

## 4 种石磺科贝类的胆甾醇含量测定

孙变娜<sup>1,2</sup>, 沈和定<sup>1</sup>, 吴洪喜<sup>2,3</sup>, 姚理想<sup>1</sup>

(1.上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005; 3. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005)

**摘要:** 将瘤背石磺(*Onchidium struma*)、里氏拟石磺(*Paraoncidium reevesii*)、平疣桑椹石磺(*Platevindex mortoni*)和紫色疣石磺(*Peronia verruculata*)样品, 经活体解剖取四种石磺肌肉组织, 运用高效液相色谱法对其可食部分进行了胆甾醇含量测定。结果表明: 瘤背石磺胆甾醇平均浓度最高, 达 5 870.00 mg/kg; 平疣桑椹石磺、紫色疣石磺、里氏拟石磺的胆甾醇平均质量分别为 3 480.00、388.00、316.00 mg/kg, 统计分析显示四种石磺可食部分的胆甾醇含量差异显著。

**关键词:** 石磺; 高效液相色谱法; 胆甾醇; 含量测定

中图分类号: TS254.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)01-0024-05

doi: 10.11759/hyxx20140513002

石磺科(Onchidiidae)隶属软体动物门(Mollusca), 腹足纲(Gastropoda), 肺螺亚纲(Pulmonata), 缩眼目(Systellommatophora), 石磺总科(Onchidiidae); 该科贝类身体柔软无贝壳, 其出肉率很高, 广泛分布于印度-太平洋沿岸的河口海域, 大多栖息于浅海、潮间带或高潮带的岩礁、红树林、芦苇丛、大米草滩等沿岸湿地及潮上带, 且适应性强、资源量比较丰富、食用历史悠久<sup>[1-2]</sup>。在中国海洋药物辞典中有如下记载: 石磺别名土海参, 四季捕捞, 捕后洗净, 除去内脏, 取肉鲜用; 肉入药, 有滋补强壮之功效; 主治肝硬化、久病体虚等症状<sup>[3]</sup>。目前国内对外对石磺的研究主要集中在系统分类<sup>[1, 4-6]</sup>、生物学特性<sup>[7-8]</sup>、受精机制<sup>[9]</sup>、繁殖<sup>[10-11]</sup>、胚胎发育<sup>[12-13]</sup>、神经系统<sup>[14]</sup>、营养价值<sup>[15-16]</sup>、化学成分研究<sup>[17]</sup>等, 而关于石磺胆甾醇含量的研究少之又少。胆甾醇是维持人体正常新陈代谢不可缺少的原料, 是抗老防衰、延年益寿的重要物质之一; 它不仅是构成细胞膜的重要组成成分, 而且是合成胆汁酸, 维生素 D 以及甾体激素的原料。本文运用高效液相色谱法对瘤背石磺(*Onchidium struma*)、里氏拟石磺(*Paraoncidium reevesii*)、平疣桑椹石磺(*Platevindex mortoni*)、紫色疣石磺(*Peronia verruculata*)的可食部分进行胆甾醇的含量测定, 以期能为各种石磺的科学利用及产品开发提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料与仪器

材料: 2013 年 5 月至 7 月, 采集瘤背石磺(*Onchi-*

*dium struma*)(上海崇明)、里氏拟石磺(*Paraoncidium reevesii*)、平疣桑椹石磺(*Platevindex mortoni*)(福建厦门)和紫色疣石磺(*Peronia verruculata*)样品(广东湛江), 凭证标本 (No. 13LB-6)、(No. 13LS-6)、(No. 13PY-6)、(No. 13DS-6)超低温(-80℃)保存在上海海洋大学海洋贝类实验室。取 4 种石磺, 解剖去除内脏后获取可食部分的足和外套膜, 用液氮研磨或剪切成粉末状, 冷冻保存待用。

