

巴豆油中佛波醇类成分的 HPLC 指纹图谱

曾宝^{1,2}, 唐君芊^{2,3}, 唐本钦¹, 马彦¹, 黄翠虹¹, 徐刚¹

(1. 顺德职业技术学院, 广东 顺德 528300; 2. 广州中医药大学, 广州 510006;
3. 广州白云山潘高寿药业股份有限公司, 广州 511490)

[摘要] 目的:建立巴豆油中佛波醇类的 HPLC 指纹图谱,为巴豆油的质量评价提供依据。方法:采用 RP-HPLC,测定了 10 批巴豆样品。色谱条件为 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水-乙腈梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 235 nm。结果:在建立的巴豆油中佛波醇类指纹图谱中,10 批样品 HPLC 指纹图谱相似度在 0.884 ~ 0.991,确立了 12 个共有峰的共有模式。结论:该方法简便、准确、重复性好,为评价巴豆油定性鉴别及内在质量提供了科学依据。

[关键词] 巴豆油; 佛波醇; 异佛波醇; 脱氧佛波醇; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0089-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140089

HPLC Fingerprint of Phorbols in Crotonis Fructus Oil

ZENG Bao^{1,2}, TANG Jun-ping^{2,3}, TANG Ben-qin¹,

MA Yan¹, HUANG Cui-hong¹, XU Gang¹

(1. Shunde Polytechnic, Shunde 528300, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 3. Guangzhou Baiyunshan Pangaoshou Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 511490, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC Phorbols part in Crotonis Fructus oil, and offer the evidence for quality evaluation of Crotonis Fructus oil accordingly. **Method:** To measure ten batches of Crotonis Fructus by using RP-HPLC. The separation condition was: Thermo Hypersil Gold C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with water as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B in gradient mode, and the flow rate is 1.0 mL · min⁻¹, column temperature was set at 30 °C, detection wavelength was at 235 nm. **Result:** The common mode of the HPLC fingerprints were setup by ensuring twelve common peaks in the chromatograms. The similar degrees to the ten batches were between 0.884-0.991. **Conclusion:** The method is simple, accurate and have a good repeatability. And the quality of Crotonis Fructus oil can be controlled effectively by the HPLC fingerprint.

[Key words] Crotonis Fructus oil; phorbol; isophorbol; deoxyphorbol; HPLC; fingerprint

巴豆为临床应用历史悠久确有疗效的有毒中药;内服为其炮制品巴豆霜,具有峻下冷积、豁痰利咽、逐水退肿之功效,用于乳食停滞、寒积便秘、腹水臌胀、二便不通、喉风、喉痹,外治痈肿脓成不溃、疥癣恶疮、疣痣。巴豆的化学成分主要包括生物碱、蛋

白质、脂肪酸酯类和佛波醇酯类等。巴豆生物碱具有抗肿瘤作用^[1-2],目前已有巴豆中生物碱含量测定^[3-4]和指纹图谱测定^[5]的质量控制方法。巴豆中佛波醇酯类物质既是其活性也是其主要毒性成分,具有抗艾滋病^[6]、抗结核杆菌^[7]和抗白血病^[8]等药

理活性,具有治疗中风的作用^[9];毒性主要表现为对肠黏膜有强烈的刺激和腐蚀作用,能引起广泛性的内脏出血;其机制可能是由于佛波醇酯类物质在蛋白激酶 C 活化中发挥关键作用,使得蛋白激酶 C 触发各种细胞反应而导致各种活性和毒性效应^[10]。巴豆的炮制和合理用药主要在其油中佛波醇酯类物质的研究,佛波醇类为佛波醇酯类成分的母核,有文献报道巴豆油中佛波醇的含量测定^[11],但目前没有巴豆中佛波醇类成分指纹图谱的报道,本文在巴豆植化分离的基础上,进行巴豆油中佛波醇类 HPLC 指纹图谱研究,为巴豆药材的质量评价和安全合理用药提供有效依据。

