

薄层层析分离鲟鱼胆汁

陈金芳¹, 郭振林², 龚世伟³, 陈 蓉², 陈启明^{1,2*}

(1. 绿色化工过程教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074;

2. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

3. 湖北省新型反应器与绿色化学工艺重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘 要:为了综合利用鲟鱼加工下脚料, 提高鲟鱼附加值和中药产业临床应用价值, 提出了采用不同的溶剂系统作展开剂分离鲟鱼胆汁的有效成分的方法. 实验过程中, 分别以单元溶剂、二元溶剂以及三元溶剂体系作展开剂, 考察了不同体系的展开剂对鲟鱼胆汁分离效果的影响. 结果表明: 单元溶剂中甲苯和氯仿分离效果好, 二元溶剂体系中氯仿/乙醇、氯仿/甲醇、石油醚/丙酮以及三元溶剂体系中石油醚/丙酮/甲苯(3:1:1, 体积比)、氯仿/甲醇/甲苯(5:1:1, 体积比)分离效果较佳. 筛选出二元溶剂氯仿/甲醇(10:1, 体积比)最适宜后续的柱层析分离鲟鱼胆汁.

关键词:薄层层析; 鲟鱼胆汁; 展开剂

中图分类号: TQ033

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2012.11.002

0 引 言

我国鲟鱼商业化养殖始于 20 世纪 90 年代初期^[1], 现已成为一种新兴的产业^[2]. 鲟鱼素有“软黄金”、“活化石”之称, 鲟鱼全身是宝, 利用率极高. 肉可制成小包装烤鱼片、炒鱼松、熏烤鱼等; 鱼皮可制成高档皮革, 也可制胶; 鱼筋、鱼骨、鱼肚等都可做出独具风格的菜肴; 鱼骨可制成高钙食品, 对增强肌体免疫力、提高大脑活力、促进人体健康有极大益处; 鱼鳍制作的鱼翅可以与鲨鱼翅媲美, 具有“黑色黄金”之称的鱼卵可制成鱼籽酱; 鱼油与内脏中含有大量的不饱和脂肪酸、叶酸, 对于防止老年痴呆、软化心脑血管、治疗烧伤有重要的疗效^[3-4]. 而鲟鱼胆却作为废弃物而丢弃, 是一种资源的浪费.

鲟鱼胆汁是一种墨绿色的粘稠液体, pH 值为 6~7^[5], 含水质量分数为 86.8%, 醇溶物为 87.5%. 一直以来, 国内外对鱼类胆汁的研究较少^[6], 研究仅局限于对胆绿素、胆汁酸等成分的初步分析, 对于鱼类胆汁的成分及其分离的研究还鲜见报道. 鉴于对鱼类胆汁缺乏系统的科学研究, 我国一直未对鱼胆汁作为药材在临床上使用^[7]. 如能从鲟鱼胆汁中提取出其有效成分, 则可充分利用废弃的鲟鱼胆汁资源, 为制药行业提供必要的原料, 缓解市场供需缺口的矛盾. 为了综合利用

鲟鱼加工下脚料, 提高鲟鱼养殖业的附加值和中药产业临床应用的价值, 急需开发一套有效分离鲟鱼胆汁有效成分的新工艺. 本实验的目的是考察利用最佳的展开剂分离鲟鱼胆汁的可行性, 为探索鲟鱼胆汁分离的新工艺和合理开发药用资源提供一定的参考基础及理论依据.

1 实验部分

1.1 原料、试剂及仪器

原料: 鲟鱼胆汁, 湖北天峡鲟业有限公司提供; 硅胶 GF254, 化学纯; 氯仿, 分析纯; 无水乙醇, 分析纯; 甲醇, 分析纯; 石油醚, 分析纯; 乙酸乙酯, 分析纯; 乙醚, 分析纯; 丙酮, 分析纯; 甲苯, 分析纯; 硫酸, 分析纯; 羧甲基纤维素钠, 粘度 800~1 200 mPa·s.

仪器: AL204 电子分析天平, 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司生产; DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司生产; KA-1000 型低速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂生产.

1.2 鲟鱼胆汁样品液的制备

称取鲟鱼胆汁多糖 2.0 g, 使其溶于 20 mL 甲醇中, 充分搅拌有部分不溶物, 将此溶液转移至离心管中, 3 000 r/min 离心 0.5 h, 分离出黄绿色的上层清液备用.

