

高压液相色谱法测定林蛙油、中华绒螯蟹卵和鲫鱼卵中雌二醇的含量

李 婷¹, 王 铮¹, 张海波¹, 金莉莉¹, 王秋雨^{1*}, 马玉珠²

(1. 辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036; 2. 辽宁北方山奇生物科技有限公司, 沈阳 100010)

摘 要: **目的** 利用高压液相色谱法测定东北林蛙输卵管(林蛙油)、中华绒螯蟹卵(蟹黄)以及鲫鱼卵(籽)中雌二醇的含量。**方法** 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(63:37), 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量为 10 μL。**结果** 在 0.3~10 μg/mL 浓度范围内, 高压液相色谱图峰面积与雌二醇浓度线性关系良好, 其回归方程为 $Y=4203.8X-661.95$, 相关系数 $R=0.9991$ 。林蛙油、中华绒螯蟹卵和鲫鱼卵中雌二醇的含量分别为 3.00、0.42、0.54 μg/g。**结论** 超声波法可以有效提取样品中的雌二醇, 通过优化所建立的方法对其具有良好的线性关系和回收率, 高压液相色谱峰型美观、分离效果好。

关键词: 林蛙油; 中华绒螯蟹卵; 鲫鱼卵; 高压液相色谱; 雌二醇

Estradiol concentration in *Rana oviduct*, ovum of *Eriocheir sinensis* and ovum of *Crucian carp* by high pressure liquid chromatography

LI Ting¹, WANG Zheng¹, ZHANG Hai-Bo¹, JIN Li-Li¹, WANG Qiu-Yu^{1*}, MA Yu-Zhu²

(1. Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Bei Fang Shan Qi Biological Technology Co., Ltd. of Liaoning, Shenyang 100010, China)

ABSTRACT: Objective To determine the concentration of estradiol in *Rana oviduct*, ovum of *Eriocheir sinensis* and ovum of *Crucian carp* by high pressure liquid chromatography. **Methods** The chromatographic column Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Chromatographic conditions were as follows: the mobile phase was acetonitrile-water (63:37), the detection wavelength was 280 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 30 °C, and sample amount was 10 μL. **Results** A good linearity were obtained in the range of estradiol concentration 0.3~10 μg/mL with the above condition. Its regression equation was $Y=4203.8X-661.95$ with the correlation coefficient $R=0.9991$. The estradiol concentration of *Rana oviduct*, ovum of *Eriocheir sinensis* and ovum of *Crucian carp* were 3.00, 0.42, 0.54 μg/g, respectively. **Conclusion** The estradiol in these samples could be extract effectively by ultrasonic method. The optimized method has a good relationship and recovery rate for estradiol, and its peak pattern and separating effect of HPLC was good.

KEY WORDS: *Rana oviduct*; ovum; *Eriocheir sinensis*; *Crucian carp*; High pressure liquid chromatography; estradiol

基金项目: 辽宁大学博士启动基金项目

Fund: Supported by Dr. Start-up Fund Projects of Liaoning University

*通讯作者: 王秋雨, 教授, 主要研究方向为功能食品的研发和病原微生物的分子生物学检测。E-mail: qiuyuwang@lun.edu.cn

*Corresponding author: WANG Qiu-Yu, Professor, Life Science, Liaoning University, No.66, Chongshan Road, Huanggu District, Shenyang, 110036, China. E-mail: jingdaping@gmail.com

1 引言

林蛙油(俗称哈士蟆油)是成熟雌性东北林蛙的干燥输卵管,是已载入《中药大词典》的珍贵滋补佳品,具有润肺生津、补肾益精等功效^[1]。现代生物医学实验证明其具有抗疲劳、延缓衰老和增强免疫力等作用^[2]。林蛙油中所含的雌激素主要为雌二醇,对治疗一些女性妇科疾病、预防骨质增生^[3]、调节体内脂质代谢有一定功效,但是过多摄入雌二醇,也会导致人体某些癌症的发生,如乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌等^[4]。中华绒螯蟹卵俗称蟹黄,是螃蟹体内的卵,其中含有丰富的蛋白质、磷脂等,营养丰富,有清热解毒、补骨活血、滋阴祛痰的功效,而且对于淤血、黄疸、腰腿酸痛和风湿性关节炎等有一定的食疗效果^[5]。鱼籽则为鱼卵,蛋白质含量高,也富含胆固醇,是人类大脑和骨髓的良好补充剂、滋长剂,鱼籽不仅具有促进发育、增强体质、健脑等作用,而且还可以起到乌发的作用,使人焕发青春^[6]。迄今文献报道了多种测定雌二醇的HPLC方法,但尚未见测定蟹黄和鱼籽中雌二醇含量的报道。本文采用高压液相色谱法测定林蛙油、螃蟹黄以及鲫鱼籽中雌二醇的含量,意在为林蛙油的食用安全性提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料、试剂与主要仪器

