

中草药有效成分的氚标记

董 墨 ,包广粮

(中国科学院 上海应用物理研究所,上海 201800)

摘要: 分别采用氚水交换与低负压气液交换 2 种标记方法,标记了中草药的 3 个有效成分: 栀子苷元、乙酰阿卡宁和绿原酸;经 TLC 和 HPLC 分离分析,放化纯度均 $>95\%$,比活度分别为 5.97、3.24 和 470 GBq/g。以上结果表明,氚水交换法及低负压气液交换法成功标记了含活泼双键的中草药有效成分。

关键词: 氚标记;中草药有效成分;栀子苷元;乙酰阿卡宁;绿原酸

中图分类号: R284.1;O615.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2008)03-0161-04

Study on Chinese Herbal Medicine Active Ingredients Labelled With Tritium

DONG Mo, BAO Guang-liang

(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract: Chinese medicinal herb active ingredients was labeled with tritium by using exchange of new synthesized tritiated water or exchange of low-pressure gas-liquid. The active ingredients was Genipin, acetylalkannin and chlorogenic acid. The radiochemical purity of the three labeled compounds were more than 95% after TLC and HPLC purification. The specific activities of tritium labeled-genipin, acetylalkannin and chlorogenic acid were 5.97, 3.24 and 470 GBq/g, respectively. The results indicated that the unstable Chinese medicinal herb active ingredients could be labeled with tritium by the methods of exchange of new synthesized tritiated water and exchange of low-pressure gas-liquid.

Key words: tritium labeling; active ingredients in Chinese herbal medicine; genipin; acetylalkannin; chlorogenic acid

中草药在抗菌、抗病毒及抗癌等方面都具有良好的治疗作用。对中草药中有效成分的作用机理、吸收和排泄过程进行研究将有助于中草药的开发、应用。放射性标记化合物易于检测,检测的方法灵敏、方便、准确,这使其在药物药理的研究中得到了广泛应用,特别是在微量代谢产物

测试中有着不可替代的作用^[1]。氚标记化合物的制备过程是氢同位素被取代的过程,标记后的化合物不会改变原化合物本身的结构和元素成分,因此,化合物的性质不会改变^[2-3]。中草药有效成分的氚标记是中草药药理研究的一个重要手段,可以使中药有效成分的研究达到细胞乃至

分子水平。本工作拟对 3 种中草药有效成分栀子苷元、乙酰阿卡宁及绿原酸的氚标记方法进行研究,为进一步研究中草药有效成分的代谢、药代动力学等提供基础。

1 仪器与材料

氚化反应装置:由瑞士 RC TRITEC 公司制造;P230p 半制备型 HPLC 色谱仪:由大连依利特分析仪器有限公司出品,检测器为 UV230+型;UV240 可见紫外分光光度仪:日本岛津公司出品;BECKMAN LS6500 液体闪烁测量仪:美国 BECKMAN 公司出品;AR 2000 放射性薄层

扫描仪:美国 Bioscan 公司生产;ZF-6 型三用紫外分析仪:上海鹏程科技有限公司产品。

栀子苷元:上海中医药大学提供;乙酰阿卡宁:北京金本草中药科技发展有限公司提供;绿原酸:北京中医药大学提供;氢化催化剂 5% PdO/BaSO₄:自制;PdO:光谱纯;甲醇:HPLC 色谱纯,上海化学试剂公司提供;其它试剂均为分析纯。

