

染料木素阴道片质量控制研究

孟庆杰,潘五九,王伟明*,刘姗姗,付磊,薛岩
(黑龙江省中医研究院中药所,哈尔滨 150036)

[摘要] **目的:**建立染料木素阴道片的质量控制方法。**方法:**采用《中国药典》pH 测定法测定染料木素阴道片的 pH,采用薄层色谱法对染料木素进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定染料木素阴道片中染料木素的含量。**结果:**薄层色谱斑点清晰,分离度良好,专属性强;染料木素在 0.201 2~1.006 0 μg ($r=0.999\ 9$) 线性关系良好,平均回收率为 97.72%,RSD 1.65% ($n=6$),且不同批次染料木素阴道片的 pH 及其染料木素的含量无明显差异。**结论:**所建立方法简便准确,重复性好,适用于染料木素阴道片的质量控制。

[关键词] 染料木素;阴道片;质量控制;pH;薄层色谱;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0132-04

[doi] 10.11653/syfy2013230132

Study on Quality Control of Genistein Vaginal Tablets

MENG Qing-jie, PAN Wu-jiu, WANG Wei-ming*, LIU Shan-shan, FU Lei, XUE Yan
(Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of
Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for the quality control of genistein vaginal tablets. **Method:** The Chinese Pharmacopoeia pH determination method was used for determination pH of genistein vaginal tablets. Genistein in genistein vaginal tablets was identified by TLC. The content of genistein in genistein vaginal tablets was determined by HPLC. **Result:** TLC spots were clear with high resolution and strong specialization. Genistein presented a good linear correlation in the range of 0.201 2-1.006 0 μg ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 97.72% with RSD of 1.65% ($n=6$). The pH and the content of genistein in genistein vaginal tablets in different batches had no significant differences. **Conclusion:** The developed method was simple, accurate and repeatable. It can be used for the quality control of genistein vaginal tablets.

[Key words] genistein; vaginal tablets; quality control; pH; TLC; HPLC

染料木素 genistein 属于异黄酮类化合物,其化学名为 5,7,4'-三羟基异黄酮,是一种典型的植物雌激素,对心血管疾病、骨质疏松症、肿瘤、妇女绝经期综合症等具有很好的预防和治疗作用^[1-4]。但其口服生物利用度极低,限制了其临床应用^[5-7],因此本

实验室通过筛选、优化处方制备了染料木素阴道片剂。为有效控制药品质量,保证临床疗效,本研究采用 TLC 对染料木素进行定性鉴别;采用 HPLC 对染料木素进行定量测定,并对其 pH 进行考察,为该制剂建立完善的质量控制方法提供依据。

1 材料

岛津 LC-2010 型高效液相色谱仪(包括岛津 SPD-10AVvp 检测器,LCsolution 工作站,LC-10ADvp 泵),Sartorius BSA224S-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),KQ-300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,300 W,40 kHz),HWS26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

[收稿日期] 20120927(003)

[第一作者] 孟庆杰,硕士,助理研究员,从事中药新药工艺与质量标准研究, Tel: 0451-55665478, E-mail: mengqingjie6646499@163.com

[通讯作者] *王伟明,博士,研究员,硕士生导师,博士后带教合作导师,中药剂型改革重点学科带头人, Tel: 0451-55665478, E-mail: zyyjy@163.com

染料木素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111704-200501),染料木素阴道片剂为本实验室自制(批号 20111201,20111202,20111203),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 pH 测定

2.1.1 水用量的选择 取本品 3 片(批号 20111201),分别加纯化水 20,30,50 mL,37 °C 水浴使溶解,放冷,制成混悬液,照 pH 测定法^[8]测定其 pH,直至供试品溶液 pH 的读数在 1 min 内改变不超过 ± 0.05 止。结果显示,染料木素阴道片的 pH 分别为 5.29,5.24,5.31,即在本实验考察范围内,加水量并未对该制剂的 pH 产生影响,故确定加水量为 50 mL。

2.1.2 样品 pH 测定 取本品 3 批(批号 20111201,20111202,20111203),各 3 片,按上述方法制备供试品溶液并测定,结果表明,不同批次样品的 pH 之间无明显差异(pH 平均值分别为 5.28,5.24,5.32)。

2.2 TLC 鉴别 取本品 1 片,研细,置具塞锥形瓶中,精密加无水乙醇 25 mL,置水浴上加热使熔化,放冷,过滤,量取滤液 1 mL 置 5 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取染料木素对照品,加无水乙醇制成每 1 mL 含 1.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。再按处方制备缺染料木素的阴道片,按照供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 1 μL ,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-冰乙酸(6:2.5:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照色谱中无此斑点。

