

• 药剂与工艺 •

键合 β -环糊精琼脂凝胶微球分离纯化大豆苷元及其色谱机制研究吕述权¹, 石国宗^{1*}, 许远杰¹, 唐博文², 王铎源¹, 潘启胜¹, 邓美健¹

1. 厦门蓝湾科技有限公司, 福建 厦门 361000

2. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102

摘要: **目的** 通过制备键合 β -环糊精琼脂凝胶微球 (AG- β -CD) 作为分离介质, 对大豆异黄酮粗品中大豆苷元进行高效分离纯化。**方法** 利用琼脂为原料, 通过乳化、交联并键合功能基团 β -环糊精 (β -CD) 制备 AG- β -CD; 将其作为一种分离介质, 通过考察流动相、洗脱体流量和微球负载量 3 个方面, 确定 AG- β -CD 分离纯化大豆苷元的工艺并进行验证, 质谱和核磁共振鉴定其结构; 通过与其他 2 种黄酮类物质表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 和葛根素在 C_{18} 反相柱色谱保留行为比较, 结合 autoDOCK4.0 进行分子模拟, 以及流动相乙腈体积分数变化对 3 种黄酮类物质在 AG- β -CD 固定相上的保留时间的变化曲线证明其色谱机制。**结果** 大豆异黄酮粗品中主要成分为大豆苷元 (57.14%), AG- β -CD 的负载量为 1.33 mg/mL (大豆异黄酮粗品总量/柱体积), 体流量为 2 BV/h 时, 通过 20%乙醇洗脱 2 BV、40%乙醇洗脱 1.33 BV、70%乙醇洗脱 6~7 BV, 得到质量分数 $\geq 95\%$ (平均质量分数 96.98%) 的大豆苷元, 收率为 97.86%。色谱机制实验表明 AG- β -CD 具有亲水和反相双重保留与分离作用。**结论** AG- β -CD 能够高效地分离纯化大豆苷元。

关键词: 琼脂凝胶微球; β -环糊精; 大豆苷元; 亲水作用色谱; 反相作用色谱; 分离纯化; 大豆异黄酮

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)15-2627-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.008

Separation and purification of daidzein by agar gel microspheres bonded β -cyclodextrin study on and its chromatographic mechanismLV Shu-quan¹, SHI Guo-zong¹, XU Yuan-jie¹, TANG Bo-wen², WANG Xin-yuan¹, PAN Qi-sheng¹, DENG Mei-jian¹

1. Xiamen Bule Bay Science & Technology Co., Ltd., Xiamen 361000, China

2. School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China

Abstract: **Objective** Daidzein was efficiently purified by agar gel microspheres bonded β -cyclodextrin (AG- β -CD). **Methods** Using agar as raw material, after emulsification, crosslinking, and bonding β -CD as functional group, AG- β -CD was synthesized for the purification of daidzein, and the purification process was determined and proved with mobile phase, flow rate, and loading capacity of microspheres. The structure of daidzein was identified by MS and NMR, AG- β -CD was chromatographically evaluated with daidzein, EGCG, and puerarin as the following tripartition such as difference of retention behavior on C_{18} reversed phase column chromatography, molecular simulation by autoDOCK4.0, and retention time curves on AG- β -CD with different contents of acetonitrile. **Results** The main component of soybean isoflavone was daidzein (57.14%). The loading quantity of AG- β -CD was 1.33 mg/mL, flow rate was 2 BV/h, eluted by 2 BV of 20% ethanol, 1.33 BV of 40% ethanol, and 6—7 BV of 70% ethanol, the content was $\geq 95\%$, purity of daidzein (96.98%) was obtained with 97.86% yield. Chromatographic mechanism research showed that AG- β -CD had hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase chromatography. **Conclusion** AG- β -CD is capable of highly efficient purification of daidzein.

Key words: agar gel microspheres; β -cyclodextrin; daidzein; hydrophilic interaction chromatography; reversed-phase chromatography; separation and purification; soybean isoflavone

收稿日期: 2016-02-01

基金项目: 厦门市海洋经济创新发展区域示范项目 (13CZP004SF27)

作者简介: 吕述权, 硕士, 研究方向为天然产物化学。Tel: (0592)5777053 E-mail: shuquan1234@126.com

*通信作者 石国宗, 高级工程师, 研究方向为有机合成化学。Tel: (0592)6318527 E-mail: shigz@bluebayst.com

大豆异黄酮 (soybean isoflavone) 是从大豆中提取分离的结构类似于雌性激素的一类次生代谢产物的总称。大豆异黄酮中主要成分有 12 种, 分为大豆苷类 (daidzin group)、黄豆苷类 (glycitin group) 以及染料木苷类 (genistin group) 3 类, 主要以游离型的苷元或是苷类形式存在^[1]。其中苷元作为体内生物活性的主要形式之一受到更多关注和研究^[2]。大豆苷元作为大豆异黄酮的主要成分之一, 具有抗心律失常^[3]、心肌保护作用^[4-5]、抗肿瘤^[6-7]、抗氧化^[8-9]、抗炎^[10]、促进神经保护或再生功能^[11]、心脑血管保护、雌激素样和抗雌激素样作用、抗骨质疏松、提高机体免疫力及影响内分泌系统^[12]、降低胆固醇^[13]等多种药理活性。目前对于大豆异黄酮的制备多集中在大豆异黄酮混合物的研究, 针对大豆苷元纯化的研究较少。Xu 等^[14]利用溶剂萃取、氧化铝纯化、重结晶操作从葛根中得到大豆苷元; 康少华等^[15]利用硅胶柱纯化后大豆苷元质量分数达到 90%; Yang 等^[16]利用高速逆流色谱从大豆粗提物中得到质量分数为 99% 的大豆苷元。以上方法较为繁琐, 对纯化设备要求较高, 投入较大, 难以高收率获得高质量分数的大豆苷元。

