

# 淡豆豉中异黄酮含量测定及其抑制乙酰胆碱酯酶活性研究

张 景, 冯亭亭, 张明柱\*

河北北方学院, 张家口 075000

**摘要:** 本文对淡豆豉中异黄酮酸水解产物的乙酰胆碱酯酶抑制作用进行了研究。采用 Ellman 比色法测抑制率, UPLC 测大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木素的含量, 相关性分析筛选其药效成分。异黄酮酸水解的工艺为温度 70 °C, 3 mol/L 盐酸甲醇溶液, 水解 5 h, 对乙酰胆碱酯酶的抑制率最高, 可达到 82.37%。相关性分析表明, 淡豆豉异黄酮对乙酰胆碱酯酶的抑制率与三种苷元的浓度呈正相关的关系, 并且与总苷元的相关性最大, 达到 0.869 ( $P < 0.01$ )。淡豆豉中起乙酰胆碱酯酶抑制作用的成分可能为总异黄酮苷元部分。

**关键词:** 淡豆豉; 异黄酮; 乙酰胆碱酯酶; 抑制率

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.023

## Content Determination and Acetylcholinesterase Inhibitory Effect of Isoflavones from Fermented Soybean

ZHANG Jing, FENG Ting-ting, ZHANG Ming-zhu\*

Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

**Abstract:** To study the inhibitory ability of acid-hydrolysate of isoflavones in Fermented Soybean. The ability of acetylcholinesterase inhibitory was determined with Ellman colorimetry method. An UPLC method was established for the simultaneous determination of daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein in fermented soybean. The optimal conditions for the hydrolysis of isoflavones were found to be at 70 °C with 3 mol/L HCl methanol for 5 h, and the acetylcholinesterase inhibition rate reached 82.37%. The acetylcholinesterase inhibition rate had significant positive correlation with isoflavone aglycone ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** fermented soybean; isoflavones; acetylcholinesterase; inhibition rate

阿尔兹海默病(AD)是一种老年性大脑退行性病,是严重威胁老年人生命健康的疾病之一<sup>[1]</sup>。现代研究表明 AD 总是伴随着明显的基底胆碱能神经元损伤、SP 及纤维缠结,老年斑数量随着乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)及胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)的变化而改变<sup>[2]</sup>。现已证明胆碱酯酶抑制剂可在短期内改善 AD 病人记忆缺失以及与其相伴的神经症状<sup>[3]</sup>,但大多数存在半衰期短,严重的外周胆碱能系统副作用,不利于患者长期服用。从中药和一些特殊食物中寻找新结构的,具有适宜患者长期服用,毒副作用小的 AChE 抑制剂是当今的研究热点。

淡豆豉是由豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子和青蒿、桑叶等中药经发酵加工而

成<sup>[4]</sup>,具有解表,除烦,宣发郁热等作用。已有文献报道<sup>[5-8]</sup>发酵大豆可以改善 AD 病人的认知功能,淡豆豉对乙酰胆碱酯酶有一定的抑制作用。因此中药淡豆豉可能成为预防阿尔兹海默病的又一位重要成员,应引起足够的关注。本文采用改良的 Ellman 比色法探讨淡豆豉中异黄酮酸水解前后对 AChE 的抑制作用,进一步明确其药用成分,以期新的乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选、研发以及淡豆豉资源开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

Waters Acquity UPLCTM 超高效液相色谱仪, WD-9415D 型超声波清洗器(北京六一仪器厂), Sartorius BS224S 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司), WWD-200 型高速中药粉碎机(兰溪市伟能达电器有限公司), HH-S6 数显恒温水浴锅(金

坛市医疗仪器厂), DZF-6050 型真空干燥箱(宁波江南仪器厂), RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), TGL-20MS 台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司), Research<sup>®</sup> plus 手动移液器(上海艾本德国际贸易有限公司), UV759 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), 分液漏斗。

## 1.2 试剂

黄豆苷元对照品(批号 100347-200702)、大豆苷对照品(批号 111738-201302)、染料木素对照品(批号 111704-201302), 均购于中国食品药品检定所; 黄豆黄素对照品(批号 BW5016-20150609)、黄豆黄苷对照品(批号 BW5052-20150703)、染料木苷对照品(批号 BW5039-20150218), 均购于北京坛墨科技有限公司。乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒(南京建成生物工程研究所), AB-8 大孔树脂, 甲醇、乙腈为色谱纯(Marda 科技有限公司, 美国), 娃哈哈纯净水, 乙酸乙酯、石油醚、乙醇、盐酸、冰乙酸为分析纯。淡豆豉药材购于张家口市新兴药房, 经河北北方学院中医学院赵恒成副教授鉴定为豆科植物大豆成熟种子的发酵加工品。药材粉碎, 过 2 号筛。

