

胆汁酸类化合物的毛细管区带电泳法分析

朱丽玢^{1*}, 洪筱坤²

(1. 北京毒物药物研究所毒检中心, 北京 100850; 2. 上海中医药大学, 上海 200032)

摘要: 目的 建立毛细管区带电泳法分离胆汁酸类化合物。方法 缓冲液含硼砂 126 mmol·L⁻¹、磷酸氢二钠 43 mmol·L⁻¹, 18% 甲醇, 磷酸调至 pH 9.3。毛细管柱 570 mm × 0.05 mm (有效长度 500 mm), 操作电压 30 kV, 温度 30 °C, 检测波长 200 nm, 压力进样, 进样量 5 kPa × 8 s。结果 30 min 内一次性分离了 8 种结合型和游离型胆汁酸。加样回收率 89% ~ 107%。结论 本法简便, 可用于熊胆中胆汁酸的测定。

关键词: 胆汁酸; 毛细管区带电泳; 熊胆

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2002)03-0217-04

胆汁酸是一类广泛存在于各种动物胆汁中的生物活性物质, 对人及动物的生命活动起着重要的作用。各种胆汁中所含的游离型和结合型胆汁酸一般是并存的。文献^[1,2]报道大多采用高效液相色谱法或气相色谱法, 分别对结合型或非结合型胆汁酸进行分析, 不能一次性的检出结合型和游离型胆汁酸, 给胆汁类药材的鉴别、质量控制、体内代谢机理的研究以及临床检验的开展都带来了一定的困难。

高效毛细管电泳^[3]是一种迅速发展的分离新技术, 有分辨率高、分析时间短、进样量少和重现性良好的优点。而且仪器简单, 自动化程度高, 分析模式多样。因此在许多领域, 特别是生物医药领域显示了广泛的应用前景^[4]。

本文用该法使 8 种游离和结合型胆汁酸一次性得到分离, 系统地研究了各种因素对分离产生的影响, 并用已建立的毛细管区带电泳法分析了 6 种熊胆中胆汁酸的成分和含量。

材料与 方法

仪器 HP 公司 HP^{3D} CE 毛细管电泳仪, 配套化学工作站。毛细管柱 570 mm × 0.05 mm (河北永年光导纤维厂), 有效长度为 500 mm。

试剂 硼砂、硼酸、磷酸氢二钠、β-环糊精、甲醇、乙醇及十六烷基磺酸钠均为分析纯, 水为市售

Spaklin 蒸馏水。

对照品 胆酸 (cholic acid, CA)、脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA)、牛磺胆酸 (taurocholic acid, TCA)、牛磺去氧胆酸 (taurodeoxycholic acid, TDCA)、鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA) 和牛磺熊去氧胆酸 (tauroursodeoxycholic acid, TUDCA) 均为 Sigma 产品; 熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 由上海医科大学提供。

样品 四川阿坝人工引流熊胆汁粉、四川阿坝熊胆、四川阿坝熊胆 3 号、四川阿坝熊胆 (吊胆)、四川阿坝熊胆 (扁胆) 和云南熊胆均由国家中药制药工程技术研究中心提供, 经叶愈青教授鉴定为熊科动物黑熊 (*Selenarctos thibetanus* G. Cuvier) 的胆囊。

标准溶液的配制 精确称取对照品适量, 用甲醇溶解, 配成各组分浓度分别为 4 mg·mL⁻¹ 的单一标准溶液。再精确称取对照品适量, 用甲醇溶解, 配成各组分浓度分别为 4 mg·mL⁻¹ 的混合标准溶液。

样品供试液的制备 将熊胆风干后研成粉末 (密度约为 1 g·cm⁻³), 精确称取约 43 mg, 加 20 倍体积的甲醇, 混合后超声 15 min, 以 2 500 r·min⁻¹ 速度离心 10 min, 吸取上清液至 10 mL 量瓶中, 重复 3 次, 补充甲醇溶液至刻度, 进样前用 4.5 μm 滤膜过滤。

电泳条件 缓冲液含硼砂 126 mmol·L⁻¹、磷酸氢二钠 43 mmol·L⁻¹, 18% 甲醇, 用磷酸调至 pH 9.3; 毛细管柱 570 mm × 0.05 mm (有效长度 500 mm); 操作电压 30 kV; 温度 30 °C, 检测波长 200 nm, 压力进样, 进样量 5 kPa × 8 s。每次进样前用 1 mmol·L⁻¹

