

海星皂苷测定条件优化及其组织分布测定

曹 荣¹, 张 媛², 赵 玲¹, 殷邦忠¹, 刘 淇^{1,*}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 獐子岛集团股份有限公司, 辽宁 大连 116001)

摘 要: 为了建立快速、简便、准确的海星皂苷含量检测方法, 以多棘海盘车为研究对象, 分析浓硫酸用量、反应温度、反应时间等比色条件以及脱色、脱脂等样品前处理条件对测定结果的影响, 并采用优化后的检测方法对多棘海盘车不同组织中的皂苷含量进行测定。结果表明: 适宜采用浓硫酸用量10%、反应温度60℃、反应时间30 min的比色条件, 样品前处理过程中进行脱色、脱脂以及丙酮沉淀可以显著提高测定的准确性。精密度实验和加标回收率实验结果表明: 皂苷含量低、中、高3组样品对应的相对标准偏差分别为4.71%、1.61%和1.52%, 平均加标回收率为99.64%, 该方法的精密度和准确性可以满足检测要求。多棘海盘车整体皂苷含量为3.65 mg/g (干基计), 其中消化腺中皂苷含量最高, 其次是体壁和生殖腺。

关键词: 皂苷; 多棘海盘车; 比色法

Optimization of Experimental Conditions for the Analysis of Tissue Distribution of Saponin in *Asterias amurens*

CAO Rong¹, ZHANG Yuan², ZHAO Ling¹, YIN Bang-zhong¹, LIU Qi^{1,*}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Zhangzidao Group Co. Ltd., Dalian 116001, China)

Abstract: The objective of this study was to establish a rapid, simple and accurate colorimetric method for the determination of saponin in starfish. *Asterias amurens* was selected as the raw materials. The effects of colorimetric conditions such as sulfuric acid dosage, reaction temperature and reaction time as well as sample preparation procedures such as decoloration and degreasing on saponin determination were analyzed. It was shown that addition of sulfuric acid in a proportion of 10% (V/V) and reaction temperature at 60℃ for 30 min were suitable colorimetric conditions, and the pretreatment steps decoloration, degreasing and acetone precipitation could significantly improve the accuracy of determination. The results of precision and spiked recovery experiments showed that RSDs (relative standard deviations) for three groups with low, medium and high saponin contents were 4.71%, 1.61% and 1.52%, respectively, and the average recovery was 99.64%. *Asterias amurens* was detected to contain 3.65 mg/g saponin (dry basis). The digestive gland of *Asterias amurens* showed the highest saponin content, followed by the body wall and gonad.

Key words: saponin; *Asterias amurens*; colorimetric method

中图分类号: TS254.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 24-0174-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201424033

海星属于棘皮动物门 (Echinodermata), 海星纲 (Asteroidea), 是一类海洋底栖的无脊椎动物, 在我国沿海海域分布广泛^[1]。海星大量掠食牡蛎、扇贝等, 且具有很强的繁殖和再生能力, 严重危害沿海的贝类养殖。目前贝类底播养殖区域的海星随拖网起捕后多被直接丢弃或经曝晒粉碎后用作农作物肥料, 这对环境是一种污染, 也造成了资源的浪费。

海星具有较高的蛋白、脂质含量^[2], 同时含有皂苷、甾醇、生物碱、多糖等多种结构独特的化学物质^[3], 在

食品、饲料、医药等领域具有良好的开发前景。海星皂苷是海星的次生代谢产物, 具有重要的生物功能和药理活性, 如调节生殖发育、降血压、抗溃疡、抗病毒、抑制肿瘤细胞生长等, 但同时也具有很强的溶血作用与毒性^[4], 人或动物过量服用后会产生头晕、呕吐等中毒症状, 因此海星用作食品和饲料加工时具有一定的安全隐患^[5], 针对海星中皂苷检测方法和脱除技术的研究具有重要的现实意义。

目前皂苷的分析方法主要有比色法、薄层扫描法、色谱

收稿日期: 2014-02-17

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (20603022011005)

作者简介: 曹荣 (1981—), 男, 副研究员, 博士, 主要从事水产品品质评定与控制技术研究。E-mail: caorong@ysfri.ac.cn

*通信作者: 刘淇 (1965—), 男, 研究员, 本科, 主要从事水产品加工研究。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

