

RP-HPLC 测定巴豆种仁中佛波醇的含量

郭虎^a 彭飞^a 马廉举^a 姜展^a 刘新^{①a,b}

^a(重庆医科大学药学院 重庆市渝中区医学院路 1 号重庆医科大学 255 号信箱 400016)

^b(重庆高校药物工程研究中心 重庆市 400016)

摘要 建立巴豆(*Croton tiglium* Linn)种仁中佛波醇的 HPLC 含量测定方法。采用岛津 LC-2010 型液相色谱仪, Diamonsil C₁₈ 分析柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相: 乙腈-水(梯度洗脱), 检测波长: 234nm, 流速: 1mL/min, 柱温: 25℃。在选定色谱条件下佛波醇浓度在 6.096—101.600μg/mL 范围内与峰面积的线性关系良好, $r=0.9999$, 平均加样回收率为 96.40%, RSD 为 1.03%。本实验建立了 RP-HPLC 测定巴豆种仁中佛波醇的含量, 为佛波醇的进一步研究提供了一种手段。

关键词 佛波醇; 巴豆; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.7⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)02-0801-05

1 引言

巴豆始载于《神农本草经》, 为大戟科植物巴豆的干燥成熟果实, 种子去壳得种仁, 主产于四川、云南等地。巴豆种子含巴豆油 34%—57%、蛋白质约 18%, 巴豆油中含有十余种佛波醇双脂化合物^[1]。佛波醇(Phorbol)及其脂类广泛存在于大戟科植物里, 是一种生理活性显著的四环二萜类化合物(结构见图 1), 它们不仅可以作为治疗艾滋病药物新药(如 12-去氧佛波醇-13-乙酯), 治疗白血病的新药, 也可以作为生化试剂使用(如佛波醇-12-肉豆蔻酯-13-乙酯)^[2-5]。为了进一步对佛波醇进行研究, 本实验参考相关文献^[5,6]建立了巴豆种仁中佛波醇的 HPLC 含量测定方法。

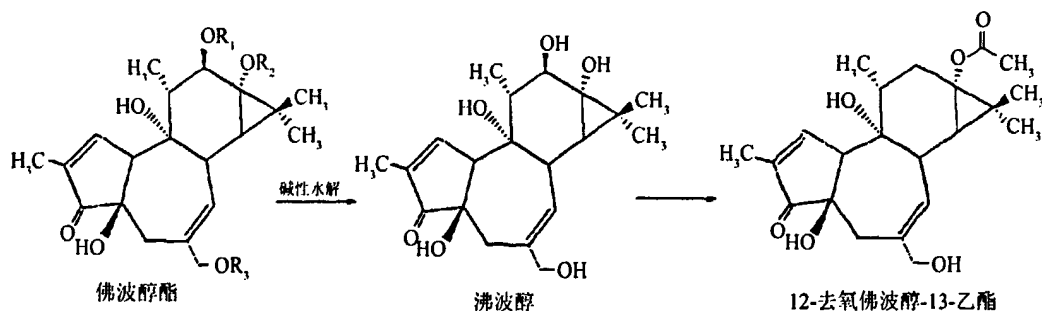


图 1 佛波醇及其酯的结构

OR₁, OR₂, OR₃——羧基或羟基, 可以相等或不等。

① 联系人, 手机: (0)13658385113; (0)13808323035; E-mail: guohu8606@yahoo.cn

作者简介: 郭虎(1986—), 男, 重庆市人, 硕士, 主要从事天然药物化学与药物制剂研究工作。

刘新(1956—), 男, 重庆市人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然药物化学及药物制剂工作。

收稿日期: 2010-08-04; 接受日期: 2010-08-21

2 实验部分

2.1 仪器

LC-2010 型液相色谱仪(日本岛津公司);UV-2501 PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司);2695 型高效液相仪(美国 Waters 公司);2996 型 DAD 检测器(美国 Waters 公司);Diamonsil C₁₈ 分析柱(4.6mm×250mm,5μm,北京迪马公司);十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2.2 材料与试剂

佛波醇对照品为自行分离精制,经 UV、IR、ESI-MS、¹H NMR 及 ¹³C NMR 等法确定结构,通过 HPLC-DAD 检测,用面积归一化法计算纯度,大于 98.5%。

干燥的巴豆种子购买于重庆市中药材市场,经重庆医科大学王刚副教授鉴定为大戟科巴豆属植物巴豆(*Croton tiglium* Linn)种子,将巴豆种子去壳即得巴豆种仁。乙腈为色谱纯,氮气(重庆市九龙坡区顺安气体供应站,纯度大于 99.9%)。其他试剂为分析纯。实验用水为超纯水。

