

文章编号: 1000-4025(2004)09-1744-04

青藏高原红景天药材的 HPLC 指纹图谱*

李维卫, 胡凤祖*, 陈世龙, 师治贤

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要: 利用高效液相色谱法建立了青藏高原红景天的色谱指纹图谱。固定相采用 C₁₈反相色谱柱, 流动相为甲醇 0.1% 磷酸水 (v/v= 15 : 85); 检测波长 220 nm; 流速为 1.0 mL/min。通过比较发现红景天样品的 8 个主要共有峰, 可作为鉴别红景天药材的主要依据。方法简便快速, 为中药品种的鉴定提供了较全面的信息。

关键词: 高效液相色谱; 红景天; 指纹图谱

中图分类号: Q946.91 文献标识码: A

HPLC chromatographic fingerprints of *Rhodiola rosea* in the Qingzang Plateau

L I W ei-wei, HU Feng-zu*, CHEN Shi-long, SH I Zhi-xian

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: The chromatographic fingerprint of *Rhodiola rosea* was established by high performance liquid chromatography (HPLC). The separation method involves a RP-C₁₈ column, a mobile phase of 0.1% H₃PO₄-CH₃OH (v/v= 15 : 85), an ultraviolet detector at 220 nm and the flow speed of 1.00 mL/min. According to the comparative study of chromatographic fingerprints, we found 8 communal peaks, which can be applied to identify *Rhodiola rosea*. This method is helpful to control the quality of this herb.

Key words: high performance liquid chromatography; *Rhodiola rosea*; chromatographic fingerprint

红景天 (*Rhodiola rosea* L.) 为景天科红景天属的多年生草本植物, 全世界有 96 种, 中国有 73 种^[1-3], 青藏高原分布有 11 个种及 1 个变种, 主要分布于海拔 2 600~ 4 800 m 的高寒地带。它具有很高的药用价值, 其主要功效有抗疲劳、抗衰老、抗辐射、抗毒、抗缺氧、兴奋智力等^[1,2,4], 藏医用于治疗肺病、神经麻痹症及妇科疾病等^[5], 其中狭叶红景天、柴胡红景天等 7 个种被用于藏药^[5]。红景天的主要有效成分为红景天苷和二苯甲基六氢吡啶^[1,6,7]。为了鉴定红景天药材的质量优劣, 曾经有人^[8]采用核磁共振法建立了长白山红景天的指纹图谱。为确

保红景天药材的质量, 本研究建立了青藏高原红景天高效液相指纹图谱。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂和材料

仪器: waters 600E 高效液相色谱仪, waters 486 紫外吸收检测器, waters 746 积分仪, HS 3120 超声波清洗器, 万分之一电子天平, waters 抽滤泵。

试剂: 色谱纯甲醇 (山东禹王实业禹城化工厂), 分析纯甲醇 (西安化学试剂厂), 磷酸 (西安化学试剂厂), 自制无离子水。

* 收稿日期: 2003-12-29; 修改稿收到日期: 2004-05-31

基金项目: 国家人事部和中国科学院人才培养计划“西部之光”项目

作者简介: 李维卫 (1978-), 男 (汉族), 在读硕士。E-mail: success2002170@sohu.com

* 通讯联系人。Correspondence to: Hu Feng-zu

供试品的制备: 将红景天样品粉碎, 各称取 1.0 g, 加 30 mL 50% 甲醇超声, 连续超声两次, 每次 30 min, 过滤, 滤液以 50% 甲醇定容至 50 mL, 过 0.45

μm 滤膜, 待测。超声波清洗器的提取率为 85%。

材料: 红景天药材样品采集时间为 2002 年 9 月, 产地及海拔如表 1。

表 1 药材样品

Table 1 The sample of medicine

样品编号 Sample No.	采收地点 Collection places	海拔 Altitude (m)	植物名称 Plants name
1	西藏曲水县	3 560	六叶红景天 <i>R. sexifolia</i>
2	西藏昌都县	3 960	同裂红景天 <i>R. coccinea</i>
3	西藏类乌齐	4 080	喜马拉雅红景天 <i>R. himalensis</i>
4	西藏浪卡子县	4 400	菊叶红景天 <i>R. chrysanthemifolia</i>
5	青海省昂欠县	4 110	巴塘红景天 <i>R. tieghenii</i>
6	西藏那曲地区	4 550	柴胡红景天 <i>R. bupleuroides</i>
7	西藏林芝县	3 470	云南红景天 <i>R. yunnanensis</i>
8	青海省花石峡	4 320	长鞭红景天 <i>R. fastigiata</i>
9	西藏林芝县	4 220	四川红景天 <i>R. alsia</i>
10	西藏昌都县	4 270	狭叶红景天 <i>R. kirilowii</i>

