

## 利用 ADS-7 大孔树脂分离纯化淡豆豉中异黄酮

牛丽颖, 蔡广华, 王鑫国

(河北医科大学 中医学院, 河北省实验动物重点实验室, 河北 石家庄 050091)

**摘要:**以染料木素为指标, 采用紫外分光光度法测定异黄酮的含量, 并利用 ADS-7 大孔树脂分离纯化淡豆豉中异黄酮。结果表明:该树脂分离淡豆豉异黄酮的工艺参数为:上样液浓度  $0.225 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH 值 4.5, 最大上样量 150 mL, 以  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速吸附, 以 8 倍柱床体积的 70% 乙醇作为洗脱剂, 洗脱流速  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 树脂可重复使用 2 次。经初步吸附分离, 异黄酮得率达 40% 以上。

**关键词:**淡豆豉; 异黄酮; 大孔吸附树脂; 吸附; 分离

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0164-04

## Separation and Purification of Soybean Isoflavone in Semen Sojae Praeparatum by ADS-7 Macroporous Adsorptive Resins

NIU Li-ying, CAI Guang-hua, WANG Xin-guo

(College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science, Shijiazhuang 050091, Hebei, China)

**Abstract:** Use ultraviolet spectrophotometry to detect the content of soybean isoflavone, with the content of genistein as the index, to investigate the ADS-7 macroporous adsorptive resins for separation and purification of soybean isoflavone in the Semen Sojae Praeparatum. The optimized technological parameters of the ADS-7 macroporous adsorptive resins were as following: loading sample density  $0.225 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH 4.5, the maximum sample volume 150 mL,  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  flow rate to adsorption and the volume of 70% (v/v) ethanol as 8 BV with desorption-flow  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ . With these conditions, more than 40% of soybean isoflavone could be obtained from primary adsorption and purification, and the ADS-7 macroporous adsorptive resins can be used twice.

**Key words:** Semen Sojae Praeparatum; Soybean Isoflavone; Macroporous Adsorptive Resins; Adsorption; Separation

淡豆豉是大豆的成熟种子和青蒿、桑叶等中药经发酵加工而成, 具有解表除烦、宣发郁热等功效<sup>[1]</sup>。其所含有效成分大豆异黄酮 (soybean isoflavone) 是一类具有雌激素作用的化合物, 主要包括染料木素 (genistein)、大豆黄素 (daidzein) 和黄豆黄素 (glycitein) 及其 7-O-葡萄糖苷。研究发现, 淡豆豉异黄酮类具有降血脂、抗动脉粥样硬化、降血糖、抗骨质疏松等作用<sup>[2-7]</sup>。牛丽颖等曾发现豆豉中异黄酮、染料木素、大豆苷元含量均高于原料大豆, 具有更高的应用价值和开发前景<sup>[8]</sup>。为了获得高纯度的异黄酮, 采用 ADS-7 大孔吸附树脂对其进行分离纯化, 用紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量, 通过对吸附和洗脱方面的研究, 确定了 ADS-7 大孔吸附树脂纯化淡豆豉异黄酮的最佳工艺条件。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

淡豆豉药材按 2005 版中国药典淡豆豉制备方法自制; 染料木素 (批号: 111704-200501 中国药品生物制品检定所); ADS-7 大孔树脂 (沧州宝恩化工有限公司); 其它试剂均为分析纯。UV-2550 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); 回流提取装置; 旋转蒸发仪。

#### 1.2 大孔吸附树脂的预处理

95% 乙醇浸泡树脂 24 h, 充分溶胀后装柱 ( $4 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ ), 先用 95% 乙醇洗至流出液与蒸馏水混合不呈白色浑浊为止, 再用蒸馏水洗净乙醇; 继用 5% 的氢氧化钠溶液以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  碱洗后, 蒸馏水洗至中

