

顺式和反式番红花甙的高效液相色谱分离及活性研究

李 娜 林 鸽¹ Geroge C. Y. Chiou² 闵知大

(中国药科大学天然药物化学教研室, 南京 210038;

香港中文大学; 美国德克萨斯州农工大学)

摘要 报道了用分段改变洗脱液浓度的方法, 将反式番红花甙和顺式番红花甙类化合物进行 HPLC 分离。本法以 Nova-Pak C₁₈ (3.9 mm×150 mm, 4 μ)柱为固定相, 甲醇-水 (1% HAc) 1 ml/min 进行梯度洗脱, 在 440 nm, 308 nm, 250 nm 波长下同时检测, 番红花酸 (crocin) 四种反式番红花甙 (trans-crocins) 和顺式番红花甙 (cis-crocins) 得到了较好的分离。用视网膜电镜法观察了大鼠视网膜中心动脉缺血后, 番红花酸和番红花甙对血流量恢复的影响。

关键词 番红花甙; HPLC; 视网膜电镜法; 分离; 药理活性

番红花 (*Saffron*) 为鸢尾科 (*Iridaceae*) 番红花属 (*Crocus L.*) 植物番红花 (*Crocus sativus L.*) 的干燥柱头, 又名藏红花, 西红花。用做香料, 染料, 医学上也常用作镇痉药, 通经药, 具有活血化瘀, 凉血解毒, 解郁安神的作用。近年研究发现还具抗自由基氧化和抗癌等作用^[1]。

番红花中的主要成分为一系列的胡萝卜甙类化合物, 为番红花酸 (crocin) 与不同糖结合而成的酯甙, 结构见图 1。它们是番红花的主要活性成分, 分离具有极重要的意义。但由于它们的极性较大, 且结构差异较小, 有时仅是一个糖的差异, 因而分离难度较大。本文应用高效液相色谱法, 以 Nova-Pak C₁₈ (3.9 mm×150 mm, 4 μ) 柱为固定相, 甲醇-水 (1% HAc) 1 ml/min 进行梯度洗脱。将洗脱过程分为三个时间段, 每阶段的洗脱液浓度梯度的递增速度各异。本法可将顺式和反式番红花甙逐一分开, 分离度好, 时间短。本文用视网膜电镜法观察了大鼠视网膜中心动脉和睫状体动脉结扎 30 min 后, 放开结扎, 番红花甙 1 (crocin 1) 和番红花酸 (crocin) 对视网膜电镜图 b 波恢复的影响, 观察到大鼠视网膜动脉缺血后, 使用番红花甙和番红花酸均使血流量得到较好的恢复。

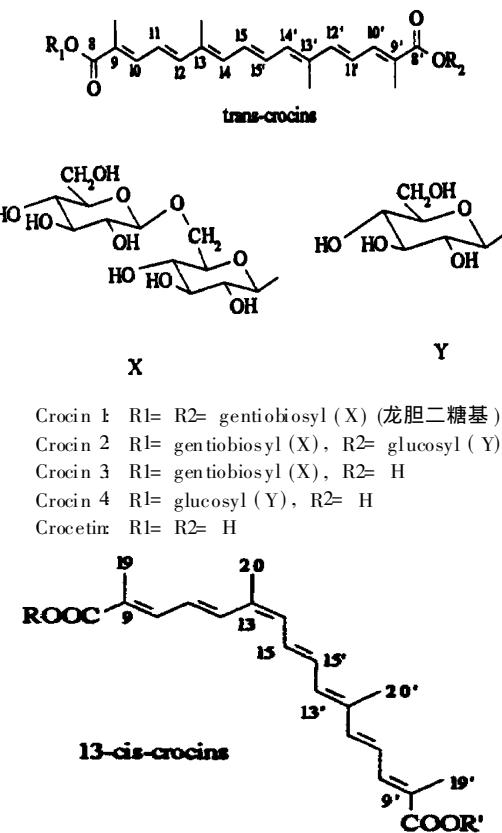


Fig. 1. Structures of crocetin and crocins

1 高效液相色谱分离

1.1 仪器与试剂

仪器 Helwett Packard 1100高效液相色谱仪;紫外可见光电二极管检测器(UV-VIS DAD检测器);Nova-Pak C₁₈(3.9 mm×150mm, 4μm)柱,前加C₁₈预柱。