1 材料

AB204-N 型电子分析天平 (Mettler Toledo), LC-20AT 型高效液相色谱仪 (包括 SPD-M20A 型二极管阵列检测器, CTO-20A 型柱温箱, SIL-20A 型自动进样器, LC Solution 色谱工作站, Shimadzu), C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Thermo Hypersil Gold), KQ3200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), DF-101s 型集热式恒温加热磁力搅拌器 (A-1030 型橄榄形搅拌子, 金坛市岸头林丰实验仪器厂)。

巴豆药材分别购自云南、广西、四川 3 个主产区,共 10 批,来源见表 1;经广州中医药大学赖小平教授鉴定为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* 的成熟果实。对照品脱氧佛波醇、异佛波醇、佛波醇 (经 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 EI-MS 数据确认结构,分别经面积归一化法计算,纯度达到 98% 以上,可供含量测定用)。甲醇、乙腈均为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为纯化水。

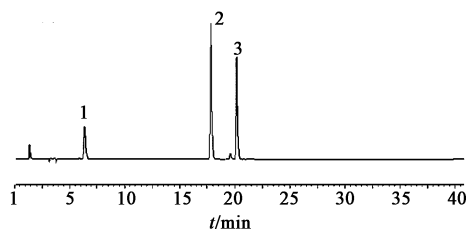
表 1 巴豆药材收集情况

Table 1 Collection of Crotonis Fructus samples

No.	产地	批号	来源
S1	四川宜宾	20100418	四川成都五块石药市
S2	四川万县	20100419	四川成都五块石药市
S3	云南	20101206	安徽亳州中药材总公司
S4	四川	20101205	安徽亳州中药材总公司
S5	广西	20101204	安徽亳州中药材总公司
S6	云南	20101201	广西玉林国际中药港
S7	四川	20101130	安徽亳州药市
S8	广西	20101122	河北安国同利中药材公司
S9	四川	20101118	云南向辉生物科技有限公司
S10	四川宜宾	20100420	四川宜宾县观音镇

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10% B; 10 ~ 15 min, 10% ~ 15% B; 15 ~ 38 min, 15% ~ 70% B; 38 ~ 41 min, 70% B), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 235 nm, 记录时间 41 min, 进样量 10 μL, 佛波醇类对照品 HPLC 色谱见图 1。



1. 佛波醇; 2. 异佛波醇; 3. 脱氧佛波醇

图 1 佛波醇类对照品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of phorbols

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取异佛波醇、佛波醇、脱氧佛波醇对照品 9.63, 3.09, 6.82 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 制成分别含 0.963, 0.309, 0.682 g · L⁻¹ 的异佛波醇、佛波醇、脱氧佛波醇对照品溶液, 4 °C 保存备用。

2.2.2 供试品溶液 取巴豆果实, 去壳后粉碎种仁, 精密称定, 置索氏提取器中, 加乙醚 40 °C 恒温回流 8 h, 至巴豆油提尽, 提取液水浴挥去乙醚, 放冷, 得巴豆油, 备用。精密量取巴豆油 2 mL, 置密闭溶剂瓶中, 加入饱和氢氧化钡甲醇溶液 40 mL, 放入搅拌子, 置磁力搅拌器中, 水浴 25 °C 下 60 r · min⁻¹ 搅拌 8 h 进行皂化, 皂化后取出皂化液, 置具塞锥形瓶中, 用甲醇洗涤皂化后的沉淀, 合并洗涤液至上述锥形瓶中, 用 50% 硫酸调 pH 至 7 左右, 甲醇洗涤沉淀, 合并滤液至 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 精密度试验 取 1 号巴豆油供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱图计算, 其各共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 表明精密度良好, 符合指纹图谱分析的要求。

2.4 稳定性试验 取 1 号巴豆油供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 记录色谱图, 结果其各共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 表明 24 h 内供试品溶液中的成分稳定, 符合指纹图谱分析的要求。

2.5 重复性试验 取 1 号巴豆药材,按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,记录色谱图,计算其各共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,表明试验重复性良好,符合指纹图谱分析的要求。

