

RP-HPLC-DAD 同时测定复方石韦胶囊中 4 个黄酮成分的含量^{*}杨志欣, 王祺茹, 李霞, 单柏松, 刘佳佳, 王海威, 王艳宏^{**}

(黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC-DAD 方法, 同时测定复方石韦胶囊中苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄腐醇、三叶豆紫檀苷 4 个黄酮含量。**方法:** 采用 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 300 nm。**结果:** 苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄腐醇、三叶豆紫檀苷线性范围分别为 0.34~6.84 μg ($r = 0.999\ 3$)、0.16~3.27 μg ($r = 0.999\ 5$)、0.04~0.85 μg ($r = 0.999\ 1$)、0.19~3.70 μg ($r = 0.999\ 8$); 精密度、重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 在室温条件下供试溶液 12 h 内稳定; 平均加样回收率 ($n=6$) 在 99.2%~101.5% ($RSD \leq 2.2\%$)。3 批样品中上述 4 个成分平均含量依次为 94.84~98.85、44.73~47.79、11.16~13.26、54.17~58.74 μg · 粒⁻¹。**结论:** 所建立的分析方法可用于复方石韦胶囊中 4 个黄酮成分的含量测定。

关键词: 复方石韦胶囊; 苦参酮; 槐属二氢黄酮 G; 异黄腐醇; 三叶豆紫檀苷; 黄酮类成分; 高效液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)03-0427-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.09

Simultaneous determination of four flavonoids in Fufang Shiwei capsules by RP-HPLC-DAD^{*}

YANG Zhi-xin, WANG Qi-ru, LI Xia, SHAN Bai-song, LIU Jia-jia,

WANG Hai-wei, WANG Yan-hong^{**}

(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract Objective: To establish a method for simultaneous determination of four flavonoids in Fufang Shiwei capsules. **Methods:** Analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using methanol-water as mobile phase at the flow rate of 1 mL · min⁻¹ for gradient elution and the detection wavelength was 300 nm. **Results:** The calibration curves of the four analytes exhibited good linearity over the range of 0.34~6.84 μg ($r = 0.999\ 3$) for kurarinone, 0.16~3.27 μg ($r = 0.999\ 5$) for sophoraflavanone G, 0.04~0.85 μg ($r = 0.999\ 1$) for isoxanthohumol, and 0.19~3.70 μg ($r = 0.999\ 8$) for trifolirhizin. The precision and the repeatability were good with RSD value less than 2.0%. The sample solution was stable in 12 h at room temperature. The average

^{*} 黑龙江省自然科学基金 (H2016057); 国家教育部春晖计划 (Z2008-1-15016); 黑龙江省教育厅骨干教师基金 (No.1251 G058); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (2012)

^{**} 通信作者 Tel:13204516819; E-mail: wang.yanhong@163.com

第一作者 Tel:13384662573; E-mail: zhixin.y@163.com

recoveries ($n=6$) ranged from 99.21% to 101.54% ($RSD \leq 2.19\%$). The average contents of 3 batches of samples were 94.84–98.85 μg per capsule for kurarinone, 44.73–47.79 μg per capsule for sophoraflavanone G, 11.16–13.26 μg per capsule for isoxanthohumol and 54.17–58.74 μg per capsule for trifolirhizin, respectively. **Conclusion:** The method is suitable for simultaneous determination of four flavonoids in Fufang Shiwei Capsules.

Keywords: Fufang Shiwei capsules; kurarinone; sophoraflavanone G; isoxanthohumol; trifolirhizin; flavonoids; HPLC

复方石韦制剂其方源自清·李用粹的《证治汇补》中的石韦散,经化裁以石韦、黄芪、苦参、篇蓄组方,临床上用于小便不利、尿频、尿急、尿痛及下肢水肿等淋症^[1-2],其片剂形式收载于2010年版、2015年版中国药典一部中。按照药典^[3-4]要求,仅采用RP-HPLC测定苦参碱、黄芪甲苷的含量。现有的研究尚有针对苦参碱、氧化苦参碱等生物碱^[1,5-7]、绿原酸、香草酸等有机酸类成分^[7-8]进行测定的报道。然而,随着化学成分及药理活性研究的深入,黄酮类化学成分越来越不容忽视^[9-11]。复方石韦制剂中亦含有较大量黄酮^[12-15],其中苦参酮、槐属二氢黄酮G、异黄腐醇以及三叶豆紫檀苷等均具有显著的杀虫、抗菌^[16-22]作用,这对于淋症的治疗有重要意义。然而,至今仅有针对芦丁进行含量测定的报道^[7]。鉴于此,本文建立了同时测定复方石韦胶囊中苦参酮、槐属二氢黄酮G、异黄腐醇以及三叶豆紫檀苷含量的HPLC方法,该内容国内外未见相关报道。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695–2996 型高效液相色谱仪(Waters公司); Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm ; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶;北京迪马科技有限公司); Milli-Q 纯水机(Millipore公司); FA2004 万分之一分析电子天平(上海良平仪器仪表有限公司); SB-5200D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

