

不同产地大花红景天有效成分的含量测定研究

黎代余^{1,2}, 黄丽凤^{1,2}, 陈鸿平^{1,2}, 向楚兵^{1,2}, 刘友平^{1,2,*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川成都 611137;
2. 中药材标准化教育部重点实验室, 四川成都 611137)

摘要:目的 通过测定西藏、四川、云南三省大花红景天药材中红景天苷、多糖、多酚的含量, 为合理开发利用大花红景天资源及建立大花红景天 GAP 基地提供理论依据。方法 采用 HPLC 测定红景天苷含量, 硫酸-苯酚法测定多糖含量, 三氯化铁-铁氰化钾法测定多酚含量。结果 西藏产大花红景天药材中红景天苷、多糖、多酚平均含量分别为: 1.39%、4.83%、5.71%; 四川产大花红景天药材中红景天苷、多糖、多酚平均含量分别为: 1.32%、4.78%、5.56%; 云南产大花红景天药材中红景天苷、多糖、多酚平均含量分别为: 1.27%、4.76%、5.51%。结论 西藏产大花红景天药材质量最优, 西藏最适宜大花红景天生长。

关键词: 大花红景天, 红景天苷, 多糖, 多酚, 不同产地

Determination of the active ingredient content of *Rhodiola crenulata* in different origins

LI Dai-yu^{1,2}, HUANG Li-feng^{1,2}, CHEN Hong-ping^{1,2}, XIANG Chu-bing^{1,2}, LIU You-ping^{1,2,*}

(1. College of Chinese Materia Medica, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine and Chinese Materia Medica, Chengdu 611137, China 2. Chinese Medicinal Standardization Lab, Chengdu 611137, China)

Abstract: Objective: To provide a basis for development and to establish GAP base of *Rhodiola crenulata* resources, the contents of salidroside, polysaccharide, polyphenol of *Rhodiola crenulata* in Tibet, Sichuan and Yunnan provinces were determined. Methods: The content of salidroside, polysaccharide and polyphenol were determined by HPLC, sulfuric acid-phenol method and ferric chloride-potassium ferricyanide method, respectively. Results: The average concentrations of glycosides, polysaccharides and polyphenols of *Rhodiola crenulata* in Tibet were: 1.39%, 4.83%, 5.71%. The average concentrations of glycosides, polysaccharides and polyphenols of *Rhodiola crenulata* in Sichuan province were: 1.32%, 4.78%, 5.56%. The average concentrations of glycosides, polysaccharides and polyphenols of *Rhodiola crenulata* in Yunnan province were: 1.27%, 4.76%, 5.51%. Conclusions: The best quality ingredient was the *Rhodiola crenulata* in Tibet, and the most suitable place for the growth of *Rhodiola crenulata* was Tibet.

Key words: *Rhodiola crenulata*; glycosides; polysaccharides; polyphenols; different origins

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)02-0347-04

大花红景天 [*Rhodiola crenulata* (Hook.f. et Thomx.) H. Ohba] 来源于景天科 (*Crassulaceae*) 景天属 (*Rhodiola*) 植物, 其具有悠久的药用历史, 主要用于滋补元气, 被誉为“高原人参”^[1]。现代药理学研究表明, 红景天中所含的红景天苷、多糖、多酚类成分具有抗疲劳、耐缺氧^[2]、防放射^[3-4]、抗病毒^[5]、双向调

节^[6]、免疫调节^[7]以及抗氧化等多种药理作用。我国大花红景天植物资源丰富, 蕴藏量大^[8-9], 主要分布于西藏、四川、云南等广大的西部地区, 具有很强的开发利用价值。本研究收集了西藏、四川、云南三省的大花红景天药材, 并分别采用 HPLC 法、硫酸-苯酚法、三氯化铁-铁氰化钾法对红景天苷、多糖、多酚进行了含量测定, 目的是为了合理开发利用我国的大花红景天资源, 为我国大花红景天药材 GAP 基地建设及其相关医药工业生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大花红景天药材 经四川大学王署教授鉴定为

