

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)06-0047-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.012



红景天标准汤剂及配方颗粒高效液相色谱特征图谱研究*

杨海燕¹, 郭书台², 张志鹏², 戴涌¹, 李霞¹

(1. 陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065; 2. 西安绿叶药物研究有限公司, 陕西 西安 710054)

摘要:目的 建立红景天标准汤剂及配方颗粒的高效液相色谱(HPLC)特征图谱。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Inert Sustain C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.04% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 278 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。以红景天苷为对照, 测定 15 批红景天标准汤剂及小试工艺、中试工艺制成配方颗粒的 HPLC 图谱, 确定共有峰。比较标准汤剂与配方颗粒样品 HPLC 图谱中共有峰的异同。**结果** 标准汤剂与配方颗粒样品 HPLC 特征图谱有 5 个共有峰, 相对保留时间均在规定的 ±5% 以内。**结论** 建立的 HPLC 特征图谱能更好地控制红景天标准汤剂及配方颗粒的质量。

关键词: 红景天; 标准汤剂; 配方颗粒; 高效液相色谱法; 特征图谱

HPLC Characteristic Chromatograms of Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma Standard Decoction and Formula Granules

YANG Haiyan¹, GUO Shutai², ZHANG Zhipeng², DAI Yong¹, LI Xia¹

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Xi'an Green Leaf Pharmaceutical Research Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710054)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) characteristic chromatograms of Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma standard decoction and formula granules. **Methods** HPLC method was adopted, the chromatographic column was Inert Sustain C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.04% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 278 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. With salidroside as a reference, the HPLC chromatograms of 15 batches of Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma standard decoction and formula granules prepared by the lab-scale and pilot-scale process were determined to identify the common peak. The similarities and differences of the common peaks in the HPLC chromatograms of the standard decoction and the formula granule sample were compared. **Results** There were five common peaks in the HPLC characteristic chromatograms of the standard decoction and the formula granule sample, and the relative retention time was within ±5% of the specified value. **Conclusion** The established HPLC characteristic chromatograms can better control the quality of Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma standard decoction and formula granules.

Key words: Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma; standard decoction; formula granules; HPLC; characteristic chromatograms

红景天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, 有益气活血、通脉平喘功效, 可用于治疗气虚血瘀、胸痹心痛、中风偏瘫、倦怠气喘^[1]。其含有丰富的黄酮类、有机酸类、多糖类、挥发油、萜醌类、蛋白质及无机元素^[2-4], 化学成分较复杂。为全面控制其质量, 本研究中收集了 15 批红景天药材制成饮片, 建立红景天标准汤剂^[5]的高效液相色谱(HPLC)特征图谱^[6], 并将其引入对红景天配方颗粒生产工艺的评价及成品质量控制。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AU250D 型分析天平、10AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); BS110S 型分析天平(德国 Sartorius

公司); KQ250 型超声波清洗机(上海科岛自动化系统有限公司); DY-2 型恒温水浴锅(上海胜启仪器仪表有限公司); LABORTA4001 型旋转薄膜蒸发器(德国 Heidolph 公司); DZ-1BC 型真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司); TQ-Z 型多功能提取罐、NH-1000 型蒸发浓缩器、RCYP-150 型喷雾干燥塔、FZG-1400 型真空干燥箱(陕西昌泰实业有限公司); 60B 型粉碎机(南京联棚制药设备有限公司); HC200A 型混合机(宝鸡中药机械厂); YK-160 型摇摆式颗粒机(常州市迅驰干燥设备有限公司)。

1.2 试药

红景天苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110818-201708, 含量 > 98%); 乙腈、磷酸均为色谱纯,

* 基金项目: 陕西省创新能力支撑计划项目[2018PT-29]。

第一作者: 杨海燕, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为中药检验与质量标准及中药新产品开发, (电子信箱)1012565407@qq.com。

其余试剂均为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。红景天药材(15批,采自西藏、青海、新疆、云南等地,经陕西省中医药研究院王伟峰教授鉴定为正品)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:InertSustain C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.04%磷酸水溶液,梯度洗脱(0~5 min时5%A,5~35 min时5%A→30%A,35~50 min时30%A→40%A,50~60 min时40%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:278 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 标准汤剂 HPLC 特征图谱建立

2.2.1 标准汤剂制备

取药材样品,经净制、浸润,切成2~4 mm厚片,自然阴干,制得饮片,取药材饮片样品100 g,加7倍量水(浸过药面4.5 cm),浸润30 min,煮沸60 min,趁热过滤(300目筛网,下同),药渣再加6倍量水,加热煮沸60 min,趁热滤过,合并2次滤液,减压浓缩至500 mL,摇匀,即得质量浓度为0.2 g/mL的药材标准汤剂。

