

## HPLC-DAD 法测定不同产地红景天中 6 个黄酮类成分

张杰<sup>1</sup>, 金诗雪<sup>2</sup>, 耿冰<sup>3</sup>, 李鸿钰<sup>4</sup>, 曾铖<sup>1</sup>, 徐丽丽<sup>1</sup>, 顾大全<sup>1</sup>, 李佑<sup>1</sup>, 顾正兵<sup>1\*</sup>

1. 江苏永健医药科技有限公司, 江苏 泰州 225300

2. 南阳市第一中学, 河南 南阳 473000

3. 中国医药城医药研发公共平台, 江苏 泰州 225300

4. 湖南省宁乡县人民医院普外科 22 病室, 湖南 宁乡 410600

**摘要:** 目的 建立同时测定红景天中 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚、大花红景天素的方法, 比较不同产地红景天中 6 个成分的差异。方法 采用 HPLC-DAD 法, Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 382 nm, 柱温为 35 °C。结果 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚、大花红景天素进样量分别在 0.015 08~0.301 6、0.123 2~2.464、0.109 5~2.190 8、0.007 8~0.156、0.021 46~0.429 2、0.006 48~0.129 6 μg 与色谱峰面积呈良好的线性关系; 加样回收率在 98.17%~100.52%, RSD 在 1.64%~1.98%。结论 该方法简单准确, 为红景天的全面质量控制提供了参考。

**关键词:** HPLC-DAD; 红景天; ternatumoside II; 红景天欧素; 红景天宁; 草质素; 山柰酚; 大花红景天素; 质量控制

**中图分类号:** R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)23-4253-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.023

## Determination of six flavonoids in *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* by HPLC-DAD

ZHANG Jie<sup>1</sup>, JIN Shi-xue<sup>2</sup>, GENG Bing<sup>3</sup>, LI Hong-yu<sup>4</sup>, ZENG Cheng<sup>1</sup>, XU Li-li<sup>1</sup>, GU Da-quan<sup>1</sup>, LI You<sup>1</sup>, GU Zheng-bing<sup>1</sup>

1. Jiangsu Yongjian Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Taizhou 225300, China

2. No. 1 Middle School of Nanyang, Nanyang 473000, China

3. Medical R&D Public Platform of China Medical City, Taizhou 225300, China

4. Department of General Surgery, People's Hospital of Ningxiang County, Ningxiang 410600, China

**Abstract: Objective** To establish a determination method for the contents of ternatumoside II, rhodiosin, rhodionin, herbacetin, kaempferol, and rhodiolin in *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* and to compare the content differences of the six flavonoid compounds in *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* from different sources. **Methods** Using HPLC-DAD method and Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile and water as mobile phase, gradient elution at flow rate of 1.0 mL/min and column temperature of 35 °C. The detection wavelength was 382 nm. **Results** Ternatumoside II, rhodiosin, rhodionin, herbacetin, kaempferol, and rhodiolin had good linearity in the ranges of 0.015 08—0.301 6, 0.123 2—2.464, 0.109 5—2.190 8, 0.007 8—0.156, 0.021 46—0.429 2, and 0.006 48—0.129 6 μg, respectively. The average recoveries of the six constituents were 98.17%—100.52% and RSD values were 1.64%—1.98%. **Conclusion** The method is simple and accurate. It provides the reference for comprehensive quality control of *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma*.

**Key words:** HPLC-DAD; *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma*; ternatumoside II; rhodiosin; rhodionin; herbacetin; kaempferol; rhodiolin; quality control

红景天 *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* 系蔷薇目景天科(Crassulaceae)红景天属 *Rhodiola* L. 多年生草本或亚灌木植物, 被誉为“高原人参”, 全世界的红景天属植物有 90 多种, 我国有 73 种, 众多种类的红景天中的主要成分为苯烷基苷类和黄酮

类成分<sup>[1-6]</sup>。将大花红景天列入《中国药典》2015 年版品种, 而国内诸多品种的红景天都被列入药用范围内, 如具有国家食品药品监督总局批准文号的关于红景天的制剂有高山红景天口服液(品种为高山红景天 *Rhodiola rosea* L.)、复方蔷薇红景天口服

