

正交试验优选佛波醇酯的水解工艺

郭虎¹, 彭飞¹, 马廉举¹, 姜展¹, 刘新^{1,2*}

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016;

2. 重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 筛选巴豆油中佛波醇酯的水解工艺。方法: 采用正交试验法, 以水解时间、碱性甲醇用量、水解次数、温度为考察因素, 佛波醇产率作为评价指标。采用 Diamonsil C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(10:90); 检测波长 234 nm; 流速 1 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL, 测定佛波醇含量。结果: 最佳水解时间 10 h、碱性甲醇用量 6 倍量、水解次数 1 次及温度 25 °C。佛波醇在 4.28 ~ 107 mg · L⁻¹ 与峰面积间的线性关系良好, $r=0.9999$, 回收率为 97.89%, RSD 0.78%。结论: 工艺稳定, 结果准确, 重复性好, 可为佛波醇的进一步研究提供参考。

[关键词] 佛波醇; HPLC; 正交试验; 水解

巴豆始载于《神农本草经》, 为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实, 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 10 余种佛波醇酯化合物^[1]。佛波醇(phorbol)及其酯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, 但其结构复杂, 见图 1。人工合成佛波醇母体结构还十分

困难, 美国进行临床试验的治疗艾滋病的新化合物 Prostratin, DPP 全部来源于天然产物或者由佛波醇半合成^[2-4], 国内亦有将佛波醇酯单体研制成一类新药的研究报道^[5], 而国外关于佛波醇提取分离的相关报道甚少, 国内尚未见报道, 本文采用正交试验法, 对佛波醇酯的水解工艺进行了研究。

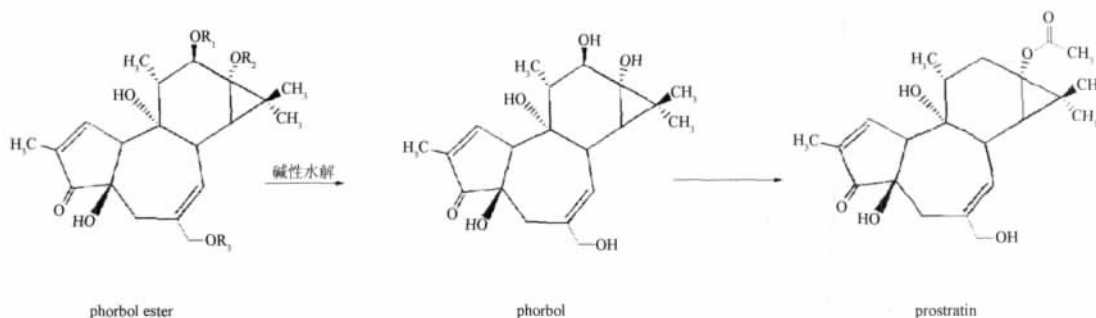


图1 佛波醇及其酯的结构式

1 材料

日本岛津 LC-2010 型液相色谱仪, 日本岛津 UV-2501 PC 型紫外分光光度计, 美国 Waters 2695

[稿件编号] 20100818004

[通信作者] * 刘新, 教授, 从事天然药物化学与药物制剂, Tel: 13808323035, E-mail: liuxin8829@sina.com

[作者简介] 郭虎, 硕士, 从事天然药物化学与药物制剂, Tel: 13658385113, E-mail: guohu8606@yahoo.cn

型高效液相仪; 美国 Waters 2996 型 DAD 检测器; 德国 Sartorius 1/10 万电子天平等。

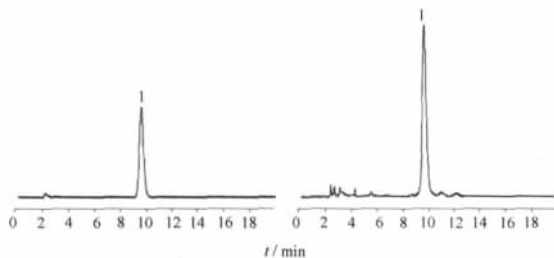
佛波醇对照品为自行分离精制, 经 UV, IR, ESI-MS, ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 等法确定结构, 通过 HPLC-DAD 检测, 用面积归一化法计算纯度, 大于 98.5%。巴豆种子购买于重庆市中药材市场, 经重庆医科大学中医药学院王刚副教授鉴定为大戟科巴豆属植物巴豆 *C. tiglium* 种子。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 佛波醇的含量测定

