

大鼠口服红花水提物和红花黄色素后 羟基红花黄色素 A 的排泄研究*

□张朝阳** 盛或欣 李 翼 张金兰**

(中国医学科学院药物研究所 北京 100050)

于治国 (沈阳药科大学药学院 沈阳 110016)

摘 要:建立简便的高效液相色谱法(HPLC)测定大鼠口服红花水提物和红花黄色素后尿、粪和胆汁中主要活性成分羟基红花黄色素 A (HSYA) 的含量。色谱柱为 Hypersil BDS-C18 (250 × 4.6mm, 5μm), 流动相为乙腈-0.3%冰醋酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 320nm, 葛根素或对羟基苯甲醛为内标。尿、粪和胆汁中的 HSYA 的日内精密度小于 3.1%, 日间精密度小于 5.8%。提取回收率为 79.2% ~ 102.1%。该方法首次研究了大鼠口服红花水提物和红花黄色素后羟基红花黄色素 A 的排泄情况。

关键词:红花水提物 红花黄色素 羟基红花黄色素 A HPLC 排泄

一、概 述

红花系菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥管状花, 其药用历史已长达 2100 多年^[1]。具有活血祛瘀, 通经止痛之功效。现代药理学研究表明红花中主要药效部位水溶性红花黄色素具有扩张冠脉, 抗氧化, 保护心肌和免疫抑制等多种药理作用^[2-7], 现今红花的多种制剂已用于治疗 and 预防冠心病、心肌梗死和脑血栓等临床常见疾病。水溶性红花黄色素是红花水提物的有效部位, 其主要药效成分为羟基红花黄色素 A (HSYA)^[8-9], 目前关于红花体内过程的研究主要

集中红花黄色素或 HSYA 静脉给药后的研究^[10-14]。红花是以口服为主的常用中药, 研究其口服后的体内过程更为重要, 本文比较研究了大鼠口服红花水提物及红花黄色素后, 其主要有效成分羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的排泄情况。

二、实验部分

1. 试药

红花药材购自新疆禾田, HSYA 对照品由本实验室提取分离纯度 > 97% (图 1), 内标葛根素购自中国药品生物制品检定所, 对羟基苯甲醛购自北京旭东化工厂 (纯度 ≥ 97%)。HPLC 级甲醇、乙腈均购自美国 (Burdick & Jackson), 去离子水经过 Milli-Q 系统纯化,

收稿日期: 2006-12-08

修回日期: 2006-12-18

* 科技部新技术新方法的研究 (Ke2004-03): 羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的代谢研究, 负责人: 张金兰。

** 联系人: 张金兰, 副研究员, 主要从事药物分析和药物代谢的研究, Tel: 010-83154880, E-mail: zhjl@imm.ac.cn。张朝阳, 中国医学科学院药物研究所, 沈阳药科大学药学院。

Supelclean - ENVI-18 固相萃取小柱(500mg/3ml)购自美国 Supelco 公司, AmberliteTMXAD16 大孔吸附树脂购自美国罗门哈斯公司。

2. 色谱条件和仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配有四元泵、自动进样器及二极管阵列检测仪, 色谱柱为 Hypersil BDS-C18 柱(250 × 4.6mm, 5μm), 流动相: 乙腈 - 0.3% 冰醋酸水溶液(0min, 2:98; 20min, 10:90; 25min, 17:83; 30min, 2:98), 流速: 1.0mL/min, 检测波长: 320nm, 柱温: 25℃, 进样体积: 10μL。

3. 红花水提物和红花黄色素的制备

称取 1.0kg 红花的干燥花, 分别以 8000mL、6000mL、6000mL 冷水浸提 3 次, 每次 12h, 过滤后合并滤液, 浓缩至 2000mL, 以 80% 醇度醇沉过夜, 滤液浓缩得红花水提物。取红花水提物经大孔吸附树脂柱层析, 用水洗脱, 水洗部分冷冻干燥得红花黄色素(含 HSYA 60.9%)。

4. 溶液制备

(1) 内标溶液的制备。

精密称取内标 5.0mg, 置 5mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成 1.0mg/mL 的内标溶液。

(2) HSYA 对照品溶液的制备。

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品 5.0mg, 置 1mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 配制成 5.0mg/mL 的 HSYA 储备液, 并以 50% 甲醇溶液将储备液稀释成一系列的工作溶液。

