

妇必舒阴道泡腾片中苦参碱、欧前胡素和蛇床子素的含量测定

盛燕, 陈勇, 张文婷(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 采用 HPLC 测定妇必舒阴道泡腾片中苦参碱、欧前胡素和蛇床子素的含量。方法 苦参碱色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 7.6)(17:83), 检测波长为 220 nm;流速为 1 mL·min⁻¹;欧前胡素、蛇床子素色谱条件:色谱柱为 Agela Innoval C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-水(65:35);检测波长为 248 nm;流速为 1 mL·min⁻¹。结果 苦参碱、欧前胡素和蛇床子素线性范围分别为 156.0~3 120.0 ng, 10.26~256.50 ng 和 36.98~924.50 ng($r=1.000\ 0$), 平均回收率分别为 97.0%, 102.8%和 99.5%, RSD 值分别为 1.8%, 0.7%和 0.3%。结论 该方法简便, 结果准确, 重现性好, 可用于妇必舒阴道泡腾片的质量控制。

关键词: 妇必舒阴道泡腾片; 苦参碱; 欧前胡素; 蛇床子素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)01-0082-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.021

Determination of Matrine, Imperatorin and Osthole in Fubishu Vaginal Effervescent Tablets

SHENG Yan, CHEN Yong, ZHANG Wenting(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine matrine, imperatorin and osthole in Fubishu Vaginal effervescent tablets by HPLC. **METHODS** The Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)column with temperature at 30 ℃ was used to separate matrine. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(adjust the pH to 7.6 with triethylamine)(17:83), the detection wavelength was 220 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The Agela Innoval C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)column with temperature at 30 ℃ was used to separate imperatorin and osthole. The mobile phase was acetonitrile-water(65:35), the detection wavelength was 248 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** A good linear relationships were obtained in the following range, matrine 156.0~3 120.0 ng, imperatorin 10.26~256.50 ng and osthole 36.98~924.50 ng($r=1.000\ 0$). The average recoveries were 97.2%, 102.8% and 99.5%, respectively, and RSDs were 1.8%, 0.7% and 0.3%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, reproducible, and it can be applied to control the quality of the Fubishu Vaginal effervescent tablets.

KEY WORDS: Fubishu Vaginal effervescent tablets; matrine; imperatorin; osthole; HPLC

妇必舒阴道泡腾片由苦参、蛇床子、大黄、百部、乌梅、硼砂、冰片、白矾、甘草 9 味中药组成, 具有清热燥湿、抗菌消炎、杀虫止痒功效, 主要用于妇女湿热下注证所致的白带增多、阴部瘙痒等症。苦参碱是君药苦参的主要活性成分, 具有抗病原微生物、抗炎、调节免疫等作用^[1]。欧前胡素和蛇床子素是蛇床子的主要活性成分, 具有抗菌、消炎、止痒等作用^[2]。原标准收载于国家食品药品监督管理局标准 YBZ03372008, 仅对蛇床子素进行了定量控制^[3]。为了更好地控制产品质量, 本实验参考文献[4-8], 建立了 HPLC 测定苦参碱、欧前胡素和蛇床子素的含量。该法可操作性强、结果准确、重复性好, 为妇必舒阴道泡腾片质量标准的制订提供了可行的科学依据。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-20ADXR 系列液相色谱仪(日本岛津)、Agilent 1100 系列液相色谱仪(美国 Agilent 公司)、Dionex U3000RS LC 系列液相色谱仪(美国戴安公司); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水; 苦参碱(批号: 110805-200306)、欧前胡素(批号: 0826-200206)、蛇床子素(批号: 110822-200003), 均由中国生物制品检验所提供, 供含量测定用; 妇必舒阴道泡腾片(浙江天昊药业有限公司, 批号: 自编 1#~10#, 批号 7#作为方法研究用样品)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 苦参碱的色谱条件 色谱柱为 Kromasil

100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 7.6)(17:83), 检测波长为 220 nm; 流速为 1 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL。理论板数按苦参碱计应≥4 000。

2.1.2 欧前胡素和蛇床子素的色谱条件 色谱柱为 Agela Innoval C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-水(65:35); 检测波长为 248 nm; 流速为 1 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL。理论板数按蛇床子素计应≥3 000。

