

HPLC法同时测定3种红景天药材中5种化学成分的含量^Δ

吕秀梅^{1,2*}, 范芳芳¹, 文 检¹, 范 刚¹, 张 静^{1#}, 张 艺¹(1. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2. 重庆市江津区中医院药学部, 重庆 402260)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2515-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.16

摘要 目的: 建立同时测定大花红景天、狭叶红景天和长鞭红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸含量的方法, 并比较3种红景天药材中5种化学成分的含量差异。方法: 采用高效液相色谱法测定含量, 色谱柱为WondaSil C₁₈, 流动相为乙腈-0.3%磷酸溶液(梯度洗脱), 检测波长为275 nm, 柱温为25 ℃, 流速为1.0 mL/min, 进样量为10 μL; 采用GraphPad Prism 5.0软件对含量测定结果进行单因素方差分析和Tukey's多重比较。结果: 没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸的检测进样量线性范围分别为0.020 48~0.614 4 μg($r=0.999\ 7$)、0.118~3.54 μg($r=0.999\ 5$)、0.010 84~0.325 2 μg($r=0.999\ 7$)、0.008 48~0.254 4 μg($r=0.999\ 5$)、0.004 1~0.123 μg($r=0.999\ 5$); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%; 加样回收率分别为99.62%~104.92% (RSD=1.68%, $n=9$)、96.55%~100.69% (RSD=1.67%, $n=9$)、98.91%~103.39% (RSD=1.48%, $n=9$)、100.93%~104.98% (RSD=1.37%, $n=9$)、97.71%~103.89% (RSD=1.99%, $n=9$)。大花红景天中没食子酸、红景天苷、酪醇和咖啡酸含量均显著高于长鞭红景天, 大花红景天中的红景天苷、咖啡酸含量均显著高于狭叶红景天, 差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。结论: 该方法简便可行、结果准确, 可用于同时测定大花红景天、狭叶红景天和长鞭红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸的含量。3种常见红景天药材中的化学成分含量存在较大差异, 大花红景天中红景天苷的含量最高。

关键词 高效液相色谱法; 单因素方差分析; Tukey's多重比较; 红景天; 没食子酸; 红景天苷; 酪醇; 咖啡酸; 对香豆酸; 含量

Simultaneous Determination of 5 Chemical Components in 3 Kinds of *Rhodiola rosea* by HPLC

LYU Xiumei^{1, 2}, FAN Fangfang¹, WEN Jian¹, FAN Gang¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Yi¹ (1. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Jiangjin District Hospital of TCM, Chongqing 402260, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of gallic acid, salidroside, tyrosol, caffeic acid and *p*-coumaric acid in *Rhodiola crenulata*, *R. kirilowii* and *R. fastigiata*, and to compare the content difference of 5 chemical components in 3 kinds of *R. rosea*. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on WondaSil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The

- cephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European association for the study of the liver and the American association for the study of liver diseases[J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 715-735.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 化学药和生物制品卷[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 401.
- [5] 陈孝治, 瑞甘[J]. 中南药学, 2004, 2(4): 254-255.
- [6] FAROOQ A, HOQUE R, OUYANG X, et al. Activation of N-methyl-daspartate receptor downregulates inflammatory activity and liver inflammation via a β -arrestin-2 pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 307(7): G732-G740.
- [7] 成军. 门冬氨酸鸟氨酸的肝病临床应用与研究进展[J]. 中国肝脏病杂志, 2015, 7(3): 49-51.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 43-44.
- [9] The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia* 40: volume 2[S]. Baltimore: United Book Press, 2017: 2868-2869.
- [10] 孟福庆, 陶建国. 门冬氨酸鸟氨酸盐的制备[J]. 科技视界, 2014(13): 277.
- [11] 徐克勋. 精细有机化工原料和中间体手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 1446-1447.
- [12] 马江权, 冷一欣, 周宏斌, 等. DL-天冬氨酸合成工艺研究[J]. 江苏石油化工学院学报, 2000, 12(2): 8-11.
- [13] 张梦悦, 宋晓妮, 李曼琳, 等. 柱前衍生化RP-HPLC法测定L-鸟氨酸盐酸盐的有关物质[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(4): 284-288.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81203000)

* 药师, 硕士。研究方向: 中药及民族药药效物质基础及质量控制。E-mail: lvxiu1@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药及民族药药效物质基础及质量控制。E-mail: zhangjingtcm@cduetcm.edu.cn

(收稿日期: 2018-02-28 修回日期: 2018-06-19)

