

文章编号 :1009 - 038X(2003)01 - 0053 - 03

大豆胚芽异黄酮的提取分离与结构鉴定

徐德平¹, 丁绍东², 肖 凯³, 谷文英¹, 丁霄霖¹

(1. 江南大学 食品学院 ,江苏 无锡 214036 ;2. 江南大学 测试中心 ,江苏 无锡 214036 ;3. 第二军医大学 海军医学系 ,上海 200433)

摘 要 :利用柱层析法从大豆胚芽中分离到 8 个异黄酮化合物 ,分别是黄豆素糖苷、大豆苷元糖苷、染料木素糖苷、丙二酰黄豆素糖苷、黄豆素苷元、大豆苷元、染料木素、染料木素葡萄糖苷 - 6'' - 阿拉伯糖 ,其中化合物染料木素葡萄糖苷 - 6'' - 阿拉伯糖在大豆中为新发现。

关键词 :大豆胚芽 ;异黄酮 ;分离 ;结构鉴定

中图分类号 S 565.1

文献标识码 :A

Isolation of Isoflavones in Soybean Plumule and Their Chemical Structure Determination

XU De-ping¹, DING Shao-dong², XIAO kai³, GU Weng-ying¹, DING Xiao-ling¹

(1. School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 ,China ;2. Centry of test and analys , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 ,China ;3. Faculty of Navy Medicine , the Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China)

Abstract : Eight isoflavones were isolated and characterized from soybean plumule using column chromatography , including Glycitin , Daidzin , Genistin , Malonyl-glycitin , Glycitein , Daidzein , Genistein , and 6''-Arabinose-Genistin . The 6''-Arabinose-Genistin is discovered in soybean for the first time .

Key words : soybean plumule ; isoflavones ; isolation ; determination

大豆胚芽是大豆的繁殖器官 , 占大豆总质量分数 2.5% 左右 , 与子叶相比除含油率较低外 , 其它营养价值 and 化学组成与子叶基本相同 ; 但在皂苷和异黄酮的含量和组成上与子叶有较大差异 , 其中异黄酮质量分数达 3.77% , 是子叶的 8 ~ 10 倍 , 化学组成以 Daidzin 和 Glycitin 为主 , 且含有较高的丙二酰异黄酮^[1] . 随着我国大豆食品加工业的发展 , 大豆胚芽已成为一种重要的副产物 . 我国的玉米、小麦、大米胚芽得到了开发利用 , 对其具有独特营养价值

和生理功能的大豆胚芽资源开发却尚未起步 , 而对其生理活性的化学成分研究则更少 . 本研究的目的是确定大豆胚芽中异黄酮的主要组成成分 , 为进一步研究其生理活性、为大豆胚芽异黄酮的工业化分离提供参考 .

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆胚芽 : 江苏维维集团提供 ; 试剂 : 甲醇、石

收稿日期 2002 - 09 - 09 ; 修回日期 2002 - 10 - 09 .

作者简介 : 徐德平 (1965 -) 男 , 安徽宣城人 , 博士后 .

万方数据

油醚(30~60℃)、二甲基亚砜(DMSO)、正丁醇皆为AR级,上海化学试剂采购供应站出品;GF₂₅₄硅胶板:山东烟台芝罘化工厂生产;层析柱:聚酰胺(60目)浙江台州化工厂生产,Sephadex LH-20, HW-40为进口分装。

1.2 实验方法

1.2.1 异黄酮提取 将2.5 kg大豆胚芽放入10 L玻璃瓶中,加入甲醇至满,不定期搅拌,浸提72 h后将甲醇滤出,回收甲醇。回收的甲醇加入玻璃瓶中,补充新甲醇至满,不时搅拌,浸提72 h滤出甲醇,反复3次,合并甲醇提取物,蒸发温度≤40℃。

1.2.2 甲醇提取物处理 将甲醇提取物用石油醚萃取脱脂,直至石油醚层无色时止。将脱脂后的物质用3倍体积的乙酸乙酯萃取,反复多次,直到乙酸乙酯相无色时止。合并乙酸乙酯相并蒸干,蒸发温度≤40℃,得乙酸乙酯提取物。将乙酸乙酯提取后的剩余物用水饱和正丁醇提取多次,直到正丁醇相无色时止。合并正丁醇相,蒸发正丁醇,得正丁醇提取物。

1.2.3 异黄酮分离 将正丁醇提取物用DMSO溶解后,抽滤,滤液上聚酰胺柱(60 mm×600 mm)。先用去离子水洗脱,再用甲醇梯度洗脱(体积分数为20%、40%、60%),分步收集。体积分数40%甲醇溶液洗脱得馏分Ⅰ,60%甲醇溶液洗脱得馏分Ⅱ,将馏分Ⅰ部分用DMSO溶解,上Sephadex LH-20柱(35 mm×500 mm)。先用去离子水洗脱,再用甲醇梯度洗脱,15 mL收集一管,可得到4个组分,每组分主要含1个化合物,将每个组分用DMSO溶解,反复上HW-40柱(35 mm×500 mm),并用甲醇梯度洗脱,可得4个纯化合物,分别为A、B、C、D。