收稿日期 2009-11-09 * 通讯联系人

作者简介 黎代余 (1983-) 男, 在读研究生, 研究方向: 中药化学成分与质量标准化研究。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A14-10); 质检公益项目 (2007GYB215)。

大花红景天[*Rhodiol crenulata*(Hook.f.et Thomx.) H.Ohba]的根和根茎;红景天苷对照品 批号: 110818-200404, 中国药品生物制品检定所;葡萄糖分析纯, 成都化学试剂厂;乙腈 色谱纯, 美国 Fisher 公司;磷酸 分析纯, 成都金山化学试剂有限公司;浓盐酸、浓硫酸、苯酚、三氯化铁、铁氰化钾分析纯, 成都科龙化工试剂厂;水 为蒸馏水;其他试剂 均为分析纯。

高效液相色谱仪(Shimadzu SPD-10aVP 紫外检测仪)、CLASS-VP 工作站 日本岛津;BP211D 电子分析天平(十万分之一)、BP121S 电子分析天平(万分之一) 德国 Sartorius 公司;BUG25-12 超声仪 上海必能信超声波有限公司;1100 型分光光度计 上海天美科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红景天苷的含量测定

1.2.1.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS(4.6mm × 200mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈: 水(8:92); 流速: 1.0mL/min; 检测波长 275nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C。

1.2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取红景天苷对照品适量, 加甲醇配制成含红景天苷 0.545mg/mL 的溶液, 即得。

1.2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛) 约 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声处理 30min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

1.2.2 多糖的含量测定

1.2.2.1 5% 苯酚试剂的配制 取苯酚 100g, 加铝片 0.1g 和 NaHCO₃ 0.05g, 蒸馏, 收集 182 $^{\circ}$ C 馏分, 称取 7.5g, 加水 150mL 溶解, 置棕色瓶内放冰箱备用。

1.2.2.2 对照品溶液制备 精密称取 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的葡萄糖标准品, 加水配制成葡萄糖 102.32 μ g/mL 的溶液, 即得。

1.2.2.3 样品溶液的制备 取大花红景天粉末 2.5g (过 3 号筛) 精密称定, 置于圆底瓶中, 加 80% 乙醇 100mL 回流提取 1.5h, 趁热过滤, 药渣挥干, 加蒸馏水 100mL, 回流 1h, 趁热过滤, 用 15mL 热水洗涤烧瓶和药渣 3 次, 待冷却后移入 250mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 摇匀, 即得样品溶液。

1.2.2.4 最大吸收波长的选择 分别精密吸取对照品溶液 0.8mL、供试品溶液 0.6mL 置于具塞试管中, 加水至 1.0mL, 再分别加入 5% 苯酚溶液 1.6mL, 摇匀, 然后加浓 H₂SO₄ 7.0mL, 充分摇匀, 室温放置 25min。另取 1.0mL 水作同上平行操作, 作为空白对照, 在 400~650nm 之间扫描。

1.2.2.5 测定方法 红景天多糖的精制: 取大花红景天药材粉末 100g, 依次用 250mL 石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)、乙醚回流 1.5h, 取过滤后的残渣, 挥干溶剂; 加入 250mL 80% 的乙醇回流 1.5h, 取过滤后的残渣, 挥干溶剂, 加 5 倍量蒸馏水回流提取 2 次, 每次 1.5h, 抽滤, 合并滤液, 减压浓缩至一定体积, 浓缩液加入等量的 Sevag 试剂除蛋白, 反复进行 5 次; 取上层液加

无水乙醇使其含醇量达到 80%, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中静置过夜, 再离心分离(4000r/min, 10min), 沉淀依次用无水乙醇、丙酮反复洗涤 5 次, 于 50 $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重, 即得精制红景天多糖。

