

## 野生大豆皂苷的提取与薄层色谱分析

张倩, 刘代成

(山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014)

**摘要:** 皂苷具有多种药理作用, 对野生大豆中各类皂苷的定量分析是研究野生大豆皂苷药理作用的基础。利用索氏提取器以甲醇热回流提取野生大豆中的皂苷, 结合理化反应进行鉴别, 以齐墩果酸作为对照品进行薄层层析, 通过薄层扫描测定皂苷含量。结果表明: 野生大豆皂苷 1 ~ 5  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好, 平均回收率为 98.98%, RSD 为 0.41%, 薄层层析斑点清晰且分离良好, 计算得总皂苷在野生大豆脱脂粕中的含量为 1.91%, 远高于在栽培大豆脱脂粕中的含量。该方法简便准确, 结果稳定, 可用于野生大豆皂苷的分析。

**关键词:** 野生大豆; 皂苷; 薄层色谱

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)05-0857-04

## Extraction and Thin Layer Chromatography of Saponins from Wild Soybean

ZHANG Qian, LIU Dai-cheng

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong, China)

**Abstract:** Saponins have many pharmacological actions. The determination of wild soybean saponins contents is the basis of the pharmacological experiments. In this experiment, wild soybean saponins were extracted by Soxhlet extractor with hot circulatory methanol, identified by physical-chemical reactions and the thin layer chromatography (TLC) with the oleanic acid taken as reference standard, and then the TLC scanner was used to determine the content of the saponins. The linear range of wild soybean saponins was from 1 to 5  $\mu\text{g}$ ; the average recovery was 98.98% with RSD of 0.41%. The TLC identification was distinct and the spots were clear. The content of saponins in defatted wild soybean was 1.91%, which was significantly higher than that in defatted cultivated soybean. The method is simple and accurate with stable outcomes, and suitable for analysis of wild soybean saponins.

**Key words:** Wild soybean; Saponins; Thin layer chromatography (TLC)

野生大豆 (*Glycine soja*) 与栽培大豆同属豆科大豆属植物, 在国内主要分布于东北、内蒙古、华北、华东及中南地区。野生大豆种子呈黑色肾形, 是中药材, 有强壮利尿、平肝敛汗的功效<sup>[1-2]</sup>。皂苷具有抗糖尿病、降脂减肥、抗氧化、抗病毒、抗癌<sup>[3]</sup>等众多有益的生理功能, 是野生大豆中重要的功能性成分, 然而国内外对野生大豆皂苷的相关报道很少。该文对野生大豆皂苷进行了提取、鉴别及含量测定等工作, 建立了简便可靠的试验方法, 为野生大豆皂苷的研究提供了依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器和试剂

CAMAG TLC SANNER 3 (CAMAG Switzerland); Quantity One (BIO-RAD); JY02G 型凝胶成像仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); 索氏提取器; 齐墩果酸 ( $\geq 98\%$ , 由山东省分析测试中心提供); 甲醇为一级色谱纯, 其它试剂均为分析纯。

#### 1.2 试样制备

野生大豆磨碎去皮, 用正己烷 (正己烷: 野生大豆 = 6:1) 常温下震荡提取 30 min, 重复 3 次, 除去油脂。称取脱脂豆粕 10 g 置于索氏提取器中, 加 140 mL 甲醇, 80℃ 连续回流提取 11 h 至提取器中溶液为无色澄清。溶液 50℃ 下减压旋蒸浓缩至 30 mL, 趁热倒入烧杯中, 冷后加 90 mL 乙醚, 充分搅拌, 冷置 18 h, 倾出上清液, 沉淀加热溶于 30 mL 甲醇中, 滤去不溶物, 再次加入 90 mL 乙醚, 充分搅拌, 冷置 18 h 后倾出上清液, 50℃ 下干燥至恒重。重量法测得 5 次提取试验所得粗皂苷平均含量为 3.76%, RSD 为 1.46%。精密称取 200 mg 上述野生大豆粗皂苷, 加 20 mL 甲醇溶解, 得到浓度为 10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液。

