

HPLC 法同时测定不同产地大花红景天中 6 种活性成分

刘青^{1,2}, 杜守颖^{1*}, 多吉仁青², 尼玛次仁², 顿珠², 嘎务²

1. 北京中医药大学, 北京 100102

2. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000

摘要: 目的 对青藏高原不同产地大花红景天 *Rhodiola crenulata* 中没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸进行分析研究, 建立定量分析方法, 为其进一步利用提供依据。方法 采用 30%乙醇提取样品; Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.3%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱; 检测波长 275 nm, 柱温 25 °C。结果 没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸分别在 38.2~382.0 ng/mL ($r=0.999\ 8$)、301.0~3 010.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、19.8~198.0 ng/mL ($r=0.999\ 6$)、17.1~171.0 ng/mL ($r=0.999\ 6$)、4.5~45.0 ng/mL ($r=0.999\ 8$)、6.38~63.80 ng/mL ($r=0.999\ 4$) 呈良好的线性关系, 加样回收率均符合定量测定要求。结论 该方法简便, 快速, 准确, 可用于同时对青藏高原大花红景天中 6 种活性成分的测定。

关键词: 大花红景天; 没食子酸; 红景天苷; 酪醇; 儿茶素; 对香豆酸; 没食子酸乙酯

中图分类号: R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)02-0276-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.023

HPLC method for simultaneous quantitative determination of six active ingredients in *Rhodiola crenulata* from different origins of Qinghai-Tibet Plateau

LIU Qing^{1,2}, DU Shou-ying¹, DUOJIE Ren-qing², YNIMA Ci-ren², DUN-zhu², GA-wu²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Tibet Traditional Medical College, Lasa 850000, China

Abstract: Objective To analyze the six active ingredients in *Rhodiola crenulata* from the different origins of Qinghai-Tibet Plateau, to establish quantitative analysis methods, and to provide a basis for further use. **Methods** Samples were extracted with 30% ethanol; In Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), gradient elution was carried out with acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution as the mobile phase, detection wavelength 275 nm, and column temperature 25 °C. **Results** A good linear relationships of gallic acid, salidroside, tyrosol, catechin, ethyl gallate, and coumaric acid were at 38.2—382.0 ($r=0.999\ 8$), 301.0—3 010.0 ($r=0.999\ 9$), 19.8—198.0 ($r=0.999\ 6$), 17.1—171.0 ($r=0.999\ 6$), 4.5—45.0 ($r=0.999\ 8$), and 6.38—63.80 ng/mL ($r=0.999\ 4$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, and can be used simultaneously to determine the content of the six active ingredients in *R. crenulata* from the different origins of Qinghai-Tibet Plateau.

Key words: *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba; gallic acid; salidroside; tyrosol; catechin; *p*-coumaric acid; ethyl gallate

本研究通过对青藏高原不同种红景天研究现状及存在问题的分析^[1], 利用基因编码区和基因间的 SSR 标记对不同种的红景天材料进行群体遗传分析, 结合藏医药理论及藏药多组分、多疗效特点, 查阅中国食品药品监督管理局网站 (CFDA); 发现目前已获批上市的含红景天原药材的药品 7 个及含有红景

天药材的保健食品 72 个, 因此有必要建立更接近于原药材的综合质量评价体系和方法。对青藏高原大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 而言, 第 1 种是对已知的活性单体, 如红景天苷^[2,4]、酪醇^[2,4]、没食子酸^[2,4]、对香豆酸^[2,4]进行测定, 第 2 种是对已知的活性成分组^[5], 如总酚^[6]、总多糖^[7]、

收稿日期: 2014-08-11

基金项目: “973” 计划前期研究专项 (2012CB722905)