林蛙油产于辽宁宽甸;中华绒螯蟹、鲫鱼购于辽宁沈阳北行农贸市场;雌二醇、甲醇、乙腈为色谱纯,丙酮为分析纯,购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;高压液相色谱仪 Waters e2695 Separations Module(沃特世科技有限公司);检测器为 Waters 2998 Photodiode Array Detector(沃特世科技有限公司);工作站为 Empower(沃特世科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(63:37)^[7],检测波长为 280 nm,流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL^[8,9]。

2.2.2 标准品溶液的制备:精密称定干燥至恒重的色谱级雌二醇 10 mg 于 100 mL 容量瓶中,加入甲醇使其溶解并定容至刻度,摇匀,配置成 100 μg/mL 的标准品溶液^[10]。

2.2.3 样品溶液的制备:分别取烘干至恒重的林蛙油、中华绒螯蟹卵和鲫鱼籽,用研钵研细,分别精密称定 1.000、2.000、5.000 g 样品置于锥形瓶中,加入 50 mL 丙酮,浸泡 24 h 后,超声处理 40 min,滤纸过滤;将滤渣重新置于 50 mL 丙酮浸泡 24 h,超声并过滤(条件如上),合并滤液,使用旋转蒸发仪干燥,用 1 mL 的甲醇溶解,即得到样品溶液^[11]。

2.2.4 标准品线性关系测定 将标准品溶液分别稀释成 0.3、0.5、1、5、10 μg/mL,进样 10 μL,按照上述色谱条件进行测定,以雌二醇的质量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得出回归方程及相关系数。

2.2.5 样品雌二醇含量的测定 分别将样品溶液经色谱仪 10 μL 进样,同样按照上述色谱条件进行测定,根据同一保留时间下的出峰面积,外标法计算样品中雌二醇的含量。

3 结果与分析

3.1 线性关系

雌二醇标准品溶液的高压液相色谱图见图 1。实验测得雌二醇标准品溶液在 0.30~10 μg/mL 范围具有良好的线性关系,回归方程为 $Y=4203.8X-661.95$,相关系数 $R=0.9991$ 。

3.2 样品中的雌二醇含量

根据峰面积外标法计算样品中的雌二醇含量,林蛙油、蟹黄和鱼籽的含量分别为 3.00、0.42、0.54 μg/g,高压液相色谱图分别见图 2、图 3、图 4。

3.3 精密度试验

精密吸取标准品溶液,按上述色谱条件,连续进样 6 次,测定的峰面积 RSD 平均值为 1.08%,结果表明仪器的精密度良好。

3.4 重复性试验

分别精密吸取样品溶液,按上述色谱条件,连续各进样 3 次,测得林蛙油、蟹黄和鱼籽的峰面积 RSD 平均值分别为 1.78%、1.05%、0.83%,表明分析方法重复性好。

3.5 回收率试验

向 3 份样品中分别加入 80%、100%、120% 的雌二醇标准品,每添加一浓度重复 3 次,按 2.2.3 步骤制

备样品溶液, 再按上述色谱条件进样, 测定并计算回收率^[12], 结果如表 1 所示。三个样品中雌二醇的回收率分别为 97.29~103.31%、99.43~102.39%、98.36~100.76%, RSD 分别为 1.81%、1.47%、1.33%。

4 讨论与结论

在样品前处理过程中, 考虑到雌二醇不溶于水、溶于丙酮、微溶于乙醇, 所以本实验选择用丙酮作为提取溶剂^[13]。鉴于超声波提取法方便且节省时间, 从而选择用超声波提取法提取样品中的雌二醇。

