

鸭胆汁中鹅去氧胆酸提取方法的建立*

杨清林, 付 亚

(重庆科技学院 化学化工学院, 重庆 401331)

摘要:以鸭胆膏为原料,以高效液相色谱法和薄层层析法测定鹅去氧胆酸(CDCA)含量,研究钡盐法提取 CDCA 以及理化影响因素,建立了制备高纯度 CDCA 的工艺方法。以 500 mL 鸭胆汁水解后制得 19.4 g 总胆酸,其中含有 8.13 g CDCA,而且在水解过程中部分牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)转化生成了 CDCA。上述方法简单有效,成本低廉,为临床分离鹅去氧胆酸提供了新的工艺方案。

关键词:鹅去氧胆酸;提取;高效液相色谱法;薄层层析法

中图分类号:Q503;Q657.7⁺2

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)05-0144-04

鹅去氧胆酸(CDCA),别名 3 α ,7 α -二羟基-5 β 胆烷酸。家禽胆汁中主要的胆汁酸有牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)、CDCA、胆酸(CA)、去氧胆酸(DCA)、猪去氧胆酸(HDCA)、石胆酸(LA)等,是目前世界上用量最大的治疗药物之一,又是合成熊去氧胆酸(UDCA)和其他甾体化合物的原料。CDCA 在临床上主要用于治疗胆结石症,尤其对胆固醇类胆结石有很好的溶解作用。此外,还具有显著的平喘、抗炎、镇咳和祛痰作用,比如制成 CDCA-Na 制剂,具有明显的镇咳、平喘和抗菌作用^[1-4]。CDCA 来源比较丰富,可以从家禽的胆汁中直接提取,目前从鸭胆汁中提取鹅去氧胆酸相关文献较少,由文献[5-7]可知在鸭胆汁中 CDCA 的相对含量较高,如果从中提取 CDCA,则可有效降低提取成本,因而具有很高的临床价值。本研究以鸭胆膏为原料,采用高效液相色谱法(HPLC)和薄层层析法(TLC)测定 CDCA 含量,并通过条件优化减少有毒有机溶剂的使用,得到制备高纯度 CDCA 工艺路线。本研究对于从动物胆汁中提取 CDCA,提高畜禽产品的附加值有参考意义。

1 材料与方方法

1.1 材料与设备

CDCA 标准品和 TCDCA 标准品,纯度均不低于 98%,均购自上海时代生物科技有限公司;乙腈(色谱纯,成都科龙化工试剂厂生产);磷酸(色谱纯,重庆北碚化学试剂厂生产);磷酸二氢钾(分析纯,重庆川东化工有限公司生产);甲醇与乙醇(分析纯,成都科龙化工试剂厂生产);氯化钡(分析纯,自贡市金通化工有限公司生产);二氯甲烷、氯仿、丙酮、冰醋酸等(分析纯,成都科龙化工试剂厂)。色谱柱(Purospher STAR C18 色谱柱 250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)购自德国默克公司;P230 II 高效液相色谱检测仪购自大连依利特有限公司。

1.2 HPLC 法的确定

对照品的配制:精密称定 0.025 0 mg CDCA 对照品,在 10 mL 容量瓶中用甲醇定容,摇匀后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。供试品的配制:纯品中的 CDCA 含量测定时则需称取 CDCA 供试品 0.024 1 g,用甲醇溶解定容成 10 mL 的溶液,摇匀后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。CDCA 检测流动相为纯乙腈和 0.001 mol \cdot L⁻¹的磷酸二氢钾缓冲液(pH 值为 2.0)按体积比 1 : 1 的比例配制(磷酸调 pH 值)。TCDCA 检测流动相为纯甲醇和 0.03 mol \cdot L⁻¹的磷酸二氢钠缓冲液(pH 值为 4.0)按体积比 65 : 35 的比例配制^[8]。

