

染料木素和大豆素的结构分析

文瑞芝¹, 李水芳¹, 曾 栋²

(¹中南林业科技大学理学院, 湖南长沙 410004; ²湖南省疾病预防控制中心, 湖南长沙 410005)

摘 要:染料木素和大豆素是大豆异黄酮苷元的两种主要成分, 具有多种生物活性, 关于其混合物的同时结构分析, 鲜有报道。实验为确保混合物结构解析的正确性, 利用质谱技术得出的物质分子离子峰及相关特征碎片峰、红外光谱技术所得的特征官能团信息、核磁共振(氢谱、碳谱及二维核磁共振谱等)技术分析出的碳氢等元素的结构分布情况, 从化学式量、主要官能团及具体分子结构等方面成功地对染料木素和大豆素的混合物进行了分子结构的同时佐证解析。这避免了实验必须对混合物进行分离收集, 再对各物质单独结构分析所带来的繁琐技术操作, 使得方法简便, 快捷省时。同时, 实验所得方法为其他混合物结构解析提供技术参考。

关键词:染料木素; 大豆素; 质谱; 红外光谱; 核磁共振谱; 二维核磁共振谱; 结构分析

Structure Analysis of Genistein and Daidzein

WEN Rui-zhi¹, LI Shui-fang¹, and ZENG Dong²

(¹Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan; ²Hunan Center of Disease Control and Prevention, Changsha 410005, Hunan, China)

Abstract: Genistein and daidzein are two primary soybean isoflavones, which have important biological activities. There are few reports about their structure analysis at the same time. The molecular structures of genistein and daidzein were analyzed at the same time by mass spectrum, infrared spectrum, ¹H- nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum, ¹³C- NMR spectrum and Two- dimension NMR spectrum, which offers a useful method for the fingerprint analysis of mixture. To make sure the truth of mixture structure analysis, the article analyzed the molecular structures of genistein and daidzein from the aspect of molecular weight, primary function group and material structure. The method makes sure of the correctness of mixtures' structures and avoids separating mixtures before analyzed. The method is proved to be easy and fast.

Key words: Genistein; Daidzein; Mass spectrum; Infrared spectrum; Nuclear magnetic resonance spectrum; Two- dimension NMR spectrum; Structure analysis

大豆是一种非常丰富的营养保健源, 它不仅为人们提供了膳食纤维、优质植物蛋白质、低聚糖等, 而且还为人们提供了多种生理活性物质。大豆异黄酮是大豆及其豆制品中的活性成分, 具有多种生理功能 (Axelson et al., 1984; Setchell and Borriello, 1984; Wei and Bowen, 1995; Raines and Ross, 1995), 特别是其中的两种主要苷元染料木素和大豆素具有抗氧化、抗肿瘤、改善心血管功能、抗动脉粥样硬化、抗骨质疏松等功效。流行病学研究发现, 大豆及其豆制品与机体癌症和心血管疾病的低发直接相关 (Henman and Adereutz, 1995; Gyorgy et al., 1964; Oinyin and Huachen, 1996; Mukies et al., 1995;

Yanagiltara and Ito, 1993; Jing et al., 1993; Peterson and Barnes, 1991; Matsukawa et al., 1993; Wei et al., 1996; Wang and Murphy, 1994; Fukutake et al., 1996)。

近年来, 大豆异黄酮的生理活性已越来越引起社会和学术界的普遍关注, 对大豆异黄酮的提取、分离和检测也越来越受重视。据相关检索, 关于混合物的结构解析鲜有报道, 一般是对其中某一成分分析。本文通过对染料木素和大豆素混合物的质谱、红外光谱、氢谱、碳谱的测定, 并结合二维核磁谱图对它们的分子结构同时进行了谱图解析, 为混合物的结构解析提供了有力的分析依据。

收稿日期 (Received): 2007-11-02; 接受日期 (Accepted): 2007-12-11

基金项目: 中南林业科技大学人才引进科研启动经费 (科研 101-0648 项)

