

大豆异黄酮糖配体制备工艺研究^{*}

王 路¹ 李玉厚² 孙丽艳¹ 韩 俊³ 崔洪斌¹

(1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省医院营养科, 哈尔滨 150001;
3. 哈尔滨基太生物芯片开发有限责任公司, 哈尔滨 150001)

摘要 以大豆胚轴为原料, 通过正交设计确立制备含染料木黄酮的糖配体酸水解条件, 水解酸液的浓度为 2.5 mol/L、水解温度为 90℃, 水解时间为 3h。根据糖配体的溶解度与极性经 AB-8 大孔树脂柱乙醇溶剂分步淋洗(水→30%乙醇→80%乙醇)分离及以氯仿:甲醇:20%冰乙酸, 体积比为 7:3:1 为展开系薄层小量制备出纯度为 48.6%大豆异黄酮糖配体染料木黄酮。

关键词 糖配体; 大豆异黄酮; 制备; HPLC

中图分类号 S 565.101 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)01-0094-03

大豆胚轴中富含具有抗氧化、天然植物雌激素样作用等多种重要生理活性的异黄酮^[1~3]。大豆异黄酮是由含量不等 3 种配糖体(Genistein、Daidzein、Glycitein)和 9 种糖甙(Genistin、Daidzin、Glycitin、Malonylgenistin、Malonyldaidzin、Malonylglycitin、Acetylgenistin、Acetyldaidzin、Acetylglycitin)单体组分组成的混合物^[4]。人体内其均以配糖体形式被吸收并发挥作用^[5]。目前, 国内对大豆异黄酮的酸水解工艺研究较多, 但酸水解条件如不同溶剂的酸的浓度差异较大^[6~7], 仍需探讨。本实验从大豆胚轴中以盐酸水解并分离制备出用于生物活性研究的试验材料大豆异黄酮糖配体染料木黄酮(Genistein), 同时为获得较高纯度的大豆异黄酮糖配体染料木黄酮为主要成分的药物开发工艺技术的探讨提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 2690-996 高效液相色谱仪(紫外检测器); 旋转蒸发器(RE-52, 上海亚荣生化仪器厂); 低速台式离心机(TDL-5-A, 上海安亭科学仪器厂); 全自动部分收集器(DBS-100, 上海沪西分析仪器厂)。

四种标准品染料木黄酮(Genistein)、黄豆苷元(Daidzein)、染料木苷(Ginistin)、黄豆苷(Daidzin)均购自美国 sigma 公司; 无水乙醇、盐酸、氯仿为分析纯; 甲醇、冰乙酸为色谱纯; 高纯水。

大豆胚轴购自黑龙江省绥化市油脂厂。

1.2 实验方法

1.2.1 水解制取糖配体

称取大豆胚轴干品 50g 加入一定浓度的盐酸 75%乙醇水溶液 250mL, 于一定温度的水浴中回流一定时间, 摇匀, 冷却后用 6mol/L 的 NaOH 调 pH 值至中性, 定容过滤后上机测定染料木黄酮、黄豆苷元、染料木苷、黄豆苷的含量, 通过正交实验选择水解条件。

1.2.2 高效液相色谱(HPLC)条件

色谱柱为 Nova-Pak C₁₈ (4μ, 3.9×150mm, Waters 公司)。流动相 A 为水:甲醇:冰乙酸(85:12:3), 流动相 B 为 2%冰乙酸的甲醇溶液, 梯度洗脱, 35min 内溶剂 A 从体积分数 95%降到 0%, 同时溶剂 B 从 5%增至 100%。流速为 0.5mL/min, 紫外检测波长 260.8nm, 柱温 35℃, 进样量 20μL。

1.2.3 AB-8 大孔树脂柱分离糖配体

首先 AB-8 大孔树脂预处理, 水洗至中性后使用, 并考察其吸附容量。对盐酸水解提取浓缩液上 AB-8 大孔树脂柱(Φ10×170mm)依次用水、30%、

^{*} 收稿日期: 2005-12-18

基金项目: 本课题为 863 资助项目(2002AA2Z2052)

