

## 分光光度法测定藜麦中总皂苷的含量

熊成文<sup>1</sup>, 李晓伟<sup>2</sup>, 徐得娟<sup>2</sup>, 贾燕花<sup>2</sup>

(1. 青海省食品检验检测院, 青海西宁 810000; 2. 青海高远锦禾生态农牧科技有限公司, 青海西宁 810016)

**摘要** [目的] 建立一种测定藜麦中总皂苷的分光光度法, 研究藜麦中总皂苷的含量。[方法] 采用超声波提取、香草醛-高氯酸分光光度法, 以藜麦皂苷 A 为对照品, 检测波长 482 nm, 样品提取采用 60% 乙醇溶液, 料液比 1:30 (g: mL), 提取时间 30 min, 提取 2 次, 回收乙醇后用水饱和的正丁醇萃取 3 次。[结果] 藜麦中总皂苷浓度在 0.021 12 ~ 0.063 36 mg/mL 范围内具有良好的线性关系, 线性方程为  $A = 12.169C - 0.0714$ , 相关系数 0.999 9。[结论] 建立了超声波提取-分光光度法测定藜麦中总皂苷含量的新方法, 该方法简便、准确, 可用于藜麦加工工艺的评价。

**关键词** 藜麦; 总皂苷; 含量测定; 分光光度法; 藜麦皂苷 A

中图分类号 TS207 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)26-0096-03

## Determination of Total Saponins in Quinoa by Spectrophotometry

XIONG Cheng-wen<sup>1</sup>, LI Xiao-wei<sup>2</sup>, XU De-juan<sup>2</sup> et al (1. Qinghai Province Institute for Food Control, Xining, Qinghai 810000; 2. Qinghai Gaoyuanjinhe Ecological Agriculture and Animal Husbandry Science and Technology Co., Ltd., Xining, Qinghai 810016)

**Abstract** [Objective] To establish a method for determination of Quinoa saponins by spectrophotometry, and study the content of total saponins in quinoa. [Method] By ultrasonic extraction and vanillin-perchloric acid spectrophotometry, with quinoa saponins A as the reference substance, detection wavelength was 482 nm, the samples extracted with 60% ethanol solution, solid-liquid ratio was 1:30, extraction time was 30 minutes, twice extraction, water-saturated n-butanol extracted three times after the recovery of ethanol. [Result] The concentration of total saponins in quinoa has a good linear relationship in 0.021 12 ~ 0.063 36 mg/mL. The linear equation was  $A = 12.169C - 0.0714$ , and the correlation coefficient was 0.999 9. [Conclusion] A new method was established for determination of content of total saponins in quinoa by ultrasonic extraction and Spectrophotometry. The method is convenient and exact. It can be used for the evaluation of processing techniques of quinoa.

**Key words** Quinoa; Total saponins; Assay; Spectrophotometry; Quinoa saponins A

苋科藜属植物 (*Chenopodium* spp.) 通常被称为“昆诺阿藜”, 大约有 250 种, 在众多未被充分利用作物中, 最具有发展前景<sup>[1]</sup>。藜麦的原产地为安第斯山脉地区, 当地人已有约 7 000 年的种植历史<sup>[2]</sup>。19 世纪 70 年代中期, 藜麦特殊的营养价值被发现, 越来越多的消费者开始食用藜麦<sup>[3]</sup>。藜麦籽实富含蛋白质, 叶片可作为菜用, 其生产和食用方式与谷物类似。由于谷物是单子叶植物, 藜麦是一种双子叶植物, 因而藜麦并非真正的谷物, 而是一种假谷物。

藜麦皂苷存在于藜麦植物各部位中, 如叶片、花、果实、籽实和种皮。藜麦皂苷主要为三萜皂苷, 通过异戊二烯途径生成, 齐墩果酸型和商陆酸型为常见类型, 糖苷配基主要为半乳糖阿拉伯糖与葡萄糖。藜麦种皮含有大量的皂角苷, 是藜麦中主要的抗营养物质<sup>[4]</sup>, 已有研究指出, 藜麦皂角苷会妨碍某些营养元素的吸收<sup>[5]</sup>, 因此在食用和制作食物的过程中, 一般需要先用水洗去藜麦皂苷。建立一种简便、准确的藜麦皂苷含量测定方法, 可为藜麦的加工工艺提供有利的评价手段, 同时藜麦皂苷也被广泛用于化妆品、食品添加剂、生物农药等行业, 因此藜麦皂苷含量测定方法的建立是十分有用和必要的。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 原料与试剂。**供试藜麦为青藜一号, 产自青海省海西蒙古族藏族自治州都兰县, 平均海拔 3 100 m; 藜麦皂苷 A 对照品, 青海高远锦禾生态农牧科技有限公司制备。香草

