



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108037216 A

(43)申请公布日 2018.05.15

(21)申请号 201810036152.5

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.01.15

(71)申请人 北京林业大学

地址 100000 北京市海淀区清华东路35号

申请人 漳州片仔癀药业股份有限公司

(72)发明人 刘树强 于娟 李旭鑫 范梦圆
张天祥 李依蒙 张美善 石明慧
杨双 周俊彤 齐磊 孙晓宁
徐尚华 查穆哈 郭小兵 刘阳
黄志鑫 林绍碧 胡德夫

(74)专利代理机构 北京冠和权律师事务所
11399
代理人 朱健 陈国军

(51)Int.Cl.
G01N 30/02(2006.01)

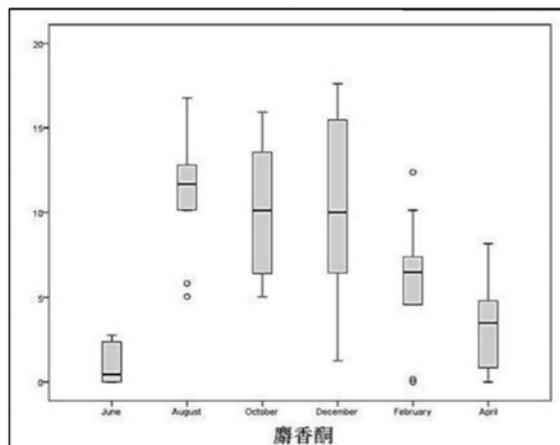
权利要求书2页 说明书12页 附图9页

(54)发明名称

一种确定林麝取香时间的方法

(57)摘要

本发明涉及林麝养殖领域,尤其涉及一种确定林麝取香时间的方法。本发明方法综合显微形态观测、干燥法分析含水量变化、气质联用技术及ELISA分析粪样激素变化等方法,通过将麝香样品的外观形态颜色、成分变化及与取香林麝粪样激素相关性动态变化进行系统对比,探索出了一套系统的多角度多层次林麝取香时间确定方法。利用本发明方法可以从不同侧面对麝香品质判定及确定最佳的取香时间提供科学依据,可用于掌握林麝麝香在分泌后熟化过程中变化情况,从而用来确定人工养殖林麝科学的取香时间,保障采集麝香品质。



1. 一种确定林麝取香时间的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 麝香样品外观形态分析

通过体视镜观察麝香外观形态,描述并记录麝香外观形态;

(2) 麝香样品水分含量测定

a. 准备200 μ l规格离心管,准确称重后在管中加入麝香样品,液体用移液器量取10 μ l,固体称取5-10mg;

b. 将装有样品的离心管称重,取一个相同规格的离心管,称重后加入10 μ l蒸馏水,再次称重后作为对照样品与麝香样品一同干燥;

c. 将所有待测样品和对照样品放置在离心管板上,打开离心管管口,置于装有足量硫酸钙、硫酸镁和硫酸钠的封闭干燥器中,静置干燥48h;

d. 当装有对照样品的离心管重量和空管重量相同时即表示干燥彻底,对所有离心管称重,计算麝香样品中的水分含量;

(3) 麝香样品主成分气质联用GC-MS色谱分析

a. 样品预处理:称取待检测的麝香样品,用预冷到-50 $^{\circ}$ C的冷冻干燥机冷冻干燥12-24h,得到麝香冻干粉,称取上述麝香冻干粉0.05g,用无水CaSO₄吸水干燥72h;

b. 向上述干燥后的麝香冻干粉样品中加1ml二氯甲烷萃取15min,过滤后得到GC-MS测试样品;

c. 气相色谱仪测试条件如下:

进样方式:无分流进样;

进样量:1 μ l;

进样口温度:250-252 $^{\circ}$ C;

管柱温度:80 $^{\circ}$ C,保持1分钟,

之后每分钟增加5 $^{\circ}$ C直至245 $^{\circ}$ C,保持1分钟,

之后每分钟增加10 $^{\circ}$ C直至280 $^{\circ}$ C,保持5分钟;

载气:氦气;

载气流速:1-1.05ml/min;

总分析时间:60min;

d. 质谱仪测试条件如下:

转接口温度:280-282 $^{\circ}$ C;

质谱室温度:230-232 $^{\circ}$ C;

四极杆分析器温度:150 $^{\circ}$ C;

(4) 林麝粪便激素含量测定

a. 样品预处理:将林麝粪便样品充分研磨粉碎,称取0.50g放入10ml离心管中,加入5ml 90%乙醇,振荡萃取20min后,2500rpm离心20min,取上清液,下层沉淀再加入5ml 90%乙醇振荡萃取20min,2500rpm再次离心20min,合并两次上清液并于60 $^{\circ}$ C水浴蒸干,加入1ml PBS振荡回收,并置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中冷冻待测;

b. 采用放射性免疫法测定林麝粪便样品皮质醇激素,所用皮质醇试剂盒的参数为:灵敏度 \leq 2.0ng/ml,批内变异系数 $<$ 10%,批间变异系数 $<$ 15%;

c. 采用发光免疫法测定林麝粪便样品睾酮和雌二醇激素,所用睾酮试剂盒和雌二醇试

剂盒的参数为:回收率90-110%,分析内精密度<15.0%,批间精密度<20.0%;

d. 数据处理:将各月份采集麝香样品对应的林麝个体粪便睾酮、雌二醇和皮质醇测定数据进行整理,制做箱线图并计算相邻两月份激素水平的差异显著性。

2. 如权利要求1所述的确定林麝取香时间的方法,其中第(3)步骤按照下述方法进行:

(3) 麝香样品主成分气质联用GC-MS色谱分析

a. 样品预处理:称取待检测的麝香样品,用预冷到-50℃的冷冻干燥机冷冻干燥24h,得到麝香冻干粉,称取上述麝香冻干粉0.05g,用无水CaSO₄吸水干燥72h;

b. 向上述干燥后的麝香冻干粉样品中加1ml二氯甲烷萃取15min,过滤后得到GC-MS测试样品;

c. 气相色谱仪测试条件如下:

进样方式:无分流进样;

进样量:1μl;

进样口温度:250℃;

管柱温度:80℃,保持1分钟,

之后每分钟增加5℃直至245℃,保持1分钟,

之后每分钟增加10℃直至280℃,保持5分钟;

载气:氦气;

载气流速:1ml/min;

总分析时间:60min;

d. 质谱仪测试条件如下:

转接口温度:280℃;

质谱室温度:230℃;

四极杆分析器温度:150℃。

3. 如权利要求1或2所述的确定林麝取香时间的方法在药物检测中的应用。

一种确定林麝取香时间的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及林麝养殖领域,尤其涉及一种确定林麝取香时间的方法。

背景技术

[0002] 林麝(*Moschus berezovskii*)也称香獐、林獐,是麝属动物中体型最小的一种,主要产于我国,为国家一级野生保护动物。雄麝所产麝香是我国传统名贵中药材和国际公认的高级香料,被视为药材中的珍品,在中西医临床方面有着广泛应用,很多重要中药配方中麝香均为必不可少的成分,如安宫牛黄丸、片仔癀、西黄丸、麝香醒脑液等。然而,由于常年受盗猎活动影响,目前国内野生林麝的数量已经很少,麝香资源十分紧缺,近年来人工养麝业发展较快,目前陕西省林麝养殖数量约为一万多只,麝香获取也由过去主要依靠野生林麝资源逐渐过渡到靠人工养殖林麝获取,由于林麝养殖规模的扩大,建立一套麝香质量判定体系并确定适宜的取香时间十分必要。

[0003] 传统上一般采用外观形态、色泽和气味判定麝香品质,但因缺乏量化数据,鉴定结果因人而异,无法给出科学的判断结论。近年来已有麝香成分测定的一些研究报道,但受制于麝香成分的复杂性及研究条件的限制,这些麝香成分变化研究都缺乏系统性,迄今对于麝香品质成分判定的标准体系还不完善,这也直接影响了麝香成熟期判定。目前四川人工养殖林麝取香时间集中在每年11月份,而陕西林麝取香时间集中在每年2月份,这种取香时间的界定是建立在传统经验的基础上,缺乏实验数据支持,因此仍存在一定的盲目性。

[0004] 本发明提供了一种确定林麝取香时间的方法,综合显微形态观测、干燥法分析含水量变化、气质联用(GC-MS)技术及ELISA分析粪样激素变化等方法,通过将麝香样品的外观形态颜色、成分变化及与取香林麝粪样激素相关性动态变化进行系统对比,探索出了一套多角度多层次林麝取香时间确定方法。利用本发明方法可以从不同侧面对麝香品质判定及确定最佳的取香时间提供科学依据,林麝最佳取香时间的确定,可以保障制药企业获取麝香原料质量,从而带来更好的社会效益和经济效益。另外,由于本发明方法具备确定的操作规范和操作条件,受试验人员主观因素影响小,其结果的准确性和可靠性远远高于传统经验判定法,且本发明方法简便易行、对操作人员的专业水平和实践经验要求不高,非常适宜于在药物检测领域推广使用。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种简便易行的确定林麝取香时间的方法,本发明方法包括以下步骤:

