

阿娜尔妇洁阴道泡腾片质量标准研究

顾政一¹, 刘砥威², 邢建国¹, 杨伟俊¹

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;

2. 新疆西部加斯特药业有限公司, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的: 建立阿娜尔妇洁阴道泡腾片的质量控制方法。方法: 采用薄层色谱法对阿娜尔妇洁阴道泡腾片中的主要药味苦豆子、蛇床子、花椒及冰片进行鉴别, 采用 HPLC 方法测定阿娜尔妇洁阴道泡腾片中的没食子酸及蛇床子素的含量。结果: TLC 定性鉴别重复性好, 阴性无干扰; HPLC 测定没食子酸及蛇床子素的线性关系良好, 重复性、稳定性和加样回收率等均达到含量测定要求。结论: 定性、定量方法简便、可靠、准确, 能有效控制阿娜尔妇洁阴道泡腾片的质量。

[关键词] 阿娜尔妇洁阴道泡腾片; 石榴皮; 蛇床子; 苦豆子

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0074-04

Quality Standard of Anaerfujie Vagina Effervescent Tablets

GU Zheng-yi¹, LIU Di-wei², XING Jian-guo¹, YANG Wei-jun¹

(1. Xinjiang Institute of Meteria, Urumqi 830004, China;

2. Xinjiang West Pharmaceutical Corporation Limited, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for quality control of Anaerfujie vagina effervescent tablets. **Method:** The herb medicines including Fructus Cnidii, Sophora alopecuroid, pricklyash peel and borneol were identified by TLC and the content of gallic acid and osthole in Anaerfujie vagina effervescent tablets was determined by RP-HPLC with C₁₈ as column. **Result:** The herbs could be identified by TLC. The calibration curves of gallic acid and osthole were in good linearity and the average recovery, reproducibility and stability were according with the requirement of assay. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be applied to the quality control of Anaerfujie vagina effervescent tablets.

[Key words] Anaerfujie vagina effervescent tablets; granatum; fructus cnidii; sophora alopecuroid

阿娜尔妇洁阴道泡腾片由石榴皮、苦豆子、蛇床子、没食子、珊瑚、花椒和冰片 7 味中药组成, 具有清热燥湿, 杀虫除痒之功效, 是治疗细菌性、霉菌性阴道炎的有效维吾尔医制剂。为了有效控制制剂质量, 本试验采用薄层色谱法对方中苦豆子、花椒及冰片进行定性鉴别; 并采用高效液相色谱法测定阿娜尔妇洁阴道泡腾片中没食子酸和蛇床子素的含量。

结果所建立的方法准确、可靠、专属性强, 可用于控制阿娜尔妇洁阴道泡腾片的质量, 为阿娜尔妇洁阴道泡腾片质量标准的建立提供了实验依据。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AVP 高效液相色谱仪 (LC-10ATVP 二元高压泵, SPD-10AVP 检测器, CTO-10ASVP 柱温箱, SCL-10AVP 系统控制器); LibrorAEG-200 电子天平 (日本岛津); LS-3120 超声波发生器 (美国)。薄层色谱用硅胶 G (青岛海洋化工有限公司)。

乙腈、甲醇为美国 Fisher 公司产色谱纯, 其他试剂均为国产分析纯。蛇床子素对照品 (批号 110822-200305)、没食子酸对照品 (批号 0831-9501)、苦参

[收稿日期] 20101213(002)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科学研究和技术开发 (含攻关) 课题 [200633126(3)]