收稿日期: 2009-07-16

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (C2009001061)。

第一作者简介: 牛丽颖 (1968-), 女, 教授。研究方向为中药药效物质基础。

通讯作者: 王鑫国, 教授。E-mail: wangxinguozy@163.com。

性;再用 5% 盐酸溶液以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  酸洗,再用蒸馏水洗至中性后备用。

### 1.3 测定方法与样品制备

1.3.1 测定淡豆豉异黄酮的含量的方法 染料木素甲醇溶液浓度在  $0.733 \sim 7.728 (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$  之间与 UV 261 nm 下的吸收值有良好的线形关系,采用紫外一阶导数分光光度法可以表征总大豆异黄酮浓度<sup>[9-10]</sup>,回归方程为: $y = 0.157 2x + 0.003 6, r^2 = 0.999 7$  ( $y$  为吸光度; $x$  为总异黄酮浓度,  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

1.3.2 上柱样品液的制备 取淡豆豉药材 1.0 kg,用石油醚( $60 \sim 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )脱脂,将脱脂后淡豆豉用 8 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液回收乙醇,浓缩至每毫升含 0.225 g 生药。

## 2 结果与分析

### 2.1 上样条件

2.1.1 吸附容量 取处理好的树脂 30 mL,装入层析柱(内径 2.0 cm),将淡豆豉浓缩液( $0.225 \text{ g 生药} \cdot \text{mL}^{-1}$ )19 份,每份 15 mL 以  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速流经层析柱,收集每份流出液,测定流出液中异黄酮的含量。以异黄酮的累计损失量为纵坐标,流分为横坐标作曲线。研究结果显示,从第 10 份开始泄露,即每毫升树脂的吸附生药量为 1.125 g (图 1)。

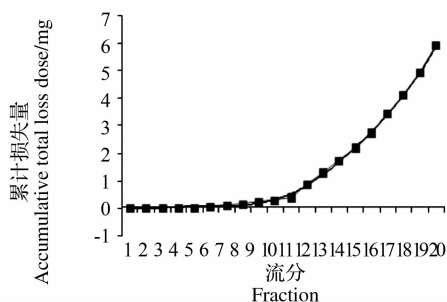


图 1 ADS-7 大孔吸附树脂的最大吸附容量

Fig.1 Largest sample volume of ADS-7 macroporous adsorptive resins column

2.1.2 上样液 pH 值 取 3 份淡豆豉浓缩液( $0.225 \text{ g 生药} \cdot \text{mL}^{-1}$ )每份 150 mL,分别调 pH 值为 4.1、4.5、5.0,分别以  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速流经树脂柱,先分别用 300 mL 水洗涤,弃去洗液,再分别用 95% 乙醇 300 mL 洗涤,收集每份洗脱液,测定流出液中异黄酮含量。结果显示,最佳 pH 值为 4.5 (图 2)。

2.1.3 上样流速 取提取液 3、4、5、6  $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的

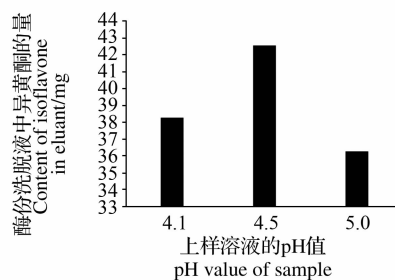


图 2 不同 pH 值对树脂吸附量的影响

Fig.2 Effect of different pH to the macroporous resins column

流速通过树脂柱,按上述方法洗脱,测定醇洗脱液中异黄酮的含量。结果表明,几种上样流速差别不大,速度为  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  时最佳(图 3)。

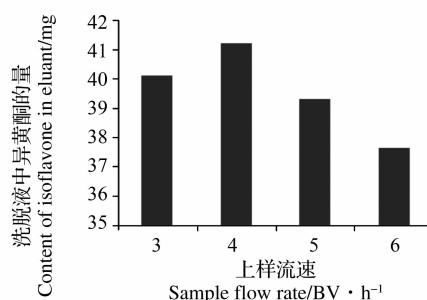


图 3 不同上样溶液流速对树脂吸附量的影响

Fig.3 Effect of different sample flow rate to the macroporous resins column

### 2.2 水洗脱用量

取提取液 150 mL 以  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速通过 30 mL 树脂柱,用水洗涤,收集水洗脱液 10 份,每份 25 mL,观察每份水洗脱液的颜色,测定每份水洗脱液固形物的重量及占总固形物的百分比。结果表明,前 6 份水洗液的固形物占总固形物的 98.61%。即水洗用量为 5 倍柱体积(表 1)。