## 1.3 溶液的制备

### 1.3.1 对照品溶液的制备

精密称取 6 个对照品适量, 用甲醇溶解并定容至 25 mL, 得到含大豆苷 191.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄豆黄苷 224.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、染料木苷 212.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄豆苷元 199.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄豆黄素 206.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、染料木素 134.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合对照品储备液, 再用甲醇稀释成一系列浓度的混合对照品溶液。

### 1.3.2 供试品溶液的制备

取石油醚浸泡 3 h 脱脂后淡豆豉粗粉适量, 置圆底烧瓶中, 80% 甲醇浸泡 1 h, 80  $^{\circ}\text{C}$  回流提取 2

次, 每次 1 h, 抽滤合并滤液减压浓缩。

## 1.4 紫外分光光度法测总异黄酮

精密称取染料木素对照品适量, 甲醇定容至 25 mL, 制成对照品储备液。依次吸取 20、40、50、60、80、100  $\mu\text{L}$  甲醇定容至 5 mL, 在 260 nm 处测定吸光度, 以吸光度 A 为纵坐标 Y, 相应对照品的浓度为横坐标 X, 绘制标准曲线为  $Y = 0.2234X + 0.0414$  ( $r = 0.9993$ ), 线性范围 0.539 ~ 4.043  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 1.5 异黄酮纯化方法

提取液经乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯层溶液减压浓缩成浸膏, 适量水溶解成含生药 0.5 g/mL 的溶液经 AB-8 大孔吸附树脂纯化, 最大药材上样量与树脂用量之比为 2:1, 2 BV/h 的速度上样, 反复上样 3 次后用 9 BV 的水, 2 BV/h 的速度洗脱, 弃去洗脱液, 继而用 10 BV 50% 乙醇和 9 BV 70% 乙醇以 2 BV/h 的速度洗脱, 接收洗脱液, 减压浓缩干燥, 经紫外分光光度法测定得总异黄酮的纯度为 40.6%。

## 1.6 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A 为 0.1% 冰乙酸溶液, 流动相 B 为乙腈, 线性梯度(0 ~ 1 min, 95% - 85% A; 1 ~ 4 min, 85% - 70% A; 4 ~ 8 min, 70% A; ), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长 260 nm, 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。标准品和样品色谱图见图 1。

## 1.7 方法学考察

### 1.7.1 线性关系考察

精密吸取“1.3.1”下的混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在“1.6”色谱条件下测定, 记录峰面积, 以峰面积 Y 为纵坐标, 相应的对照品浓度 X ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为横坐标, 进行回归分析, 绘制标准曲线, 见表 1。

表 1 6 种异黄酮的线性关系

Table 1 Linear relationship of 6 isoflavones

分析物 Analyte	回归方程 Regression equation	R	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
大豆苷 Daidzin	$Y = 12480X - 6741.2$	0.9993	2.876 ~ 11.504
黄豆黄苷 Glycitin	$Y = 8576.2X + 8661.8$	0.9995	2.244 ~ 8.974
染料木苷 Genistin	$Y = 17373X - 11470$	0.9998	3.192 ~ 12.766
黄豆苷元 Daidzein	$Y = 17989X - 6705$	0.9997	2.991 ~ 11.964
黄豆黄素 Glycitein	$Y = 9117.7X - 5764.8$	0.9994	3.102 ~ 12.405
染料木素 Genistein	$Y = 40848X - 16967$	0.9995	2.022 ~ 8.087

### 1.7.2 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液(大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木素的浓度分别为3.835、3.366、4.487、3.988、4.135、2.696  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )按“1.6”项下色谱条件重复进样6次,测各对照峰的面积,计算精密度,所得上述6种异黄酮峰面积的RSD值为0.8%~1.5%。确认仪器精密度良好。

### 1.7.3 稳定性实验

取室温放置的同一供试品溶液,分别在制备后0、2、4、8、12、24 h,按“1.6”项下色谱条件进样,测定6种异黄酮的峰面积,所得大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木素的峰面积的RSD值为1.2%~2.8%,表明供试品溶液在室温下24h内稳定性良好。