[0006] (1) 麝香样品外观形态分析

[0007] 通过体视镜观察麝香外观形态,描述并记录麝香外观形态;

[0008] (2) 麝香样品水分含量测定

[0009] a. 准备200 μ l规格离心管,准确称重后在管中加入麝香样品,液体用移液器量取10 μ l,固体称取5-10mg;

[0010] b. 将装有样品的离心管称重, 取一个相同规格的离心管, 称重后加入10 μ l蒸馏水, 再次称重后作为对照样品与麝香样品一同干燥;

[0011] c. 将所有待测样品和对照样品放置在离心管板上, 打开离心管管口, 置于装有足量硫酸钙、硫酸镁和硫酸钠的封闭干燥器中, 静置干燥48h;

[0012] d. 当装有对照样品的离心管重量和空管重量相同时即表示干燥彻底, 对所有离心管称重, 计算麝香样品中的水分含量;

[0013] (3) 麝香样品主成分气质联用GC-MS色谱分析

[0014] a. 样品预处理: 称取待检测的麝香样品, 用预冷到-50 $^{\circ}$ C的冷冻干燥机冷冻干燥12-24h, 得到麝香冻干粉, 称取上述麝香冻干粉0.05g, 用无水CaSO₄吸水干燥72h;

[0015] b. 向上述干燥后的麝香冻干粉样品中加1ml二氯甲烷萃取15min, 过滤后得到GC-MS测试样品;

[0016] c. 气相色谱仪测试条件如下:

[0017] 进样方式: 无分流进样;

[0018] 进样量: 1 μ l;

[0019] 进样口温度: 250-252 $^{\circ}$ C;

[0020] 管柱温度: 80 $^{\circ}$ C, 保持1分钟,

[0021] 之后每分钟增加5 $^{\circ}$ C直至245 $^{\circ}$ C, 保持1分钟,

[0022] 之后每分钟增加10 $^{\circ}$ C直至280 $^{\circ}$ C, 保持5分钟;

[0023] 载气: 氦气;

[0024] 载气流速: 1-1.05ml/min;

[0025] 总分析时间: 60min;

[0026] d. 质谱仪测试条件如下:

[0027] 转接口温度: 280-282 $^{\circ}$ C;

[0028] 质谱室温度: 230-232 $^{\circ}$ C;

[0029] 四极杆分析器温度: 150 $^{\circ}$ C;

[0030] (4) 林麝粪便激素含量测定

[0031] a. 样品预处理: 将林麝粪便样品充分研磨粉碎, 称取0.50g放入10ml离心管中, 加入5ml 90%乙醇, 振荡萃取20min后, 2500rpm离心20min, 取上清液, 下层沉淀再加入5ml 90%乙醇振荡萃取20min, 2500rpm再次离心20min, 合并两次上清液并于60 $^{\circ}$ C水浴蒸干, 加入1ml PBS振荡回收, 并置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中冷冻待测;

[0032] b. 采用放射性免疫法测定林麝粪便样品皮质醇激素, 所用皮质醇试剂盒的参数为: 灵敏度 \leq 2.0ng/ml, 批内变异系数 $<$ 10%, 批间变异系数 $<$ 15%;

[0033] c. 采用发光免疫法测定林麝粪便样品睾酮和雌二醇激素, 所用睾酮试剂盒和雌二醇试剂盒的参数为: 回收率90-110%, 分析内精密密度 $<$ 15.0%, 批间精密密度 $<$ 20.0%;

[0034] d. 数据处理: 将各月份采集麝香样品对应的林麝个体粪便睾酮、雌二醇和皮质醇测定数据进行整理, 制做箱线图并计算相邻两月份激素水平的差异显著性。

[0035] 完成上述测定步骤后, 本发明方法可通过下述几个方面来确定林麝取香时间:

[0036] 1. 从麝香外观形态变化判断取香时间

[0037] 当麝香样品为浅色水油状液体, 静置沉淀后液体内含有浅棕色的微小颗粒状麝香

时,此阶段为林麝开始泌香阶段的初香形态。随着时间推移,麝香变成棕黄色固态,能观察到这个时期麝香湿度较大,此阶段为麝香由液态向固态转化的阶段,之后麝香外观颜色没有明显变化,但能直观观察到麝香外观湿度明显下降,然后在接下来的约6个月时间内,麝香外观形态颜色变化不大,湿度逐渐下降,但变化不明显。经检测我们发现,当麝香外观湿度明显下降时开始,即可确定为适宜的取香时间。

[0038] 2. 从麝香水分含量变化范围判断取香时间

[0039] 麝香含水量结果显示,早期分泌的麝香含水量非常高,此阶段麝香为液态,然后麝香逐渐转变为固态,麝香颜色逐渐加深,慢慢变成棕黄色,水分含量显著下降,此阶段麝香由液态变成固态,麝香含水量下降幅度较大。当到达一定阶段后,麝香含水量继续下降,但下降趋势变缓,基本趋于稳定。经检测我们发现,当麝香含水量基本稳定时开始,即可确定为适宜的取香时间。

[0040] 3. 从麝香色谱图变化判断取香时间

[0041] 早期麝香色谱图显示泌香初期麝香已经开始出现部分成分指纹图谱特征,但物质成分种类较少,麝香色谱图成分特征峰数量较少。随着时间推移,麝香色谱图出现明显成分指纹图谱特征,成分特征峰数量显著增多,麝香主要成分特征峰基本出现,之后在接近8个月时间内,麝香色谱图中的上述麝香成分特征峰数量没有显著变化,基本保持稳定。因此,当麝香色谱图中的上述麝香成分特征峰数量不发生显著变化时,即可确定为适宜的取香时间。

[0042] 4. 从麝香主成分含量变化判断取香时间

[0043] 通过对经特殊处理的麝香样品进行GC-MS分析,确定适宜的GC-MS检测条件,并对其中10种含量较高的主成分进行面积归一法半定量分析,可以看出麝香中多种主成分12月份含量达到最高,如:环十五烷酮、胆固醇、胆甾烷醇、3 α -羟基-5 β -雄甾烷-17-酮和cis-1,2-Cyclododecanediol均在12月含量最高,而Cholest-2-ene、Cholest-3-ene, (5. β .)-、Cholesta-3,5-diene含量在次年2月或4月达到最高。多种主成分在12月份期间开始出现波动,部分主成分有下降趋势,这表明各种主成分变化趋势存在差别。分析后我们认为12月底为此阶段林麝交配结束阶段,上述成分可能在麝香分泌和熟化的过程中后期部分成分发生化学反应,转化成其他有机物,如cis-9-Hexadecenal的含量从10月份开始逐渐下降,但cis-1,2-Cyclododecanediol等环酮类化合物的含量开始上升,这些有机物成分间可能存在化学反应或相互转化,但相关结论尚需要进一步验证。因此,我们认为综合考虑各种主成分的含量变化趋势,12月份为人工养殖林麝适宜的取香时间。

[0044] 5. 从林麝粪样激素变化范围判断取香时间

[0045] 激素在动物各种生理过程中发挥着重要作用,激素变化可以反映出动物生理变化,因此通过激素变化可以了解动物的健康状态。本研究采用了非损伤的方法对林麝粪样激素进行了动态检测,林麝粪样生理激素水平结果显示,繁殖生理相关激素睾酮和雌二醇水平在6月份含量较高,波动较大,8月份至第二年4月份含量较低,波动较小,本研究将泌香初期和泌香期的时间分开,分析激素水平与麝香主成分的相关性,结果表明泌香初期两种性激素水平与十种成分含量均显著相关,其余时期仅少数几种麝香主成分与激素水平相关。6月份是林麝泌香初期,通过激素和麝香成分相关性分析表明,睾酮和雌二醇激素在香囊腺初期启动分泌麝香过程中发挥了重要作用,而在后期熟化过程中的相关性不明显。

[0046] 林麝粪样皮质醇激素分析结果显示在6月份、10至12月份含量较高,其它月份含量较低,6月份林麝正处于泌香开始时期、10至12月正处于林麝繁殖交配季节,表明林麝在泌香期和繁殖期应激水平较高,其余时期皮质醇水平相对比较稳定。本研究分析皮质醇激素水平与麝香主成分的相关性,结果表明皮质醇激素水平与十种成分含量相关性不显著。因此,林麝粪样激素变化分析结果表明,考虑林麝泌香和配种季节皮质醇激素的变化及与麝香成分相关性,林麝最佳取香时间应在1月份,若取香林麝不参与交配,取香时间可提前至12月份。

[0047] 6.综合判定最佳取香时间

[0048] 综合各项林麝麝香分析结果:①麝香外观形态季节变化;②麝香水分含量季节变化;③麝香色谱图及主成分含量季节变化;④粪便生理激素季节变化与成分相关性分析;林麝取香时间应根据繁殖麝和非繁殖麝确定取香时间,参与繁殖林麝最佳取香时间应在1月份交配结束后进行取香,非繁殖林麝取香时间可提前至12月初开始。

