·制剂与质量·

大孔树脂柱色谱法制备红花黄色素和羟基红花黄色素 A

金 鸣[1], 高子淳[2], 李金荣[1], 臧宝霞[1], 吴 伟[1*]

(1. 北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院 药理研究室, 北京 100029;
2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘 要: **目的** 建立简便有效的制备红花有效部位红花黄色素(safflor yellow, SY)及有效成分羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA)的方法。**方法** 室温水提减压浓缩所得红花水提液上 D-4020 型非极性大孔树脂柱, 水洗脱糖类等杂质, 以 30% 和 10% 乙醇洗脱分别得 SY 和 HSYA; 采用分光光度法和 HPLC 法分析水洗脱除糖过程中 SY 和 HSYA 的损失率及醇洗脱 SY 和 HSYA 的回收率。**结果** 聚酰胺薄膜色谱结果显示 SY 和 HSYA 洗脱液分别可见 4～5 个和 1 个黄色荧光斑点。HPLC 分析结果表明, 两洗脱液中所含 SY 和 HSYA 纯度分别为 92.4% 和 83.0%。在水洗除杂质和稀醇洗脱过程中, 损失率和回收率分别为 SY: 7.5% 和 80.6%, HSYA: 1.64% 和 77.3%。**结论** 本法适于大规模制备 SY 和 HSYA。

关键词: 红花; 红花黄色素; 羟基红花黄色素 A; 大孔树脂柱色谱

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标识码**: B **文章编号**: 0253 2670(2004)01 0025 04

Preparation of safflor yellow and hydroxysafflor yellow A by macroporous resin column chromatography

JIN Ming[1], GAO Zi-chun[2], LI Jin-rong[1], ZANG Bao-xia[1], WU Wei[1]

(1. Department of Pharmacology, Beijing Institute of Heart, Lung, and Blood Vessel Diseases—Beijing Anzhen Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing 100029, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: **Object** To establish the simple and effective technique for preparing water soluble safflor yellow (SY) and hydroxysafflor yellow A (HSYA) from *Carthamus tinctorius* L. **Methods** Aqueous extract prepared through repeated water extraction at room temperature and vacuum evaporation was added to nonpolar macroporous resin column and the impurities such as sugar were washed out by water, then SY and HSYA was eluted by 30% and 10% ethanol individually. The rate of loss and of recovery was determined with spectrophotometry and HPLC analysis. **Results** It was observed that the polyamide TLC analysis result of SY and HSYA elution was 4—5 or one yellow spot under fluorescent light. It was shown in HPLC analysis that the content of SY and HSYA in two elutions was 92.4% and 83.0% respectively. In the procedure of sugar washing with water or the effective components eluting by diluted ethanol, the rate of loss and recovery are SY: 7.5% and 80.6%, HSYA: 1.64% and 77.3% respectively. **Conclusion** This technique is suitable to prepare SY and HSYA in a large scale.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; safflor yellow (SY); hydroxysafflor yellow A (HSYA); macroporous resin column chromatography

红花为一活血化瘀药, 红花黄色素(safflor yellow, SY)和羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA)为红花活血化瘀作用的主要有效部位和有效成分[1～3]。Meselhy 首次报道 HSYA 的制备方法为丙酮提取, 醋酸乙酯沉淀, 通过纤维素柱及 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱反复纯化获得[4]。过程较为复杂, 且 Sephadex LH-20 价格昂贵, 使此法的应用受到了限制。为此, 本实验建立了非极性大孔树脂柱色谱法制备 SY 和 HSYA 的方法, 提供了一种简便价廉的技术, 并且采用此法制备的 SY 活性较好, 可作为药理实验的材料。

1 材料与仪器

* 收稿日期: 2003-04-17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30171146)
作者简介: 金 鸣(1957—), 男, 北京人, 北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院药理研究室主任, 研究员, 硕士生导师, 1992 年博士毕业于北京中医药大学中西医结合生化专业, 研究方向为中药红花活血化瘀作用机制。
Tel: (010)64414231-2308 E-mail: jinzang@public3.bta.net.cn

