

· 制剂与质量 ·

大孔吸附树脂纯化红花提取物的研究

宋洪涛¹, 初 阳², 张 倩², 郭 涛³, 陈大为², 李可鑫¹, 刘 伟¹, 颜 鸣³

(1. 南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016;

3. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:目的 探讨大孔吸附树脂对红花提取物的纯化条件及纯化效果。方法 通过红花黄色素(SY)在树脂上的吸附量和解吸率筛选树脂的种类;以 SY 的保留率和转移率为指标考察药液的 pH 值、上柱吸附体积流量、树脂药材比、树脂柱径高比、清洗液的 pH 值及体积流量、洗脱液的种类及体积流量等纯化条件。与乙醇沉淀法进行纯化效果的比较。结果 优化后的纯化条件为采用 HPD400A 作为吸附树脂,树脂药材比为 4:1,树脂柱径高比为 1:6,上柱药液和清洗液 pH 值为 2.0,50%乙醇作为洗脱液,上柱吸附体积流量为 4 BV/h,清洗和洗脱体积流量为 10 BV/h。在该纯化条件下,SY 的转移率为 88.8%,与乙醇沉淀法相当,固形物中 SY 的质量分数约为乙醇沉淀法的 2.6 倍,固形物的质量(固形物得率)仅为乙醇沉淀法的 38.5%。结论 通过纯化条件的优化大大提高了 SY 的转移率,大孔吸附树脂法对红花提取物的纯化效果优于乙醇沉淀法。

关键词:红花;红花黄色素;大孔吸附树脂;纯化

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)07-0996-05

Purification of *Carthamus tinctorius* extract with macroporous adsorption resinsSONG Hong-tao¹, CHU Yang², ZHANG Qian², GUO Tao³, CHEN Da-wei²,LI Ke-xin¹, LIU Wei¹, YAN Ming³

(1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To study the conditions and effects of purification of *Carthamus tinctorius* extract by adopting macroporous adsorption resin. **Methods** The kinds of resin were selected through the determination of adsorption ratio and elution ratio of safflower yellow (SY) in resin. The reservation ratio and transferring ratio of SY were used as index to investigate the purification conditions, such as the pH value of water extract, the flow speed for adsorption, the ratio of the resin to crude drug, the ratio of diameter to height of resin column, the pH value and flow speed of cleaning agent, and the kinds and flow speed of the elution agent, etc. The purification results of macroporous adsorption resin were compared with the alcohol sedimentation. **Results** The optimum purification conditions were as follows: HPD400A Macroporous adsorption resin was selected as the adsorbed resin, the ratio of resin to crude drug was 4:1, the ratio of diameter to height of resin column was 1:6, the pH value of water extract and cleaning agent was adjusted to 2.0, 50% alcohol was chosen as elution agent, the flow speed of adsorption was 4 BV/h, the flow speed of cleaning and elution agent was 10 BV/h. Under the purification condition, the transferring ratio of SY was 88.8%, approximated to that by the alcohol sedimentation method. Compared with the alcohol sedimentation method, the macroporous adsorption resin purification method could increase the SY content in dried solid about 2.6 times, while be the weight of dried solid about 38.5%. **Conclusion** The transferring ratio of SY is greatly improved through the optimization of the purification conditions. The method of macroporous adsorption resin purification is superior to the method of alcohol sedimentation.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; safflower yellow (SY); macroporous resin; purification

收稿日期:2005-10-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200363); 辽宁省博士启动基金资助项目(2001102042)

作者简介:宋洪涛(1968—),男,山东肥城人,博士,主任药师,主要从事药剂学方面的研究。

Tel: (0591) 83707254 E-mail: sohoto@sohu.com

红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,具有活血通经、祛瘀止痛的功效,是传统的活血化瘀中药。红花活血的有效成分主要集中于水溶性的红花黄色素(safflor yellow, SY),SY 为查耳酮类化合物,具有抑制血小板聚集、抑制血栓形成、扩张血管、改善心肌缺血、降血压、抗氧化、抗炎镇痛等作用^[1,2]。虽然已有研究报道了红花中 SY 的提取纯化方法^[3~5],但尚存在不少问题。本实验采用大孔吸附树脂法对红花提取物进行了纯化富集,并对纯化条件进行了筛选优化。