β -环糊精 (β -CD) 是由 7 个吡喃葡萄糖单元通过 α -1,4 糖苷键组成的“外亲水, 内疏水”环状空腔结构的化合物, 其最重要的特点是可作为主体分子能通过“内识别”作用 (包括空间匹配效应、范德华力及疏水作用) 和“外识别”作用 (包括氢键作用、 π - π 电子作用、偶极-偶极作用及静电作用) 对化合物进行识别^[17], 根据上述特性, 多种 β -CD 键合不同种类基质的固定相用来分离葛根素^[18]、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)^[19]等多种天然产物。本实验以键合 β -CD 琼脂凝胶微球 (AG- β -CD) 作为分离介质, 用于大豆异黄酮粗品中大豆苷元的分离纯化, 对纯化工艺进行了优化, 并对其色谱机制进行了研究。

1 仪器与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪、2998 PDA 检测器、Waters C-18 柱, 美国 Waters 公司; 色谱柱, 上海华美实验仪器厂; 制备型高效液相色谱仪 LC3000, 包括二元梯度泵、紫外检测器、混合器, 北京创新通恒科技有限公司; AUW120D 半微量分析天平, 日本岛津公司。

大豆异黄酮粗品 (批号 20140428, 大豆苷元质量分数 57.14%)、大豆苷元对照品 (20150817, 质

量分数 $\geq 98\%$)、葛根素 (20150516, 质量分数 $\geq 98\%$)、EGCG (20151109, 质量分数 $\geq 98\%$), 西安沃森生物科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 无水乙醇, 分析纯, 西陇化工股份有限公司; 琼脂粉、 β -CD、环己烷、司盘 85, 国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 AG- β -CD 的制备

参考文献方法^[20-22]并加以改进。①琼脂凝胶裸球制备: 配制 1 L 的 0.1 g/mL 的琼脂水溶液, 使其加热溶解后, 加入 1 L 混合后的油相和乳化剂 (环己烷-司盘 85, 4:1) 搅拌乳化 30 min, 抽滤, 乙醇和纯化水交替洗涤去除残余油相和乳化剂得到琼脂凝胶裸球。②裸球交联: 取 100 g 裸球加入 100 mL 纯化水后, 搅拌中依次加入 15 g 的硫酸钠, 4 mL 的 50% NaOH 和 1.2 g 硼氢化钠后, 缓慢加入 25 mL 环氧氯丙烷和 50 mL 的 50% NaOH 后, 于 50 °C 加热搅拌 18 h, 冷却至室温用乙酸调节 pH 5.0~6.0, 抽滤后乙醇和纯化水交替洗涤得到交联微球。③键合 β -CD: 取 5 g β -CD 加入 100 mL 纯化水加热溶解后, 加入 100 g 交联微球, 后续同步步骤②, 得到 AG- β -CD。

微球制备完成后, 依次通过 0.300、0.100、0.068 mm 筛网的振动筛进行筛选, 通过 0.068 mm 筛网的微球用于分离纯化应用, 通过扫描电镜 (SEM) 观察以及通过粒度分析仪测定粒径大小及其分布情况发现 AG- β -CD 颗粒较为均匀, 其平均粒径大小为 $(12.39 \pm 0.80) \mu\text{m}$, 见图 1。

2.2 大豆苷元分析检测方法

2.2.1 色谱条件^[23] 色谱柱为 Waters C-18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-甲醇, 洗脱方式为梯度洗脱: 0~15 min, 35% 甲醇; 15~20 min, 35%~65% 甲醇; 20~40 min, 65%~55% 甲醇; 40~50 min, 55%~35% 甲醇; 检测波长 254 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL 。色谱图见图 2。

2.2.2 对照品溶液配制 精确称取 50 mg 大豆苷元对照品至 50 mL 量瓶中, 分别加甲醇溶解完全后并定容至刻度, 为大豆苷元对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液配制 精确称取大豆异黄酮粗品 50 mg 至 50 mL 量瓶中, 分别加甲醇溶解完全后并定容至刻度后摇匀, 过 0.22 μm 的微孔滤膜, 滤液为大豆异黄酮供试品溶液。

