

文章编号 :1009 - 038X(2001)01 - 0068 - 04

大豆皂甙 A 的分离与 ESI/MS 分析

谷利伟¹, 谷文英¹, 陶冠军², 王林祥², 秦 昉

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036 ; 2. 无锡轻工大学分析测试中心, 江苏无锡 214036)

摘 要 :大豆胚芽中皂甙的含量是子叶的 6 ~ 14 倍,soyasaponin A 仅存在于胚芽中.以硅胶柱色谱和制备高效液相色谱法从大豆胚芽的乙醇提取物中分离出二种 A 组皂甙,进行定性反应. UV 和 ESI/MS 分析确证其结构为 soyasaponin A₁ 和 soyasaponin A₄. 实验证明大豆皂甙的 ESI/MS 裂解特征与 FD-MS 和 FAB-MS 不同,特别适于皂甙等强极性难挥发的糖甙化合物的结构解析.

关键词 :大豆 胚芽 皂甙 电喷雾质谱

中图分类号 :S 565.1

文献标识码 :A

Isolation of Soyasaponin A and Their Structural Elucidation with ESI/MS

GU Li-wei¹, GU Wen-ying¹, TAO Guan-jun², WANG Lin-xiang², QIN Fang²

(1. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China ; 2. Analying and Testing Center, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract : Soyasaponins were physiologically active components existed in high concentration in soy germs. Two A group soya saponins were isolated from soy germs with preparative HPLC method. Their structures were confirmed with characteristic reaction, UV and ESI/MS as soya saponin A₁ and A₄. ESI/MS was found to be highly sensitive and accurate for the structural analysis of saponins.

Key words : soybean ; soy germs ; soya saponins ; ESI/ MS

大豆皂甙是存在于大豆中的一类的五环三萜的糖甙,结构与柴胡皂甙类似. Kitagawa 和 Okubo 等人从大豆中分离出 7 种 A 组皂甙(Aa-Ah)和 5 种 B 组皂甙(Ba, Bb, Bc, Bb', Bc'). A 组皂甙和 B 组皂甙的皂甙元只有较小区别,但 2 组皂甙的糖链明显不同, A 组为双链, B 组为单链^[1,2]. 大豆胚芽中皂甙的含量是子叶的 6 ~ 14 倍,豆皮中几乎不含有皂甙. Shiraiwa 等人分析了多达 457 个品种的大豆胚芽中的皂甙含量,表明胚芽中总皂甙含量为 0.62% ~ 6.16%,其中 A 组皂甙 0.36% ~ 3.41%、B 组皂甙 0.26% ~ 2.75%^[3]. 皂甙是大豆制品苦涩味的主要来

源,其中最苦的是乙酰化的 A 组皂甙, A 组皂甙脱乙酰后苦涩味降低, B 组皂甙的苦涩味小于 A 组皂甙^[4]. 皂甙能导致红血球破坏,因而具有溶血作用,一度被认为是大豆中的一种抗营养因子. 20 世纪 80 年代后人们研究证明大豆皂甙具有多种有益的生理功能. 如大豆皂甙可以抑制血清中过氧化脂质的形成,抑制过氧化脂质和四氯化碳对肝脏细胞的损伤^[5]. 抑制结肠癌细胞 HCT-15 的生长,降低结肠癌的发生率^[6,7];干扰小肠对胆固醇的吸收和胆酸的肝肠循环,具有降低血清胆固醇的作用. 此外,大豆皂甙还具有免疫增强作用和抗血栓作用.

收稿日期 2000 - 04 - 05 修订日期 2000 - 11 - 06.

作者简介:谷利伟(1972 -),男,河南许昌人,粮油科学与工程博士研究生.

万方数据

胚芽组成成份与子叶明显不同^[8~10],作者以制备高效液相色谱法从胚芽中分离制备了 2 种脱乙酰的 A 组大豆皂甙的单体.以定性反应和 ESI/MS (电喷雾质谱)分析确定其结构为 soyasaponin A₁ 和 soyasaponin A₄.