[第一作者] 顾政一, 研究员, 从事中药民族药新药研究, Tel: 0991-2828537, E-mail: zhengyi087@126.com

碱对照品(批号 0805-200005)、氧化苦参碱对照品(批号 0780-200006)、槐定碱对照品(批号 784-9001)、蛇床子对照药材(批号 121030-200405)、花椒对照药材(批号 121106-200402)、冰片对照药材(批号 111688-200501)均由中国药品生物制品检定所提供;阿娜尔妇洁阴道泡腾片(批号 041014,新疆西部加斯特药业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 苦豆子的 TLC 鉴别^[1] 取本品 10 片,研细,加浓氨水润湿,放置 10 min,加三氯甲烷 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。同法制成阴性对照溶液。取苦参碱、槐定碱、氧化苦参碱对照品,加甲醇制成 0.5 g·L⁻¹ 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部,附录 VI B) 试验,吸取上述对照品溶液各 2 μL、供试品溶液 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-浓氨水(5:1:0.8)为展开剂,展距 10 cm,取出,晾干,喷以改良的碘化铋钾试液。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照在相应位置上无斑点。

2.1.2 蛇床子的 TLC 鉴别 取本品 2 片,研细,加乙醇 50 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。同法制成阴性对照溶液。另取蛇床子对照药材 0.5 g,加乙醇 10 mL,超声处理 30 min,制成对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 1 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯(15:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照在相应位置上无斑点。

2.1.3 冰片 TLC 鉴别 本品 10 片,研细,加甲醇 50 mL 超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至 2 mL,加入 20 mL 水使成混悬液,用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯液,浓缩至 1 mL,作为供试品溶液;同法制备阴性样品溶液;另取冰片对照品,加甲醇制成 1 g·L⁻¹ 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》一部,附录 VI B) 试验,吸取对照品溶液 2 μL、供试品溶液和阴性样品溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(85:15)为展开剂,展开,取出,晾

干,喷以 5% 香草醛-硫酸溶液,在 105℃ 加热至斑点显色清晰。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照在相应位置上无斑点。

2.1.4 花椒的 TLC 鉴别^[2] 取本品 20 片,研细,加氯仿 100 mL,加热回流提取 1 h,滤过,滤液浓缩至干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取花椒对照药材 0.5 g,加氯仿 20 mL,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》一部,附录 VI B) 试验,吸取上述 3 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 的磷钼酸乙醇溶液,在 105℃ 加热至斑点显色清晰。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照在相应位置上无斑点。

2.2 高效液相色谱法测定没食子酸含量^[3]

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),检测波长 270 nm,流动相甲醇-0.1% 磷酸(5:95),流速 1.00 mL·min⁻¹,柱温 40℃。

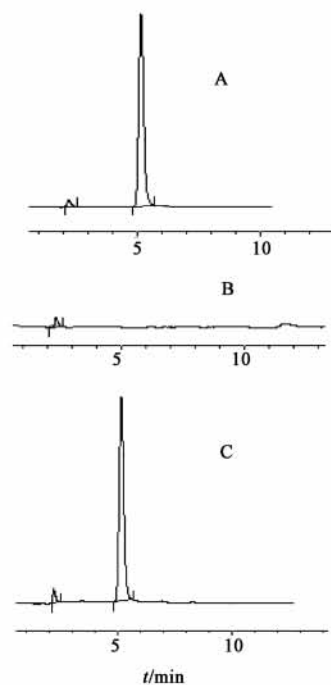


图3 没食子酸 HPLC

A. 对照品;B. 阴性样品;C. 样品;1. 没食子酸

2.2.2 线性关系的考察 取没食子酸对照品约 7 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成 75.72 mg·L⁻¹ 的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液 0.3, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置 10

mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。以进样量C(μg)为横坐标,峰面积A为纵坐标进行回归,得标准曲线方程 $A = 59\ 868C + 1\ 317.9$ ($r = 0.999\ 7$),在2.272~37.86 μg没食子酸峰面积与进样量具有良好的线性关系。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品10片,研细。取约0.1 g,精密称定,置100 mL量瓶中,加甲醇约90 mL,超声提取30 min,冷却后用甲醇稀释至刻度,摇匀,静置,取上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.4 阴性样品试验 按处方中药味比例制备不含没食子、石榴皮的阴性样品,按2.2.3项下方法制备没食子、石榴皮空白溶液,依法测定,结果无干扰。

