

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.12.034

大花红景天指纹图谱研究^①

刘 爽¹, 王佩龙¹, 胡益杰¹,
兰小中², 廖志华³, 陈 敏¹

1. 西南大学 药学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000; 3. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 目的: 建立大花红景天药材的 HPLC 指纹图谱. 方法: 采用 RP-HPLC 分析, 以 WondaSil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)为色谱柱, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水(pH=3.2), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 275 nm, 进样量 10 μL. 利用中药指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对 10 个批次大花红景天药材 HPLC 图谱进行分析比较. 结果: 建立了不同产地大花红景天药材的 HPLC 指纹图谱, 以红景天苷、酪醇为参照峰确立了大花红景天药材指纹图谱中的 30 个共有峰. 结论: 该方法具有良好的重现性及稳定性, 可用于大花红景天药材的质量管理规范.

关键词: 大花红景天; HPLC 指纹图谱; 质量控制; 酪醇; 红景天苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)12-0215-07

大花红景天 [*Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba] 为景天科 (Crassulaceae) 红景天属 (*Rhodiola* L.) 植物, 享有“高原人参”、“北极玫瑰”之美誉. 《中国药典》2010 年版将大花红景天 (*R. crenulata*) 收载为红景天的唯一药用品种^[1]. 大花红景天主要分布于西藏、四川、云南等广大的西部地区, 以干燥根和根茎入药, 具有抗疲劳、抗衰老、抗辐射、增强免疫力、抗高原反应等功效, 可保护神经, 治疗抑郁、焦虑、癌症等多种疾病, 有巨大的经济价值和广阔的开发前景^[2-3]. 红景天属植物化学成分有酚类、黄酮类、苷类、木质素类^[4-7]等, 其中苯乙醇类化合物酪醇及红景天苷被认为是主要药理活性成分^[8], 而《中国药典》2010 年版仅以红景天苷作为对照品^[1]. 红景天属植物资源丰富、种类多、分布广, 除大花红景天外, 狭叶红景天 (*R. kirilowii*)、小丛红景天 (*R. dumulosa*) 等也用作药用.

本试验选取的大花红景天在质量控制方面的研究基础较薄弱: 现有药典主要通过薄层色谱法对大花红景天药材进行鉴别^[1], 文献报道利用高效液相色谱法对大花红景天药材根茎中红景天苷、酚类进行含量测定^[9], HSCCC 分离大花红景天中苯丙素类化合物、红景天苷^[10-11], GC-MS 对大花红景天挥发油的化学成分进行分析鉴定^[12]等. 相比文献报道^[13-14]仅用红景天苷为参照峰建立大花红景天 HPLC 指纹图谱, 本试验通过红景天苷、酪醇两个标准品建立大花红景天药材指纹图谱, 确立了 30 个共有峰, 并通过聚类分析及相似度评价软件对大花红景天药材进行分析, 该方法精确、可靠、重复性好.

① 收稿日期: 2013-12-05

基金项目: 国家科技支撑计划子课题资助项目(2011BAI13B06); 国家自然科学基金资助项目(81102894).

作者简介: 刘 爽(1987-), 女, 四川绵阳人, 硕士研究生, 主要从事中药学方面的研究.

通讯作者: 陈 敏.

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪(SPD-20 紫外检测器、LC-20AD 泵、SIL-20A 自动进样器、DGU-20A3R 在线脱气), 分析天平(AB135-S 型, 梅特勒·托利多仪器有限公司), 超声清洗仪(KQ5200 型, 昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

红景天苷(批号: MUST-11121506, Sigma 试剂公司), 酪醇(批号: MUST-11080501, Sigma 试剂公司), 乙腈(SPECTRUM, 色谱纯); 水(怡宝纯净水), 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

本实验室采集或购买的 10 批大花红景天药材, 经西藏大学农牧学院动物科技系植物生物技术教研室兰小中副教授鉴定为大花红景天[*Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba] 的干燥根和根茎。药材来源见表 1。

表 1 大花红景天子药材来源

编号	购买时间	购买/采集地	收集方式	编号	购买时间	购买/采集地	收集方式
S1	2012.8	西藏 林芝	采集	S6	2012.8	浙江 宁波	购买
S2	2012.10	重庆 渝中	购买	S7	2012.8	四川 成都	购买
S3	2012.9	重庆 渝中	购买	S8	2012.11	重庆 渝北	购买
S4	2012.8	安徽 亳州	购买	S9	2012.11	重庆 渝北	购买
S5	2012.10	西藏 拉萨	购买	S10	2012.11	重庆 渝中	购买

