

高纯度大豆黄苷及大豆黄素的制备^{*}

贾乃[✉] 袁其朋^{* *}

(北京化工大学制药工程系, 北京 100029)

摘要 使用不同的溶剂从大豆异黄酮粗品中提取大豆黄苷。通过溶剂回流萃取及不同溶剂组合萃取实验确定了最佳的提取条件。结果表明, 丙酮和乙酸乙酯的组合萃取可以将原料中大豆黄苷的含量提高 2.5 倍以上。最终可以得到纯度为 90% 的大豆黄苷产品, 收率 40%。产品再通过盐酸水解可以得到其相应甙元。

关键词 大豆异黄酮; 大豆黄苷; 溶剂萃取

中图分类号 S 565.138 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)01-0011-04

0 前言

异黄酮是大豆等豆科植物所具有的微量物质, 是豆科植物产生的化学结构类似雌激素的成分总称。大豆异黄酮是以大豆为原料提取制成的植物雌性激素, 作为一种优良的天然抗氧化剂, 长期服用可降低心血管病的发病率, 并有防癌抗癌功效^[1, 2], 对于妇女更年期综合症和骨质疏松症治疗效果显著。大豆异黄酮由于具有医药、保健、食物等多种功能而发展潜力巨大^[3, 4]。也正因为如此, 大豆异黄酮的研究也愈来愈引起全世界科学家的广泛关注。

大豆异黄酮在自然界中有糖苷型和游离型 2 种形式, 异黄酮糖苷从结构上分为葡萄糖苷配基及配糖物 2 部分, 这 2 部分各自不同的结构组合形成不同的 9 种异黄酮葡萄糖苷。再加上 3 种游离型的大豆异黄酮: 大豆黄素 (Daidzein)、黄豆黄素 (Glycitein) 及染料木素 (Genistein), 自然界总共有 12 种大豆异黄酮。在非发酵大豆制品中, 异黄酮只有极少量以游离形式存在, 大部分以 β -葡萄糖苷的形式存在, 主要成分为: 大豆黄苷 (Daidzin)、黄豆黄苷 (Glycitin)、染料木苷 (Genistin)。此外, 还有较少的异黄酮苷的乙酰化合物和丙二酰化合物^[5]。

随着对大豆异黄酮研究的不断深入, 大豆异黄酮衍生物也逐渐被人所认识。现在国外已有关于异

黄酮衍生物合成的报道, 并且申请了专利。异黄酮衍生物是以异黄酮为原料合成的, 例如牛尿酚就是以大豆黄素为初始物经过一系列反应合成的。本实验的目的就是制备出高纯度的大豆黄苷及大豆黄素, 从而为异黄酮衍生物的制备打下基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

异黄酮粗品, 购于山东三维生物公司, 总异黄酮含量 37%, 其中 Daidzin 25.46%, Genistin 9.30%, 其他 2.10%。

乙醇、乙酸乙酯、丙酮, 均为分析纯, 购于化学试剂公司

1.2 方法分析

实验中所用的原料是一定含量的大豆异黄酮的混合物, 主要只含大豆黄苷 (Daidzin)、黄豆黄苷 (Glycitin) 和染料木苷 (Genistin), 而其中黄豆黄苷的含量一般较少, 因此主要的问题是把大豆黄素和染料木素分开, 然后再除掉非异黄酮杂质。根据大豆异黄酮的溶解度性质, 一般易溶于丙酮、甲醇、乙醇、乙酸乙酯及稀碱液, 难溶于乙醚、氯仿、苯、石油醚、正己烷等。在水溶性上, 与大豆异黄酮的结构有关。游离形式的大豆异黄酮水溶性最差, 基本不溶于水, 异黄酮糖苷一般易溶于水, 但其中的 Genistin

* 收稿日期: 2003-08-25

* * 通讯联系人: 北京化工大学 75 信箱, Tel: 010-64445884

作者简介: 贾乃[✉] (1978-), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物提取研究。

难溶于水, 在水中的溶解度在 4—50℃没有明显变化^[6]。另外大豆黄苷(Daidzin)、黄豆黄苷(Glycitin)在各种有机溶剂中的溶解度也肯定有差异, 比如大豆黄苷在乙酸乙酯中的溶解度明显比染料木苷小。

