HPLC-UV-ELSD 同时测定复方红景天胶囊中 8 种成分

殷洪梅[1, 2]，刘俊超[1, 2]，徐忠坤[1, 2]，韦迎春[1, 2]，陶永华[1, 2]，付 娟[1, 2]，孙永城[1, 2]，萧 伟[1, 2]

1. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室，江苏 连云港 222001

摘 要：目的 采用 HPLC-UV-ELSD 同时测定复方红景天胶囊中大花红天素、没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、肉桂酸 8 种成分。**方法** 应用 KromasiL 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-0.3%冰醋酸水溶液，梯度洗脱，体积流量 1.0 mL/min，紫外检测波长 275 nm，柱温 30 ℃，蒸发光散射检测器漂移管温度 40 ℃，载气 N_2，压力 150 kPa。**结果** 大花红天素、没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、肉桂酸 8 种成分能够达到很好分离；其线性范围分别为 67.084～670.84（R^2＝0.999 2）、11.410～114.100（R^2＝0.999 4）、78.995～789.95（R^2＝0.999 6）、19.625～196.25（R^2＝0.999 7）、59.368～593.68（R^2＝0.999 8）、62.585～625.85（R^2＝0.999 5）、55.045～550.45（R^2＝0.999 6）、6.895～68.95 μg/mL（R^2＝0.999 8）；平均回收率分别为 100.8%、98.9%、100.1%、100.8%、98.9%、99.6%、100.7%、99.2%，RSD 分别为 0.64%、0.56%、0.35%、0.65%、0.26%、0.58%、1.00%、0.64%（n＝6）。**结论** 该方法分析简便、准确，可作为该制剂的定量分析方法。

关键词：复方红景天胶囊；HPLC-UV-ELSD；大花红天素；没食子酸；红景天苷；酪醇；哈巴苷；哈巴俄苷；安格洛苷 C；肉桂酸

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2016)05 - 0771 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.014

Simultaneous determination of eight constituents in Compound Rhodiola Capsule by HPLC-UV-ELSD

YIN Hong-mei[1, 2], LIU Jun-chao[1, 2], XU Zhong-kun[1, 2], WEI Ying-chun[1, 2], TAO Yong-hua[1, 2], FU Juan[1, 2], SUN Yong-cheng[1, 2], XIAO Wei[1, 2]

1. Jiangsu Kanion PharmaceuticaL Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-UV-ELSD method for the simultaneous determination of crenelatin, gallic acid, salidroside, tyrosol, harpagide, harpagoside, angoroside C, and cinnamic acid in Compound Rhodiola Capsule. **Methods** Kromasil C_{18} column (250 mm× 4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and 0.3% HAC (B) with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 275 nm. the column temperature was 30 ℃, and the evaporative light-scattering detector (ELSD) drift tube temperature was 40 ℃, and gas pressure of 1.5 bar (150 kPa). **Results** Crenelatin, gallic acid, salidroside, tyrosol, harpagide, harpagoside, angoroside C, and cinnamic acid were separated well. The linear calibration curves were obtained in 67.084—670.84 μg/mL for crenelatin, R^2 = 0.999 2; 11.410—114.100 μg/mL for gallic acid, R^2 = 0.999 4; 78.995—789.95 μg/mL for salidroside, R^2 = 0.999 6; 19.625—196.25 μg/mL for tyrosol, R^2 = 0.999 7; 59.368—593.68 μg/mL for harpagide, R^2 = 0.999 8; 62.585—625.85 μg/mL for harpagoside, R^2 = 0.999 5; 55.045—550.45 μg/mL for angoroside C, R^2 = 0.999 6; and 6.895—68.95 μg/mL for cinnamic acid, R^2 = 0.999 8. The average recoveries of the eight constituents were 100.8%, 98.9%, 100.1%, 100.8%, 98.9%, 99.6%, 100.7%, and 99.2% with RSD of 0.64%, 0.56%, 0.35%, 0.65%, 0.26%, 0.58%, 1.00%, and 0.64%. **Conclusion** The method is convenient, accurate, and can be used for the simultaneous determination of the preparation.

