

# 大豆异黄酮甙元抗脂质过氧化作用的研究

金 明,李 天,刘淑萍,全吉淑

(延边大学 医学部,吉林 延吉 133000)

**摘 要:**从大豆提取大豆异黄酮糖甙,再将其部分水解成其甙元,研究其体外抗氧化能力。用 T-AOC 方法测定化学模拟体系中的总抗氧化能力,用八木变法测定过氧化脂质(LOOH)含量,用硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)含量,用分光光度法测定红细胞溶血和肝线粒体膨胀程度。结果表明:大豆异黄酮甙元的体外总抗氧化能力较强,可抑制血浆及肝组织脂质过氧化,减少红细胞溶血和减轻肝线粒体膨胀程度。说明大豆异黄酮甙元具有抗脂质过氧化作用。

**关键词:**大豆;异黄酮;甙元;体外;脂质过氧化

**中图分类号:**R151.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)05-0909-04

## Anti-lipid Peroxidative Effect of Soybean Isoflavone Aglycones

JIN Ming, LI Tian, LIU Shu-ping, QUAN Ji-shu

(Health Science Center of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

**Abstract:** Soybean isoflavone glycosides were extracted from soybean hypocotyl, then isoflavone aglycones were prepared by hydrolysis of isoflavone glycosides and their antioxidative effects were investigated *in vitro*. The total antioxidant activity was detected by T-AOC method, the content of LOOH (lipid hydroperoxide) was measured by Yagi's method, the content of MDA (malonyldialdehyde) was measured by TBA (thiobarbituric acid) assay, the hemolysis of erythrocytes and the swelling of liver mitochondria were detected by spectrophotometric method. The result showed that soybean isoflavone aglycones exerted the high total antioxidative activities *in vitro*, inhibited the lipid peroxidation in plasma and liver, reduced the hemolysis of erythrocytes and suppressed the swelling of mitochondria. It is suggested that soybean isoflavone aglycones have the anti-lipid peroxidative effects.

**Key words:** Soybean; Isoflavones; Aglycones; *in vitro*; Lipid peroxidation

大豆是人类的重要食物资源,大豆异黄酮是其主要功能成分之一,具有防治癌症、降低血脂、防止动脉粥样硬化、抗氧化、预防骨质疏松和改善妇女更年期综合症等多种生理功能<sup>[1]</sup>。目前发现的大豆异黄酮共有 12 种,分为游离型的甙元(大豆甙元 daidzein、染料木酮 genistein、黄豆甙元 glycitein)和相应的糖甙(大豆甙 daidzin、染料木甙 genistin、黄豆甙 glycitin 以及它们的丙二酰化形式和乙酰化形式)<sup>[2]</sup>。近年来,大豆异黄酮的抗癌研究成为热点,有报道开始探索大豆异黄酮的抗氧化作用,发现大豆异黄酮具有清除氧自由基能力,能阻抑低密度脂蛋白的氧化修饰作用<sup>[1,3-4]</sup>。但大豆异黄酮甙元对血及肝脏抗氧化活性的干预研究报道甚少。以大豆胚轴提取大豆异黄酮糖甙为原料,经水解得异黄酮

甙元,研究其在体外对血液及肝脏抗脂质过氧化能力的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料和试剂

大豆为中国东北产大豆。丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,过氧化脂质(LOOH)检测试剂盒购自日本协和公司,其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 仪器设备

YAMATO GA32 型喷雾干燥机、IWAKI REN-1 型旋转蒸发仪、EYELA FDU-830 型冷冻干燥仪、HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪、HITACHI himac cp 100α 超速离心机 and RT-2100 型酶标仪。

收稿日期:2009-04-25

基金项目:吉林省科技发展计划资助项目(200705428);国家自然科学基金资助项目(30360113)。

作者简介:金明(1972-),女,副教授,研究方向为天然活性物质的药理作用研究。E-mail:jinming@ybu.edu.cn。

1.3 方法

1.3.1 大豆异黄酮的提取及其水解 将大豆胚轴用50%甲醇常温提取,提取液经喷雾干燥得粗粉。将粗粉用正丁醇萃取,得富含大豆异黄酮糖甙和皂甙试样。将其用30%甲醇溶解,上C<sub>18</sub>层析柱,用甲醇梯度洗脱,收集丙二酰大豆异黄酮糖甙。将其酸解4 h,得大豆异黄酮甙元<sup>[5]</sup>,纯度为80%,其中染料木黄酮、大豆甙元和黄豆甙元之比值为5:4:1。