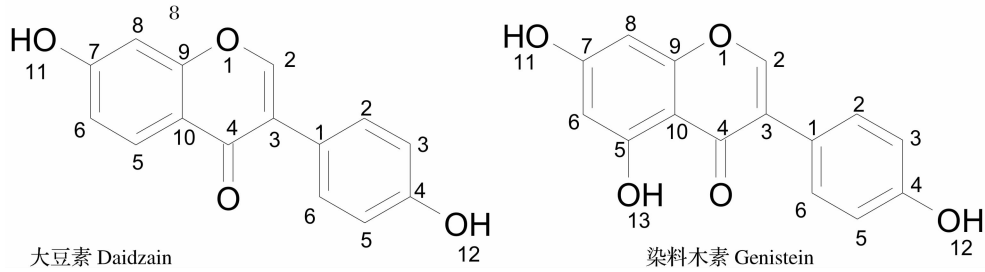
作者简介: 文瑞芝 (1978-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事药用植物功效成分的分离分析及结构解析。Tel: 013787121542; E-mail: csuft_wrz@126.com

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HP6890 系列气相色谱仪,HP5973 质量选择检测器 MSD(Hewlett- Packard, USA), INOVA- 500 超导傅里叶变换核磁共振波谱仪(美国 Varinm 公司), 傅立

叶变换红外光谱仪(370 型,美国 Nicolet 公司)。
氘代二甲亚砜、甲醇(分析纯), 溴化钾晶体, 测试样品为大豆素和染料木素的混合物, 是本实验室提纯产品, 分子式分别为 $C_{15}O_4H_{10}$ 、 $C_{15}O_5H_{10}$, 其结构如下所示。



1.2 样品分析

1.2.1 样品的质谱分析 将适量固体样品配成甲醇溶液后进气相色谱 - 质谱分析。分析条件: MSD 质量扫描范围 40 ~ 300 amu, EI 源温度 260℃, 四极杆温度 150℃, MSD 倍增电压 EM(V)1624。
1.2.2 样品的核磁共振分析 将适量固体样品以氘代二甲亚砜溶解, 用于氢谱(1H - NMR)、 D_2O 交换谱、H- H 相关谱(1H - 1H COSY)、碳谱(^{13}C - NMR)及极化转移谱(DEPT)、同核相关谱(COSY)、异核相关谱(HMQC), 特别是远程偶合谱(HMBC)等分析。

1.2.3 样品的红外光谱分析 将适量固体样品与溴化钾晶体研磨、压片, 利用傅里叶变换红外光谱仪进行分析。

2 结果与分析

2.1 质谱分析

据上述分析条件获得大豆素和染料木素的质谱图, 见图 1。从图中可以明显得出大豆素和染料木素的分子离子峰、基峰和其他特征性的碎片离子峰, 其主要对应碎片峰结果如表 1、表 2 所示。

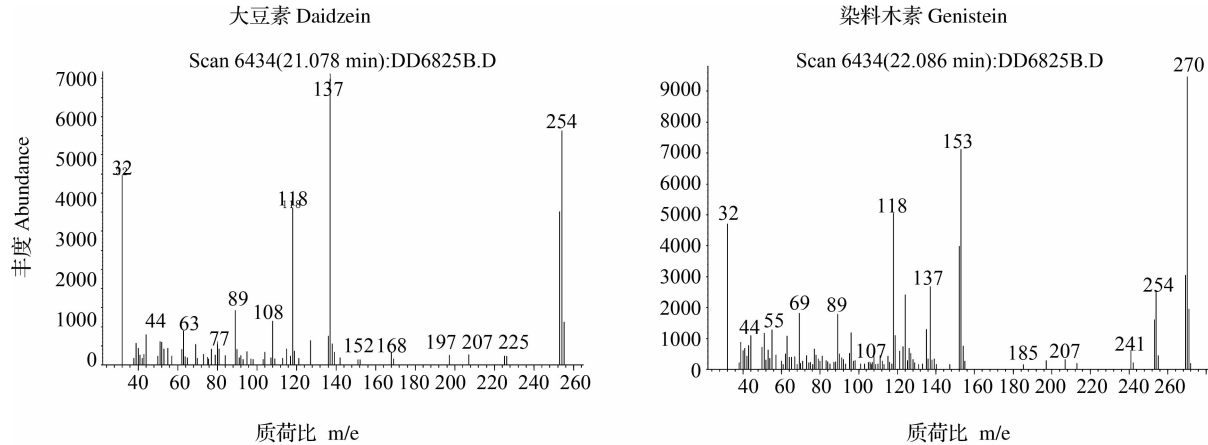


图 1 染料木素和大豆素的质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of Genistein and Daidzein