试剂: 胆甾醇标准品(Sigma 产品); 甲醇为色谱纯(Fisher 公司); 其他药品、试剂均为国产分析纯。

仪器: 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-M20A 二极管阵列检测器; Agilent Zorbax 300B-C18(4.6mm×250mm, 5μm)(美国 Agilent 公司); 双列六孔恒温水浴锅(上海慧泰仪器制造有限公司); KQ-50B 舒美超声波清洗器(上海骥辉科学分析仪器有限公司); AUY120 型电子分析天平(广州湘仪机电设备有限公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 供试样品溶液的制备

准确称取瘤背石磺、里氏拟石磺、紫色疣石磺、平

收稿日期: 2014-05-13; 修回日期: 2014-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(41276157), 上海高校水产学一流学科建设项目

作者简介: 孙变娜(1990-), 女, 硕士研究生; 主要从事海洋生物资源研究与开发, E-mail: sun1998521@126.com; 沈和定, 通信作者, 博士, 教授; 电话: 021-61900446; E-mail: hdshen@shou.edu.cn

疣桑椹石磺四种石磺可食部分切碎的鲜冻品各 10.0 g, 分别置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 各贴上标签, 分别加三氯甲烷与甲醇(体积比 2:1)混合液 125 mL, 进行超声波提取 2 次, 每次 20 min, 用快速滤纸过滤, 用混合液多次洗涤滤纸及残渣, 并收集滤液和洗液, 置入 250 mL 具塞圆底烧瓶, 添加无水乙醇 25 mL 和 500 g/L 氢氧化钾溶液 6 mL, 于 60~65℃ 水浴中皂化 45 min, 期间不断振摇; 皂化结束后, 稍冷后加入 25 mL 50 g/L 氯化钠溶液, 混匀后加入 37.5 mL 乙醚萃取 3 次, 将乙醚溶液置于 250 mL 分液漏斗中, 加少量水多次洗涤提取液(至洗涤液为中性), 用无水硫酸钠对提取液脱水, 旋转蒸发溶剂后, 用甲醇定容至 100 mL, 混匀, 即得各供试品溶液。

### 1.2.2 胆甾醇对照品溶液的配制

精密称取胆甾醇标准品 51 mg, 倒入 50 mL 量瓶中, 添加适量甲醇, 进行超声波溶解, 再滴加甲醇至刻度, 摇匀得 1.02 g/L 的胆甾醇标准品溶液。

### 1.2.3 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax 300SB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇; 流速 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 35℃。紫外检测器波长: 204 nm。

### 1.2.4 定量测定及数据分析

精确吸取胆甾醇标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 各置于 2 mL 量瓶中, 滴加甲醇定容至刻度, 摇匀即得各浓度的标准液。运用外标定量法, 根据标准曲线方程计算各样品中的胆甾醇含量。

数据分析采用 SPSS 17.0 软件, 所有实验数据用平均值±标准差(Mean±SE)表示, 用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行方差分析, 并进行 Duncan 多重比较。分析显著性水平设置为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 胆甾醇标准曲线绘制

取一系列质量浓度不同的胆甾醇对照品溶液, 从低浓度到高浓度, 依次进样 20 μL, 每个浓度进样 3 次, 按上述 1.2.3 项下色谱条件进行 HPLC 分析, 测定出峰面积。以胆甾醇质量浓度  $X(\text{g/L})$  为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 绘制标准曲线图(图 1)。

由图 1 可知, 胆甾醇浓度在 0.102~0.510 g/L 范围内峰面积与浓度的线性回归方程为,  $y = 3874835.84x + 62628.36$ , 相关系数  $R^2$  为 0.993 4, 表明胆甾醇在此质量浓度范围内的线性关系良好。

