

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00458

## 苏木对羟基红花黄色素 A 在寒凝血瘀大鼠体内药代动力学的影响

徐 宁<sup>1</sup>,董娟妮<sup>1</sup>,吴一振<sup>1</sup>,陈向梅<sup>1</sup>,夏 丽<sup>1</sup>,彭莉蓉<sup>2</sup>,于 洁<sup>1</sup>,廖 莎<sup>1</sup>,刘勤社<sup>1,3</sup>,郑晓晖<sup>1,4\*</sup>

1. 西北大学生命科学学院中药学系,西安 710069

2. 西安市中心医院药剂科,西安 710086

3. 陕西省人民医院,西安 710068

4. 深圳创新中药及天然药物联合研究实验室,深圳 518057

**[摘要]** **目的** 建立寒凝血瘀大鼠体内羟基红花黄色素 A(HSYA)的反相高效液相色谱分析方法,研究苏木对 HSYA 在寒凝血瘀模型大鼠体内药代动力学(药动学)的影响。**方法** 寒凝血瘀模型大鼠 12 只,随机分为 2 组,分别灌服红花单煎液和红花-苏木合煎液,于给药后 5、10、20、30、45、60、90、120、150、210、270 min 眼底静脉丛取血,20%三氯乙酸水溶液沉淀蛋白,采用 RP-HPLC 法检测给药不同时间后大鼠血浆中 HSYA 的浓度,DAS 2.0 药动学软件计算药动学参数。**结果** 与红花单用组相比,红花与苏木配伍后,大鼠血浆中 HSYA 的药时曲线下面积  $AUC_{(0-t)}$  和峰浓度  $C_{max}$  及分布半衰期  $t_{1/2\alpha}$  增大( $P < 0.01$ ),表观分布容积  $V1/F$  和清除率  $CL/F$  减小( $P < 0.01$ )。**结论** 苏木可促进寒凝血瘀模型大鼠对红花中 HSYA 的吸收,降低 HSYA 在体内的分布,从而发挥增效作用。

**[关键词]** 红花;苏木;羟基红花黄色素 A;寒凝血瘀;药代动力学**[中图分类号]** R 969.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0458-04

### Effects of *Sappan lignum* on pharmacokinetics of hydroxysafflor yellow A from *Carthami flos* in rats with cold coagulation and blood stasis

XU Ning<sup>1</sup>, DONG Juan-ni<sup>1</sup>, WU Yi-zhen<sup>1</sup>, CHEN Xiang-mei<sup>1</sup>, XIA Li<sup>1</sup>, PENG Li-rong<sup>2</sup>, YU Jie<sup>1</sup>, LIAO Sha<sup>1</sup>, LIU Qin-she<sup>1,3</sup>, ZHENG Xiao-hui<sup>1,4\*</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medicine, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

2. Department of Pharmacy, the Central Hospital of Xi'an, Xi'an 710086, Shaanxi, China

3. The People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710068, Shaanxi, China

4. Shenzhen Key Lab for New Drug Research of TCM, Shenzhen 518057, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To develop a reversed phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) analysis system for hydroxysafflor yellow A (HSYA) in rat model of cold coagulation and blood stasis (CCBS), and to investigate the influence of *Sappan lignum* on the pharmacokinetics of HSYA in CCBS rats. **Methods** Rat CCBS models were randomly divided into two groups with each containing 6 animals. Rats were orally given *Carthami flos* extract or *Carthami flos* extract combined with *Sappan lignum* (The dosage: 20.0 g/kg crud drug of *Carthami flos*). Plasma samples were collected in heparinized tubes from the oculi chorioideae vein at 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 210, and 270 min after drug administration; and the plasma proteins were precipitated with 20% trichloroacetic acid aqueous solution. Plasma concentrations of HSYA were detected by RP-HPLC at different time points after drug administration. The data were processed by DAS 2.0 software to calculate the pharmacokinetic parameters. **Results** Compared with the *Carthami flos* group, the pharmacokinetic parameters  $V1/F$  and  $CL/F$  of HSYA in the *Carthami flos* combined with *Sappan lignum* group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the

