



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808856 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410034888. 0

(22) 申请日 2014. 01. 24

(71) 申请人 山东师范大学

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路  
88 号

(72) 发明人 马善利 刘代成

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限  
公司 37221

代理人 彭成

(51) Int. Cl.

G01N 30/90(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

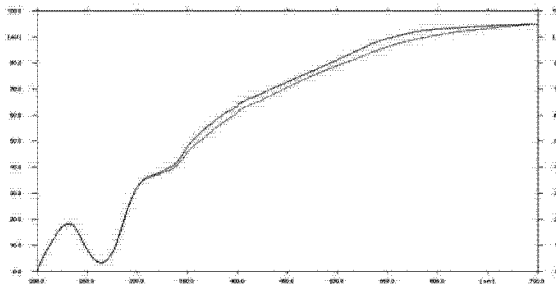
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种从南极磷虾中提取己烯雌酚的方法及高效薄层层析扫描检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从南极磷虾中提取己烯雌酚的方法及高效薄层层析扫描检测方法,以南极磷虾为原料,用甲醇提取,过滤后用旋蒸仪蒸干滤液,得到含己烯雌酚的粗提物。南极磷虾己烯雌酚的检测采用高效薄层层析扫描法,展开剂为体积比为四氯化碳:乙酸乙酯:丙酮:冰醋酸:甲苯:环己烷=78-80:9-11:9-11:2-4:3d:2d的混合液,染色剂为10%硫酸乙醇溶液。用CAMAG薄层层析扫描仪-III,以400nm吸收波长扫描检测,通过检测样品和标准品的吸光度计算得到己烯雌酚的含量,该方法操作简单、快速、准确、可靠。



1. 一种己烯雌酚的高效薄层层析扫描检测方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 取待检测的样品液和  $1.0\text{mg mL}^{-1}$  的标准液  $5\mu\text{L}$  点于同一块  $\text{GF}_{254}$  高效薄层硅胶板上,以体积比为四氯化碳:乙酸乙酯:丙酮:冰醋酸:甲苯:环己烷 = 78-80:9-11:9-11:2-4:3d:2d 的混合液为展开剂,在展开缸内展开,展距为 9.5cm,展完后晾干展板;

(2) 用 10% 硫酸乙醇溶液染色,然后置于  $100^{\circ}\text{C}$  -  $110^{\circ}\text{C}$  条件下烘烤 5-10 分钟;

(3) 用 CAMAG 薄层扫描仪 - III 扫描,扫描波长 400nm,通过检测样品和标准品的吸光度计算得到己烯雌酚的含量。

2. 如权利要求 1 所述的己烯雌酚的高效薄层层析扫描检测方法,其特征在于,所述样品液是通过将己烯雌酚粗提物溶于 5mL 甲醇中制得。

3. 如权利要求 1 所述的己烯雌酚的高效薄层层析扫描检测方法,其特征在于,所述步骤 1) 中在展开缸内展开时,先将展开剂在室温条件下预平衡 35-45 分钟,再放入高效薄层板,继续在室温条件下展开,当展距达到 4.5cm 时,取出薄层板,室温下晾干 10 分钟,再将薄层板放入展开缸中,展开到展距为 9.5cm。

4. 一种从南极磷虾中提取己烯雌酚的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 取干的南极磷虾(w)和甲醇(v)以 1:8-11 的比例在  $35^{\circ}\text{C}$ 、350w、40kHz 的条件下超声提取,过滤提取液;

(2) 将上述滤液置于旋蒸仪中蒸干,得到己烯雌酚的粗提物。

## 一种从南极磷虾中提取己烯雌酚的方法及高效薄层层析扫描检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种从南极磷虾中提取己烯雌酚的方法及高效薄层层析扫描检测方法。

### 背景技术

[0002] 己烯雌酚分子式为  $C_{18}H_{20}O_2$ ，分子量为 268.35 道尔顿，又称女性素、人造求偶素等，属于雌激素类物质，与天然雌二醇具有相同药理与治疗作用，可用于治疗妇科疾病、促进动物生长等。

