

巴豆生物碱部位 HPLC 特征指纹图谱研究

金锋¹, 任玉珍², 陈彦琳², 杜杰², 周林², 白宗利², 梁焕², 张振凌^{1*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 中国药材公司, 北京 102600)

[摘要] 目的: 建立巴豆生物碱部位的高效液相指纹图谱。方法: 色谱柱 Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-0.2% 乙酸水流动相系统梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 292 nm, 温度 28 °C。结果: 对 10 批巴豆药材进行了测定, 建立了巴豆生物碱部位的指纹图谱, 共有 13 个共有峰, 指认了两种主要生物碱巴豆苷和木兰花碱。结论: 该方法可为巴豆的研究和质量控制提供依据。

[关键词] 巴豆; 生物碱; 高效液相; 指纹色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0090-04

Study on HPLC Fingerprint of Alkaloids in *Croton tiglium*

JIN Feng¹, REN Yu-zhen², CHEN Yan-lin², DU Jie², ZHOU Lin²,
BAI Zong-li², LIANG Huan², ZHANG Zhen-ling^{1*}

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. China National Corp of Traditional & Herba Medicine, Beijing 102600, China)

[Abstract] **Objective:** To study chromatography fingerprints of the alkaloids in *Croton tiglium* by HPLC. **Method:** Waters Symmetry C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.2% acetic acid of water gradient elution, at flow-rate of 0.8 mL·min⁻¹, detection wavelength at 292 nm; column temperature was at 25 °C. **Result:** HPLC was used to establish fingerprint chromatograph of methanol extraction from thirteen batches of *C. tiglium*, which had been harvested from the same area at the same time. Crontonoside and magnoflorine in the fingerprint were identified. The result showed that peaks were common. **Conclusion:** The method could be used for the research and the quality control of *C. tiglium*.

[Key words] *Croton tiglium*; alkaloids; HPLC; fingerprint

巴豆为大戟科乔木植物巴豆的干燥成熟果实, 首载于《神农本草经》, 列为下品。生巴豆味辛、性热, 有大毒, 归胃大肠经, 外用蚀疮, 内服多制霜用, 具有峻下积滞、逐水消肿、豁痰利咽的功效^[1]。巴豆主要含脂肪油、蛋白、生物碱等成分。近年来, 有

相关实验研究发现巴豆总生物碱具有抗癌活性^[2-6], 《中国药典》2010 年版中已将巴豆苷作为指标成分进行质量控制^[7], 但巴豆中生物碱类具体的成分研究尚不全面^[8], 为更好地研究和利用巴豆, 笔者对巴豆生物碱类成分的指纹图谱进行了研究。

1 材料

1.1 仪器 Waters2695-2998 高效液相色谱仪 (四元高压梯度泵、手动进样、柱温箱、2998PAD 检测器、Empower Pro3 工作站), TB-215D 型 1/10 万天平 (赛多利斯科学仪器有限公司), FW-100 高速粉碎器 (天津泰斯特仪器有限公司), KQ2100DB 型超声波清洗器 (浙江昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与对照品 巴豆苷 (中国药品生物制品鉴定所, 批号 11856-201001), 木兰花碱 (上海源叶

[收稿日期] 20120718(004)

[基金项目] 2011 年中医药行业科研专项 (201107008); 中药过程控制技术国家工程实验

[第一作者] 金锋, 在读研究生, 从事中药炮制与新药研究, Tel: 18810383251, E-mail: jinfeng198823 @ 126.com

[通讯作者] * 张振凌, 教授, 从事中药炮制学教学与研究, Tel: 0371-65680970, E-mail: zhangzl7658 @ 163.com

生物科技有限公司,批号 20120519),乙醚(北京化工厂,分析纯),硫酸(北京化工产,分析纯),色谱级甲醇(FisherScientific),水为双蒸水。巴豆药材经北京中医药大学金世元教授鉴定为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实。巴豆药材来源批次见表 1。

表 1 巴豆药材来源批次

批号	产地	指纹图谱编号
111106	四川宜宾	S1
071008	四川乐山	S2
091021	四川万县	S3
090812	四川高县	S4
090615	四川高县	S5
111120	四川宜宾	S6
090615	广西	S7
111120	河北安国	S8
090615	四川万县	S9
111120	四川犍为	S10