2 实验方法

栀子苷元、乙酰阿卡宁及绿原酸的化学结构示于图 1。

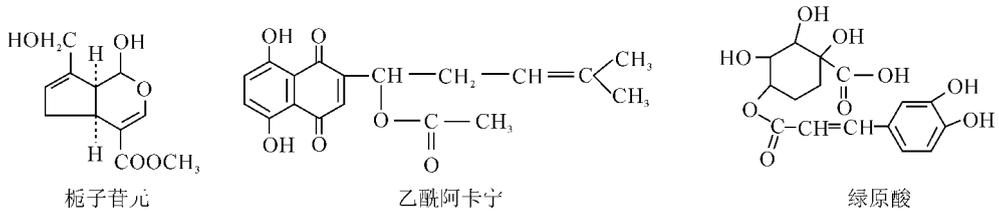


图 1 栀子苷元、乙酰阿卡宁及绿原酸化合物结构

采用低负压气液交换法和氚水交换法对中草药 3 种有效成分栀子苷元、乙酰阿卡宁及绿原酸进行了氚标记。3 种化合物中都含有可被催化氢化的双键,绿原酸中的双键具有共轭作用,比较稳定,采用低负压气液交换法进行氚标记^[4]。在栀子苷元和乙酰阿卡宁中的双键为单双键,非常活泼,在气液交换状态下易于氚化,因此采用氚水交换法进行氚标记制备^[5]。

2.1 新生成氚水交换法制备氚标记化合物

2.1.1 氚水的制备 10 mg 栀子苷元或 10 mg 乙酰阿卡宁存放于氚化反应瓶(带有翻板装置)的翻板内。将 80 mg 5% PdO/BaSO₄ 和 10 mg PdO 混合物置于氚化反应瓶底作为催化剂,移入 1 mL 无水二氧六环作为反应溶剂。接上氚化真空系统,用液氮冷冻反应液后抽系统及反应瓶真空至 0.1 Pa,通入氚气,反应压力为 6.5 kPa。在 30~60 °C 搅拌反应 1 h。反应结束后,冷冻反应瓶,回吸氚气。

2.1.2 液液交换氚化反应 在 2.1.1 节的氚化反应瓶内,通过翻板装置,加入待氚化交换反应物栀子苷元或乙酰阿卡宁,在催化剂存在下 30 °C~60 °C 搅拌反应 3 h。反应结束,离心去除催化剂,将上清液减压去除溶剂。用 1 mL 甲醇

溶解固体初产物,抽除甲醇溶剂,反复 3 次,以去除不稳定氚。

2.1.3 氚标记栀子苷元产物的纯化 用少量无水乙醇溶解氚标记栀子苷元初产物,点样于预制的硅胶板上进行制备分离。展开剂为 V(乙酸乙酯):V(氯仿)=6:4,上行展开。在紫外分析仪下,波长为 254 nm 处观察紫外吸收带,刮下与标准样品栀子苷元吸收带对应的标记产物吸收带的硅胶粉。用无水乙醇进行提取,即得到放射性产品溶液。取样,用液闪仪测试标记物放射性活度,用紫外吸收测化学量。放射性薄层(TLC)扫描法测定标记物的放化纯度,展开体系为 V(乙酸乙酯):V(氯仿)=6:4。

2.1.4 氚标记乙酰阿卡宁产物的纯化 用少量的氯仿溶解氚标记乙酰阿卡宁初产物,进行半制备 HPLC 的分离制备。色谱柱为 Innovasil C18 柱(250 mm×20 mm;10 μL),流动相 V(甲醇):V(氯仿):V(水):V(冰乙酸)=66:14:18:2,流速为 10 mL/min。检测波长设置为 520 nm。根据乙酰阿卡宁样品的保留时间,分部收集氚标记乙酰阿卡宁流出液,合并后用正己烷萃取,得红色的氚标记乙酰阿卡宁产品正己烷溶液。负压除去正己烷溶剂,得深红色氚标记

乙酰阿卡宁固体产品,称重。用乙酸乙酯溶解,用液闪仪测放射性活度并计算比活度。通过 HPLC(C18 柱,流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{氯仿}):V(\text{水}):V(\text{冰乙酸})=66:14:18:2$,流速为 1 mL/min)分析放化纯度。

