

柠檬苦素乳膏的制备与质量控制

刘史佳^{1,2}, 戴国梁³, 程小桂³, 余伯阳^{2*}, 居文政^{1*}, 纪伟¹, 谈恒山⁴
(1. 江苏省中医院临床药理科, 南京 210029; 2. 中国药科大学中药学院, 南京 210009;
3. 南京中医药大学药学院, 南京 210029; 4. 南京军区总医院, 南京 210002)

[摘要] 目的:制备柠檬苦素乳膏并考察其质量稳定性。方法:以柠檬苦素为主药制备乳膏剂,采用 HPLC 测定主药含量及有关物质,色谱条件为 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),Zorbax SB-C₁₈ 保护柱(4.6 mm×12.5 mm,5 μm),流动相水-乙腈(42:58),检测波长 207 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,进样量 20 μL,考察 3 批样品的初步稳定性。结果:柠檬苦素乳膏呈乳白色,鉴别、检查项均符合相关规定,线性范围 20.26~101.3 mg·L⁻¹,平均回收率 99.6% (RSD 0.68%)。3 批样品中柠檬苦素质量分数 100.4%~101.6%,除了在高湿或高温条件下体积会略有增大或减小,其他检测在不同环境中均稳定。结论:该制剂工艺简单、质量可控,应置于阴凉干燥处保存。

[关键词] 柠檬苦素乳膏; 制备; 质量控制; 稳定性; 方法学考察; 有关物质

[中图分类号] R283.6;R943;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0008-04

[doi] 10.11653/syfy2013200008

Preparation and Quality Control of Limonin Creams

LIU Shi-jia^{1,2}, DAI Guo-liang³, CHENG Xiao-gui³, YU Bo-yang^{2*}, JU Wen-zheng^{1*}, JI Wei¹, TAN Heng-shan⁴
(1. Department of Clinical Pharmacology, Jiangsu Province Hospital of
Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
4. Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] Objective: To prepare limonin creams and investigate its quality stability. Method: Creams was prepared with limonin as raw material, HPLC was adopted to determined the content and related substances of limonin, chromatographic conditions were as follows: Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), Zorbax SB-C₁₈ guard column (4.6 mm×12.5 mm, 5 μm), mobile phase of water-acetonitrile (42:58), detection wavelength 207 nm, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature at room temperature, injection volume 20 μL, stability of three batches of limonin creams were carried out. Result: Limonin creams showed milky white, its identification and inspection items were in line with relevant regulations, the linear range of limonin was 20.26-101.3 mg·L⁻¹ with average recovery of 99.6% (RSD 0.68%). The mass fraction of limonin in three creams samples was 100.4%-101.6%, quality of samples was stable in different environments except in high humidity or high temperature, where volume would be slightly increased or decreased. Conclusion: This preparation technology was simple and controllable, it should be saved in cool and dry place.

[Key words] limonin creams; preparation; quality control; stability; methodological study; related substances

[收稿日期] 20130318(019)
[基金项目] 国家科技重大专项重大新药创制项目(2012ZX09303009-002);江苏省中医药领军人才(LJ200906,LJ200907);江苏高校优势学科建设工程项目(2010);2011 年度江苏省高等学校优秀科技创新团队(苏教科[2011]11 号)
[第一作者] 刘史佳,助理研究员,博士,从事药代动力学研究,Tel:025-86617141-80518,E-mail:andy3312083@sina.com
[通讯作者] * 余伯阳,教授,博士生导师,从事生药学研究,E-mail:boyanguy59@163.com;
* 居文政,主任中药师,博士生导师,从事药代动力学研究,E-mail:snow8185@yahoo.com.cn

