

## 反相高效液相色谱法制备纯化大豆异黄酮糖苷

杨学东<sup>1</sup>, 邓志成<sup>1,4</sup>, 王 晶<sup>2</sup>, 丁明玉<sup>3</sup>

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 国家标准物质研究中心, 北京 100013;  
3. 清华大学化学系, 北京 100084; 4. 国家纳米技术产业化基地, 天津 300457)

**摘要** :利用制备高效液相色谱法从大豆总异黄酮提取物中制备出了3种大豆异黄酮糖苷。在 Nova-Pak HR C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 25 mm i. d. , 6 μm)上,以甲醇-体积分数为0.1%的乙酸水溶液(体积比为23:77)为流动相,流速为20 mL/min,采用等度洗脱方式,制备了3种大豆异黄酮糖苷,经质谱分析,确认它们分别为大豆苷、黄豆苷和染料木苷。高效液相色谱分析表明,所制备的3种化合物的纯度均达到了99%以上。

**关键词** :制备高效液相色谱法;大豆异黄酮;葡萄糖苷;大豆

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)04-0363-04 栏目类别 :研究论文

## Preparation of Soybean Isoflavone Glucosides by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

YANG Xuedong<sup>1</sup>, DENG Zhicheng<sup>1,4</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, DING Mingyu<sup>3</sup>

(1. College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. National Research Center for CRM 'S, Beijing 100013, China; 3. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 4. Nanotechnology Industrialization Base of China, Tianjin 300457, China)

**Abstract** : A method was established for the isolation of soybean isoflavone glucosides from the total isoflavone extracts of soybean using preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The total isoflavone extracts were separated into four parts by solvent extraction, those are the ethyl acetate extract, butanol extract, precipitate (D4), and the remaining aqueous phase. The part D4 containing soybean isoflavone glucosides was acquired and subjected to preparative HPLC for the isolation of target components. A preparative Nova-Pak HR C<sub>18</sub> column (100 mm × 25 mm i. d., 6 μm) was used in the preparation process. By isocratic elution with methanol-0.1% aqueous acetic acid (23:77, v/v) as the mobile phase at a flow rate of 20 mL/min, followed by concentration and desalination, three soybean isoflavone glucosides were obtained and subsequently identified by mass spectrometry as daidzin, glycitin, and genistin. HPLC analysis showed that the purities of the three soybean isoflavone glucosides were all higher than 99%.

**Key words** : preparative high performance liquid chromatography; soybean isoflavones; glucosides; soybean

大豆(Soybean)是豆科植物大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 的成熟种子,大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次生代谢产物,其结构与雌激素相似,是一类植物雌激素。大豆异黄酮有多方面的药理活性,包括抗癌、预防和治疗心血管疾病、预防和治疗骨质疏松和更年期综合征以及免疫调节作用。大豆异黄酮在防治癌症、降低血脂、抗动脉粥样硬化症等方面有很好的疗效,在激素替代治疗、激素依赖性肿瘤以及其他肿瘤的防治方面

有着广阔的应用前景。目前,以大豆总异黄酮或大豆异黄酮提取物为功效成分的保健食品或功能食品已被陆续开发出来。

大豆中天然存在的异黄酮主要有12种,可以分为3类,即大豆苷类(daidzin group)、染料木苷类(genistin group)和黄豆苷类(glycitin group),它们分别以游离型、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型和丙二酰基葡萄糖苷型4种形式存在,其结构式见图1和图2。其中大豆苷(daidzin)、染料木苷(genis-