(编辑: 陈 宏)

detection wavelength was set at 275 nm, and the column temperature was 25 °C. Sample size was 10 μL. GraphPad Prism 5.0 software was used for single factor variance analysis and Tukey's multiple comparison of content determination results. RESULTS: The linear ranges of gallic acid, salidroside, tyrosol, caffeic acid and *p*-coumaric acid were 0.020 48-0.614 4 μg ($r=0.999\ 7$), 0.118-3.54 μg ($r=0.999\ 5$), 0.010 84-0.325 2 μg ($r=0.999\ 7$), 0.008 48-0.254 4 μg ($r=0.999\ 5$) and 0.004 1-0.123 μg ($r=0.999\ 5$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 99.62% -104.92% (RSD=1.68%, $n=9$), 96.55% -100.69% (RSD=1.67%, $n=9$), 98.91% -103.39% (RSD=1.48%, $n=9$), 100.93% -104.98% (RSD=1.37%, $n=9$), 97.71% -103.89% (RSD=1.99%, $n=9$), respectively. The contents of gallic acid, salidroside, tyrosol and caffeic acid in *R. crenulata* were higher than *R. fastigiata*; the contents of salidroside and caffeic acid in *R. crenulata* were significantly higher than *R. kirilowii*, with statistical significance ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$). CONCLUSIONS: The method is simple, feasible and accurate, and can be used for simultaneous determination of gallic acid, salidroside, tyrosol, caffeic acid and *p*-coumaric acid in *R. crenulata*, *R. kirilowii* and *R. fastigiata*. There was great difference in the contents of chemical components in 3 kinds of common *R. rosea*, the content of salidroside is the highest in *R. crenulata*.

KEYWORDS HPLC; Single factor variance analysis; Tukey's multiple comparison; *Rhodiola rosea*; Gallic acid; Salidroside; Tyrosol; Caffeic acid; *p*-coumaric acid; Content

红景天为藏医临床常用药材,始载于《四部医典》^[1],藏语称为“索罗玛布”。《晶珠本草》^[2]中记载:“大株红景天治瘟病时疫,清肺热,治脉病。”有研究表明,红景天具有抗缺氧、抗衰老、抗氧化等功效^[3-7],其有效活性成分主要为红景天苷、红景天素、没食子酸、酪醇等^[8-10]。近年来,随着红景天的需求量激增,市场上出现许多近缘品种代用的现象。红景天及其常用近缘品种虽具有相似的化学成分,如红景天苷、酪醇等,但含量存在着差异^[11-12]。

2015年版《中国药典》(一部)^[13]规定大花红景天 [*Rhodiola crenulata* (Hk. f. et Thoms.) H. Ohba]为基源药材,2014年版《四川省藏药材标准》^[14]中收录了狭叶红景天 [*R. kirilowii* (Regel) Maxim],而长鞭红景天 [*R. fastigiata* (Hk. f. et Thoms.) S. H. Fu]野生资源储量相当丰富,且此3种红景天药材在四川省草原科学研究院红原县红景天种植基地均有规范化种植。本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定上述3种红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸含量的方法,并对不同药材样品中各成分含量进行了比较,以为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030型HPLC仪,包括脱气单元、泵单元、低压梯度单元、柱温箱、自动进样器及紫外-可见分光检测器(日本岛津公司);SB-5200D型超声波清洗机(宁波新艺超声设备有限公司);TDZ5-W型台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);BSA124S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号:110831-201204,纯度:>98%)、红景天苷对照品(批号:110818-201206,纯度:>98%)均购自中国食品药品检定研究院;酪醇对照品(批号:MUST-15080501,纯度:>98%)、对香豆酸对照品(批号:MUST-15091503,纯度:>98%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;咖啡酸对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号:0211-0020,纯度:>98%);乙

睛、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

大花红景天、狭叶红景天、长鞭红景天药材样品各16批,均由本课题组野外实地采集所得,经成都中医药大学张艺研究员鉴定分别为景天科红景天属植物大花红景天 [*R. crenulata* (Hk. f. et Thoms.) H. Ohba]、狭叶红景天 [*R. kirilowii* (Regel) Maxim]、长鞭红景天 [*R. fastigiata* (Hk. f. et Thoms.) S. H. Fu]的根与根茎。药材样品来源见表1。

