

无氧黄芩甙乙醇溶液辐解 产物的 HPLC 分离

蔡中丽¹ 何永克 吴季兰

(北京大学技术物理系 北京 100871)

摘要 探索反相 HPLC 分离黄芩甙乙醇溶液辐解产物, 特别探讨了酸在淋洗液中的作用, 及“液塞”对分离的影响。选用 37% CH_3OH + 63% (0.01% $\text{CF}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$) 为淋洗液, 利用梯度流速法, 在放大 ODS 柱上成功地分离了 12 个无氧黄芩甙乙醇溶液的 γ 辐解产物。

关键词 黄芩甙, 高效液相色谱法, 辐解产物, 分离

中药辐射灭菌的优越性已为大家所公认, 但受 ^{60}Co γ 射线照射过的中药质量有否保证? 特别是辐解产物是什么? 它们的药性、毒性如何? 这是人们所关心的问题, 也是中药辐射灭菌质量评价的依据^[1]。黄芩甙是传统中药黄芩的有效成分, 又具有典型黄酮类化合物的结构^[2], 因此本文选择黄芩甙作为一类黄酮类中药的代表, 探索研究其辐解产物的 HPLC 分离方法, 以利进一步研究辐解产物及其药性、毒性。

1 实 验

1.1 试剂

三蒸水, 蒸馏水经 KMnO_4 和 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 处理的二次蒸馏; 甲醇 (AR) 及冰醋酸 (AR), 北京化工厂产; 三氟乙酸 Merck Schuchardt 产; 黄芩甙 (化学对照品, 纯度 99%), 卫生部药品生物制品检定所提供。

1.2 仪器

Varian Model 5060 HPLC-Vista-401 Data System, 自配 BSZ-160 型自动部分收集器 (上海沪西仪器厂生产); 旋转蒸发仪 (上海玻璃仪器二厂生产)。

1.3 辐照条件

辐照源为 $5.6 \times 10^{14} \text{Bq}$ ^{60}Co γ 源, 吸收剂量用亚铁剂量计测定, 取 $G(\text{Fe}^{3+}) = 15.5$ 。样品在冰水中不间断通高纯氮 30 min, 在不断气条件下用煤气灯封管后辐照。辐照样品的吸收剂量均为 3 kGy。

1.4 HPLC 分离条件

条件实验采用 ODS 分析柱 ($\phi 4.0 \times 300 \text{ mm}$), 柱温 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 检测波长 292 nm, 等梯度淋洗, 流速 0.8 ml/min, 样品为 2.5 mmol/L 黄芩甙乙醇溶液加 3 倍三蒸水稀释, 进样 10 μL 。制备用放大 ODS 柱 ($\phi 8.0 \times 300 \text{ mm}$), 柱温 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 检测波长 276 nm, 淋洗液为 37% CH_3OH +

¹厦门火炬开发区光厦楼厦门火炬高技术产业建设发展公司, 厦门 361006

收稿日期: 初稿 1995-09-05, 修回 1995-11-23

63% (0.01% $\text{CF}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$), 流速为: 0~2 min, 3.2 ml/min; 5 min, 0.8 ml/min; 60 min, 3.2 ml/min, 进样 1 ml。

2 结果与讨论

2.1 淋洗液中酸的作用

一般认为酸在淋洗液体系中对分离有以下三种作用: (1) 抑制可电离酸性基团的离解^[3], (2) 减轻峰的拖尾^[4]; (3) 非专一性改善分离^[5]。Hennigan^[6] 等认为乙酸还有调节淋洗液溶剂强度的作用。

2.1.1 淋洗液不含酸对黄芩甙保留时间的影响 尝试用不含酸的甲醇-水混合溶液为淋洗液, 在 ODS 柱上分离黄芩甙及其辐解产物。发现 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ 比例从 27:73, 37:63, 47:53, 直到 100:0, 即溶剂强度相当大的无水甲醇, 淋洗 4 h 也未能将任何辐解产物或黄芩甙洗脱。然而当淋洗液中加入少量乙酸 ($\text{HAc}-\text{H}_2\text{O}$ 1:11), 以上淋洗液分别用 36、13、9 和 3 min 即能把保留最强的黄芩甙洗脱。这说明淋洗液中含少量酸, 则能从 ODS 柱上洗脱黄芩甙。这种作用可能是由于 ODS 残基上带正电荷, 能紧紧吸住解离的黄芩甙阴离子, 但其确切的机理仍有待进一步研究。

