

黑豆种皮的酚酸类成分研究

张翠^{1,2}, 刘占云¹, 於洪建², 刘岱琳^{1*}

1. 中国人民武装警察部队后勤学院 生药教研室 天津市职业与环境危害防治重点实验室, 天津 300162

2. 天津市尖峰天然产物研究开发有限公司, 天津 300457

摘要: 目的 研究黑豆 *Glycine max* 种皮的化学成分。方法 采用大孔树脂、硅胶、ODS、Sephadex LH-20、Toyopearl HW-40、MCI 柱色谱及半制备 HPLC 等方法进行分离纯化, 并通过理化性质和波谱学技术 (ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR) 鉴定化合物的结构。结果 从黑豆皮提取物中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (1)、咖啡酸甲酯 (2)、3-甲氧基-4, 5-二羟基苯甲酸甲酯 (3)、原儿茶酸甲酯 (4)、原儿茶酸乙酯 (5)、3-甲氧基-4-羟基-苯甲酸 (6)、3-甲氧基没食子酸 (7)、二氢槲皮素 (8)、原儿茶酸 (9)、原儿茶酸酐 (10)、表儿茶素 (11)。结论 化合物 2~10 为首次从该属植物中分离得到。

关键词: 黑豆种皮; 酚酸; 咖啡酸甲酯; 3-甲氧基没食子酸; 二氢槲皮素; 原儿茶酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)24-3440-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.003

Phenolic acids from seed coats of *Glycine max*

ZHANG Cui^{1,2}, LIU Zhan-yun¹, YU Hong-jian², LIU Dai-lin¹

1. Tianjin Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Department of Pharmacognosy, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

2. Tianjin Jianfeng Natural Product R&D Co., Ltd., Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To study the phenolic acids from the seed coats of *Glycine max*. **Methods** The chemical constituents in the acid water extract from the seed coats of *G. max* were isolated and purified by chromatographic methods, including macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20, Toyopearl HW-40, and MCI columns, as well as semi-preparation HPLC. The structures of the isolated compounds were elucidated based on physicochemical properties and spectroscopies, such as ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. **Results** Eleven compounds were obtained from the acid water extract and identified as cyanidin-3-*O*-glucoside (1), methyl caffeate (2), 3-methoxy-4, 5-dihydroxy methyl benzoate (3), protocatechuic acid methyl ester (4), protocatechuic acid ethyl ester (5), 3-methoxy-4-hydroxy benzoic acid (6), 3-methoxy gallic acid (7), dihydroquercetin (8), protocatechuic acid (9), protocatechuic acid anhydride (10), and epicatechin (11). **Conclusion** Compounds 2—10 are isolated from the plants in *Glycine* Wild. for the first time.

Key words: seed coats of *Glycine max*; phenolic acids; methyl caffeate; 3-methoxy gallic acid; dihydroquercetin; protocatechuic acid

黑豆种皮来源于豆科植物黑豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种皮, 秋季采收脱皮可得, 俗称黑豆皮、料豆衣、乌衣等。中国自古就有“大豆数种, 唯黑入药”的记载^[1]。黑豆种皮具有滋阴养血、平肝益肾、滋阴清热之功效。适用于肝血不足、血虚肝旺或阴虚阳亢所致的头痛眩晕、阴虚潮热盗汗等^[1]。现代研究表明其具有明显的抗氧化、抗炎、抑制诱变、抗心血管疾病等作用^[2-5]。花青素是黑豆

种皮中最主要的化学成分^[6-8], 近年来又从中分离得到一些三萜类^[9]物质, 其他化合物报道较少。为了深入研究黑豆种皮的化学成分, 本实验对黑豆种皮酸水提取物进行系统的化学成分研究, 利用各种色谱和波谱技术, 分离得到了 11 个酚酸类化合物, 分别鉴定为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (cyanidin-3-*O*-glucoside, 1)、咖啡酸甲酯 (methyl caffeate, 2)、3-甲氧基-4, 5-二羟基苯甲酸甲酯 (3-methoxy-4, 5-

收稿日期: 2013-09-11

基金项目: 天津市科技支撑计划项目 (09ZCKFNC01000)

作者简介: 张翠 (1987—), 女, 硕士, 河北邢台人, 研究方向为天然产物活性成分研究。

*通信作者 刘岱琳 Tel: (022)84876754 E-mail: dailinlch@163.com

dihydroxy methyl benzoate, 3)、原儿茶酸甲酯 (protocatechuic acid methyl ester, 4) 原儿茶酸乙酯 (protocatechuic acid ethyl ester, 5)、3-甲氧基-4-羟基-苯甲酸 (3-methoxy-4-hydroxy benzoic acid, 6)、3-甲氧基没食子酸 (3-methoxy gallic acid, 7)、二氢槲皮素 (dihydroquercetin, 8)、原儿茶酸 (protocatechuic acid, 9)、原儿茶酸酐 (protocatechuic acid anhydride, 10)、表儿茶素 (epicatechin, 11)。化合物 2~10 为首次从该属植物中分离得到。

