

中药红花有效成分的开发研究

徐 蓉 徐志南¹ 田 军¹ 岑沛霖¹ (杭州 310027 杭州中美华东制药有限公司技术质量部;¹ 浙江大学化工与生物工程系技质部)

红花(*Carthamus tinctorius*, L)是菊科 1~2 年生草本植物,广泛分布于我国四川、河南、江浙等地,至今已有 2100 年的栽培历史。红花有多种广泛使用的功效成分,如红花色素、红花油等,是一种重要的经济作物和传统中草药。近年来,针对红花的多种药效作用,国内外研究者从多个角度研究了红花的成分分析鉴定、药理药效、提取纯化以及红花植物细胞培养,形成了中草药研究的一个热点。

1 红花的主要成分

红花分布较广,全世界有 50 多个国家和地区有红花分布,我国则有 26 个省市有红花分布。不同地区红花资源中化学成分有较大区别,主要表现在含油量的差异。红花的成分比较复杂,主要活性成分有黄色素、腺苷、亚油酸、棕榈酸和油酸以及蛋白质等。有关情况介绍如下:

1.1 红色素与黄色素

1.1.1 结构分析

迄今为止,红花红色素通常被认为由红花素(I)和几种黄色素组成,通过 TLC 方法分析,红花黄色素有三种组分^[1]。红色素的组分有一个共同的醌苯基苯乙烯酮(C)配醌结构^[2]。

1.1.2 含量分析

红花中红色素含量不高,红花干花中一般含量为 0.4~0.6%,而花色素含量较高,一般含黄色素 20~36%,且属水溶性,不溶于水而溶于碱中的黄色素含量为 2.1~6.1%。

1.1.3 功效作用

(1)作染料、化妆品等的添加剂。从卫生保健的角度看,人工合成的黄色素对人体有较大的副作用,所以,从植物中

提取黄色素势在必行。从红花中提取的黄色素,其亮度是日落黄色的13.7倍^[1],它可用作食用天然色素;从红花中提取的红色素经处理后可制成色泽范围从玫瑰到樱桃红的染色剂,可用于口红、胭脂等高档化妆品。

(2)治疗作用:红花黄色素具有明显地提高缺氧耐受力,使冠脉扩张,增大冠脉流量,并具有抗凝血、降压作用。红花黄色素Ⅱ有一定的 Ca^{2+} 拮抗作用^[3],可以用于治疗冠心病。

1.2 红花油

1.2.1 组成和含量

红花含油量为20~44%,其亚油酸含量是已知植物中最高的,约为70~85%。

1.2.2 功效和作用

红花油是优质食用油;另外,还可作药用,用于治疗动脉粥样硬化,防止原发性脂肪酸缺乏症等。

1.3 生育酚(维生素E)

1.3.1 组成和含量

生育酚类化合物主要有 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚四种类型,其中以 α -生育酚的活性最强。红花细胞中主要含 α -生育酚(70~90%左右),其次为 β -生育酚,没有发现 γ 、 δ -生育酚。

1.3.2 功效和作用

生育酚具有强的抗氧化性能并有防止衰老和防老年病的作用,因而在医药、食品和化妆品工业方面需求量很大。

2 红花的药理研究

2.1 治疗冠心病

用钙跨膜流动测定方法表明,红花对静息 Ca^{2+} 内流作用不明显,没有阻滞作用,而对受体操纵钙通道(ROC) Ca^{2+} 有阻滞作用,并对电压依赖钙通道(PDC) Ca^{2+} 有较强的阻滞作用。这说明,红花具有钙拮抗作用,阻滞ROC、PDC Ca^{2+} 的内流可能是红花治疗冠心病的机理之一^[4]。

2.2 降血压作用

红花黄色素是从红花中提取的查尔酮类化合物,具有急性降压,可使血压降低2~3Kpa,并有抗凝血、抗缺氧等作用。研究表明,红花黄色素的降压作用可能是通过抑制肾素-血管紧张素系统来实现的^[5]。同时,红花提取物可扩张冠脉,增加缺血心肌的血流量,这也可能与改善心肌缺血作用有关^[6],从而降低血压。