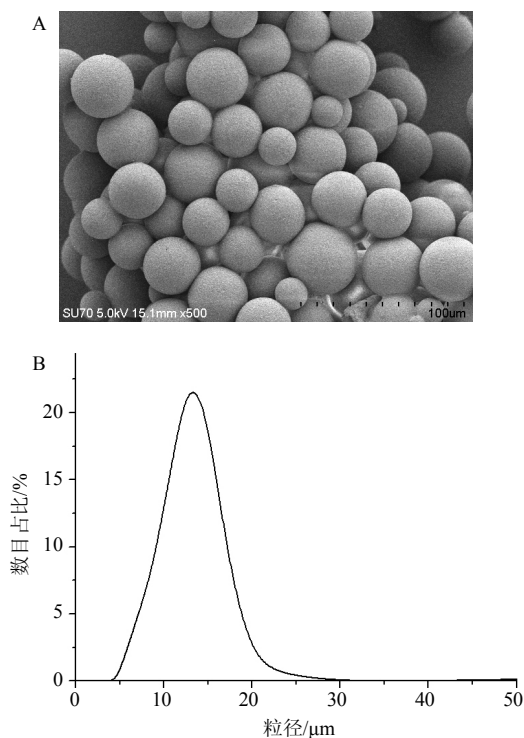


图 1 AG-β-CD 的 SEM 照片 (A) 及其粒径分布 (B)
Fig. 1 SEM micrograph (A) and particle size distribution (B) of AG-β-CD

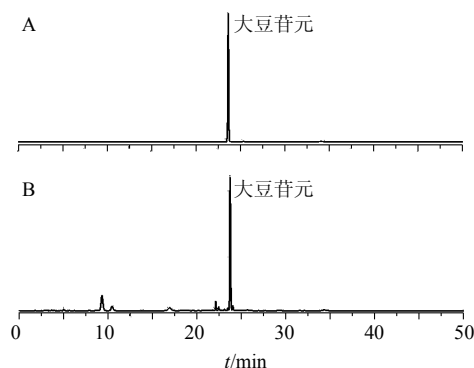


图 2 大豆苷元对照品 (A) 和大豆异黄酮粗品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of reference substance (A) and crude product (B) of soybean isoflavone

2.2.4 线性范围考察 精密量取大豆苷元对照品溶液各 6、5、4、3、2、1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容到刻度线后摇匀, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=3.14 \times 10^7 X+1.18 \times 10^5$, $r=0.999\ 8$, 线性范围为 0.1~0.6 mg/mL。

2.2.5 精密度试验 取对照品溶液, 按照“2.2.1”项色谱条件重复进样 6 次, 记录色谱峰面积, 其 RSD

为 0.76%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后, 按照“2.2.1”项色谱条件测定峰面积, 其 RSD 为 0.97%, 结果表明供试品溶液在 24 h 是稳定的。

2.2.7 重复性试验 精密称取大豆异黄酮粗品 6 份, 按照“2.2.3”项方法平行制备同样供试样品溶液 6 份, 按照“2.2.1”项色谱条件测定峰面积, 计算大豆苷元质量分数, 其 RSD 为 1.12%, 表明重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 按照“2.2.3”项精密称取 50 mg 大豆异黄酮粗品 6 份, 分别加入 3 mL 的大豆苷元对照品溶液于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度线, 按照“2.2.1”项色谱条件测定并计算, 其平均加样回收率为 100.23%, RSD 为 1.34%。

2.3 AG-β-CD 分离纯化大豆苷元

取 AG-β-CD 凝胶微球装入色谱柱 (10 mm×40 cm) 中, 用纯化水洗涤压柱, 柱体积为 (30.0 ± 0.5) mL, 装柱完毕后连接到制备型色谱系统上, 用流动相进行平衡 60 min。称取 20 mg 大豆异黄酮粗品溶于流动相中后上柱, 紫外检测器监测波长 254 nm, 按色谱峰顺序收集, 峰宽较大时, 按照 10 mL 收集 1 次, 通过 HPLC 检测其量和色谱纯度后, 合并质量分数 (指色谱纯度, 为面积归一化法得到) $\geq 95\%$ 的洗脱液。

2.3.1 流动相的考察 考虑到成本和环境安全因素, 以乙醇和水作为流动相进行纯化, 上柱洗脱体积流量为 1 mL/min 进行洗脱, 实验结果表明, 15% 乙醇作为流动相洗脱 200 min 后, 主要成分难以洗脱下来, 而 70% 乙醇能够迅速将主要成分洗脱下来, 但难以达到对主要成分纯化的目的 (图 3-A), 因此流动相的优化区间设置为 15%~70% 乙醇。

当 20% 乙醇洗脱 2 BV 后, 部分杂质被洗脱下来, 将乙醇体积分数增加到 70%, 可将大豆苷元洗脱下来, 质量分数 $\geq 95\%$ 的大豆苷元收率为 88.64% (图 3-B, 收集时间为 105~135 min), 但少量的杂质与大豆苷元重合, 降低其质量分数和收率。

继续增加 20% 乙醇洗脱体积时, 难以将其他杂质与大豆苷元实现较好地分离, 并且使得目标产物的峰展宽增大, 因此增加 1 个洗脱梯度, 以达到分离效果和兼顾洗脱效率的目的, 结果表明 20% 乙醇 (0~60 min)、40% 乙醇 (60~100 min)、70% 乙醇 (100~200 min), 大豆苷元能与其他成分得到较好