法、毛细管电泳法等^[6]。不同类型的皂苷,其适用的检测方法也不同。海星中的皂苷多以甾体化合物的形式存在^[7],利用其可被浓硫酸氧化脱水生成 $\alpha\beta$ -不饱和酮共轭体系的性质^[8],可以采取紫外分光光度法测定其含量^[9],但该方法的准确性和稳定性会受到样本中脂质、色素、游离糖及部分水解苷元等的影响,因此有必要对该方法的测定条件进行优化。

本实验以薯蓣皂苷元作为标准品,分析了浓硫酸用量、反应温度、反应时间对比色的影响,并以黄海和渤海较为常见的海星——多棘海盘车(*Asterias amurensis*)为研究对象,考察皂苷提取过程中脂质脱除、色素脱除以及水解苷元分离对测定结果的影响,对基于紫外分光光度法的海星中皂苷定量检测条件进行优化,并采用该方法对多棘海盘车中的皂苷分布进行了分析,以期为海星的开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

多棘海盘车由大连獐子岛集团股份有限公司提供,2013年5月采集自渤海獐子岛海域,选取辐径 (12 ± 2) cm的样品,洗净后烘干、粉碎,过200目筛备用。

薯蓣皂苷元标准品 美国Sigma公司;浓硫酸、甲醇、丙酮、石油醚等均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制

取50.0 mg于50 mL容量瓶中,甲醇定容,配制成1.0 mg/mL薯蓣皂苷元甲醇标准溶液。

1.2.2 比色条件优化

1.2.2.1 吸收波长的确定

准确量取0.1 mL标准皂苷溶液,于冰水浴中加入浓硫酸1.0 mL,混匀,60 ℃水浴中反应30 min,冰浴冷却后用甲醇定容至10 mL。用紫外-可见分光光度计在200~1 000 nm波长范围内进行光谱扫描。

1.2.2.2 硫酸用量

准确量取0.1 mL标准皂苷溶液,于冰水浴中分别加入浓硫酸0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 mL,混匀,60 ℃水浴中反应30 min,冰浴冷却后用甲醇定容至10 mL,测定吸光度。

1.2.2.3 反应温度

准确量取0.1 mL标准皂苷溶液,于冰水浴中加入浓硫酸1.0 mL,混匀,分别在20、40、60、80 ℃、水浴中反应30 min,冰浴冷却后用甲醇定容至10 mL,测定吸光度。

1.2.2.4 反应时间

准确量取0.1 mL标准皂苷溶液,于冰水浴中加入浓硫酸1.0 mL,混匀,60 ℃水浴中分别反应10、20、30、40、50、60 min,冰浴条件下冷却后用甲醇定容至10 mL,测定吸光度。

1.2.3 样品处理

取6份海星干粉,每份5.0 g,分别加入甲醇100 mL,超声提取60 min,过滤。滤液分别进行如下处理: I 滤液用甲醇定容至100 mL,直接取0.5 mL,按1.2.2节优化后的条件进行比色; II 滤液中按照0.01 g/mL的比例加入活性炭脱色,充分混匀后滤纸过滤,滤液用甲醇定容后比色; III 滤液中按照1:2 (V/V)的比例加入石油醚,采用分液漏斗脱除脂质,收集下层液体用甲醇定容后比色; IV 滤液中加入5倍体积丙酮,8 000 r/min离心20 min后,弃上清液,黄色沉淀物用甲醇溶解、定容后比色; V 滤液依次脱色、脱脂处理后,甲醇定容比色; VI 滤液依次脱色、脱脂、丙酮沉淀处理后,甲醇定容比色。

1.2.4 方法精密度、准确性验证

1.2.4.1 标准曲线绘制

分别取薯蓣皂苷元-甲醇标准溶液(1.0 mg/mL) 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL,冰浴条件下分别加入浓硫酸1.0 mL,60 ℃条件下反应30 min,冰浴冷却,甲醇定容至10 mL。于271 nm波长处测定吸光度。

1.2.4.2 精密度实验

设置皂苷含量低、中、高3组样品(分别取海星干粉1.00、4.00 g和7.00 g),按照1.2.2节优化的条件进行样品处理,提取粗皂苷并测定含量。每组均重复3次,每次设2个平行。结果以平均值±标准偏差表示,以相对标准偏差表征精密度。

1.2.4.3 加标回收率实验

取已知皂苷含量的海星干粉样品6份,每份1.00 g,按照1.2.2节优化的条件进行样品处理,然后分别加入5.0 mg/mL薯蓣皂苷元标准溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,定容后比色。计算各组加标回收率,以平均加标回收率表征准确性。