### 2.2 精密度实验

精密吸取胆甾醇对照品溶液 20 μL, 按 1.2.3 节

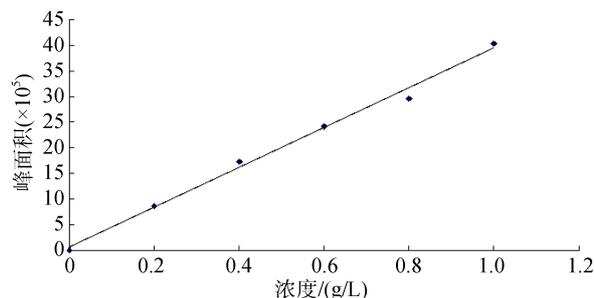


图 1 胆甾醇标准曲线

Fig.1 Standard curve of cholesterol

色谱条件下进行 HPLC 分析, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 胆甾醇峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.72%, 结果表明仪器精密度良好。

### 2.3 稳定性实验

分别精密吸取 4 种石磺的供试品溶液 20 μL, 按 1.2.3 节色谱条件下分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 测定 4 种石磺胆甾醇的峰面积, 结果瘤背石磺胆甾醇的 RSD 为 0.82%、里氏拟石磺的胆甾醇 RSD 为 1.03%、紫色疣石磺的胆甾醇 RSD 为 1.25%、平疣桑椹石磺的胆甾醇 RSD 为 0.77%, 表明 4 种石磺供试品溶液在 8 h 内较稳定。

### 2.4 加标回收率实验

精密称取已知含量的 4 种石磺 5 g, 分别准确加入不同质量浓度的胆甾醇对照品溶液, 按 1.2.1 制备供试样品溶液, 按 1.2.3 节的色谱条件进行 HPLC 测定。各加标量平行测定 5 次, 利用差减法求出胆甾醇的回收率, 用外标法计算测定值, 通过比较测定值与理论值, 计算回收率。结果瘤背石磺、里氏拟石磺、紫色疣石磺、平疣桑椹石磺这 4 种石磺胆甾醇的平均回收率分别为 102.30%、97.60%、98.57%、96.71%。

### 2.5 4 种石磺胆甾醇的含量测定

4 种石磺各取 3 批样品, 按 1.2.1 节方法分别制备供试品溶液, 按 1.2.3 节色谱条件进行 HPLC 测定并计算含量。样品中胆甾醇的出峰时间为 4.66 min, 图 2~图 5 为 4 种石磺测定的色谱图; 表 1 为 4 种石磺胆甾醇平均含量、质量浓度表。

由表 1 知, 瘤背石磺可食部分胆甾醇的平均质量浓度为 5 870.00 mg/kg, 平疣桑椹石磺的胆甾醇平均质量浓度为 3 480.00 mg/kg, 里氏拟石磺的胆甾醇平均质量浓度为 316.00 mg/kg, 紫色疣石磺的胆甾