(3) 红花水提物和红花黄色素口服溶液的制备。

精密称取红花水提物和红花黄色素适量, 加水溶

解, 配制含 HSYA 浓度约为 30mg/mL 的口服溶液, 供大鼠灌胃用。

5. 标准溶液和质控样品的制备

分别在空白生物样品中加入不同浓度的 HSYA 工作溶液, 按样品前处理方法操作, 得到一系列适宜浓度范围的标准生物样品(尿样和粪样 4.8 - 192.1μg/mL, 胆汁 2.4 - 95.5μg/mL)。质控样品也按上述操作配制成高, 中, 低三种浓度的分析样品。

6. 实验动物及生物样品的收集

取 Wistar 雄性大鼠 200g ± 10g(中国医学科学院实验动物繁殖场)24 只, 给药前禁食 12h, 自由饮水, 612 只用于收集尿样及粪样, 12 只麻醉后进行胆插管收集胆汁, 按 HSYA 100mg/kg 剂量给予红花水提物和红花黄色素, 灌胃后按时间段收集 60h 内尿样、粪样和胆汁并贮存于 -10℃ 的冰箱, 待测。

7. 生物样品的处理

(1) 尿样的处理。

1mL 尿样加入 3mL 甲醇和 10μL 葛根素内标溶液, 涡旋 3min, 在 4500rpm 下离心 10min。取上清液在常温减压下蒸干, 残渣溶于 150μL 水中。溶液上 SPE 固相萃取小柱, 上样前用 5mL 甲醇活化再用 5mL 水平衡。先用 1mL 水洗除杂, 再用 50% 甲醇洗脱并收集馏分。馏分在常温下减压蒸干, 最后溶于 1mL 的 50% 甲醇水溶液中, 过滤后以 10μL 进 HPLC 分析。

(2) 粪样的处理。

将收集到的粪样称重, 加入 10 倍体积的水研磨, 在 4500rpm 下离心 10min。取上清液 1mL, 加入 3mL 乙腈和 10μL 葛根素内标溶液, 涡旋 3min, 在 4500rpm 下离心 10min。取上清液在常温减压下蒸干后溶于 1mL 的 50% 甲醇水溶液中, 过滤后以 10μL 进 HPLC 分析。

(3) 胆汁样品的处理。

0.5mL 胆汁加入 1.5mL 乙腈和 10μL 对羟基苯甲醛内标溶液, 涡旋 3min, 在 4500rpm 下离心 10min。取上清液在常温减压下蒸干后溶于 1mL 的 50% 甲醇水溶液中, 过滤后以 10μL 进 HPLC 分析。

三、结 果

1. 色谱分离条件

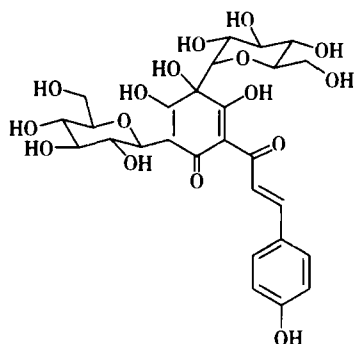


图 1 羟基红花黄色素 A 的结构式

HSYA 为水溶性成分极性较大,采用梯度洗脱并在流动相中添加适量冰醋酸使其与生物基质中的内源性物质达到完全分离。HSYA 为一醌形查耳酮类化合物,其紫外吸收光谱最大吸收峰在 230,320 和 400nm 处,由于 230 和 400nm 处无法选择合适的内标物并且会有杂质和内源性物质的干扰,选择 320nm 作为检测波长。并且由于内源性物质的干扰,无法选择一种合适的内标物用于测定几种生物样品,因此测定尿样和粪样时使用葛根素作内标,测定胆汁样品时使用对羟基苯甲醛作内标。

由于尿样中有较多内源性物质的干扰,采用有机溶剂沉淀与固相萃取相结合的手段以获得较好的选择性,而其余生物样品仅采用有机溶剂沉淀蛋白法就可得到较好的分离。

2. 方法确证

(1) 方法专属性。

通过大鼠的空白生物样品色谱图,空白生物样品中加入 HSYA 和内标物的色谱图及给药后生物样品色谱图进行比较,在选定的色谱条件下,生物样品内源性物质对 HSYA 和内标物测定无干扰,见图 2 - 图 4。