醛、乙醇、甲醇、冰醋酸、高氯酸, 均为分析纯; 实验室用水为超纯水。

**1.1.2 主要仪器设备。**Lambda 35 紫外可见分光光度计, 美国 PE 公司; FA2004 电子分析天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 101-1S 电热鼓风干燥箱, 邦西仪器科技(上海)有限公司; HH-2 数显恒温水浴锅, 常州智博瑞仪器制造有限公司; JP-030S 超声波清洗机, 深圳市洁盟清洗设备有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

## 1.2 样品测定

**1.2.1 标准溶液的配制。**藜麦籽实中的皂苷为三萜皂苷, 在没有藜麦皂苷对照品的情况下通常选用齐墩果酸为对照品, 但藜麦皂苷因含有糖苷配基分子量一般在 700 以上, 而齐墩果酸不含糖苷配基分子量为 456.71, 故实验室通过高效液相色谱纯化制备了藜麦皂苷 A, 分子结构见图 1, 分子量 810.44, 并以藜麦皂苷 A 为对照品建立含量测定方法。

准确称取藜麦皂苷 A 对照品 6.60 mg, 置 25 mL 量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.264 mg/mL 的标准储备溶液。

**1.2.2 标准曲线<sup>[6]</sup>。**分别精密量取藜麦皂苷 A 标准储备溶液各 0.400、600、800、1 000、1 200  $\mu$ L 置于干燥的具塞试管中, 60  $^{\circ}$ C 蒸干, 取出放冷, 依次加入 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 于 60  $^{\circ}$ C 水浴中保温 15 min, 取出, 用冰水浴冷却 10 min, 加入 4 mL 冰醋酸, 摇匀。选取藜麦皂苷 A 800  $\mu$ L 的标准溶液, 于 400 ~ 760 nm 范围进行扫描, 选定最大吸收波长为测定波长。在最大吸收波长处测定各标准溶液的吸光度 A, 以吸光度 A 为纵坐标, 以相应对照品浓度 (mg/mL) 为横坐标, 分别绘制标准曲线。

**作者简介** 熊成文(1980—), 男, 青海西宁人, 副主任药师, 硕士, 从事天然药物化学研究。

**收稿日期** 2017-06-26

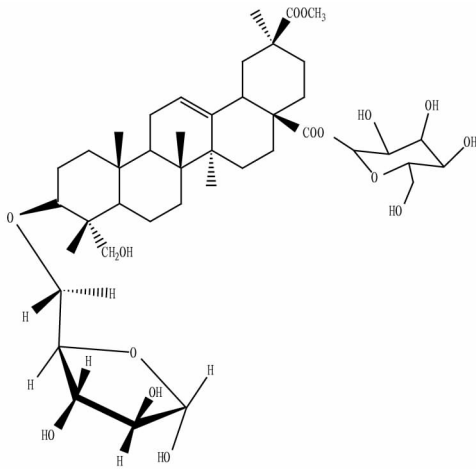


图1 藜麦皂苷 A 分子结构

Fig.1 Molecular structure of quinoa saponin A

### 1.2.3 供试品溶液的制备。

**1.2.3.1 乙醇体积分数的确定。**将一定量的藜麦种子粉碎后过 60 目筛,分别称取藜麦粉 5 份,每份 1 g,置于 100 mL 锥形瓶中,按料液比 1:30(g:mL) 分别加入 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇水溶液,超声提取 15 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残渣重复提取 1 次,合并上清液回收乙醇至无醇味,用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 10 mL,合并萃取液,挥干溶剂,残渣用甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 400  $\mu$ L,置于具塞试管中,60  $^{\circ}$ C 蒸干,取出放冷,采取与标准溶液相同的方法测定其吸光度 A。根据标准曲线查得供试品溶液中总皂苷的浓度(mg/mL),按照公式计算出藜麦中总皂苷的含量,确定最佳的乙醇体积分数。

$$\text{总皂苷含量}(\text{mg/g}) = CV/W$$

式中,C 为供试品溶液中总皂苷的浓度(mg/mL);V 为供试品溶液的体积(mL);W 为藜麦重量(g)。

**1.2.3.2 料液比的确定。**分别称取粉碎过筛后的藜麦粉 5 份,每份 1 g,置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入 60% 乙醇溶液 10、20、30、40、50 mL[料液比依次为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g:mL)],超声提取 15 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残渣重复提取 1 次,合并上清液回收乙醇至无醇味,用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 10 mL,合并萃取液,挥干溶剂,残渣用甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 400  $\mu$ L,置于具塞试管中,60  $^{\circ}$ C 蒸干,取出放冷,采取与标准溶液相同的方法测定其吸光度值 A,在标准曲线上查得供试品溶液中总皂苷的浓度(mg/mL),按照公式计算出藜麦中总皂苷含量,确定最佳的料液比。