收稿日期: 2016-06-19

作者简介: 张杰(1987—), 男, 硕士, 研究方向为中药分析和天然药物化学。Tel: 15116327288 E-mail: 13478536926@163.com

\*通信作者 顾正兵, 博士, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0523)80183620 E-mail: zbg@youging.com

液(品种为蔷薇红景天 *Rhodiola rosea* L.) 狭叶红景天片[品种为狭叶红景天 *Rhodiola lilifolia* (Regel) Maxim.]和大株红景天片[品种为大株红景天 *Rhodiola wallichiana* (Hook.) S. H. Fu] 等,因此有必要对不同品种的红景天的成分进行分析研究。目前,对于红景天的质控指标主要集中在苯烷基苷类,如红景天苷、大花红景天素等,《中国药典》2015 年版将红景天苷作为大花红景天的指标性成分,未对黄酮类成分作限定要求<sup>[7-11]</sup>。研究表明,红景天中还有另外一类很重要的有效成分即黄酮类成分,主要为草质素及其苷类、山柰酚及其苷类及大花红景天素等,其中仅有 1 篇文献报道从红景天中分离得到山柰酚-3-*O*- $\alpha$ -L-鼠李糖(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖苷(ternatumoside II),红景天中黄酮类成分具有抗氧化、抗缺氧、抗补体和抗肿瘤等作用<sup>[12-14]</sup>。Ternatumoside II、草质素、红景天欧素[草质素-7-*O*-(3''- $\beta$ -D-葡萄糖基)- $\alpha$ -L-鼠李糖苷]、红景天宁(草质素-7-*O*- $\alpha$ -L-鼠李糖苷)和大花红景天素均为红景天中特征性成分,专属性强,其中大花红景天素是一种天然产物中很少存在的黄酮醇与苯丙素结合而成的化合物(大花红景天素与大花红景天素为不同类化合物)。故本实验以草质素、红景天欧素、红景天宁、大花红景天素、山柰酚和 ternatumoside II 为指标,建立了同时测定上述 6 个黄酮类成分的方法,涵盖了红景天药材中绝大部分黄酮类成分,首次对红景天中的 ternatumoside II、红景天欧素、草质素和大花红景天素 4 个成分进行了测定,为红景天的质量控制及深入开发利用提供参考。

### 1 仪器与试剂

Waters 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);sartorius CP225D 十万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);ternatumoside II(批号 20141212)、红景天欧素(批号 20141216)、红景天宁(批号 20141213)、草质素(批号 20150119)、山柰酚(批号 20140915)、大花红景天素(批号 20150120)均为江苏永健医药科技有限公司自制,质量分数均大于 98%,乙腈(色谱纯);水为纯化水,其余均为分析纯。红景天 *Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma* 经嘉兴学院医学院王峻副教授鉴定为玫瑰红景天 *Rhodiola rosea* L.、大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu、高山红景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.、蔷薇红景天 *Rhodiola rosea* L. (表 1)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,0~10 min, 8% A; 10~25 min, 31% A; 25~35 min, 45% A; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35  $^{\circ}$ C; 检测波长为 382 nm。色谱图见图 1。

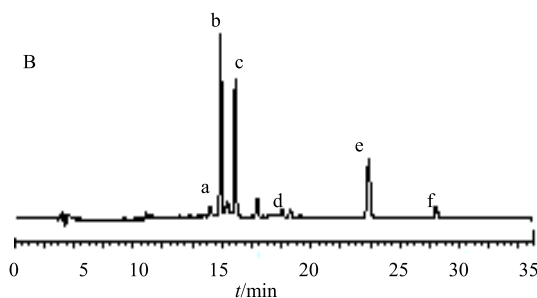
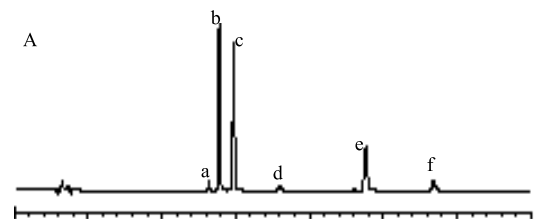
### 2.2 对照品溶液的制备