1.3.2 动物及动物样品的处理<sup>[6]</sup> 家兔用乙醚麻醉,经颈动脉取血,肝素抗凝,分离血浆,4℃保存以备用。将红细胞制成0.5%红细胞悬浮液,4℃保存以备用。将兔肝制成10.0%肝匀浆悬浮液,以3 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,合并上清液,然后以10 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,沉淀用10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液配成含蛋白质0.5 g·L<sup>-1</sup>的线粒体悬液,4℃保存以备用。

1.3.3 总抗氧化能力的测定<sup>[7]</sup> 操作方法根据总抗氧化能力试剂盒说明书。每分钟每毫升抗氧化物质使反应体系得吸光度值每增加0.01时,定义为一个总抗氧化能力单位(U)。

1.3.4 对Cu<sup>2+</sup>诱导的血浆脂质过氧化作用的影响 取1 mL血浆,药物组加大豆异黄酮甙元0.1 mL和0.1 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 0.1 mL,37℃温浴6 h。取0.1 mL反应液按试剂盒说明书测定LOOH,并计算抑制率。剩余反应液中加入15%三氯乙酸(TCA)1 mL终止反应后,加0.67%硫代巴比妥酸(TBA)1 mL,于沸水浴中显色15 min,冷却后离心,于532 nm测上清液吸光值,测定MDA生成量并计算抑制率(IR)。抑制率计算公式为:

$$IR(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.3.5 对红细胞氧化溶血抑制作用的影响<sup>[8]</sup> 取0.5%红细胞悬液1 mL,加入大豆异黄酮甙元0.1 mL,37℃温浴24 h后,加生理盐水稀释3倍,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液于415 nm处测定吸光度,以对照组为100%溶血,计算溶血度(HD)和抑制率。

$$HD(\%) = A_{\text{测定}} / A_{\text{对照}} \times 100\%;$$
$$IR(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%;$$

另取0.5%红细胞悬液1 mL,加入大豆异黄酮甙元0.1 mL,加入60 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mL启动反应,37℃温浴1 h后,加生理盐水稀释3倍,离心,测定上清液吸光度A<sub>415 nm</sub>,计算溶血度和抑制率。

1.3.6 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的肝匀浆脂质过氧化的影

响<sup>[8]</sup> 取1 mL肝匀浆液,加入大豆异黄酮甙元0.1 mL,再加入0.1 mL 60 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在37℃温浴1 h后,加入15% TCA 1 mL终止反应。按TBA法(参见1.3.4)测定MDA生成量并计算抑制率。

1.3.7 对肝线粒体肿胀度的影响<sup>[8]</sup> 取新鲜肝线粒体悬液1 mL,加入大豆异黄酮甙元0.1 mL、0.1 mmol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> 0.1 mL和1 mmol·L<sup>-1</sup> 抗坏血酸(VC)0.1 mL,在520 nm处测吸光值,每隔10 min测1次,观察吸光值下降的程度。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮甙元的总抗氧化能力

从图1中可以看到大豆异黄酮甙元的总抗氧化能力较强,以100 mg·L<sup>-1</sup> VC为对照考察了大豆异黄酮甙元的总抗氧化能力,相同浓度大豆异黄酮甙元的总抗氧化能力为9.0 U,是等浓度VC总抗氧化能力的2.5倍,说明大豆异黄酮甙元具有较强总抗氧化能力。

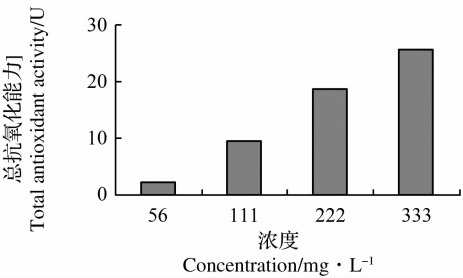


图1 大豆异黄酮甙元的总抗氧化能力  
Fig.1 Total antioxidant activities of soybean isoflavone aglycones