表1 药材样品来源

Tab 1 Source of medicinal materials

| 编号 | 品种 | 采集时间 | 采集地点 |
|-----|-------|-------------|-----------------|
| S1 | 大花红景天 | 2015年9月21日 | 四川省阿坝州小金县巴郎山 |
| S2 | 大花红景天 | 2015年9月20日 | 四川省阿坝州小金县大哇梁子山 |
| S3 | 大花红景天 | 2015年9月19日 | 四川省阿坝州茂县 |
| S4 | 大花红景天 | 2016年8月1日 | 四川省阿坝州黑水县 |
| S5 | 大花红景天 | 2015年7月11日 | 四川省甘孜州道孚县 |
| S6 | 大花红景天 | 2016年8月2日 | 四川省甘孜州稻城县 |
| S7 | 大花红景天 | 2016年8月24日 | 四川省甘孜州得荣县 |
| S8 | 大花红景天 | 2016年7月31日 | 四川省甘孜州九龙县 |
| S9 | 大花红景天 | 2016年8月23日 | 四川省凉山州冕宁县 |
| S10 | 大花红景天 | 2016年8月5日 | 青海省果洛州久治县 |
| S11 | 大花红景天 | 2015年9月29日 | 西藏自治区林芝市工布江达县 |
| S12 | 大花红景天 | 2015年10月1日 | 西藏自治区林芝市林芝县 |
| S13 | 大花红景天 | 2016年8月25日 | 西藏自治区林芝市朗县 |
| S14 | 大花红景天 | 2016年8月28日 | 西藏自治区那曲市嘉黎县 |
| S15 | 大花红景天 | 2016年8月22日 | 云南省迪庆州香格里拉县 |
| S16 | 大花红景天 | 2016年8月22日 | 云南省迪庆州香格里拉县哈巴雪山 |
| S17 | 狭叶红景天 | 2015年9月21日 | 四川省阿坝州小金县巴郎山 |
| S18 | 狭叶红景天 | 2015年9月20日 | 四川省阿坝州小金县大哇梁子山 |
| S19 | 狭叶红景天 | 2016年7月17日 | 四川省阿坝州小金县巴郎山 |
| S20 | 狭叶红景天 | 2015年7月15日 | 四川省阿坝州红原县瓦切乡 |
| S21 | 狭叶红景天 | 2016年8月23日 | 四川省阿坝州红原县瓦切乡 |
| S22 | 狭叶红景天 | 2015年9月14日 | 四川省阿坝州马尔康县 |
| S23 | 狭叶红景天 | 2015年10月25日 | 四川省甘孜州甘孜县 |
| S24 | 狭叶红景天 | 2016年7月31日 | 四川省甘孜州九龙县 |
| S25 | 狭叶红景天 | 2015年7月11日 | 四川省甘孜州道孚县 |
| S26 | 狭叶红景天 | 2016年8月2日 | 四川省甘孜州稻城县 |
| S27 | 狭叶红景天 | 2016年8月24日 | 四川省甘孜州得荣县 |
| S28 | 狭叶红景天 | 2016年8月26日 | 四川省甘孜州白玉县 |
| S29 | 狭叶红景天 | 2016年8月27日 | 四川省甘孜州德格县 |
| S30 | 狭叶红景天 | 2016年8月29日 | 青海省玉树州玉树市 |
| S31 | 狭叶红景天 | 2016年8月22日 | 云南省迪庆州香格里拉县 |

