

黃豆異黃酮在人體的抗氧化性

2. 材料與方法

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(密蘇里州聖路易市)購得。99% 的 RRR- α 生育酚和 97% 的 RRR- γ 生育酚是從 Fluka Chemie(威斯康辛州米爾瓦基市)買來的。97% 的戊酮[2]、97% 的 2-庚烯醛、90% 的 2,4-庚二烯醛、癸醛和 2,4-癸二醛是來自 Aldrich Chemical Co.(威斯康辛州米爾瓦基市)。鹽酸、丙酮、甲醇、二氯甲烷、正己烷和水來自 EM Science(新澤西州吉布斯湯市)。正己烷和異丙醇購自 Fisher Scientific(新澤西州費而良市)。所有使用的溶劑皆是 HPLC 級。丁醛的衍生物 DNPH、丁酮、己醛、辛醛、2-壬醛、4-羥基己醛-[2]、4-羥基壬醛-[2]、4-羥基辛醛-[2]和 4-羥基癸醛-[2]是奧地利格拉茨大學生化系的 H. Esterbauer 贈與的。

2.2 實驗對象

選 10 個從上一個實驗所描述的 18 至 35 歲女性。排除的標準包括：素食者、高纖、大量黃豆攝取或低脂飲食者、長期服用維他命礦物質補給品比建議使用量還高者、固定運動者、吸煙者、服用抗生素或賀爾蒙不超過 6 個月者、慢性病史者、定期藥物服用者包括阿斯匹靈、懷孕或是哺乳期、月經不順者、低於 90%或是高於 120%理想體重者、每天飲用兩種以上含酒精的飲料和食物過敏者。

2.3 實驗飲食

實驗對象自行選擇飲食(隨意使用)但避免黃豆產品、亞麻子、全麥產品、種子類、豆芽菜、豆類、豆莢類、維他命礦物質補給品和含酒精的飲料。根據其體重，每天補充其中一種的黃豆蛋白粉(來自密蘇里聖路易市國際蛋白質工業技術 Supro Brand 黃豆蛋白分離物)。這三種補充物含有相似的大營養物成分(每天平均 290 大卡，53 g 的蛋白質、15g 的碳水化合物和 1.9g 的脂肪)但異黃酮量不同(對照組 0.15、低分離物 1.01 和高分離物 2.01 mg 的異黃酮總量/體重(kg)/天。染料木黃酮、大豆素和黃豆黃素的平均比率為 55%、37%和 8%。97%的大豆素和 91%的黃豆黃素以配醣共存的方式存在在黃豆蛋白分離物粉裡。

實驗對象隨機食用三種黃豆補給品(對照組、低分離物和高分離物)。每一種補給品服用一個飲食週期。也就是連續使用至少 90 天，等 3 星期的排除期，然後再使用另一種補給品。每個飲食週期需紀錄六次，每次連續紀錄三天。每個實驗對象皆是自己的對照組。這個實驗步驟是經明尼蘇達大學的審查委員會人體試驗委員會許可。

2.4 尿液檢查

每個飲食周期結束時，收集實驗對象的 24 小時尿液。取 20 ml 的尿液樣本，在檢驗(如同 Csallany et al. 的報告所使用的方法)前，暫儲存於-70°C 冰箱裡。樣本利用 Amicon 攪拌器和 YC05 Diaflo 濾紙(Amicon Corp. 麻州比佛利市)過濾。在氮氣壓力 35 psi 下，除去所有大於 500 道爾頓的分子。

尿液樣本和 DNPH 在室溫下作用一個晚上。用二氯甲烷粹取 DNPH 衍化物，在矽膠板(矽膠 60，鋁墊，20 x 20 cm, 0.2 mm 厚，購自伊利諾州 Deerfield 市的 Alltech Associates, Inc.) 上，利用薄層層析法將非極性醛化物(NPC)、極性醛化物(PC)和苯脲(糖的衍化物)分離。PC 和 NPC 親脂醛和相關的羰化合物(LARC)則利用甲醇從板上洗脫下來。利用高效液像層析(HPLC)將個別的 NPC 和 PC 腺分離與定量。利用 75:25v/v 甲醇/水流動相將 NPC 分離，50:50v/v 甲醇/水流動相將 PC 分離。同溶劑洗脫 10 分鐘接著用線性梯度到 100% 的甲醇以 0.8 mL/min 的流速洗 15 分鐘。以吸光率 378nm 來監視 DNPH 衍生物的量。

