

研究简报

薄层色谱扫描法测定草鱼胆汁酸的含量

TLC-SCANNING DETERMINATION OF BILE ACID IN GRASS CARP

刘玉芳 俞鲁礼 刘振华

(上海水产大学, 200090)

Liu Yu-fang, Yu Lu-li and Liu Zheng-hua

(Shanghai Fisheries University, 200090)

关键词 薄层色谱扫描法测定, 胆汁酸, 草鱼

KEYWORDS TLC-scanning determination, bile acid, grass carp

多年来,动物胆汁的研究已有较大成就,熊胆、蛇胆、鹿胆是名贵药材,猪胆、牛胆、羊胆、鸡胆、鹅胆、鸭胆也用来制药,具有清心化痰,镇惊降压,平肝明目,解毒等作用[刘直,1990]。动物胆汁中含有胆酸,去氧胆酸,石胆酸,猪去氧胆酸,熊去氧胆酸,鹅去氧胆酸等等,这些成份大多以牛磺酸、甘氨酸结合的形式存在于胆汁中。本文通过对草鱼胆汁酸盐进行薄层色谱扫描分析研究,发现草鱼胆汁中含有胆酸,去氧胆酸及牛磺脱氧胆酸等成份。这就提供了一个研究方向,从草鱼胆汁中提取胆酸,去氧胆酸,牛磺脱氧胆酸用来制药,变废为宝,提高淡水养殖鱼类的经济价值,造福于人类。

1 实验材料和仪器

1.1 药品与试剂

游离型胆汁酸标准品:①胆酸(CA);②去氧胆酸(DCA);③石胆酸(LCA)(Fluka产品)。结合型胆汁酸标准品:①牛磺脱氧胆酸(TDCA);②甘氨酸胆酸(GCA);③甘氨酸鹅脱氧胆酸(GCDCA)(Sigma产品)。上述标准品分别用无水乙醇配成1mg/ml标准品溶液。

试剂(分析纯):95%乙醇,无水乙醇,正丁醇,冰醋酸,氢氧化钠,氢氧化钾,环己烷,异辛烷,甲醇,乙醚,乙酸乙酯,磷酸,盐酸,磷钼酸等。

1.2 薄层层析板

硅胶G;薄层层析用(青岛海洋化工厂生产)。玻璃板:200×200mm,0.5%羧甲基纤维素钠溶液与硅胶G混匀,用电动薄层涂布器铺板,室温放置过夜,于105℃烘箱中活化1小时,贮于干燥器中备用,薄层板厚度为

1995-03-23收到。

0.5mm。

1.3 展开剂溶剂系统

结合型胆汁酸溶剂系统—S₁:正丁醇:冰醋酸:水(10:1:1)。游离型胆汁酸溶剂系统—S₂:环己烷:乙酸乙酯:冰醋酸:水(1:32:1:1)。S₃:异辛烷:冰醋酸:乙醚:正丁醇:水(10:5:5:3:1)。

1.4 显色剂

①10%磷钼酸无水乙醇溶液;②10%磷酸无水乙醇溶液。

1.5 仪器

薄层色谱扫描仪 TLC,瑞士 CAMAG,型号—SCANNER— I;附数据处理机—SP4290;电动薄层涂布器—CAT.NO. 21602;双波长紫外分析器(入为254和366nm)—UV—CABINET11;多用双槽层析缸,25×23×7.5cm;定量毛细管。

1.6 薄层扫描条件

W 灯,波长650nm,狭缝0.8×10mm,扫描速度2mm/秒,反射法线性扫描。

1.7 薄层分离条件的选择

草鱼胆汁所含化学成份较多[张天民,1983],主要为胆酸,去氧胆酸,牛磺去氧胆酸,胆红素及无机盐等等。我们选用胆酸,脱氧胆酸,牛磺脱氧胆酸作为指标,研究了薄层分离条件,同时排除其它成份的干扰。