续表 1

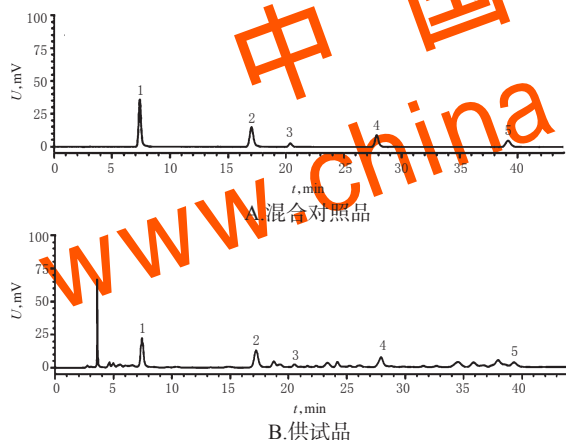
Continued tab 1

| 编号 | 品种 | 采集时间 | 采集地点 |
|-----|-------|------------|-----------------|
| S32 | 狭叶红景天 | 2016年8月3日 | 甘肃省甘南州合作市 |
| S33 | 长鞭红景天 | 2015年9月21日 | 四川省阿坝州小金县巴郎山 |
| S34 | 长鞭红景天 | 2015年9月20日 | 四川省阿坝州小金县大哇梁子山 |
| S35 | 长鞭红景天 | 2016年8月1日 | 四川省阿坝州黑水县 |
| S36 | 长鞭红景天 | 2015年9月14日 | 四川省阿坝州马尔康县 |
| S37 | 长鞭红景天 | 2015年7月10日 | 四川省甘孜州康定县 |
| S38 | 长鞭红景天 | 2015年7月11日 | 四川省甘孜州道孚县 |
| S39 | 长鞭红景天 | 2016年8月26日 | 四川省甘孜州白玉县 |
| S40 | 长鞭红景天 | 2016年8月24日 | 四川省甘孜州得荣县 |
| S41 | 长鞭红景天 | 2016年8月1日 | 四川省甘孜州雅江县 |
| S42 | 长鞭红景天 | 2016年8月23日 | 四川省凉山州冕宁县 |
| S43 | 长鞭红景天 | 2016年8月5日 | 青海省果洛州玛多县 |
| S44 | 长鞭红景天 | 2015年10月1日 | 西藏自治区林芝市林芝县色季拉山 |
| S45 | 长鞭红景天 | 2016年8月24日 | 西藏自治区林芝市林芝县色季拉山 |
| S46 | 长鞭红景天 | 2016年8月28日 | 西藏自治区那曲市嘉黎县 |
| S47 | 长鞭红景天 | 2016年8月22日 | 云南省迪庆州德钦县 |
| S48 | 长鞭红景天 | 2016年8月22日 | 云南省迪庆州香格里拉县 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱: WondaSil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 7% A; 10~20 min, 7% A→14% A; 20~30 min, 14% A→15% A; 30~50 min, 15% A→20% A); 检测波长: 275 nm; 柱温: 25 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。在该色谱条件下, 各成分峰之间分离度均大于1.5, 理论板数以没食子酸峰计应不低于4 000, 色谱图见图1。



注: 1. 没食子酸; 2. 红景天苷; 3. 酪醇; 4. 咖啡酸; 5. 对香豆酸

Note: 1. gallic acid; 2. salidroside; 3. tyrosol; 4. caffeic acid; 5.

p-coumaric acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸对照品各适量, 精密称定, 置于10 mL量瓶中, 分别加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为0.512、1.180、0.542、0.848、0.205 mg/mL的单一对照品贮备液。分别精密吸取上述各单一对照品贮备液2、5、1、0.5、1 mL, 置于同一50 mL量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀,

得没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸质量浓度分别为20.48、118、10.84、8.48、4.1 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品细粉约0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入70%乙醇溶液50 mL, 称定质量, 超声(功率: 200 W, 频率: 40 kHz)处理30 min, 放冷, 再次称定质量, 用70%乙醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 以4 000 r/min离心10 min, 取上清液, 即得供试品溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、5、10、15、20、25、30 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以各待测成分的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

| 待测成分 | 回归方程 | r | 线性范围, μg |
|------|---------------------------|---------|------------------|
| 没食子酸 | $y=3\ 000\ 000x+13\ 022$ | 0.999 7 | 0.020 48~0.614 4 |
| 红景天苷 | $y=291\ 292x+9\ 816.7$ | 0.999 5 | 0.118~3.54 |
| 酪醇 | $y=549\ 554x-3\ 250.1$ | 0.999 7 | 0.010 84~0.325 2 |
| 咖啡酸 | $y=2\ 000\ 000x+7\ 173.3$ | 0.999 5 | 0.008 48~0.254 4 |
| 对香豆酸 | $y=4\ 000\ 000x-10\ 321$ | 0.999 5 | 0.004 1~0.123 |

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸峰面积的RSD分别为0.96%、0.44%、1.23%、0.72%、0.81% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号: S1)适量, 分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸峰面积的RSD分别为1.83%、1.78%、1.89%、1.91%、1.63% (n=8), 表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取药材样品(编号: S1)细粉约0.5 g, 共6份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸平均含量分别为1.393、11.313、1.043、1.194、0.347 mg/g, RSD分别为1.53%、1.61%、1.73%、1.76%、1.95% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的药材样品(编号: S1)细粉约0.25 g, 共9份, 分别加入“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