复方石韦胶囊(陕西东泰制药有限公司,批号20150706、20150918、20151204,规格为0.5 g·粒⁻¹); 苦参酮、槐属二氢黄酮G、异黄腐醇、三叶豆紫檀苷的对照品均为实验室自制,采用乙酸乙酯提取苦参干燥根,提取物经正相硅胶柱层析、ODS反相柱层析分离纯化,经UV、IR、MS及NMR鉴定结构,HPLC检测面积归一化法计算纯度均大于

98%; 甲醇为色谱纯,水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇(A)–水(B)为流动相,梯度洗脱(0~14 min, 12%A → 30%A; 14~24 min, 30%A → 45%A; 24~44 min, 45%A → 65%A; 44~54 min, 65%A; 54~59 min, 65%A → 70%A; 59~69 min, 70%A; 69~75 min, 70%A → 75%A; 75~90 min, 75%A → 90%A),流速1 mL·min⁻¹,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长300 nm,进样量20 μL 。

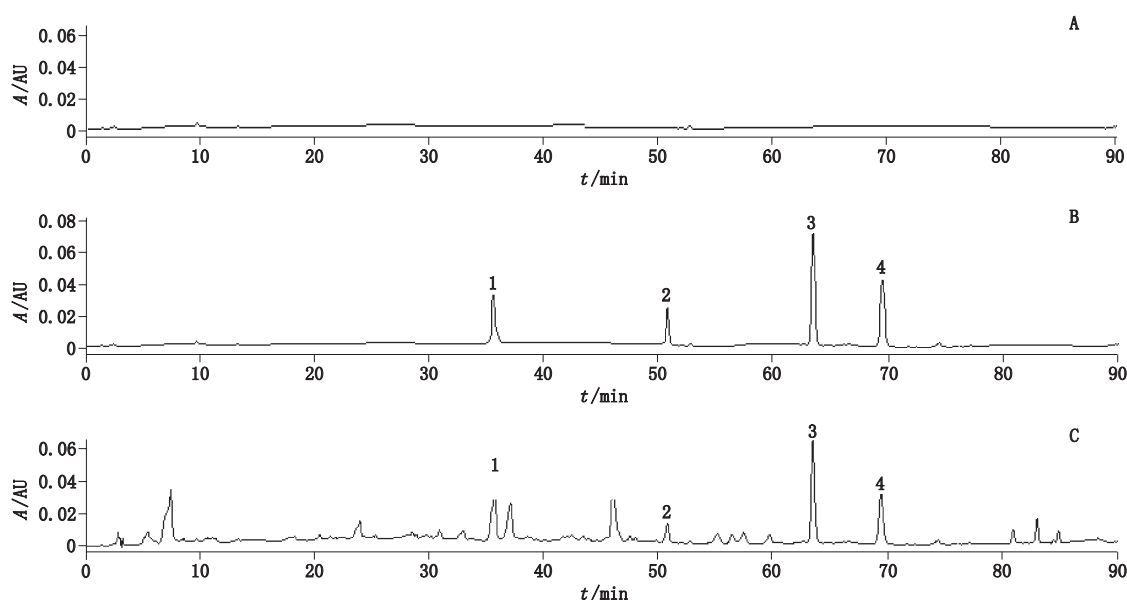
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品储备液 分别取苦参酮、槐属二氢黄酮G、异黄腐醇和三叶豆紫檀苷的对照品适量,精密称定,用甲醇制成每1 mL分别含苦参酮0.342 mg、槐属二氢黄酮G 0.1635 mg、异黄腐醇0.0425 mg及三叶豆紫檀苷0.185 mg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品10粒,除去胶囊壳,内容物混匀,精密称定,研细;取粉末适量(约3.5 g),精密称定,加入乙酸乙酯140 mL,称量,超声(功率300 W,频率25 kHz)处理30 min,放冷,再称量,用乙酸乙酯补足减失的量,摇匀,滤过,以40 mL乙酸乙酯分2次洗涤残渣,过滤,合并滤液,回收溶剂至干,残渣加甲醇约3 mL使溶解,并转移至5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 空白试验 按“2.1”项下色谱条件,分别将空白溶剂(甲醇)、混合对照品储备液及供试品溶液各20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见图1。三叶豆紫檀苷、异黄腐醇、苦参酮和槐属二氢黄酮G的保留时间分别为35.75、50.82、63.48和69.44 min,且溶剂对样品含量测定无干扰。



