

反相高效液相制备色谱法分离淡豆豉中的大豆苷、黄豆苷、染料木苷

曲丽萍, 范国荣, 宓鹤鸣*, 孙 亮

(第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 建立一种快速、高效地从淡豆豉的乙醇提取物中分离 3 种大豆异黄酮苷的方法。**方法:** 采用索氏提取除去脂溶性成分, 再经 1300 型大孔吸附树脂初步分离纯化, 分别用水、10%、20%、30%、40%、50%、70%、95% 乙醇梯度洗脱, 其中对 40% 乙醇洗脱流分采用反相高效液相色谱法制备, 色谱条件: YWG C₁₈ 柱(10.0 mm × 200 mm, 10 μm), 进样量 750 μl, 乙腈-水-冰醋酸(25 : 75 : 1, V/V/V) 为流动相, 流速 3.0 ml/min, 检测波长 260 nm。**结果:** 快速分离得到大豆苷、黄豆苷和染料木苷, 经外标法检测, 所得化合物纯度均达到 99% 以上。**结论:** 该方法操作简便, 可重复进样, 适用于高纯度大豆异黄酮苷的制备。

[关键词] 色谱法, 高效液相; 淡豆豉; 大豆苷; 黄豆苷; 染料木苷

[中图分类号] R 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0325-02

Separation of soybean isoflavone glucosides from *Semen Sojæ Praeparatum* by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography

QU Li-ping, FAN Guo-rong, MI He-ming*, SUN Liang (Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To search for a rapid and efficient method for the isolation of 3 kinds of isoflavone glucosides from the ethanol extract of *Semen Sojæ Praeparatum*. **Methods:** The crude isoflavones were extracted by 75% aqueous ethanol after removing the oil by Soxhlet extraction. Then 1300 macroporous resin, water and different concentrations of aqueous ethanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, and 95%) were used to separate and elute the crude isoflavones. The fraction eluted by 40% aqueous ethanol was subjected to preparative HPLC analysis. The chromatographic conditions: A YWG C₁₈ (10.0 mm × 200 mm, i. d. 10 μm) column was used; the mobile phase consisted of acetonitrile-water-acetic acid at volume ratio of 25 : 75 : 1 (V/V/V) and a flow rate of 3.0 ml/min; the injection volume was 750 μl; and the detection wave length was set at 260 nm. **Results:** Daidzin, glycitin and genistin were rapidly separated with the purities over 99% as determined by external standard HPLC. **Conclusion:** This technique is simple and suitable for the isolation of daidzin, glycitin and genistin from *Semen Sojæ Praeparatum*.

[KEY WORDS] chromatography, high performance liquid; *Semen Sojæ Praeparatum*; daidzin; glycitin; genistin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 325-326]

淡豆豉(*Semen Sojæ Praeparatum*)为常用中药,为《中国药典》记载药材,具有解表除烦、宣发郁热等功效。大豆异黄酮(soybean isoflavones)是其主要活性成分之一,具有抗癌抗癌、防治心血管疾病、治疗妇女更年期综合征等多种药理作用^[1-3]。基于其多种药理活性,大量的制备其单体化合物是非常有必要的。研究者从天然产物中分离纯化大豆异黄酮的方法主要有硅胶柱色谱法、聚酰胺色谱法和高速逆流色谱法等^[4-6],本研究采用制备型反相高效液相色谱法(RP-HPLC)从淡豆豉中分离异黄酮苷单体,得到了大豆苷、黄豆苷和染料木苷,该法简便易行,产物纯度高。

1 仪器和试剂

Waters 制备型高效液相色谱仪,包括 515 泵和 2487 检测器。SHIMADZU-10A 分析型高效液相色谱仪,包括 LC-10AD VP 泵、SPD-10A VP 检测器、TO-10AS VP 柱温箱,所用色谱工作站均为 N2000 型(浙江大学智能信息研究所)。

大豆苷、黄豆苷和染料木苷对照品含量均 ≥ 99% (中国

药品生物制品检定所)。甲醇和乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),其余所用试剂均为分析纯。大孔树脂为 1300 型(上海医药工业研究院)。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 分析色谱 Lichrospher C₁₈ (6.0 mm × 150 mm, 5 μm) 分析色谱柱, 甲醇-水-冰醋酸(40 : 60 : 1, V/V/V) 为流动相, 流速 1.0 ml/min, 进样量 20 μl, 检测波长 260 nm。

2.1.2 制备色谱 YWG C₁₈ 柱(10.0 mm × 200 mm, 10 μm) 制备色谱柱, 乙腈-水-冰醋酸(25 : 75 : 1, V/V/V) 为流动相, 流速 3.0 ml/min, 进样量 750 μl, 检测波长 260 nm。

[基金项目] 上海市科技发展基金(02DZ19111)。Supported by Foundation for Science and Technology Development of Shanghai Municipal Government(02DZ19111)。

