



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725147 A

(43)申请公布日 2019. 05. 07

(21)申请号 201711035900.X

(22)申请日 2017.10.30

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家  
科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 张淑雅 杜霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

### (54)发明名称

一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法

### (57)摘要

本发明公开了一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法,其方法如下:(1)预处理制得林蛙卵粉,(2)选用超临界CO<sub>2</sub>萃取方法进行林蛙卵雌二醇的萃取。本发明使萃取过程充分接触,萃取率高,不添加任何其他成分,雌二醇纯度高、质量好。

1. 一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法,其特征在于:

(1) 预处理

试验原料为长白山新鲜林蛙卵,经干燥粉碎处理后备用;

(2) 超临界CO<sub>2</sub>萃取

准确称取 4550 g干燥粉碎后的林蛙卵粉装入料筒,将料筒装入萃取缸,装上料筒O型圈再放入通气环,盖好压环及上堵头,进行萃取试验;在林蛙卵雌二醇萃取过程中选取萃取压力 15、20、25、30、35MPa,萃取温度37、42、47、52、57℃,CO<sub>2</sub>流量 8、10、12、14、16 kg/h和萃取时间 30、60、90、120、150 min,以林蛙卵雌二醇的萃取得率为考察指标,进行单因素试验;雌二醇萃取得率按下列公式计算:得率=(提取物质量/林蛙卵粉质量)×100 %;

(3) 酶联免疫分析(ELISA)检测超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵中雌二醇的含量

ELISA 试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中林蛙雌二醇(E2)水平;用纯化的林蛙雌二醇(E2)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入雌二醇(E2),再与HRP 标记的雌二醇(E2)抗体结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物TMB 显色;TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色;颜色的深浅和样品中的雌二醇(E2)呈正相关;用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中林蛙卵雌二醇(E2)含量;在酶标包被板上设标准孔10孔,依次稀释后各孔加样量都为50μL,浓度分别为 48、32、16、8、4 ng/L;以标准物的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,得到标准曲线为:

$y = (-1.8198) + 25.48401x, R^2 = 0.9991$ ;将样品的 OD 值代入方程,计算出样品的浓度,再乘以稀释倍数得到超临界萃取林蛙卵中雌二醇的含量为38.11 ng/L。

2. 如权利要求1所述的一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法,其特征为:

最佳萃取条件为萃取压力30 MPa,萃取温度47℃,CO<sub>2</sub>流量为12 kg/h,萃取时间为90 min。

## 一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法,属于保健食品技术领域。

### 背景技术

[0002] 长白山林蛙 (*Rana chensinensis Changbaishanensis*) 属中国林蛙长白山亚种, 主要在我国东北长白山和小兴安岭地区有分布, 林蛙卵的药理作用研究在国内未见有太多的报道, 因其有显著的抑制血小板聚集、降血脂及降低过氧化脂质含量等相关作用, 所以被认为是一种天然的优质的保健食品原料, 有相关资料报道, 林蛙卵中含有 18 种氨基酸其中必需氨基酸的总量可达到 28.93 %、富含雌二醇孕酮等, 是中国药典中收录的重要名贵中药之一。

[0003] 雌激素可缓解或消除绝经前后引起的更年期症状, 可保护神经元, 对改善骨密度, 预防骨质疏松具有一定的作用, 此外, 雌激素还能增加大脑皮质血液的供应, 雌二醇是雌激素中的生物活性最强的一种激素, 林蛙卵常常被废弃, 我们从废弃的原料中提取有很大利用价值的雌二醇鲜见有相关文献报道。

[0004] 超临界萃取技术因其提取温度低, 尤其适宜于提取热敏性有效成分; 传质速率快, 萃取率高; 相对与传统方法工艺流程简单, 因此便于过程中的调节; 惰性无毒, 产品中没有溶剂残留, 从萃取到分离可以一步完成, 萃取后的 CO<sub>2</sub> 不会残留在萃取物上, 且比较容易从产物中进行分离出来, 基于以上的特点, 超临界萃取的应用范围越来越广泛。