1.3 实验方法

1.3.1 根据大豆黄苷(Daidzin)、染料木苷(Genistin)在水中的溶解度差异, 调节不同的 pH 值(酸性环境), 比较提取液及沉淀中两者的含量。

1.3.2 根据两者在有机溶剂中的溶解度差异进行分离提纯。使用不同的溶剂进行萃取, 比较提取液中两者的含量变化。选出理想的溶剂, 再进行进一步萃取。

1.3.3 原料中的非异黄酮杂质可以通过稀碱液除去。将原料溶于稀碱液, 过滤除去杂质, 再调 pH 值到中性, 使异黄酮沉淀出来。

1.4 分析方法

实验结果的分析采用高效液相色谱(HPLC)。色谱条件为: 色谱柱, 苯基柱; 柱温, 50℃; 流动相, 甲醇: 1.8%冰醋酸(30: 70); 流动相流速, 1.0ml/min; 检测波长, 254nm。异黄酮标准品采用 Daidzin、Genistin 及其对应甙元的混标。标准品的 HPLC 谱图如下: (D、G、D'、G' 分别是 Daidzin、Genistin、Daidzein、Genistein 的简称, 下同)

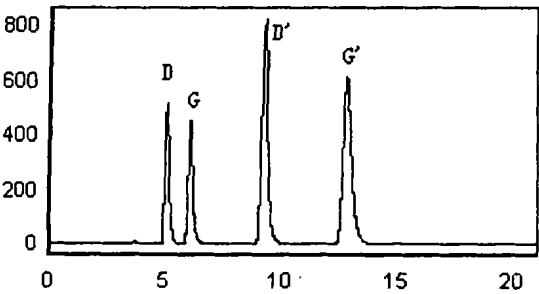


图1 D、G、D'、G' 的标准品谱图

Fig. 1 The chromatogram of D, G, D', G' standards

2 结果与讨论

2.1 水萃取实验

2g 原料加入 200ml 去离子水中, 50℃水浴 1 小时, 充分搅拌, 分别调 pH 值至 2.50、2.00、1.75、1.50, 上清液取样测 D、G 含量。结果如表 1 所示。

由表 1 可知, 不同 pH 值下提取液中 D、G 的比例变化不大, 且 D 的收率很低。

2.2 乙酸乙酯常温萃取实验

2.5g 原料加入 50ml 乙酸乙酯中, 充分混合, 冰

表 1 不同 pH 值下 D 的收率及 D、G 比

Table 1 Yield of D and D: G of different pH

上清液 pH 值 pH of solutions	D 的收率(%) Yield of D (%)	D: G
原料 material		2.74
2.5	10.35	3.09
2.0	11.05	3.21
1.75	10.04	3.16
1.5	9.27	3.28

箱中静置过夜, 过滤, 滤渣加 20ml 乙酸乙酯, 重复 3 次, 滤液合并, 滤渣烘干, 分别测 D、G 含量。结果如表 2 所示。

表 2 乙酸乙酯常温萃取结果

Table 2 Extraction with ethyl acetate at room temperature

	D: G	收率(%) Yield (%)
原料 Material	2.74	
萃取液 Solution	3.26	
滤渣 Residue	2.62	89

由表 2 可知, 滤渣中 D、G 比与原料相差不大甚至有所降低。因此溶剂常温萃取不可行, 下面采用溶剂回流萃取。

2.3 溶剂回流萃取实验

根据异黄酮的溶解度性质, 分别使用丙酮、无水乙醇、乙酸乙酯进行回流萃取实验。由于异黄酮在纯溶剂中溶解度比在溶剂水溶液中高, 因此实验中均选用纯溶剂, 且保证过量; 另外, 由于大豆黄苷在乙酸乙酯中的溶解度要比染料木苷小, 因此丙酮、无水乙醇萃取时取滤液, 而乙酸乙酯萃取时取滤渣。实验温度为沸点。工艺流程如下:

原料粉+40 倍溶剂→混合均匀, 沸点回流 2 小时→过滤, 滤渣加 40 倍溶剂→混合均匀, 沸点回流 2 小时→滤液合并, 回收溶剂。

实验结果如表 3 所示。

表 3 溶剂回流萃取结果

Table 3 Circumfluence extraction with different solvents

溶剂 Solvents	产品含量(%) Isoflavones contents(%)		D: G	收率(%) yield (%)
	D	G		
原料 Material	25.46	9.3	2.74	
丙酮 Acetone	45.7	4.96	9.21	76
无水乙醇 Ethanol	28.9	10.23	2.82	90
乙酸乙酯 Ethyl acetate	32.88	12.05	2.73	70

由表 3 可知, 丙酮萃取的结果最好, 可以明显的提高异黄酮含量及 D、G 比; 另外, 乙酸乙酯萃取也可以提高总黄酮含量。下面用这两种溶剂进行实

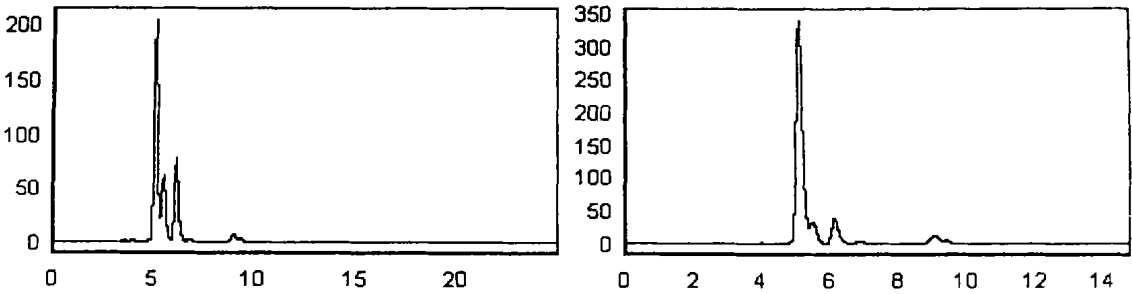


图 2 原料及丙酮提取物的谱图比较

Fig. 2 Chromatograms comparison of material and product with acetone extration

验。图 2 是原料及丙酮提取物的 HPLC 谱图比较。

2.4 组合溶剂回流萃取

2.4.1 丙酮 2 次萃取

丙酮 2 次萃取的工艺流程如下: 丙酮提取物 + 100 倍丙酮 → 沸点回流 2 小时 → 过滤, 滤液蒸干。

实验结果为: D, 34.37%; G, 4.93%; 收率 72%

2.4.2 乙酸乙酯、丙酮萃取

乙酸乙酯、丙酮萃取的工艺流程为: 原料 + 60 倍乙酸乙酯 → 沸点回流 2 小时 → 过滤, 滤渣 + 50 倍丙酮 → 沸点回流 2 小时 → 趁热过滤, 滤液蒸干。

实验结果为: D, 41.25%; G, 17.44%; 收率 66%

由上述实验结果可知, 乙酸乙酯、丙酮混合萃取的效果不很理想; 而丙酮 2 次萃取后所得产物的含

量比丙酮一次萃取物的含量还低, 因此可以断定滤渣中 D 的含量应该很高。

2.5 大豆黄苷的制备

通过上述实验可以得出, 丙酮可以用来制备大豆黄苷, 而乙酸乙酯和丙酮的进一步萃取则可以进一步提高其纯度。因此制备大豆黄苷的工艺路线总结为:

原料 + 80 倍丙酮 → 沸点回流 3 小时 → 趁热过滤 → 滤液蒸干 → 固体 + 100 倍乙酸乙酯 → 沸点回流 2 小时 → 过滤 → 滤渣 + 100 倍丙酮 → 沸点回流 2 小时 → 过滤, 滤渣烘干。图 3 为原料与所得产物的 HPLC 谱图比较。

