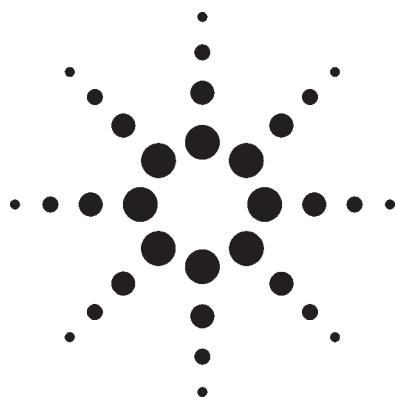




用反相HPLC和紫外-可见与荧光检测器分离红色三叶草中的植物雌激素应用

作者: Puri G. David
Udo Huber

摘要

植物雌激素的研究已经得到广泛的关注，这是因为这些植物的雌激素具有防癌的作用，特别是乳腺癌和前列腺癌。它们是具有雌激素作用的非甾族化合物，本研究中，我们介绍用紫外—可见检测和荧光检测的HPLC分离和鉴定红色三叶草中的植物雌激素。

引言

植物雌激素已被研究作为可能的防癌药并用于治疗更年期和骨质疏松病。实验室动物试验和对亚洲和西方人口的比较表明，饮食在这类健康问题方面起着重要作用。

一项研究发现，亚洲人食用大量的豆制品（含有大量的植物雌激素），因此亚洲人中与荷尔蒙相关的癌症发病率较低，更年期症状和骨质疏松的问题也较少。目前正在研究异

黄酮(isoflavonoids)，拟雌内酯类(coumestans)，和木酯素(lignans)类植物雌激素食品对人体健康的促进作用。

在本应用报告中，我们介绍从红色三叶草中萃取得到的7种植物雌激素及其具有异黄酮结构的糖苷的分离和鉴定，这些糖苷包括，金雀异黄甙(genistin)，芒柄花苷(ononin)，

黄豆苷原(daidzein)，sissotrin，金雀异黄素(genistein)，芒柄花黄(formononetin)和生原禅宁-A(biochanin A)(图1)

异黄酮的鉴定是基于保留时间和荧光^{2,3}或紫外—可见检测。为了确认鉴定，对一些化合物的紫外—可见光谱图与标准谱图进行了比较。

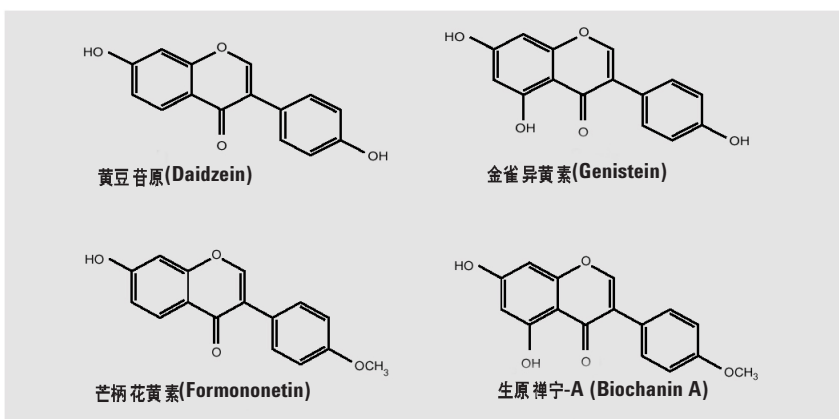


图1. 一些植物雌激素的结构



Agilent Technologies

仪器

系统包括:

- Agilent 1100系列脱机剂
- Agilent 1100系列四元泵
- Agilent 1100系列自动进样器
- Agilent 1100系列柱温箱
- Agilent 1100系列二极管阵列检测器
- Agilent 1100系列荧光检测器

系统通过安捷伦化学工作站控制。

结果与讨论

萃取

以往使用甲醇/2N HCl 80:20 v/v对样品进行萃取导致了一些异黄酮糖苷水解成糖苷配基和一些未知化合物, 因此本文中使用甲醇对样品进行超声波萃取。

标准品的测定

采用标准品开发了基线分离8种植物雌激素[金雀异黄酮(genistin), 芒柄花苷(ononin), 黄豆苷原(daidzein), sissotrin, 金雀异黄素(genistein), 芒柄花黄素(formononetin), 拟雌内酯(coumestrol), 拟雌

内酯(coumestrol), 芒柄花黄素 (formononetin), 生原禅宁-A (biochanin A)]的HPLC方法。因为其中4种化合物显示很好的荧光性质, 所以, 采用Agilent 1100系列荧光检测器(FLD)易于鉴定复杂天然产物提出物中的这些化合物。采用FLD也是鉴定与金雀异黄素(genistein)共流出的拟雌内酯(coumestrol)的唯一可能方法, 因为只有拟雌内酯(coumestrol)显示荧光性质。图2和3为使用二极管阵列检测器和荧光检测器检测标准品的色谱图。