tin)和黄豆苷(glycitin)是大豆异黄酮的主要存在形式。

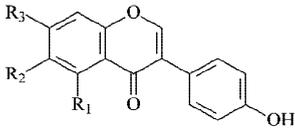


图 1 3 种大豆异黄酮苷元的结构

Fig. 1 Structures of three soybean isoflavone aglucones

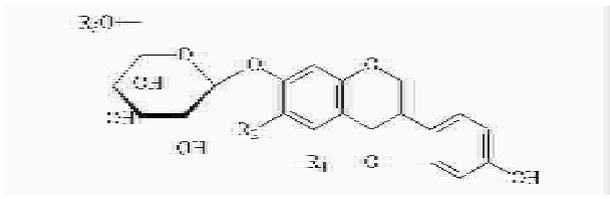


图 2 9 种大豆异黄酮糖苷的结构

Fig. 2 Structures of nine soybean isoflavone glucosides

关于大豆异黄酮的报道主要集中于大豆异黄酮的生物活性、总异黄酮的提取和精制、异黄酮成分的鉴定和定量测定以及体内代谢研究方面。大豆异黄酮的分析方法很多<sup>[1-3]</sup>,其中高效液相色谱法(HPLC)是目前应用最为广泛的大豆异黄酮成分测定方法,具有测定样品范围广、样品制备较为简单、分离效率高、灵敏度好、测定结果准确等优点<sup>[4-5]</sup>。HPLC与质谱(MS)联用是大豆异黄酮成分快速鉴定和定量的最佳方法,对于大豆异黄酮成分的体内代谢研究起到了重要作用<sup>[6-7]</sup>。大豆异黄酮的制备研究主要集中于以产品为导向的总异黄酮的提取分离和精制<sup>[8-12]</sup>。大豆异黄酮各成分的分离制备研究文献报道较少,采用常规硅胶、聚酰胺或凝胶柱色谱反复分离,可以实现对部分成分的分离,但由于大豆异黄酮的溶解度低使这些方法的效率很低、成分易发生变化<sup>[13-15]</sup>;采用高速逆流色谱法结合溶剂萃取可以实现大豆异黄酮各成分的分离制备,大容量分离柱可以得到较为满意的效果,但制备效率仍然受到样品溶解度和仪器性能的限制<sup>[16-18]</sup>。为了获得用于大豆异黄酮类保健食品质量分析和质量控制

的对照品,我们开展了大豆异黄酮标准物质的研究。本文利用制备 HPLC 结合溶剂萃取和离心脱盐技术同时制备出了大豆苷、黄豆苷和染料木苷这 3 种大豆异黄酮糖苷的单体,纯度均达到 99% 以上。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Waters Prep LC 4000 制备型高效液相色谱仪,配 Waters 2487 双波长紫外-可见分光光度检测器(美国 Waters 公司);HP 1100 分析型高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD)(美国 Agilent 公司);Finnigan LCQ Advantage Max 质谱仪(美国 Finnigan 公司)。

甲醇和乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),水为 Milli-Q 超纯水,其他试剂均为分析纯。大豆总异黄酮提取物购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,其中总异黄酮含量为 40%。

### 1.2 色谱条件

分析型高效液相色谱条件 (1)分析色谱柱 Nova-Pak C<sub>18</sub>(150 mm × 3.9 mm i. d., 4 μm);流动相 I 为 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH 5)-甲醇-乙腈(体积比为 40:40:20)混合液,流动相 II 为 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH 5)-甲醇(体积比为 80:20)混合液;梯度洗脱程序为 5% I  $\xrightarrow{30 \text{ min}}$  45% I  $\xrightarrow{15 \text{ min}}$  60% I  $\xrightarrow{5 \text{ min}}$  100% I;流速为 0.8 mL/min。检测波长 260 nm,进样体积 3 μL。(2)分析色谱柱 Zorbax Extend-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm);流动相为甲醇-水(体积比为 30:70)混合液;流速 0.8 mL/min;检测波长 260 nm;进样体积 5 μL。

制备型高效液相色谱条件 制备色谱柱 Nova-Pak HR C<sub>18</sub>(100 mm × 25 mm i. d., 6 μm);流动相为甲醇-体积分数为 0.1% 的乙酸水溶液(体积比为 23:77);流速 20 mL/min;检测波长 260 nm;进样体积 1 mL。

### 1.3 质谱条件

采用电喷雾电离源(ESI),正离子和负离子扫描,质量范围 120 ~ 1 500 u;将样品溶于甲醇中,采用注射泵进样方式,流速 3 μL/min。高纯氮气流量 0.15 MPa;毛细管温度 200 °C,电压 10 V;电喷雾电压 ±4.5 kV。碰撞诱导解离(CID)能量根据测定结果调整,一般为 30 ~ 40 eV。