换算因素的测定: 精密称取 60 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的大花红景天多糖 21.03mg, 置于 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即可。精密吸取 0.6mL, 按照“ 1.2.2.4 ”项操作, 在所选定的最大波长处测定吸光度。按照下面公式计算换算因素 f:

$$\text{换算因素 } f = \frac{W \times 1000}{C \times D} \quad \text{式(1)}$$

式中: W-称取多糖的重量, μ g; C-溶液中多糖液中葡萄糖单糖的重量, μ g; D-多糖的稀释倍数。计算得 f=2.14。

样品测定: 精密吸取样品溶液 0.6mL, 按照“ 1.2.2.4 ”中方法在所选定的最大波长处测定吸光度。按照下面公式计算样品中红景天多糖的含量:

$$\text{多糖}(\%) = \frac{C \times D \times f \times 10^{-6}}{W} \times 100\% \quad \text{式(2)}$$

式中: C-样品提取液中按标准曲线计算出的葡萄糖的量, μ g; D-多糖的稀释倍数; f-换算因素; W-样品重量, g。

1.2.3 多酚的含量测定

1.2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品, 加入丙酮: 水(1:1) 配制成没食子酸 50 μ g/mL 的溶液, 即得。

1.2.3.2 供试品溶液的制备 取大花红景天粉末 0.5g, 精密称量, 加入 80mL 丙酮: 水(1:1), 置水浴中煮沸浸提 30min 后, 趁热抽滤, 冷却后定容至 100mL。

1.2.3.3 最大吸收波长的选择 分别精密吸取没食子酸对照品溶液 0.5mL、供试品溶液 0.6mL 置于 25mL 量瓶中, 依次加入 0.100mol/L 三氯化铁溶液 0.5mL、0.008mol/L 铁氰化钾溶液 0.5mL 和 0.10mol/L 盐酸溶液 0.5mL, 定容, 同时在 25mL 量瓶中加入 0.100mol/L 三氯化铁溶液 0.5mL、0.008mol/L 铁氰化钾溶液 0.5mL 和 0.10mol/L 盐酸溶液 0.5mL, 定容后得到空白溶液, 在 600~900nm 之间扫描。

2 结果与讨论

2.1 红景天苷测定结果

2.1.1 线性关系的考察 分别精密量取对照品溶液 2.5、5、10、12.5、15 μ L 注入液相色谱仪, 按前述色谱条件分别测定其峰面积。以对照品含量(C)为横坐标, 峰面积积分值(A)为纵坐标, 绘制标准曲线。计算得回归方程和相关系数见表 1。

表 1 红景天苷、多糖、多酚的回归方程

测定成分	回归方程	线性范围	相关性
红景天苷	$A = 358405C - 11736$	1.3625~8.175 μ g	0.9999
多糖	$A = 0.0743C + 0.0005$	2.13~10.66 μ g/mL	0.9998
多酚	$A = 0.4877C + 0.0649$	0.4~1.6 μ g/mL	0.9995

2.1.2 精密度实验 精密吸取红景天苷对照品溶液 10 μ L, 重复进样测定 3 次, 结果红景天苷平均峰面积分别为 1160245、1159862、1200973, RSD 分别为 0.43%、0.98%、0.64%。

2.1.3 稳定性实验 取红景天苷标准溶液 2mL 放

置,分别在 0、1、2、4、8、16h 测定峰面积,进样量 10 μ L。测得峰面积的平均值为 1156785, RSD 为 0.67%。

2.1.4 重现性实验 取大花红景天样品 5 份,每份 0.5g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液后测定,进样量 10 μ L,测得红景天苷的平均含量为 1.34%, RSD 为 0.60%。

2.1.5 加样回收实验 取已知红景天苷含量的大花红景天样品 5 份,每份 0.25g,精密称定后,精密加入红景天苷对照品溶液 4mg,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液后测定,进样量 10 μ L,计算得回收率为 101.4%, RSD 为 2.27%。