作者简介: 刘青, 男, 博士在读。Tel: 15089037014 E-mail: liu_navy86@126.com

*通信作者 杜守颖, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型与制剂关键技术的研究。

Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

黄酮类^[8]等进行测定。无论是对哪一种活性单体或活性成分组测定,均不能完全反映原药材的本质,故本实验选择 HPLC 法,以没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸 6 种活性单体为对照,同时对青藏高原不同产地的大花红景天上述成分进行定量分析,旨在建立简单可控的检测方法,尽可能达到全面有效地质量评价大花红景天的质量。

1 仪器与材料

天美(岛津 LC-20A)液相色谱仪,配 SPD-20A 紫外可见检测器; Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); GraceSmart RP₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梅特勒 AE200 电子天平; KQ-250DB 超声清洗器(250 W, 昆山超声仪器有限公司)。甲醇(色谱纯, Fisher 公司); 30%乙醇; 磷酸(分析纯); 蒸馏水(自制)。没食子酸(批号 110831-200803); 红景天苷(批号 110818-201206)购自中国食品药品检定研究院; 酪醇(批号 L-042-130713)、儿茶素(批号 154-23-4)、没食子酸乙酯(批号 831-61-8)、对香豆酸(批号 501-98-4)购自北京盛世康普化工技术研究院,质量分数均大于 98%。西藏自治区不同地区产样品均经嘎务教授鉴定为大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 7%A; 10~25 min, 7%~14%A; 25~40 min, 14%~20%A); 柱温 25 °C; 体积流量 1 mL/min, 检测波长 275 nm, 进样量 10 μL。取供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,样品中各待测组分与相邻峰的分度均>1.5, 拖尾因子在 0.95~1.05, 塔板数按没食子酸峰计算不低于 4000。对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备

分别取没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸对照品适量,精密称定,加 30%乙醇制成含没食子酸 0.34 mg/mL、红景天苷 0.18 mg/mL、酪醇 0.24 mg/mL、儿茶素 0.21 mg/mL、没食子酸乙酯 0.23 mg/mL、对香豆酸 0.16 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取本品粉末约 2.5 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 30%乙醇 20 mL,20 °C 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 2 min,静置室温,加 30%乙醇稀释至

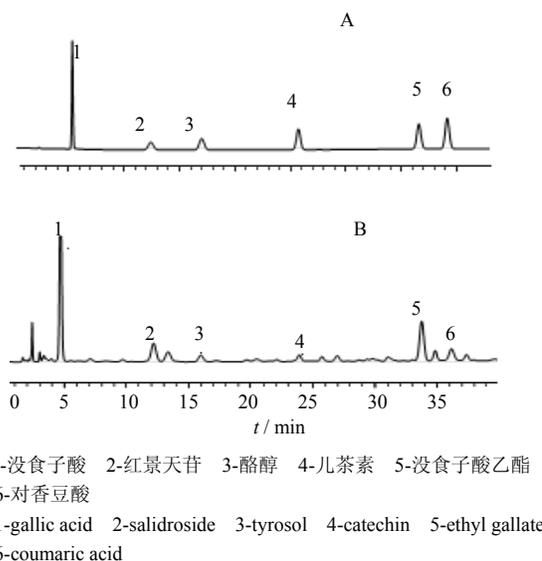


图 1 混合物对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixtures reference substances (A) and sample (B)

刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 30%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

取没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸对照品适量,精密称定,用 30%乙醇制成含没食子酸 19.11 μg/mL、红景天苷 150.83 μg/mL、酪醇 9.92 μg/mL、儿茶素 8.54 μg/mL、没食子酸乙酯 2.28 μg/mL、对香豆酸 3.19 μg/mL 的混合对照品标准溶液,分别精密吸取混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、2.5、3.5、4.0、4.5、5.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加 30%乙醇稀释至刻度,摇匀,分别精密进样 10 μL,测定峰面积,以色谱峰面积(A)对进样量(C)进行线性回归,结果表明各组分在各自进样量范围内线性关系良好,线性范围、回归方程、回归系数见表 1。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液(没食子酸 0.22 mg/mL、红景天苷 0.24 mg/mL、酪醇 0.22 mg/mL、儿茶素 0.21 mg/mL、没食子酸乙酯 0.22 mg/mL、对香豆酸 0.24 mg/mL),按“2.1”色谱条件测定,重复进样 6 次,测得峰面积,计算没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸 RSD 分别为 0.40%、0.41%、0.47%、0.43%、0.40%、0.39%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(山南桑日样品),按上述色

