

高山红景天中红景天苷的分离及含量测定^{*}

★ 王莹^{1**} 汲晨锋^{1,2,3***} 季宇彬^{1,2,3} (1. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 哈尔滨 150076; 3. 哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站 哈尔滨 150076)

摘要:目的:对高山红景天的主要成分红景天苷进行分离与含量检测。方法:先采用 AB-8 型大孔吸附树脂法对高山红景天提取物进行分离,再通过 HPLC 法对高山红景天的主要成分红景天苷进行含量测定。结果:HPLC 法测得高山红景天提取物分离后的红景天苷含量为 37.63% (质量分数)。

关键词:高山红景天;红景天苷;大孔吸附树脂;高效液相色谱

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A

Separating Rhodioside from *Rhodiola sachalmensis* A Bor and Determining its Content by Using HPLC

WANG Ying¹, JI Chen-feng^{1,2,3}, JI Yu-bin^{1,2,3}

1. Engineering Reseach Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076;

2. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076;

3. Institute of Materia Medica and Postdoctoral Programme of Harbin University of Commerce, Harbin 150076

Abstract: Objective: To separate the main component of rhodiola sachalmensis A Bor, and to determine the content of Rhodioside by using HPLC. Methods: AB-8 Macroporous adsorptive resins were used to purify the extractive of Rhodiola, and then the content of Rhodioside was determined by using HPLC. Results: The purity of rhodioside in product was 37.63%.

Key words: *Rhodiola sachalmensis* A Bor; Rhodioside; Macroporous adsorptive resins; HPLC

高山红景天 (*Rhodiola sachalmensis* A Bor), 又名红景天, 库页红景天, 是景天科 (Crassulaceae) 红景天属 (*Rhodiola* L) 多年生草本或亚灌木植物的干燥全草^[1], 国内外研究证实其具有抗氧化、抗缺氧和延缓衰老的功效^[2,3] 及保肝^[4] 的作用, 同时可以通过调节能量代谢平衡提高大鼠的运动能力, 有一定的抗疲劳作用^[5], 是一种具有多种生物效应的药材。

红景天苷 (Salidroside, SDS) 为红景天中最主要

的有效成分, 通常以它的有无与含量的高低作为红景天质量优劣的判断标准^[6], 目前制备红景天苷的研究报道较多^[7-9]。本文采用大孔吸附树脂方法分离红景天苷, 建立了一个操作简便、快速、结果准确可靠的测定红景天苷含量的 HPLC 方法。

1 实验材料与仪器

高山红景天提取物 (哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 含量 3%); 红景天苷标准品 (上海药谷药业有限公司, 批号: 080112, 含量 ≥

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (D200402)

** 作者简介: 王莹 (1985 -), 女, 硕士生, 研究方向: 中药活性成分研究。

*** 通讯作者: 汲晨锋, Tel: 0451-84866922, E-mail: smilejef001@sina.com

98%);AB-8型大孔吸附树脂(南开大学化工厂);甲醇(色谱纯);乙醇(分析纯),单蒸水,双蒸水。

Waters 高效液相色谱仪(2996DAD 检测器、2695 泵、自动进样器、Empower 化学工作站, Waters 公司);液相色谱柱(SymmetryShield RP18 5 μ l, 4.6 $\times$ 250 mm);层析柱(3 cm $\times$ 80 cm, 上海华美玻璃仪器厂), R-201 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);KQ-250E 型台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ALC-110.4 型电子天平(美国奥好斯科科技有限公司), 鼓风干燥箱(上海一恒仪器有限公司), 微孔滤膜(0.45 μ m)。

2 方法

2.1 大孔树脂的筛选 红景天苷为极性较大的苷类^[10], 因此选取两种较大极性的大孔吸附树脂 AB-8、NKA-9。解析剂分别为 AB-8: 乙醇-水(体积比 20% 乙醇)^[11]、NKA-9: 乙醇-二氯甲烷(3:7)^[12]。采用静态吸附法, 将预处理过的两种大孔树脂中分别加入样品液(5 mg/ml 高山红景天提取物), 浸渍 72 h, 滤过后用蒸馏水洗涤, 洗涤液与滤液合并, 测定吸附残液中红景天苷成分含量, 分别计算静态吸附率。装柱后分别以 50 ml 50% 乙醇 2-BV/h 的流速洗脱, 合并洗脱液, 浓缩并定容, 计算两种树脂的定量洗脱率, 筛选最佳树脂型号。

2.2 大孔吸附树脂吸附条件的考察 吸附等温曲线: 将上柱样品液按高山红景天提取物(mg)/树脂用量(g)的比例, 以相同的吸附容量配制成不同浓度的溶液分别加入到 20g 筛选的大孔树脂柱上, 以 2~4 BV/h 的流速重吸附 2 次, 吸附 10 h, 收集吸附残液, 测定其红景天苷含量, 筛选最佳上样液浓度。

