

# 高速逆流色谱结合制备型高效液相色谱法 分离制备大豆皂苷单体

黄玉艾, 严明霞, 赵大云\*  
(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:** 为建立一种有效的同时分离制备多种大豆皂苷单体的方法, 先采用高速逆流色谱分离去除大豆皂苷粗提物中的大豆异黄酮, 然后对得到大豆总皂苷, 优化制备型高效液相的流动相酸(乙酸或三氟乙酸)的含量和梯度洗脱程序, 以制备高纯度的大豆皂苷单体。结果表明: 流速10mL/min, 流动相乙腈(含0.01%三氟乙酸)-水按梯度程序III洗脱, 出峰数量多、峰形好、分离度高。经高效液相分析与光谱特性、质谱和核磁共振鉴定了11个峰的大豆皂苷种类, 包括5种A组、2种B组以及3种2,3-2H-2,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-(DDMP)大豆皂苷。研究结果提供了从含量相对丰富的大豆胚芽中大量分离制备部分或完全乙酰化的A组以及非DDMP和完整DDMP存在的B组大豆皂苷的有效方法。

**关键词:** 大豆皂苷单体; 高速逆流色谱; 制备型高效液相色谱; 质谱; 核磁共振

## Large-Scale Isolation and Preparation of Soybean Saponin by High-Speed Countercurrent Chromatography Combined with Preparative HPLC

HUANG Yu-ai, YAN Ming-xia, ZHAO Da-yun\*  
(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** The objective of this study is to isolate and purify soybean saponin from soybean germs by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) combined with preparative HPLC. The isoflavonoids were removed from crude extract by HSCCC first. The pure soybean saponin was then obtained by preparative HPLC with acetic acid or trifluoroacetic acid (TFA) as mobile phase in a gradient elution mode. The optimal conditions for preparative HPLC were dual mobile phases composed of acetonitrile containing 0.01% (V/V) TFA and millipore water at a flow rate of 10 mL/min for gradient elution. Five compounds in group A and two compounds in group B and 3 kinds of 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP)-conjugated soybean saponins with high purity were prepared and their structures were elucidated by mass spectrum (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Therefore, the developed method can be used to separate partially and fully acetylated soybean saponins as well as DDMP-conjugated and unconjugated soybean saponins in the original sample.

**Key words:** soybean saponin; high-speed countercurrent chromatography (HSCCC); preparative high performance liquid chromatography; mass spectroscopy (MS); nuclear magnetic resonance (NMR)

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0027-06

大豆皂苷是大豆中的主要活性物质之一, 具有药疗营养的双重功效, 已逐渐成为研究的热点。国内外的许多研究已表明, 大豆皂苷是一种具有广泛应用价值的纯天然植物提取的生物活性物质, 对人体具有很多有益的生理功能, 有良好的保健效果。这些生理功能或活性包括免疫佐剂活性<sup>[1]</sup>、抗血栓功效<sup>[2]</sup>、防治糖尿病<sup>[3]</sup>、增强免疫力<sup>[4]</sup>、抗疲劳<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、保护肝脏<sup>[7]</sup>、抗诱变<sup>[8]</sup>等。

大豆皂苷存在于大豆等豆科植物中, 是一类结构复

杂的化合物。由非极性的苷元和极性的糖链组成, 整体极性较强。大豆皂苷苷元为齐墩果烷型五环三萜类化合物, 苷元分A(soyasapogenol A)、B(soyasapogenol B)和E(soyasapogenol E)<sup>[9-10]</sup>, 如图1所示。

糖链上的单糖种类主要有 $\beta$ -D-葡萄糖、 $\beta$ -D-半乳糖、 $\beta$ -D-木糖、 $\alpha$ -L-鼠李糖、 $\alpha$ -L-阿拉伯糖、 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸(本实验中分别简写为glc、gal、xyl、rha、ara、glcUA)6种单糖。A组大豆皂苷在苷元A的C<sub>3</sub>和C<sub>22</sub>位上

收稿日期: 2011-10-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31071630)

