

文章编号:1001-6880(2014)3-0351-04

味噌异黄酮类化学成分

陈权威¹,田瑛²,高婷¹,陈恒文²,董俊兴^{2*}¹中南大学药学院,长沙 410013; ²军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850

摘要:对味噌中异黄酮类化学成分进行了研究。通过硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、反相 C₁₈ 硅胶柱色谱以及制备 HPLC 等方法,对味噌正丁醇萃取部位进行分离纯化,根据化合物的理化性质和波谱数据(¹H NMR、¹³C NMR、HMBC、MS)鉴定单体化合物的化学结构。总共分离得到 6 个异黄酮类化合物(图 1),分别鉴定为:染料木素(1)、大豆素(2)、黄豆黄素(3)、4',5,7,8-四羟基异黄酮(4)、4',7,8-三羟基异黄酮(5)、4',7,8-三羟基-6-甲氧基异黄酮(6)。以上化合物均为首次从味噌中分离得到。

关键词:味噌;异黄酮;化学成分

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

Isoflavones from Wei Ceng

CHEN Quan-wei¹, TIAN Ying², GAO Ting¹, CHEN Heng-wen², DONG Jun-xing^{2*}¹College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China; ²Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: To investigate the chemical constituents of isoflavones from *wei ceng*. The butanolic extract was subjected to various column chromatography and spectroscopic methods were used for the elucidation of compounds. Six isoflavones were isolated and identified as genistein (1), daidzein (2), glycitein (3), 4',5,7,8-tetrahydroxy isoflavone (4), 4',7,8-trihydroxy isoflavone (5), 4',7,8-trihydroxy-6-methoxy isoflavone (6). All the six isoflavones were isolated from *wei ceng* for the first time.

Key words: *wei ceng*; isoflavones; chemical constituent

味噌是一种传统的大豆发酵产品,其发酵过程与日本的 miso, 韩国的 chungkookjang, doenjang, kochujang 等相似,在亚洲国家,作为调味品一直被广泛使用。现代研究发现,大豆的发酵产品不仅天然、营养、安全,而且药理作用丰富,如抗氧化、抗癌变、抗高血压、降血糖、抗糖尿病等^[1-5],具有潜在的药用价值。为阐明大豆发酵产品的药用物质基础,对味噌正丁醇萃取部位的化学成分进行了深入系统的研究。本文主要介绍分离得到的 6 个异黄酮类化合物:染料木素(1)、大豆素(2)、黄豆黄素(3)、4',5,7,8-四羟基异黄酮(4)、4',7,8-三羟基异黄酮(5)、4',7,8-三羟基-6-甲氧基异黄酮(6),化合物 1 ~ 6 均为首次从味噌中分离得到。

1 仪器与材料

供试样品购买于大连松井味噌有限公司。标本

存放于本实验室。

Varian UNITY INOVA 600 超导核磁共振谱仪(美国 Varian 公司),TMS 为内标; Finnigan LCQ Advantage Max 液相色谱-质谱联用仪(美国 Finnigan 公司); BP211D 电子天平(美国 Sartorius 公司); Sephadex LH-20 凝胶(瑞士 Pharmacia 公司);薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶 200 ~ 300 目(青岛海洋化工厂);所用试剂为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

将购买的味噌原料 100 Kg 用 95 % 乙醇回流提取 3 次,合并提取液,减压回收溶剂得浸膏 7.8 Kg。取浸膏 1500 g 用蒸馏水溶解后依次用石油醚和正丁醇进行萃取,分别得到石油醚部位 251 g、正丁醇部位 250 g 和水部位 960 g。取正丁醇部位 244 g,经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇梯度洗脱,20:1,10:1,5:1,5:2,1:1)分离,并用薄层色谱进行检测,合并相似组分得到 fractions A ~ E 五个流分。Fr. B 经硅胶柱色

谱(氯仿-甲醇梯度洗脱,20:1,10:1,5:1)分离以及重结晶,得到化合物**1**(1200 mg)。Fr. C 经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇梯度洗脱,20:1,10:1,5:1)和凝胶柱色谱(氯仿-甲醇1:1洗脱)分离,得到化合物**2**(1000 mg)和化合物**3**(20 mg)。Fr. D 经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇梯度洗脱,15:1,12:1,10:1,8:1,4:1)、凝胶柱色谱(氯仿-甲醇1:1洗脱)、PHPLC(甲醇-水35:65)分离得到化合物**4**(21 mg)、**5**(36 mg)和**6**(4 mg)。