2.1.1 检测波长选择 称取佛波醇对照品适量, 甲醇溶解, 配成适当的浓度, 在 200~600 nm 进行紫外扫描, 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 1 mL·min⁻¹, 波长 200~600 nm, 柱温 25 °C] 时, 佛波醇在波长 234 nm 处吸收峰面积最大, 峰型对称性最好, 因此确定检测波长为 234 nm。

2.1.2 色谱条件及系统适应性 岛津 LC-2010 型液相色谱仪, Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (10:90), 检测波长 234 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL, 结果见图 2; 按佛波醇理论塔板数不低于 5 000, 分离度 1.99, 对称因子 1.04。



1. 佛波醇。
图2 对照品和供试品的 HPLC 图

2.1.3 对照品溶液的制备及线性关系考察 精密称取佛波醇对照品, 用甲醇配成每 1 mL 含 107 μg 的对照品储备液。分别精密吸取储备液 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度线, 摇匀, 后按 2.1.2 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, 佛波醇质量浓度 (X) 为横坐标作图, 得线性回归方程 $Y = 669\,502X - 945.7$, $r = 0.999\,9$, 表明佛波醇在 4.28~107 mg·L⁻¹, 其质量浓度与峰面积间的线性关系良好。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密吸取表 2 中 1~9 号水解液各 1.0 mL, 分别移入 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微滤膜过滤, 取续滤液作为 1~9 号供试品溶液。

2.1.5 精密度考察 取同一佛波醇对照品溶液

(42.8 mg·L⁻¹), 按 2.1.2 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 0.21%。

2.1.6 稳定性试验 取表 2 中 6 号水解液, 按 2.1.4 项制备供试品, 分别静置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 后, 按 2.1.2 项下色谱条件分析, 记录色谱图, 峰面积的 RSD 1.3%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取表 2 中 6 号水解液, 按 2.1.4 项制备 6 份供试品, 后按 2.1.2 项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 结果表明重复性良好, 峰面积的 RSD 0.56%。

2.1.8 回收率试验 取表 2 中 1 号水解液 1.0 mL, 共 6 份, 分别移入 10 mL 量瓶中, 加入 64.2 mg·L⁻¹ 佛波醇对照品 6 mL, 再用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 按 2.1.2 项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 计算平均回收率为 97.89%, 峰面积的 RSD 0.78%。

2.1.9 样品测定 取 1~9 号水解液, 按 2.1.4 项制备供试品溶液, 按 2.1.2 项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 计算样品中佛波醇的含量, 结果见表 2。

2.2 佛波醇酯的碱性水解工艺筛选

2.2.1 巴豆油的制取 取干燥的巴豆种子, 去壳, 将种仁压榨, 得巴豆油, 颜色浅黄色, 密度约 0.92 g·mL⁻¹。

2.2.2 正交试验设计 以水解液中佛波醇含量为指标, 采用 L₉(3⁴) 正交试验表, 对水解时间 (A)、碱性甲醇用量 (B)、水解次数 (C)、温度范围 (D) 进行考察, 因数水平及结果见表 1~3。每次试验, 称取 1.5 g 巴豆油, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 加入用氢氧化钡饱和过的甲醇后^[7,9], 磁力搅拌, 用三通阀抽出空气, 再充入氮气, 密封。最后将水解液过滤, 残渣用少量甲醇溶解, 过滤, 合并滤液, 减压回收至干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 1~9 号水解液。从表 2, 3 可知, 影响产物含量的各个因素中, 其主次顺序依次为 B>A>C>D, 即碱性甲醇用量对佛波醇的产率影响最大, 其次是水解时间, 并且这 2 个因素对佛波醇的产率有显著影响, 温度对产量影响最小, 最优水解条件为 A₂B₂C₁D₂, 即在 25 °C 下用 6 倍量的碱性甲醇, 10 h 水解 1 次, 佛波醇的产率最高。

表 1 佛波醇酯水解工艺正交试验因素

水平	A/h	B/倍	C/次	D/℃
1	8	4	1	20
2	10	6	2	25
3	12	8	3	30

表 2 佛波醇酯水解工艺正交试验 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	phorbol
1	6.651
2	7.767
3	8.807
4	7.120
5	9.353
6	11.03
7	7.193
8	10.77
9	9.227

表 3 正交试验结果方差分析

方差来源	离差平方和	方差	F	P
A	18.74	9.371	29.61	<0.05
B	21.42	10.71	33.84	<0.05
C	11.32	5.662	17.89	
误差	0.633 0	0.316 5		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19; f = 2$ 。