2 实验方法及结果

2.1 草鱼胆汁酸盐的提取

草鱼胆汁100克置入圆底烧瓶中,水浴浓缩至干,除去水份得膏状固体物质,加入100ml95%乙醇,数粒沸石,活性炭少许,装上回流装置,水浴加热至沸,回流30分钟,趁热布氏漏斗过滤,将滤液浓缩至干,再用95%乙醇重结晶一次,将所得膏状物置于100℃干燥箱中干燥,将所得固体物质置研钵缸中研磨成粉末状固体,即为草鱼胆汁酸盐。将此草鱼胆汁酸盐用无水乙醇配成2mg/ml 的供试液样品。

2.2 草鱼结合型胆汁酸盐的薄层色谱分析

2.2.1 草鱼结合型胆汁酸盐的薄层色谱观察[王芳生,1989]

用定量毛细管分别吸取结合型胆汁酸盐标准品和草鱼胆汁酸盐供试液样品,点于同一块硅胶 G 薄层板上。用 S₁展开剂系统上行法展开,展层15cm 后,取出,凉干,喷以显色剂 I,置于105℃干燥箱中加热5分钟,标准样品显蓝色,草鱼胆汁酸盐亦呈现蓝色斑点;用显色剂 II 显色时,紫外灯下(366nm)观察到荧光斑点,TLC 图谱见图1。

由图1可以看出,草鱼胆汁酸盐经层析后出现蓝色斑点,其中在相当于牛磺脱氧胆酸 Rf 值处有一斑点存在,而且颜色较深,说明草鱼胆汁酸盐中含有牛磺脱氧胆酸。草鱼胆汁酸盐样品还用游离型胆汁酸溶剂系统 S₂溶剂系统进行上行法展开,层析结果表明,样品没有展开,仍旧停留在原点,表明草鱼胆汁酸盐是以结合型存在,而不是以游离型存在于胆汁中。

2.2.2 草鱼胆汁酸盐中牛磺脱氧胆酸薄层扫描测定

TDCA 线性范围及标准曲线的绘制。分别用定量毛细管吸取 TDCA 标准液1、2、3、4微升点于同一块硅

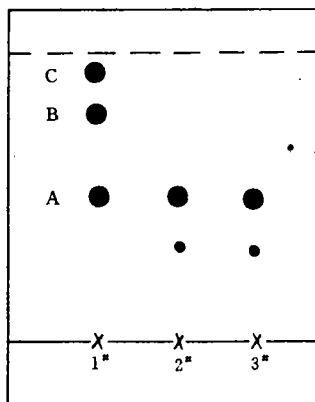


图1 草鱼胆汁酸盐及结合型胆汁酸盐标准品 TLC 图谱

Fig. 1 TLC of grass carp combinig bile acid and standard samples

A,牛磺脱氧胆酸; B,甘氨酸胆酸; C,甘氨酸脱氧胆酸。
1, 标准品; 2, 样品甲; 3, 样品乙。

胶 G 薄层板上,同前展开,晾干,用显色剂 I 显色后,立即用薄层色谱扫描仪测定其各斑点的峰面积,以 TDCA 浓度为横坐标,面积积分为纵坐标,绘制标准曲线。测定结果,面积积分值与点样量呈线性关系。回归方程 $y=197706x-65773$, 相关系数 $r=0.9955$ 。

草鱼胆汁酸盐中 TDCA 测定结果。在制作标准曲线的同一块硅胶 G 薄层板上,点上供试液样品,与标准品同时层析,显色,测定其峰面积,测定结果草鱼胆汁酸盐中 TDCA 的含量为 39% 左右。

2.3 草鱼胆汁酸盐的碱水解

2.3.1 水解试验

①碱的浓度。上述薄层层析结果表明草鱼胆汁中的胆汁酸盐是以结合型存在。为了测定草鱼胆汁中游离型胆汁酸的成份及含量,需要对草鱼胆汁酸盐进行水解。我们选用了 10% 和 20% 二种不同浓度的 NaOH 溶液对同一样品进行相同时间水解,结果表明 20% NaOH 溶液水解的效果略好一些。15% KOH 溶液水解后产物得率很低。②水解时间。同一样品经 8、12、16、24 小时水解,测定结果表明,水解时间长,水解产物得率高。③水解温度。同一样品经过 100℃ 和 120℃ 水解 24 小时试验,100℃ 时样品水解不完全,以 120℃ 水解 24 小时水解效果最佳。④样品处理。胆汁酸盐 2 克,加 10% NaOH 溶液 30ml,煤气灯上封安瓶,置入 120℃ 烘箱中恒温水解 24 小时。水解完毕后,将水解物用 6NHCl 调节 pH 为 1-2,放置数小时,离心得沉淀物,用蒸馏水洗涤沉淀物至中性,干燥后得白色碱性水解产物,得率为 68% 左右。