Key words: Compound Rhodiola Capsule; HPLC-UV-ELSD; crenelatin; gallic acid; salidroside; tyrosol; harpagide; harpagoside; angoroside C; cinnamic acid

收稿日期：2015-08-25

基金项目：科技部重大新药创制：现代中药创新集群与数字制药技术平台（2013ZX09402203），负责人：王振中

作者简介：殷洪梅（1982—），女，主要从事中药新药研究及制药新技术研究。Tel: 15062987446 E-mail: yinhongmei1010@126.com

***通信作者** 萧 伟，男，研究员级高级工程师，博士；研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionLunwen@163.com

复方红景天胶囊处方由红景天、玄参 2 味药材组成，主要用于治疗缺血性脑卒中[1]。据报道，红景天中主要含有红景天苷、酪醇、大花红天素、没食子酸、洛塞维等成分[2-3]。红景天苷及其苷元酪醇为红景天已知有效成分[4-7]，大花红天素是红景天中特有成分，专属性好[2]，药材中其量较高，对脑及肺微血管内皮细胞凋亡有调节作用[8-9]。玄参中主要含有环烯醚萜类、苯丙素类、三萜皂苷类、有机酸类等成分，其中哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C 为玄参主要活性成分[10]。原标准采用 HPLC 法分别测定了该制剂中红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C; 为更有效控制复方红景天胶囊的质量，本实验采用 HPLC-UV-ELSD 在同一色谱条件下，测定该制剂中大花红天素、没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、肉桂酸 8 个成分。结果表明，该方法良好，可为全面控制复方红景天胶囊内在质量提供参考。

1 仪器与试药

ULtiMate 3000 高效液相色谱仪，Thermo Fisher 公司，DAD 紫外检测器，SEDEX80 LT-ELSD 检测器；BP211D、XP6 电子天平，梅特勒-托利多国际股份有限公司。红景天苷（批号 110818-201206，质量分数 99.8%）、酪醇（批号 111676-200401，质量分数 100%）、没食子酸（批号 110831-200803，质量分数 90.1%）、肉桂酸（批号 110786-200503，质量分数 100%），均购自中国食品药品检定研究院；大花红天素，自制，批号 20131210，质量分数 99.89%；哈巴苷（批号 MUST-15031105，质量分数 99.88%）、哈巴俄苷（批号 MUST-13071801，质量分数≥98%）、安格洛苷 C（批号 MUST-14120502，质量分数 99.32%），成都曼斯特生物科技有限公司；复方红景天胶囊（批号 140914、141015、141201、150311、150314、150316，规格：0.39 g/粒）由江苏康缘药业股份有限公司提供；乙腈为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取大花红天素、哈巴苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成含大花红天素 670.84 μg/mL、哈巴苷 593.68 μg/mL 的混合对照品储备液①。

取红景天苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、没食子酸、酪醇、肉桂酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成含红景天苷 789.95 μg/mL、哈巴俄苷 625.85 μg/mL、安格洛苷 C 550.45 μg/mL、没食子酸 114.10 μg/mL、酪醇 196.25 μg/mL、肉桂酸 68.95 μg/mL 的混合对照品储备液②。

2.2 供试品溶液的制备

取复方红景天胶囊内容物约 0.2 g，精密称定，至 50 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声处理 30 min，放冷，加甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3 阴性对照溶液制备

