

HPLC测定中药巴豆中巴豆苷和木兰花碱的含量

胡静, 王艳, 宋丽丽, 曹颖, 王金艳, 张丽娟*
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定巴豆中巴豆苷和木兰花碱含量的方法,比较不同产地样品含量差异为制定中药巴豆的质量标准提供实验依据。方法:采用 Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.2%磷酸0.2%三乙胺水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min,5% A;10~12 min,5%~15% A;12~29 min,15% A;29~30 min,15%~5% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 275 nm。结果:巴豆苷在 0.078 8~0.472 8 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为 99.29%,RSD 2.5%;木兰花碱在 0.013 7~0.082 2 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为 99.28%,RSD 2.2%。不同产地巴豆中巴豆苷、木兰花碱的含量差异较大。巴豆苷的含量以四川最高、广西最低,分别为 17.57,7.07 mg·g⁻¹,木兰花碱的含量以贵州最高、广西最低,分别为 3.42,1.00 mg·g⁻¹。结论:该方法准确简便,快速可行,可用于中药巴豆的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱;巴豆;巴豆苷;木兰花碱;含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0039-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080039

Determination of Isoguanosine and Magnoflorine in Crotonis Fructus by HPLC HU Jing, WANG Yan, SONG Li-li, CAO Ying, WANG Jin-yan, ZHANG Li-juan* (Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** An HPLC assay was established to determine and compare the contents of isoguanosine and magnoflorine in Crotonis Fructus from different areas, and used for its quality control. **Method:** An Accurasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile (A) -0.2% phosphoric acid-0.2% triethylamine solution (B) as the mobile phase (0-10 min, 5% A; 10-12 min, 5%-15% A; 12-29 min, 15% A; 29-30 min, 15%-5% A). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was kept at 30 °C. The detection wavelength was set at 275 nm. **Result:** Isoguanosine had good linearity in the range of 0.078 8-0.472 8 μg ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 99.29% with RSD of 2.5%. Magnoflorine had good linearity in the range of 0.013 7-0.082 2 μg ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 99.28% with RSD of 2.2%. The content of isoguanosine and magnoflorine in Crotonis Fructus from different areas varied notably. The content of isoguanosine from Sichuan was the highest with 17.57 mg·g⁻¹, while the one from Guangxi was the lowest with 7.07 mg·g⁻¹. And the Guizhou one was the highest in the content of magnoflorine with 3.42 mg·g⁻¹, while the Guangxi one was the lowest with 1.00 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The method is convenient, rapid and accurate, which can be applied to the quality control of Crotonis Fructus.

[Key words] HPLC; Crotonis Fructus; isoguanosine; magnoflorine; determination

巴豆性热,味辛,有大毒^[1]。内服具有泻下寒积、逐水消肿、祛痰利咽的功效,外用蚀疮,可用于恶疮疥癣、疣痣^[2]。

巴豆主要含有脂肪油、生物碱、有机酸、二萜类、谷甾醇、氨基酸和酶等。巴豆油是其活性成分,也是其毒性成分^[3]。近来研究表明,巴豆生物碱亦

[收稿日期] 20140617(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102801)

[第一作者] 胡静,博士,副教授,从事中药质量控制研究, E-mail:hjtju@163.com

[通讯作者] *张丽娟,博士,教授,从事中药鉴定研究, Tel:022-59596225, E-mail:hjtju@163.com

是其活性成分。巴豆生物碱能抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖生长并促进其凋亡^[4], 对人宫颈癌 HeLa 细胞有增殖抑制和诱导细胞凋亡的作用^[5], 并诱导人卵巢癌细胞 HO-8910 细胞凋亡^[6]。巴豆苷对植入 S-180 腹水瘤小鼠具有抗肿瘤活性, 还能抑制小鼠 S-180 和埃利希实体瘤的生长。木兰花碱具有良好的抗心律失常作用, 高浓度木兰花碱能够抑制 HERG 蛋白表达^[7]; 对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用^[8]; 抗炎并能诱导胃黏膜病变^[9]; 对低密度脂蛋白 LDL 具有抗氧化活性^[10]; 还可用作神经肌肉阻滞剂, 脂肪氧合酶抑制剂, 还具有细胞毒性、免疫抑制及抗菌等活性^[11]。虽有文献报道巴豆生物碱的提取分离及药理活性研究, 但相关的成分分析研究较少^[12-13]。

本实验建立 HPLC 测定巴豆中巴豆苷和木兰花碱含量的方法, 并比较了不同产地巴豆中巴豆苷和木兰花碱的含量, 为有毒中药巴豆的质量控制及临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪 (包括 SPD-M20A 型二极管阵列检测器、CTO-20AC 型柱温箱、SIL-20A 型自动进样器, LC solution 色谱工作站, 日本岛津), Accurasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), FA1004N 型电子分析天平 (上海精密仪器有限公司), HH-S 型水浴锅, DZF-6020 型真空干燥箱 (巩义市予华仪器有限责任公司), GM-0.33H 隔膜真空泵 (天津市津腾设备有限公司)

