

黃豆異黃酮在人体的抗氧化性

2. 材料与方法

2.1材料

2,4-二硝基苯肼(DNPH)、己醛、90% 的RRR- δ 生育酚和90% 的生育三烯醇全是在Sigma(密苏里州圣路易市)购得。99% 的RRR- α 生育酚和97% 的RRR- γ 生育酚是从Fluka Chemie(威斯康星州米尔瓦基市)买来的。97% 的戊酮[2]、97% 的2-庚烯醛、90% 的2,4-庚二烯醛、癸醛和2,4-癸二醛是来自Aldrich Chemical Co.(威斯康星州米尔瓦基市)。盐酸、丙酮、甲醇、二氯甲烷、正己烷和水来自EM Scinece(新泽西州吉布斯汤市)。正己烷和异丙醇购自Fisher Scientific(新泽西州费而良市)。所有使用的溶剂皆是HPLC级。丁醛的衍生物DNPH、丁酮、己醛、辛醛、2-壬醛、4羟基己醛-[2]、4羟基壬醛-[2]、4羟基辛醛-[2]和4羟基癸醛-[2]是奥地利格拉茨大学生化系的H. Esterbauer赠与的。

2.2 实验对象

选10个从上一个实验所描述的18至35岁女性。排除的标准包括：素食者、高纤、大量黄豆摄取或低脂饮食者、长期服用维他命矿物质补给品比建议使用量还高者、固定运动者、吸烟者、服用抗生素或贺尔蒙不超过6个月者、慢性病史者、定期药物服用者包括阿斯匹灵、怀孕或是哺乳期、月经不顺者、低于90%或是高于120%理想体重者、每天饮用两种以上含酒精的饮料和食物过敏者。

2.3 实验饮食

实验对象自行选择饮食(随意使用)但避免黄豆产品、亚麻子、全麦产品、种子类、豆芽菜、豆类、豆荚类、维他命矿物质补给品和含酒精的饮料。根据其体重，每天补充其中一种的黄豆蛋白粉(来自密苏里圣路易市国际蛋白质工业技术Supro Brand 黄豆蛋白分离物)。这三种补充物含有相似的大营养物成分(每天平均290大卡，53 g的蛋白质、15g的碳水化合物和1.9g的脂肪)但异黄酮量不同(对照组0.15 mg低分离物1.01 和高分离物2.01 mg的异黄酮总量/体重(kg)/天。染料木黄酮、大豆素和黄豆黄素的平均比率为55%，37%和8%。97%的大豆素和91%的黄豆黄素以配糖共存的方式存在在黄豆蛋白分离物粉裡)。

实验对象随机食用三种黄豆补给品(对照组、低分离物和高分离物)。每一种补给品服用一个饮食周期。也就是连续使用至少90天，等3星期的排除期，然后再使用另一种补给品。每个饮食周期需纪录六次，每次连续纪录三天。每个实验对象皆是自己的对照组。这个实验步骤是经明尼苏达大学的审查委员会人体试验委员会许可。

2.4 尿液检查

每个饮食周期结束时，收集实验对象的24小时尿液。取20 ml的尿液样本，在检验(如同Csallany et al. 的报告所使用的方法)前，暂储存于-70°C冰箱裡。样本利用Amicon搅拌器和YC05 Diaflo滤纸(Amicon Corp. 麻州比佛利市)过滤。在氮气压力35 psi下，除去所有大于500道尔顿的分子。

尿液样本和DNPH在室温下作用一个晚上。用二氯甲烷萃取DNPH衍化物，在硅胶板(硅胶60，铝垫，20 x 20 cm, 0.2 mm厚，购自伊利諾州Deerfield市的Alltech Associates, Inc.)上，利用薄层层析法将非极性醛化物(NPC)、极性醛化物(PC)和苯豚(糖的衍化物)分離。PC和NPC亲脂醛和相关的羰化合物(LARC)则利用甲醇从板上洗脫下來。利用高效液像层析(HPLC)将个别的NPC和PC腙分離与定量。利用75:25v/v甲醇/水流动相将NPC分離，50:50v/v甲醇/水流动相将PC分離。同溶剂洗脫10分钟接着用线性梯度到100% 的甲醇以0.8 mL/min的流速洗15分钟。以吸光率378nm來监视DNPH衍生物的量。

