

文章编号:1001-6880(2014)10-1659-05

加工方法对毛豆中大豆异黄酮苷元含量的影响及其对糖尿病小鼠的降血糖降血脂活性研究

刘璐璐,王洲婷,丁传波,李爽,李伟,刘文丛*,郑毅男*

吉林农业大学中药材学院,长春 130118

摘要:本文比较不同处理方式下毛豆中大豆异黄酮苷元的含量,继而对冻干条件下处理的毛豆样品进行降血糖降血脂活性的研究。采用高效液相色谱(HPLC)法测定通过热烫、煮沸、冷冻、冻干、烘干从毛豆中提取出的大豆异黄酮苷元的含量。HPLC 测定条件如下:色谱柱: Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-0.3% 磷酸溶液(48:52),流速:0.7 mL/min,测定波长:260 nm,柱温:25 °C,进样量:20 μL。留一组健康小鼠作为空白,将造模成功的 ICR 小鼠随机分为 3 组,分别用生理盐水,消渴丸,冻干毛豆,对其连续灌胃 4 周,4 周后处死,测定其血糖和血脂指标。结果显示,冻干条件下,大豆异黄酮苷元含量最多(115.45 μg/g),并且冻干的毛豆能够显著改善糖尿病小鼠的血糖和血脂水平。

关键词:毛豆;大豆异黄酮;定量分析;血糖;血脂

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

Determination of Soy Isoflavone Aglycone Content of Edamame Prepared by Different Processing Methods and Its Hypoglycemic and Hypolipidemic Activity for Diabetic Mice

LIU Lu-lu, WANG Zhou-ting, DING Chuan-bo, LI Shuang, LI Wei, LIU Wen-cong *, ZHENG Yi-nan *

Institute of Traditional Chinese Medicines, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: This paper compares soy isoflavone aglycone content of edamame prepared by different processing methods, and then study its hypoglycemic and hypolipidemic activity. Determination isoflavone aglycone content of edamame by high performance liquid chromatography (HPLC) methods in blanching, boiling, freezing, freeze-dried, drying conditions respectively. HPLC conditions: Column: Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase: methanol -0.3% phosphoric acid solution (48:52), flow rate :0.7 mL / min, detection wavelength:260 nm, column temperature :25 °C , the injection volume :20 μL. Leaving a group of healthy mice were used as blank, successful modeling ICR mice were randomly divided into three groups, each with saline, xiaoke pills, freeze-dried edamame, its intragastrically four weeks, after four weeks, determination of blood glucose and lipid levels. The results showed that in freeze-dried condition, the most abundant isoflavone aglycone(115.45 μg/g), and freeze-dried edamame can improve the blood sugar and lipid levels significantly.

Key words: edamame; soy isoflavones; quantitative analysis; blood sugar; blood lipid

菜用大豆(*Glycine max* L. Merr.)也叫毛豆,日本称枝豆,是指在 R6(鼓粒盛期)至 R7(初熟期)生育期间采青作为食用的大豆,属大豆的专用型品种。此时豆荚鼓粒饱满,豆色、籽粒呈翠绿色、籽粒还没有达到完全成熟时,但籽粒填充达到豆长的 80% ~ 90%^[1]。毛豆富含植物蛋白质、维生素、矿物质、纤维以及大豆异黄酮^[2]。毛豆因其独特的口感和风

味,被誉为最美味、最富营养的绿色保健蔬菜,是深受亚洲人喜爱的特色蔬菜^[3]。

大豆异黄酮(soy isoflavones)是大豆等豆科植物生长过程中形成的一类次生代谢物,迄今为止有 12 种异构体,其中 3 种为苷元形式即染料木素(genistein)、大豆黄素(daidzein)和黄豆黄素(glycitein),9 种为葡萄糖苷形式^[4]。据报道,大豆异黄酮元比糖苷更容易被人体吸收^[5],并且大豆苷元和燃料木素是有益于健康的主要成分^[6]。大豆异黄

酮有益于减轻糖尿病患者的体重以及控制患者血浆胰岛素水平和葡萄糖水平^[7]。卜勇军等^[8]研究表明,大豆异黄酮可降低糖尿病小鼠肾缺血再灌注损伤后血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、血总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)等水平,对预防糖尿病具有一定的意义。