作者简介: 王路(1973-), 女, 博士研究生, 主要从事植物化学物提取研究。E-mail: wanglu_tianfeng@yahooh.com.cn

通讯作者: 崔洪斌教授

80%乙醇溶液进行分步淋洗, 每 10mL 为接取单位收集各流出部分, 经减压蒸馏得干粉, 分别称为 P₃₀、P₈₀。

1.2.4 薄层分离染料木黄酮

展开系统为氯仿 : 甲醇 : 20%冰乙酸, 体积比为 7 : 3 : 1。在硅胶 G 板(20cm×20cm)上条状点样。上行法一次展开, 喷以 10%硫酸的乙醇溶液, 在 120℃烘 10min 后, 观察条形黄色斑, 计算比移值 R_f, 取下用 80%乙醇溶解后, 定容 HPLC 法测定。

2 结果与讨论

2.1 水解制取糖配体条件的确定

在单因素分析的基础上, 选择水解酸液的浓度、

水解温度和水解时间三个影响水解效率的主要因素为考察对象, 制定各因素的水平表, 见表 1。采用正交设计进行试验, 通过每个试验获得糖甙型水解转化率(%) (水解转化率=糖甙型异黄酮水解前后含量差/糖甙型异黄酮水解前含量), 并对结果进行极差分析, 确定较优的水解提取条件, 结果与分析见表 2。

表 1 各因素水平表

Table 1 Level values of each factor for hydrolysis

水平	A 酸度(mol/L)	B 温度(℃)	C 时间(h)
Level	Acidity	Temperature	Time
1	1.0	60	1
2	2.0	75	2
3	2.5	90	3

表 2 水解正交实验分析表

Table 2 Analysis of regression orthogonal experiment designed for hydrolysis

No.	因素			水解转化率(%) Transformation efficiency of hydrolysis	No.	因素			水解转化率(%) Transformation efficiency of hydrolysis
	A	B	C			A	B	C	
1	1	1	1	6.22	8	3	2	1	88.15
2	1	2	2	46.83	9	3	3	2	98.85
3	1	3	3	79.83	K ₁	132.88	58.92	177.87	
4	2	1	2	13.14	K ₂	195.27	233.61	158.82	
5	2	2	3	98.63	K ₃	226.56	262.18	218.02	
6	2	3	1	83.50	极差 R	33.23	67.75	13.38	
7	3	1	3	39.56					

通过表 2 分析可知 R_B>R_A>R_C, 三因素影响转化为糖配体的主次关系为 B→A→C, 水解酸液的浓度、水解温度是主要影响因素, 水解时间影响较小。三因素的最佳水平组合为 A₃B₃C₃, 即水解酸液的浓度为 2.5mol/L、水解温度为 90℃, 水解时间为 3h。值得注意的是水解酸液的浓度不易过大, 否则会破坏糖配体的结构。

利用选择的最佳水解条件将 50g 大豆胚轴水解后, 离心、旋转蒸发得到糖配体浓缩液 4.8mg/mL。

2.2 AB-8 大孔树脂柱糖配体分离结果

2.2.1 糖配体浓缩液中主要成分的溶解度与极性

水解制取糖配体过程中所用酸与调节 PH 值用碱生成 NaCl 盐以及大豆胚轴中低聚糖成分、糖甙水解糖链产物都具有强的亲水性, 可以用水洗脱除去。未水解完全极性较大的异黄酮糖甙溶于 30%乙醇溶液而被分离。糖配体极性弱, 难溶于水, 易溶于极性弱的有机溶剂中, 经过分步淋洗以 80%乙醇溶液收集获取。但大豆胚轴中另外一种功效成分大豆皂甙

由于其分子结构特征决定极性和溶解度与异黄酮糖配体相近而可能会产生较大的竞争吸附作用。

2.2.2 AB-8 树脂异黄酮糖配体分离

参考文献, AB-8 树脂对吸附的大豆异黄酮洗脱量大而且速度快, 解吸容易。且 AB-8 树脂在低温下有利于对大豆异黄酮的吸附, 另外, 高浓度样液

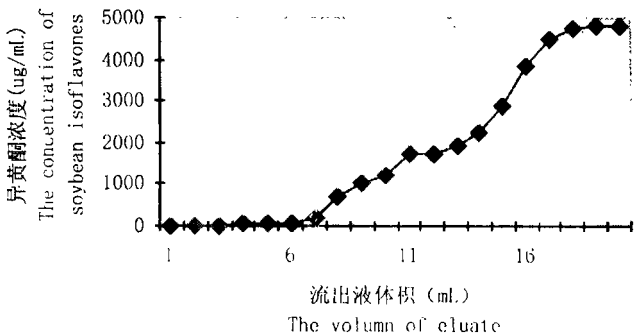


图 1 AB-8 柱异黄酮吸附穿透曲线

Fig.1 The penetration curve of soybean isoflavone absorbed by AB-8 column

以较低的流速通过树脂层可以提高动态吸附的吸附速率。因此,本实验在 20℃的室温环境下,以 1BV/h 的较慢流速对糖配体浓缩液上 AB-8 柱。将浓缩原料液连续进入吸附柱,测流出液中异黄酮浓度变化,得树脂柱的吸附泄漏曲线,见图 1。由图可知对于该吸附柱,合适的上样量为 6-7mL,单位体积树脂上样量约为 4.5mg 大豆异黄酮/mL 树脂。