1.2 色谱分离条件

1.2.1 流动相的选择 试验过程中选择了 3 种流动相系统: (1) 甲醇-水 (18:82); (2) 甲醇-水 (15:85); (3) 甲醇-0.1% 磷酸水 (15:85)。流动相以 (3) 甲醇-0.1% 磷酸水 (15:85) 系统效果最佳。

1.2.2 吸收波长的选择 根据红景天组成, 我们共选择了 220、254、280 nm 3 种波长进行分离。在 220 nm 波长下出现的色谱峰数目比较理想, 各色谱峰相互之间分离度和稳定性较好 (图 1, B)。其色谱图 (B) 及标准品图谱 (A) 如图 1。

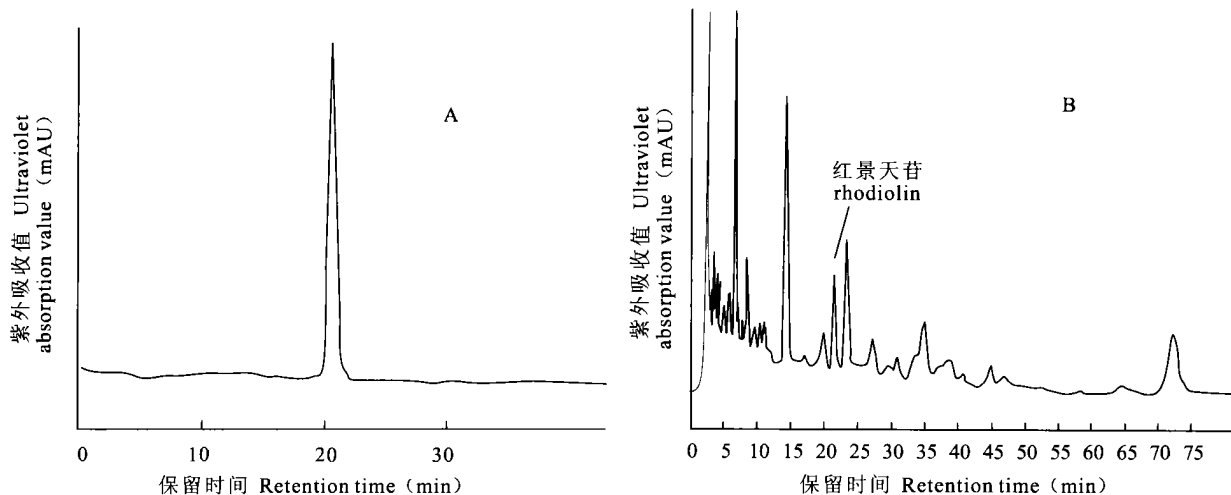


图 1 220 nm 波长下的指纹图谱

A. 红景天苷标准对照品; B. 红景天指纹图谱

Fig. 1 Chromatographic fingerprint of 220 nm

A. Control sample; B. Chromatographic fingerprint

1.2.3 红景天色谱分离条件 采用 C₁₈ 反相色谱柱, 250 mm × 4.6 mm, 流速为 1.00 mL/min, 进样量为 10 μL, 紫外检测波长: 220 nm。