表 1 大豆素的质谱碎片

质荷比 m/e	相应碎片 Fragment	备注 Remark
254	$C_{15}O_4H_{10}$	[M]峰[Molecule] peak
225	$C_{14}O_3H_9$	
137	$C_7O_3H_5$	基峰 Base peak

表 2 染料木素的质谱碎片

质荷比 m/e	相应碎片 Fragment	备注 Remark
270	$C_{15}O_5H_{10}$	[M]峰[Molecule] peak
254	$C_{15}O_4H_{10}$	
153	$C_7O_4H_5$	基峰 Base peak

2.2 核磁共振分析

据核磁共振分析条件对样品进行系列分析,所得结果见图 2 至图 8 所示。由图 2 知,低场区共有 14 组峰,20 个氢。高场区的几组峰为测试溶剂二甲亚砆和提取提纯溶剂乙醇等杂质峰。图 3 的 D_2O 交换谱由于消除了 OH 缔合对其他峰的影响,使谱图变得更为清晰,并且在图 2 中能见到的 $\delta 12.940$ 、 $\delta 10.756$ 和 $\delta 9.513$ 三个活泼氢 OH 的峰也被去掉。图 4 结果表明有三组相关氢。

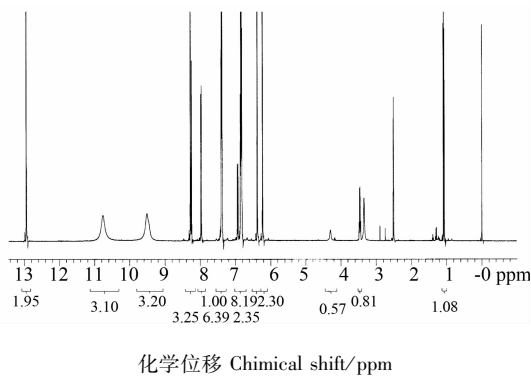


图 2 染料木素和大豆素的 1H -NMR 谱

Fig. 2 1H -NMR spectrum of Genistein and Daidzein

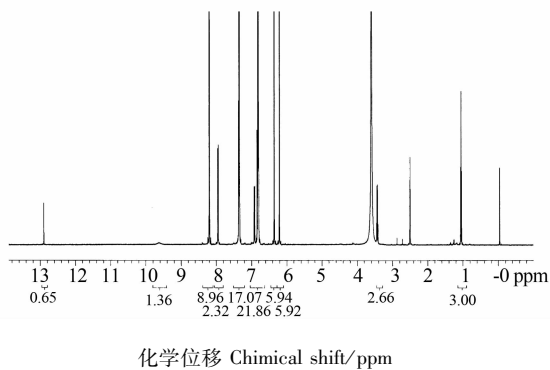


图 3 染料木素和大豆素的 D_2O 交换谱

Fig. 3 D_2O exchange spectrum of Genistein and Daidzein

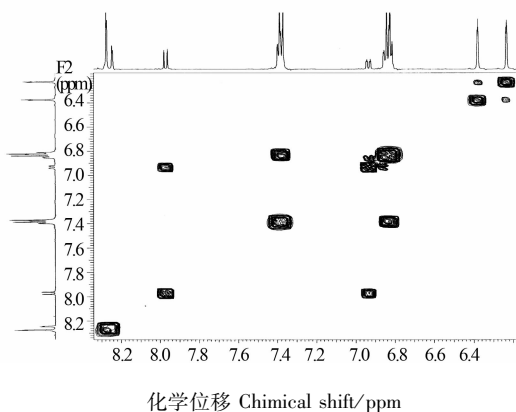


图 4 染料木素和大豆素的 1H - 1H COSY 谱

Fig. 4 1H - 1H COSY spectrum of Genistein and Daidzein