HPLC仪器含Altex 110A 溶剂计量帮浦和样品注射器(Beckman Instruments, 加州柏克莱市)和SP8400UV/Vis检测器(Spectra-Physics, 伊利諾州阿靈顿市)和HP3380A积分器(Hewlett-Packard,加州圣地亚哥市)。利用Ultrasphere ODS C18 逆相管柱(25cm x 4.6mm i.d., 粒子大小:5μm , Altex, 加州柏克莱市)和保护管柱(2cm x 2cm i.d., ChromTech, 明尼苏达州苹果谷市)。用來注入样本的可抛弃式针筒内含0.2μm PVDF过滤器(ChromTech)。

尿液中个别的NPC和PC DNPH衍化物的确认是，比较每个高峰的停滞时间与纯标准的滞留时间。更深入的化合物确认方式是利用本实验室以前所建立的聯合层析法，将纯标准物放入三种不同级别的溶剂中。

2.5 黄豆蛋白分離物裡的生育酚检验

9g取自对照组和高分離物组的黄豆分離物粉分別放在Soxhlet圆筒濾纸上，用100ml的丙酮連續粹取4小时。用減压浓缩装置真空蒸发掉丙酮，剩下的结晶体溶解于2ml的異丙醇/正己烷裡(1.5 : 98.5 v/v)。用Altex 110A 溶剂计量帮浦和样品注射器，将从異丙醇/正己烷溶液中取20μl的样本注入同向HPLC管柱裡(Lichrosorb Si-60 5μ4.6mm x 25cm，伊利諾州Deerfield市的Alltech)。其流动相为1.5 : 98.5 v/v異丙醇/正己烷，流速为1.0mL/min。利用PE650-10S荧光分光光度计(Perkin-Elmer,康乃迪克州諾沃克市)和SP4270积分器(SpectraPhysics,加州圣塔克萊拉市)监控荧光激化在295nm，发射在330nm，來侦测 α -， γ -， δ -生育酚和 α -生育形成。

2.6统计分析

利用窗口使用的SAS系统(8.02版)來做统计分析。用配对样本的t检定做所有数据的比較。所有的结果用平均值和平均值的标准误差(SEM)來表示。结果的统计意义是在p<0.05。

3结果

3.1 尿液中非极性和极性亲脂醛和相关的羰化合物

典型的尿液中非极性和极性亲脂醛和相关的羰化合物(LARC)HPLC分離图如图1所显示。HPLC的洗脫图形和本实验室之前所做的老鼠和人類的HPLC洗脫图形相似。所有的实验对象在三个饮食周期所收集的尿液分離物，其非极性LARC皆须测量。

