

海星中皂苷总含量测定方法的研究

张立新¹, 薛峰¹, 赵爱云², 王丽娜¹, 林维红¹

(1. 青岛大学化工学院 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学天然色素研究所 山东 青岛 266071)

摘要: 为了对海星中的总皂苷进行含量测定, 本研究利用海星总皂苷能与香草醛-硫酸体系显色的特点, 以提纯海星皂苷 D262 为标准品, 26% 香草醛乙醇溶液和 75% 硫酸为显色剂, 用分光光度法对海星总皂苷的含量进行了测定, 并系统研究了测定过程中的各种条件, 确定了一种快速、简单、准确的海星总皂苷含量测定方法, 标准曲线相关系数为 0.99978。用此方法测得青岛海域罗氏海盘车和海燕中的皂苷总含量分别为 0.0251% 和 0.0313%。相对标准偏差(RSD)分别为 0.55% 和 0.33%, 平均回收率分别为 99.31% 和 97.57%。

关键词: 海星皂苷; 香草醛-硫酸; 分光光度法; 含量测定; 相对标准偏差

Study on Determination Methods of Total Asterosaponins Content from Starfish

ZHANG Li-xin¹, XUE Feng¹, ZHAO Ai-yun², WANG Li-na¹, LIN Wei-hong¹

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. Institute of Natural Pigments, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: To determine the total asterosaponins content from starfish, the photometric method was applied with 26% ethanol solution of vanillin and 75% sulfuric acid as color-forming reagents and pure Asterosaponin D262 as control standard. Various determination conditions were studied, and a quick, simple and accurate method was found. The interrelating coefficient of the standard curve is 0.99978. It was found that the total contents of asterosaponins from *Asterias rollestoni* and *Asteriaspectinifera* are 0.0251% and 0.0313%, RSD 0.55% and 0.33% and average recovery rate 99.31% and 97.57%, respectively.

Key words: asterosaponins; vanillin-sulfuric acid; photometry; content determination; RSD (relative standard deviation)

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0243-04

海星属于海洋无脊椎动物中的棘皮动物门海星纲, 种类繁多, 资源丰富, 因为常常吞食鲍鱼、扇贝等海珍品, 被认为是一种有害的海洋动物。九十年代以来, 人们对其化学成分与营养价值进行了广泛的研究, 发现它是一种含有大量营养成分的海产品。它含有丰富的维生素, 多种氨基酸和蛋白质, 还有大量的微量元素锌、铜、硒、锰等^[1], 经过处理, 海星黄可制成具有保健和滋补作用的营养口服液^[2], 海星全体可制成饲料添加剂等^[3]。但是海星中含有的皂苷类物质对人体和动物体却都有一定的毒性, 人或动物过量服用后会产生头晕、呕吐等中毒症状。所以, 在产品加工过程中, 要对原材料进行脱毒处理, 对中间品和成品中的皂苷含量都要进行严格的控制, 所以对海星皂苷含量进行准确测定就显得尤为重要。目前, 海星皂苷的定量是皂苷研究中的最大难题, 因皂苷的本身没有紫外吸收, 无专一性显色剂, 直接测定的难度较大。对海星的研究开发迫切需要建立一个快速、简便、重复性较好、灵敏度高的分析

方法。为寻找简便的海星皂苷含量的测定方法, 本研究工作应用其能与香草醛-硫酸试剂起显色反应^[4], 来检测海星(罗氏海盘车 *Asterias rollestoni* Bell 和海燕 *Asterina pectinifera*) 中皂苷的总含量, 确定了理想的测定条件, 建立了一种快速、简便的海星皂苷的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料与仪器

材料: 罗氏海盘车 *Asterias rollestoni* Bell 和海燕 *Asterina pectinifera* 于 2004 年 4 月采自青岛领域。新鲜时洗净泥沙, 冷冻保存。使用时剪成块状, 置于 60 烘箱内真空烘干, 研成粉末, 过 80 目筛, 置于干燥器中备用。