3 结构鉴定

化合物1 黄色粉末,易溶于甲醇,FeCl₃显色反应呈阳性。分子式C₁₅H₁₀O₅,ESI-MS m/z:271 [M + H]⁺,269 [M-H]⁻;¹H NMR (DMSO-d₆,600 MHz) δ:6.22 (1H,s,H-6),6.38 (1H,s,H-8),6.81 (2H,d,J = 8.7 Hz,H-3',5'),7.37 (2H,d,J = 8.7 Hz,H-2',6'),8.33 (1H,s,H-2),9.63 (1H,s,OH-4'),10.83 (1H,s,OH-7),12.96 (1H,s,OH-5);¹³C NMR (DMSO-d₆,150 MHz) δ:93.6 (C-8),98.9 (C-6),104.4 (C-10),115.0 (C-3',5'),121.2 (C-3),122.2 (C-1'),130.1 (C-2',6'),153.9 (C-2),157.4 (C-5),157.5 (C-9),162.0 (C-4'),164.2 (C-7),180.2 (C-4)。通过波谱数据分析并与文献^[6]比较,鉴定化合物**1**为染料木素(genistein),即4',5,7-三羟基异黄酮(4',5,7-trihydroxy isoflavone)。

化合物2 黄色粉末,易溶于甲醇,FeCl₃显色反应呈阴性。分子式C₁₅H₁₀O₄,ESI-MS m/z:255 [M + H]⁺,253 [M-H]⁻;¹H NMR (DMSO-d₆,600 MHz) δ:6.81 (2H,d,J = 8.4 Hz,H-3',5'),6.87 (1H,d,J = 2.2 Hz,H-8),6.84 (1H,dd,J = 2.2,9.0 Hz,H-6),7.38 (2H,d,J = 8.4 Hz,H-2',6'),7.97 (1H,d,J = 9.0 Hz,H-5),8.30 (1H,s,H-2),9.55 (1H,s,OH-4'),10.81 (1H,s,OH-7);¹³C NMR (DMSO-d₆,150 MHz) δ:102.1 (C-8),115.0 (C-3',5'),115.2 (C-6),116.7 (C-10),122.6 (C-3),123.5 (C-1'),127.3 (C-5),130.1 (C-2',6'),152.4 (C-4'),152.9 (C-2),157.5 (C-9),163.1 (C-7),174.8 (C-4)。通过波谱数据分析并与文献^[6]比较,鉴定化合物**2**为大豆素(daidzein),即4',7-二羟基异黄酮(4',7-dihydroxy isoflavone)。

化合物3 白色粉末,易溶于甲醇,FeCl₃显色反应呈阴性。分子式C₁₆H₁₂O₅,ESI-MS m/z:285 [M

+ H]⁺,283 [M-H]⁻;¹H NMR (DMSO-d₆,600 MHz) δ:3.87 (3H,s,OCH₃),6.80 (2H,d,J = 8.7 Hz,H-3',5'),6.93 (1H,s,H-8),7.38 (2H,d,J = 8.7 Hz,H-2',6'),7.42 (1H,s,H-5),8.27 (1H,s,H-2),9.49 (1H,s,OH-4'),10.54 (1H,s,OH-7);¹³C NMR (DMSO-d₆,150 MHz) δ:55.8 (OCH₃),102.8 (C-8),104.7 (C-5),114.9 (C-3',5'),116.2 (C-10),122.7 (C-1'),122.9 (C-3),130.0 (C-2',6'),146.9 (C-6),151.7 (C-9),152.4 (C-2),152.8 (C-7),157.1 (C-4'),174.3 (C-4)。通过波谱数据分析并与文献^[7]比较,鉴定化合物**3**为黄豆黄素(glycitein),即4',7-二羟基-6-甲氧基异黄酮(4',7-dihydroxy-6-methoxy isoflavone)。

