

高效液相色谱法测定巴豆油中佛波醇

彭飞 林於^{①a} 刘新 郭虎 马廉举

(重庆医科大学药学院 重庆市医学院路 1 号 400016)

^a(重庆医科大学中医药学院 重庆市医学院路 1 号 400016)

摘 要 建立巴豆油中佛波醇(Phorbol)的含量测定方法。用 HPLC 测定水解后佛波醇的含量,并通过正交法优化巴豆油水解条件。采用 Kromasil C₈(4.6mm×250mm,5μm)色谱柱,流动相为甲醇:水=20:80,流速为 1.0mL/min,柱温为 25℃,检测波长为 234nm。在 46.8—468μg/mL 范围内佛波醇浓度与峰面积线性关系良好,回归方程为 $y=9820.8x+50238$, $r=0.9999$;回收率为 93.16%,RSD 为 2.73%。巴豆油的优化水解条件:温度 20℃,料液比 1:8(mL/mL),水解 3h,此条件下佛波醇的产率最高,平均产率为 2.41%。所建方法易于操作、结果稳定、重现性好,可用于巴豆油中佛波醇的含量测定。

关键词 巴豆油;正交试验;佛波醇;高效液相色谱法

中图分类号:O657.7+2

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2012)01-0111-05

1 引言

巴豆油来源于中药材巴豆(大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实)。巴豆油中含有巴豆油酸,巴豆酸,甘油酯和巴豆醇酯类化合物^[1]。巴豆醇酯为大戟二萜醇酯类化合物,是以佛波醇(Phorbol)为母核与多种酸形成的酯类^[2,3],可经水解生成四环二萜类化合物佛波醇。结构见图 1。据报道,一种佛波醇酯(Prostratin)是有望成为根治艾滋病的新化合物,具有抑制 HIV 的作用,其天然资源极其稀少,而其人工合成前体来源于佛波醇^[4,5]。虽然国外已有化学全合成佛波醇酯的报道,但步骤多,操作复杂,仅停留在实验室阶段,而以来自天然的佛波醇为母核合成佛波醇酯的方法则较为可行^[6]。水解巴豆油能为工业生产提供较低成本和短生产周期的原料来源。建立巴豆油中佛波醇的含量检测方法,对巴豆原药材和巴豆油原料的质量控制,及其中佛波醇的提取分离工艺制定等具有意义。巴豆油中佛波醇含量检测方法报道很少,本方法与已见报道相比,具有水解时间短,检测成本低等优点。

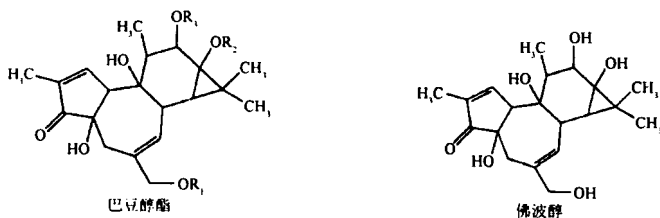


图 1 巴豆醇酯及佛波醇结构

① 联系人,电话:(023)68485587;E-mail:linyus819@163.com

作者简介:彭飞(1987—),男,重庆市人,在读硕士,主要从事中药化学研究工作。

收稿日期:2011-07-30;接受日期:2011-09-02

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);UV-2501 PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司);BSA323S 型电子天平(德国赛多利斯集团);85-2 数显恒温磁力搅拌器(江苏金坛市晶玻实验仪器厂);RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器有限公司)。

甲醇(分析纯,重庆川东化工有限公司);石油醚(60—90℃沸程,分析纯,重庆川东化工有限公司);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);碳酸钾(分析纯,天津永大化学试剂开发中心);巴豆(购买于重庆储奇门中药材市场,经重庆医科大学药学院刘新教授鉴定,为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实);佛波醇对照品(本实验室自制,其结构经 UV、IR、NMR 确认,经 HPLC 测定含量 $\geq 98.5\%$)。实验用水为超纯水(自制)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