在本实验的色谱条件选择中, 由于乙腈和甲醇的溶剂截止波长分别为 190 nm 和 205 nm, 刘娟等^[11]发现蛤蟆油中雌二醇在 205 nm 处有最大吸收峰, 修丽华等^[10]发现其在 280 nm 波长处也有较强的吸收峰, 为了排除溶剂峰对实验结果的影响, 最终选择 280 nm 作为雌二醇的吸收波长。本研究经过多次摸索, 尝试用乙腈和水作为流动相洗脱样品中的雌二醇^[14], 发现用乙腈作为流动相比甲醇的出峰效果好、分离完全, 所以确定选择用乙腈和水作为流动相进行检测, 更细化了流动相的比例, 最终选择乙腈-水的比例为

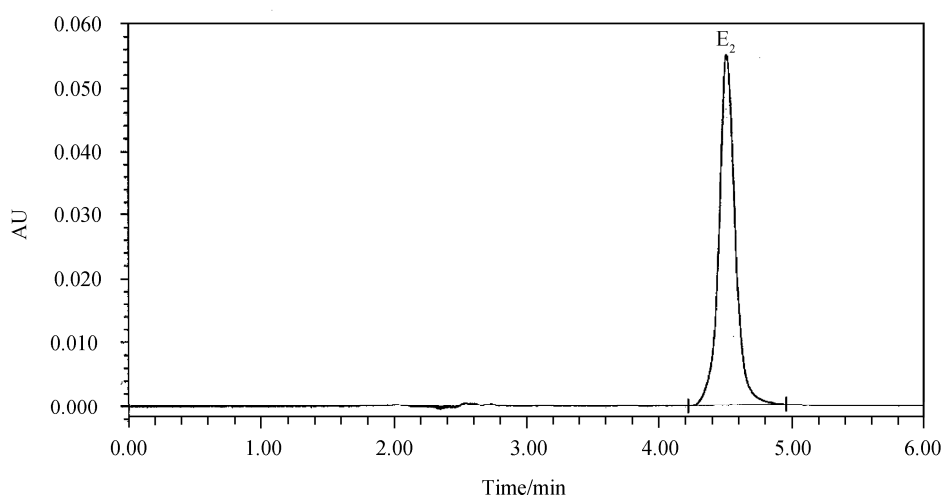


图 1 雌二醇标准品溶液高压液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of estradiol

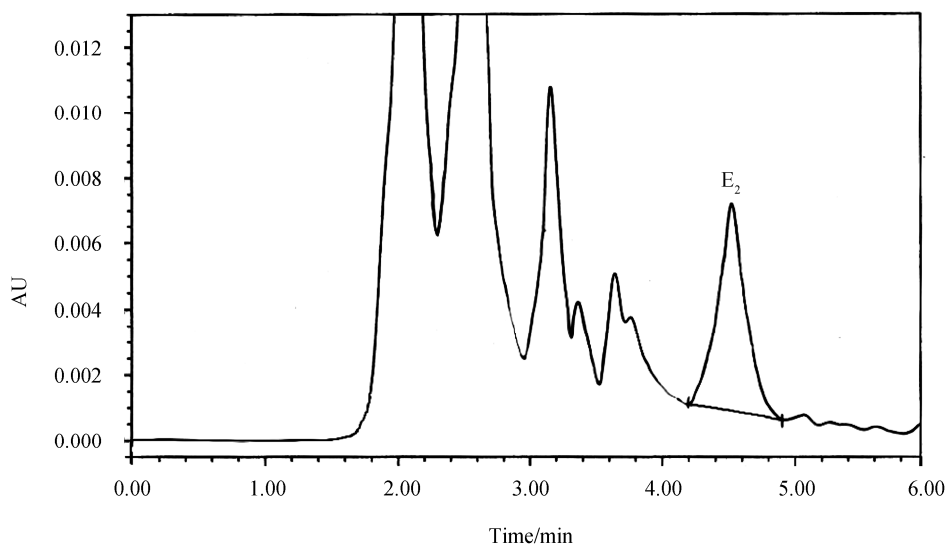


图 2 林蛙油样品高压液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of *Rana oviduct*