### 2.3 乙醇浓度

取提取液按上述条件通过树脂柱,先用 5 BV 的水洗涤,弃去水洗液,再用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、95% 乙醇 150 mL  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速洗脱,分别测定各洗脱液中异黄酮含量,计算各洗脱液中异黄酮含量占上样液异黄酮的百分比,以乙醇浓度为横坐标,百分比为纵坐标作曲线。结果显示,随着乙醇浓度的升高,异黄酮的洗脱量增大,主要集中在 30% ~ 70% 之间,80%、95% 乙醇洗脱主要为油状物,为脂溶性杂质,故选择 70% 乙醇做洗脱剂(图 4)。

表1 水洗脱用量考察

Table1 Inspection of eluting H<sub>2</sub>O dosage

流分 Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
颜色 Color	黄	黄	黄	浅黄	浅黄	近无	近无	无	无	无
每份固体物重 Weight of solid content/g	0.085	0.0273	0.0169	0.0123	0.0080	0.0060	0.0010	0.0004	0.0004	0.0004
占总固体物百分 Percentage of total solid content/%	253.96	17.29	10.70	7.79	5.07	3.80	0.63	0.25	0.25	0.25

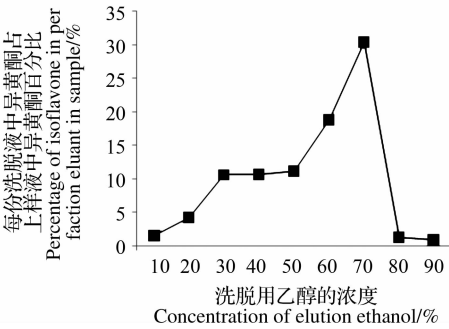


图4 对洗脱用乙醇浓度的考察

Fig. 4 Inspection of elution ethanol concentration

2.4 70% 乙醇用量

取提取液 150 mL 按上述条件通过 30 mL 树脂柱,先用 5 BV 水洗脱,弃去洗脱液,再用 70% 的乙醇洗涤,洗脱液每 25 mL 收集 1 份,共收集 14 份,分别测定异黄酮含量,计算每份洗脱液异黄酮含量占上样液异黄酮的百分比,以流分为横坐标,百分比为纵坐标作曲线。结果表明,从 2 到 11 份,异黄酮含量的累计百分比呈上升趋势,然后变化不大,即醇洗用量约为 8 倍柱体积(图 5)。

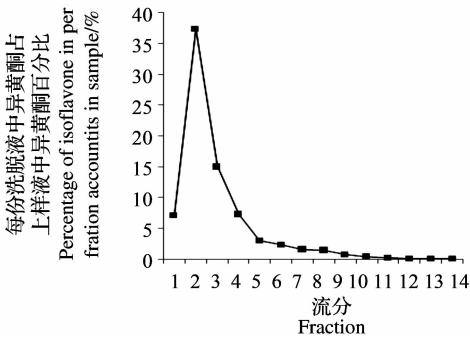


图5 对洗脱用 70% 乙醇用量的考察

Fig. 5 Inspection of eluting 70% ethanol dosage

2.5 70% 乙醇流速

取提取液 4 份按上述条件分别通过树脂柱,先分别用 5 BV 水洗,再分别用 8 BV 70% 乙醇以 3、4、5、6 BV·h<sup>-1</sup>洗脱,收集洗脱液,测定异黄酮的含量。结果表明,几种上样流速差别不大,3 和 4 BV·h<sup>-1</sup>