1.1.2 试剂 甲醇: 色谱纯; 双蒸水: 自制; 冰醋酸: 分析纯

1.1.3 药品 番红花酸及番红花甙对照品: 从番红花中分离得到, 通过¹H NMR, ¹³C NMR, MS, UV, IR鉴定了它们的结构, 并经高效液相色谱法测定其纯度在98%以上。

番红花: 伊朗进口, 经生药学李萍教授鉴定为鸢尾科番红花属植物番红花。

1.2 方法

取番红花酸及各番红花甙对照品, 用甲醇配成对照品溶液, crocin 1, crocin 2, crocin 3的浓度均为0.5 mg/ml, crocin 4和crocin的浓度为0.2 mg/ml, 在下列条件下进行高效液相色谱测定。

HPLC系统: Helwett Packard 1100高效液相色谱仪, 紫外可见光电二极管检测器。

色谱柱: Nova-Pak C₁₈(3.9 mm×150 mm, 4 μm)柱, 柱前加C₁₈预柱。

流速: 1.0 ml/min

检测波长: 440 nm, 308 nm, 250 nm

进样量: 5 μl

流动相: 将流动相中甲醇的浓度梯度递增速度分为三个时间段, 如表所示

Tab 1. The mobile phase of HPLC

t(min)	M ethanol(%)	E% Ethanoic acid(%)
0	40	60
1	40	60
6	55	45
23	75	25
25	90	10
30	90	10

从表中可以看出: 1~6 min 甲醇浓度在5 min内从40%增加到55%, 递增速度为每分钟3%, 番红花甙出峰

6~23 min 甲醇浓度在17 min内, 从55%增加到75%, 递增速度为每分钟1.3%, 在此阶段番红花甙2, 3, 和番红花酸得到较好分离。

23~30 min 甲醇浓度在前两分钟内按7.5%的速度递增, 并维持5 min, 是为了在测定提取物时极性小的成分尽快被洗脱下来, 缩短了分析时间。

1.3 结果

分离结果见图2

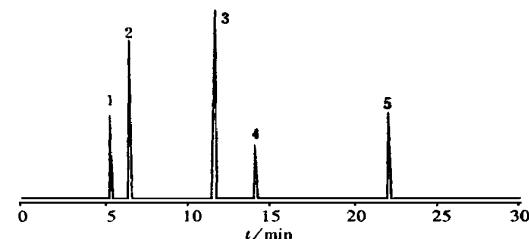


Fig 2. HPLC of crocetin and crocins at 440 nm

1. crocin 1; 2. crocin 2; 3. crocin 3; 4. crocin 4; 5. crocetin

2 番红花提取物的高效液相色谱分离

2.1 提取方法

将番红花药材研碎, 称20 mg, 置具塞试管内, 加入80%甲醇5 ml, 在室温避光搅拌下提取2 h, 微孔滤膜过滤, 滤液直接进行高效液相色谱测定。

2.2 结果

据文献报道^[2~3], 番红花甙类化合物的紫外图谱中, 最大吸收在波长458 nm, 440 nm, 250 nm左右, 其中458 nm, 440 nm为特征吸收峰, 若在308 nm处也有吸收, 则说明为13-顺式番红花甙。

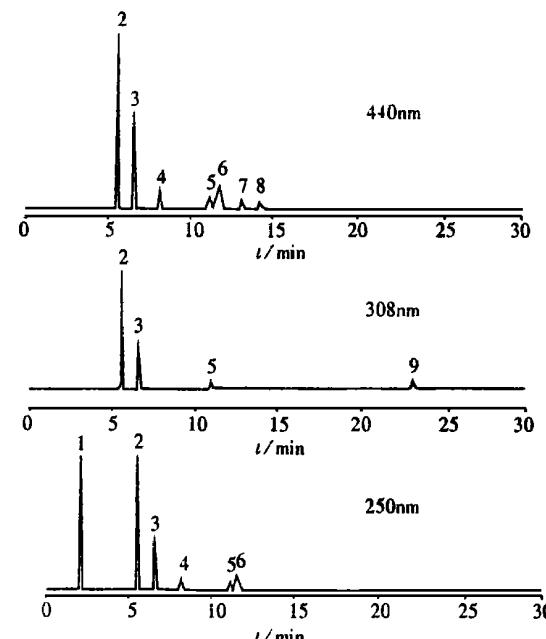


Fig 3. HPLC of saffron extract

2. crocin 1; 3. crocin 2; 6. crocin 3; 8. crocin 4; 5 and 7. cis-crocins; 4. trans-crocins; 1, 9. unidentified