柠檬苦素为含呋喃环且高度氧化的四环三萜类化合物,具有抗菌、抗病毒、镇痛、抗炎和抗癌等活性^[1-3],对金色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌等具有较强抑制作用^[4-7]。柠檬苦素胶囊为芸香科柚属植物文旦核提取物的黄酮苷类制剂,气微,味苦,性温,具有理气散结、止痛消肿等功能,临床用于治疗痔疮。柚核含黄酮、柠檬苦素等成分,由于柠檬苦素的溶解度极低和渗透性较差,导致口服生物利用度很低^[8-10],原因可能是 *P*-糖蛋白外排引起的。本实验拟将其改制成乳膏,可直接涂抹于痔疮部位,以提高药效,并考察柠檬苦素乳膏的质量稳定性。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱和 Zorbax SB-C₁₈ 保护柱(美国 Agilent 公司), Centri Vap 型离心浓缩仪(美国 Labconco 公司), AE240 型电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司), HWS-80 型恒温恒湿培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司), Biofuge PrimoR 型冷冻高速离心机(德国 Heraeus 公司), Millipore Driect-Q5 型超纯水机(法国 Millipore 公司), WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

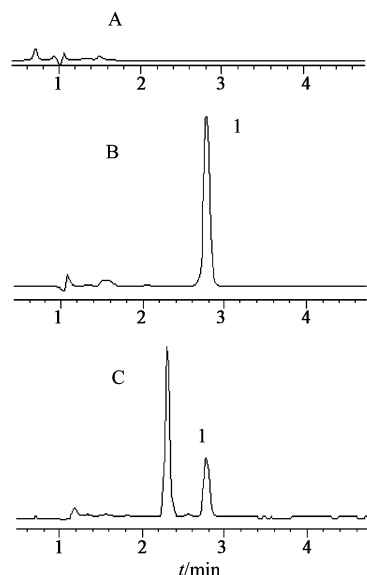
柠檬苦素胶囊(浙江南洋药业有限公司,批号 120302,柠檬苦素质量分数 > 95%),柠檬苦素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110800-200404),柠檬苦素乳膏(试制,批号分别为 20120901,20120902,20120903,规格 100 mg·10 g⁻¹),液体石蜡(国药集团化学试剂有限公司),十二烷基硫酸钠(西陇化工股份有限公司),十八醇(国药集团化学试剂有限公司),单硬脂酸甘油酯(国药集团化学试剂有限公司),尼泊金乙酸钠(南京美博生物科技有限公司),甲醇、甲酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 制备工艺 处方为柠檬苦素 10 g,十二烷基硫酸钠 6 g,甘油 100 g,硬脂酸 37.5 g,单硬脂酸甘油酯 35 g,液体石蜡 160 g,十八醇 45 g,氮酮 8 g,尼泊金乙酸钠 3 g,纯化水加至 1 000 g。取处方量的硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、氮酮、十八醇、液体石蜡、尼泊金乙酸钠置于油相锅内,水浴加热至 85 ℃,使融化。另取处方量甘油、十二烷基硫酸钠、水置于水相锅内,水浴加热至 80 ℃。将油相置于乳化锅内,恒温下将水相缓缓加入油相中,迅速搅拌。取处方量柠檬苦素加入锅内,搅拌至完全溶解^[11],室温测定软膏含量,灌装于 10 g 规格的软管中,装量 10 g/支。

2.2 有关物质检测

2.2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Zorbax SB-C₁₈ 保护柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm),流动相水-乙腈(42:58),检测波长 207 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,进样量 20 μL。理论板数按柠檬苦素峰计算不低于 2 500,见图 1。



A. 阴性对照; B. 对照品; C. 供试品; 1. 柠檬苦素

图 1 柠檬苦素乳膏 HPLC

2.2.2 溶液制备 取空白软膏约 0.25 g,置 10 mL 量瓶中,加流动相适量,超声 15 min,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为阴性对照溶液。精密称取柠檬苦素对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。精密称取本品软膏适量(约相当于柠檬苦素 10 mg),置 50 mL 量瓶中,加流动相适量,超声 15 min,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 方法学考察 取本品适量(约相当于柠檬苦素 10 mg),共 5 份,分别置于 50 mL 试管中,依次在强酸(1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL)、强碱(1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL)、加热(沸水浴 1 h)、光照(紫外光照射 24 h)及氧化(30% 双氧水 2 mL)等条件下对样品进行加速破坏。酸、碱破坏的样品分别用盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 至中性,分别加流动相至 10 mL,氧化、光照及加热破坏的样品直接加流动相 10 mL,分别制备成供试品溶液,进样,按 2.2.1 项下色谱条件进行有关物质检查。取柠檬苦素对照品 10.21 mg,用流动相逐步稀释,依法进样,记录色