[0003] 南极磷虾(*Euphausia superba*)，是一种生活在南极洲水域的磷虾，以群集方式生活，有时密度可达每立方米 10000-30000 只。它们以微小的浮游植物作为食物，身长大约 6cm，重约 2g，最长寿命可达 6 年。它们是南极生态系统的关键物种，若以生物质能来说，它们可能是地球上最成功的生物物种。因南极磷虾蕴藏量巨大，加上群体的生活容易捕捞，所以吸引很多国家对它进行开发。目前，南极磷虾最主要用途是作为鱼饲料。而在挪威、加拿大等国则把南极磷虾油提取出来作为保健品，价格约 2000 元 /kg。由于南极磷虾含有大量氟(约  $2400\text{mg kg}^{-1}$ )，不能直接食用。因而，以南极磷虾为原料，开发天然药物，对其综合利用，具有广阔的应用前景。

[0004] 己烯雌酚的检测主要采用酶联免疫检测、荧光免疫分析、放射性受体测定等免疫检测的方法以及气相色谱、高效液相色谱、生物分析法进行，但是这些检测方法有如下的不足之处：检测过程耗时长、费用高、可能会引起环境污染等。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种操作简单、快速、准确、可靠的南极磷虾己烯雌酚的检测方法。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0007] 一种分析己烯雌酚的高效薄层层析扫描检测方法，步骤如下：

[0008] (1) 取待检测的样品液和  $1.0\text{mg mL}^{-1}$  的标准液  $5\mu\text{L}$  点于同一块  $\text{GF}_{254}$  高效薄层硅胶板上，以体积比为四氯化碳：乙酸乙酯：丙酮：冰醋酸：甲苯：环己烷 = 78-80 : 9-11 : 9-11 : 2-4 : 3d : 2d 的展开剂，在展开缸内展开，展距为 9.5cm，展完后晾干展板；

[0009] (2) 用 10% 硫酸乙醇溶液染色，然后置于  $100^{\circ}\text{C}$  -  $110^{\circ}\text{C}$  条件下烘烤 5-10 分钟；

[0010] (3) 用 CAMAG 薄层扫描仪 - III 扫描，扫描波长 400nm，通过检测样品和标准品吸光度计算得到己烯雌酚的含量。

[0011] 样品液是通过将己烯雌酚粗提物溶于 5mL 甲醇中制的。

[0012] 己烯雌酚粗提物的提取方法，包括以下步骤：

[0013] (1) 取干的南极磷虾(w)和甲醇(v)以 1 : 8-11 的比例在  $35^{\circ}\text{C}$ 、350w、40kHz 的条件下超声提取，过滤提取液；

[0014] (2) 将上述滤液置于旋蒸仪中蒸干, 得到己烯雌酚的粗提物。

[0015] 在展开缸内展开时, 先将展开剂在室温条件下预平衡 35-45 分钟, 再放入高效薄层板, 继续在室温条件下展开, 当展距达到 4.5cm 时, 取出薄层板, 室温下晾干 10 分钟, 再将薄层板放入展开缸中, 展开到展距为 9.5cm。

[0016] 制作标准曲线:

[0017] (1) 精密称取 1.0000mg 己烯雌酚标准品(中国食品药品检定研究院)溶于 1.0mL 甲醇, 得浓度为  $1.0\text{mg mL}^{-1}$  的标准液;

[0018] (2) 取上述配置好的己烯雌酚标准品溶液  $2\mu\text{L}$ 、 $3\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $7\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ , 点样于同一 GF<sub>254</sub> 高效薄层硅胶板, 按己烯雌酚的高效薄层层析扫描检测方法条件展开, 晾干;

[0019] (3) 用 10% 硫酸乙醇溶液染色后, 用 CAMAG 薄层扫描仪 - III, 400nm 吸收波长扫描, 经薄层扫描仪软件 wincats1.4.1 统计得到回归方程  $Y=-285.7233+643.4958X$ , 相关性系数  $r=0.99946$ ,  $RSD=2.57\%$ 。

[0020] 本发明检测己烯雌酚的高效薄层扫描检测方法, 其精密度、重复性、稳定性、回收率情况以及展开剂配方确定、染色时间及染色温度的确定、检测波长的确定如下:

[0021] 1. 精密度测定

[0022] 精密吸取样品液, 在同一块高效薄层硅胶板上水平点样  $5\mu\text{L}$ , 展开, 晾干, 用 10% 硫酸乙醇溶液染色后用 CAMAG 薄层扫描仪 - III, 以 400nm 吸收波长扫描得峰面积分别为 3234.1, 3301.3, 3256.4, 3199.2, 3260.1,  $RSD=1.15\%$ 。

[0023] 2. 重复性测定

[0024] 精密吸取样品液, 在五块高效薄层硅胶板上分别点样  $5\mu\text{L}$ , 展开, 晾干, 用 10% 硫酸乙醇溶液染色后用 CAMAG 薄层扫描仪 - III, 以 400nm 吸收波长扫描的峰面积分别为 3234.1, 3310.2, 3320.3, 3299.3, 3298.5,  $RSD=1.03\%$ 。

[0025] 3. 稳定性测定

[0026] 吸取样品液  $5\mu\text{L}$  于高效薄层板上点样, 展开, 晾干, 10% 硫酸乙醇溶液染色后用 CAMAG 薄层扫描仪 - III, 以 400nm 吸收波长扫描, 以后每隔 10 分钟扫描一次, 记录每次的峰面积, 计算相应  $RSD$  值, 多次试验证明, 染色后 20-60 分钟内比较稳定, 平均  $RSD=1.64\%$ 。具体数据如表 1 所示:

[0027] 表 1

[0028]

20min	30min	40min	50min	60min	平均 RSD
1428.9	1425.8	1394.7	1390.1	1378.7	1.60%
1470.3	1463.5	1431.5	1426.9	1417.0	1.64%
1492.4	1489.1	1454.9	1446.8	1439.1	1.68%

[0029] 4. 回收率试验

[0030] 精密吸取  $6\mu\text{L}$  样品液 3 次, 分别加入  $2.853\mu\text{g}$ 、 $5.706\mu\text{g}$ 、 $7.838\mu\text{g}$  己烯雌酚标准品, 点样, 展开, 晾干, 用 10% 硫酸乙醇溶液染色后用 CAMAG 薄层扫描仪 - III, 以 400nm 吸收波长扫描, 计算得平均回收率为 102.3%,  $RSD=0.87\%$ 。数据如表 2 所示:

[0031] 表 2

[0032]

样品量 / $\mu\text{g}$	加入标准品量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 %
5.706	2.853	8.610	101.8
5.706	5.706	11.602	103.3
5.706	8.559	14.410	101.7

[0033] 5. 展开剂配方确定

[0034] 当展开剂设定为不同的配方时,每一种组合,都进行了多次的比例调试,分离效果如表 3 所示:

[0035] 表 3

[0036]

展开剂配方	分离效果
氯仿-正己烷-甲醇	拖尾严重, Rf 值偏大, 分离效果差
氯仿-正己烷-丙酮	Rf 值合适, 但在薄层板上显示出一个较大的含有多种混合物的斑点, 样品分离效果差。
氯仿-丙酮-甲酸	分离出两个斑点, 第二个斑点拖尾严重。
氯仿-正己烷-甲苯-丙酮	样品分离出三个斑点, 且三个点 Rf 适中, 但后两个点拖尾严重。

[0037]

正己烷-甲苯-丙酮-冰乙酸	样品分离出三个点, 第一个点 Rf 偏大, 第三个点拖尾严重。
氯仿-环己烷-乙酸乙酯-丙酮-冰乙酸	样品分离出两种物质, Rf 适中, 无拖尾现象。
氯仿-丙酮-乙酸乙酯-冰乙酸-甲苯	样品分离出三种物质, Rf 适中, 一个斑点拖尾严重。
氯仿-乙酸丁酯-冰乙酸-丙酮-甲苯-环己烷	样品分离出三种物质, Rf 值合适, 且无拖尾现象, 是合适的展开剂组合。

[0038] 6. 检测波长的确定

[0039] 由图 1- 图 4 的检测样品和标准品在不同波长时的扫描图像可知,当波长设定为 400nm 时,样品与标准品波长扫描图像最为吻合。

[0040] 本发明的有益效果:

[0041] 本发明以南极磷虾为材料提取己烯雌酚,南极磷虾生物量大,以其开发天然药物,对于含量微少的物质可通过加大其基数量来进行提取研究。

[0042] 利用高效薄层层析扫描检测方法分析雌酮的含量,自动化程度高,灵敏性强。与其他检测方法相比较,高效薄层层析检测法需要更少的试剂,这对环境有着较好的保护作用;整个分析检测过程十分短暂。

[0043] 以体积比四氯化碳:乙酸乙酯:丙酮:冰醋酸:甲苯:环己烷=78-80:9-11:9-11:2-4:3d:2d的配比混合而成的展开剂,使样品液中的己烯雌酚和其他成分分离清楚,斑点圆且清晰、标准品点和样品点准确对应,Rf值为0.36,是南极磷虾中己烯雌酚展开分离的良好配方。采用硫酸乙醇溶液染色,该显色剂通用性好,且方便易得。该检测方法简单、快速、准确、可靠、稳定。

#### 附图说明

[0044] 图1为设定检测波长为600nm时检测样品和标准品的扫描图像;

[0045] 图2为设定检测波长为500nm时检测样品和标准品的扫描图像;

[0046] 图3为设定检测波长为400nm时检测样品和标准品的扫描图像;

[0047] 图4为设定检测波长为300nm时检测样品和标准品的扫描图像。

#### 具体实施方式

[0048] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0049] 实施例1

[0050] 取干南极磷虾1g,加入甲醇9mL,在35℃、350w、40kHz的超声波清洗机中超声加热提取,提取15分钟,过滤提取液,将滤液置于旋蒸仪中蒸干,得到己烯雌酚的粗提物。

[0051] 将上述制得的己烯雌酚的粗提物溶于5mL甲醇中制成样品液;精密称取1.0000mg己烯雌酚标准品(中国食品药品检定研究院)溶于1.0mL甲醇,得浓度为1mg mL<sup>-1</sup>的标准液。

[0052] 将样品液和标准液点于同一块GF<sub>254</sub>高效薄层硅胶板(10×10cm<sup>2</sup>)上,展开剂体积比为四氯化碳:乙酸乙酯:丙酮:冰醋酸:甲苯:环己烷=78:10:10:3:3d:2d,将展开剂加入展开缸(10×12×15cm<sup>3</sup>)在室温下预平衡30分钟,再放入高效薄层板,继续在室温下展开,当展距达到4.5cm时,取出薄层板,室温下晾干10分钟,再将薄层板放入展开缸中,展距9.5cm,展开结束后,将板取出晾干。用10%硫酸乙醇溶液染色,然后置于105℃下烘烤10分钟,样品液和标准品对应的点染成紫色。用CAMAG薄层扫描仪-III,以400nm的吸收波长扫描,得Rf=0.36,经检测和计算得南极磷虾中己烯雌酚含量为3.20mg g<sup>-1</sup>。

[0053] 实施例2

[0054] 取干南极磷虾1g,加入甲醇11mL,在35℃、350w、40kHz的超声波清洗机中超声加热提取,提取25分钟,将提取液过滤,将滤液置于旋蒸仪中蒸干,得到己烯雌酚的粗提物。

[0055] 将上述制得的己烯雌酚的粗提物溶于5mL甲醇制成样品液,精密称取1.0000mg己烯雌酚标准品(中国食品药品检定研究院)溶于1.0mL甲醇,得浓度为1mg mL<sup>-1</sup>的标准液。

[0056] 将样品液和标准液点于同一块GF<sub>254</sub>高效薄层硅胶板(10×10cm<sup>2</sup>)上,展开剂体积比为四氯化碳:乙酸乙酯:丙酮:冰醋酸:甲苯:环己烷=80:10:10:2:3d:2d,将展开剂加入展开缸(10×12×15cm<sup>3</sup>)在室温下预平衡35分钟,再放入高效薄层板,继续在室温下展