1 材料与方法

1.1 大豆皂甙的提取

以精制大豆胚芽(含胚芽约 68%,子叶 32%) 3.3 kg为原料,以 30 L 的 70%乙醇回流提取 1 h,减压蒸去乙醇浓缩得到糖浆 2.5 L,以 3 L6 号溶剂脱脂,脱脂后的样品以 5 L 水饱和的正丁醇萃取,得到以异黄酮甙和皂甙为主要成份的大豆总糖甙 218 g.取总糖甙 16.1 g 作硅胶柱层析(80~100 目,青岛海洋化工厂),柱层析用硅胶 500 g 装入 D 5 cm×80 cm 开口柱,以氯仿-甲醇-水(体积比为 65:35:10),下层洗脱,以薄层色谱作分析和定性检测,依次洗脱出异黄酮糖甙,B 组皂甙和 A 组皂甙.取 A 组皂甙 100 mg 溶于 3% 甲醇钠的甲醇溶液中,室温下放置 2 h,以 1 mol/L 的 HCl 中和后,得到完全脱乙酰的 A 组皂甙.

1.2 异黄酮和皂甙的薄层色谱分析

薄层层析用硅胶 GF254 按文献[11]方法制成 0.5 mm 厚度板,展开系统为氯仿-甲醇-水-乙酸(体积比为 70:30:10:1),下层.皂甙 $R_f = 0.15$,喷含 10% 硫酸的乙醇溶液,110 ℃烘 10 min,显红-紫色斑点.异黄酮糖甙 $R_f = 0.6$,在薄层板上喷体积比为 1:1 混和的 1% 三氯化铁和 1% 铁氰化钾的水溶液,显兰色斑点.

1.3 皂甙的高效液相制备分离

Waters 600 型溶剂泵系统,Waters 600 控制单元和 Waters 2487 双波长检测器.色谱柱:μBondpark™ C18 10 μm,D 7.8 mm×250 mm,流速 3 mL/min,UV 210 nm 检测,进样量每次 200 μL,以甲醇-异丙醇-水-甲酸(体积比为 45:5:50:0.1)分离脱乙酰皂甙 A,得到脱乙酰皂甙 I 和 II.

1.4 皂甙的结构测定

紫外光谱:岛津 UV 240 型紫外可见扫描仪,波长范围 200~500 nm.红外光谱采用岛津 IR-440 型红外光谱仪,KBr 压片法测定,扫描波长 5000~300 cm⁻¹.

ESI/MS(电喷雾质谱):Micromass 型电喷雾质谱仪,注射进样.ESI+ /MS 毛细管电压 4.05 kV,一级锥孔电压 110 V,二级锥孔电压 5 V,离子源温度 120 ℃,脱溶温度 200 ℃.ESI- /MS:毛细管电压 3.7

kV,一级锥孔电压 90 V.

2 结果与讨论

2.1 大豆总糖甙分离结果

皂甙的相对分子质量大,亲水性强,是较难分离的天然成份之一,以硅胶柱色谱分离仅能得到较纯的皂甙混和物^[12],分离结果如表 1.完整的 A 组皂甙的 C-22 位连接的双糖的末端糖基是全乙酰化的,C-3 位上的糖链部分乙酰化,乙酰化的 A 组皂甙在提取过程中可能发生少量的脱乙酰反应,很难分离.A 组皂甙完全脱乙酰后性质稳定,可以在反相制备液相色谱中得到基线分离(图 1).由于大豆皂甙的最大吸收波长为 203 nm,而甲醇在此波长的透光率仅有 60%,在此波长检测或应用梯度会引起严重的基线漂移,本实验中以单一浓度的甲醇洗脱,以 210 nm 为检测波长.大豆皂甙 A 在含水甲醇中的溶解性优于 B 组皂甙,但仍小于 30 mg/mL,流动相中加入异丙醇能提高皂甙的溶解度.A 组皂甙为酸性皂甙,加入甲酸能改善分离度,但由于保留时间相差很少,当进样量超过 300 μL 时将无法分开.