据文献^[9]报道,大豆摄入对于糖尿病并无显著作用,而关于毛豆的抗糖尿病研究,尚未见报道。

本文采用HPLC法对不同处理方式(热烫、煮沸、冷冻、冻干、烘干)条件下毛豆中大豆异黄酮苷元进行含量测定,并对冻干条件下处理的毛豆样品进行了降血糖降血脂活性的研究。本研究首次对冻干毛豆对糖尿病小鼠的降血糖降血脂活性进行了研究,为毛豆的保存及其抗糖尿病活性提供了理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

毛豆,购自农贸市场;染料木素、大豆苷元、黄豆黄素(纯度>98%),成都曼斯特生物科技有限公司;甲醇、甲酸均为色谱纯;96孔酶标板(美国康宁公司),链脲佐菌素(STZ)(美国Sigma公司),消渴丸(广州中一药业有限公司),葡萄糖试剂盒(氧化酶法)(北京北化康泰临床试剂有限公司),总胆固醇试剂盒(酶法)(北京北化康泰临床试剂有限公司),甘油三酯试剂盒(酶法)(北京北化康泰临床试剂有限公司),HDLC试剂盒(选择性沉淀法),葡萄糖、柠檬酸、柠檬酸钠、冰醋酸、乙醇、二甲苯(分析纯)(北京化工厂),甲醛,分析纯(沈阳经济技术开发区试剂厂),生理盐水(长春豪邦药业有限公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),

1.2 仪器与设备

Shimadzu LC-20A高效液相色谱仪(SPD-20A紫外检测器,LC-20AT泵,CTO-10AS VP柱温箱,LC-solution工作站)日本岛津公司;Sartorius BP211D型电子分析天平 德国赛多利斯公司;KQ-250DB型数控超声波清洗器 昆山超声波仪器有限公司;FW135中草药粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司;DK-98-1型电热恒温水浴锅 天津泰斯特仪器有限公司;DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;冷冻干燥机FD-1D-50 北京博医

康实验仪器有限公司;SpectraMax Plus384连续光谱扫描式酶标仪(美国分子仪器公司),Sartorius PB10标准型pH计(德国赛多利斯公司),HC2517高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),FS-2组织匀浆机(江苏金坛金城国胜实验仪器厂)。

1.3 实验动物

雄性ICR小鼠,SCXK-(吉)2007-0003,体重25~28g,购自吉林大学白求恩医学院实验动物中心,饲养室温度23±2℃,湿度50±5%,小鼠自由摄食和饮水,适应性饲养一周。

2 实验方法

2.1 不同处理方式下毛豆中大豆异黄酮苷元的含量测定

2.1.1 HPLC条件

Shimadzu LC-20A高效液相色谱仪,色谱柱:依利特Hypersil C₁₈(250mm×4.6mm,5μm),流动相:甲醇-0.3%磷酸溶液(体积比48:52),流速0.7mL/min,测定波长260nm,柱温25℃,进样量:20μL。

2.1.2 对照品溶液的制备

对照品储备液:称取染料木素、大豆苷元、黄豆黄素各5.0mg,精密称定,分别置于25mL容量瓶中,用70%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为0.2mg/mL的对照品储备液;对照品溶液:精密量取三种对照品储备液各1mL,混匀,即得对照品溶液,其中三中大豆异黄酮苷元质量浓度均为0.067mg/mL。

2.1.3 样品前处理

将新鲜毛豆去荚后,进行以下处理。

(1)热烫100g毛豆用纱布包好,放在沸水中热烫1min,在冰水中冷却,取出吸干水分;(2)煮沸100g毛豆加水(重量/体积1:1)煮沸35min,吸干水分;(3)冷冻100g毛豆用纱布包好,放在沸水中热烫1min,在冰水中冷却,取出吸干水分,放于密封袋中,-80℃保存一小时,-20℃保存2周;(4)冻干100g毛豆用纱布包好,放在沸水中热烫1min,在冰水中冷却,取出吸干水分,放于密封袋中,-80℃保存一小时,冷冻干燥18~26h;(5)烘干100g毛豆放置烘箱中48h,直至烘干,取出。

