

大猪屎豆种子中野百合碱的分析

蒋丽群¹ 程敏² 高秋芳² 汤俊¹ (1. 武汉大学药学院 武汉 430072;2. 武汉市食品药品监督检验所)

摘要 目的:建立大猪屎豆种子中野百合碱HPLC含量测定的方法并对其种子及种子水提取物中的野百合碱进行定性与定量的分析。**方法:**提取和制备野百合碱,采用色谱柱为Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾-三乙胺(5:95:0.1,用磷酸调节pH=3.0);检测波长为205 nm;流速为1.0 ml·min⁻¹;柱温为25℃的色谱条件对种子及种子水提取物中的野百合碱进行含量测定。**结果:**野百合碱在浓度0.102~1.020 mg·ml⁻¹范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.9996, n=5$)。野百合碱平均回收率为($n=9$)为98.2%,RSD为2.7%;大猪屎豆中野百合碱的含量为2.6%,种子水提取物中的含量为15.0%。**结论:**本法快速、灵敏、准确,可作为大猪屎豆种子中野百合碱的含量测定方法,并可为进一步毒理学研究提供参考。

关键词 大猪屎豆;野百合碱;高效液相色谱法

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2010)12-1743-03

Analysis of Monocrotaline in Seed of *Crotalaria assamica* Benth.

Jiang Liqun¹, Cheng Min², Gao Qiufang², Tang Jun¹ (1. College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Wuhan Institute for Food and Drug Control)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method for determination of monocrotaline in the seed of *Crotalaria assamica* Benth. and its decoction. **Method:** The HPLC separation was performed on a Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm) column with a mixture of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate-triethylamine (5:95:0.1, adjust pH to 3.0 with phosphoric acid) as the mobile phase, at a flow rate of 1.0 ml·L⁻¹. The detection wavelength was at 205 nm, and column temperature at 25℃. **Result:** The linear response of monocrotaline ranges from 0.102~1.020 mg·ml⁻¹ ($r=0.9996, n=5$). The average recovery of monocrotaline was 98.2% with RSD 2.7%. The content of monocrotaline in the seed drug and its decoction was 2.6% and 15%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate, and reproducible, which can offer reference for the quality control of *Crotalaria assamica* Benth. and its toxicological study.

KEY WORDS *Crotalaria assamica* Benth.; Monocrotaline; HPLC

大猪屎豆(*Crotalaria assamica* Benth.)为豆科植物猪屎豆属(*Crotalaria* Lnn.)大猪屎豆的全草或带根全草,全草及种子均可入药。本品味苦、淡、性平,具有清热解毒、凉血止血和利水消肿等作用^[1,2]。研究表明,大猪屎豆中主要活性成分为野百合碱(monocrotaline),其结构属于吡咯里西啶生物碱类(PA)^[3~6]。经动物抗瘤谱实验,野百合碱具有抗癌活性作用^[7],且临幊上曾用于鳞状上皮癌、宫颈癌和白血病等的治疗^[8]。但由于许多吡咯里西啶生物碱类成分具有肝毒性,这类生物碱及含该类成分中药的开发与利用均受到了极大的制约^[9]。本课题前期研究也表明一次给予大鼠人用剂量的大猪屎豆种子水提取物(相当于生药剂量约为4.1 g·kg⁻¹)后,毒性反应明显,出现肝腹水、肝脾肿大及部分肝空泡化等现象。目前有关大猪屎豆含量测定方法的研究较少,且该药材中野百合碱的含量尚不清楚。为合理利用该中药资源以及进一步评价其毒性和毒理机制,本研究采用了反相高效液相色谱法对大猪屎豆种子中野百合碱进行定性与定量的分析。

1 仪器与试药

P680型高效液相色谱仪系统(美国戴安),其中包括:在线脱气机、P-680型输液泵、ASI-100自动进样器、TCG-100柱温箱、UVD-170U紫外检测器、Chromeleon色谱工作站;UV-

2100紫外分光光度计(日本岛津);十万分之一电子天平(瑞士 Mettler)、HSS-214恒温水浴锅(重庆四达);SevenEasy pH计(瑞士 Mettler);SB-52000D超声清洗机(宁波新芝,250 W,40 kHz)。