| 待测成分 | 取样量, g | 样品含量, mg | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % | | | |
|---------|---------|----------|---------|---------|----------|------------|--------|-------|--------|------|
| 没食子酸 | 0.250 1 | 0.348 5 | 0.279 0 | 0.635 4 | 102.84 | 103.35 | 1.68 | | | |
| | 0.250 3 | 0.348 8 | 0.279 0 | 0.626 7 | 99.62 | | | | | |
| | 0.250 3 | 0.348 8 | 0.279 0 | 0.635 8 | 102.88 | | | | | |
| | 0.250 4 | 0.348 9 | 0.349 0 | 0.716 7 | 104.92 | | | | | |
| | 0.250 1 | 0.348 5 | 0.349 0 | 0.714 1 | 104.75 | | | | | |
| | 0.250 2 | 0.348 6 | 0.349 0 | 0.714 5 | 104.85 | | | | | |
| | 0.250 5 | 0.349 0 | 0.419 0 | 0.780 4 | 102.96 | | | | | |
| | 0.250 4 | 0.348 9 | 0.419 0 | 0.789 7 | 104.81 | | | | | |
| | 0.250 3 | 0.348 8 | 0.419 0 | 0.778 2 | 102.49 | | | | | |
| | 红景天苷 | 0.250 1 | 2.855 6 | 2.284 0 | 5.060 8 | | | 96.55 | 98.60 | 1.67 |
| | | 0.250 3 | 2.857 9 | 2.284 0 | 5.103 9 | | | 98.34 | | |
| | | 0.250 3 | 2.857 9 | 2.284 0 | 5.132 9 | | | 99.61 | | |
| 0.250 4 | | 2.859 0 | 2.853 0 | 5.728 0 | 100.56 | | | | | |
| 0.250 1 | | 2.855 6 | 2.853 0 | 5.701 2 | 99.74 | | | | | |
| 0.250 2 | | 2.856 7 | 2.853 0 | 5.729 4 | 100.69 | | | | | |
| 0.250 5 | | 2.860 1 | 3.424 0 | 6.176 8 | 96.87 | | | | | |
| 0.250 4 | | 2.859 0 | 3.424 0 | 6.229 9 | 98.45 | | | | | |
| 0.250 3 | | 2.857 9 | 3.424 0 | 6.165 5 | 96.60 | | | | | |
| 酪醇 | | 0.250 1 | 0.258 2 | 0.204 0 | 0.466 0 | 101.87 | 101.01 | 1.48 | | |
| | | 0.250 3 | 0.258 4 | 0.204 0 | 0.461 2 | 99.41 | | | | |
| | | 0.250 3 | 0.258 4 | 0.204 0 | 0.465 7 | 101.64 | | | | |
| | 0.250 4 | 0.258 5 | 0.254 0 | 0.512 6 | 100.06 | | | | | |
| | 0.250 1 | 0.258 2 | 0.254 0 | 0.509 4 | 98.91 | | | | | |
| | 0.250 2 | 0.258 3 | 0.254 0 | 0.515 0 | 101.08 | | | | | |
| | 0.250 5 | 0.258 6 | 0.310 0 | 0.579 1 | 103.39 | | | | | |
| | 0.250 4 | 0.258 5 | 0.310 0 | 0.576 5 | 102.59 | | | | | |
| | 0.250 3 | 0.258 4 | 0.310 0 | 0.568 9 | 100.18 | | | | | |
| | 咖啡酸 | 0.250 1 | 0.305 6 | 0.244 0 | 0.551 8 | 100.93 | | | 103.54 | 1.37 |
| | | 0.250 3 | 0.305 8 | 0.244 0 | 0.555 8 | 102.45 | | | | |
| | | 0.250 3 | 0.305 8 | 0.244 0 | 0.561 5 | 104.79 | | | | |
| 0.250 4 | | 0.305 9 | 0.304 0 | 0.625 1 | 104.98 | | | | | |
| 0.250 1 | | 0.305 6 | 0.304 0 | 0.622 1 | 104.13 | | | | | |
| 0.250 2 | | 0.305 7 | 0.304 0 | 0.615 6 | 101.94 | | | | | |
| 0.250 5 | | 0.306 0 | 0.364 0 | 0.686 8 | 104.60 | | | | | |
| 0.250 4 | | 0.305 9 | 0.364 0 | 0.683 6 | 103.77 | | | | | |
| 0.250 3 | | 0.305 8 | 0.364 0 | 0.685 2 | 104.24 | | | | | |
| 对香豆酸 | | 0.250 1 | 0.089 6 | 0.072 0 | 0.160 5 | 98.47 | 100.89 | 1.99 | | |
| | | 0.250 3 | 0.089 7 | 0.072 0 | 0.161 2 | 99.31 | | | | |
| | | 0.250 3 | 0.089 7 | 0.072 0 | 0.160 0 | 97.71 | | | | |
| | 0.250 4 | 0.089 7 | 0.090 0 | 0.181 1 | 101.57 | | | | | |
| | 0.250 1 | 0.089 6 | 0.090 0 | 0.180 6 | 101.12 | | | | | |
| | 0.250 2 | 0.089 7 | 0.090 0 | 0.181 4 | 101.98 | | | | | |
| | 0.250 5 | 0.089 8 | 0.108 0 | 0.202 0 | 103.89 | | | | | |
| | 0.250 4 | 0.089 7 | 0.108 0 | 0.199 2 | 101.38 | | | | | |
| | 0.250 3 | 0.089 7 | 0.108 0 | 0.200 5 | 102.58 | | | | | |