2.1.4 供试样品提取

将样品粉碎,称取1g(干重),置250mL容量

瓶中,加入50 mL乙醇,20 mL去离子水,8 mL浓盐酸。回流2 h,浓缩至10 mL,过滤膜,备用。

2.2 毛豆降血糖降血脂活性研究

2.2.1 动物模型

取健康雄性ICR小鼠若干,基础饲料适应性饲养一周,随机取10只作为空白对照组,其余小鼠给以高脂饲料(脂肪22%、蛋白质20%、碳水化合物48%、包括纤维素及水分在内的其他成分占10%,总热量为44.3 kJ/kg)饲养4周,小鼠禁食不禁水12 h后,腹腔注射链脲佐菌素100 mg/kg(溶于0.1 M新配制的柠檬酸缓冲盐溶液中,pH 4.5),继续以高脂饲料饲养4周后,测定空腹血糖,血糖值高于7.8 mmol/L的小鼠作为2型糖尿病造模成功小鼠。

2.2.2 分组及给药

将造模成功的小鼠随机分3组,每组10只。给药剂量分别为消渴丸240 mg/kg,毛豆组2.25 g/kg正常组及模型组给以等体积的生理盐水。小鼠每日给药一次,连续给药4周。

将冻干的毛豆粉碎,加入适量的水,匀浆机匀浆,煮熟,制成豆浆。

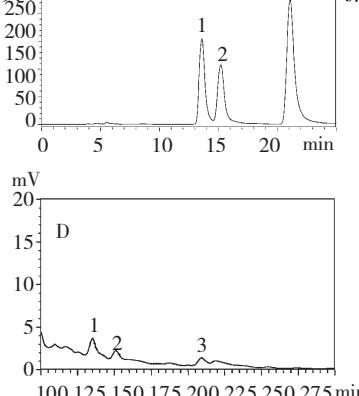
2.2.3 血糖血脂指标的测定

给药4周后,各组小鼠测定空腹血、口服葡萄糖耐量、血清TC、TG。

2.2.4 数据统计

数据结果以平均值±标准差来表示。用

SPSS17.0软件进行统计学分析,使用one-way ANOVA法,



1 大豆苷元 Daidzein 2 黄豆黄素 Glycitein 3 染料木素 Genistein

A 混合标准品 Mixed standards B 热烫 Banching C 煮沸 Boiling D 冷冻 Freezing E 冻干 Freeze-dried F 烘干 Drying

3 结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 线性关系

精密吸取大豆异黄酮苷元对照品混合溶液4、8、12、16、20 μL进样,以峰面积积分值A为纵坐标,进样量B为横坐标进行线性回归,得三种活性物质回归方程分别为:

$$\text{大豆苷元: } Y = 193319X + 73134 \quad R^2 = 0.9994$$

$$\text{黄豆黄素: } Y = 113722X + 35248 \quad R^2 = 0.9994$$

$$\text{染料木素: } Y = 565129X + 200070 \quad R^2 = 0.9993$$

结果表明,大豆苷元、黄豆黄素、染料木素均在0.268~1.340 μg范围内与峰面积呈良好的线性关系。

3.1.2 精密度试验

取对照品溶液,重复进样5次,记录色谱图,测定峰面积值,计算RSD值,得大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的RSD分别为1.64%、1.76%和1.94%。实验表明,仪器精密度良好。

3.1.3 重复性试验

取同一批次大豆异黄酮苷元混合物5份,按2.1.2项下,制备样品溶液,测定峰面积值,计算RSD值,得大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的RSD分别为2.2%、2.73%和2.51%。表明该法重复性良好。

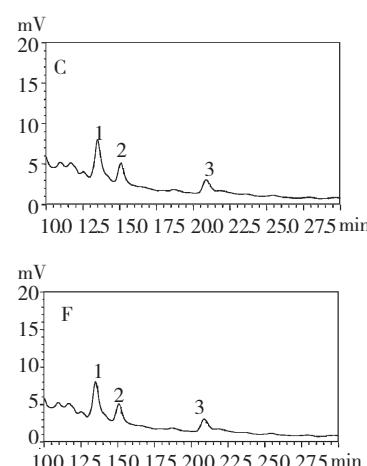


图1 混合标准品(A)及经热烫(B)、煮沸(C)、冷冻(D)、冻干(E)、烘干(F)处理后毛豆样品的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and the edamame samples after banching (B)、boiling (C)、freezing (D)、freeze-dried (E)、drying (F)

