大豆活性成分析與抗老化之研究

計畫編號：CNAL94-01

子計畫(1)大豆製品中異黃酮之 ELISA 分析

計畫總主持人：范晉嘉

子計畫主持人：范晉嘉

執行機關：嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

摘要

近年來，國人罹患心血管疾病之比例日漸提高，飲食習慣是原因之一。根據報告指出，西方國家居民罹患乳癌、大腸癌和前列腺癌的機率較亞洲國家高出許多，學者們普遍認為這與東方人的飲食習慣有關，而非遺傳的影響。Lee *et al.* (1991) 的實驗結果，證明新加坡國民的大豆飲食與減少癌症風險有直接相關。大豆含豐富的營養成分及一些機能性成分，如：異黃酮、皂素 、植酸、固醇、卵磷脂等。本研究使用 ELISA 方法利用其快速、簡便、靈敏的優點分析國產大豆和市面上販售大豆之異黃酮含量。結果顯示，國產大豆種中毛豆高雄 6 號總異黃酮含量高達 47.71(μg/g FW)，是其中含量最高者。針對國產之黑豆比較發現以青仁黑豆台南 3 號總異黃酮量高於黃仁台南 5 號。在市售大豆方面，以妙鷹牌黑豆最高，達 110.56(μg/g FW)。整體而言，其中 daidzein 含量比 genistein 含量要高。將市售大豆與國產大豆做比較，發現除了妙鷹黑豆外，其黑豆的異黃酮含量低於黃豆。

前言

大豆(soybean)學名為 *Glycine max* (L.) Merrill，它屬於豆科（Leguminosae）大豆屬（*Glycine*）一年生草本植物。大豆品種甚多，依種皮顏色不同取名，包如：黃豆、黑豆皆屬大豆，而毛豆則是大豆豆莢發育至八分飽滿時採收(R6) 的鮮果莢，此時因為豆莢附有許多絨毛，因而稱之為毛豆 (吳和連，1998)。大豆含有豐富及高營養價值的蛋白質和脂質，其中蛋白質含量約為 34%，係由 18 種人體所需胺基酸構成，其中以麩氨酸 (glutamic acid)、天冬胺酸 (aspartic Acid) 及白胺酸 (leucine) 的含量較高 (Friedman, 2001)；脂肪含量約 18%，其中不飽和脂肪酸高達 86% (高，2002)；另外還含有一些微量成份，包含在約 5%的灰份中，如：鉀、磷、鈣等。大豆尚含有一些特殊的機能性成份，如：卵磷脂 (lecithin)、皂素 (saponins)、固醇 (sterols)、植酸、異黃酮 (genistein, daidzein and glycitein) 和蛋白酶抑制劑 (BBI) 等 (張，2002)。近年來許多研究證實大豆具有預防癌症的特性，尤其是與荷爾蒙有關的癌症，如：乳癌、前列腺癌及肺癌。除了抑癌作用之外，異黃酮特殊的結構使其具有雌激素的功能及具抗氧化活性等，因此異黃酮在近幾年逐漸受到重視。本研究採用免疫酵素結合分析法(ELISA)分析自台南農改場及高雄農改場提供之大豆以及市面上所販售之大豆其異黃酮含量。

材料與方法

一、試驗材料

本研究所使用的國產大豆品種有：毛豆台南選 1 號、青仁黑豆台南選 3 號、黃仁黑豆台南選 5 號、綠肥大豆台南選 6 號、毛豆高雄 5 號、毛豆高雄 6 號以及毛豆高雄 7 號。市售大豆包括：日正大豆、義美大豆、日正黑豆、政豐黑豆、妙鷹黑豆。