收稿日期: 2012-10-31

作者简介: 陈金芳(1957-), 男, 湖北黄梅人, 教授, 硕士研究生导师. 研究方向: 化学工程与技术. * 通信联系人

1.3 硅胶板的制备

将 75 mm×26 mm 的载玻片依次用水和乙醇洗净并晾干。称取 2.5 g CMC-Na 于 1 L 烧杯中,加入 500 mL 蒸馏水,同时用玻璃棒搅拌均匀,并在电炉上加热至沸,使 CMC-Na 充分溶解,冷却,配置成质量分数 0.5% CMC-Na 水溶液备用。称取 25.0 g 硅胶 GF254,与 70 mL CMC-Na 水溶液混合,在烧杯中调成糊状,充分搅拌至无气泡。用药匙量取一定量调制好的硅胶涂匀于载玻片上,将载玻片在桌面轻震使其表面平坦光滑,薄层厚度控制在 0.25 mm 左右,将制备好的硅胶板在室温条件下自然干燥,然后转移至 110 °C 的烘箱中加热活化 0.5 h,自然冷却后放入干燥器中备用^[8]。

1.4 显色剂的选择

本实验选用的显色剂为质量分数 20% 的硫酸乙醇。称取 80 g 无水乙醇和 20 g 浓硫酸,将两者混合均匀,放入试剂瓶中备用。

1.5 点样、展开与显色

用管口平整、内径为 0.5 mm 的毛细管吸取样品液,并将吸取样品的一侧轻轻接触距离硅胶板下端约 10 mm 处点板并重复多次点样,观察样点为黄绿色。若同一块薄层上需点多个样点时,样点之间距为 10 mm 左右,而且要保证样点在同一水平线上。点样后,待溶剂完全挥发再将硅胶板放入层析缸中,当展开剂前沿到距离硅胶板上端 10 mm 左右时取出,将硅胶板用电风吹干,此时用质量分数 20% 硫酸乙醇溶液均匀喷洒于硅胶板上,置 110 °C 烘箱中加热 3~5 min,呈现出紫红色或紫色的胆汁酸斑点。

选择展开剂的条件:**a.** 对欲分离组分有良好的溶解性;**b.** 可使各组分分开,待测组分的定量测定在 0.3 左右, R_f 值在 0.2~0.8 之间;**c.** 不能与吸附剂或待测组分发生化学反应,沸点适中,黏度要小,展开后各组分斑点集中^[9]。

2 结果与讨论

2.1 单元溶剂系统

根据溶剂对胆汁的溶解性,选用 8 种较常用的溶剂为展开剂,显色后图谱如图 1。

由图 1 可知,氯仿(A)虽可分离出一种组分,但对于其中两种组分的极性偏小;甲苯(B)可分离出其中的两种组分;石油醚(C)可以分离极性较大的组分,但对于极性小的组分分离效果不明显;甲醇(D)和乙酸乙酯(H)极性较大,可将胆汁中极性较小的组分展开至前沿位置;无水乙醇(E)、丙酮(G)均有不同程度的拖尾现象,不能分离胆汁中组

分;乙醚(F)的极性最小,所有组分在点样处未移动;水(I)将所有组分推至溶剂前沿。无水乙醇(E)和水(I)的展开时间太长,约 1 h,其它溶剂的展开时长约 10 min。

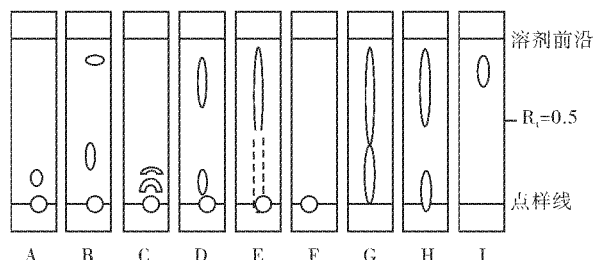


图 1 单元溶剂系统的 TLC 图谱

Fig. 1 TLC spectrum of unit solvent system

注:展开距离(点样线到溶剂前沿的间距)

均为 56 mm;用虚线显示拖尾;A—I 表示展开剂。

A. 氯仿;B. 甲苯;C. 石油醚;D. 甲醇;E. 无水乙醇;
F. 乙醚;G. 丙酮;H. 乙酸乙酯;I. 水。

2.2 二元溶剂系统

单一溶剂不能很好地展开胆汁中各组分,则选用混合溶剂作为展开剂。首先用一种极性较小的溶剂作为基础展开溶剂混合物,观察展开效果,若不好再用极性较大的溶剂与前一种溶剂相混合,并不断调整混合溶剂的配比,直至选出合适的展开剂组合。

乙醚是易挥发、低沸点的溶剂,溶剂损失较大,故不选乙醚与其它溶剂混合。参照图 1 的显示结果,将极性较大和较小的溶剂相组合作为展开剂,显色后如图 2。

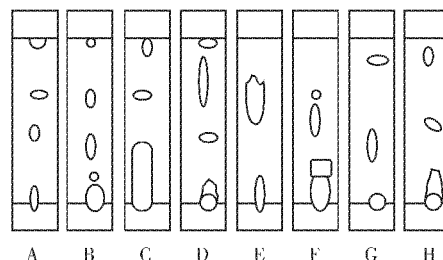


图 2 二元溶剂系统 TLC 图谱

Fig. 2 TLC spectrum of binary solvent system

注:A—H 表示展开剂。A. 氯仿/甲醇(5:1, 体积比,下同);
B. 氯仿/甲醇(10:1);C. 氯仿/乙醇(10:1);D. 氯仿/乙醇
(15:1);E. 甲醇/乙酸乙酯(2:1);F. 乙醇/乙酸乙酯(2:
1);G. 石油醚/丙酮(3:1);H. 石油醚/乙酸乙酯(5:1)。