#### 1.3 标样制备

精密称取 10 mg 齐墩果酸<sup>[6]</sup>对照品, 加甲醇溶解定容至 10 mL, 制成浓度为 1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照液。

收稿日期: 2011-06-19

第一作者简介: 张倩 (1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为水产品加工与贮藏工程。E-mail: zhangqian1115@163.com。

通讯作者: 刘代成 (1955-), 男, 教授, 研究方向为动物性食品研究。E-mail: liudch@sdnu.edu.cn。

### 1.4 薄层层析

硅胶 G 薄板 (20 cm × 10 cm), 110℃ 活化 40 min, 展开系统为三氯甲烷: 甲醇: 水 (32: 18: 5), 10℃ 以下静置 12 h 后的下层溶液, 4℃ 冰箱中预平衡 20 min, 点样量 1 μL, 4℃ 上行展开, 展距 18 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 110℃ 烘干至紫红色斑点清晰。若不喷硫酸乙醇显色, 晾干后 1 h 用凝胶成像仪观察荧光光斑<sup>[4]</sup>, 用 Quantity One 拍照。

### 1.5 薄层扫描

扫描速度为 100 mm · s<sup>-1</sup>, 数据分辨率为 50 μm · step<sup>-1</sup>, 照射灯为 D<sub>2</sub> 灯, 扫描波长为 200 nm, 扫描 Y 范围 10.0 ~ 195.0 mm。

### 1.6 理化反应

将供试液薄层层析展开, 晾干后紫外灯下刮板分离各荧光斑点, 分别用甲醇提取、浓缩; 刮取无荧光的硅胶, 按同样方法用甲醇处理, 作为空白对照液。取上述 10 种溶液适量, 分别滴于白色滤纸上, 待干后各滴加 1 滴三氯乙酸, 置烘箱 100℃ 加热, 观察颜色变化<sup>[5]</sup>; 分别滴于白色滤纸上, 待干后各滴加 1 滴氯仿-硫酸混合液, 自然晾干后置紫外灯 (365 nm) 下观察荧光光斑<sup>[6]</sup>; 取刮板后未经甲醇处理的 10 种硅胶 G 粉末适量, 分别溶于冰乙酸中, 各滴加 3 滴乙酰氯, 置烘箱中 100℃ 加热, 观察颜色变化<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 展开系统的确定

采用三氯甲烷-甲醇-水以相关配比作为展开系统。结果表明, 三氯甲烷: 甲醇: 水 (32: 18: 5), 10℃ 以下静置 12 h 后的下层溶液展开效果最好, 斑点清晰且分离度高。发现齐墩果酸对照品色谱只显示 1 个紫红色斑点, 与供试品色谱的前沿对应, 紫外灯 (365 nm) 下显示相同荧光。而供试品色谱中还存在另外 8 个明显的紫红色斑点, 且在紫外灯下同样显示荧光。将 9 个斑点按比移值从小到大的顺序 ( $R_f = 0.04, 0.12, 0.23, 0.30, 0.46, 0.58,$

$0.64, 0.68, 0.80$ ) 编号 1 ~ 9 号, 其中与齐墩果酸对照品相对应的前沿带为 9 号, 供试品层析板在紫外灯 (365 nm) 下拍照如图 1。

### 2.2 扫描速度、数据分辨率和扫描波长的确定

在栽培大豆皂苷的最大吸收波长 205 nm<sup>[7]</sup> 下用各扫描速度-数据分辨率组合对供试品扫描。结果表明, 扫描速度为 100 mm · s<sup>-1</sup>, 数据分辨率为 50 μm · step<sup>-1</sup> 时, 吸收峰清晰, 基线低。在此条件下对 9 种组分及齐墩果酸对照品进行全波长扫描, 测得最大吸收波长为 200 nm, 认为是由于野生大豆皂苷与栽培大豆皂苷的差异所致。