1 仪器与材料

UV—2501PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津);ZFQ85A 型旋转式蒸发仪(上海医械专机厂);HZQ—C 型空气浴振荡器(哈尔滨市东联电子科技发展有限公司);668 型真空干燥箱(大连第四仪表厂)。

红花购自沈阳市药材公司,经鉴定为菊科植物红花 *C. tinctorius* L. 的干燥花;红花黄色素 A 对照品(中国药品生物制品检定所);红花黄色素(日本旭化成株式会社);大孔吸附树脂(D-101、D-201、D-301 型购自天津农药股份有限公司,HPD 系列及 D900 型购自河北省沧州宝恩化工有限公司);聚酰胺薄膜(浙江台州市路桥四青生化材料厂); α -萘酚(中国医药集团上海化学试剂公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的建立:精密称取红花黄色素 A 对照品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取该液适量,加水配成一系列质量浓度的对照品溶液,在 401 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)对红花黄色素 A 质量浓度(C, $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归,结果表明,红花黄色素 A 在 2.5~15 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度线性关系良好,回归方程为 $C=23.07 A-0.1256$, $r=0.9999$ 。

2.2 红花水提液的制备:称取红花药材 100 g,加 14 倍量水,浸泡 30 min,加热提取,药渣再加 12 倍水提取,每次 20 min^[3]。合并提取液,滤过,将滤液减压浓缩至提取液含生药 0.1 g/mL,滤过,滤液备用。临用前,于 401 nm 波长处测定吸光度,计算红花黄色素(SY)的质量分数。

2.3 清洗终点与洗脱终点的判断

2.3.1 清洗终点的判断:采用 Molish 反应。吸取 1 mL 清洗液,加 5% α -萘酚乙醇溶液 3 滴,摇匀。沿试管壁缓缓加入 0.5 mL 浓硫酸,如在试液与硫酸的交界面处,很快形成紫色环,表明有还原糖类、多糖

或苷类的存在。以 Molish 反应阴性作为清洗终点。

2.3.2 洗脱终点的判断:采用 TLC 检查法^[5]。吸取洗脱液,点样于聚酰胺薄膜上,以醋酸乙酯-甲醇-3.6%盐酸(1:3:6)为展开剂于密闭容器内上行展开,以在 254 nm 紫外灯下观察无荧光斑点作为洗脱(SY 解吸)终点。

2.4 吸附条件的选择

2.4.1 树脂的选择:精密称取各种干树脂 0.5 g,置锥形瓶中,加入 SY 水溶液(5 mg/mL) 40 mL,放入恒温(25 $^{\circ}\text{C}$)摇床中振荡 24 h。取滤液于 401 nm 处测定溶液中 SY 质量浓度。将吸附平衡后的树脂转移至色谱柱中,用 50%乙醇解吸,测定解吸液中 SY 质量浓度。按下式计算吸附量和解吸率。结果(表 1)表明,各种大孔吸附树脂的吸附量与解吸率均不同,其中 HPD400A 型吸附量较大,且解吸率较高。故本实验选用 HPD400A 型大孔吸附树脂。

吸附量 = 溶液体积 $\times$ (吸附前溶液质量浓度 - 吸附后溶液质量浓度) / 干树脂质量

解吸率 = (洗脱液的平衡质量浓度 $\times$ 洗脱液体积) / (吸附量 $\times$ 树脂质量) $\times 100\%$

表 1 不同类型大孔树脂对 SY 的静态吸附量及解吸率

Table 1 Adsorption ratio and elution ratio of SY in various kinds of resin

树脂 型号	吸附量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	解吸 率/%	树脂 型号	吸附量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	解吸 率/%
D-101	193	84.2	HPD450	185	89.9
D-201	152	95.1	HPD500	194	86.3
D-301	179	93.4	HPD600	149	92.1
HPD100	222	88.0	HPD700	179	78.7
HPD300	229	94.2	HPD750	207	97.0
HPD400	206	90.3	HPD800	168	94.6
HPD400A	237	96.1	D900	281	6.9