收稿日期: 2001-07-26。

作者简介: 朱丽玢 (1973-), 女, 博士后。

* Tel: (010) 66931650, Fax: (010) 68211656,

E-mail: libinzh@sohu.com

NaOH、蒸馏水、运行缓冲溶液各洗 5 min。

结 果

1 缓冲溶液 pH 值的选择

按电泳法条件操作。缓冲溶液的 pH 对各组分的分离有很大影响(图 1)。

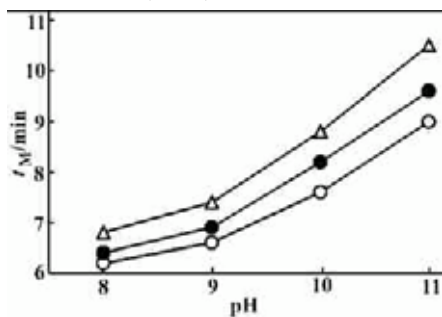


Figure 1 Effects of pH on migration time (t_M)
Buffer solution: 126 mmol·L⁻¹ disodium tetraborate, 43 mmol·L⁻¹ disodium hydrogenphosphate, 18% methanol; Temperature: 30 °C; Voltage: 30 kV; Total length of capillary: 570 mm and 500 mm from injection end; Detector: UV 200 nm; Pressure: 5 kPa, 8 s.

△—△ Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA);
●—● Taurochenodeoxycholic acid (TCDCA);
○—○ Taurodeoxycholic acid (TDCA)

结果表明,随着 pH 值的增加各峰的迁移时间也随之增加。在 pH 8 时 R_s 太小,在 pH 10 和 11 时出峰则太慢且基线不稳定,因而本实验选择缓冲溶液的 pH 值为 9.3。

2 缓冲溶液中电解质浓度的选择

分别试验了缓冲溶液中硼砂浓度为 100, 125, 150, 175, 200 mmol·L⁻¹ 时的分离情况。结果表明,硼砂浓度越高,电渗流、峰迁移时间和分离度都相应减小,但峰形状却越来越对称。因为随着浓度的增大,双电层厚度变薄, zeta 电势下降,电渗流(EOF)随之变小。因而选择 126 mmol·L⁻¹ 硼砂加入磷酸盐,随着后者浓度的增加,分离度和峰形均有所改善。但电解质浓度过高时电渗流会突然增大,电流也非常大,电渗流和电场强度的关系不成正比,不可取。最终选择的电解质为硼砂 126 mmol·L⁻¹, 磷酸氢二钠 43 mmol·L⁻¹。

3 有机改性剂对分离的影响

分别试用了甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈作为有机改性剂。后 3 种有机溶剂的加入并不能改善分离度,而甲醇的加入却使分离度有明显的改观。因而本文重点考察了甲醇对电渗流、各组分迁移时间和

电流的影响。随着甲醇含量的提高,电渗流明显减慢,各组分迁移时间加长,分离度也得到了明显的提高。在含甲醇 14% 时只分得 4 个峰;当甲醇含量提高到 16% 时,则可分到 6 个峰;继续加大甲醇含量到 18% 时,8 个组分完全分开。这主要是由于溶液离子强度降低,电导减小,电流降低,另外缓冲溶液粘度变大的缘故。文献曾报道,甲醇加到缓冲体系中会导致 Stern 层厚度变薄,导致电渗流变小。但甲醇的加入量是有限的,应考虑到缓冲体系各离子溶解度的问题。另外,甲醇量增大,虽可提高分离度,但同样增加了各组分的迁移时间,会导致分离效率降低。综合各种因素,甲醇的量选定为 18%。

4 线性关系考察

取混合标准溶液 1 mL 分别进样 4, 6, 8, 10, 12 和 16 s, 在选定的条件下,测定 5 次,以峰面积 Y 为纵坐标,进样时间 X 为横坐标计算回归方程,结果见表 1。各标准品的最低检测限为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

Table 1 Regression equation of bile acids ($n = 5$)

