

人工种植红景天不同药用部位中红景天苷的含量测定

次仁巴姆^{1,2},赵晓玲^{1*},马兴斌³,王静²,余永新^{2,3*},色珠³,吴金措姆³,
四郎玉珍³,拉巴次旦³,白玛玉珍³,李宝海³

(1. 西藏大学农牧学院,西藏 林芝 860000; 2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术
研究所,北京 100081; 3. 西藏自治区农牧科学院,拉萨 850000)

[摘要] 目的:测定人工种植红景天不同药用部位花瓣、茎、根的含量。方法:取各 1 g 样品经过 60% 的乙醇溶解,超声波清洗器清洗 50 min,过滤,旋蒸,加 2 mL 的甲醇,用微孔滤膜(0. 45 μm) 过滤,采用 CAPCELL PAK C₁₈ 柱(2. 0 mm × 150 mm,i. d. ,3 μm),柱温 30 ℃,波长 278 nm;样品温度 10 ℃,进样体积 10 μL。流动相为甲醇-1% 乙酸溶液 45:55,流速为 1 mL·min⁻¹进行定量分析。结果:有效部位中的红景天苷含量从高到低依次为花瓣(35. 00mg)、根(18. 89mg)、茎(1. 59 mg)。结论:建立了红景天中红景天苷含量的高效液相色谱方法,可适用于不同药材中红景天苷含量的测定。

[关键词] 红景天; 高效液相色谱-质谱法; 活性成分

[中图分类号] R284. 1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0079-03

[doi] 10. 13422/j. cnki. syfix. 2014080079

Study on Qualtaive Method of Salidroside of Artificial Cultivation Ultivation
Rhodiola Rosea by HPLC-MS

Tsering Balme^{1,2}, ZHAO Xiao-ling^{1*}, MA Xin-bin³, WANG Jing², SHE Yong-xin^{2,3*},
SE Zhu³, WUJIN Cuomu³, Selang Wazhen³, Laba Cdan³, Bama Yuzhen³, LI Bao-hai³

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry in Tibet University, Linzhi 860000, China;
2. The Chinese Academy of Agricultural Sciences Agricultural Quality Standards and Testing
Technology Research Institute, Beijing 100081, China;
3. Tibet Academy of Agriclture and Animal Husbandry, Lhasa 850000, China)

[Abstract] To determine the petals, stems, roots planted content Rhodiola different medicinal parts. **Method:** Each 1 g sample is dissolved after 60% ethanol, ultrasonic cleaner cleaning 50 min, filtered, rotary evaporated, add 2 mL of methanol, microporous filter membrane (0. 45 μm) filter using CAPCELL PAK C₁₈ column ((2. 0 mm × 150 mm, i. d. , 3 μm), column temperature 30 ℃, wavelength 278 nm, sample temperature 10 ℃, injection volume of 10 μL. The mobile phase was methanol-1% acetic acid solution 45:55, flow rate of 1 mL · min⁻¹ for quantitative analysis. **Result:** The effective parts of salidroside content in the order of the petals (35. 00 mg), root (18. 89 mg), stems (1. 59 mg). **Conclusion:** A detection of salidroside content in Rhodiola rosea was established by high performance liquid chromatography. It can be applied to the analysis on the salidroside in the different medicinal materials.

[Key words] Rhodiola Rosea; HPLC-MS; active ingredient

[收稿日期] 20130506(014)
[基金项目] 国家公益性行业科技专项项目(201303040-13);“十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD34B03)
[第一作者] 次仁巴姆,硕士,从事天然产物提取技术研究,Tel:13889084974, E-mail:13889084974@163. com
[通讯作者] * 赵晓玲,副教授,从事天然产物提取技术研究,Tel:13659592936, E-mail:474839943@163. com
* 余永新,博士后,副研究员,从事农畜产品质量安全与检测技术研究,Tel:13488770243, E-mail:443014178@163. com

红景天为景天科 Crassulaceae 红景天属 *Rhodiola* 植物,共有 96 个,主要分布在东亚、中亚、西伯利亚以及北美地区^[1-3];中国为其主产区,有 73 个种,主要分布在西南、西北、华北及东北地区,尤以云南、四川及西藏高寒地区^[4]最多。红景天是传统藏药的主要组成部分,具有抗衰老、抗肿瘤、增强免疫、改善心血管系统、保护脏器、影响三大物质代谢及双向调节等作用,被誉为“高原人参”^[5]。近年,对红景天原药的需要量急剧加大,致使红景天野生资源濒于枯竭,因此,在原生态地区开展人工种植红景天已经成为保护野生资源的有效途径。