2.2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液10 μL,按上述色谱条件,连续进样6次,测定供试品溶液中没食子酸峰面积值,结果供试品峰面积值RSD 0.64%。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液10 μL,按上述色谱条件,每隔2 h测定供试品溶液中没食子酸峰面积值,共测定6次,结果供试品没食子酸峰面积值RSD 0.65%。

2.2.7 重复性试验 取供试品细粉5份,各约1.0 g,精密称定,照2.2.3项下处理,按含量测定项下色谱条件进行测定,结果供试品峰面积值的RSD 1.08%。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取供试品9份,各约0.05 g,精密称定,分别置100 mL量瓶中,加甲醇约90 mL,各精密加入没食子酸对照品溶液适量,照2.2.3项下处理,测定,计算回收率,结果平均回收率为99%,RSD 1.94%,见表1。

2.2.9 样品测定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL测定,外标一点法计算10批样品含量,没食子酸的平均值为18.39 mg/片($n = 10$)。

2.3 高效液相色谱法测定蛇床子素含量^[4]

2.3.1 色谱条件 色谱柱 CLC-ODS (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),检测波长 322 nm,流动相乙腈-水(70:30),流速 1.00 mL·min⁻¹,柱温 40 °C。

2.3.2 线性关系的考察 取蛇床子素对照品约10 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加95%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成48.7 mg·L⁻¹的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液1.25,2.5,5,7.5,10 mL

表1 没食子酸回收率测定

No.	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.135 8	2.378 4	98.78		
2	1.135 8	2.364 5	97.56		
3	1.135 8	2.350 8	96.35		
4	1.262 0	2.504 8	98.92		
5	1.262 0	2.518 5	100.01	99.00	1.94
6	1.262 0	2.554 5	102.86		
7	1.388 2	2.645 1	100.04		
8	1.388 2	2.605 5	97.18		
9	1.388 2	2.634 6	99.28		

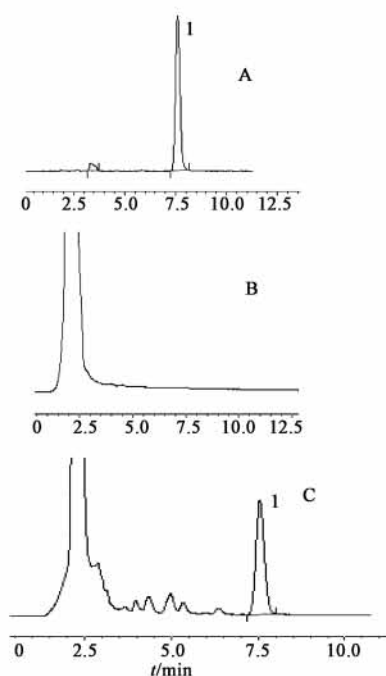


图2 蛇床子素 HPLC

A. 对照品; B. 阴性样品; C. 样品; 1. 蛇床子素

置10 mL量瓶中,加95%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。以进样浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得标准曲线方程 $A = 37\ 066C - 23\ 060$ ($r = 0.999\ 8$),在6.09~48.70 mg·L⁻¹蛇床子素峰面积与进样浓度具有良好的线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备 取本品10片,研细,取0.25 g,精密称定,置50 mL量瓶中,加甲醇约45 mL,超声提取30 min,冷却后用甲醇稀释至刻度,摇匀,静置,取上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,

即得。

2.3.4 阴性对照溶液 按处方中药味比例,制备不含蛇床子的阴性样品,按**2.3.3**方法制备蛇床子空白溶液,依法测定,结果无干扰。

2.3.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL ,按上述色谱条件,连续进样 6 次,测定供试品溶液中蛇床子素峰面积值,结果 RSD 1.17%。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL ,按上述色谱条件,每隔 2 h 测定供试品溶液中蛇床子素峰面积值,共测定 6 次,结果供试品蛇床子素峰面积值 RSD 0.61%。

