References

[1] Wei L, Yang Y, Yu Q. Tyrosine kinase-dependent PI3-kinase and mitogen-activated protein-kinase-independent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma anoikis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 2439-2444.

[2] Zhou Z H, Song M Z, Yu E X, *et al*. Progress on apoptosis induction of cancer cells by Chinese traditional herbs [J]. *Foreign Med Sci—Tradit Chin Med* (国外医学·中医中药分册), 1998, 20(3): 3-6.

[3] Sun Z G, Zhao W Z, Lu Y, *et al*. Inhibitory effects of proanthocyanidins from the seed of *Vitis vinifera* on forming of micronucleus of mouse bone marrow polysomic red blood cells induced by cyclophosphamide and study of its mechanism [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(5): 386-387.

[4] Ye X, Krohn R L, Liu W, *et al*. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 196(1-2): 99-108.

[5] Sen C K, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 216(1-2): 1-7.

红花黄色素 A在大鼠体内的药动学研究

刘月庆,李 康,毕开顺*

(沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 目的 研究红花黄色素 A在大鼠体内的药动学。方法 建立 RP-HPLC法定量测定大鼠血浆中红花黄色素 A含量。色谱条件: 色谱柱为 Hypersil ODS2柱(200 mm× 4.6 mm, 5μm);流动相为甲醇-0.2% 乙酸水溶液(24∶76);流速为 0.8 mL/min;核黄素为内标;检测波长为 410 nm 健康大鼠禁食 24 h后,尾 iv红花黄色素 A生理盐水溶液,测定不同时间的血药浓度。用 3P87药动学程序对血药浓度-时间数据进行拟合。结果 大鼠 iv红花黄色素 A后,其主要药动学参数为: V_c(0.30± 0.04) L/kg, CL (1.12± 0.33) mL/mim, K_e(0.91± 0.19) h^{-1}, $t_{1/2}$ (0.76± 0.10) h,曲线下面积 AUC (24.97± 4.83) (μg·h)/mL。结论 红花黄色素 A在大鼠体内呈一室开放模型,进入体内迅速分布,代谢消除也较快。

关键词: 红花黄色素 A; 反相高效液相色谱; 药动学

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)08-0000-00

Pharmacokinetics of safflower yellow A in rats *in vivo*

LIU Yue-qing, LI Kang, BI Kai-shun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract **Object** To study the pharmacokinetics of safflower yellow A, a major ingredient in the crude drug of *Carthamus tinctorius* L., in rats *in vivo*. **Methods** RP-HPLC method was set up used to determine the content of safflower yellow A in plasma of rat. The chromatographic condition included Hypersil ODS2 column (200 mm× 4.6 mm, 5μm); the mobile phase consisting of methanol-0.2% acetic acid (24∶76); the flow rate at 0.8 mL/min; the detective wavelength at 410 nm. Riboflavin was used as internal standard. Safflower yellow A was injected into the rats through caudal vein, and its concentrations at different time were determined in healthy rat after 24 h fasting. The data were processed with the software 3P87. **Results** The primary pharmacokinetic parameters were V_c (0.30± 0.04) L/kg, CL (1.12± 0.33) mL/min, K_e (0.91± 0.19) h^{-1}, $t_{1/2}$ (0.76± 0.10) h, AUC (24.97± 4.83) (μg·h)/mL, respectively in iv safflower yellow A to the rats. **Conclusion** The safflower yellow A in rats is fited to one-compartment model, and it is distributed and eliminated quickly.

Key words safflower yellow A; RP-HPLC; pharmacokinetics

红花系菊科红花属红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,是活血化瘀的传统中药。其活血通经、祛瘀止痛功效在中药中具有一定的代表性。在现代医学中是预防和治疗冠心病、心肌梗死和脑血栓等中老年疾病的重要中药。研究表明,红花中起活血化瘀作用的主要成分是红花黄色素[1,2]。红花黄色素的

* 收稿日期: 2002-11-29

作者简介: 刘月庆(1973-),男,安徽怀宁人,沈阳药科大学药物分析专业 2000级研究生,研究方向: 中药质量标准化研究。

* 通讯作者 Tel (024) 2384371-3363 E-mail: ksbi@mail.sy.ln.cn

主要成分为红花黄色素 A (safflower yellow A)[3,4]。近年来,国内外学者曾用分光光度法对红花黄色素在小鼠体内的分布特征和家兔体内药动学进行探讨[5,6]。红花黄色素 A的药动学研究未见报道。本实验建立了 RP-HPLC法测定大鼠血浆中红花黄色素 A的浓度,并对红花黄色素 A在大鼠体内的变化过程及特征进行初步探讨。

1 仪器与材料

1.1 仪器: 岛津 LC-10AD型高效液相色谱仪; SPD-10A型紫外检测器; C-R6A色谱积分记录仪; BP210S电子天平; 800型离心沉淀器; CAY-1型液体快速混合器。