1 材料与仪器

Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪; Shimadzu LC-GAD 半制备高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Bruker Esquire 2000 质谱仪; Bruker Avance-400 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); 色谱柱: COSMOSIL 5C18-MS-II (250 mm × 4.6 mm) 柱为日本 COSMOSIL 公司产品; 半制备色谱柱 SHIMADZU PRC-ODS (250 mm × 20 mm, 5 μm) 由日本岛津公司生产。薄层色谱硅胶 GF254、柱色谱硅胶由青岛海洋化工厂分厂生产; HP20 大孔吸附树脂是日本三菱化学公司产品; ODS 是德国 Merck 公司产品; Toyopearl HW-40 为日本 TOKYO 公司产品; Sephadex LH-20 是瑞典 Pharmacia 公司产品。

黑豆种皮采收自山东阳信, 由沈阳药科大学孙启时教授鉴定为豆科植物黑豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种皮。该黑豆种皮原料经过 1% 盐酸水溶液室温浸提 2 次 (物料比分别为 10 倍和 8 倍, 浸提时间为 10 h), 滤过, 合并浸提液, 利用膜浓缩, 干燥得到黑豆种皮提取物 (批号 BB060101, 由天津尖峰天然产物研究开发有限公司提供)。

2 提取与分离

取黑豆种皮提取物 (BB060101) 2 kg, 用 100 L 水溶解后, 经 HP20 大孔树脂柱色谱吸附样品, 用水、10%乙醇、30%乙醇、50%乙醇分别洗脱, 减压浓缩后得到组分 I (360 g)、II (450 g)、III (480 g)、IV (510 g)。组分 II 经硅胶柱色谱分离, 分别用氯仿-甲醇 (80:20)、氯仿-甲醇 (70:30)、氯仿-甲醇 (60:40) 和甲醇梯度洗脱, 其中氯仿-甲醇 (60:40) 洗脱的 BS-II-9 (15.9 g) 经过 Sephadex LH-20 柱色谱 (40%甲醇洗脱) 及 MCI 柱色谱 (30%甲醇洗脱) 分离纯化得到化合物 1 (193.9 mg)。组分 IV 经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 氯仿-甲醇 (60:40) 洗脱部分浓缩后获得组分 BS-IV-10 (14.3 g)。该组分经 ODS 柱色谱, 甲醇-水梯度洗脱,

45%甲醇洗脱部分 BS-IV-10-8 (4.1 g) 经过制备高效液相色谱分离纯化, 40%甲醇洗脱 (DAD 280 nm 检测), 得到化合物 2 (6.1 mg)、3 (3.0 mg)、4 (16.0 mg)、5 (3.0 mg)、6 (17.7 mg)、7 (10.1 mg)、8 (5.3 mg)、9 (9.6 mg)、10 (8.2 mg)、11 (86 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 红色粉末 (甲醇), 三氯化铁显色阳性, 说明有酚羟基存在。该化合物与矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对照品共薄层检测, 3 种不同展开系统下, 显色斑点一致。经 HPLC 分析, 保留时间及紫外吸收波长均相同, 故鉴定该化合物为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。

化合物 2: 淡黄色粉末 (甲醇), 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$ 。三氯化铁显色阳性, 提示该化合物含有酚羟基。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.16 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 7.05 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 3.88 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.9 (C-9), 150.4 (C-4), 149.3 (C-7), 146.8 (C-3), 127.8 (C-1), 123.9 (C-6), 116.4 (C-5), 115.9 (C-8), 111.7 (C-2), 56.4 (C-10)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 2 为咖啡酸甲酯。

化合物 3: 白色粉末 (甲醇), 分子式为 $C_9H_{10}O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 7.16 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃), 3.85 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 168.8 (C-7), 149.1 (C-3), 146.3 (C-5), 141.0 (C-4), 121.4 (C-1), 111.9 (C-6), 106.1 (C-2), 56.6 (3-OCH₃), 52.3 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 3 为 3-甲氧基-4, 5-二羟基苯甲酸甲酯。

化合物 4: 无色针晶 (甲醇), 分子式为 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.41 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.39 (1H, dd, $J = 8.9, 1.8$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 3.82 (3H, s, H-8)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 4 为原儿茶酸甲酯。

化合物 5: 无色针晶 (甲醇), 分子式为 $C_9H_{10}O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.39 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 4.27 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-8), 1.33 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-9)。以上数据与文献报道基

本一致^[14], 故鉴定化合物 **5** 为原儿茶酸乙酯。

化合物 **6**: 白色针晶(甲醇), 分子式为 $C_8H_8O_4$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.77 (2H, m, H-2, 6), 7.04 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 3.92 (3H, s, $-OCH_3$); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.8 ($-COOH$), 153.6 (C-4), 149.1 (C-3), 125.5 (C-6), 123.6 (C-1), 116.4 (C-5), 114.8 (C-2), 57.1 (3- OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **6** 为 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸。