2.2 大豆异黄酮甙元对Cu<sup>2+</sup>诱导的血浆脂质过氧化的抑制作用

LOOH代表血浆脂蛋白中脂质过氧化物的含量,MDA则是脂质过氧化物的分解产物,二者含量常常反映机体细胞脂质过氧化程度,也间接反映血浆成分受自由基攻击的严重程度。由表1可见,经Cu<sup>2+</sup>诱导后,模型组MDA和LOOH含量均明显增高,而药物组MDA和LOOH生成量明显减少,说明大豆异黄酮甙元可抑制血浆脂质过氧化作用,且抑制作用随浓度的增高而增强,呈良好的剂量效应关系。

2.3 大豆异黄酮甙元对红细胞氧化溶血的抑制作用

红细胞经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱发后模型对照组吸光值增加,

由正常组的0.078增至0.898,说明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以氧化红细胞膜。如表2所示,药物组溶血度显著低于模型对照组,表明大豆异黄酮甙元可抑制红细胞的氧化损伤,保护红细胞膜,且溶血度随异黄酮浓度的增高而降低。同时,大豆异黄酮甙元还可抑制红细胞的自发性氧化损伤,溶血度随异黄酮浓度的增加而降低,呈显著的量效关系。

表1 大豆异黄酮甙元对Cu<sup>2+</sup>诱导的血浆脂质过氧化的影响  
Table 1 Effects of soybean isoflavone aglycones on lipid peroxidation of plasma induced by Cu<sup>2+</sup>

| 组别<br>Group     | 浓度<br>Concentration<br>/mg · L <sup>-1</sup> | MDA<br>/μmol · L <sup>-1</sup> | 抑制率 IR<br>/% | LOOH<br>/μmol · L <sup>-1</sup> | 抑制率<br>IR/% |
|-----------------|--|--------------------------------|--------------|---------------------------------|-------------|
| 模型组<br>Model    | -  | 15.4                           | -            | 34.1                            | -           |
| 正常组<br>Control  | -  | 4.9                            | -            | 17.3                            | -           |
| 甙元组<br>Aglycone | 42   | 14.3                           | 10.5         | 24.8                            | 55.4        |
|                 | 83   | 12.9                           | 23.8         | 22.4                            | 69.6        |
|                 | 167  | 12.0                           | 32.4         | 20.8                            | 79.2        |
|                 | 333  | 8.6                            | 64.8         | 17.9                            | 96.4        |

2.4 大豆异黄酮甙元对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱发的肝组织脂质过氧化的抑制作用

MDA反映机体细胞脂质过氧化程度,也间接反映细胞受自由基攻击的严重程度。与正常肝匀浆相比,诱导组(模型组)MDA生成量增加,说明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>促使肝组织脂质过氧化反应。由图2可以看出,大豆异黄酮甙元组肝匀浆MDA生成的抑制率随浓度的增加而增高,呈良好的量效关系。表明大豆异黄酮甙元可抑制肝匀浆脂质过氧化作用。

表2 大豆异黄酮甙元对红细胞氧化溶血的影响  
Table 2 Effects of soybean isoflavone aglycones on hemolysis of erythrocytes

| 组别<br>Group     | 浓度<br>Concentration<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 自发性溶血<br>Auto-hemolysis |      | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 诱导溶血<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced hemolysis |      |
|-----------------|--|-------------------------|------|--|------|
|                 |  | 溶血度                     | 抑制率  | 溶血度  | 抑制率  |
|                 |  | HD/%                    | IR/% | HD/%   | IR/% |
| 甙元组<br>Aglycone | 42   | 45.2                    | 54.8 | 83.7   | 17.8 |
|                 | 83   | 33.2                    | 66.8 | 71.8   | 30.9 |
|                 | 167  | 27.7                    | 72.3 | 50.7   | 54.0 |
|                 | 333  | 20.0                    | 80.0 | 36.6   | 69.4 |

2.5 大豆异黄酮甙元对VC + Fe<sup>2+</sup>诱导的肝线粒体肿胀的影响

线粒体因脂质过氧化而使膜的通透性增加,引

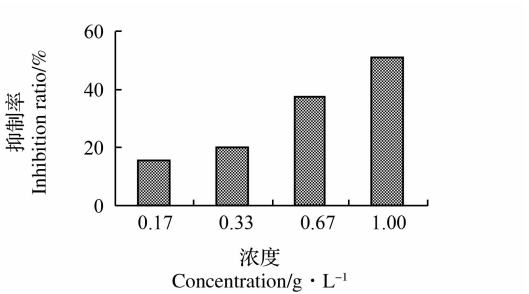


图2 大豆异黄酮甙元对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的肝匀浆脂质过氧化的影响  
Fig. 2 Effects of soybean isoflavone aglycones on lipid peroxidation of liver homogenate induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