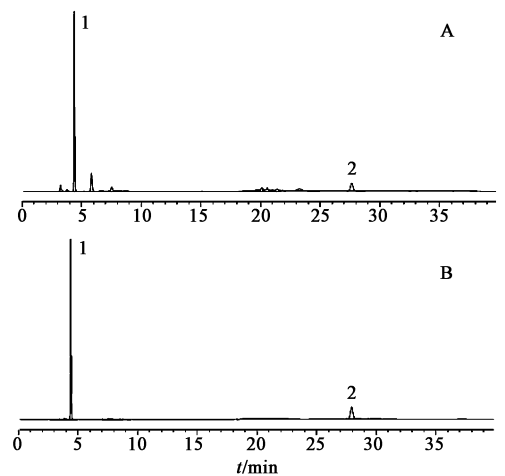
1.2 试剂 甲醇、石油醚、磷酸 (分析纯, 天津市化学试剂供销公司), 甲醇、乙腈 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 三乙胺 (色谱纯, 天津市津科精细化工研究所), 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)

1.3 药材与对照品 巴豆药材经本校张丽娟教授鉴定为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* 的干燥成熟果实。巴豆苷、木兰花碱对照品 (成都普思生物科技有限公司, 批号分别为 20100420, MUST-12022901, 纯度均 >98%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Accurasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈 (A)-0.2% 磷酸 0.2% 三乙胺水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% A; 10 ~ 12 min, 5% ~ 15% A; 12 ~ 29 min, 15% A; 29 ~ 30 min, 15% ~ 5% A, 每次进样检测前用 5% A 平衡基线 20 min), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 275

nm。见图 1。



A. 供试品; B. 对照品; 1. 巴豆苷; 2. 木兰花碱

图 1 巴豆的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Crotonis Fructus

2.2 对照品溶液的制备 精密称取巴豆苷对照品 19.7 mg 置 10 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇稀释至刻度, 再精密量取 1 mL 置 5 mL 量瓶, 稀释至刻度, 即得 0.394 g · L⁻¹ 的对照品溶液 I。

精密称取木兰花碱对照品 13.7 mg 置 10 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇稀释至刻度, 再精密量取 0.5 mL 置 10 mL 量瓶, 稀释至刻度, 即得 0.068 5 g · L⁻¹ 的对照品溶液 II。

精密量取对照品溶液 I, II 各 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇稀释至刻度, 制成含巴豆苷、木兰花碱 0.039 4, 0.006 85 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取巴豆粉末约 0.3 g (过 40 目筛), 精密称定, 置索氏提取器中, 加石油醚 40 mL, 加热回流 3 h, 弃去石油醚液, 药渣挥干溶剂, 连同滤纸筒移入圆底烧瓶中, 精密加 60% 乙醇 40 mL, 回流提取 3 次, 每次 4 h, 混匀以上提取液, 定容, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μ L, 以 2.1 项下色谱条件进行测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标进行线性回归。得线性回归方程 $Y_{\text{巴豆苷}} = 2.03 \times 10^6 X - 7.79 \times 10^5$ ($r = 0.999 9$), $Y_{\text{木兰花碱}} = 1.76 \times 10^6 X + 1.71 \times 10^3$ ($r = 0.999 9$)。结果表明, 巴豆苷、木兰花碱分别在 0.078 8 ~ 0.472 8, 0.013 7 ~ 0.082 2 μ g 线性关系良好。

2.4.2 精密度考察 精密量取混合对照品溶液 10 μ L, 连续进样 6 次, 按照 2.1 项下色谱条件进行测

定。结果巴豆苷和木兰花碱峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.4%, 表明精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 精密称取巴豆粉末(批号 2013052001)0.3 g, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定。结果巴豆苷、木兰花碱峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取巴豆粉末(批号 2013052001)6 份, 每份约 0.3 g, 精密称定, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件进行测定。结果巴豆苷、木兰花碱的平均质量分数分别为 17.12, 2.59 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.5%, 1.7%, 表明重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 称取巴豆粉末(批号 2013052001)6 份, 每份 0.15 g, 精密称定, 分别精密加入适量混合对照品溶液, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件测定。结果见表 1。

表 1 巴豆中巴豆苷、木兰花碱的回收率

Table 1 Recovery of isoguanosine and magnoflorine

成分	取样量 /g	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
巴豆苷	0.150 1	2.213 2	2.245 8	4.409 1	97.78	99.29	2.5
	0.149 8	2.294 4	2.285 2	4.498 5	96.45		
	0.150 1	2.284 1	2.245 8	4.538 0	100.36		
	0.150 2	2.269 4	2.285 2	4.636 0	103.56		
	0.149 9	2.315 7	2.206 4	4.509 5	99.43		
	0.150 3	2.313 2	2.206 4	4.479 2	98.17		
木兰花碱	0.150 1	0.385 5	0.390 5	0.772 3	99.05	99.28	2.2
	0.149 8	0.408 7	0.397 3	0.795 0	97.23		
	0.150 1	0.402 2	0.390 5	0.786 1	98.31		
	0.150 2	0.399 1	0.397 3	0.802 6	101.56		
	0.149 9	0.405 7	0.383 6	0.798 0	102.27		
	0.150 3	0.406 2	0.382 6	0.778 2	97.23		