[0005] 酶联免疫测定法具有快速、灵敏、特异、简便等优点, 同时还具有检测成本低, 便于大批量样品检测等特点, 因此具有广泛的实际应用价值。

[0006] 本文中采用超临界CO<sub>2</sub>流体萃取林蛙卵雌二醇, 研究萃取压力、温度、CO<sub>2</sub>流量和萃取时间对萃取得率的影响, 并用酶联免疫分析进行检测, 为林蛙卵雌二醇的实际应用提供理论指导和实验依据。

### 发明创造内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术的缺陷, 提供一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法, 使萃取过程充分接触, 萃取率高, 不添加任何其他成分, 雌二醇纯度高、质量好。

[0008] 本发明是通过如下技术方案予以实现的:

一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法, 其方法如下:

#### (1) 预处理

试验原料为长白山新鲜林蛙卵, 经干燥粉碎处理后备用;

#### (2) 超临界CO<sub>2</sub>萃取

准确称取4550g干燥粉碎后的林蛙卵粉装入料筒, 将料筒装入萃取缸, 装上料筒 O型圈再放入通气环, 盖好压环及上堵头, 进行萃取试验; 在林蛙卵雌二醇萃取过程中选取萃取压力 15、20、25、30、35 MPa, 萃取温度 37、42、47、52、57 °C, CO<sub>2</sub>流量 8、10、12、14、16 kg/h和萃取时间 30、60、90、120、150 min, 以林蛙卵雌二醇的萃取得率为考察指标, 进行单因素试

验;雌二醇萃取得率按下列公式计算:得率=(提取物质量/林蛙卵粉质量)×100 %;

(3) 酶联免疫分析(ELISA)检测超临界 CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵中雌二醇的含量

ELISA 试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中林蛙雌二醇(E2)水平。用纯化的林蛙雌二醇(E2)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入雌二醇(E2),再与HRP 标记的雌二醇(E2)抗体结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物TMB 显色;TMB在HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的雌二醇(E2)呈正相关。用酶标仪在450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中林蛙卵雌二醇(E2)含量。在酶标包被板上设标准孔10孔,依次稀释后各孔加样量都为50μL,浓度分别为 48、32、16、8、4 ng/L。以标准物的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,得到标准曲线为:

$y = (-1.819\ 8) + 25.484\ 01x, R^2 = 0.999\ 1$ 。将样品的OD值代入方程,计算出样品的浓度,再乘以稀释倍数得到超临界萃取林蛙卵中雌二醇的含量为 38.11 ng/L。

[0009] 本发明的各种条件适宜,使林蛙卵雌二醇萃取率提高,不添加任何其他成分,雌二醇纯度高、质量好。

## 附图说明

[0010] 图1萃取压力对萃取得率的影响。

[0011] 图2萃取温度对萃取得率的影响。

[0012] 图3 CO<sub>2</sub>流量对萃取得率的影响。

[0013] 图4萃取时间对萃取得率的影响。

## 具体实施方式

[0014] 实施例1、一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法

(1) 材料

长白山新鲜林蛙卵

(2) 设备

HA221-40-11 超临界萃取装置:江苏华安科研仪器有限公司;林蛙雌二醇ELISA

试剂盒:上海士锋生物科技有限公司;酶标仪:北京普朗 9602A 酶标仪。

[0015] 实施例2、样本处理、提取及检测

(1) 样品的预处理

试验原料为长白山新鲜林蛙卵,经干燥粉碎处理后备用。

[0016] (2) 提取

准确称取4550g干燥粉碎后的林蛙卵粉装入料筒,将料筒装入萃取缸,装上料筒O型圈再放入通气环,盖好压环及上堵头,进行萃取试验。在林蛙卵雌二醇萃取过程中选取萃取压力 15、20、25、30、35 MPa,萃取温度 37、42、47、52、57 °C,CO<sub>2</sub>流量 8、10、12、14、16 kg/h和萃取时间 30、60、90、120、150 min,以林蛙卵雌二醇的萃取得率为考察指标,进行单因素试验。雌二醇萃取得率按下列公式计算:得率=(提取物质量/林蛙卵粉质量)×100 %。