2.2 对照品溶液的制备

取苦参碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 312.0 μg 的溶液, 备用。

取欧前胡素、蛇床子素对照品各适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 各含 25.65 μg 和 92.45 μg 的溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 苦参碱供试品溶液 取本品 10 片, 精密称定, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 加浓氨试液 0.5 mL, 再加三氯甲烷 25 mL, 密塞, 加热回流提取 40 min, 滤过, 容器及残渣用三氯甲烷少量多次洗涤, 合并滤液, 蒸干, 残渣用甲醇适量使溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 滤过, 即得。

2.3.2 欧前胡素、蛇床子素供试品溶液 取本品 10 片, 精密称定, 研细, 取约 0.45 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 称定重量, 加甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 专属性试验

按处方配比, 分别制备缺苦参、缺蛇床子的阴性样品, 按拟定的方法制备、测定。结果表明, 供试品溶液在 2 种色谱条件下均分离良好, 阴性对照无干扰。色谱图见图 1~2。

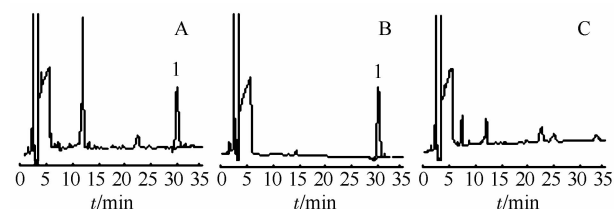


图 1 苦参碱 HPLC 图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-缺苦参阴性; 1-苦参碱。

Fig. 1 HPLC chromatograms of matrine

A-standard solution; B-sample solution; C-matrine negative solution; 1-matrine.

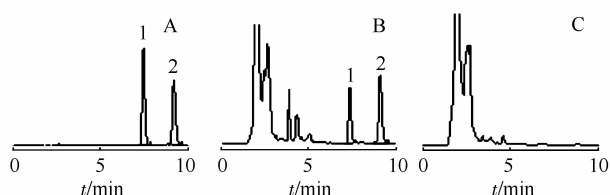


图 2 欧前胡素和蛇床子素 HPLC 图

A-混合对照品; B-样品; C-缺蛇床子阴性; 1-欧前胡素; 2-蛇床子素。

Fig. 2 HPLC chromatograms of imperatorin and osthole

A-standard solution; B-sample solution; C-osthole negative solution; 1-imperatorin; 2-osthole.

2.5 线性关系考察

分别吸取苦参碱对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积; 精密量取欧前胡素、蛇床子素混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度作为工作液, 注入液相色谱仪, 测定峰面积。以色谱峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得苦参碱、欧前胡素和蛇床子素回归方程分别为 $Y=783.95X-15\ 511$ 、 $Y=4\ 855X-251.25$ 、 $Y=1\ 076.9X-357.2$, r 均为 1.000 0, 分别在进样量 156.0~3 120.0 ng, 10.26~256.50 ng 和 36.98~924.50 ng 内呈良好的线性关系。

2.6 仪器精密度试验

分别精密吸取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.1”项下色谱条件测定苦参碱、欧前胡素和蛇床子素峰面积, 结果 RSD 值均为 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品各 6 份, 按“2.3”项下方法制备、测定, 结果苦参碱、欧前胡素和蛇床子素峰含量平均值分别为 1.24, 0.98 和 4.45 mg·g⁻¹, RSD 值分别为 1.9%, 1.0% 和 0.9%, 表明方法测定的重复性良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 于 0, 5, 20, 25, 30, 40 h 分别进样, 按拟定条件测定峰面积, 结果苦参碱、欧前胡素和蛇床子素峰 RSD 值分别为 1.4%, 0.3% 和 0.7%, 表明供试品溶液在 40 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量样品 6 份, 分别精密加入苦参碱对照品溶液(156.00 μg·mL⁻¹)和混合对照品

溶液(欧前胡素 10.26 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和蛇床子素 36.98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)适量,按拟定方法制备、测定,计算回收率,结果苦参碱平均回收率为 97.0%,RSD=1.8%;欧前胡素平均回收率为 102.8%,RSD=0.7%;蛇床子素平均回收率为 99.5%,RSD=0.3%。结果见表 1~3。

表 1 苦参碱加样回收实验结果(n=9)

Tab. 1 Results of recovery tests(n=9)