图 1 野生大豆皂苷薄层层析图

Fig. 1 TLC chromatogram of wild soybean saponin

### 2.3 定性

三氯乙酸处理后, 1, 4 ~ 9 号试液生成粉红色斑点渐变为紫色, 2, 3 号试液变色不明显, 空白对照不变色; 氯仿-硫酸处理后, 1 ~ 5, 7, 9 号试液显示绿色荧光斑点, 6, 8 号试液显示蓝色荧光光斑, 空白对照不显荧光; 冰醋酸-乙酰氯处理后, 1 号变为棕红色, 4 ~ 8 号为粉红至紫红色, 2, 3, 9 号变色不明显, 空白对照不变色 (表 1), 认为 9 个组分均为皂苷。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取 1, 2, 3, 4, 5 μL 齐墩果酸对照液及 3 份 1 μL 供试液交叉点样于同一块硅胶 G 板上, 按条件展开, 晾干, 1 h 时薄层扫描峰面积积分值, 以齐墩果酸对照品的质量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 由薄层扫描仪直接得到回归方程  $Y =$

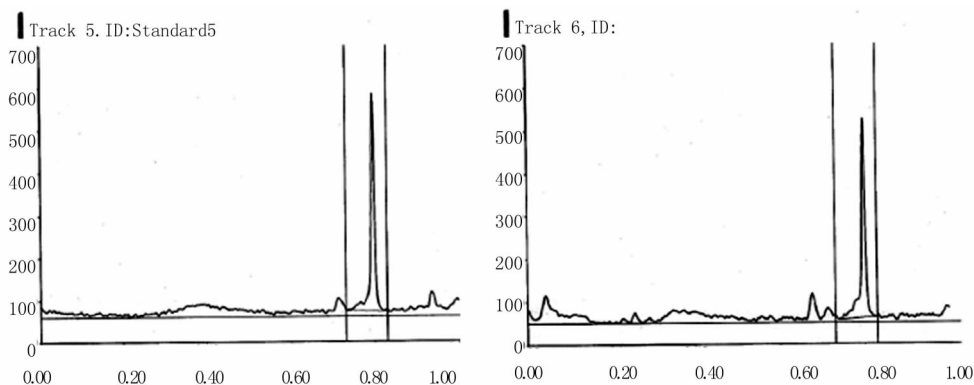


图 2 齐墩果酸对照液 5 μL 和野生大豆皂苷供试液 1 μL 薄层扫描图

Fig. 2 TLC chromatogram of 5 μL oleanolic acid and 1 μL wild soybean saponins

12735. 0255 + 1634. 2724 $X$ ,  $r = 0.99997$ ,  $x = 2.585 \mu\text{g}$ ,  $\text{RSD} = 0.706\%$ ,  $n = 3$ 。结果表明,齐墩果酸在  $1 \sim 5 \mu\text{g}$  线性良好,供试液中前沿部分的皂苷含量为  $2.585 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。齐墩果酸对照液  $5 \mu\text{L}$ 和野生大豆皂苷供试液  $1 \mu\text{L}$ 的薄层扫描结果如图 2。其中野生大豆皂苷吸收峰个数明显多于齐

墩果酸,认为野生大豆皂苷成分复杂,若仅采用传统齐墩果酸标定,结果有误差,所以该试验结合皂苷自身理化特性对提取物中结构不同于齐墩果酸的成分进行定性鉴别,与传统方法相比测定结果更加准确。

表 1 理化反应结果  
Table 1 Result of the physical-chemical reactions

处理 Treatment	比移值 Rf									空白 CK
	0.04	0.12	0.23	0.30	0.46	0.58	0.64	0.68	0.80	
三氯乙酸 Acetocaustin	变紫色	—	—	变紫色	变紫色	变紫色	变紫色	变紫色	变紫色	—
氯仿-硫酸 Chloroform and sulphuric acid	绿色荧光	绿色荧光	绿色荧光	绿色荧光	绿色荧光	—	绿色荧光	—	绿色荧光	—
冰醋酸-乙酰氯 Glacial acetic acid and acetyl chloride	变棕红色	—	—	变粉红色	变粉红色	变粉红色	变粉红色	变粉红色	—	—