[0049] 优选地,本发明确定林麝取香时间的方法,其中第(3)步骤按照下述方法进行:

[0050] (3) 麝香样品主成分气质联用GC-MS色谱分析

[0051] a. 样品预处理:称取待检测的麝香样品,用预冷到 -50°C 的冷冻干燥机冷冻干燥24h,得到麝香冻干粉,称取上述麝香冻干粉0.05g,用无水 CaSO_4 吸水干燥72h;

[0052] b. 向上述干燥后的麝香冻干粉样品中加1ml二氯甲烷萃取15min,过滤后得到GC-MS测试样品;

[0053] c. 气相色谱仪测试条件如下:

[0054] 进样方式:无分流进样;

[0055] 进样量:1 μl ;

[0056] 进样口温度: 250°C ;

[0057] 管柱温度: 80°C ,保持1分钟,

[0058] 之后每分钟增加 5°C 直至 245°C ,保持1分钟,

[0059] 之后每分钟增加 10°C 直至 280°C ,保持5分钟;

[0060] 载气:氦气;

[0061] 载气流速:1ml/min;

[0062] 总分析时间:60min;

[0063] d. 质谱仪测试条件如下:

[0064] 转接口温度: 280°C ;

[0065] 质谱室温度: 230°C ;

[0066] 四极杆分析器温度: 150°C 。

[0067] 此外,本发明还涉及一种确定林麝取香时间的方法在药物检测中的应用。

[0068] 由于麝香价格昂贵,因此微量检测方法更具实用性,本发明通过改进原料预处理工艺,在原料提取过程中引入了冷冻干燥步骤,在提高干燥效率的同时抑制了麝香中挥发性成分的散失,使样品标志性成分的提取效率大大提高,具备了微量检测的可能性。

[0069] 本发明方法可用于掌握林麝麝香在分泌后熟化过程中变化情况,从而用来确定人工养殖林麝科学的取香时间,保障采集麝香品质。

[0070] 本发明确定林麝取香时间的方法,综合显微形态观测、干燥法分析含水量变化、气

质联用(GC-MS)技术及ELISA分析粪样激素变化等方法,通过将麝香样品的外观形态颜色、成分变化及与取香林麝粪样激素相关性动态变化进行系统对比,探索出了一套系统的多角度多层次林麝取香时间确定方法。利用本发明方法可以从不同侧面对麝香品质判定及确定最佳的取香时间提供科学依据,林麝最佳取香时间的确定,可以保障制药企业获取麝香原料质量,从而带来更好的社会效益和经济效益。另外,由于本发明方法具备确定的操作规范和操作条件,受试验人员主观因素影响小,其结果的准确性和可靠性远远高于传统经验判定法,克服了经验判定具有盲目性的缺陷,且本发明方法简便易行、对操作人员的专业水平和实践经验要求不高,非常适宜于在药物检测领域推广使用。

附图说明

[0071] 图1为麝香样品外观形态变化图(A:2016年6月、B:2016年8月、C:2016年10月、D:2016年12月、E:2017年2月、F:2017年4月);

[0072] 图2为不同取香时间麝香样品含水量数据变化图;

[0073] 图3为不同取香时间麝香样品的色谱图变化趋势图;

[0074] 图4为不同取香时间麝香样品的麝香酮含量变化趋势图(麝香酮含量6月至12月逐渐升高,之后逐渐下降);

[0075] 图5为不同取香时间麝香样品的3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮含量变化趋势图(3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮含量6月至12月逐渐升高,之后逐渐下降);

[0076] 图6为不同取香时间麝香样品的胆固醇含量变化趋势图(胆固醇含量在6月份为0,8月至12月逐渐升高,2月份含量下降,4月份含量回归为0);

[0077] 图7为不同取香时间麝香样品的胆甾烷醇含量变化趋势图(胆甾烷醇含量6月份为0,8月至12月逐渐升高,2月份和4月份含量回归为0);

[0078] 图8为不同取香时间麝香样品的Cholesta-3,5-diene含量变化趋势图(Cholesta-3,5-diene含量在6月份为0,8月至12月比较稳定,2月份含量升高,4月份下降);

[0079] 图9为不同取香时间麝香样品的Cholest-3-ene,(5.beta.)-含量变化趋势图(Cholest-3-ene,(5.beta.)-6月至12月含量为0或较少,之后逐渐升高);

[0080] 图10为不同取香时间麝香样品的Cholest-2-ene含量变化趋势图(Cholest-2-ene含量6月份到10月份由0开始逐渐升高,12月降为0,2月到4月持续升高);

[0081] 图11为不同取香时间麝香样品的cis-9-Hexadecenal含量变化趋势图(cis-9-Hexadecenal在6月份含量为0,8月份升至最高,之后开始逐渐下降,至2月份和4月份降为0);

[0082] 图12为不同取香时间麝香样品的cis-1,2-Cyclododecanediol含量变化趋势图(cis-1,2-Cyclododecanediol在6月份含量为0,8月和10月比较稳定,12月含量升至最高,2月和4月下降至0);

[0083] 图13为不同取香时间麝香样品的环十五烷酮含量变化趋势图(环十五烷酮在6月份含量为0,8月份含量升高,10月和12月趋于稳定,之后逐渐下降);

[0084] 图14为不同时间段林麝粪便中睾酮含量变化趋势图(睾酮含量6月份最多,其他月份含量很低并趋于稳定);

[0085] 图15为不同时间段林麝粪便中雌二醇含量变化趋势图(雌二醇含量6月份最多,其

他月份含量很低并趋于稳定)；

[0086] 图16为不同时间段林麝粪便中皮质醇含量变化趋势图(皮质醇含量6月份较多,8-12月激素含量逐渐上升,到2-4月开始下降)。

具体实施方式

[0087] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0088] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。

[0089] 除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0090] 实施例

[0091] 1. 麝香样品采集

[0092] 陕西凤县片仔癀林麝养殖基地28只体质年龄一致的林麝个体,作为研究组。根据实验计划,取样工作分为6个阶段,2017年5月1日,所有阶段取样工作完成:第一阶段(2016年5月12日至2016年6月18日)、第二阶段(2016年8月1日)、第三阶段(2016年10月25日)、第四阶段(2016年12月25日)、第五阶段(2017年2月23日),第六阶段(2017年4月26日)。依据取香方案,2017年5月,顺利完成全部计划的麝香取样工作,采集到合格麝香样品,对样品进行了冷冻保存用于后续分析。采样过程中记录了采样林麝个体年龄、体重及遗传背景等信息,并初步记录了各个阶段麝香外观、颜色及取香情况等信息。2. 麝香外观形态变化(2016.5-2017.5)

[0093] 分析方法:通过体视镜观察麝香外观形态,描述并记录麝香外观形态。

[0094] 2016年6月麝香为浅色水油状液体,内部含有棕黄色物质,至8月份后颜色加深,变为黄色油状液体或半固体,10月至次年4月麝香为棕黄色固体颗粒状的成熟麝香(见图1,其中A:2016年6月、B:2016年8月、C:2016年10月、D:2016年12月、E:2017年2月、F:2017年4月)。

3. 含水量数据变化分析(2016.5-2017.5)

[0095] 麝香样品水分含量测定方法:

[0096] a. 准备200 μ l规格离心管,准确称重后在管中加入麝香样品,液体用移液器量取10 μ l,固体称取5-10mg;

[0097] b. 将装有样品的离心管称重,取一个相同规格的离心管,称重后加入10 μ l蒸馏水,再次称重后作为对照样品与麝香样品一同干燥;

[0098] c. 将所有待测样品和对照样品放置在离心管板上,打开离心管管口,置于装有足量硫酸钙、硫酸镁和硫酸钠的封闭干燥器中,静置干燥48h;

[0099] d. 当装有对照样品的离心管重量和空管重量相同时即表示干燥彻底,对所有离心

管称重,计算麝香样品中的水分含量。

[0100] 随着时间推移,麝香样品的含水量呈现逐渐下降趋势(见图2),2016年6月份含水量变化范围(84.99%-87.66%),2016年8月份含水量变化范围(45.34%-69.44%),2016年10月份含水量变化范围(44.39%-58.95%),2016年12月份含水量变化范围(37.99%-49.31%),2017年2月份含水量变化范围(34.90%-49.54%),2017年4月份含水量变化范围(34.44%-49.46%)。下降幅度2016年8月份比6月份下降幅度最大,后面下降幅度逐渐变缓。2016年7月份水分含量范围波动较大,分析是由于6-8月份麝香由淡浅色水油状液体状态转化为棕黄色颗粒固体态过程,变化较为剧烈,变化过程存在时间上的差别,10月份后水分含量变化范围变小,12月份含量相比10月份继续下降。2017年2月份麝香含水量相比2016年12月份含量继续下降,但下降不明显,4月份麝香含水量相比2月份含量继续下降,但趋势不明显,可认为2016年12月份后含水量基本稳定。通过对上述各时间段麝香样品的含水量分析,我们得出如下结论:林麝香囊腺中成熟麝香含水量范围标准应为35%-50%,当所采集的麝香样本的含水量处于上述范围之内时,提示已到适宜的取香时间。