开,当展距达到 4.5cm 时,取出薄层板,室温下晾干 10 分钟,再将薄层板放入展开缸中,展距 9.5cm,展开结束后,将板取出晾干。用 10% 硫酸乙醇溶液染色,然后置于 105℃ 下烘烤 8 分钟,样品液和标准品对应的点染成紫色。用 CAMAG 薄层扫描仪 - III,以 400nm 的吸收波长扫描,得  $R_f=0.36$ 。经检测和计算得南极磷虾中己烯雌酚含量为  $3.18\text{mg g}^{-1}$ 。

[0057] 实施例 3

[0058] 取干南极磷虾 1g,加入甲醇 10mL,在 35℃、350w、40kHz 的超声波清洗机中超声加热提取,提取 25 分钟,将提取液过滤,将滤液置于旋蒸仪中蒸干,得到己烯雌酚的粗提物。

[0059] 将上述制得的己烯雌酚的粗提物溶于 5mL 甲醇制成样品液;精密称取 1.0000mg 己烯雌酚标准品(中国食品药品检定研究院)溶于 1.0mL 甲醇,得浓度为  $1\text{mg mL}^{-1}$  的标准液。

[0060] 将样品液和标准液点于同一块 GF<sub>254</sub> 高效薄层硅胶板 ( $10\times 10\text{cm}^2$ ) 上,展开剂体积比为四氯化碳:乙酸乙酯:丙酮:冰醋酸:甲苯:环己烷 =80:9:9:2:3d:2d,将展开剂加入展开缸 ( $10\times 12\times 15\text{cm}^3$ ) 在室温下预平衡 45 分钟,再放入高效薄层板,继续在室温下展开,当展距达到 4.5cm 时,取出薄层板,室温下晾干 10 分钟,再将薄层板放入展开缸中,展距 9.5cm,展开结束后,将板取出晾干。用 10% 硫酸乙醇溶液染色,然后置于 105℃ 下烘烤 5 分钟,样品液和标准品对应的点染成紫色。用 CAMAG 薄层扫描仪 - III,以 400nm 的吸收波长扫描,得  $R_f=0.36$ 。经检测和计算得南极磷虾中己烯雌酚含量为  $3.17\text{mg g}^{-1}$ 。