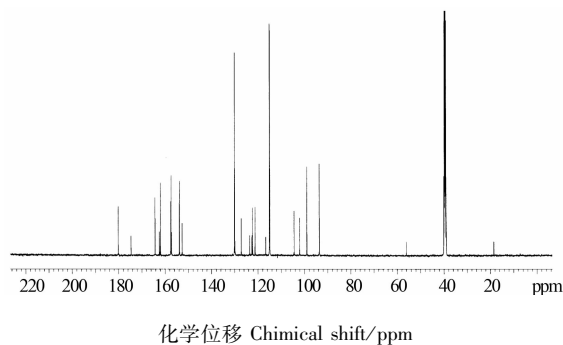


图 5 染料木素和大豆素的 ^{13}C -NMR 谱

Fig. 5 ^{13}C -NMR spectrum of Genistein and Daidzein

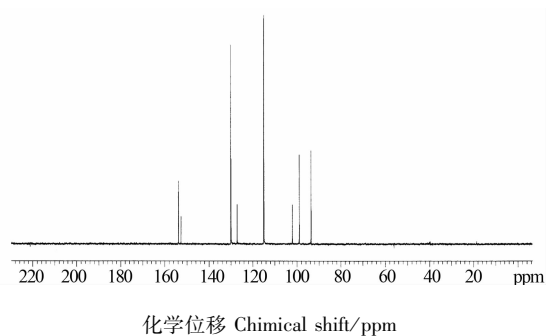


图 6 染料木素和大豆素的 135° -DEPT 谱

Fig. 6 135° -DEPT spectrum of Genistein and Daidzein

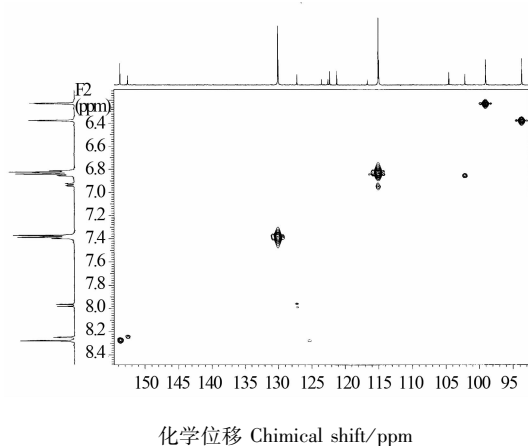
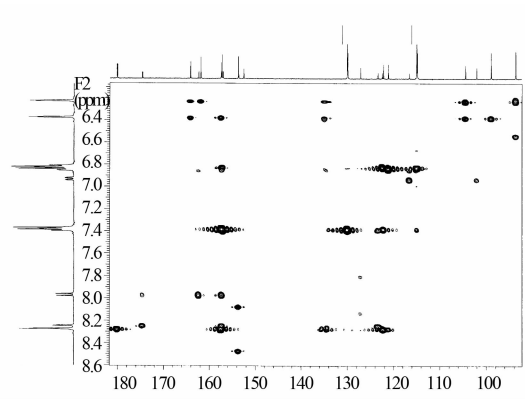


图 7 染料木素和大豆素的 HMQC 谱

Fig. 7 HMQC spectrum of Genistein and Daidzein

由以上分析可知 $\delta 12.940$ 、 $\delta 10.756$ 和 $\delta 9.513$ 为活泼氢 OH 的峰,根据 1H - 1H COSY 谱 H 与 H 的相关关系可知 $\delta 12.940$ 、 $\delta 10.756$ 和 $\delta 9.513$ 依次归属为 13-H(G)、H-11(G,D)和 H-12(G,D)。由 1H -NMR、 D_2O 交换谱、 1H - 1H COSY 谱三种谱图相互佐证得,单峰 $\delta 8.276$ 为 H-2(G), $\delta 8.246$ 为 H-2(D); $\delta 7.971$ 为 H-5(D),受 H-6(D)的邻位偶合裂分为双峰; $\delta 7.392$ 为 H-2'、6'(G); $\delta 7.377$ 为 H-2'、6'(D); $\delta 6.879$ 为 H-6(D),受 H-5(D)的邻位偶合及 H-8(D)的间位偶合裂分为 2 组双重峰; $\delta 6.855$ 为 H-8(D),受 H-6(D)的间为偶合裂分为双重



