

HPLC 法测定姜黄素-槲皮素复方自微乳的载药量和包封率

黄瑞雪 黎翊君 茅玉炜 刘乐环 王渐鸿 余家齐 戴俊东 (北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定姜黄素-槲皮素复方自微乳(CUR-QUE-SMEDDS)的载药量和包封率。**方法:** 采用离心法分离游离药物,HPLC 法测定药物含量。色谱柱:Purospher STAR LP C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈-4%冰醋酸(50:50),流速:1.0 ml·min⁻¹,检测波长:370 nm,柱温:30℃,进样量:10 μl。**结果:** 姜黄素和槲皮素的线性范围分别为 10.728~96.552 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 8)和 1.08~9.72 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 9),平均回收率分别为 99.98% (*RSD* = 1.46%, *n* = 9)和 100.34% (*RSD* = 1.06%, *n* = 9)。CUR-QUE-SMEDDS 中姜黄素和槲皮素的包封率分别为 (95.97±0.50)% 和 (95.91±2.52)%,载药量分别为 (25.82±0.15)mg·g⁻¹和 (1.80±0.05)mg·g⁻¹。**结论:** 该法准确可靠,快速简便,适用于测定 CUR-QUE-SMEDDS 的载药量和包封率。

关键词 姜黄素;槲皮素;复方自微乳;高效液相色谱法;载药量;包封率

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2017)04-0664-04

Determination of the Entrapment Efficiency and Drug Loading Capacity of Curcumin and Quercetin Loaded Self-microemulsifying Drug Delivery System

Huang Ruixue, Li Yijun, Mao Yuwei, Liu Lehuan, Wang Jianhong, Yu Jiaqi, Dai Jundong (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method to determine the entrapment efficiency (EE) and drug loading (DL) of curcumin (CUR) and quercetin (QUE) loaded self-microemulsifying drug delivery system. **Methods:** A centrifugation method was used to isolate the free drug. The content of drug was determined by HPLC. The analytical column was a Purospher STAR LP C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and the column temperature was 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-4% acetic acid (50:50) and the flow rate was 1.0 ml·min⁻¹. The UV detection wavelength was set at 370 nm and the injection volume was 10 μl. **Results:** CUR and QUE were linear within the range of 10.728-96.552 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 8) and 1.08-9.72 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 9), respectively. The average recovery was 99.98% (*RSD* = 1.46%, *n* = 9) and 100.34% (*RSD* = 1.06%, *n* = 9), respectively. In CUR-QUE-SMEDDS, the EE of curcumin and quercetin was (95.97±0.50)% and (95.91±2.52)%, and the DL was (25.82±0.15) mg·g⁻¹ and (1.80±0.05)mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method is accurate, rapid and simple, and suitable for the determination of DL and EE in CUR-QUE-SMEDDS.

KEY WORDS Curcumin; Quercetin; Self-microemulsifying drug delivery system; HPLC; Entrapment efficiency; Drug loading

姜黄素 (Curcumin, CUR) 是一种从姜科植物姜黄、郁金等的根茎中提取的天然生物活性成分,具有显著的抗炎^[1]、抗氧化^[2]等药理活性,在溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的治疗^[3]方面表现出良好的效果。但由于其水溶性和稳定性较差,易在肠道发生葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphate glucuronosyl transferase, UGT) II 相代谢^[4],限制了其临床应用及开发。更有研究^[5,6]表明,溃疡性结肠炎的炎症部位存在 UGT 高表达和活性增强现象,会进一步加速姜黄素的代谢失活,进而影响其抗炎疗效的发挥。

槲皮素 (quercetin, QUE) 是一种多羟基黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化、免疫调节等药理作用^[7,8]。研究表明,槲皮素可以通过抑制核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB) 信号通路^[9]、提高免疫反应调节的过氧化物酶体增殖物激活受体 (per-

oxisome proliferator-activated receptor γ, PPAR-γ), 减少环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导性一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达发挥抗炎作用^[10,11], 并且能够通过对肠黏膜葡萄糖醛酸转移酶 UGT 1A8 和 UGT 1A10 的抑制作用降低姜黄素的 II 相代谢^[12]。

本研究通过制备姜黄素-槲皮素复方自微乳 (CUR-QUE-SMEDDS), 以增加疏水药物姜黄素和槲皮素在肠道中的溶解度,改善其在炎症表面分布,提高姜黄素在肠粘膜表面的稳定性,发挥两者的协同抗炎效果,从而增强对溃疡性结肠炎的治疗效果。CUR-QUE-SMEDDS 制剂中药物的载药量和包封率直接影响其对疾病的治疗效果,本文建立了一种同时检测 CUR-QUE-SMEDDS 中姜黄素和槲皮素的 HPLC 方法,为制剂的质量评价与工艺优化奠定基础。

基金项目:北京中医药大学自主选题项目 (编号:2016-JYB-XS072)