表1 不同处理方式条件下毛豆中大豆异黄酮含量(ug/g)

Table 1 Soybean isoflavone content of edamame in different treatment conditions(ug/g)

处理方式 treatment modes	各化合物平均含量 Average content of each compound(ug/g)			
	大豆苷元 Daidzein	黄豆黄素 Glycitein	染料木素 Genistein	总和 Sum
热烫 blanching	26.35	10.59	3.03	39.97
煮沸 boiling	18.38	8.49	1.74	28.61
冷冻 freezing	8.65	3.92	1.94	14.51
冻干 freeze-dried	63.91	40.87	10.66	115.45
烘干 drying	36.38	18.04	3.93	58.36

3.1.4 稳定性试验

取同一样品溶液分别在0、2、4、6、8、12 h于上述色谱条件下测定峰面积值,计算RSD值,得大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的RSD分别为1.89%、2.35%和1.96%。表明供试品溶液在12h内稳定性良好。

3.1.5 回收率试验

取大豆异黄酮苷元混合物,精密称定,分别准确加入对照品溶液各适量,余同2.1.2项下操作。分别计算得大豆苷元、黄豆黄素和染料木素平均回收率。检测结果表明,平均加样回收率分别为:97.6%、101.8%、98.4%;RSD分别为:1.8%、2.2%、1.76%。表明该法的回收率结果良好。

3.2 含量测定

取供试品溶液,在2.1.1节色谱条件下进样分析,结果如图1,具体含量见表1。

3.3 动物实验

测定2型糖尿病小鼠空腹血糖及口服糖耐量结果如图3、图4、图5,血清TC、TG如表2所示。

4 讨论

实验结果显示,冻干条件下,毛豆中保留的大豆

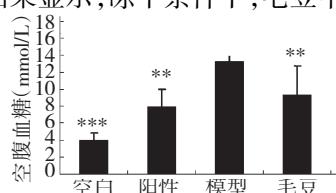


图3 2型糖尿病小鼠空腹血糖

Fig. 3 Fasting blood glucose level of T2MD mice

注:与模型组相比较, * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001。

Note: Compare with model group, * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

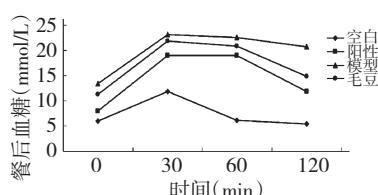


图4 2型糖尿病小鼠餐后血糖

Fig. 4 Postprandial blood glucose level in type 2 diabetic mice

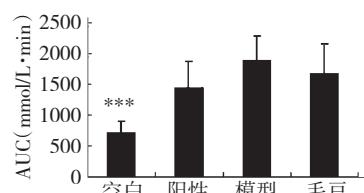


图5 2型糖尿病小鼠口服糖耐量

Fig. 5 Oral glucose tolerance in T2DM mice

注:与模型组相比较, * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001。

Note: Compare with model group, * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

表2 2型糖尿病小鼠血脂指标 (Mean ± SD, mmol/L)

Table 2 Blood lipid levels in type 2 diabetic mice (Mean ± SD, mmol/L)

血脂指标 Serum lipids	空白 Blank	消渴丸 Xiaoke pills	模型 Model	毛豆 Edamame
TC/(mmol/dL)	3.53 ± 0.21 ***	4.57 ± 0.32 **	5.78 ± 0.88	4.81 ± 1.10 *
TG/(mmol/dL)	0.96 ± 0.11 ***	1.13 ± 0.06 **	1.54 ± 0.22	1.23 ± 0.20 *

注:与模型组相比较, * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001。

Note: Compare with model group, * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