二、試驗方法

1. 大豆異黃酮之萃取

取大豆種子 15 g，用磨豆機磨碎。秤取 2 g 大豆粉置於 15ml 離心管，加入 10 ml n-hexane 進行脫脂，共一小時 (每 30 min 更換萃取液)。其粉末自離心管中挖出，置於秤藥盤上，使其在抽氣櫥中自然揮發風乾，待粉末風乾後，精秤 1 g，置於 15 ml 離心管中，並加入 7 ml 萃取液。均勻混合後，置於水平式震盪器上搖 1 hr 後，離心 (3000 rpm) 15 min，取上清液。其上清液經減壓濃縮後，剩下液體用氮氣吹乾，置於-20 ℃下冷凍備用。

2.ELISA 分析

96 well plate 中每一 well 加入 200μl 的 Thyr conjugates solution，4℃反應 overnight 。PBS-T-PS-DMSO buffer 37℃反應 30 min 後 PBS-T-DMSO buffer wash 3 次，每次 3 min，加入樣品和 1˚Antibody 於 37℃ 反應 2 hr， 1˚Antibody 洗掉加入 2˚ antibody 於 37℃反應 30 min 後洗掉，加 Substrate solution，室溫下反應 30 min 在加 4M H_2SO_4 中止反應並以 ELISA reader 偵測 OD 490。

3.統計分析

本研究之統計方法主要採用 SPSS 10.0 (1999)系統，使用 One Way ANOVA (analysis of variance)及 LSD (least significant difference) 分析各組間的差異性。

結果與討論

由表一得知國產大豆的總異黃酮含量以毛豆高雄 5 號較高，黃仁台南 5 號較低。另外將青仁黑豆與黃仁黑豆做比較發現其青仁黑豆之異黃酮含量較黃仁黑豆高。在市售大豆(表二)方面則以妙鷹牌黑豆之異黃酮含量位居第一，且 daidzein 含量比 genistein 含量要高。將市售大豆與國產大豆做比較發現除了妙鷹黑豆外，整體而言，黑豆的異黃酮含量低於黃豆。其中台南 1 號是國產大豆中含量最高者，與市售大豆相比仍比市售大豆來的低。

表一、國產大豆各品種之異黃酮含量

序號	品種	genistein 含量 a) (μg/g FW)	daidzein 含量 a) ((g/g FW)	異黃酮含量 b) ((g/g FW)
1	毛豆台南選 1 號 (茶豆)	3.44±0.11	8.63±0.26	12.07
2	青仁黑豆台南 3 號	3.53±0.15	6.61±0.24	10.14
3	黃仁黑豆台南 5 號	3.12±0.14	2.16±0.05	5.28
4	綠肥大豆台南 6 號	4.02±0.16	7.40±0.22	11.42
5	毛豆高雄 5 號	10.44±0.20	9.73±0.11	20.17
6	毛豆高雄 6 號	16.48±0.37	31.23±1.13	47.71
7	毛豆高雄 7 號	5.01±0.08	3.77±0.05	8.78
F valuesc)		1760.12***	1374.75***	

