

模拟胆汁中各组分含量高效液相色谱法测定

许久辰, 郑碧云, 张芬, 张英华, 周耀明, 安学勤

(南京师范大学化学与环境科学学院 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 采用高效液相色谱法, 可同时测定一个模拟胆汁样品中胆固醇、卵磷脂和胆酸盐的含量. 与传统方法相比, 该方法具有简便、快速和准确的特点.

[关键词] 高效液相色谱法, 模拟胆汁, 胆固醇, 卵磷脂, 胆酸盐

[中图分类号] O614.33, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)01-0074-03

Determination of the components in model bile by a HPLC method

Xu Jiuchen, Zheng Biyun, Zhang Fen, Zhang Yinghua, Zhou Yaoming, An Xueqin

(School of Chemistry and Environment Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract A method was developed for the detection of cholesterol, lecithin, and bile salts in model bile by HPLC simultaneously. Comparing to the traditional methods, it is a simple, quick, and accurate technique.

Key words HPLC, model bile, cholesterol, lecithin, bile salts

0 引言

胆结石成因机制的研究已有一百年的历史, 大多数研究集中在胆结石的生长速度和影响结石生长的因素, 即胆结石生长动力学研究^[1], 然而, 对胆结石晶核的形成研究却很少. 从热力学的角度考察模拟胆汁相平衡和胆固醇晶核的生成条件, 研究胆结石的成因, 对于胆结石的防治具有重要的意义.

目前研究模拟胆汁相平衡的方法主要有浊点法^[2]和饱和溶解度法^[3-5]. 浊点法因为实验操作复杂, 实验重复性差, 消耗试剂多等缺点, 现在一般不采用. 溶解度法研究模拟胆汁相平衡的关键问题是如何准确测定模拟胆汁中各组分. 目前主要采用比色法、色谱法和酶法检测模拟胆汁中的各组分, 但上述检测方法存在一个共同的问题是不能用一个样品同时分析得到模拟胆汁中所有成分的含量, 由此产生较大实验误差. 因此, 准确地研究模拟胆汁相平衡以及各种因素对相平衡影响的首要条件是寻找一种能够准确测定模拟胆汁中各种成分的分析方法. 本工作建立了一种准确、简单的测定模拟胆汁各组分的高效液相色谱分析方法, 可同时测定胆固醇、卵磷脂、胆汁酸盐的浓度, 快速绘制模拟胆汁的相图.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: 美国 Agilent 1100 高效液相色谱系统.

试剂: 胆酸钠(胆酸钠和脱氧胆酸钠的混合物) (美国 Sigma 公司, 分析纯), 卵磷脂(华东师范大学化工厂, 分析纯), 胆固醇(中国医药上海化学试剂公司, 分析纯), 乙腈(美国 Tedia 公司, HPLC 级), 甲醇(美国 Tedia 公司, HPLC 级), 水为超纯水(18.2 M Ω), 其它试剂均为分析纯级试剂.

收稿日期: 2004-06-28.

基金项目: 国家自然科学基金(20273032, 29873020), 教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目.

作者简介: 许久辰, 1974—, 硕士研究生, 主要从事物理化学的学习与研究. E-mail: xujiuchen@tom.com

通讯联系人: 安学勤, 女, 1951—, 教授, 博士生导师, 主要从事物理化学的教学与研究. E-mail: anxueqin@njnu.edu.cn

1.2 色谱条件

色谱柱: Hanbon 公司的 Lichrospher C18 柱(Column 4.6 × 150 mm, Media 10 nm ~ 5 μm).

检测器: G1315B 型 DAD 检测器.

检测波长: 210 nm.

流动相的选择: 不同配比的甲醇、乙腈、乙酸钠 – 磷酸缓冲溶液作为流动相.

1.3 标准溶液配制

用甲醇作溶剂, 配制胆固醇标准溶液, 浓度分别为 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg/mL. 卵磷脂标准溶液, 浓度分别为 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL. 胆酸盐标准溶液, 浓度分别为 0.40、0.80、1.20、1.60、2.00 mg/mL.

1.4 模拟胆汁的配制

根据实验要求, 称取一定量的胆固醇、卵磷脂、胆汁酸盐, 混合于三角烧瓶中, 用体积比为 2:1 的氯仿 – 甲醇溶液溶解, 在 40℃, 用 N₂ 气吹, 使溶剂挥发后, 样品成玻璃态或粘稠状, 抽真空至恒重. 加 0.15 mol/L NaCl 水溶液, 使总脂浓度达 10%, 然后充满 N₂ 气, 在密封条件下 65℃ 水浴震荡 1 h, 逐渐冷却至 37℃, 在恒温水浴中保持 5 d.