[0101] 4. 色谱图变化(2016.5-2017.5)

[0102] 麝香样品主成分气质联用GC-MS色谱分析方法:

[0103] a. 样品预处理:称取待检测的麝香样品,用预冷到-50℃的冷冻干燥机冷冻干燥24h,得到麝香冻干粉,称取上述麝香冻干粉0.05g,用无水CaSO₄吸水干燥72h;

[0104] b. 向上述干燥后的麝香冻干粉样品中加1ml二氯甲烷萃取15min,过滤后得到GC-MS测试样品;

[0105] c. 气相色谱仪测试条件如下:

[0106] 气相色谱-质谱联用仪:GC MS-QP2010;

[0107] 进样方式:自动进样,无分流进样;

[0108] 进样量:1μl;

[0109] 进样口温度:250℃;

[0110] 管柱温度:80℃,保持1分钟,

[0111] 之后每分钟增加5℃直至245℃,保持1分钟,

[0112] 之后每分钟增加10℃直至280℃,保持5分钟;

[0113] 载气:氦气;

[0114] 载气流速:1ml/min;

[0115] 总分析时间:60min;

[0116] d. 质谱仪测试条件如下:

[0117] 转接口温度:280℃;

[0118] 质谱室温度:230℃;

[0119] 四极杆分析器温度:150℃。

[0120] 麝香样品的色谱图变化趋势(见图3)。

[0121] 2016年6月份总离子流(TIC)图谱表明麝香开始出现指纹图谱特征,但各种物质种类及峰值较低,分析表明很多成分为杂质峰,麝香色谱图基本没有明显成分特征峰。

[0122] 2016年8月份总离子流(TIC)图谱表明麝香开始出现明显的成分特征峰,各种有效成分种类及含量相比6月份明显上升,质谱分析显示成分种类约100多种。分析此阶段麝香

水分已大量被吸收,含水量减少,麝香已经开始浓缩形成棕黄色固态。

[0123] 2016年10月份总离子流(TIC)图谱表明麝香有麝香成分图谱特征,但各种有效成分种类及含量与8月份相比已经差别不显著,显示成分种类约100多种。

[0124] 2016年12月份总离子流(TIC)图谱表明麝香有麝香成分图谱特征,但各种有效成分种类及含量与8月份及10月份相比已经差别不显著,显示成分种类约100多种。

[0125] 2017年2月份总离子流(TIC)图谱表明麝香有麝香成分图谱特征,但各种有效成分种类及含量与8月份、10月份及12月份相比已经差别不显著,显示成分种类约100多种。

[0126] 2017年4月份总离子流(TIC)图谱表明麝香有麝香成分图谱特征,但各种有效成分种类及含量与8月份、10月份、12月份及2017年2月份相比已经差别不显著,显示成分种类约100多种。分析,麝香呈棕黄色固态,麝香有效成分特征峰显著,麝香色谱图包含明显成分特征峰,但特征成分峰出现了部分变化。

[0127] 2016年8月份至2017年4月份明显出现特征峰位置时间分别在26.8分、34.6分、35.5分、38.7分、44.6分、45分、48.2分、48.6分。因此从麝香色谱图可以看出麝香色谱图主要特征峰在8月份基本出现,因此,麝香气质联用色谱图表明8月份后可以进行取香。

[0128] 5.面积归一法麝香样品主成分分析(2016.5-2017.5)

[0129] 麝香样品的主成分含量变化趋势(见图4-13)。

[0130] 2016年6月份麝香色谱图分析显示麝香主要成分含量较低,基本没有明显成分特征峰。8月开始麝香有效成分特征峰显著,色谱图出现明显成分特征峰,成分种类约100多种。8月-12月特征峰峰面积差别不大,2017年2月和4月特征峰出现了部分变化。本研究筛选出麝香酮、环十五烷酮、cis-9-Hexadecenal、胆固醇、3 α -羟基-5 β -雄甾烷-17-酮、Cholest-3-ene, (5. β .)-、Cholesta-3,5-diene、Cholest-2-ene、胆甾烷醇、cis-1,2-Cyclododecanediol共十种有效成分。检测数据显示麝香酮6月份变化范围(0.35%-2.04%)、8月份变化范围(8.57%-13.52%)、10月份变化范围(7.34%-12.72%)、12月份变化范围(6.39%-14.28%)、2月份变化范围(3.20%-8.73%)、4月份变化范围(1.53%-5.11%);环十五烷酮6月份为0、8月份变化范围(0.16%-0.51%)、10月份变化范围(0.14%-0.48%)、12月份变化范围(0.11%-0.49%)、2月份变化范围(0.94%-3.32%)、4月份变化范围(0.05%-0.23%);cis-9-Hexadecenal 6月份为0、8月份变化范围(4.10%-9.85%)、10月份变化范围(0.78%-3.54%)、12月份变化范围(0.46%-1.64%)、2月份变化范围(0.01%-0.08%)、4月份变化范围(0.04%-0.14%);胆固醇6月份变化范围(1.73%-5.37%)、8月份变化范围(5.19%-7.37%)、10月份变化范围(6.34%-10.16%)、12月份变化范围(9.05%-12.05%)、2月份变化范围(0.16%-4.96%)、4月份为0;3 α -羟基-5 β -雄甾烷-17-酮6月份变化范围(0.37%-2.55%)、8月份变化范围(4.90%-7.08%)、10月份变化范围(4.07%-7.91%)、12月份变化范围(4.45%-11.71%)、2月份变化范围(0.21%-2.67%)、4月份变化范围(0.15%-0.38%);Cholest-3-ene, (5. β .)-6月份为0、8月份变化范围(0.43%-0.80%)、10月份变化范围(0.90%-1.80%)、12月份变化范围(0.42%-1.08%)、2月份变化范围(0.24%-2.82%)、4月份变化范围(1.56%-3.43%);Cholesta-3,5-diene 6月份变化范围(0.95%-2.46%)、8月份变化范围(2.98%-4.41%)、10月份变化范围(2.42%-6.29%)、12月份变化范围(3.35%-6.15%)、2月份变化范围(2.63%-13.21%)、4月份变化范围(1.14%-6.93%);Cholest-2-ene 6月份变化范围(0.33%-

0.85%)、8月份变化范围(1.03%–1.84%)、10月份变化范围(2.24%–3.62%)、12月份变化范围(0.20%–0.94%)、2月份变化范围(1.32%–7.40%)、4月份变化范围(4.94%–8.29%);胆甾烷醇6月份为0、8月份变化范围(1.69%–4.22%)、10月份变化范围(3.09%–4.93%)、12月份变化范围(2.71%–7.09%)、2月份变化范围(0.16%–0.79%)、4月份为0; cis-1,2-Cyclododecanediol 6月份为0、8月份变化范围(0.14%–0.80%)、10月份变化范围(0.25%–2.09%)、12月份变化范围(1.10%–3.66%)、2月份变化范围(0.04%–0.30%)、4月份为0。

[0131] 6. 林麝粪便激素含量变化趋势(2016.5–2017.5)

[0132] 林麝粪便激素含量测定方法:

[0133] a. 样品预处理:将林麝粪便样品充分研磨粉碎,称取0.50g放入10ml离心管中,加入5ml 90%乙醇,振荡萃取20min后,2500rpm离心20min,取上清液,下层沉淀再加入5ml 90%乙醇振荡萃取20min,2500rpm再次离心20min,合并两次上清液并于60℃水浴蒸干,加入1ml PBS振荡回收,并置于–20℃冰箱中冷冻待测;

[0134] b. 采用放射性免疫法测定林麝粪便样品皮质醇激素,放免仪型号GC-2016(安徽中科中佳科学仪器有限公司,安徽,中国),皮质醇试剂盒(北京北方生物技术公司)的参数为:灵敏度 $\leq 2.0\text{ng/ml}$,批内变异系数 $<10\%$,批间变异系数 $<15\%$;

[0135] c. 采用发光免疫法测定林麝粪便样品睾酮和雌二醇激素,发光免疫分析仪型号TZD-CL-200S(厦门天中达生物科技有限公司,福建,中国),睾酮试剂盒(北京北方生物技术公司)和雌二醇试剂盒(北京北方生物技术公司)的参数为:回收率90–110%,分析内精密度 $<15.0\%$;批间精密度 $<20.0\%$;

[0136] d. 数据处理:将各月份采集麝香样品对应的林麝个体粪便睾酮、雌二醇和皮质醇测定数据进行整理,制做箱线图并计算相邻两月份激素水平的差异显著性。

[0137] 不同时间段林麝粪便激素含量变化趋势(见图14–16)。

[0138] 各月份差异分析结果显示,6–8月和12–2月林麝个体睾酮水平变化差异显著;雌二醇除6–8月和12–2月外,10–12月的激素水平变化也有显著差异;皮质醇水平各月份差异均不显著,处于较稳定的状态。