3 红花功效成分的提取分离

3.1 红花油的提取工艺

用传统的压榨提取法。

3.2 红花黄色素和红色素的提取分离

3.2.1 溶剂的选择

一般来说,前体红花素(precarthamin)难以释放,把红花捣碎后,前体红花素就比较容易释放出来了^[7],但是捣碎对红花黄色素的提取有一定副作用^[8]。丙酮是一种比较好的萃取溶剂,其萃取效率很高,但随丙酮用量的增加,萃取得率迅速下降;乙醇可以加速前体红花素的释放,但效果不明显^[7]。非极性溶剂对前体红花素的提取不利,采用醋酸和氨水有可能增加其收率^[8]。

3.2.2 提取方法

a)传统的提取法

干燥红花加水于50℃下浸渍,水液减压浓缩后加乙醇沉淀,然后去沉淀加水溶解,并除去不溶物,澄清液通过Sephadex LH-20柱层析,水为洗脱剂,反复处理纯化就可以得到粉末状的黄色素,水浸后的药渣加稀碳酸钠溶液浸泡,浸出液减压浓缩至适量,加酒石酸酸化,过滤,溶于适量甲醇中,经硅胶柱(二氯甲烷~甲醇7:3洗脱)或Sephadex LH-20柱(甲醇为洗脱剂)层析,反复层析纯化可得到暗红色粉末、并带有绿色金属光泽的红色素^[9]。

b)加酶提取

用纤维素酶从红花中提取黄色素是一种比较先进、比较新颖的方法。与传统的用水和乙醇提取法相比,纤维素酶法提取条件较温和,提取率增加9.40~13.35%,而且黄色素的有效组分稳定性比较好。这种提取方法的较好的实验条件如下:温度为50℃;pH为4.4;纤维素酶和红花黄色素重量比为1:80^[10]。另外, β -葡萄糖苷酶和果胶酶的加入有利于对红花素的提取^[11]。

3.2.3 红花素的后提取

从红花中提取出的只是前红花素物质,要经过处理才能成为可以被利用的红花素。较适的处理条件如下:黑曲霉中提取出的葡萄糖氧化酶在30℃、pH4.8的醋酸盐缓冲溶液中处理^[12]。当有 β -D-葡萄糖和空气氧存在时,这种处理比较有效,而仅仅只有葡萄糖氧化酶存在时转化率下降,而且反应速度很慢^[13]。研究表明,与没有葡萄糖存在时相比,当葡萄糖浓度为10mM时产红花素的活性能力可以提高2~3倍^[14]。L-葡萄糖对这个反应的影响亦不同,D-型/L-型的影响能力比为1.7:1.0^[15]。金属元素锰对这个反应没有催化作用^[14]。加入氨基酸有利于反应的进行,表现出红花素变得更红,其中最有效的是酸性氨基酸,中性氨基酸其次,芳香族和含硫氨基酸尾随,杂环氨基酸最差^[16]。真菌葡萄糖氧化酶可以把前体红花素从亮橙色氧化成微红色^[15],从而使前体红花素变得更红。

4 红花植物细胞的培养

4.1 红花细胞培养产生生育酚(维生素E)

4.1.1 生育酚的特性

生育酚在植物中以右旋体(D)的形式存在,其活性比消旋体(DL)形式高1.4倍左右。化学合成的生育酚均为消旋体且 α -生育酚所占的比例很小,从而,从植物中提取高活性的生育酚的要求迅速增加^[17]。

4.1.2 不同组织细胞产生生育酚能力的比较

红花的不同组织细胞均有合成 α -生育酚的能力,其中胚轴组织细胞在生长速率和产物含量上均优于其它组织细胞,分别达到0.389DW/l.d和2.28mg/100gDW^[1]。其次是花蕾和子叶的组织细胞,胚根的组织细胞最差。

