

# 黑豆之機能性成分鑑別與分析

林佩吟<sup>1</sup>、林佑勳<sup>2</sup>、王惠珠<sup>2</sup>、劉忬函<sup>3</sup>、李彥輝<sup>3</sup>、陳宏彰<sup>3</sup>、呂廷璋<sup>3,\*</sup>

## 摘要

黑豆是臺灣普遍食用的食材，富含蛋白質、脂質、膳食纖維等，是良好營養素的來源。黑豆中含有多種生理活性物質，除了熟知的大豆異黃酮外，尚有植物固醇、生育酚、皂素、類黃酮、酚酸，與花青素等植化素。進階的層析串聯質譜技術已可以進行多種植化素的譜型分析，黑豆中植物素組成態樣的譜型資料，可為品種選育、栽培管理、加工製程與品質管制上的可靠指標，利於開發機能性黑豆產品與其產業的推廣。

**關鍵詞：**黑豆、層析串聯質譜法、大豆異黃酮、大豆皂素、花青素、多酚

## 前言

大豆是臺灣重要雜糧作物之一，食用大豆製品已是國民日常飲食習慣。黑豆是大豆之一種，因黑色種皮而稱之。黃色種皮的大豆最為常見，常見大豆製品也多以黃豆製作。黑豆除了是良好蛋白質來源外，更有豐富的機能性植物性化合物。大豆異黃酮是最為熟知的一種機能性成分，其他如花青素、大豆皂素、植物固醇等，皆有許多文獻發表其對生理健康的影響。

黑豆中的植物性化合物對健康有益，

由源頭端選育出高植物性化合物含量的黑豆品種，或利用適當加工製程，移除化合物的修飾基團，皆是增加黑豆中植物性化合物的生理活性的方式。以此類植物性化合物

<sup>1</sup> 國立臺灣大學生物資源暨農學院共同儀器中心；ntuagricenter@ntu.edu.tw

<sup>2</sup> 中國文化大學生活應用科學系

<sup>3</sup> 國立臺灣大學食品科技研究所

\* 通訊作者：tjlu@ntu.edu.tw

或稱為植化素，對健康益處為訴求，有助於拓展黑豆的食用與利用價值。黑豆中的植物性化合物可以作為黑豆或黑豆製品的品質指標因子，因此有效率的分析工具，對黑豆中植物性化合物的監測實為重要。

## 黑豆中的機能物質與分析

### 1. 生育酚與生育三烯酚 Tocopherols & Tocotrienols

生育酚 (Tocopherols) 與生育三烯酚 (Tocotrienols) 結構相似，合稱為維生素 E，兩者都具有苯環結構，能對抗自由基、活性氧分子，故具有抗氧化性。生育酚有一飽和長碳鏈，而生育醇的長碳鏈結構上有三個雙鍵，抗氧化能力更勝於生育酚，對自由基的清除率，與防止脂肪過氧化能力皆高出生育酚許多 [1]。

生育酚與生育三烯酚為脂溶性化合物，常做為脂溶性抗氧化物，化合物易受光、熱、氧影響而降解。生育醇可抑制膽固醇合成酵素 HMG-CoA reductase 的活性，使膽固醇合成受到限制，對腫瘤細胞增生也有抑制效果，以其中  $\gamma$ 、 $\delta$  兩種結構的效果最佳 [2]。

生育酚與生育三烯酚的苯環結構上有不同甲基取代，形成  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四種結構。液相層析為生育酚與生育三烯酚主要分析方法，使用正向層析系統可以良好分離八種化合物，使用逆向層析系統，則有  $\beta$  與  $\gamma$  兩種結構無法有效分離的問題。雙鍵結構使生育酚與生育醇在 295 nm 有最大吸收峰，可用紫外光檢測。此外，生育酚與生育醇具有螢光特性，以 290 nm 波長激發、測定 330 nm 放射波長 [3]，使用螢光偵測受到的干擾相對少於紫外光，是靈敏度更高的光學偵測法。而以質譜儀作為分析工具藉，則可利用質量與斷片資訊，來確認化合物種類，又可同步分析其他化合物如植物固醇 [4]。生育酚、生育三烯酚的非極性結構，由於缺乏可以質子化或去質子化基團，因此以質譜儀分析時適用大氣壓下化學游離法，其感度較電灑法佳。

大豆的維生素 E 以生育酚為主，含量高低依序為  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  型態 [4]。大豆加工製品中的生育酚組成與大豆原料一致，含量可能因加工過程流失，或受其他成分稀釋而減少。生育酚脂溶性高，萃取時常伴隨在油脂內，也容易在去除油脂的過程中被除去，可以利用 C18 或 silica 材質的固相萃取匣，搭配適當流洗溶劑，提高生育酚的分析回收率 [5,6]。