2.6 指纹图谱的建立 取 10 批巴豆药材按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件测定,记录 41 min 内 HPLC 指纹图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)(研究版)软件进行指纹图谱分析,以批号为 20100420 巴豆油中佛波醇类的图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了 12 个共有峰,建立了巴豆油中佛波醇类 HPLC 指纹图谱的共有模式,见图 2。与图 1 比较,确定图 2 中 3,7(r)和 8 号峰分别为佛波醇、异佛波醇和脱氧佛波醇。

2.7 指纹图谱的评价 12 个共有峰的面积总和占

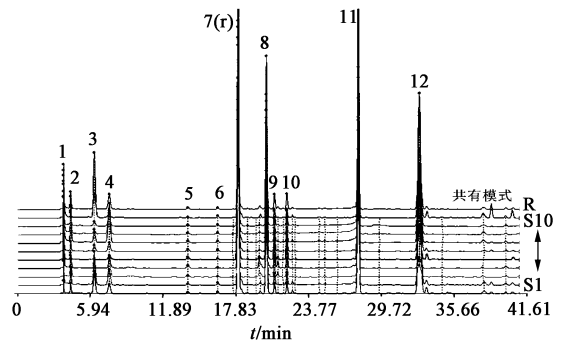


图 2 10 批巴豆油中佛波醇类 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of phorbols in croton oil

总面积的比例 > 90%,以异佛波醇为参照物,其峰面积和保留时间为 1,计算其他各共有峰的相对峰面积和相对保留时间,结果见表 2,3。计算 10 批样品的相似度分别为 0.968,0.991,0.958,0.976,0.978,0.942,0.884,0.906,0.986,0.984。

表 2 巴豆油中佛波醇类各色谱峰相对峰面积比值

Table 2 Relative peak area of consensus peaks for all samples

No.	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
S1	0.136	0.022	0.449	0.043	0.011	0.016	0.862	0.041	0.039	1.283	1.273
S2	0.096	0.068	0.040	0.127	0.014	0.015	0.809	0.088	0.090	0.811	1.017
S3	0.171	0.186	0.036	0.274	0.015	0.010	0.642	0.078	0.081	0.606	1.380
S4	0.133	0.139	0.059	0.220	0.013	0.010	0.585	0.058	0.059	0.587	1.152
S5	0.064	0.024	0.027	0.047	0.014	0.010	0.470	0.052	0.053	0.457	0.593
S6	0.093	0.014	0.013	0.032	0.020	0.007	0.355	0.071	0.073	0.678	0.287
S7	0.164	0.059	0.021	0.105	0.029	0.005	0.250	0.124	0.123	0.477	0.140
S8	0.041	0.149	0.027	0.267	0.024	0.006	0.314	0.144	0.141	0.734	0.195
S9	0.052	0.078	0.218	0.120	0.011	0.016	0.828	0.055	0.057	1.078	1.138
S10	0.022	0.041	0.154	0.081	0.012	0.013	0.716	0.052	0.052	1.263	1.088

注:7 号峰均为 1.000(表 3 同)。

表 3 巴豆油中佛波醇类各色谱峰相对保留时间比值

Table 3 Relative retention time of consensus peaks for all samples

No.	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
S1	0.211	0.240	0.353	0.410	0.774	0.907	1.130	1.167	1.224	1.550	1.828
S2	0.209	0.242	0.356	0.416	0.772	0.908	1.128	1.165	1.221	1.544	1.821
S3	0.209	0.242	0.357	0.416	0.772	0.908	1.128	1.165	1.221	1.544	1.821
S4	0.210	0.242	0.356	0.416	0.773	0.908	1.128	1.165	1.222	1.544	1.819
S5	0.209	0.242	0.357	0.418	0.775	0.909	1.128	1.165	1.221	1.544	1.822
S6	0.209	0.242	0.356	0.419	0.774	0.909	1.127	1.164	1.220	1.543	1.819
S7	0.209	0.241	0.357	0.415	0.771	0.908	1.128	1.165	1.222	1.544	1.820
S8	0.209	0.241	0.357	0.415	0.770	0.907	1.128	1.165	1.221	1.544	1.820
S9	0.209	0.241	0.356	0.417	0.774	0.908	1.127	1.164	1.220	1.542	1.820
S10	0.209	0.242	0.357	0.417	0.773	0.908	1.128	1.165	1.222	1.545	1.823