大猪屎豆种子药材由中国科学院武汉植物园屠治本研究员提供并鉴定为豆科植物大猪屎豆(*Crotalaria assamica* Benth.)的种子。乙腈、甲醇、三乙胺均为色谱纯,磷酸二氢钾、氯仿、氨水、磷酸等均为分析纯,水为Millipore高纯水。野百合碱(自制),通过对大猪屎豆乙醇提取、酸碱萃取、重结晶等步骤分离得到野百合碱,再经¹H-NMR、¹³C-NMR图谱测定及与文献^[3~6]对照确证为野百合碱(monocrotaline),又经HPLC分析,峰面积归一化法计算其纯度大于98.5%。大猪屎豆种子水提取物(自制),称取大猪屎豆粉末约3 000 g,通过水煎醇沉法制得水提取物为269.5 g,得率约为9.0%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm),另配保护柱;流动相:乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾-三乙胺(5:95:0.1,用磷酸调pH=3.0);流速:1.0 ml·min⁻¹;柱温:25

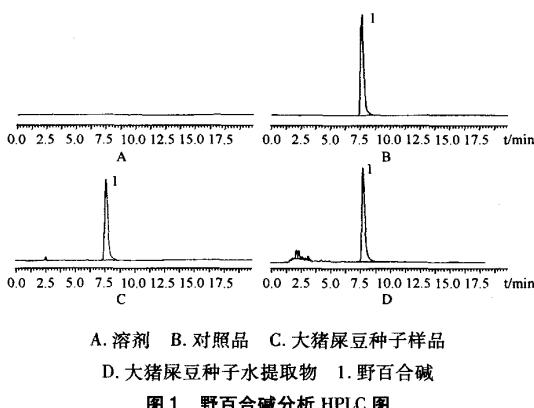
基金项目:武汉大学引进人才科研启动基金项目(编号:306276214)

通讯作者:汤俊 Tel:(027)68759923 E-mail:tangj0205@whu.edu.cn

℃; 检测波长: 205 nm; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 野百合碱峰保留时间约为 7.5 min, 理论塔板数大于 3 000, 与邻近峰分离度大于 2(见图 1)。

2.2 对照品储备液的制备

取野百合碱对照品适量, 精密称定, 置于 25 ml 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摆匀, 制得浓度为 1.02 mg·ml⁻¹野百合碱对照品溶液, 备用。



A. 溶剂 B. 对照品 C. 大猪屎豆种子样品

D. 大猪屎豆种子水提取物 1. 野百合碱

图 1 野百合碱分析 HPLC 图

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 大猪屎豆种子供试品 大猪屎豆种子药材打成粉末状, 并过药典 3 号筛。取粉末约 0.4 g, 精密称定, 准确加入甲醇 20 ml, 称重, 于 80 ℃ 温度下回流 45 min, 待其冷却至室温, 称重, 用甲醇补足减失重量, 摆匀, 过滤, 取续滤液 10 ml, 置水浴上挥干溶剂, 残渣以 20 ml 0.2 mol·L⁻¹ 的稀盐酸溶解, 用氨水调 pH 至 9~10, 再加 20 ml 氯仿萃取, 分离氯仿层, 萃取重复三次, 挥干氯仿, 残渣以流动相溶解并稀释至 10 ml, 摆匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3.2 大猪屎豆种子水提取物供试品 另取大猪屎豆种子水提取物浸膏约 0.20 g, 精密称定, 参照“2.3.1”项方法, 从“以 20 ml 0.2 mol·L⁻¹ 的稀盐酸溶解”开始同法操作, 最后所得残渣以流动相溶解并稀释至 25 ml, 摆匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 得大猪屎豆种子水提取物供试液。

2.4 线性关系的考察

精密量取野百合碱对照品储备液 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ml 置于 10 ml 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 得浓度为 0.102, 0.255, 0.510, 0.765, 1.020 mg·ml⁻¹ 系列对照品溶液, 摆匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 参照“2.1”项色谱条件进行测定。以对照品浓度 X (mg·ml⁻¹) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归分析, 得标准曲线回归方程为 $Y = 50.163X + 0.446 r = 0.9996 (n=5)$, 野百合碱在浓度 0.102~1.020 mg·ml⁻¹ 范围内线性良好。

2.5 精密度试验

精密称定大猪屎豆种子粉末 1 份, 按“2.3.1”项处理方法操作, 在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积。结果野百合碱峰面积 RSD ($n=6$) 为 0.66%。