地分离(图 3-C),可以得到 4 个色谱峰,通过 HPLC 分析检测后,其中色谱峰 4(保留时间为 120~180 min)是大豆苷元富集馏分,质量分数为 97.76%(图 4)。

2.3.2 洗脱体流量的考察 称取 20 mg 大豆异黄酮粗品,色谱柱规格和柱体积(BV)同上,按照 20%乙醇(2 BV)、40%乙醇(1.3 BV)洗脱后,70%乙醇继续洗脱,通过检测分析发现,当洗脱体流量为 2 mL/min,质量分数 $\geq 95\%$ 的大豆苷元收率为

96.79%(质量分数 97.53%),增加到 3 mL/min,质量分数 $\geq 95\%$ 的大豆苷元收率为 76.28%(质量分数 97.81%)。

以大豆苷元色谱质量分数 $\geq 95\%$ 的收率为指标考察,并通过制备色谱图(图 5,阴影部分为质量分数 $\geq 95\%$ 的大豆苷元,下同)观察发现,增加洗脱体流量,色谱峰 3 和 4 的分离度降低,继而会降低收率,体积流量为 2 mL/min 时并不明显,当体流量增加到 3 mL/min 后,收率迅速下降。

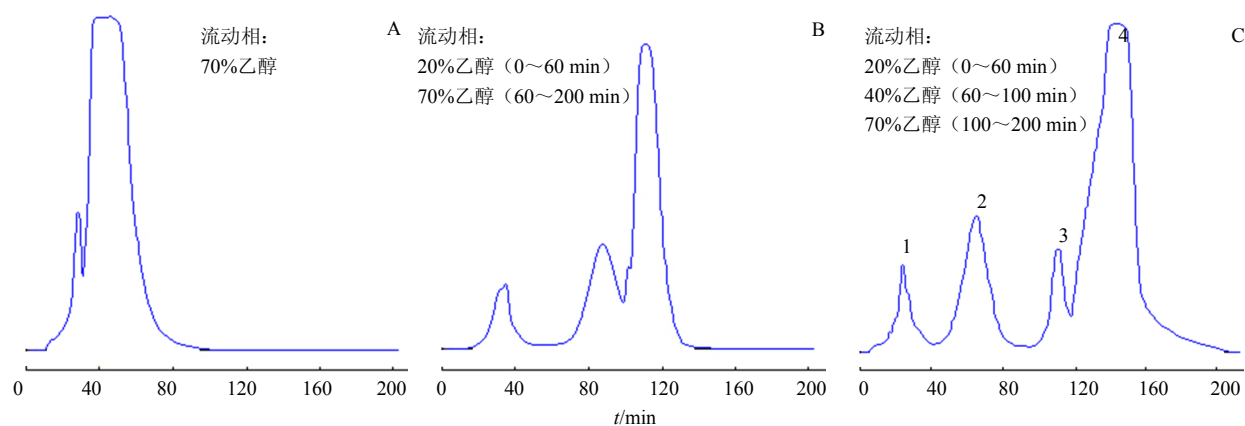


图 3 AG- β -CD 纯化大豆异黄酮的制备色谱图

Fig. 3 Preparative chromatogram of purification of soybean isoflavone by AG- β -CD

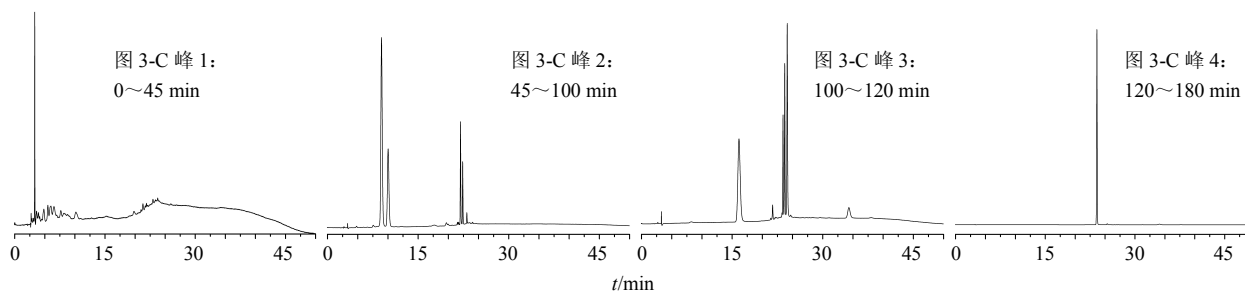


图 4 AG- β -CD 纯化大豆异黄酮 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of soybean isoflavone purified by AG- β -CD