Component	Regression equation	Linear range/ mg·mL ⁻¹	Coefficient of correlation
TUDCA	$Y = 0.08314 X + 0.00421$	4.64 ~ 18.56	0.9990
TCDCA	$Y = 0.01961 X + 0.00865$	5.75 ~ 23.00	0.9965
TCA	$Y = 0.00469 X + 0.00137$	14.92 ~ 59.68	0.9974
TDCA	$Y = 0.02885 X - 0.00942$	4.61 ~ 18.47	0.9985
CA	$Y = 0.06839 X + 0.02473$	10.05 ~ 40.20	0.9954
DCA	$Y = 0.5839 X - 0.08905$	9.45 ~ 37.80	0.9968

TUDCA: Tauroursodeoxycholic acid; TCDCA: Taurochenodeoxycholic acid; TCA: Taurochoic acid; TDCA: Taurodeoxycholic acid; CA: Cholic acid; DCA: Deoxycholic acid

5 精密度实验

取混合标准溶液进样 10 s, 每 1 h 进样 1 次,共测试 5 次,计算每个峰保留时间和峰面积的 RSD。结果: CA, UDCA, TUDCA, CDCA, TCDCA, DCA, TDCA 和 TCA 的峰保留时间的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.8%, 1.0%, 1.0%, 1.6% 和 2.3%; 峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 2.8%, 3.1%, 1.5%, 2.2%, 1.2%, 3.1% 和 2.4%。

6 回收率试验

回收率测定用加样回收法。精确称取四川阿坝熊胆样品约 100 mg, 分别精确加入 DCA, CA, TUDCA, TCDCA, UDCA, CDCA 10 mg, 按照样品供试液制备方法处理,最后定容至 5 mL, 在选定的色谱条件下,每份平行进样 3 次,进样量 8 s, 测得各标准品的回收率为 89% ~ 107%。

7 毛细管区带电泳

取混合标准溶液在选定条件下进行电泳分离

(图 2), 特征谱见表 2。各组分均在 25 min 以前出峰, 且有很好的分离度。

Table 2 Character of standards by capillary zone electrophoresis

Peak	t_M /min	Peak width/min	Peak area/mAU ²	Peak height/mAU	RMT1	RMT2	N	R_s	$\mu_{ep} \times 10^{-2}$
CA	15.45	0.14	14.45	1.40	3.30	0.00	252600		9.32
UDCA	20.91	0.25	7.09	0.43	8.76	5.46	155895	27.72	6.89
TUDCA	21.42	0.14	60.16	6.67	9.27	5.97	540133	2.64	6.72
CDCA	22.32	0.18	4.47	0.33	10.17	6.87	338877	5.67	6.45
TCDCa	22.88	0.17	33.99	3.15	10.72	7.43	421890	3.21	6.29
DCA	23.55	0.20	6.97	0.45	11.40	8.10	298210	3.64	6.11
TDCA	24.10	0.16	15.82	1.53	11.95	8.65	498973	3.03	5.98
TCA	24.75	0.20	68.86	4.85	12.60	9.30	348034	3.64	5.82

RMT: Relative migration time; N: Theoretical plates; R_s : Resolution; μ_{ep} : Electrophoretic mobility

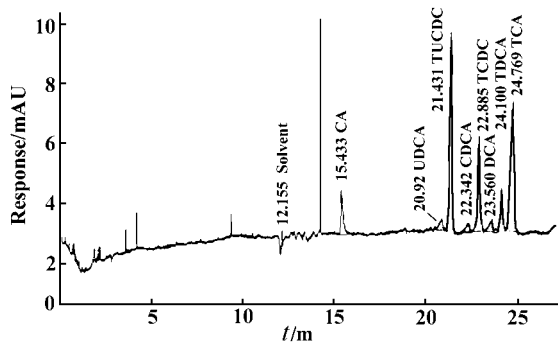


Figure 2 Electropherogram of standards of bile acids by capillary zone electrophoresis

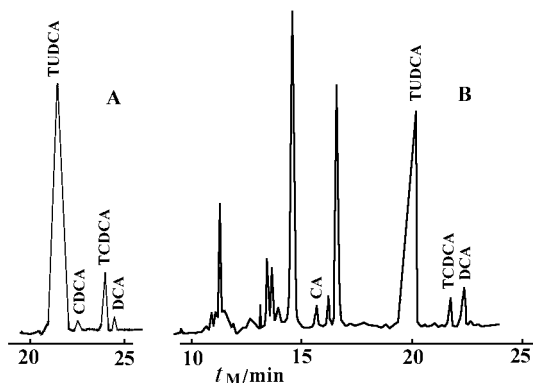


Figure 3 Electropherogram of samples by capillary zone electrophoresis

8 样品测定

取各样品供试液各 1 mL 于进样瓶中, 在选定的色谱条件下每个样品平行测定 3 次, 每次进样 12 s, 谱图见图 3(仅以 A. 四川阿坝熊胆及 B. 人工引流熊胆粉为例), 结果见表 3。