2.6 重复性试验

精密称定大猪屎豆种子粉末 6 份, 按“2.3.1”项处理方

法操作, 在“2.1”项色谱条件下, 测定峰面积。结果野百合碱峰面积 RSD ($n=6$) 为 2.69%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密称定大猪屎豆种子粉末 1 份, 按“2.3.1”项处理方法操作, 分别置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后在“2.1”项色谱条件下, 测定峰面积。结果野百合碱峰面积 RSD ($n=6$) 为 0.78%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的大猪屎豆种子粉末 0.2 g, 精密称定, 共 9 份, 分别精密加入野百合碱对照品 4.0, 5.0, 6.0 mg, 各三份, 按“2.3.1”项处理方法操作, 在“2.1”项色谱条件下, 测定峰面积。结果野百合碱平均回收率为 98.2%, RSD 为 2.7% ($n=9$)。

2.9 大猪屎豆种子及种子水提物中野百合碱的含量

精密称定大猪屎豆种子粉末及种子水提取物各 6 份, 按“2.3”项处理方法操作, 在“2.1”项色谱条件下测定峰面积。按照“2.4”线性回归方程进行计算, 结果野百合碱在大猪屎豆中的含量为 $(26.2 \pm 0.8) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 在水提取物中的含量为 $(150.0 \pm 1.2) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 检测波长的考察

配制一定浓度的野百合碱对照品溶液, 在 200~400 nm 波长范围内扫描, 当波长在 200 nm 附近吸收最大, 考虑到 200 nm 为溶剂末端吸收, 因此选择 205 nm 为检测波长。

3.2 流动相条件的选择

本试验中分别对乙腈-磷酸二氢钾缓冲盐、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 甲酸铵的流动相系统进行了多次试验, 结果发现: 乙腈-磷酸二氢钾缓冲盐系统能使野百合碱达到较好分离, 故选择乙腈-磷酸二氢钾缓冲盐流动相组成。在试验中还发现大猪屎豆样品溶液浓度较高时, 色谱峰型严重拖尾, 柱效也随之降低, 尝试加入三乙胺扫尾剂, 试验后发现野百合碱峰型明显改善, 柱效升高, 峰形尖锐, 效果理想。

3.3 样品提取方法的研究

考察了加热回流、超声提取和冷浸 3 种方法对野百合碱含量测定的影响, 结果表明加热回流提取方法更完全, 故选择了加热回流提取; 大猪屎豆直接以甲醇回流提取引进较多杂质, 且野百合碱峰难于与其他杂质峰分开, 干扰测定, 故实验在甲醇回流提取后, 再用氯仿萃取纯化, 以便除去干扰杂质。同时, 本实验对甲醇的用量(15, 20, 25 ml)进行考察, 结果表明甲醇用量为 20 ml 时大猪屎豆种子中野百合碱可提取完全, 因此甲醇用量定为 20 ml; 进一步对提取时间进行了考察, 分别试验了 30, 45, 60 min, 结果提取时间为 45 min 时, 大猪屎豆种子中野百合碱就可提取完全, 因此提取时间定为 45 min。

3.4 大猪屎豆水提物中野百合碱的分析

以上分析表明, 大猪屎豆水提取物中野百合碱得到进一步富集, 相比原药材的含量增加了大约 5 倍($150/26.2 \approx 5.7$)。由此可见, 传统的中药汤剂可以使 PA 类成分从其药材中大量溶出, 可能是其毒性产生重要的物质基础。

匹多莫德糖浆在健康人体的药动学和生物等效性评价

陈倩 刘东 (华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部 武汉 430030)

摘要 目的:研究匹多莫德糖浆的人体相对生物利用度和生物等效性。**方法:**健康志愿者20名,随机双交叉单剂量口服匹多莫德糖浆(受试制剂)和溶液(参比制剂),剂量分别为20 ml(800 mg)和14 ml(800 mg),采用HPLC法测定血浆中匹多莫德的浓度,用DAS2.1药动学程序计算药动学参数和生物利用度,并进行生物等效性评价。**结果:**单剂量口服匹多莫德受试和参比制剂后,血浆匹多莫德的 C_{max} 分别为 $(4.45 \pm 1.80) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $(5.17 \pm 1.57) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, t_{max} 分别为 $(2.28 \pm 0.550) \text{ h}$ 和 $(2.18 \pm 0.61) \text{ h}$, $t_{1/2}$ 分别为 $(2.27 \pm 1.07) \text{ h}$ 和 $(1.98 \pm 0.77) \text{ h}$, AUC_{0-14} 分别为 $(21.77 \pm 6.48) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $(21.13 \pm 5.30) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(22.28 \pm 6.48) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $(21.56 \pm 5.36) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。 AUC_{0-14} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 的90%可信区间分别为89.2%~116.4%,89.8%~116.9%和74.8%~94.2%。受试制剂的相对生物利用度 F_{0-14} 和 $F_{0-\infty}$ 分别为 $(107.69 \pm 37.25)\%$ 和 $(108.20 \pm 37.13)\%$ 。**结论:**匹多莫德受试制剂和参比制剂具有生物等效性。