作者简介: 黄玉艾(1986—), 女, 硕士, 研究方向为功能食品。E-mail: fn-huangyuai@163.com

\*通信作者: 赵大云(1966—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品化学。E-mail: dyzhao@sjtu.edu.cn

各有一个糖链,完整的A组大豆皂苷C<sub>22</sub>连接的糖链末端的单糖应该是全乙酰化的,只是在加工等过程中因受热等因素影响才部分或全部脱乙酰的。B组大豆皂苷只在C<sub>3</sub>位上有一个糖链,E组皂苷为B组皂苷的光氧化产物。完整的B组大豆皂苷应该是在C<sub>22</sub>位上结合有DDMP基团(结构如图2所示)。不同的苷元和糖链的复杂组合使得大豆皂苷的种类繁多,且有些大豆皂苷之间仅是某个单糖不同,给分离制备高纯的大豆皂苷单体带来了很大困难。

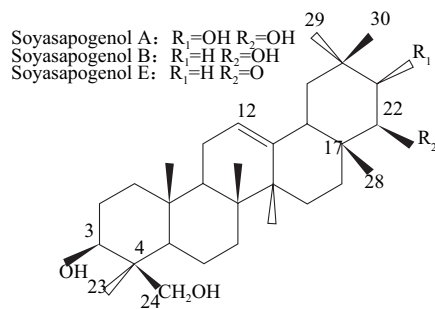


图1 大豆皂苷苷元的结构图  
Fig.1 The structure of soybean sapogenol

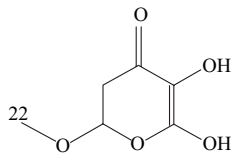


图2 DDMP基团结构图  
Fig.2 The structure of DDMP group

大豆皂苷在大豆加工副产物大豆胚芽中含量相对丰富,但由于其与大豆异黄酮共存,二者极性重叠,用传统的溶剂萃取的方法很难将他们分离,是制备大豆皂苷单体的另一个棘手问题。若想得到高纯度且分离度良好的大豆皂苷单体,首先需要除去大豆异黄酮,将其对大豆皂苷单体分离的影响降到最低。

另外,单体皂苷因为大豆产地以及品种等因素的影响,各自的含量存在差异,目前尚无种类完全的大豆皂苷标准品商品,因而无法有效开展相关质量指标检测和有效地开展其生物活性评价工作。本实验的目的是探索分离纯化大豆皂苷的条件和方法,并研究利用大豆胚芽制备大豆皂苷单体的工艺流程,分离制备高纯度的种类齐全的大豆皂苷单组物质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆胚芽(2010年产) 黑龙江九三油脂有限责任公司; AB-8大孔吸附树脂 南开大学化工厂; 无水乙醇、

石油醚(30~60℃沸程)等均为分析纯; HPLC使用试剂均为色谱纯; Sep-Park® Vac 6cc C<sub>18</sub>-500m 美国Waters公司。

### 1.2 仪器与设备

TBE300A高速逆流色谱 上海同田生物技术有限公司; HPLC系统(配有600E型溶剂泵系统、717自动进样器、2996二极管阵列(PDA)检测器)、ACQUITY™ UPLC & Q-TOF MS Premier超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪 美国Waters公司; 2000蒸发光散射检测器 美国Alltech公司; 无油空气发生器 上海安谱仪器科学有限公司; Avance III核磁共振谱仪 瑞士Bruker公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 粗提物的准备<sup>[11]</sup>

称取大豆胚芽粉40g,用石油醚(30~60℃)脱脂至回流管中石油醚无色,取出挥干石油醚后,再用400mL的70%乙醇水溶液常温浸提6~8h,旋转蒸发回收乙醇相,水相上AB-8大孔吸附树脂柱(30mm×800mm,树脂床层高250mm)吸附过夜,经多次水洗去除糖等杂质,用95%乙醇水溶液洗脱,旋蒸除去乙醇,干燥后得粗提物粉末。