2.3 染料木素含量测定

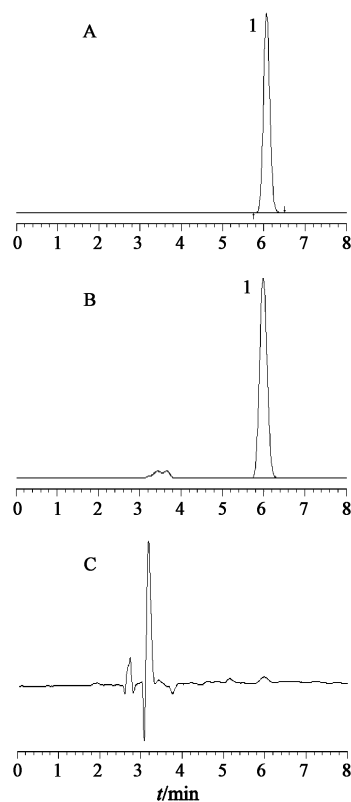
2.3.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),流动相 甲醇-0.05% 磷酸水(70:30),流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 262 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL 。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的染料木素对照品 10.06 mg,置 50 mL 量瓶中,加适量甲醇超声使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,即得 201.2 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品储备液,精密量取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得 40.24 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取染料木素阴道片剂样品 5 粒,研细,精密称取 0.5 g,置 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用无水乙醇补足减失的质量,摇匀(如有沉淀,滤过,取续滤液),精密量取 1 mL 置 25 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例制备不含染料木素的阴性对照片剂,按 2.3.3 项下方法制备阴性对照溶液。

2.3.5 方法专属性实验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪中,按 2.3.1 项下测定,可见供试品和对照品溶液在 6 min 左右出现染料木素特征吸收峰,而阴性对照色谱图中在与对照品保留时间相同处未见色谱峰出现,表明辅料无干扰,该法专属性较强。色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 染料木素

图 1 染料木素阴道片剂 HPLC

2.3.6 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 5,10,15,20,25 μL ,按 2.3.1 项下测定,以峰面积均值为纵坐标,以进样量(μg)为横坐标进行线性回归($n = 5$)。结果回归方程为 $Y = 8.183 \times 10^6 X + 6234.61$ ($r = 0.9999$),表明染料木素在 0.2012 ~

1.006 0 μg 线性关系良好。

2.3.7 精密度试验 取同一份供试品溶液,按 **2.3.1** 项下重复进样 6 次。结果染料木素峰面积的 RSD 0.08%,表明该法精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 将对照品溶液、供试品溶液在室温下贮存,分别于 0,1,2,3,6,24,48,72 h 测定。结果对照品溶液、供试品溶液中染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.51%,1.53%,表明两者在 72 h 内均稳定。

2.3.9 重复性试验 同一批号样品(批号 20111201),分别取低、中、高 3 个样品量,每个样品量 3 份,按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下测定,计算 RSD。结果染料木素含量的 RSD 0.94%,表明该法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的阴道片剂(批号 20111201)细粉约 25 mg,共 6 份,分别精密加入染料木素对照品适量,精密加入无水乙醇 25 mL,按 **2.3.3** 项下供试品溶液的制备方法,超声提取,补重摇匀后,精密量取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤。按 **2.3.1** 项下测定,各份重复进样 2 次,以峰面积均值计算染料木素的平均回收率及 RSD 见表 1。

表 1 染料木素加样回收率(n=6)

No.	称样量 /mg	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	25.03	2.505 9	2.48	4.915 4	97.16	97.72	1.65
2	24.98	2.500 9	2.54	5.003 8	98.54		
3	25.06	2.508 9	2.52	4.956 1	97.11		
4	25.04	2.506 9	2.50	4.989 8	99.32		
5	25.11	2.513 9	2.53	5.022 2	99.14		
6	25.08	2.510 9	2.52	4.906 6	95.07		

2.3.11 样品测定 取 3 批染料木素阴道片剂,每批重复测定 3 次,以峰面积外标法计算含量,结果见表 2。

3 讨论

阴道给药可使药物在局部发挥治疗作用,也可通过吸收入血发挥全身治疗作用,同时可减少药物受肝脏首过作用的破坏和药物对肝脏的毒副作用,对于口服生物利用低的药物不失为一种良好的给药途径。

目前《中国药典》2010 年版一部附录 I D 片剂项下并未对阴道片的 pH 进行规定,而健康妇女阴道的 pH 环境为 4.0~5.0,在此环境下有利于抵御外来病菌的侵袭^[9],如用药后改变其 pH 环境,将导

表 2 染料木素阴道片中染料木素含量的测定(n=3)

批号	含量	平均含量
20111201	102.07	103.00
	104.81	
	102.11	
20111202	102.37	102.46
	102.40	
	102.61	
20111203	102.81	101.40
	99.54	
	101.86	