取 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素对照品适量,精密称定,加甲醇制成含 ternatumoside II 15.08  $\mu$ g/mL、红景天欧素 123.20  $\mu$ g/mL、红景天宁 109.54  $\mu$ g/mL、

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

样品	来源	品种
1	亳州药材市场	玫瑰红景天
2	西藏林芝地区八一永久村	大花红景天
3	广西玉林药材市场	大花红景天(带皮)
4	广西玉林药材市场	大花红景天(不带皮)
5	西藏-1	大花红景天
6	西藏-2	大花红景天
7	西藏-3	大花红景天
8	吉林长白山	高山红景天
9	中国食品药品检定研究院	大花红景天
10	中国食品药品检定研究院	高山红景天
11	云南后山地区	蔷薇红景天



a-ternatumoside II b-红景天欧素 c-红景天宁 d-草质素 e-山柰酚 f-大花红景天素  
a-ternatumoside II b-rhodosin c-rhodiolin d-herbacetin e-kaempferol f-rhodiolin

图 1 混合对照品 (A) 和红景天药材 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and *Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma* (B)

草质素 7.80 μg/mL、山柰酚 21.46 μg/mL 和大花红景天素 6.48 μg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

红景天药材约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入 80%乙醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1.5 h, 放至室温, 再称定质量, 用 80%乙醇补足失质

量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 2。

表 2 化合物的标准曲线方程、相关系数和线性范围

Table 2 Regressive equations, correlation coefficients, and linear ranges of investigated compounds

成分	回归方程	r	线性范围/μg
ternatumoside II	$Y=400.62 X+45.09$	0.999 8	0.015 08~0.301 60
红景天欧素	$Y=998.75 X-7.31$	0.999 9	0.123 20~2.464 00
红景天宁	$Y=808.21 X-17.263$	0.999 8	0.109 50~2.190 80
草质素	$Y=399.11 X+12.82$	0.999 8	0.007 80~0.156 00
山柰酚	$Y=2 621.1 X+20.60$	0.999 9	0.021 46~0.429 20
大花红景天素	$Y=1 900.8 X+54.81$	0.999 8	0.006 48~0.129 60

### 2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 在“2.1”色谱条件下连续进样 6 次, 测得 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素峰面积的 RSD 分别为 1.06%、0.60%、0.62%、1.21%、0.92%、1.16%。表明仪器的精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 在室温下放置, 于 0、2、4、6、8、10、12 h 分别进样, 测得 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素峰面积的 RSD 分别为 1.13%、0.82%、0.97%、1.31%、0.79%、1.19%。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

取 6 份 1 号样品粉末, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 测定 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素的量, 计算 RSD 分别为 1.21%、0.84%、0.76%、1.46%、1.07%、1.32%, 表明重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

称取已测定的 1 号样品粉末 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 加入“2.2”项下混合对照品溶液 5.0 mL, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件进样测定, 计算 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素的平均回收率分别为 98.93%、100.52%、100.24%、

98.17%、99.8%、99.4%, RSD 分别为 1.82%、1.64%、1.71%、1.96%、1.77%、1.98%。

### 2.9 样品测定

取不同来源红景天药材粉末约 1 g, 精密称定。按“2.3”项的方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算样品中的 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素的质量分数, 结果见表 3。

由表 3 可知, 同一药材中, 除 3 号样品外, 红景天欧素量均高于其他 5 个被测成分, 不同品种、不同产地的红景天各被测成分的量差异甚大。6 号和 9 号样品均为同一品种即大花红景天, 但是产地为西藏的 6 号样品各被测成分的量均显著高于中国食品药品检定研究院提供的大花红景天的量, 同时也是 11 个样品中量最高的; 另一方面, 2、5、6 和 7 号样品品种和产地均相同, 但各成分的量差异很大。此外, 在本实验的 6 个被测成分中, 9 和 10 号样品同为中国食品药品检定研究院提供的药材, 高山红景天被测成分的量明显低于大花红景天, 这可能为比较不同品种红景天药理作用提供一定的物质基础。

## 3 讨论

在提取方式上比较了超声和回流提取, 选择提取效率高的加热回流; 提取溶剂比较了甲醇和乙醇, 选择提取率高的 80%乙醇。流动相比较了甲醇-水和乙腈-水, 综合分离效果、峰形及洗脱时间, 最终选择乙腈-水梯度洗脱。

