HPLC-小粒径色谱柱法测定红景天提取物中红景天苷、酪醇和络赛维

邹 亮[1]，王战国[2*]，胡慧玲[3]，阳明福[4]，包希福[5]，王安齐[3]

1. 成都大学生物产业学院，四川 成都 610106
2. 四川大学生命科学学院，四川 成都 610065
3. 成都中医药大学药学院，四川 成都 610075
4. 成都华高药业有限公司，四川 成都 610041
5. 茂县羌医药研究所，四川 茂县 623200

摘 要：目的 建立应用小粒径色谱柱快速测定红景天（蔷薇红景天）提取物中红景天苷、酪醇和络赛维的 HPLC 方法。**方法** 色谱柱为 HALO C_{18}（150 mm×4.6 mm，2.7 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱：0～5 min，7%～15% A；5～8 min，15%～18% A；8～20 min，18%～30% A；20～25 min，30%～40% A；25～30 min，40%～55% A；体积流量 0.6 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 280 nm；进样量 5 μL。**结果** 红景天苷、酪醇、络赛维 15 min 内达到分离，峰形尖锐对称，线性范围分别为 0.41～106.00、0.42～108.00、0.38～98.00 μg/mL，平均加样回收率分别为 99.29%、98.82%、98.33%。采用所建立的方法测定不同来源红景天提取物的多种成分，结果表明单一采用红景天苷作为质量控制指标，9 批样品的差异度较小（RSD＝7.95%），如果将酪醇或络赛维引入质量评价体系，则红景天提取物各批次间就存在较大的差异（酪醇，RSD＝24.42%；络赛维，RSD＝50.55%）；但是，同一单位提供的样品间的差异度较小。**结论** 建立的 HPLC-小粒径色谱柱法高效、准确，经济，精密度好，灵敏度高，可用于红景天提取物中的红景天苷、酪醇和络赛维的同时快速测定；引入多成分的测定方法，可以评价不同厂家提取物质量的差异，并筛选出导致质量差异的成分，为提取物的工艺优化提供参考。

关键词：小粒径色谱柱；HPLC；红景天提取物；红景天苷；酪醇；络赛维

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**B **文章编号：**0253 - 2670(2011)07 - 1334 - 04

Rapid determination of salidroside, tyrosol, and rosavin in *Rhodiola rosea* extract by HPLC using a fused-core column

ZOU Liang[1], WANG Zhan-guo[2], HU Hui-ling[3], YANG Ming-fu[4], BAO Xi-fu[5], WANG An-qi[3]

1. College of Biological Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China
2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China
3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China
4. Chengdu Wagott Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610041, China
5. Maoxian Qiang Medicine Insititute, Maoxian 623200, China

Key words: fused-core column; HPLC; *Rhodiola rosea* L. extract; salidroside; tyrosol; rosavin

红景天（蔷薇红景天）*Rhodiola rosea* L. 是我国重要的常用中药之一，主要有效成分为红景天苷、酪醇、络赛维、洛塞琳、洛缇等成分，其中络赛维为红景天中的特有成分[1]。近年来，随着国际市场的需要，红景天提取物得到广泛应用，而其质量控制是实现其药效的基本保证。但目前，对于红景天提取物质量评价报道较少，此外由于红景天及其提取物中成分复杂，特别是成分间极性相差较大，现有 HPLC 法所采用的常规色谱柱对其进行定量测定，需较长时间才可达到较好的分离效果[2-5]。文献报道 HPLC 法测定红景天或红景天提取物中有效成分，常采用色谱柱粒径为 4.5 μm。由于红景天提取

收稿日期：2010-10-11

基金项目：国家教育部博士点基金新教师项目（200806101089）

作者简介：邹 亮（1979—），男，四川省万源市人，博士，副教授，从事中药药剂学与中药质量标准化研究。
Tel: (028)84616526 E-mail: zouliang@cdu.edu.cn