2.3 大孔吸附树脂洗脱条件的考察 洗脱液流速的考察: 将等质量的已吸附树脂 20 g(5mg/g 干树脂的吸附量)装于层析柱内, 用 50 ml/g 干树脂的解吸剂量以不同流速对高山红景天苷进行解吸, 收集洗脱液, 测定其红景天苷含量, 计算解吸百分率。

2.4 高山红景天苷的分离 预处理 AB-8 型大孔树脂时, 将树脂于蒸馏水中浸泡 24 h, 单蒸水淋洗至澄清, 95% 乙醇以 2 BV/h 的流速通过树脂, 洗至流出液与水(1:5)无混浊停止, 最后用单蒸水以同样的流速洗净乙醇。湿法装柱至约 2/3 柱高, 称取红景天苷粗品 2.5 g 制成 0.01 g/ml 水溶液, 置于经预处理后的树脂柱上吸附 16 h, 蒸馏水洗至流出液澄清, 用 20% 的乙醇洗脱液约 1 000 ml 进行洗脱, 流速 5~10 ml/min, 收集流出液, 蒸干溶剂, 即得红景天苷分离物, HPLC 法测其含量。按文献方法^[13]再生树脂后重新装柱, 最佳再生液浓度为 30% 乙醇溶

液、1% 氢氧化钠溶液、2% 盐酸溶液。

2.5 高山红景天苷的含量测定

2.5.1 红景天苷标准品溶液的配制 精密称取红景天苷标准品 10 mg, 于 50 ml 容量瓶中制成 0.2 mg/ml 的甲醇溶液, 微孔滤膜(0.45 μ m)过滤, 即得标准品溶液, 根据需要稀释成不同浓度^[14,15]。

2.5.2 供试品溶液的配制 精密称取红景天苷供试品 10 mg, 于 50 ml 容量瓶中制成 0.2 mg/ml 的甲醇溶液, 微孔滤膜(0.45 μ m)过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.5.3 色谱条件 色谱柱: SymmetryShield RP18 5 μ l, 4.6 mm $\times$ 250 mm; 流动相: 甲醇-水(15:85); 流速: 1 ml/min; 进样量: 10 μ l; 检测波长: 222 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.5.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 ml 标准样溶液于 10 ml 容量瓶中用甲醇稀释至刻度, 摇匀。上述浓度的标准品溶液分别以 10 μ l 进样, 以峰面积(y)与红景天苷标准品浓度(x)绘制标准曲线。

2.5.5 样品的含量测定 分别精密吸取供试品溶液 10 μ l, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算红景天苷含量。

3 结果

3.1 大孔吸附树脂的筛选

不同型号大孔吸附树脂对红景天苷的静态吸附率: AB-8 型为 87.46%、NKA-9 为 87.48%, 效果无较大的差异; 定量洗脱率 AB-8 型为 36.20%、NKA-9 为 43.44%, 差距不大。由于 AB-8 型大孔吸附树脂能够得到更好的分离纯化效果, 其解析系统为乙醇-水, 相对 NKA-9 的解析系统(二氯甲烷-乙醇)更为经济, 适合大量制备, 因此选择 AB-8 树脂进行吸附条件和洗脱条件的考察。

3.2 大孔吸附树脂吸附条件的考察

AB-8 型大孔吸附树脂吸附红景天苷的吸附等温曲线见图 1。随着药液浓度的增加, 红景天苷的残留率逐渐增加。药液浓度为 10 mg/ml 时, 吸附残液中的红景天苷泄漏较少且有较好的吸附效果, 为最佳吸附浓度。

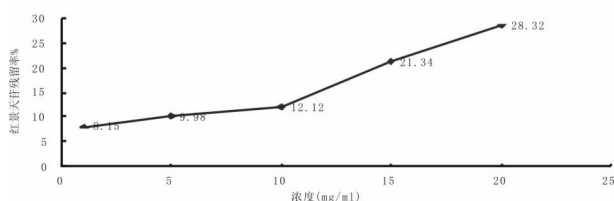


图1 AB-8型大孔吸附树脂吸附红景天苷的吸附等温曲线

3.3 大孔吸附树脂洗脱条件的考察

不同流速洗脱液对吸附后的 AB-8 型大孔吸附树脂中的红景天苷的洗脱能力见图 2。解吸液流速越快,红景天苷解吸效率越低,这与流速的提高,解吸液与树脂间的接触及交换不充分,导致无法充分实现解吸有关,实验结果表明解吸速率控制在 1.5 倍柱体积/h 为最佳。

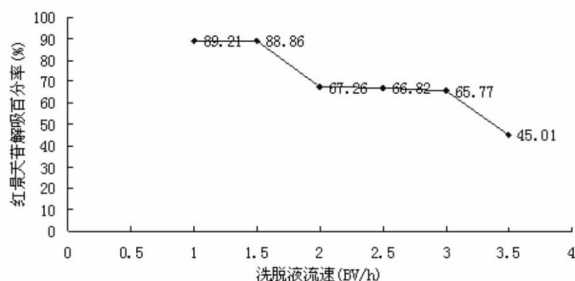


图 2 AB-8 型大孔吸附树脂中的红景天苷的洗脱能力

3.4 样品的含量测定

红景天苷标准品溶液全波长扫描吸收光谱图如图 3 所示,液相色谱图如图 4 所示。标准曲线方程为 $y = 10^7 x - 14764$ (线性范围 0.02 ~ 0.2 mg/ml), 经检测计算红景天苷含量为 37.63%, 如图 5 所示。