2 方法与结果

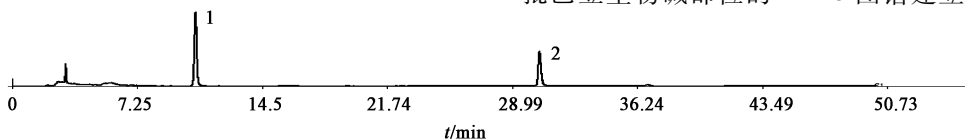
2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 292 nm, 温度 28 °C, 流动相比例见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱

t/min	A (%) 甲醇	B (%) 0.2% 乙酸水
0 ~ 8	1 ~ 3	99 ~ 96
8 ~ 12	4 ~ 5	96 ~ 95
12 ~ 32	5 ~ 15	95 ~ 85
32 ~ 50	15 ~ 28	85 ~ 72

2.2 对照品溶液的配制 精密巴豆苷和木兰花碱对照品适量,用 1% 硫酸溶液配制每 1 mL 分别含 38.4, 40.9 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的配制 取巴豆种仁粉末(过三号筛)约 0.3 g,精密称定,置索氏提取器中,加乙醚 50 mL,加热回流 3 h,弃去乙醚液,药渣挥干溶剂,连同滤纸筒移入具塞锥形瓶中,精密加入 1% 的硫酸溶液 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 24 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 1% 的硫酸溶液补足缺失的质量,摇匀^[7,9],以 0.45 μg 微孔滤膜滤过,即得。



1. 巴豆苷; 2. 木兰花碱

图 2 对照品 HPLC 色谱

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 8 号样品的供试品溶液,连续进样 6 次,其相对应的色谱峰相对保留时间 RSD 均 < 0.1%,主要峰的相对峰面积的 RSD 均 < 3%,试验结果表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取 8 号样品 6 份,每份 0.3 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,其相对应的色谱峰相对保留时间 RSD 均 < 0.1%,主要峰的相对峰面积的 RSD 均 < 3%,试验结果表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 测定,检测色谱图,对其中的共有色谱峰进行分析,其相对应的色谱峰相对保留时间 RSD 均 < 0.4%,主要峰的相对峰面积的 RSD 均 < 3%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立

2.5.1 共有峰的选择和特征峰的指认 按上述方法制备样品和进样,选择 10 批药材的共有的色谱峰作为指纹图谱的共有峰,最终选择了 13 个共有峰,指认了 2 种生物碱特征峰,其中 3 号峰为巴豆苷,11 号峰为木兰花碱,代表性指纹图谱见图 1, 2。

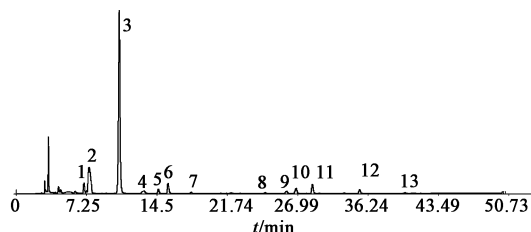


图 1 巴豆药材样品 HPLC

2.5.2 参照峰的选择 在 10 批样品的色谱图中,巴豆苷的峰面积最大且为所有样品共有,因此选择巴豆苷(3 号峰)为参照峰,计算各特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,见表 3, 4, 5。13 个共有峰的相对保留时间的 RSD < 0.5%,峰面积之和大于总峰面积的 90%,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行)中关于药材部分的要求。