Kromasil C₈(4.6mm × 250mm, 5 μ m)色谱柱(江苏汉邦科技有限公司);流动相为甲醇(色谱纯):水=20:80(V/V);检测波长为 234nm;流速为 1.0mL/min;柱温为 25℃;进样量为 20 μ L。以佛波醇计理论塔板数不低于 4500,分离度为 1.72。结果见图 2。

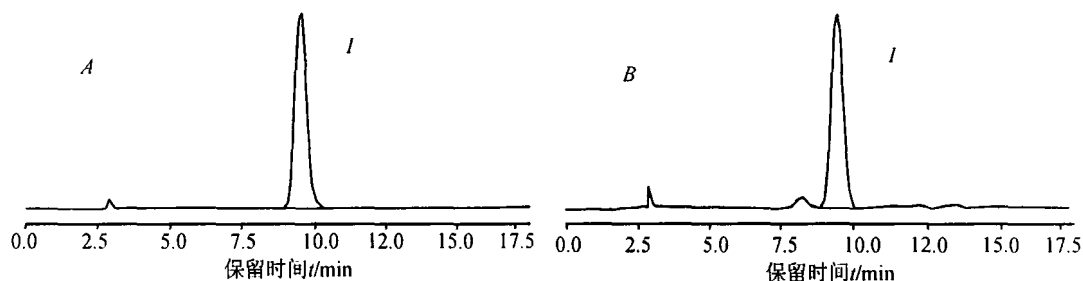


图 2 对照品溶液(A)及供试品溶液(B)HPLC 图

I—佛波醇,保留时间=9.489min。

2.2.2 巴豆油的制备

取干燥的巴豆种子,去壳后将种仁粉碎,用石油醚(60—90℃沸程)索氏提取器加热回流提取,减压回收溶剂,得巴豆油(浅黄色油状,相对密度为 0.90g/mL),备用。

2.2.3 对照品溶液的制备

准确称取佛波醇对照品 23.4mg,于烧杯中用少量甲醇(分析纯)溶解,然后置于 25mL 容量瓶中,并用甲醇(分析纯)稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备溶液(0.936mg/mL)。

2.2.4 供试品溶液的制备

准确量取 1mL 巴豆油,置于 100mL 圆底烧瓶中,加入碳酸钾甲醇饱和溶液 8mL,置于 20℃ 恒温磁力搅拌器上氮气保护搅拌 3h,取出过滤,挥干溶剂,用甲醇(分析纯)溶解并转移至 25mL 容量瓶中,加入甲醇(分析纯)稀释至刻度,摇匀,再准确量取 2mL 溶液定容于 10mL 容量瓶中,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.5 测定波长的选择

取对照品储备溶液,甲醇(分析纯)稀释 5 倍后,以甲醇(分析纯)做空白在紫外分光光度计

200—600nm 范围内扫描测定吸光度,结果在 234nm 处有最大吸收,故确定 234nm 为测定波长。

3 结果与讨论

3.1 线性关系及检出限的考察

准确量取上述对照品储备溶液 0.5、1、2、3、4、5mL 置于 10mL 容量瓶中,加甲醇(分析纯)至刻度,摇匀,分别进样检测,按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制校准曲线,得回归方程, $y=9820.8x+50238$, $r=0.9999$ 。结果表明:在 46.8—468 $\mu\text{g/mL}$ 范围内佛波醇浓度与峰面积线性关系良好。连续稀释对照品,至信号(峰高)为基线噪音 3 倍的浓度为检出限,经测定计算为 0.023 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 精密度实验

取同一对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积,重复测定 5 次,峰面积的 RSD 为 0.42%。结果表明,仪器精密度良好。

3.3 稳定性考察

取 1mL 巴豆油按“2.2.4”项下方法制备供试品,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24h 不同时间,按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积,RSD 为 1.01%。结果表明,供试品溶液在 24h 内具有较好的稳定性。