1.2.5 多棘海盘车不同组织中皂苷含量测定

鲜活多棘海盘车洗净泥沙,分离出体壁、消化腺(包括胃、幽门盲囊)和生殖腺,烘干,研成粉末备用。分别取体壁、消化腺和生殖腺干粉5.0 g,按照1.2.2节和1.2.3节确立的条件进行皂苷提取和含量测定。

1.3 数据处理与分析

采用SPSS 11.0对实验数据进行统计分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间分析采用 t -检验,显著性界值以 $P<0.01$ 为非常显著, $P<0.05$ 为显著, $P>0.05$ 为不显著。

2 结果与分析

2.1 吸收光谱

标准品薯蓣皂苷元与浓硫酸反应后,在200~1 000 nm范围内进行光谱扫描,发现在紫外光区有强吸收,其中271 nm波长处有最大吸收峰。这与文震等^[9]

发现标准皂苷与浓硫酸反应产物在277 nm有最大吸收峰以及王荣镇等^[10]发现紫蛇尾皂苷检测波长为276 nm的结论基本一致。

2.2 反应条件对吸光度的影响

标准皂苷溶液0.1 mL中分别加入浓硫酸0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 mL，在同样温度条件下反应相同时间，反应后吸光度见图1a。0.2、0.5 mL和1.0 mL浓硫酸用量对应的吸光度有显著性差异 ($P<0.01$)，1.0、2.0、3.0 mL浓硫酸用量对应的吸光度无显著性差异 ($P>0.05$)。从经济和实验安全的角度，采用浓硫酸用量1.0 mL（即浓硫酸用量为反应总体系的10%）。

标准皂苷溶液0.1 mL中加入浓硫酸1 mL，分别在20、40、60、80 °C水浴中反应30 min，反应后的吸光度见图1b。随着反应温度的升高，吸光度呈增大的趋势。20 °C对应的吸光度明显低于其他组 ($P<0.01$)，说明20 °C条件下皂苷与浓硫酸反应不完全。60 °C对应的吸光度略高于40 °C ($P<0.05$)，60、80 °C对应的吸光度之间差异不显著 ($P>0.05$)。因此，60 °C适宜作为反应温度。

标准皂苷溶液0.1 mL中加入浓硫酸1 mL，在60 °C水浴中分别反应10、20、30、40、50、60 min，反应后的吸光度见图1c。随着反应时间的延长，吸光度呈增大的趋势，30 min以后吸光度趋于平稳。因此，反应时间控制为30 min。

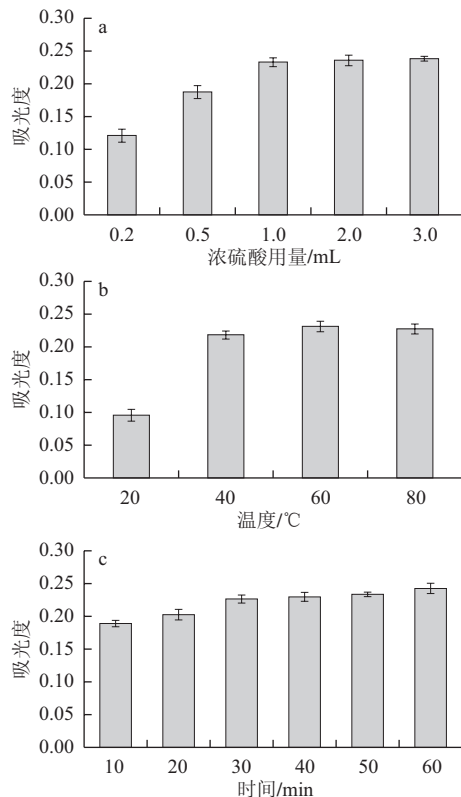
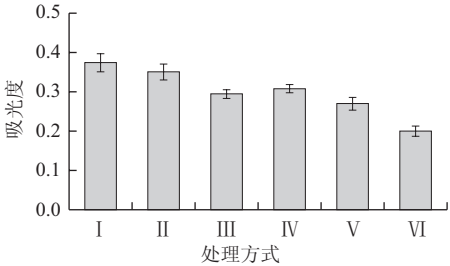


图1 不同浓硫酸用量 (a)、反应温度 (b)、反应时间 (c) 条件下的吸光度

Fig.1 Absorbance as a function of sulfuric acid dosage (a), reaction temperature (b) and reaction time (c)

