 上海产);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-914385-M 上海产);二苯代苦味肼基自由基(DPPH),购自美国 Sigma 公司;硅胶 GF₂₅₄ 高效薄层铝板,购自德国 Merk 公司;其它试剂为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 豆渣粗提物的制备 将新鲜豆渣清洗干净后放入恒温鼓风干燥箱中 55℃ 烘干,再将豆渣粉碎,过 40 目筛后备用。取备用干豆渣分别置于 4 个平底烧瓶中,分别加入 10 倍体积的石油醚,乙酸乙酯,丙酮,乙醇,40℃ 下超声(功率 250 W,频率 33 kHz)提取 2 h。取出溶液减压蒸发,浓缩至浸膏状时,加入适量相应溶剂洗涤并用枪吸出,置于培养皿中。放通风厨中至干燥(或冷冻干燥)后,将豆渣

提取物分别用甲醇稀释成不同浓度进行清除 DPPH 自由基活性试验。

1.3.2 豆渣粗提物清除 DPPH 自由基活性测定 定性分析采用 DPPH-TLC 法:取 10 mg·mL⁻¹ 1.3.1 中提取物的甲醇溶液进行 DPPH 薄层层析实验,以 1.0 mg·mL⁻¹ 的抗坏血酸甲醇溶液为阳性对照。点样量为 4 μL,展开剂为氯仿:甲醇:水:乙酸 = 70:30:10:1(V/V)。等流动相到达距上沿 1 cm 时,取出挥去展开剂,然后喷浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 DPPH 95% 乙醇溶液进行显色,并用相机将色谱图拍照。

定量分析参考 Hu 等^[10] 的 DPPH 试剂酶标仪法:用移液器准确量取各浓度样品 100 μL 放入 96 孔酶标板中,同时加入预先用 95% 乙醇配好的 0.4 mg·mL⁻¹ 的 DPPH 试剂 100 μL。上述每个测试做 3 个重复,之后把 96 孔酶标板置于酶标仪中振动 30 s,在 517 nm 下保温前测定 1 次;于 37℃ 保温 15 min 后再测定 1 次。

$$\text{自由基相对清除率} = [1 - (A_p - A_c) / A_{max}] \times 100\%$$

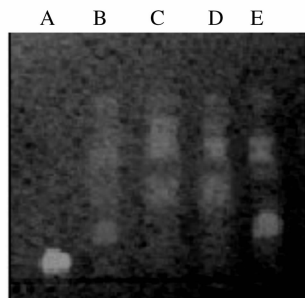
式中: A_p 为样品加入 DPPH 试剂的吸光度; A_c 为样品不加入 DPPH 试剂的吸光度; A_{max} 为 DPPH 试剂不加样品(以甲醇代替样品)的吸光度。

2 结果与分析

2.1 豆渣粗提物清除自由基活性的定性分析

豆渣不同极性粗提物清除 DPPH 自由基活性定性分析结果见图 1。A、B、C、D、E 样品点均有黄色斑点呈现(黑白图片中应为白色),这是因为 DPPH 为稳定的自由基,它能够强烈地吸收 517 nm 的光而呈紫色,当它与自由基清除剂反应时,其孤电子被配对,此时其吸收光发生蓝移而呈现黄色^[11],表明对应的大豆豆渣不同极性粗提物中均含有清除 DPPH 自由基的活性成分。

由图 1 可以看出,当用石油醚作为提取溶剂时,黄色斑点较弱,随着提取溶剂极性的增强,对应的薄层板上黄色斑点颜色也随之变深,表明豆渣中清除 DPPH 自由基的活性成分极性相对较强,不易被极性相对较低的石油醚提取出来,而较容易被极性相对较强的溶剂提取出来。



A: 维生素 C (阳性对照); B: 石油醚提取物; C: 乙酸乙酯提取物;
D: 丙酮提取物; E: 乙醇提取物

A: Vc (positive control) B: Petroleum ether extract C: Ethyl acetate extract D: Acetone extract E: Ethanol extract

图 1 豆渣不同极性溶剂提取物清除 DPPH 自由基活性 TLC 图谱

Fig. 1 TLC results of DPPH radical scavenging activity of four kinds of solvent extracts from soybean residue

