

大豆异黄酮的研究概况*

孙军明 丁安林 张艳

(中国农业科学院作物育种栽培研究所 北京 100081)

常汝镇

(中国农业科学院品种资源研究所 100081)

GENERAL REVIEW IN THE STUDY OF THE SOYBEAN ISOFLAVONES

Sun Junming Ding Anlin Zhang Yan

(*Institute of Crop Breeding and Cultivation CAAS 100081*)

Chang Ruzhen

(*Institute of Crop Germplasm Resource CAAS 100081*)

由于大豆富含蛋白质和油脂,因此大豆产品作为营养而经济的传统食品在我国已有悠久的历史,如豆腐、豆酱、豆奶等,但大豆因含有胰蛋白酶抑制因子(trypsin inhibitor)和脂氧酶(Lipoxygenase),而使大豆制品的营养价值和风味大大降低。我国已育成了不含Kunitz胰蛋白酶抑制因子(SBTI-A₂)的大豆品系(丁安林等1990),脂氧酶也可经杂交和 γ 射线诱变育种而完全去除(Hajika等1991)。而异黄酮和皂甙(Saponin)产生的苦味和收敛性使大豆制品具有不愉快的后味,虽然经大豆脱胚轴处理,使皂甙大部去除,但种子中异黄酮的存在使豆制品的后味犹存。(Okubo等1983)因此可以认为异黄酮是产生豆制品

* 本文于1994年7月25日收到。

This paper was received on July 25, 1994.

后味的重要化学物质。

我国大豆资源相当丰富,有春夏秋豆,可以预测,经分析会鉴定出异黄酮含量很低或很高的大豆品种,通过育种等途径培育出不同含量的大豆品系,根据不同的目的分别加以利用。大豆异黄酮国外早有研究,Walz(1931)用 90% 甲醇从豆奶中提取出大豆异黄酮糖苷:5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(genistin)并发现其能被盐酸水解成 1 分子的染料木因(genistein)和 1 分子的葡萄糖(glucose),以后国外陆续有报道,现将有关异黄酮研究概况介绍如下:

一、大豆异黄酮化合物的组成及结构式:

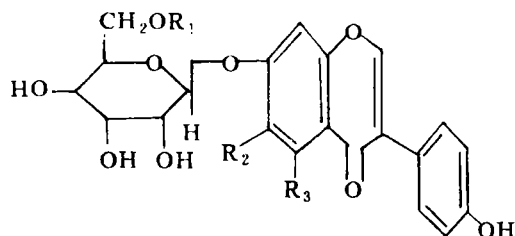
Kudou 等(1991)已从大豆胚轴中分离出 9 种异黄酮糖苷和 3 种相应的配糖体,并用 UV,MS, ^{13}C 和 ^1H -NMR 光谱分析确定了此化合物组分的结构式。(见表 1)

(一)九种异黄酮糖苷分别为:

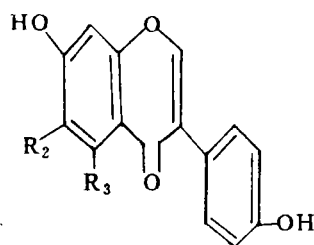
1. 7,4'-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(daidzin);
 2. 5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(genistin)(Walz 1931 和 Walter, 1941);
 3. 7,4'-二羟基-6-甲氧基异黄酮-7-葡萄糖苷(glycitin)(Naim 等, 1973);
 4. 6"-0-乙酰基-5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(6"-0-acetylgenistin);
 5. 6"-0-乙酰基-7,4'-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(6"-0-acetyldaidzin)(Ohta 等, 1979);
 6. 6"-0-乙酰基-7,4'-二羟基-6-甲氧基异黄酮-7-葡萄糖苷(6"-0-acetylglycitin);
 7. 6"-0-丙二酰-7,4'-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(6"-0-malonyl daidzin);
 8. 6"-0-丙二酰-7,4'-二羟基-6-甲氧基异黄酮-7-葡萄糖苷(6"-0-malonylglycitin);
 9. 6"-0-丙二酰-5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(6"-0-malonylgenistin)
- (Kudou 等 1991)

(二)三种配糖体分别为:

1. 黄豆苷原(daidzein)
2. 染料木因(genistein)
3. 7,4'-二羟基-6-甲氧基异黄酮(glycitein)