**1.2.3.3 提取时间的确定。**分别称取粉碎好的藜麦粉 5 份,每份 1 g,置于 100 mL 锥形瓶中,按照确定好的料液比和乙醇体积分数加入乙醇溶液,分别提取 15、30、45、60、90 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残渣重复提取 1 次,合并上清液回收乙醇至无醇味,用水饱和的正丁醇萃取 3

次,每次 10 mL,合并萃取液,挥干溶剂,残渣用甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 400  $\mu$ L,置于干燥的具塞试管中,60  $^{\circ}$ C 蒸干,取出放冷,采取与标准溶液相同的方法测定其吸光度值 A。根据标准曲线查得供试品溶液中皂苷的浓度,确定最佳的提取时间。

**1.2.3.4 萃取次数的确定。**分别称取粉碎好的藜麦粉 5 份,每份 1 g,置于 100 mL 锥形瓶中,按照确定好的料液比和乙醇体积分数加入乙醇溶液,超声提取 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残渣重复提取 1 次,合并上清液回收乙醇至无醇味,分别用水饱和的正丁醇萃取 1、2、3、4、5 次,每次 10 mL,合并萃取液,挥干溶剂,残渣用甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 400  $\mu$ L,置于干燥的具塞试管中,60  $^{\circ}$ C 蒸干,取出放冷,采取与标准溶液相同的方法测定其吸光度值 A。根据标准曲线查得供试品溶液中皂苷的浓度(mg/mL),确定最佳的萃取次数。

**1.2.4 藜麦样品中总皂苷的测定。**取藜麦籽实、藜麦叶、藜麦茎秆和藜麦种皮样品粉碎后过 60 目筛,分别称取粉碎好的样品粉各 2 份,每份 1 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入 60% 乙醇溶液 30 mL,超声提取 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残渣重复提取 1 次,合并上清液回收乙醇至无醇味,用水饱和的正丁醇萃取 4 次,每次 10 mL,合并萃取液,挥干溶剂,残渣用甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 400  $\mu$ L,置于干燥的具塞试管中,60  $^{\circ}$ C 蒸干,取出放冷,采取与标准溶液相同的方法测定其吸光度值 A。根据标准曲线查得供试品溶液中皂苷的浓度,确定各样品中藜麦总皂苷的含量。

## 2 结果与分析

**2.1 检测波长的测定** 由图 2 可知,藜麦皂苷 A 对照品在 400 ~ 700 nm 处的最大吸收波长为 482 nm,因此,选用 482 nm 作为检测波长。

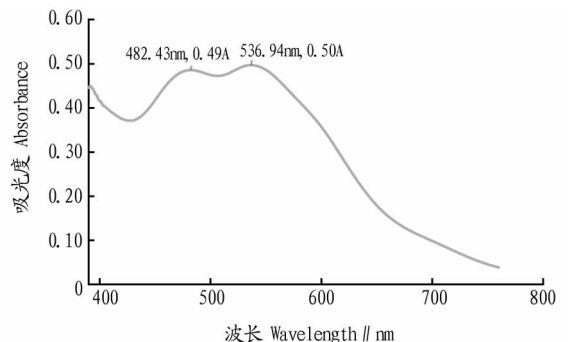


图2 藜麦皂苷 A 标准溶液紫外光谱

Fig.2 UV spectrum of standard solution of quinoa saponin A

**2.2 标准曲线的绘制** 通过数据处理得到的藜麦皂苷 A 对照溶液回归方程为  $y = 12.169x - 0.0714$ ,  $r = 0.9999$ ,在 0.02112 ~ 0.06336 mg/mL 范围内线性关系良好(图 3)。