化合物4 黄色粉末,易溶于甲醇,FeCl₃显色反应呈阳性。分子式C₁₅H₁₀O₆,ESI-MS m/z:287 [M + H]⁺,285 [M-H]⁻;¹H NMR (DMSO-d₆,600 MHz) δ:6.28 (1H,s,H-6),6.81 (2H,d,J = 9.0 Hz,H-3',5'),7.37 (2H,d,J = 9.0 Hz,H-2',6'),8.35 (1H,s,H-2),8.72 (1H,s,OH-7),9.55 (1H,s,OH-4'),10.52 (1H,s,OH-8),12.36 (1H,s,OH-5);¹³C NMR (DMSO-d₆,150 MHz) δ:98.7 (C-6),104.1 (C-10),115.0 (C-3',5'),121.4 (C-3),121.8 (C-1'),124.9 (C-8),130.2 (C-2',6'),145.9 (C-9),153.2 (C-7),153.5 (C-5),153.8 (C-2),157.3 (C-4'),180.1 (C-4)。通过波谱数据分析并与文献^[8]比较,鉴定化合物**4**为4',5,7,8-四羟基异黄酮(4',5,7,8-tetrahydroxy isoflavone)。

化合物5 黄色粉末,易溶于甲醇,FeCl₃显色反应呈阳性。分子式C₁₅H₁₀O₅,ESI-MS m/z:271 [M + H]⁺,269 [M-H]⁻;¹H NMR (DMSO-d₆,600 MHz) δ:6.79 (2H,d,J = 9.0 Hz,H-3',5'),6.94 (1H,d,J = 8.4 Hz,H-6),7.37 (2H,d,J = 9.0 Hz,H-2',6'),7.46 (1H,d,J = 8.4 Hz,H-5),8.32 (1H,s,H-2),9.40 (1H,s,OH-7),9.49 (1H,s,OH-4'),10.27 (1H,s,OH-8);¹³C NMR (DMSO-d₆,150 MHz) δ:114.1 (C-6),114.9 (C-3',5'),115.6 (C-5),117.4 (C-10),122.6 (C-3),122.9 (C-1'),130.0 (C-2',6'),132.8 (C-8),146.7 (C-9),149.9 (C-7),152.6 (C-2),157.1 (C-4'),175.1 (C-4)。通过波谱数据分析并与文献^[8]比较,鉴定化合物**5**为4',7,8-三羟基异黄酮(4',7,8-trihydroxy isoflavone)。

化合物6 黄色粉末,易溶于甲醇,FeCl₃显色

反应呈阳性。ESI-MS m/z : 301 [M + H]⁺, 299 [M-H]⁻, 结合¹H NMR、¹³C NMR 谱确定其分子式为 C₁₆H₁₂O₆, 不饱和度为 11。由化合物 6 的¹H NMR 和¹³C NMR(表 1)显示, δ_{H} 8.28 (1H, s) 为异黄酮 2 位的特征氢信号, 碳谱上 δ_{C} 152.3 为 2 位碳的信号。 δ_{H} 6.80 (2H, d, J = 9.0 Hz) 和 7.38 (2H, d, J = 9.0 Hz) 的两对芳香质子成 AA'BB'耦合系统, 为异黄酮分子母核 B 环上两对碳 δ_{C} 114.9 (C-3', 5') 和 130.1 (C-2', 6') 的四个氢, 同时可判断 B 环为对位取代。 δ_{H} 3.87 (3H, s) 为甲氧基的特征氢信号。 δ_{H} 7.04 (1H, s) 为母核 A 环上的芳香质子, δ_{H} 9.50 (3H, br s) 为三个羟基质子, δ_{C} 174.6 为羰基碳 (C-4) 的特征碳信号。通过 HMBC 远程相关谱发现, 羰基碳 (δ_{C} 174.6, C-4) 与芳香质子 (δ_{H} 7.04, 1H, s) 相关, 说明此芳香质子是 5 位碳上的质子, 同时还发现此质子与 δ_{C} 140.0, 142.5 和 146.8 的三个碳呈远程相关, 结合文献, 确定这三个碳分别为 7 位、9 位和 6 位碳。进一步观察, 可见 6 位碳和甲氧基呈远程相关, 故确定 6 位碳被甲氧基取代。剩下的三个羟基分别取代 4'位、7 位和 8 位。综上所述, 数据归属为:¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 3.87 (3H, s, OCH₃), 6.80 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3', 5'), 7.04 (1H, s, H-5), 7.38 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2', 6'), 8.28 (1H, s, H-2), 9.50 (3H, br s, OH-4', 7, 8); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 55.8 (OCH₃), 95.1 (C-5), 114.9 (C-3', 5'), 115.9 (C-10), 122.6 (C-3), 122.9 (C-1'), 130.1 (C-2', 6'), 133.7 (C-8), 140.0 (C-7), 142.5 (C-9), 146.8 (C-6), 152.3 (C-2), 157.0 (C-4'), 174.6 (C-4)。与文献^[9]比较, 鉴定化合物为 4', 7, 8-三羟基-6-甲氧基异黄酮 (4', 7, 8-trihydroxy-6-methoxy isoflavone)。