2.3 色谱条件及系统适应性

岛津 LC-2010 型液相色谱仪;色谱柱:Diamonsil C₁₈ 分析柱(4.6mm×250mm,5μm);流动相:乙腈-水,梯度洗脱(0—4min,乙腈:水=2:98—6:94;4—5min,乙腈:水=6:94;5—15min,乙腈:水=6:94—10:90;15—25min,乙腈:水=10:90);检测波长:234nm;流速:1mL/min;柱温:25℃;进样量:20μL。结果见图 2、图 3;色谱图显示,佛波醇峰型良好,按佛波醇计理论塔板数不低于 9000,分离度 2.02,对称因子 1.01。

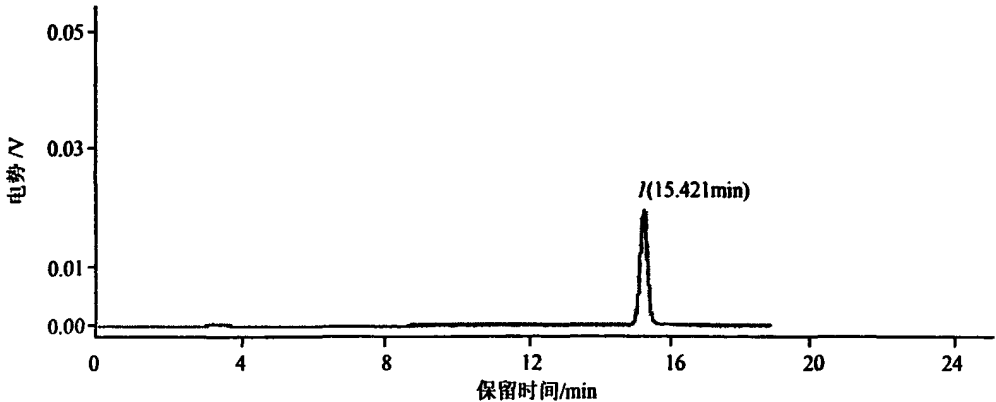


图 2 对照品的 HPLC 图

1—佛波醇。

2.4 对照品溶液的制备

准确称取佛波醇对照品适量,用甲醇配成每 1mL 含 101.60μg 的溶液,作为对照品储备液。

2.5 供试品溶液的制备

准确称取碾碎的巴豆种仁,约 5.0g,置于 100mL 的圆底烧瓶中,加入 40.0mL 预先用氢氧化钡饱和过的甲醇^[7],磁力搅拌,转速 1300r/min,用三通阀抽出空气,再充入氮气,25℃,10h 水解一次,过滤,残渣用少量甲醇溶解,过滤,合并滤液,减压回收至干,残渣加甲醇溶解并转移至 25mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,再准确吸取 1.0mL,移入 10mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.22μm 微滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

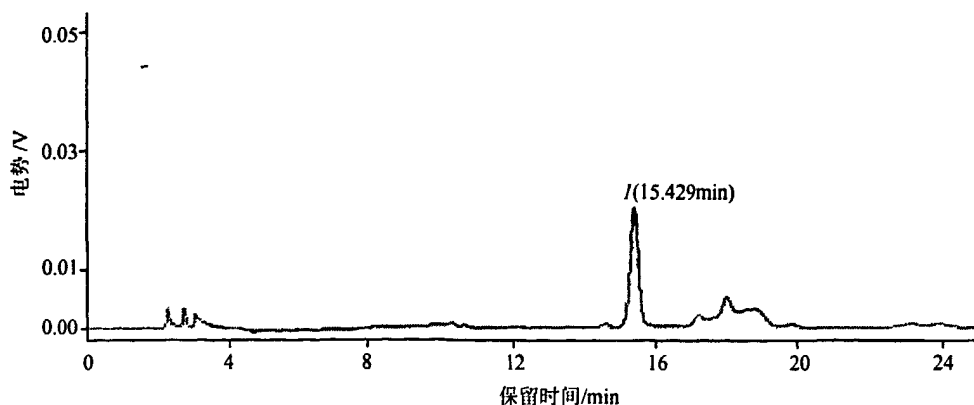


图 3 供试品的 HPLC 图

1—佛波醇。

3 结果与讨论

3.1 检测波长选择

取佛波醇对照品适量,甲醇溶解,配成适当的浓度,在 200—600nm 范围内进行紫外扫描,结果见图 4。可以看出,佛波醇对照品在 233.8 nm 处有较明显的吸收峰,并且在 HPLC-DAD 上进行佛波醇的纯度分析(流动相:乙腈:水=10:90;流速:1mL/min;波长:200—600nm;柱温:25℃)时,化合物在波长 234nm 处吸收峰面积最大,峰型对称性最好,其三维色谱图见图 5,因此确定检测波长为 234nm。

