

# 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

林夏<sup>1,2</sup>, 胡军华<sup>1,2</sup>, 崔培超<sup>1,2</sup>, 秦建平<sup>1,2</sup>, 仲艳<sup>1,2</sup>, 杨绪芳<sup>1,2</sup>, 李家春<sup>1,2</sup>, 毕宇安<sup>1,2</sup>, 萧伟<sup>1,2\*</sup>

(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:建立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4种成分含量的HPLC法。方法: Phenomenex Luna C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.3%冰醋酸溶液梯度洗脱,流速0.7 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长275,308 nm,柱温40℃。结果:没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸分别在0.435~13.912 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=1, *n*=6), 22.813~730 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8, *n*=6), 7.819~250.200 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8, *n*=6), 1.618~51.760 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8, *n*=6)呈良好的线性关系,加样回收率均符合含量测定要求。结论:该含测方法简便、准确,可以用于大花红景天提取物中4个成分的含量测定。

**[关键词]** 高效液相色谱; 红景天提取物; 没食子酸; 红景天苷; 酪醇; 对香豆酸; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0102-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013100102

## Determination of Gallic acid, Salidroside, Tyrosol and *p*-Coumaric Acid in Rhodiola Extract by HPLC

LIN Xia<sup>1,2</sup>, HU Jun-hua<sup>1,2</sup>, CUI Pei-chao<sup>1,2</sup>, QIN Jian-ping<sup>1,2</sup>, ZHONG Yan<sup>1,2</sup>,  
YANG Xu-fang<sup>1,2</sup>, LI Jia-chun<sup>1,2</sup>, BI Yu-an<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical CO., LTD, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

**[收稿日期]** 20121018(010)

**[基金项目]** 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09401-097)

**[第一作者]** 林夏,助理研究员,从事中药质量标准研究, Tel: 15105130710, E-mail: linxia200408@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 萧伟,研究员,高级工程师,博士,从事中药新剂型的研究与开发, Tel: 0518-85521956, E-mail: wzzhz-nj@tom.com

- [4] 倪琳,杨锡. HPLC测定雪山金罗汉止痛涂膜剂中延胡索乙素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):106.
- [5] 叶秀金,宋粉云. HPLC测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):90.
- [6] 张芳向,林朝霞. HPLC法测定温肺止咳软胶囊中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚及厚朴酚[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):83.
- [7] 姜清华,邓晶晶,吴琼,等. 芍药苷的药代动力学研究进展[J]. 实用药物与临床, 2010, 13(6):451.
- [8] 权勤波,李启红. HPLC法测定胃炎康胶囊中药药苷、盐酸小檗碱及甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1):120.
- [9] 艾路,邱落,杜菁,等. 高效液相色谱法测定调胃舒肝丸中厚朴酚、和厚朴酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):87.
- [10] 曹旦华,张剑,朱丹妮. HPLC同时测定乳癖消颗粒中7种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):74.
- [11] 李明,陈志维,黎玉翠,等. 高效液相色谱法测定养坤丸中黄芩苷和芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4):12.

[责任编辑 顾雪竹]

**[ Abstract ] Objective:** To establish an HPLC method for content determination of gallic acid, salidroside, tyrosol and *p*-coumaric acid in Rhodiola Extract. **Method:** Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-0.3% HAC at a flow rate of 0.7 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 275 and 308 nm and the column temperature was maintained at 40 °C. **Result:** The linear ranges of gallic acid, salidroside, tyrosol and *p*-coumaric acid were in the range of 0.435-13.912 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 1, *n* = 9), 22.813-730.00 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 8, *n* = 6), 7.819-250.20 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 8, *n* = 6), 1.618-51.76 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 8, *n* = 6). The average recoveries of four components were in accordance with the determination requirement. **Conclusion:** This method was simple, accurate and reproducible for the four components determination of the Rhodiola Extract.