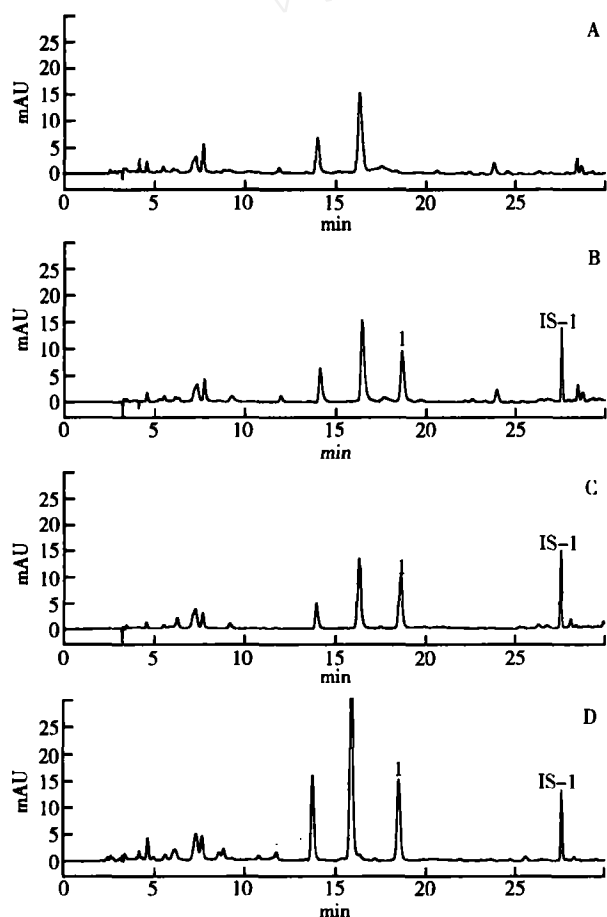


图 2 大鼠尿样的 HPLC 色谱图

- (A) 空白尿样 (B) 空白尿样 + HSYA (1) + 内标 (IS-1)
(C) 大鼠口服红花水提物后 2-4h 尿样图
(D) 大鼠口服红花黄色素后 2-4h 尿样图

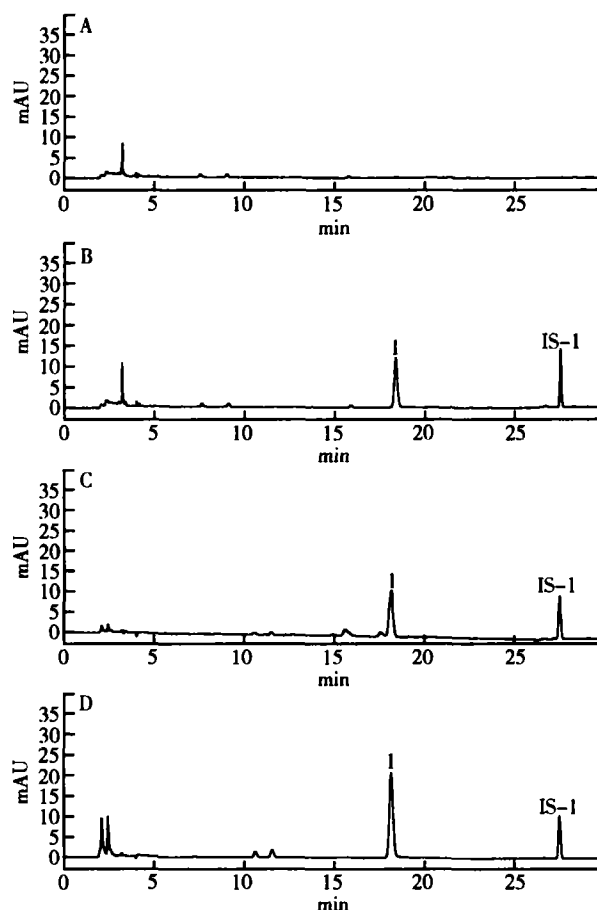


图 3 大鼠粪样的 HPLC 色谱图 (A) 空白粪样

- (B) 空白粪样 + HSYA (1) + 内标 (IS-1)
(C) 大鼠口服红花水提物后 2-4h 粪样图
(D) 大鼠口服红花黄色素后 2-4h 粪样图