[0139] 7. 取香林麝粪便激素与麝香成分相关性分析表

[0140] (1) 睾酮

[0141] A

[0142]

成分	相关系数	Sig. (双侧)	N
麝香酮	–.743**	0	22
环十五烷酮	–.749**	0	22
cis-9-Hexadecenal	–.721**	0	22
胆固醇	–.750**	0	22
3 α -羟基-5 β -雄甾烷-17-酮	–.789**	0	22
Cholest-3-ene, (5.β.)-	–.738**	0	22
Cholesta-3,5-diene	–.832**	0	22
Cholest-2-ene	–.776**	0	22

胆甾烷醇	-.783**	0	22
cis-1,2-Cyclododecanediol	-.789**	0	22

[0143] B

[0144]

成分	相关系数	Sig. (双侧)	N
麝香酮	-.015	0.91	57
环十五烷酮	-.146	0.28	57
cis-9-Hexadecenal	.048	0.722	57
胆固醇	.295*	0.026	57
3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮	.156	0.247	57
Cholest-3-ene, (5.beta.)-	.019	0.887	57
Cholesta-3,5-diene	-.174	0.195	57
Cholest-2-ene	-.13	0.335	57
胆甾烷醇	.316*	0.017	57
cis-1,2-Cyclododecanediol	.062	0.648	57

[0145] *.在置信度(双侧)为0.05时,相关性是显著的;

[0146] **.在置信度(双侧)为0.01时,相关性是显著的。

[0147] (2) 雌二醇

[0148] A

[0149]

成分	相关系数	Sig. (双侧)	N
麝香酮	-.644**	0.001	22
环十五烷酮	-.674**	0.001	22
cis-9-Hexadecenal	-.719**	0	22
胆固醇	-.742**	0	22

[0150]

3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮	-.774**	0	22
Cholest-3-ene, (5.beta.)-	-.769**	0	22
Cholesta-3,5-diene	-.715**	0	22
Cholest-2-ene	-.723**	0	22
胆甾烷醇	-.763**	0	22
cis-1,2-Cyclododecanediol	-.553**	0.008	22

[0151] B

[0152]

成分	相关系数	Sig. (双侧)	N
麝香酮	-.061	0.651	57
环十五烷酮	-.181	0.178	57
cis-9-Hexadecenal	-.274*	0.039	57
胆固醇	.278*	0.036	57

3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮	-.045	0.739	57
Cholest-3-ene, (5.beta.)-	-.016	0.904	57
Cholesta-3,5-diene	.044	0.743	57
Cholest-2-ene	-.305*	0.021	57
胆甾烷醇	.143	0.288	57
cis-1,2-Cyclododecanediol	.039	0.773	57

[0153] *.在置信度(双测)为0.05时,相关性是显著的;**在置信度(双测)为0.01时,相关性是显著的。

[0154] (3) 皮质醇

[0155] A

[0156]

成分	相关系数	Sig. (双侧)	N
麝香酮	-.337	0.171	18
环十五烷酮	-.255	0.307	18
cis-9-Hexadecenal	-.268	0.282	18
胆固醇	-.287	0.249	18
3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮	-.208	0.408	18
Cholest-3-ene, (5.beta.)-	-.480*	0.044	18
Cholesta-3,5-diene	-.323	0.191	18
Cholest-2-ene	-.316	0.201	18
胆甾烷醇	-.438	0.069	18
cis-1,2-Cyclododecanediol	-.302	0.223	18

[0157] B

[0158]

成分	相关系数	Sig. (双侧)	N
麝香酮	.22	0.122	51

[0159]

环十五烷酮	.276	0.05	51
cis-9-Hexadecenal	.167	0.241	51
胆固醇	.256	0.07	51
3a-羟基-5b-雄甾烷-17-酮	.21	0.139	51
Cholest-3-ene, (5.beta.)-	-.194	0.173	51
Cholesta-3,5-diene	-.128	0.371	51
Cholest-2-ene	-.274	0.052	51
胆甾烷醇	.176	0.218	51
cis-1,2-Cyclododecanediol	.311*	0.027	51

[0160] *.在置信度(双测)为0.05时,相关性是显著的;

[0161] **.在置信度(双测)为0.01时,相关性是显著的。

[0162] 以上对本发明优选的具体实施方式和实施例作了详细说明,但是本发明并不限于

上述实施方式和实施例,在本领域技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明构思的前提下作出各种变化。