**[收稿日期]** 2012-11-02**[接受日期]** 2013-03-11

**[基金项目]** “十一五”国家科技支撑计划课题(2008BAI51B01),陕西省自然科学基金(2011JM4042,2011JM4047),陕西省中医药管理局项目(ZY47,20072506),深圳市科技工贸和信息化委员会项目(CXB201005260069A)。Supported by the Eleventh Five-Year National Science and Technology Supporting Program of China (2008BAI51B01), Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2011JM4042,2011JM4047), Project of Chinese Medicine Administration Bureau of Shaanxi Province(ZY47,20072506) and Research Fund of Science, Industry, Trade and Information Technology Commission of Shenzhen Municipality (CXB201005260069A)。

**[作者简介]** 徐 宁,硕士生。E-mail: xnximu@gmail.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-88302686, E-mail: zhengxh@nwu.edu.cn

AUC<sub>0-1</sub>, C<sub>max</sub>, and t<sub>1/2α</sub> of HSYA were significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Sappan lignum* can promote the absorption of HSYA in rat model of CCBS and reduce the distribution of HSYA, thus exercise an efficacy-enhancing effect.

[Key words] *Carthami flos*; *Sappan lignum*; hydroxysafflor yellow A; cold coagulation and blood stasis; pharmacokinetics  
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 458-461]

红花具有活血化瘀的作用,常与苏木相须配伍应用,见于诸多方剂,如红花活血汤、红花苏木汤等,用于治疗瘀血阻络、血滞不行等<sup>[1]</sup>。羟基红花黄色素A(HSYA)为红花化瘀通路的主要有效成分,具有抗血栓、抗脑缺血、缓解心肌缺血等作用<sup>[2-5]</sup>,临床常用于冠心病、脑血栓等疾病的治疗<sup>[6-8]</sup>。我们以苏木对红花中 HSYA 在正常大鼠体内药代动力学(药动学)影响的研究<sup>[9]</sup>为基础,进一步研究苏木对红花在寒凝血瘀模型大鼠体内药动学的影响,以期为中药配伍研究及临床合理用药提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 仪器与设备 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器有限公司);BP221S 电子天平(德国赛多利斯集团);VERTEX26 型快速混匀器(中国海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Maxima 超纯水机(美国基因公司)。

1.2 药品与试剂 苏木、红花分别为 *Sappan lignum* 和 *Carthami flos* 药材(购于陕西省药材公司,由西北大学生命科学学院房敏峰副教授鉴定);HSYA 对照品(中国食品药品检定生物制品研究院,批号:111637-200905);肝素钠注射液(河北常山生化药业有限公司,批号:100109);甲醇(色谱纯,美国费希尔公司);实验用水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 SD 雄性大鼠,5 个月龄,SPF 级,体质量 190~250 g(由西安交通大学实验动物中心提供,动物合格证号:陕医动证字 2006105)。

1.4 药材提取 精确称取干燥至恒质量的红花药材 100.0 g,置于 2 000 mL 圆底烧瓶中,加 10 倍量水浸泡 30 min 后,加热回流提取 2 次,每次提取时间为 2 h,抽滤,合并滤液,减压浓缩至 50 mL(生药量以红花计 2.0 g/mL)得红花单煎液,4℃ 冷藏备用。按红花与苏木 1:1 配比同法制备红花-苏木合煎液。

1.5 动物实验设计 取健康 SD 大鼠 20 只,放入 0℃ 冰水中刺激 8 min,每天 2 次,持续 30 d,建立寒凝血瘀大鼠模型<sup>[10]</sup>。选取造模成功的大鼠随机分成 2 组,每组 6 只,禁食不禁水,12 h 后,分别灌服红花单煎液和红花-苏木合煎液(以 20.0 g/kg 红花生药量灌胃),给药前和给药后 5、10、20、30、45、60、90、

120、150、210、270 min 于眼底静脉丛取血 0.3 mL,置于肝素化离心管中,4 200×g 离心 10 min,取上层血浆于 -20℃ 保存。前 5 个取血点尾静脉注射 0.3 mL 生理盐水,后边各取血点腹腔注射 0.3 mL 生理盐水以补充血容量。