仪器: 7530G 紫外-可见分光光度计; 电热恒温水浴锅; CQ50 超声波清洗器; CS101-1A 型电热鼓风干燥箱。

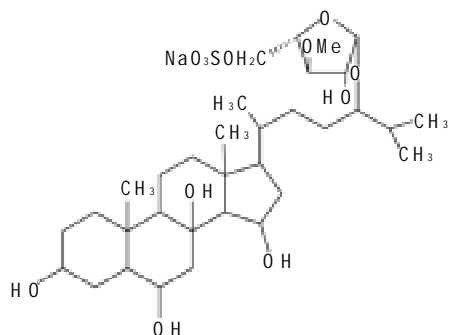
收稿日期: 2005-10-13

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(2005BS11014)

作者简介: 张立新(1968-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。

1.1.2 试剂

海星皂苷标准品 D262 为本实验室自行制备, 结构如下:



0.18mg/ml 标准品皂苷甲醇溶液: 准确称取 18mg 标准品皂苷溶于 100ml 容量瓶中, 加甲醇定容到刻度。

香草醛、浓硫酸、95% 乙醇、甲醇、石油醚等试剂均为分析纯。

1.2 比色条件的选择

1.2.1 最大吸收波长的确定

准确量取 0.5ml 0.18mg/ml 的标准皂苷溶液于具塞试管中, 在 55℃ 水浴中蒸干甲醇, 后加入 0.5ml 蒸馏水, 加入 26% 香草醛乙醇溶液 0.5ml, 于冰水浴中加入 75% 硫酸 5ml, 摇匀, 盖好瓶塞于 55℃ 水浴中加热 25min。取出摇匀, 于冰水浴中冷却 10min, 室温下放置 20min 后, 以试剂空白为参比, 用 7530G 紫外-可见分光光度计在 200nm 到 800nm 波长范围内扫描测定吸收光谱, 发现最大吸收波长为 584nm, 其它条件实验均在此最大波长下进行。

1.2.2 香草醛浓度对显色反应的影响

取 0.5ml 0.18mg/ml 的皂苷溶液于具塞试管中, 操作方法同 1.2.1, 只改变香草醛浓度, 分别为 8%、16%、20%、22%、24%、26%、28%、30%。测定样品在 584 nm 处的吸光度。

1.2.3 硫酸浓度对显色反应的影响

取 0.5ml 0.18mg/ml 的皂苷溶液于具塞试管中, 操作方法同 1.2.1, 只改变硫酸浓度, 分别为 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%。测定样品在 584nm 处的吸光度。

1.2.4 加热温度对显色反应的影响

取 0.5ml 0.18mg/ml 的皂苷溶液于具塞试管中, 操作方法同 1.2.1, 于 35、40、45、50、55、60、65 加热 25min, 取出摇匀, 于冰水浴中冷却 10min, 放置 20min 后, 于 584nm 处测定吸光度。

1.2.5 加热时间对显色反应的影响

取 0.5ml 0.18mg/ml 的皂苷溶液于具塞试管中, 操作方

法同 1.2.1, 于 55℃ 水浴中加热不同时间, 分别为 10、15、20、25、30、35、40min, 在 584nm 处测定吸光度。

1.2.6 放置时间对显色反应的影响

取 0.5ml 0.18mg/ml 的皂苷溶液于具塞试管中, 操作方法同 1.2.1, 于 55℃ 水浴中加热 25min 后, 在室温中分别放置 0、10、20、30、60、120、180min, 在 584 nm 处测定吸光度。

1.3 样品测定

1.3.1 标准曲线制作

分别量取 0.18mg/ml 的标准品皂苷溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2ml, 于具塞试管中, 操作方法同 1.2.1, 在 584nm 处测定吸光度。