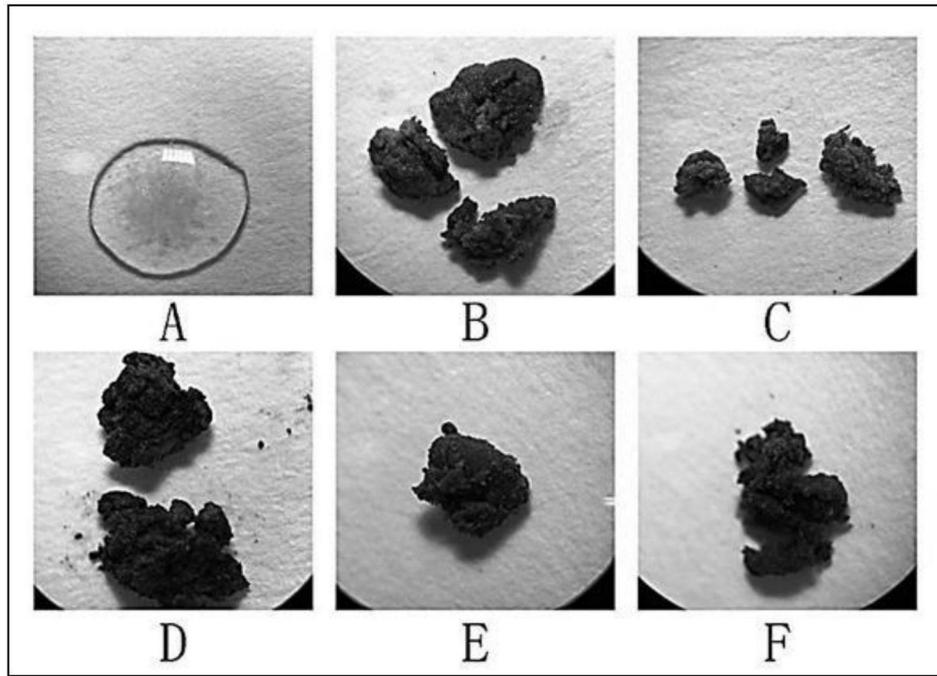


图1

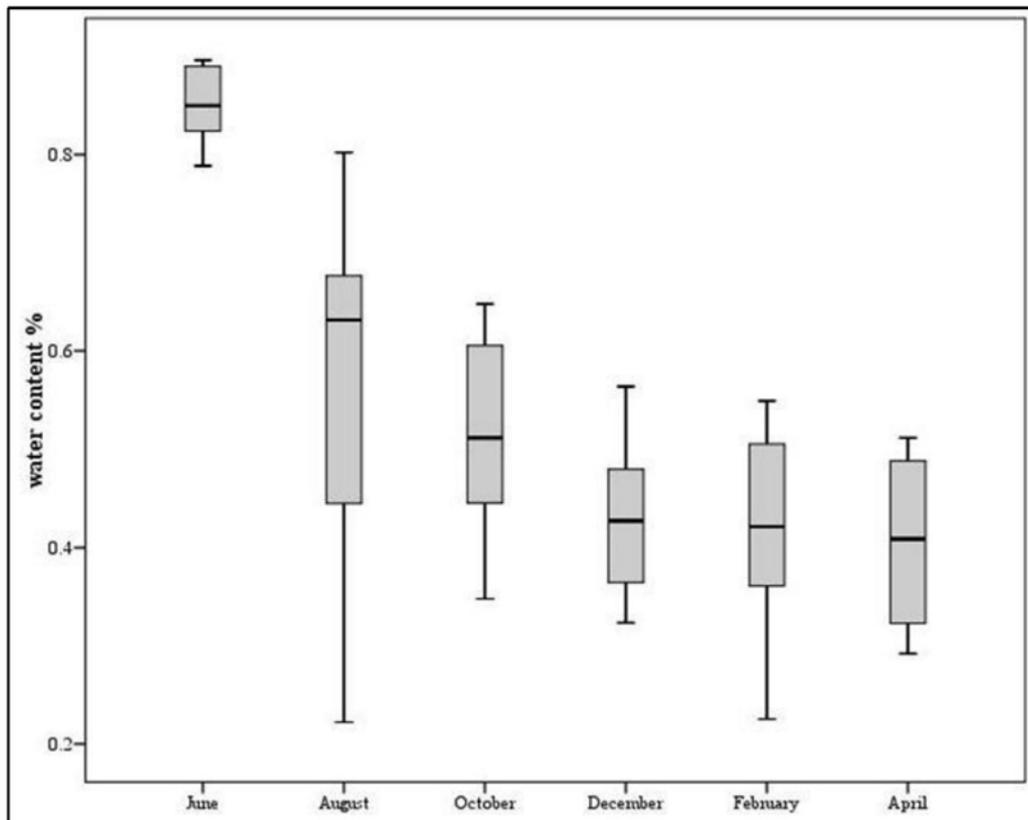


图2

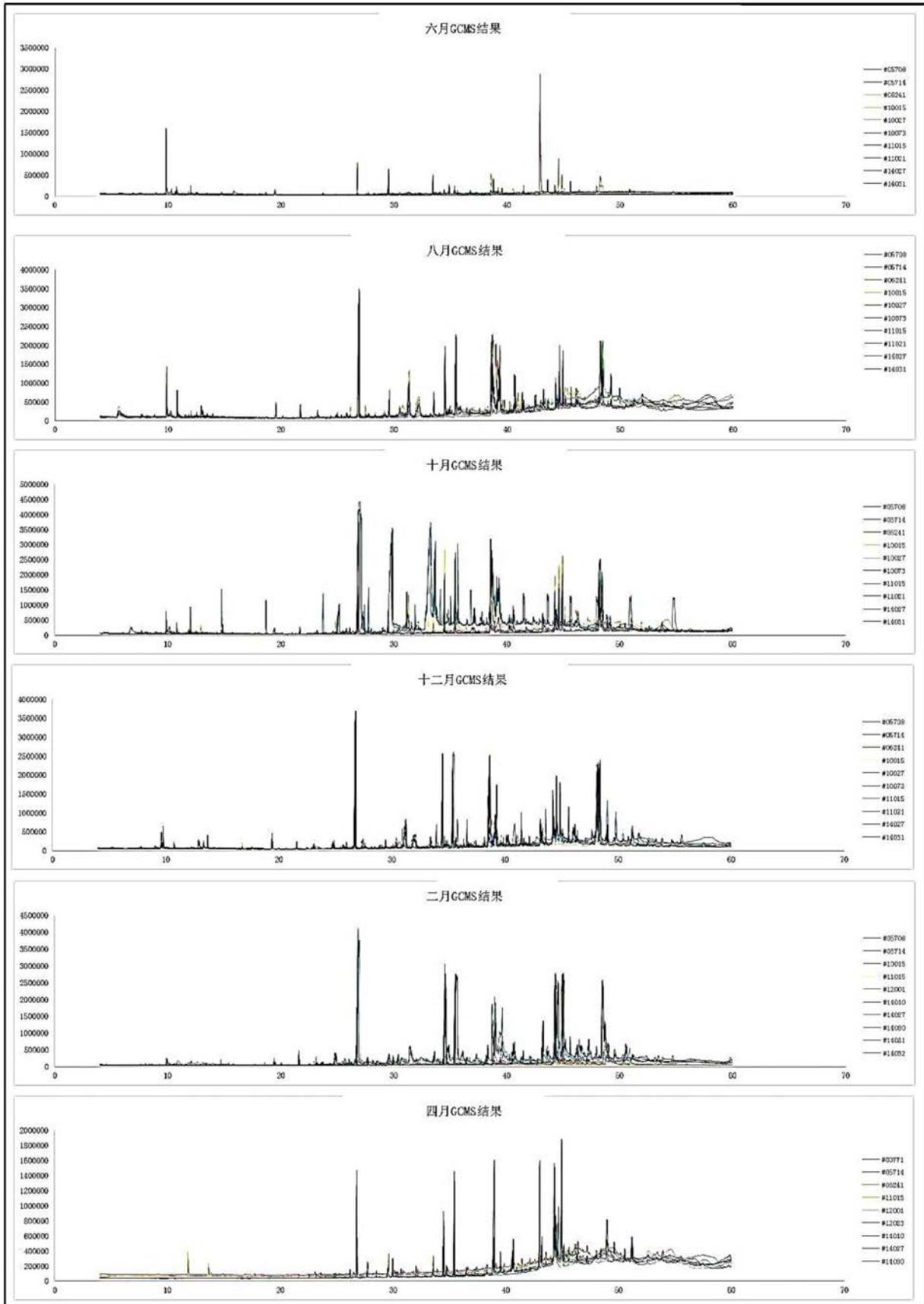


图3

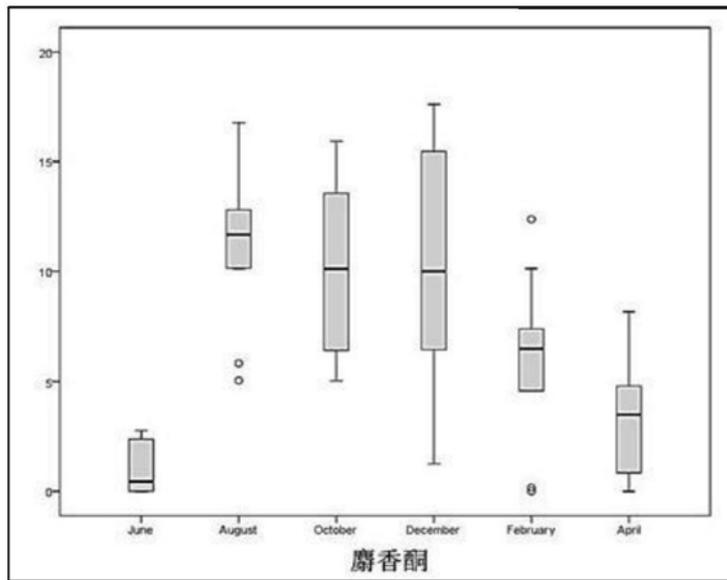


图4

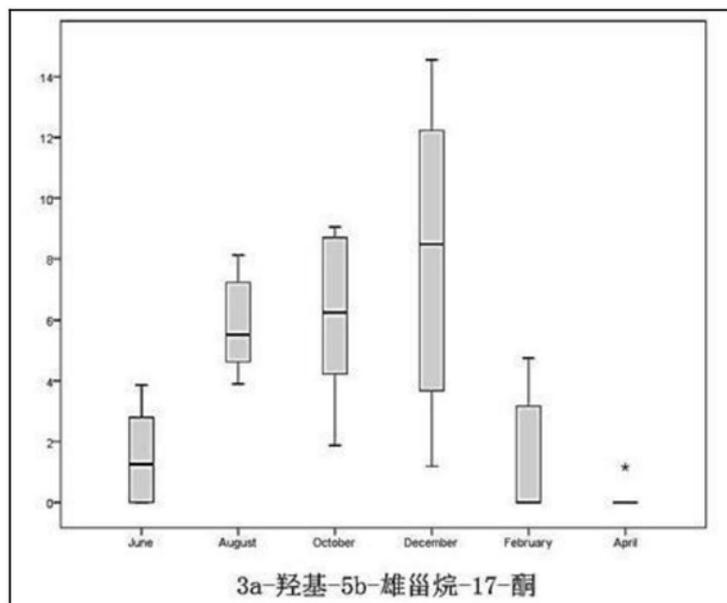


图5

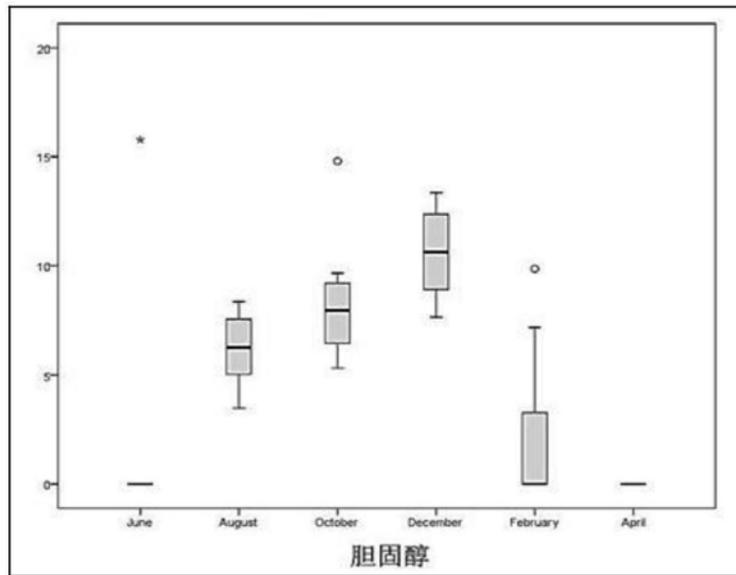


图6

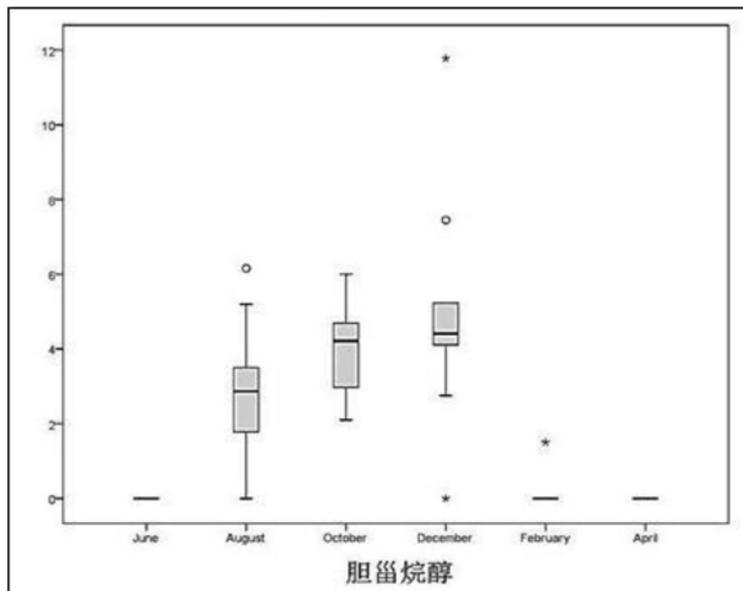


图7

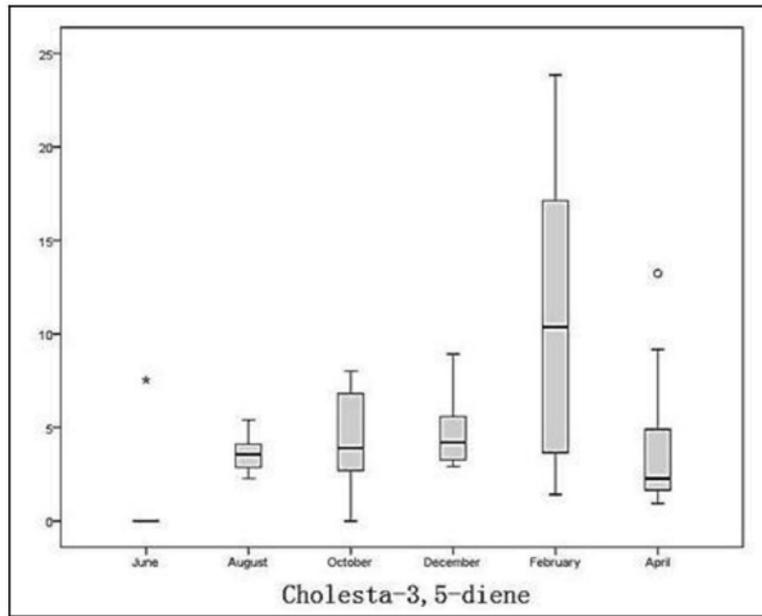


图8

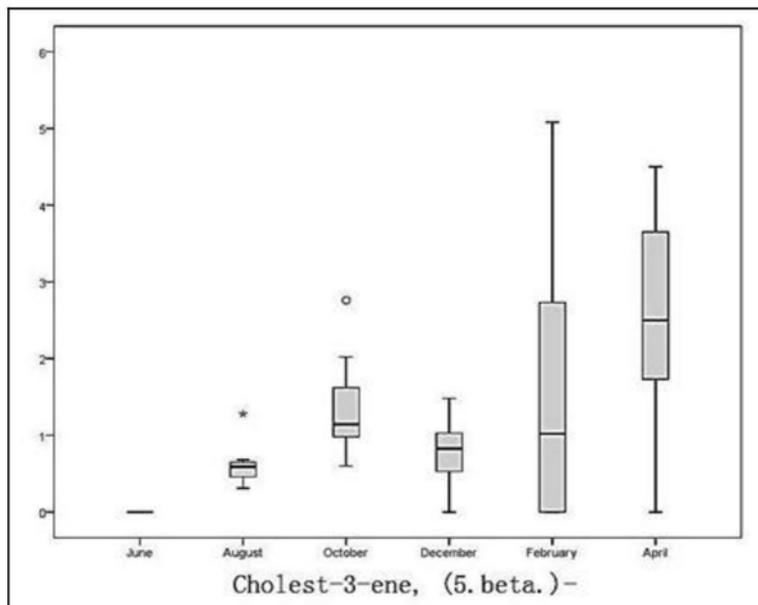


图9

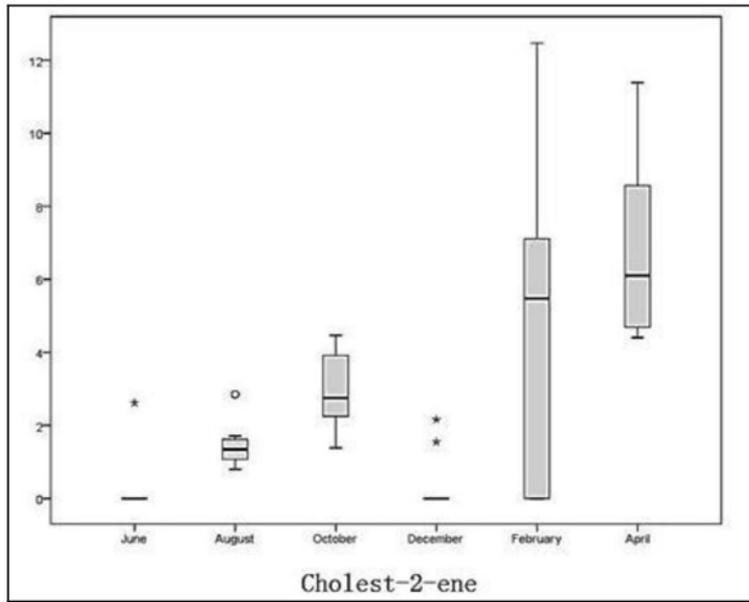


图10

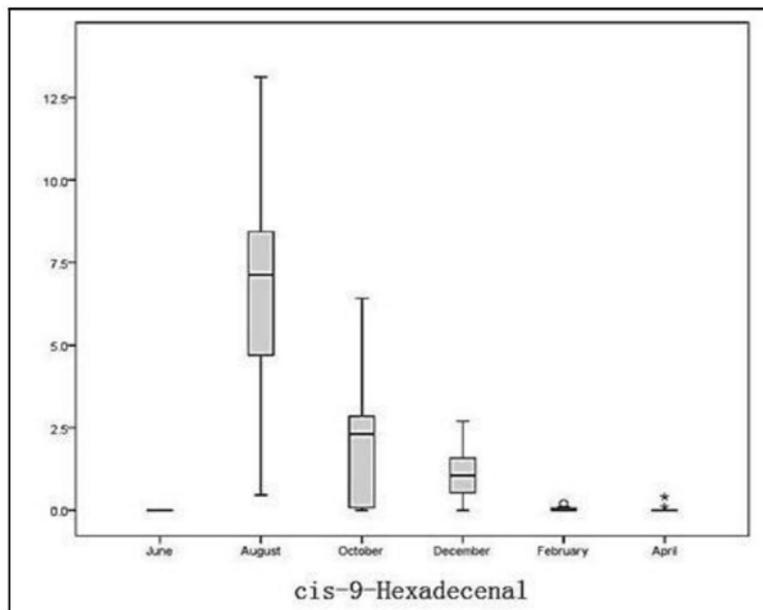