3.4 重复性实验

取 6 份 1mL 巴豆油按“2.2.4”项下方法制备供试品,每份按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积,RSD 为 1.29%。结果表明,本法具有较好的重复性。

3.5 加标回收率实验

取 9 份 1mL 已知含量的巴豆油,置于 100mL 圆底烧瓶中,分别按“2.2.4”项下“加入碳酸钾甲醇饱和溶液”至“取出过滤”方法处理后,再加入适量佛波醇对照品制成低、中、高浓度溶液,再按“2.2.4”项下余下方法制备供试液,经测定计算平均回收率为 93.16%,RSD 为 2.73%。结果见表 1。

表 1 回收率实验结果

($n=9$)

编号	样品中含量 (mg)	加入对照品的量 (mg)	测得的量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	21.76	17.1	37.07	89.53	93.16	2.73
2	21.76	16.9	36.80	88.99		
3	21.76	17.3	37.71	92.20		
4	21.76	21.1	41.41	93.13		
5	21.76	21.4	41.98	94.49		
6	21.76	20.8	41.17	93.32		
7	21.76	26.2	46.93	96.07		
8	21.76	25.5	46.12	95.53		
9	21.76	25.7	46.23	95.21		

3.6 巴豆油水解条件对佛波醇含量的影响考察

以温度(A)、料液比(B,巴豆油与碳酸钾甲醇饱和溶液体积比,mL/mL),时间(C)为考察因素,各取 3 水平,安排正交试验,试验因素水平表,见表 2。按 $L_9(3^3)$ 正交表设计实验,准确量取巴豆油 1mL,置于 100mL 圆底烧瓶中,照正交表要求加入适量碳酸钾甲醇饱和溶液,置于恒温磁力搅拌器搅拌,并充入氮气,反应完后取出过滤,挥干溶剂,用甲醇(分析纯)溶解并转移至 25mL 容量瓶中,

加入甲醇(分析纯)稀释至刻度,摇匀,再准确量取 2mL 溶液定容于 10mL 容量瓶中,摇匀,即得供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定佛波醇含量。结果见表 3。

表 2 因素水平

水平	因素		
	温度 A(°C)	料液比 B(mL/mL)	时间 C(h)
1	20	1 : 6	1
2	25	1 : 8	2
3	30	1 : 10	3

表 3 正交试验结果

编号	A(°C)	B(mL/mL)	C(h)	空白	佛波醇含量(mg)
1	20	1 : 6	1	1	17.24
2	20	1 : 8	2	2	20.15
3	20	1 : 10	3	3	21.27
4	25	1 : 6	2	3	19.69
5	25	1 : 8	3	1	19.53
6	25	1 : 10	1	2	17.84
7	30	1 : 6	3	2	12.42
8	30	1 : 8	1	3	14.46
9	30	1 : 10	2	1	12.83
K_1	58.659	49.350	49.539	49.599	
K_2	57.060	54.141	52.671	50.409	
K_3	39.711	51.939	53.220	55.419	
R	6.316	1.597	1.227	1.940	

表 4 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	73.632	2	36.816	28.029	$P < 0.05$
B	3.832	2	1.916	1.459	
C	2.627	2	1.314	1.000	
误差	2.630	2	1.315		

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

从表 3、4 可知,影响产物含量的各个因素主次关系为 $A > B > C$,即温度对佛波醇产率影响最大,其次是料液比和时间。最优水解条件为 $A_1B_2C_3$,即在 20°C 下,料液比 1 : 8,水解 3h,佛波醇的产率最高。

3.7 水解验证实验

准确量取巴豆油 1mL,置于 100mL 圆底烧瓶中,按上述最优条件分别平行处理巴豆油 3 份,经测定计算平均含量为 21.68mg, RSD 为 0.99%,平均产率为 2.41%。结果表明,按上述条件处理结果稳定可靠。结果见表 5。

表 5 验证实验

(n=3)