谱图,至柠檬苦素主峰峰高约为噪音 3 倍时,计算最低检出限 15 ng,至柠檬苦素主峰峰高约为噪音 10 倍时,计算定量限 50 ng。

2.2.4 样品有关物质检测 称取本品约 10 g,加流动相溶解并稀释至 100 mL,滤过,取滤液 5 mL 用流动相稀释至 50 mL,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL,加流动相稀释至 100 mL,作为对照溶液。取对照溶液 20 μL 进样,调节仪器灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 10% ~ 25%,取供试品溶液和对照溶液各 20 μL 分别进样,记录色谱至主峰保留时间的 2 倍。采用主成分的自身对照法分别计算最大单一杂质峰含量及各杂质峰总和的含量,结果 3 批样品中总有关物质质量分数分别为 0.65% ,0.71% ,0.58% ,单个最大杂质质量分数依次为 0.23% ,0.30% ,0.19% 。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 同 2.2.1 项下色谱条件。

2.3.2 方法学考察 精密称取柠檬苦素对照品 10.13 mg,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取该溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液,进样,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 27\,196X + 36\,000$ ($r = 0.998$),表明柠檬苦素在 20.26 ~ 101.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。取 60.78 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬苦素对照品溶液,连续进样 6 次,结果峰面积的 RSD 0.83%,表明仪器精密度良好。取 60 ℃ 真空干燥至恒重的柠檬苦素对照品和空白软膏适量,精密称定,照软膏规格(柠檬苦素 10 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)按 80% ,100% ,120% 比例配制成模拟软膏,各取样 3 份,制成供试品溶液,进样,记录色谱图,测定柠檬苦素含量,计算回收率,结果见表 1。

表 1 柠檬苦素含量测定的加样回收试验

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
8.03	8.01	99.8	99.6	0.68
8.02	7.94	99.0		
8.02	8.04	100.2		
10.01	10.04	100.3		
9.98	9.95	99.7		
10.02	9.93	99.1		
12.02	11.91	99.1		
11.98	12.04	100.5		
12.04	11.87	98.6		

2.3.3 样品测定 精密称取本品适量(约相当于柠檬苦素 10 mg),置 100 mL 量瓶中,制备供试品溶液,进样,记录色谱图,计算柠檬苦素质量分数 100.4% ~ 101.6% 。

• 10 •

2.4 稳定性试验

2.4.1 离心试验 取样品 10 g,置玻璃离心管中,以 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,结果乳膏未见分层现象。

2.4.2 耐热、耐寒试验 取本品 10 g,装于密闭小瓶中,分别置 55 ℃ 恒温水浴箱中恒温 6 h 和置冰箱(- 12 ℃)中放置 24 h,结果乳膏均未见分层现象。

2.4.3 影响因素试验 取同一批样品,试验前全部除去包装,将乳膏置玻璃平皿中,暴露于强光(4 500 lx)、高温(40 ℃)、低温(4 ℃)、高湿(RH 92.5%)的环境下试验,分别于第 5,10 d 取样供检测,与 0 d 作比较。结果表明柠檬苦素软膏在光照、高温、低温及高湿等环境中均稳定,含量均无明显改变,HPLC 检查未发现新的杂质峰,柠檬苦素的峰面积比未下降;但该制剂在高湿条件下体积略有增大,在高温条件下除体积略有减小外(由于完全暴露在试验环境中,此变化为吸水或失水过程,属物理改变),其余均无明显改变,提示本品应置阴凉干燥处保存。