起膜内外物质交换,导致线粒体肿胀的发生,线粒体越肿胀,A<sub>520nm</sub>值下降幅度越大。由图3可见,VC + Fe<sup>2+</sup>诱导的线粒体A<sub>520nm</sub>比非诱导的正常组A<sub>520nm</sub>下降幅度大,说明VC + Fe<sup>2+</sup>诱导产生的羟自由基,加速了线粒体膜的氧化损伤,致使肿胀严重。与VC + Fe<sup>2+</sup>诱导组相比,0.67 g · L<sup>-1</sup>大豆异黄酮甙元均明显降低了VC + Fe<sup>2+</sup>诱导的线粒体A<sub>520nm</sub>下降幅度,说明大豆异黄酮甙元能抑制或减弱自由基所导致的氧化损伤,从而阻止线粒体膜的脂质过氧化。

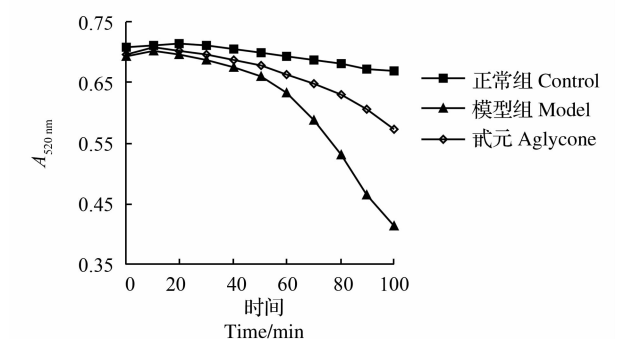


图3 大豆异黄酮甙元对VC + Fe<sup>2+</sup>诱导的肝线粒体肿胀的影响  
Fig. 3 Effects of soybean isoflavone aglycones on mitochondria swelling induced by VC + Fe<sup>2+</sup>

3 结论与讨论

试验着重研究了大豆异黄酮甙元的体外抗氧化作用。众所周知,自由基损伤参与多种疾病的病理生理过程,如炎症、免疫失调、动脉粥样硬化、恶性肿瘤、衰老等,研究和开发抗氧化剂和自由基清除剂对疾病的防治有重大意义。目前国内外也已将抗氧化检测用于抗衰老等保健食品的评价,对保健食品的开发具有积极作用。而大豆异黄酮是一种天然的且价格低廉对人体无副作用的物质,试验证明了大豆

异黄酮甙元具有较强抗氧化能力,可以抑制自由基所致的脂质过氧化发生,保护膜系统免受损伤,抑制自发或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的红细胞溶血,减轻肝线粒体肿胀程度。这对开发以大豆为原料的功能食品或新药材有一定的指导意义。

参考文献

[1] 周建芹. 大豆异黄酮提取工艺优化及其活性研究[J]. 大豆科学,2007,26(2):276-279. (Zhou J Q. Optimization of extraction technology of soybean isoflavones and its physiological activity analysis[J]. Soybean Science,2007,26(2):276-279. )

[2] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone contents in commercial soybean foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42 (8):1666-1673.

[3] Vedavanam K, Srijayanta S, O'Reilly J, et al. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid- containing soybean phytochemical extract (SPE) [J]. Phytotherapy Research, 1999, 13(7):601-608.

[4] Kerry N, Abbey M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxyl radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro

[J]. Atherosclerosis, 1998, 140(2):341-347.

[5] 全吉淑, 沈明花, 柳明洙, 等. 大豆异黄酮苷元的提取及其抗血浆脂蛋白氧化作用[J]. 食品科技, 2008, 33(1):126-128. (Quan J S, Shen M H, Liu M Z, et al. Isolation of soy isoflavone aglycones and inhibition on oxidation of plasma lipoproteins[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(1):126-128. )

[6] 杨建雄, 杨晨, 邱娟, 等. 连翘叶黄酮的体外抗氧化作用[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19:97-100. (Yang J X, Yang C, QIU J, et al. In vitro antioxidant properties of *Forsythia suspense* leave flavonoids[J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19:97-100. )