表 1 不同极性溶剂豆渣粗提取物不同浓度对 DPPH 的相对清除率

Table 1 DPPH radical scavenging activities of four kinds of solvent extracts from soybean residue at different concentrations

样品浓度 Sample concentration/ mg · mL ⁻¹	自由基清除率 Scavenging rates/%							
	保温时间 Reaction time /0 min				保温时间 Reaction time /15 min			
	石油醚粗提取物 Petroleum ether extract	乙酸乙酯粗提取物 Ethyl acetate extract	丙酮粗提取物 Acetone extract	乙醇粗提取物 Ethanol extract	石油醚粗提取物 Petroleum ether extract	乙酸乙酯粗提取物 Ethyl acetate extract	丙酮粗提取物 Acetone extract	乙醇粗提取物 Ethanol extract
0.5	6.68	10.65	12.32	16.42	8.42	15.77	16.28	25.77
1.0	9.45	17.81	20.49	22.18	11.37	28.53	29.55	31.86
2.0	11.71	25.32	28.71	32.81	15.72	36.19	37.29	45.73
4.0	16.49	33.79	39.48	41.67	21.45	45.26	48.16	55.78
6.0	18.41	37.65	43.81	45.29	23.11	47.38	51.82	63.63
8.0	20.64	40.16	46.29	48.44	26.71	51.91	53.91	69.16
10.0	28.71	43.17	51.16	54.39	30.16	57.48	61.72	76.48

2.3 豆渣乙醇粗提取物、维生素 C 及柠檬酸对 DPPH 自由基清除能力的比较

当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂后,溶液颜色会变浅,在 517 nm 处吸光度变小,而吸光度变小程度与自由基被清除程度呈线性关系,因此,可用溶液吸光度的变化来检测自由基的消除情况,从而评价物质的抗氧化能力。其能力用清除率表示,清除率越大,抗氧化能力越强^[12]。

选择 DPPH 自由基清除能力较强的豆渣乙醇粗提取物与维生素 C、柠檬酸清除 DPPH 自由基能力进行比较。由图 2 可知,DPPH 自由基清除率随抗氧化剂浓度增加而增大,当清除率达到 90% 以上时,再加大浓度则清除率变化很小;豆渣乙醇粗提取物对

2.2 豆渣粗提取物清除自由基活性的定量分析

根据 DPPH 自由基的特性,选择波长 517 nm 作为检测波长,豆渣不同极性溶剂的粗提取物对 DPPH 自由基清除活性见表 1,不同极性粗提取物的不同浓度样品对 DPPH 自由基的清除能力不同,对 DPPH 自由基清除能力的大小顺序为乙醇粗提取物 > 丙酮粗提取物 > 乙酸乙酯粗提取物 > 石油醚粗提取物;随着样品浓度的递增,粗提取物对 DPPH 自由基清除活性均有所增强;当样品浓度一定时,反应(保温)15 min 后,自由基清除率有所提高。如样品浓度为 10.0 mg · mL⁻¹,于 37℃ 下保温 15 min 后,乙醇提取物对 0.4 mg · mL⁻¹ 的 DPPH 自由基的清除率由 54.39% 提高到 76.48%,提高了 40.6%,而石油醚、乙酸乙酯和丙酮提取物在同等条件下对 0.4 mg · mL⁻¹ 的 DPPH 自由基的清除率仅分别提高了 5.1%、33.1% 和 20.6%。

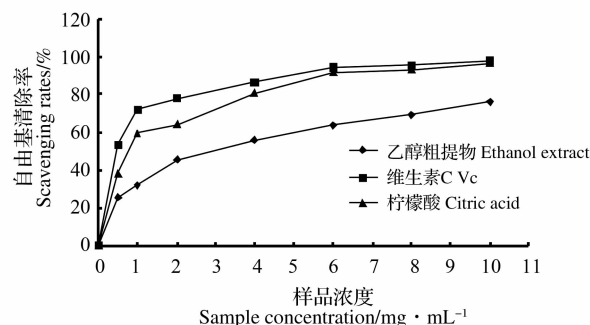


图 2 DPPH 自由基清除能力比较

Fig. 2 Comparision of DPPH scavenging effect
DPPH 自由基的清除能力明显低于同浓度的维生素 C 和柠檬酸。

2.4 维生素 C、柠檬酸的协同增效作用

采用常用的抗氧化增效剂维生素 C、柠檬酸与清除 DPPH 自由基活性最强的乙醇粗提物混合使用,考察其协同效应。由表 2 可知,乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸组成的混合物对 DPPH 自由基的清除率大于单个物质在对应添加浓度下清除率的代数,表明豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸均存在协同效应,相对而言,维生素 C 的增效优于柠檬酸。

在豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸组成的混合物系统中,维生素 C、柠檬酸在对应的浓度下对 DPPH 自由基的清除活性均高于豆渣乙醇粗提物,

在复合抗氧化剂中维生素 C、柠檬酸分别作为主抗氧化剂发挥作用,豆渣乙醇粗提物为次抗氧化剂。目前已有的研究表明在复合抗氧化剂中,次抗氧化剂可以再生具有强抗氧化性能的氧化剂,从而表现出抗氧化协同作用^[13-14]。豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸之间存在协同抗氧化效应,其机理可能为豆渣乙醇粗提物能使维生素 C、柠檬酸再生,使混合物溶液中主抗氧化剂的有效浓度得到增加,提高了抗氧化活性,其具体作用机理尚不清楚,有待进一步深入研究。

表 2 豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸的组合对 DPPH 自由基的清除作用

Table 2 DPPH radical scavenging activities of the ethanol extracts from soybean residue mixture with Vc and citric acid

豆渣乙醇粗提物 Ethanol extract from soybean residue /mg · mL ⁻¹	与维生素 C 组合 Mixture of ethanol extract and Vc			与柠檬酸组合 Mixture of extract and citric acid		
	维生素 C Vc/mg · mL ⁻¹	复合组分的清除率 Scavenging rates of the mixture/%	单一组分清除 率的代数 Summation of scavenging rates of single component/%	柠檬酸 Citric acid/ mg · mL ⁻¹	复合组分的清除率 Scavenging rates of the mixture/%	单一组分清除 率的代数 Summation of scavenging rates of single component/%
0.25	0	-	11.62	0	-	11.62
0.50	0	-	25.77	0	-	25.77
0	0.25	-	36.58	0.25	-	27.35
0	0.50	-	53.72	0.50	-	38.19
0.25	0.25	55.52	48.20	0.25	42.64	38.97
0.25	0.50	69.73	65.34	0.50	52.19	49.81
0.50	0.25	67.19	62.35	0.25	56.31	53.12
0.50	0.50	85.62	79.49	0.50	67.23	64.96

3 讨论

DPPH 是一个大分子的稳定自由基,抗氧化剂与其作用模式为:AH(抗氧化剂) + DPPH· → DP-PH—H + A·,清除活性与抗氧化剂分子中有效酚羟基的数目与新形成的抗氧化剂自由基(A·)的稳定性有关。由于大豆豆渣是含有黄酮类、醇类、酚类等具有各种官能团的各类化合物的混合物,可以推测,凡是能与自由基进行反应,使自由基形成稳定状态的成分都有可能起到清除 DPPH 自由基的作用。豆渣不同极性提取物的清除 DPPH 自由基活性应该是提取物中各组分清除活性的作用之和。豆渣中含有的清除自由基活性的黄酮类、醇类、酚类等物质均具有一定的极性,而试验所用的 4 种提取溶剂的极

性分别为极性较小的石油醚、极性中等的丙酮和乙酸乙酯、极性较大的乙醇,不同极性粗提物的清除 DPPH 自由基活性的大小为:乙醇粗提物 > 丙酮粗提物 > 乙酸乙酯粗提物 > 石油醚粗提物,所获结果符合相似相容原理。豆渣不同极性粗提物中含有多种成分,其纯化、构效关系及清除 DPPH 自由基加和作用的机理研究有待进一步探讨。

维生素 C、柠檬酸是常用的抗氧化增效剂,与多种抗氧化剂有协同氧化作用。结果表明,在清除 DPPH 自由基活性方面,大豆豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸均表现出较明显的协同抗氧化效应。在考察豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸清除 DPPH 自由基协同效果时,所选用的浓度是否为最佳浓度,尚需作进一步验证。