***通讯作者** 王战国 Tel: (028)85416957 E-mail: wangzhanguo@scu.edu.cn wzg103@126.com

物中成分复杂，普通色谱柱无法在相对较短时间内将其有效分离，故本课题组所建立的 HPLC 法中选用粒径更小（2.7 μm）的高效能色谱柱，以更小的样品用量（进样量 5 μL）、更少的流动相（体积流量 0.6 mL/min）实现在常规高效液相色谱仪上的测定分析，达到高效、准确、快速、经济的效果。本实验首次采用新型小粒径（2.7 μm）高效色谱柱，建立了在相对较短时间内同时快速测定红景天提取物中红景天苷、酪醇、络赛维的方法，为红景天提取物的质量控制提供高效、准确、便捷的参考方法。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪，包括四元梯度泵单元、自动脱气单元、自动控温进样单元、DAD 检测器单元和 Agilent 1200 色谱工作站等（Agilent Techologies，美国）；CP225D 和 BS 210S 电子天平（Sartorius，德国）；KH—300DB 型数控超声仪（昆山禾创超声仪器有限公司）；HALO C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，2.7 μm）（Advanced Materials Technology，美国）。TGL—16C 台式高速离心机（上海市安亭科技仪器厂）；WSD—UP—III—10 精密型纯水机（成都威思达智能科技有限公司）。

红景天提取物（成都华高药业有限公司提供 5 批样品，茂县羌医药研究所提供 4 批样品）；红景天苷对照品（批号 A0076，质量分数 99%）、酪醇对照品（批号 A0312，质量分数 98%、）、络赛维对照品（批号 A0078，质量分数 98%）均为成都曼斯特生物科技有限公司产品。

乙腈、甲酸为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 HALO C_{18}（150 mm×4.6 mm，2.7 μm）。流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱程序：0～5 min，7%～15% A；5～8 min，15%～18% A；8～20 min，18%～30% A；20～25 min，30%～40% A；25～30 min，40%～55% A；柱温 30 ℃；体积流量 0.6 mL/min；检测波长 280 nm；进样量 5 μL。

2.2 混合对照品储备液的制备

分别称取红景天苷、酪醇、络赛维对照品约 5.00 mg，精密称定，置 50 mL 棕色量瓶中，加入甲醇-水（30∶70）约 45 mL，超声处理 15 min（100 Hz），冷却后，用甲醇-水（30∶70）定容至刻度，得红景天苷 106.00 μg/mL、酪醇 108.00 μg/mL、络赛维 98.00 μg/mL 的混合对照品储备溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取红景天提取物样品约 10.00 mg，精密称定，置 10 mL 棕色量瓶中，加入甲醇-水（30∶70）约 8 mL，超声处理 15 min，冷却后，用甲醇-水（30∶70）定容至刻度，得红景天提取物供试品溶液，进样前，过 0.2 μm 微孔滤膜。

2.4 线性关系考察

将混合对照品储备液作为 1 号混合对照品溶液（S1）。采用倍数稀释法，精密量取 S1 5 mL，置 10 mL 棕色量瓶中，加入甲醇-水（30∶70）约 4 mL，超声处理 5 min，混匀，冷却后，用甲醇-水（30∶70）定容至刻度，得 2 号混合对照品溶液（S2）；按上法，依次获得 S3～S9。分别过 0.2 μm 微孔滤膜后，按上述色谱条件进样测定，记录色谱峰。以色谱峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标进行线性回归，得回归方程：红景天苷 Y＝1.921 2 X＋0.640 2，r＝0.999 95；酪醇 Y＝5.029 5 X＋1.382 7，r＝0.999 95；络赛维 Y＝1.522 1 X＋0.332 6，r＝0.999 95；表明红景天苷在 0.41～106.00 μg/mL，酪醇在 0.42～108.00 μg/mL，络赛维在 0.38～98.00 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 系统适应性考察

选择 4 号混合对照品溶液（S4）和红景天提取物供试品溶液（样品 1），按上述色谱条件进样分析，记录色谱图。红景天苷、酪醇、络赛维峰形尖锐对称，保留时间分别为 7.4、8.8、14.8 min，分离度均大于 1.5，理论塔板数均大于 5 000，拖尾因子符合分析要求，供试品溶液中其他物质不干扰红景天苷、酪醇、络赛维的测定。色谱图见图 1。

