

# 分光光度法测定大豆总皂甙含量\*

滕燕平 张玉梅 刘颖 崔洪斌

(哈尔滨医科大学公卫学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:** 为建立一种测定大豆总皂甙含量的新方法, 以齐墩果酸作为标准品, 采用分光光度法, 配合薄层分析结果测定了经大孔树脂吸附法、正丁醇再分配法和混合法精制纯化后的 3 种大豆总皂甙试样含量。本测定方法的平均回收率为 100.58%, *RSD* 为 3.34%, 方法简便, 重现性好, 可作为大豆皂甙含量检测的一种手段。

**关键词:** 分光光度法 皂甙 食品分析

中图分类号: R15, O657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004—8456(2000)04—0010—04

大豆皂甙(Soybean Saponins, 简称 SS) 是一类从豆科植物大豆中分离提取的由齐墩果烯型三萜甙元与低聚糖连接而成的三萜皂甙。目前已知的大豆皂甙主要有 2 组 5 种, 即 A 组(双糖链皂甙) 2 种 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B 组(单糖链皂甙) 3 种 I、II、III。大豆皂甙具有较强的生物学活性, 如降脂减肥、抗过氧化损伤、抗病毒、免疫调节、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等。<sup>[1]</sup> 关于大豆皂甙的提取、分离及精制在日本研究得较多, 主要是采用乙醇提取物经水和正丁醇两相分配, 液-液萃取法纯化制得, 制得物中因含糖较多而影响其纯度。对于大豆皂甙含量的检测日本采用 HPLC 法, 用大豆皂甙 I 作为标准品, 计算繁琐, 操作不便, 且标准品大豆皂甙 I 来源受限,<sup>[2]</sup> 很大程度地限制了开发应用研究的推进。本文采用大豆皂甙的甙元类似物齐墩果酸(Oleanolic Acid, 简称 OA) 作为标准品, 将分光光度法配合薄层色谱分析的结果用于确定大豆总皂甙的含量,<sup>[3, 4]</sup> 拟建立一种测定大豆总皂甙含量的新方法。

## 1 材料与方方法

**1.1 仪器与试剂** 721 分光光度仪, 上海第三分析仪器厂; 电热恒温水浴锅, 北京长源实验设备厂; 齐墩果酸标准品和人参皂甙标准品, 中国药品生物制品检定所提供; 大豆皂甙 I 标准品, 日本静岗县立大学富田薰教授惠赠; CMC 及硅胶 G, 青岛海洋化工集团生产; 98% 浓硫酸, 哈尔滨化工厂生产, 稀释成 10% 溶液待用; 显色剂: 氯仿+ 甲醇+ 水(65+ 35+ 10) 混均静置取上层; 氯仿及甲醇, 上海化工厂生产, 分析纯。

**1.2 测定试样** 试样 1 为本研究中经大孔树脂吸附法纯化的大豆皂甙制得物, 棕黄色粉末。试样 2 正丁醇再分配法纯化制得的大豆总皂甙提取物, 黄色粉末。试样 3 将试样 2 按试样 1 的方法进一步纯化处理的大豆皂甙制得物, 为浅黄色片状结晶。以上 3 组试样皆为本研究室自制所得。

### 1.3 校正曲线的制备

**标准溶液的配制** 精密称取齐墩果酸标准品 27.60 mg, 加甲醇溶解, 定容至 100 mL, 得浓度为 0.276 μg/μL 的标准溶液。

**校正曲线的制备** 精密吸取齐墩果酸标准溶液 100、200、300、400、500、600 μL 于具塞试管中, 70℃水浴上蒸干, 于每个试管中加新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 置 60℃水浴上加热 15 min, 流水冷却, 加冰醋酸 5 mL, 摇匀, 以分光光度计在 560 nm 波长处测量吸光度值 *A*, 将结果作统计分析得到回归方程。

**1.4 精密度试验** 连续测定 200 μL 齐墩果酸标准品溶液, 方法同上, 共 5 次, 得出 *RSD*。

### 1.5 试样中大豆皂甙含量的测定

**试样溶液的制备** 精密称取试样 1、试样 2 及试样 3, 分别为 31.2、26.6、27.2 mg, 甲醇溶解后分别定容于 100 mL 容量瓶中, 即得浓度分别为 0.312、0.266、0.272 μg/μL 的试样溶液。

\* 本研究是黑龙江省科委 1996 年攻关课题的一部分。

试样的薄层色谱分析<sup>[4]</sup> 把提取的试样溶液,人参皂甙的 90% 醇提取物的甲醇溶液及齐墩果酸标准液点于 CMC- 硅胶 G(0.3%) 薄层板上,进行分析。展开剂: CHCl<sub>3</sub>- MeOH- H<sub>2</sub>O(65+ 35+ 10 上层),显色剂: 10% 的硫酸溶液,110℃加热 10 min。