2.2.3 工艺验证试验 称取 1.5 g 巴豆油,共 3 份,分别按最优水解条件进行试验,按 2.1.4 项制备供试品,按 2.1.2 项下色谱条件进行分析,记录色谱图,计算样品中佛波醇的平均含量为 $12.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,平均得率为 1.20%。按最优水解条件对残渣进行重复实验,发现油中佛波醇酯类已经水解完全,故正交试验筛选的最优水解条件可以作为佛波醇酯类的水解工艺条件。

3 讨论

佛波醇通常以多种酯的形式存在于巴豆油中^[6]。前期实验发现,将未水解过的巴豆油用甲醇溶解,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微滤膜过滤后,按 2.1.2 项下色谱条件分析,记录色谱图,结果未见佛波醇的组分峰,显示在巴豆油中无游离的佛波醇。佛波醇对热、氧等不稳定^[2,4],所以实验中采用了氮气保护水解产物。水解巴豆油中的佛波醇酯类可以用氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙等多种碱,根据实验预试和文献报道^[7-9],氢氧化钡饱和过的甲醇碱性适中,更适合

于佛波醇酯的水解。

巴豆油成分较为复杂^[6-7],且佛波醇有 5 个羟基,是一种易溶于水的四环二萜类化合物,极性较大。因此实验中将水解液回收至干后,把残渣混悬于水中,依次用石油醚(60~90℃)、二氯甲烷萃取除去亲脂性杂质,再用硅胶(200~300目)柱色谱反复分离,合并佛波醇组分,用丙酮重结晶,即得。操作中注意氮气保护。

佛波醇及其酯类是一种生理活性显著的化合物,如 prostratin(佛波醇的衍生物)是有望成为治疗艾滋病的一种天然化合物,美国通过 10 多年的研究已进入到临床实验阶段^[2,8-9],而 Science 报道其人工合成前体化合物可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醇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类衍生物的母体结构,其本身的药理活性从 20 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及其酯还存在相当大的困难^[2,8-9]。本实验研究了巴豆油中佛波醇的水解工艺,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,丁诸亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:479.
- [2] Paul A W, Jung M K, Jeffrey M W, et al. Practical synthesis of prostratin, DPP, and their analogs, adjuvant leads against latent HIV[J]. Science, 2008, 320: 649.
- [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.
- [4] Sahar E M, Meselhy R M, Norio N, et al. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium* [J]. Phytochemistry, 2000, 53: 457.
- [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.
- [6] 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.
- [7] Masao H. Phorbol esters having antiviral activity: USA, US6268395B1 [P/OL]. (2001-7-31) [2010-08-18]. <http://www.patentstorm.us/patents/6268395/fulltext.html>.
- [8] 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.
- [9] Paul A W, Jeffrey M W, Jung M K. Process to produce prostratin and structural of functional analogs thereof: USA, US20090187046A1 [P/OL]. 2009-7-23 [2010-08-18]. <http://www.patentstorm.us/applications/20090187046/fulltext.htm>.

Hydrolysis technology optimization of phorbol esters by orthogonal experiment

GUO Hu¹, PENG Fei¹, MA Lianju¹, JIANG Zhan¹, LIU Xin^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Chongqing Pharmaceutical Engineering Research Center, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the best hydrolytic conditions from phorbol esters. **Method:** The orthogonal experiment was used to optimize 4 factors, which were reaction time, ratio of solid-to-liquid, hydrolytic times, and temperature. Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used and the mobile phase was consisted of acetonitrile and water for HPLC detection. The detection wavelength was set at 234 nm, the flow rate was 1 mL · min⁻¹, and the column temperature was 25 °C. **Result:** The optimum conditions were 10 h of reaction time, 1:6 of solid-to-liquid (BaOH/MeOH) ratio, 25 °C of temperature, and one time of hydrolysis. There was a good linear relationship of phorbol in the range of 4.28-107 mg · L⁻¹ ($r = 0.9999$), and the average recovery was 97.89%, with RSD 0.78%. **Conclusion:** The method is steady, reliable and reproducible, and it provides a mean for future study.

[Key words] phorbol; HPLC; orthogonal experiment; hydrolysis

doi: 10.4268/cjcm20110414

[责任编辑 马超一]

本刊重要启事

本刊已开通在线支付功能,作者请登录本刊网站 www.cjcm.com.cn “作者中心”,点击在线充值,可以选择网上银行(没开通网银功能的帐户可以选择信用卡充值)和手机充值卡2种充值方式,充值成功后系统会显示您的账号余额。然后您可以根据稿件状态和编辑部邮件通知来缴纳相应的费用,如审稿费,发表费等。如有疑问请咨询周驰编辑:13810178861,21310385@qq.com。