2.4.2 药液 pH 值对 SY 泄漏曲线的影响:取 HPD400A 型干树脂 3.0 g 湿法装柱(内径 7 mm),将 2 mg/mL SY 水溶液分别调 pH 值为 1.0、2.0、3.0、5.0、7.0,然后分别以 6 BV/h 的流速通过树脂柱,分段收集流出液。以流出液的相当于床体积的倍数(倍床体积, BV)与流出液中 SY 的浓度作图,结果(图 1)表明,溶液 pH 值对 SY 的吸附有显著影响,随着 pH 值的增加,SY 在树脂上的吸附力及吸附速度显著减小,当 pH 值大于 5.0 时,SY 水溶液极易穿透树脂床,当 pH 值为 2.0 时,SY 即可在树脂床上产生较好的吸附。

2.4.3 上柱吸附体积流量对 SY 保留率的影响:将红花水提液调节 pH 值为 2.0,精密吸取 7.5 mL 分别以 2、4、6、8、10 BV/h 的体积流量上柱吸附,收集

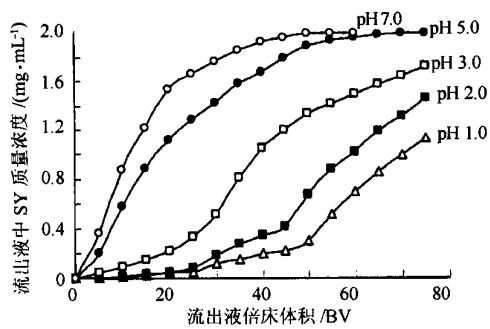


图 1 溶液 pH 值对 SY 泄漏曲线的影响
Fig. 1 Effects of solution pH value on SY leakage curves

流出液,静置 1 h。然后用 16 BV 的 pH 2.0 水溶液以 10 BV/h 进行清洗,收集流出液。合并 2 次的流出液,测定 SY 的质量浓度,计算 SY 在树脂柱上的保留率。结果(表 2)表明,上柱吸附体积流量过快,SY 损失较大,当吸附体积流量小于 4 BV/h 时,SY 保留率较高。

表 2 上柱吸附体积流量对 SY 保留率的影响
Table 2 Effects of adsorption flow speed on SY reservation ratio

上柱吸附体积流量/(BV · h ⁻¹)	SY 保留率/%
2	95.5
4	95.1
6	91.5
8	86.0
10	76.3

2.4.4 树脂药材比对 SY 转移率的影响:调整红花水提液的上柱量,使树脂药材比(干树脂与水提液中红花药材的质量比)分别为 4 : 1、2 : 1、1 : 1、0.5 : 1、0.25 : 1,以 50%乙醇溶液作为洗脱溶液,在 10 BV/h 下进行解吸,收集洗脱液,测定 SY 的质量浓度,计算 SY 的转移率。结果(表 3)表明,树脂药材比在 4 : 1~2 : 1 时,SY 保留率较高,考虑到树脂药材比越小,上柱时间越长,为减少上柱时间,确定树脂药材比为 4 : 1。

表 3 树脂药材比对 SY 转移率的影响
Table 3 Effects of ratio of resin to crude drug on SY transferring ratio

树脂药材比	SY 转移率/%	树脂药材比	SY 转移率/%
4 : 1	90.2	0.5 : 1	81.1
2 : 1	90.0	0.25 : 1	68.2
1 : 1	87.4		

2.4.5 树脂径高比对 SY 转移率的影响:取不同量的干树脂湿法装柱,使径高比分别为 1 : 3、1 : 6、1 : 9、1 : 12,按树脂药材比为 4 : 1,精密吸取红花提取液上柱,清洗后洗脱,收集洗脱液,测定 SY 的

质量浓度,计算 SY 的转移率。结果(表 4)表明,树脂柱径高比在 1 : 6~1 : 12 时,SY 的转移率均较高,考虑到工业化生产的可行性,径高比确定为 1 : 6~1 : 9 较为妥当。

表 4 树脂径高比对 SY 的转移率的影响
Table 4 Effects of ratio of diameter to height of resin column on SY transferring ratio