红花生药购自新疆乌鲁木齐药材公司, 产地为新疆维吾尔族自治区吉木萨尔县, 经北京中医药大学中药鉴定教研室李家实教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。

D-4020 型非极性大孔树脂为天津南开大学化工厂产品。聚酰胺薄膜为浙江台州市路桥四青生化材料厂产品。乙腈为 Fisher 公司 HPLC 级产品, 羟基红花黄色素 A 对照品为本研究室制备, 经多种光谱鉴定结构, HPLC 法分析其纯度为 92%[1,3]。甲醇为国产优级纯, 工业乙醇为北京化工厂产品, 其他试剂均为国产分析纯。

岛津 LC—6A 高效液相色谱仪; 泰立化公司 TL 9900 液相色谱工作站。

2 方法

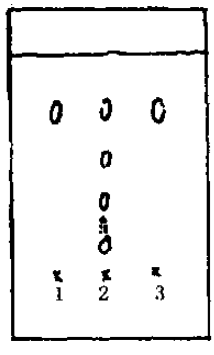
2.1 大孔树脂处理方法: 新购大孔树脂用 5% NaOH 浸泡 2 h 后, 用水洗至中性, 再以 5% HCl 浸泡 2 h, 水洗至中性后湿法装柱, 工业乙醇清洗至流出液中加蒸馏水无白色混浊, 蒸馏水洗树脂至流出液无醇味, 备用。

2.2 红花水提液制备: 红花 40 kg, 加 800 L 水, 室温浸泡并不时搅动, 24 h 后放出提取液, 并加第二次 800 L 水同法冷浸 24 h, 弃药渣, 合并两次水提液, 离心滤过除去药渣, 80 ℃以下减压浓缩至提取液含生药 1 kg/L, 离心滤过, 即得。

2.3 红花水提液中 SY 和 HSYA 的含量测定: 采用分光光度法测定红花水提液中 SY 含量[3]。以刻度吸管吸取红花水提液 0.5 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL 量瓶刻线, 取此稀释液于 405 nm 测定吸光度, 以标准曲线法计算 SY 含量; 取此稀释液进行 HPLC 分析, 色谱柱为 GL Sciences 公司 Inertsil ODS-3 柱, 检测波长 405 nm, 流动相为甲醇-乙腈-水 (20∶10∶70, 含 0.02% 磷酸, pH 2.6), 柱温 30 ℃, 流速 0.6 mL/min, 按 TL 9900 色谱工作站程序, 以面积归一化法计算 HSYA 的含量, 依 HSYA 峰面积、HPLC 进样体积及其稀释倍数计算得红花水提液中以 HPLC 峰面积表示的 HSYA 含量。

2.4 大孔树脂柱色谱法制备 SY 及 SY 回收率的测定: 以刻度吸管取上述红花水提液 5 mL, 上 D-4020 大孔树脂柱 (40 cm × 2 cm), 蒸馏水洗至流出液 Molish 反应呈阴性, 再以 30% 乙醇洗脱, 至柱上无明显黄色时结束洗脱。测量除糖水洗脱液总体积, 并以刻度吸管吸取 1 mL 此溶液, 加蒸馏水稀释至 10 mL 量瓶刻线, 取此稀释液测定 405 nm 处吸光度, 标准曲线法计算 SY 含量, 并通过稀释倍数及除糖洗脱液总体积算得除糖时被洗脱的 SY 总量, 以此 SY 量与上柱的 5 mL 红花水提液中分光光度法测得 SY 总量之比计算损失率。30% 乙醇洗脱制备 SY 结束后, 水浴蒸发洗脱液至无醇味, 测量此水溶液总体积, 进行 HPLC 及 TLC 分析, 并以刻度吸管吸取该溶液 1 mL, 加蒸馏水稀释至 50 mL 量瓶刻线, 405 nm 处测定此稀释液吸光度, 标准曲线法计算 SY 含量, 依稀释倍数及醇洗脱液蒸发所得水溶液总体积计算稀醇洗脱液中 SY 总量, 以此 SY 量与上样的红花水提液中 SY 总量之比计算大孔树脂法制备 SY 回收率。