[0061] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

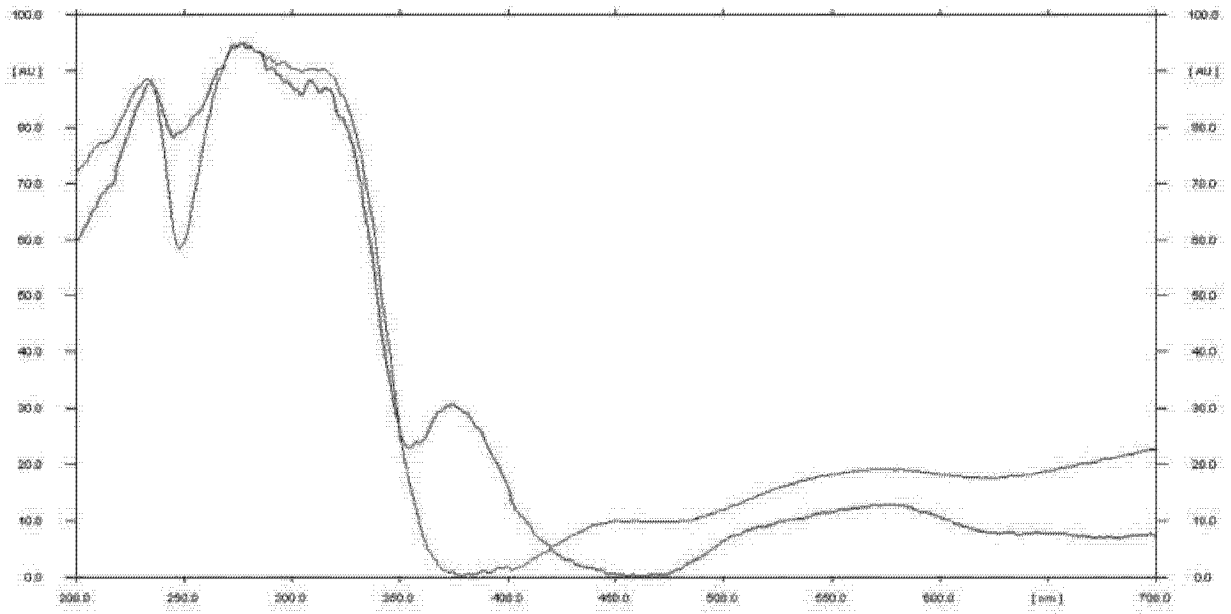


图 1