树脂径高比	SY 转移率/%	树脂径高比	SY 转移率/%
1 : 3	85.3	1 : 9	91.2
1 : 6	90.5	1 : 12	90.1

2.5 清洗条件的选择

2.5.1 清洗液 pH 值对 SY 保留率的影响:取 3.0 g 干树脂湿法装柱,将红花水提液调节 pH 值为 2.0,精密吸取 7.5 mL 以 4 BV/h 的体积流量上树脂柱吸附,静置 1 h。然后,分别用 16 BV/h 的 pH 2.0、4.0、6.0 和 8.0 的水溶液以 10 BV/h 进行清洗,收集流出液,测定 SY 的质量浓度,计算 SY 在树脂柱上的保留率,结果(表 5)表明,随着清洗液 pH 值的提高,SY 的损失越大,采用 pH 2.0 水溶液清洗杂质较为合适。当 pH 2.0 清洗液用量为 16 BV 时,即可将多糖等杂质基本清洗除净。

表 5 清洗液 pH 值对 SY 保留率的影响
Table 5 Effects of cleaning agent pH value on SY reservation ratio

清洗液 pH 值	SY 保留率/%	清洗液 pH 值	SY 保留率/%
2.0	93.1	6.0	49.2
4.0	64.0	8.0	29.1

2.5.2 清洗液体积流量 SY 保留率的影响:装柱及上样方法同 2.5.1 项下方法。用 16 BV 的 pH 2.0 水溶液分别以 2.5、5、10、20、30 BV/h 的流速进行清洗,收集流出液。测定 SY 的质量浓度,计算 SY 在树脂柱上的保留率。结果(表 6)表明,清洗体积流量在 2.5~20 BV/h 时,SY 的保留率均较高。具体操作时,为加快实验进程,可在清洗液流速控制范围内适当增大清洗流速。

表 6 清洗液体积流量对 SY 的保留率的影响
Table 6 Effects of cleaning agent flow speed on SY reservation ratio

清洗液体积流量/(BV · h ⁻¹)	SY 保留率/%
2.5	90.1
5	91.4
10	92.3
20	91.0
30	88.4

2.6 洗脱条件的选择

2.6.1 不同洗脱液对 SY 转移率及其洗脱曲线的影响:装柱、上样及清洗方法同 2.5.2 项下方法。分

别用 15%、30%、50%、70% 乙醇溶液以 10 BV/h 的流速进行解吸,收集洗脱液,测定 SY 的质量浓度,计算 SY 的转移率。结果(表 7,图 2)表明,当乙醇体积分数大于 50% 时,对 SY 具有较高的洗脱能力,但随着乙醇体积分数的增加,溶液颜色明显变深,说明已将许多有色杂质洗下。因此以 50% 乙醇作为洗脱液较为妥当。

表 7 不同体积分数乙醇溶液对 SY 转移率的影响
Table 7 Effects of various alcohol concentration on SY transferring ratio

洗脱液	SY 转移率/%	洗脱液	SY 转移率/%
15% 乙醇	51.2	50% 乙醇	91.7
30% 乙醇	84.2	70% 乙醇	91.6

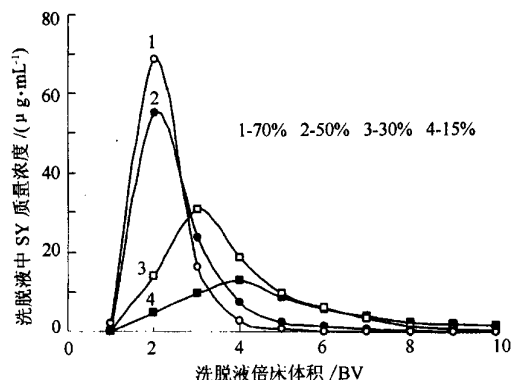


图 2 不同体积分数乙醇溶液对 SY 洗脱曲线的影响
Fig. 2 Effects of various alcohol concentration on SY elution curves

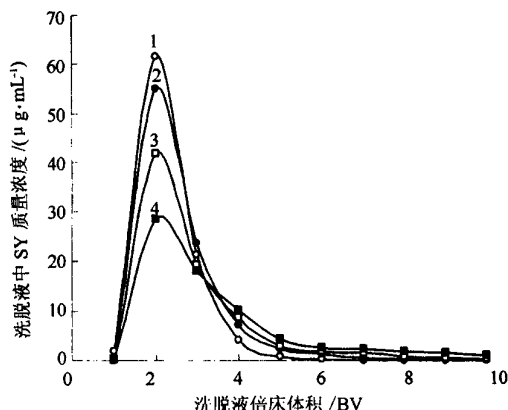
2.6.2 洗脱液体积流量对 SY 转移率及其洗脱曲线的影响:装柱、上样及清洗方法同 2.5.2 项下方法,50% 乙醇溶液作为洗脱溶液,分别以 5、10、20、30 BV/h 的流速进行解吸,收集洗脱液,测定,计算 SY 的转移率。结果(表 8,图 3)表明,SY 的洗脱流速控制在 10 BV/h 以下较好。