2.5 含量测定 精密称取 7 批不同产地的巴豆药材, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件下进行测定。巴豆药材中巴豆苷和木兰花碱的含量测定结果见表 2。

3 结论与讨论

3.1 流动相的选择 本实验对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸-0.1% 三乙胺水溶液和乙腈-0.2% 磷酸-0.2% 三乙胺水溶液等

表 2 不同产地巴豆中巴豆苷和木兰花碱的含量(n=3)

Table 2 Content of isoguanosine and magnoflorine in Crotonis

Fructus from different areas(n=3)		mg·g ⁻¹	
批号	产地	巴豆苷	木兰花碱
2013052001	四川	17.57	2.69
2013052002	广西	7.07	1.00
2013052003	贵州	15.67	2.71
2013052004	云南	15.78	2.52
2013052005	四川	15.11	2.75
2013052006	贵州	15.34	3.42
2013052007	甘肃	16.64	3.05

流动相进行了考察, 结果用乙腈-0.2% 磷酸-0.2% 三乙胺水溶液梯度洗脱时, 峰形和分离度最好, 基线平稳。

3.2 提取条件的选择 本实验分别对提取溶剂、提取方法、提取时间、提取次数进行了考察, 结果表明, 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 4 h, 色谱峰的峰形、分离度最好, 峰面积较大。

3.3 检测波长的选择 本实验对巴豆苷和木兰花碱的最大吸收波长进行了考察, 结果发现在 275 nm 时, 巴豆苷和木兰花碱的峰面积都相对较高, 峰形和分离度良好, 基线平稳。

3.4 色谱柱的选择 本实验对 Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 等进行了考察。结果表明, 采用 Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 时, 色谱图基线平稳, 分离度和峰形良好, 对称性较好。

本研究建立了一种准确、快速、便捷、灵敏度高的巴豆中巴豆苷和木兰花碱的含量测定方法, 可作为巴豆药材的质量控制方法。巴豆药材的含量测定结果表明, 不同产地巴豆中巴豆苷和木兰花碱的含量差异较大, 其中四川巴豆的巴豆苷含量最高, 贵州巴豆木兰花碱含量最高, 而广西巴豆中巴豆苷和木兰花碱含量都较低。

[参考文献]

[1] 金峰, 任玉珍, 陈彦琳, 等. 巴豆生物碱部位 HPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 90-93.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 74.

[3] 金锋, 张振凌, 任玉珍, 等. 巴豆的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2013, 15(5):

- 372-375.
- [4] 陈武,陈鹏英,刘鹏,等. 巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):199-201.
- [5] 许群,方轶萍,赵小迎,等. 巴豆生物碱上调 TRAIL 配体、caspase-8 的表达诱导 HeLa 细胞凋亡的体外研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(2):180-183.
- [6] 赵小迎,陈俊,蔡平生. 巴豆生物碱抑制卵巢癌细胞增殖和诱导其凋亡的实验研究[J]. 中国全科医学, 2010, 13(7):2345-2348.
- [7] 沈国平,龙启福. 木兰花碱对 HERG 钾通道蛋白表达的影响[J]. 山东医药, 2011, 51(31):36-37.
- [8] 瞿庆喜,朱庆亚,喻凯. 凹叶厚朴中具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的成分[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6):796-798.
- [9] Kupeli E, Kosar M, Yesilada E, et al. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis species*[J]. Life Sci, 2002, 72(6):645-657.
- [10] Tran Manh Hung, Min Kyun Na, Byung sun Min, et al. Protective effect of magnoflorine isolated from *Coptidis Rhizoma* on Cu^{2+} -induced oxidation of human low density lipoprotein [J]. Planta Med, 2007, 73(12):1281-1284.
- [11] Doslov-Kokorus Zvezdana R, Ivanovic Ivana D, Simic Milena R, et al. The HPLC determination of the content of magnoflorine in *Epimedium alpinum* L. [J]. J Serb Chem Soc, 2006, 71(3):251-255.
- [12] 凌云,赵红玉,潘兴亮,等. 高效液相色谱法测定巴豆中巴豆苷的含量[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(11):1057-1060.
- [13] 曾宝,李生梅,唐君苹,等. 大孔树脂分离纯化巴豆中木兰花碱工艺研究[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(6):20-22.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第4版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于2015年1月13日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的112本中医学与中药学类期刊中综合排名第15名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2年影响因子、即年指标、基金论文比、Web 即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共6201种,排名前5%的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A⁺)316种,排名前5%~20%的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前20%~30%的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A⁻)共1572种,准核心的学术期刊1848种(B⁺),一般期刊1828(B)种,较差期刊637种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系。