表4 样品含量测定结果($n=3, \text{mg/g}$)Tab 4 Results of content determination of samples ($n=3, \text{mg/g}$)

| 编号 | 品种 | 没食子酸 | 红景天苷 | 酪醇 | 咖啡酸 | 对香豆酸 |
|-----|-------|---------|----------|---------|---------|---------|
| S1 | 大花红景天 | 1.400 9 | 11.446 1 | 1.059 1 | 1.189 5 | 0.342 5 |
| S2 | 大花红景天 | 1.622 8 | 16.897 8 | 0.633 6 | 2.215 4 | 0.081 4 |
| S3 | 大花红景天 | 1.315 7 | 17.941 5 | 0.488 8 | 0.942 7 | 0.103 0 |
| S4 | 大花红景天 | 0.680 4 | 13.036 9 | 0.384 9 | 2.199 2 | 0.076 9 |
| S5 | 大花红景天 | 1.411 3 | 5.031 4 | 1.125 5 | 0.549 7 | 0.175 8 |
| S6 | 大花红景天 | 1.352 1 | 13.805 8 | 0.541 5 | 1.093 3 | 0.187 8 |
| S7 | 大花红景天 | 5.792 2 | 11.299 6 | 1.030 0 | 0.972 3 | 0.208 3 |
| S8 | 大花红景天 | 1.797 7 | 18.701 2 | 0.801 5 | 0.910 7 | 0.136 2 |
| S9 | 大花红景天 | 1.139 1 | 14.224 6 | 0.690 8 | 1.189 4 | 0.324 3 |
| S10 | 大花红景天 | 1.483 3 | 10.854 8 | 0.630 7 | 2.244 5 | 0.083 4 |
| S11 | 大花红景天 | 2.668 8 | 15.098 9 | 0.921 1 | 1.040 4 | 0.415 3 |
| S12 | 大花红景天 | 1.180 4 | 13.772 7 | 0.930 5 | 0.460 9 | 0.255 3 |
| S13 | 大花红景天 | 1.551 6 | 17.573 8 | 0.778 2 | 0.446 0 | 0.177 2 |
| S14 | 大花红景天 | 0.680 0 | 13.646 9 | 0.721 1 | 0.607 3 | 0.208 7 |
| S15 | 大花红景天 | 3.775 1 | 22.740 8 | 1.107 8 | 1.612 9 | 0.466 6 |
| S16 | 大花红景天 | 4.939 3 | 13.529 8 | 0.503 5 | 2.050 6 | 0.276 6 |
| S17 | 狭叶红景天 | 1.782 6 | - | 0.247 6 | 0.100 5 | 0.469 8 |
| S18 | 狭叶红景天 | 0.907 9 | 1.334 6 | 0.209 2 | 0.058 9 | 0.280 2 |
| S19 | 狭叶红景天 | 0.682 1 | 3.579 4 | 0.178 3 | 0.011 5 | 0.228 5 |
| S20 | 狭叶红景天 | 1.568 7 | 8.402 2 | 0.248 3 | 0.007 5 | 0.115 4 |
| S21 | 狭叶红景天 | 0.367 6 | - | 0.078 5 | - | 0.173 0 |
| S22 | 狭叶红景天 | 1.377 6 | 6.403 8 | 0.520 1 | 0.047 4 | 0.196 4 |
| S23 | 狭叶红景天 | 1.114 0 | 5.978 8 | 0.308 8 | 0.011 7 | 0.209 4 |
| S24 | 狭叶红景天 | 5.509 9 | 5.044 4 | 0.401 8 | - | 0.098 6 |
| S25 | 狭叶红景天 | 4.310 5 | 0.927 8 | 0.579 7 | 3.608 3 | 0.137 0 |
| S26 | 狭叶红景天 | 0.839 5 | 1.202 8 | 0.124 2 | 0.438 9 | 0.269 3 |
| S27 | 狭叶红景天 | 0.612 4 | - | 0.652 0 | - | 0.193 5 |
| S28 | 狭叶红景天 | 1.294 0 | 30.739 7 | 3.680 1 | 0.148 8 | 0.227 2 |
| S29 | 狭叶红景天 | 0.432 4 | 20.618 3 | 0.473 7 | 0.098 3 | 0.277 2 |
| S30 | 狭叶红景天 | 0.453 1 | 7.000 9 | 0.315 3 | 0.123 9 | 0.304 6 |
| S31 | 狭叶红景天 | 1.201 7 | 0.717 8 | 1.353 9 | 0.303 3 | 0.435 3 |
| S32 | 狭叶红景天 | 0.845 1 | 2.951 3 | 0.178 4 | 0.034 7 | 0.156 3 |
| S33 | 长鞭红景天 | 0.606 6 | 0.067 9 | 0.158 7 | 0.004 8 | 0.134 9 |
| S34 | 长鞭红景天 | 0.712 8 | 0.733 5 | 0.366 1 | 0.182 1 | 0.176 0 |
| S35 | 长鞭红景天 | 1.080 5 | - | 0.182 9 | 0.044 1 | 0.028 8 |
| S36 | 长鞭红景天 | 0.596 2 | 0.008 6 | 0.184 9 | 0.053 2 | 0.113 0 |
| S37 | 长鞭红景天 | 0.947 1 | 0.258 0 | 0.371 3 | 0.177 0 | 0.062 6 |
| S38 | 长鞭红景天 | 1.022 4 | - | 0.089 9 | 0.009 2 | 0.035 9 |
| S39 | 长鞭红景天 | 0.442 5 | - | 0.174 2 | 0.113 8 | 0.188 6 |
| S40 | 长鞭红景天 | 0.309 8 | - | 0.213 0 | 0.100 4 | 0.155 0 |
| S41 | 长鞭红景天 | 0.948 3 | - | 0.080 9 | 0.099 8 | 0.037 9 |
| S42 | 长鞭红景天 | 0.685 7 | 0.546 2 | 0.266 6 | 0.044 5 | 0.130 2 |
| S43 | 长鞭红景天 | 0.746 3 | 1.874 6 | 0.220 5 | 0.032 2 | 0.201 6 |
| S44 | 长鞭红景天 | 0.315 5 | 2.146 0 | 0.241 8 | 0.008 2 | 0.113 4 |
| S45 | 长鞭红景天 | 0.391 3 | 1.179 2 | 0.299 1 | 0.044 5 | 0.208 0 |
| S46 | 长鞭红景天 | 1.549 8 | 0.968 1 | 0.460 7 | 0.375 3 | 0.285 4 |
| S47 | 长鞭红景天 | 0.285 5 | - | 0.193 5 | 0.208 6 | 0.258 2 |
| S48 | 长鞭红景天 | 0.540 0 | 0.033 5 | 0.239 3 | 0.154 7 | 0.144 7 |