由图 2 的显示结果可知,展开剂 A、B 分离效果较佳;溶剂 C、D、E、H 均有不同程度的拖尾现象;溶剂 F 的极性最大,不能分离出胆汁中的组分。展开时间约 10 min。

2.3 三元溶剂系统

由图 3 可知,三元溶剂 A、C 可以分离出胆汁中的三种成分,但与二元溶剂相比,三元溶剂不易

回收;溶剂 D、E、F 的极性略大,显色后位于板上部有一斑点,这表明胆汁中某种组分已被展开至板顶;溶剂 G 虽可观察到 4 个主斑点,但各组分之间均有拖尾现象。

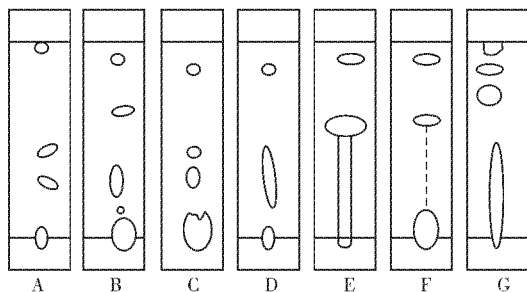


图 3 三元溶剂系统 TLC 图谱

Fig. 3 TLC spectrum of multiple solvent system

注: A—G 表示展开剂。A. 氯仿/甲醇/甲苯(5:1:1, 体积比,下同); B. 氯仿/甲醇/甲苯/石油醚(5:1:1:1); C. 石油醚/丙酮/甲苯(3:1:1); D. 石油醚/丙酮/乙醇(3:1:1); E. 石油醚/甲醇/甲苯(1:1:1); F. 氯仿/甲醇/甲苯(10:2:1); G. 氯仿/甲醇/乙醇(5:1:1)。

3 结 语

实验中选用不同的溶剂系统作展开剂,对鲟鱼胆汁中的有效成分进行薄层层析分离。应用硅胶薄层层析法分离鲟鱼胆汁,筛选和优化展开剂,作为柱层析的洗脱剂体系分离鲟鱼胆汁的重要参考依据。溶剂的选择和对比对鲟鱼胆汁的分离效果均有显著的影响。如何进一步提高胆汁中各组

分的分离效果将是后续工作的重点。整个分离过程投资少,节约能源,对后续的柱层析分离有重要的参考价值。

致谢:感谢湖北天峡鲟业有限公司提供的鲟鱼胆汁等实验材料。

参考文献:

- [1] 崔禾,何建湘,郑维中. 我国鲟鱼产业现状分析及发展建议[J]. 中国水产,2006(6):8-10.
- [2] 胡智力,陈金芳,钱明,等. 人工养殖鲟鱼皮的有效利用与制革实验研究[J]. 武汉工程大学学报,2008,30(3):4-7.
- [3] 王凯平,石朝周. 动物胆汁药用研究的概况与展望[J]. 中国中医药报,2000,7(5):350-352.
- [4] 胡梦红,王有基. 鲟鱼加工产品及其开发前景[J]. 水产加工,2006,6:55-58.
- [5] 陈蓉. 柱层析法分离鲟鱼胆汁的研究[D]. 武汉:武汉工程大学化工与制药学院,2008.
- [6] Goto T, Shibata A, Sasaki D, et al. Identification of a novel conjugate in human urine: bile acid acyl galactosides[J]. Steroids,2005,70(3):185-192.
- [7] 李小勤,冷向军. 鱼类胆汁的应用[J]. 天津农业科学,2006,12(4):22-25.
- [8] 宋晓虹. 浅谈薄层层析及柱层析[J]. 中山大学研究生学刊:自然科学版,2000,21(2):83-85.
- [9] 蒋蕾. 羊胆汁与其主要成分抗炎作用及作用机制的比较研究[D]. 黑龙江:黑龙江中医药大学,2007.

Separation of sturgeon bile by thin layer of chromatography silica

CHEN Jin-fang¹, GUO Zhen-lin², GONG Shi-wei³, CHEN Rong³, CHEN Qi-ming^{1,2}

(1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan 430074, China;

2. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

3. Hubei Novel Reactor and Green Chemical Technology Key Laboratory, Wuhan 430074, China)

Abstract: To effectively transform useless sturgeon bile into medicinal products with high added-value, a process concerning medicinal resource of separating sturgeon bile was proposed. Effective ingredients of sturgeon bile were separated by the developing solvent with different solvent systems. Solvent systems of unary, binary and ternary were used as developing solvents in experiment. The influence of separating the sturgeon bile was investigated by the developing solvent with different solvent systems. The results show that the unary solvents such as toluene and chloroform have a fine separability, the binary solvents of chloroform/ethanol, chloroform/methanol, and petroleum ether/acetone have a better separation effect, the ternary solvents of petroleum ether/acetone/toluene (3:1:1, volume ratio) and chloroform/methanol/toluene (5:1:1, volume ratio) have obvious separation effects. Therefore, we selected Chloroform/methanol (10:1, volume ratio) as an appropriate solvent system to follow-up separation of sturgeon bile by column chromatography.

Key words: thin layer chromatography; sturgeon bile; developer

本文编辑:张 瑞