称样量/g	原含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.126 7	0.157 1	0.156 0	0.305 4	95.06
0.125 6	0.155 7	0.156 0	0.308 4	97.88
0.126 1	0.156 4	0.156 0	0.304 6	95.00
0.253 2	0.314 0	0.312 0	0.618 9	97.73
0.253 0	0.313 7	0.312 0	0.627 9	100.70
0.250 1	0.310 1	0.312 0	0.609 8	96.05
0.374 7	0.464 6	0.468 0	0.913 2	95.85
0.373 5	0.463 1	0.468 0	0.915 7	96.70
0.380 0	0.471 2	0.468 0	0.931 9	98.44

表 2 欧前胡素加样回收实验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery of Imperatorin(n=9)

称样量/g	原含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.112 6	0.110 2	0.102 6	0.216 0	103.12
0.115 9	0.113 4	0.102 6	0.218 6	102.53
0.113 6	0.111 1	0.102 6	0.217 4	103.61
0.225 0	0.220 1	0.205 2	0.431 1	102.83
0.225 6	0.220 7	0.205 2	0.429 4	101.71
0.225 4	0.220 5	0.205 2	0.432 4	103.27
0.340 9	0.333 5	0.307 8	0.647 7	102.08
0.338 6	0.331 3	0.307 8	0.646 9	102.53
0.339 1	0.331 8	0.307 8	0.651 7	103.93

表 3 蛇床子素加样回收实验结果(n=9)

Tab.3 Results of recovery of osthole(n=9)

称样量/g	原含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.112 6	0.500 9	0.369 8	0.869 0	99.54
0.115 9	0.515 6	0.369 8	0.884 9	99.86
0.113 6	0.505 4	0.369 8	0.872 1	99.16
0.225 0	1.001 0	0.739 6	1.739 3	99.82
0.225 6	1.003 6	0.739 6	1.740 6	99.65
0.225 4	1.002 7	0.739 6	1.736 9	99.27
0.340 9	1.516 6	1.109 4	2.620 2	99.48
0.338 6	1.506 3	1.109 4	2.614 3	99.87
0.339 1	1.508 6	1.109 4	2.609 9	99.27

2.10 样品测定

取样品 10 批,按“2.3”项下方法制备制备,测定结果见表 4。

表 4 妇必舒阴道泡腾片中苦参碱、欧前胡素和蛇床子素的含量测定结果(n=3)

Tab. 4 Contents of matrine, imperatorin and osthole in Fubishu Vaginal effervescent tablets(n=3)

批号	苦参碱		欧前胡素		蛇床子素	
	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
1#	1.16	1.4	0.68	0.2	4.51	1.0
2#	1.18	1.2	0.77	1.0	4.64	0.8
3#	1.25	0.2	0.82	0.2	4.64	0.6
4#	1.28	0.1	0.53	0.7	4.50	1.4
5#	1.12	1.9	0.66	1.4	4.47	1.3
6#	1.15	1.1	0.67	1.0	4.38	1.8
7#	1.23	1.1	0.77	1.5	4.27	0.6
8#	1.26	1.9	0.98	0.7	4.45	0.5
9#	1.05	0.9	1.16	0.5	5.12	0.3
10#	1.08	1.8	1.16	0.5	5.15	0.9

3 讨论

苦参中的主要成分为苦参碱和氧化苦参碱,二者可以相互转化^[9]。妇必舒阴道泡腾片中的苦参药材经过炮制、制备其氧化苦参碱已经转化为苦参碱,在检测中未见氧化苦参碱,故本方法以苦参碱做定量指标。制备供试品溶液时进行了提取方法(超声、回流、萃取)的比较,选择了提取效率高且操作简便的回流提取。进行了提取溶剂的比较,结果表明以甲醇、三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(40:10:3)为提取溶剂,阴性样品均有干扰,故选择先加浓氨试液,再加三氯甲烷为提取溶剂;还进行了称样量(0.2, 0.5 和 1.0 g)、提取时间(30, 40 和 50 min)的比较,结果表明这 2 项对苦参碱含量影响不大。