2.6 指纹图谱相似度计算 本实验采用《中国药典》2004 色谱指纹图谱相似度 A 版计算软件,以 10 批巴豆生物碱部位的 HPLC 图谱建立其共有模式指

纹图谱, 见图 3, 对 10 巴豆生物碱部位的 HPLC 图谱 进行相似度计算, 结果见表 4。

表 3 各批样品共有峰的相对保留时间

峰	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.659	0.657	0.657	0.657	0.657	0.657	0.656	0.658	0.658	0.657	0.657	0.1
2	0.710	0.709	0.703	0.707	0.711	0.708	0.712	0.707	0.707	0.716	0.709	0.5
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
4	1.238	1.232	1.234	1.229	1.232	1.233	1.231	1.235	1.235	1.231	1.233	0.2
5	1.376	1.378	1.375	1.377	1.379	1.377	1.378	1.378	1.378	1.381	1.378	0.1
6	1.470	1.470	1.467	1.469	1.471	1.470	1.470	1.471	1.471	1.473	1.470	0.1
7	1.693	1.695	1.692	1.693	1.695	1.694	1.694	1.695	1.695	1.699	1.694	0.1
8	2.407	2.408	2.406	2.406	2.410	2.407	2.409	2.409	2.409	2.413	2.408	0.1
9	2.616	2.618	2.613	2.615	2.618	2.616	2.617	2.618	2.618	2.623	2.617	0.1
10	2.708	2.710	2.706	2.707	2.711	2.708	2.710	2.711	2.711	2.715	2.710	0.1
11	2.864	2.867	2.861	2.863	2.868	2.865	2.867	2.868	2.869	2.874	2.867	0.1
12	3.318	3.318	3.317	3.318	3.324	3.320	3.323	3.323	3.326	3.334	3.322	0.2
13	3.753	3.758	3.752	3.754	3.761	3.757	3.760	3.759	3.763	3.772	3.759	0.2

表 4 各批样品共有峰的相对峰面积

峰	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.038	0.057	0.045	0.046	0.046	0.052	0.041	0.041	0.047	0.047	0.046	12.1
2	0.319	0.245	0.247	0.238	0.238	0.273	0.243	0.238	0.239	0.238	0.252	10.2
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
4	0.013	0.018	0.011	0.017	0.017	0.014	0.013	0.013	0.034	0.030	0.018	43.6
5	0.023	0.016	0.012	0.020	0.020	0.016	0.020	0.021	0.025	0.025	0.020	20.2
6	0.079	0.044	0.041	0.055	0.055	0.046	0.044	0.047	0.057	0.057	0.053	20.9
7	0.014	0.007	0.008	0.010	0.010	0.008	0.007	0.010	0.009	0.008	0.009	20.9
8	0.005	0.005	0.004	0.008	0.008	0.005	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006	23.8
9	0.015	0.013	0.013	0.016	0.016	0.013	0.012	0.011	0.016	0.016	0.014	13.8
10	0.007	0.025	0.028	0.053	0.053	0.018	0.025	0.017	0.036	0.035	0.030	50.8
11	0.069	0.058	0.060	0.067	0.067	0.053	0.057	0.058	0.054	0.050	0.059	10.9
12	0.034	0.024	0.023	0.020	0.020	0.023	0.024	0.024	0.022	0.022	0.024	16.7
13	0.012	0.010	0.008	0.008	0.008	0.009	0.003	0.003	0.005	0.005	0.007	38.4

表 5 10 批样品的相似度计算

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1	0.997	0.997	0.996	0.997	0.998	0.997	0.997	0.996	0.996	0.997
S2	0.997	1	1	0.999	1	1	1	1	1	1	1
S3	0.997	1	1	1	1	1	1	1	0.999	1	1
S4	0.996	0.999	1	1	0.999	0.999	0.999	0.999	1	1	1
S5	0.997	1	1	0.999	1	1	1	1	0.999	0.999	1
S6	0.998	1	1	0.999	1	1	0.999	0.999	0.999	0.999	1
S7	0.997	1	1	0.999	1	0.999	1	1	1	1	1
S8	0.997	1	1	0.999	1	0.999	1	1	1	1	1
S9	0.996	1	0.999	1	0.999	0.999	1	1	1	1	1
S10	0.996	1	1	1	0.999	0.999	1	1	1	1	1
对照指纹图谱	0.997	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