### 2.3 供试品溶液制备条件的确定

**2.3.1 乙醇体积分数对藜麦总皂苷提取效果的影响。**从图

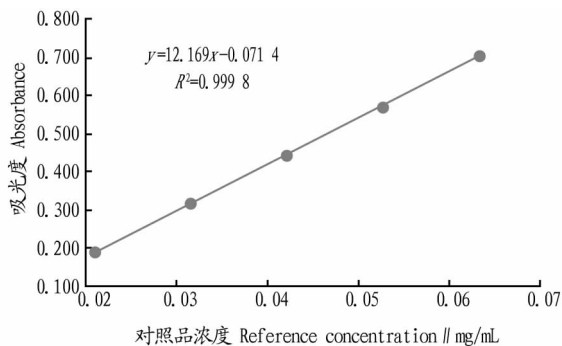


图3 藜麦皂苷 A 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of quinoa saponin A

4可以看出,当乙醇的体积分数从50%提高到60%时,提取出的藜麦总皂苷含量逐渐增加;当乙醇的体积分数从60%提高到90%时,提取出的藜麦总皂苷含量逐渐减少,乙醇的体积分数为60%时,提取出的藜麦总皂苷含量最大,为24.72 mg/g。因此,确定乙醇的最佳体积分数为60%。

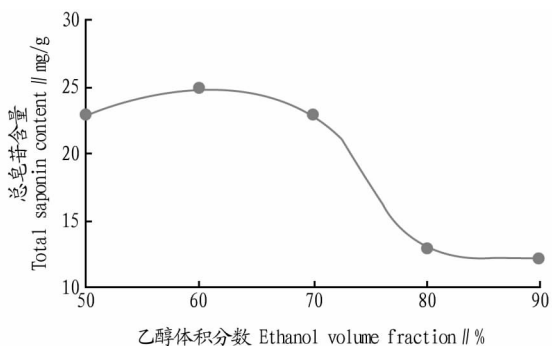


图4 不同乙醇体积分数对藜麦总皂苷提取效果的影响

Fig. 4 Effect of different ethanol volume fractions on extraction efficiency of total saponins of quinoa

2.3.2 料液比对藜麦总皂苷提取效果的影响。由图5可知,当料液比为1:10~1:30(g:mL)时,提取出的藜麦总皂苷含量明显增加;当料液比为1:30~1:50(g:mL)时,提取出的藜麦总皂苷含量不再明显增加,故确定料液比的值为1:30(g:mL)。

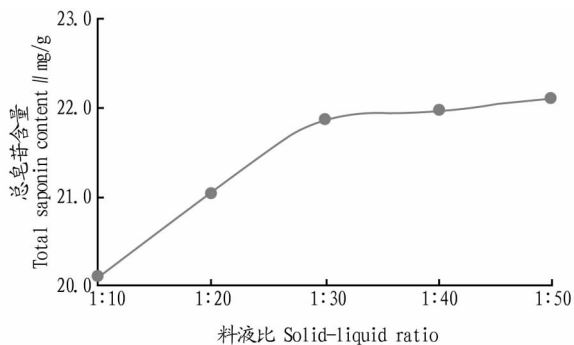


图5 不同料液比对藜麦总皂苷提取效果的影响

Fig. 5 Effect of different solid-liquid ratio on extraction efficiency of total saponins of quinoa

2.3.3 提取时间对藜麦总皂苷提取效果的影响。从图6可以看出,随着提取时间的增加,藜麦总皂苷的提取量逐渐增大,当提取时间大于30 min后藜麦总皂苷的提取量不再明显

增加,考虑到提取效率确定提取时间为30 min。

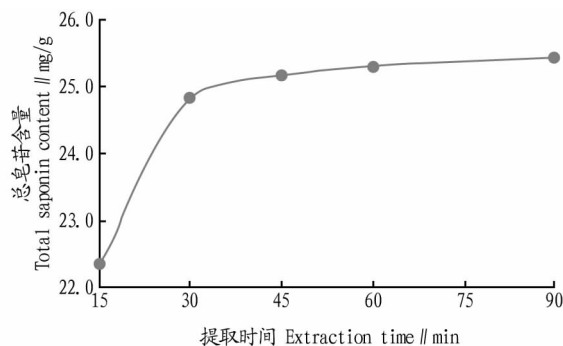


图6 提取时间对藜麦总皂苷提取效果的影响

Fig. 6 Effect of extraction time on extraction efficiency of total saponins of quinoa

2.3.4 萃取次数对总皂苷提取效果的影响。从图7可以看出,随着萃取次数的增加,总皂苷的提取量也随着增大,当萃取次数为4次时,提取出的总皂苷含量为24.74 mg/g,萃取5次时提取出的总皂苷含量为24.79 mg/g,说明萃取大于4次时,提取出的总皂苷含量不再增加。因此,确定提取过程中萃取4次即可。