化学位移 Chemical shift/ppm
图8 染料木素和大豆素的HMBC谱

Fig. 8 HMBC spectrum of Genistein and Daidzein
峰;δ6.846 为 H-3',5'(G);δ6.820 为 H-3',5'(D);
δ6.376 为 H-8(G),受 H-6(G)间位偶合,裂分为双峰;
δ6.228 为 H-6(G),受 H-8(G)间位偶合,裂分为双峰。
以上归属结果列于表3。归属结果符合染料木素和大
豆素分子结构中H的个数及H的化学位移。

表3 ¹H-NMR 谱信息及归属
Table 3 Information data and assignment of ¹H-
NMR spectrum of Genistein and Daidzein

峰号 Peak No.	化学位移 Chemical shift	峰形* Peak shape	质子数 Proton number	归属 Assign	耦合常数 Coupling constants/Hz
1	12.940	S	1	H-13(G)	
2	10.756	S	2	H-11(D,G)	
3	9.513	S	2	H-12(D,G)	
4	8.276	S	1	H-2(G)	
5	8.246	S	1	H-2(D)	
6	7.971	D	1	H-5(D)	9
7	7.392	D	2	H-2',6'(G)	5
8	7.377	D	2	H-2',6'(D)	5.5
9	6.879	D,D	1	H-6(D)	2.5,9
10	6.855	D	1	H-8(D)	2.5
11	6.846	D	2	H-3',5'(G)	5
12	6.820	D	2	H-3',5'(D)	5.5
13	6.376	D	1	H-8(G)	2
14	6.228	D	1	H-6(G)	2

* S: 单峰 Singlet; D: 双峰 Doublet

图5和图6分别为染料木素和大豆素混合物的¹³C-NMR谱和DEPT谱。图5中可见24条谱线,由定量¹³C谱峰强度相对值可估算δ157.355、δ130.050、δ129.964和δ115.009分别代表两个碳,δ114.894代表三个碳,这样计算出C的个数为30个,与染料木素和大豆素的结构式中碳总数一致。图6中有10个叔碳峰,14个季碳峰,由上述结果可得15个叔碳,15个季碳,无伯碳和仲碳,与结构式

相符。在低场δ180.137和δ174.618为两个羰基碳峰。由图7碳氢相关情况可知,与H直接相连的C有11种,与H间接相关的C由图8可知。

根据前面分析讨论所得的H的归属结果,由HMQC谱中C与H直接相关关系可知,δ98.907、δ93.583、δ115.009、δ114.894、δ102.017、δ130.050、δ129.964、δ127.179、δ152.608、δ153.755依次归属于C-6(G)、C-8(G)、C-3',5'(G)、C-3',5',6(D)、C-8(D)、C-2',6'(G)、C-2',6'(D)、C-5(D)、C-2(D)、C-2(G)。由HMBC谱中C与H远程相关关系可知,δ174.618、δ180.137为C-4(D)、C-4(G),δ122.512为C-3(D),δ123.457为C-1'(D),δ157.013为C-4'(D),δ122.252、δ121.170、δ161.951分别是C-1'(G)、C-3(G)、C-4'(G),δ157.355是C-9(D)和C-9(G)的重叠峰,δ164.194、δ104.433为C-7(G)和C-10(G),δ162.412、δ116.611为C-7(D)、C-10(D),δ157.521则为C-5(G)。归属结果与染料木素和大豆素分子结构中C的个数及C的化学位移相符,与文献(于德泉等,1985)相差不大。归属结果列于表4。

表4 ¹³C-NMR 谱峰信息及归属
Table 4 Information data and assignment of ¹³C-NMR spectrum

峰号 Peak No.	化学位移 Chemical shift	碳数 Carbon number	归属 Assignments
1	180.137	1	C-4(G)
2	174.618	1	C-4(D)
3	164.194	1	C-7(G)
4	162.412	1	C-7(D)
5	161.951	1	C-4'(G)
6	157.521	1	C-5(G)
7	157.355	2	C-9(D,G)
8	157.103	1	C-4'(D)
9	153.755	1	C-2(G)
10	152.608	1	C-2(D)
11	130.050	2	C-2',6'(G)
12	129.964	2	C-2',6'(D)
13	127.179	1	C-5(D)
14	123.457	1	C-1'(D)
15	122.512	1	C-3(D)
16	122.252	1	C-1'(G)
17	121.170	1	C-3(G)
18	116.611	1	C-10(D)
19	115.009	2	C-3',5'(G)
20	114.894	3	C-3',5',6(D)
21	104.433	1	C-10(G)
22	102.017	1	C-8(D)
23	98.907	1	C-6(G)
24	93.583	1	C-8(G)