a) Data are means ± S.D. for 3 trials

b) Isoflavone content＝genistein + daidzein

c) Levels of significance of ANOVA; ***, significant at 0.1 %

表二、市售大豆之異黃酮含量

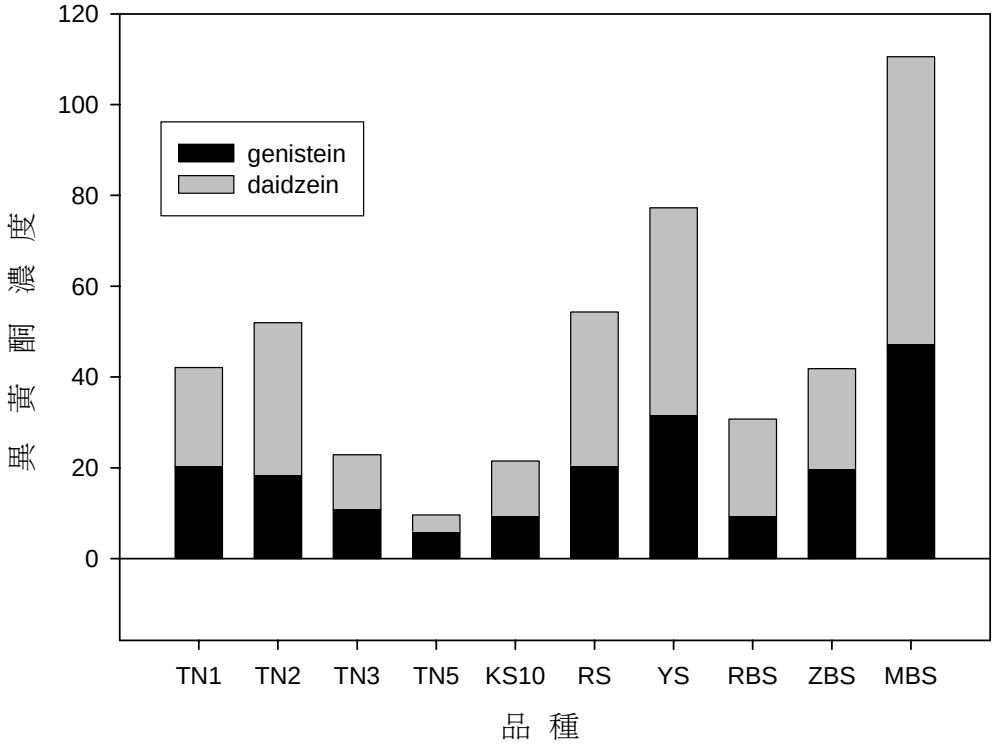
序號	材料	genistein 含量 a) ((g/g FW)	daidzein 含量 a) (μg/g FW)	異黃酮含量 b) (μg/g FW)
1	市售日正牌大豆	20.60±1.21	33.73±0.93	54.33
2	市售義美牌大豆	31.64±1.19	45.67±1.05	77.31
3	市售日正牌黑豆	9.35±0.44	21.40±0.88	30.75
4	市售政豐牌黑豆	19.81±0.45	22.03±0.54	41.84
5	市售妙鷹牌黑豆	47.25±0.80	63.31±1.78	110.56
F values[d)]		1264.18***	1387.46***	

[a)] Data are means ± S.D. for 3 trials

[b)] Isoflavone content＝genistein + daidzein

[c)] Not detected

[d)] Levels of significance of ANOVA; ***, significant at 0.1 %



圖一、 市售大豆與國產大豆之異黃酮含量比較

TN1：毛豆台南選一號 (茶豆)； TN2：大豆台南二號；
TN3：青仁黑豆台南三號; TN5：黃仁黑豆台南五號；
KS10：大豆高雄選十號； RS：市售日正牌大豆；
YS：市售義美牌大豆；RBS：市售日正牌黑豆;
ZBS：市售政豐牌黑豆； MBS：市售妙鷹牌黑豆

參考文獻

1. Messina M, Persky V, Setchell KDR, Barnes S. Soy intake and cancer risk : a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr. Cancer.*1994 ；21:113-131.
2. Kennedy AR, Wan XS.Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *The Prostate*. 2002；50:125-133.
3. Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet.*1991；337: 1197-1200.

4.林士祥、彭湘琦、簡怡雯，市售黃豆製品之主要異黃酮素含量及分布。中華民

國學會雜誌，

pp.139-146，2002。

5.江文德，簡介大豆中的異黃酮素。食品工業月刊，30：6-12，1998。

6.Houerou CL. *et al.*Syntheses of novel hapten-protein conjugates for production of

highly specific antibodies to formononetin,daidzein and genistein.*Tetrahedron*.

2000；56：295-301.

7.Bennetau-Pelissero C. *et al.*ELISA as a new method to measure genistein and daidzein

in food and human fluids.*Food Chemistry.*2003；82：645-658.