编号	佛波醇含量(mg)	平均含量(mg)	RSD(%)
1	21.44	21.68	0.99
2	21.85		
3	21.75		

3.8 讨论

佛波醇以多种酯类形式存在于巴豆油中,可用碱将其水解为醇类^[4,7-9],在预试时采用 NaHCO_3 、 KOH 、 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 等都能将其水解,但用 NaHCO_3 水解需要的料液比较大,不利于溶剂的回

收, KOH 碱性强使副产物量增加, 而 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水解时间长, 水解过程中产生大量的粘稠物不利于搅拌和分离。本文选用碳酸钾, 有水解时间短, 碱性适中, 副产物生成少的优点。

单因素考察中温度上升到 40°C 后副产物含量上升且佛波醇含量下降, 提高温度对水解造成影响, 副产物生成增多。料液比的考察中小于 $1:8$ 后佛波醇含量无明显差异变化。水解时间在 1、2、3h 有明显差异, 反应 3h 产量较高, 超过 3h 则含量趋于下降, 可能与本品易氧化有关。正交试验中时间无显著性差异可能与水平选取跨度不大有关。

实验在充氮气保护下进行, 比末在氮气保护下佛波醇含量有明显的提高。

4 结论

本文建立高效液相色谱法测定佛波醇的方法及考察了巴豆油水解条件对佛波醇含量影响, 按最优水解条件佛波醇平均产率为 2.41%。本方法简便快捷, 重复性好, 水解时间短, 为巴豆油中佛波醇的质量控制提供了一定依据。

参考文献

- [1] 肖培根, 阴健, 郭力弓等. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1994. 191—192.
- [2] 吴新安. 短瓣金莲花、巴豆叶植物化学成分及药效学研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2005. 126—127.
- [3] 邹国安. 光叶巴豆、毛叶巴豆化学成分研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2009. 12—13.
- [4] 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**(5): 649—652.
- [5] Sophie R, Miriam C, Carine V L *et al.* Synergistic Activation of HIV-1 Expression by Deacetylase Inhibitors and Prostratin: Implications for Treatment of Latent Infection[J]. *Plos one*, 2009, **4**(6): 60—93.
- [6] 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.
- [7] Nrusingha C M, Richard D E, Mahmoud M A. Isolation and Purification of Phorbol from Croton Oil by Reversed-Phase Column Chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1986, **369**(8): 435—439.
- [8] David A C, Sidney S M, Lawrence W. A Rapid Method for Isolating Phorbol from Croton Oil[J]. *Cancer Letters*, 1981, **14**(6): 86—91.
- [9] 郭虎, 马廉举, 刘新等. 正交试验优选佛波醇酯的水解工艺[J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(4): 446—449.

Determination of Phorbol in Croton Oil by HPLC

PENG Fei LIN Yu LIU Xin GUO Hu MA Lian-Ju

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

a(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

Abstract The method for the determination of content of phorbol in *Croton* oil was established. The content of phorbol was determined by HPLC, and hydrolyzation conditions of *Croton* oil were optimized by orthogonal test. The chromatographic column was Kromasil C_8 (4.6mm \times 250mm, $5\mu\text{m}$), the mobile phase was methanol : water = 20 : 80 with flow rate of 1.0mL/min, the detection wavelength was 234nm, and the column temperature was 25°C . There was a good linear relationship for phorbol concentration in the range of 46.8—468 $\mu\text{g/mL}$ with peak area, and the regression equation was $y = 9820.8x + 50238$ ($r = 0.9999$), and the average recovery was 93.16% with RSD of 2.73%. The optimal hydrolyzation conditions of *Croton* oil were as follows: the temperature of 20°C , ratio of material to liquid of 1 : 8 (mL/mL) and hydrolytic time of 3h. The productivity of phorbol was highest, and the average productivity was 2.41% under the conditions. The method has simple operation, steady results and good repeatability, that is applied to determining the content of phorbol in *Croton* oil.

Key words *Croton* Oil; Orthogonal Test; Phorbol; HPLC