2.3 红外光谱分析

由红外光谱(图9)可见大豆素和染料木素的主要官能团的振动峰:3409.14 cm^{-1} 为 $\nu(\text{O}-\text{H})$ 的伸缩振动;3200–2500 cm^{-1} 为 OH 与 $\text{C}=\text{O}$ 形成的分子内氢键;1652.65 cm^{-1} 为 $\nu(\text{C}=\text{O})$ 的伸缩振动;1614.93 cm^{-1} 、1519.29 cm^{-1} 为苯环的骨架振动;1309.57 cm^{-1} 为 OH 的面内弯曲振动,1202.52 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动,840.42 cm^{-1} 、810.91 cm^{-1} 为芳环上 $=\text{C}-\text{H}$ 的弯曲振动。分析结果与染料木素和大豆素中的主要基团 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{O}-\text{H}$ 和苯环相吻合。

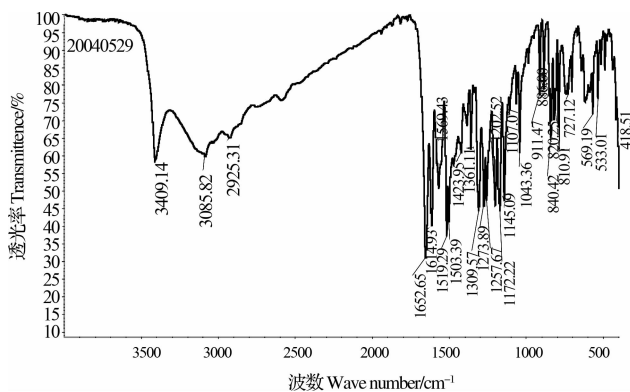


图9 染料木素和大豆素的红外光谱

Fig. 9 Infrared spectrum of Genistein and Daidzein

3 讨论

大豆素质谱中最高质量数峰 m/z 254, 染料木素质谱中最高质量数峰 m/z 270, 与大豆素和染料木素结构式的整数分子量的分子离子峰 $[M]^+$ 质量数相符。大豆素最高质量数与次高质量数的质量差为29, 是脱去 CHO 的结果, 其质量差合理, 所以 m/z 254 的准分子离子峰成立。染料木素最高质量数与次高质量数的质量差为16, 是脱去 O 的结果, 其质量差合理, 所以 m/z 270 的准分子离子峰成立。二者的分子离子峰的质量数(254)、(270)为偶数, 表明该样品结构中含偶数个 N 原子或不含 N 原子, 与大豆素和染料木素结构中不含 N 原子的结构特征相符。

对于混合物或复杂化合物的结构分析要利用多种核磁手段才能准确无误的对其结构分析。单独的一种氢谱或碳谱并不能分析出混合物大豆素和染料木素的结构, 只有相互结合、综合分析才能得出满意的结果。氢谱只能给出 H 的总数和 H 的类别, 不能一一识别。利用 D_2O 交换谱可以得知消失的谱峰

为活泼 OH 峰, 结合分子结构后分析它们的化学位移就可以对 OH 峰一一归属。由 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱可知 H 与 H 的相关关系, 根据各质子 H 的分裂模式将 H 完全归属。由碳谱可知碳的总数, 从 DEPT 谱中可知碳的种类和各类别碳原子的个数, 再结合 C/H 近程相关 HMQC 谱和 C/H 远程相关 HMBC 谱就可将 C 归属完全。