将馏分Ⅱ部分用DMSO溶解,上Sephadex LH-20柱(35 mm×500 mm)。先用去离子水洗脱,再用甲醇梯度洗脱,15 mL收集一管,可得到2个组分;每组分主要含1个化合物,将每个组分用DMSO溶解,反复上HW-40柱(35 mm×500 mm),并用甲醇梯度洗脱,可得2个纯化合物,分别为E、F。

将乙酸乙酯粗提部分上聚酰胺柱(60 mm×600 mm),先用去离子水洗脱,再用甲醇梯度洗脱(体积分数30%、50%、70%),20 mL收集一管,可得4个馏分;每馏分主要含1个化合物,将每个组分用DMSO溶解,反复上HW-40柱(35 mm×500 mm),并用甲醇梯度洗脱,可得4个纯化合物,分别为G、H、I、J。

1.2.4 异黄酮的结构鉴定 将所得10个化合物用氘代DMSO溶解后,进行¹H-NMR和¹³C-NMR

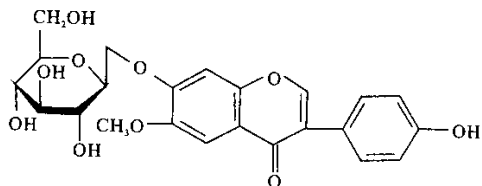
等分析。

2 结果与分析

2.1 化合物A

白色粉末,¹H-NMR(DMSO, 400 MHz, $\times 10^{-6}$) δ 9.54(1 H, s, A'-OH), 8.38(1 H, s, H-2), 7.48(1 H, s, H-5), 7.41(2 H, d, J=8.55, H-2', 6'), 7.33(1 H, s, H-8), 6.82(2 H, d, J=8.41, H-3', 5'), 5.14(1 H, d, J=7.4, H-1''), 3.89(3 H, s, -OCH₃), 5.40, 5.10, 5.08, 4.60为葡萄糖上4个羟基氢, 3.71-H-6'', 3.51-H-6'', 3.47-H-3'', 3.34-H-5'', 3.32-H-4'', 3.18-H-2''。

根据以上数据推断并参考文献^[2~4]确定化合物A为黄豆素糖苷(Glycitin)。

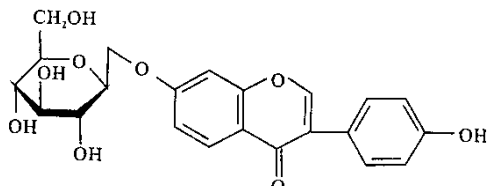


化合物A的结构

2.2 化合物B

白色粉末,¹H-NMR(DMSO, 400 MHz, $\times 10^{-6}$) δ 8.38(1 H, s, H-2), 8.03(1 H, d, J=8.9, H-5), 7.41(2 H, d, J=8.6, H-2', 6'), 7.23(1 H, d, J=2.2, H-8), 7.12(2 H, dd, J=2.4, 2.3, H-6), 6.82(2 H, d, J=8.6, H-3', 5'), 5.10(1 H, d, J=7.4, H-1''), 3.71-H-6'', 3.48-H-6'', 3.44-H-3'', 3.31-H-5'', 3.21-H-4'', 3.10-H-2''。

根据以上数据推断并参考文献^[2~4]确定化合物B为大豆苷元糖苷(Daidzin)。



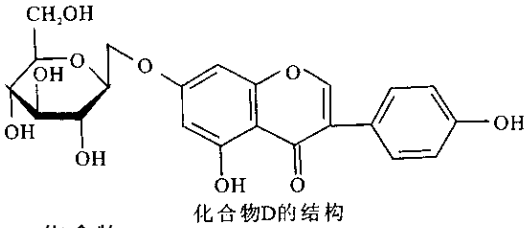
化合物B的结构

2.3 化合物D

淡黄色粉末,¹H-NMR(DMSO, 400 MHz, $\times 10^{-6}$) δ 12.9(1 H, s, 5-OH), 9.58(1 H, s, A'-OH), 8.41(1 H, s, H-2), 7.41(2 H, d, J=8.6, H-2', 6'), 6.84(2 H, d, J=8.5, H-3', 5'), 6.72(1 H, d, J=2, H-5), 6.48(1 H, d, J=2, H-8), 5.05

(1 H d $J=7.4$,H - 1'') 3.73 - H - 6'' 3.45 - H - 6'' 3.44 - H - 3'' 3.27 - H - 5'' 3.21 - H - 4'' 3.18 - H - 2''.