1. 三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin) 2. 异黄酮醇 (isoxanthohumol) 3. 苦参酮 (kurarinone) 4. 槐属二氢黄酮 G (sophoraflavanone G)

图1 空白溶剂 (A)、混合对照品 (B) 及复方石韦胶囊 (C) HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of solvent blank (A), mixed reference substances (B) and Fufang Shiwei Capsules (C)

2.3.2 线性关系考察 精密吸取按“2.2.1”项下方法制备的混合对照品储备液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液。分

别吸取上述系列混合对照品溶液各 20 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以峰面积 (Y) 对进样质量 (X) 进行线性回归, 得回归方程, 结果见表 1。

表 1 回归方程和线性关系

Tab.1 Regression equations and linear correlation

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/ μ g
苦参酮 (kurarinone)	$Y=0.50 \times 10^6 X + 1.43 \times 10^5$	0.999 3	0.34~6.84
槐属二氢黄酮 G (sophoraflavanone G)	$Y=1.46 \times 10^6 X + 1.79 \times 10^5$	0.999 5	0.16~3.27
异黄酮醇 (isoxanthohumol)	$Y=9.05 \times 10^5 X - 4.74 \times 10^4$	0.999 1	0.04~0.85
三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin)	$Y=5.85 \times 10^5 X + 6.06 \times 10^3$	0.999 8	0.19~3.70

2.3.3 精密度试验 取同一供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图及峰面积。结果苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄酮醇和三叶豆紫檀苷峰面积的 RSD 分别为 0.54%、0.97%、1.51% 和 0.69%, 表明精密度符合要求。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、12 h 分别进样 20 μ L, 测定苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄酮醇和三叶豆紫檀苷的峰面积并计算 RSD, 结果分别为 0.68%、0.73%、1.18% 和 0.75%, 表明供试品溶液可在 12 h 内测定而对结果没有影响。

2.3.5 重复性试验 取同一批复方石韦制剂, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”

项下条件进样测定各成分的峰面积, 计算苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄酮醇和三叶豆紫檀苷平均含量分别为 96.56、47.32、12.11、58.26 μ g $\cdot$ 粒⁻¹, RSD 分别为 1.4%、0.98%、1.6%、1.2%。结果表明本法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的复方石韦胶囊粉末 6 份, 每份约 1.75 g, 精密称定。分别精密加入混合对照品储备液 1.0 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱峰峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 2。4 个成分的平均回收率在 99.2%~101.5% 之间, RSD 在 1.3%~2.2% 之间, 表明回收率符合要求。

表 2 4 个成分的加样回收率实验结果

Tab. 2 Recovery of four components

成分 (components)	样品量 (amount of sample)/g	样品中成分量 (content)/ mg	加入量 (added)/ mg	测得量 (measure)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
苦参酮 (kurarinone)	1.768 6	0.342 9	0.342 0	0.688 9	101.2	100.8	1.4
	1.753 1	0.341 2	0.342 0	0.691 9	102.5		
	7.757 3	0.341 7	0.342 0	0.686 7	100.9		
	1.762 3	0.342 5	0.342 0	0.686 3	100.5		
	1.771 3	0.344 7	0.342 0	0.681 1	98.4		
	1.759 8	0.342 4	0.342 0	0.689 4	101.5		
槐属二氢黄酮 G (sophoraflavanone G)	1.768 6	0.164 8	0.163 5	0.332 4	102.5	101.4	2.2
	1.753 1	0.165 3	0.163 5	0.333 8	103.1		
	7.757 3	0.160 6	0.163 5	0.319 5	97.2		
	1.762 3	0.156 8	0.163 5	0.322 3	101.2		
	1.771 3	0.163 2	0.163 5	0.331 4	102.9		
	1.759 8	0.152 8	0.163 5	0.318 5	101.4		
异黄腐醇 (isoxanthohumol)	1.768 6	0.045 8	0.042 5	0.089 3	102.4	99.2	1.6
	1.753 1	0.044 3	0.042 5	0.086 2	98.6		
	7.757 3	0.042 2	0.042 5	0.083 9	98.1		
	1.762 3	0.040 7	0.042 5	0.082 9	99.3		
	1.771 3	0.042 9	0.042 5	0.084 7	98.4		
	1.759 8	0.043 8	0.042 5	0.085 7	98.6		
三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin)	1.768 6	0.184 9	0.185 0	0.371 6	100.9	101.5	1.3
	1.753 1	0.183 2	0.185 0	0.366 8	99.2		
	7.757 3	0.192 7	0.185 0	0.381 8	102.2		
	1.762 3	0.187 2	0.185 0	0.377 5	102.9		
	1.771 3	0.187 8	0.185 0	0.375 9	101.7		
	1.759 8	0.179 2	0.185 0	0.368 5	102.4		