在红外谱图中, 羰基($\text{C}=\text{O}$)的伸缩振动峰一般在 1900~1600 cm^{-1} 范围内, 孤立的羰基伸缩振动峰波数较高, 有共轭效应的羰基峰波数较低。图9中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动峰在 1652.65 cm^{-1} 处, 是因为与芳环及双键共轭, 与一般的烷基酮 $\text{C}=\text{O}$ 相比, 吸收峰明显向低波数位移, 这为异黄酮类化合物的特征吸收峰之一。

4 结论

质谱数据符合大豆素和染料木素的分子量及其裂解途径, 红外光谱数据体现了大豆素和染料木素分子结构中主要官能团的振动, 核磁共振氢谱、碳谱以及二维核磁共振谱数据进一步佐证了大豆素和染料木素的具体分子结构。实验利用质谱、红外光谱、核磁共振氢谱、碳谱以及二维核磁共振谱等多种技术相互佐证, 成功的解析了混合物染料木素和大豆素的分子结构, 为其他混合物的结构解析提供了有力的分析参考依据。

References

- Axelsson M, Sjövall J, Gustafsson B E, and Setchell K D. 1984. Soya – A dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *Journal of Endocrinology*, 102:49-56
- Cai Q, and Wei H. 1996. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutrition and Cancer*, 25(1):1-7
- Fukutake M, Takahashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, and Wakabayashi K. 1996. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical Toxicology*, 34(5):457-461
- Gyorgy P, Murata K, and Ikehata H. 1964. Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh). *Nature*, 203:870-872
- Herman C, Adlercreutz T, Goldin B R, Gorbach S L, Höckerstedt K A V, Watanabe S, Hämäläinen E K, Markkanen M H, Mäkelä T H, Wähälä K T, Hase T A, and Fotsis T. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *The Journal of Nutrition*, 125:757-770
- Jing Y, Nakaya K, and Han R. 1993. Differentiation of promyelocytic leukemia cells HL-60 induced by daidzein in vitro and in vivo. *Anticancer Research*, 13(4):1049-1054
- Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K,

- Nishino H, and Aoiike A. 1993. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Research*, 53(6):1328-1331
- Murkies A L, Lombard C, Strauss B J, Wilcox G, Burger H G, and Morton M S. 1995. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas*, 21(3):189-195
- Peterson C, and Barnes S. 1991. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(1):661-667
- Raines E W, and Ross R. 1995. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *The Journal of Nutrition*, 125:624-630
- Setchell K D, Borriello S P, Hulme P, Kirk D N, and Axelson M. 1984. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 40:569-578
- Wang H, and Murphy P A. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42(8):1666-1673
- Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, and Wang Y. 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1):124-130
- Wei H, Cai Q, and Rahn R O. 1996. Inhibition of UV light and fenton reaction induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis*, 17(1):73-77
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, and Numoto M. 1993. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Research*, 53(23):5815-5821
- Yu D Q, Yang J S, and Xie J X eds. 1985. *Analytical chemistry manual, the fifth Fascicule*. Chemical Industry Press, China, Beijing, pp. 742-743 (于德泉, 杨峻山, 谢晶曦, 著. 1985. 分析化学手册, 第五分册. 化学工业出版社, 中国, 北京, pp. 742-743)
-
- (上接 127 页)
- Xu H H, Shen D C, and Xu Y. 2004. Influence of soybean oil and meal qualities produced by extruding- expelling. *Journal of Agricultural Mechanization Research*, 6:60-62 (徐红华, 申德超, 许岩. 2004, 挤压膨化技术对大豆油脂及豆粕质量的影响. 农机化研究, 6:60-62)
- Xu H N, and He C H. 2007. Extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi using n-butanol/water two-phase solvent system and separation of daidzein. *Separation and Purification Technology*, 56(1):85-89
- Yang M Q, Chen W, and Feng L. 2006. Research progress of biological functions of soybean isoflavone. *Soybean Science*, 25(3):320-324 (杨茂区, 陈伟, 冯磊. 2006. 大豆异黄酮的生理功能研究进展. 大豆科学, 25(3):320-324)
- Zhang Y Z, and Shi D D. 2003. The research on extract isoflavone through microwave pretreatment. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 11(3):8-10 (张永忠, 石冬冬. 2003. 微波法预处理提取大豆异黄酮的研究. 粮油食品科技, 11(3):8-10)