关键词 匹多莫德; 药动学; 生物等效性; 高效液相色谱法

中图分类号:R969.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2010)12-1745-03

Pharmacokinetics and Bioequivalence of Pidotimod Syrup in Healthy Volunteers

Chen Qian, Liu Dong (Department of Pharmacy of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective: To study the relative bioavailability and bioequivalence of pidotimod syrup in healthy volunteers. **Method:** A single oral dose of pidotimod (800 mg test and reference preparations) were given to 20 male healthy volunteers in a randomized crossover study. The concentration of pidotimod in plasma was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated and the relative bioavailability and bioequivalence of two formulations were evaluated by DAS ver2.1 program. **Result:** After a single dose, the pharmacokinetic parameters of the test and reference pidotimod were as follows: C_{max} (4.45 ± 1.80) $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ and (5.17 ± 1.57) $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, t_{max} (2.28 ± 0.550) h and (2.18 ± 0.61) h , $t_{1/2}$ (2.27 ± 1.07) h and (1.98 ± 0.77) h , AUC_{0-14} (21.77 ± 6.48) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ and (21.13 ± 5.30) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ (22.28 ± 6.48) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ and (21.56 ± 5.36) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectively. The 90% confidential interval of AUC_{0-14} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} were 89.2%~116.4%, 89.8%~116.9% and 74.8%~94.2%, respectively. The relative bioavailability was ($108.20 \pm 37.13\%$). **Conclusion:** The results of the statistic analysis showed that the two formulations were bioequivalent.

KEY WORDS Pidotimod; Pharmacokinetics; Bioequivalence; HPLC

匹多莫德[(R)-3-[(S)-(5-氧-2-吡咯烷基)羰基]-四氢噻唑-4 羧酸]是一种全新型的化学反应调节剂,其结构类似于二肽,是一种新型免疫调节剂。口服及肌肉注射具有良好的生物利用度,既能促进非特异性免疫反应又能促进特异性免疫反应。尽管匹多莫德无直接的抗菌和抗病毒活性,但通过促进机体的免疫功能可发挥显著的治疗细菌及病毒感染的作用。临幊上主要用于治疗反复发作的呼吸

道感染、耳鼻喉反复感染、泌尿生殖系统的反复感染^[1]。匹多莫德最初由意大利多帕药业公司研制生产(普利莫口服液),目前临床使用的剂型主要有口服液、干混悬剂、颗粒剂、片剂和注射剂。广东顺峰药业有限公司开发出了糖浆剂。本试验采用反相高效液相色谱法测定血浆中匹多莫德浓度,并将该法用于健康人口服匹多莫德糖浆后的药动学研究和生物等效性评价。

通讯作者:刘东 Tel:(027)83663519 E-mail:ld_2069@163.com

参考文献

- 李林珍,朱海燕,石京山,等.猪屎豆属植物化学成分及药理活性研究概况[J].天然产物研究与开发,2007,19(4):724-730
- Edgar JA, Lin HJ, Kumana CR, et al. Pyrrolizidine alkaloid composition of three Chinese medicinal herbs, *Eupatorium cannabinum*, *E. japonicum* and *Crotalaria assamica* [J]. Am J Chin Med, 1992, 20(3/4): 281-288
- Ran MS, Rao PS. Anocrotine-a crotanecine alkaloid from *Crotalaria trifoliastrum* [J]. Fitoterapia, 1999, 70(4): 449-450
- Verdoorn GH, Wyk BE. Pyrrolizidine alkaloids from seeds of *Crotalaria capensis* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(1): 369-371
- 张芳,王长虹,王峰涛.植物中吡咯里西啶生物碱的检测与分析[J].天然产物研究与开发,2006,18(6):1057-1063
- Kupchan SM, Doskotch RW, Wanenhoorn PW. Tumor inhibitors III. Monocrotaline, the active principle of *Crotalaria spectabilis* [J]. J Pharm Sci, 1964, 53(3): 343-345
- Jain SC, Purohit M. Antitumor active pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium marifolium* Retz [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(12): 5154
- 连文琰.猪屎豆属药用植物的调查[J].中药材,1986,9(6):19-22
- Tang J, Akao T, Nakamura N, et al. In vitro metabolism of isoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia duciformis*, by rodent liver microsomal esterase and enhanced hepatotoxicity by esterase inhibitors [J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(10): 1832-1839