[7] 唐瑛. 藤茶总黄酮的体外抗氧化作用研究[J]. 中国药师, 2006, 9(8):716-718. (Tang Y. Antioxidative effect of total flavonoids from *Ampelopsis Grossedentata* (AGTF) in vitro[J]. China Pharmacist, 2006, 9(8):716-718. )

[8] 李俊丽, 王运强, 向长萍. 南瓜水溶性多糖的体外抗氧化作用[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2):256-259. (Li J L, Wang Y Q, Xiang C P. The anti-oxidative effect of pumpkin polysaccharide in vitro[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(2):256-259. )

(上接第 908 页)

[2] 张哲, 魏海国. 生物柴油生产技术进展[J]. 石油规划设计, 2009, 20(1):23-26. (Zhan Z, Wei H G. Biodiesel's progress of production technology [J]. Petroleum Planning & Engineering, 2009, 20(1):23-26. )

[3] 韩毅, 邓宇. 脂肪酸甲酯的制备现状及新技术[J]. 皮革化工, 2007, 24(2):26-31. (Han Y, Deng Y. Present situation and new technologies of biodiesel [J]. Leather Chemicals, 2007, 26(2):26-31. )

[4] 侯智, 郑丹星, 武向红, 等. 加压催化合成生物柴油的酯交换反应动力学[J]. 石油化工, 2008, 37(6):569-572. (Hou Z, Zheng D X, WU X H, et al. Kinetics of catalytic transesterification of rapeseed oil with methanol in batch reactor [J]. Petrochemical Technology, 2008, 37(6):569-572. )

[5] Matteo G, Rinaldo P, Nicoletta R, et al. Titanium silica catalysts for the production of fully epoxidised fatty acid methyl esters[J]. Catalysis Letter, 2008, 122:53-56.

[6] Chen Y M, Xiao B, Chang J, et al. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor[J]. Energy Conversion and Management, 2009, 50:668-673.

[7] A P Vyas A P, N Subrahmanyam N, Payal A Patel P A. Production of biodiesel through transesterification of Jatropha oil using KNO<sub>3</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solid catalyst[J]. Fuel, 2009, 88:625-628.

[8] Liang X Z, Gong G Z, Wu H H, et al. Highly efficient procedure for the synthesis of biodiesel from soybean oil using chloroalunate ionic liquid as catalyst[J]. Fuel, 2009, 88:613-616.

[9] Chongkhong S, Tongurai C, Chetpattananondh P. Continuous esterification for biodiesel production from palm fatty acid distillate using economical process[J]. Renewable Energy, 2009, 34:1059-1063.

[10] 斯沃恩 D. 贝雷油脂化学与工艺学[M]. 秦洪万, 主译. 第4版, 北京:中国轻工业出版社, 1989:120. (Qin H W, Fr. Bailey's industrial oil & fat products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1989:120. )

[11] Lilja J, Aumo J, Salmi T, et al. Kinetics of esterification of propanoic acid with methanol over a fibrous polymer-supported sulphonic acid catalyst[J]. Applied Catalysis A, 2002, 228:253-267.

[12] 邬国英, 林西平, 巫鑫森, 等. 棉籽油间歇式酯交换反应动力学的研究[J]. 高校化学工程学报, 2003, 17(3):314-318. (Wu G Y, Lin X Q, WU M X, et al. Kinetics of cottonseed oil transesterification in a batch reactor [J]. Journal of Chemical English of Chinese Universities, 2003, 17(3):314-318. )

[13] 刘群, 肖国民, 高李璟. 硫酸催化合成三醋酸甘油酯的反应动力学[J]. 过程工程学报, 2009, 9(1):43-46. (Liu Q, Xiao G M, Gao L J. Kinetic study on synthesis of glycerol triacetate catalyzed by zirconium-loaded sulfuric acid [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2009, 9(1):43-46)

[14] 杨呈祥, 毛建华, 乔志道. 固体超强酸 S<sub>2</sub>O<sup>2-8</sup>/TiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 催化合成乙酸戊酯的动力学研究[J]. 应用化工, 2007, 35(9):673-676. (Yang C Y, Mao J H, Qiao Z D. Reserch on the kinetics of the synthesis of amyl acetate with the catalyst of S<sub>2</sub>O<sup>2-8</sup>/TiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [J]. Applied Chemical Industry, 2007, 35(9):673-676. )