表 8 洗脱液体积流量对 SY 转移率的影响
Table 8 Effects of elution agent flow speed on SY transferring ratio

洗脱体流量/(BV·h ⁻¹)	SY 转移率/%
5	90.9
10	91.7
20	78.1
30	70.4

2.7 大孔吸附树脂法与乙醇沉淀法的比较

2.7.1 传统的水提乙醇沉淀法:将红花水提液减压浓缩至质量浓度约为 1 g 生药/mL,调 pH 值至 2.0,缓慢搅拌下加入一定量 95% 乙醇,使药液乙醇体积分数升为 65%,抽滤。滤液再加一定量 95% 乙醇,使药液乙醇体积分数升为 85%,抽滤。减压浓缩



1-5 BV/h 2-10 BV/h 3-20 BV/h 4-30 BV/h
图 3 洗脱液流速对 SY 洗脱曲线的影响
Fig. 3 Effects of elution agent flow speed on SY elution curves

后置真空干燥箱内干燥,称质量,精密称取适量测定 SY 的质量分数。计算固形物收率,固形物中 SY 的质量分数,SY 的转移率,结果见表 9。

表 9 乙醇沉淀法与大孔吸附树脂法纯化效果的比较
Table 9 Comparison of purification effects between macroporous resin method and alcohol sedimentation method

方 法	SY 转移率/%	固形物中 SY/%	固形物得率/%
乙醇沉淀法	88.3	10.7	30.9
大孔树脂法	88.8	27.5	11.9

2.7.2 大孔吸附树脂纯化法:取 100 g 干树脂湿法装柱,树脂径高比为 1:6,将红花水提液(0.1 g 生药/mL)调节 pH 值为 2.0,按树脂药材比为 4:1 精密量取适量,以 4 BV/h 的流速上柱吸附,静置 1 h 后,用 pH 2.0 水溶液以 10 BV/h 的流速进行清洗。然后,用 50% 乙醇溶液以 10 BV/h 的体积流量进行解吸,收集洗脱液,减压浓缩后置真空干燥箱内干燥,称质量,精密称取适量测定 SY 的质量分数。计算固形物收率,固形物中 SY 的质量分数,SY 的转移率。结果(表 9)表明,采用大孔吸附树脂法纯化,SY 的转移率稍高于乙醇沉淀法,固形物中 SY 的质量分数约为乙醇沉淀法的 2.7 倍,固形物的质量(固形物得率)仅为乙醇沉淀法 38.5%。可见,大孔吸附树脂法使红花提取物得到了更好地富集和纯化。

3 讨论

3.1 不同厂家不同型号的大孔吸附树脂对 SY 的吸附量与解吸率均不同,其中 HPD400A 型吸附量较大,且解吸率较高。本实验选用 HPD400A 型大孔吸附树脂作为红花中 SY 的吸附纯化树脂。

3.2 红花水提液的 pH 值约为 5,在该 pH 值下,溶

液中的 SY 极性较强,在树脂上吸附较慢,且吸附力较弱,极易穿透树脂床,造成 SY 的泄漏。pH 值越高,泄漏越严重。因此,上样前需调节 pH 值至 2.0,以降低 SY 的极性,增加 SY 在树脂上的吸附,减少泄漏。此外,SY 在树脂床上的吸附需要有一个过程,若药液的上柱吸附体积流量过快,部分 SY 未及吸附就会泄漏,因此,应适当控制吸附体积流量。本实验结果表明,当吸附体积流量为 4 BV/h 时,即可保证 SY 较高的保留率。具体实验时,由于红花水溶液具有颜色,也可通过肉眼观察,调节流速,控制大孔树脂柱色带在整个树脂柱的 2/3 以内,也可保证 SY 具有较高的保留率。

3.3 由于 pH 值会显著影响 SY 的极性,因此,在水溶液清洗杂质时,应调节其 pH 值至 2.0 为宜,以保证在清洗杂质的同时不至于造成 SY 的过多流失。清洗液的体积流量亦不宜太快,以在 10~20 BV/h 为宜。