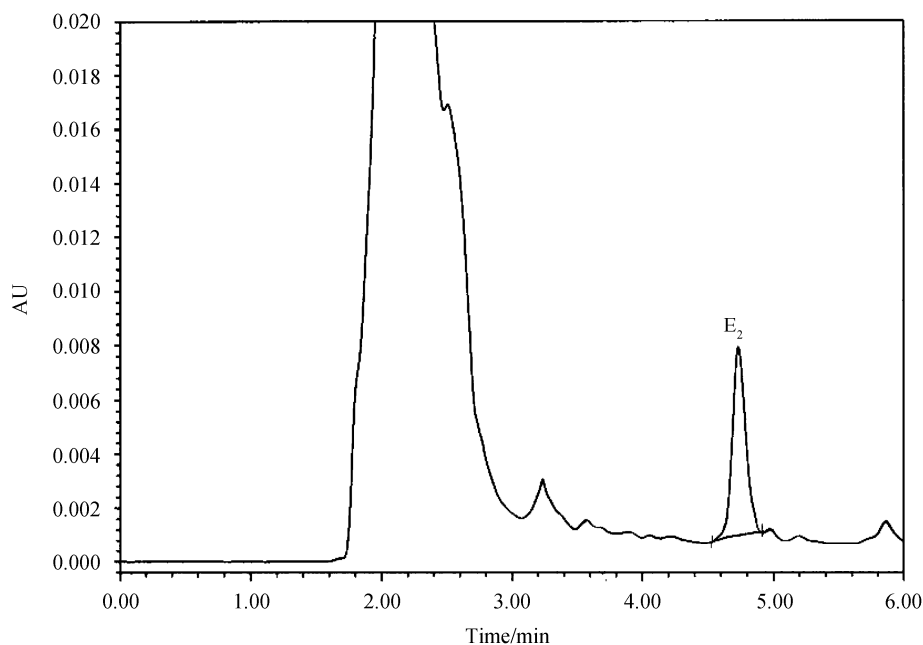


图3 螃蟹黄样品高压液相色谱图

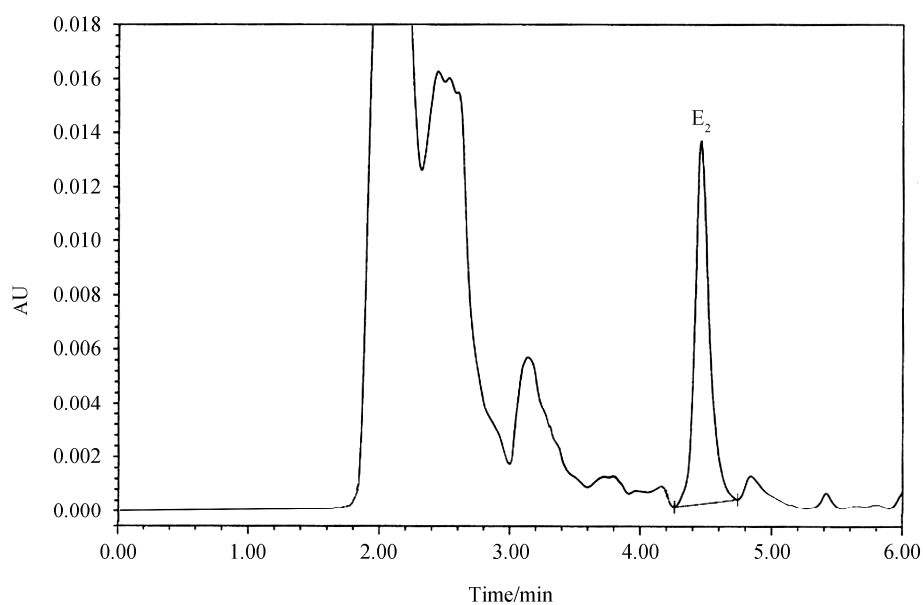
Fig. 3 HPLC chromatogram of *Eriocheir sinensis* ovum

图4 鱼籽样品高压液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of *Crucian carp* ovum

63:37。通过此分析方法,三个样品中的雌二醇均得到了很好的分离且回收率也满足要求,从而为蟹黄及鱼籽中雌二醇含量的测定提供了一定的理论依据,具有广阔的应用前景。

对于林蛙油中雌二醇含量的测定,王丽兰^[15]等

对哈士蟆油成分分析中,通过从脂溶性物质中提取雌二醇,测定其含量为 52.3 ± 5.89 pg/100 mg,陈晓平等^[16]通过放免法测得林蛙油中雌二醇含量为 25.03 μ g/g。近期刘娟^[11]等和李坚等^[13]使用高压液相色谱法测定林蛙油中雌二醇的含量,结果分别为 3.6 μ g/g 和