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 WondaSil C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相以(A)-0.1%甲酸水(pH=3.2), (B)-乙腈梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 275 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL, 记录时间 90 min. 洗脱程序见表 2。

表 2 流动相洗脱梯度

时间/min	0	30	35	55	60	80	85	90
B/%	6	18	18	24	24	28	6	6

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品酪醇 3.34 mg, 红景天苷 1.40 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加色谱甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 以 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4 °C 保存备用。

2.3 供试品溶液的制备

取大花红景天药材粉末(过 40 目筛), 精密称定 1.000 g, 置于 50 mL 三角烧瓶中, 精密加入 20 mL 甲醇, 称重, 超声提取 40 min(200 W), 放冷, 再称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4 °C 保存备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

取 S6 样品一份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进行分析, 连续进样 6 次, 计算 30 个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD. 结果显示: 各色谱峰相对保留时间的 RSD<

1.15%, 相对峰面积的 RSD < 2.95%, 说明该仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.4.2 稳定性试验

取 S6 样品一份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进行分析, 分别在 0, 4, 8, 16, 24 h 各精密吸取 10 μ L 进样, 计算 30 个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示: 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 1.03%, 相对峰面积的 RSD < 3.27%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内基本稳定, 符合指纹图谱要求。

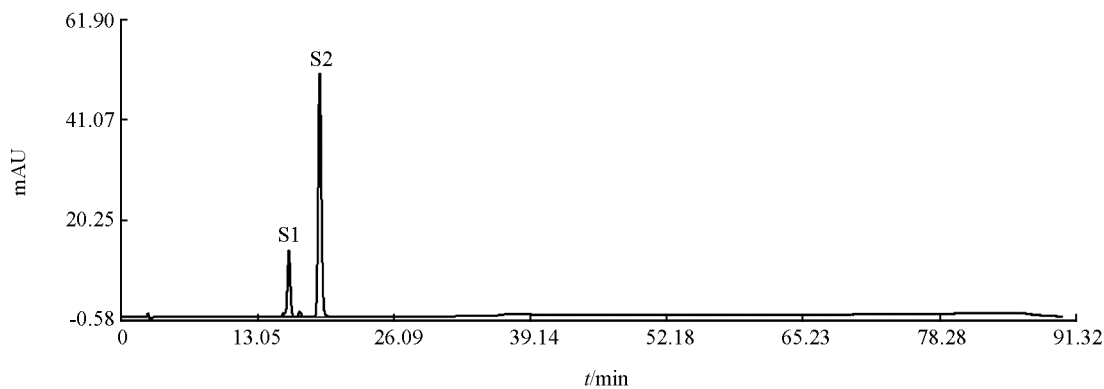
2.4.3 重复性实验

取 S6 样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进行分析, 计算 30 个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示: 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 2.07%, 相对峰面积的 RSD < 2.68%, 表明该法重现性较好, 符合指纹图谱要求。