本文同时应用三种波长进行测定,得到三个图谱,见图3。从波长440 nm的图谱可以看出,共出现七个峰,峰2,3,6,8为反式番红花甙,峰4和7为顺式番红花甙,番红花酸因含量太低,未能检测到。在波长308 nm的图谱中,由于紫外光谱位移远离反式番红花甙的最大吸收峰440 nm,只有含量较大的番红花甙和2可以看到吸收峰,番红花甙3和4未见到吸收峰,而峰7的顺式番红花甙的出现很明显,用来分离和测定顺式番红花甙较为有利。在波长250 nm,出现一丰度较高的峰1,因没有标准品,而未能确定它的结构。

3 药理实验

采用视网膜电镜法^[4],结扎大鼠视网膜中心动脉和后睫状体动脉,使视网膜电镜图的b波消失,造成视网膜缺血模型,然后给予番红花甙和番红花酸,观察它们对b波恢复的影响。

3.1 仪器

视网膜电镜仪 LKC Technologies INC.
(Gaithersburg, US, MD)

3.2 动物

Long-Evans大鼠(雌性,200~250 g)

3.3 方法

将大鼠麻醉后,结扎视网膜中心动脉和后睫状体动脉30 min,视网膜电镜图的b波消失,放开结扎,于腹腔注射空白液(一般4 h内,b波恢复40%

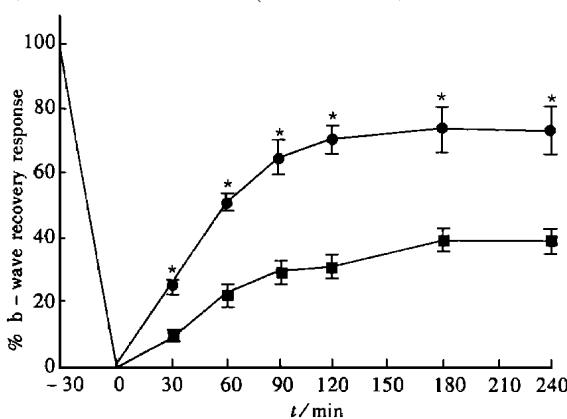


Fig. 4. Effects of Croci-1(10mg /kg, ip) on recovery of ERG b-wave after 30 min occlusion of central retinal artery in rat eyes. Each point is a mean of 6 values from 6 animals and bars represent SE. Stars indicate significant difference from corresponding control (DMSO) at $P < 0.05$.

—□— DMSO; —●— Crocetin 1 (10 mg /kg)

左右),按相同方法,注射药液后,于0,30,60,90,

120,180和240 min 观察视网膜电镜图的b波,与空白比较,若b波增高,b波恢复在60%以上,空白恢复低于40%以下,说明该药物对血流量的增加有意义。

3.4 结果

结果见图4和5。由图4可知,番红花甙1 b波恢复在70%以上,持续时间在240 min以上,120~240 min间出现一个平稳态势。从图5知番红花酸b波恢复也在70%以上,说明二者对视网膜缺血状态的血流量都可以具有较好的恢复能力。两者对血流量恢复的能力无明显差别。

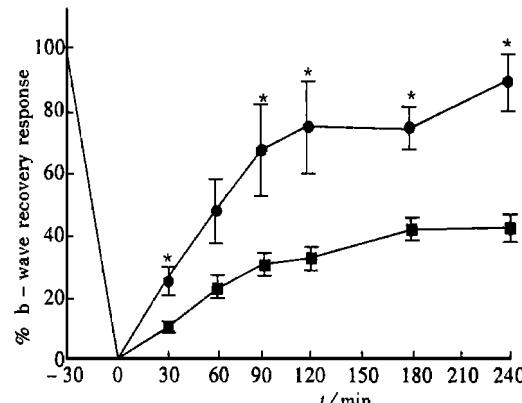


Fig. 5. Effects of Crocetin (10mg /kg, ip) on recovery of ERG b-wave after 30 min occlusion of central retinal artery in rat eyes. Each point is a mean of 6 values from 6 animals and bars represent SE. Stars indicate significant difference from corresponding control (DMSO) at $P < 0.05$