2.2.2 溶液制备

取红景天苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成质量浓度为0.05 mg/mL的对照品溶液。精密吸取标准汤剂5 mL,置25 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,超声(功率150 W,频率40 kHz)处理10 min,放冷至室温,再加50%甲醇定容,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以红景天苷峰为参照峰,计算各特征峰的保留时间和相对峰面积。结果的RSD

均小于1.0%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液适量,分别在室温下放置0,5,10,15,20,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,以红景天苷峰为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间和峰面积。结果各特征峰相对保留时间的RSD均小于2.0%;相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=6),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.2.4 参照峰和共有峰的选择

以红景天苷为对照^[5-6],取15批标准汤剂样品,按2.1项下色谱条件进样分析。结果15批红景天标准汤剂HPLC叠加特征图谱(图1)共分离出8个共有峰,选取其中峰面积大于总峰面积5%的5个共有峰为标准汤剂对照特征图谱(图2)。其中峰2(s)为红景天苷峰。

2.3 配方颗粒特征图谱建立

2.3.1 配方颗粒制备

小试工艺:取药材饮片样品4 000 g(厚度0.2~0.5 cm,下同),加7倍量水,浸泡30 min,加热煮沸,微沸回流60 min,趁热滤过,药渣再加6倍量水,加热煮沸后微沸回流60 min,趁热过滤,合并2次滤液,55~60℃减压(-0.08~-0.05 MPa)浓缩至相对密度为1.04~1.06(50℃测,下同,约相当于饮片1倍量,作为中间体),静置,滤过,浓缩至相对密度为1.20~1.25,干燥,加入相当于饮片量4%的麦芽糊精、95%乙醇适量制粒,20目筛整粒,制成1 000 g。出膏率为14%~17%。每1 g颗粒相当于饮片约4 g。

中试工艺:取药材饮片样品50 kg,置多功能提取罐中,加7倍量水,浸泡30 min,提取60 min,趁热滤过(160目滤布,下同),药渣再加6倍量水,提取60 min,趁热滤过,合并2次滤液,置蒸发浓缩器(温度45~55℃,真空度-0.09~-0.06 MPa)浓缩得相对密度1.10~

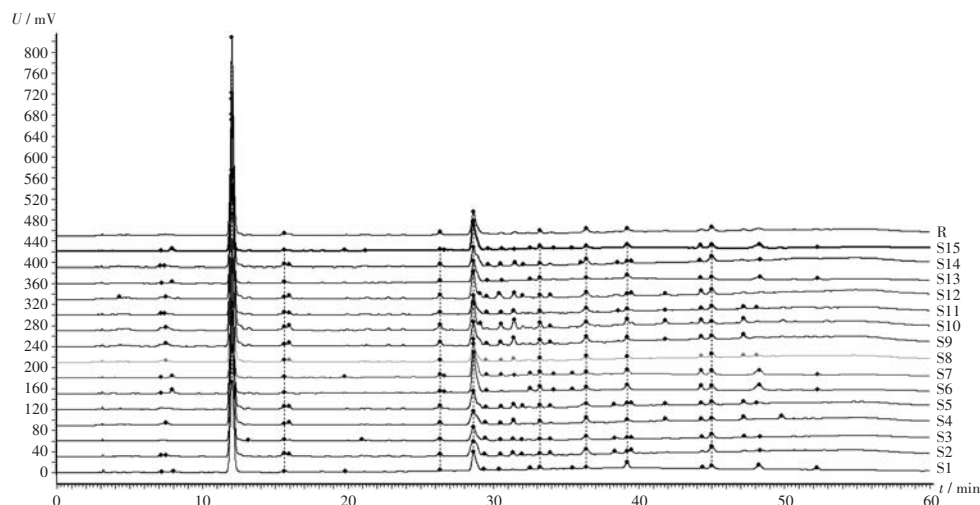


图1 15批红景天标准汤剂高效液相色谱叠加特征图谱

Fig. 1 HPLC superimposed characteristic chromatograms of 15 batches of Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma standard decoction

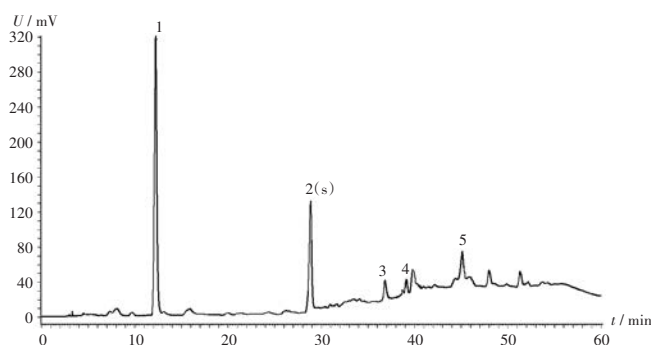


图2 红景天标准汤剂高效液相色谱对照特征图谱

Fig. 2 HPLC reference characteristic chromatograms of *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* standard decoction