## 2. 植物固醇 Phytosterols

植物固醇是三萜結構 (triterpenoid) 的植物二次代謝物，存在於植物細胞膜上，具有穩固雙層膜的作用，類似膽固醇存在動物細胞的功能。植物固醇的主體結構有  $\beta$ -sitosterol、stigmasterol、campesterol、 $\Delta$ 5-avenasterol 較為常見，ergosterol 則常見於真菌類中。植物固醇多半以結合型態存在植物體中，接上醣基為醣苷態，醣基上再接脂肪酸為酯化醣苷態，脂肪酸直接接上固醇則為酯化態。固醇結構中的雙鍵如全數被還原則為植物烷醇 (stanol)。植物固醇的結構與膽固醇類似，但於人體的吸收率約 .9 – 0.5%，遠低於膽固醇 (56%)，雙鍵被還原的烷醇類吸收率更低，如 sitostanol 約 0.04% [7]。推測固醇結構與吸收率關係，當固醇支鏈的取代基增加，以及雙鍵被還原時，都會降低該結構的吸收率 [8]。

文獻指出植物固醇有降低血膽固醇的作用 [9,10]，能夠藉由啟動細胞凋亡、延緩細胞分裂週期、抑制腫瘤細胞轉移等機制，達到抑制大腸癌、乳癌與攝護腺癌的發生 [11]。

大豆中的植物固醇主結構以  $\beta$ -sitosterol 為主要，其次為 campesterol 與 stigmasterol。大豆中自由態的固醇佔比最大，醣苷態的醣基主要是  $\beta$  形式鍵結的 glucose，酯化醣苷態的脂肪酸以 18 碳與 16 碳為主 [13]。

植物固醇存在油脂高的環境，如植物種子中。在植物油脂精鍊的過程中醣苷態易被大量去除，各型態固醇也會受到影響而降低 [12]。以微生物加工大豆，則因酵素作用，使植物固醇型態轉換。味噌醱酵過程，酯化醣苷態之脂肪酸被水解轉為醣苷態，而微生物未能將醣苷態再進一步水解，因此醱酵後比例大幅提高的是醣苷態，而非自由態 [4]。

植物固醇極性較低，最常以氣相層析為分析方法 [14]，不過因為固醇氯化不易，需要先行衍生化，使增加揮發性後才得以分析。而衍生的過程耗時，且需考量衍生化效率與有無副產物生成等問題，又酯化態、醣苷態固醇沸點太高，分析溫度需要拉高等種種問題限制，不利於使用氣相層析法分析植物固醇。以液相層析法分析植物固醇，少去樣品衍生的前置問題，分析過程無高溫破壞化合物結構的可能。在液相層析的分析系統中，正向與逆向分離系統皆可運作，但因正向層析對於極性相近的分子分析效果欠佳，逆向層析因此成為分析主力。

少數植物固醇具有共軛雙鍵結構，可用光學檢測器偵測，但大多數固醇並無特徵吸

收波長，不利以光學法偵測。蒸發光散射檢測器偵測化合物形成的懸浮顆粒，無關待測物是否有光學特性，也不受流洗動相干擾，對同類物質的偵測反應相近，對同類型化合物進行相對定量時的偏差較小 [15]，但蒸發光散射檢測器無法提供足夠的固醇定性資訊是其不足之處。質譜儀測得離子質量與結構資訊，靈敏度高，兼具定性與定量的用途。因固醇極性低，游離方式需採用大氣壓下化學游離法，此游離方式使植物固醇分子帶上電荷時會脫去一分子水，可以做為其特徵離子 [13]。各種自由態與結合態固醇在無法逐一取得標準品比對的狀態下，可由質量與離子斷片模式解析結構，辨識化合物種類。部份層析無法分離的化合物，透過質量篩選，也能與其他化合物分開各自定量。

### 3. 多酚類 Polyphenols

多酚類化合物普遍存在植物內，依照結構區分出酚酸與類黃酮兩群化合物。多酚類化合物結構具有共軛雙鍵，遇上活性氧物質、自由基等分子，會藉由雙鍵的共振效應使其穩定，此抗氧化特性可以對抗體內如脂質分子的氧化裂解，因此降低因脂質裂解產生斑塊堆積，所引起的心血管硬化疾病。

酚酸與纖維素、半纖維素、木質素等大分子形成鍵結，構建植物細胞壁，是使細胞壁堅韌、完整的重要分子 [16]。大豆中的酚酸約 8-18 種，因品種、種植環境、萃取方式等，使測得的酚酸組成樣貌與含量有所差異 [17-20]。大豆中的酚酸含量以結合態酚酸為多，而分佈則以種皮優於子葉 [21]。陳 [17] 測得游離態酚酸以 *p-coumaric acid* 為主，結合態則以 *syringic acid*、*vanillic acid* 為主。而黑豆中結合態 *protocatechuic acid* 的含量明顯，此化合物在不含花青素的黃豆中並未測得。

