

RP-HPLC 法测定家兔血浆中西红花苷-1 浓度及其药代动力学研究

唐琳, 颜钊, 徐莺, 戎芳, 李爽, 陈放*

(四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064)

关键词: 西红花苷-1; 药代动力学; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2004)10 - 0854 - 03

Determination of crocin-1 in rabbit plasma and the pharmacokinetics by RP-HPLC

TANG Lin, YAN Fang, XU Ying, RONG Fang, LI Shuang, CHEN Fang*

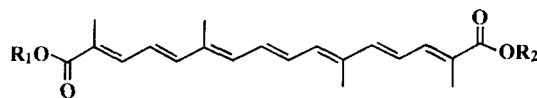
(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Aim To develop a sensitive and specific HPLC method for the determination of crocin-1 in rabbit plasma, and study the pharmacokinetics in rabbit. **Methods** After iv administration of crocin-1 in rabbit, the sample could be well purified after precipitation of protein with methanol. Waters spherisorb C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) was used and the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-1% aqueous acetic acid (15 : 10 : 50) at the flow rate of 1 mL · min⁻¹, and the UV detection wave length was 440 nm. The column temperature is 25 °C. **Results** The calibration curve was linear ($r = 0.9997$) in the range from 0.86 to 27.54 mg · L⁻¹ for crocin-1. The lowest detectable concentration of crocin-1 was 0.42 mg · L⁻¹. After given iv crocin-1 in rabbit, the concentration-time curves of crocin-1 was shown to fit two-compartment open model. **Conclusion** This method is proved to be rapid, precise and reliable enough to be applied to the pharmacokinetics studies of crocin-1 in rabbit.

Key words: crocin-1; pharmacokinetics; RP-HPLC

西红花为鸢尾科 (Iridaceae) 番红花属 (*Crocus*) 植物番红花的干燥柱头, 有活血化瘀, 散郁开结等功效^[1]。现代医学表明, 西红花能抑制血小板凝集^[2], 预防动脉粥样硬化^[3], 并有抗肿瘤活性及降低化疗药物毒副作用的作用^[4,5]。西红花苷 (crocin) 是西红花的主要成分之一, 为西红花酸 (crocetin) 与不同糖结合而成的酯苷。现已报道了 7 种西红花糖苷的结构^[6]。西红花苷-1 (图 1) 是其中含量最高的一种。西红花苷的定量检测方法有少量报道^[7-9]。为深入研究其体内药代动力学, 本文建

立了反相高效液相色谱法测定血浆中的西红花苷-1 浓度的方法, 可用于西红花苷-1 血药浓度分析及其药代动力学研究。



α -Crocetin: $R_1 = R_2 = H$

Crocins-1: $R_1 = R_2 = \text{Gentiobiosyl}$

Figure 1 Structures of crocetin and crocins

材料和方法

仪器 美国 Waters 高效液相色谱仪 (包括 515 泵, 2487 双波长紫外可见光检测器); 大连物理化学所 WDL-95 工作站; 高速台式离心机; 旋涡混合器。

药品与试剂 西红花苷-1 标准对照品, 本实验

收稿日期: 2003-11-14.

基金项目: 四川省应用基础研究计划资助项目 (03-TY029-090-2).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 28 - 85417281,

E-mail: tanglin66@263.net

室分离精制,暗红色粉末,经紫外、红外、质谱和核磁共振确认结构,HPLC测定含量为98%以上;甲醇为色谱纯;乙腈、乙酸为分析纯。

标准溶液的配制 精密称取西红花苷-1对照品17.21 mg置50 mL量瓶中,定容得 $344.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液。取贮备液0.05,0.1,0.2,0.4,0.8,1.6 mL,置10 mL量瓶,配制成1.72,3.44,6.88,13.77,27.54,55.07 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照液。

实验动物 健康家兔,♂,体重2.5-3 kg,四川大学华西实验动物中心提供。

色谱条件 色谱柱:Waters spherisorb C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm ID,5 μm);流动相:甲醇-乙腈-1%乙酸(15:10:50);流速:1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:440 nm。

血浆样品处理 家兔耳缘取血,1%肝素抗凝,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取血浆备用。吸取血浆200 μL ,加流动相100 μL , $1 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液经0.45 μm 滤膜过滤,滤液10 μL 进样分析。

结果

1 方法学研究

在上述色谱条件下,空白血浆、含药血浆和实测血浆的色谱如图2所示,色谱分离良好,不受内源性杂质峰干扰,西红花苷-1保留时间为5.43 min。

2 标准曲线及最低检测浓度测定

取空白家兔血浆200 μL ,加入系列对照液100 μL ,配制成0.86,1.72,3.44,6.87,13.77,27.54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按“血浆样品处理”项下操作,建立标准曲线。以样品浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行回归运算。回归方程为 $Y =$

$1.042 \times 10^4 X - 1.732 \times 10^4$, $r = 0.9997$,西红花苷-1 0.86-27.54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系,西红花苷-1最低检测限为0.42 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 方法回收率实验

用空白血浆配制含西红花苷-1分别为1.72,6.87和27.54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血样,按“血浆样品处理”项下方法操作,连续测定5次,平均方法回收率分别为97.16%,99.56%,99.93%,RSD分别为3.46%,3.18%,0.52%($n=5$)。

4 方法精密度实验

用空白血浆配制含西红花苷-1分别为1.72,6.87和27.54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准血样,按“血浆样品处理”项下方法操作,连续测定5次,测得3种浓度标准血浆的日内RSD分别为7.8%,7.5%,6.6%。