HPLC儀器含Altex 110A 溶劑計量幫浦和樣品注射器(Beckman Instruments, 加州柏克萊市)和SP8400UV/Vis檢測器(Spectra-Physics, 伊利諾州阿靈頓市)和HP3380A積分器(Hewlett-Packard, 加州聖地牙哥市)。利用Ultrasphere ODS C18 逆相管柱(25cm x 4.6mm i.d., 粒子大小:5 μ m, Altex, 加州柏克萊市)和保護管柱(2cm x 2cm i.d., ChromTech, 明尼蘇達州蘋果谷市)。用來注入樣本的可拋棄式針筒內含 0.2 μ m PVDF過濾器(ChromTech)。

尿液中個別的 NPC 和 PC DNPH 衍化物的確認是，比較每個高峰的停滯時間與純標準的滯留時間。更深入的化合物確認方式是利用本實驗室以前所建立的聯合層析法，將純標準物放入三種不同級性的溶劑中。

2.5 黃豆蛋白分離物裡的生育酚檢驗

9g 取自對照組和高分離物組的黃豆分離物粉分別放在 Soxhlet 圓筒濾紙上，用 100ml 的丙酮連續粹取 4 小時。用減壓濃縮裝置真空蒸發掉丙酮，剩下的結晶體溶解於 2ml 的異丙醇/正己烷裡(1.5 : 98.5 v/v)。用 Altex 110A 溶劑計量幫浦和樣品注射器，將從異丙醇/正己烷溶液中取 20 μ l 的樣本注入同向 HPLC 管柱裡(Lichrosorb Si-60 5 μ , 4.6mm x 25cm, 伊利諾州 Deerfield 市的 Alltech)。其流動相為 1.5 : 98.5 v/v 異丙醇/正己烷，流速為 1.0mL/min。利用 PE650-10S 螢光分光光度計(Perkin-Elmer, 康乃迪克州諾沃克市)和 SP4270 積分器(SpectraPhysics, 加州聖塔克萊拉市)監控螢光激化在 295nm，發射在 330nm，來偵測 α -、 γ -、 δ -生育酚和 α -生育形成。

2.6 統計分析

利用視窗使用的 SAS 系統(8.02 版)來做統計分析。用配對樣本的 t 檢定做所有數

據的比較。所有的結果用平均值和平均值的標準誤差(SEM)來表示。結果的統計意義是在 $p < 0.05$ 。

3 結果

3.1 尿液中非極性和極性親脂醛和相關的羰化合物

典型的尿液中非極性和極性親脂醛和相關的羰化合物(LARC)HPLC 分離圖如圖 1 所顯示。HPLC 的洗脫圖形和本實驗室之前所做的老鼠和人類的 HPLC 洗脫圖形相似。所有的實驗對象在三個飲食週期所收集的尿液分離物，其非極性 LARC 皆須測量。