西藏地处高寒地区,自然资源丰富,尤其是天然药物种类独特、活性成分含量相对较高。西藏地区分布的野生红景天主要是大花红景天,其别名为宽瓣红景天、宽叶景天,是红景天的优良品种之一,已先后收载于《中华人民共和国卫生部藏药标准》和《中国药典》2005 年、2010 年版^[6]。红景天苷是大花红景天的主要活性成分,其含量高低是评价其药用价值的重要指标之一^[7-9]。目前西藏高原地区的红景天原料及其产品较多,由于不同环境种植的红景天其品质和药效成分差异很大,给红景天及其产品质量控制带来了很大难度。目前,关于红景天苷的检测多数采用高效液相色谱方法,尚不能对红景天苷等活性成分进行准确定性研究。随着国际市场对红景天需求的逐年增加,红景天种植产业已经成为西藏地区许多企业提高利润和增加当地农民收入的主要途径^[10-11]。为了评价西藏高原地区种植的红景天其品质和药效价值,笔者采用了高效液相色谱-质谱技术对西藏人工种植的大花红景天的主要成分和含量进行了对比分析,旨在为红景天的品质鉴定和分级标准提供科学依据,建立其质量控制标准体系和方法。

1 材料

大花红景天由西藏自治区农牧科学院进行栽培与种植,命名为西藏大花红景天,编号分别为 20121105,20121110,20121115。小花红景天由拉萨市场销售部提供,经西藏自治区食品药品检验所鉴定师格桑鉴定;分别取一定量的大花红景天的茎、根、花以及小花红景天的根和茎为本实验的研究

材料。

红景天苷对照品(98%,批号 MUST-11082405,100 mg)由北京恩诺科技有限公司提供;色谱柱为资生堂生产(CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (S-5) 2.0 mm×150) mm;甲醇、乙腈等均为色谱纯,自制重蒸馏水;其他试剂均为分析纯,由西藏汇民科技有限公司提供。

高效液相色谱仪 Waters2695,质谱仪 API 4000 (AB 公司),包括二元溶剂泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、光二极管阵列检测器(DAD)和 ESI 接口的质谱检测器;氮吹仪(Organomation,美国);RE-3000A 型旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司);均质器;BILON-W-501S 型超声波萃取仪(天津比朗科技有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(2.0 mm×150 mm,3 μm),柱温 30 ℃,波长 278 nm,样品温度 10 ℃,进样体积 10 μL。流动相甲醇-1% 乙酸溶液 45:55,流速 1 mL·min⁻¹。

2.2 质谱参数 质谱检测方式:正离子(positive)检测;质量扫描范围 *m/z* 105~1 400,采用多反应离子监测模式进行检测。

2.3 标准溶液的制备 精密称取对照品红景天苷 10 mg,分别置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇和水(1:1)溶解并稀释至刻度,得质量浓度 1 000 mg·L⁻¹的红景天苷标准贮备溶液,置 4 ℃冰箱避光保存。

2.4 样品前处理 分别称取大花红景天的茎、根、花瓣以及小花红景天的茎、根各 2 g,分别用配好的 60% 的乙醇 50 mL 溶解,然后用超声波清洗器清洗 50 min,过滤,取上清液 10 mL,然后用旋转蒸发仪浓缩至无液体状,加 2 mL 的甲醇后,继续用超声波清洗器清洗至完全溶解,取 100 μL 溶液用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,上高效液相色谱仪进行测量其红景天苷的含量。

3 结果与分析

3.1 红景天苷采集参数 一定浓度的对照品红景天苷,在以上确定的高效液相色谱串联质谱检测条件下进样,通过筛选和优化,得到质谱参数,见表 1。

表 1 红景天苷的质谱参数

化合物	母离子	特征离子	DP	EP	CUR	GAS ₁	GAS ₂	TEM	IS	CAD
红景天苷	300	250,266,282	-76	-10	20	20	40	500	-4 500	5

3.2 红景天苷质谱图 在上述色谱与质谱条件下,取待测样品溶液 20 μL 进样,得到相关色谱质谱图(图 1)。图 1 是红景天稀释液的电喷雾离子化(ESI)正离子(positive)检测条件下的总离子质谱图。从图中可以得知,图中是红景天苷得到 [M + H]⁺ 离子,质荷比 m/z 为 300.1。