—□— DMSO; —●— Crocetin 1 (10 mg /kg)

参 考 文 献

- Rios JL, Recio MC, Giner RM. An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*, 1996, **10**: 189
- Petros A, Tarantilis, Moschos Polissiou, Michel Manfait. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocin and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 1994, **664**, 55
- Petros A Tarantilis, George Tsoupras, Moschos Polissiou. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1995, **699**, 107
- Chiou GCY, Li B HP. Effects of dopamine antagonists on retinal b-wave recovery after retinal ischemia. *Journal of Ocular Pharmacology*, 1993, **9**, 179

Separation of *Trans*- and *Cis* Crocin in Saffron Using HPLC and Study on Their Pharmacological Activities

Li Na, Lin Ge¹, Chiou G. C. Y.², Min Zhida

Department of Natural Products Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038; ¹The Chinese University of HongKong; ²Texas A & M University College of Medicine, USA

Abstract Crocins are the major components in saffron. They are the esters of crocetin ($8,8'$ -diapo Ψ,Ψ' -carotenedioic acid) and it's very difficult to separate them. HPLC was used to separate *trans*- and *cis*-crocin in this paper. The conditions of HPLC were Nova-Pak C₁₈(3.9 mm× 150 mm, 4 μ) column; Methanol-H₂O(1% HAc) as mobile phase in which the concentration of methanol was changed at different rates in three parts; Detection wavelength is 440 nm, 308 nm, 250 nm. *Trans*- and *cis*-crocins were separated at shorter time. Crocin 1 and crocetin were found to significantly increase the blood flow in the retina and choroid and to facilitate retinal function recovery by electroretinography.

Key words Crocins; HPLC; Electroretinography; Separate; Pharmacological activity

文摘 039 雷公藤总甙(T_{II})中雷藤氯内酯醇的高效液相色谱分析 张胜强,余启明,宋燕玲等.中国药师,1998,1(1): 31~ 32

建立了雷公藤总甙(T_{II})中雷藤氯内酯醇的高效液相色谱分析方法。采用 μ-Bondapak C₁₈柱和4%甲醇-水流动相,紫外检测波长219 nm 考察了雷藤氯内酯醇的稳定性,雷藤氯内酯醇在0.5~ 10.0 μ g /ml范围内线性良好,回收率在98%~ 101%之间。

文摘 040 脉络宁注射液对不同动物模型缺血性脑损伤的保护作用 杨 平,王晓雷,戴德哉等.中国临床药学杂志,1998,7(6): 290~ 293

目的: 观察对以泊路沙姆为助溶剂的脉络宁新注射液(P-脉络宁)对缺血性脑损伤的保护作用。方法: 测定 P-脉络宁注射液对不同缺血模型及血液流变学的作用。结果: 脉络宁注射液能明显降低家兔的全血比粘度; 血浆比粘度及红细胞比容; 并能明显缩小小鼠大脑中动脉阻断(M CAO)

后引起的脑梗死范围,降低毛细血管通透性、脑含水量和脑指数。结论: P-脉络宁可以通过改善上述各指标,有效地保护缺血引起的脑损伤;而助溶剂则无此脑保护作用。

文摘 041 家蚕细胞基因工程人 α₁干扰素在离体培养的 HL₆₀, KB细胞上与其他化疗药物之间的相互作用 王秋娟,李 放,王 等.中国药师,1998,2(1): 2

探讨了离体细胞中家蚕细胞基因工程人 α₁干扰素(rh IFN-α₁)与某些肿瘤药物的相互作用。这些药物包括环磷酰胺 8.3 μ g·mL⁻¹、盐酸阿霉素 0.008 μ g·mL⁻¹和5-氟尿嘧啶 6.2 μ g·mL⁻¹。观察它们与 rh IFN-α₁在 HL₆₀以及 KB细胞中的作用。研究发现 rh IFN-α₁以及3个化学药物单独使用能明显降低细胞的增殖数目及活细胞数($P < 0.01$),但是,它们相互合用不表现为协同作用,而表现为亚相加或相加作用,甚至在 HL₆₀细胞中,150 IU·mL⁻¹的 rh IFN-α₁与5-氟尿嘧啶 6.0 μ g·mL⁻¹合用呈拮抗作用。