2.5 指纹图谱的建立

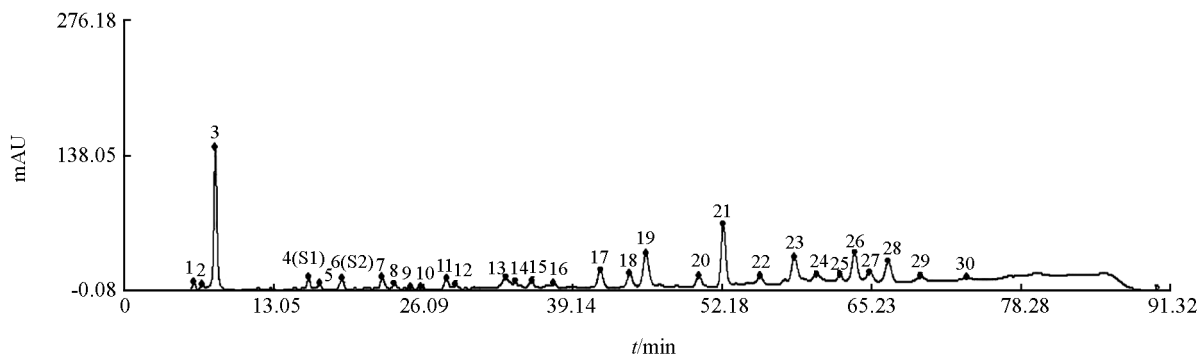
2.5.1 共有峰的标定

将 10 批大花红景天药材样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液, “2.1”项下色谱条件依次进样检测, 记录 90 min 色谱图。采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价体系(2004A 版)”对 10 批次药材的色谱图对应的峰进行多点校对后进行色谱峰匹配, 确定 30 个共有峰, 选择色谱图中主要峰 4 为校正点, 建立大花红景天药材标准指纹谱图(见图 2)和指纹图谱(见图 3), 通过与对照品图谱(见图 1)比较指认 4 号峰为红景天苷、6 号峰为酪醇。



S1 为红景天苷, S2 为酪醇。

图 1 对照品色谱图



S1 为红景天苷, S2 为酪醇。

图 2 大花红景天药材标准指纹图谱

2.5.2 指纹图谱相似度分析

根据图 2 匹配结果, 中药色谱指纹图谱相似度评价体系 A 版系统软件自动计算出色谱中各峰的峰面积, 利用 Excel 表格导出, 得到表 3 的数据. 表 3 中, 10 批大花红景天药材的非共有峰面积占总峰面积的百分比只有 3 个小于 10%, 这可能与药材中共有峰面积的差异有关. 根据图 2 的谱图信息以红景天苷(S1)为参照峰得到 10 批大花红景天药材的相对峰面积(见表 4)和相似度计算结果(见表 5).

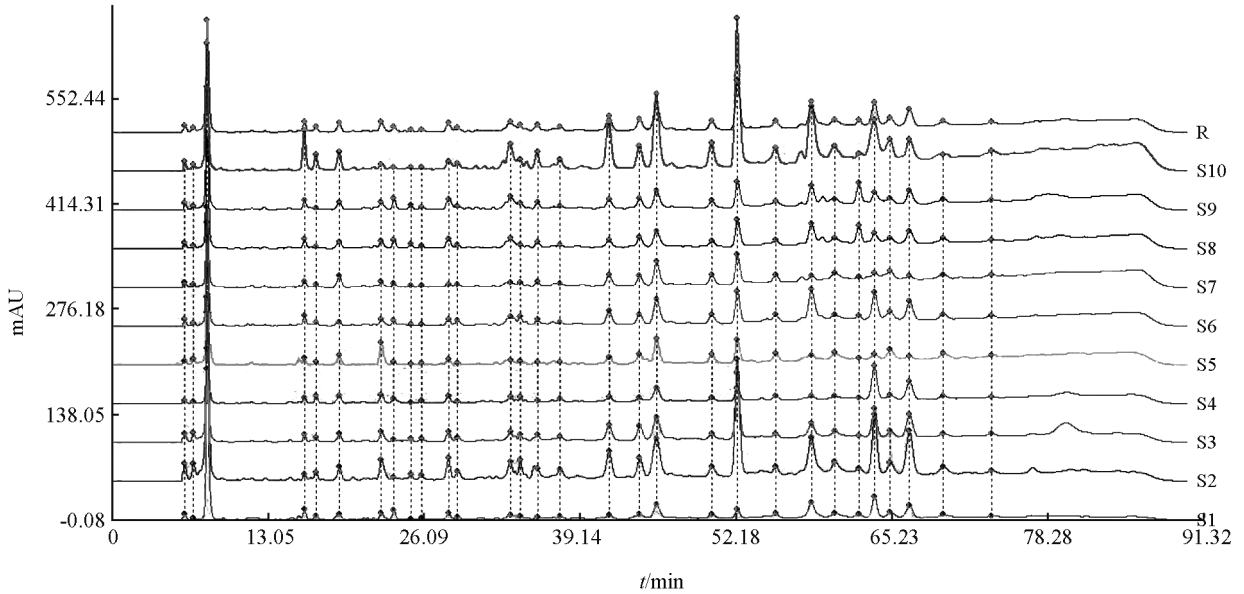


图 3 10 批大花红景天药材的 HPLC 指纹图谱

表 3 共有峰与非共有峰面积及占总峰面积百分比

编号	SC	SP	$\frac{SC}{SC+SP}/\%$	编号	SC	SP	$\frac{SC}{SC+SP}/\%$
S1	30410645	27013502	88.83	S6	35749267	30095193	84.18
S2	33980263	29784714	87.65	S7	66199735	60589255	91.52
S3	67057943	60501235	90.22	S8	35267925	29634266	84.03
S4	34132860	29631630	86.81	S9	66419387	60789884	91.52
S5	67327281	60358619	89.64	S10	31191230	27013502	86.01

注: SP-非共有峰面积; SC-共有峰面积; $SC/(SC+SP)\%$ -共有峰面积占总面积百分比.