1.2 材料: 红花黄色素 A对照品从红花中分离提纯得到,经核磁、质谱鉴定为红花黄色素 A,纯度> 98.0%。甲醇为色谱纯,水为重蒸水,乙酸为分析纯,内标物核黄素为分析纯。

1.3 动物: 健康 Wistar大鼠,雌雄兼用,体重 225~ 270 g,沈阳药科大学实验动物中心提供。

1.4 溶液制备

1.4.1 内标溶液的制备: 精密称取核黄素 7.2 mg,置 50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。精密吸取 10 mL,置 50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得内标物溶液。

1.4.2 红花黄色素 A系列对照品溶液的制备: 精密称取红花黄色素 A对照品 8.9 mg,置 50 mL量瓶中,加 60% 甲醇溶解并稀释至刻度。再分别精密吸取 0.25, 0.5, 1, 2.5, 8和 20 mL,置 50 mL量瓶中,加 60% 甲醇稀释至刻度,即得浓度分别为 0.89, 1.78, 3.56, 8.90, 28.48, 71.20 μg/mL的红花黄色素 A系列对照品溶液。

1.4.3 红花黄色素 A注射剂的配制: 精密称取红花黄色素 A适量,加生理盐水溶解,配成浓度为 0.84 mg/mL红花黄色素 A生理盐水溶液。

2 方法

2.1 给药方案: 大鼠禁食 24 h (不禁水),尾 iv红花黄色素 A注射液,剂量 6.72 mg/kg (剂量选择依据: 以正常人的用量换算成大鼠的给药剂量)。

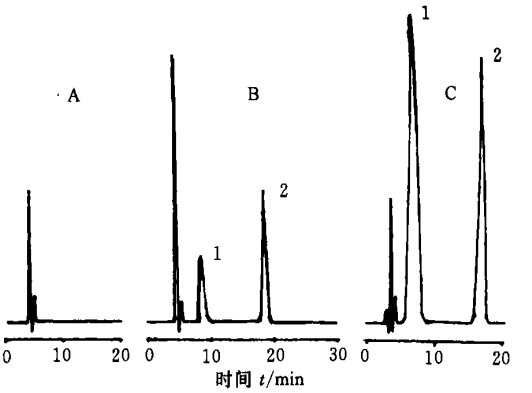
2.2 采样时间: 大鼠 iv后,分别在 5, 10, 20, 50, 90, 150和 240 min,眼眶取血 0.6 mL, 4 000 r/min离心 10 min,取上层血清 0.3 mL,冷冻保存,待测。

2.3 色谱条件: 色谱柱: Htypersil ODS2柱 (200 mm× 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.2% 乙酸水溶液 (24∶ 76);流速: 0.8 mL/min;检测波长: 410 nm;柱温: 25℃;内标物: 核黄素。

2.4 血浆样品处理: 精密吸取肝素抗凝血浆 200 μL于 10 mL尖底离心管中加入 60% 甲醇 100 μL,内标溶液 50 μL和甲醇 0.5 mL,涡旋 2 min, 4 000 r/min离心 10 min,精密吸取上清液 0.5 mL,置另一 10 mL尖底离心管中,于 60℃ 水浴中氮气吹干,残渣加水 200 μL,超声溶解 30 s,涡旋混合 1 min,取 20 μL,注入色谱仪。

2.5 系统适用性试验: 在上述色谱条件下,红花黄色素 A和内标物核黄素分离度大于 2,理论塔板数按红花黄色素 A计算大于 4 500。

2.6 方法选择性试验: 通过大鼠的空白血浆色谱图、空白血浆中加入红花黄色素 A和内标物核黄素后得到的色谱图和给药后大鼠血浆色谱图进行比较,在选定的色谱条件下,血浆内源性物质对红花黄色素 A和内标物核黄素无干扰。见图 1。



1-红花黄色素 A 2-内标物

1-safflower yellow A 2-internal standard

A-空白血浆 B-空白血浆+ 红花黄色素 A+ 内标物 C-大鼠血浆

A-blank plasma B-blank plasma+ safflower yellow A+ internal standard C-plasma sample of rats

图 **1** 大鼠血浆中红花黄色素 **A**的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of safflower yellow A in rat plasma

2.7 标准曲线的建立: 取大鼠空白血浆 200 μL,红花黄色素 A系列对照品溶液各 100 μL,配制成 0.45, 0.89, 1.78, 4.45, 14.24, 35.60 μg/mL的对照品溶液,除不加 60% 甲醇外,其余按"血浆样品处理"项下依法操作,建立标准曲线。上述系列对照品溶液的每个浓度平行进行 6个样品的分析,重复进行 3个分析批。分别将红花黄色素 A与内标物核黄素峰面积比对待测物浓度进行加权回归计算,即得标准曲线方程。本法在 0.45~ 35.60 μg/mL线性关系良好,线性回归方程 $Y = 0.218\,1X + 0.024\,7$, $r = 0.999\,6$。