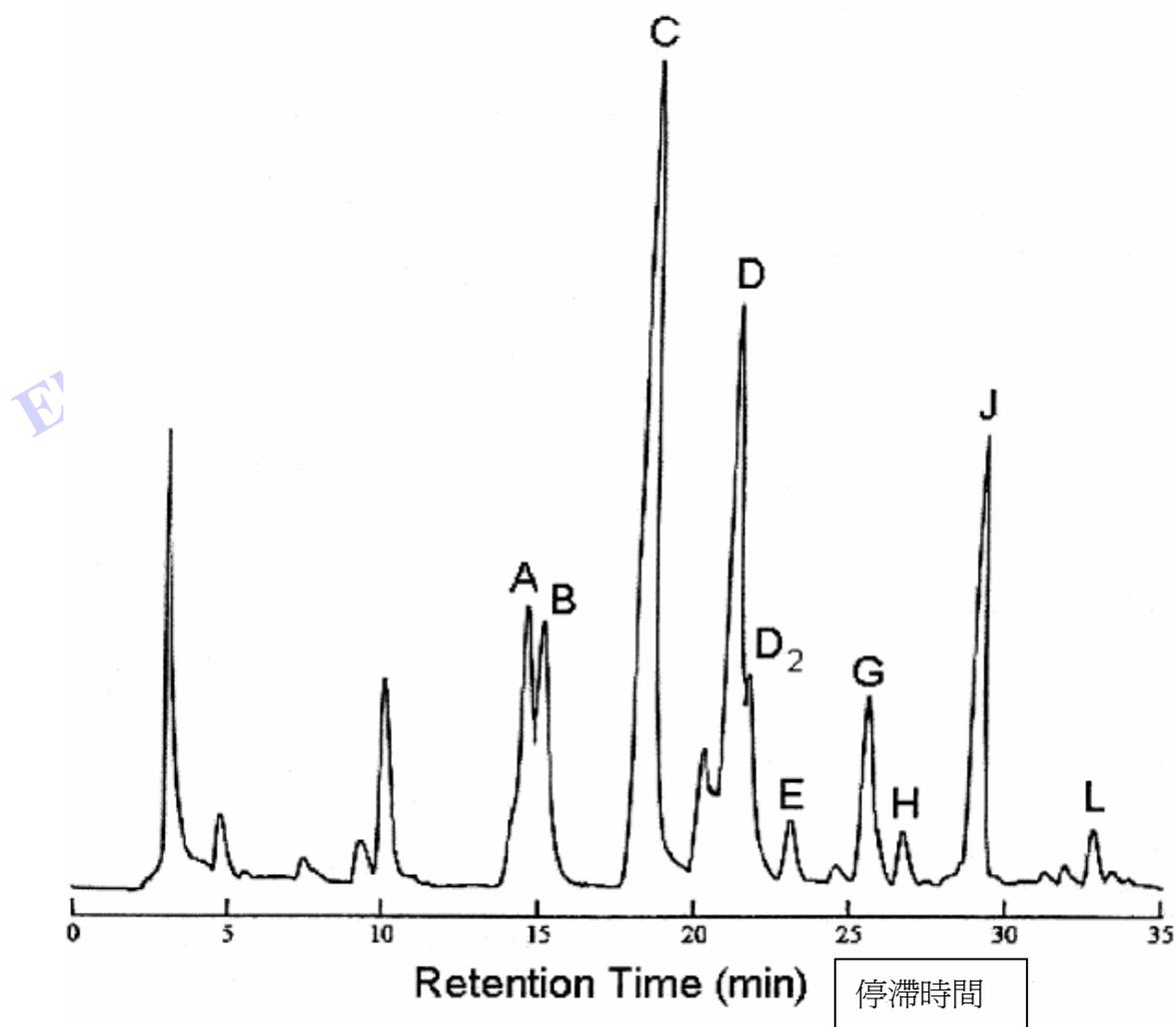


圖 1：人體試驗對象的尿液中非極性親脂醛和相關的羰化合物HPLC分離圖。A：丁醛，B：丁酮，D：戊酮[2]，D₂：戊酮[3]，G：己醛，H：2,4-庚二烯醛，L：2-壬醛，C, E和J 未確認的化合物。分離條件: Ultrasphere ODS管柱(4.6mm x 25 cm, 5 μm), 75 : 25 v/v甲醇/水同溶劑洗脫 10 分鐘，接著用線梯度至 100%的甲醇以 0.8 mL/min的流速洗 15 分鐘。檢測波長: 378 nm，注射量：100μL。

從尿液中非極性化合物可分離出包括：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，和三個未確認的化合物(C, E和J)。和個別的NPC比起來(圖 2)，10 個LARC在兩組不同量(低分離物和高分離物組)的異黃酮有 8 個的NPC低於對照組。和對造組比起來，高分離物組的丁醛，戊酮[2]，己醛，2,4-庚二烯醛和化合物E明顯的較低 ($p < 0.05$)，化合物J也明顯的較低 ($p < 0.01$)。和對造組比起來，低分離物組的化合物J也較低在 $p < 0.05$ 。