2.5 大孔树脂柱色谱法制备 HSYA 及 HSYA 回收率测定: 以刻度吸管取上述红花水提液 5 mL, 上 D-4020 大孔树脂柱 (40 cm × 2 cm), 蒸馏水洗至流出液 Molish 反应呈阴性, 以 10% 乙醇洗脱 HSYA, 以 HSYA 为对照品进行聚酰胺薄膜法检视, 至 HSYA 单一成分洗脱结束为止, HSYA 洗脱液水浴加热至无醇味, 进行 HPLC 和 TLC 分析; 量取除糖水洗脱液总体积, HPLC 法分析除糖洗脱液中的 HSYA, 并由 HSYA 峰面积、HPLC 分析进样体积及糖洗脱液总体积计算得该洗脱液中以峰面积表示的 HSYA 总量, 以此 HSYA 量与上柱红花水提液中以峰面积表示的 HSYA 总量之比即为 HSYA 损失率; 类似地, HSYA 制备时稀醇洗脱液挥尽醇后测量此 HSYA 水溶液的总体积并进行 HPLC 分析, 并由 HPLC 分析的进样体积、HSYA 峰面积及 HSYA 水溶液总体积计算得以峰面积表示的该溶液中 HSYA 总量, 以此 HSYA 量与上柱红花水提液中以峰面积表示的 HSYA 总量之比算得大孔树脂法制备 HSYA 回收率。



1-HSYA 2-SY
3-HSYA 对照品 (HSYA reference substance)

图 1 大孔树脂法制备的 SY 和 HSYA 的薄层图谱

Fig 1 TLC analysis of SY and HSYA prepared by macroporous resin chromatography

2.6 聚酰胺薄膜分析 SY 方法: 取聚酰胺薄膜, 点样后以醋酸乙酯-甲醇-3.6% 盐酸 (1∶3∶6) 为展开剂于密闭容器中上行展开, 254 nm 紫外灯下观察斑点荧光。

3 结果

3.1 HSYA 和 SY 聚酰胺薄膜色谱检视结果: 见图 1。

3.2 SY 和 HSYA 的 HPLC 分析结果: 见图 2。大孔树脂

法制备的 SY 最高的峰为主要成分 HSYA，面积归一化法分析结果表明其 HSYA 含量为 83.0%，其他成分的结构尚待确定。

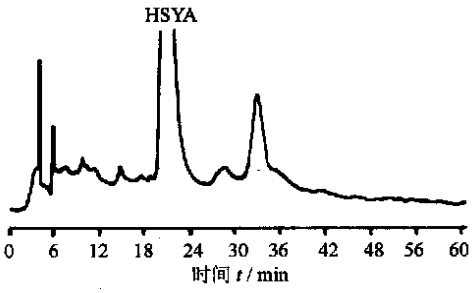


图 2 大孔树脂法制备所得 SY 的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of SY prepared by macroporous resin chromatography

大孔树脂法制备的 HSYA 的 HPLC 分析见图 3。结果表明，该条件下洗脱 30 min 后已不出峰，其 HSYA 纯度为 92.4%，该产物可以供药理实验用。药理实验结果表明上述方法制备的 SY 和 HSYA 抑制 PAF 诱发的家兔血小板聚集均具明显的量效关系。

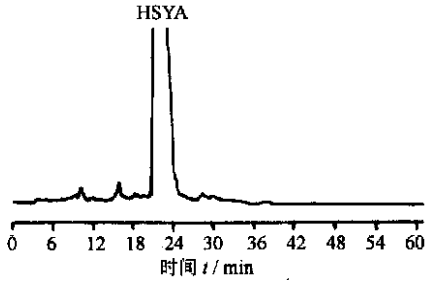


图 3 大孔树脂法制备所得的 HSYA 的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC chromatogram of HSYA prepared by macroporous resin method