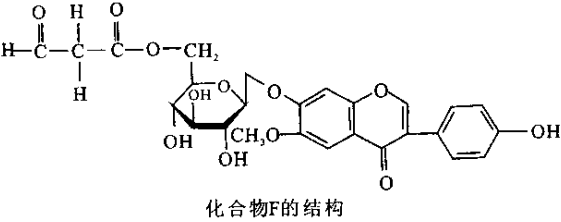
根据以上数据推断并参考文献^[2~4]确定化合物 D 为染料木素糖苷(Genistin).



2.4 化合物 F

白色粉末 , ¹H-NMR (DMSO , 400 MHz ,) ($\times 10^{-6}$) δ 9.54(1 H ,s ,A' - OH) ,8.38(1 H ,s ,H - 2) ,7.48(1 H ,s ,H - 5) ,7.41(2 H ,d $J=8.58$,H - 2' ,6') ,7.33(1 H ,s ,H - 8) ,6.82(2 H ,d , $J=8.58$,H - 3' ,5') ,5.14(1 H ,d $J=6.64$,H - 1') ,3.89(3 H ,s , - OCH₃) ,4.71 - H - 6'' 4.27 - H - 6'' 3.74 - H - 3'' 3.47 - H - 5'' 3.32 - H - 4'' 3.21 - H - 2'' 3.17(2 H , - CO - CH₂ - CO -).

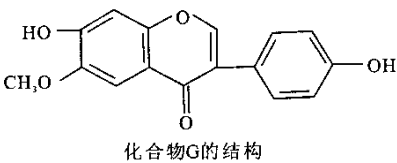
根据以上数据并参考文献^[2~4]确定化合物 F 为丙二酰黄豆素糖苷(6''-O-Malonylglycitin).



2.5 化合物 G

白色粉末 , ¹H-NMR (DMSO , 400 MHz ,) ($\times 10^{-6}$) δ 8.27(1 H ,s ,H - 2) ,7.44(1 H ,s ,H - 5) ,7.39(2 H ,d $J=8.63$,H - 2' ,6') ,6.95(1 H ,s ,H - 8) ,6.81(2 H ,d , $J=8.62$,H - 3' ,5') ,3.89 (3 H ,s , - OCH₃).

根据以上数据并参考文献^[4,5]确定化合物 G 为黄豆素苷元(Glycitein).



2.6 化合物 H

白色粉末 , ¹H-NMR (DMSO , 400 MHz ,) ($\times 10^{-6}$) δ 8.28(1 H ,s ,H - 2) ,7.94(1 H ,d , $J=8.8$,H - 5) ,7.38(2 H ,d , $J=8.5$,H - 2' ,6') ,6.93(1 H ,dd $J=6.7$ 2.1 ,H - 6) ,6.86(1 H ,d $J=2$,H - 8) ,6.81(2 H ,d $J=8.5$,H - 3' ,5').

根据以上数据并参考文献^[4,5]确定化合物 H 为大豆苷元(Daidzein).



2.7 化合物 I

淡黄色粉末 , ¹H-NMR(DMSO , 400 MHz ,) ($\times 10^{-6}$) δ 8.21(1 H ,s ,H - 2) ,7.55(2 H ,d , $J=6.72$,H - 2' ,6') ,7.03(2 H ,d $J=9.08$,H - 3' ,5') ,6.51(1 H ,d $J=2.15$,H - 8) ,6.39(1 H ,d $J=2.15$,H - 6).

根据以上数据并参考文献^[4,5]确定化合物 I 为染料木素(Genistein).

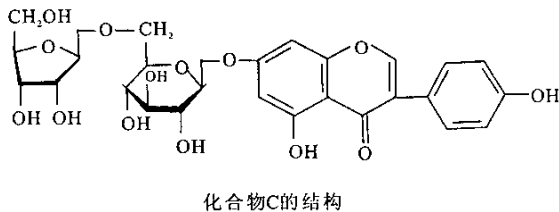


2.8 化合物 C

紫红色粉末 ,易溶于甲醇、乙醇 ,可溶于水 . ¹H-NMR(DMSO , 400 MHz ,) ($\times 10^{-6}$) : δ 8.37 (1 H ,s ,H - 2) ,7.38(2 H ,d $J=7.87$,H - 2' ,6') ,6.85(2 H ,d $J=7.82$,H - 3' ,5') ,6.68(1 H ,s ,H - 8) ,6.42(1 H ,s ,H - 6) ,5.0(1 H ,d , $J=6.78$,H - 1') 3.61 ~ 3.15 为糖上氢 ;MS M_r/z :564(M^+) ,432(Genistin) 270(Genistein 基峰).