### 1.7.4 重复性实验

取同一供试品按“1.3.2”项下条件制备6份供试品溶液按“1.6”项下色谱条件进样测定峰面积,所得6种异黄酮峰面积的RSD值为0.64%~2.2%,表明方法的重复性良好。

### 1.7.5 加样回收率实验

称取已知含量的淡豆豉药材9份(每份约0.5g),平均分为低、中、高三组( $n=3$ ),分别加入约6种异黄酮含量的80%、100%、120%的各对照品。按“1.3.2”项下条件制备供试品溶液,“1.6”项下色谱条件进样测定峰面积,计算回收率,回收率的RSD值为0.11%~1.94%。

## 1.8 AChE 抑制活性的测定

采用改良的Ellman比色法<sup>[10]</sup>,按试剂盒操作说明于试管中加入酶液0.05 mL、样品0.5 mL、底物缓冲液0.5 mL、显色剂0.5 mL,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 准确反应6 min,加入抑制剂0.03 mL、透明剂0.1 mL,混匀,静置15 min,412 nm波长下测吸光度值,按以下公式测定抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{本底}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$ 为未添加样品溶液时的吸光度值, $A_{\text{对照}}$ 为溶液试剂代替样品时的吸光度值, $A_{\text{样品}}$ 为添加样品溶液时的吸光度值, $A_{\text{本底}}$ 为未添加酶液时样品的本底吸光度值。

本课题前期实验中采用2 mol/L盐酸甲醇溶液,70  $^{\circ}\text{C}$ 水解淡豆豉异黄酮1 h,发现水解前异黄酮对AChE的抑制率为 $36 \pm 2\%$ ,水解后的抑制率为

$75 \pm 3\%$ ,水解后抑制率明显增加。异黄酮经酸水解后由异黄酮糖苷转化为生理活性较高的异黄酮苷元,所以异黄酮中起乙酰胆碱酯酶抑制作用的成分可能是异黄酮苷元。优化酸水解条件并根据相关性分析,进一步探讨淡豆豉中异黄酮对乙酰胆碱酯酶的作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸水解法水解异黄酮

#### 2.1.1 水解温度的优化

精密称取纯化后的异黄酮粉末约50 mg,放入圆底烧瓶内,2 mol/L盐酸甲醇溶液50 mL在不同温度(50、60、70、80、90  $^{\circ}\text{C}$ )下水解1 h,抽滤除去不溶物,滤液减压浓缩干燥后用甲醇溶解,离心,取上清液定容至10 mL,适量稀释后测抑制率。如图2所示,随着温度的升高抑制率也逐渐增加,但当温度过高时抑制率反而下降,说明其中起抑制作用的物质对温度有一定的耐受性,所以选择水解温度为70  $^{\circ}\text{C}$ 。

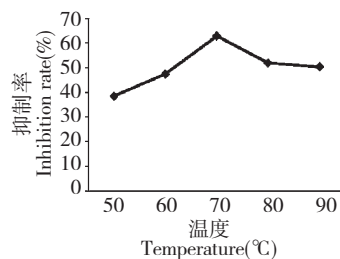


图2 不同温度水解后的抑制率

Fig. 2 Inhibition rate of different temperature hydrolysis

#### 2.1.2 盐酸浓度的优化

在5个圆底烧瓶中分别加入约50 mg的异黄酮粉末,不同浓度(1、2、3、4、5 mol/L)盐酸甲醇溶液50 mL,在70  $^{\circ}\text{C}$ 下水解1 h,抽滤除去不溶物,后续处理过程如上,抑制率测定结果如图3,随着盐酸浓度

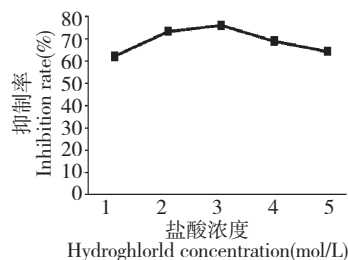


图3 不同酸浓度水解后的抑制率

Fig. 3 Inhibition rate of different concentrations of acid hydrolysis

的增加,抑制率逐渐升高,但当酸浓度过大时,抑制率降低,说明淡豆豉中起抑制作用的物质对酸也有一定的耐受性,所以选取 3 mol/L 为水解用盐酸浓度。

### 2.1.3 水解时间的优化

在 5 个圆底烧瓶中分别加入约 50 mg 的异黄酮粉末,3 mol/L 的盐酸甲醇溶液 50 mL,在 70 °C 下水解 1、2、3、4、5 h,抽滤除去不溶物,后续处理过程如上,测得抑制率结果如图 5。在水解时间为 5 h 时,抑制率最高,达到 82.37%,所以确定水解时间为 5 h,淡豆豉中的异黄酮更有效的转化为抑制乙酰胆碱酯酶的成分。