接近,因此确定醇洗流速为 4 BV·h<sup>-1</sup>(图 6)。

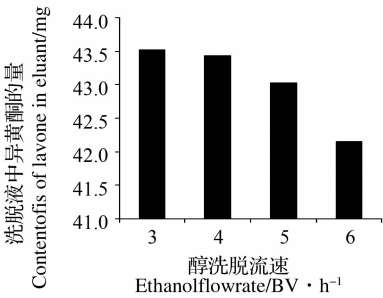


图6 不同洗脱流速对树脂吸附量的影响

Fig. 6 Effect of different elution flow rate to the macroporous resins column

2.6 树脂重复次数

按确定的吸附和洗脱条件上样、吸附、洗脱,在同一根树脂柱上重复操作 4 次,分别计算 4 次总黄酮的吸附量,结果第 3 次使用时总黄酮吸附量约下降 41.23%,表明树脂重复使用 2 次后,需要再生才可以再次使用。

2.7 工艺验证与淡豆豉异黄酮纯度

按所确定工艺,取 5 份提取液进行上样、吸附、洗脱,测定总黄酮的含量及总黄酮的解析率。结果表明,所优化的工艺稳定、重现性佳,总黄酮的纯度可达 42.0%(表 2)。

表2 验证试验

Table 2 Verification test

试验号 Test No.	洗液中异黄酮量 Isoflavones content in eluant/mg	干膏量 Extracta sicca weight/g	解析率 Resolve rate/%	纯度 Purity /%
1	43.00	0.1013	77.01	42.45
2	43.52	0.1026	77.06	42.42
3	44.01	0.1051	77.21	41.87
4	42.89	0.1022	77.13	41.97
5	42.10	0.1010	77.00	41.68