分步淋洗分离流出成分两阶段产品 P₃₀、P₈₀ 主要糖甙和糖配体经 HPLC 分析含量见表 3,混合标准品出峰顺序依次是黄豆苷,染料木苷,黄豆苷元和染料木黄酮。样品浓缩液在水淋洗过程中,有少量大豆异黄酮泄漏流失,以 30%乙醇溶液淋洗,随着流出液接管数的增加,黄豆苷逐渐减少,染料木苷逐渐增加,同时伴有极微量的糖配体溶出。为减少糖配体过度流失,当糖甙显著减少时,以 80%乙醇溶液淋洗,在此过程中黄豆苷元逐渐减少,而染料木黄酮增加。分步淋洗过程中流出的大豆异黄酮糖甙和糖配体含量进一步表明,利用极性差异,可以将糖配体分步淋洗分离制备。产品 P80 为较纯的含大豆异黄

酮糖配体的目标产品,其中染料木黄酮纯度为 26.0%。

表 3 P₃₀、P₈₀ 异黄酮主要组分含量
Table 3 The main ingredient content of

isoflavone for P ₃₀ 、P ₈₀ mg/g					
产品 Product	染料木黄酮 Genistein	黄豆苷元 Daidzein	染料木苷 Giristin	黄豆苷 Daidzin	总量 Total
P ₃₀	-	-	1.1	0.3	1.4
P ₈₀	259.6	113.4	-	-	373.0

注:“-”为小于 0.01mg/g。

2.3 染料木黄酮的薄层制备

染料木黄酮和黄豆苷元的标准品 R_f 分别为 0.58 和 0.56,样品黄色条形斑 R_f 为 0.58 和 0.56。HPLC 分析结果见图 2。薄层分离制备板在水平层析缸中倾斜角度较小,以促进两种糖配体的分离。染料木黄酮与黄豆苷元结构相似,极性差异较小,而且薄层小量制备分离时,样品含量高,因此 R_f 相差较小,产品中染料木黄酮纯度为 48.6%。

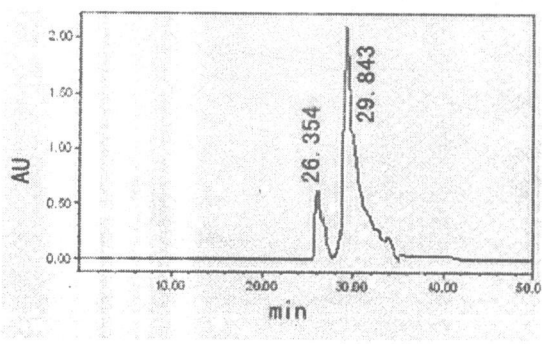
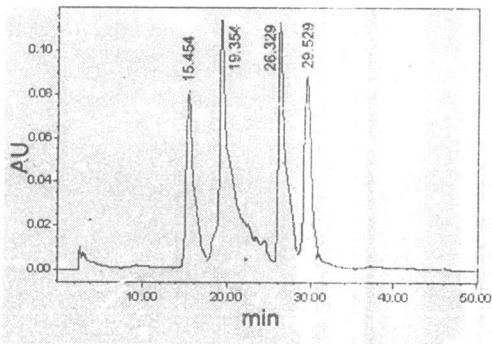


图 2 混标(a)和产品(b)的色谱图

Fig. 2 The chromatogram of mixed standards(a) and product(b)

3 结论

本文以大豆胚轴为原料在最佳水解工艺条件下制得异黄酮糖配体,水解酸液的浓度为 2.5 mol/L、水解温度为 90℃,水解时间为 3h;并根据糖配体的溶解度与极性以 AB-8 大孔树脂柱经水、30%乙醇溶液、80%乙醇溶液分步淋洗分离及薄层小量制备出纯度为 48.6%染料木黄酮。