4.1.3 不同培养基对产 α -生育酚能力和生长速率的影响

目前,常常选用MS和RT两种培养基。与MS培养基比较,RT培养基比MS培养基含有更多的纤维糖。如果用

MS培养基,植物激素和细胞分裂素对细胞的生长和生育酚的产生影响不大;如果用RT培养基,则加入酪蛋白氨基酸后细胞的生长速率和生育酚的产量都会增加。酪蛋白氨基酸的浓度对生长速率和生育酚的产量有影响,0.1~0.5%的酪蛋白氨基酸使生育酚的产量增加8~9倍,从而使生育酚的产量达到11.4~13.4mg/100gDW;而1.0%浓度的酪蛋白氨基酸会抑制细胞生长和生育酚的形成^[17]。

4.1.4 前体的加入对生育酚产生的影响

尿黑酸和叶绿醇是两种有效的生育酚合成前体。尿黑酸(HGA)的加入对生育酚的产生有一定的提高作用;叶绿醇为前体时, γ - δ -生育酚同时被合成^[17]。如果尿黑酸和叶绿醇同时加入,则只有尿黑酸浓度较高时尿黑酸才有一定的效用,可见尿黑酸的加入对叶绿醇的作用有一定的抑制作用。

4.1.5 其他有机物或激素的加入对生育酚形成和细胞生长速率的影响

在培养基中加入酵母提取液和0.1%CA可以提高生育酚的产量。一定浓度的NAA和BAP组合有利于细胞的快速增长。其中2.0~3.0mg/l NAA和0.5~1.0mg/l BAP配比最佳,细胞相对生长量均在50mgFW/gFW.d以上。在培养液中加入人参低聚糖也可以提高细胞的生长速率和生育酚的含量。研究表明最佳浓度为5 mg/L,从培养一开始就加入的效果最佳,加入的第二天即可见效。加入人参低聚糖后,细胞生长的指数期会缩短。在指数期,细胞的生长速率提高了21~23%,而生育酚的含量提高1.4~1.8倍^[18]。人参提取物中,低聚糖VI, VII和VIII是最有效的,加入1.0 mg/L可使生育酚的含量和产率提高4.3倍左右^[19]。

4.1.6 培养模式及溶氧条件选择

红花细胞的培养是一个需氧过程,当溶氧是红花细胞生长的限制性因子时,生育酚产量和溶氧增加呈线性关系^[20]。红花细胞培养的临界溶氧估计为9 mg O₂/L。与间歇培养模式相比,流加培养模式会增加生育酚的产量^[20],细胞中生育酚的含量达到9mg/l^[20],从而远远高于自然生长的红花细胞中生育酚的含量。为保证充分的溶氧和营养,最适接种量为0.035~0.067 gDWt./瓶(50 mL vol.)^[21]。

4.1.7 生育酚形成的代谢过程分析

在培养基中加入 α -, γ -和 δ -生育酚,几周之后发现,培养基中几乎没有生育酚,而在加入 γ -生育酚的培养基中生长的细胞含有大量的 γ -生育酚。这证明,培养基中所加入的生育酚都进入到细胞内部去了;同时发现,生长在加入 γ -生育酚培养基中的细胞,其中 β -生育酚的含量大大增加。通过一个有关酶的实验证明,在细胞中存在腺苷甲硫氨酸酶,即 γ -生育酚转甲基酶,这种酶对 γ -生育酚有较强的专一性,这说明 γ -生育酚生物转化合成 α -生育酚是 α -生育酚形成的主要途径,而通过 β -, δ -生育酚合成 α -生育酚则是次要途径。植物细胞在培养20天之后,生育酚在细胞中的含量才大大增加,并在25天左右产量达到最大^[17],这说明生育酚是一种次级代谢产物。

4.1.8 高产 α -生育酚变异体的筛选及细胞稳定性研究

植物细胞培养有着极大的变异性,所以利用培养细胞之间的变异来筛选具有高产次级代谢产物的细胞变异是可能的。研究表明,用紫外线照射使红花细胞变异以获得 α -生育酚高产细胞的效果不够理想,而克隆变异的效果相对较好,从克隆变异中筛选出的高产细胞平均 α -生育酚含量高达114.4 μ g/g干重,比原始细胞提高了7.2倍,最高的可以达到138.9 mg/g干重^[22];生长速率与原始细胞差别不大。 α -生育酚含量和生长速率没有必然联系,生长速率高, α -生育酚含量不一定高。在克隆过程中,对其稳定性进行观察,发现在1~4代克隆均表现极大的变异性,长时间培养,有些克隆体合成产物趋于稳定,有些仍在变异之中。