2.1.2 淋洗液含乙酸或三氟乙酸对黄芩甙保留时间的影响 在 47% $\text{CH}_3\text{OH} + 53\%$ ($\text{HAc}/\text{CF}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$) 混合淋洗剂中, 乙酸或三氟乙酸在水相中所占体积分数(φ)的改变对黄芩甙保留时间(t_R)的影响如表 1 所示。

Tab 1. Retention time of baicalin depending on acid volume fraction in water phase

HAC			CF ₃ COOH		
$\varphi_{\text{HAC}}/\times 10^{-3}$	t_R/min	$\Delta t_R/\text{min}$	$\varphi_{\text{CF}_3\text{COOH}}/\times 10^{-5}$	t_R/min	$\Delta t_R/\text{min}$
5	16.9		2	11.0	
2.2	12.0	-4.9	4	12.9	1.9
8.3	10.0	-2.0	6	14.1	1.3
			8	14.8	0.7
			10	15.0	0.2

表 1 结果表明水相中乙酸含量增大, 黄芩甙保留时间减小, 而三氟乙酸含量增大, 黄芩甙保留时间也增大。由于酸能抑制黄芩甙在淋洗液中的解离, 减小溶质在流动相中的溶解度, 而且 ODS 是反相柱, 因此增长了黄芩甙的保留时间, 这解释了三氟乙酸在淋洗液中的作用。而乙酸的结果表明, 乙酸在淋洗液中不仅起抑制黄芩甙解离的作用, 而且增大淋洗液的溶剂强度。由于相对于乙酸, 三氟乙酸酸度大, 沸点低, 而且在淋洗液中的作用单一, 因此选择了含三氟乙酸的淋洗液。当三氟乙酸在水相中的含量由 0.008% 增加到 0.01% 时, 黄芩甙的保留时间仅增加 0.2 min, 接近于保留时间的实验误差, 说明水相中三氟乙酸含量为 0.01% 时, 黄芩甙在淋洗液中的解离已经基本被抑制, 因此选择了水相中三氟乙酸含量为 0.01%。

2.2 样品溶剂效应

Schnide 等^[7] 在谈论键合相色谱的特殊问题时曾提到, 如果样品是溶解在比流动相溶剂强度大的溶剂中, 那么进柱以后, 该溶剂与流动相混合在柱内的某一小范围内, 使强度明显增大。局部加浓的流动相形成“液塞”, 这种强度较强的溶剂带着保留时间小的样品通过柱子, 从而使这些

样品的平均 k' 值降低。因此, 注入的样品溶液最好使用分离的初始流动相或比流动相溶剂强度弱的溶剂配制。由于本实验所分离样品是乙醇溶液, 所以在制备分离中, 不仅碰到上述提到的“液塞”问题, 而且更为严重。

用 ODS 柱($\phi 8 \times 300$ mm), 淋洗液为 47% $\text{CH}_3\text{OH} + 53\%$ (8.3% $\text{HAc}-\text{H}_2\text{O}$), 流速 3.2 ml/min, 进样 1 ml 黄芩甙乙醇溶液 (2.5 mmol/L), 除了得到黄芩甙峰 ($t_R = 10.0$ min) 外, 还有另一峰 ($t_R = 2.6$ min)。收集以上 2.5~4.0 min 馏分, 相同 HPLC 条件下再进样 1 ml 此馏分, 仅得到 $t_R = 10.0$ min 的黄芩甙峰, 而 $t_R = 2.6$ min 的峰却没有出现。这说明第一次分离时, $t_R = 2.6$ min 的峰是由“乙醇液塞”造成的, 使部分黄芩甙于柱死时间洗脱。

将黄芩甙乙醇溶液用三蒸水稀释 3 倍, 使进样溶液溶剂强度与淋洗液的相近, 然后进样 1.0 ml, 仅得到黄芩甙峰 ($t_R = 10.0$ min)。这样可消除“乙醇液塞”。

2.3 无氧黄芩甙乙醇溶液辐照样品的实际分离

2.3.1 分析分离 用 ODS 分析柱($\phi 4 \times 300$ mm), 47% $\text{CH}_3\text{OH} + 53\%$ (0.01% $\text{CF}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$) 为淋洗液, 产物谱带重叠严重。选用溶剂强度较小的淋洗液 37% $\text{CH}_3\text{OH} + 63\%$ (0.01% $\text{CF}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$), 其它条件不变, 可将原来五个重叠的辐解产物谱带进一步分离为 12 个主要辐解产物峰, 如图 1 所示。