表 4 10 批次大花红景天特征指纹图谱的相对峰面积

编号	相 对 峰 面 积									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.576 488	0.190 396	2.708 719	1.088 143	2.719 685	1.100 477	2.847 123	1.144 033	2.759 566	1.138 769
2	0.308 981	0.120 227	3.101 841	1.322 493	3.109 742	1.344 597	3.25 209	1.381 76	3.126 889	1.378 524
3	11.322 38	3.726 91	39.521 79	15.189 66	39.631 8	15.450 33	44.424 92	15.933 19	40.016 22	15.928 84
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0.228 732	0.150 672	1.257 813	1.037 112	1.263 123	1.057 295	1.280 361	1.089 219	1.291 617	1.090 592
6	1.079 426	0.779 31	2.638 301	2.590 698	2.651 084	2.6340 82	2.768 692	2.714 925	2.644 083	2.712 704
7	0.338 577	0.103 008	2.211 716	0.899 437	2.241 166	0.910 943	2.355 909	0.936 204	2.284 967	0.935 374
8	1.128 534	0.148 109	4.910 284	0.382 649	4.928 295	0.390 235	5.133 94	0.413 159	4.975 21	0.421 098
9	0.547 413	0.268 366	0.923 013	0.554 549	0.918 063	0.552 917	0.948 535	0.566 628	0.919 109	0.564 95
10	0.395 437	0.093 639	0.846 074	0.245 663	0.847 47	0.246 617	0.885 18	0.252 745	0.858 429	0.251 715

续表 4

编号	相 对 峰 面 积									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
11	1.591 445	0.489 44	4.293 711	1.342 81	4.316 251	1.367 75	4.414 849	1.410 375	4.281 995	1.408 892
12	0.599 692	0.207 238	1.997 907	0.977 197	1.994 377	0.988 185	0.105 586	1.014 686	2.026 05	1.016 336
13	0.923 05	1.027 269	2.875 699	1.375 609	2.910 623	1.425 44	3.143 103	1.5174 36	3.102 383	1.544 588
14	0.565	0.193 666	3.591 594	1.735 925	3.563 544	1.747 305	3.688 194	1.782 353	3.565 907	1.777 982
15	1.154 849	0.292 823	4.508 655	1.761 931	4.539 866	1.795 432	4.747 548	1.853 672	4.604 083	1.855 781
16	0.796 51	0.395 924	3.521 459	3.047 048	2.829 579	3.096 575	2.923 944	3.189 948	2.833 178	3.189 046
17	2.536 515	0.704 303	8.232 062	4.512 711	8.244 285	4.586 24	8.604 289	4.731 73	8.318 377	4.725 239
18	2.465 901	1.009 811	5.831 01	3.471 257	5.822 306	3.533 803	6.067 987	3.650 736	5.867 505	3.651 302
19	4.362 568	1.243 111	14.825 44	5.010 128	14.931 95	5.098 263	15.668 16	5.255 159	15.222 98	5.252 525
20	2.394 728	0.521 403	2.553 523	1.234 298	2.563 165	1.263 943	2.700 861	1.316 194	2.623 366	1.320 518
21	5.448 38	2.741 021	31.414 17	20.769 02	31.556 35	21.130 2	32.991 41	21.823 66	31.864 84	21.818 83
22	2.393 662	0.473 582	2.696 367	0.878 03	2.686 84	0.885 789	2.790 529	0.911 276	2.634 254	0.912 855
23	5.714 247	2.261 819	7.891 69	3.772 742	7.933 775	3.850 55	8.274 082	3.999 073	8.000 288	4.029 507
24	4.852 118	0.985 857	5.862 483	1.516 768	5.957 356	1.540 257	6.338 202	1.610 88	6.067 077	1.621 202
25	5.136 552	0.605 237	2.677 911	0.113 944	2.659 427	0.132 271	2.777 323	0.151 912	2.598 958	0.164 774
26	4.600 469	0.800 818	15.563 61	4.020 723	15.586 29	4.107 339	16.249 3	4.266 84	15.528 85	4.274 523
27	3.757 542	0.758 363	3.528 227	1.479 607	3.577 741	1.526 187	3.778 614	1.601 287	3.590 93	1.618 866
28	5.945 741	0.825 409	11.989 95	3.437 047	12.027 86	3.501 201	12.550 61	3.617 928	11.943 13	3.616 885
29	5.000 86	0.369 131	3.104 824	0.974 675	3.136 234	1.005 475	3.314 173	1.049 033	3.233 225	1.055 651
30	4.375 774	0.197 898	1.419 698	0.795 512	1.492 762	0.820 326	1.569 344	0.835 489	1.564 383	0.820 809