依照复方红景天胶囊标准，由相关辅料制得复方红景天阴性胶囊，按照“2.2”项下方法制得空白对照溶液。

2.4 色谱条件

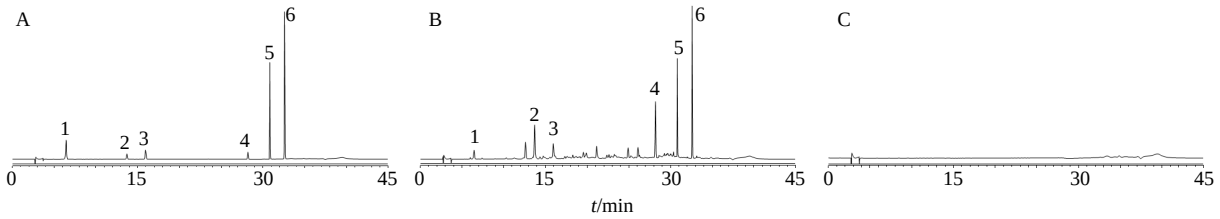
色谱柱为 KromasiL C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.3%冰醋酸水溶液[8]，梯度洗脱程序为 0～10 min，3%～10%乙腈；10～25 min，10%～25%乙腈；25～30 min，25%～50%乙腈；30～35 min，50%～80%乙腈；35～36 min，80%～3%乙腈；36～45 min，3%乙腈；体积流量 1.0 mL/min，柱温 30 ℃，进样体积 10 μL；没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴俄苷、安格洛苷 C、肉桂酸用紫外检测器检测，检测波长为 275 nm；大花红天素、哈巴苷用蒸发光散射检测器检测，漂移管温度 40 ℃，载气 N_2，压力为 150 kPa。

2.5 专属性考察

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液，按照“2.4”项下方法进样检测，结果表明供试品色谱图中呈现与对照品主峰保留时间一致的色谱峰，阴性对照无干扰。大花红天素、没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、肉桂酸与其相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，拖尾因子在 1.00～1.10，理论塔板数以各色谱峰计均在 10 000 以上。结果见图 1～2。

2.6 线性关系的考察

取“2.1”项下混合对照品储备液①，精密量取 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、10.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得系列混合对照品溶液。按“2.4”项色谱条件，分别精密吸取上述溶液各 10 μL，测定峰面积，以质量浓度对数为横坐标（X），峰面积对数为纵坐标（Y）进行线性回归，结果表明，大花红天素、哈巴苷在相应质量浓度范围内呈良好线性关系，线性范围、回归方程、相关系数分别为大花红天素 Y＝1.030 8 X－1.590 7，R^2＝0.999 2，线性范围 67.084～670.84 μg/mL；哈



1-没食子酸 2-红景天苷 3-酪醇 4-安格洛苷 C 5-哈巴俄苷 6-肉桂酸

1-gallic acid 2-salidroside 3-tyrosol 4-angoroside C 5-harpagoside 6-cinnamic acid

图 1 混合对照品 (A)、复方红景天胶囊供试品 (B) 和阴性对照样品 (C) 的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), and negative control sample (C)

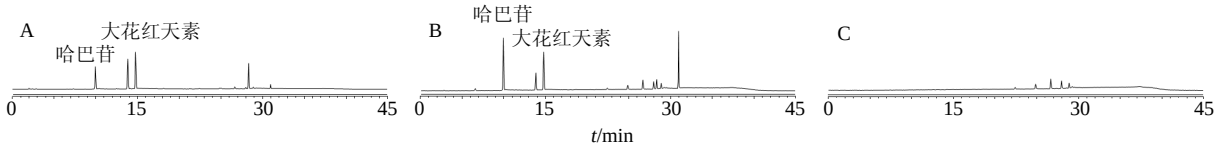


图 2 混合对照品 (A)、复方红景天胶囊供试品 (B) 和阴性对照样品 (C) 的 HPLC-ELSD 图谱

Fig. 2 HPLC-ELSD chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), and negative control sample (C)