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 考察了乙腈、甲醇和水等溶剂不同组合配比,进行等度或梯度洗脱,结果表明,以水和乙腈梯度洗脱时,得到的色谱图基线平稳,不同峰的分度、保留时间和对称性良好,利于指纹图谱的分析。实验中采用 DAD 检测器在 210 ~ 400 nm 波长下进行全波长扫描,在 235 nm 波长下,色谱图信息丰富,基线噪音干扰小,各成分色谱峰的响应值均匀,代表性良好,经过比较,确定 235 nm 为检测波长。以十八烷基键和相硅胶色谱柱为固定相,分别考察了 Agilent Eclipse XDB C₁₈, Kromasil C₁₈ 和 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 等品牌的色谱柱,在基线、色谱峰数目、峰形和分离度等方面经过综合比较,选择 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 为试验色谱柱。

3.2 皂化方法的选择 巴豆油中佛波醇酯类成分非常复杂,经过皂化后得到佛波醇类成分相对简单一些,利于指纹图谱分析,考察了回流和搅拌 2 种方式的皂化方法,结果表明搅拌皂化更加充分,得到的色谱图信息更丰富;进一步考察皂化温度和时间,在 25 ℃ 水浴 8 h 的皂化条件下,佛波醇酯类基本皂化成佛波醇类成分。

3.3 参照峰的选择 共有模式中 3, 7 和 8 号峰分别为佛波醇、异佛波醇和脱氧佛波醇,对照品色谱图与供试品色谱图中保留时间相同的色谱峰进行比较,其紫外吸收光谱完全一致。在 10 批次巴豆油样品色谱图中,都有异佛波醇色谱峰,且有较理想的保留时间、峰面积和分离度,因此确定参照峰为异佛波醇。

通过建立巴豆油中佛波醇类 HPLC 指纹图谱,确认色谱峰 3 个,确立共有峰 12 个。10 批样品进行指纹图谱相似度评价,共有峰有基本一致的相对保留时间,但有差异较大的相对峰面积,表明不同产地的巴豆药材中佛波醇类成分相似,含量差异明显。实验表明本文建立的方法重复性好,操作性强,特征

性较强,为巴豆药材质量控制和临床安全用药进一步奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 许群,方铁萍,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): 179-183.
- [2] 朱均,吴智南,徐卫东,等. 巴豆生物碱对人骨肉瘤细胞细胞周期凋亡及对 Bcl-2 基因表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2009,27(7): 1450-1452.
- [3] 李生梅,曾宝,林吉,等. 反相高效液相色谱法测定巴豆中木兰花碱的含量[J]. 中国新药杂志,2013,22(15): 1754-1756.
- [4] 胡静,王艳,宋丽丽,等. HPLC 测定中药巴豆中巴豆昔和木兰花碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(8): 39-42.
- [5] 金锋,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.
- [6] El-Mekkawy S, Meselhy M R, Nakamur N, et al. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium* [J]. Phytochemistry, 2000,53(4):457-464.
- [7] 赵中夫,赵正保. 巴豆油各分离组份体外抗结核分枝杆菌实验研究[J]. 长治医学院学报,2006,20(1): 1-3.
- [8] 孙文峰,余祖胤,善亚君,等. 脱氧佛波醇乙酸酯通过激活 PKC/ERK 通路诱导急性髓系白血病细胞分化[J]. 军事医学,2011,35(6):416-419.
- [9] Han Z T, Chen H F. Compositions and methods of use of phorbol esters for the treatment of stroke; US, 14/025176[P]. 2015-03-12.
- [10] Goel G, Makkar H P, Francis G, et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals [J]. Int J Toxicol,2007,26(4):279-288.
- [11] 彭飞,林於,刘新,等. 高效液相色谱法测定巴豆油中佛波醇[J]. 光谱实验室,2012,29(1):111-115.

[责任编辑 顾雪竹]