表 1 6 种活性成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of six active ingredient

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)
没食子酸	$A=3\ 000\ 000\ C-1\ 251.4$	0.999 8	38.2~382.0
红景天苷	$A=320\ 864\ C+993.34$	0.999 9	301.0~3\ 010.0
酪醇	$A=451\ 064\ C+863.33$	0.999 6	19.8~198.0
儿茶素	$A=549\ 020\ C-705.01$	0.999 6	17.1~171.0
没食子酸乙酯	$A=3\ 000\ 000\ C-813.63$	0.999 8	4.5~45.0
对香豆酸	$A=3\ 000\ 000\ C+1\ 175.6$	0.999 4	6.4~63.8

谱条件测定, 2 h 测定 1 次, 每次进样 10 μ L, 共 6 次, 测得没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸峰面积的 RSD 分别为 1.48%、1.78%、1.64%、1.25%、1.43%、1.57%, 表明本样品稳定性较好。

2.7 重复性试验

取样品(山南措那) 6 份, 按“2.1”项条件, 每次进样 10 μ L, 测得没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸质量分数的 RSD 分别为 0.29%、0.41%、1.58%、0.93%、0.63%、1.61%, 表明本方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称取适量的已测定的大花红景天药材粉末(林芝江达县) 9 份, 分为低、中、高 3 个质量浓度, 分别精密加入混合对照品, 低质量浓度(没食子酸 0.25 mg/mL、红景天苷 0.94 mg/mL、酪醇 0.11 mg/mL、儿茶素 0.19 mg/mL、没食子酸乙酯 0.09

mg/mL、对香豆酸 0.07 mg/mL), 中质量浓度(没食子酸 0.32 mg/mL、红景天苷 1.2 mg/mL、酪醇 0.14 mg/mL、儿茶素 0.23 mg/mL、没食子酸乙酯 0.11 mg/mL、对香豆酸 0.09 mg/mL)、高质量浓度(没食子酸 0.40 mg/mL、红景天苷 1.45 mg/mL、酪醇 0.17 mg/mL、儿茶素 0.28 mg/mL、没食子酸乙酯 0.14 mg/mL、对香豆酸 0.11 mg/mL), 制样并测定, 计算加样回收率, 结果没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸的平均加样回收率分别为 101.5%、100.8%、100.2%、101.8%、98.8%、100.5%, RSD 值分别为 2.2%、1.9%、1.9%、2.3%、2.4%、2.0%。

2.9 样品测定

分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 按上述色谱条件进行测定, 计算其中没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸在原药材中的质量分数。结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Table 2 Determination results of samples

产地	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	没食子酸	红景天苷	酪醇	儿茶素	没食子酸乙酯	对香豆酸
山南	4.54	11.53	2.02	0.92	0.77	1.16
山南措那	2.54	8.90	0.38	1.75	1.62	0.82
山南桑日	16.91	21.61	2.04	1.47	6.40	0.38
山南措美卡雷拉山	1.34	0.24	—	1.10	0.48	0.08
日喀则	2.53	19.45	2.47	0.82	1.32	1.46
日喀则昂仁县	2.17	27.85	1.63	1.88	1.89	1.07
日喀则南木林县	9.04	6.98	5.18	0.89	2.41	0.27
当雄	5.55	0.74	2.30	1.32	2.32	0.22
那曲	1.55	8.12	1.23	0.87	0.47	0.99
那曲县	5.94	7.55	0.70	0.57	3.28	0.27
林芝	2.29	16.15	2.77	0.81	0.18	1.03
林芝江达县	3.14	11.69	1.41	2.30	1.09	0.86
林芝色季拉山	4.11	2.41	1.43	0.08	1.42	0.72
林芝米林县	7.03	2.68	4.87	0.43	3.25	0.52
林芝朗县	3.39	5.87	2.28	0.80	1.85	0.65
林芝米拉山	1.04	17.43	0.33	2.33	1.21	0.49
平均值	4.57	10.57	1.94	1.15	1.87	0.69