#### 1.3.2 高速逆流色谱分离条件

参考吴永慧等<sup>[12]</sup>研究成果。

#### 1.3.3 HPLC分析条件

分析色谱柱: Alltima C<sub>18</sub>(250mm×10.0mm, 10μm); 温度: 30℃; 样品质量浓度: 5mg皂苷样品溶于1mL甲醇; 进样体积: 20μL; 流动相流速: 1mL/min; 流动相: A: 体积分数0.002%乙酸水溶液, B: 0.002%乙酸乙腈溶液; 检测器: 紫外-可见光PDA二极管阵列检测器(200~800nm, 205nm为监控波长)、蒸发光散射检测器; HPLC梯度洗脱程序参考Decroos等<sup>[13]</sup>研究,见表1。

表1 HPLC分析检测梯度洗脱程序(梯度洗脱程序I)

		%						
时间/min		0	10	30	80	90	110	120
流动相	A	90	90	70	60	0	0	90
	B	10	10	30	40	100	100	10

### 1.4 制备型HPLC分离条件

表2 优化实验的选择条件

	乙腈中含有酸的种类	体积分数/%	梯度洗脱程序
Line 1	乙酸	0	I
Line 2	乙酸	0.004	I
Line 3	乙酸	0.006	I
Line 4	乙酸	0.01	I
Line 5	乙酸	0.02	I
Line 6	三氟乙酸	0.008	I
Line 7	三氟乙酸	0.008	II
Line 8	三氟乙酸	0.008	III
Line 9	三氟乙酸	0.01	III

确定流动相中的酸以及洗脱程序是两个关键的HPLC制备色谱条件。采用Daisogel C<sub>18</sub> 100Å制备型色谱柱(20mm×250mm, 10μm), 流动相为水/乙腈梯度洗脱, 流速10mL/min, 样品质量浓度400mg/mL, 进样体积100μL(40mg), 检测器为PDA二极管阵列检测器, 波长范围200~800nm, 205nm为监控波长。具体参数见表2。

#### 1.4.1 流动相优化

##### 1.4.1.1 流动相中乙酸对分离效果的影响

参照大豆皂苷的HPLC分析条件, 进样量不变, 按梯度洗脱程序I(表1)洗脱, 考察含0%、0.004%、0.006%、0.008%、0.01%、0.02%乙酸的不同体积配比的乙腈和纯水作为流动相对制备HPLC色谱行为的影响。

##### 1.4.1.2 三氟乙酸对分离效果的影响

参照大豆皂苷的HPLC分析条件, 进样量不变, 根据乙酸的实验结果, 考察含0.008%、0.01%三氟乙酸的不同体积配比的乙腈和纯水作为流动相对制备HPLC色谱行为的影响。

#### 1.4.2 洗脱程序优化

根据流动相优化的结果, 调整梯度洗脱程序(梯度洗脱程序II和梯度洗脱程序III, 见表3、4), 改变流动相水和乙腈的比例, 改变组分在固定相与流动相中的质量比(即容量因子 $k$ ), 从而调整的各峰的保留时间, 提高分离度。

表3 梯度洗脱程序II

Table 3 Gradient elution program II

时间/min	0	10	80	100	110	120
流动相 A	90	70	50	0	0	90
流动相 B	10	30	50	100	100	10

表4 梯度洗脱程序III

Table 4 Gradient elution program III

时间/min	0	10	80	90	100	110
流动相 A	90	70	50	0	0	90
流动相 B	10	30	50	100	100	10

#### 1.5 皂苷结构鉴定

本研究利用电喷雾飞行时间质谱(electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, ESI-TOF-MS)确定各峰对应皂苷种类。

UPLC分离柱: Acquity C<sub>18</sub> BEH(250mm×10.0mm, 0.17μm); 流动相为A: 0.1%甲酸-水, B: 0.1%甲酸-乙腈, 流速0.3mL/min; 梯度洗脱程序: 0→3min, 10→40% B; 3→8min, 40→70% B; 8→12min, 70→100% B; 12→20min, 100% B; 20→20.5min, 100→10% B; 20.5→22min, 100% B。