1. 15的清膏。喷雾干燥(进风温度100~120℃,塔内温度70~90℃,排风温度70~90℃)至水分小于4.0%,干浸膏粉碎过80目筛。取浸膏粉和麦芽糊精(1:0.4, m/m)置混合机中混匀,在摇摆式颗粒机中用80%~90%乙醇制软材,12目筛制粒,置真空干燥箱(45~55℃)中干燥至水分小于3.0%,10目筛整粒,得红景天中试配方颗粒。每1g颗粒相当于饮片3.33g。

2.3.2 溶液制备

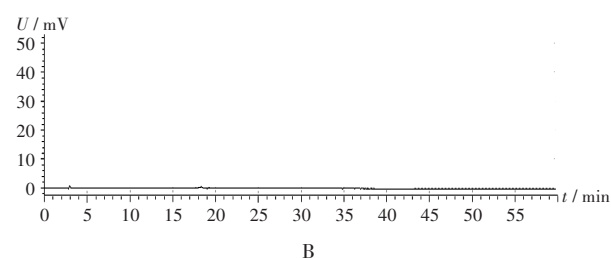
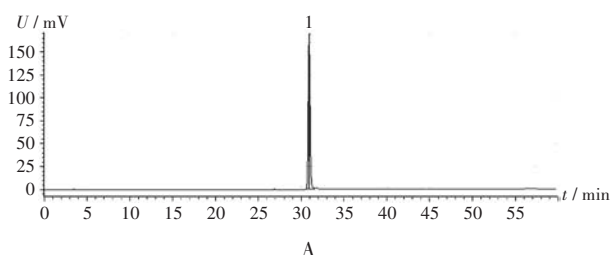
取红景天苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成质量浓度为0.05 mg/mL的对照品溶液。分别取上述小试、中试配方颗粒样品细粉约0.25g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25mL,称定质量,超声(功率250W,频率50kHz)处理30min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取辅料麦芽糊精0.07g,精密称定,同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。详见图3。

精密度、稳定性试验:按2种试验相关要求操作,以红景天苷峰为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间和峰面积。结果各特征峰上述2个指标的RSD均小于3%,表明仪器精密度良好,供试品溶液室温放置24h内基本稳定。

耐用性考察:采用3个不同厂家不同品牌的色谱柱[InertSustain C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm), 汉邦ODS-2 C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm), 月旭Ultimate@XB-C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm)],按选定色谱条件进样测定,结果5个共有峰均可得到良好分离,相对



1. 红景天苷

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液

图3 红景天配方颗粒高效液相色谱图

1. Salidroside

A. Reference solution B. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms of *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* formula granules

保留时间基本稳定,表明色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

2.3.4 共有峰确定

6批红景天小试、中试配方颗粒样品共检出10个共有峰,其中与红景天标准汤剂对照图谱相对保留时间一致的5个共有峰均检出;其余5个峰中的4个峰,在部分标准汤剂指纹图谱中也出现过,但因面积较小未计入共有峰,另一峰可能为生产过程中引入,故配方颗粒HPLC对照特征图谱仍保留5个共有峰,与标准汤剂HPLC对照特征图谱基本一致,5个共有峰的相对保留时间均在规定值的±5%以内,说明小试、中试工艺基本可行,制成的配方颗粒与传统汤剂的主要化学成分基本一致。详见图4、图5及表1。

3 讨论

红景天为藏医临床常用药材,主产于西藏、四川、云南、青海等地的高寒地区^[7],最早收载于藏医药著作《四部医典》。1977年版《中国药典(一部)》开始收录红景天,其后4版中均仅收载在一部附录,从2005年版起明确基源为大花红景天,收入一部正文^[8]。现代药理学研究表明,红景天具有抗炎、抗氧化、抗疲劳、抗缺氧、抑癌作用^[9],为防治高原缺氧的良药,近年来,有研究报道其还能较好地干预治疗阿尔茨海默病^[10-11]。