3.4 树脂药材比是影响 SY 转移率的重要因素,树脂药材比值过小,会引起药量超载,使药物泄露流失,降低保留率。树脂药材比值越大,保留率越高,但过大会造成上柱时间的延长,增加成本。本实验结果表明,树脂药材比为 2:1~4:1 即可。

3.5 树脂的径高比对 SY 的转移率亦有较大影响,在树脂柱直径一定的条件下,树脂高度越高,柱效越高;太低则柱效过低,SY 的吸附路径短,容易造成泄漏。本实验结果表明,树脂柱径高比在 1:6~1:12 时,SY 的转移率均较高,考虑到工业化生产的可行性,径高比确定为 1:6~1:9 较为妥当。

3.6 随着洗脱用乙醇体积分数的提高,SY 的洗脱率与洗脱速率逐渐增大,但杂质也随着增加,说明高体积分数乙醇对 SY 的分离效果较差。因此,在保证洗脱率较高的条件下,应选用较低体积分数的乙醇溶液,以减少脂溶性杂质,提高洗脱液的纯度。但体积分数太低,洗脱速度过慢,洗脱液用量大,同时鉴于洗脱终点检查的灵敏度,可能会造成洗脱不完全,因此,应选择一个适中的体积分数。本实验结果表明,以 50%乙醇作为洗脱液即可达到较好的洗脱效果。洗脱液流速对 SY 的洗脱亦有显著影响,过快会导致 SY 来不及解吸附而造成损失,本实验结果表明,洗脱流速控制在 10 BV/h 以下较好。

3.7 在优化条件下,采用大孔吸附树脂法纯化红花提取物,SY 的转移率为 88.8%,与乙醇沉淀法相当,固形物中 SY 的质量分数约为乙醇沉淀法的 2.6 倍,固形物的质量(固形物得率)仅为乙醇沉淀法 38.5%。可见,大孔树脂法对 SY 的富集与纯化效果远优于乙醇沉淀法,值得在生产中推广使用。

3.8 大孔吸附树脂由于具有良好的分离纯化性能及稳定性,在中药成分精制纯化中的应用越来越广泛^[6]。有文献采用大孔树脂法对红花中的 SY 进行过纯化研究^[4,5],但由于纯化条件考察的不够全面,特别是未对上柱药液及清洗液的 pH 值进行考察,造成 SY 在上柱及清洗过程中的损失,致使 SY 的转移率不够理想。因此,在实际应用大孔树脂纯化的过程中,应详细了解待分离成分的理化性质,对树脂的种类,药液的 pH 值,上柱吸附体积流量,树脂药材比,树脂柱径高比,清洗液的 pH 值、用量及体积流量,洗脱液的种类、用量及体积流量,清洗终点与洗脱终点的判断等纯化条件进行具体研究,以期提高其纯化效果和目标成分的转移率。

3.9 大孔树脂法对多糖和蛋白多肽类成分的除去效果较好,但对鞣质的除去效果较差。在本实验的纯化条件下,SY 质量分数只有 27.5%,尚不太高,有待于进一步优选纯化条件或与其他纯化方法联合应用,以期在保证获得较高转移率的前提下进一步提高其纯度。

References:

- [1] Nie Q R. Recent research on pharmacokinetics and pharmacological action of safflor yellow [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14 (8): 503-505.
- [2] Yang Z F, Mei Q B, Jiang Y P. Effective component and pharmacological action of *Flos Carthami* [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2001, 16 (3): 131-133.
- [3] Zhou P L, Xia X H. Studies on extract techniqgxe of safflor yellow [J]. *J Hunan Coll Tradit Chin Med* (湖南中医学院学报), 2004, 24 (1): 11-12.
- [4] Chen Y Z, Zhang J X, Lü Z F. Studies on separation technique of safflor yellow A in *Flos Carthami* [J]. *J Chin Mater Med* (中药材), 2004, 27 (9): 645-647.
- [5] Jin M, Gao Z C, Li J R, et al. Preparation of safflor yellow and hydroxysafflor yellow A by macroporous resin column chromatography [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (1): 25-28.
- [6] Hu J, Zhou Y H. Application of macroporous resin in the purification of Chinese herbs [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24 (2): 127-130.