表 1 硅胶柱色谱分离 16.1 克大豆总糖甙的分离结果
Tab.1 Separation outcome of soy glycosides by silica gel column chromatography

流出液 体积/mL	异黄酮定 性反应	皂甙定性 反应	TLC 成份分析	质量/g
100	-	-	无	-
200~500	+	-	乙酰化异黄酮糖甙	-
600~1000	+	-	异黄酮糖甙	-
1100~2000	-	+	B 组皂甙	4.1
2100~2300	-	+	A + B 组皂甙	1.4
2400~2600	-	+	A 组皂甙	2.7

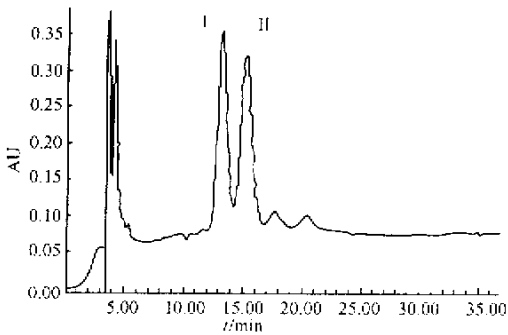


图 1 A 组皂甙的制备液相色谱分离结果,峰 I、II 分别为大豆皂甙 A₄ 和 A₁

Fig. 1 Preparative HPLC profile of group A soyasaponin. Peak I, II were soyasaponin A₄ and soyasaponin A₁ respectively