3.3 大孔树脂法制备 SY 回收率及损失率试验结果：见表 1。大孔树脂制备 SY 水洗除糖过程中，SY 损失率为 7.5%，稀醇洗脱所得 SY 回收率为 80.6%。

表 1 大孔树脂法制备 SY 回收率及损失率试验结果

Table 1 Results of loss and recovery rate test of SY prepared by macroporous resin method

样品液	稀释液 $A_{405\,nm}$	原液体积/mL	稀释倍数	SY 总量/mg	比率/%
上柱液	0.606±0.002	5	2 000	160	
糖洗脱液	0.351±0.002	132	10	12	7.5
SY 液	0.546±0.001	180	50	129	80.6

3.4 HSYA 回收率及损失率试验结果：见表 2。大孔树脂制备 HSYA 水洗除糖过程中，HSYA 损失 1.64%，稀醇洗脱所得 HSYA 回收率为 77.3%。

4 讨论

表 2 大孔树脂法制备 HSYA 回收率及损失率实验结果

Table 2 Results of loss and recovery rate test of HSYA prepared by macroporous resin method

样品液	总体积/mL	稀释倍数	进样体积/μL	HSYA 峰面积	HSYA 量(峰面积计)	比率/%
上柱液	5	2 000	10	3 574 206	3.57×10^{12}	
糖洗脱液	130		10	4 506 435	5.86×10^{10}	1.64
HSYA 液	180		10	153 375 457	2.76×10^{12}	77.3

红花活血通经，化瘀止痛，用于多种血液循环障碍疾病。临床上红花以水煎液入药，其主要水溶性组分为 SY，HSYA 为其含量最高的查尔酮成分。SY 具抗血小板激活因子等心血管药理活性，为红花水溶性有效部位[5]，HSYA 可竞争性地抑制氚标记的血小板激活因子与血小板受体的结合，为 SY 中的主要有效成分[1]。

目前国内关于红花的理论研究及药物开发方兴未艾，但较为简便有效的 SY 及其主要有效成分 HSYA 的色谱制备方法尚未见报道。水提醇沉法制备的 SY 为一食品色素，其制备工艺较为简单，但其杂质含量较高，毒性较强，药效较差[6]。我们曾报道硅胶吸附法制备的 SY 虽然药效比食品 SY 强，毒性较弱[6]，但由于制备过程中未先将糖等杂质洗脱分离，故该法仍有待改进。Meselhy 制备 HSYA 的方法较为复杂，曾报道的聚酰胺柱色谱除杂、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化的方法虽然可行，但该法试剂成本较高，且在凝胶色谱分离时，另一红花查尔酮成分与 HSYA 混在一起，需反复多次色谱分离方可逐步分开，制备 HSYA 比较麻烦[1]。

本实验采用 HPLC 法对红花成分进行了分析，该法可较好地分离 HSYA 与其他黄酮类成分，HSYA 峰面积与进样量线性关系良好，r= 0.999 8，回收率为 99.84%，批内 RSD 为 1.40%，批间 RSD 为 1.63%。HPLC 分析结果表明大孔吸附树脂法制备的 SY 所含黄酮类组份与硅胶吸附法制得的 SY 基本相同，其抗血小板激活因子诱发的家兔血小板聚集作用强度亦与硅胶吸附法制得的 SY 相近，由于大孔树脂法制备过程中经水洗除杂质过程，为一更好的制备方法。本实验所用的大孔树脂为 D-4020 型非极性大孔树脂，预试中，共试验了天津南开大学化工厂生产的 8 种大孔树脂，结果表明，非极性大孔树脂 D-4020 型、D-3520 型及 X-5 型分离糖类与 HSYA 效果较好，另外 5 种即 H-103 型非极性大孔树脂，AB-8 型弱极性大孔树脂，NKA-2，NKA-9 型及 S-8 型极性大孔树脂分离 HSYA 与水溶性糖类的效果均欠佳，故采用 D-4020 型大孔树脂进行实