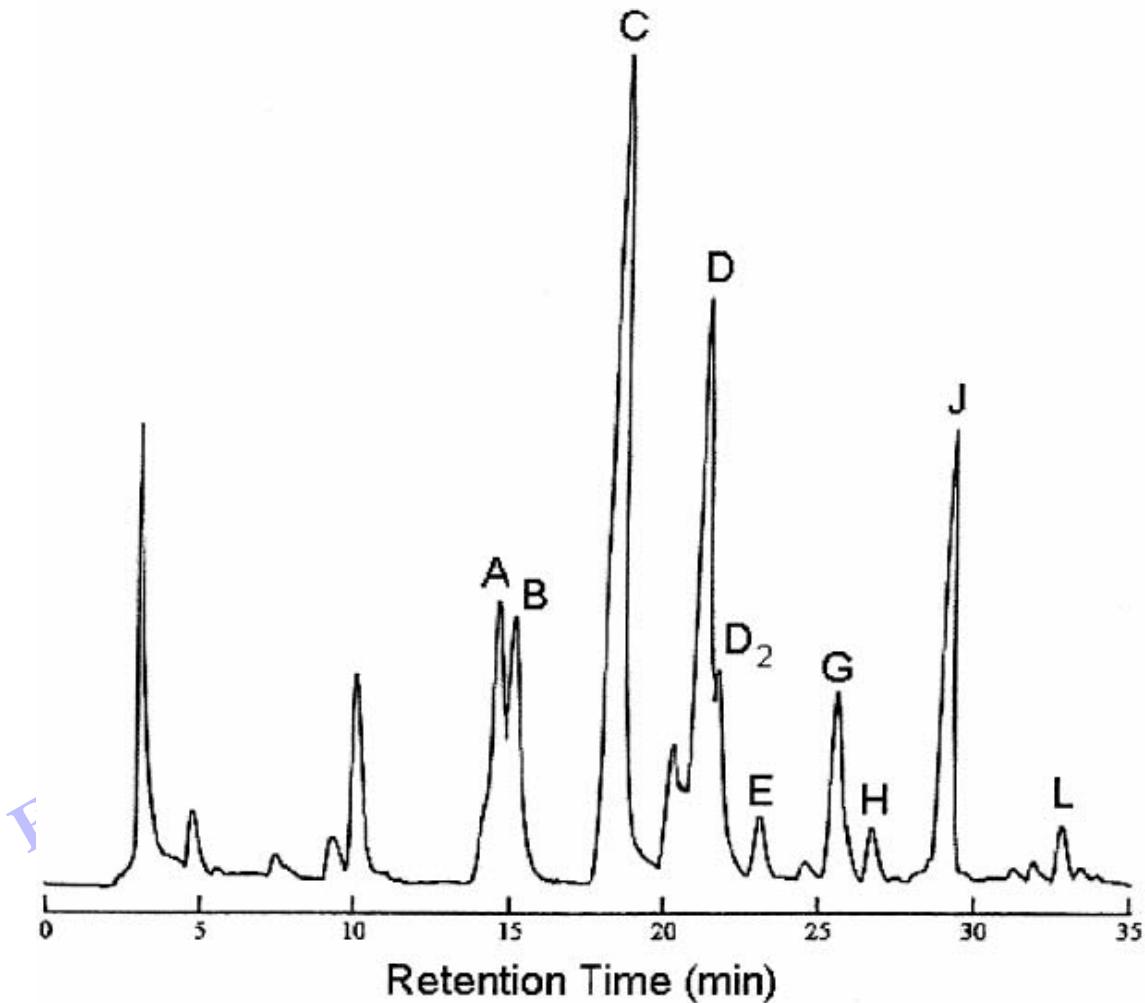


图1：人体试验对象的尿液中非极性亲脂醛和相关的羧化合物HPLC分离图。A：丁醛，B：丁酮，D：戊酮[2]，D₂：戊酮[3]，G：己醛，H：2.4-庚二烯醛，L：2-壬醛，C, E和J 未确认的化合物。分离条件: Ultrasphere ODS管柱(4.6mm x 25 cm, 5 μm), 75 : 25 v/v甲醇/水同溶剂洗脱10分钟, 接着用线梯度至100%的甲醇以0.8 mL/min的流速洗15分钟。检测波长: 378 nm, 注射量: 100μL。

停滞时间

从尿液中非极性化合物可分离出包括：A：丁醛，B：丁酮，D：戊酮[2]，D₂：戊酮[3]，G：己醛，H：2.4-庚二烯醛，L：2-壬醛，和三个未确认的化合物(C, E和J)。和个别的NPC比起来(图2)，10个LARC在两组不同量(低分离物和高分离物组)的异黄酮有8个的NPC低于对照组。和对照组比起来，高分离物组的丁醛，戊酮[2]，己醛，2.4-庚二烯醛和化合物E明显的较低 ($p<0.05$)，化合物J也明显的较低 ($p<0.01$)。和对照组比起来，低分离物组的化合物J也较低在 $p<0.05$ 。