(1)大豆异黄酮葡萄糖苷结构式



(2)大豆异黄酮(配糖体)结构式

表1 大豆异黄酮化合物的结构式

化合物		R1	R2	R3
异黄酮葡萄糖苷结构式	1 Daidzin	H	H	H
	2 Glycitin	H	OCH ₃	H
	3 Genistin	H	H	OH
	4 6"-O—Malonyl daidzin	COCH ₂ COOH	H	H
	5 6"-O—Malonyl genistin	COCH ₂ COOH	OCH ₃	H
	6 6"-O—Malonyl genistin	COCH ₂ COOH	H	OH
	7 6"-O—Acetyl daidzin	COCH ₃	H	H
	8 6"-O—Acetyl glycitin	COCH ₃	OCH ₃	H
	9 6"-O—Acetyl genistin	COCH ₃	H	OH
配糖体	10 Daidzein	—	H	H
	11 Glycitein	—	OCH ₃	H
	12 Genistein	—	H	OH

注:(1)1—9,(2)10—12;

二、大豆异黄酮的特性与作用

(一)大豆异黄酮特性

1. 大豆异黄酮化合物具有苦味,收敛性和干涩感觉。

Huang(1981)指出大豆异黄酮化合物与豆制品的不愉快风味:苦味和收敛性有关。且大豆异黄酮配糖体比其糖苷化合物具有更强的不愉快风味,主要指的是 daidzein 和 genistein(Okubo 等 1983), Matsuura 等(1989)还指出豆制品的不愉快风味的产生与其浸泡水的温度和 pH 值具有很大的相关性,在 50℃pH=6 的条件下产生的异黄酮化合物最多,且在 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)作用下有大量 daidzein 和 genistein 产生,使豆制品的苦味增强。他们还发现在低温和加入葡萄糖- δ -内酯可明显抑制 β -葡萄糖苷酶的活性,使 daidzein 和 genistein 产生减少。

2. Kudou 等(1991)研究发现大豆种子中三种丙二酰基异黄酮葡萄糖苷具有热不稳定性。在加热情况下能转化成相应的异黄酮糖苷。异黄酮葡萄糖苷又能被酸水解成 1 分子的异黄酮和 1 分子的葡萄糖(见表 3)。在 80℃条件下丙二酰基异黄酮葡萄糖苷大部分转化成相应的异黄酮葡萄糖苷。

(二)大豆异黄酮的作用

1. 大豆异黄酮在食品加工中的作用:大豆异黄酮化合物具有苦味和收敛性,如果其含量过高,可对大豆加工食品如豆奶、豆腐等产生一定的不愉快的后味(aftertaste),因此在加工过程中必须去除。

2. 大豆异黄酮的生理生化方面的作用

(1)大豆异黄酮具生物活性,大豆异黄酮是大豆根瘤菌结瘤基因(*Bradyrhizobium japonicum nod*)的诱导物质(Kosslak 1987),并且还是大豆组织对疫霉根腐病菌(*Phytophthora megasperma*)侵染的反应物质(Graham 等 1990)。

(2)大豆异黄酮又具有抗肿瘤活性,主要指的是 genistein 和 daidzein 及他们的 β -葡萄糖苷复合体。Coward 等(1993)指出大豆制品中含有的异黄酮化合物(genistein 和 daidzein)对预防乳腺肿瘤,抑制肿瘤细胞活性具有很重要的作用。

(3)大豆异黄酮具有抗真菌(antifungal)活性,0.005%的自由异黄酮含量就可抑制真菌活性,而当异黄酮浓度超过 0.1%时,却没有显著增强作用(Naim 等 1974)。

(4)大豆异黄酮还具有其他作用,如抗溶血(antiheamolytic),抗氧化(antioxidant)(Naim 等 1976),雌激素(Oestrogenic)(Farmakalidis 等 1985)等作用,但其生理机制还有待进一步研究。

(三)大豆异黄酮的阈值(Threshold value)

1. 大豆异黄酮的阈值指的是此化合物的风味直接为味觉所能辨认的最低浓度。Kudou 等(1991)测验了异黄酮化合物各组分的阈值。(见表 2)

表 2 大豆种子异黄酮阈值

	阈值(mM)					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Daidzein			●			
Daidzin		●				
6''-O--Acetyldaidzin			●			
6''-O--Maonyldaidzin				●		
Glycitein				●		
Glycitin			●			
6''-O--Acetylglycitin					●	
6''-O--Malonylglycitin					●	
Genistein		●				
Genistin	●					
6''-O--Acetylgenistin		●				
6''-O--Malonylgenistin		●				