电喷雾质谱(ESI<sup>+</sup>/MS): 毛细管电压 3.2kV; 取样锥

电压35V; 二级锥孔电压5V; 离子源温度110℃; 脱溶温度350℃;  $m/z$  100~1500, 脱溶剂气流量600.0L/h。

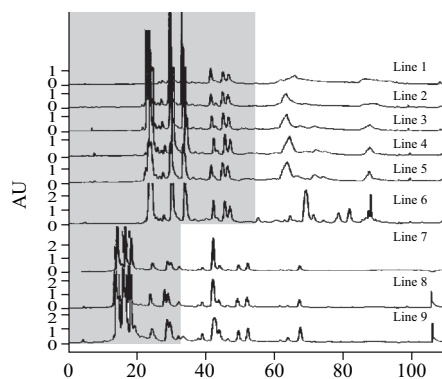
核磁共振进一步验证质谱结果, 400MHz, 温度300K, 采样次数1000~3000次。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆总皂苷的制备

逆流色谱能分离出去粗提物中的大部分大豆异黄酮, 且分离条件温和, DDMP大豆皂苷未降解。经计算, 粗提物的得率为3.92%, 逆流粗分产物得率为23.2%。

### 2.2 HPLC制备色谱条件的确立



阴影部分的峰为大豆异黄酮, 非阴影部分的峰为大豆皂苷。

图3 流动相中酸的种类和含量对峰形的影响

Fig.3 Preparative HPLC chromatographic profiles under the gradient elution with the mobile phase containing acetic acid or trifluoroacetic acid

如图3所示, 阴影部分覆盖的峰为大豆异黄酮, 非阴影部分的峰为大豆皂苷峰。Line 1~Line 5(根据大豆皂苷的光谱特征确定保留时间50~90min的为大豆皂苷), 制备洗脱程序与大豆皂苷HPLC分析检测的程序相同, 流动相乙腈中加入乙酸, 随着乙酸含量的增加, 峰形越来越尖锐, 峰的个数增加。Line 5乙腈中乙酸的含量高达0.02%, 分离度有所改善。

Line 6流动相乙腈中加入0.008%的三氟乙酸, 可明显看出, 对各皂苷单体的分离度有显著改善, 只有保留时间90min左右DDMP类皂苷没有分开。Line 7(保留时间32~75min的为大豆皂苷)通过适当压缩大豆异黄酮的洗脱时间, 延长大豆皂苷的洗脱时间, 使所有的皂苷单体组分分离度、峰形都较理想, 并且使整体的皂苷出峰时间提前。

Line 8在Line 7的基础上缩短了出峰后的清洗时间, 节省了制备的时间成本和12.4%的乙腈用量。Line 9将三氟乙酸的含量提高为0.01%, 峰数目最多, 达到最好的分离效果。将Line 9的分离条件作为分离的最佳条件: 乙腈(含0.01%三氟乙酸)-水为流动相按梯度程序III洗脱, 流速10mL/min。

### 2.3 各峰对应单体种类的确定

按照最佳分离制备条件, 即Line 9, 分离制备结果如

表 5 各峰得率与质谱鉴定结果  
Table 5 The yield of each peak and corresponding mass spectrometric identification