¹³ C-NMR(DMSO , 400 MHz ,) ($\times 10^{-6}$) : δ 180.5 C - 4 ,162.9 C - 7 ,161.6 C - 5 ,157.5 C - 8a ,157.3 C - 4' ,154.5 C - 2 ,130.2 C - 2' ,6' ,122.6 C - 3 ,121.0 C - 1' ,115.1 C - 3' ,5' ,109.4 C - 4a ,99.7 C - 6 ,94.6 C - 8 ,106.2 C - 1'' ,78.7 C - 5'' ,76.3 C - 3'' ,73.1 C - 2'' ,69.6 C - 4'' ,60.6 C - 6'' ,100.1 C - 1''' ,69.8 C - 2''' ,69.8 C - 3''' ,69.8 C - 4''' ,63.2 C - 5''' .

根据以上数据并参考文献^[3,4,6]确定化合物 C 为 Genistein 的葡萄糖基 6 - 位上连接一个阿拉伯糖 .



胡萝卜素代谢途径中聚异二烯长链合成的相似性,添加有利于胡萝卜素合成的物质对合成有利^[7].实验证明,添加番茄汁(含有其中的有效成分)对细胞生长与辅酶 Q₁₀合成的促进作用可能与此有关.添加物等对辅酶 Q₁₀发酵的影响机理以及从代谢网络分析角度如何调节辅酶 Q₁₀合成的代谢通量是今后研究的重点.由正交试验结果,放射型根瘤菌

WSH2601 采用葡萄糖和蔗糖作复合碳源时,细胞生长和产物辅酶 Q₁₀的合成优于单一碳源;在试验质量浓度范围内,酵母膏质量浓度增大对菌体生长有利,但超过一定质量浓度(0.8 g/dL)后,产辅酶 Q₁₀能力下降.由辅酶 Q₁₀发酵的最佳条件,通过几批发酵重复试验,细胞干重和辅酶 Q₁₀含量比优化前分别提高了 31%和 53%.

参考文献：

[1] 吴祖芳,翁佩芳,陈坚. 辅酶 Q₁₀的功能研究进展[J]. 宁波大学学报, 2001 (2): 35 – 88.

[2] Winrow M J, Rudney H. Methods in Enzymology[M]. New York: Academic Press, 1971.

[3] 吴祖芳,翁佩芳,李寅,等. 辅酶 Q₁₀发酵生产的育种思路及发酵条件优化策略[J]. 食品与发酵工业, 2001 (7): 49 – 53.

[4] 相田浩. 辅酶素 Q₁₀的制造法,日本特许公报[P]. 日本专利 昭 57-18869, 1982-04-19.

[5] Kuratsu Y, Sakurai M, Hagino, et al. Aeration-agitation effect on coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium species*[J]. J Ferment Technol, 1984, 62: 305 – 308.

[6] Lee M T, Chen W C, Chou C C. Optimization and kinetic analysis of cholesterol oxidase production by *Rhodococcus equi* no.23 in submerged culture[J]. Enzyme and Microbial Tech, 1999, 25: 598 – 604.

[7] Natori Y, Nagasaki T. Enhancement of coenzyme Q₁₀ accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of coenzyme Q homologs by *Pseudomonas* N842 and mutant[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45: 2175 – 2182.

[8] Yamada Y, Haneda K. Application of fuzzy control system to coenzyme Q₁₀ fermentation[J]. J Chemical Engineering Japan, 1991, 24: 94 – 99.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 55 页)

3 结 论

从大豆胚芽中初步分离到 10 个化合物,8 个为异黄酮类化合物,分别是黄豆素糖苷、大豆苷元糖

苷、染料木素糖苷、丙二酰黄豆素糖苷、黄豆黄素、大豆苷元、染料木素、染料木素葡萄糖苷-6"-阿拉伯糖,其中化合物 E 为大豆皂苷(另文待发),化合物 J 暂不能确定其结构.通过检索天然产物词典,确定化合物 C 在大豆中为首次发现.

参考文献：

[1] 谷利伟.大豆胚芽异黄酮与皂苷的研究[D].无锡:无锡轻工业大学,2000.

[2] 宣利江.植物水溶性成分的研究[D].上海:中科院上海药物研究所,1995.

[3] Efi Farmakalidis, Patricia A Murphy. Isolation of 6"-O-acetylgenistin and 6"-O-acetylaidizin from toasted defatted soyflak[J]. J Agric Food Chem, 1985, 33: 385 – 389.

[4] Pawan K Agrawal. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycoside[J]. Phytochemistry, 1992, 313: 3307 – 3330.

[5] 徐德平.丹贝异黄酮的提取分离与结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(3): 1 – 3.

[6] Hem Chandra Jha, Fritz Zilliken. Carbon-13-chemical shift assignments of chromones and isoflavones[J]. CAN CHEM, 1980, 58: 1211 – 1219.