2.1.6 药材含量测定 称取大花红景天样品 10 份,每份 0.5g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,测定,计算红景天苷含量。10 批大花红景天药材红景天苷含量见表 2,图 1。

表 2 10 批大花红景天药材红景天苷、多糖、多酚含量结果(% $n=3$)

编号	来源	红景天苷含量	多糖含量	多酚含量
1	西藏拉萨	1.37	4.84	5.61
2	西藏林芝	1.41	4.84	5.65
3	西藏定日	1.38	4.83	5.64
4	西藏拉沙	1.38	4.81	5.62
5	四川大金	1.32	4.79	5.54
6	四川小金	1.29	4.80	5.55
7	四川诺尔盖	1.35	4.75	5.53
8	四川马尔康	1.33	4.79	5.63
9	云南迪庆	1.26	4.78	5.47
10	云南丽江	1.28	4.74	5.54

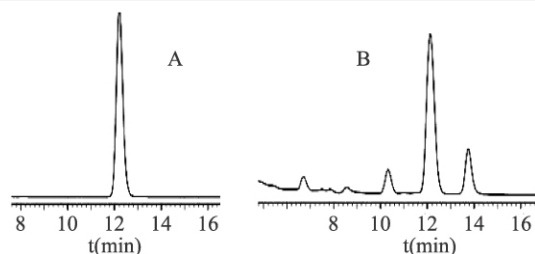


图 1 HPLC 色谱图

注:A-红景天苷对照品,B-样品。

2.2 红景天多糖的测定结果

2.2.1 最大吸收波长的选择 结果表明,对照品溶液和供试品溶液在 486nm 处有最大吸收峰,故选择 486nm 作为测定波长。

2.2.2 标准曲线的制备 精密移取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 分别置具塞试管中,按“1.2.2.4”项下操作,在 486nm 处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程和相关系数见表 1。

2.2.3 精密度实验 取葡萄糖对照品溶液 0.6mL,按“1.2.2.4”项下操作,在 486nm 处测定吸光度,重复测定 5 次。结果吸光度分别为 0.481、0.479、0.486、0.479、0.483, RSD 为 0.30%。

2.2.4 稳定性实验 取葡萄糖标准溶液 0.6mL,按“1.2.2.4”项下操作,在 486nm 处测定吸光度。在 0、

10、30、60、120、240min 测定,其吸光度分别为 0.477、0.481、0.479、0.474、0.485、0.480, RSD 为 0.37%。

2.2.5 重复性实验 取大花红景天同一样品 5 份,每份 2.5g,分别精密称定,按照“1.2.2.4”项下操作,在 486nm 处测定吸光度。结果所测样品平均含量为 4.83%, RSD 为 1.44%。

2.2.6 加样回收实验 取已知多糖含量的药材 5 份,每份约 0.25g,精密称定,分别精密加入红景天多糖 12mg,按照样品溶液制备方法制备样品,按照“1.2.2.4”项下方法,在 486nm 处测定吸光度,并以葡萄糖对照品溶液作对比测定。测得平均回收率为 98.6%, RSD 为 1.15%。

2.2.7 药材样品测定 取各大花红景天药材样品粉末各 2.5g,精密称定,加水至 1.0mL,再分别加入 5% 苯酚溶液 1.6mL,摇匀,然后加浓 H₂SO₄ 7.0mL,充分摇匀,室温放置 25min,以相应试剂为空白,在 486nm 处测定吸光度,并计算其含量,测定结果见表 2。

2.3 多酚的含量测定结果

2.3.1 最大吸收波长的选择 结果表明,对照品溶液和供试品溶液在 738nm 处有最大吸收峰,故选择 738nm 作为测定波长。

2.3.2 标准曲线的制备 精密移取对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mL 分别置于 25mL 容量瓶中,按照“1.2.3.3”项下方法,在 738nm 处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程和相关系数见表 1。