**[ Key words ]** HPLC; Rhodiola extracts; gallic acid; salidroside; tyrosol and *p*-coumaric acid; content determination

大花红景天系景天科红景天属植物,为2010年版《中国药典》明确规定的仅此一种景天属植物的药用资源。我国为大花红景天的分布中心,储存量大<sup>[1]</sup>,其主要含有红景天苷、酪醇、大花红天素、多酚类及多糖类等<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究表明红景天具有抗衰老、抗氧化性溶血、抗辐射等活性<sup>[4-6]</sup>。较多文献报道用高效液相法测定红景天药材中有效成分<sup>[7-9]</sup>,而有关红景天提取物质量评价的报道较少<sup>[10]</sup>。本文利用双波长 HPLC 建立了大花红景天提取物中没食子酸、红景天苷、酪醇及对香豆酸含量测定的方法,为大花红景天提取物质量评价提供依据。

## 1 材料

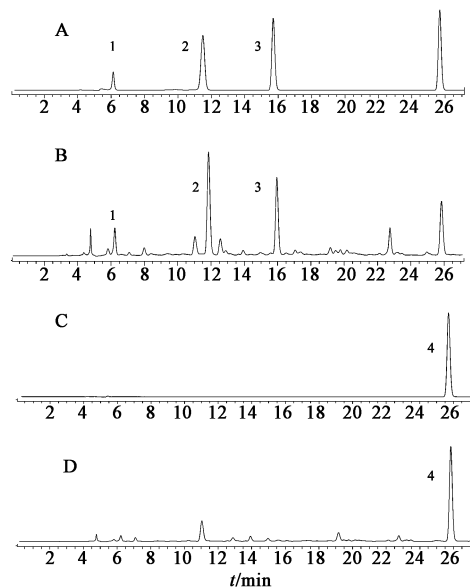
高效液相色谱仪(Waters2695-2487 美国),BP-211D 型电子天平(Sartorius 德国),色谱柱 Phenomenex Luna C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),离心机(Centrifuge 5415D),红景天提取物(江苏康缘药业股份有限公司制备,批号 100702,100902,101001),没食子酸对照品(批号 110831-200803),红景天苷对照品(批号 110818-200404),酪醇对照品(批号 111676-200602),以上来源均为中国药品生物制品检定所,对香豆酸对照品(批号 MUST-11122604),来源于成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈(色谱纯),水(超纯水),其余试剂均为分析纯。

大花红景天药材购自西藏,经本公司药品分析与质量标准研究部鉴定为景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的干燥根和根茎。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.3%冰醋酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 5 min, 9% A;

5 ~ 30 min, 9% ~ 25% A; 30 ~ 35 min, 25% ~ 40% A),柱温 40 °C,流速 0.7 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 275 nm(没食子酸、红景天苷、酪醇),308 nm(对香豆酸),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,塔板数按红景天苷计算 > 20 000。对照品与样品的色谱图见图 1。



A. 275 nm 混合对照品; B. 275 nm 样品;  
C. 308 nm 混合对照品; D. 308 nm 样品;  
1. 没食子酸; 2. 红景天苷; 3. 酪醇; 4. 对香豆酸

图 1 红景天提取物液相色谱

**2.2 对照品溶液制备** 分别取没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸对照品适量,精密称定,加 20% 乙醇制成每 1 mL 含没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸分别为 103.52, 100.08, 123.44, 105.60 μg 的混合对照品溶液,即得。

**2.3 供试品溶液制备** 取红景天提取物约 50 mg,

精密称定,置 25 mL 量瓶内,加 20% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,离心,即得。

**2.4 定量限** 按上述色谱条件,用混合对照品溶液稀释进行试验,结果没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的定量限分别为 1.32, (S/N = 10.0), 6.26 (S/N = 10.2), 3.09 (S/N = 10.0), 1.62 (S/N = 10.3), 检测限分别为 0.40 (S/N = 3.0), 2.00 (S/N = 3.3), 0.95 (S/N = 3.0), 0.50 (S/N = 3.2)

**2.5 线性关系考察** 取没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸对照品适量,精密称定,分别用 20% 乙醇制成每 1 mL 含没食子酸 139.12 μg、红景天苷 1 460.0 μg、酪醇 1 000.8 μg、对香豆酸 517.6 μg<sup>1</sup> 的对照品溶液,分别精密吸上述对照品溶液 1.0, 5.0, 2.5, 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加 20% 乙醇稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液①(没食子酸 13.912 mg·L<sup>-1</sup>、红景天苷 730.000 mg·L<sup>-1</sup>、酪醇 250.200 mg·L<sup>-1</sup>、对香豆素 51.760 mg·L<sup>-1</sup>),精密吸取混合对照品溶液①5.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得混合对照品溶液②(没食子酸 6.956 mg·L<sup>-1</sup>、红景天苷 365.000 mg·L<sup>-1</sup>、酪醇 250.200 mg·L<sup>-1</sup>、对香豆素 25.880 mg·L<sup>-1</sup>),依此倍倍稀释,即得标准曲线所需的 6 个浓度的混合对照品溶液。按 2.1 色谱条件和系统适应性项下色谱条件测定,记录色谱图,以峰面积 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标进行线性回归,结果表明,各成分在相应浓度范围内呈良好线性关系,线性范围、回归方程、相关系数见表 2。