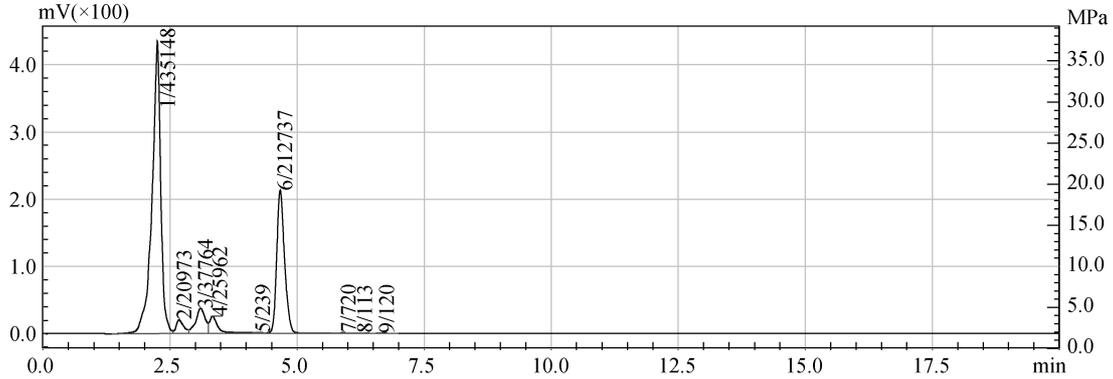


图 2 瘤背石磺样品测定的色谱图

Fig. 2 The chromatograms for determination of *Onchidium struma*

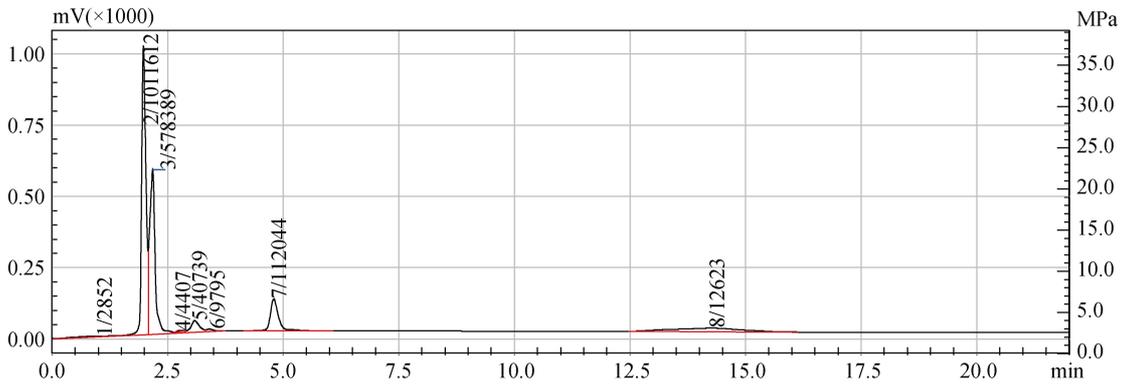


图 3 平疣桑椹石磺样品测定的色谱图

Fig.3 The chromatograms for determination of *Platevindex mortoni*

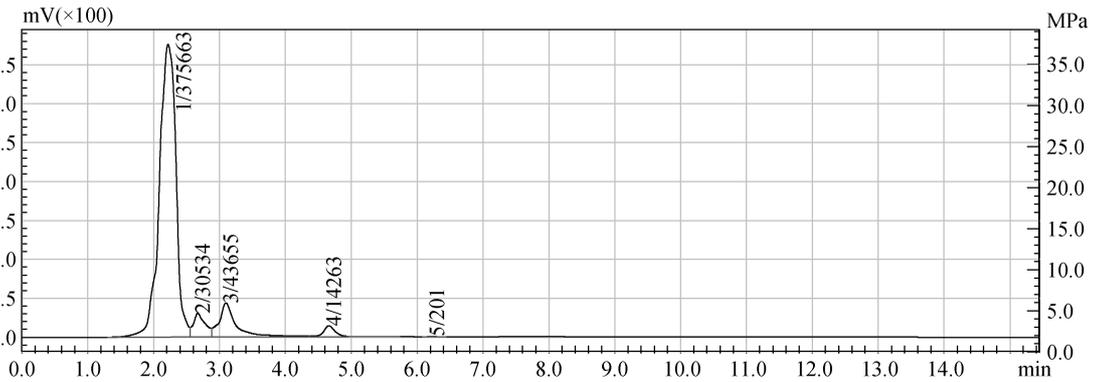


图 4 里氏拟石磺样品测定的色谱图

Fig. 4 The chromatograms for determination of *Paraoncidium reevesii*

醇平均质量浓度为 388.00 mg/kg。

分别将 4 种石磺 3 次测试液中胆甾醇平均质量浓度(表 1)进行差异显著性分析。统计分析结果显示, 四种石磺的胆甾醇含量存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

曾报道过使用高效液相色谱-蒸发光散射检测器<sup>[18]</sup>、

电化学检测器<sup>[19]</sup>测定胆甾醇含量的研究。本实验使用紫外检测器的高效液相色谱法, 达到了良好的分离效果。该方法简便、快速、准确, 灵敏度高, 分析时间短, 能快速检测石磺中的胆甾醇。

