



红花及复方脑得生片中羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的药动学研究

汤建明, 欧阳臻*, 冯旭, 方静, 曹旭

(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的: 利用反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中羟基红花黄色素 A 的浓度, 分别比较红花提取物及复方脑得生片中羟基红花黄色素 A 的药代动力学参数差别, 探讨复方配伍对羟基红花黄色素 A 在大鼠体内药动学的影响。方法: 以相同剂量的羟基红花黄色素 A ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对大鼠分别灌胃给予红花药材提取物和复方脑得生片, 采用反相高效液相色谱法测定不同时间点血浆中羟基红花黄色素 A 的含量, 利用 3P97 软件处理数据, 进行药动学模型拟合并计算二者的药代动力学参数。结果: 羟基红花黄色素 A 血浆浓度在 $0.03 \sim 2.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 血浆中最低检测限和最低定量限分别为 $10, 30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。高、中、低浓度样品平均回收率分别为 $(99.3 \pm 1.4) \%$, $(92.8 \pm 1.8) \%$, $(98.4 \pm 2.0) \%$ 。大鼠灌胃给予红花提取物和脑得生片后的药-时曲线均符合二房室模型, 主要药动学参数 $\text{AUC}_{0 \sim t}$, $\text{AUC}_{0 \sim \infty}$, C_{max} 和 t_{max} 在红花提取物和脑得生片各组间均有显著性统计学意义。结论: 本实验建立的反相高效液相色谱测定法专属、准确、灵敏, 适用于羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的药动学研究。脑得生片中其他配伍药材可以促进羟基红花黄色素 A 的吸收, 提高羟基红花黄色素 A 的生物利用度。

[关键词] 羟基红花黄色素 A; 红花; 脑得生片; 药动学; 高效液相色谱法

脑得生片收载于《中国药典》2005 年版一部, 由三七、川芎、红花、葛根、山楂提取而成的中药复方制剂, 具有活血化瘀, 疏通经络之功效^[1]。临床主要用于淤血阻络所致的眩晕、中风, 症见肢体不用、言语不利及头晕目眩; 脑动脉硬化, 缺血性脑中风及脑出血后遗症。红花为处方中主药之一, 为活血化瘀中药, 现代医学中用于预防和治疗冠心病、心肌梗死和脑血栓等中老年疾病。研究表明, 羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 作为红花和脑得生片主要药效成分之一, 具有明显的抗凝、抗缺氧、降血压、改善心脑血管供血不足等作用^[2-4]。本课题组已研究了本复方中的葛根素和阿魏酸的药代动力学特征^[5-6], 为了进一步考察中药复方配伍的合理性, 本文以复方中 HSYA 为研究对象, 对其药动学特征做比较研究。目前, 关于 HSYA 单体和单味药材中 HSYA 的

药动学已分别有报道^[7-8], 而有关红花及其复方制剂中 HSYA 的药动学差异尚未见报道, 为了考察复方中 HSYA 的体内过程及其药动学参数是否受中药复方配伍的影响, 研究了大鼠口服红花药材提取物和复方脑得生片的药动学特征, 初步评价复方中其他中药配伍对 HSYA 药动学特征的影响, 以进一步探讨中药复方配伍的合理性。

1 材料

1.1 药物与试剂 羟基红花黄色素 A 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111637-200503); 红花提取物(自制同脑得生制备工艺, HPLC 测得提取液中 HSYA 为 $70.814 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$); 脑得生片(哈尔滨华雨制药集团有限公司, 批号 20060808, HPLC 测定 HSYA 为 $5.858 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 动物 清洁级 SD 雄性大鼠, 体重 $(320 \pm 20) \text{ g}$, 江苏大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK(苏) 2009-0002。

1.3 仪器 JASCO LC-1500 高效液相色谱仪(日本分光工业株式会社); N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); Sigma 高速离心机(美国 Sigma 公司); 微量移液器(Thermo Electron 公司); 1-2LD 冷冻干燥机(Marin Christ 公司)。

[稿件编号] 20100809008

[基金项目] 江苏大学高级专业人才科研启动基金项目(06JDG042)

[通信作者] * 欧阳臻, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新药研究及药动学研究, Tel: (0511) 88791564, E-mail: zhenouyang@ujs.edu.cn