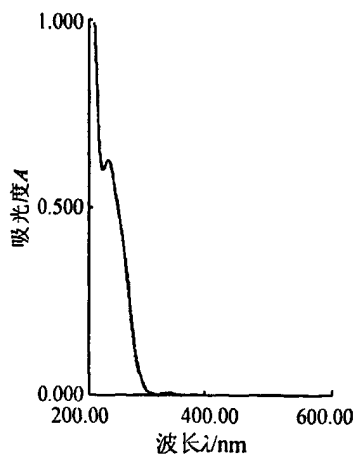


图 4 对照品的 UV 图

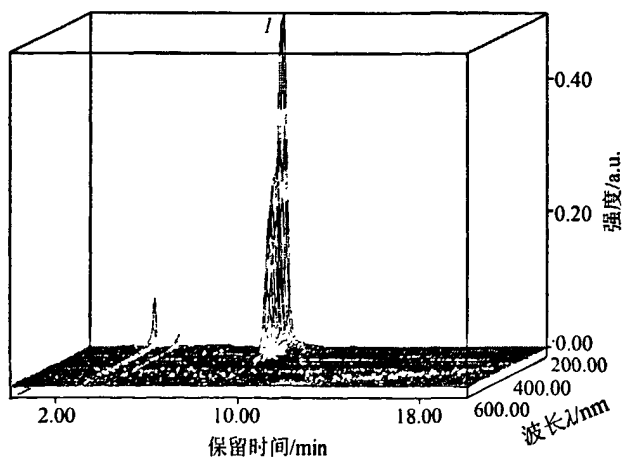


图 5 对照品的 HPLC-DAD 图

1—佛波醇。

3.2 校准曲线的绘制

分别准确吸取佛波醇对照品储备液 0.6、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、8.0、10.0mL 于 10mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度线,摇匀,后按“2.3”项下色谱条件进行分析,记录色谱图。以对照品峰面积(y)作为纵坐标,进样浓度(x)为横坐标作图,得线性回归方程: $y=10386x+6704.7$, $r=0.9999$,表明佛波醇浓度在 6.096—101.600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,其浓度与峰面积间的线性关系良好。

3.3 精密度实验

取同一佛波醇对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件进行分析,连续进样 5 次,记录色谱图,其峰面积的 RSD 为 0.46%。

3.4 稳定性实验

取同一供试品溶液,分别静置 0、2、4、6、8、10、12、24h 后,按“2.3”项下色谱条件分析,记录色谱图,峰面积的 RSD 为 1.31%,结果表明供试品溶液在 24h 内基本稳定。

3.5 重复性实验

准确称取碾碎的巴豆种仁,共 6 份,每份约 5.0g,按“2.5”项下方法制备供试品溶液,后按“2.3”项下色谱条件进行分析,记录色谱图,结果表明重复性良好,RSD 为 1.01%。

3.6 加样回收率实验

准确称取碾碎的巴豆种仁,共 5 份,每份约 5.0g,分别准确加入佛波醇对照品 9.00mg,按“2.5”项下方法制备供试品溶液,后按“2.3”项下色谱条件进行分析,记录色谱图,计算平均回收率。结果佛波醇的平均回收率为 96.40%($n=5$),RSD 为 1.03%,结果见表 1。

表 1 加标回收率实验

($n=5$)

样品中佛波醇的含量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率(%)		
			单次	平均	RSD
9.02	9.00	17.60	95.33		
9.06	9.00	17.86	97.78		
9.06	9.00	17.79	97.00	96.40	1.03
9.04	9.00	17.65	95.67		
9.05	9.00	17.71	96.22		

3.7 样品测定

准确称取碾碎的巴豆种仁,共 6 份,每份约 5.0g,按“2.5”项下方法制备供试品溶液,后按“2.3”项下色谱条件进行分析,记录色谱图。按外标法计算,本实验所用巴豆种仁中佛波醇平均含量为 0.18%,RSD 为 1.05%。

3.8 讨论

3.8.1 流动相的选择

巴豆种仁中含有生物碱、黄酮、萜类及甾体、有机酸、鞣质等^[7,8],成分较为复杂,并且佛波醇含有 5 个羟基,是一种极易溶于水的四环二萜类化合物,极性较大,在以 C_{18} 为填料的色谱柱上保留时间较短,为色谱条件筛选增加了难度,实验研究中分别考察了乙腈-水(10:90),乙腈-水(5:95),甲醇-水(5:95),甲醇-水(梯度)为流动相,但供试品溶液中的佛波醇与其他峰均未达到基线分离,最后从分离情况和出峰时间等综合分析选择了乙腈-水(梯度洗脱)。