表 2 线性范围、回归方程和相关系数

成分	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>	回归方程	r
没食子酸	0.435 ~ 13.912	Y = 38 939X - 939.90	0.999 9
红景天苷	22.813 ~ 730.000	Y = 4 042.8X + 12 345	0.999 8
酪醇	7.819 ~ 250.200	Y = 124 392X + 6 512.7	0.999 8
对香豆酸	1.618 ~ 51.760	Y = 12 329X + 18 270	0.999 8

**2.6 仪器精密度试验** 取混合对照品溶液③(没食子酸浓度为 3.478 mg·L<sup>-1</sup>,红景天苷浓度为 182.500 mg·L<sup>-1</sup>,酪醇为 62.550 mg·L<sup>-1</sup>,对香豆酸为 12.940 mg·L<sup>-1</sup>),按 2.1 色谱条件和系统适应性项下色谱条件测定,重复进样 6 次,测得峰面积,计算没食子酸、红景天苷、酪醇和对香豆酸 RSD 分别为 0.90%, 0.89%, 1.00%, 1.10%。表明仪器精密度良好。

**2.7 重复性** 取红景天提取物(批号 100702)按 2.2.2 供试品溶液制备项下方法平行制备供试品溶

液 6 份,按 2.1 色谱条件和系统适应性项下色谱条件测定,计算得没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的 RSD 分别为 2.43%, 2.19%, 2.78%, 2.84%。结果表明本方法重复性良好。

**2.8 稳定性** 取红景天提取物供试品溶液(批号 100702),在室温条件下分别于 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 h 按 2.1 色谱条件和系统适应性项下色谱条件测定,没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的 RSD 分别为 2.10%, 2.46%, 1.78%, 2.52%。结果表明供试品溶液在 18 h 内稳定。

**2.9 回收率试验** 取本品(批号 100702,没食子酸 3.0 g·g<sup>-1</sup>、红景天苷 153.8 g·g<sup>-1</sup>、酪醇 35.5 g·g<sup>-1</sup>,对香豆酸 6.3 g·g<sup>-1</sup>)约 20 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶内,加入没食子酸对照品溶液(139.12 mg·L<sup>-1</sup>)0.5 mL,红景天苷(1 460.0 mg·L<sup>-1</sup>)2 mL,酪醇对照品溶液(1 000.8 mg·L<sup>-1</sup>)0.7 mL、对香豆酸对照品溶液(517.6 mg·L<sup>-1</sup>)0.3 mL,用 20% 乙醇溶解并稀释至刻度,平行制备 6 份。按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的加样回收率,结果见表 3~6。

表 3 没食子酸加样回收率试验(n = 6)

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
20.90	0.062 7	0.069 6	0.129 2	95.6		
20.05	0.060 2	0.069 6	0.126 6	95.6		
19.20	0.057 6	0.069 6	0.124 3	95.8	96.6	2.3
19.70	0.059 1	0.069 6	0.129 5	101.2		
19.98	0.059 4	0.069 6	0.126 5	95.7		
19.90	0.059 7	0.069 6	0.126 3	95.7		

表 4 红景天苷加样回收率试验(n = 6)

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
20.90	3.214 4	2.920 0	6.173 4	101.3		
20.05	3.083 7	2.920 0	6.077 4	102.5		
19.20	2.953 0	2.920 0	5.963 1	103.1	103.0	1.0
19.70	3.029 9	2.920 0	6.064 1	103.9		
19.98	3.072 9	2.920 0	6.070 4	102.7		
19.90	3.060 6	2.920 0	6.107 5	104.3		

**2.10 样品测定** 取红景天提取物(批号 100702, 100902, 101001)按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,计算没

表5 酪醇加样回收率试验( $n=6$ )

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD
20.90	0.742 0	0.700 6	1.412 8	95.8	100.0	2.8
20.05	0.711 8	0.700 6	1.393 9	97.4		
19.20	0.681 6	0.700 6	1.393 5	101.6		
19.70	0.699 4	0.700 6	1.411 3	101.6		
19.98	0.709 3	0.700 6	1.413 1	100.5		
19.90	0.706 5	0.700 6	1.428 4	103.0		