[0017] (3) 检测

酶联免疫分析(ELISA)检测超临界 CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵中雌二醇的含量

ELISA 试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中林蛙雌二醇(E2)水平。用纯化的林蛙雌二醇(E2)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入雌二醇(E2),再与HRP 标记的雌二醇(E2)抗体结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物TMB 显色。TMB在HRP酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的雌二醇(E2)呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD值),通过标准曲线计算样品中林蛙卵雌二醇(E2)含量。在酶标包被板上设标准孔10 孔,依次稀释后各孔加样量都为50 $\mu$ L,浓度分别为 48、32、16、8、4 ng/L。以标准物的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,得到标准曲线为:

$y = (-1.8198) + 25.484 \ 01x, R^2 = 0.9991$ 。将样品的OD值代入方程,计算出样品的浓度,再乘以稀释倍数得到超临界萃取林蛙卵中雌二醇的含量为38.11 ng/L。

[0018] 实施例3、结果与分析。

[0019] (1)压力对雌二醇提取物得率的影响

调节萃取温度为47 $^{\circ}$ C,CO<sub>2</sub>流量为12 kg/h,萃取时间90min,萃取得率随温度的变化如图1所示。

[0020] 由图1可知,随着压力的增加,萃取得率也相应有大程度的提高,当萃取压力达到30MPa 时,继续增加压力,得率增加的趋势较为平缓接近于平稳,且在30 MPa 时对雌二醇提取物已达到较好的提取效果,故选择30MPa为最佳萃取压力。

[0021] (2)萃取温度对雌二醇提取物得率的影响

调节萃取条件维持压力30MPa,CO<sub>2</sub>流量为12 kg/h下萃取90 min,温度对萃取得率的影响如图2所示。

[0022] 由图2可知,雌二醇提取物得率在37 $^{\circ}$ C~ 47 $^{\circ}$ C范围内随温度的增加而增加,47 $^{\circ}$ C可达到最大值,47 $^{\circ}$ C后再升高温度,萃取得率反而呈下降的趋势。这是因为当温度升高时,分子运动加快,分子间相互碰撞的机会相对增加,挥发性和扩散系数会提高,溶解能力会增大,但温度升高的同时,CO<sub>2</sub>分子间距增大,作用力减小,密度减小,又会导致溶解能力下降,综合考虑上述因素选择 47 $^{\circ}$ C为最佳萃取温度。

[0023] (3)CO<sub>2</sub>流量对雌二醇提取物得率的影响

调节萃取条件在萃取温度 47 $^{\circ}$ C,压力30 MPa下萃取 90 min,可得CO<sub>2</sub>流量与得率的关系如图3所示。

[0024] 由图3可知,随着CO<sub>2</sub>流量的增加萃取得率增加,达到12kg/h时再增加CO<sub>2</sub>流量萃取得率开始下降,这是因为CO<sub>2</sub>流量对萃取得率有着复杂的影响,当增加CO<sub>2</sub>流量时,CO<sub>2</sub>流体通过萃取釜的速度增大,在萃取釜中停留的时间短与原料接触的时间少,对萃取能力的提高不利;与此同时,CO<sub>2</sub>流量的增加导致CO<sub>2</sub>流体通过林蛙卵粉层的速度加快,传质推动力会相应增加,传质系数增加对萃取能力的提高是有利的。通过实验得出在萃取雌二醇时CO<sub>2</sub>流量为 12 kg/h时,得率较高。因此,选择最佳CO<sub>2</sub>流量为 12 kg/h。

[0025] (4)萃取时间对雌二醇提取物得率的影响

选择在萃取压力30MPa,温度47 $^{\circ}$ C,CO<sub>2</sub>流量为12 kg/h 条件下,萃取不同的时间,得率见图4。

[0026] 由图4可知,随着萃取时间的增加,萃取物得率增加,但当萃取时间达到 90 min以后,随着时间的延长得率增加很缓慢,考虑到现实中的经济因素,再继续延长萃取时间是不