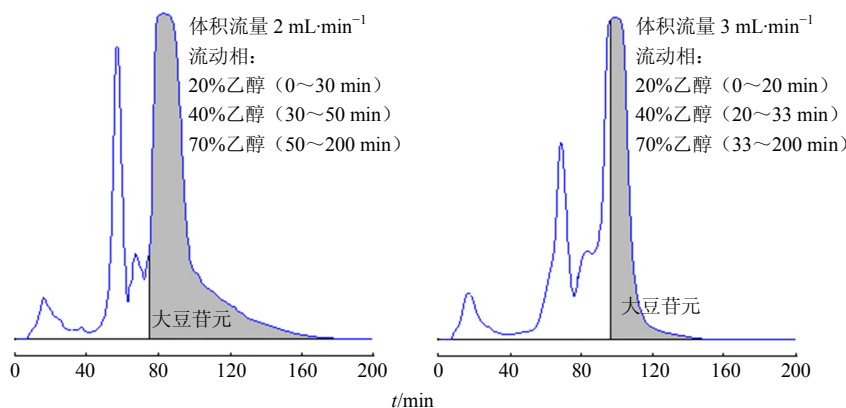


图 5 不同体流量的 AG- β -CD 纯化大豆苷元制备色谱图

Fig. 5 Preparative chromatogram of different flow rate for purification of daidzein by AG- β -CD

相同的色谱条件下,通过压力测试实验发现,大豆异黄酮粗品上样量增加到 30 mg 时,洗脱体积流量 2 mL/min 时,质量分数 $\geq 95\%$ 的大豆苷元收率迅速下降,为 78.47%。综合洗脱效率、微球负载量和收率 3 个方面考虑,2 BV/h (1 mL/min) 的洗脱体积流量达到的纯化效果最佳。

2.3.3 微球负载量(负载量为上样量与微球体积之比)的考察 确定洗脱体积流量后,按照相同的色

谱柱规格和柱体积,按照优化后的流动相洗脱条件,体积流量 1 mL/min,分别称取 30、40、50 mg 大豆异黄酮粗品,通过流动相溶解后上样,通过制备色谱观察(图 6),HPLC 检测质量分数和质量浓度,并计算收率。结果表明,上样量 40 mg,即分离介质负载量为 1.33 mg/mL(上样量与微球柱体积之比)时效果最佳,质量分数为 97.66%时收率达到 97.23%。

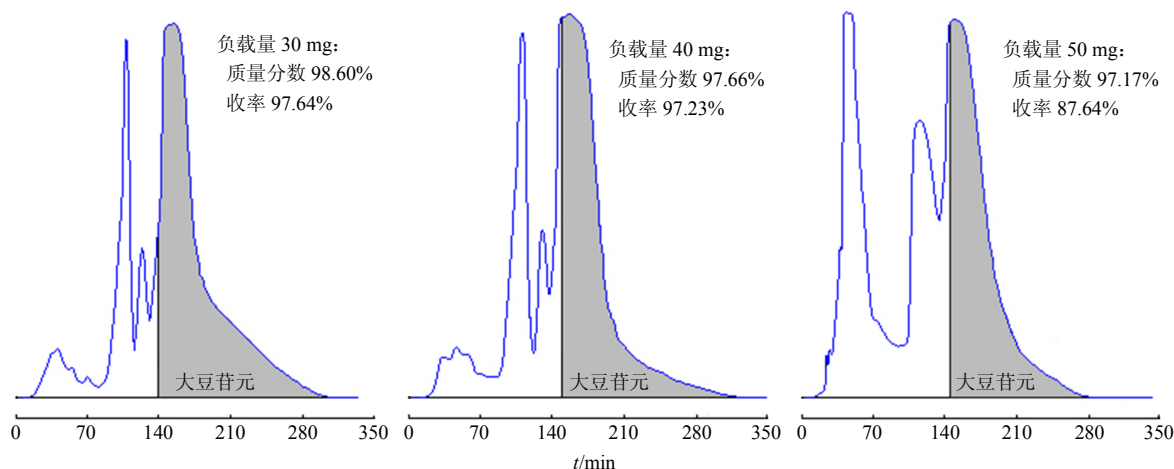


图 6 不同微球负载量的 AG-β-CD 纯化大豆苷元制备色谱图

Fig. 6 Preparative chromatogram of different sample loading for purification of daidzein by AG-β-CD

2.4 结构鉴定

通过 HPLC 分析可以看出大豆异黄酮主要成分富集在制备色谱图色谱峰 4,即保留时间在 120~180 min,目标产物质量分数较高,根据上述最佳流动相纯化条件,富集的产物浓缩后冷冻干燥进行样品制备,通过质谱和核磁共振鉴定其结构。冻干样品为淡黄色粉末;HR-ESI-MS (m/z): 255.062 05 [$M+H$] $^+$ (计算值 255.062 05),推测分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.28 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 7.39 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, dd, $J=8.8, 2.0$ Hz, H-6), 6.86 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.81 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.7 (C-4), 163.1 (C-7), 157.5 (C-9), 157.2 (C-2), 152.7 (C-4'), 130.0 (C-2', 6'), 127.2 (C-5), 123.4 (C-1'), 122.6 (C-3), 116.3 (C-10), 115.4 (C-6), 114.9 (C-3', 5'), 102.1 (C-8)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[24],鉴定其结构为大豆苷元。