2.8 准确度与精密度试验: 取空白血浆,按 2.7项

方法操作,分别制成高、中、低 3个浓度 (0.89, 4.45, 35.60 μg/mL) 的质量监控样品,每个浓度 6份,依法测定。重复 3个分析批,并与标准曲线同批进行测定,以当日的标准曲线计算样品浓度,求得方法的准确度与精密度,结果见表 1。

表 1 红花黄色素 A在血浆中精密度和准确度试验结果

Table 1 Precision and accuracy for determination of safflower yellow A in plasma

加药浓度 /(μg·mL⁻¹)	测定浓度 /(μg·mL⁻¹)	相对误差 /%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
0.89	0.86	-3.4	6.5	8.5
4.45	4.37	-1.9	5.4	6.1
35.60	35.94	1.0	3.3	4.0

2.9 回收率试验:取 2.8项中质量监控样品的色谱图中红花黄色素 A与内标物核黄素的峰面积,与相同浓度未经处理的标准溶液色谱图中红花黄色素 A与内标物核黄素峰面积相比较,求得绝对回收率,见表 2。

表 2 红花黄色素 A在血浆中提取回收率试验结果

Table 2 Extract recovery of safflower yellow A in plasma

组份	加药浓度 /(μg·mL⁻¹)	回收率 /%	RSD/%
红花黄色素 A	0.89	78.4	9.6
	4.45	79.6	2.9
	35.60	80.5	3.2

3 结果

实验中所得红花黄色素 A在大鼠体内的血药浓度-时间曲线,见图 2。用 3P87药动学程序对血药浓度-时间数据进行拟合,表明大鼠在尾 iv红花黄色素 A后,其血药浓度随时间变化符合一室开放模型,主要药动学参数为: V_c (0.30±0.04) L/kg, CL (1.12±0.33) mL/min, K_e (0.91±0.19) h^{-1}, $t_{1/2}$ (0.76±0.10) h,曲线下面积 AUC (24.97±4.83) (μg·h)/mL。

4 讨论

4.1 红花黄色素 A在大鼠体内呈一室开放模型,进入体内迅速分布,代谢消除也比较快,其生物半衰期为 45 min。

4.2 红花黄色素 A的极性大,在甲醇中溶解度较小,为兼顾提高沉淀蛋白效率,故选用 60% 甲醇配制标准溶液。另外,笔者比较了乙醇、乙腈、丙酮、甲醇等溶剂沉淀蛋白的效果。发现乙醇、丙酮处理样品,回收率低于 75%;乙腈与甲醇效果接近,从成本及毒性方面考虑,选用甲醇。

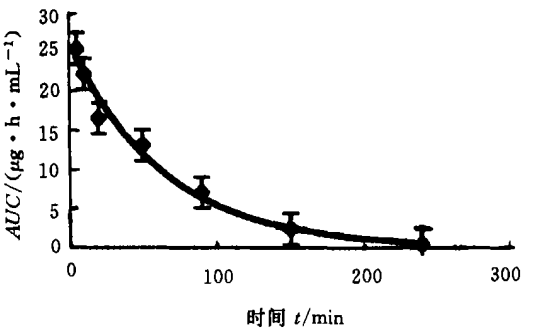


图 2 红花黄色素 A在大鼠体内的血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Blood concentration-time curve of safflower yellow A in rats *in vivo*

4.3 本方法准确、专属性强、简单易行。样品处理直接用甲醇沉淀蛋白,不需分离提取。进样前溶解样品的溶剂对红花黄色素 A的峰形有较大影响,用甲醇溶解样品,色谱峰前延变宽,用流动相溶解样品也有一定影响,用水溶解则峰形较好,其原因可能是红花黄色素 A在甲醇溶液中与甲醇生成缀合物,从而影响峰形。

References:

[1] Wang Y P, Qiao J, Qian Z X, *et al*. Studies on effect of safflower to protect ischemia of myocardium and antioxidation [J]. *Chin J Thorac Cardiovasc Surg* (中华胸心血管外科杂志), 1995, 11(3): 176-178.

[2] Huang Z L, Gao Q M, Cui Z M, *et al*. Pharmacological study on safflower yellow from safflower [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(4): 188-189.

[3] Takahashi Y, Miyassaka N, Tasaka S H, *et al*. Constitution of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1982, 23(49): 5163-5166.

[4] An X Q, Li Y H, Chen J. Separation and identification of safflower yellow A and carthamin from *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(4): 188-189.

[5] Yang Z F, Wen A D, Jiang Y P, *et al*. Distributive character of safflower yellow in tissues of mice [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2001, 22(14): 1301-1302.

[6] Cao W, Li J S, Song Y Q, *et al*. Pharmacokinetics of safflower yellow A in rabbits [J]. *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医学院学报), 2002, 25(1): 53-54.

热烈庆祝《中草药》杂志
荣获第 2届国家期刊奖