2.2 绿原酸的氚标记制备

采用低负压气液交换法制备绿原酸氚标记化合物。适量的绿原酸存放于氚化反应瓶内,再加入 5%PdO/BaSO₄ 作为催化剂,并移入 1 mL 甲醇作为反应溶剂。接上氚化真空系统,用液氮冷冻反应液后抽系统及反应瓶真空至 0.1 Pa,通入氚气,反应压力为 3.2 kPa。在 30 ℃ 搅拌反应 60 min。反应结束后,冷冻反应瓶,回吸氚气。离心去除催化剂,将上清液减压去除溶剂,用 1 mL 甲醇溶解固体初产物,抽除甲醇溶剂,反复 3 次,以去除不稳定氚。产品用乙醇溶解,进行紫外分析并定量,用液闪仪测放射性活度,采用 TLC 测放化纯度,展开溶剂为 $V(\text{乙酸乙}$

酯): $V(\text{丙酮}):V(\text{甲酸}):V(\text{水})=5:1:1:1$ 。

3 结果与分析

3.1 氚标记产物栀子苷元及绿原酸的紫外吸收光谱分析

氚标记栀子苷元在乙醇中的紫外吸收光谱示于图 2。由图 2 可知,其最大吸收波长为 240 nm,与标准样品栀子苷元相同。氚标记产物与标准品的 TLC 鉴定结果表明,放射性峰的位置与标准品紫外分析仪下观察的紫外吸收位置一致, R_f 为 0.55,可以判断氚标记产品即为氚标记栀子苷元。氚标记绿原酸在乙醇中的紫外吸收光谱示于图 3。由图 3 可知,其最大吸收波长为 329 nm,与标样绿原酸相同。氚标记绿原酸与标准品绿原酸的 TLC 鉴定结果显示,放射性峰的位置与标准品紫外分析仪下观察的紫外吸收位置一致, R_f 为 0.56,可以判断此氚标记产品即为氚标记绿原酸。

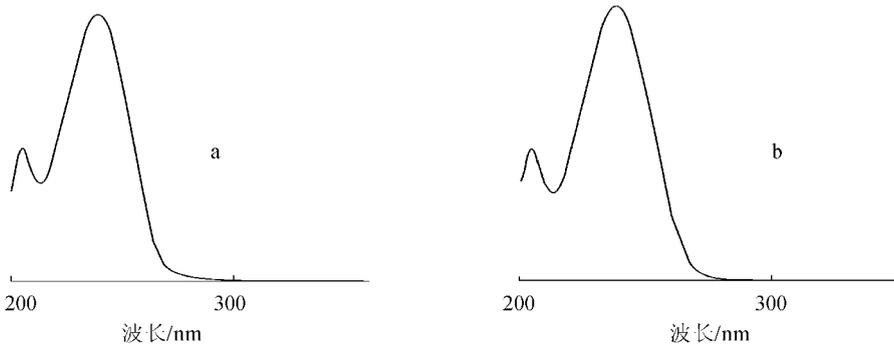


图 2 氚标记栀子苷元与栀子苷元标准品紫外吸收光谱

a——氚标记栀子苷元; b——栀子苷元标准品

3.2 放化纯度测定

氚标记栀子苷元、绿原酸、乙酰阿卡宁的放化纯度鉴定图谱分别示于图 4~6。经 TLC 及 HPLC 鉴定,氚标记栀子苷元、绿原酸、乙酰阿卡宁的放化纯度均 >95%。

3.3 放射性比活度

根据栀子苷元在乙醇溶液中波长 240 nm 处的摩尔分子消光系数(ϵ)为 7.9×10^3 ,紫外吸收定量得化学量为 3.73 mg,氚标记栀子苷元的比活度为 5.97 GBq/g。

根据绿原酸在乙醇溶液中波长 329 nm 处的摩尔分子消光系数(ϵ)为 1.59×10^4 ,紫外吸收定量得化学量为 5.63 mg,氚标记绿原酸的比活

度为 470 GBq/g。

氚标记乙酰阿卡宁称重得 15 mg,比活度为 3.24 GBq/g。

4 小结

(1)采用低负压气液交换法对绿原酸进行氚标记时,绿原酸中的双键具有共轭作用,比较稳定,采用氚标记通过低的氚气负压(一般的交换负压在 5~10 kPa),可控制苯环侧链上单双键的还原,得到了比较满意的氚标记结果。