在确定检测波长时, 利用 DAD 检测器对上述 6

表 3 红景天药材中 6 个黄酮类成分的测定结果

Table 3 Determination of six flavonoid constituents in *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma*

样品	ternatumoside II/%	红景天欧素/%	红景天宁/%	草质素/%	山柰酚/%	大花红景天素/%
1	0.018	0.120	0.110	0.007	0.028	0.008
2	0.015	0.133	0.090	0.004	0.046	0.007
3	0.028	0.220	0.240	0.010	0.034	0.023
4	0.014	0.071	0.068	0.006	0.033	0.003
5	0.037	0.200	0.160	0.012	0.036	0.010
6	0.036	0.470	0.330	0.060	0.025	0.040
7	0.009	0.068	0.053	0.007	0.011	0.011
8	0.012	0.067	0.028	0.002	0.011	0.006
9	0.027	0.250	0.190	0.022	0.008	0.011
10	0.012	0.088	0.037	0.004	0.011	0.010
11	0.005	0.100	0.100	0.004	0.013	0.011

个成分的在线光谱吸收图进行比对分析, 红景天欧素、红景天宁、草质素和大花红景天素在 382 nm 处均有最大吸收, ternatumoside II 和山柰酚在 364 nm 处有最大吸收, 另一方面当波长为 382 nm 时基线比较平稳且干扰峰较少, 故综合选定 382 nm 为检测波长。

红景天作为传统的常用补益类中药, 是近年研究开发热点之一, 但红景天种类繁多, 化学成分差异较大, 对药材质控有待全面地完善, 本实验选择红景天中研究相对较少的 ternatumoside II、红景天欧素、红景天宁、草质素、山柰酚和大花红景天素共 6 个黄酮类成分作为指标, 对不同来源及不同种类的红景天药材中上述成分进行了定量研究, 专属性和特征性强, 基本涵盖了红景天中的黄酮类成分, 其中 ternatumoside II、红景天欧素、草质素和大花红景天素 4 个成分为首次测定, 特别是对天然产物中罕见的黄酮醇与苯丙素结合而成的大花红景天素进行了比较, 结果表明不同来源及不同品种的红景天各成分差异显著, 为了全面控制红景天药材, 将黄酮类成分纳入质量标准进行综合性评价意义甚远。

#### 参考文献

- [1] 罗晓. 大花红景天的标准化研究 [D]. 开封: 河南大学, 2006.
- [2] 宋月英, 韩慧文, 郝素云. 红景天研究进展 [J]. 武警医学院学报, 2003, 13(1): 66-68.
- [3] 李伟, 黄勤妮. 红景天属植物的研究及应用 [J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2003, 24(1): 55-58.
- [4] 俞文胜, 陈新民, 杨磊. 大花红景天多元酚类化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1992, 4(2): 23-28.
- [5] 周凌云, 张祥华, 陈昌祥. 丽江产大花红景天的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 410-415.
- [6] Fan W, Tezuka Y, Ni K M, et al. Prolylendopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola saccharinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(4): 396-401.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 伍小燕, 张桥, 杨素德, 等. HPLC-ELSD 法测定红景天中红景天苷及大花红景天素 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1157-1159.
- [9] 杨智海, 罗定强, 杨瑞瑞, 等. 小丛红景天中总黄酮及其 4 种黄酮类成分分析 [J]. 中药材, 2011, 34(1): 74-76.
- [10] 章娟. 大花红景天质量控制和相关成分药代动力学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [11] 李青, 宋志前, 曾林燕. 大花红景天中草质素苷含量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 114-115.
- [12] Zhou J T, Li C Y, Wang C H, et al. Phenolic compounds from the roots of *Rhodiola crenulata* and their antioxidant and inducing IFN- $\gamma$  production activities [J]. *Molecules*, 2015, 20(8): 13725-13739.
- [13] 倪付勇. 高山红景天抗补体活性成分研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [14] 乔燕. 草质素体外抗氧化活性及对人肝癌细胞 HepG2 凋亡的分子机制研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013.