大豆皂甙与齐墩果酸量比换算系数的推算。

试样的测定 精密吸取 300 μL 试样 1,试样 2 和试样 3 溶液,按校正曲线制备项下进行操作,测得 A 值,每个试样各取 3 份测定。

1.6 加样回收率试验 精密吸取试样 1 溶液 200 μL 于 3 只具塞试管中,加入精密吸取的齐墩果酸标准液 100 μL,按校正曲线制备项下操作,测得在 560 nm 波长处的吸光度 A 值,同时作试样 1 的 300、400 μL 各 3 份,同上操作;计算回收率及 RSD。

2 结果

2.1 齐墩果酸校正曲线的测定 结果见表 1。

表 1 齐墩果酸校正曲线的测定结果

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	
取样量 μL	0	100	200	300	400	500	600	700	
齐墩果酸量 μg	0	27.6	55.2	82.8	110.4	138.0	165.6	193.2	x
A 值	空白	0.204	0.376	0.634	0.828	1.025	1.175	1.360	y

回归方程为:  $y = 0.02073 + 0.00706x$   $t < 0.05$  相关系数  $r = 0.998$

2.2 精密度试验 结果为 3.34%。

2.3 试样中大豆皂甙含量的测定

2.3.1 试样的薄层色谱分析结果见图 1。

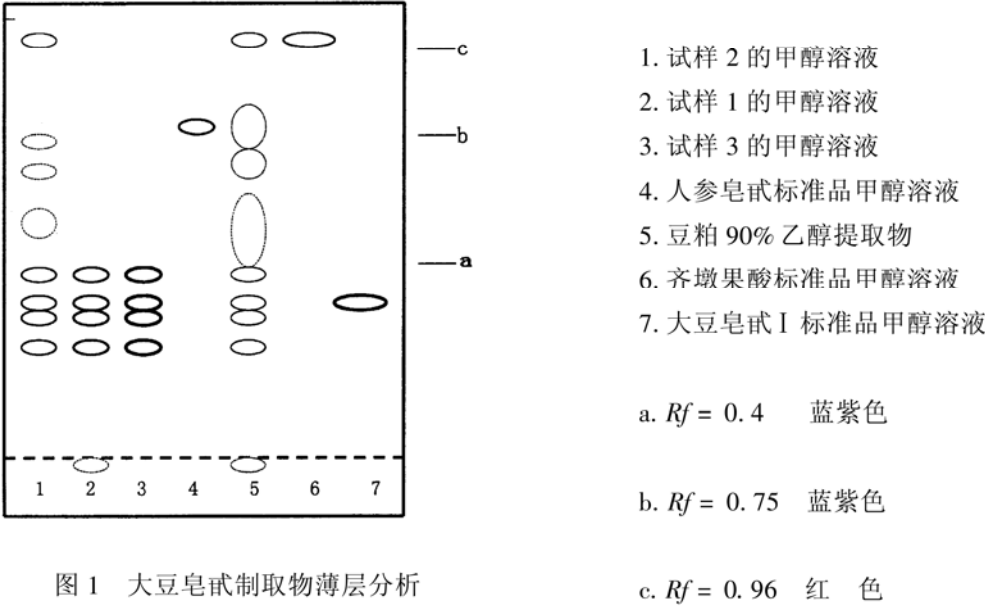


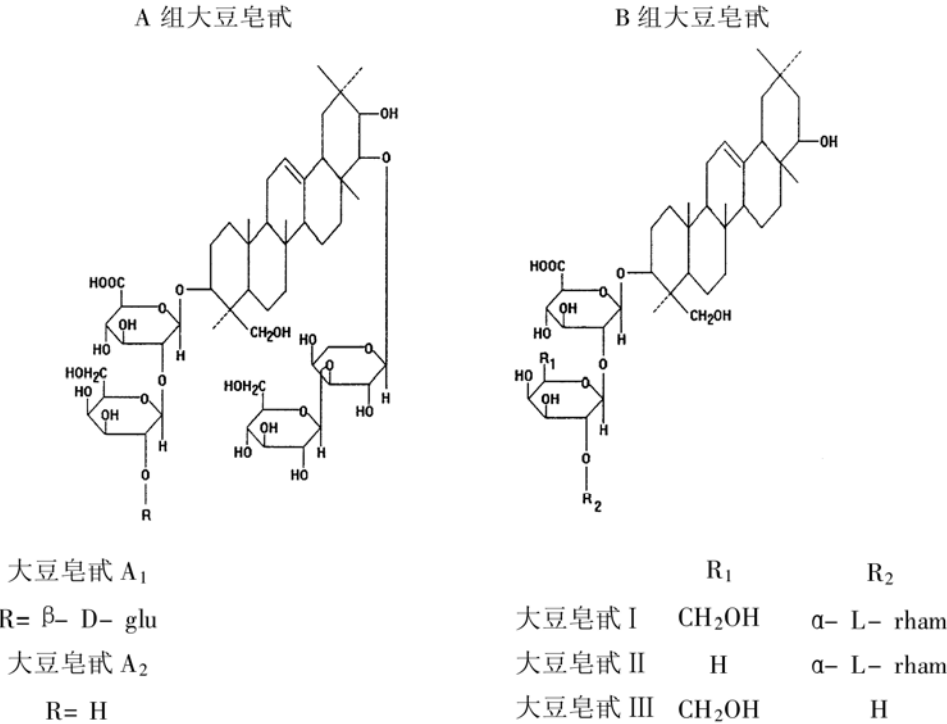
图 1 大豆皂甙制取物薄层分析

从薄层色谱分析结果中可以看出: 试样 1 和试样 3 的斑点在大极性展开系统(即正向色谱)中  $R_f$  值均小于 0.4, 且与大豆皂甙 I 在相同  $R_f$  值处有相同颜色斑点, 但试样 1 与混合法制得的试样 3 比较, 原点有死吸附, 且呈棕色, 表明大孔树脂法在除色素方面弱于水与正丁醇两相分配法。试样 1 与试样 2 相比较, 斑点清晰, 且  $R_f > 0.4$  以上没有其它斑点, 提示采用大孔树脂法, 控制一定的条件, 不仅可以较好地除去糖类杂质, 而且可以除去脂溶性杂质。所以结果中皂甙纯度较高, 而采用混合法制得的精制皂甙的纯度则更为理想。