15批标准汤剂特征图谱可反映出不同饮片之间的差异,最终选定的5个特征峰均为共有峰,且峰面积均大于总峰面积的5%,共有峰总面积超过90%,一定程度

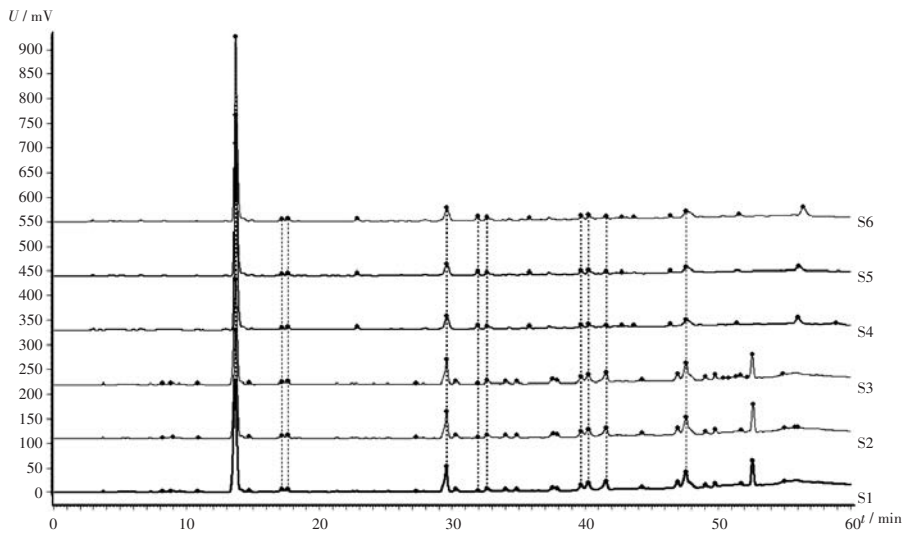


图4 红景天配方颗粒高效液相色谱叠加特征图谱

Fig. 4 HPLC superimposed characteristic chromatograms of 15 batches of *Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma* formula granules

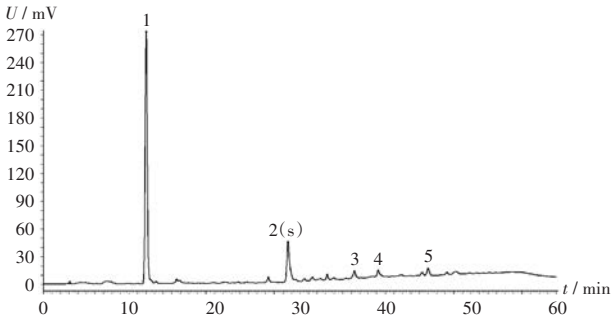


图5 红景天配方颗粒高效液相色谱对照特征图谱

Fig. 5 HPLC reference characteristic chromatograms of *Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma* formula granules

表1 6批配方颗粒样品高效液相色谱共有峰的相对保留时间

Tab.1 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of six batches of formula granule samples

编号	1	2(s)	3	4	5
S1	0.43	1	1.28	1.37	1.60
S2	0.43	1	1.28	1.38	1.60
S3	0.42	1	1.28	1.37	1.61
S4	0.43	1	1.28	1.37	1.59
S5	0.43	1	1.28	1.37	1.60
S6	0.43	1	1.28	1.37	1.60
R	0.43	1	1.28	1.37	1.59
RSD(%)	0	0	0	0	0.01

上保证了共有峰的稳定性。由于特征图谱主要用于定性,受原药材批次和生产工艺的影响,不同批次的配方颗粒5个共有峰峰面积有一定偏差,故暂未将相对峰面积纳入评价体系。另外考察了红景天标准汤剂和配方颗粒的专属性,以辅料麦芽糊精为阴性样品,无明显色谱峰,表明阴性对照无干扰。

综上所述,本研究规范了红景天标准汤剂的制备

工艺,并建立了其HPLC特征图谱,该方法可更有效控制红景天药材、饮片以及配方颗粒的内在质量,也可通过对比标准汤剂与配方颗粒特征图谱的一致性来评价、控制红景天配方颗粒的生产工艺,以保障与临床传统汤剂药效的一致性。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 161-162.

[2] 周凡. 红景天属植物化学成分研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(7): 108-110.

[3] 图荪古丽·托合提, 万传星. 红景天根茎化学成分的分离与结构鉴定[J]. 塔里木大学学报, 2018, 30(3): 33-38.

[4] 屈坤玥, 魏小东, 赛曼, 等. 大花红景天化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42(12): 3199-3203.

[5] 陈士林. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.

[6] 徐智玮, 宋霞, 李永鹏, 等. 红景天特征图谱的建立及不同品系之间差异的研究[J]. 中国现代中药, 2021, 23(9): 1568-1573.

[7] 吕秀梅. 藏药红景天及其常用近缘品种研究进展[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1698-1701.

[8] 谷燕莉, 陈玉婷. 药用红景天初考——兼与《中国药典》商榷[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 929-930.

[9] 胡樱, 甘禹鑫, 贾慧萍, 等. 红景天化学成分及药理活性研究进展[J]. 青海草业, 2021, 30(2): 53-56.

[10] 何黎黎, 顾健, 林芸竹. 红景天抗氧化作用对阿尔茨海默病干预机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(2): 440-443.

[11] 吴涛, 石镜明, 孙正启. 藏药红景天抗氧化作用在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(7): 65-68.

(收稿日期: 2022-03-29; 修回日期: 2022-11-11)