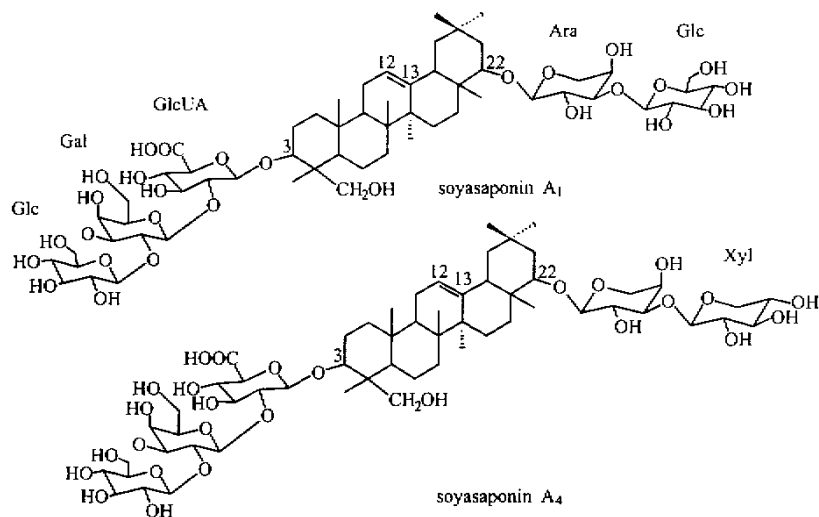


图 2 大豆皂甙 A₄ 和 大豆皂甙 A₁ 的结构式

Fig.2 Structure of soyasaponin A₄ and soyasaponin A₁

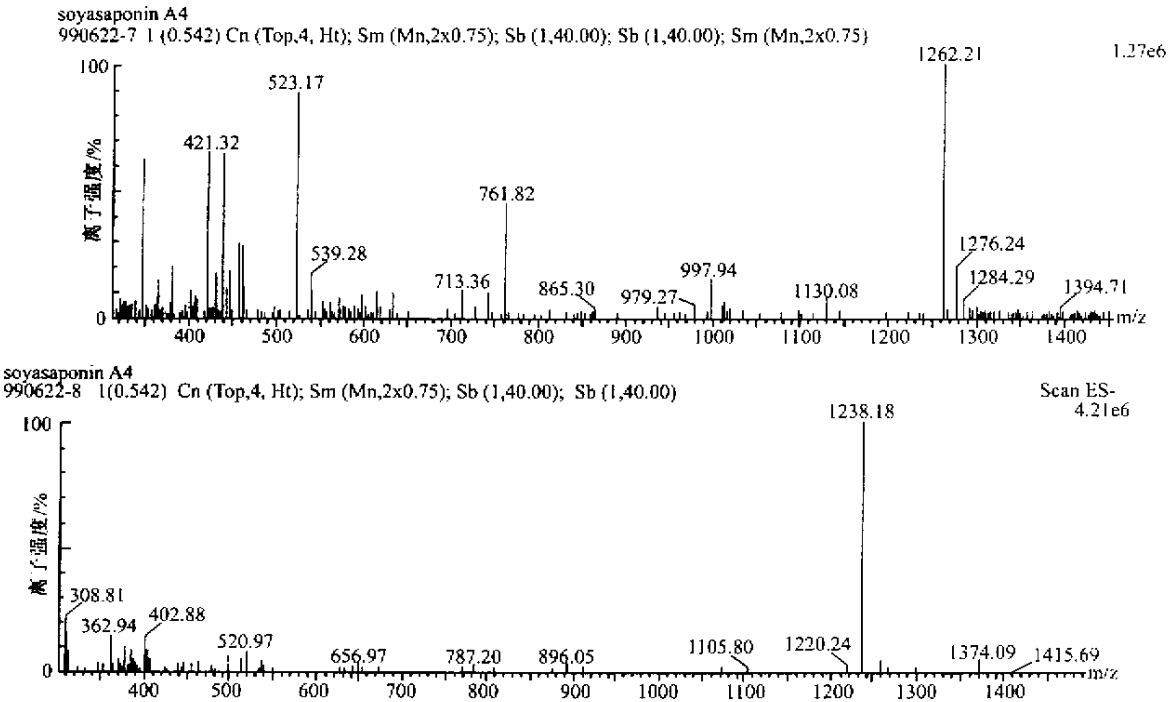


图 3 soyasaponin A₄ 的 ESI+ /MS 和 ESI- /MS 谱

Fig.3 ESI mass spectrum of soyasaponin A₄ in positive and negative mode

2.2 A 组皂甙的 ESI/MS 分析

皂甙 I :白色粉末, Libermann-Burchard 反应呈阳性,UV λ (MeOH) max = 203 nm,示为皂甙类化合物.ESI- /MS 仅产生 m/z 1238.18 的基峰,ESI+ /MS 产生 m/z 1262.21 的基峰(如图 3 所示).前者是皂甙分子失去一个氢原子的准分子离子峰,后者是分子捕获一个钠离子形成的准分子离子峰.表明此分子的相对分子质量为 1239.08,大豆皂甙 A₄ 的分

子式为 C₅₈H₉₄O₂₈,计算平均相对分子质量为 1239.37,与此质谱特征相吻合.ESI/MS 提供了糖链的断裂信息,m/z 1130.08 可能是分子失去 C-22 位糖链末端的 Xyl(132.11)后再结合一个钠离子形成,它再失去 C-22 位的 Ara(132.11)后结合一个钠离子形成 m/z 997.94 ;m/z 761.82 是分子失去 C-3 位的 Glc-Gal-GlcUA 糖链后再结合一个钠离子形成 ;失去的 Glc-Gal-GlcUA 糖链结合钠离子形成 m/z 523.17 离

子, m/z 347.08 可能是 C-3 位上断裂的 Glc-Gal-糖链捕获一个钠离子形成的. m/z 439.30 是皂甙元上的 12、13 位环已烯式双键处发生 RAD 裂解后形成的离子. Soyasaponin A₄ 仅存在于胚芽中.

表 2 Soyasaponin A₄ 和 Soyasaponin A₁ 的 ESI/MS 解析*
Tab.2 Assignments of ESI/MS data of Soyasaponin A₄ and Soyasaponin A₁

皂甙类形	A ₄	A ₁
分子式	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₈	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₉
平均相对分子质量	1239.37	1269.39
ESI- /MS m/z (%)		
[M-H] ⁻	1238.18(100)	1268.05(100)
ESI+ /MS m/z (%)		
[M+Na] ⁺	1262.21(100)	1292.10(100)
[M-162.13+Na] ⁺		1130.32(10)
[M-132.11+Na] ⁺	1130.08(10)	
[M-162.13-132.11+Na] ⁺		997.94(20)
[M-2*162.13-176.12+Na] ⁺	761.82(50)	791.72(60)
[M-2*132.11+Na] ⁺	997.94(20)	
[176.12+2*162.13+Na] ⁺	523.17(80)	523.17(75)

注 :162.13 是 Glc 或 Gal 的残基相对分子质量,146.14 是 Rha 的残基相对分子质量,132.11 是 Xyl 或 Ara 的残基相对分子质量,176.12 是 GlcUA 的残基相对分子质量.

脱乙酰皂甙 II :白色粉末, Libermann-Burchard 反应呈阳性, $\lambda_{\max}$ (CH₃OH) = 203 nm, 由 ESI/MS 图谱鉴定为 Soyasaponin A₁ (如表 2), 仅存在于胚芽中.