3.8.2 佛波醇提取条件选择

佛波醇在巴豆药材中通常以多种酯的形式存在^[8],需要水解后才能获得,且佛波醇对热对氧不稳定^[2,7],所以实验中采取了氮气保护水解产物。以佛波醇提取转移率为考察指标,用正交试验,对温度(25、30、35℃),碱性甲醇用量(6、8、10 倍),水解时间(8、10、12h),水解次数(1、2、3 次)进行考察,发现用 8 倍量的氢氧化钡饱和过的甲醇做溶媒,在 25℃,10h 水解一次,从巴豆种仁中获得的佛波醇含量最高。

万方数据

3.8.3 佛波醇及其酯类的用途

佛波醇及其酯类是一种生理活性显著的化合物,如佛波醇的衍生物(Prostratin)是有望成为根治艾滋病的一种天然化合物,美国通过10多年的研究已进入临床实验阶段,而《Science》报道其人工合成前体化合物目前来源于巴豆油中的水解产物佛波醇^[2],国内也有关于研制佛波酯用于治疗白血病的一类新药报道^[5]。佛波醇是所有佛波醇酯的母体结构,其本身的药理活性从上世纪开始就引起热议,斯坦福大学著名教授 Paul A W 对佛波醇进行过深入多年的全合成研究,但是目前人工全合成佛波醇还存在相当大的困难^[2,9]。

4 结论

本实验建立了 RP-HPLC 测定了巴豆种仁中佛波醇的含量,数据准确可靠,为佛波醇的进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 宋立人,洪恂,丁诺亮等.现代中药学大辞典[M].北京:人民卫生出版社,2001.479—483.
- [2] Paul A W, Jung M K, Jeffrey M *et al.* Practical Synthesis of Prostratin, DPP, and Their Analogs, Adjuvant Leads Against Latent HIV[J]. *Science*, 2008, **320**:649—652.
- [3] Yu J M, Zhong Y, Nao K Y *et al.* Synthesis of New Phorbol Derivatives Having Ethereal Side Chain and Evaluation of Their Anti-HIV Activity[J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**:4383—4388.
- [4] Saharel M, Meselhy R M, Norio N *et al.* Anti-HIV-1 Phorbol Esters from the Seeds of *Croton Tiglium*[J]. *Phytochemistry*, 2000, **53**:457—464.
- [5] 冯明霞, 闻京伟, 韩正涛等. HPLC 法测定佛波双脂及其注射液的含量和有关物质[J]. *药物分析杂志*, 2008, **28**(8): 1284—1287.
- [6] Holly E J, Sandra A B, Paul A C. Variability in Content of the Anti-AIDS Drug Candidate Prostratin in Samoan Populations of *Homalanthus nutans*[J]. *J Nat Prod.*, 2008, **71**(12):2041—2044.
- [7] Masao H. *Phorbol Esters Having Antivirus Activity*[P]. US:6268395B1, 2001-07-31.
- [8] 张少梅. 广西产川黄柏和巴豆中抗癌活性成分的初步研究[D]. 桂林:广西师范大学, 2008. 46—52.
- [9] 刘铭, 卢德鸿. Prostratin 的发现及其合成原料来源[J]. *宝鸡文理学院学报(自然科学版)*, 2008, **28**(3):214—219.

Determination of Phorbol in the Seeds of *Croton Tiglium Linn* by RP-HPLC

GUO Hu^a PENG Fei^a MA Lian-Ju^a JIANG Zhan^a LIU Xin^{a,b}

a(College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

b(Chongqing Pharmaceutical Engineering Research Center, Chongqing 400016, P. R. China)


Abstract The determination of phorbol in the seeds of *Croton tiglium linn* by HPLC was investigated. Shimadzu LC-2010 HPLC, Diamonsil C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm) were used, and the mobile phase was consisted of acetonitrile-water (gradient elution) with the flow rate of 1mL/min. The detection wavelength was 234nm, and the column temperature was 25℃. There was a good linear relationship of phorbol in the range of 6.096—101.600μg/mL ($r=0.9999$), while the average standard recovery was 96.40% with RSD of 1.03%. The method is established for determination of phorbol in the seeds of *Croton tiglium linn* by RP-HPLC, and provides a means for future study.