通过对温度,盐酸浓度,时间等影响酸水解的因素进行考察,最终确定水解条件为:水解温度 70 °C,盐酸甲醇浓度 3 mol/L,水解时间 5 h,在此条件下得到的乙酰胆碱酯酶抑制物浓度最高,对乙酰胆碱酯酶的抑制率最高。

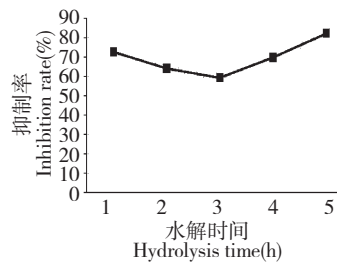


图 4 不同时间下水解后的抑制率

Fig. 4 Inhibition rate of different time hydrolysis

## 2.2 UPLC 测定异黄酮含量

采用“1.6”项下色谱条件测定在不同温度、不同盐酸浓度、不同时间下酸水解得到的大豆苷、黄豆苷、染料木苷、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木素的浓度见表 2,异黄酮水解后的色谱图如图 1,对 6 种异黄酮的浓度,总苷元的浓度与其对 AChE 抑制率的高低进行相关性分析,分析结果见表 3。

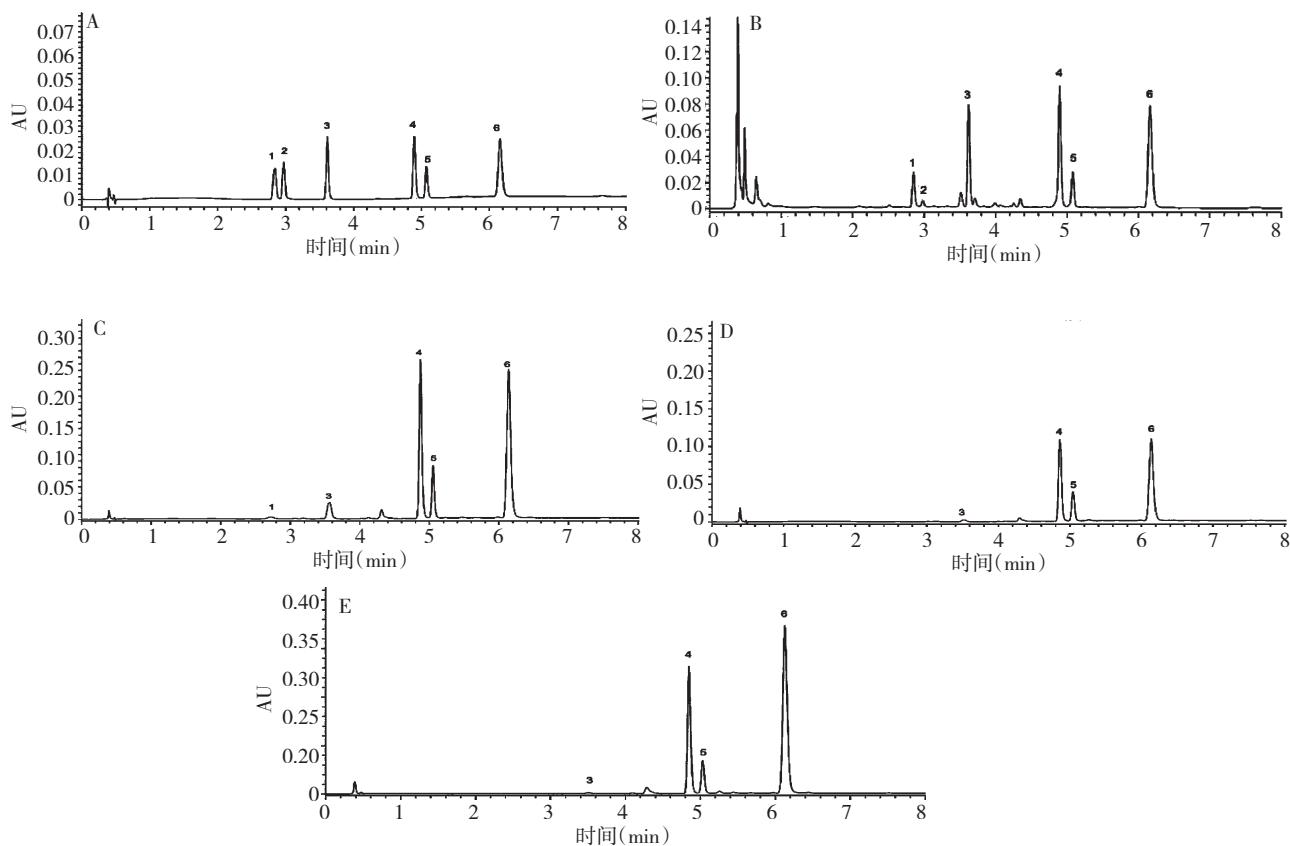


图 5 混合对照品(A)、样品溶液(B)、70 °C 水解 1 h(C)、3 mol/L 盐酸水解 1 h(D) 及水解 5 h(E) 的 UPLC 色谱图

Fig. 5 UPLC chromatograms of mixed standards (A), sample solution (B), hydrolysis of 1h by 70 °C (C) and hydrolysis of 1h by 3 mol/L hydrochloric acid (D) and hydrolysis of 5 h (E)

注:1-大豆苷;2-黄豆苷;3-染料木苷;4-黄豆苷元;5-黄豆黄素;6-染料木素

Note: 1-Daidzin; 2-Glycitin; 3-Genistin; 4-Daidzein; 5-Glycitein; 6-Genistein

表2 不同条件酸水解后各分析物的浓度 ( $n=3$ )Table 2 Concentration of each analyte by different acid hydrolysis conditions ( $n=3$ )

水解条件 Hydrolysis condition	分析物浓度 Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	大豆苷 Daidzin	黄豆黄苷 Glycitin	染料木苷 Genistin	黄豆苷元 Daidzein	黄豆黄素 Glycitein	染料木素 Genistein	总苷元 Total glycosides
50 °C	4.27	0.70	3.85	134.66	36.43	78.52	249.61
60 °C	2.21	0.22	3.50	137.85	52.32	99.52	289.67
70 °C	4.19	0	17.57	141.04	47.63	116.74	305.41