2. 阈值的测量方法:

对每份样品洗脱液(10^{-1} mM),每次稀释 10 倍至最后浓度为 10^{-7} mM 为止。然后首先用 10^{-7} mM 浓度的样品洗脱液检验,直到检测小组成员检验出样品的气味为止,此时化合物的浓度即为其阈值。任何样品的浓度必须大于其阈值才能为人们直接辨认出来。(Kudou 等 1991)

(1)对 daidzin 及其相关化合物阈值进行顺序排列:

daidzin>daidzein=acetyldaidzin>malonyl daidzin

(2)对 glycitin 和 genistin 相关化合物顺序排列:

glycoside>aglycone \geq 6''-O--acetylglycoside (Kudou 等 1991)

三、大豆异黄酮在植物体中的分布

表 3 大豆种子中异黄酮的含量 (mg/100g)*

化合物	室温 24hr 提取		80℃ 15hr 提取	
	胚轴	子叶	胚轴	子叶
Daidzin	320	45	838	145
Glycitin	485	—	1004	—
Genistin	118	80	246	210
6"-O—Malonyl daidzin	423	70	8	3
6"-O—Malonyl glycitin	445	—	11	—
6"-O—Malonyl genistin	144	117	4	—
6"-O—Acetyl daidzin	2	2	57	8
6"-O—Acetyl glycitin	6	—	89	—
6"-O—Acetyl genistin	105	1	39	1
Daidzein	102	53	35	11
Glycitein	—	—	15	—
Genistin	35	48	16	14
总量	2185	396	2362	392

* 品种: Suzuyutaka

1. Kudou 等(1991)报道在成熟的大豆种子中特别是下胚轴(包括胚根和胚芽)中异黄酮含量相当丰富,而在其子叶中含量即很低,到种皮中含量就更少了(见表 3)。

2. 在未成熟的大豆种子中随着种子的发育其总的异黄酮含量逐渐升高,特别是 6"-O—malonylgenistin 和 genistin 的含量升高特别快,且到成熟后种子中 malonylgenistin 和 malonyldaidzin 二者含量占整个异黄酮含量的 66%。Naim(1974)还指出大豆异黄酮含量的 99%是葡萄糖苷类。

3. 大豆异黄酮在植物体的不同部位含量差异显著。在嫩叶中异黄酮含量是低的,在老叶中也没有特殊的积累(Morris 等 1991),而在根部特别是根尖中主要含有 daidzein 及其复合体,且光线对根部异黄酮分布有一定影响,黑暗中根尖的异黄酮含量有很大减少,而在子叶中却有所升高(Graham 等 1991)。

4. 在不同的大豆栽培品种中异黄酮也具有不同的含量。喜多村(1991)指出在一些早熟品种“夏大豆”(相当于我国的春播大豆)中异黄酮含量很低,而在一些中熟/晚熟品种中异黄酮含量接近正常水平(Kitamura 等 1991)。

四、大豆异黄酮的提取,检测及其含量计算

(一)大豆异黄酮的提取:

研磨的大豆粉在分析天平上称取 100mg,放入试管中,加入 80%乙醇若干毫升,在室温下提取 1—2hr 左右,离心或过滤后取上清液用于检测。

(二)大豆异黄酮的检测:

1. 利用高压液相色谱(HPLC)检测

含有异黄酮的样品经有机溶剂提取后直接注入反相化学键合体系,按 C 数多少,从柱中流出经紫外检测器测定,而与标准比较定性定量。

2. 方法:

取上清液 10 μ l 注入仪器内。色谱柱为 C18 柱,用乙腈作为流动相,254nm 波长的紫外下检测 30 分钟左右,得出异黄酮不同组分的峰高和峰面积。

3. 计算:

(1)根据标样 Daidzin 和 Genistin 的保留时间定性。

(2)根据标准峰高和峰面积确定样品中异黄酮的含量^{[2][12]}。

五、大豆异黄酮的研究与利用前景

(一)大豆异黄酮后味特性(苦味和收敛性)的改善,可以通过育种等途径培育出异黄酮低含量的大豆新品种。喜多村等已研究出某些春播大豆中异黄酮低含量,可以由此进一步研究异黄酮的生成机理,利用我国丰富的大豆资源,培育出我国低含量或高含量的大豆新品种。