2.3.2 草鱼游离型胆汁酸薄层层析

样品液:将草鱼胆汁酸盐碱性水解产物用无水乙醇配成 2mg/ml 溶液。

将上述样品液和胆酸及脱氧胆酸标准液用定量毛细管点样于硅胶 G 薄层板上,用 S2 溶剂系统上行法展开,展层 15cm 后,取出晾干,喷以显色剂 I,烘箱中 105℃ 加热 5 分钟,样品及胆酸和脱氧胆酸标准品呈现蓝色斑点。用显色剂 II 显色时,紫外灯下 (366nm) 观察到发亮的荧光斑点,见 TLC 图谱 2。用 S3 溶剂系统上行展层后亦得同样结果。

由图 2 可以看出,草鱼胆汁酸盐经碱水解层析后呈现蓝色斑点,其中对应于 A、B 二个斑点的 Rf 值分别与胆酸及脱氧胆酸相同,表明草鱼胆汁酸盐经碱水解后含有胆酸及脱氧胆酸二种成份。

2.3.3 草鱼胆汁酸盐碱水解物中 CA 和 DCA 薄层色谱扫描测定

得 CA 标准液用定量毛细管分别吸取 1、2、3、4 微升点于同一块硅胶 G 薄层板上,样品液也点于同一块板上,按定性鉴别项下方法展开,再于薄层色谱扫描仪

上进行扫描测定。分别以样品浓度为横坐标,面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,测得结果,面积积分值与点样量呈线性关系,回归方程为 $y=199232+137748x$, 相关系数 $r=0.9999$, CA 测定结果为 15% 左右。

将 DCA 标准液和样品液同样进行上述处理,测定结果,面积积分值与点样量呈线性关系,回归方程为 $y=175641+176032x$, 相关系数 $r=0.9998$, DCA 测定结果为 10% 左右。

3 小结

(1)草鱼胆汁酸盐通过薄层色谱分析含有牛磺脱氧胆酸,其含量为 39% 左右。草鱼胆汁酸盐经碱水解后薄层色谱分析含有胆酸和脱氧胆酸,其含量分别为 15% 和 10% 左右。

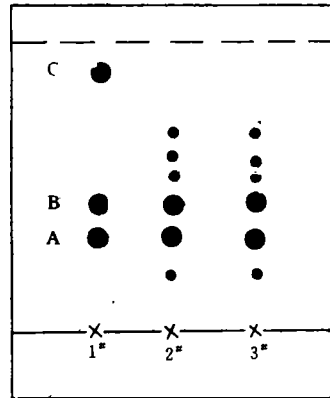


图 2 草鱼游离型胆汁酸及标准胆汁酸样品 TLC 图谱

Fig. 2 TLC of grass carp free state bile acid and standard samples

A, 胆酸; B, 脱氧胆酸; C, 石胆酸。
1, 标准品; 2, 样品; 3, 样品

- (2)草鱼胆汁中除了上述三个成份外,还有其它成分,尚待研究。
- (3)草鱼胆汁中通过实验表明,主要以结合型胆汁酸盐形式存在。
- (4)本法取样量少,灵敏、快速、准确。

参 考 文 献

- [1] 王芳生,1989.薄层扫描法测定熊胆引流物中胆汁酸的含量.药学报,24(5):397—400。
- [2] 张天民,1983.动物生化制药,257.人民出版社(京)。
- [3] 刘 直,1990.简述熊去氧胆酸的药理作用.中成药,12(1):33—34。