每个地区收购、采挖的红景天各活性成分质量分数有高有低,采收季节均在9~10月份,并且储藏时间短,当年采收的药材(山南、山南桑日、日喀则、日喀则昂仁县、那曲县、林芝产地样品)其活性成分的质量分数较高;受采收季节的影响,在9月前或10月后采收的红景天(山南措美卡雷拉山、林芝色季拉山)的活性成分质量分数较低;收购的样品(山南措那、日喀则南木林县、当雄、那曲、林芝江达县),其经过加工炮制,切段,未去皮,储藏时间长久,其活性成分质量分数也较低。另外其测得各组分之间质量分数变化的关系,有待更进一步研究。

3 讨论

本实验采用HPLC法测定青藏高原大花红景天中没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸,线性关系良好,相关系数均在0.999 4以上,精密度、重复性、回收率均符合要求,样品稳定性好,此法能有效控制大花红景天的质量。

3.1 流动相选择

比较不同比例的甲醇-水、甲醇-0.04%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.04%磷酸等流动相,乙腈-0.04%磷酸溶液梯度洗脱分离效果好。

3.2 波长选择

选择了没食子酸、红景天苷、酪醇、儿茶素、没食子酸乙酯、对香豆酸各自的吸收波长223、261、274、275、308、310 nm,综合评价后选择275 nm为测定波长,各指标峰峰形较好。

3.3 溶剂选择

分别考察了100%、70%、50%、30%甲醇,100%、70%、50%、30%乙醇为溶剂的影响,发现用30%乙醇提取样品效果及色谱成分峰形均最佳。

3.4 样品测定

从样品测定结果可以看出,青藏高原大花红景天中没食子酸的量平均值为4.57 mg/g、红景天苷

的量平均值为10.57 mg/g(《中国药典》2010年版规定红景天苷质量分数大于5 mg/g,在16个样品中,有4个样品低于《中国药典》规定值)、酪醇量平均值为1.94 mg/g、儿茶素量平均值为1.15 mg/g、没食子酸乙酯量平均值为1.87 mg/g、对香豆酸量平均值为0.69 mg/g。

目前对大花红景天药材的质量控制主要以红景天苷为指标,这样不能完全体现红景天药材的质量,多个活性成分的测定更接近对原药材的质量控制,更符合祖国传统医学中“多成分”、“多靶点”的思维模式,因而更加客观、科学。

参考文献

- [1] 尼玛次仁,刘青,多杰仁青,等. 青藏高原红景天研究进展及存在问题[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2675-2677.
- [2] 林夏,胡军华,崔培超,等. HPLC同时测定大花红景天提取物中没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 102-105.
- [3] 邵云东,苏艳芳,於洪建,等. RP-HPLC法测定不同品种和产地红景天中指标成分的含量[J]. 中草药, 2004, 35(5): 505-508.
- [4] 章娟,段虎成,毕开顺. HPLC法同时测定大花红景天中的4个酚类成分的含量[J]. 北方药学, 2011, 8(7): 13-14.
- [5] 张继稳,陈立兵,葛卫红. 中药物质组相关概念释义[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(2): 1-4.
- [6] 韩林辛,倪键. 大花红景天中红景天苷和总酚的含量测定[A] // 全国中药创新与研究论坛论文集[C]. 运城: 中华中医药学会中药制剂分会, 2009.
- [7] 宋学伟,任磊,韩泳平. 大花红景天多糖RCPS分离纯化及单糖组成分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 642-644.
- [8] 卢永昌,王玲. 大花红景天中总黄酮的提取及含量测定[J]. 青海师专学报: 教育科学, 2005, 6(1): 31-33.