(2)采用氚水交换法对栀子苷元、乙酰阿卡宁进行氚标记时,新生成的氚水制备及随后的催化下的氚水交换的分步标记方法条件温和,它利

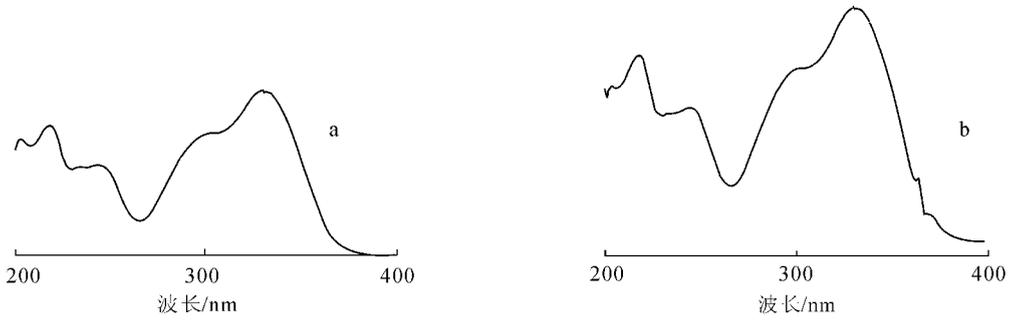


图 3 氚标记绿原酸与绿原酸标准品紫外吸收光谱

a——氚标记绿原酸；b——绿原酸标准品

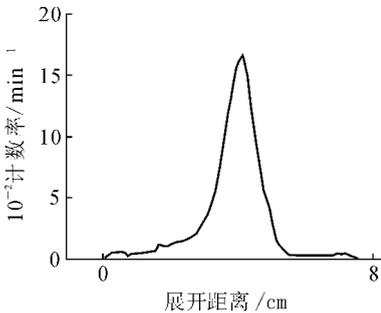


图 4 氚标记槲皮苷元放化纯度鉴定图谱

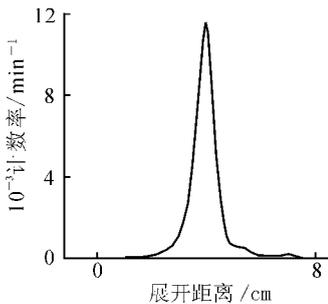


图 5 氚标记绿原酸放化纯度鉴定图谱

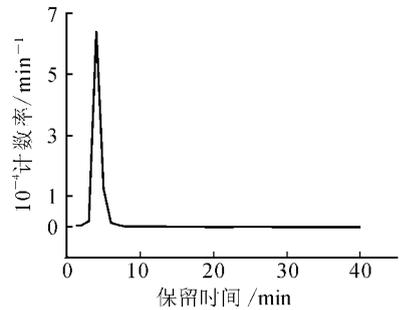


图 6 氚标记乙酰阿卡宁 HPLC 放化纯度鉴定图谱

用一个特殊的翻板装置,待制得高活性的氚水后再加入反应物进行氚水交换,避免了氚气对活泼双键的加成反应。

参考文献:

[1] 叶玲,刘宁,杨远友,等. 同位素在中药研究中的应用进展[J]. 同位素,2006,19(3):177-183.

- [2] 张年宝,谢炳华. 氚化示踪剂的辐射-诱导标记[J]. 核技术,1992,15(10):628-633.
- [3] LOCKLEY WJS, Tritium Chemistry: History, Current Status and Future Developments; a Brief Review [J]. J Labelled Compd, 2007, 50: 256-259.
- [4] EVANS EA, SHEPPARD HC, TURNER, JC, et al. A New Approach to Specific Labelling of Compounds With Tritium: Catalysed Exchange in Solution With Tritium Gas [J]. J Labelled Compd, 1974, 10(4): 569-587.
- [5] SHEVCHENKO VP, NAGAEV IY, MYASOEDOV NF. Optimization of Conditions for Tritium Labeling of Organic Compounds by Isotope Exchange With Tritium Water, Based on the Concepts of Reactions on the Catalyst Surface[J]. Radiochemistry, 2005, 47(4): 368-373.