2.5 验证试验

根据上述优化后的色谱条件,柱体积为 (30.0 $\pm$ 0.5) mL,按 1.33 mg/mL 负载量将样品溶解到流动

相中后按照 2 BV/h 体积流量上样和洗脱,洗脱程序为 20%乙醇 2 BV、40%乙醇 1.33 BV、70%乙醇洗脱 6~7 BV。按照最佳纯化条件,连续 3 批次进行验证,结果见表 1,色谱图见图 7。由验证试验结果发现,大豆异黄酮粗品通过 AG-β-CD 纯化后的大豆苷元平均质量分数达到 96.98%,RSD 为 0.22%;平均收率达到 97.86%,RSD 为 0.20%;因此,AG-β-CD 纯化大豆苷元的方法是稳定可靠的。

2.6 色谱行为与分离机制

以琼脂为原料,通过乳化、交联后制备琼脂凝胶微球,并键合 β-CD 功能基团对大豆异黄酮进行纯化,实验过程中发现,没有键合 β-CD 的琼脂凝胶微球,无论在纯水体系还是高浓度的有机溶剂中,

表 1 AG-β-CD 纯化大豆苷元验证试验

Table 1 Verification of purification of daidzein by AG-β-CD

批号	收集时间*/min	质量分数/%	收率/%
1	140~210	96.89	97.89
2	140~210	97.23	97.65
3	130~200	96.83	98.03

*质量分数 $\geq 95\%$ 的大豆苷元收集时间

*collection time of daidzein at purity $\geq 95\%$

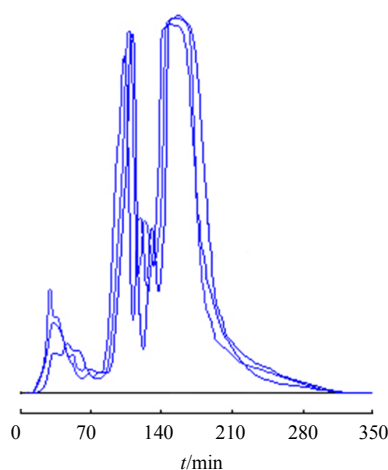


图 7 AG-β-CD 纯化大豆苷元制备色谱图验证

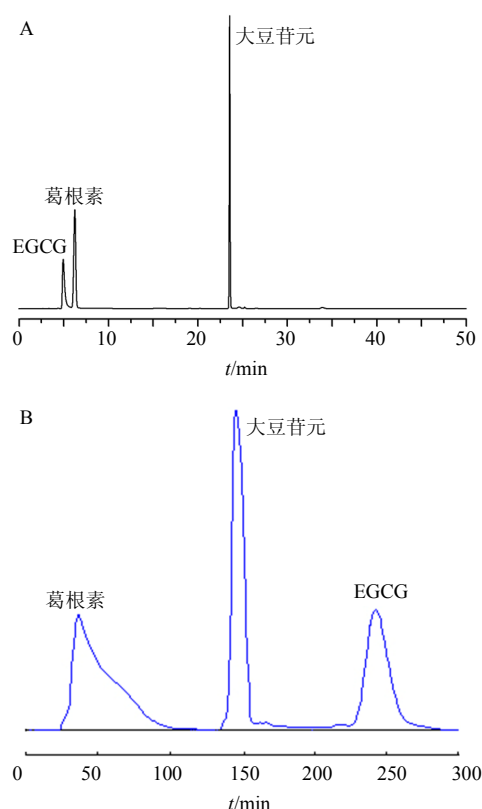
Fig. 7 Verification of preparative chromatogram for purification of daidzein by AG-β-CD

对大豆异黄酮粗品基本无吸附和分离作用, 因此表明 AG-β-CD 的吸附与分离作用源于 β-CD。

2.6.1 保留行为比较 β-CD 固定相在制备分离色谱中报道较多的是黄酮类化合物的纯化研究, 本实验以 EGCG、葛根素 (puerarin) 和大豆苷元为研究对象, 通过 C₁₈ 色谱柱的色谱保留行为进行对比。各称取 2 mg 的 EGCG、葛根素、大豆苷元混合溶解于 10% 甲醇, C₁₈ 色谱柱的色谱条件除紫外检测波长设置为 275 nm 外, 其他条件同“2.2.1”项; AG-β-CD 的色谱柱规格和柱体积与“2.3”项相同, 流动相按照 10% 甲醇 (0~80 min), 70% 甲醇 (80~150 min), 100% 甲醇 (150~300 min), 体积流量 1 mL/min 进行洗脱; 为兼顾 3 种物质的检测, 紫外波长设置为 275 nm。

根据反相色谱分离原理, 不同的化合物根据其疏水特性的差异而得到分离。根据图 8 所示, EGCG、葛根素和大豆苷元在 C₁₈ 色谱柱中的洗脱顺序是 EGCG > 葛根素 > 大豆苷元; 而在 AG-β-CD 中, 按照梯度洗脱, 其洗脱顺序为葛根素 > 大豆苷元 > EGCG, 洗脱顺序与反相色谱柱 C₁₈ 并不完全一致, 以上现象说明 AG-β-CD 的保留与分离作用除了 β-CD 空腔提供了疏水作用外, 还有其他类型的作用力需要进一步验证。

2.6.2 分子模拟研究 客体分子能进入环糊精空腔, 与环糊精空腔的体积匹配作用是最重要的, 其中相对分子质量为 200~800 的客体分子较为适合其空腔尺寸^[17]。通过 autoDOCK4.0 软件进行分子模拟对接, 从空间结构看, EGCG 与 β-CD 通过空间