2 结果与讨论

2.1 柱温、流速、检测器和波长的选择

(1) 柱温的选择: 柱温过低, 流动相粘度增大, 不利于样品的分离, 鉴于人体正常体温为 37℃, 本实验的柱温选择为 37℃.

(2) 流速的选择: 流速减小, 样品洗脱速度慢, 分析周期长, 流速的增大可缩短分析周期, 但不利于组分的分离. 本实验选择流速为 1.0 mL/min.

(3) 检测器的选择: 因胆酸盐、卵磷脂和胆固醇在紫外区有强吸收, 我们选择了 DAD 检测器作为检测手段.

(4) 检测波长的选择: 考虑到胆酸盐、卵磷脂和胆固醇在波长 200 ~ 210 nm 范围内有特征吸收, 为避免溶剂甲醇(在波长 205 nm 以下有特征吸收)对样品检测的干扰, 本实验选择 210 nm 作为检测波长.

2.2 流动相和洗脱时间

由于胆酸盐与卵磷脂和胆固醇的极性差异很大, 采用一般洗脱的方法无法使用同一个样品检测模拟胆汁中各组分的浓度, 必须采用合适的流动相以及梯度洗脱方法, 才能将模拟胆汁中的三种成分在较短的时间内达到完全分离的目的. Santo Scalia 等^[6]用 HPLC 法检测出了药物中的自由胆汁酸的含量, 王氢等^[7]用 HPLC 法测定卵磷脂产品中卵磷脂的含量, Duncan 等^[8]用 HPLC 法检测出了人体低密度脂蛋白中胆固醇的含量. 我们分别采用不同比例的甲醇、乙腈、乙酸钠溶液混合物作为流动相, 首先洗脱出极性较大的胆酸盐, 然后变化流动相的极性, 洗脱出极性较小的卵磷脂和胆固醇. 0 ~ 12 min, 流动相采用 Santo Scalia 等^[6]选择的甲醇、乙腈和乙酸钠溶液(pH = 4.3)体积比, 洗出极性较大的胆酸盐; 12 ~ 14 min 过渡, 14 min 后减小缓冲液的含量, 保持乙腈含量不变, 增大甲醇含量, 洗出极性较小的卵磷脂和胆固醇. 在 35 min 内分别成功地分离检测到胆酸盐、卵磷脂和胆固醇.

2.3 标准工作曲线的绘制

在选择合适的色谱条件下, 以胆固醇、卵磷脂、胆汁酸盐标准溶液进样, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线如图 1 所示, 并进行线性回归. 胆固醇回归方程为: $Y = 6024.7X + 1.142$, 相关系数 $r = 0.9999$. 卵磷脂回归方程为: $Y = 923.15X + 6.289$, 相关系数 $r = 0.9997$. 胆汁酸盐回归方程为: $Y = 147.43X + 0.834$, 相关系数 $r = 0.9983$.

2.3 模拟胆汁中各组分含量的测定

根据实验要求在模拟胆汁相图的一相区内选择一合适的物系点, 该物系点的组成为: 胆酸盐: 卵磷脂: 胆固醇(摩尔比) = 0.60:

万方数据

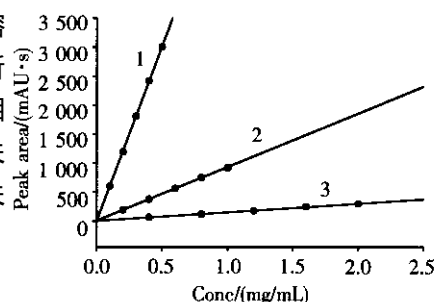


图 1 胆固醇、卵磷脂和胆酸盐的标准曲线

0.33:0.07.