類黃酮是植物的二次代謝產物，異黃酮是大豆中最為人所知的一種類黃酮，黑豆的黑色種皮所含的花青素也是類黃酮之一類，種皮顏色深淺受花青素種類、含量，與葉綠素、原花青素等各種色素化合物與其分解物質存在的影響 [22]。除此之外，大豆中尚有 *quercetin*、*kaempferol* 等類黃酮 [20]，黑豆或有色大豆中以 *catechin* 為單體所聚合的原花青素，亦屬於類黃酮之一種 [23,24]。

### 4. 大豆異黃酮 Isoflavones

大豆異黃酮是大豆中最受注目的植物性化合物，常用為大豆的機能性指標成份。大豆異黃酮能減少體內細胞與遺傳物質受到氧化傷害的壓力，被認為可降低心血管疾病的

風險 [25]。根據流行病學統計數據，攝取大豆與乳癌、大腸直腸癌等癌症發生率降低有正相關 [26]。而大豆異黃酮因化合物結構與雌激素  $17\beta$ -estradiol 相似，可與雌激素受器結合，調節女性賀爾蒙分泌不足與過多問題，臨床醫學上重視其能改善更年期雌激素不足的相關徵狀 [27,28]。

大豆中異黃酮存在於胚軸中的濃度為最高，但整體而言，仍以子葉的含量為最大，種皮為最低 [29]。大豆異黃酮結構有四種形態，丙二醯態 (malonylglucoside)、乙醯態 (acetylglucoside) 與醣苷態 (glucoside)，均為帶有醣基的形式，而不帶醣基的是醣苷配基 (aglycone)。異黃酮的結構影響生理活性與人體吸收效率，大豆中的異黃酮結構以帶有醣基的為主，異黃酮醣苷配基僅佔異黃酮總量的 2% 左右 [30]。由腸道黏膜與肝臟分泌的酵素切除醣基後，不帶醣基的異黃酮糖苷配基方可被小腸黏膜吸收 [31]。部分未被吸收的異黃酮經腸道微生物代謝後，其代謝物更容易被腸道細胞吸收，也具有較強的生理活性 [32,33]。常見的大豆加工如：加熱、發芽、醱酵等，能用來改變食品中大豆異黃酮的型態，影響攝取時的生物可利用性。例如蒸煮法或烘烤法加熱，異黃酮會循不同的轉化途徑，前者主要讓 malonylglucoside 與 acetylglucoside 轉化生成 glucoside，後者則使 malonylglucoside 結構脫去  $\text{CO}_2$ ，生成 acetylglucoside [37, 38]。調整適當加工條件，可以控制異黃酮的轉化效率 [30]。利用不同微生物種類進行醱酵，其衍生物的異黃酮結構也不同，甚至成為該加工後的特有結構化合物 [34-36]。

大豆異黃酮萃取以甲醇、乙醇等醇類為常用的溶劑，考量帶有醣基的大豆異黃酮極性高，醣苷配基極性低，使用甲醇混合水溶液有良好的萃取效率 [39]。大豆異黃酮的分析多以逆向層析系統進行，各異黃酮依照極性分離，以極性最高的醣苷態為最先溶洗出，其次為丙二醯態與乙醯態，醣苷配基為最後。由於大豆異黃酮的結構具有多組雙鍵，在 250 – 300 nm 波長有特定吸收，適合以光學檢測器分析。高效液相層析儀串連光電二極體陣列檢測器是十二種大豆異黃酮最主要的分析設備，以標準化合物比對滯留時間可做定性與定量。

以微生物醱酵的黃豆製品中，因酵素系統的轉化作用，可能產生多種大豆異黃酮的代謝物，如 hydroxydaidzein、hydroxygenistein、daidzein-phosphate、genistein-phosphate 等，這類代謝物具有較高的生物可利用性，也具有特定生理活性 [40,41]，在大豆醱酵製

品中成為另一群被重視的機能性目標化合物。這類代謝物在結構的不同位置上有修飾基團，因為含量低，光學檢測器的感度不足以偵測，無法在既有的方法中同步分析。

質譜儀的靈敏度高，適用於代謝物的分析，透過斷片質量獲取結構資訊，協助於判斷代謝物種類。文獻資料顯示，目前已知大豆醱酵食品中可以找到的 OH 基修飾異黃酮，有 B 環結構 3' 位置 (3'-OH)、A 環 C6 位置 (6-OH)，與 C8 位置 (8-OH) 等三種位置異構。文獻指出 3'-OH 異黃酮修飾於 B 環，與 6-OH 或 8-OH 異黃酮修飾在 A 環位置不同，在質譜儀中所產生的碎片質量也就不同，可作為區別 [42]。而 6-OH 與 8-OH 修飾的結構斷裂碎片無法分辨，需靠層析的滯留順序分辨。以有相同分子量的 genistein、3'-OH-daidzein (3-OHD)、6-OH-daidzein (6-OHD) 與 8-OH-daidzein (8-OHD) 為例，在 C18 管柱中的流洗先後依序為：8-OHD、3'-OHD、6-OHD [4]，而 genistein 為醣苷配基極性低，滯留時間最長。利用層析做分離質譜輔助測定，是相關代謝物分析最有利的工具。