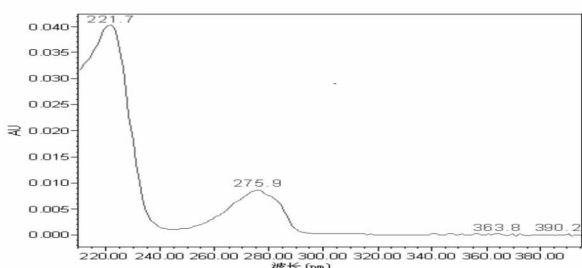


图 3 红景天苷标准品溶液的紫外吸收光谱图

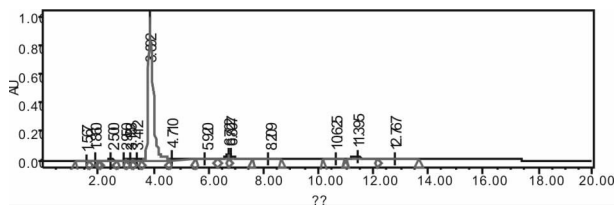


图 4 红景天苷标准品液相色谱图

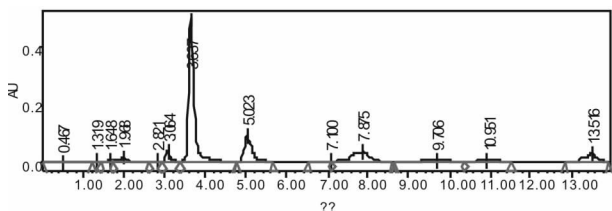


图 5 AB-8 型大孔树脂分离红景天苷的液相色谱图

4 讨论

AB-8 型大孔吸附树脂吸附红景天苷的最佳吸

附条件为:5 mg 高山红景天提取物/g 干树脂用量,样品液浓度 10 mg/ml。解吸速率控制在 1.5 倍柱体积/h 为最佳,此时既能达到满意效果,又能提高实验速度。

AB-8 型大孔吸附树脂分离红景天苷时,为了减少药材的浪费,提高制备速度,我们选择高山红景天提取物与树脂的重量比为 5 mg 红景天提取物/g 干树脂上柱,吸附浓度为 10 mg 高山红景天提取物/ml 溶液,吸附时间为 16 h,洗脱液为 3BV 的体积比为 20% 的乙醇,流速为 1.5 BV/h,按此条件洗脱,制备高山红景天苷分离物共 19.743 g。

参考文献

- [1] 全国中草药编著组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996: 273-274.
- [2] 张文生,朱陵群,牛福玲,等. 红景天苷对缺氧/缺糖损伤的神经细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志,2004,29(5):459.
- [3] 林树新,刘亚玲,赵贺玲,等. 红景天苷对低氧培养的兔肺动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志,2001,17(12):1229.
- [4] Song EK, Kim JH, Kim JS, et al. Hepatoprotective phenolic constituents of *Rhodiola sachalinensis* on tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(5): 563-565.
- [5] 汲晨锋,耿欣,季宇彬. 运动疲劳大鼠能量代谢与红景天苷的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,45(11):9419.
- [6] 胡锦美. 红景天初提液的澄清处理与纯化[J]. 福州师专学报(自然科学版),2000,20(6): 75-80.
- [7] 葛永潮. 红景天苷的制备工艺改进[J]. 中国药物化学杂志, 1994, 4(3): 196-197.
- [8] 胡馨,张国明,童月建,等. 红景天片剂薄层鉴别及红景天苷的含量测定[J]. 中成药,2000,22(11):808-810.
- [9] 姜舜尧. HPLC 法测定高山红景天胶囊中红景天苷的含量[J]. 中成药,2001,23(12):927-928.
- [10] 张晓丹,余白云,张茹. 红景天属植物的化学成分研究进展[J]. 航空航天医药,2006,17(1):61-63.
- [11] 邵韧辉. 高纯度红景天苷的制备工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2004,18(4):58-59.
- [12] 李静,鱼红闪,张春枝,等. 制备红景天苷标准品的新方法[J]. 大连轻工业学院学报,2002,21(3):189-192.
- [13] 王化田. 高山红景天中红景天苷、甾元醇、香豆素的生产工艺[D]. 东北林业大学硕士研究生学位论文,2002,3:31-35.
- [14] 李娜,赵斌,余娅方,等. 高效液相色谱法测定圣地红景天中红景天苷的含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):411-412.
- [15] 马涛,郭亚东,熊春媚,等. 高效液相色谱法测定清新胶囊中红景天苷和酪醇的含量[J]. 中国药师,2006,9(11):1014-1016.

(收稿日期:2009-04-12)