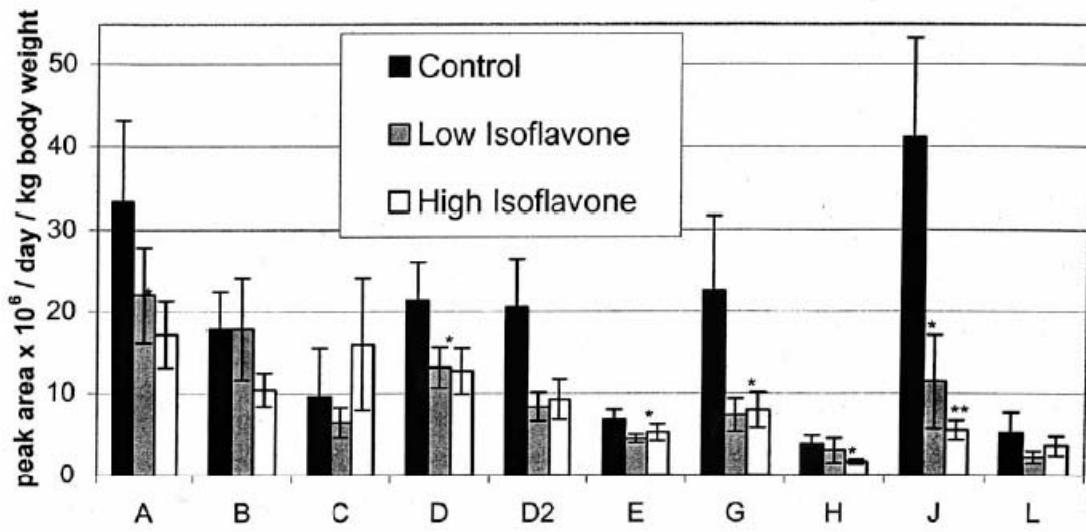


图2：比较妇女服用对照组、低分離和高分離異黃酮分離物组，和其尿液粹取物利用HPLC所分離出的个别非极性亲脂醛和相关的羧化合物。所有实验对象($n = 10$)的数据皆以平均值 \pm SEM表示。实验对象服用这项补给品至少13周。与对照组比较，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。A: 丁醛，B: 丁酮，D: 戊酮[2]，D₂: 戊酮[3]，G: 己醛，H: 2,4-庚二烯醛，J: 2-壬醛，C, E和J 未确认的化合物。

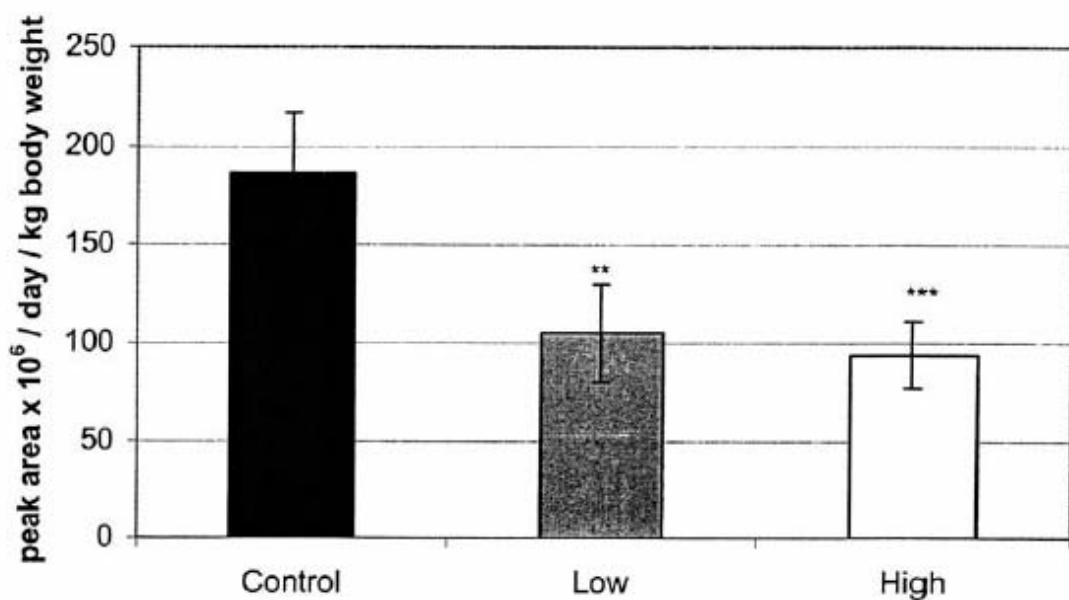


图3显示所有的NPC总合是利用尖峰下的面积和算出的。在两个饮食的異黃酮实验组的数据明显较低。与对照组比起来，低分離物组的显著水平 $p < 0.01$ 而高分離物组 $p < 0.001$ 。

至于分離个别极性LARC和本实验室之前用动物和人類尿液所做的分離方式相似。在本试验裡，食用黃豆異黃酮的实验对象的尿液中所含的化合物包括4羟基己醛-[2]、4羟基辛醛-[2]和4羟基癸醛-[2]。如同我们所预見的，4羟基壬醛-[2]并不存在于人類的尿液样本中。剩余的化合物皆属于未确认的化合物。兩個实验組含的个别的极性化合物或是PC总和与对照组比起來并无明显的差異。因为尿液的PC没有显著差異，所以个别PC的层析分析图与测量和总PC程度的图就没刊在本报告裡。