2.5 精密度试验

精密吸取供试液,在同一块硅胶 G 板上水平点样 5 次,每次  $1 \mu\text{L}$ ,层析,扫描测定各部分峰面积积分值,结果见表 2,  $\text{RSD}$  均小于  $3\%$ ,表明野生大豆皂苷薄层层析具有较好的精密度。

2.6 重复性试验

精密吸取供试液,在 5 块硅胶 G 板上分别点样  $1 \mu\text{L}$ ,层析,扫描测定各部分峰面积积分值,结果见表 2,  $\text{RSD}$  均小于  $3\%$ ,表明野生大豆皂苷薄层层析重复性较好。

2.7 稳定性试验

吸取供试液,点样,层析,晾干后测定第 1,2,3 h 时各部分峰面积积分值,结果见表 2,  $\text{RSD}$  均小于  $3\%$ ,表明野生大豆皂苷薄层层析后  $1 \sim 3 \text{ h}$  内测定结果均较稳定。

2.8 回收率试验

吸取已知含量的供试液 3 份,各  $2 \text{ mL}$ ,分别加入齐墩果酸标准品 2,3,4 mg,充分溶解后按条件进

行薄层扫描,记录前沿部分峰值面积积分值,结果见表 3,  $\text{RSD}$  小于  $1\%$ ,符合分析要求。

表 2 野生大豆皂苷的精密性、重复性及稳定性试验结果  
Table 2 Accuracy, repeatability and stability of wild soybean saponins

比移值 Rf	精密性 Accuracy	重复性 Repeatability	稳定性 Stability
	$\text{RSD}\% (n = 5)$	$\text{RSD}\% (n = 5)$	$\text{RSD}\% (1 \sim 3 \text{ h})$
0.04	1.0221	0.9418	1.6645
0.12	0.8075	0.8633	1.5152
0.23	2.2104	0.6721	1.3114
0.30	1.6803	2.5085	1.7735
0.46	1.8838	1.3524	2.4608
0.58	2.7097	1.6715	1.5795
0.64	2.1248	1.0492	1.5317
0.68	0.9952	0.7697	1.0284
0.80	0.9753	0.4406	1.4547

表 3 野生大豆皂苷回收率试验数据  
Table 3 Recovery of wild soybean saponins

供试液中相应部分皂苷含量 Saponins content in sample/ $\mu\text{g}$	加入齐墩果酸量 Oleanolic acid addition/ $\mu\text{g}$	测得量 Determined content/ $\mu\text{g}$	回收率 Recovery/ $\%$	平均回收率 Average recovery/ $\%$	$\text{RSD}/\%$
2.585	1.0	3.55	99.07	98.98	0.4068
2.585	1.5	4.06	99.33		
2.585	2.0	4.52	98.54		

## 2.9 样品测定

按上述色谱条件对样品进行测定,9号前沿部分由齐墩果酸标定,根据1~8部分与前沿部分含量的比例关系即可得到各部分的含量,计算得到1~9号百分含量及提取物中各部分的含量,结果见表4,脱脂粕中总皂苷含量为1.91%。

表4 野生大豆皂苷各部分含量

Table 4 Saponins content of wild soybean saponins

比移值 Rf	各部分百分含量 Percentage composition/%	提取物中各 部分含量 Content/mg · g <sup>-1</sup>	提取物中各 部分含量之和 Total content/mg · g <sup>-1</sup>
0.04	5.82	29.57	508.36
0.12	4.43	22.51	
0.23	4.34	22.05	
0.30	9.98	50.73	
0.46	4.73	24.05	
0.58	3.74	19.01	
0.64	7.55	38.36	
0.68	8.58	43.61	
0.80	50.85	258.48	