### 5. 花青素 Anthocyanins

花青素屬於類黃酮之一種，具良好的水溶性，結構與穩定性易受環境 pH 或溫度的影響，常用做天然色素 [43]。由細胞實驗結果證實 Cyanidin-3-glucoside 花青素可控制脂肪細胞功能，預防高脂肪飲食所引起的肥胖與代謝症候群 [44]。

黑豆的黑色種皮含大量花青素，自黑豆中分離純化並鑑定的花青素，多數結構帶有醣基，是花青素相對穩定的結構形式。所帶有的醣基以 glucose 為多，少數接有 galactose、arabinose、rutinose，與丙二醣基 (malonyl) 修飾的醣基，未接有醣基的花青素苷元則為少數 [45-47]。文獻中紀錄黑豆的花青素種類不盡相同，因品種等因素影響甚多。Choung [22] 等發表的研究中 cyanidin-3-glucoside 與 delphinidin-3-glucoside 是大豆中含量較高的花青素種類。Koh 等 [46] 的發表中則以 Cyanidin-3-glucoside 為多，Petunidin-3-glucoside 為次。Zhang 等 [48] 自 60 種黑豆分析出六種花青素，亦以 cyanidin-3-glucoside 為最多。統整文獻發表之黑豆花青素，大致上以 cyanidin-3-glucoside、delphinidin-3-glucoside、petunidin-3-glucoside 為主，peonidin-3-glucoside、pelargonidin-3-glucoside、malvidin-3-glucoside、cyanidin-3-galactoside 等的含量普遍偏低，因品種而異，有些品種甚至無法測得。

花青素的極性偏高，在酸性環境下較為穩定，萃取時取用酸化溶劑有助於減少結構

降解。且花青素對熱敏感，避免受高溫使結構破壞 [49]。花青素具有光學吸收特性，於 520 nm 波長下有特徵吸收。利用液相層析儀搭配紫外 – 可見光偵測器，或光二極體陣列偵測器，是化學分析花青素常用的方式。但此方法遇上有相似光吸收特性的波峰時，若無標準品可供比對，則無法判斷是否為花青素，或為其衍生化合物。近年質譜儀在分析領域較為普及後，以質譜儀作為分析工具，除了由質荷比作為判斷訊息外，透過離子斷裂的二次質譜，解讀結構資料，比傳統分析方法取得更多可定性化合物的資訊，對判斷各種衍生結構也較傳統分析方法明確且快速 [45]。

## 6. 大豆皂素 Soyasaponins

皂素 (Saponin) 為具有疏水端皂苷元 (aglycone) 與親水端醣基的兩性特性化合物，是普遍存在植物內的一種二次代謝物。大豆皂素的皂苷元為三萜結構中的  $\Delta$ 12-Oleanane type，此為三萜類皂素中具有生理活性之一類，主結構上又再細分有 Group A、B 與 E 三種類型 [50]。大豆皂素多半以結合型態存在大豆中，soyasaponins A 有乙醯基修飾為主，soyasaponins B 則有 DDMP (2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) 基團結合 [51]。目前已有 36 種大豆皂素發表於文獻中 [52,53]。

大豆皂素具有抗發炎、抗突變、抗致癌性、保護心血管與護肝等生理活性。大豆皂素利用疏水端，與體內的膽酸堆疊形成微胞，干擾膽酸的回收利用，進而促使體內消耗膽固醇用以製造新的膽酸，具有使血脂降低、減少心血管疾病風險作用 [54,55]。大豆皂素在腸道的吸收效率，以皂苷元優於帶有醣基的結構 [56]，然而結構上的醣基單體如 glucose、glucuronic acid、rhamnose 等種類繁多，要去除醣基相對不易，因此影響吸收的效率。

文獻指出大豆皂素能夠抑制發炎反應，不同結構的大豆皂素，透過不同的機制作用，如降低發炎因子、抑制酵素活性、阻礙輔助 T 細胞的增生等來抑制發炎反應。大豆皂素上的醣基、OH 基團，與醣醛酸等結構的差異，都是影響抗發炎機制的因素 [57-59]。

大豆皂素抑制癌細胞的相關研究顯示，研究大豆皂素透過改變細胞膜的結構，同時降低細胞增生的酵素活性與增加細胞分化，進而抑制人類結腸癌細胞的生長 [60] 降低了癌細胞轉移的發生率 [61,64]。皂苷元 soysapogenol B 會降低結腸癌細胞存活率與抑制其增生 [62,63]。研究顯示，隨著大豆皂素的親脂性增加，對抗結腸癌細胞生長能力亦提