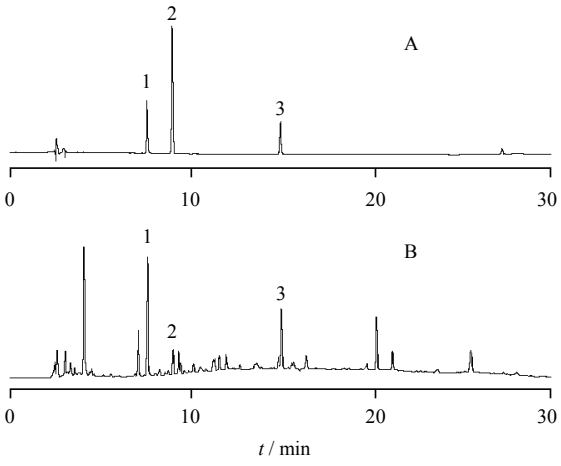
2.6 精密度试验

选择高、中、低 3 份混合对照品溶液（S2、S4、S6），按上述色谱条件进样分析，S2、S4、S6 分别连续进样 5 次，记录色谱图，计算各成分峰面积的 RSD，结果见表 1。

2.7 稳定性试验

取样品 1 制备供试品溶液，在室温（25 ℃）条件下分别于 0、4、8、16、24 h 按上述色谱条件进样测定，记录色谱图，计算得红景天苷、酪醇、络赛维峰面积的 RSD 分别为 1.91%、2.83%、1.27%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重现性试验



1-红景天苷 2-酪醇 3-络赛维
1-salidroside 2-tyrosol 3-rosavin

图 1 混合对照品（A）和红景天提取物（B）的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and *R. rosea* extract (B)

表 1 混合对照品溶液的精密度

Table 1 Precision tests of mixed reference substance solution

成 分	质量浓度/(μg·mL^{-1})	RSD/%
红景天苷	3.31	0.81
	13.25	0.99
	53.00	0.17
酪醇	3.38	0.50
	13.50	1.04
	54.00	0.14
络赛维	3.06	1.13
	12.25	0.90
	49.00	0.22

取样品 1 平行制备供试品溶液 5 份，按上述色谱条件进样测定，记录色谱图，计算得红景天苷、酪醇、络赛维质量分数的 RSD 分别为 1.88%、3.45%、1.79%。

2.9 加样回收率试验

取样品 1 共 5 份，每份约 5.00 mg，精密称定，置 10 mL 棕色量瓶中，分别精密加入红景天苷、酪醇、络赛维混合对照品溶液 1.00 mL（红景天 160.00 μg/mL、酪醇 15.00 μg/mL、络赛维 140.00 μg/mL），再分别加入甲醇-水（30∶70）溶液约 7 mL，制备供试品溶液，按上述色谱条件进样测定，计算得红景天苷、酪醇、络赛维的平均回收率分别为 99.29%、98.82%、98.33%，RSD 分别为 0.33%、1.44%、0.81%。

2.10 样品测定

分别制备 9 批红景天提取物供试品溶液，按上述色谱条件进样测定，记录色谱图，外标法计算红景天苷、酪醇、络赛维的质量分数，结果见表 2。

表 2 红景天提取物样品的测定（*n*=3）

Table 2 Determination of *R. rosea* extract samples (*n* = 3)

样品号	厂家	红景天苷/%	酪醇/%	络赛维/%
1	成都华高药业有限公司	3.20	0.29	2.80
2	成都华高药业有限公司	2.86	0.25	2.21
3	成都华高药业有限公司	3.00	0.27	2.32
4	成都华高药业有限公司	3.12	0.24	2.44
5	茂县羌医药研究所	2.71	0.33	0.83
6	茂县羌医药研究所	3.43	0.42	1.08
7	成都华高药业有限公司	3.02	0.34	2.91
8	茂县羌医药研究所	2.75	0.39	0.48
9	茂县羌医药研究所	2.87	0.49	0.86

3 讨论

3.1 多成分的选择依据

红景天提取物中含有红景天苷、酪醇、络赛维、洛塞琳、洛缪等成分，其中后 3 种为红景天特有成分。本实验选取有效成分中具有代表性的且对照品相对较易得的苷（红景天苷、络赛维）及苷元（酪醇）进行定量测定方法学探索，为后期开展红景天提取物的综合质量控制评价提供基础数据和参考。

采用所建立的方法对不同来源的红景天提取物中的多种成分进行测定，结果表明单一采用红景天苷作为质量控制指标，9 批样品的差异度非常小，如果将酪醇或络赛维引入质量评价体系，则红景天提取物各批次间就存在较大的差异；但是，同一来源的样品间的差异度较小。因此引入多成分的测定方法，可以评价不同来源提取物质量的差异，并筛选出导致质量差异的成分，为提取物的工艺优化提供参考。