### 1.6 血药浓度的测定

1.6.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:A 为 0.3% 甲酸水溶液,B 为甲醇溶液;梯度洗脱:0~25 min, 5%~35% B;25~30 min, 35%~40% B;30~40 min, 40%~60% B;检测波长:0~30 min, 280 nm;30~40 min, 403 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。

1.6.2 对照品溶液的制备 精密称取 HSYA 对照品 2.0 mg,以甲醇定容至 10 mL 棕色容量瓶中,摇匀,配制成浓度为 0.2 mg/mL 的储备溶液。

1.6.3 血浆样品的处理 取上述冻存血浆,室温下解冻,加入 1/10 血浆体积的 20% (质量体积分数) 三氯乙酸水溶液沉淀蛋白,涡旋 2 min,9 500×g 离心 10 min,取上清液并用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤,备用。

1.7 药动学研究 取 20 μL 血浆样品,按 1.6.1 项色谱条件下进样,记录峰面积,按标准曲线计算 HSYA 的浓度,以时间( $t$ )为横坐标,血药浓度( $c$ )为纵坐标绘制药-时曲线。用 DAS 2.0 药动学软件分析药动学参数。

## 2 结果

2.1 方法学考察 精密量取 200 μL 空白血浆,配制成浓度分别为 0.20、0.40、0.78、1.56、3.13、6.25 mg/L 的 HSYA 标准溶液,按 1.6.3 项下方法制备样品,按 1.6.1 项下液相条件进样分析,记录峰面积。以样品中 HSYA 峰面积( $y$ )及 HSYA 标样浓度( $x$ )进行线性回归,得回归方程为  $y = 70.94x + 0.68$  及相关系数  $r = 0.9998$  ( $n = 6$ ),由此看出,HSYA 在 0.20~6.25 mg/L 具有良好的线性关系。HSYA 检出限为 0.09 mg/L (S/N = 3 计)。0.40 mg/L、1.56 mg/L 和 6.25 mg/L 低、中、高 3 个浓度的日内和日间精密度 (RSD) 分别小于 4.5% ( $n = 6$ ) 和 7.5% ( $n = 6$ );提取回收率大于 85%;冻融稳定性、短期稳定性及长期稳定性 (RSD) 分别小于

3.7%、4.5%及6.7%。说明该方法精密度好,回收率高,且具有良好的稳定性。色谱图如图1所示。

2.2 药动学研究 用DAS 2.0药动学软件分析HSYA的药动学参数。结果显示(图2,表1),与红花单煎液组相比,红花-苏木合煎液组大鼠血浆中

HSYA药时曲线下面积(AUC)、峰浓度( $C_{max}$ )及分布半衰期( $t_{1/2\alpha}$ )增大( $P < 0.01$ );表观分布容积( $V1/F$ )和清除率( $CL/F$ )减小( $P < 0.01$ );吸收半衰期( $t_{1/2K_a}$ )和达峰时间( $T_{max}$ )有所减小,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