高 [65]。含 B 型態為主的大豆皂素萃出物對肝癌細胞具有細胞毒性，顯著造成細胞凋亡，而含 DDMP 型態為主的大豆皂素萃出物，則會造成細胞分化與型態改變 [66]。

Soyasapogenol A 與 B 保護肝臟細胞不受黃麴毒素毒性的傷害 [67]，soyasapogenol B 具有保護細胞免於 actinomycin 引起的細胞凋亡，適合用於慢性肝炎的治療劑。僅有 B 型態的皂素，可以顯著提昇血中甲狀腺激素，延緩肝臟中脂質的過氧化 [68]。大豆皂素粗萃物，會降低酒精性急性肝損傷小鼠血液中的肝臟指標性酵素 AST、ALT，也增加體內抗氧化酵素活性，保護肝臟細胞免受脂質氧化所造成的損傷 [69,70]。

大豆中皂素含量最高者為接有 DDMP 基團修飾的 soyasaponin B，其次為無修飾基團的 soyasaponin B，再次之為乙醯基修飾 soyasaponin A。然而修飾基團在加工環境下較為不穩定，加熱或醱酵處理，都易會使修飾基團脫落，若再經過酵素作用，大豆皂素上的醯基被切除的狀況，因醱酵程度、微生物種類而有異。

早期分析大豆皂素採用薄層層析法進行分離，後來多採用高效液相層析法增加分離效能。大豆皂素的主結構於 205 nm 波長下具有吸光特性，若接上 DDMP 基團，則具有 292 nm 波長吸收特性 [71]，因此分離後可用光學偵測器測得訊號。但使用光學偵測器的不足之處在於種類繁多的大豆皂素，往往差異在其上醯基的結構不同，以光學特性無法分辨個別的差異。

採用質譜儀作為偵測工具，除了取得分析目標的分子量，透過串聯式質譜的斷裂結構質量，提供更進一步的化合物結構資訊，是兼顧定性與定量的利器。大豆皂素多半帶有醯基，理化性質帶有一定極性，適合以大氣壓下電噴灑法游離。由文獻整理大豆皂素的醯基組成，主要為 glucose、galactose、rhamnose、glucuronic acid，質譜儀訊號無法直接判斷相同分子量的醯基，如 glucose 與 galactose，但對於五碳醣、六碳醣、去氧六碳醣，以及有無乙醯化差異，可以由二次質譜的特徵斷片做判斷 [4]。大豆皂素三種皂苷元判別，在質譜圖以皂苷元脫去一分子水後的質量，為其特徵離子訊號。當不易取得完整大豆皂素標準化合物下進行分析工作，導入質譜儀作為分析工具之一，有其不易替代的優勢效益。



## 結 論

黑豆中具機能性的植物性化合物，包括花青素、酚酸、類黃酮，大豆皂素、生育酚、植物固醇等化合物，其性質橫跨了高到低的極性範圍。若採以植物性化合物的含量與種類分佈，來做為黑豆品質指標的一環，則在品種培育篩選上、加工製程上成為重要的指引。

隨著分析工具的進步，質譜儀技術的進展與其普及性，打破分析工具受化合物特性的種種限制，它有能辨別複雜樣品中的多種化合物能力，因此大大增進對植物性化合物的分析效率。質譜儀兼具可定性與定量分析特性，當能取得完整的植物性化合物組成輪廓，做為該材料的特徵圖譜，藉此反應出與其他材料的組成差異，或含量差異。對加工製程的標準化、特定組成的篩選等極為有利。黑豆作為營養價值高，又兼具有生理活性潛力的日常食材，透過完善的組成資料與合適的分析方式，黑豆應用時的品質監測，也不再只有單一化指標，而侷限其價值。

## 參考文獻

1. Packer, L. Nutrition and biochemistry of the lipophilic antioxidants, vitamin E and carotenoids. In: *Nutrition, Lipids, Health, and Disease*. Ong, A. S. H., Niki, E., Packer, L., Eds., American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, USA, 1995.
2. Qureshi, A.A.; Mo, H.; Packer, L.; Peterson, D.M. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 3130-3140.
3. Heinemann, R.J.B.; Xu, Z.; Godber, J.S.; Lanfer-Marquez, U.M. Tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol contents in Japonica and Indica subspecies of rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in Brazil. *Cereal Chem* **2008**, 85, 243-247.
4. 李婕妤。大豆與味噌中特徵化合物之生物轉換與其含量分析。2017。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。