1.3.2 海星皂苷的提取及待测液的制备

1.3.2.1 海星皂苷易溶于甲醇和乙醇, 考虑到甲醇有毒性, 本测定采用 85% 乙醇作为提取溶剂。准确称取罗氏海盘车和海燕样品各 5g, 分别置于烧杯中, 各加入 200ml 85% 乙醇超声清洗机中超声提取 1h, 抽滤, 滤液于旋转蒸发仪上蒸干。

1.3.2.2 残渣加 100ml 蒸馏水混溶后, 倒入分液漏斗中, 用 300ml 石油醚脱脂。

1.3.2.3 分出水层, 用 1g 活性炭吸附以除去色素, 过滤后得极浅色澄清溶液。

1.3.2.4 溶液减压蒸干后用甲醇定容于 10ml, 待测。

1.3.3 测定与精密度实验

分别准确吸取罗氏海盘车、海燕提取液各 1ml, 操作方法同 1.2.1, 在 584nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算总皂苷的含量, 平行测定 6 份, 计算测定的精密度。

1.3.4 回收率测定

分别准确吸取罗氏海盘车、海燕提取液 0.5ml, 各 6 份, 分别加入不同量的标准皂苷, 操作方法同 1.2.1, 在 584nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算回收率。

2 结果与分析

2.1 显色条件的选择

2.1.1 最大吸收波长的确定

香草醛—硫酸能与海星皂苷反应形成特征的灰绿色, 其反应机理可能是皂苷在强氧化性酸的作用下脱氢, 氧化后再与香草醛加成。紫外可见吸收光谱扫描结果表明, 海星皂苷与香草醛—硫酸体系显色后的最大吸收波长是 584nm。选择此波长为测定波长。

2.1.2 香草醛浓度对显色反应的影响

由图 1 可见, 吸光度开始时随香草醛浓度增加而变大, 当香草醛浓度为大于 22% 时, 吸光度趋于稳定,

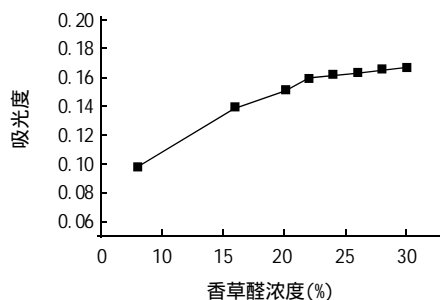


图1 香草醛浓度对吸光度的影响

Fig.1 Effects of Vanillin concentration on the absorption

选择 2.6% 香草醛乙醇溶液作为显色剂。

2.1.3 硫酸浓度对显色反应的影响

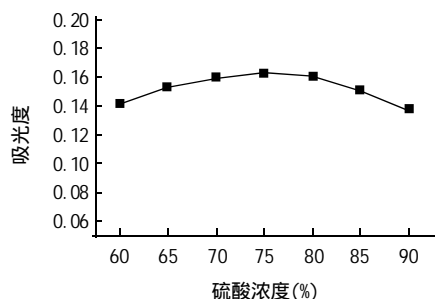


图2 硫酸浓度对吸光度的影响

Fig.2 Effects of sulfuric acid concentration on the absorption

由图 2 表明, 吸光度先随硫酸浓度增大而稍有增加, 之后又有所下降, 但整体变化不大, 当硫酸浓度在 70% ~ 80% 之间时, 吸光度变化曲线平缓, 本方法选择 75% 硫酸溶液与 2.6% 香草醛乙醇溶液共同作为显色剂。