表 1 样品的雌二醇回收率测定结果
Table 1 Recoveries of estradiol in three samples

样品	样品中雌二醇含量 (μg/g)	加入量 (μg/g)	测得量 (μg/g)	平均回收率 (%)
林蛙油	3.0012	2.409	5.2635	99.64
林蛙油	3.0084	3.008	6.2156	
林蛙油	3.0003	3.600	6.4904	
蟹黄	0.4236	0.336	0.7553	100.98
蟹黄	0.4205	0.420	0.8498	
蟹黄	0.4196	0.504	0.9457	
鱼籽	0.5421	0.432	0.9581	99.50
鱼籽	0.5413	0.541	1.0756	
鱼籽	0.5409	0.648	1.1979	

0.2271 mg/g。本文通过改进高压液相色谱条件,对产于辽宁宽甸的林蛙油中雌二醇进行了精确测定,结果为 3.00 μg/g,与刘娟^[11]的报道相似。

林蛙油是营养价值极高的保健营养品,但是民间以及文献曾报道雌二醇可以引发癌症^[17,18],使得社会上部分人食用时出现担忧。本文比较了林蛙油、蟹黄和鱼籽中的雌二醇含量,实验结果表明,三种样品中均含有一定量的雌二醇。我们认为虽然林蛙油中雌二醇含量相对较高,但由于日常林蛙油食用量较小,按照成人(60 kg 体重)食用林蛙油 3 g/日,换算成雌二醇的量约为每日摄入 9.00 μg,相当于食用蟹黄和鱼籽约 18 g。雌二醇为天然雌激素,生物活性高,口服无效,虽然在胃肠道迅速吸收,但在肝脏很快被代谢^[19-21]。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大词典(下册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1648-1651.
Jiangsuxin Medical College. The dictionary of traditional Chinese Medicine (Part ii) [M]. Shanghai: People's Publishing House, 1977: 1648-1651.

[2] 包玉晓. 林蛙油化学成分的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(3): 37-38.
Bao YX. The Research Progress of *Rana dybowskii* oviduct chemical composition [J]. J Anim Sci Vet Med, 2009, 28(3): 37-38.

[3] 洪敏. 老年女性骨质疏松患者雌二醇与骨钙素的相关性[J].

中国老年学杂志. 2013, 33(15): 3782-3783.

Hong M. The Correlation between Estradiol and osteocalcin in old women osteoporosis patients [J]. Chin J Gerontol, 2013, 33(15): 3782-3783.

[4] 江文洋, 付向宁, 廖永德. 雌激素与肺癌关系的研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2011, 26(5): 551-554.
Jiang WX, Fu XN, Liao YD. The Research Progress of relationship between Estrogen and Lung Cancer [J]. Pract J Cancer, 2011, 26(5): 551-554.

[5] Planas-Silva MD, Bruggeman RD, Grenko RT, *et al* . Role of c-Src and focal adhesion kinase in pmgre8sion and metastasis of estrogen receptor-positive breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(1): 73.

[6] 许庆陵, 崔铁军, 刘靖, 等. 速冻河蟹肉及蟹黄的营养成分分析[J]. 水产科学, 2003, 22(6): 12-14.
Xu QL, Cui TJ, Liu J, *et al* . The Nutrition Composition Analysis of *Eriocheir sinensis* Meat and Eggs [J]. Aquatic Sci, 2003, 22(6): 12-14.

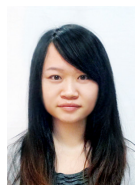
[7] 侯冬岩, 回瑞华, 李铁纯, 等. 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定鲫鱼籽中 10 种元素[J]. 中国无机分析化学, 2011, 1(3): 58-61.
Hou DY, Hui RH, Li TC, *et al* . Determination of 10 Elements in *Carassius Auratus* Seed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) [J]. Chin J Inorga Anal Chem, 2011, 1(3): 58-61.