CDCA 检测和 TCDCA 检测:填料为 C18 反相高效液相色谱,规格为 250 mm \times 4.6 mm,进样量 20 μ L;柱温为恒温 30 $^{\circ}$ C。CDCA 检测流动相 A 为纯乙腈,流动相 B 为 0.001 mol \cdot L⁻¹的磷酸二氢钾缓冲液(pH 值为 2.0),洗脱条件为 V_A : V_B=1 : 1。TCDCA 检测检测流动相 A 为纯甲醇,流动相 B 为 0.03 mol \cdot L⁻¹的磷酸二氢钠缓冲液(pH 值为 4.0),洗脱条件为 V_A : V_B=65 : 35。CDCA 检测和 TCDCA 检测时间为 25 min,流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长为 210 nm。

* 收稿日期:2015-02-13 修回日期:2015-04-22 网络出版时间:2015-06-08 12:29

作者简介:杨清林,男,讲师,研究方向为药物分析、药物化学教学,E-mail:qlyangcqu@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150608.1229.008.html>

1.3 TLC 法的建立

1.3.1 试液配制 标准品用乙醇溶解配成 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;CDCA 检测展开溶剂按 $V_{\text{二氯甲烷}} : V_{\text{丙酮}} : V_{\text{冰醋酸}} = 60 : 30 : 3$ 的比例配置。显色剂为 3.0% 磷钼酸-乙醇溶液;TCDCA 检测展开溶剂按 $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{冰醋酸}} = 7 : 3 : 0.2$ 的比例配制,显色液同 CDCA 检测。

1.3.2 TLC 方法的建立 CDCA 检测:对照品 CDCA($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 CDCA 供试品严格定量的分别点在预先制备的硅胶 G 薄层板上($4 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$)。样品被展开溶剂在薄层板上分开,然后喷上 3.0% 磷钼酸-乙醇溶液进行显色反应。然后在 $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,烘烤显色。TCDCA 检测:对照品 TCDCA($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 TCDCA 供试品分别定量的点在预先制备的硅胶 G 薄层板上($4 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$)。样品被展开溶剂在薄层板上分开,喷上 3.0% 磷钼酸-乙醇溶液进行显色反应。然后在 $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,烘烤显色。

1.4 CDCA 的制备

将鸭胆剪破,制取足够量的胆汁;称取鸭胆汁 3 g,置于干燥箱中烘至恒重,测得胆汁中固体物质含量约为胆汁的 10%;再取适量鸭胆汁两份稀释 4 倍按前述检测法进行高效液相色谱检测;检测其中所含 TCDCA 和 CDCA 的吸收峰面积及相关参数;根据峰面积和含量的比值就可计算供试品中 CDCA 和 TCDCA 的含量。

1.5 钡盐法的建立

称取总胆酸 50 g,用 4 倍量(质量)饱和 NaOH-乙醇($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液搅拌溶解,待样品溶解完全后加入 10% 活性炭,然后在搅拌条件下回流 20 min;趁热抽滤,弃渣,收集滤液,在室温下放冷,用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调 PH 至 8.0~8.5,调酸过程需在低温下进行;再向溶液中加入 8 倍量(体积)10% BaCl_2 溶液,加热 20 min;冷冻至基本无沉淀析出后抽滤,收集沉淀物,烘干,得到总胆酸钡盐。称取总胆酸钡盐 20 g,用 10 倍量水,将钡盐悬浮,加热至回流后,向其中加入 10 g 无水 Na_2CO_3 ,然后搅拌回流 20 min,回流温度在 $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,回流过程中有白色沉淀析出,回流后的溶液放冷至室温;抽滤,收集滤液。

2 结果与讨论

2.1 CDCA 的 HPLC 图谱建立

图 1 为 TCDCA 与 CDCA 混合对照品 HPLC 图,图 2 为鸭胆汁中 TCDCA 与 CDCA 的 HPLC 图。图中在 3 min 左右出现的峰是溶剂峰,10 min 时的峰是 CDCA 的吸收峰,20 min 左右出现的峰就是 TCDCA 的检测峰,其他峰则是杂质峰。检测的相应峰面积见表 1。由对照品 CDCA 含量及以上测得的对照品和供试品中 CDCA 和 TCDCA 的峰面积,通过所列计算式就可以计算出供试品中 CDCA 和 TCDCA 的含量。相关计算公式为:

$$C_2 = C_1 \times S_2 / S_1, \quad (1)$$

式中 C_1, C_2 分别表示配制的标准品和鸭胆汁中 TCDCA 的含量, S_1, S_2 分别表示标准品和鸭胆汁中 TCDCA 的峰面积(单位: $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$)。由于供试品是由鸭胆汁稀释 4 倍后的样品,因此可得到鸭胆汁中 CDCA 和 TCDCA 的含量,有关具体结果见表 1。