Key words Phorbol; *Croton Tiglium Linn*; HPLC

RP-HPLC测定巴豆种仁中佛波醇的含量

作者: [郭虎](#), [彭飞](#), [马廉举](#), [姜展](#), [刘新](#), [GUO Hu](#), [PENG Fei](#), [MA Lian-Ju](#), [JIANG Zhan](#), [LIU Xin](#)

作者单位: [郭虎, 彭飞, 马廉举, 姜展, GUO Hu, PENG Fei, MA Lian-Ju, JIANG Zhan\(重庆医科大学药学院, 重庆市渝中区医学院路1号重庆医科大学255号信箱, 400016\)](#), [刘新, LIU Xin\(重庆医科大学药学院, 重庆市渝中区医学院路1号重庆医科大学255号信箱, 400016; 重庆高校药物工程研究中心, 重庆市, 400016\)](#)

刊名: [光谱实验室](#) 

英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF SPECTROSCOPY LABORATORY](#)

年, 卷(期): 2011, 28(2)

参考文献(9条)

1. Paul A W;Jung M K;Jeffrey M [Practical Synthesis of Prostratin, DPP, and Their Analogs, Adjuvant Leads Against Latent HIVI](#) 2008
2. 宋立人;洪恂;丁诸亮 [现代中药学大辞典](#) 2001
3. 刘铭;卢德鸿 [Prostratin的发现及其合成原料来源](#)[期刊论文]-[宝鸡文理学院学报\(自然科学版\)](#) 2008(03)
4. 张少梅 [广西产川黄柏和巴豆中抗癌活性成分的初步研究](#)[学位论文] 2008
5. Masao H [Phorbol Esters Having Antivirus Activity](#) 2001
6. Holly E J;Sandra A B;Paul A C [Variability in Content of the Anti-AIDS Drug Candidate Prostratin in Samoan Populations of biomalanthus nutans](#) 2008(12)
7. 冯明霞;闻京伟;韩正涛 [HPLC法测定佛波双脂及其注射液的含量和有关物质](#)[期刊论文]-[药物分析杂志](#) 2008(08)
8. Saharel M;Meselhy R M;Norio N [Anti-HIV-1 Phorbol Esters from the Seeds of Croton Tiglium](#) 2000
9. Yu J M;Zhong Y;Nao K Y [Synthesis of New Phorbol Derivatives Having Ethereal Side Chain and Evaluation of Their Anti-HIV Activity](#)[外文期刊] 2005(14)

本文读者也读过(10条)

1. [胡圣能](#), [邱攀](#) [高等级公路养护管理及其市场化的研究](#)[期刊论文]-[黑龙江科技信息](#)2009(27)
2. [甘雪雁](#) [从英语词汇用法演变看社会潮流和价值观的转变现象](#)[期刊论文]-[西安政治学院学报](#)2004, 17(5)
3. [梁芳](#), [杨士芬](#) [中国医学科学院院、所图书馆\(室\)现状调查与分析](#)[期刊论文]-[医学情报工作](#)1999, 20(6)
4. [张妍](#) [跨国公司在转型国家的社会责任](#)[期刊论文]-[时代经贸](#)2010(32)
5. [陈文明](#), [拦生发](#) [教室空气消毒中几种化学消毒剂消毒效果比较方案](#)[期刊论文]-[中国现代教育装备](#)2011(2)
6. [许陆文](#) [浅谈县级公路管理机构改革创新](#)[期刊论文]-[科技资讯](#)2009(21)
7. [李凤明](#), [唐浩](#), [吴家全](#), [李鹏](#), [吴俊玲](#), [杨英](#), [Li Fengming](#), [Tang Hao](#), [Wu Jiaquan](#), [Li Peng](#), [Wu Junlin](#), [Yang Ying](#) [苯醚甲环唑10%水分散剂的高效液相色谱分析方法](#)[期刊论文]-[农药科学与管理](#)2008, 29(11)
8. [高静](#), [闫冬](#), [张焯](#), [姜春梅](#), [GAO Jing](#), [YAN Dong](#), [ZHANG Xuan](#), [JIANG Chun-mei](#) [复方甘草酸苷胶囊的生物等效性研究](#)[期刊论文]-[中南药学](#)2011, 09(2)
9. [陈会良](#), [袁向阳](#), [黄磊](#), [方炜](#) [牛至油对仔猪肠道微生物菌群的影响](#)[期刊论文]-[中兽医医药杂志](#)2005, 24(6)
10. [纪树国](#), [张波](#), [于红](#), [王东](#) [重症COPD临床分型有无意义的思考](#)[期刊论文]-[心肺血管病杂志](#)2004, 23(3)