[8] 周建科, 张明翠, 李娜, 等. 豆奶粉中三种雌激素的高效液相色谱法测定[J]. 粮油食品科技, 2009, 17(1): 42-43.
Zhou JK, Zhang MC, Li N, *et al* . Determination of three kinds of

- estrogens in the soy milk powder by HPLC [J]. Food Sci Technol, 2009, 17(1): 42–43.
- [9] 康海宁, 欧阳珊, 林黎, 等. 液相色谱-串联质谱法检测动物肝肾组织中3种雌激素[J]. 色谱, 2012, 10(30): 986–990.
- Kang HN, Ou YS, Lin L, *et al.* Determination of three estrogens in animal liver and kidney tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 10(30): 986–990.
- [10] 修丽华, 许跃东, 李毅然, 等. 高效液相色谱法检测乳粉中雌二醇的残留量[J]. 中国乳品工业, 2011, 39, (4): 58–59.
- Xiu LH, Xu YD, Li YR, *et al.* Determination of β -Estradiol residues in milk powder by HPLC [J]. Dairy Ind, 2011, 39, (4): 58–59.
- [11] 刘娟, 刘爽, 刘程诚. 高效液相色谱法测定哈蟆油中雌二醇的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(1): 138–139.
- Liu J, Liu S, Liu CC. Determination of Estradiol in Oviductus Ranae by HPLC [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2010, 37(1): 138–139.
- [12] 魏瑞成, 葛峰, 郑勤, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定青菜中雌酮、雌二醇和雌三醇残留[J]. 江苏农业学报, 2013, 04(34): 880–884.
- Wei RC, Geng F, Zheng Q, *et al.* Determination of Oestrone, Estradiol and estriol of vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2013, 04(34): 880–884.
- [13] 李坚, 易延遼, 周林娟, 等. 高效液相色谱法测定不同产地蛤蟆油中雌二醇的含量研究[J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(6): 114–115.
- Li J, Yi YK, Zhou LJ, *et al.* Determination of Estradiol in Oviductus from different producing areas [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2011, 27(6): 114–115.
- [14] 张建勋, 田颖, 李雪兰, 等. 高效液相色谱法测定饲料中雌二醇含量[J]. 中国饲料, 2005, 12: 34–35.
- Zhang JX, Tian Y, Li XL, *et al.* Determination of Estradiol in Fodder by HPLC [J]. Chin Feed Mag, 2005, 12: 34–35.
- [15] 王丽兰. 哈士蟆油成分分析[J]. 中草药, 1982, 13(9): 5.
- Wang LL. Component analysis of Rana oviduct [J]. Chin Herbal Med, 1982, 13(9): 5.
- [16] 陈晓平, 崔敬爱, 胡饶辉. 林蛙油主要营养成分的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 361–363.
- Chen XP, Cui JA, Hu RH. Study on the Main Nutrition Elements of Oviductus Ranae [J]. Food Sci, 2005, 26(8): 361–363.
- [17] Turan VK, Sanchez RI, Li JJ, *et al.* The effects of steroidal estrogens in ACI rat mammary carcinogenesis: 17 β -estradiol, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 16 α -hydroxyestradiol, and 4-hydroxyestrone [J]. J Endocrinol, 2004, 183: 91–99.
- [18] Li JJ, Kirkmam H, Hunter RL. Sex difference and gonadal hormone influence on syrian hamster kidney esterase isozymes [J]. J Histochem Cytochem, 1968, 17(6): 386–393.
- [19] 李烨, 李燕. 雌激素与肿瘤发生[J]. 国外医学药学分册, 1999, 26(2): 71–75.
- Li H, Li Y. Estrogen and tumorigenesis [J]. Foreign Med Sci Sect on Pharm, 1999, 26(2): 71–75.
- [20] Chemopreventive Effects of Berries and Berry Components in Animal Models: Prevention of Estrogen-Mediated Mammary Tumors in ACI Rats by Berries [J]. Berries and Cancer Prev, 2011, 143–161.
- [21] Ganapathy V, Banach-Petrosky W, Xie W, *et al.* Luminal breast cancer metastasis is dependent on Estrogen signaling [J]. Clin Experim Metast, 2012, 29(5): 493–509.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



李婷, 硕士在读, 主要研究方向为食品科学研究。
E-mail: tingzai1004@126.com



王秋雨, 教授, 主要研究方向为功能食品的研发和病原微生物的分子生物学检测。
E-mail: qiuyuwan@lun.edu.cn