异黄酮含量最多,烘干次之。说明这几种处理方式相比较而言,冻干条件下能够很好地保留毛豆中大豆异黄酮的含量。热烫和煮沸是毛豆自身的大豆异

黄酮损失的主要原因。煮沸,由于其加热时间足够长,从而使毛豆中某些物质转变为大豆昔,染料木昔和染料木素^[10]。本研究通过酸水解,使经过煮沸转化而来的大豆异黄酮昔转变为相应的昔元,从而增加了煮沸样品中大豆昔元和染料木素的含量;但与热烫处理的样品相比较,煮沸可能会使更多的大豆异黄酮损失在水中。本研究中烘干处理的毛豆未经过热烫,所以其异黄酮含量仅低于冻干条件下处理的毛豆样品。而冷冻的样品中,大豆异黄酮昔元含量最少,说明冷冻不利于毛豆中大豆异黄酮昔元含量的保存。动物实验结果显示,冻干的毛豆能够显著改善糖尿病小鼠的血糖血脂水平,虽然能够改善糖尿病小鼠的口服糖耐量,但与模型组相比,差异并不显著。

据报道^[11],豆类调节血糖和血脂代谢的主要原因是其含有高浓度的大豆异黄酮,说明毛豆中还含有一些其它的成分,对调节糖尿病小鼠的血糖血脂也有一定的作用。本研究表明真空冻干毛豆能够显著改善糖尿病小鼠的血糖血脂水平,其他几种加工方法是否对糖尿病小鼠也有治疗作用,这些有待进一步研究加以证明,也就是说大豆异黄酮昔元含量的多少,或许可能不是改善糖尿病的主要原因,究竟还有何种物质存在,这些都有待进一步研究加以证实。

本文研究结果显示,冻干条件下处理的毛豆样品,其大豆异黄酮昔元含量最多;所以我们首先对冻干毛豆的抗2型糖尿病的活性进行了研究。研究发现,冻干的毛豆能显著改善2型糖尿病小鼠的血糖和血脂水平。这可能是毛豆中的大豆异黄酮与毛豆中其他成分共同作用的结果。

参考文献

- Konovsky J, Lumpkin T A, McClary D. Edamame : the vegetable soybean. In A. D. O'Rourke (ed), Understanding the Japanese Food and Agrimarket : a multifaceted opportunity. Binghamton: Haworth Press, 1994. 173-181.
- Karina Czaikoski, Rodrigo Santos Leite, José Marcos Gontijo Mandarino, et al. Canning of vegetable-type soybean in acidified brine: Effect of the addition of sucrose and pasteurisation time on color and other characteristics. *Industrial Crops and Products*. 2013, 45:472-476.
- Katou T, Fukushima T, Akazawa T. Differences in contents of amino acid, sugar and composition of fatty acids between edamame and normal soybean. *J Jap Soc Hort Sci*, 1982, 51: 537.
- Zou YB(邹娅斌), Wang JL(王俊玲). Pharmacological studies status of soy isoflavones. *China Foreign Medical Treatment*(中外医疗), 2010, 29:134-137.
- Sun X(张逊), Yao W(姚文), Zhu WY(朱伟云). Research of Intestinal isoflavone degrading bacteria. . *Digestion Journal of World Chinaman*. (世界华人消化杂志), 2006, 14: 973-978.
- Christopher D. Gardner, Lorraine M. Chatterjee, Adrian A. Franke. Effects of isoflavone supplements vs. soy foods on blood-concentrations of genistein and daidzein in adults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2009, 20:227-234.
- Zhang YB , Chen WH, Guo JJ, et al. Soy isoflavone supplementation could reduce body weight and improve glucose metabolism in non-Asian postmenopausal women—A meta-analysis. *Nutrition*, 2013, 29:8-14.
- Bu YJ(卜勇军), Yang JJ(杨静静), Liu SF(刘素芳), et al. Effects of Soy isoflavones on renal ischemia-reperfusion injury in diabetic mice. *Chinese Journal of Gerontology*(中国老年学杂志), 2012, 32:309-310.
- Keshavarz SA, Nourieh Z, Attar MJ, et al. Effect of Soymilk Consumption on Waist Circumference and Cardiovascular Risks among Overweight and Obese Female Adults. *Int J Prev Med*, 2012, 3:798-805.
- Simonne AH, Smith M, Weaver DB, et al. Retention and Changes of Soy Isoflavones and Carotenoids in Immature Soybean Seeds (Edamame) during Processing. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:6061-6069.
- Nouredine Behloul, Guanzhong Wu. Genistein: A promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 698(1-3) :31-38.