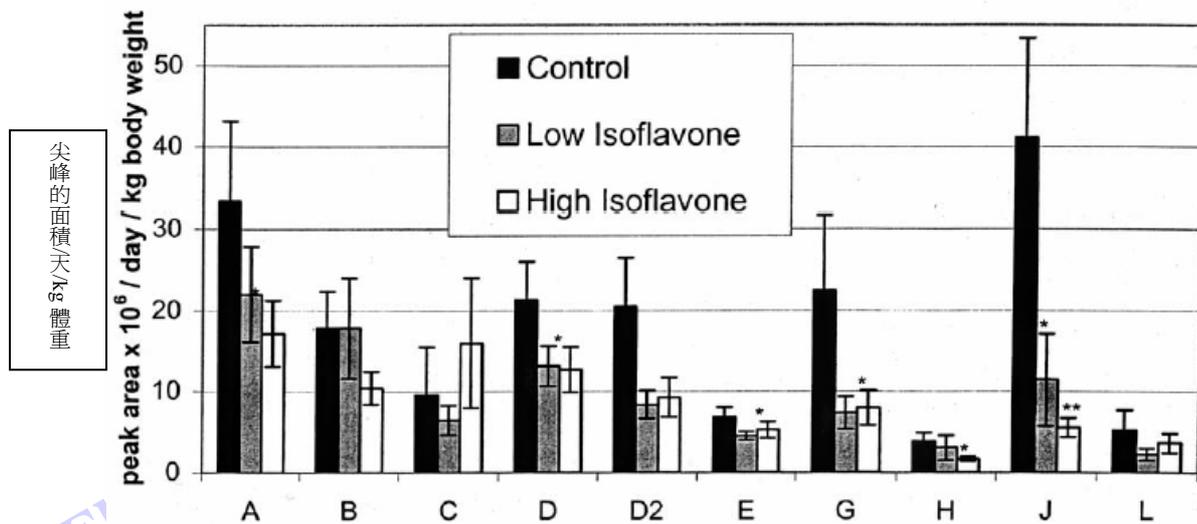


圖 2：比較婦女服用對照組、低分離和高分離異黃酮分離物組，和其尿液粹取物利用HPLC所分離出的個別非極性親脂醛和相關的羰化合物。所有實驗對象(n = 10)的數據皆以平均值±SEM表示。實驗對象服用這項補給品至少 13 週。與對照組比較，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。A：丁醛，B：丁酮，D：戊酮[2]，D₂：戊酮[3]，G：己醛，H：2,4-庚二烯醛，L：2-壬醛，C, E和J 未確認的化合物。

圖 3 顯示所有的 NPC 總合是利用尖峰下的面積和算出的。在兩個飲食的異黃酮實驗組的數據明顯較低。與對照組比起來，低分離物組的顯著水準 $p < 0.01$ 而高分離物組 $p < 0.001$ 。

至於分離個別極性 LARC 和本實驗室之前用動物和人類尿液所做的分離方式相似。在本試驗裡，食用黃豆異黃酮的實驗對象的尿液中所含的化合物包括 4 羥基己醛-[2]、4 羥基辛醛-[2]和 4 羥基癸醛-[2]。如同我們所預見的，4 羥基壬醛-[2]並不存在於人類的尿液樣本中。剩餘的化合物皆屬於未確認的化合物。兩個實驗組含的個別的極性化合物或是 PC 總和與對照組比起來並無明顯的差異。因為尿液的 PC 沒有顯著差異，所以個別 PC 的層析分析圖與測量和總 PC 程度的圖就沒刊在本報告裡。