在对照组和高黃豆蛋白分離粉组裡并没有发现生育酚。而低分離物组是对照组和高分離物组以1:1比例混合，所以低分離物组裡因该也没有生育酚。

4. 討論

累积对细胞脂质和DNA的氧化伤害是造成癌症和心脏疾病发展的重要的因素。近來对于脂质氧化的研究大多集中在LDL(当LDL氧化时，会促进动脉粥狀硬化)。多不饱和脂肪酸的过氧化脂质与氢过氧化物的形成、自由基中间产物和二次氧化产物如醛和某些羰化合物有关。即使目标離醛形成的处有些距離，低分子量醛仍是足够破坏其分子目标。活体中，过氧化脂质会逐渐侵蚀细胞膜的结构和机能的完整性。它的产物会借着和大分子(包括蛋白质和核酸)作用而破坏细胞的功能。在活体裡，许多的醛和羰化合物是过氧化脂质的降解产物，这些产物可经由尿液排出。在本实验室裡，我们可以测量这些只有奈克产量的尿液产物。也是目前测量过氧化脂质和活体抗氧化保护物最零敏的方法之一。

食用抗氧化物可以保护我们对抗氧化破坏。在黃豆中含有抗氧化作用的化合物包括類黃酮(異黃酮、染料木黃酮和大豆素)、三類帖、類胡蘿卜素、生育酚和皂苷。虽然个别的抗氧化物的量和其贡献并不清楚，但有明显的证据显示，当这些抗氧化物相互作用可以有加成和增效保护的作用。黃豆或黃豆食品是主要的食用異黃酮的來源之一。染料木黃酮和大豆素(兩個主要的黃豆異黃酮)单独或是一起与他们的代谢产物，不論是在活体裡或活体外的实验条件下，皆表现出抗氧化的作用。

图3：比较妇女服用对照组、低分離和高分離異黃酮分離物组，其尿液中含非极性亲脂醛和相关的羰化合物的总合。所有实验对象($n = 10$)的数据皆以平均值 \pm SEM表示。实验对象服用这项补给品至少13周。与对照组比较， $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

在本实验中，我们用女性实验对象调查黃豆異黃酮在活体内的抗氧化效果。利用测量脂质的过氧化程度，和服用三种不同量的黃豆異黃酮后，尿液中醛排泄來测量抗氧化效果。结果显示，服用低量(1.0 mg的異黃酮总量/体重(kg)/天)和高量的異黃酮(2.0 mg的異黃酮总量/体重(kg)/天)，与对照组(0.15 mg的異黃酮总量/体重(kg)/天)比起來，其尿液中醛化二次过氧化脂质产物明显降低，显示出抗氧化效果。因为食用较高量的黃豆異黃酮，尿液中某些二次过氧化脂质产物比起低量组少(图2)。服用高或低量

的異黃酮組也降低醛的排泄总量。和对照組比起來，高量組比低量組的減少程度更明顯(圖3)。抗氧化的效果主要是來自異黃酮，因為這三組的黃豆粉中並沒有含生育酚。

本次實驗結果顯示，對健康的女性實驗對象而言，食用的黃豆異黃酮在人體中具有抗氧化的效果，因為其尿液中二次過氧化脂質產物(用來測量活體內過氧化脂質的指標)排出量明顯減少。這個結果也同時顯示出這些脂質氧化產物(尿液中的醛和相關的羰化合物)是非常靈敏的非侵略性的生物指標，可以用來測量在人體內或動物體內過氧化脂質和抗氧化作用的效果。

感謝

K.L. Fritz, C.M. Seppanen, 和 A. Saari Csallany負責準備草稿和完成分析尿液樣本。M.S. Kurzer負責提供尿液樣本。本實驗是明尼蘇達大學農業試驗所、明尼蘇達黃豆研究促進會、美國國家衛生研究院 NIH補助編號CA66016、國家研究資源中心普通臨床實驗中心補助編號M01-RR-00400和密蘇里聖路易市國際蛋白質工業技術共同贊助。