验。本法经一步制备即可获得纯度为 92.4% 的 HSYA，可满足一些药理实验的需要。若欲制备含量测定用对照品，再经凝胶柱色谱纯化即可。实验中水洗脱时应注意在除去糖类同时应尽可能保留较多的 HSYA，每一次色谱制备结束后，应以稀碱液及稀醇液洗掉树脂上吸附的残余黄酮成分，并以蒸馏水洗净担体后方可进行下一次制备。由于 HSYA 不稳定，制备时加热浓缩温度不可太高，SY 及 HSYA 溶液均可短期冷藏保存，长期保存则应冷冻。

References:

[1] Zang B X, Jin M, Si N, *et al*. Antagonistic effect of hydroxy-safflor yellow A against platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2002, 37(9): 696-699.

[2] Jin M, Wu W, Chen W M, *et al*. Inhibitory effect of gross safflor yellow against platelet activating factor receptor binding *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 37(3): 167-169.

[3] Zang B X, Wang Y Q, Li J S, *et al*. Spectrophotometric determination of safflor yellow [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(2): 137-138.

[4] Meselhy M R, Kadota S, Momose Y, *et al*. Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca^{++} antagonistic activity of tinctormine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(10): 1796-1802.

[5] Huang Z L, Gao Q M, Cui Z M. Pharmacological study of safflor yellow [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1984, 15(8): 12-14.

[6] Zang B X, Wu W, Li W R, *et al*. Experimental study of safflor yellow prepared through silica gel adsorption procedure on anticoagulation effect [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 37(2): 106-109.

阿魏酸的稳定性及其在川芎和当归药材中的存在形式

丁明玉[1], 马帅武[2], 刘德麟[2]*

(1. 清华大学 化学系, 北京 100084; 2. 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

摘 要: **目的** 确认阿魏酸的异构体转换反应及川芎、当归药材中阿魏酸的存在形式。**方法** 采用高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用等手段研究阿魏酸的异构体转换。**结果** 反式阿魏酸在常规保存条件下，可部分转变成为顺式，在川芎和当归药材中，反式和顺式阿魏酸是共存的。**结论** 反式阿魏酸有较好的热稳定性，但存在缓慢的异构体转换反应。

关键词: 阿魏酸; 稳定性; 川芎; 当归

中图分类号: R282.6; R286.02 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2670(2004)01-0028-03

Stability of ferulic acid and its existing form in *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis*

DING Ming-yu[1], MA Shuai-wu[2], LIU De-lin[2]

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: **Object** To investigate the isomer transition reaction of ferulic acid and the existing form of ferulic acid in *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. **Methods** HPLC and HPLC-MS were used to confirm the isomer transition of ferulic acid. **Results** The *trans*-ferulic acid was translated into *cis*-ferulic acid partly when its solution was deposited under some routine conditions, and the *trans*- and *cis*-ferulic acids could coexist in the Chinese medicinal materials, *L. chuanxiong* and *A. sinensis*. **Conclusion** The *trans*-ferulic acid is stable thermodynamicly, but could be translated into *cis*-ferulic acid partly and slowly.

Key words: ferulic acid; stability; *Ligusticum chuanxiong* Hort.; *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels

川芎和当归都是常用中药材，阿魏酸是它们的有效成分之一。从化学结构上看，阿魏酸有顺式和反式两种立体异构体(图 1)。有关阿魏酸(钠)的药理作用和中药(药材及中成药)中阿魏酸的液相色谱分

* **收稿日期**: 2003-06-12

基金项目: 科技部社会公益专项(2001BB00150)

作者简介: 丁明玉(1960—)，男，湖南华容人，清华大学化学系副教授，博士，1986 年获中国地质大学应用化学硕士学位，1995 年获日本山梨大学工学部生物工学科博士学位，1995 年至 1997 年在清华大学作为博士后研究人员，主要从事色谱分析与中药化学及制剂技术的研究。Tel: (010) 62781687 E-mail: dingmy@mail.tsinghua.edu.cn