2.3.3 精密度实验 取同一份没食子酸对照品溶液,按照“1.2.3.3”项下方法,在 738nm 处测定吸光度,重复测定 6 次。吸光度分别为:0.561、0.562、0.561、0.559、0.564、0.562, RSD 为 0.17%。

2.3.4 稳定性实验 取没食子酸标准溶液 0.5mL,按“1.2.3.3”项下操作显色,在 738nm 处测定吸光度,每 30min 测定一次吸光度。吸光度分别为:0.567、0.561、0.565、0.558、0.560、0.566, RSD 为 0.37%。表明在 3h 内吸光度基本保持恒定,稳定性良好。

2.3.5 重复性实验 取大花红景天同一样品 5 份,每份 0.5g,分别精密称定,按照“1.2.3.3”项下方法操作测定,在 738nm 处测定吸光度。所测样品平均含量为 5.55%, RSD 为 1.44%,表明供试品重复性良好。

2.3.6 加样回收实验 取已知多酚含量的药材 5 份,每份约 0.1g,精密称定,分别精密加入没食子酸 5.6mg,按照样品溶液制备方法制备样品,按照“1.2.3.3”项下方法,在 486nm 处测定吸光度,并以葡萄糖对照品溶液作对比测定。测得平均回收率为 96.1%, RSD 为 3.81%。

2.3.7 药材样品测定 取各大花红景天药材样品粉末各 0.5g,精密称定,按照“1.2.3.3”项下方法操作,测定,以相应试剂为空白,在 738nm 处测定吸光度,并计算其含量,测定结果见表 2。

3 讨论

大花红景天植物在我国集中地分布在西南和西北地区,其中,以西藏地区产量最大^[8],根据文献记(下转第 352 页)

表2 回归方程、检出限及回收率结果

	标准曲线	相关系数	检测限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD(%)	回收率 (% $n=6$)
碱性橙嫩黄 O	$Y = 1.1682 \times 10^{-5}X - 0.167$	0.9998	0.1	2.03	94.7~98.9
碱性橙 2	$Y = 1.6711 \times 10^{-5}X - 0.058$	0.9996	0.1	1.84	92.9~96.0
碱性橙 21	$Y = 2.0574 \times 10^{-5}X - 0.013$	0.9995	0.1	0.87	94.8~97.4
碱性橙 22	$Y = 1.1758 \times 10^{-5}X - 0.152$	0.9998	0.1	1.41	94.2~98.0
酸性间胺黄	$Y = 2.4201 \times 10^{-5}X - 0.056$	0.9997	0.1	1.97	95.6~98.8

影响很大,当采用水浴蒸干时,过高的温度使碱性橙 2 和碱性橙嫩黄 O 回收率很低,碱性橙 2 和碱性橙嫩黄 O 在 50℃ 以上容易分解,低温真空浓缩可以得到比较高的回收率,但是过低的温度需要花费很长的时间,浓缩的效果也欠佳,本实验采用了 45℃ 真空浓缩,可以达到比较满意的效果。

2.4 线性关系、检测限、精密度和回收率

五种工业染料的定量标准曲线、检测限、精密度和回收率见表 2。

2.5 干扰性实验

在本研究方法的色谱条件下,食品中常见的添加剂苯甲酸、山梨酸、糖精钠、咖啡因在 430、480nm 几乎无吸收,不会干扰碱性橙的测定;食品中常见的食用色素柠檬黄、日落黄的保留时间分别为 4.2、7.3min(色谱图见图 8),均不干扰碱性橙嫩黄 O、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22、酸性间胺黄的测定。