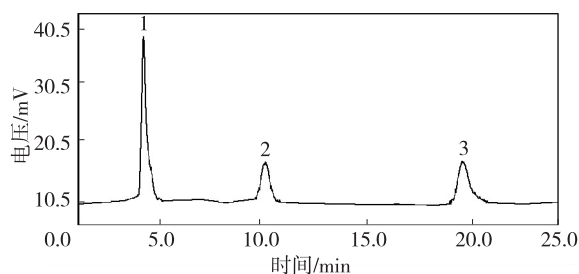


图 1 TCDCA 与 CDCA 混合对照品 HPLC 图

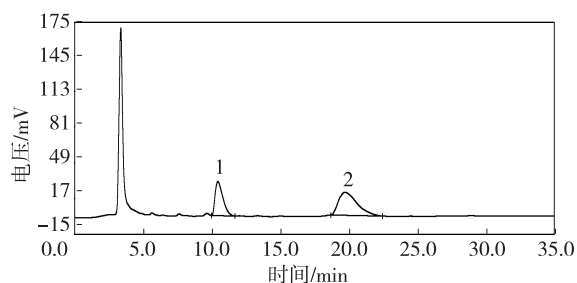


图 2 鸭胆汁中 TCDCA 与 CDCA 的 HPLC 图

表 1 鸭胆汁中 TCDCA 和 CDCA 的含量

	混合对照品		供试品(稀释 4 倍的鸭胆汁)		鸭胆汁	
	TCDCA	CDCA	TCDCA	CDCA	TCDCA	CDCA
峰面积/($\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$)	522.58	408.13	1 941.25	413.82	—	—
含量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.70	2.50	2.60	2.53	10.40	10.12

2.1.1 鸭胆汁中 TCDCA 和 CDCA 的检测 由表 1 可知鸭胆汁中 TCDCA 含量较大,若通过皂化将之转化为 CDCA 就可以提高后者的产率。

2.1.2 水解条件 分别取 3 种水解条件下制得的总胆酸适量按本文 1.3 部分所述方法进行薄层分析。由图 3 中各供试品所显色的斑点大小及强弱可以看出水解 20 h 所得沉淀中含有的目的产物相对较多;由此可知水解 15 h 总胆酸中 CDCA 的含量还没有达到最大值,而水解 25 h 后可能有部分 CDCA 样品被降解;所以在本研究中选择 20 h 作为鸭胆汁的水解时间。

2.1.3 总胆酸结晶条件 将鸭胆汁水解 20 h 后,在较低温度下,采取钡盐法,用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl,调酸(pH 值在 2~3 之间)制总胆酸。相比较于钙盐法制总胆酸,若以等同的胆汁水解液进行总胆酸的制备,调酸得到的总胆酸的量也明显较高。本研究在较低温度下调酸制得的总胆酸较脆,且粘稠度不高。利用 TLC 法分析比较两种制取总胆酸方法的优劣,可知直接调酸制备的总胆酸沉淀所显色的斑点明显比 CaCl_2 转换后调酸制得的总胆酸沉淀更大(图 4);这说明调酸制得的总胆酸中含目的物要高,而且工艺步骤也相对简单。所以本研究采用钡盐法,用盐酸调酸制备总胆酸,制取一定量的总胆酸冷冻保存。

图 5 为总胆酸中 CDCA 的 HPLC 检测图,检测的峰面积及对照品和供试品的有关数据见表 2。由图 5 中的峰面积和浓度,通过(1)式可计算出总胆酸供试品进料液中 CDCA 的含量,又因进料液配制的总体积为 10 mL,由此可得所取供试品中 CDCA 的含量,并可计算得总胆酸中 CDCA 的纯度。CDCA 纯度计算公式为:

$$t = V \times c / m \times 100\%, \quad (2)$$

式中 t 表示初品的纯度(单位:%), V 表示配置的 CDCA 进样液体积(单位:mL), c 表示 HPLC 检测进样液中 CDCA 的含量(单位: $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), m 表示配制样品液时所取样品质量(单位:g)。具体结果如表 2 所示。