5. Irakli, M.N.; Samanidou, V.F.; Papadoyannis, I.N. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and carotenoids in cereals after solid-phase extraction. *J Sep Sci* **2011**, 34, 1375-1382.
6. Grigoriadou, D.; Androulaki, A.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M. Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chem* **2007**, 105, 675-680.
7. Ostlund Jr, R.E.; McGill, J.B.; Zeng, C.M.; Covey, D.F.; Stearns, J.; Stenson, W.F.; Spilburg, C.A. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy  $\Delta$ 5-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2002**, 282, E911-E916.
8. Gylling, H.; Miettinen, T.A. The effect of plantstanol- and sterol-enriched foods on lipid metabolism, serum lipids and coronary heart disease. *Ann Clin Biochem* **2005**, 42, 254-263.
9. Lin, X.; Ma, L.; Racette, S.B.; Spearie, C.L.A.; Ostlund Jr, R.E. Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2009**, 296, G931-G935.
10. Lin, X.; Ma, L.; Moreau, R.A.; Ostlund Jr, R.E. Glycosidic bond cleavage is not required for phytosteryl glycoside-induced reduction of cholesterol absorption in mice. *Lipids* **2011**, 46, 701-708.
11. Bradford, P.G.; Awad, A.B. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* **2007**, 51, 161-170.
12. Piironen, V.; Lindsay, D.G.; Miettinen, T.A.; Toivo, J.; Lampi, A.M. Plantsterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* **2000**, 80, 939-966.
13. 蘇鼎元。糙米及豆類中不同型態植物固醇同步分析方法之建立。2012。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
14. Abidi, S.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J Chromatogr A* **2001**, 935, 173-201.
15. Young, C.S.; Dolan J.W. Success with evaporative light-scattering detection, part II: Tips and techniques. *LC-GC Europe* **2004**, 17, 192-199.

16. Katapodis, P.; Vardakou, M.; Kalogeris, E.; Kekos, D.; Macris, B.J.; Christakopoulos, P. Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan. *Eur J Nutr* **2003**, 42, 55-60.
17. 陳宏權。建立黑豆植化素指紋圖譜分析平台。2017。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
18. Alu'datt, M.H.; Rababah, T.; Ereifej, K.; Alli, I. Distribution, antioxidant and characterization of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chem* **2013**, 139, 93-99.
19. Kim, M.Y.; Jang, G.Y.; Lee, Y.; Li, M.; Ji, Y.M.; Yoon, N.; Lee, S.H.; Kim, K.M.; Lee, J.; Jeong, H.S. Free and bound form bioactive compound profiles in germinated black soybean (*Glycine max* L.). *Food Sci Biotechnol* **2016**, 25, 1551-1559.
20. Lee, S.J.; Kim, J.J.; Moon, H.I.; Ahn, J.K.; Chun, S.C.; Jung, W.S.; Lee, O.K.; Chung, I.M. Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, 2751-2758.
21. Peng, H.; Li, W.; Li, H.; Deng, Z.; Zhang, B. Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycine max* (L.) merr). *J Funct Food* **2017**, 32, 296-312.
22. Choung, M.G.; Baek, I.Y.; Kang, S.T.; Han, W.Y.; Shin, D.C.; Moon, H.P.; Kang, K.H. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J Agric Food Chem* **2001**, 49, 5848-5851.
23. Ito, C.; Oki, T.; Yoshida, T.; Nanba, F.; Yamada, K.; Characterisation of proanthocyanidins from black soybeans: Isolation and characterization of proanthocyanidin oligomers from black soybean seed coats. *Food Chem* **2013**, 141, 2507-2512.
24. Todd, J.J.; Vodkin, L.O. Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development. *Plant Physiol* **1993**, 102, 663-670.
25. Foti, P.; Erba, D.; Riso, P.; Spadafranca, A.; Criscuoli, F.; Testolin, G. Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. *Arch*

*Biochem Biophys* **2005**, 433, 421-427.

26. Adlercreutz, H.; Honjo, H.; Higashi, A.; Fotsis, T.; Hämäläinen, E.; Hasegawa, T.; Okada, H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr* **1991**, 54, 1093-1100.
27. Howes, L.G.; Howes, J.B.; Knight, D.C. Isoflavone therapy for menopausal flushes: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas* **2006**, 55, 203-211.
28. Arjmandi, B.H.; Smith, B.J. Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. *J Nutr Biochem* **2002**, 13, 120-137.
29. Genovese, M.I.; Lopes Barbosa, A.C.; Pinto, M.D.; Lajolo, F.M. Commercial soy protein ingredients as isoflavone sources for functional foods. *Plant Food Hum Nutr* **2007**, 62, 53-58.
30. Wang, H.J.; Murphy, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa - effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem* **1994**, 42, 1674-1677.
31. Day, A.J.; DuPont, M.S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M.J.C.; Morgan, M.R.A.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett* **1998**, 436, 71-75.
32. Decroos, K.; Eeckhaut, E.; Possemiers, S.; Verstraete, W. Administration of equol-producing bacteria alters the equol production status in the simulator of the gastrointestinal microbial ecosystem (SHIME). *J Nutr* **2006**, 136, 946-952.
33. Kostelac, D.; Rechkemmer, G.; Briviba, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors and to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 7632-7635.
34. Klus, K.; Borger-Papendorf, G.; Barz, W. Formation of 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (factor 2) from soybean seed isoflavones by bacteria isolated from tempe. *Phytochem* **1993**, 34, 979-981.
35. Esaki, H.; Onozaki, H.; Kawakishi, S.; Osawa, T. New antioxidant isolated from tempeh. *J Agric Food Chem* **1996**, 44, 696-700.