参 考 文 献

1 Cassidy A, Bingham S, Setchell K. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition

of soybean products[J]. Br J Nutr, 1995, 74(4): 578-601.
2 Albertazzi P, pansini F, Bottazzi M, et al. Dietary Soy supplementation and phytoestrogen levels[J]. Obstet Gynecol, 1999, 94(2): 229-231.
3 Breinholt V, Lauridsen S T, Dragsted L O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat[J]. Xenobiotica, 1999, 29(12): 1227-1240.
4 Kudou S, Feary Y, Welti D, et al. Malonylisoflavone glucosides in soybean seeds(*Glycine max* Merri)[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1991, 55(9): 2227-2233.
5 崔洪斌主编. 大豆异黄酮活性研究与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 16-17.
6 李文亮, 韩继福, 崔洪斌. 盐酸水解大豆异黄酮的工艺研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 73-75.
7 张炳文, 宋永生, 郝征红, 等. 糖苷型大豆异黄酮水解工艺的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 75-78. (下转第 93 页)

参 考 文 献

1 林茂松. 土壤真菌防治大豆孢囊线虫的效果测定[J]. 中国油料, 1990, (3): 63 – 65.

2 刘汉起. 黑龙江大豆孢囊线虫发生、危害及研究状况[J]. 大豆科学, 1987, 6(2): 144 – 147.

3 刘学义, 马俊奎, 任小俊, 等. 塑料钵柱法在大豆抗孢囊线虫病鉴定中的应用[J]. 华北农学报, 1998, 13: 92 – 96

4 王中田. 大豆孢囊线虫病发生规律及防治[J]. 中国油料, 1983, (3): 62 – 67.

5 吴和礼. 大豆孢囊线虫病抗病鉴定技术的研究[J]. 大豆科学, 1984, 3(1): 2 – 3.

6 张磊. 安徽省大豆孢囊线虫病的发生及防治[J]. 中国油料, 1986, (4): 74 – 75.

7 A. L. 泰勒著, 陈品三, 郝近大译. 植物线虫学研究入门[M]. 北京: 农业出版社, 1981, 33 – 34.

8 Ali A. H. H. Influence of some chemical factors affecting emergence of juveniles from cysts of soybean cyst nematode , *Heterodera glycines*[J]. Egyptian Journal Phytopathology. 1988, 20(2): 151 – 157.

9 Ali A. H. H. Influence of some physical factors affecting emergence of juveniles from cysts of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* [J]. Egyptian Journal Phytopathology. 1988, 20(2): 159 – 164.

A STUDY ON THE STABLE TOXICITY OF DISEASED SOIL IN IDENTIFYING SOYBEAN CYST NEMATODE

Ma Junkui Ren Donglian Ren Xiaojun Shi Hong Wang Yong Liu xueyi *

(Industrial Crop Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang, 032200)

Abstract We studied stable toxicity and controlling technology of the diseased soil in identifying soybean cyst nematode with five methods, heating the diseased soil, exchanging the diseased soil with the diseased – free soil, frozen the diseased soil, applying nematocide and grinding the diseased soil. There was very significance variance between the method of exchange the diseased soil and the other methods. Soybean cyst nematode was sensitive to the heat treatment. In order to providing the quantity of soybean cyst nematode in the old – diseased soil, the best one was the method of exchanging the diseased soil with the diseased – free soil.

Key words Soybean; Cyst nematode; Stable toxicity; Identifying resistant technology

(上接第 96 页)

STUDY ON PREPARATION OF ISOFLAVONES AGLYCON

Wang Lu¹ Li Yuhou² Sun Liyan¹ Han Jun³ Cui Hongbin¹

(1. Harbin Medical University, Harbin, 150086; 2. Nutrition Institute of Heilongjiang Province Hospital, Harbin, 150036; 3. Harbin Gene – tech Biochip Development Inc. , Ltd, Harbin, 150001)

Abstract By orthogonal experimental methodology, the optimum parameters of acid hydrolysis for aglycon including Genistein were established, as follows: concentration of ethanol of acid, 2.5 mol/L; temperature, 90 ℃; and time 3h. According to solubility and polarity the Genistein of 48.6% purity was prepared with macro – pore resin AB – 8 desorping of terraced concentration (water→30% ethanol→80% ethanol) and thin layed which the mixture of chloroform: methanol :20% acetic acid(7 :3 :1) was mobile phase.

Key words Aglycon; Isoflavones; Preparation; HPLC