在本研究的薄层分析中有 3 个参照标准品: (1) 齐墩果酸、(2) 大豆皂甙 I 和(3) 人参皂甙标准品, 其中(1)

是为了定性排除试样中大豆皂甙分解出齐墩果酸造成的干扰;(2)可用于大豆皂甙的直接定性;而(3)人参皂甙为小极性皂甙且标准品易得,除在本展开系中作间接参照外,还可在没有大豆皂甙标准品的情况时,以本条件下薄层斑块的显色和  $R_f$  值( $0.75 > 0.4$ )来给大豆皂甙定性。

2.3.2 大豆皂甙与齐墩果酸量比换算系数的推算<sup>[5,6]</sup>



齐墩果酸的分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, M= 456; A 型皂甙包括两种 A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub>, 分子量分别为 1342 和 1168; B 型皂甙包括 3 种 I , II 和 III, 分子量分别为 1008, 978 和 804。

据文献报道大豆总皂甙中 A 型占 70%, B 型占 30%,<sup>[5]</sup>按含量加权分析推测大豆皂甙的平均分子量为 1157.5, 与齐墩果酸分子量 456 对比, 二者理论上的量比系数为 2.54, 考虑到在提取过程中失糖和与前期研究中试样 2 的高压液相色谱测定结果的对比分析,<sup>[2,6]</sup>所以将量比系数定为 2.2 是适宜的。故在薄层分析定性的基础上, 大豆总皂甙含量的计算公式为:

$$\text{大豆总皂甙含量}(\text{mg}) = \text{试样中齐墩果酸相当量}(\text{mg}) \times 2.2。$$

2.3.3 3 种皂甙试样含量的测定结果见表 2。

表 2 试样中大豆皂甙的含量测定结果

	试样 1			试样 2			试样 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	0.360	0.359	0.364	0.212	0.213	0.208	0.350	0.343	0.345
A <sup>-</sup>		0.361			0.211			0.346	
OA 相当量 μg		38.61			25.25			42.45	
大豆皂甙含量 %		84.95			55.56			93.39	