36. Toda, T.; Tamura, J.; Okuhira, T. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan* **1997**, 172, 83-89.
37. Chang, S.K.C. Isoflavones from soybeans and soy foods. In: *Functional foods: biochemical & processing aspects*. Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M. Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2002; Vol. 2.
38. Lai, H.M.; Lin, P.Y. Thermal effects on the conversion of isoflavones in soybean. In *Chemistry, Texture, and Flavor of Soy*; Cadwallader, K.R., Chang, S.K.C., Eds.; A.C.S. Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2010; Chapter 11, pp. 171-187.
39. Tsai, H.S.; Huang, L.J.; Lai, Y.H.; Chang, J.C.; Lee, R.S.; Chiou, R.Y.Y. Solvent effects on extraction and HPLC analysis of soybean isoflavones and variations of isoflavone compositions as affected by crop season. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, 7712-7715.
40. Chang, T.S. Isolation, bioactivity, and production of *ortho*-hydroxydaidzein and *ortho*-hydroxygenistein. *Int J Mol Sci* **2014**, 15, 5699-5716.
41. Wang, S.T.; Chang, H.S.; Hsu, C.; Su, N.W. Osteoprotective effect of genistein 7-*O*-phosphate, a derivative of genistein with high bioavailability, in ovariectomized rats. *J Funct Food* **2019**, 58, 171-179.
42. Kuhn, F.; Oehme, M.; Romero, F.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R. Differentiation of isomeric flavone/isoflavone aglycones by MS2 ion trap mass spectrometry and a double neutral loss of CO. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, 17, 1941-1949.
43. Cisse, M.; Vaillant, F.; Acosta, O.; Dhuique-Mayer, C. Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the Arrhenius, eyring, and ball models. *J Agric Food Chem* **2009**, 57, 6285-6291.
44. Tsuda, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *J. Agric. Food Chem* **2008**, 56, 642-646.
45. Lee, J.H.; Kang, N.S.; Shin, S.O.; Shin, S.H.; Lim, S.G.; Suh, D.Y.; Baek, I.Y.; Park, K.Y.; Ha, T.J. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-

DAD-ESI/MS analysis. *Food Chem* **2009**, 112, 226-231.

46. Koh, K.; Youn, J.E.; Kim, H.S. Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. *J Food Sci Technol* **2014**, 51, 377-381.
47. Kim, E.H.; Lee, O.K.; Kim, J.K.; Kim, S.L.; Lee, J.; Kim, S.H.; Chung, I.M. Isoflavones and anthocyanins analysis in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) from three different planting locations in Korea. *Field Crops Res* **2014**, 156, 76-83.
48. Zhang, R.F.; Zhang, F.X.; Zhang, M.W.; Wei, Z.C.; Yang, C.Y.; Zhang, Y.; Tang, X.J.; Deng, Y.Y.; Chi, J.W. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties. *J Agric Food Chem* **2011**, 59, 5935-5944.
49. Navas, M.J.; Jiménez-Moreno, A.M.; Bueno, J.M.; Sáez-Plaza, P.; Asuero, A.G. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part IV: extraction of anthocyanins. *Anal Chem* **2012**, 42, 313-342.
50. Takada, Y.; Sayama, T.; Kikuchi, A., Kato, S., Tatsuzaki, N., Nakamoto, Y., Suzuki, A.; Tsukamoto, C.; Ishimoto, M. Genetic analysis of variation in sugar chain composition at the C-22 position of group A saponins in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Breeding Sci* **2010**, 60, 3-8.
51. Decroos, K.; Vincken, J.P.; Heng, L.; Bakker, R.; Gruppen, H.; Verstraete, W. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* **2005**, 1072, 185-193.
52. Wu, X.; Kang, J. Phytochemicals in soy and their health effects. In *Phytochemicals – Bioactivities and Impact on Health*. Rasooli, I. Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2011; pp. 43-76.
53. Kang, J.; Badger, T.M.; Ronis, M.J.J.; Wu, X. Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. *J Agric Food Chem* **2010**, 58, 8119-8133.