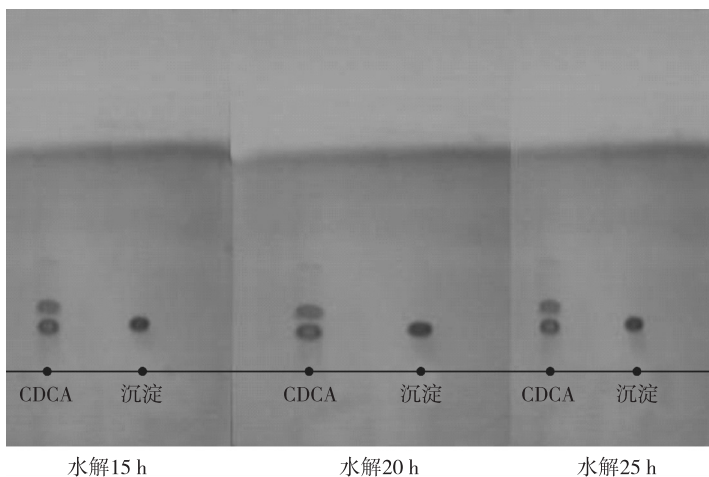


图 3 鸭胆汁水解实验薄层分析结果

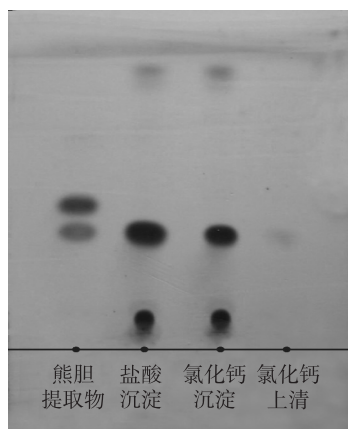


图 4 调酸沉淀与转换钙盐沉淀对比

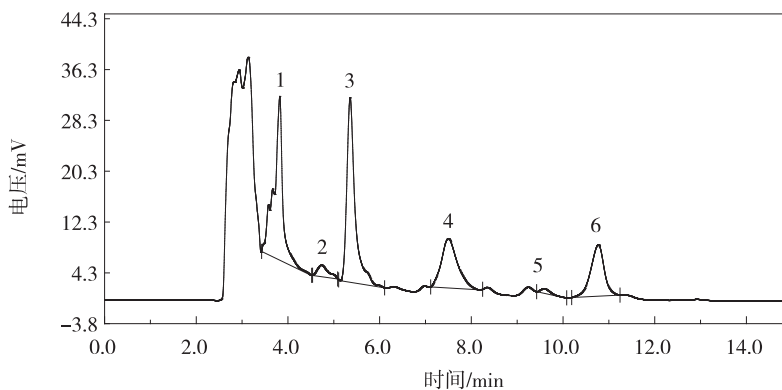


图 5 总胆酸中 CDCA 的 HPLC 检测结果图

2.2 TCDCA 与 CDCA 转化分析

由表 3 中数据计算的总胆酸的纯度即可计算得总胆酸中 CDCA 的含量。而由已经测得的鸭胆汁中 TCDCA 和 CDCA 的含量则可计算得 500 mL 鸭胆汁中 TCDCA 和 CDCA 的含量。再通过比较 500 mL 鸭胆汁制得的总胆酸中 CDCA 的含量和 500 mL 鸭胆汁中 CDCA 的含量就可得知 TCDCA 是否通过水解转化成了 CDCA,500 mL 鸭胆汁中含 5.06 g CDCA 酸,

表 2 总胆酸中 CDCA 的纯度

	CDCA 对照品	CDCA 供试品
峰面积/ $(\text{mV} \cdot \text{s}^{-1})$	408.13	164.96
含量/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	2.50	1.0105
样品中 CDCA 含量/mg	—	10.105
样品取量/mg	25.00	24.10
纯度/%	不低于 98.00	41.93