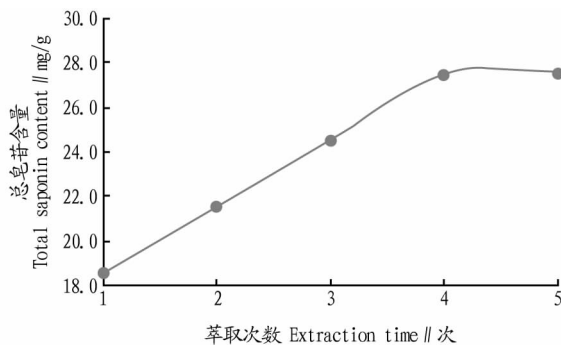


图7 萃取次数对藜麦总皂苷提取效果的影响

Fig. 7 Effect of extraction times on extraction efficiency of total saponins of quinoa

2.4 藜麦样品中总皂苷的测定结果 藜麦籽实、藜麦叶、藜麦茎秆和藜麦种皮中均检测出藜麦总皂苷,含量依次为27.26、49.89、9.78、97.68 mg/g,其中藜麦种皮中总皂苷含量最多。

### 3 结论

藜麦皂苷是藜麦中主要的抗营养物质,味苦,可防止鸟类和昆虫的食用,起到保护藜麦叶片和籽实的作用,不利于作为食物和饲料应用。同时,皂苷类物质具有一定的生物活性,可用于保健食品、化妆品、生物农药、食品添加剂中,建立一种简便、可靠的藜麦总皂苷测定方法十分必要。采用超声波提取,香草醛-高氯酸比色法测定藜麦中皂苷含量,以藜麦皂苷A为对照品,检测波长482 nm,样品提取采用60%乙醇溶液,料液比1:30(g:mL),提取时间30 min,提取2次。配制不同浓度对照品溶液建立标准曲线,通过在标准曲线上查得的供试品溶液皂苷浓度计算样品中藜麦总皂苷的含量。对藜麦籽实、藜麦叶、藜麦茎秆和藜麦种皮样品中藜麦总皂

(下转第121页)

呈下降趋势,因为冲淋作用,使得土壤中的有机质流失。1~4组的有机质随时间均呈上升趋势,4组的增长率最高,其次是土样3、2、1。

### 3 讨论

环保酵素含有水解酶、淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶,其主要微生物为酵母菌、霉菌和厌氧菌<sup>[11-12]</sup>。试验结果表明,环保酵素的稀释比最大时,有机质和全氮含量增加的最多。这是因为在此体系中存在着2种相反的作用,只有在一定稀释比时,才表现出环保酵素增加全氮和有机质含量的效应。

环保酵素中厌氧菌通过反硝化作用、氨化作用可降低全氮含量。反硝化作用是指由硝酸盐还原成亚硝酸盐,并进一步还原成氮气的过程。氨化作用是含氮有机物经微生物的分解产生氨的作用。所以在此两方面因素下,表现出降低全氮含量的作用。另一方面,部分微生物又可促进土壤有机质的矿化作用,以增加土壤中有效氮的含量。

环保酵素稀释液中的霉菌可分解纤维素,降低碳含量,从而减少有机质含量。导致土壤有机质含量下降的另外一个因素是有机质的矿质化作用,即在微生物作用下被分解为简单无机化合物并放出二氧化碳。而稀释液中的厌氧微生物可促进腐殖质的合成作用,增加土壤有机质的含量。

在上述几方面的综合影响下,环保酵素的稀释比越低,表现出全氮和有机质含量越低。而在环保酵素:水的体积比为1:800时,表现出最高的全氮和有机质含量。

有报道,环保酵素中还具有较高浓度的有机质、氮素、磷素、钾素等成分,可使土壤更加肥沃。在一定浓度下,试验土壤中出现了较多蚯蚓,说明环保酵素浇灌土壤有利于土壤中蚯蚓量的增加,从而有利于土壤质量的改良<sup>[13-15]</sup>。

### 4 结论

自制环保酵素经6个月发酵后的混合液,是含有多种酶和微生物菌群的生态平衡系统。在此过程中,果蔬皮和糖提供营养成分,它们被转化成乙醇、乳酸、乙酸等,并产生各种各样的酶。通过持续浇灌环保酵素稀释液,在数周后,可以