表6 没食子酸加样回收率试验( $n=6$ )

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD
20.90	0.131 7	0.155 3	0.293 9	104.5	103.4	2.7
20.05	0.126 3	0.155 3	0.288 5	104.4		
19.20	0.121 0	0.155 3	0.283 4	104.6		
19.70	0.124 1	0.155 3	0.286 4	104.5		
19.98	0.125 9	0.155 3	0.288 2	104.5		
19.90	0.125 4	0.155 3	0.277 1	97.7		

食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的百分含量,结果见表7。

表7 全景天提取物样品测定 %

批号	没食子酸	红景天苷	酪醇	对香豆酸
100702	0.30	15.38	3.55	0.63
100902	0.56	20.00	2.72	0.56
101001	0.44	18.60	8.66	0.46

### 3 讨论

在供试品溶液制备时,考虑到指标成分的提取率及不同溶媒对各指标成分色谱峰峰形的影响,考察了甲醇、乙醇、80%甲醇、80%乙醇和20%乙醇,结果表明用20%乙醇提取效果及色谱峰峰形均最佳。

比较了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.3%冰醋酸、甲醇-0.3%冰醋酸4种流动相系统,结果采用乙腈-0.3%冰醋酸溶液梯度洗脱分离效果较好。采用PDA检测器在190~400 nm扫描,结果表明没食子酸、红景天苷、酪醇在220,275 nm附近均有最大吸收,但在275 nm处,各指标峰峰形良好,基线平稳,分离度高。对香豆酸在308 nm处,峰形良好,基线平稳,分离度高。考察了25,30,40℃不同柱温及0.5,0.7,1.0,1.5 mL·min<sup>-1</sup>不同流速对各指标成分分离的影响,结果在40℃,流速为0.7 mL·min<sup>-1</sup>时

分离效果最佳。比较了Phenomenex Luna C<sub>18</sub>柱、Kromasil C<sub>18</sub>柱和Thermo C<sub>18</sub>,结果Kromasil C<sub>18</sub>柱和Thermo ODS C<sub>18</sub>未能使本文中4个成分均达到基线分离,Phenomenex Luna C<sub>18</sub>能较好的分离本品种上述4个成分。在本文所确定的检测条件下,所测定的4个成分与相邻色谱峰的分度度>1.5。

采用PDA检测器对样品中所检测的4个成分进行了峰纯度验证,结果表明在本文确定的检测条件下,样品中所检测的4个成分不含其他干扰成分。

由于市场上红景天植物来源复杂,各地习用品种也有所不同,且不同来源的红景天提取物成分差异较大。大花红景天主要含有红景天苷、酪醇、焦硫酸、没食子酸、β-谷甾醇、大花红天素、黄酮类及香豆素类成分,采用所建立的方法对大花红景天提取物中具代表性的4个成分进行测定,为大花红景天提取物的质量控制提供数据参考。

### [参考文献]

- [1] 贺俊生,白马群增,康中林,等. 藏东地区大花红景天资源调查[J]. 西藏医药杂志,1995,16(4):45.
- [2] 王曙,王锋鹏. 大花红景天化学成分的研究[J]. 华西医科大学学报,1992,23(4):394.
- [3] 王曙,张曙光,徐小平,等. 4种红景天属植物根茎中Rosavin和红景天苷的含量测定[J]. 华西药理学杂志,2002,17(6):443.
- [4] 孙芳云,王金华,张斌,等. 大花红景天的抗氧化性溶血作用研究[J]. 中药药理与临床,2006,22(Z1):118.
- [5] 陈玉满,陈江,毛光明,等. 大花红景天的抗缺氧作用研究[J]. 浙江预防医学,2007,19(1):92.
- [6] 全国辉,谭壮生,杨庆,等. 大花红景天的抗辐射损伤作用[J]. 卫生毒理学杂志,2004,18(3):183.
- [7] 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]. 分析试验室,2009,28(S1):58.
- [8] 易智彪,赖小平,许冬瑾,等. 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.
- [9] 李青,宋志前,王超,等. 青海产红景天中红景天苷及酪醇含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):110.
- [10] 邹亮,王战国,胡慧玲,等. 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[J]. 中草药,2011,42(7):1334.

[责任编辑 顾雪竹]