(二)由于异黄酮在植株中同样含有,且具有生物生化活性,可以利用异黄酮抑菌作用,培育抗病植株,增加大豆植株抗病性,减少农药的使用量,提高经济效益。

(三)利用异黄酮的抗肿瘤作用,应用高含量异黄酮的大豆品种研制出抗癌防癌食品或药物,减少癌症的发病率。

(四)由于豆油中不含异黄酮,且异黄酮具有抗氧化作用,是否可以向豆油中加入一定量的异黄酮防止油脂氧化,起到天然的抗氧化剂作用。

(五)利用异黄酮的抗溶血作用和雌激素作用可生产出某种药品。

(六)对于异黄酮的生理作用还不太清楚,有待进一步深入研究。

初步分析表明,我国丰富的大豆资源中有含量很低的品种,也有含量丰富的品种,可分别不同用途筛选和选育含量低或高的品种,使其发挥各自的作用。

参考文献

- [1] 丁安林等,1990,不含 SBT1-A₂ 的基因导入我国大豆的遗传表达,作物学报 16(1)26—31
- [2] 韩雅珊,1992,食品化学实验指导,北京农业大学出版社
- [3] Coward, L.; Barnes, N. C.; Setchell, K. D. R.; Barnes, S.; 1993 Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J. Agric. Food Chem. 41, 1961—1967
- [4] Farmakalidis, E.; Hathcock, J. N.; Murphy, P. A. 1985 Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. Food Chem. Toxic. 23:741—745
- [5] Graham, T. L.; 1991 Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. Plant Physiol. 95. 594—603
- [6] Graham, T. L.; Kim, J. E.; Graham, M. Y. 1990 Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. Mol. Plant Microbe Interact. 3; 157—166
- [7] Hajika, M.; Igita, K.; Kitamura, K. 1991. A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) MERRILL) induced by gamma-ray irradiation. Japan, J. Breed, 41; 3, 507—509
- [8] Huang, A.; Hsieh, O. A. L.; Chang, S. S. 1981. Characterization of the nonvolatile minor constituents responsible for the objectionable taste of defatted soybean flour. J. of Food Sci. 47; 19—23

- [9] Kudou S; Fleury, Y; Welti, D.; Magnolato, D; Vchida, T; Kitamura, K; Okubo, K; 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL) Agric. Biol. Chem. 55(9), 2227—2233
- [10] Kudou, S; Shimoyamada, M; Imura, T; Vchida, T; Okubo, K. 1991. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL) glycitein —7—0— β -D—(6"-0—Acetyl)—glucopyranoside, Agric. Biol. Chem. 55(3), 859—860
- [11] Kosslak, R. M; Bookland, R; Barkei, T; Paaren, H. E; Appelbaum, E. R. 1987 Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84; 7428—7432
- [12] Kitamura, K; Igita, K; Kikuchi, A; Kudou, S; Okubo, K; 1991. Low isoflavone content in some early maturing cultivars socalled "Summer—type soybeans" (*Glycine max* (L.) MERRILL) Japan, J. Breed. 41, 4, 651—654
- [13] Matsuura, M; Obata, A; Fukushima, D. 1989. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control J. Food, Sci. 54, 602—605
- [14] Morris, P. F; Savard, M. E; Ward, E. W. B. 1991. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to Physiological and Molecular Plant Pathology. 39, 3, 229—244
- [15] Naim, M.; Gestetner, B; Zilkah, S.; Birk, Y.; Bondi, a. 1974. Soybean isoflavones characterization, determination, and antifungal activity. J. Agri. Food Chem. 22(5) 806—810
- [16] Naim, M. Gestetner, I; Birk, Y; Bondi, A; 1973 A new isoflavone from soya beans. Phytochemistry 12; 169—170
- [17] Ohta, N; Kuwata, G; Akahori, H; Watanabe, T; 1979 Isoflavonoid Constituents of soy beans and isolation of a new Acetyldaidzin. Agric. Biol. Chem. 43(7), 1415—1419
- [18] Okubo, K; Kobayashi, Y.; Takahashi, K; 1983 Improvement of soy milk and tofu process on the behavior of undesirable taste component such as glycosides. Up—to —Date Food Processing 18; 16—22 (in Japanese)
- [19] Walter, E, D; 1941 Genistin (an isoflavone glucoside) and its Aglucone, Genistein, from soybeans. J. Amer. Chem. Soc. 63; 3273—3276
- [20] Walz, E. 1931 Isoflavone and saponin—glucoside in soja hispida. Ann, Chem. 489, 118—155