## 3 讨 论

建立了稳定的野生大豆皂苷展开系统,三氯甲烷:甲醇:水(32:18:5)下层溶液能较好地分离野生大豆皂苷,斑点清晰且分离良好。其展开过程必须在10℃以下完成,否则会影响分离效果。试验证明野生大豆皂苷至少含有9个部分,用薄层扫描仪测得野生大豆皂苷各部分的最大吸收波长为200 nm,在此波长下测得野生大豆皂苷各部分的含量,结果稳定。

试验测得野生大豆脱脂粕中总皂苷含量为1.91%,而栽培大豆脱脂粕中总皂苷含量仅为1.03%<sup>[8]</sup>,某些可达到1.29%<sup>[9]</sup>,可知野生大豆中皂苷含量远高于栽培大豆。测定大豆皂苷的传统方法多以齐墩果酸作为标准品,但野生大豆皂苷成分复杂,采用齐墩果酸标定法结果误差较大。该试

验利用薄层层析的方法,结合皂苷自身理化特性对其进行定性鉴别,与传统方法相比更加准确,并证明了提取方法的可靠性。采用薄层扫描法测定含量,其精密度、重复性、稳定性、回收效果均较好,因此该方法可作为野生大豆皂苷实验室测定及工业生产的可靠方法。

## 参考文献

- [1] 黄贤校,谷克仁.大豆皂甙研究进展[J].粮食与油脂,2006(3):9-12. (Huang X X, Gu K R. Recent progress of soyasaponin research[J]. Cereals & Oils, 2006(3):9-12.)
- [2] 陈汉斌,郑亦津,李法曾.山东植物志[M].青岛:青岛出版社,1997:408-409. (Chen H B, Zheng Y J, Li F Z. Flora of Shandong [M]. Qingdao: Qingdao Press, 1997:408-409.)
- [3] 樊守金,赵尊田.山东野生蔬菜志[M].济南:山东科学技术出版社,1996:68-69. (Fan S J, Zhao Z T. Wild vegetable of Shandong [M]. Jinan: Shandong Science & Technology Press, 1996:68-69.)
- [4] 滕燕平,张玉梅,刘颖,等.分光光度法测定大豆总皂甙含量[J].中国食品卫生杂志,2000,12(4):10-13. (Teng Y P, Zhang Y M, Liu Y, et al. Determination of soybean saponins by the method of spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2000, 12(4):10-13.)
- [5] 林启寿.中草药成分化学[M].北京:科学出版社,1977:398-399. (Lin Q S. Chinese medicine ingredient chemistry [M]. Beijing: Science Press, 1977:398-399.)
- [6] 于志萍,王昌禄,顾晓波.大豆皂甙的研究与进展[J].粮油食品科技,2002,10(3):17-18. (Yu Z P, Wang C L, Gu X B. The research and development of soyasaponins [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2002, 10(3):17-18.)
- [7] 尹学哲,沈明花,全吉淑,等.高效液相色谱法测定大豆胚轴中单糖链大豆皂甙的含量[J].大豆科学,2007,26(6):943-945. (Yin X Z, Shen M H, Quan J S, et al. Determination of monodesmoside soyaponnins from soybean hypocotyl by HPLC [J]. Soybean Science, 2007, 26(6):943-945.)
- [8] 魏静,张春红,刘长江.比色法测定大豆总皂甙的研究[J].粮油加工,2006(10):60-62. (Wei J, Zhang C H, Liu C J. Determination of soybean saponins by colorimetry [J]. Cereals and Oils Processing, 2006(10):60-62.)
- [9] 薛锦峰,闫子鹏,郭丰盛.紫外分光光度法测定大豆中的总皂甙[J].中国油脂,2006,31(10):77-78. (Xue J F, Yan Z P, Guo F S. Determination of soybean saponins by ultraviolet spectrophotometry [J]. China Oils and Fats, 2006, 31(10):77-78.)