[作者简介] 汤建明, 硕士研究生, Tel: (0511) 88791564, E-mail: tommysoup@126.com



2 方法

2.1 色谱条件 Kromasil-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-乙腈-0.7% 磷酸水溶液(26:2:72); 检测波长 403 nm; 流速 1 mL · min⁻¹; 柱温 40 °C; 进样量 20 μL。

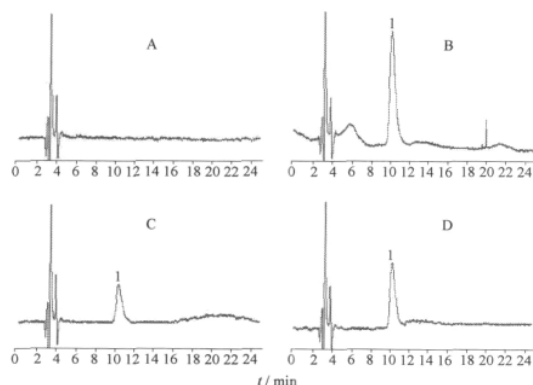
2.2 标准溶液的配制 精密称取 HSYA 对照品适量置 25 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 制得质量浓度为 0.1 g · L⁻¹ 的 HSYA 对照品溶液, 密封、低温避光保存备用。

2.3 血浆样品的预处理 精密吸取血浆 0.2 mL, 加 0.3 mL 甲醇沉淀蛋白, 涡流振荡 1 min, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 20 μL 进样。

2.4 药动学研究 取 SD 雄性大鼠 12 只, 随机平均分成 2 组, 每组 6 只, 给药前禁食 18 h, 自由饮水, 2 组分别灌胃给予红花提取物和脑得生片(给药剂量按 HSYA 算均为 50 mg · kg⁻¹), 并于给药前和给药后 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h 眼眶后静脉丛取血 0.5 mL, 置于肝素化的离心管中, 分离血浆, 置于 -20 °C 保存待测。

3 结果

3.1 色谱行为及专属性实验 空白血清、空白血清中加入 HSYA 对照品、灌胃红花提取物及灌胃脑得生片, 血浆样品色谱图见图 1。HSYA 与其他干扰组分分离效果良好, 无杂质峰干扰。在此色谱条件下, 血浆中 HSYA 的理论塔板数不低于 3 000, k_R 为 10.5 min 左右, 分离度均达到 1.5。



A. 空白血浆; B. 血浆中加入羟基红花黄色素 A 对照品;
C. 灌胃红花提取物后的血浆; D. 灌胃脑得生后的血浆;
1. 羟基红花黄色素 A。

图1 大鼠血浆样品的 HPLC 图

3.2 线性范围及灵敏度 精密吸取 HSYA 对照品溶液适量, 置于 1 mL 离心管中, 加入大鼠空白血浆 200 μL, 配制成 HSYA 质量浓度分别为 0.03, 0.05, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 和 2.56 mg · L⁻¹ 的系列血浆样本, 按 2.3 项制备系列对照品溶液, 并进行色谱分析, 以峰面积(A)对血药浓度(C)进行线性回归得 $A = 29.948C - 747.47$ ($r = 0.9994$), 血浆中 HSYA 在 0.03 ~ 2.56 mg · L⁻¹ 线性关系良好。按信噪比 S/N = 3 时为最低检测限(LOD), S/N = 9 时为最低定量限(LOQ), 得血浆中最低检测限和最低定量限分别为 10, 30 μg · L⁻¹。

3.3 精密度试验 精密吸取 200 μL 空白血浆置于 1 mL 离心管中, 15 份, 分成 3 组, 精密加入不同量的 HSYA 对照品, 使其分别为 0.05, 0.5, 1 mg · L⁻¹ 的血浆样品, 按 2.3 项下方法操作, 在 2.1 色谱条件下测定 HSYA 含量, 计算日内及日间精密度, 得日内平均 RSD 分别为 2.0%, 1.5%, 1.2%, 日间平均 RSD 分别为 3.7%, 2.3%, 2.5%。