(2010-06-17 收稿 2010-08-10 修回)

大猪屎豆种子中野百合碱的分析

作者: 蒋丽群, 程敏, 高秋芳, 汤俊, Jiang Liqun, Cheng Min, Gao Qiufang, Tang Jun
作者单位: 蒋丽群, 汤俊, Jiang Liqun, Tang Jun(武汉大学药学院, 武汉, 430072), 程敏, 高秋芳, Cheng Min, Gao Qiufang(武汉市食品药品监督检验所)
刊名: 中国药师 [STIC]
英文刊名: CHINA PHARMACIST
年, 卷(期): 2010, 13(12)

参考文献(9条)

- 李林珍;朱海燕;石京山 猪屎豆属植物化学成分及药理活性研究概况[期刊论文]-天然产物研究与开发 2007(04)
- Tang J;Akao T;Nakamura N In vitro metabolism of isoline.a pyrrolizidine alkaloid from Ligularia duciformis, by rodent liver microsomal esterase and enhanced hepatotoxicity by esterase inhibitors[外文期刊] 2007(10)
- 连文琰 猪屎豆属药用植物的调查 1986(06)
- Jain SC;Purohit M Antitumor active pyrrolizidine alkaloids from Heliotropium marifolium Retz 1986(12)
- Kupchan SM;Doskotch RW;Wanevenhoren PW Tumor inhibitors III. Monocrotaline, the active principle of Crotalaria spectabilis 1964(03)
- 张芳;王长虹;王峥涛 植物中吡咯里西啶生物碱的检测与分析[期刊论文]-天然产物研究与开发 2006(06)
- Verdoom GH;Wyk BE Pyrrolizidine alkaloids from seeds of Crotalaria capensis 1992(01)
- Ran MS;Rao PS Anocrotine-a crotanecene alkaloid from Crotalaria trifoliastrum 1999(04)
- Edgar JA;Lin HJ;Kumana CR Pyrrolizidine alkaloid composition of three Chinese medicinal herbs, Eupatorium cannabinum, E. japonicum and Crotalaria assamica 1992(3/4)

本文读者也读过(10条)

- 杨丹莉. 李淑慧. 张海港. 杨晓娇. 郝丽云. 蒋琳琳. 李晓辉. YANG Dan-li. LI Shu-hui. ZHANG Hai-gang. YANG Xiao-jiao. HAO Li-yun. JIANG Lin-lin. LI Xiao-hui 野百合碱对大鼠肺动脉α-SMA抗原过表达和VIII因子抗原低表达的影响[期刊论文]-医药导报2010, 29(4)
- “中国肉牛生产全程质量安全可追溯关键技术研究”通过鉴定/中国中药有效成分微波辅助提取法达国际水平/研究发现增加食物中铜的摄入能治疗心脏病[期刊论文]-农业工程技术·农产品加工2007(3)
- 汤俊. 王峥涛. 张勉. 赤尾光昭. 中村憲夫. 服部征雄 Monocrotalic acid从脱氢野百合碱的释放及其鉴定[期刊论文]-中国药科大学学报2003, 34(6)
- 蒋娟娟. 徐德然. 濮社班. 马仁玲. JIANG Juan-juan. XU De-ran. PU She-ban. MA Ren-ling 菊三七地下部分的化学成分[期刊论文]-药学与临床研究2008, 16(3)
- 金鑫. Jin Xin 药用菊三七的HPLC指纹图谱[期刊论文]-中国野生植物资源2010, 29(5)
- 朱远平. Zhu Yuanping 微波辅助提取-紫外分光光度法测定柚皮中总黄酮含量[期刊论文]-饲料工业2007, 28(22)
- 赵永红. 苏肇仇. 张海波. 陈会文. 蒋祖明. 邹文艳 脱氢野百合碱诱导犬肺动脉高压模型的建立[期刊论文]-中华胸心血管外科杂志2005, 21(6)
- 冯秀琼. 汤庆勇 中草药中14种有机磷农药残留量同时测定—微波辅助提取法[期刊论文]-农药学学报2001, 3(3)
- 杨莉. 王春雨. 韩梅. 杨利民. YANG Li. WANG Chun-yu. HAN Mei. YANG Li-min 葵藜总黄酮和总皂苷提取工艺的优化[期刊论文]-吉林农业大学学报2009, 31(1)
- 梁云贞. 彭金云. 李怡. 梁海红 微波辅助提取山黄皮果中的黄酮类物质[期刊论文]-安徽农业科学2010, 38(14)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgys201012018.aspx