### 1.4 样品处理

取大豆总异黄酮提取物 600 g,在研磨下水混匀成混悬液。依次以乙酸乙酯、水饱和和正丁醇萃取。由于用水饱和和正丁醇萃取时不能分层,故每次萃取

完成后采用抽滤的方法将其分为滤饼和滤液两个部分。滤饼以新鲜的水饱和和正丁醇研磨混匀,再与水相充分分配后再抽滤。这样重复操作5次。最后,经高效液相色谱分析确定抽滤后得到的滤饼(D4,150 g)为含目标成分部分,此部分用于高效液相色谱制备。其余三部分(包括乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水部分)含有其他几种大豆异黄酮,另作研究。

称取D4部分5 mg,用甲醇超声溶解后定容至10 mL,取样进行HPLC分析,所用色谱条件见“1.2”节中分析型HPLC条件(1),色谱图见图3。

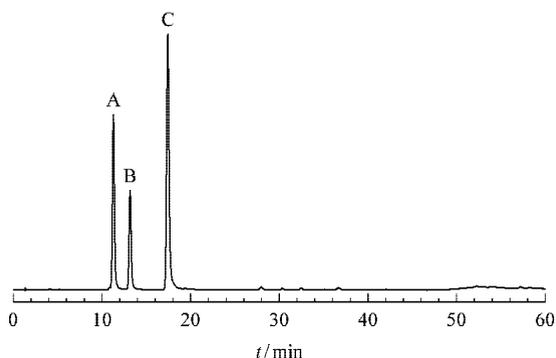


图3 大豆异黄酮糖苷的分析色谱图

Fig. 3 Chromatogram of soybean isoflavone glucosides by analytical HPLC

Analytical column: Nova-Pak C<sub>18</sub>(150 mm × 3.9 mm i. d., 4 μm); sample volume: 3 μL; mobile phase: 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5)-methanol-acetonitrile (40:40:20, v/v) (I) and 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5)-methanol (80:20, v/v) (II) using a gradient program of 5% I → 30 min → 45% I → 15 min → 60% I → 5 min → 100% I; flow rate: 0.8 mL/min; measured at UV 260 nm.

Peaks: A. daidzin; B. glycitin; C. genistin.

图3表明,D4部分主要含有3种大豆异黄酮糖苷类成分,其他成分很少,非常有利于这3个成分的放大制备。

### 1.5 D4中成分的制备

取220 mg D4,用甲醇溶解并调其浓度为5.0 g/L,然后以4:1的体积比与制备色谱所用的流动相混合,配制成供试液,用于制备色谱分离。分别收集制备色谱的A、B、C3个组分(见图4),用氨水将pH值调至中性后再浓缩至干。在所得固体中加入少量水(3种异黄酮糖苷在水中几乎不溶),用离心的方法脱去中和时产生的醋酸铵,最后分别得到化合物A 59 mg,化合物B 34 mg及化合物C 106 mg。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纯度检测

将“1.5”节中得到的化合物A、B和C分别用分析型高效液相色谱法检测,分析用色谱条件见

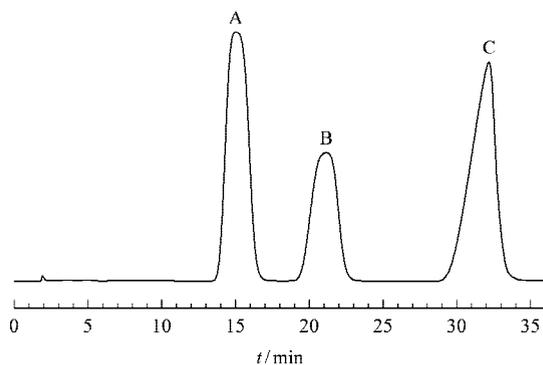


图4 大豆异黄酮糖苷的制备色谱图

Fig. 4 Chromatogram of soybean isoflavone glucosides by preparative HPLC

Preparative column: Nova-Pak HR C<sub>18</sub>(100 mm × 25 mm i. d. 6 μm); sample volume: 1 mL; mobile phase: methanol-0.1% aqueous acetic acid (23:77, v/v); flow rate: 20 mL/min; measured at UV 260 nm.

Peaks: A. daidzin; B. glycitin; C. genistin.