3.4 回收率试验 按 3.3 项下分别配制 HSYA 质量浓度为 0.1, 0.5, 1 mg · L⁻¹ 的血浆样品, 按 2.3 项下方法操作, 在 2.1 色谱条件下测定 HSYA 含量, 计算回收率, 得低、中、高 3 种质量浓度的提取回收率分别为 98.4%, 92.8%, 99.3%, 其平均回收率均大于 90%, RSD 小于 2.0%, 符合药动学研究要求。

3.5 药代动力学参数 将测得的血药浓度数据用 3P97 药动学程序拟合计算, 结果表明红花提取物和脑得生片中的 HSYA 在大鼠体内的药代过程均符合二房室模型, 其平均药-时曲线见图 2, 主要药动学参数见表 1。

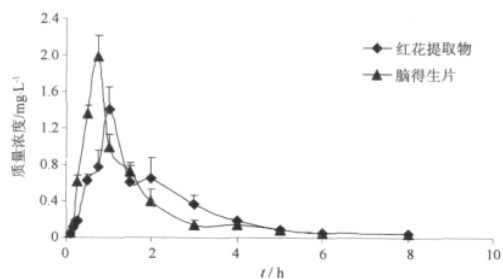


图2 羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的药-时曲线($n = 6$)

4 讨论

4.1 血浆样品的处理 本实验采用甲醇沉淀蛋白



表3 羟基红花黄色素A在大鼠体内的主要药动学参数($n=6$)

参数	红花提取物	脑得生
β/h^{-1}	0.60 ± 0.06	$0.11 \pm 0.11^{(2)}$
K_a/h^{-1}	1.22 ± 0.09	$1.76 \pm 0.18^{(1)}$
$t_{1/2\beta}/h$	1.18 ± 0.14	$0.19 \pm 0.20^{(3)}$
$t_{1/2k_a}/h$	0.57 ± 0.04	$0.40 \pm 0.04^{(2)}$
K_{21}/h^{-1}	1.40 ± 0.75	$0.18 \pm 0.20^{(2)}$
K_{10}/h^{-1}	0.59 ± 0.08	$1.66 \pm 1.93^{(2)}$
K_{12}/h^{-1}	0.083 ± 0.16	$1.98 \pm 2.57^{(3)}$
$AUC_{0-t}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	1.462 ± 0.545	$2.482 \pm 0.236^{(1)}$
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	1.598 ± 0.537	$2.595 \pm 0.235^{(1)}$
t_{max}/h	1.22 ± 0.04	$0.76 \pm 0.04^{(2)}$
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	0.554 ± 0.084	$0.711 \pm 0.086^{(1)}$

注:与红花提取物组比¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$ ³⁾ $P < 0.001$ 。

取上清过滤后直接进样,操作简单、快速、灵敏,内源性物质对测定的干扰较少,经方法学证实,此法灵敏度高、专属性强,符合红花提取物及脑得生复方中 HSYA 在大鼠体内的药动学分析方法的要求。

4.2 羟基红花黄色素A药动学特征 各时间点血药浓度数据经 3P97 药动学软件拟合分析后,大鼠分别灌胃红花提取物和脑得生后 HSYA 在大鼠体内的药动过程均符合二房室模型,其药动学参数经方差分析有显著性统计学差异。其中脑得生组的 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 明显高于红花提取物组 ($P < 0.05$),脑得生组的 T_{max} 显著高于红花提取物组 ($P < 0.01$)。张海防等^[7]研究表明,HSYA 在体内的绝对生物利用度仅为 1.4%,口服吸收较差,在胃肠道内有降解,有较强的胆汁排泄效应,本试验数据分析表明复方经过配伍后可能改变了其有效成分在体内的过程,促进了 HSYA 在大鼠体内的吸收,加快其吸收速率,提高了 HSYA 在大鼠体内的生物利用度;从 HSYA 药-时曲线还可看出,红花提取物组在 1.5~3 h 出现第 2 个吸收峰,这与张海防的研究结果基本相符,该学者研究表明此双峰现象并非胆汁排泄造成的,而本研究中脑得生片组未发生此双吸