4 结论

大豆渣不同极性粗提物中均含有一定量的抗氧化活性成分,乙醇粗提物的 DPPH 自由基清除活性强于丙酮、乙酸乙酯、石油醚粗提物,且 DPPH 自由基清除能力随提取物反应时间、浓度的增大而增强。豆渣乙醇粗提物浓度达到 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保温 15 min 后,对 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 自由基的清除率为 76.48%,其 DPPH 自由基清除效果与 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 维生素 C (78.16%)、 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 柠檬酸(80.91%)相当。大豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸均具有一定的抗氧化协同效应,且维生素 C 的协同作用强于柠檬酸。豆渣乙醇粗提物与维生素 C、柠檬酸间存在协同抗氧化作用的机理可能为豆渣乙醇粗提物能使维生素 C、柠檬酸再生。

参考文献

- [1] 黄晓东,陈玲,胡华俊. 豆渣提取物抗氧化性能的研究[J]. 食品工业科技,2004,25(3):109-110. (Huang X D, Chen L, Hu H J. Study on the antioxidative of the extracts from soybean residue [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 25(3): 109-110.)
- [2] 张强,牟雪姣,周正义,等. 豆渣多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报,2007,22(5):49-52. (Zhang Q, Mu X J, Zhou Z Y, et al. Extraction and anti-oxidation activity evaluation of polysaccharide from soybean residue [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007, 22(5): 49-52.)
- [3] 何恩铭,齐香君,魏丽娜. 大豆渣中大豆异黄酮的提取工艺研究[J]. 西北农业学报,2006,15(4):160-162. (He E M, Qi X J, Wei L N. Research on extraction of soybean isoflavones from soybean residue [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2006, 15(4): 160-162.)
- [4] Gordon M H. Dietary antioxidants in disease prevention [J]. Natural Product Reports, 1996, 3(4): 265-273.
- [5] 黄晓东,李绍中,高新义. 豆渣提取物抗氧化稳定性的研究[J]. 中国调味品,2006(4):36-37. (Huang X D, Li S Z, Gao X Y. Study on the antioxidative stabilities of the extracts from soybean residue [J]. China Condiment, 2006(4): 36-37.)
- [6] 李兆陇,马兰萍,刘有成,等. β -胡萝卜素和 α -生育酚协同抗氧化作用的微环境效应[J]. 高等学校化学学报,1997,18(11):1814-1819. (Li Z L, Ma L P, Liu Y C, et al. Microenvironmental effect in the synergistic antioxidation of (-)-carotene and (-)-tocopherol [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 1997, 18(11): 1814-1819.)
- [7] Cedric T S, Andrew L W. Synergetic activity of catechin and other antioxidants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(11): 4491-4494.
- [8] 胡圣尧,聂志妍,宋聿文,等. 超临界萃取后紫草籽中黄酮类化合物的提取及其抗氧化性研究[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(2):100-103. (Hu S Y, Nie Z Y, Song Y W, et al. Extraction of flavonoids from Zicao seeds after SCF and its antioxidative activity [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutice, 2008, 29(2): 100-103.)
- [9] 潘文洁,黄晓东,张玲. 咖啡渣提取物抗氧化性及其协同效应的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(11):130-132. (Pan W J, Huang X D, Zhang L. Study on antioxidation of extracts from coffee residue and its coordination effect [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(11): 130-132.)
- [10] Hu F L, Karen S, Stefka S, et al. Free radical scavengers from the entomogenous deuteromycete *Beaveria amorpha* [J]. Planta Medica, 2002, 68: 64-65.
- [11] Cotelle N, Bernier J L, Catteau J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 20(1): 35-43.
- [12] 彭长连,陈少薇,林植芳,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658-661. (Peng C L, Chen S W and Lin Z F, et al. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH [J]. Prog. Biochem. Biophys., 2000, 27(6): 658-661.)
- [13] 翁新楚. 抗氧化剂及其抗氧化机制 [J]. 郑州粮食学院学报, 1993(3): 20-29. (Weng X C. Antioxidants and their antioxidation mechanism [J]. Journal of Zhengzhou Grain College, 1993(3): 20-29.)
- [14] 胡秀芳,沈生荣,朴宰日,等. 茶多酚抗氧化机理研究现状[J]. 茶叶科学,1999,19(2):93-103. (Hu X F, Shen S R, Park J I, et al. Review on antioxidative mechanism of tea polyphenols [J]. Journal of Tea Science, 1999, 19(2): 93-103.)