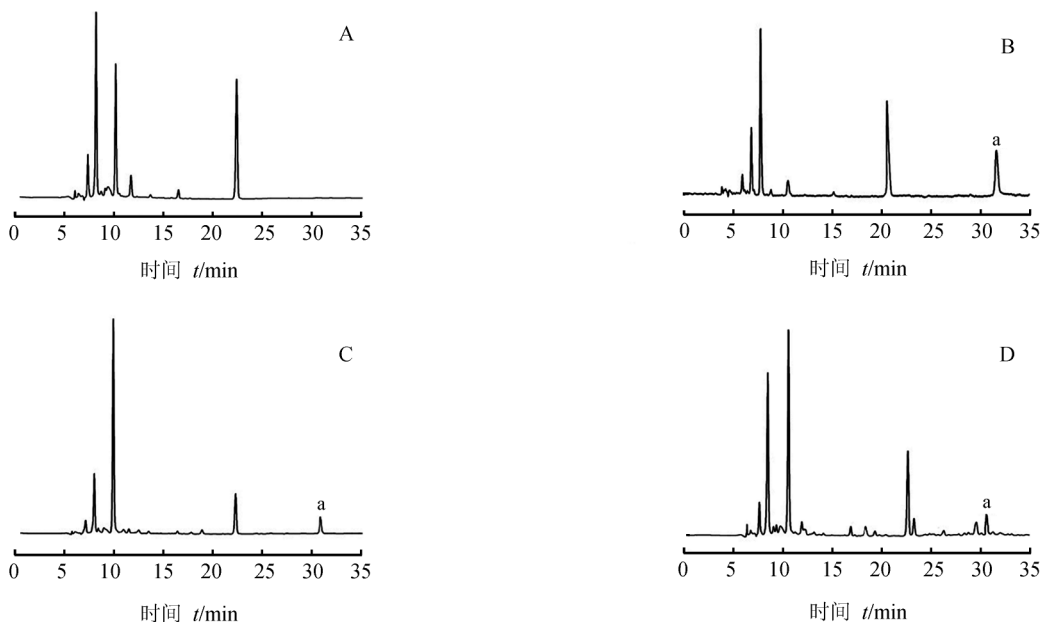


图1 各样品的HPLC图谱

A: 空白血浆; B: 空白血浆加对照品; C: 大鼠灌胃红花单煎液后血浆; D: 大鼠灌胃红花-苏木合煎液后血浆. a: 羟基红花黄色素A(HSYA)

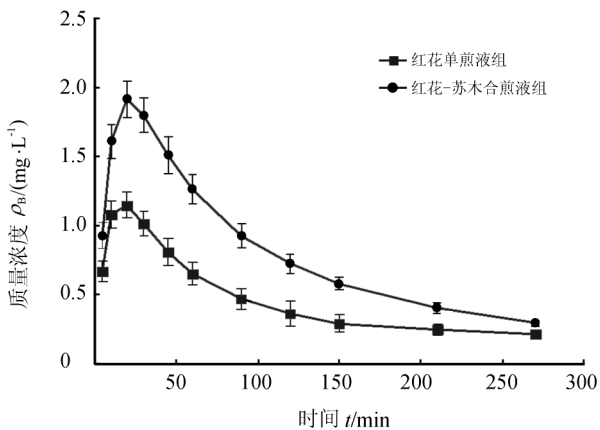


图2 羟基红花黄色素A在寒凝血瘀大鼠体内的药时曲线

$n=6, \bar{x} \pm s$

表1 羟基红花黄色素A在寒凝血瘀大鼠体内的药代动力学参数

房室参数	$n=6, \bar{x} \pm s$	
	红花单煎液组	红花-苏木合煎液组
$t_{1/2\alpha}$ t/min	13.81 ± 1.52	29.91 ± 3.02**
$t_{1/2\beta}$ t/min	67.46 ± 4.56	69.32 ± 0
$V1/F$ (L · kg <sup>-1</sup> )	134.75 ± 16.35	93.66 ± 10.21**
$CL/F$ (L · min <sup>-1</sup> · kg <sup>-1</sup> )	1.90 ± 0.24	1.18 ± 0.22**
$AUC_{(0-1)}$ (mg · min · L <sup>-1</sup> )	116.94 ± 19.33	218.10 ± 24.88**
$AUC_{(0-\infty)}$ (mg · min · L <sup>-1</sup> )	147.16 ± 12.95	270.90 ± 29.35**
$t_{1/2K_a}$ t/min	6.11 ± 0.71	5.72 ± 0.71
$C_{max}$ $\rho_B$ / (mg · L <sup>-1</sup> )	1.31 ± 0.30	2.02 ± 0.41**
$T_{max}$ t/min	20.00 ± 5.08	18.00 ± 4.47

\*\*  $P < 0.01$  与红花单煎液组比较

### 3 讨论

3.1 色谱条件及血浆制备方法的选择 本研究考察了等度和梯度洗脱两种方式、甲醇-0.05%甲酸水溶液和甲醇-0.3%甲酸水溶液的流动相体系的方法专属性,最终确定采用梯度洗脱,甲醇-0.3%甲酸水溶液为流动相。此方法专属性良好,灵敏度高。

本研究比较了不同种类和用量的蛋白沉淀剂处理血浆样品后对提取回收率的影响,最终确定采用20%(质量体积分数)三氯乙酸水溶液沉淀蛋白,用量为血浆体积的1/10,结果显示内源性物质无干扰,精密度高,稳定性好,且提取回收率高,均在85%以上,满足生物样品检测要求。