表 5 10 批大花红景天药材相似度结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.938	0.990	0.945	0.989	0.944	0.978	0.947	0.978	0.947	0.939

由表 5 可知, 10 批大花红景天药材相似度值均大于 0.9, 表明目前市场上流通的大花红景天商品药材质量比较稳定。

2.5.3 系统聚类分析

将各色谱峰相对于内参比色谱峰的峰面积量化, 运用“SPSS16.0 统计分析软件”对其进行系统聚类分析, 采用欧氏距离(Euclidean)作为样品的测度对其进行系统聚类分析, 得到聚类树状图见图 4。

结果显示: 10 批大花红景天药材可以分为两大类, S2 聚为一类, 其余聚为一类, 参照样品产地, S8、S9、S6、S1、S4、S5、S7、S10 的产地接近西藏; 此外 S2 的产地与上述产地的距离较远。

3 讨 论

分别比较了 50% 甲醇、70% 甲醇、纯甲醇对大花红景天药材的提取效果, 结果表明纯甲醇提取的效果最佳, 色谱峰数目最多, 含量较高, 且峰形较好, 因此选择纯甲醇为提取溶剂。本试验考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水不同 pH、乙腈-水不同 pH 等多种流动相系统, 最后采用乙腈-甲酸水 pH 3.2 进行梯度洗脱, 确保各共有峰能有更好的分离度。选取 275 nm 作为大花红景天检测波长, 液相图谱杂质干扰小, 基线平稳, 灵敏度高。

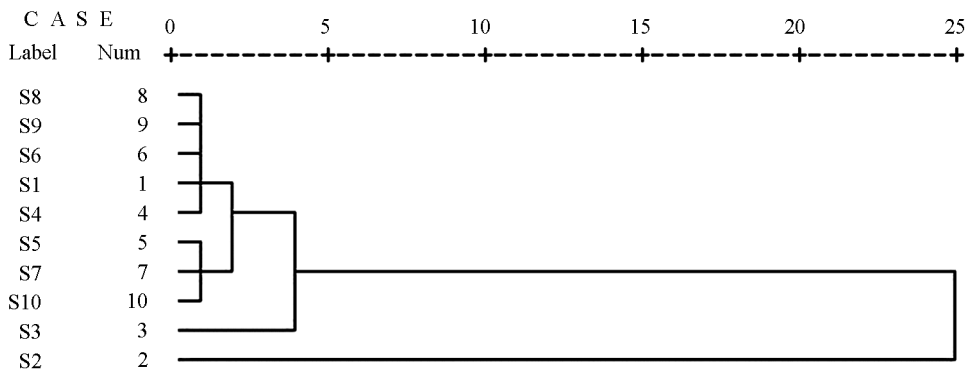


图 4 大花红景天药材指纹图谱的聚类分析

本文采用 RP-HPLC 方法建立了大花红景天药材的指纹图谱, 标定了 30 个共有峰, 10 批大花红景天药材相似度均达到 0.9 以上, 整体来说 10 批大花红景天的化学成分一致性较好, 质量较均一. 指纹图谱中的 30 个共有峰相对保留时间符合程度好, 相对面积略有差异, 表明批次间各成分含量的相对比值有所不同. 聚类分析结果表明于不同地方购买的药材其产地可能相近或相同.