收峰现象,可能是由于复方经过配伍后改善了胃肠道环境,加快了 HSYA 的吸收,减少了药物在胃肠道中的保持时间,此外,从药动学参数上看,脑得生片组的 t_{max} 、消除速率常数以及消除半衰期显著比红花提取物组短 ($P < 0.01$),显示口服复方脑得生片后其有效成分 HSYA 吸收加快,消除也加快。

中药复方成分在体内的变化是一个复杂的过程,复方配伍给药可能影响其他药物有效成分的吸收。脑得生片中 HSYA 的药动学行为与红花提取物中 HSYA 相比有较大差异,脑得生片中的其他配伍药材对其 HSYA 在体内的过程有较大影响,促进了 HSYA 在大鼠体内的吸收,提高了 HSYA 口服吸收的生物利用度,本实验研究结果为进一步探中药复方配伍应用的合理性提供了依据,但导致参数变化的机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 572.
- [2] 臧宝霞,金鸣,司南,等. 羟基红花黄色素A对血小板活化因子的拮抗作用[J]. 药学报, 2002, 37(9): 696.
- [3] Zhu H, Wang Z, Ma C, et al. Neuroprotective effects of hydroxy-safflor yellow A: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Med*, 2003, 69(5): 429.
- [4] Wei X, Liu H, Sun X, et al. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against is chemia-reperfusion injury by antioxidant action [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 386(1): 58.
- [5] 潘璐琳, 欧阳臻, 杨雨, 等. 葛根及复方中葛根素在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(9): 703.
- [6] 欧阳臻, 潘璐琳, 汤建明, 等. 阿魏酸、川芎及复方脑得生中阿魏酸在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 226.
- [7] 张海防, 郭健新, 黄罗生, 等. 羟基红花黄色素A在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 456.
- [8] Yu Zhiguo, Gao Xiaoxia, Yuan Hongxia, et al. Simultaneous determination of safflor yellow A, puerarin, daidzein, ginsenosides (R_{g1} , R_{b1} , R_d), and notoginsenoside R_1 in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 327.

Studies on pharmacokinetics of hydroxysafflor yellow A in *Carthamus tinctorius* and its compound preparation in rat

TANG Jianming, OUYANG Zhen*, FENG Xu, FANG Jing, CAO Xu
(College of Pharmaceutical, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for the determination of the concentration of hydroxysafflor yellow A in rat plasma, to study the pharmacokinetics of *Carthamus tinctorius* extraction and Naodesheng tablet, and to investigate the effect of other components on the pharmacokinetics of hydroxysafflor yellow A. **Method:** The rats were orally treated with *Carthamus tinctorius* extraction and Naodesheng capsule respectively. Blood samples were collected in heparinized eppendorf tube via the oculi chorioideae vein. Plasma was separated by centrifugation at $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 10 min, and two-times methanol in volume was added to deposit proteins. After centrifugation, the upper liquid was transferred to filter. The concentration of hydroxysafflor yellow A in serum was determined by RP-HPLC. The stationary phase was C_{18} , and methanol-acetonitrile-0.7% orthophosphoric acid (26:2:72) was taken as the mobile phase, A UV detector was used at 403 nm. The pharmacokinetic parameters were calculated with 3p97 program. **Result:** A good linear relationship of hydroxysafflor yellow A was obtained in the range of 0.03 and $2.56\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the lowest limit of determination was $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, and the lowest limit of quantitation was $30\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The mean recoveries were $(99.3 \pm 1.4)\%$, $(92.8 \pm 1.8)\%$, $(98.4 \pm 2.0)\%$ for high, middle, low concentrations of the samples respectively. The plasma concentration-time curves of hydroxysafflor yellow A were fitted with two-compartment model. The AUC_{0-4} , $\text{AUC}_{0-\infty}$, C_{\max} and T_{\max} of hydroxysafflor yellow A were increased in the Naodesheng group, compared with $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ *C. tinctorius* extract group. **Conclusion:** The HPLC method was selective, accurate and sensitive. The results indicated that the other herbs improved the absorption of hydroxysafflor yellow A and increased the bioavailability of hydroxysafflor yellow A significantly.

[Key words] hydroxysafflor yellow A; *Carthamus tinctorius*; Naodesheng tablet; pharmacokinetics; RP-HPLC

doi: 10.4268/cjcm20111621

[责任编辑 张宁宁]