图11

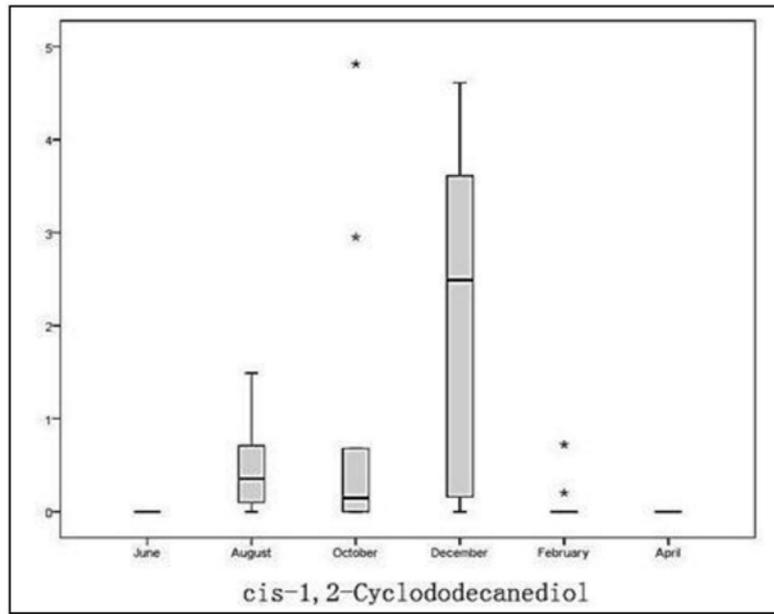


图12

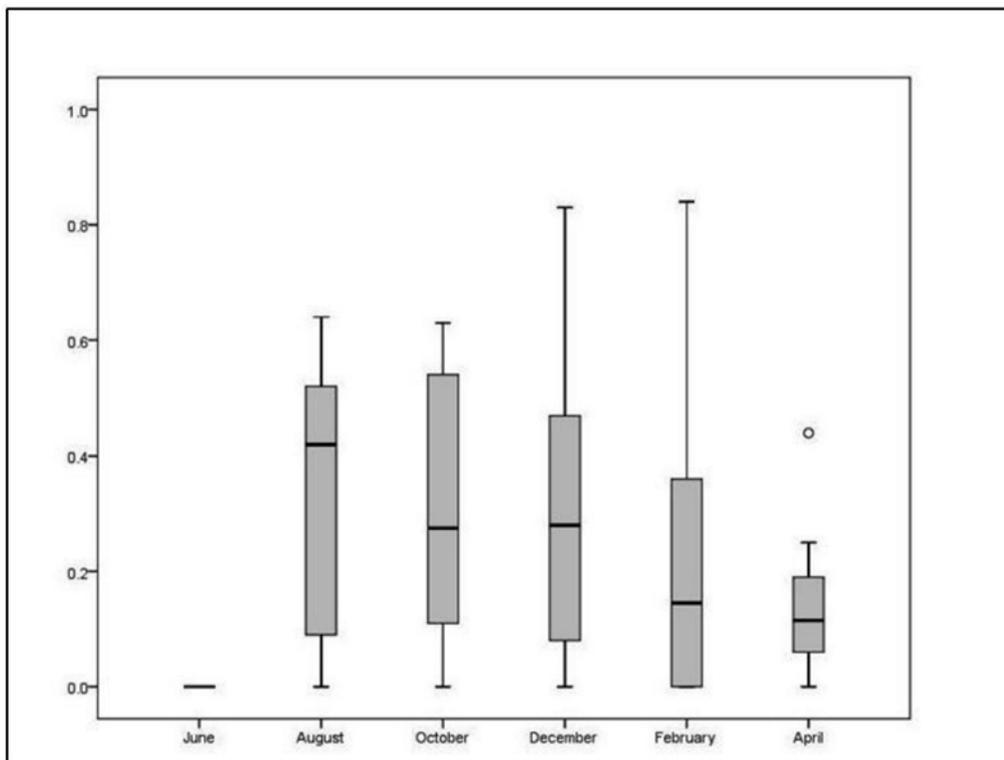


图13

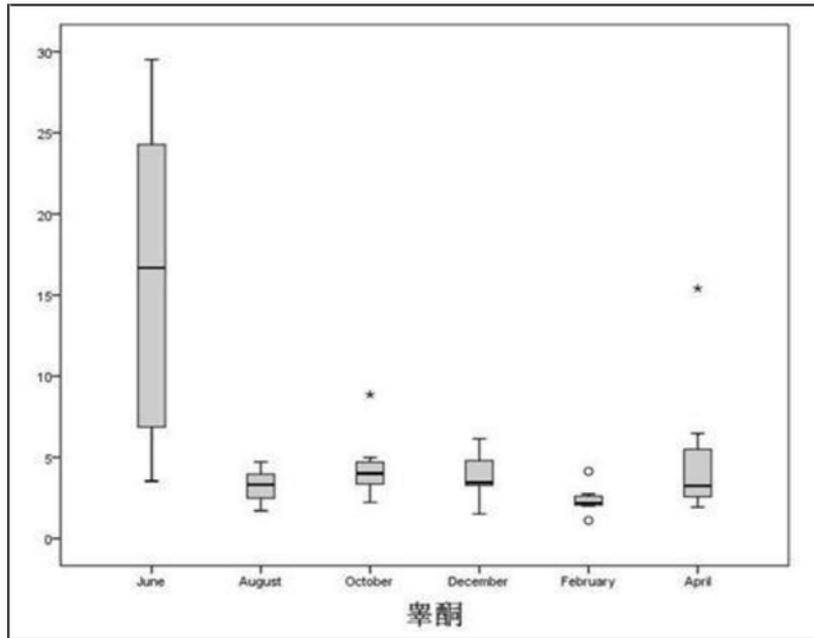


图14

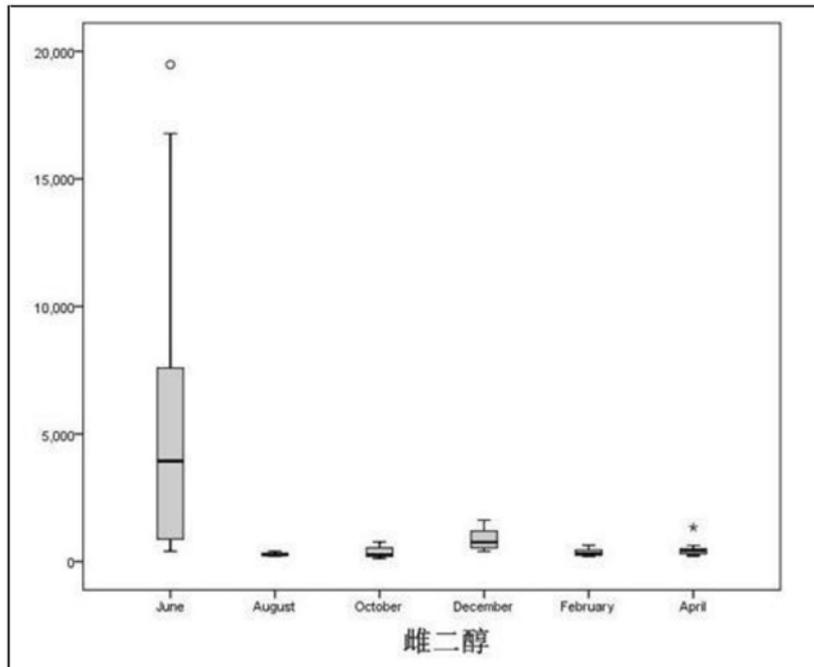


图15

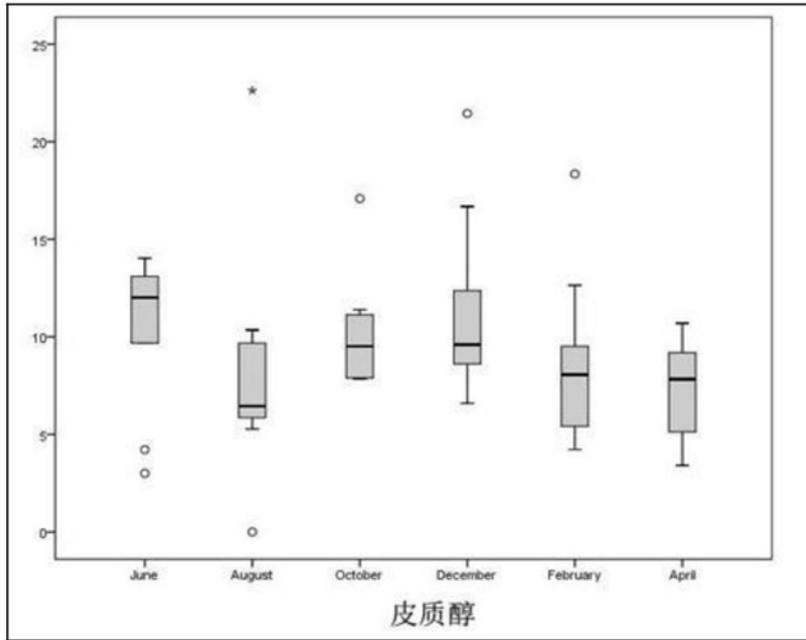


图16

专利名称(译)	一种确定林麝取香时间的方法		
公开(公告)号	CN108037216A	公开(公告)日	2018-05-15
申请号	CN201810036152.5	申请日	2018-01-15
[标]申请(专利权)人(译)	北京林业大学 漳州片仔癀药业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京林业大学 漳州片仔癀药业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京林业大学 漳州片仔癀药业股份有限公司		