化合物 **7**: 白色粉末(甲醇), 分子式为 $C_8H_8O_5$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 7.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 3.86 (3H, s, $-OCH_3$); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.1 (C-7), 149.1 (C-5), 146.2 (C-3), 140.5 (C-4), 122.0 (C-1), 112.2 (C-2), 106.4 (C-6), 56.7 (3- OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为 3-甲氧基没食子酸。

化合物 **8**: 黄色晶体(甲醇), 分子式为 $C_{15}H_{12}O_7$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.95 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.83 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 5.91 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.87 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.90 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-2), 4.48 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 198.3 (C-4), 168.7 (C-7), 165.3 (C-9), 164.5 (C-5), 147.1 (C-4'), 146.3 (C-3'), 129.9 (C-1'), 120.9 (C-2'), 115.9 (C-5'), 116.1 (C-6'), 97.3 (C-6), 96.3 (C-8), 85.1 (C-2), 73.7 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **8** 为二氢槲皮素。

化合物 **9**: 无色针晶(甲醇), 分子式为 $C_7H_6O_4$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.41 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 7.43 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **9** 为原儿茶酸。

化合物 **10**: 白色粉末(甲醇), ESI-MS m/z : 313.2 $[M+Na]^+$, 结合碳谱氢谱确定分子式为 $C_{14}H_{10}O_7$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.41 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 2'), 7.37 (2H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6, 6'), 6.74 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5, 5')。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **10** 为原儿茶酸酐。

化合物 **11**: 白色针晶(甲醇), 分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。三氯化铁显色阳性, 说明存在酚羟基。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.97 (1H, d, $J = 2.0$

Hz, H-2'), 6.80 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 5.93 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 5.91 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 4.81 (1H, m, H-2), 4.16 (1H, m, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.0, 4.8$ Hz, H-4), 2.72 (1H, dd, $J = 16.0, 3.2$ Hz, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 158.0 (C-9), 157.7 (C-7), 157.4 (C-5), 146.0 (C-3'), 145.8 (C-4'), 132.3 (C-1'), 119.4 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.4 (C-2'), 100.1 (C-10), 95.5 (C-8), 96.5 (C-6), 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.2 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[19-20], 故鉴定化合物 **11** 为表儿茶素。

参考文献

- [1] 黄 昉, 李汴生, 徐志宏, 等. 黑豆种皮色素的测定和提取 [J]. 食品工业科技, 2004, 25(4): 112-114.
- [2] 刘岱琳, 董晋泉, 王 媚, 等. YWD-01 大孔吸附树脂分离纯化黑豆红色素的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(3): 85-88.
- [3] 刘岱琳, 谢文利, 朱 珊, 等. 黑豆皮花青素在制备防治糖尿病及血管并发症药物或食物的应用: 中国, 200810053954. 3 [P]. 2008-10-05.
- [4] Astadi I R, Astuti M, Santoso U, *et al.* *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL) [J]. *Food Chem*, 2009, 112: 659-663.
- [5] 张瑞芬, 黄 昉, 徐志宏, 等. 黑豆皮提取物抗氧化和延缓衰老作用研究 [J]. 营养学报, 2007, 29(2): 160-162.
- [6] Choung M G. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 5848-5851.
- [7] Lee J H, Kang N S, Shin S O, *et al.* Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis [J]. *Food Chem*, 2009, 112: 226-231.
- [8] Koh K, Youn J E, Kim H S. Identification of anthocyanins in black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] varieties [J]. *J Food Sci Technol*, 2011, DOI 10. 1007/s13197-011-0493y.
- [9] Dong M, He X G J, Liu R H. Phytochemicals of black bean seed coats: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidative activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 6044-6051.
- [10] Lou H X, Yoshimitsu Y, Tsutomu S, *et al.* A-type proanthocyanidins from peanut skins [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51: 297-308.
- [11] Reynertson K A, Wallace A M, Adachi S, *et al.* Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria*

- cauliflora*) [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 1228-1230.
- [12] 胡 婷, 李 军, 屠鹏飞. 布渣叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 844-846.
- [13] Nozawa K, Takada M, Udagawa S I, *et al.* Three *p*-hydroxybenzoic acid derivatives from *Talaromyces derxii* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(2): 655-656.
- [14] 王莉宁, 徐必学, 曹佩雪, 等. 赤胫散化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(1): 72-75.
- [15] 刘雪润, 陈 重, 李笑然, 等. 紫玉盘叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2197-2199.
- [16] 巴寅颖, 刘倩颖, 石任兵, 等. 鬼箭羽中黄酮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 242-246.
- [17] 舒永志, 成 亮, 曹潜喆, 等. 黑老虎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 428-431.
- [18] Termentzi A, Zervou M, Kokkalou E, *et al.* Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from *Sorbus domestica* fruits [J]. *Food Chem*, 2009, 116: 371-381.
- [19] 陈智仙, 高文远, 刘岱琳, 等. 大血藤的化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2010, 41(6): 867-870.
- [20] 傅 建, 梁光义, 张建新, 等. 茸毛木蓝化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 265-268.