峰序号	得率/%	纯度/%	正离子基峰( <i>m/z</i> )		正离子离子碎片( <i>m/z</i> )				鉴定结果
峰1	1.11	98.71	1395.65 (M+H)	813 M-(glc+3Ac)-ara-glc+H	975 M-(glc+3Ac)-ara+H	1107 M-(glc+3Ac)+H	1233 M-glc+H		Ac3-Ab
峰2	0.58								
峰3	0.49								
峰4	0.45								
峰5	1.03	100	1365.64 (M+H)	259 xyl+3Ac+H	692 M-glc-gal-glcUa-CH <sub>2</sub> OH-O-3Ac+H	813 M-(xyl+3Ac)-ara-glc+H	975 M-(xyl+3Ac)-ara+H		Aa
峰6	0.40								
峰7	19.30	100	1437.65 (M+H)	246 glc+2Ac-H <sub>2</sub> O	33 lglc+4Ac-H <sub>2</sub> O+H	504 glc+4Ac+ara+Na	959 M-glc-gal-glcUa+Na		Ab
峰8	1.88								
峰9	0.30	91.12	1203.58 (M+H)	795 M-(xyl+3Ac)-ara-H <sub>2</sub> O+H	813 M-(xyl+3Ac)-ara+H	945 M-(xyl+3Ac)+H	1185 M-H <sub>2</sub> O+H		Ac
峰10	0.64	85.18	1275.62 (M+H)	504 glc+4Ac+ara+Na	795 M-(glc+4Ac)-ara-H <sub>2</sub> O+H	813 M-(glc+4Ac)-ara+H	945 M-(glc+4Ac)+H		Af
峰11	4.48	99.31	943.53 (M+H)	441 昔元B-H <sub>2</sub> O+H	797 M-rha+H	925 M-H <sub>2</sub> O+H	965 M+Na		Bb
峰12	0.35	91.93	943.53 (M+H)	441 昔元B-H <sub>2</sub> O+H	797 M-rha+H	925 M-H <sub>2</sub> O+H	965 M+Na		Bb
峰13	0.28								
峰14	0.61	92.05	941.50 (M+H)	439 昔元E-H <sub>2</sub> O+H	761 M-rha-H <sub>2</sub> O-O+H	795 M-rha+H	963 M+Na		Be
峰15	0.47	分析时降解	959.52 (M-DDMP+H)	441 昔元B-H <sub>2</sub> O+H	981 M-DDMP+Na				ag
峰16	1.13	分析时降解	943.53 (M-DDMP+H)	327 rha+gal+H	441 昔元B-H <sub>2</sub> O+H	500.3928 rha+gal+glcUa-2H	797 M-DDMP-rha+H		βg
峰17	0.20	分析时降解	797.47 (M-DDMP+H)	427 昔元B-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> +H	779 M-DDMP-rha-H <sub>2</sub> O+H	820 M-DDMP+Na			γg

图4所示，共得到17个大豆皂苷峰，手动接收各峰，因实验重复性极好，多次制备，相同峰合并。

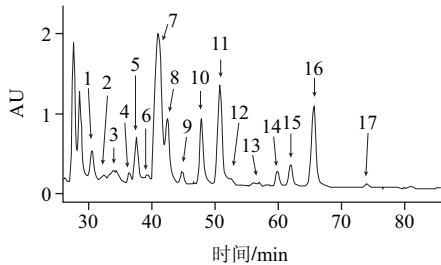


图 4 制备型HPLC分离得到的17个大豆皂苷单体峰

Fig.4 17 peaks of soybean saponins isolated from preparative HPLC

2.3.1 PDA光谱图区分DDMP类大豆皂苷与非DDMP类大豆皂苷

PDA二极管阵列检测器能测定各物质在200~800nm波长范围内的吸收值。根据光谱图中各峰的吸收特性，初步区分大豆异黄酮、非DDMP皂苷和DDMP皂苷。

非DDMP类大豆皂苷在205nm处有吸收信号，且随波长的增加吸收值减小；DDMP类大豆皂苷在205、295nm处有吸收信号，且它们在254nm处几乎没有吸收，295nm以后随波长增大信号减弱，直至近乎于无。而大豆异黄酮在205、254nm和295nm处均有强吸收信号。

1~14号峰为非DDMP大豆皂苷；保留时间小于1号峰的物质为大豆异黄酮；保留时间为64.348、67.815、76.168min的15、16号和17号峰为DDMP皂苷特征峰，从PDA光谱图能够明显看出，如图5所示，210nm以下和295nm处有最大吸收值。