[标]发明人	刘树强 于娟 李旭鑫 范梦圆 张天祥 李依蒙 张美善 石明慧 杨双 周俊彤 齐磊 孙晓宁 徐尚华 查穆哈 郭小兵 刘阳 黄志鑫 林绍碧 胡德夫		
发明人	刘树强 于娟 李旭鑫 范梦圆 张天祥 李依蒙 张美善 石明慧 杨双 周俊彤 齐磊 孙晓宁 徐尚华 查穆哈 郭小兵 刘阳 黄志鑫 林绍碧 胡德夫		
IPC分类号	G01N30/02 G01N33/53		

CPC分类号	G01N30/02 G01N33/53
代理人(译)	朱健 陈国军
外部链接	Espacenet SIPO

摘要(译)

本发明涉及林麝养殖领域，尤其涉及一种确定林麝取香时间的方法。本发明方法综合显微形态观测、干燥法分析含水量变化、气质联用技术及ELISA分析粪样激素变化等方法，通过将麝香样品的外观形态颜色、成分变化及与取香林麝粪样激素相关性动态变化进行系统对比，探索出了一套系统的多角度多层次林麝取香时间确定方法。利用本发明方法可以从不同侧面对麝香品质判定及确定最佳的取香时间提供科学依据，可用于掌握林麝麝香在分泌后熟化过程中变化情况，从而用来确定人工养殖林麝科学的取香时间，保障采集麝香品质。