80 °C	6.54	0	13.04	127.56	40.10	131.33	298.99
90 °C	0	2.72	9.05	129.29	37.17	128.25	294.71
1 mol/L 盐酸	5.53	0	23.19	235.73	46.83	122.06	404.62
2 mol/L 盐酸	5.95	0	7.47	200.25	81.57	189.18	471.00
3 mol/L 盐酸	0	0	1.55	207.47	66.58	222.55	496.30
4 mol/L 盐酸	11.15	0	19.59	199.65	58.85	223.18	481.68
5 mol/L 盐酸	0	0	0.82	199.20	59.00	253.13	511.33
1 h	0	0	1.55	201.47	66.58	222.55	496.30
2 h	0	3.11	5.55	260.84	68.15	163.04	492.03
3 h	0	0	17.31	207.02	73.19	160.29	441.30
4 h	7.79	0	12.1	214.93	51.44	228.09	494.46
5 h	0	0	3.73	233.88	58.05	248.42	510.35

表3 相关性分析结果

Table 3 Correlation between analytical values of isoflavone content and AChE inhibition

	大豆苷 Daidzin	黄豆黄苷 Glycitin	染料木苷 Genistin	黄豆苷元 Daidzein	黄豆黄素 Glycitein	染料木素 Genistein	总苷元 Total glycosides	抑制率 Inhibition rate
大豆苷 Daidzin	1							
黄豆黄苷 Glycitin	-0.348	1						
染料木苷 Genistin	0.602 *	-0.168	1					
黄豆苷元 Daidzein	-0.131	-0.022	-0.020	1				
黄豆黄素 Glycitein	-0.214	-0.155	-0.190	0.632 *	1			
染料木素 Genistein	-0.084	-0.280	-0.280	0.607 *	0.549 *	1		
总苷元 Total glycosides	-0.121	-0.169	-0.169	0.865 **	0.741 **	0.907 **	1	
抑制率 Inhibition rate	-0.072	-0.302	-0.095	0.708 **	0.652 **	0.845 **	0.869 **	1

注: \*\* 在 0.01 水平(双侧)上显著相关; \* 在 0.05(水平双侧)上显著相关。

Note: \*\* Significant correlation at 0.01 level (bilateral); \* Significant correlation at 0.05 level (bilateral).