2.3.2 制备分离 用放大 ODS 柱 ($\phi 8 \times 300$ mm), 流速依柱面积比同样放大 4 倍, 即 3.2 ml/min, 其它 HPLC 条件不变, 可得到与分析柱相同的分离效果。但是, 由于黄芩甙含量高、保留时间长, 峰拖尾严重。考虑到黄芩甙极性、水溶性小于辐解产物, 而且 3 kGy 辐照下产生的辐解产物浓度不到黄芩甙的 1/10, 将辐照样品于 50℃ 下, 减压旋转蒸发浓缩 25 倍, 加三蒸水稀释 3 倍, 以使黄芩甙析出而辐解产物仍留在溶液中, 而且溶液的溶剂强度不大于淋洗液的溶剂

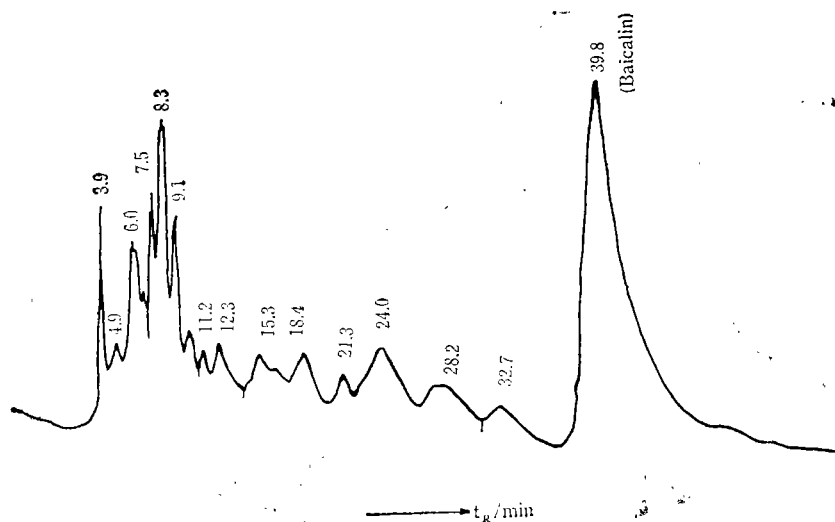


Fig 1. HPLC profile of irradiated deaerated baicalin ethanolic solution (3 kGy, 2.5 mmol/L)

HPLC condition:

ODS column: $\phi 4 \times 300$ mm Flow: 0.8 ml/min

Column temp.: $28 \pm 1^\circ\text{C}$ UV detection: 292 nm

Eluent: 37% $\text{CH}_3\text{OH} + 63\%$ (0.01% $\text{CF}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$)

Injection volume: 10 μl

强度。以上处理样品室温放置过夜,第二天析出黄色沉淀,过滤得清液。在同样 HPLC 条件下,分析比较此清液与未浓缩处理样品,发现:(1)浓缩并未使辐解产物或黄芩甙发生化学变化;(2)浓缩使约 90% 黄芩甙沉淀析出。虽然辐解产物也不同程度的沉淀析出,但是为了减轻黄芩甙拖尾的影响,只得损失部分辐解产物。因此,用于制备分离的样品均依上法除去大部分黄芩甙。

此外,自配国产部分收集器最小时间设置为 1 min,保留时间小的馏分在 3.2 ml/min 流速条件下不易收集,因此,采用流速梯度法:0~2 min 时,流速 3.2 ml/min 使样品快速进入柱子,以免谱带过宽,不利于分离;2~5 min 使流速线性回到 0.8 ml/min,以便梯度淋洗;5~60 min 使流速线性递增至 3.2 ml/min,一方面改善保留时间小的馏分的分离,便于收集,另一方面减少高保留时间馏分的拖尾。其它 HPLC 条件不变,可成功地分离 12 个辐解产物(见图 2)。其中 8 个主要辐解产物的结构已由 UV 和 MS 确定,将另文发表。