保留值。选用狭叶红景天的色谱图作为标准, 其色谱分离图如图 2。

2 结果与讨论

2.1 色谱指纹图谱的建立

将红景天的有效成分红景天苷定为标示峰, 该峰为所有样品所共有, 求出所有色谱特征峰的相对

相对保留值计算公式^[9]: $T = T_i / T_s$ 。式中, T_i 为待测峰的绝对保留时间, T_s 为标示峰 (红景天苷) 的绝对保留时间。

相对面积计算公式^[9]: $S_r = [\text{待测峰的相对面积} / \text{标准样品 (狭叶红景天) 的总面积}] \times 100$ 。

经过比较, 发现不同样品共有 8 个共有峰, 如图

2 所示。把 8 个峰按不同的种列表如表 2。

表 2 共有峰的相对保留时间及相对面积

Table 2 Relative retention time and relative area of communal peaks

样品号 Sample No.	峰号 No. of peak															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>	<i>T</i>	<i>S_r</i>
1	0.693	9.74	0.878	0.81	1.029	3.1	1.142	2.04	1.322	16.35	1.569	5.83	2.247	3.32		
2	0.672	24.85			1.041	15.63	1.141	2.57	1.367	4.79	1.59	11.32	2.273	4.97	3.481	21.19
3	0.721	21.98	0.992	3.26	1.066	35.73	1.173	8.56	1.362	5.05	1.565	2.67	2.468	6.77	3.982	21.87
4	0.670	77	0.949	2.79	1.032	11.57	1.141	5.04	1.302	29.01	1.583	41.29	2.309	7.02	3.589	84.48
5	0.711	9.56	0.973	3.35	1.052	0.74			1.34	2.66	1.547	1.11	2.321	3.23	3.92	4.27
6	0.719	5.91	0.99	2.89	1.063	27.62	1.17	3.6	1.262	10.4	1.668	0.97	2.453	14.12	4.29	7.56
7	0.643	14.9	0.867	1.37	1.031	31.66	1.159	4.89	1.282	2.26	1.525	4.27	2.315	1.6	3.561	4.2
8	0.699	28.52	0.965	4.19	1.043	24.08	1.159	6.09	1.344	6.09	1.536	4.42	2.455	4.01	3.41	5.58
9	0.704	39.15	0.978	22.93	1.054	12.99	1.164	2.94	1.357	13.66	1.525	5.47	2.438	1.79	3.49	4.66
10	0.643	7.3	0.946	1.45	1.000	13.17	1.134	2.57	1.281	4.03	1.543	4.34	2.226	14.04	3.511	5.72

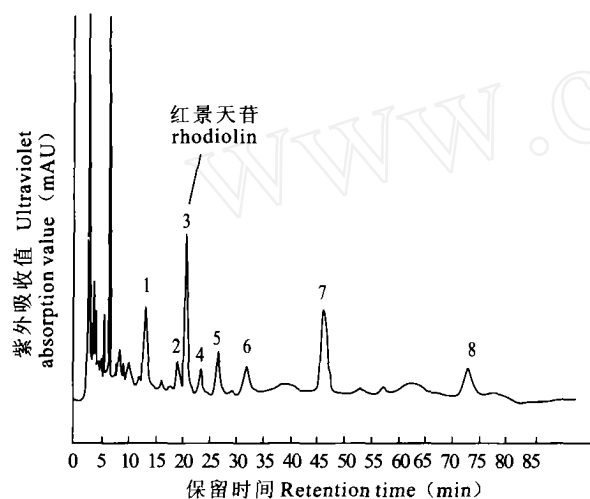


图 2 狭叶红景天指纹图谱

Fig 2 Chromatographic fingerprint of *R. kirilowii*

2.2 指纹图谱的分析

各个种的图谱大致相似。如图 2 所示,在 0~35 min 内,集中了 6 个共有峰,而 35~75 min 只有 2 个共有峰。其中 3 号峰为红景天苷,该峰为所有样品共有,但含量差异很大。

由表 2 看到,1 号、5 号样品红景天苷含量较低。

色谱峰的重叠率反映了不同种之间的相似度,其计算方法如下:

峰重叠率的计算^[9]: 重叠率 = $[2 \times (\text{待测样品与标准样品共有峰}) / (\text{待测样品峰数} + \text{标准样品峰数})] \times 100$

以此求出其余 9 个样品的色谱指纹图谱重叠率。重叠率从 1 号到 10 号分别见表 3。

表 3 指纹图谱共有峰的重叠率

Table 3 Ratio of communal overlap peaks

峰号 No. of peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10(CK)
百分比 Percent (%)	64.2	73.5	73.7	74.6	67.9	71.4	76.4	71.2	72.4	100

2.3 讨论

中药提取物在给定条件下得到的指纹图谱反映了该中药的含量组成及其含量分布状况,其特征峰可作为鉴别中药的依据。由表 2 看出,8 个共有峰中,1、3、5、6、7 号峰为各样品的 100% 共有峰,这 5 个组分为红景天的基本组成成分,可作为指纹图谱的基本依据。2 号样品没有 2 号峰,5 号样品没有 4 号峰,这 2 个峰共有率依次为 80%、86.7%。8 号峰的相对保留时间差异较大,在 3.400 和 4.300 之间