图 8 3 种黄酮类化合物的 C₁₈ HPLC 图 (A) 和 AG-β-CD 制备液相色谱图 (B)Fig. 8 C₁₈ HPLC of three kind of flavonoids (A) and preparation chromatogram of AG-β-CD (B)

诱导效应, 整个分子基本进入 β-CD 的空腔当中, 通过形成稳定的复合物; 大豆苷元分子较小, 进入 β-CD 内腔, 与之疏水作用较强; 葛根素仅部分结构与 β-环糊精空间匹配, 作用较弱 (图 9)。比较 EGCG, 葛根素和大豆苷元与 β-CD 结合自由能发现, 影响其分子间结合的稳定性是由多重作用力综合作用的结果, 如疏水作用力、氢键作用力、范德华力等。其中 EGCG 与 β-CD 形成的结合自由能最小 ($-\Delta G = -6.7$), 因此是最稳定的, 其次是大豆苷元 ($-\Delta G = -5.4$), 结合作用最弱的是葛根素 ($-\Delta G = -5.14$), 因此可以预测 3 种化合物的保留能力是 EGCG > 大豆苷元 > 葛根素, 与实验结果一致。

2.6.3 保留机制研究 以 EGCG、葛根素和大豆苷元为研究对象, 各称取 2 mg 的对照品混合溶解于乙腈溶液中, 研究 AG-β-CD 不同体积分数的乙腈对 3 种黄酮类化合物的保留行为 (除流动相外, 其他色谱条件同“2.6.1”)。

在纯化实验过程中发现, 3 种黄酮化合物的保留时间并不呈现梯度变化, 都呈现出“U”形洗脱

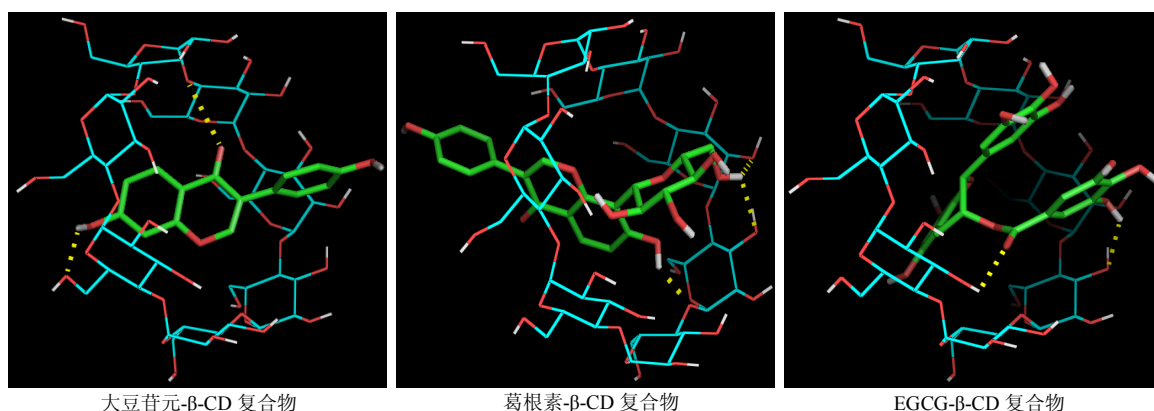


图 9 最稳定的 β -CD 复合物结构
Fig. 9 Most stable β -CD complexes

曲线(图 10),与文献报道一致^[25-26]。尤其是 EGCG 的保留趋势更加明显,20%乙腈连续洗脱 300 min 难以洗脱下来,60%乙腈保留时间最短,而 100%乙腈连续洗脱 200 min 依然难以洗脱,这与 2-苯基色原酮母核及其 C 环上的苯甲酯结构引起的疏水性和众多的羟基提供的亲水性有关,葛根素和大豆苷元也具有相关的疏水和亲水结构,从而与 β -CD “外亲水,内疏水”的结构相互作用,表明 AG- β -CD 具有亲水与反相双重保留与分离作用。

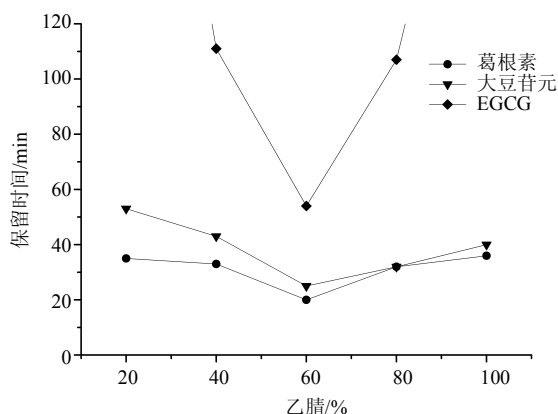


图 10 3 种黄酮化合物保留时间曲线
Fig. 10 Retention time curves of three kinds of flavonoids

3 讨论

本研究利用廉价易得的琼脂制备的 AG- β -CD 凝胶分离介质,对大豆异黄酮主要成分进行纯化,并对流动相,上样量和体积流量关键工艺参数进行系统的研究,得到了高质量分数与高收率的大豆苷元。本方法纯化体系简单,溶剂毒性低,具有较好的实用价值,为大豆异黄酮标准化药用开发提供了可靠的参考依据。