4.2 红花细胞培养生产红色素

4.2.1 培养液的选择。

上面已经详细总结了生产生育酚植物细胞培养较适的条件,这些条件也基本适合于红花细胞中红色素的生产。但是培养红花细胞来生产红色素也有其自己的特点。培养过程前25天,植物生长激素对细胞生长没有影响;25天之后才有利于红色素的形成。NAA和咪喹甲基腺嘌呤是红色素形成所必须的,特定时间段加入一定量的植物生长素对红色素的产量有很大的影响^[21]。

4.2.2 引物的添加对红色素产生的影响

有效的引物对细胞培养产红色素影响很大。研究表明,黄原胶和岩藻依聚糖的加入可以使红色素的产量提高6倍左右;而热压处理过的海藻、蓝绿色海藻作为引物时,可使红色素产量提高10倍左右;另外,从一种不知名的蘑菇中提取出的胞外低聚糖作为引物可使红色素的产量提高13倍左右^[23]。

4.2.3 培养模式及培养器的选择

红花细胞培养生产红色素的最佳培养模式是采用两级培养,在第一级中,将细胞及培养液放在锥形烧瓶中,采用滚动摇床培养。搅拌式培养器和气浮式培养器效果不佳,因为在搅拌式培养器中,红花细胞聚集体变得越来越小了;搅拌对细胞的呼吸、细胞壁的完整性以及细胞中ATP的含量都极大影响,而且有可能影响细胞的代谢途径^[24]。第二级培养,主要用来生产红色素。红色素是产物抑制型产物,所以,其积累会影响到红色素的产量,应采用重复间歇培养模式,并且回收利用取出红色素时所带出的培养基^[25]。

5 中药红花开发研究的前景及展望

红花是一类很珍贵的植物资源,主要用于食品工业和医药工业,存在着广阔的发展前景。尽管有很多学者对红花做过很多研究工作,也取得了不少进展,但还存在不少问题。首先,红花的化学成分还有待进一步研究明确,找出各种有确切疗效的有效成分;其次,还应加强红花本身和各种组分的药理研究;再次,随着药材资源的枯竭,应进一步加强植物细胞培养的研究,特别是同时产红色素和维生素E的红花细胞培养。找出红花产生生育酚的基因,采用基因工程的手段,进行红花细胞体外生产生育酚是一个有前途的研究方

向。对于产红花素,也存在类似的研究方向。即便不如此,进一步研究产生育酚和产红花素细胞培养条件和培养模式,也可能进一步提高生育酚和红花素的产量和质量。另外,通过代谢工程手段改造红花细胞,强化红花中维生素E或红色素的生物合成是红花研究中的一个重要发展方向。总之,对红花的多方面研究必将有利于该种传统中药的现代化。