致其抵抗力降低,故应对本品 pH 进行检查,以保证其安全性。

经提取方法筛选证明,超声法所得染料木素含量较加热法、超声+冷凝法更接近实际投料值,为能真实反应本品中染料木素含量,故确定供试品溶液的制备方法为超声法。

以染料木素含量为指标,考察提取时间结果表明,超声少于 30 min 测得含量偏低,超声大于 30 min 含量不再增加,因此确定制备供试液的超声时间为 30 min。

根据染料木素在一般的有机溶媒中溶解度差,而易溶于二甲基亚砜,在甲醇、乙醇中亦有一定的溶解度^[10],但因二甲基亚砜流动性差,对色谱柱和泵均有影响,不易作为溶剂^[11]。比较甲醇和无水乙醇对染料木素提取率,确定提取溶剂为无水乙醇。

在溶剂系统条件下紫外扫描结果显示,染料木素最大吸收波长为 262 nm,因此确定测定波长为 262 nm。

参考有关文献中测定染料木素含量的方法^[11-12],经试验甲醇-0.05% 磷酸水体系、甲醇-水体系均可使待测组分达到定量分析要求,但前者较后者色谱峰峰形对称性好,同时为节省检测时间和试剂,综合考虑确定流动相组成及比例为甲醇-0.05% 磷酸水(70:30)。

根据本品含量测定的结果,HPLC 可以使染料木素主成分峰与杂质峰达到较好的分离,能反映本品的真实含量,且本方法灵敏、准确、简便,重复性好,专属性强,有利于药品的质量控制。

[参考文献]

[1] 张萍,郑万金,仲英. 染料木素的研究进展[J]. 齐鲁药事,2008,27(2):103.

HPLC 测定秃叶黄皮树和黄皮树中 5 种有效成分的含量

谭尔, 罗尚华, 林升得, 谭荣, 王宇, 张艺, 张静*
(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:测定秃叶黄皮树和黄皮树中黄柏碱、木兰花碱、巴马汀、小檗碱、黄柏酮的含量,并比较不同品种黄柏药材有效成分含量的差异。方法:采用 HPLC, Xtimate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 检测波长 220 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。结果:5 种成分在上述条件下分离良好。黄柏碱、木兰花碱、巴马汀、小檗碱、黄柏酮分别在 0.001 7~0.07, 0.002~0.08, 0.000 5~0.02, 0.01~0.4, 0.000 5~0.02 g·L⁻¹ 呈良好线性关系, *r* 分别为 0.999 9, 0.999 9, 0.999 9, 0.999 9, 0.999 5, 平均回收率均 >97%, (RSD <3%, *n* = 9)。结论:该方法简便、准确、重复性好, 可作为秃叶黄皮树与黄皮树质量控制的方法。秃叶黄皮树中黄柏碱、木兰花碱、巴马汀、小檗碱、黄柏酮含量与黄皮树无明显差异; 且已成为黄柏药材的主流商品, 建议将秃叶黄皮树与黄皮树一同作为黄柏收入药典。

[关键词] 秃叶黄皮树; 黄皮树; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0135-05

[doi] 10.11653/syfy2013230135

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130924.1435.004.html>

[网络出版时间] 2013-09-24 14:35

Determination of Five Active Ingredient in *Phellodendron chinense* var *Glabriusculum* and *P. chinense* by HPLC

[收稿日期] 20130507(017)

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(10ZB075); 四川省教育厅创新团队项目(11TD004)

[第一作者] 谭尔, 在读硕士研究生, 从事中药及民族药药效物质基础的研究, Tel:18380415872, E-mail:tanle_2009@126.com

[通讯作者] *张静, 博士, 副教授, 从事中药及民族药药效物质基础及质量控制的研究, Tel:028-61800160, E-mail:zhangjingtc@126.com

- [2] 孟庆杰, 潘五九, 王伟明. 染料木素水溶性栓剂处方及制备工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):63.
- [3] 胡志苹, 黄志华, 吴亮亮, 等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):164.
- [4] 余立华, 刘康, 刘保林. 染料木素的药理作用[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3):299.
- [5] 冯怡, 曾星, 邓远辉. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中染料木素及其葡萄糖醛酸代谢物[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(1):64.
- [6] 夏丽文, 李大维, 张丽杰. 染料木素自乳制剂的制备及溶出度研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2010, 26(4):398.
- [7] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化 + 染料木素胶束制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):12.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:附录 VII g.
- [9] 徐丹. 新型阴道栓剂——替硝唑复合胶囊栓剂研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2008.
- [10] 王剑波, 顾宜, 郭萍, 等. 紫外分光光度法测定染料木素胶囊含量和溶出度[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5):473.
- [11] 王剑波, 郭萍, 赵小兵, 等. RP-HPLC 法测定槐角提取物中染料木素的含量[J]. 中草药, 2004, 35(4):402.
- [12] 杜先华, 牛欣, 冯前进, 等. HPLC 法测定染料木素自微乳中染料木素的含量[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(10):2152.

[责任编辑 顾雪竹]