### 3 结论

通过对 ADS-7 大孔吸附树脂纯化淡豆豉异黄酮的研究,确定该树脂的最佳工艺参数为:上样液浓度  $0.225 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH 4.5, 最大上样量  $1.125 \text{ g}$  生药  $\cdot \text{mL}^{-1}$  树脂,最佳上样流速  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ ,先用  $5 \text{ BV}$  水洗,再用  $8 \text{ BV}$  70% 乙醇  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  洗脱。在此条件下,该树脂的解析率在 77% 以上,产物中异黄酮纯度达 42%。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 230. (Chinese Pharmacopoeia Committee. China pharmacopoeia version(part one)[M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2005: 230. )
- [2] 王鑫国, 葛喜珍, 白霞, 等. 淡豆豉对去卵巢大鼠脂代谢的影响[J]. 中药材, 2003, 26(9): 652-654. (Wang X G, Ge X Z, Bai X, et al Effects of Semen sojae preparatum on lipid metabolism in ovariectomized rat [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 26(9): 652-654. )
- [3] 高淑丽, 牛丽颖, 曹秀莲, 等. 淡豆豉提取物抗心肌缺血作用的研究[J]. 河北医药, 2007, 29(9): 923-924. (Gao S L, Niu L Y, Cao X L, et al Protective effect of fermented soybean extraction on myocardial ischemia in mice[J]. Hebei Medical Journal, 2007, 29(9): 923-924. )
- [4] 牛丽颖, 刘娇, 崔力剑, 等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 120-122. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al Effects and mechanisms of semen sojae preparatum extracts on rats' injury at the early stage of atherosclerosis[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2007, 23(5): 120-122. )
- [5] 牛丽颖, 田鹏娜, 李清, 等. 淡豆豉水煎液对早期动脉粥样硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 156-159. (Niu L Y, Tian P N, Li Q, et al. Effects of Semen Sojae preparatum on the apoptosis of aortic smooth muscle cells in rats with early stherosclerosis[J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 156-159. )
- [6] 牛丽颖, 王鑫国, 葛喜珍, 等. 淡豆豉中降血糖活性成分研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5): 21-22. (Niu L Y, Wang X G, Ge X Z, et al. Study on active components of fermented soybean in reduceing blood glucose[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2004, 20(5): 21-22. )
- [7] 毛俊琴, 李铁军, 黄晓瑾. 淡豆豉异黄酮抗骨质疏松的实验研究[J]. 解放军药学报 2006, 22(2): 136-138. (Mao J Q, Li T J, Huang X J. Empirical study on anti-osteoporosis effect of Semen sojae praeparatum(SSP) [J]. Pharmacy Journal Chinese People's Liberation Army, 2006, 22(2): 136-138. )
- [8] 牛丽颖, 杜红娜, 刘姣, 等. 淡豆豉炮制前后异黄酮组分含量的比较研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 672-678. (Niu L Y, Du H N, Liu J, et al. The comparative study on the content of isoflavone in Sojae preparatum extracts before and after processing[J]. Soybean Science, 2008, 27(4): 672-678. )
- [9] 顾建明, 潘春云. 大豆异黄酮的测定方法及其评价[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2007, 13(6): 65-67. (Gu J M, Pan C Y. Analytical approach of soybean isoflavones and its evaluation[J]. Journal of Shanghai University(Natural Science Edition), 2007, 13(6): 65-67. )
- [10] 崔力剑, 黄芸, 杜淑娟, 等. 紫外分光光度法测定淡豆豉中总异黄酮的含量[J]. 河北中医药学报 2004, 19(3): 32-34. (Cui L J, Huang Y, Du S J, et al. Assay isoflavonids content in semen sojae preparatrm with ultraviolet spectrophotometry[J]. Journal of Hebei Traditionnal Chinese Medicine and Pharmacology, 2004, 19(3): 32-34. )
- [11] Kim H S, Sneller C H, Diers B W, et al. Evaluation of soybean cultivars for resistance to Sclerotinia stem rot in field environments [J]. Crop Science, 1999, 39: 64-68.
- [12] McLaren N W, Craven M. Evaluation soybean cultivars for resistance to Sclerotinia stalk rot in South Africa [J]. Crop Protection, 2008, 27: 231-235.
- [13] Chun D, Kao L B, Lockwood J L. Labortory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by Sclerotinia sclerotiorum [J]. Plant Disease, 1987, 71(9): 811-815.
- [14] Kim H S, Hartman G L, Manandhar J B, et al. Reaction of soybean cultivars to Sclerotinia stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations [J]. Crop Science, 2000, 40: 665-669.
- [15] Vuong T D, Hoffman D D, Diers B W, et al. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to Sclerotinia sclerotiorum [J]. Crop Science, 2004, 44(3): 777-783.
- [16] 董志敏, 王曙明, 刘玉芝, 等. 大豆抗菌核病研究进展 [J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1053-1057. (Dong Z M, Wang S M, Liu Y Z, et al. Progress on resistance to Sclerotinia sclerotiorum in soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1053-1057. )
- [17] 孙玉龙. 拜泉县大豆菌核病大面积发生规律的探讨 [J]. 农民致富之友, 2007(5): 16. (Sun Y L. Happen on soybean Sclerotinia sclerotiorum on Baiquan county [J]. Peasant Friend, 2007(5): 16. )
- [18] Cline M N, Jacobsen B J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to Sclerotinia sclerotiorum [J]. Plant Disease, 1983, 67(7): 784-786.
- [19] Aulair J, Boland G J, Kohn L M, et al. Genetic interactions between Glycine max and Sclerotinia scerotiorum using a straw inoculation method [J]. Plant disease, 2004, 88(8): 891-895.
- [20] Chen Y, Wang D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to Sclerotinia sclerotiorum [J]. Plant Disease, 2005, 89(12): 1268-1272.
- [21] Grau C R, Radke V L. Effects of cultivars and cultural practices on Sclerotinia stem rot of soybean [J]. Plant Disease, 1984, 68(1): 56-58.
- [22] Boland G J, Hall R. Evaluating soybean cultivars for resistance to Sclerotinia sclerotiorum under field conditions [J]. Plant Disease, 1987, 71(10): 934-936.

(上接第 163 页)