巴苷 Y=1.007 6 X−1.756 8，R^2=0.999 8，线性范围 59.368～593.68 μg/mL。

取“2.1”项下混合对照品储备液②，精密量取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得系列混合对照品溶液。按“2.4”项色谱条件，分别精密吸取上述溶液各 10 μL，测定峰面积，以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，结果表明，红景天苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、没食子酸、酪醇、肉桂酸在相应质量浓度范围内呈良好线性关系，线性范围、回归方程、相关系数分别为没食子酸：Y=0.306 8 X+0.146 0，R^2=0.999 4，线性范围 11.410～114.100 μg/mL；酪醇：Y=0.053 9 X+0.035 4，R^2=0.999 7，线性范围 19.625～196.250 μg/mL；肉桂酸：Y=0.288 6 X+0.065 4，R^2=0.999 8，线性范围 6.895～68.950 μg/mL；红景天苷：Y=0.024 6 X−0.092 2，R^2=0.999 6，线性范围 78.995～789.95 μg/mL；哈巴俄苷：Y=0.432 2 X−0.684 7，R^2=0.999 5，线性范围 62.585～625.85 μg/mL；安格洛苷 C：Y=0.097 1 X+0.132 6，R^2=0.999 6，线性范围 55.045～550.45 μg/mL。

2.7 精密度试验

精密吸取“2.1”项下的混合对照品溶液，连续进样 6 次，按上述色谱条件测定峰面积，计算，求得大花红天素、哈巴苷、没食子酸、酪醇、肉桂酸、红景天苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C 峰面积的 RSD 分别为 0.39%、1.03%、0.37%、1.01%、0.86%、0.65%、0.58%、0.31%。

2.8 重复性试验

取胶囊（批号 140914）内容物，按照“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，分别进样，测定峰面积，计算质量分数。结果大花红天素、哈巴苷、没食子酸、酪醇、肉桂酸、红景天苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C 的平均质量分数的 RSD 分别为 1.27%、0.97%、1.11%、0.57%、1.20%、1.56%、0.31%、0.23%。

2.9 稳定性试验

取胶囊（批号 140914）内容物，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于 2、4、8、12、16、24 h 进样测定，记录峰面积。结果大花红天素、哈巴苷、没食子酸、酪醇、肉桂酸、红景天苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C 峰面积的 RSD 分别为 1.10%、1.84%、0.96%、1.91%、0.78%、1.33%、1.13%、1.85%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 回收率试验

取已测定的样品（批号 140914，大花红天素、没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、肉桂酸分别为 33.78、4.42、29.80、8.52、27.46、24.11、22.88、2.72 mg/粒）0.1 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，精密加入大花红天素对照品 8.708 mg、红景天苷对照品 7.827 mg、哈巴苷对照品 7.212 mg、哈巴俄苷对照品 6.332 mg、安格洛苷 C 对照品 6.009 mg、没食子酸、肉桂酸、酪醇对照品溶液（1.162、0.714、2.238 mg/mL）各 1 mL，采用“2.2”项下供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，计算回收率。结果大花红天素、红景天苷、酪醇、没食子酸、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、

肉桂酸的平均回收率分别为 100.8%、100.1%、100.8%、98.9%、98.9%、99.6%、100.7%、99.2%，RSD 分别为 0.64%、0.35%、0.65%、0.56%、0.26%、0.58%、1.00%、0.64%。

2.11　样品测定

分别取不同批号的复方红景天胶囊适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件测定，记录色谱图，计算 8 种成分质量分数。结果见表 1。

表 1　6 批复方红景天胶囊样品中 8 种成分定量测定结果 (n = 3)

Table 1　Detemination of six batches of samples in Compound Rhodiola Capsule (n = 3)

批号	质量分数/(mg·粒$^{-1}$)							
	大花红天素	没食子酸	红景天苷	酪醇	哈巴苷	哈巴俄苷	安格洛苷 C	肉桂酸
140914	33.78	4.42	29.80	8.52	27.46	24.11	22.88	2.72
141015	38.48	3.98	31.42	8.14	26.45	22.79	23.19	3.79
141201	31.23	4.56	32.06	10.44	26.87	20.82	23.76	3.45
150311	32.19	5.31	30.12	14.57	25.43	19.45	21.82	2.98
150314	35.26	5.29	28.23	13.29	24.18	20.19	22.01	4.15
150316	33.19	3.52	26.18	12.18	23.49	21.45	24.79	5.29