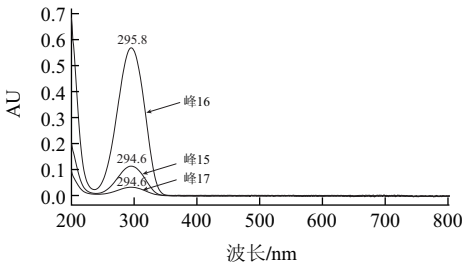


图 5 3个DDMP类大豆皂苷单体的PDA光谱图

Fig.5 PDA scanning spectra of 3 DDMP soybean saponins

2.3.2 质谱核磁共振图谱分析

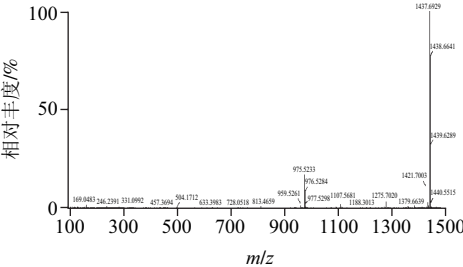
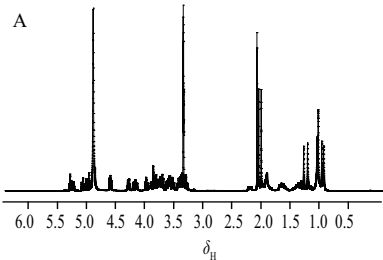


图 6 制备图谱中峰7质谱检测图

Fig.6 MS profile of fraction 7 from preparative HPLC





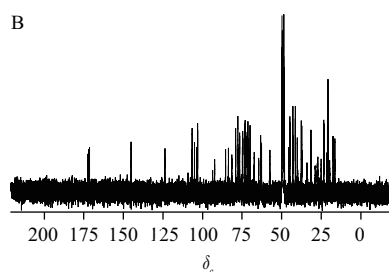


图7 制备图谱中峰7核磁共振<sup>1</sup>H(A)和<sup>13</sup>C谱(B)(溶剂氘代甲醇)  
Fig.7 <sup>13</sup>C-NMR profile of fraction 7 from preparative HPLC

表6 大豆皂苷Ab<sup>13</sup>C-NMR数据  
Table 6 <sup>13</sup>C-NMR spectral data of soybean saponin Ab

苷元A		糖残基					
苷元碳	$\delta$	糖残基碳		$\delta$	糖残基碳		$\delta$
1 (CH <sub>2</sub> )	42.7						
2 (CH <sub>2</sub> )	27.3						
3 (CH)	93.5	3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> - glcUA	C'-1	103.6		C'''-1	109.0
4 (C)	48.0		C'-2	81.4		C'''-2	72.5
5 (CH)	57.3		C'-3	76.6	22- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -	C'''-3	85.3
6 (CH <sub>2</sub> )	19.5		C'-4	71.2	ara	C'''-4	67.2
7 (CH <sub>2</sub> )	37.1		C'-5	76.9		C'''-5	67.3
8 (C)	41.2		C'-6	171.3		C'''-6	
9 (CH)	49.8		C''-1	103.0		C''''-1	104.9
10 (C)	39.7		C''-2	83.5		C''''-2	73.1
11 (CH <sub>2</sub> )	24.2	2'- <i>O</i> - $\beta$ -	C''-3	72.9	3'''- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -	C''''-3	76.7
12 (CH)	123.6	<i>D</i> -gal	C''-4	71.0	glc	C''''-4	69.8
13 (C)	145.1		C''-5	76.4		C''''-5	77.5
14 (C)	45.3		C''-6	62.5		C''''-6	62.9
15 (CH <sub>2</sub> )	28.7						
16 (CH <sub>2</sub> )	28.6		C'''-1	106.5		C''''-Ac1	172.4
17 (C)	40.0		C'''-2	74.7			21.3
18 (CH)	49.0	2''- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glc	C'''-3	72.5		C''''-Ac2	172.4
19 (CH <sub>2</sub> )	49.8		C'''-4	69.7			20.9
20 (C)	31.3		C'''-5	77.5		C''''-Ac3	171.9
21 (CH)	76.6		C'''-6	63.1			20.7
22 (CH)	92.2						171.7
23 (CH <sub>3</sub> )	23.2					C''''-Ac4	20.6
24 (CH <sub>2</sub> )	64.4						
25 (CH <sub>3</sub> )	17.4						
26 (CH <sub>3</sub> )	19.5						
27 (CH <sub>3</sub> )	24.9						
28 (CH <sub>3</sub> )	23.2						
29 (CH <sub>3</sub> )	33.8						
30 (CH <sub>3</sub> )	27.3						