Table 3 Analytical results of samples (n = 3)

Sample	Content/ mg·g ⁻¹							
	UDCA	TUDCA	CDCA	TCDCa	DCA	CA	TDCA	TCA
Artificial drainage bear bile	-	412.2	Trace	76.2	86.4	40.6	-	-
Sichuan aba bear bile	-	433.7	-	11.4	-	32.9	Trace	-
Sichuan aba bear bile No.3	-	248.1	-	3.8	-	-	203.1	2.5
Sichuan aba hanging bear bile	-	322.8	Trace	23.1	93.2	Trace	-	-
Sichuan aba flat bear bile	22.9	521.7	28.3	Trace	192.8	51.7	-	-
Yunnan bear bile	-	716.4	Trace	-	54	-	-	-

A: Sichuan aba hanging bear bile; B: Artificial drainage bear bile

讨 论

本研究首次用毛细管区带电泳法分离了 8 种胆汁酸成分, 分析时间短, 峰形对称, 仪器操作简便, 溶剂耗费少, 充分显示了毛细管电泳法快速、高效、经济的特点。同高效液相法相比其迁移时间的重现性更好。另外, 由于采用毛细管区带电泳模式电泳的出峰次序是电正性 > 电中性 > 电负性, 因而熊胆中大部分不带电荷的组分随着电渗流先行流出, 并不干扰带负电荷的胆汁酸的鉴别分析, 从而无须进行复杂的样品前处理。

REFERENCES:

[1] Zhang QM, Yuan HN. High performance liquid chromatography determination of combined bile acids in bear bile [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1993, 13(5): 321 - 323.

- [2] Dai ZY, Tan GS, Qian KN, *et al.* Reverse high performance liquid chromatography determination of 8 combined bile acids in human bile [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1997, 25(4) :360 - 362 .
- [3] Deng YD, He JL. *High Performance Capillary Electrophoresis* (高效毛细管电泳) [M]. Beijing : Science Press ,1996 .1 - 2 .
- [4] Lin BC. *Introduction to Capillary Electrophoresis* (毛细管电泳导论) [M]. Beijing : Science Press , 1996 .27 - 28 .

SEPARATION OF BILE ACIDS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

ZHU Li-bin¹, HONG Xiao-kun²

(1 . Toxicant Detection Center , Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology , Beijing 100850 , China ;
2 . Shanghai Traditional Chinese Medicine University , Shanghai 200032 , China)

ABSTRACT: **AIM** To develop a method for separating the major bile acids by capillary zone electrophoresis (CZE) . **METHODS** The effect of different separation conditions , such as the compose , pH and the concentration of buffer , on the electro osmotic flow (EOF) , the migration time and resolution of 8 bile acids in this system were studied . The general trends in migration time could be correlated to the pH and concentration of the buffer . The effect of organic reagent on EOF and migration time were also investigated . By addition of methanol , the EOF went smaller than before , and better resolution was achieved . The experimental results showed that optimum separation was achieved under the following condition : buffer composition of 126 mmol·L⁻¹ disodium tetraborate , 43 mmol·L⁻¹ disodium hydrogenphosphate , 18 % methanol ; temperature 30 °C ; voltage 30 kV ; total length of capillary 570 mm and 500 mm from injection end ; ultraviolet detection at 200 nm ; pressure injection 5 kPa for 8 s . **RESULTS** Eight kinds of bile acid had been separated by CZE with only one injection . The method was used to analyse the contents of bile acids from different kinds of bear biles , the recovery was 89 % ~ 107 % . **CONCLUSION** This method is simple and rapid , and can be used to determine the content of bile acids in bear biles . The calibration curve showed good linearity for eight bile acids in the concentration range of 4 ~ 60 mg·mL⁻¹ ($r > 0.9954$) . The total time for seperation and determination was within 25 min .

KEY WORDS: bile acid ; capillary zone electrophoresis ; bear bile