[作者简介] 曲丽萍, 硕士。

* Corresponding author. E-mail: mixiao0519@msn.com

2.2 粗提物的制备 淡豆豉药材烘干至恒重,粉碎后过筛,称取 500 g 置于索氏提取器中,用 2 000 ml 石油醚水浴回流抽提 8 h,除去其中脂溶性成分。取脱脂烘干的药材,用 7 000 ml 75%的乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并提取液,减压浓缩得浸膏 200 ml。浸膏加水 200 ml 混悬后,进行 1300 大孔树脂(树脂量:药材量=1:1)柱层析。依次用水、10%、20%、30%、40%、50%、70%、95%乙醇梯度洗脱,每个梯度洗脱体积为 1 000 ml,收集各梯度洗脱液并按 2.1.1 分析色谱条件进行 HPLC 检测,经标准品对照显示:水和低浓度乙醇洗去极性较强的杂质成分;40%乙醇洗脱流分中含有目标化合物,分离良好,适合液相色谱制备(见图 1A);70%乙醇洗脱流分中主要有游离型大豆异黄酮苷元;95%乙醇洗脱主要用于解析树脂吸附的弱极性组分。

2.3 纯度分析 制备所得流分减压浓缩后真空干燥,得白色和浅黄色粉末。取各粉末适量甲醇溶解后按 2.1.1 分析色谱条件进行 HPLC 分析,结果与标准品大豆苷、黄豆苷和染料木苷对照色谱保留行为完全一致,外标法检测纯度均高于 99%(图 1B、1C、1D)。

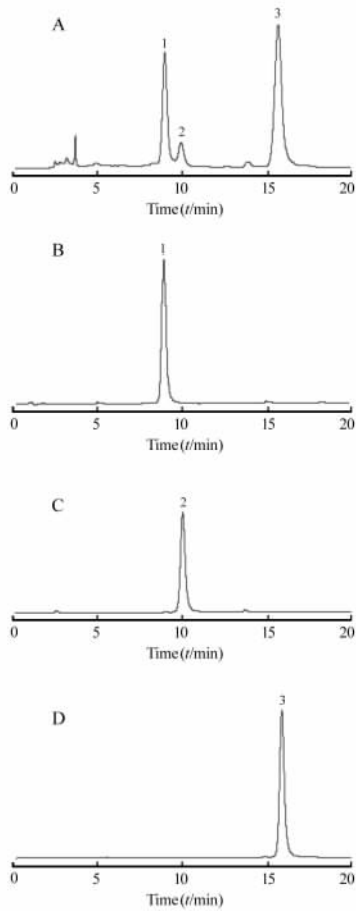


图 1 淡豆豉粗提物及制备流分纯度检测 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of crude extract and purity determination of fraction obtained by preparative HPLC
A: Crude extract of 40% aqueous ethanol; B: Fraction I; C: Fraction II; D: Fraction III; 1: Daidzin; 2: Glycitin; 3: Genistin

3 结果和讨论

在制备分离过程中,考察了不同流动相组成包括甲醇-水、乙腈-水对分离效果的影响;此外也考察了不同流速(2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml/min)和不同进样量(250、500、750、1 000 μ l)对分离效果的影响。结果表明:流速较低时,虽然分离较好,但出峰时间较长(>60 min),流速过高,大豆苷和黄豆苷峰不能达到良好分离。进样量较少时,虽然可以达到较好分离,但一次制备量少,需多次进样;进样量过大,由于大豆苷相对含量较高,峰形容易扩展而引起交叉干扰。流动相中加少量醋酸可以明显改善峰形。因此本研究中以乙腈-水-醋酸(25:75:1)为流动相,流速 3.0 ml/min,进样 750 μ l 时大豆苷、黄豆苷和染料木苷能达到较好分离,制备色谱图见图 2。

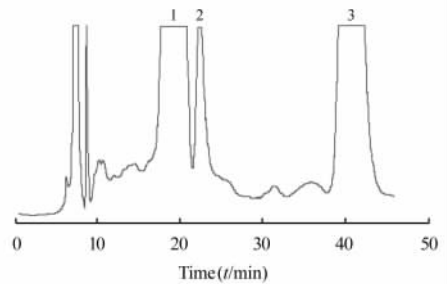


图 2 淡豆豉中异黄酮苷的 HPLC 制备色谱图

Fig 2 Preparative HPLC chromatogram of isoflavone glucosides from *Semen Sojae Praeparatum*
1: Daidzin; 2: Glycitin; 3: Genistin

本研究建立了用反相制备高效液相色谱法从淡豆豉中分离纯化异黄酮苷的方法。制备的 3 种异黄酮苷纯度均达到 99% 以上,符合标准物质的质量要求。

[参考文献]

- [1] 毛峻琴, 宓鹤鸣. 大豆异黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31: 61-64.
- [2] Lee CH, Yang L, Xu JZ, et al. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides [J]. Food Chem, 2005, 90: 735-741.
- [3] Guo JM, Xiao BX, Liu DH, et al. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42: 1641-1646.
- [4] 汪海波, 刘大川. 大豆胚芽甲醇提取物中大豆皂甙、大豆异黄酮分离纯化工艺的研究[J]. 食品科学, 2001, 22: 40-44.
- [5] Yang FQ, Ma Y, Ito Y. Separation and purification of isoflavones from a crude soybean extract by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2001, 928: 163-170.
- [6] Du QZ, Li ZH, Ito Y. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2001, 923: 271-274.

[收稿日期] 2005-09-08

[修回日期] 2006-01-11

[本文编辑] 尹 荼