“1.2”节中分析型高效液相色谱条件(2)。经峰面积归一化法计算,化合物A、B和C的纯度分别为99.42%、99.68%和99.95%。

### 2.2 结构鉴定

大豆异黄酮糖苷主要由大豆黄素、黄豆黄素和染料木素3种苷元分别形成的葡萄糖苷、乙酰葡萄糖苷和丙二酰葡萄糖苷组成,葡萄糖残基通常连接在苷元的7位。因此,可以通过其质谱中分子离子和特征碎片离子分析确认其分子结构<sup>[7]</sup>。

化合物A在ESI/MS正离子模式下给出准分子离子  $m/z$  417.1 ( $[M+H]^+$ , 100%) (括号内的数字为质谱峰的相对强度)和  $m/z$  255.2 ( $[M+H-glc]^+$ , 16%);  $m/z$  417.1离子的二级质谱给出  $m/z$  255.2 ( $[M+H-glc]^+$ , 100%)。化合物A在ESI/MS负离子模式下给出准分子离子  $m/z$  461.5 ( $[M+HCOO]^-$ , 100%),  $m/z$  451.8 ( $[M+Cl]^-$ , 90%) 和  $m/z$  253.8 ( $[M-H-glc]^-$ , 18%);  $m/z$  451.8离子的二级质谱给出  $m/z$  253.2 ( $[M+Cl-glc]^-$ , 100%)。上述实验结果与文献[7]中大豆苷的数据一致。其结构见图2中的化合物4。

化合物B在ESI/MS正离子模式下给出准分子离子  $m/z$  447.1 ( $[M+H]^+$ , 100%) 和  $m/z$  285.3 ( $[M+H-glc]^+$ , 14%);  $m/z$  447.1离子的二级质谱给出  $m/z$  285.2 ( $[M+H-glc]^+$ , 100%)。化合物B在ESI/MS负离子模式下给出准分子离子  $m/z$  491.8 ( $[M+HCOO]^-$ , 100%) 和  $m/z$  284.0 ( $[M-H-glc]^-$ , 20%);  $m/z$  491.8离子的二级质谱给出  $m/z$  283.1 ( $[M-H-glc]^-$ , 100%)。上述实验结果与文献[7]中黄豆苷的数据一致。其结构见图2中的化合物7。

化合物 C 在 ESI/MS 正离子模式下给出准分子离子  $m/z$  433.1 ( $[M+H]^+$ , 100%) 和  $m/z$  271.3 ( $[M+H-glc]^+$ , 60%) ;  $m/z$  433.1 离子的二级质谱给出  $m/z$  271.3 ( $[M+H-glc]^+$ , 100%)。化合物 C 在 ESI/MS 负离子模式下给出准分子离子  $m/z$  477.5 ( $[M+HCOO]^-$ , 100%) 和  $m/z$  269.5 ( $[M-H-glc]^-$ , 18%) ;  $m/z$  477.5 离子的二级质谱给出  $m/z$  269.2 ( $[M-H-glc]^-$ , 30%)。上述实验结果与文献 [7] 中染料木苷的数据一致。其结构见图 2 中的化合物 10。

### 2.3 流动相酸化的作用与后续处理

由于 3 种大豆异黄酮糖苷的结构中均含有酚羟基, 故三者均呈弱酸性。若流动相中不加酸, 当进样量较小时, 峰形和分离度尚可, 但随着进样量的增加 (大于 1 mL 时), 色谱峰出现拖尾和前伸等情况, 所以流动相中添加酸对改善峰形和分离效果是必需的。但是流动相中加酸后, 若不加以中和, 在浓缩过程中酸浓度会逐渐升高, 容易引起糖苷的酸水解。故浓缩前须加少量氨水中和, 蒸干后还必须进行脱盐处理, 这给实验操作带来了一定的麻烦。

### 2.4 进样量的优化

由于大豆异黄酮糖苷的溶解性不好, 且 3 种异黄酮糖苷的极性相近, 当进样量过大时, 各峰分离度变差, 分离时间及溶剂用量均增加, 需对色谱峰进行切割收集, 很难同时获得纯度较高的 3 种异黄酮糖苷单体。从图 5 中可以看出, 进样体积为 1.2 mL 时, 峰形开始分叉, 分离度尚可; 当进样体积增大为 1.6 mL 和 2.0 mL 时, 峰形前伸, 分离度明显下降。另外, 从图 5 中也可看出当进样量增大时, 保留时间为 1.9 min 左右的峰会越来越大直至变为平头峰 (经分析型 HPLC 分析这个平头峰为 3 种糖苷的混合物), 这使得后面 3 种糖苷的纯度下降。因此, 为