2.4 样品含量测定

取 3 批复方石韦胶囊样品各 3 份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱

条件进行测定, 记录色谱图及峰面积, 由回归方程计算 4 个成分的含量, 结果见表 3。

表 3 复方石韦胶囊中 4 个黄酮成分的平均含量测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$, $n = 3$)Tab.3 Contents of 4 components in Fufang Shiwei capsules (μg per capsule, $n = 3$)

批号 (lot No.)	苦参酮 (kurarinone)	槐属二氢黄酮 G (sophoraflavanone G)	异黄腐醇 (isoxanthohumol)	三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin)
20150706	97.18 $\pm$ 2.59	47.79 $\pm$ 1.43	13.26 $\pm$ 0.54	58.74 $\pm$ 1.25
20150918	94.89 $\pm$ 2.40	46.38 $\pm$ 1.10	11.16 $\pm$ 0.77	54.17 $\pm$ 1.74
20151204	98.85 $\pm$ 2.08	44.73 $\pm$ 1.64	12.12 $\pm$ 0.49	56.23 $\pm$ 1.29

3 讨论

针对黄酮类成分的提取, 预实验中考察了不同的提取溶剂, 如甲醇、乙醇、80% 甲醇、80% 乙醇水溶液、乙酸乙酯、石油醚; 不同的提取方法, 如回流、超声、渗滤法; 不同的溶剂量, 如 20 倍、30 倍、40 倍、50 倍。结果表明, 以乙酸乙酯为提取溶剂 (40 倍量) 超声 30 min 的效果最佳, 待测成分提取率高、杂质少。

4 个黄酮成分在 200~600 nm 全波长扫描, 分别在 299.3 nm (苦参酮)、296.4 nm (槐属二氢黄酮 G)、291.7 nm (异黄腐醇) 和 309.5 nm (三叶豆紫檀苷) 处有最大吸收波长, 且吸收峰为较对称峰形, 在 300 nm 处 4 个黄酮成分吸收均较强, 因此在本试验条件下测定波长选择 300 nm。流动相分别考察了乙腈-水、甲醇-水梯度洗脱系统, 结果后者即可实现

较好的分离,且可降低成本。

本研究建立了灵敏、准确的 HPLC-DAD 法同时检测复方石韦胶囊中苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄酮醇以及三叶豆紫檀苷 4 种黄酮成分,为提高该制剂的质量控制提供了有价值的参考。