3 讨论

通过对基质处方和制备工艺的考察发现,不同乳化剂的不同配比均会影响膏体的稠度及其他各项指标;同时主药加入顺序、搅拌方式、乳化剂加入顺序及温度控制等也能影响膏体的性状及稳定性。柠檬苦素的含量测定多采用 HPLC,但由于其吸收波长在 207 nm 处,处于紫外光谱末端,流动相将甲醇改用乙腈后柠檬苦素响应值有所增加,流动相的背景干扰减少。建立的柠檬苦素乳膏质量控制方法操作简便、准确度和精密度高、稳定性好、耐用性较好,可用于该制剂的质量评价,以保证临床用药的有效性和合理性。

[参考文献]

[1] Tanaka T, Maeda M, Kohno H, et al. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by the citrus limonoids obacunone and limonin [J]. Carcinogenesis, 2000, 22(1) : 193.

[2] Matsuda H, Yoshikawa M, Linuma M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var. bodinieri [J]. Plant Med, 1998, 64(4) : 339.

[3] Lam L K, Hasegawa S. Inhibition of benzo [α] pyrene-induced forestomach neoplasia in mice by citrus limonoids [J]. Nutr Cancer, 1989, 12(1) : 43.

超声波辅助酶解法制备宝藿苷 I

于海帅*

(吉林工业职业技术学院质量与安全系,吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:优选宝藿苷 I 的超声波辅助酶解工艺。方法:采用 HPLC 测定宝藿苷 I 含量,色谱条件为 Diamond C₁₈ 色谱柱(4.60 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(25:75),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 270 nm。以宝藿苷 I 转化率为指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察超声功率、pH、温度、酶用量及反应时间对超声酶解工艺的影响。结果:最佳酶解条件为超声功率 200 W,pH 5.0,温度 40 ℃,酶用量 5%,反应时间 4 h;宝藿苷 I 转化率 97.4%。结论:超声波辅助酶解法制备宝藿苷 I 具有转化率高、反应温度低、反应时间短、酶用量少等优点,优选的工艺简单稳定,适合工业化生产。

[关键词] 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 超声波; 转化效率

[中图分类号] R283.6;R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0011-03

[doi] 10.11653/syfy2013200011

Optimization of Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis Technology for Baohuoside I from Icariin

YU Hai-shuai*

(Department of Quality and Safety, Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China)

[收稿日期] 20130320(005)

[基金项目] 吉林省中医药管理局项目(2010-pt064)

[通讯作者] *于海帅,硕士,讲师,从事中药化学研究,Tel:13844631856,E-mail:yuhaishuaijl@163.com

[4] XIE F,ZHANG M,ZHANG C F,et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit [J]. J Ethnopharmacol,2008,117(3):463.

[5] Breksa A P,Manners G D. Evaluation of the antioxidant capacity of limonin,nomilin,and limonin glucoside[J]. J Agric Food Chem,2006,54(11):3827.

[6] Maneerat W,Laphookhieo S,Koysomboon S, et al. Antimalarial,antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*[J]. Phytomedicine,2008,15(12):1130.

[7] Kim W,FAN Y Y,Smith R,et al. Dietary curcumin and limonin suppress CD4⁺ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice[J]. J Nutr,2009,139(5):1042.

[8] Manners G D,Jacob R A,Schoch T K,et al. Bioavailability of citrus limonoids in humans[J]. J Agric Food Chem,2003,51(14):4156.

[9] TIAN Q G,Kent K D,Bomser J A,et al. Characterization of limonin glucoside metabolites from human prostate cell culture medium using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2004,18(24):3099.

[10] LIANG Y,XIE L,LIU X D, et al. Determination of limonin in rat plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed,2005,39(5):1031.

[11] 张军霞,仲平,卢来春. 克林霉素磷酸酯乳膏的制备与质量控制[J]. 中国药房,2010,21(21):1979.

[责任编辑 全燕]