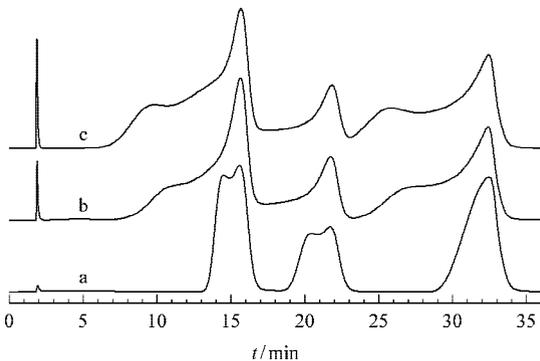


图 5 过载时大豆异黄酮糖苷的制备色谱图

Fig. 5 Overloading preparative HPLC chromatograms of soybean isoflavone glucosides

Chromatographic conditions are the same as in Fig. 4.  
Sample volume : a. 1.2 mL ; b. 1.6 mL ; c. 2.0 mL.

了获得高纯度单体及便于手动收集, 本制备方法中, 每次进样约为 4.0 mg, 进样体积为 1 mL。

## 3 结论

本文采用制备型高效液相色谱结合溶剂萃取和离心脱盐的方法, 制备了 3 种大豆异黄酮的糖苷, 经分析型 HPLC 检测, 纯度均达到了 99% 以上。由于异黄酮类化合物在各种常用溶剂中的溶解性都很差, 使得制备液相色谱的进样量受到很大限制。因此, 如何增加进样量, 提高分离效率, 还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Yang Hu. Journal of Cereals & Oils (杨虎. 粮食与油脂), 2006(1):44
- [2] Ma Guizhi, Gao Xiaoli. Chinese Traditional Patent Medicine (马桂芝, 高晓黎. 中成药), 2002, 24(6):461
- [3] Guan Junjun, Fang Xixiu. China Western Cereals & Oils Technology (管军军, 方希修. 西部粮油科技), 2003(6):59
- [4] Wiseman H, Casey K, Clarke D B, Barnes K A, Bowey E. J Agric Food Chem, 2002, 50(6):1404
- [5] Sun Junming, Ding Anlin, Dong Huiru. Soybean Science (孙君明, 丁安林, 东惠茹. 大豆科学), 2000, 19(1):15
- [6] Fang N B, Yu S G, Badger T M. J Agric Food Chem, 2002, 50(9):2700
- [7] Wu Q L, Wang M F, Sciarappa W J, Simon J E. J Agric Food Chem, 2004, 52(10):2763
- [8] Qu Liping, Mi Heming, Fan Guorong. Journal of Pharmaceutical Practice (曲丽萍, 宓鹤鸣, 范国荣. 药学实践杂志), 2006, 24(2):69
- [9] Yuan Jian, Jü Xingrong. Food Science (袁建, 鞠兴荣. 食品科学), 2002, 23(8):118
- [10] Yuan Qipeng, Zhang Huai, Qian Zhongming. Soybean Science (袁其朋, 张怀, 钱忠明. 大豆科学), 2002, 21(3):177
- [11] Rostagno M A, Palma M, Barroso C G. J Chromatogr A, 2003, 1012:119
- [12] Pan Liaoming. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition (潘廖明. 四川大学学报: 工程科学版), 2004, 36(1):74
- [13] Yao Kai, Jia Dongying, He Qiang, Lü Yuanping. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition (姚开, 贾冬英, 何强, 吕远平. 四川大学学报: 工程科学版), 2004, 36(3):77
- [14] Liu Pingping, Li Yunzheng, Zhang Qingshan. Fine Chemicals (刘苹苹, 李云政, 张青山. 精细化工), 2004, 21(3):200
- [15] Xu Deping, Jiang Hanhu, Xiao Kai, Xuan Lijiang. Journal of Nanjing Agricultural University (徐德平, 江汉湖, 肖凯, 宣利江. 南京农业大学学报), 2001, 24(3):8
- [16] Yang F Q, Ma Y, Ito Y. J Chromatogr A, 2001, 928:163
- [17] Du Q Z, Li Z H, Ito Y. J Chromatogr A, 2001, 923:271
- [18] Jiang Heyuan, Tai Jianxiang, Lü Feijie. Food Science (江和源, 台建祥, 吕飞杰. 食品科学), 2004, 25(1):85