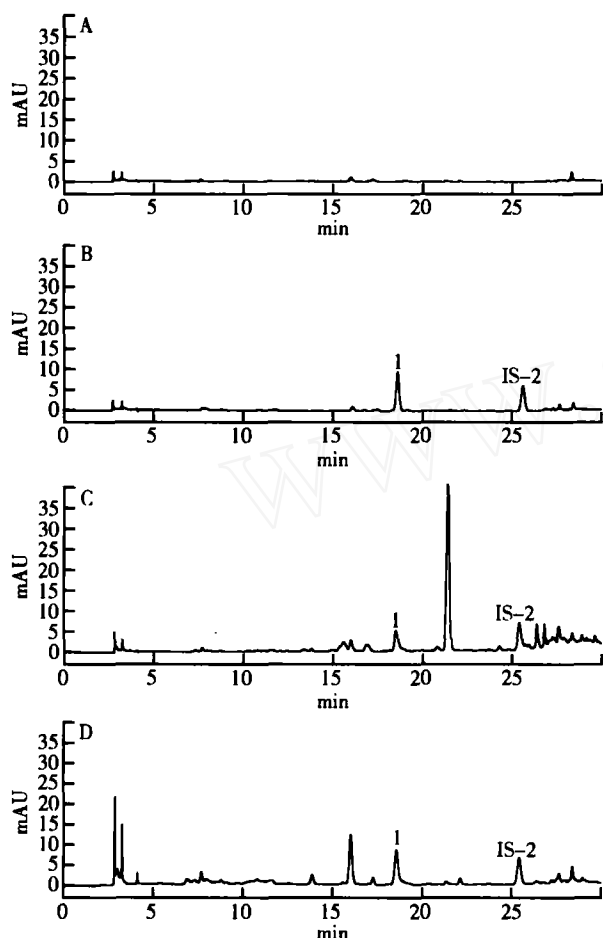


图4 大鼠胆汁样品的HPLC色谱图

(A) 空白胆汁样品 (B) 空白胆汁样品 + HSYA(1) + 内标 (IS-2) (C) 大鼠口服红花水提物后 2-4h 胆汁样品图 (D) 大鼠口服红花黄色素后 2-4h 胆汁样品图

(2) 最低检测限 (LOD) 测定。

取 HSYA 对照品溶液, 用 50% 甲醇水溶液将其稀释成一系列浓度的溶液, 按 HPLC 条件分析, 记录各浓度样品每次测定得到的药物信号强度与噪音的比值, 信噪比为 3 时最低检测限为 0.75 ng。

(3) 标准曲线的建立。

分别取各生物样品精密加入不同浓度的 HSYA 对照品溶液, 按“生物样品的处理”操作, 以 HSYA 与内标峰面积的比值对 HSYA 浓度作图, 求得 r 值及直线回归方程 $y = ax + b$, 结果见表 1。

表1 HSYA 在生物样品中的标准曲线

生物样品	标准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	r^2	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
尿	$y = 0.0704x - 0.021$	4.8 - 192.1	0.9999	4.8
粪	$y = 0.0642x + 0.1148$	4.8 - 192.1	0.9998	4.8
胆汁	$y = 0.0543x + 0.0096$	2.4 - 95.5	0.9999	2.4

(4) 日内日间精密度。

取高、中、低 3 个浓度的质控样品, 按上述 HPLC 分析方法, 连续进样 6 次测定日内精密度, 连续 5 日测定日间精密度。胆汁质控样品, 连续 3 日测定日间精密度, 结果见表 2。

(5) 提取回收率。

配制高、中、低 3 个浓度的质控样品各 6 份, 通过比较空白生物样品中添加被测药物并经样品前处理后的检测信号与未经提取处理的相应浓度的标准溶液的检测信号比较, 计算回收率, 结果见表 3。