2.1.4 加热温度对显色反应的影响

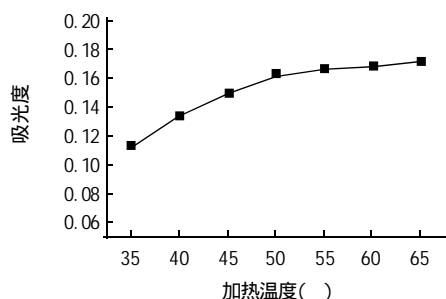


图3 加热温度对吸光度的影响

Fig.3 Effects of heating temperature on the absorption

由图 3 表明, 随加热温度的升高, 吸光度开始时有所增加, 而加热温度在 50 ~ 60 °C 时, 吸光度变化趋于平缓, 本方法控制加热温度为 55 °C。

2.1.5 加热时间对显色反应的影响

由图 4 可知, 吸光度开始时随加热时间增长而变大, 20min 后变化极小, 本方法选择加热时间为 25min。

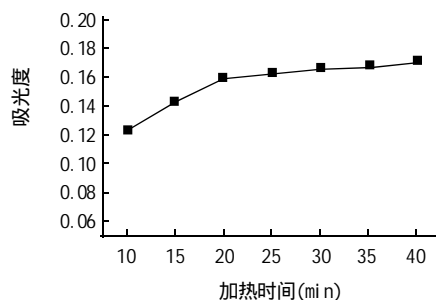


图4 加热时间对吸光度的影响

Fig.4 Effects of heating time on the absorption

2.1.6 放置时间对显色反应的影响

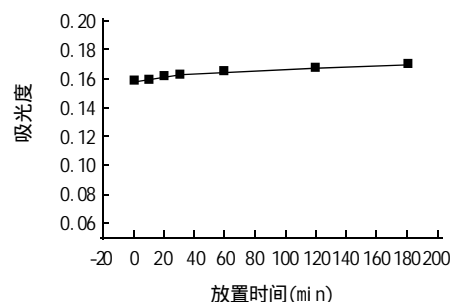


图5 放置时间对吸光度的影响

Fig.5 Effects of disposing time on the absorption

海星皂苷显色后立即放入冰水浴中冷却, 冷却后在室温下放置不同时间测定吸光度, 由图 5 表明, 放置时间对吸光度影响不是很明显, 显色后的溶液十分稳定, 本实验选择放置 20min 后测定。

通过以上实验, 选定比色条件为: 样品在 55 °C 水浴中蒸干甲醇后加入 0.5ml 蒸馏水, 2.6% 香草醛乙醇溶液 0.5ml, 于冰水浴中加入 75% 硫酸 5ml, 摇匀后, 于 55 °C 水浴中加热 25min, 取出摇匀, 于冰水浴中冷却 10min, 室温放置 20min 后, 于 584nm 检测。

2.2 样品测定

2.2.1 标准曲线的制作

经回归分析, 标准曲线的方程为 $Y=0.006+0.00187X$, 相关系数 $R=0.99978$ 。皂苷含量在 30 ~ 216g/ml 范围内线

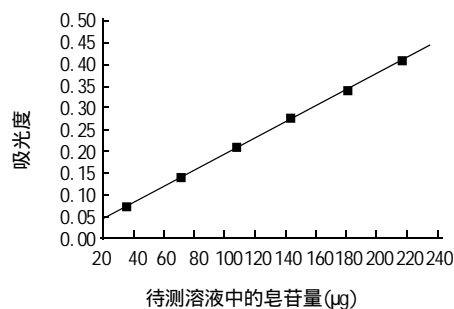


图6 标准曲线

Fig.6 Standard curve

性关系非常好。

2.2.2 测定与精密度实验结果

表1 罗氏海盘车中总皂苷的含量
Table 1 Total contents of asterosaponins from *Asterias rollestoni*

样品号	皂苷量(μg)	含量(%)	平均含量(%)	标准偏差	CV(%)
1	125.003	0.0250	0.0251	1.38×10^{-6}	0.55
2	125.003	0.0250			
3	125.531	0.0251			
4	124.475	0.0249			
5	125.003	0.0250			
6	126.587	0.0253			

表2 海燕中总皂苷的含量
Table 2 Total contents of asterosaponins from *Asterias pectinifera*