2.4 加样回收率结果 见表 3。

3 讨论 采用 HPLC 法, 以大豆皂甙某一单体成分作为标准品测定大豆皂甙含量的方法比较简便, 但在国内, 大豆皂甙的单体成分不易获得, 加之国内大部分厂家尚未配备高效液相色谱仪, 因此需要一种操作简便、标准品易于获得的大豆皂甙含量检测方法。

本文报导的检测方法是在大豆皂甙开发应用研究中逐步提出并完善的, 在研究中我们借鉴了中药化学分析中人参皂甙及柴胡皂甙的定量分析方法, 将分光光度法配合薄层色谱分析的结果用于大豆总皂甙含量

的测定,并从准确度和精密度两方面对本测定方法的可靠性进行了验证。结果表明本方法具有操作简便,易于推广;重现性好,精密度高以及可用于产品质量控制及监测等特点。

表 3 加样回收率

编 号	低剂量 200 $\mu$ L SS			中剂量 300 $\mu$ L SS			高剂量 400 $\mu$ L SS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
试样中 SS 量 $\mu$ g	62.88	62.88	62.88	94.32	94.32	94.32	125.76	125.76	125.76
相当 OA $\mu$ g	28.58	28.58	28.58	42.87	42.87	42.87	57.16	57.16	57.16
加入 OA 量 $\mu$ g	27.60	27.60	27.60	41.40	41.40	41.40	55.20	55.20	55.20
测得 A 值	0.294	0.301	0.291	0.623	0.608	0.612	0.811	0.820	0.808
测得相当于 OA 量	56.14	57.14	55.71	85.30	83.18	83.74	111.93	113.21	111.50
回收率 %	99.86	103.48	98.30	102.48	97.36	98.72	99.22	101.54	98.44
平均 RSD %	1.91								

采用皂甙的甙元或甙元类似物测定皂甙的含量已多有报道,如采用齐墩果酸作标准品检测柴胡皂甙的含量,还有用人参二醇、人参三醇作标准品检测人参及其制品中人参皂甙的含量,也多参照了一个量比系数,在本文中,我们进行了大豆总皂甙结构与丰度加权分析以推算确定了齐墩果酸与大豆皂甙的理论量比换算系数,同时参照同一试样的 HPLC 测定结果加以验证分析(本方法与 HPLC 法测算的试样 2 的大豆皂甙含量相仿,都约为 56%,证明本法与经典的 HPLC 法相比测定结果是可靠的),最后将系数确定为 2.2,大豆总皂甙这一类化合物组成的复杂性决定了本系数虽然不非常精确,但是仍具有很大的指导意义。

本检测方法设立的薄层色谱分析为一参照指标,其意义在于作为本检测方法的定性保障。因为本方法的建立是与本课题大豆总皂甙纯化精制同时进行的,所以含量测定一定要建立在定性的基础之上。同时这一环节不仅和准确度、精密度一样是本方法可靠性的保证,并且对在实际应用中防止造假也有很大意义。

参考文献:

[1] 王章存. 大孔吸附树脂在中草药成分分离中的应用[J]. 中草药, 1995, 26(11): 607~ 610  
[2] 陈近利. 大豆皂甙提取技术及开发应用研究[D]. 哈尔滨医科大学硕士学位论文, 1998  
[3] 孟宪抒主编. 中草药成份分析[M]. 北京: 科学出版社, 1990  
[4] 刘训红编. 中药材薄层色谱鉴别[M]. 天津: 天津科技出版社, 1990  
[5] Kitagawa I, et al. Histochemistry V soyasaponins in soybeans[J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(9): 3829~ 3833  
[6] Philip A. Ireland, et al. Saponins content of soya and some commercial soya products by means of HPLC of the sapogenins [J]. J Sci Food Agric, 1986, 37: 694~ 698

**Determination of soybean saponins by the method of spectrophotometry/ Teng Yanping, Zhang Yumei, Liu Ying, et al. // Chinese Journal of Food Hygiene. – 2000, 12(4): ~**

A method was developed for rapid determination of soybean saponins, the oleanolic acid was taken as the reference standard. The samples were determined by spectrophotometry, the soybean saponins were extracted by different method (amberlyst adsorption, n- butanol deallocation and synthesis method) and the content was 84.95, 55.56, 93.39 percent respectively. The recovery rate was 100.58% and the relative standard deviation 3.34%. It is concluded that this method is suitable for analysis of saponins in soybean.

**Author's addresss** Teng Yanping, Harbin Medical University, 150001 PRC

**Ke words** Spectrophotometry      SAPONINS      Food Analysis