2.8 样品含量测定

分别取各批药材样品细粉适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4(注:“-”表示含量低于0.001 mg/g)。

采用GraphPad Prism 5.0软件对含量测定结果进行单因素方差分析和Tukey's多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。结果显示,大花红景天中的没食子酸、红景天苷、酪醇和咖啡酸含量均显著高于长鞭红景天,大花红景天中的红景天苷、咖啡酸含量均显著高于狭叶

红景天,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$);其中,红景天苷含量大花红景天>狭叶红景天>长鞭红景天,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.001$),详见图2(注:“*”为 $P<0.05$,“**”为 $P<0.01$,“***”为 $P<0.001$)。

3 讨论

本研究建立了采用HPLC法同时测定大花红景天、

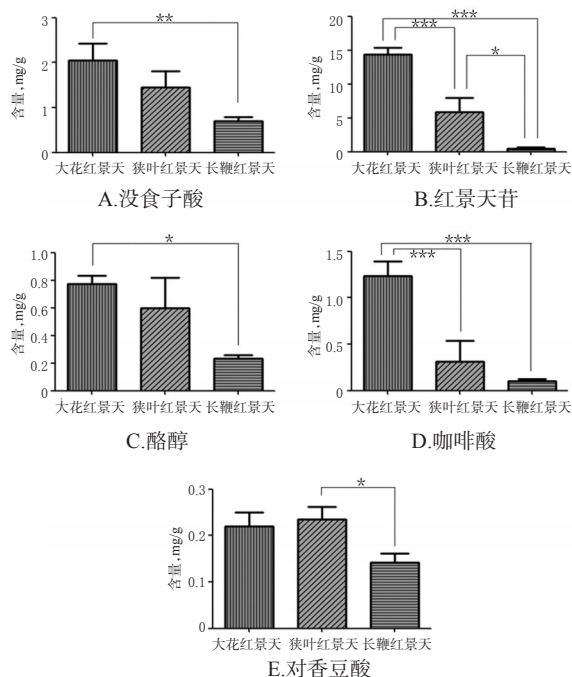


图2 大花红景天、狭叶红景天及长鞭红景天中5种成分含量比较的柱状图

Fig 2 Histograms of content comparison of 5 components in *R. crenulata*, *R. kirilowii* and *R. fastigiata*