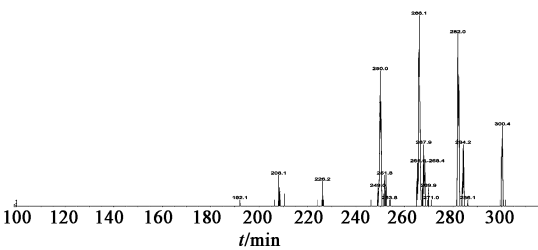


图 1 红景天苷总离子指纹图谱[ESI(+)]

3.3 线性关系的考察 参考《中国药典》2010 年版操作。取上述红景天苷对照品溶液,用 50% 甲醇水溶液分别稀释成 5 个不同质量浓度,各进样 10 μL,按 2.1 项中的色谱条件测定峰面积,以对照品浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程及相关系数分别为: $Y_{\text{红景天苷}} = 3.58e + 003X + 3.50e + 003$ ($R^2 = 0.99$);结果表明,红景天中的红景天苷在 0.5 ~ 100 mg·L⁻¹ 具有良好的相关性。

3.4 精密度试验 分别精密吸取红景天苷对照品溶液,连续测定 5 次,每次进样 10 μL,测得红景天苷峰面积的 RSD 2.10%,表明仪器精密度良好。

3.5 稳定性试验 分别精密吸取红景天苷样品溶液于 4,8,12,16,20,24 h 进样,按上述色谱条件测得红景天苷峰面积的 RSD 2.23%。

3.6 重复性试验 平行制备 5 份样品溶液,按上述色谱条件测定得红景天苷含量的 RSD 2.30%。

3.7 加样回收率试验 精密称取已知的大花红景天根粉样品,平均分为 6 份样品,分别加入一定量的红景天苷对照品溶液,按照 2.4 项下供试品溶液的制备方法处理,按 2.1 项下的色谱条件测定,计算回收率见表 2。

表 2 大花红景天根粉样品加样回收率(n=6)

No.	测得量 /mg·g ⁻¹	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	26.23	89.74	91.79	3.59
2	28.54	97.64		
3	27.76	94.97		
4	25.61	87.62		
5	30.10	92.08		
6	25.94	88.74		

注:样品中含有量 18.89 mg·g⁻¹,加入量 10.34 mg·g⁻¹。

3.8 样品测定 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,连续测定 3 个批次,见表 3。

从表 3 中可以看出,大花红景天等不同种类的有效部位,其红景天苷的高效液相色谱吸收峰的保留时间几乎一致。

表 3 红景天的有效部位中的红景天苷的含量

不同部位	红景天苷(n=3)	比例(n=3)	RSD
	/mg·g ⁻¹	/%	/%
人工大花-茎	1.59	0.15	2.05
人工大花-根	18.89	1.88	1.98
野生小花-茎	2.55	0.25	2.13
人工大花-花瓣	35.00	3.50	1.02
野生小花-根	5.53	0.55	2.11

4 讨论

结果显示西藏人工种植的红景天主要成分的不同部位其含量差异显著,其种植的红景天产品中红景天苷含量符合《中国药典》(2010 年版)的标准,红景天苷含量高于国家标准,表明了西藏高原人工种植的红景天符合中草药种植规范的标准。此外,通过对拉萨红景天的不同部位进行了系统检测分析表明,不同部位中的红景天苷含量从高到低依次为花瓣、根、茎,其中花瓣中含量高达 35 mg·g⁻¹,由于野生红景天多数只是根部入药,采集大量的根部不仅加剧资源枯竭,而且破坏高寒植被,人工种植大花红景天具有两次开花时期,可以通过采集花瓣来提取红景天苷。因此,红景天花瓣有望成为今后替代红景天根的主要有效部位。

[参考文献]

[1] Kammerer B, Kahlich R, Biegert C, et al. HPLC-MS/MS analysis of willowbark extracts contained in pharmaceutical preparations[J]. Phytochem Ana, 2005, 16(6):470.

[2] Diaz L A, Adad M M, Femandez M L, et al. Lignan and phenyl pro-panoidglycosides from *Phillyrea latifolia* and their *in vitro* anti-inflam-matory activity[J]. Planta Med, 2001, 67(3):219.

[3] Taskova R M, Gotfredsen C H, Jensen S R. Chemotaxonomy of veronicaeae and its allies in the plantaginaceae[J]. Phytochemistry, 2006, 67(3):286.

[4] 陈小明,徐超群.红景天中红景天苷的提取工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3):329.

[5] 谢卉,朱大会.红景天苷对神经系统疾病药理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17):2505.

[6] 王聪庆,陈娟,李彩东,等.红景天中红景天苷和多糖制备工艺研究[J]. 中药材, 2011, 34(7):1122.