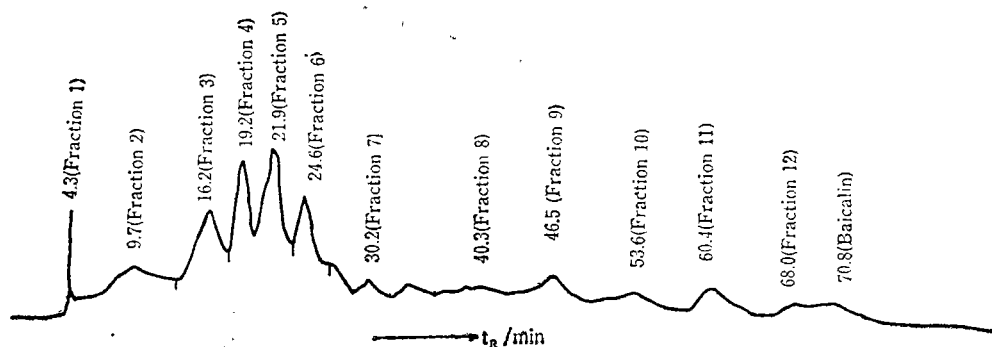


Fig 2. HPLC profile of irradiated deaerated baicalin ethanolic solution
HPLC condition:

ODS column, $\phi 8 \times 300$ mm Injection volume, 1 ml

Column temp.: $28 \pm 1^\circ\text{C}$ UV detection: 292 nm

Eluent: 37% CH_3OH + 63% (0.01% CF_3COOH - H_2O)

Linear gradient flow: 0~2 min, 3.2 ml/min; 5 min, 0.8 ml/min;
60 min, 3.2 ml/min.

3 结 论

1) 淋洗液中含少量酸,则能从 ODS 柱上洗脱黄芩甙。用 ODS 柱分离黄芩甙,乙酸在淋洗液中起双重作用:抑制黄芩甙解离和增大淋洗液溶剂强度;三氟乙酸在淋洗液中仅起抑制黄芩甙解离的作用。

2) 样品溶剂强度大于淋洗液溶剂强度将导致“液塞”,使部分溶质于柱死时间流出。黄芩甙乙醇溶液用三蒸水稀释 3 倍,可消除“液塞”。

3) 用放大 ODS 柱成功地分离了 12 个无氧黄芩甙乙醇溶液的辐解产物。

参 考 文 献

- 1 袁荣尧,吴季兰. γ 射线照射下中草药主要成分的辐射化学研究,辐射工艺某些重要领域的发展与对策专题调研报告,国家科学技术委员会新技术局,1987
- 2 北京医学院,北京中医学院主编,中草药成分化学,人民卫生出版社,1983, 276

- 3 Wulf L W and Negel C W. J. Chromatogr., 1976, 116: 271
- 4 Karch K, Sebestion I, Halase I and Eengelhardt H. J. Chromatogr, 1976, 122: 171
- 5 Niemann G I and Koereslman-kooy J W. Planta Med., 1977, 31:297
- 6 McMurrrough I and Hennigan G P. J. Chromatorgr, 1983, 258: 103
- 7 Schnide L R, Kakera J J, 高潮, 陈新民, 高虹译. 现代液相色谱法导论, 第二版, 化学工业出版社, 1988, 286

HPLC SEPARATION OF RADIOLYSIS PRODUCTS OF DEAERATED BAICALIN ETHANOLIC SOLUTION

Cai Zhongli He Yongke Wu Jilan

(Dept. of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT The separation of radiolysis products of deaerated baicalin ethanolic solution by reverse HPLC was studied, especially, the functions of acid in eluents and the influence of solvent strength on separation were discussed. Twelve radiolysis products were successfully separated on the enhanced ODS column with eluent 37% CH₃OH + 63% (0.01% CF₃COOH-H₂O).

KEYWORDS Baicalin, HPLC, Radiolysis product, Separation

(上接第 217 页 Continued from P 217)

BLEND-RADIATION MODIFICATION OF POLYETHYLENE

Li Chaoshun Zeng Xinmiao Zhang Yidong Xu Ziyang Wang Binglin

(Beijing Radiation Application Research Center, Beijing 100012)

ABSTRACT Blending, radiation, chemical post-treating methods are employed to modify the surface of low density polyethylene (LDPE) sheets in order to enhance their hydrophilicity, and the contact angles of the modified LDPE sheets with water are measured and analyzed. It has been found that by blending to LDPE sample ethylene-vinylacetate copolymer (EVA) and itaconate (IA) and then treating with NaOH-methanol liquid after radiation, the improved surface of LDPE is prepared.

KEYWORDS Polyethylene, Surface modification, Blending modification, Contact angle