参考文献

- 1 Danisova, Cecilia; Sarocka, Iveta, Yellow pigments of the flowers of *Carthamus tinctorius* L. . *Biologia*(Bratislava), 1994, 49 (6), 887.
- 2 Kazuma, K. ; Takashashi, T. ; Okuno, T. ; Matsumoto, T. Quinochalcones and flavonoids from the petals of *Carthamus tinctorius* L. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, 37th, 1995, 505~10 (Japanese) .
- 3 Meselhy, Meselhy R. ; Kadota, Shigetoshi; Momose, Yasunori, etc, Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca²⁺ antagonistic activity of tinctormine, *Plant Biochemistry*, 41(10), 1796~802, 1993.
- 4 莫尚武等. 用⁴⁵Ca 研究红花对大鼠胸主动脉 Ca²⁺ 内流的影响. *中草药*, 1995, 26(10).
- 5 刘发等. 红花黄素对高血压大鼠的降压作用及对肾素~血管紧张素的影响. *药理学学报*, 1992, 27(10).
- 6 刘建国等. 红花黄素Ⅲ对犬缺血心肌的影响. *中国药理学通报*, 2000, 12, 16(5).
- 7 Saito, K. Biointeraction between precarthamin and cell components in florets of *Carthamus tinctorius* L. . *Biol. Plant.*, 1994, 36(3), 396.
- 8 Saito, Koshi; Katsukura, Masatoshi, The chemical interaction between precarthamin and cellular components. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 1993, 188(6), 399.
- 9 Danisova, Cecilia; Subinova, Ivana, Study of stability of yellow pigments of *Carthamus tinctorius* L. under laboratory conditions, *Biologia*(Bratislava), Volume Date 1995, 50(6), 583.
- 10 Xue, Weiming; Kang, Maode; Zhang, Xiaolin; Liu, Xiudong; Wang, Kang, Study on enzyme~based extracting carthamus yellow, *Huaxue Gongcheng/Chemical Engineering v 27 n 1* 1999. p 42~44, 50 Publication Year: 1999.
- 11 Saito, Koshi; Miyakawa, Ken~Ichi, Enzyme~mediated liberation of precarthamin from the floral tissues of *Carthamus tinctorius* L. . *Biologia* (Bratislava), 1995, 50(6), 591.
- 12 Saito, Koshi, etc, The catalytic aspects of glucose oxidase in the red color shift of *Carthamus tinctorius* capitula, *Plant Sci.* 1993, 90(1), 1.
- 13 Saito, Koshi, Glucose oxidase, a potential contributor towards flower color modification in the capitula of *Carthamus tinctorius* L. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 1993, 188(6), 405.
- 14 Saito, Koshi, Potential competency of glucose oxidase for modification of flower color in *Carthamus tinctorius*. *Z. Naturforsch.*, C; Biosci., 1992, 47(3~4), 205.
- 15 Saito, Koshi; Katsukura, Masatoshi, The reddening of dyer's saffron florets induced by a fungal glucose oxidase. *J. Plant Physiol.*, 1992, 140(1), 121.
- 16 Saito, Koshi; Matsumura, Makiko, Amino acid mediated reddening of florets in *Carthamus tinctorius* L, *Acta Physiol. Plant.*, 1993, 15(2), 77.
- 17 Tsutomu Furuya, etc, production of tocopherols by cell culture of safflower, *Phytochemistry*, 26(10), 1987.
- 18 Gan, Fanyuan; Xu, Chun; Zheng, Guangzhi, Effect of ginseng~oligosaccharin M on the growth rate and a~tocopherol synthesis in cultured cell of *Carthamus tinctorius*. *Zhiwu Shengli Xuebao*, 18(4), 355~60 (Chinese) 1992.
- 19 Gan, Fanyuan; Zheng, Guangzhi; Wang, Shilin; Zhou, Li-gang; Xu, Chun, The physiological effects of elicitor ginseng~oligosaccharides on cell culture of *Carthamus tinctorius*. *Zhiwu Xuebao*, 34(3), 208~13 (Chinese) 1992.
- 20 Takeda, Toshiya; Seki, Minoru; Furusaki, Shintaro; Furuya, Tsutomu, Factors affecting vitamin E production using plant cell culture of *Carthamus tinctorius*. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 1993, 26 (5), 470.
- 21 Gan, Fanyuan; Zheng, Guangzhi, The influence of different factors on cell growth and a~tocopherol content of cultures from *Carthamus tinctorius*. *Zhiwu Xuebao*, 33(7), 516~22 (Chinese) 1991.
- 22 Gan, Fanyuan; Zheng, Guangzhi, Screening of high~producing a~tocopherol clone lines from *Carthamus tinctorius* cell cultures. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, 14(3), 289~94 (Chinese) 1992.
- 23 Hanagata, Nobutaka; Ito, Akihide; Fukuju, Yoshiharu; Murata, Katsuhide, Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus tinctorius* L. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1992, 56(1), 44.
- 24 Takeda, Toshiya; Seki, Minoru; Fureusaki, Shintaro, Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 1994, 27(4), 466.
- 25 Hanagata, Nobutaka; Karube, Isao, Red pigment production by *Carthamus tinctorius* cells in a two~stage culture system. , *J. Biotechnol.*, 1994, 37(1), 59.

收稿日期: 2001-05-09