浮动,从色谱图上看,出峰时间在 70~85 min 分之间。

从重叠率可以看出:7 号样品峰重叠率大于 75%,2、3、4、6、8、9 号样品峰的重叠率在 70%~75% 之间;较高的重叠率表明上述样品应用价值较高。1、5 号样品峰重叠率低于 70%,属于应用性较差的品种。

2.4 指纹图谱相对保留时间及相对峰面积重现性试验

以 10 号样品狭叶红景天为供试品($n=3$), 按照供试品指纹图谱的制备和检测方法, 以指纹图谱重现性规定的方法操作, 对共有峰中单峰面积大于

5% 的峰面积及对应的相对保留时间进行考察, 结果见表 4。

表 4 指纹图谱重现性

Table 4 The repeatability test of detem ination ($n=3$)

		共有峰 Communal fingerprint peak			
		1	3	7	8
相对保留时间 Retention time	SD	0.155	0.102	0.537	1.022
	Average	13.407	20.753	46.27	72.91
	RSD (%)	1.16	0.49	1.16	1.40
峰面积 Area	SD	8.303	1.836	10.201	6.659
	Average	169.434	323.099	353.280	134.760
	RSD (%)	4.90	0.57	2.89	4.94

2.5 指纹图谱相对保留时间精密度的计算

在色谱分离过程中, 我们对 10 个供试品的 8 个共有峰的相对保留时间进行了精密度的计算, 发现

前 7 个峰的 RSD % 均在 5% 以内, 如表 5, 8 号峰的 RSD 为 8.12%, 其原因已讨论过。

表 5 共有峰的精密度

Table 5 Precision of communal peak

	峰号 No. of peak							
	1	2	3	4	5	6	7	8
SD	0.027	0.046	0.019	0.014	0.037	0.042	0.094	0.300
Average	0.689	0.949	1.041	1.154	1.322	1.565	2.351	3.693
RSD (%)	3.93	4.86	1.87	1.24	2.87	2.73	3.99	8.12

2.6 指纹图谱稳定性试验

以 10 号样品狭叶红景天为供试品, 考察 48 h 溶液的稳定性, 分别对 8 个共有峰的相对保留时间及其中相对峰面积(s) 大于 5% 的峰面积进行统计, RSD 不超过 5%。供试品 48 h 稳定。

研究表明: 在中药成分不完全明确的情况下, 利用其指纹图谱来判别红景天药材的优劣是切实可行的。就其应用性来说, 可作为中药生产厂家辨别中药原料优劣的依据, 也可作为中药植物细胞培养选种的依据。

参考文献:

[1] MINGHQ (明海泉), XIAGCH (夏光成), ZHANGRJ (张瑞均). Advancement of the study on *Rhodiola rosea* L. [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 1988, 19(5): 37- 42 (in Chinese).

[2] QIANYC (钱彦丛), QINBX (秦百萱), JINXY (靳新营), QNK (秦葵). Recent advances of the study on *Rhodiola rosea* L. [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials* (中药材). 1994, 17(8): 43- 45 (in Chinese).

[3] 陈伟球, 阮云珍. 中国植物志 (第 34 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1: 159- 216

[4] KURKNVA. The chemical composition and pharmacological properties of *Rhodiola* plants [J]. *Pharm. Chem. J.* (English), 1986, 20(10): 123

[5] 杨永昌. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 432- 434

[6] PENGJN (彭江南), MA CHY (马成禹), GE YCH (葛永潮). The chemical constituents of *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim. [J]. *China Journal of Chinese Medicinal Materials*. (中国中药杂志), 1994, 19(11): 676 (in Chinese).

[7] PENGJN (彭江南), CHEN H (陈浩), MA CHY (马成禹). HPLC determination of salidroside and tyrosol in nine species of *Hongjingtian* [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), 1995, 15(4): 21 (in Chinese).

[8] WANGSH (王思宏), YIXM (尹秀梅), ZHANG YCH (张艳春), WU XZ (吴信子), ZHENG X (郑兴), YIN QF (尹起范). Studies on identification of *Rhodiola sachalinensis* by HNMN fingerprints in different Changbaimountain regions [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2002, 33(9): 846- 848 (in Chinese).

[9] ZENGZH (曾志), YANGDH (杨东晖), SONGLF (宋力飞), YANGT (杨挺), LUXX (刘乡乡), YUANM (袁敏), ZENGHP (曾和平). The identification of *Isatis indigotica* Fort by high performance liquid chromatographic fingerprint [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学). 2002, 7: 849- 852 (in Chinese).