3 结论

称取 20g 左右的样品,经无水乙醇超声振荡数次提取,于 45℃ 真空浓缩,高速离心,上清液进 HPLC 以 20mmol/L 醋酸铵溶液和甲醇梯度洗脱,在二极管阵列检测器 430nm 和 480nm 下检测,用外标法峰面积定量。五种工业橙染料在 0~20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的峰面积与浓度的线性关系良好;方法的最低检测限碱性橙嫩黄 O 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,碱性橙 2 为

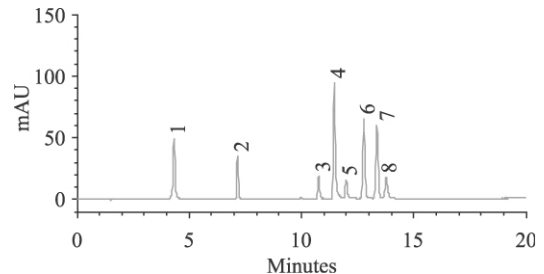


图 8 8 种混合标准溶液色谱图(Det 168~430nm)

注:1-柠檬黄 2-日落黄 3、4-碱性橙嫩黄 O;

5-碱性橙 21 6-碱性橙 2 7-酸性间胺黄 8-碱性橙 22。

0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,碱性橙 21 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,碱性橙 22 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,酸性间胺黄为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以进样浓度计);方法的回收率为 90.9%~98.9%。总之,本方法用于食品多种工业染料的测定,具有准确、快速、简便等优点。

参考文献

- [1] 铁晓威,黄百芬,任一平. RP-HPLC 法测定染色黄鱼中碱性橙含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 59-60.
- [2] 谷岩,崔松林,周宇,等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙、玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202-204.
- [3] 王佩珍,陈芸,朱维芳,等. 高效液相色谱法测定纺织品上禁用偶氮染料[J]. 化学世界, 2000(7): 353-355.
- [4] 佟力,席军. 红景天苷的药理作用研究进展[J]. 中外医疗, 2008, 27: 135-137.
- [5] 骆传环,高月,王作华,等. 红景天多糖的抗放实验研究[J]. 中国放射医学与防护杂志, 1994, 14(5): 340-341.
- [6] 骆传环,舒融,高月. 高山植物红景天抗疲劳抗辐射的实验研究[J]. 现代应用药学, 1996, 13(4): 5-7.
- [7] 孙非,王秀清,许守民,等. 高山红景天多糖对小鼠抗柯萨奇 B6 病毒感染能力的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(4): 361-363.
- [8] 李西林,南艺蕾. 红景天多糖的化学药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(3): 109-111.
- [9] 张汝学. 红景天多糖对小鼠体内脾淋巴细胞转化反应及 NK 细胞活性的影响[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(4): 278-280.
- [10] 熊先荣. 西藏红景天资源调查[J]. 华西药理学杂志, 1995, 10(3): 187-188.
- [11] 贺俊生,白马群增,康中林. 藏东地区大花红景天资源调查[J]. 西藏医药杂志, 1995, 16(4): 45-46.

(上接第 349 页)

载,红景天易受地形、地貌、土壤、气候等各种自然条件影响,其分布与海拔高度有密切关系,多数种红景天都分布在海拔 2500~5000m 之间,有些种分布高度达 5000m 以上,1700m 以下几乎没有红景天分布。从实验结果看,三省的大花红景天药材红景天苷含量均高于《中国药典》2005 年版一部中规定的红景天苷含量($\geq 0.5\%$),但是,西藏所产的大花红景天药材中红景天苷、多糖、多酚类成分的含量较四川、云南的高,而且成分稳定,这可能与西藏地区海拔高度密切相关。而四川大花红景天产地与西藏海拔高度、气候条件相似,其大花红景天药材中的红景天苷、多糖、多酚类成分的含量与西藏大花红景天中的含量相近。由此可见,西藏是大花红景天药材最适宜的生长区。

参考文献

- [1] 江林波. 高原人参红景天[J]. 餐饮世界, 2005(9).