质谱分析结果如表5所示,除DDMP皂苷外,非DDMP大豆皂苷质谱图中的基峰均为分子离子峰,DDMP的基峰为失去DDMP基团后的离子碎片峰。大豆皂苷Ab含有4个乙酰基(Ac),峰1为大豆皂苷Ab失去一个Ac后的Ac3-Ab。一级质谱图中,A组皂苷均有 $m/z$ 为651(苷元A+glcUA+H)、633(苷元A+glcUA-H<sub>2</sub>O+H)和615(苷元A+glcUA-2H<sub>2</sub>O+H)的三个峰;B组和DDMP皂苷为635(苷元B+glcUA+H)、617(苷元B+glcUA-

H<sub>2</sub>O+H)和599(苷元B+glcUA-2H<sub>2</sub>O+H);而E组皂苷(苷元E比苷元B小2)Be为597、615和633;3个DDMP皂苷均有为111(DDMP基团-H<sub>2</sub>O-O+H)等峰。峰11与峰12的质谱图基本相同,为同一种物质,峰14的每个离子碎片较峰11和12的均小2,为大豆皂苷Be,峰11和12为Bb。

在<sup>1</sup>H-NMR高场区出现多个甲基信号是三萜皂苷的最大特征,信号在 $\delta$  0.6~1.5之间,糖的端基质子信号在 $\delta$  4.3~6.0,其余质子信号在 $\delta$  3.2~4.2之间。一维氢谱中信号在 $\delta$  3.0~4.0之间重叠严重,参考价值不及一维碳谱。<sup>13</sup>C-NMR,苷元上双键C<sub>12</sub>和C<sub>13</sub>分别为 $\delta$  122、 $\delta$  143左右;糖端基碳 $\delta$  95~105,CH<sub>2</sub>OH  $\delta$  62左右;葡萄糖醛酸羧基碳和A组大豆皂苷乙酰化的xyl和glc上的乙酰基羰基碳,化学位移为 $\delta$  170~175。

以大豆皂苷Ab为例,图6为制备图谱中峰7的质谱结果,基峰1437为大豆皂苷Ab捕获一个氢离子的分子离子峰,离子碎片峰1421为大豆皂苷Ab失去一个O结合H,1275为Ab失去C<sub>3</sub>位糖链上glc结合H,1107为Ab失去C<sub>22</sub>位糖链上含有4个Ac的glc结合H,975为Ab失去整个C<sub>22</sub>位糖链结合H,其他离子碎片分析见表5,故可以判定制备图谱中的峰7为大豆皂苷Ab。图7为大豆皂苷Ab的核磁共振<sup>1</sup>H谱和<sup>13</sup>C谱图,<sup>1</sup>H-NMR,Ab皂苷<sup>1</sup>H谱中苷元上的7个甲基氢信号为 $\delta$  0.92(3H, s)、0.95(3H, s)、1.01(6H, s)、1.04(3H, s)、1.20(3H, s)、1.26(3H, s)。C<sub>22</sub>位糖链上末端糖上4个乙酰基上的甲基氢信号为 $\delta$  2.06(6H, s)、2.03(3H, s)、1.99(3H, s)。<sup>13</sup>C-NMR,5个端基碳信号为 $\delta$  109.0、106.5、104.9、103.6和103.0。葡萄糖醛酸羧基碳和C<sub>22</sub>糖链末端glc上4个Ac的碳信号为 $\delta$  172.4、172.4、171.9、171.7和171.3。其余各碳化学位移见表6。大豆皂苷Ab的核磁共振分析结果与质谱结果相一致。同理分析其他各峰,结果见表5。

### 3 讨论与结论

大豆皂苷属五环三萜皂苷,它们性质相差较小,利用常规的分离方法,如溶剂萃取等,很难得到高纯度的单体皂苷。本研究以大豆胚芽为原料,逆流色谱初步纯化,去除大部分大豆异黄酮,为成功分离出大豆皂苷单体提供了保证,避免了大豆异黄酮对大豆皂苷单体分离的干扰。

实验最关键的步骤在于制备型HPLC实验条件的确定。HPLC制备条件与制备的大豆皂苷单体的纯度有直接关系,在确定样品的浓度以及进样量的情况下,流动相中的酸种类及含量对制备图谱的峰形影响很大。未加酸时,由于大豆皂苷C<sub>3</sub>位上葡萄糖醛酸的羧基处于解离状态,呈离子状态的大豆皂苷与制备柱填料硅胶上的残余羟基作用,保留弱,峰形很差。随着乙酸量的增加,