2.3 样品处理条件对比色结果的影响



I.直接比色; II.活性炭脱色; III.脱脂; IV.丙酮沉淀; V.依次脱色、脱脂处理; VI.依次脱色、脱脂、丙酮沉淀处理。

图2 样品前处理方式对吸光度的影响
Fig.2 Effects of sample pretreatment methods on absorbance

由图2可知，海星样品脱色、脱脂及丙酮沉淀处理对吸光度均有一定的影响，其中活性炭脱色处理影响显著 ($P<0.05$)，脱脂、丙酮沉淀处理影响均极显著 ($P<0.01$)。海星样品用甲醇提取粗皂苷过程中，部分脂质、色素、游离糖及部分水解苷元等会一并溶出，且都可能与浓硫酸发生反应，造成吸光度增大，进而影响检测的准确性。VI组样品经脱色、脱脂、丙酮沉淀处理后，吸光度为0.202，与对照 I 组的吸光度0.376相比，明显降低。

2.4 标准曲线

以薯蓣皂苷元作为标准品，绘制标准曲线。溶液中皂苷质量分数在2~40 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈线性相关，其回归方程式为： $Y=0.022X+0.0018$ ，相关系数 $R^2=0.9998$ 。以吸光度0.01对应的皂苷质量分数为检测限，计算出最低检测限为0.37 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 精密度与加标回收率

表 1 精密度实验结果									
Table 1		Results of precision experiments							
组别	指标	1	2	3	4	5	6	平均值±标准偏差	相对标准偏差/%
组 I (1.0 g)	吸光度	0.042	0.043	0.042	0.040	0.039	0.044	1.81±0.085	4.71
	皂苷含量/(μg/mL)	1.83	1.87	1.84	1.74	1.69	1.92		
组 II (4.0 g)	吸光度	0.163	0.166	0.162	0.162	0.158	0.163	7.30±0.117	1.61
	皂苷含量/(μg/mL)	7.33	7.46	7.28	7.28	7.10	7.33		
组 III (7.0 g)	吸光度	0.278	0.277	0.282	0.289	0.283	0.282	12.73±0.194	1.52
	皂苷含量/(μg/mL)	12.55	12.51	12.74	13.05	12.78	12.74		

表2 样品加标回收率实验结果						
Table 2 Results of spiked recovery experiments						
编号	海星样品量/g	样品中皂苷含量/mg	加入标准品量/mg	实测总量/mg	回收率/%	
1	1.004	3.665	5.00	8.798	101.54	
2	1.002	3.657	10.00	13.846	101.38	
3	1.003	3.661	15.00	18.778	100.63	
4	1.000	3.650	20.00	23.203	98.11	
5	1.001	3.654	25.00	28.107	98.09	
6	1.003	3.661	30.00	33.026	98.11	

精密度实验和加标回收率实验结果见表1、2。皂苷含量低、中、高3组样品对应的相对标准偏差分别为4.71%、1.61%和1.52%，说明方法精密度高、重复性好。平均加标回收率为99.64%（相对标准偏差为1.72%），说明方法准确性高。

2.6 多棘海盘车中皂苷的组织分布

表3 多棘海盘车各组织中海星皂苷含量（以干基计）

Table 3 Saponin contents in different tissues of *Asterias amurensis*

组织	体壁	消化腺	生殖腺	整体
皂苷含量/(mg/g)	3.82±0.13	14.10±0.16	2.85±0.09	3.65±0.26

采用建立的检测方法测定多棘海盘车中皂苷的组织分布。由表3可知，体壁、消化腺和生殖腺中皂苷含量有极显著差异（ $P<0.01$ ）。其中，消化腺中皂苷含量最高，其次是体壁和生殖腺。

3 讨论

多棘海盘车中皂苷组织分布的检测方法与Kicha等^[11]研究结果类似，Kicha等^[11]采用高效液相色谱法测得海燕（*Asterina pectinifera*）中甾体物质含量的分布规律为：幽门盲囊>胃>体壁>性腺。郭承华等^[12]测得罗氏海盘车幽门盲囊、胃、体壁、生殖腺的皂苷含量分别为4.16、3.04、1.54、0.24 mg/g，同样是幽门盲囊中含量最高。Garneau等^[13]测得北极海星（*Leptasterias polaris*）中皂苷含量分布规律为：胃>幽门盲囊>体壁>性腺。这些研究均表明海星消化腺（胃、幽门盲囊）中具有较高的皂苷含量，这种现象可能与海星独特的生理有关，相关机理有待进一步研究。