通过相关性分析可知,黄豆苷元、黄豆黄素、染料木素,这三种苷元类成分与抑制率的相关性较大,且总苷元 > 染料木素 > 黄豆苷元 > 黄豆黄素,总苷元与抑制率的相关性达到了 0.869 ( $P < 0.01$ ),所以对乙酰胆碱酯酶的抑制有可能是三种苷元的共同作用的结果,这也符合中药“多成分,多靶点”的作用模式。

### 3 讨论

大豆异黄酮多以结合型糖苷的形式存在,一般

认为结合型的糖苷是无活性的,异黄酮苷元是游离型的异黄酮,包括黄豆苷元、黄豆黄素、染料木素这三种物质,大量研究表明,异黄酮苷元具有较强的生物活性。本实验采用酸水解法使大豆异黄酮糖苷转化为苷元,其生理活性增强,药用价值充分体现。

通过考察温度、酸浓度、水解时间等因素对抑制率的影响,确定最佳的水解工艺为通过对水解温度、盐酸浓度、水解时间等单因素进行考察,最终确定水解条件为:水解温度 70 °C,盐酸甲醇浓度 3 mol/L,

水解时间 5 h。浓度为 510.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的总苷元,对乙酰胆碱酯酶的抑制率为 82.37%。

本实验采用改良的 Ellman 比色法体外研究淡豆豉中异黄酮对 AChE 的抑制作用,发现抑制作用主要与苷元类成分有关,且相关性总苷元 > 染料木素 > 黄豆苷元 > 黄豆黄素,总苷元与抑制率的相关性达到了 0.869 ( $P < 0.01$ ),所以异黄酮苷元对 AD 的防治可能具有良好的应用前景,可对其结构和体内药理作用进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Sun L (孙凌), Qiu X (邱霞). Research progress on the treatment of AD with Chinese and Western medicine. *Chin J Con Med* (中国疗养医学), 2015, 24: 232-234.
- 2 Chopra K. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*, 2011, 12 (3): 335-350.
- 3 Zhang Y (张于), Cheng W (程伟). Research status on treating AD in the integrative medicine. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2012, 4: 115-117.
- 4 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国

- 和国药典). Beijing: China Medicine Science Press, 2015. Vol 1, 318.
- 5 Cai B (蔡标), Wang YJ (王远金), Wang Y (王艳), et al. Effect of soybean isoflavone on acetylcholine metabolism in Alzheimer's disease rats. *J Anhui TCM Coll* (安徽中医学院学报), 2013, 32(1): 57-60.
- 6 Yang HJ, Jung DY, Moon NR. Fermenting soybeans with *Bacillus licheniformis* potentiates their capacity to improve cognitive function and glucose homeostasis in diabetic rats with experimental Alzheimer's type dementia. *Eur J Nutr*, 2015, 54: 77-88.
- 7 Song Q (宋庆), Zhang BB (张赞彬). Extraction and enrichment technique of Acetyl cholinesterase inhibitor from Dou chi. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2011, 32: 285-288.
- 8 Li G (李刚), Liang YH (梁永红), Su MS (苏明声), et al. Inhibitory ability of the extractive of fermented soybean to acetyl cholinesterase. *J Jiangxi Univ TCM* (江西中医药大学学报), 2014, 26(1): 64-66.
- 9 Ellman GL, Courteney KD, Valentino AJ, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88-95.

(上接第 336 页)

- 11 Tian YQ (田雅琴), Wang XX (王新霞), Gao LH (高丽红). On the stability of volatile oil of *Rhizoma Chuanxiong*. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2003, 37(7): 49-52.
- 12 Zhang K (张葵), Yu H (余慧), Li Q (李琼), et al. Comparison on comprehensive influences of mixed vegetable oil and white oil on skin. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2013, 3: 27-32.
- 13 Li W (李伟), Li CS (李川山), Xie J (谢军), et al. Application of fuzzy comprehensive evaluation method in the sensory

- assessment of camellia skin oil. *Grain Tech Eco*, 2012, 04, 37 (2): 47-49.
- 14 Liu SX (刘树兴), Jiao WN (焦维娜). Optimization of the processing of buckwheat tea by using orthogonal test and fuzzy comprehensive evaluation. *Food Ind*, 2013, 2: 69-71.
- 15 Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 1707-1723.