3.2 HPLC-小粒径色谱柱法的优势

常规色谱柱很难实现极性差别较大的物质的快速分离测定[2-4]，而 HPLC-小粒径色谱柱法则可以实现。常规色谱柱分离效能较差，而小粒径色谱柱分离效能高，且灵敏度高，可实现小量进样分析要求。常规色谱柱分离所需的流动相用量大，而小粒径色谱柱可实现较小用量达到实验分析的要求。

HPLC-小粒径色谱柱法需要对对照品溶液、供

试品溶液以及流动相进行小粒径滤膜（0.2 μm）滤过的前处理，还需要克服柱压过高的问题，这需要选择合适的小粒径色谱柱。本实验选择 2.7 μm 粒径色谱柱，而没有选择 1.8 μm 或 2.2 μm 粒径色谱柱就是考虑到实验需符合普通高效液相色谱仪柱压要求，而不超过其柱压承受范围。

参考文献

[1] 朱 薇. 反相高效液相色谱法测定蔷薇红景天片中 Rosavin 的含量 [J]. 中成药, 2007, 29(4): 附 1-附 2.

[2] 杨晓艳, 芦启琴, 娄灯吉, 等. HPLC 法同时测定红景天中红景天苷、酪醇和没食子酸 [J]. 分析实验室, 2009, 28(增刊): 57-60.

[3] 卢义德, 姚 欣, 张 囡, 等. HPLC 法测定玫瑰红景天中 3 种有效成分的含量 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24(6): 452-453.

[4] 易智彪, 赖小平, 许冬瑾. HPLC 法同时测定红景天中红景天苷和酪醇 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1827-1830.

[5] Shao Y D, Su Y F, Yu H J, *et al*. Determination of marker compounds in plants of *Rhodiola* L. from different habitats by RP-HPLC [J]. 中草药, 2004, 35(5): 505-508.

欢迎订阅

Chinese Herbal Medicines（CHM, 中草药英文版）

我国第一份中药专业的英文期刊——*Chinese Herbal Medicines*（CHM，中草药英文版）经国家新闻出版总署批准，已于 2009 年 10 月正式创刊，国内统一连续出版号为：CN12—1410/R。

CHM 由天津药物研究院和中国医学科学院药用植物研究所主办，天津中草药杂志社出版。中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长肖培根教授担任主编；中国工程院院士、天津药物研究院刘昌孝研究员，天津药物研究院院长汤立达研究员，中国医学科学院药用植物研究所所长陈士林研究员共同担任副主编；天津药物研究院医药信息中心主任、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员担任编辑部主任。

办刊宗旨 以高起点、国际化为特点，继承和发扬祖国医药学遗产，报道和反映中草药研究最新进展，宣扬我国中草药的传统特色，加强与世界各国在传统药物研究的经验交流，在中医和西医、传统与现代、东方与西方之间架起一座理解和沟通的桥梁，促进中药现代化、国际化。

主要栏目 综述与述评、论著、快报、简报、文摘、信息和国际动态、人物介绍、来信、书评等栏目。

读者对象 国内外从事中医药研究、管理、监督、检验和临床的专业技术人员。

CHM 邀请相关领域的院士和国内外知名专家加盟，组建一支国际化、高水平、精干的编委会队伍（第一届编辑委员会由 49 位专家组成，其中院士 10 名，国外编委 19 名）。吸引国内外高质量的稿件，提高期刊的学术质量；坚持按照国际标准编排，加强刊物规范化和标准化，充分利用计算机、网络技术和英语，加强与国际知名科技期刊的交流合作；充分发挥中医药特色，争取在较短时间内进入国际最著名的检索系统——美国科学引文索引（SCI），把 CHM 办成国际知名期刊之一。

欢迎广大作者踊跃投稿！ 欢迎广大读者积极订阅！自办发行，直接与编辑部订阅！

本刊已正式开通网上在线投稿系统。欢迎投稿、欢迎订阅！ **网址:** www.tiprpress.com

Chinese Herbal Medicines（CHM, 中草药英文版）编辑部

天津编辑部
地址：天津市南开区鞍山西道 308 号
邮编：300193
E-mail: chm@tiprpress.com
Tel: (022)27474913
Fax: (022)23006821

北京编辑部
地址：北京市海淀区马连洼北路 151 号
邮编：100193
E-mail: chm@tiprpress.com
Tel: (010)62894436
Fax: (010)62894436

开户银行：兴业银行天津南开支行 **账号：**44114010010081504 **户名：**天津中草药杂志社