在對照組和高黃豆蛋白分離粉組裡並沒有發現生育酚。而低分離物組是對照組和高分離物組以 1:1 比例混合，所以低分離物組裡因該也沒有生育酚。

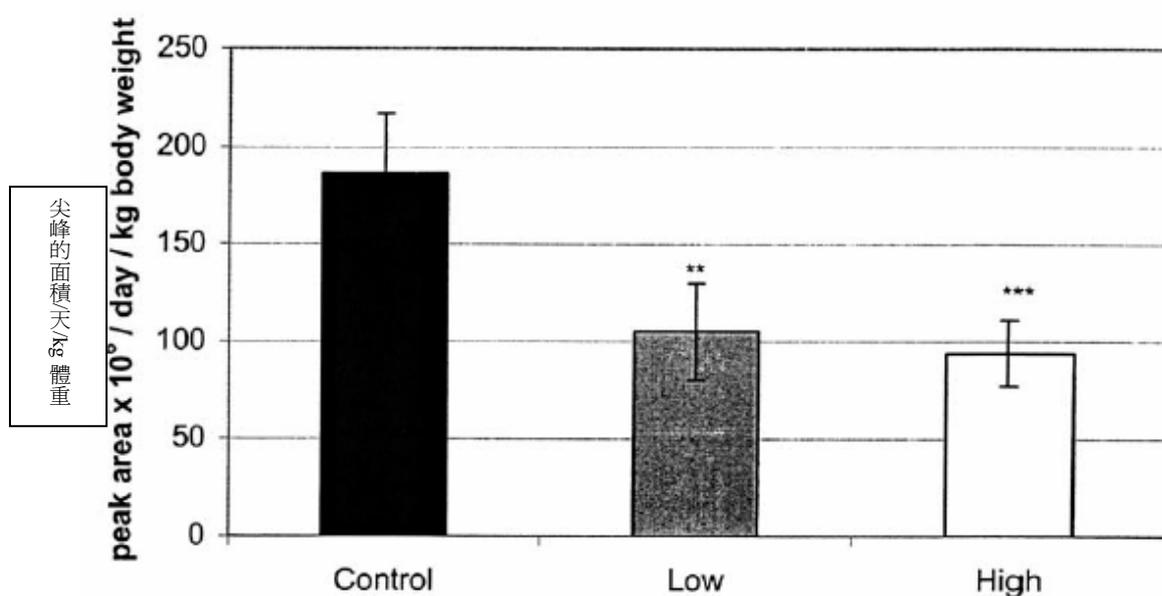


圖 3：比較婦女服用對照組、低分離和高分離異黃酮分離物組，其尿液中含非極性親脂醛和相關的羰化合物的總合。所有實驗對象(n = 10)的數據皆以平均值±SEM 表示。實驗對象服用這項補給品至少 13 週。與對照組比較，*p<0.05, **p<0.01。

4. 討論

累積對細胞脂質和 DNA 的氧化傷害是造成癌症和心臟疾病發展的重要因素。近來對於脂質氧化的研究大多集中在 LDL(當 LDL 氧化時，會促進動脈粥狀硬化)。多不飽和脂肪酸的過氧化脂質與氫過氧化物的形成、自由基中間產物和二次氧化產物如醛和某些羰化合物有關。即使目標離醛形成的處有些距離，低分子量醛仍是足夠破壞其分子目標。活體中，過氧化脂質會逐漸侵蝕細胞膜的結構和機能的完整性。它的產物會藉著和大分子(包括蛋白質和核酸)作用而破壞細胞的功能。在活體裡，許多的醛和羰化合物是過氧化脂質的降解產物，這些產物可經由尿液排出。在本實驗室裡，我們可以測量這些只有奈克產量的尿液產物。也是目前測量過氧化脂質和活體抗氧化保護物最零敏的方法之一。

食用抗氧化物可以保護我們對抗氧化破壞。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、類胡蘿蔔素、生育酚和皂苷。雖然個別的抗氧化物的量和其貢獻並不清楚，但有明

顯的證據顯示，當這些抗氧化物相互作用可以有加成和增效保護的作用。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)單獨或是一起與他們的代謝產物，不論是在活體裡或活體外的實驗條件下，皆表現出抗氧化的作用。

在本實驗中，我們用女性實驗對象調查黃豆異黃酮在活體內的抗氧化效果。利用測量脂質的過氧化程度，和服用三種不同量的黃豆異黃酮後，尿液中醛排泄來測量抗氧化效果。結果顯示，服用低量(1.0 mg 的異黃酮總量/體重(kg)/天)和高量的異黃酮(2.0 mg 的異黃酮總量/體重(kg)/天)，與對照組(0.15 mg 的異黃酮總量/體重(kg)/天)比起來，其尿液中醛化二次過氧化脂質產物明顯降低，顯示出抗氧化效果。因為食用較高量的黃豆異黃酮，尿液中某些二次過氧化脂質產物比起低量組少(圖 2)。服用高或低量的異黃酮組也降低醛的排泄總量。和對照組比起來，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。