产物含量: D, 89.6%; G, 2.29%; 收率 40%。所得产品基本可以达到要求。

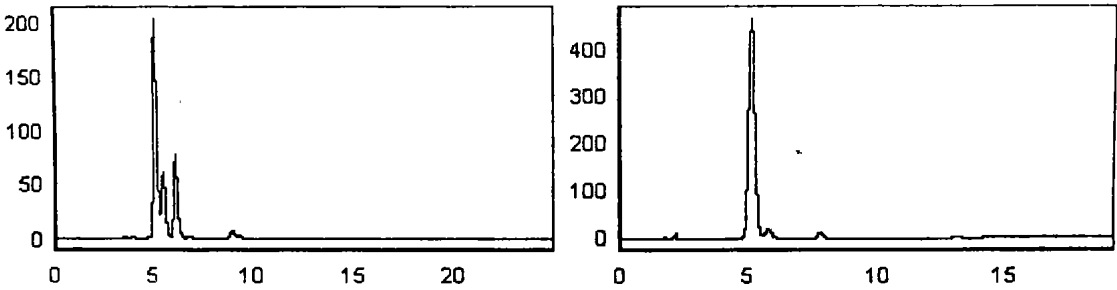


图 3 原料与大豆黄苷产品的谱图比较

Fig. 3 Chromatograms comparison of material and daidzin

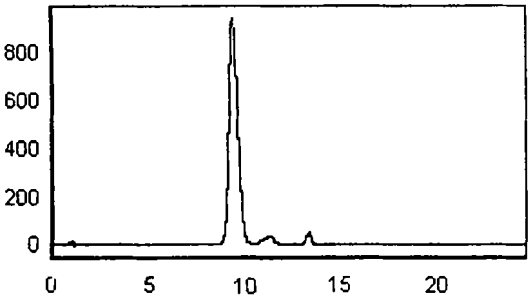


图 4 大豆黄素的 HPLC 谱图

Fig. 4 The chromatogram of daidzein

以上所得的大豆黄苷水解即可得到 90% 以上的大豆黄素, 水解条件为: 两相比 1:10 (W/V), 2% 盐酸溶液, 反应温度 120℃, 反应时间 4 小时。图 4 为所得产品的 HPLC 谱图, 从图中可以看出, 大豆黄苷已经完全转化为大豆黄素, 纯度 92.1%, 收率 99%。

3 结论

根据大豆异黄酮不同组分在不同溶剂中的溶解度差异, 通过溶剂回流萃取法, 可以从异黄酮粗品中

2.6 大豆黄素的制备

提取出高纯度的大豆黄苷,再通过盐酸水解的方法便可以得到其甙元。方法简单可行,操作方便,成本低廉,易于实现工业化生产。

参 考 文 献

- 1 Peterson, T. G., Barnes S. Genistein and biochain A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation[J] . Prostate, 1993, 22: 335—345
- 2 Messins M., Barnes S. The role of soy products in reducing cancer risk[J] . J. Natl Cancer Inst. 1991, 83: 541—546
- 3 Aedin Cassidy, Bryn Hanley, Rosa M. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health [J] . J Sci. Food Agric. 2000, 80: 1044—1047
- 4 Stephen Barnes. Evolution of the health benefits of soy isoflavones [J] . PSEBM, 1998, 217: 38—42
- 5 夏剑秋, 刘宇峰. 国内外大豆异黄酮的研发及生产动态[J] . 中国油脂, 2000, 27(5): 10—12
- 6 史宣明, 岳琳, 武丽荣. 大豆异黄酮的提取及精制[J] . 中国油脂, 2001, 26(2): 3—5
- 7 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

PREPARATION OF THE HIGH PURITY DAIDZIN AND SAIDZEIN

Jia Naikun Yuan Qipeng

(*Department of Pharmaceutical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029*)

Abstract Daidzin is extracted from rough isoflavone with different solvents. The optimal condition of extraction is obtained through the experiments of the circumfluence extraction with different solvents and hybrid solvents. The result shows that, on over 2.5 times content of Daidzin in materials can be arrived with the hybrid extraction of acetone and ethyl acetate. Ultimately, Daidzin is obtained with a purity 90% and yield 40%. And its aglycone is attained through the hydrolysis of Daidzin with hydrochloric acid.

Key words Isoflavone; Daidzin; Extraction