参考文献

- [1] 甘蓉. 复方石韦胶囊质量标准研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(2): 328
GAN R. The study on quality standard of complex prescription capsules of Folium Pyrrosiae[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2011, 38(2): 328
- [2] 李云章. 山庄牌复方石韦片[J]. 中草药, 1997, 28(3): 190
LI YZ. Compound Shiwei tablets villa brand[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1997, 28(3): 190
- [3] 中国药典 2010 年版. 一部[S]. 2010: 907
ChP 2010. Vol I [S]. 2010: 907
- [4] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 1220
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 1220
- [5] 苏静州, 刘明言, 董海荣. HPLC 法测定复方石韦片中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中草药, 2005, 36(3): 383
SU JZ, LIU MY, DONG HR. Content of matrine and oxymatrine in compound Shiwei tablets by HPLC[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2005, 36(3): 383
- [6] 陈亚飞, 田颂九, 孙曾培. 复方石韦片中生物碱的分离测定[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 94
CHEN YF, TIAN SJ, SUN ZP. Separation and determination of alkaloids in compound Shiwei tablets[J]. Chin J Pharm Anal, 2002, 22(2): 94
- [7] 刘晓星, 索志荣, 郑建斌, 等. RP-HPLC 法同时测定复方石韦胶囊中 5 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(12): 1547
LIU XX, SUO ZR, ZHENG JB, et al. RP-HPLC determination of 5 components in Fufang Shiwei capsules[J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(12): 1547
- [8] 刘丽欣, 王岳. HPLC 法测定复方石韦片中绿原酸的含量[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 26(9): 4130
LIU LX, WANG Y. HPLC determination of chlorogenic acid in compound Shiwei tablets[J]. Mod J Integr Tradit Chin Wes Med, 2008, 26(9): 4130
- [9] 赵雪巍, 刘培玉, 刘丹, 等. 黄酮类化合物的构效关系研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(21): 3264
ZHAO XW, LIU PY, LIU D, et al. Research progress in structure-activity relationship of flavonoids[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(21): 3264
- [10] 范红艳, 任旷, 王艳春, 等. 苦参总黄酮对醋酸铅诱导雄性小鼠睾丸损伤的影响[J]. 中药材, 2014, 37(12): 2279
FAN HY, REN K, WANG YC, et al. Effects of total flavonoids from sophora flavescens on the testicular damage induced by lead acetate in male mice[J]. J Chin Med Mater, 2014, 37(12): 2279
- [11] 杨进华, 刘红星, 黄初升, 等. 异戊烯基黄酮化合物的研究进展[J]. 化工技术与开发, 2015, 44(3): 14
YANG JH, LIU HX, HUANG CS, et al. Research advances of prenyl flavones[J]. Technol Dev Chem Ind, 2015, 44(3): 14
- [12] 赵慧娟, 孙文基. 苦参中黄酮类化合物的化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(3): 247
ZHAO HJ, SUN WJ. Research progress in the chemical constituents and pharmacological activities of flavonoids from Sophorae Flavescentis Radix[J]. J Chin Med Mater, 2005, 28(3): 247
- [13] 袁春玲, 郭伟英. 超声循环法提取扁蓄总黄酮[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1336
YUAN CL, GUO WY. Ultrasonic and circulated extraction of total flavones from polygonum aviculare[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2006, 37(9): 1336
- [14] 辛博, 马生军, 谢景, 等. 生长年限对黄芪药材中黄酮及皂苷类成分含量积累的影响[J]. 中药材, 2015, 38(7): 1366
XIN B, MA SJ, XIE J, et al. Influence of different growing years on accumulation of flavonoids and saponins in Astragali Radix[J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(7): 1366
- [15] 周超, 何轶, 鲁静, 等. 黄芪异黄酮对照提取物的制备及其在黄芪药材含量测定中的应用[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 523
ZHOU C, HE Y, LU J, et al. Studies on the preparation of isoflavones reference extract and application on the assay of Astragalus Radix[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(3): 523
- [16] CHA JD, MOON SE, KIM JY, et al. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Phytother Res, 2009, 23(9): 1326
- [17] KIM CS, PARK SN, AHH SJ, et al. Antimicrobial effect of sophoraflavanone G isolated from *Sophora flavescens* against *Mutans streptococci*[J]. Anaerobe, 2013, 19: 17
- [18] CHA JD, JEONG MR, JEONG SI, et al. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*[J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(5): 858
- [19] TSUCHIYA H, LINUMA M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*[J]. Phytomedicine, 2000, 7(2): 161
- [20] KUROYANAGI M, ARAKAWA T, HIRAYAMA Y, et al. Antibacterial and antian drogen flavonoids from *Sophora flavescens*[J]. Nat Prod, 1999, 62(12): 1595
- [21] SOHN HY, SON KH, KWON GS, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait. and *Echinosophora koreensis* Nakai[J]. Phytomedicine, 2004, 11(7-8): 666
- [22] 郑永权, 姚建仁, 邵向东. 苦参杀虫抑菌活性成分研究[J]. 农药学报, 1999, 1(3): 91
ZHENG YQ, YAO JR, SHAO XD. Study on bioactive compounds from *Sophora flavescens* Ait. [J]. Chin J Pest Sci, 1999, 1(3): 91

(本文于 2016 年 3 月 24 日收到)