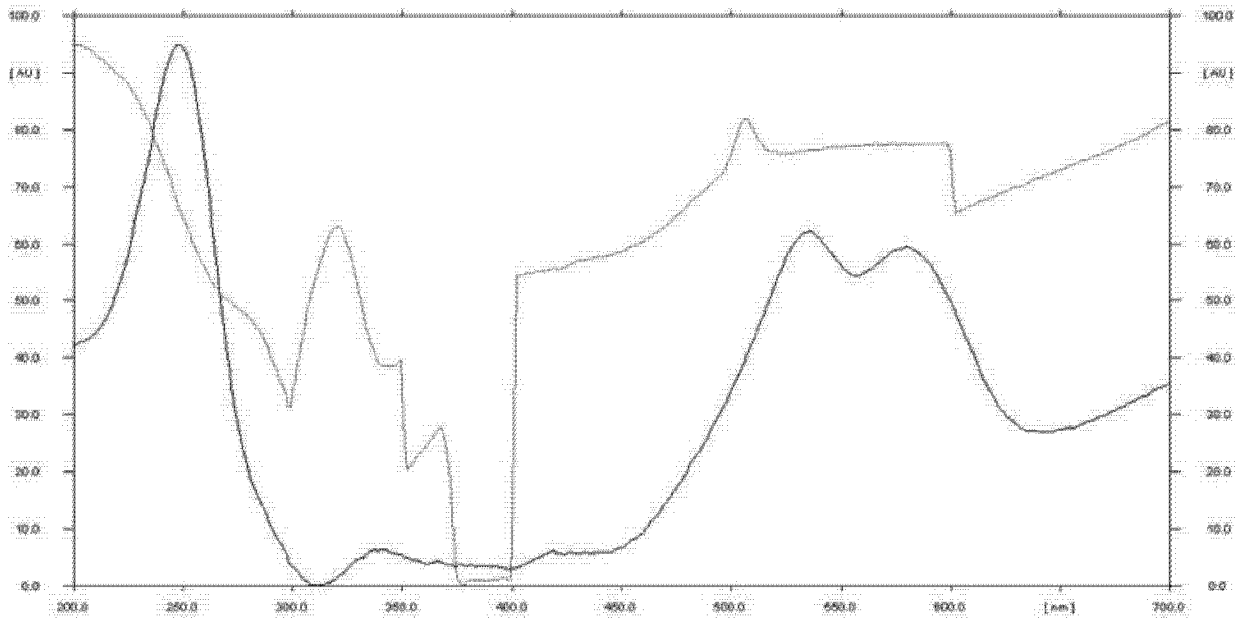


图 2



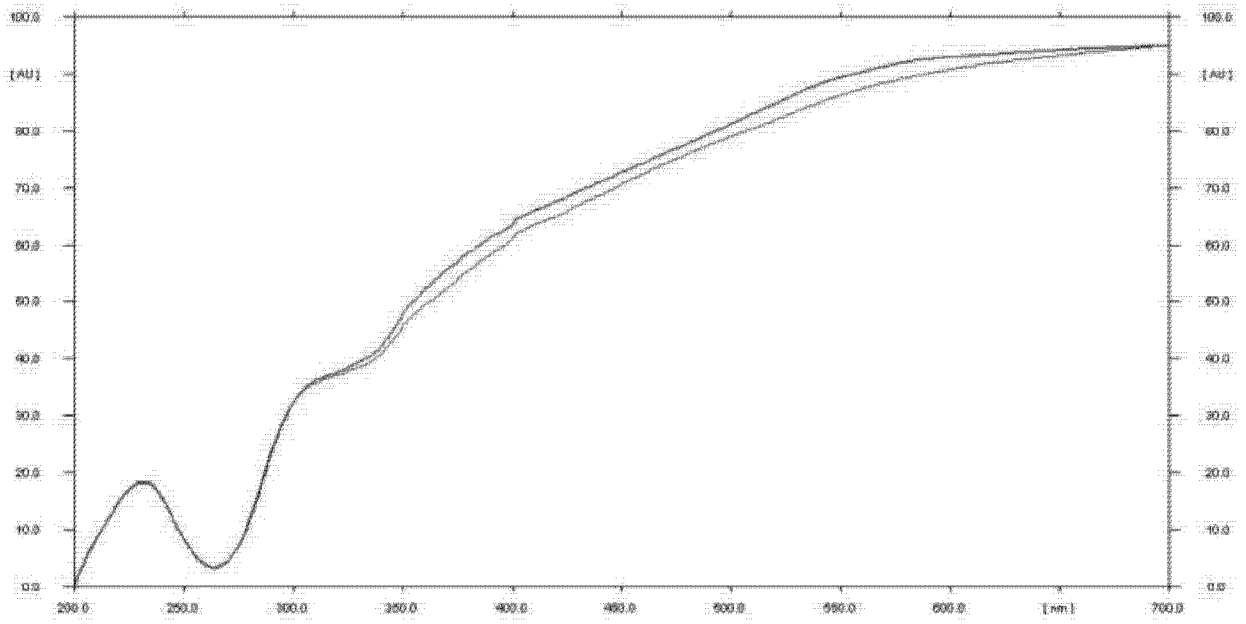


图 3

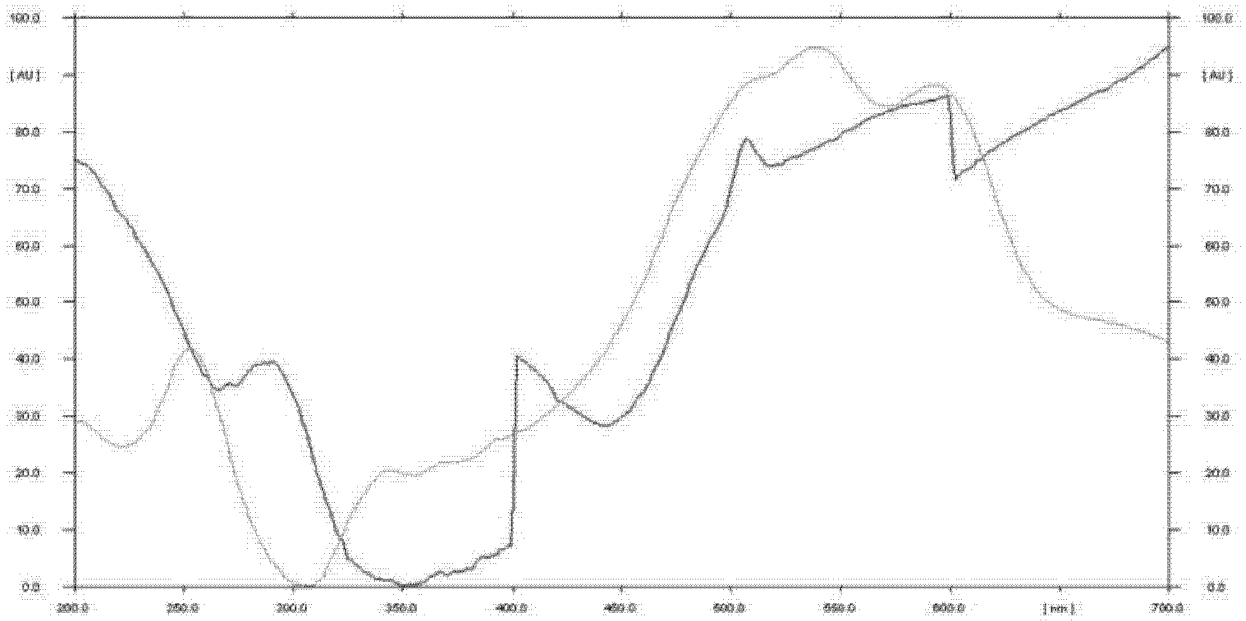


图 4