54. Oakenfull, D.G.; Topping, D.L.; Illman, R.J.; Fenwick, D.E. Prevention of dietary hypercholesterolaemia in the rat by soya bean and quillaja saponin. *Nutr Rep Intl* **1984**, 29, 1039-1049.
55. Topping, D.L.; Storer, G.B., Calvert, G.D., Illman, R.J., Oakenfull, D.G.; Weller, R.A. Effect of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, plasma lipids, and lipoprotein turnover in the pig. *Am J Clin Nutr* **1980**, 33, 783-786.
56. Kamo, S.; Suzuki, S.; Sato, T. Comparison of bioavailability (I) betweensoyasaponin andsoyasapogenols, and (II) between group A and B soyasaponins. *Nutr* **2014**, 30, 596-601.
57. Guang, C.; Chen, J.; Sang, S.; Cheng, S. Biological functionality of soyasaponins and soyasapogenols. *J Agric Food Chem* **2014**, 62, 8247-8255.
58. Zha, L.; Mao, L.; Lu, X.; Deng, H.; Ye, J.; Chu, X.; Sun, S.; Luo, H. Anti-inflammatory effect of soyasaponins through suppressing nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by attenuation of NF- $\kappa$  B-mediated nitric oxide synthase expression. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 21, 2415-2418.
59. Lee, I.; Park, Y.; Joh, E.; Kim, D. Soyasaponin Ab ameliorates colitis by inhibiting the binding of lipopolysaccharide (L.P.S.) to Toll-like receptor (T.L.R.) 4 on macrophages. *J Agric Food Chem* **2011**, 59, 13165-13172.
60. Tsai, C.; Chen, Y.; Chien, Y.; Huang, W.; Lin, S. Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* **2010**, 16, 3371-3376.
61. Ellington, A.A.; Berhow, M.; Singletary, K.W. Induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 159-167.
62. Hu, J.; Reddy, M.B.; Hendrich, S.; Murphy, P.A. Soyasaponin I and saponenol B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavailability in women, *J Nutr* **2004**, 134, 1867-1873.
63. MacDonald, R.S.; Guo, J.; Copeland, J.; Browning, J.D.; Slepser, D.; Rottinghaus, G.E.; Berhow, M.A. Environmental influence on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J Nutr* **2005**, 135, 1239-1242.

- 64.Kang, J.; Han, I.; Sung, M.; Yoo, H.; Kim, Y.; Kim, J.; Kawada, T.; Yu, R. Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2. *Cancer Lett* **2008**, 261, 84-92.
- 65.Gurfinkel, D.; Rao, A. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr Cancer* **2003**, 47, 24-33.
- 66.Zhang, W.; Yeo, M.; Tang, F.; Popovich, D.G. Bioactive responses of Hep-G2 cells to soyasaponin extracts differs with respect to extraction conditions. *Food Chem Toxicol* **2009**, 47, 2202-2208.
67. Kuzuhara, H.; Nishiyama, S.; Minowa, N.; Sasaki, K. Effects of triterpene compounds on cytotoxicity, apoptosis, and immune response in cultured cells. *J Nat Med* **2006**, 60, 113-120.
- 68.Ishii, Y.; Tanizawa, H. Effects of soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones. *Biol Pharm Bull* **2006**, 29, 1759-1763.
- 69.Ohminami, H.; Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S. Effect of soyasaponins on liver injury induced by highly peroxidized fat in rats. *Planta Medica* **1984**, 50, 440-441.
- 70.Yang, X.; Dong, C.; Ren, G. Effect of soyasaponins-rich extract from soybean on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *J Agric Food Chem* **2011**, 59, 1138-1144.
- 71.Hubert, J.;Berger, M.; Daydé, J. Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, 3923-3930.



# Identification and analysis of bioactive components in black soybean

Pei-Yin Lin<sup>1</sup>, You-Xun Lin<sup>2</sup>, Hui-Zhu Wang<sup>2</sup>, Yu-Han Liu<sup>3</sup>, Yan-Hui Li<sup>3</sup>,  
Hong-Zhang Chen<sup>3</sup>, Ting-Jang Lu<sup>3,\*</sup>

## Abstract

Rice grain is a nutritious food source, especially its bran layer. It possesses abundant phytochemicals, such as -oryzanol, tocopherols and tocotrienols. The rice whole grain, namely brown rice, is rich in minerals and dietary fiber, which is worth recommending for daily diet. In the past, in Taiwan, there were many breeders working on rice breeding by interspecific hybridization with varieties of Indica and Japonica. One of the key breeding criteria was the sensory evaluation of the cooked rice. Nowadays many brand-new cultivars produced have become representatives of High-Quality Rice in Taiwan. Among them, 13 cultivars of brown and white rice samples were employed for the analysis of estimated glycemic index. Results showed that the brown and white rice of the TCS10 rice cultivar (both belonged to the low GI level in the human study) were low and medium GI food, respectively. All brown rice samples of the thirteen cultivars were evaluated as low GI rating.

**Keywords:**rice, whole grain nutrition, glycemic index

---

<sup>1</sup> Joint Center for Instruments and Researches, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.; ntuagricenter@ntu.edu.tw

<sup>2</sup> Department of Applied Science of Living, Chinese Culture University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

<sup>3</sup> Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

\* Correspondence: tjlu@ntu.edu.tw