3.2 药动学研究 与红花单煎液组相比,红花-苏

木合煎液组大鼠血浆中 HSYA 的  $t_{1/2K_a}$  和  $T_{max}$  有所减小 ( $P > 0.05$ ),  $AUC$ 、 $C_{max}$  增大 ( $P < 0.01$ ), 表明苏木促进了机体对红花中 HSYA 的吸收;  $V1/F$  和  $CL/F$  减小 ( $P < 0.01$ ), 提示配伍苏木可加快 HSYA 的消除;  $t_{1/2\alpha}$  增大 ( $P < 0.01$ ), 提示苏木减慢了 HSYA 在体内的分布速度。

本课题组前期对苏木和红花在正常大鼠体内药代动力学研究发现, 与红花单用组相比, 红花和苏木配伍后, 正常大鼠体内 HSYA 的吸收半衰期  $t_{1/2K_a}$ 、分布半衰期  $t_{1/2\alpha}$  减小; 达峰时间  $T_{max}$  有所提前; 消除半衰期  $t_{1/2\beta}$ 、清除率  $CL/F$  变化不显著, 而表观分布容积  $V1/F$  减小, 表明苏木可促进正常大鼠体内 HSYA 的吸收和分布, 加快 HSYA 在体内的代谢过程, 减少 HSYA 在体内的蓄积<sup>[9]</sup>。本研究结果结合上述研究表明, 苏木和红花配伍后, 与正常大鼠相比, 寒凝血瘀模型大鼠血浆中 HSYA 分布半衰期  $t_{1/2\alpha}$ 、药时曲线下面积  $AUC_{(0-t)}$ 、峰浓度  $C_{max}$  增大, 表观分布容积  $V1/F$  和清除率  $CL/F$  减小, 提示在相应的病理模型下药物能发挥更好的疗效。

综上所述, 在寒凝血瘀模型大鼠体内, 苏木可促进机体对 HSYA 的吸收, 使更多的 HSYA 被吸收入血; 同时苏木可加快 HSYA 的消除, 降低 HSYA 在体内的分布, 从而发挥增效作用。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Tien Y, Lin J, Lai C, Kuo C, Lin W, Tsai C, et al. *Carthamus tinctorius* L. prevents LPS-induced TNF $\alpha$  signaling activation and cell apoptosis through JNK1/2-

NF $\kappa$ B pathway inhibition in H9c2 cardiomyoblast cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130:505-513.

- [2] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 羟基红花黄色素 A 抗凝作用的研究[J]. *中草药*, 2007, 38:741-743.
- [3] 郑为超, 陈铎葆, 李 兵, 张 雷. 红花黄素对大鼠心肌缺血-再灌注模型的作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19:1032-1034.
- [4] Tang J, Lou Z, Wang Y, Guo M. Expression of a small heat shock protein (CTL-hsyapr) screened by cDNA-AFLP approach is correlated with hydroxysafflor yellow A in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *Biochem System Ecol*, 2010, 38:722-730.
- [5] 陈铎葆, 郑为超, 赵 辉, 张梅芳, 张 雷, 李 兵. 红花总黄素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能的影响[J]. *中国中医药科技*, 2003, 10:290-292.
- [6] Liu L, Duan J, Tang Y, Guo J, Yang N, Ma H, et al. *Taoren-Honghua* herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139:381-387.
- [7] 臧宝霞, 金 鸣, 司 南, 张 彦, 吴 伟, 朴永哲. 羟基红花黄色素 A 对血小板活化因子的拮抗作用[J]. *药理学学报*, 2002, 37:696-699.
- [8] Zhu H, Wang Z, Ma C, Tian J, Fu F, Li C, et al. Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Med*, 2003, 69:429-433.
- [9] 夏 丽, 陈向梅, 彭莉蓉, 王世祥, 王晓雯, 左 燕, 等. 苏木对红花中羟基红花黄色素 A 的药代动力学影响 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38:52-55.
- [10] 曹振华, 尹军祥, 田金洲, 李乐军, 时 晶, 王文洁, 等. 源于冷刺激的血液与血管病理变化研究 [J]. *北京中医药*, 2009, 28:308-311.

[本文编辑] 尹 茶