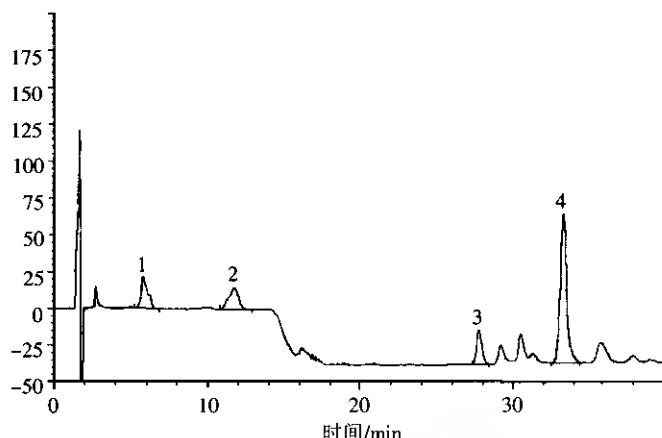
将配制好的模拟胆汁抽真空,然后用一定量的甲醇溶解,经过 $0.22\ \mu\text{m}$ 水相过滤膜过滤,制备得到模拟胆汁的样品.取 $20\ \mu\text{L}$ 样品,恒温 37°C ,采用上述色谱条件和梯度洗脱的方法得到图 2,根据标准曲线计算出该物系点的胆酸盐:卵磷脂:胆固醇的摩尔比为 $0.602:0.329:0.069$,胆酸盐摩尔百分含量偏差为 0.2% ,卵磷脂摩尔百分含量偏差为 0.1% ,胆固醇摩尔百分含量偏差为 0.1% .而 Antonio Moschetta 等^[4]实验偏差小于 1% ,说明本实验方法能够用于模拟胆汁相平衡的研究.

2.4 用饱和溶解度法绘制模拟胆汁相图的绘制

为了进一步检测我们建立的 HPLC 的方法在研究模拟人体胆汁相平衡的可行性,我们用饱和溶解度法研究了模拟人体胆汁的相图.配置一系列不同组分的胆固醇过饱和和溶液的模拟胆汁样品,用孔径为 $0.22\ \mu\text{m}$ 水相过滤器过滤配制好的样品,取 $20\ \mu\text{L}$ 样品在上述色谱条件下测定.根据标准曲线分别计算出各模拟胆汁样品中的胆固醇、卵磷脂、胆酸盐的摩尔百分含量,根据研究结果,在三角形相图中标出胆固醇溶解度曲线,如图 3 中 \blacktriangledown 所示.用我们建立的同时测定模拟胆汁中胆固醇、卵磷脂和胆酸盐浓度的 HPLC 法绘制的模拟胆汁相图,与 Small^[3]用比色法测定胆固醇浓度、色谱法测定卵磷脂浓度、酶法测定胆酸盐绘制的相图 \bullet 比较,得到基本相同的结果,说明我们现在已建立的 HPLC 法是有效的.

3 结论

本研究建立了用一个样品同时测定模拟胆汁中胆固醇、卵磷脂和胆酸盐浓度的 HPLC 法,该方法具有准确、简便、快速、重现性好等特点,对大批样品的测定效果尤其显著,为饱和溶解度法绘制模拟胆汁相图提供有效的分析测试手段,为研究外界条件对模拟胆汁相平衡影响提供了重要的条件.



1.胆酸钠; 2.脱氧胆酸钠; 3.卵磷脂; 4.胆固醇

图 2 采用 HPLC 梯度洗脱法,在不同时间分别检测出模拟胆汁中的胆酸盐、卵磷脂和胆固醇

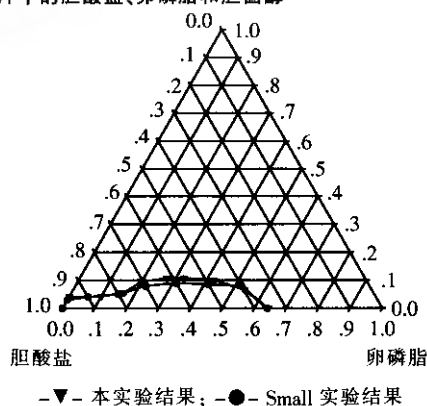


图 3 模拟胆汁相图

[参考文献]

- [1] 孙颖,杨展澜,申国荣,等.胆结石组成和形成机理的研究进展[J].中国科学(B辑),2001,31(5):385—393.
- [2] Admirand W H, Small D M. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1968, 47(5):1043—1051.
- [3] Carey M C, Small D M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1978, 61(4):998—1026.
- [4] Antonio Moschetta, Gerard P. VanBerge - Henegouwen. Cholesterol crystallization in model bile: effects of bile salts and phospholipid species composition[J]. Journal of Lipid Research, 2001, 42(8):1273—1281.
- [5] Catherine Juste, Isabelle Catala. Influence of bile salt molecular species on cholesterol crystallization from supersaturated model bile[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1254(1):89—97.
- [6] Santo Scalia, Salvatore Tirendi. Assay of free bile acids in pharmaceutical preparations by HPLC with electrochemical detection[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1995, 115(2):249—253.
- [7] 王氢,冯学伟,董晓渭等. HPLC 法测定卵磷脂产品中卵磷脂的含量[J]. 化学世界, 2000, (增刊):149.
- [8] Edda B. Hoving. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids[J]. Journal of Chromatography B, 1995, 671(1-2):341—362.

[责任编辑:孙德泉]