表2 HSYA 在生物样品中的日内日间精密度

生物样品	加入浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度 ($n=6$)			日间精密度 ($n=3$ or 5)		
		测得浓度 $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	准确度 (%)	测得浓度 $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	准确度 (%)
尿	4.8	4.9 ± 0.2	3.1	102.1	4.9 ± 0.2	4.0	102.1
	24.0	23.8 ± 0.4	1.6	99.2	23.5 ± 0.4	1.7	97.9
	192.1	192.3 ± 1.0	0.5	100.1	193.7 ± 1.1	0.6	100.8
粪	4.8	3.9 ± 0.0	0.9	81.3	3.8 ± 0.1	3.5	79.2
	24.0	24.6 ± 0.3	1.2	102.5	24.2 ± 0.3	1.1	100.8
	192.1	191.1 ± 3.0	1.6	99.5	195.0 ± 2.2	1.2	101.5
胆汁	2.4	2.8 ± 0.0	0.9	116.7	2.8 ± 0.1	3.9	116.7
	24.0	25.8 ± 0.2	0.9	107.5	23.0 ± 1.3	5.8	95.8
	95.5	95.8 ± 1.7	1.7	100.3	92.3 ± 2.6	2.9	96.6

表3 HSYA在生物样品中的提取回收率

生物样品	加入浓度($\mu\text{g/mL}$)	测得浓度 $\pm$ SD($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)	RSD(%)
尿	4.8	4.9 ± 0.2	102.1	3.6
	24.0	23.6 ± 0.5	98.3	2.8
	192.1	191.6 ± 1.1	99.7	0.6
粪	4.8	3.8 ± 0.05	79.2	1.3
	24.0	24.4 ± 0.05	101.7	0.2
	192.1	190.1 ± 1.8	99.0	0.9
胆汁	2.4	2.1 ± 0.1	87.5	3.3
	24.0	23.1 ± 0.1	96.3	0.5
	95.5	85.2 ± 5.2	89.2	6.0

3. 尿、粪、胆汁中的测定结果

大鼠口服红花水提物后 60h ($n=6$), HSYA 在尿、粪、胆汁中的累积排泄率分别为 2.8%、26.4%、0.39%, 口服红花黄色素后 60h ($n=6$), HSYA 在尿、粪、胆汁中的累积排泄率分别为 2.6%、35.0%、0.68%, 大鼠口服红花水提物在胆汁中发现一个代谢物, 累积排泄率曲线如图 5 - 图 7 所示。

四、结论与讨论

实验结果表明大鼠口服红花水提物或红花黄色素后, HSYA 在尿和粪中的排泄趋势基本一致, 胆汁中排泄率很低, 粪中排泄率最高。口服红花黄色素后 HSYA 在粪中排泄率高于口服红花水提物, 而对大鼠口服红花水提物或红花黄色素后血浆中 HSYA 的测定