2.3.7 重复性试验 取供试品细粉 5 份,各约 0.4 g,照**2.3.3**项下处理,按含量测定项下色谱条件进行测定,结果供试品蛇床子素峰面积值 RSD 0.93%。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取供试品 9 份,各约 0.125 g,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,各精密加入蛇床子素对照品适量,照**2.3.3**项下处理,测定,计算回收率,结果平均回收率为 99.35%,RSD 0.76%,见表 2。

表 2 蛇床子素回收率测定

No.	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.311 7	0.698 7	99.24		
2	0.311 7	0.697 5	98.85		
3	0.311 7	0.697 0	98.69		
4	0.389 6	0.771 5	98.07		
5	0.389 6	0.775 3	99.05	99.35	0.76
6	0.389 6	0.778 7	99.92		
7	0.467 5	0.856 9	100.00		
8	0.467 5	0.858 1	100.25		
9	0.467 5	0.857 3	100.08		

2.3.9 样品测定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 测定,外标一点法计算 10 批样品含量,蛇床子素的平均含量为 2.26 mg/片($n=10$)。

3 讨论

维吾尔医药是中国民族医药中重要的组成部分,阿娜尔妇洁阴道泡腾片处方来自维吾尔医名方“阿娜尔妇洁液”,是《中华人民共和国卫生部药品

标准——维吾尔药分册》1999 年版收载品种,是治疗细菌性、霉菌性阴道炎的有效维吾尔医制剂,原有制剂质量控制方法简单,仅制定了方中 2 味药材的定性方法和总生物碱定量分析方法。本实验依据方中主药石榴皮主要含没食子酸、苹果酸、熊果酸等有机酸,具有收敛、抗炎、促进黏膜愈合的作用^[4],使药没食子中含 50%~70%鞣酸,其水解产物主要含有没食子酸。蛇床子中香豆素类成分具有抑菌和杀灭阴道滴虫的作用^[5]。因此,为提高其质量标准,增加药品可控性,以没食子酸及蛇床子中香豆素类成分蛇床子素为指标成分,建立了含量测定的方法。

根据文献及预试,选择 322 nm 为蛇床子素的检测波长。文献报道测定蛇床子素的流动相多采用乙腈-水系统^[5-6],以乙腈-水(65:35)进行实验,结果柱压较低,色谱峰对称性好,但主峰的保留时间长,不利于高效率的分析样品,当流动相比比例为乙腈-水(70:30)时,保留时间适中,主峰与其他峰的分度、理论塔板数、对称性等色谱参数符合检测方法要求。

在蛇床子素及没食子酸供试品溶液制备条件确定时,分别考察了 15,30,45,60 min 超声提取时间,结果超声提取 30 min 后,样品含量保持恒定,故超声提取时间定为 30 min。

[参考文献]

- [1] 黄秀梅,李波. 苦豆子类生物碱的药理学研究进展[J]. 中国药事,2002,16(3):175.
- [2] 孙铁梅,李恒,王蕊,等. “椒茱汤”中主药的薄层鉴定和药理学实验研究[J]. 开封医学学报,1999,18(2):57.
- [3] 周本宏,吴玥,王慧媛,等. 石榴皮药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房,2008,19(30):18.
- [4] 李婕姝,贾冬英,姚开,等. 石榴的生物活性成分及其药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2009,11(9):7.
- [5] 袁发荣,杜连平. HPLC 测定藏成药仁青常觉中蛇床子素的含量[J]. 中成药,2008,30(9):附 25.
- [6] 刘晓华,孙文基,李涛. HPLC 法测定独活中蛇床子素的含量[J]. 药物分析杂志,2004,24(2):21.

[责任编辑 蔡仲德]