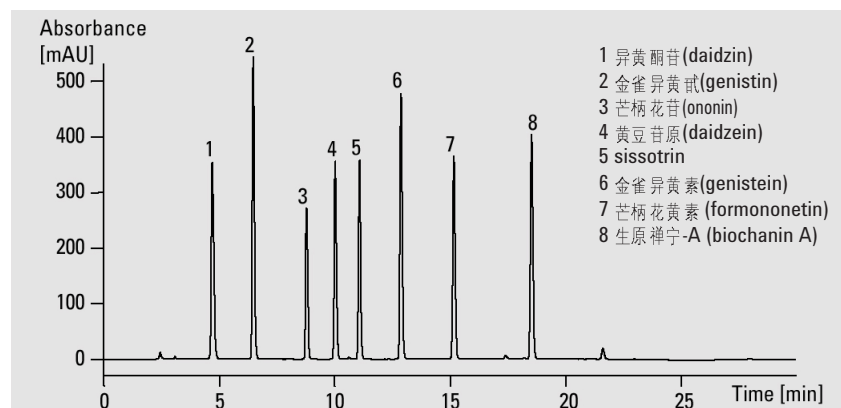


图2. 使用紫外-可见检测器在260 nm处检测的标准品的色谱图

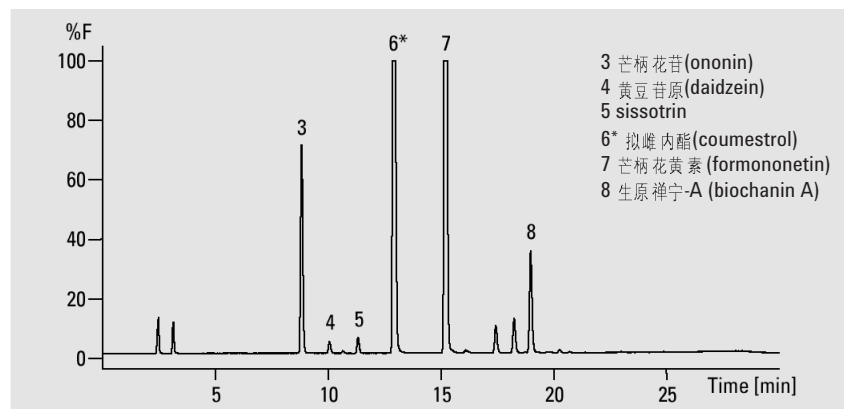


图3. 使用荧光检测器检测标准品的色谱图, Ex = 249 nm, Em = 419 nm

色谱柱:	Zorbax SB-C18
	4.6 x 250 mm, 5 μ m
流动相:	含0.1 % H_3PO_4 的水= A
	含0.1 % H_3PO_4 的乙腈= B
梯度:	25 min, 20 % B到80 % B,
	5 min内, 80 % B到20 % B
停止时间:	30 min
分析后停留时间:	2 min
流速:	1.0 ml/min
进样量:	10 μ l
柱温:	35°C
UV 检测器:	DAD 260 nm/40,
	(参比380nm/30)
	标准流通池(10 mm)
FLD:	激发249 nm
	发射419 nm
	标准流通池(8 μ l)

红色三叶草提出物的分析

采用保留时间、紫外-可见光谱和荧光光谱来鉴定三叶草中的植物雌激素。由于荧光检测比紫外-可见检测的选择性更好，因此Agilent 1100 系列FLD是鉴定复杂天然产物提出物组分的通用工具。如图4所示，通过荧光检测能够鉴定红色三叶草提出物中的三种植物雌激素，即：芒柄花苷 (ononin)，黄豆苷原 (daidzein) 和 芒柄花黄素 (formononetin)。

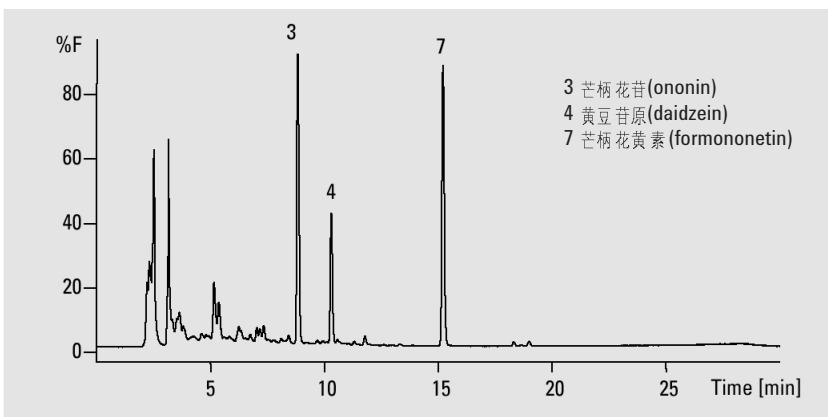


图4. 红色三叶草提出物的荧光检测色谱图, Ex = 249 nm, Em = 419 nm

图5所示为紫外-可见色谱图。通过保留时间能鉴定紫外-可见色谱图中7种植物雌激素。为了确认对化合物的鉴定，还与标准物的紫外-可见光谱图进行了比较。由于芒柄花苷 (ononin)，黄豆苷原 (daidzein) 和 芒柄花黄素 (formononetin) 已经通过荧光色谱图得到鉴定，这里只是对其他化合物，即：金雀异黄酮 (genistin)，黄豆苷原 (daidzein)，sissotrin，金雀异黄素 (genistein) 和 生原禅宁-A (biochanin A) 进行鉴定 (图 6)。