本研究用高效液相色谱法(HPLC)测了四种石磺可食部分中的胆甾醇含量, 检测得到胆甾醇标准品含量在 0.102~0.510 g/L 范围内与峰面积值的线性

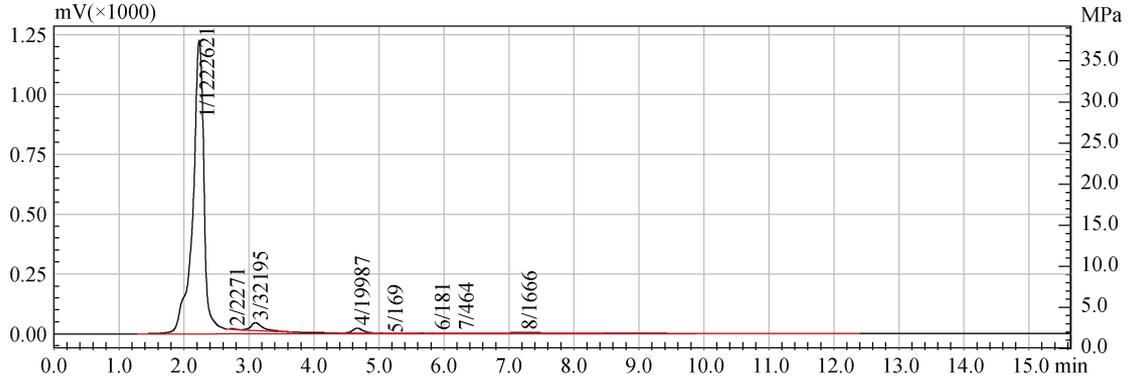


图 5 紫色疣石磺样品测定的色谱图

Fig.5 The chromatograms for determination of *Peronia verrucolata*

表 1 四种石磺胆甾醇的质量浓度

Tab.1 Contents of cholesterol in four species of Onchidiidae

样品	编号	胆甾醇质量浓度(g/L)		RSD(%)	换算后胆甾醇质量浓度(mg/kg)	
		测试值	平均值		测试值	平均值
瘤背石磺	1	0.5850			5850.00	
	2	0.5870	0.5870 ± 0.0015	1.6	5870.00	5870.00
	3	0.5880			5880.00	
平疣桑椹石磺	1	0.3530			3530.00	
	2	0.3490	0.3480 ± 0.0056	0.26	3490.00	3480.00
	3	0.3420			3420.00	
里氏拟石磺	1	0.0312			312.00	
	2	0.0316	0.0316 ± 0.0004	1.1	316.00	316.00
	3	0.0319			319.00	
紫色疣石磺	1	0.0388			388.00	
	2	0.0387	0.0388 ± 0.0001	0.15	387.00	388.00
	3	0.0388			388.00	

关系良好, 相关系数  $R^2$  为 0.993 4; 标准曲线比较完美。其中瘤背石磺可食部分胆甾醇的平均质量浓度最高, 为 5 870.00 mg/kg; 平疣桑椹石磺可食部分的胆甾醇平均含量为 3 480.00 mg/kg; 里氏拟石磺可食部分的胆甾醇平均含量为 316.00 mg/kg; 紫色疣石磺可食部分的胆甾醇平均含量为 388.00 mg/kg。

瘤背石磺和平疣桑椹石磺的胆甾醇含量明显高于里氏拟石磺和紫色疣石磺, 造成这种差异的可能原因或许与瘤背石磺、平疣桑椹石磺均栖息于高潮带和潮上带的红树林、滩涂及湿地, 它们皮肤的保湿能力强, 能长时间离开河口水域, 其生活习性和食性基本相同; 而紫色疣石磺与里氏拟石磺则生活中潮带滩涂, 生活区域、生活习性和食性均不同于前两者。推测四种石磺可食部分中的胆甾醇含量受生活环境和食性的影响较大, 其差异原因值得深入探究。

同时四种石磺之间胆甾醇含量的巨大差异能为石磺产品开发、资源综合利用提供良好的理论依据。

参考文献:

- [1] 沈和定. 中国大陆沿海石磺生物学实验研究及系统分类[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009: 112.
- [2] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 石磺营养价值、活性物质的研究现状及开发前景[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 14-17.
- [3] 姜凤梧, 张玉顺. 中国海洋药物辞典[M]. 北京: 海洋出版社, 1994: 81.
- [4] Sun Bianna, Chen Cheng, Shen Heding, et al. Species diversity of Onchidiidae (Eupulmonata: Heterobranchia) on the mainland of China based on molecular data [J]. Molluscan Research, 2014, 34(1): 62-70.

- [5] 陈诚. 基于三种基因的中国石磺科系统分类及瘤背石磺亲缘地理学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 25.
- [6] Dayrat B, Zimmermann S, Raposa M. Taxonomic revision of the Onchidiidae (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) from the Tropical Eastern Pacific [J]. *Journal of Natural History*, 2011, 45(15-16): 939-1003.
- [7] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海 4 种石磺形态学比较[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(6): 92-100.
- [8] 黄金田, 沈伯平, 王资生. 瘤背石磺的生态习性观察[J]. *海洋渔业*, 2004, 26(2): 103-109.
- [9] 吴杨平, 沈和定, 吴永宁. 石磺精子利用规律的初步研究[J]. *热带海洋学报*, 2009(1): 67-73.
- [10] 滕炜鸣, 吴旭干, 唐伯平, 等. 瘤背石磺滩涂生态繁殖的初步研究[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(3): 214-220.
- [11] 沈和定, 陈汉春, 陈贤龙, 等. 石磺繁殖生物学的实验研究[J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 753-760.
- [12] 沈和定, 陈贤龙, 陈汉春, 等. 水温对石磺胚胎发育的影响[J]. *水产学报*, 2006, 29(6): 776-782.
- [13] 沈和定, 陈汉春, 陈贤龙, 等. 盐度对石磺胚胎发育的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(3): 297-302.
- [14] Tsukasa G. Role of cyclic nucleotides in the long-lasting histaminergic inhibition in the mollusc, *Onchidium neuron* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 1988, 91(1): 75-78.
- [15] 黄金田, 王爱民. 瘤背石磺营养成分分析及品质评价[J]. *海洋科学*, 2008, 32(11): 29-35.
- [16] 管菊, 沈和定, 钱静, 等. 四种石磺营养成分分析及价值评价[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(17): 349-353.
- [17] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 紫色疣石磺化学成分分离与鉴定[J]. *中国药房*, 2014, 25(11): 1019-1021.
- [18] Kazuhiro Hojo, Hideki Hakamata, Ayumi Ito, et al. Determination of total cholesterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1166(1): 135-141.
- [19] 孙塞龙, 赵志萍, 谢建龙, 等. 高效液相色谱法检测蛋黄卵磷脂中胆甾醇的含量[J]. *精细化工中间体*, 2003, 33(4): 52-53.

## Determination of cholesterol content in four species of Onchidiidae

SUN Bian-na<sup>1, 2</sup>, SHEN He-ding<sup>1</sup>, WU Hong-xi<sup>2, 3</sup>, YAO Li-xiang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 3. Zhejiang Key Lab of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Wenzhou 325005, China)

**Received:** May, 13, 2014

**Key words:** Onchidiidae; cholesterol; HPLC; content determination

**Abstract:** In this paper, the contents of cholesterol in four species of Onchidiidae include *Onchidium struma*, *Paraoncidium reevesii*, *Platevindex mortoni* and *Peronia verruculata* were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results show that the average cholesterol content of *O. Struma*, *P. Mortoni*, *P. Verruculata* and *P. reevesii* was 5 870.00 mg/kg, 3 480.00 mg/kg, 388.00 mg/kg and 316.00 mg/kg, respectively. Statistical analysis shows that the content of cholesterol in the edible part of four species has significant difference.

(本文编辑: 康亦兼)