合理的,所以选择最佳萃取时间为90 min。

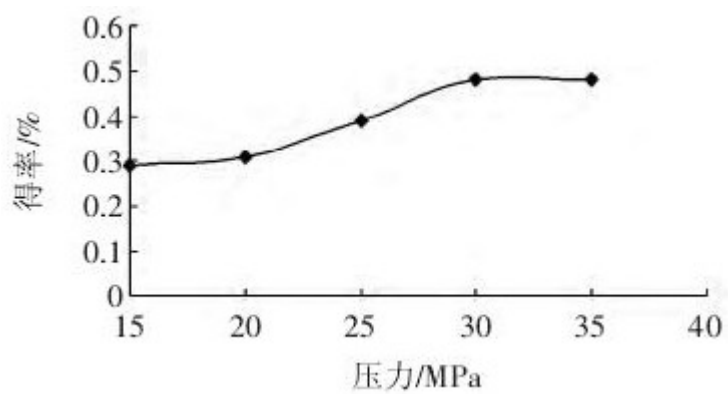


图1

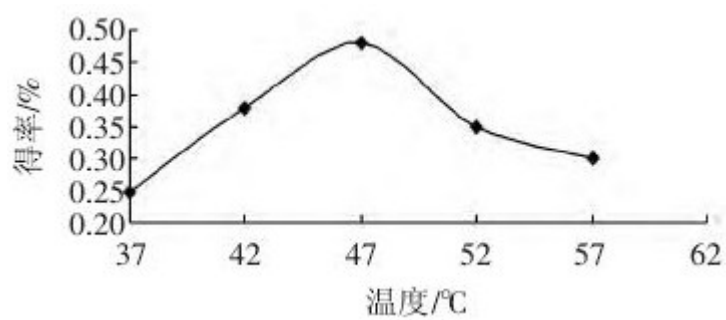


图2

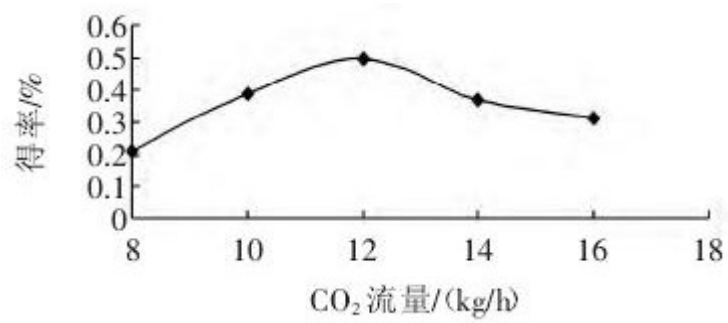


图3

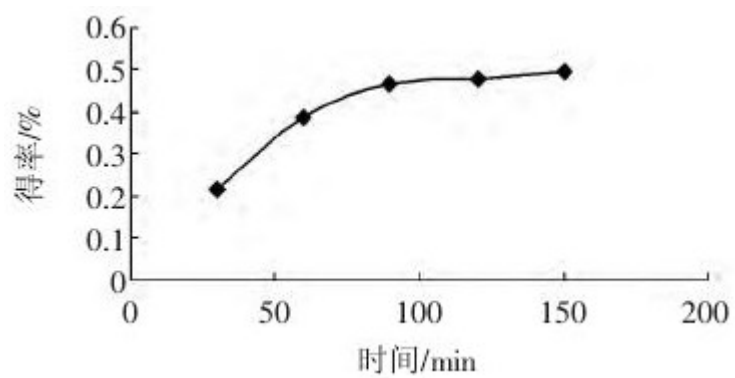


图4



专利名称(译)	一种超临界CO <sub>2</sub> 萃取林蛙卵雌二醇的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109725147A</a>	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201711035900.X	申请日	2017-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 张淑雅 杜霞		
发明人	洪霞 张淑雅 杜霞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种超临界CO<sub>2</sub>萃取林蛙卵雌二醇的方法，其方法如下：  
（1）预处理制得林蛙卵粉，（2）选用超临界CO<sub>2</sub>萃取方法进行林蛙卵雌二醇的萃取。本发明使萃取过程充分接触，萃取率高，不添加任何其他成分，雌二醇纯度高、质量好。