Shiraiwa 等人分析认为不同品种大豆的胚芽中的 A 组皂甙组成变化较大, 分为 7 种类型, 90% 以上的品种以 A₁ 或 A₄ 皂甙中的一种作为主要成分, 作者所用胚芽显然同时含有这两种成份.

大豆皂甙 A 是由多个饱和和环组成的有立体空间结构的分子, 环上同碳的两个氢原子同为饱和和氢, 但是磁不等价的, 核磁共振的化学位移相差较大, 它们除受到相邻碳原子上的氢的耦合作用, 彼此也发生强烈的同碳耦合作用 ($J = 15 \sim 20$ Hz). 皂甙的信号集中, 耦合裂分特别复杂, 如果没有高分辨的 DEPT, COSY, ROESY 和 HMBC 谱, 对皂甙的结构分析是非常困难的. 电喷雾质谱是一种近年来迅速发展的新的质谱电离方式, 是一种非常“软”的电离方式, 同时提供正负两种电离方式, 负离子方式仅出现准分子离子峰, 正离子方式提供的碎片信息可以显示糖基的类型, 具有极高的灵敏度和准确度, 特别适用于皂甙等复杂糖甙化合物的结构分析. 作者首次报道了大豆皂甙的 ESI/MS 裂解特征, 证明大豆皂甙的 ESI/MS 裂解特征与场解析质谱 (FD-MS) 和快原子轰击质谱 (FAB-MS) 等方法不同. FD-MS 高质量区的信息详细, 低质量区碎片少; 与之相比 ESI/MS 提供了更多的碎片信息和低质量区碎片, 这一特点与 FAB-MS 相同^[13]. 皂甙的 FAB-MS 阳离子质谱仅有准分子离子峰, 阴离子质谱同时提供碎片信息, 而 ESI/MS 的电离规律与 FAB-MS 相反.

参考文献：

[1] SHIMOYAMADA M, KUDO S, OKUBO K, *et al.* Distributions of saponin constituents in some varieties of soybean plant[J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54 :77 ~ 81.

[2] KITAGAWA I, TANIYAMA T, SAITO M. *et al.* Structure of acetyl-soyasaponin A1, A2 and A3, astringent partially acetylated bis-desmoside of soyasapogenol A from American soybean, the seed of *Glycine max* MERRILL[J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(8) :2819 ~ 2828.

[3] SHIRAIWA M, HARADA K, OKUBO K. Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55 :323 ~ 331.

[4] OKUBO K, IJIMA M, KOBAYASHI Y, *et al.* Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56 :99 ~ 103.

[5] 陆世荣. 大豆皂甙的制备及其应用[J]. *中国油脂*, 1993, 3 :41 ~ 44.

[6] KUDOU S, TONOMURA M, TSUKAMOTO C, *et al.* Structural elucidation and physiological properties of genuine soybean saponins[J]. *ACS Symp*, 1994, 547 :340 ~ 348.

[7] RAO A V, SUNG MK. Saponins as anticarcinogens[J]. *J Nutri*, 1995, 125 :171s ~ 174s.

[8] TANI T, KATSUKI T, KUBO M, *et al.* Histochemistry. Soyasaponins in soybeans (*Glycine max* MERRILL, seeds) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(9) :3829 ~ 3833.

(下转第 76 页)

- [9] TANI T, KATSUKI T, KUBO M, *et al.* Soyasaponins in soybeans (*Glycine max* MERRILL, seeds) [J]. **Chem Pharm Bull**, 1985, 33(9) :3834 ~ 3837.
- [10] YOSHIDA H, TAKAGI S, IENAGA H, *et al.* Regional distribution of tocopherols and fatty acids within soybean seeds[J]. **J Amer Oil Chem Soc**, 1998,75(7) :767 ~ 774.
- [11] 徐任生主编. 中草药有效成份的分离提取[M]. 上海:上海科技出版社,1986.
- [12] 姚新生主编. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.
- [13] SHIRAIWA M, KUDO S, SHIMOYAMADA M, *et al.* Composition and structure of 'group A saponin' in soybean seed[J]. **Agric Biol Chem**, 1991,55(2) :315 ~ 322.

(责任编辑 朱 明)