结果表明, HSYA 的吸收红花水提物好于红花黄色素, 同时对大鼠小肠内容物的测定结果还表明其中含有大量未被吸收的 HSYA, 且 HSYA 的含量红花水提物小

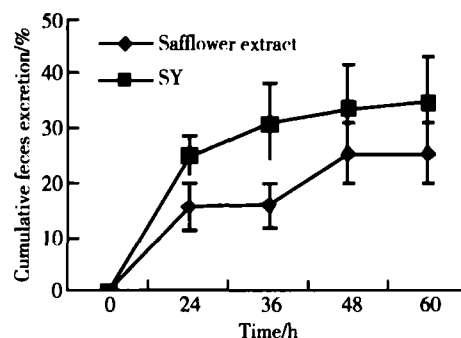


图6 大鼠口服红花水提物或红花黄色素后 HSYA 在粪中累积排泄率

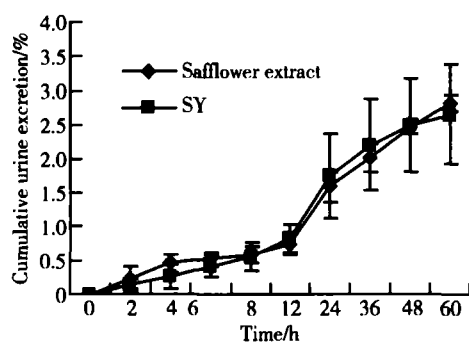


图5 大鼠口服红花水提物或红花黄色素后 HSYA 在尿中累积排泄率

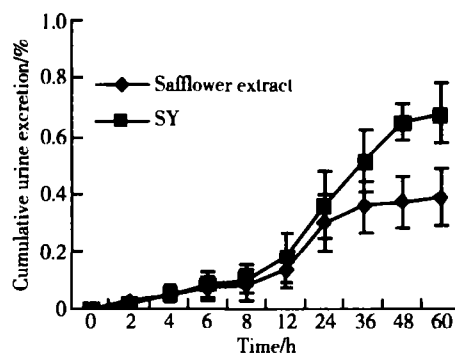


图7 大鼠口服红花水提物或红花黄色素后 HSYA 在胆汁中累积排泄率

于红花黄色素,更进一步说明粪中药物浓度高的原因可能是未被吸收的原型药物。

本实验首次采用 HPLC - UV 的方法测定大鼠口服红花水提物和红花黄色素后尿、粪及胆汁中 HSYA 的排泄量。样品处理过程简便,方法专属,灵敏可靠,为传统中药红花的药代动力学研究提供实验数据,同时也为红花的新药开发提供一定的理论基础。

参考文献

- 1 黄泰康,丁志遵,赵守训. 现代本草纲目,中国医药科技出版社. 2001.
- 2 安照强,李燕虹,陈杰,等. 红花中黄色素和红色素的分离鉴定. 中草药,1990,21(4):44-45.
- 3 金鸣,李金荣,蔡亚欣,等. 红花水溶性成分抗氧化作用的研究. 心肺血管病杂志,1998,17(4):277-279.
- 4 陈文梅,金鸣,李金荣,等. 红花黄色素对羟自由基损伤抗凝血酶Ⅲ的保护作用. 心肺血管病杂志,1998,17(3):215-217.
- 5 陈文梅,金鸣,吴伟,等. 红花黄素抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用的研究. 中国药学杂志,2000,35(11):741-744.
- 6 陆正武,刘发,胡坚,等. 红花总黄酮对免疫功能的抑制作用. 中国药理学报,1991,12(6):537-542.
- 7 刘发,魏苑,杨新中,等. 红花黄色素对高血压大鼠的降压作用及对肾素-血管紧张素的影响. 药理学报,1992,27(10):785-787.
- 8 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. 药理学报,2002,37(9):696-699.
- 9 Meswlhy M R, Kadota S, Momose Y, et al. Two New Quinochalcone Yellow Pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca^{2+} Antagonistic Activity of Tinctormine [J]. Chem Pharm Bull, 1993, 41(10):1796-1802.
- 10 刘月庆,李康,毕开顺. 红花黄色素 A 在大鼠体内的药代动力学. 中草药,2003,34(8):725-727.
- 11 刘月庆,周海涛,毕开顺. 红花黄色素 A 在小鼠体内分布研究. 药理学报,2004,39(3):217-219.
- 12 熊全美,刘英,等. 羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的药物动力学的研究. 中国医药工业杂志,2004,35(4):228-229.
- 13 杨志福,文爱东,蒋永培,等. 红花黄色素在小鼠组织中的分布特征. 第四军医大学学报,2001,22(14):1301-1303.
- 14 Chu DF, Liu WH, Huang Z, Liu SS, Fu XQ and Liu K. Pharmacokinetics and excretion of hydroxysafflor yellow A, a potent neuroprotective agent from safflower, in rats and dogs. Planta Med 2006; 72:418-423.

An Analysis of Hydroxysafflor Yellow A Excretion of Rats After Oral Administration of Safflower Extracts and Safflor Yellow*

Sheng Yuxin, Li Yi, Zhang Jinlan**

Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine,
Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union
Medical College, Beijing 100050, P. R. China

Zhang Zhaoyang, Yu Zhiguo

Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning Province, P. R. China

In this study, a simple and reproducible high-performance liquid chromatography (HPLC) method was employed to determine hydroxysafflor yellow A (HSYA) in rat urine, feces and bile, after an oral administration of safflower extracts and safflor yellow. HPLC was performed on a Hypersil BDS-C18 column, with a gradient elution system that is made up of acetonitrile and aqueous acetic acid. Ultraviolet detection was performed at 320 nm, with puerarin and p-Hydroxybenzaldehyde as the internal standard (IS). The intra-day and inter-day precision were registered less than 3.1% and 5.8% respectively, and the extract recovery ranged between 79.2% - 102.1% in urine, feces and bile. The effort makes the first instance of using HPLC method to work on the excretion rates of HSYA in rat urine, feces and bile, after an oral administration of safflower extract and safflor yellow.

Keywords: Safflower extracts, safflor yellow, hydroxysafflor Yellow A, HPLC, excretion

(责任编辑:王 瑀, 责任编辑:张志华, 责任译审:邹春申)