流动相的pH值逐渐接近大豆皂苷的解离指数 $pK_a$ ，抑制其解离，保留逐渐增强，峰形得到改善。因乙酸为弱酸，达到理想的pH值需要很大的添加量，但由于其沸点高(117.9℃)，旋转蒸发等后续处理不易除去。为避免对单体造成不必要的影响，选用酸性更强的三氟乙酸，此外三氟乙酸与大豆皂苷的离子对效应更使得皂苷不易电离，有效改善峰形，克服峰展宽和拖尾问题，使分离度大大提高。最终表明，乙腈(含0.01%三氟乙酸)-水为流动相按梯度程序III洗脱，流速10mL/min为最优条件，得到17个大豆皂苷单体峰，其中大豆皂苷Aa、Ab、Bb的纯度达到99%以上。其中由于各单体在大豆胚芽中的含量不一，得率差异较大。

目前国内外只有两三种大豆皂苷的标准样品出售，有学者采用齐墩果酸标准样品作为标样来研究，但只能用于总体皂苷定量分析，并且不能对一种皂苷单体进行研究。国内对皂苷的分多为总皂苷分离<sup>[14]</sup>，或按类别分离<sup>[15-17]</sup>，很难见有大豆皂苷单体的分离或分离种类仅为几种，国外Decroos等<sup>[18]</sup>对大豆皂苷的单体分离研究较为深入，但分离效果不够理想。本实验着重研究了大豆皂苷的单体制备，制备峰形好，分离度高，鉴定了10种大豆皂苷单体，包括很难制备得到的DDMP类皂苷，具有极大的应用前景。

#### 参考文献：

- [1] SUN Hongxiang, XIE Yong, YE Yiping. Advances in saponin-based adjuvants[J]. Vaccine, 2009, 27(12): 1787-1796.
- [2] 杜丽洁. 大豆皂甙对高脂血症大鼠血脂及抗血栓作用的影响研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2011.
- [3] 郑奇志, 吴家祥, 肖纫秋, 等. 大豆皂甙对胰岛素下的平滑肌细胞脂质过氧化反应的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1998, 24(5): 455-457.
- [4] 靖雪妍. 大豆复合物和大豆皂苷的免疫调节作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [5] 袁晓洁. 大豆异黄酮和大豆皂苷缓解体力疲劳作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [6] YOSHIKI Y, OKUBO K. Active oxygen scavenging activity of DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(8): 1556-1557.
- [7] 马利刚. 大豆异黄酮和大豆皂苷对酒精肝损伤的干预作用[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [8] BERHOW M A, WAGNER E D, VAUGHN S F, et al. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins[J]. Mutation Research, 2000, 448(1): 11-22.
- [9] SHIRAIWA M. Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed[J]. Agri Biol Chem, 1991, 55(2): 315-322.
- [10] SHIRAIWA M. Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed[J]. Agri Biol Chem, 1991, 55(4): 911-917.
- [11] 王东冬. 大豆皂苷的提取纯化与分离检测[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [12] 吴永慧, 贾竞夫, 唐波, 等. 高速逆流色谱分离大豆皂苷和异黄酮[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(12): 24-27; 31.
- [13] DECROOS K, VINCKEN J P, HENG L, et al. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-di-hydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed phase high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1072(2): 185-193.
- [14] 马杰. 高含量大豆皂苷制备和分离工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [15] 金米聪, 龚文杰, 范建中. 大豆胚芽中大豆皂苷Ba、Bb和Bb'的HPLC-MS法测定研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 410-412; 436.
- [16] 全吉淑, 尹学哲, 田中真实, 等. 大豆胚轴中B类、E类和DDMP大豆皂甙的分离纯化[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 107-109.
- [17] 徐龙权, 田晶. 大豆皂苷II的提取及HPLC-MS分析[J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(3): 178-180.
- [18] DECROOS K, VINCKEN J P, van KONINGSVELD G A, et al. Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls[J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 324-333.