对蛇床子药材及其相关复方制剂,中国药典 2010 年版和其他法定标准中均仅对蛇床子素进行了定量控制,而对其另一主要有效成分欧前胡素未进行控制。本实验采用 HPLC 同时测定了蛇床子中欧前胡素和蛇床子素的含量。对提取溶剂甲醇、乙醇进行了比较,结果甲醇对欧前胡素的提取效率高,对蛇床子素含量影响不大;还进行了提取方法(超声、回流)、提取时间(20, 30 和 40 min)、称样量(0.25, 0.45 和 0.65 g)的比较,结果对欧前胡素和蛇床子素含量均影响不大。

在 200~400 nm 进行全扫描,欧前胡素在 218, 248 和 299 nm 处有较强紫外吸收,蛇床子素在 203, 321 nm 处有较强紫外吸收,考虑到样品中欧前胡素含量较蛇床子素低,且在 248 nm 处样品中

两者峰面积相当,故选择检测波长为 248 nm。

试验中均考察了仪器、色谱柱、柱温、流速的变动对分离度等结果的影响。苦参碱定量测定还考察了流动相磷酸浓度和 pH 值的变动对分离度等结果的影响,发现在测定条件下,系统的轻微变动对试验结果影响不大,系统耐用性良好。

从 10 批样品含量测定结果看,苦参碱、蛇床子素含量相近,欧前胡素含量有些差异。对三者含量同时进行控制,对加强工艺控制和产品质量控制具有积极意义。

REFERENCES

[1] CHEN H Z, BAO H Y, NUO M, et al. Summary of chemical composition and pharmacological effects and clinical study of sophora flavescens [J]. Ginseng Res(人参研究), 2010(3): 31-37.
[2] LIN A H, LI Y. Pharmacological action and related research progress of osthole [J]. Med Inf(医学信息), 2010(12): 3868.

[3] YBZ03372008. The State Food and Drug Administration Standard(国家食品药品监督管理局标准)[S]. 2008.
[4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 188, 295, 1038.
[5] SHA D X, HAO Y J, KANG Q, et al. Determination of belamcandin, chlorogenic acid and matrine in Kangbingdu granules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(10): 1928-1933.
[6] MA L L, DONG Z M, LU Y, et al. HPLC simultaneous determination of schizandrin, imperatorin and osthole in Qirong tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(7): 1111-1114.
[7] HUANG C H, LEI P, LIU S, et al. Simultaneous determination of osthole and isopimpinell in in Fructus Cnidii by HPLC [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2009, 7(3): 171-174.
[8] GAO J, CHANG Y L, SHAN W G. Preparation and content determination of osthole aquogel suppository [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(11): 1006-1009.
[9] JIA M G, SUN W J. Studies on transform of matrine and oxymatrine in Radix Sophorae Flavescentis and its prescription [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2003, 23(2): 90-93.

收稿日期: 2014-01-24

本刊 2014 年度特邀审稿专家名单

本刊 2014 年特邀请以下医药专家 96 人(按审稿数量排序)审定稿件。各位审稿专家以严谨的科学作风、高超的学术造诣、对作者负责的高尚精神认真审稿,并提出修改意见,保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者,在此表示衷心的感谢!

梁文权	周 权	郑高利	许东航	苗明三	孙晓译	王泽民	杨明华	吴永江
郑彩虹	李功华	王 梦	赵瑞芝	曾 苏	陈红梅	刘丽娟	周 萍	匡 荣
王向军	叶益萍	王书芳	谢升阳	王玮琴	何俏军	杨伟峰	马忠俊	王 珏
孙德清	陶巧凤	吴耀东	陈金亮	王 建	王金朝	余露山	陈碧莲	程国华
吕良忠	王志强	杨 波	王胜浩	俞 佳	盛炳义	马 珂	沈水杰	胡巧红
王知坚	温 清	傅旭春	韩 峰	刘晓文	朱全红	张如松	郭青龙	瞿海斌
周长新	黄 真	黄红兵	申屠建中	詹金彪	洪利娅	李 渊	茹仁萍	陈枢青
蒋惠娣	楼宜嘉	倪韶青	邱利焱	徐云根	范晓辉	卢晓阳	陈丽珍	陆森泉
俞旭平	方红梅	阮邹荣	陈 悦	王志安	高建青	陈志卫	胡士高	吕圭源
吕献康	胡永洲	陆 进	马凤森	盛 荣	王溶溶	王选铨	陈庆庆	高正华
毕开顺	李水福	刘 滔	倪维芳	白晓菊	胡富强			