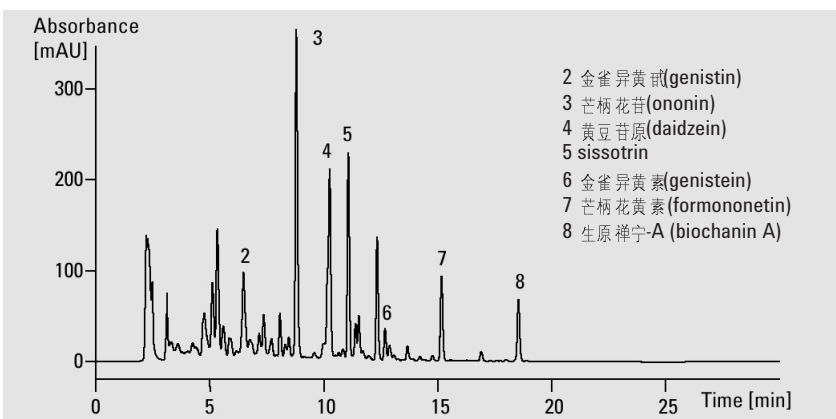


图5. 红色三叶草提出物在260 nm的紫外-可见检测色谱图

结论

在本文中，我们采用带有紫外-可见和荧光检测器的HPLC对红色三叶草中8种植物雌激素进行了分离和鉴定。通过其在紫外-可见和荧光检测色谱图上的保留时间以及紫外-可见光谱图鉴定了异黄酮类化合物。由于具有异黄酮结构的植物雌激素显示了很好的抗乳腺癌和子宫癌的活性，而且能够用于治疗更年期和骨质疏松疾病，本方法可以作为天然植物雌激素源的质量控制的通用工具。

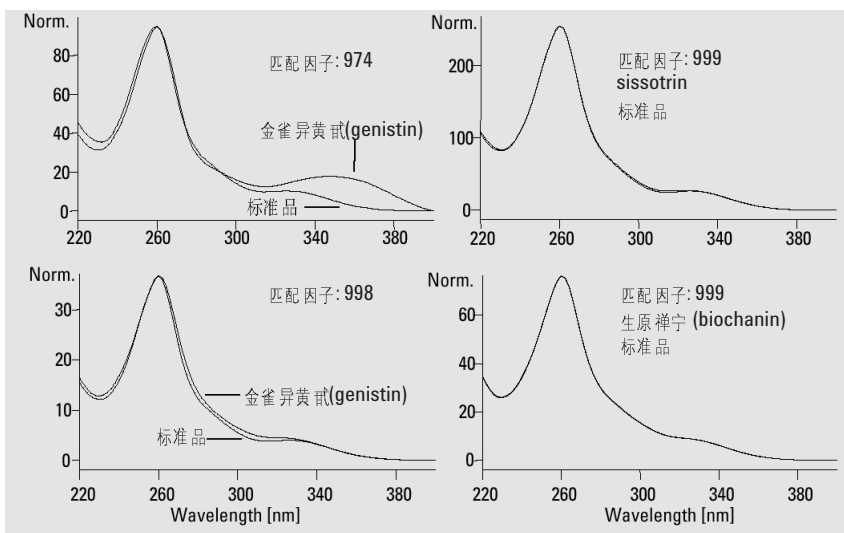


图6. 植物雌激素的光谱图

参考文献

1.

Julia Barrett, "Phytoestrogens: Friends or Foes", *Environmental Health Perspectives*, **1996** (104), 478

2.

"Sensitive and Reliable Fluorescence Detection for HPLC", Agilent Technologies Brochure, **1999**, publication number 5968-9105E

3.

"A New Approach to Lower Limits of Detection and Easy Spectral Analysis", Agilent Technologies Primer, **1998**, publication number 5968-2445E

Puri G. David 是美国加州 Lakeview 的微量营养素专家 (Division of Access Business Group)

Udo Huber 是德国 Waldbronn 安捷伦科技公司的应用化学家

www.agilent.com/chem

安捷伦科技公司生命科学与化学分析部用户服务中心
免费热线: 800-820-3278

如需了解我们产品和服务的详细信息请访问我们的网站
<http://www.agilent.com/chem>.

安捷伦将在此材料包含的错误或与本材料的供应、性能或使用相关的损失不承担责任。

本出版物的信息、说明和规格如果变更,恕不另行通知。

安捷伦公司版权所有©, 2001

除版权法允许之外,未经书面许可,禁止复制、改编或翻译。

2001年3月1日中国出版

出版号 5988-2399CHCN