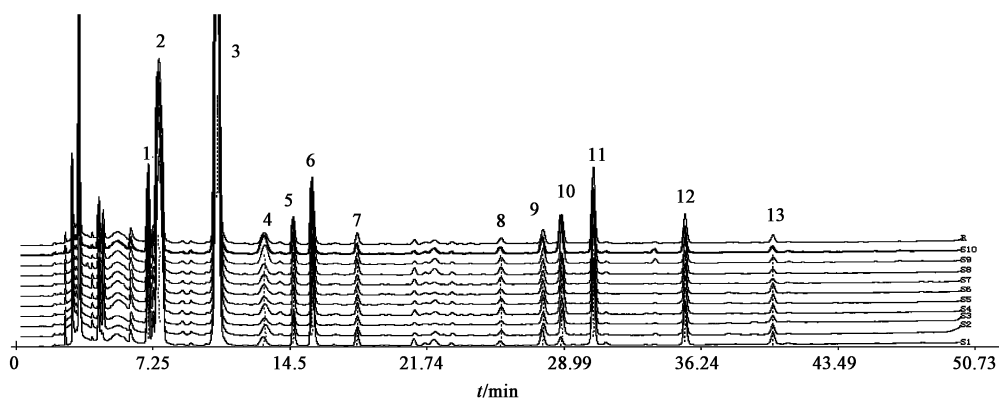


图3 10批巴豆药材生物碱部位的共有模式及叠加

3 讨论

3.1 供试品制备方法的选择 曾以巴豆苷为对照品,采用紫外分光光度法测定了巴豆中总生物碱的含量,通过对提取方法、提取溶剂和提取时间的考察,发现1%的硫酸溶液超声30min提取的生物碱含量最多,且经HPLC分析供试品溶液的色谱峰比较丰富,能够比较完整地反映生物碱部位的特征,故选择该制备方法。

3.2 色谱条件的选择 对甲醇-水,乙腈-水,甲醇-水-乙酸,乙腈-水-乙酸等不同流动相系统的考察,发现以甲醇-0.2%乙酸为流动相梯度洗脱得到的色谱图基线平稳,各峰的对称性和分离度较好。考察了Waters Sunfire™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Dikmasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex Synergi C12 (4.6 mm × 250 mm, 4 μm) 4根色谱柱,结果表明采用Waters Symmetry C₁₈色谱柱时,基线平稳,峰型和分离度好,且色谱峰数目多,故选用该色谱柱。实验过程中发现,柱温对色谱峰保留时间的影响非常大,尤其是对木兰花碱的保留时间影响较大,经过考察,将柱温恒定在28℃时,供试品溶液的保留时间变化较小。

3.3 检测波长的选择 采用UV2802-pc紫外分光光度计对巴豆生物碱部位的提取液进行全波长扫描,结果表明其在292nm的吸光度最大。通过DAD检测器在200~400nm进行3D全波长扫描,发现在292nm下,各特征峰比较明显,相对丰度合适,且基线平稳,故选择292nm为指纹图谱的检测波长。

以建立的总生物碱提取方法和测定波长为基础去研究建巴豆生物碱部位的HPLC指纹图谱,可以系统地反映巴豆生物碱类成分的全貌,两者能很好的互补和印证。本次试验共指认了含量较高的两种

特征生物碱巴豆苷和木兰花碱,为更好地开发利用巴豆中的生物碱及控制巴豆的质量提供了很好的依据。10批巴豆药材的相似度很好,而13个共有峰的相对峰面积却相差很大,说明不同产地的巴豆药材生物碱部位的化学成分种类相似,但含量的差别比较明显,可能与产地、贮存时间等有关。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典. 上册[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 702.
- [2] 刘秀德, 隋在云. 巴豆总生物碱对癌细胞质膜流动性及胞浆基质结构的影响[J]. 山东中医药大学学报 1995, 19(3): 192.
- [3] 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]. Chin General Practice, 2010, 7c(7): 13.
- [4] 王明艳, 瞿融, 许冬青. 巴豆生物碱诱导人胃癌SGC-7901细胞凋亡的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(9): 368.
- [5] 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, 11(6): 17.
- [6] 孙晓芳, 王巍, 杜贵友, 等. 埃及药用植物中抗人类免疫缺陷病毒药物的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 7(9): 649, 679.
- [7] 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.
- [8] 曾宝, 李生梅, 等. 0酸性染料法测定巴豆中总生物碱的含量[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(2).
- [9] 匡海学, 中药化学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 328.
- [10] 刘正清, 杨华, 易跃能. 乌药药材水提液的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 127.

[责任编辑 顾雪竹]