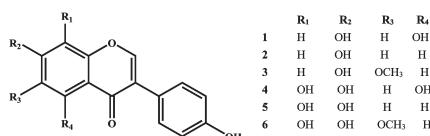


图 1 化合物 1 ~ 6 的化学结构

Fig. 1 The molecular structures of compounds 1~6

4 讨论

大豆发酵产品丰富的生理调节作用与其物质基础密切相关, 其中异黄酮类化合物是重要的药理活性成分之一。研究发现, 未发酵大豆中异黄酮类化

合物主要以糖苷形式存在(如染料木苷、大豆苷及黄豆黄苷), 经发酵后, 其异黄酮糖苷易被水解成相应的异黄酮苷元(即染料木素、大豆素及黄豆黄素)^[10,11], 并且在微生物二次代谢作用下可能生成新的异黄酮苷元。

研究发现, 发酵生成的异黄酮苷元脂溶性增强, 更容易被机体吸收和利用, 且更易透过细胞膜进入到细胞内部产生作用, 从而提高药物的生物利用度和活性^[11]。体外研究发现, 4', 5, 7, 8-四羟基异黄酮和 4', 7, 8-三羟基异黄酮的 8 位羟基被糖取代后, 其抑制络氨酸酶的活性便散失^[8]; 染料木素对 MCF-7 和 BT20 乳腺肿瘤细胞具有抗肿瘤的作用, 而糖苷型的染料木苷未表现抗肿瘤的活性^[12]。

本文研究味噌的异黄酮类化学成分发现, 化合物 1 ~ 3 是由大豆原有的三种异黄酮糖苷水解而来; 化合物 4 ~ 6 的母核结构在未发酵大豆中不存在相应的糖苷, 因此化合物 4 ~ 6 可能是微生物二次代谢生成的新物质。

参考文献

- Luft FC, Rankin LI, Bloch R, et al. Cardiovascular and humoral responses to extremes of sodium intake in normal black and white men. *Circulation*, 1979, 60:697-706.
- Miller JZ, Weinberger MH, Daugherty SA, et al. Heterogeneity of blood pressure responses to dietary sodium restriction in normotensive adults. *J Chronic Dis*, 1987, 40:245-250.
- Moktan B, Saha J, Sarhar PK, et al. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Res Int*, 2008, 41:586-593.
- Kim DJ, Jeong YJ, Kwon JH, et al. Beneficial effect of chungkukjang on regulating blood glucose and pancreatic β -cell functions in C75BL/KsJ-db/db mice. *J Med Food*, 2008, 11: 215-223.
- Watanabe H, Kashimoto N, Kajimura J, et al. A miso (Japanese soybean paste) diet conferred greater protection against hypertension than a sodium chloride diet in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*, 2006, 29:731-738.
- Yuan SQ(袁珊琴), Yu NJ(于能江), Zhao YM(赵毅民), et al. Chemical Constituents of *Dan Dou Chi*(淡豆鼓中的化学成分). *J Chin Med Mater*(中药材), 2008, 31: 1172-1174.
- Park HJ, Park JH, Moon JO, et al. Isoflavone glycosides from the flowers of *Pueraria thunbergiana*. *Phyto*, 1999, 51: 147-151.

(下转第 350 页)