色谱指纹图谱是目前控制中药材综合分析最有效、最直观的手段之一^[15-16]. 本试验利用 HPLC 建立的指纹图谱方法具有较好的精密度、稳定性和重现性, 有助于大花红景天药材的标准化研究和质量控制, 可作为区分大花红景天与其混淆品的标准. 该方法可行、方便、可靠, 对红景天类药材的品种、产地及质量控制具有一定的参考价值, 对红景天属药用资源的扩大应用具有重要意义.

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 144.
- [2] 刘明成, 张得钧. 红景天药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(6): 65-69.
- [3] QU Z Q, ZHOU Y, ZENG Y S, et al. Protective Effects of a *Rhodiola crenulata* Extract and Salidroside on Hippocampal Neurogenesis Against Streptozotocin-Induced Neural Injury in the Rat [J]. PloS one, 2012, 7(1): e29641.
- [4] NAKAMURA S, LI X Z, MATSUDA H, et al. Bioactive Constituents from Chinese Natural Medicines. XXVIII. Chemical Structures of Acyclic Alcohol Glycosides from the Roots of *Rhodiola crenulata* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 56(4): 536-540.
- [5] YANG Y N, LIU Z Z, FENG Z M, et al. Lignans from the Root of *Rhodiola crenulata* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4): 964-972.
- [6] WU S X, GUO Y D, GUO S Y, et al. Study of the Chemical Constituents of Ethanol Extracts of *Rhodiola Crenulata*. H [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(4): 322-324.
- [7] 杨桢楠, 冯子明, 姜建双, 等. 大花红景天中化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(6): 410-413.
- [8] 滕静茹, 熊佳鹏, 肖 诚, 等. 红景天的现代药理学研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(4): 319-320.
- [9] 韩林辛, 倪 键. 大花红景天中红景天苷和总酚的含量测定 [C] // 2009·全国中药创新与研究论坛论文集. 山西运城: 中医药学会, 2009: 394-399.
- [10] CHEN D J, FAN J T, WANG P, et al. Isolation, Identification and Antioxidative Capacity of Water-Soluble Phenylpropanoid Compounds from *Rhodiola crenulata* [J]. Food Chemistry, 2012, 134: 2126-2133.
- [11] HAN X, ZHANG T Y, WEI Y, et al. Separation of Salidroside from *Rhodiola crenulata* by High-Speed Counter-Current Chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 971(1-2): 237-241.
- [12] 韩泳平, 陈胡兰, 宋学伟, 等. 藏药大花红景天挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析 [J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(2): 104-106.
- [13] 郭晓蕾, 翟旭峰, 王怀豫, 等. 大花红景天药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6):

1317-1319.

[14] 史 伟. 大花红景天药材质量控制及 HPLC 指纹图谱研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.

[15] 王佩龙, 杨丽花, 令狐浪, 等. 波棱瓜子药材指纹图谱研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 38(12): 139-144.

[16] 罗志江, 徐 彦, 吴建英, 等. 虎杖指纹图谱及其抗氧化活性的“谱-效”关系研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(1): 138-142.

Study on HPLC Fingerprint of *Rhodiola crenulata*

LIU Shuang¹, WANG Pei-long¹, HU Yi-jie¹,
LAN Xiao-zhong², LIAO Zhi-hua³, CHEN Min¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Agricultural and Animal Husbandry College, Tibet University, Nyingchi, Tibet 860000, China;

3. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective: To establish the chromatographic fingerprint of the root of *Rhodiola crenulata* by RP-HPLC. Methods: Ten batches of samples from different producing areas were analyzed with a Wonda-Sil C18 column (4.6 mm×150mm, 5 μm), gradiently eluted with A (water containing 0.1% methanoic acid, pH=3.2)-B (acetonitrile) at 25 °C, and monitored with a UV detector at 275 nm. The flow rate was 0.8 mL/min, and the sample volume injected was 10 μL. The chromatograms of different batches of *R. crenulata* were compared by the software of Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004A). Results: HPLC Fingerprints of *R. crenulata* of different origins were established with tyrosol and salidroside as the reference compounds. Thirty mutual peaks were selected as the fingerprint peaks of *R. crenulata*. Conclusion: The method is simple, rapid and accurate, and can be provided as a scientific and effective way for quality control of *R. crenulata*.

Key words: *Rhodiola crenulata*; HPLC fingerprint; quality control; tyrosol; salidroside

责任编辑 汤振金