提高土壤全氮和有机质含量,进而提高土壤肥力。土样中全氮和有机质含量随浇灌时间的增加而升高;随环保酵素的稀释比而变化,环保酵素:水的体积比为1:800时,全氮和有机质增加的最多。

### 参考文献

- [1] HO Y M, LING L K, MANAF L A. Garbage enzyme as a solution to waste minimization[C]//From Sources to Solution, Proceedings of the International Conference on Environmental Forensics 2013. Berlin: Springer, 2014: 347-350
- [2] 徐伟,宋佳玲,毛予茜,等. 低碳视角下环保酵素在现代生活中的应用[J]. 现代园艺, 2014(21): 110-111.
- [3] 李方志,杨琴,杨汝兰,等. 环保酵素对土壤中有效氮、全氮及有机质改良效果的研究[J]. 玉溪师范学院学报, 2016, 32(4): 42-47.
- [4] 李方志,王殷,李丝丝,等. 环保酵素对土壤钾素的改良效果[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 168-169.
- [5] 韦文芳,梁春红,唐千滔,等. 环保酵素对田间种植蔬菜残留农药的降解作用[J]. 广西农学报, 2016, 31(3): 24-26, 30.
- [6] 庞元明. 土壤肥力评价研究进展[J]. 山西农业科学, 2009, 37(2): 85-87.
- [7] 刘洪鹤,赵玉明,王秀颖,等. 土壤肥力评价方法探讨[J]. 长江科学院院报, 2008, 25(3): 62-66.
- [8] 李方志,李丝丝,王殷,等. 环保酵素改良土壤中有机质与磷素的探索性研究[J]. 环境科学导刊, 2016, 35(5): 65-69.
- [9] 中华人民共和国农业部. 土壤有机质测定法: NY/T 85—1988[S]. 中国: 中国标准出版社, 1989.
- [10] 环境保护部. 土壤质量 全氮的测定 凯氏法: HJ 717—2014[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2014.
- [11] ARUN C, SIVASHANMUGAM P. Study on optimization of process parameters for enhancing the multi-hydrolytic enzyme activity in garbage enzyme produced from preconsumer organic waste [J]. Bioresource technology, 2017, 226(2): 200-210.
- [12] 邹梦遥,吴俊良,胡卓,等. 不同单一原料自制环保酵素抗氧化力初探[J]. 广东化工, 2015, 42(16): 296-297, 287.
- [13] RODRIGUEZ-CANCHE L G, CARDOSO VIGUEROS L, MALDONADO-MONTREL T, et al. Pathogen reduction in septic tank sludge through vermicomposting using *Eisenia fetica* [J]. Bioresource technology, 2010, 101(10): 3548-3553.
- [14] JOUQUET P, PLUMERE T, THU T D, et al. The rehabilitation of tropical soils using compost and vermicompost is affected by the presence of endogeic earthworms [J]. Applied soil ecology, 2010, 46(1): 125-133.
- [15] ROS M, RODRÍGUEZ I, GARCIA C, et al. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments [J]. Bioresource technology, 2010, 101(18): 6916-6923.
- [16] KOLE C. Genome mapping and molecular breeding in plants. Heidelberg: Springer, 2007: 147-158.
- [17] ESTRADA A, LI B, LAARVELD B. Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens in mice [J]. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 1998, 21(3): 225-236.
- [18] IMPROTA F, KELLEMS R O. Comparison of raw, washed and polished quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to wheat, sorghum or maize based diets on growth and survival of broiler chicks [J]. Livestock research for rural development, 2001, 13(1): 10.
- [19] 谷利伟,谷文英. 比色法测定大豆中的总皂甙[J]. 中国粮油学报, 2000, 15(6): 38-42.

(上接第98页)

昔含量的测定表明,藜麦种皮中含有的总皂昔最多,为97.68 mg/g;其次为藜麦叶片和藜麦籽实;藜麦茎秆中含有的总皂昔最少,为9.78 mg/g。

### 参考文献

- [1] GIUSTI L. El género chenopodium en argentina: I. Números de cromosomas [J]. Darwiniana, 1970, 16: 98-105.
- [2] GARCIA CARDENAS M. Agroclimatic study and drought resistance analysis of quinoa for an irrigation strategy in the Bolivian Altiplano [D]. Leuven: Katholieke Universiteit Leuven, 2003.
- [3] MAUGHAN P J, BONIFACIO A, COLEMAN C E, et al. Quinoa (*Chenopo-*