5 样品稳定性考察

用空白血浆配制含西红花苷-1 1.72 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 血样,按“血浆样品处理”项下方法操作。在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)放置12 h和-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存24 h后分别进样,连续测定5次,RSD分别为1.72%,6.45%。

6 家兔体内药代动力学试验

健康家兔5只,体重2.5-3.0 kg,♂,给药前禁食12 h,试验过程中不禁饮水。给药剂量为2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,iv家兔体内。给药后不同时间点(5,15,30,45,60,90,120,150,180,210,240 min)耳缘静脉取血500 μL ,置肝素化的离心管中,3 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离取血浆。按“血浆样品处理”项下方法操作,测定各血浆样品中西红花苷-1浓度。家兔单次iv西红花苷-1后的经时平均血药浓度曲线见图3。用中国药理学会3P87实用药代计算程序处理,拟合的药-时曲线符合二室模型特征,有关药代动力学参数见表1。

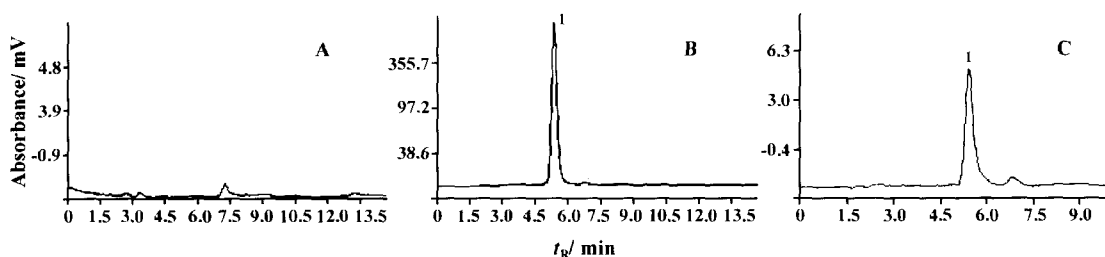


Figure 2 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with crocin-1 (B) and a plasma sample 30 min after a single dose of crocin-1 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) iv to a rabbit (C). Peak 1: Crocin-1

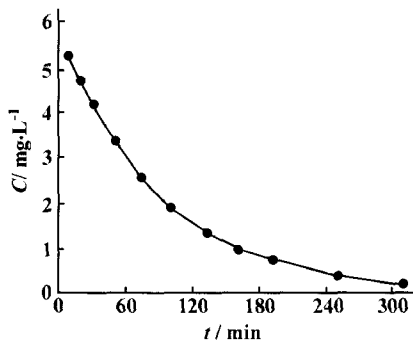


Figure 3 Mean plasma concentration (C)-time (t) curve of crocin-1 after iv $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of crocin-1 after single dose of $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ iv in rabbits ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Value	Parameter	Value
$A / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.298 ± 0.014	K_{21} / min^{-1}	0.083 ± 0.004
$B / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	5.564 ± 0.027	K_{10} / min^{-1}	0.013 ± 0.003
α / min	0.100 ± 0.006	K_{12} / min^{-1}	0.015 ± 0.003
β / min	0.011 ± 0.004	$\text{AUC} / \text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	538 ± 4
$T_{1/2\alpha} / \text{min}$	6.911 ± 0.010	V_c / mL	0.292 ± 0.005
$T_{1/2\beta} / \text{min}$	65.54 ± 0.06	$\text{CL} / \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	0.223 ± 0.004

讨论

由于西红花苷-1 见光易分解,稳定性较差(结果未显示),因而在进行方法精密度实验时只做了室温下日内精密度测试。刘旋等^[9]建立了西红花苷-1 的 HPLC 定量检测方法,确定其最大吸收波长 440 nm 为检测波长。本文建立了血浆中西红花苷-1 的测定方法,流动相、流速做了相应改变,使其具有高灵敏度的特点。图 2C 出现一杂质峰,可能是在体内代谢中西红花苷-1 被血液中氧化酶分解造成的,其成分有待进一步研究。静脉给药的安全性及所用剂量由前期的预实验确定。由动力学参数可知,家兔 iv 西红花苷-1 后,其药代动力学参数符合二室开放模型,分布相生物半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 为 6.9 min,

提示西红花苷-1 自中央室向周边室分布迅速;消除相生物半衰期 $T_{1/2\beta}$ 为 65.5 min,提示西红花苷-1 在体内消除较快。本工作为研究西红花苷体内的药代动力学和研制治疗脑血管疾病的西红花苷注射剂奠定了技术基础。

References:

- [1] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典) [S]. Part I. 1995 Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 1995. 105.
- [2] Maria LK, Angelas IS. Characterization of the platelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus sativus* [J]. *Biochem Int*, 1990, **22**(1):103-110.
- [3] Cormier F, Dufresne C, Dorion S. Enhanced crocetin glucosylation by means of maltosyl- β -cyclodextrin encapsulation [J]. *Biotechnol Tech*, 1995, **9**(8):553-556.
- [4] Nair SC, Panikkar B, Panikkar KR. Antitumour activity of saffron [J]. *Cancer Lett*, 1991, **57**(2):109-114.
- [5] Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Exp Biol Med*, 2002, **227**:20-25.
- [6] Pfister S, Meyer P, Steck A, et al. Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, **44**(9):2612-2615.
- [7] Lin N, Lin G, Kwan YW, et al. Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1999, **849**(2):349-355.
- [8] Lozano P, Castallar MR, Simancas MJ, et al. Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyze commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products [J]. *J Chromatography A*, 1998, **830**(2):477-483.
- [9] Liu X, Qian ZY, Fu J. Determination of Crocin-I by HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, **30**(2):108-111.