样品号	皂苷量(μg)	含量(%)	平均含量(%)	标准偏差	CV(%)
1	156.687	0.0313	0.0313	1.03×10^{-6}	0.33
2	156.159	0.0312			
3	156.687	0.0313			
4	156.687	0.0313			
5	157.215	0.0314			
6	157.743	0.0315			

6次重复测定计算皂苷的平均含量分别为罗氏海盘车0.0251%，海燕0.0313%。6次测定的RSD分别为0.55%和0.33%，重现性很好，说明此测定方法准确可靠。

表3 罗氏海盘车样品测定回收率
Table 3 Recovery rate of the determination of *Asterias rollestoni*

样品号	标准皂苷加入量(μg)	皂苷测出量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	标准偏差	CV(%)
1	54.0	115.498	97.87	99.31	0.0389	3.92
2	54.0	114.970	96.89			
3	72.0	131.228	95.25			
4	72.0	132.812	97.45			
5	90.0	156.687	104.49			
6	90.0	156.159	103.90			

表4 海燕样品测定回收率

Table 4 Recovery rate of the determination of *Asterias rollestoni*

样品号	标准皂苷加入量(μg)	皂苷测出量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	标准偏差	CV(%)
1	25.0	102.824	97.60	97.57	0.0313	3.21
2	25.0	104.352	103.71			
3	75.0	149.766	95.12			
4	75.0	150.277	95.80			
5	125.0	198.708	96.23			
6	125.0	199.652	96.98			

2.2.3 回收率测定

6次重复测定的平均加标回收率分别为罗氏海盘车99.31%，海燕97.57%，结果说明此方法能够准确地测定海星中总皂苷的含量。

总之，本文对海星皂苷的含量测定方法和测定条件进行了摸索和研究，应用其能与香草醛-硫酸体系显色，来检测海星皂苷的含量。通过对香草醛浓度、硫酸浓度、加热温度、加热时间和放置时间等影响条件的系统研究，找出了合适的显色条件。实验表明，用26%香草醛乙醇溶液加75%硫酸作显色剂，于55℃水浴中加热25min，再于冰水浴中冷却10min，室温放置20min后，于584nm测定吸光度，用本实验室自制的纯品海星皂苷作标准对照，标准曲线具有很好的线性关系。用本方法测得罗氏海盘车和海燕中皂苷总含量分别为0.0251%和0.0313%，RSD分别为0.55和0.33，加标回收率分别为99.31%和97.57%。此方法是一种快速、简便、准确的海星总皂苷的测定方法。

参考文献：

- [1] 徐均望, 张天民, 郭占明, 等. 海星综合利用的研究[J]. 齐鲁渔业, 1995, 12(1): 38-41.
- [2] 张成业, 张良树, 王竞华, 等. 海洋生物保健品“金海星”口服剂: 中国, 93116535.0[P].
- [3] 徐均望, 张天民, 郭占明, 等. 海星制品: 中国, 97105863.6[P].
- [4] 魏有良, 陈志兴. 土贝母皂苷原料及其注射液出土贝母总皂苷的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 1999, 16(1): 41-43.



美国研究人员发明一种快速检测细菌新方法

美国珀杜大学的研究人员发明了一种新方法，可快速并精确地检测出包括大肠杆菌和沙门氏菌在内的细菌。

利用质谱仪等常用方法来检测和分析细菌往往需要几个小时的时间，因为样本需要经过一系列步骤处理后才能用于检测。新方法虽然也要用到质谱仪，但省去了对样本的繁琐处理过程，仅用不到1min就可检测出细菌。

珀杜大学发布的消息说，利用这种名为“解吸电喷雾离子法”的新方法，研究人员不仅能够检测出仅有1毫微克(1毫微克相当于10亿分之一克)的细菌，还可以确认细菌的亚种。

研究人员称，这项成果可望用于分析食品、实验室培养物以及对医院、地铁站和机场空气中的细菌进行检测。他们的有关论文将正式发表在2007年1月7日出版的《化学通讯》杂志上。