狭叶红景天及长鞭红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸含量的方法,该方法简便可行,可为其质量控制提供参考。单因素方差分析和Tukey's多重比较结果显示,大花红景天、狭叶红景天及长鞭红景天中5种化学成分含量存在显著差异,大花红景天中没食子酸、红景天苷、酪醇和咖啡酸含量均显著高于长鞭红景天,大花红景天中的红景天苷、咖啡酸含量均显著高于狭叶红景天。

同一品种红景天药材不同产地的化学成分含量也存在较大差异,如四川省甘孜州白玉县(S28)及德格县(S29)所产狭叶红景天中红景天苷含量明显高于其他批次,说明产地对药材质量具有重要影响。另外,长鞭红景天中红景天苷的含量普遍很低,若临床应用中出现品种混用的情况,其疗效难以得到保证。

笔者参考相关文献^[15],考察了乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.3%磷酸溶液、甲醇-0.3%磷酸溶液等流动相体系,发现以乙腈-0.3%磷酸溶液为流动相(梯度洗脱)时的色谱峰分离效果良好,故选择此流动相体系。此外,通过对不同检测波长(230、275、308、330 nm)、不同柱温(20、25、30 ℃)、不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同色谱柱(ZORBAX SB-C₁₈、WondaSil C₁₈、CAPCELL PAK C₁₈)进行比较,发现色谱柱为WondaSil C₁₈,检测波长为275 nm,柱温为25 ℃,流速为1.0 mL/min时5种成分均能达到基线分离。

笔者又通过对不同提取方式(超声、冷浸、回流)、不

同提取时间(15、30、45 min)、不同提取溶剂(50%乙醇溶液、70%乙醇溶液、乙醇、70%甲醇溶液、甲醇)进行比较,发现以70%乙醇溶液超声处理30 min时5种成分的提取效果最好。

综上所述,本方法简便可行、结果准确,可用于同时测定大花红景天、狭叶红景天和长鞭红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸的含量。3种常见红景天药材中的化学成分含量存在较大差异,尤以大花红景天中红景天苷的含量最高。

参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡布. 四部医典[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983:54.
- [2] 帝玛尔·旦增彭措. 毛继祖,等,译. 晶珠本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:108-109.
- [3] 索朗,贡布多杰,仁青. 3种红景天药效学比较研究[J]. 中国药业,2014,23(24):44-45.
- [4] MAO GX, DENG HB, YUAN LG, et al. Protective role of salidroside against aging in a mouse model induced by D-galactose[J]. *Biomed Environ Sci*, 2010, 23(2): 161-166.
- [5] 占海思,潘涛. 红景天在心肌缺血再灌注损伤中保护机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):231-234.
- [6] 范桂强,齐善厚,庞红霞,等. 红景天提取物与红景天苷体外抗氧化作用研究[J]. 中国药房,2016,27(13):1797-1800.
- [7] 龚嘎蓝孜,次仁旺姆,索朗央宗,等. 红景天治疗急性高原反应的临床观察[J]. 中国药房,2015,26(20):2818-2820.
- [8] 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):2675-2678.
- [9] 王毓杰,张艺,冯雪梅,等. 红景天化学成分的研究及其对低氧诱导因子-1 α 表达的影响[J]. 华西药学杂志,2009,24(1):21-24.
- [10] 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.
- [11] 陈志英,陈玉婷,王丹红. HPLC测定不同品种红景天中红景天苷的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(11):939-941.
- [12] 李慧侠. RP-HPLC法测定大花红景天和长鞭红景天中红景天苷的含量[J]. 中国药房,2011,22(43):4098-4099.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:154.
- [14] 四川省食品药品监督管理局. 四川省藏药材标准:2014年版[M]. 成都:四川科学技术出版社,2014:132.
- [15] 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.

(收稿日期:2018-03-28 修回日期:2018-06-18)

(编辑:陈宏)