不同的海星种类，其皂苷含量有较大差异。如郭承华等^[12]测得罗氏海盘车和海燕中的皂苷含量分别为0.70 mg/g和5.17 mg/g。即使同一种类的海星，其皂苷含量也可能因为地理分布、生长季节等因素存在差别。实验发现，渤海产多棘海盘车整体皂苷含量为3.65 mg/g，这一结果与王长云等^[5]测得多棘海盘车粗总皂苷含量为0.077%的结论有很大差异。这种差异一方面与样品的地域性、季节性有关，更重要的可能与测定过程采用的方法不同有关。如张立新等^[14]采用香草醛-硫酸显色方法，测得海燕中的皂苷含量为0.313 mg/g，这一结果与郭承华等^[12]采用甲醇提取、干燥后称重法测定的海燕皂苷含量5.17 mg/g相差十余倍。

海星中的皂苷在化学结构上多属于甾体皂苷，香草醛-硫酸显色法适用于典型的三萜皂苷，用该方法测定海星中的甾体皂苷时会因为草醛显色后在可见光区没有明显的吸收峰而导致结果偏低。而称重法过程繁琐，测定周期长。相对而言，比色法更为快速、简便，对比色条件进行优化后准确率也较高，完全可以满足日常科研的需要。

4 结论

采用分光光度法可以准确测定海星中的皂苷含量。优化后的提取和前处理条件为：海星干粉按照0.05 g/mL的比例加入甲醇，超声提取60 min，过滤；滤液中按照0.01 g/mL的比例加入活性炭脱色，之后按照1:2（V/V）的比例加入石油醚脱除脂质，收集下层液体加入5倍体积丙酮，8 000 r/min离心20 min后，弃上清液，黄色沉淀物用甲醇溶解并定容至100 mL，比色。优化后的比色条件为取上述皂苷溶液0.5 mL，冰浴条件下加入浓硫酸1.0 mL，60 ℃条件下反应30 min，冰浴冷却，甲醇定容至10 mL；在271 nm波长处测吸光度。精密度和加标回收率实验表明，该方法可以快速、准确测定海星总皂苷含量。采用上述方法测得多棘海盘车皂苷含量为3.65 mg/g（以干基计），其中消化腺中皂苷含量最高，其次是体壁和生殖腺。

参考文献：

- [1] 廖玉麟, 由香莉. 海盘车[J]. 生物学通报, 2002, 37(11): 25-27.
- [2] 郝林华, 李八方. 多棘海盘车营养成分的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 385-388.
- [3] 刘铁铮, 郭爱洁, 王桂春, 等. 海星化学成分的生物活性及应用研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(13): 122-125.
- [4] ANDERSSON L, BOHLIN L, IORIZZI M, et al. Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars[J]. Toxicon, 1989, 27(2): 179-188.
- [5] 王长云, 顾谦群. 多棘海盘车用作新型海洋食品原料的可行性研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 67-71.
- [6] 陈方, 宋海峰. 皂苷分析方法研究进展[J]. 天津中医药, 2005, 22(3): 257-258.
- [7] 郭万成, 刘丽娟, 张翠仙, 等. 海星中的皂甙和多羟基甾体化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(1): 108-114.
- [8] IORIZZI M, de MARINO S, MINALE L, et al. Investigation of the polar steroids from an Antarctic Starfish of the family (*Echinasteridae*): isolation of twenty seven polyhydroxysteroids and steroidal oligoglycosides, structures and biological activities[J]. Tetrahedron, 1996, 52(33): 10997-11012.
- [9] 文震, 朱志鑫, 申德妍, 等. 紫外分光光度法测定海星皂甙的含量[J]. 分析科学学报, 2004, 20(6): 592-594.
- [10] 王荣镇, 党永龙, 冯建荣, 等. 正交实验法优化紫蛇尾皂苷提取工艺研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(2): 46-49.
- [11] KICHA A A, IVANCHINA N V, GORSHKOVA I A, et al. The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 128(1): 43-52.
- [12] 郭承华, 高学良, 吕建刚, 等. 罗氏海盘车组织中海星皂甙的分布及活性研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(2): 56-60.
- [13] GARNEAU F X, HARVEY C, SIMARD J L, et al. The distribution of asterosaponins in various body components of the starfish (*Leptasterias polaris*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1989, 92(2): 411-416.
- [14] 张立新, 薛峰, 赵爱云, 等. 海星中皂苷总含量测定方法的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 243-246.