色谱机制研究表明,AG- β -CD 具有亲水与反相

双重作用保留与分离作用,通过流动相的改变,可以在单一色谱柱中实现不同的分离模式,并且 β -CD 固定相性质稳定性、操作简便,这为复杂的天然产物分离提供了较好的分离模式。

志谢:厦门大学药学院孙翠玲工程师在质谱和核磁共振检测方面提供相关帮助。

参考文献

- [1] 杨学东,邓志成,王晶,等.反相高效液相色谱法制备纯化大豆异黄酮糖苷[J].色谱,2006,24(4):363-366.
- [2] Setchell K D R, Brown N M, Linda Z N, *et al.* Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(2): 447-453.
- [3] 叶和,邱峰,曾靖,等.大豆苷元抗心律失常作用的研究[J].中国中药杂志,2003,28(9):853-856.
- [4] 周俐,周青,熊小琴,等.大豆苷元对压力负荷性心肌梗死大鼠心室重构的影响[J].中国中药杂志,2007,32(14):1449-1452.
- [5] 周俐,刘建新,周青,等.大豆异黄酮对大鼠心肌梗死与纤维化的保护作用[J].中草药,2007,38(11):1673-1677.
- [6] Jin S, Zhang Q Y, Kang X M, *et al.* Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21: 263-268.
- [7] Liu X, Suzuki N, Laxmi Y R S, *et al.* Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents [J]. *Life Sci*, 2012, 91(11/12): 415-419.
- [8] Roghani M, Mahdavi M R V, Jalali-Nadoushan M R, *et al.* Chronic administration of daidzein, a soybean

- isoflavone, improves endothelial dysfunction and attenuates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(1): 112-117.
- [9] 范红艳, 任 旷, 王艳春, 等. 大豆异黄酮对醋酸铅致小鼠睾丸组织损伤的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 227-231.
- [10] Choi E Y, Jin J Y, Lee J Y, *et al.* Anti-inflammatory effects and the underlying mechanisms of action of daidzein in murine macrophages stimulated with iPrevotella intermedia/i lipopolysaccharide [J]. *J Periodontal Res*, 2012, 47(2): 204-211.
- [11] Ma T C, Campana A, Lange P S, *et al.* A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzein as a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(2): 739-748.
- [12] 钱一鑫, 何 霏, 李洪庆, 等. 大豆苷元药剂学研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1429-1434.
- [13] 李培恒, 王继峰, 牛建昭, 等. 染料木素和大豆苷元对去卵巢大鼠胆固醇代谢的影响 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3): 276-279.
- [14] Xu H N, He C H. Extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi using *n*-butanol/water two-phase solvent system and separation of daidzein [J]. *Sep Purif Technol*, 2007, 56(1): 85-89.
- [15] 康少华, 芦明春. 硅胶柱层析法分离大豆异黄酮苷元的研究 [J]. 中国酿造, 2009, 28(1): 29-32.
- [16] Yang F Q, 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(2): 163-170.
- [17] 李 霞, 周智明, 孟子晖. β -环糊精衍生物的超分子体系识别机理及其在手性分离中的应用 [J]. 色谱, 2010, 28(4): 413-421.
- [18] 贺湘凌, 谭天伟, Janson J C. 利用 β -环糊精键合固定相分离纯化葛根素 [J]. 色谱, 2003, 21(6): 610-613.
- [19] Lai S M, Gu J Y, Huang B H, *et al.* Preparative separation and purification of epigallocatechin gallate from green tea extracts using a silica adsorbent containing β -cyclodextrin [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 887/888: 112-121.
- [20] Li S R, Chen P Y, Chen L Y, *et al.* Synthesis of hagin E, equol, daidzein, and formononetin from resorcinol via an isoflavene intermediate [J]. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50(18): 2121-2123.
- [21] 张 帆. 琼脂凝胶微球的制备修饰及应用 [D]. 北京: 北京化工大学, 2015.
- [22] 张荣生, 石国宗, 张慧兰, 等. DEAE-琼脂凝胶微球的制备及在 R-PE 和 C-PC 提取分离中的应用 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 301-306.
- [23] 胡晓娟, 苏 惠. 保健品原料中大豆异黄酮的 HPLC 法测定 [J]. 光谱实验室, 2007, 24(2): 268-270.
- [24] Li S R, Chen P Y, Chen L Y, *et al.* Synthesis of hagin E, equol, daidzein, and formononetin from resorcinol via an isoflavene intermediate [J]. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50(18): 2121-2123.
- [25] 徐雪峰, 沈爱金, 郭志谋, 等. 基于巯基-烯点击化学法的 β -环糊精固定相多模式色谱保留行为研究 [J]. 色谱, 2013, 31(3): 185-190.
- [26] 梅丹萍, 吕永琴, 张海洋, 等. 分子模拟研究 β -环糊精整体柱的分离识别机理 [J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2012, 39(1): 83-88.