而 500 mL 鸭胆汁水解过后制得的 19.4 g 总胆酸中含有 8.13 g CDCA, 说明水解皂化过程中鸭胆汁中的 TCDCA 有一部分转化生成了 CDCA。

3 结论

以鸭胆膏为原料, 以 HPLC 法和 TLC 法测定鹅去氧胆酸含量, 研究钡盐法提取 CDCA。由 500 mL 鸭胆汁水解过后制得的 19.4 g 总胆酸中含有 8.13 g CDCA, 而且在水解过程中 TCDCA 部分转化生成了 CDCA。本方法简单有效, 成本低廉, 为临床分离 CDCA 提供了新的工艺方案。

表 3 500 mL 鸭胆汁中相关物质的参数

	500 mL 鸭胆汁	总胆酸
TCDCA 含量/(mg · mL ⁻¹)	10.40	—
CDCA 含量/(mg · mL ⁻¹)	10.12	—
TCDCA 含量/g	5.20	—
可制得总胆酸量/g	19.40	19.40
纯度/%	—	41.93
CDCA 含量/g	5.06	8.13

参考文献:

- [1] 曹荣安, 李良玉, 张丽萍. 猪胆汁中鹅去氧胆酸提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4): 12-15.
Cao R A, Li L Y, Zhang L P. Study on the extraction technology of chenodeoxycholic acid from porcine bile[J]. Food Research and Development, 2011, 32(4): 12-15.
- [2] 王有同, 吴文俊. CDCA 的制备[J]. 农副产品加工, 1995, 13(2): 39-40.
Wang Y T, Wu W J. The preparation of CDCA[J]. Sideline Products Processing Industry, 1995, 13(2): 39-40.
- [3] 关红, 李培峰, 赵红霞. 鹅去氧胆酸的镇咳、平喘及祛痰作用研究[J]. 中药材, 2004, 27(3): 206-208.
Guan H, Li P F, Zhao H X. Study on antitussive, antiasthmatic and expectorant effects of chenodeoxycholic acid[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27(3): 206-208.
- [4] 李培峰, 关红, 赵红霞. 鹅去氧胆酸的平喘及抗炎作用机理研究[J]. 中华中医药杂志, 2004(4): 65-68.
Li P F, Guan H, Zhao H X. Study on the mechanism of antiasthmatic and anti-inflammatory actions of chenodeoxycholic acid[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2004(4): 65-68.
- [5] 柯尊洪, 李奎鸾, 向东. 从动物胆汁中分离纯化鹅去氧胆酸的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 1991(4): 228-230.
Ke Z H, Li K L, Xiang D. Research progress on separation and purification of chenodeoxycholic acid from animal bile[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 1991(4): 228-230.
- [6] Martin F P, Dumas M E, Wang Y, et al. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model[J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3(112): 2-16.
- [7] Hagio M, Matsumoto M, Fukushima M, et al. Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS[J]. Journal of Lipid Research Method, 2009, 50(1): 173-180.
- [8] 张晓艳, 崔蕊, 贾建静, 等. HPLC 测定牛磺熊去氧胆酸胶囊中的有关物质[J]. 华西医学杂志, 2012(5): 585-587.
Zhang X Y, Cui X, Jia J J, et al. Determination of related substances in Tauroursodeoxycholic Acid Capsules in HPLC[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012(5): 585-587.

An Effective Strategy for Extraction of TCDCA from Duck Bile

YANG Qinglin, FU Ya

(Chemistry and Chemical of Engineering College, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

Abstract: This study aimed to establish a effective scheme of extraction of TCDCA from duck bile by barium chloride precipitation companied by HPLC and TLC monitoring its content. Other physical and chemical factors were also investigated for construction a scheme of acquisition of high content TCDCA. The results showed 500ml duck bile can obtain 19.4 g total cholic acid and 8.13 g TCDCA. TLC testified that partial TCDCA were hydrolyzed into CDCA. This method was simple, effective and low-cost. It offered an alternative for clinic isolation of TCDCA.

Key words: TCDCA; extract; HPLC; TLC

(责任编辑 方 兴)