3　讨论

3.1　检测方式的选择

复方红景天胶囊中大花红天素紫外无吸收，哈巴苷为末端吸收，故选用蒸发光散射检测器（ELSD）对 2 种成分进行分析。ELSD 虽为通用型质量检测器，但灵敏度较紫外检测器低，同时测定该制剂中 8 种成分较困难，故选择紫外检测器对红景天苷、酪醇、没食子酸、哈巴俄苷、安格洛苷 C 及肉桂酸 6 种成分进行分析，所以本实验建立了 UV 检测器与 ELSD 串联同时测定复方红景天胶囊中 8 种成分[11-13]。

3.2　测定波长的选择

分别取红景天苷、酪醇、没食子酸、哈巴俄苷、安格洛苷 C 及肉桂酸的甲醇溶液用 PDA 检测器在 200～400 nm 扫描，结果表明没食子酸、红景天苷、酪醇在 275 nm 处有最大吸收，哈巴俄苷、肉桂酸在 280 nm 处有最大吸收，安格洛苷 C 在 275、330 nm 处均有吸收，故选择 275 nm 波长下测定 6 种成分，各指标成分峰峰型良好，基线平稳，分离度高。

3.3　色谱条件的选择

考察了 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%冰醋酸体积分数对分离度的影响。结果不同醋酸体积分数对峰的保留时间影响较大，对峰型和分离度也有一定的影响，以 0.3%冰醋酸体积分数为佳。

3.4　供试品制备方法考察

以大花红天素、没食子酸、红景天苷、酪醇、哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C 和肉桂酸的提取率为考察指标，考察了提取溶剂（甲醇及 95%、70%乙醇）、提取方式（超声处理和回流提取）、提取溶剂用量（25、50、100 mL）、提取时间（15、30、45 min）的提取效果，结果表明采用甲醇 50 mL 超声处理 30 min，提取收率最高。

参考文献

[1] 伍小艳, 周　军, 石　伟, 等. 红景天玄参组合物对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(4): 353-358.
[2] 王　曙, 王锋鹏. 大花红景天化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1992, 27(2): 117-120.
[3] 刘　青, 杜守颖, 多吉仁青, 等. HPLC 法同时测定不同产地大花红景天中 6 种活性成分 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 276-279.
[4] 黄钰芳. 红景天活性成分及药理作用 [J]. 中医药临床杂志, 2008, 20(5): 528-530.
[5] 张明发, 沈雅琴. 红景天苷抗痴呆药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(6): 675-681.
[6] 陈　菲, 艾　国, 盛柳青, 等. 浙贝母、天麻和红景天最细粉的稳定性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3397-3401.
[7] 郑明昱, 金哲悟, 朴红梅, 等. 红景天苷通过 NF-κB/TGF-β1 信号通路抑制哮喘小鼠气道重塑的实验研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2511-2516.
[8] 钱睿哲, 张国平, 金惠铭, 等. 大花红天素对脑微血管内皮细胞凋亡的双相调节作用及机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(11): 2086-2090.
[9] 张国平, 金惠铭, 王文健, 等. 大花红天素对大鼠肺微血管内皮细胞凋亡影响的实验研究 [J]. 中国微循环, 2004, 8(5): 272-273.
[10] 胡瑛瑛, 黄　真. 玄参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(2): 268-270.
[11] 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.
[12] 杨　宪, 杨水平, 张　雪, 等. HPLC-UV-ELSD 同时测定玄参中 5 种成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 68-71.
[13] 中国药典 [S]. 一部. 2010.