通讯作者:戴俊东 Tel: (010)84738616 E-mail: daijd@163. com

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪,包括 SIL-20A 自动进样器、SPD-20A 紫外检测器、CTO-10AS 柱温箱(日本岛津公司);BT125D 型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];501 A 型超级恒温水浴器(上海实验仪器有限公司);KH-7200DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);RT10 Power IKA ㉔-WERKE 型多点加热磁力搅拌器(上海大迈仪器有限公司);DL-5-B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

姜黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110823-201004,含量:≥98%);槲皮素对照品(陕西慈缘生物技术有限公司,批号:20100912,含量: >98%);姜黄素原料药(天津市福晨化学试剂厂,批号:20140324,含量:95%);槲皮素原料药(四川协力制药有限公司,批号:C004C150503,含量:96%);丙二醇单辛酸酯(Capryol 90,法国嘉法赛公司,批号:144603);二乙二醇单乙基醚(Transcutol HP,法国嘉法赛公司,批号:143339);聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH40,德国 BASF 公司,批号:87712168E0);乙腈、甲醇(色谱纯,Fisher 公司);水为纯化水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CUR-QUE-SMEDDS 的制备

取 Cremophor RH 40 6.0 g, Transcutol HP 3.0 g, Capryol 90 1.0 g,精密称定,置于 50 ml 烧杯中,在 70℃ 下 $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌 10 min,得空白自微乳;精密称取空白自微乳 1.0 g,分别加入姜黄素 30 mg、槲皮素 3 mg,在 37℃ 下 $50\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌 15 min 使之完全溶解,得 CUR-QUE-SMEDDS。

2.2 姜黄素和槲皮素的 HPLC 检测方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Purospher STAR LP C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-4% 冰醋酸(50:50),流速: $1.0\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长:370 nm,柱温:30℃,进样量:10 μl。

2.2.2 溶液的制备

2.2.2.1 姜黄素和槲皮素对照品储备液 取姜黄素对照品 8.94 mg 和槲皮素对照品 0.9 mg,精密称定,分别置于 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得姜黄素对照品储备液(浓度约为 $894.00\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)和槲皮素对照品储备液(浓度约为 $90.00\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

2.2.2.2 姜黄素和槲皮素对照品溶液 精密量取姜黄素对照品储备液 1 ml 和槲皮素对照品储备液 1 ml,分别置于 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得姜黄素对照品溶液(浓度约为 89.40

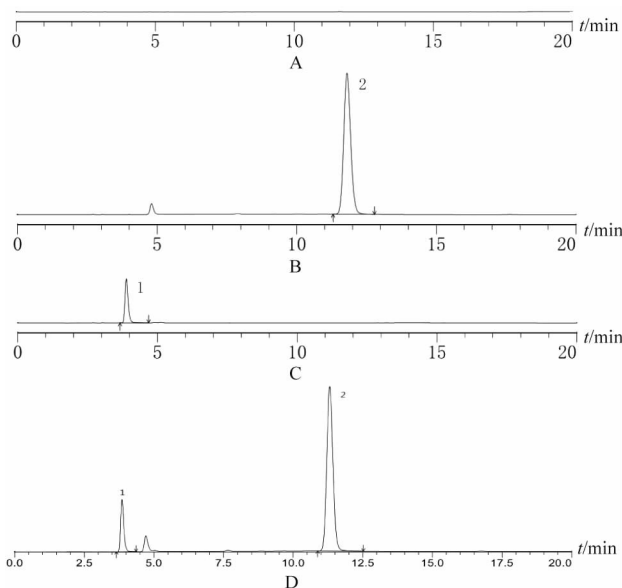
$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)和槲皮素对照品溶液(浓度约 $9.00\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

2.2.2.3 姜黄素-槲皮素混合对照品储备液 精密量取上述姜黄素对照品储备液 3 ml 和槲皮素对照品储备液 3 ml,置于同一 25 ml 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(姜黄素浓度为 $107.28\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,槲皮素浓度为 $10.80\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

2.2.2.4 供试品溶液 取 CUR-QUE-SMEDDS 25.00 mg,精密称定,置于 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,超声(200 W, 40 kHz) 10 min,精密量取 2 ml,置于 5 ml 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得供试品溶液。

2.2.2.5 阴性样品溶液 取不含药物的空白自微乳约 25.00 mg,精密称定,置 10 ml 棕色量瓶中,按“2.2.2.4”项下方法制得阴性样品溶液。

2.2.3 系统适用性试验 分别取阴性样品溶液、供试品溶液、姜黄素对照品溶液和槲皮素对照品溶液注入液相色谱仪,依法检测,记录色谱图(图 1)。结果表明,姜黄素和槲皮素峰形良好,保留时间分别为 11.899 min 和 3.898 min,理论塔板数分别为 10 459 和 5 883,均不低于 5 000,表明分离度良好,空白自微乳对主峰无干扰。



A. 阴性样品 B. 姜黄素对照品 C. 槲皮素对照品

D. 供试品 1. 槲皮素 2. 姜黄素

图 1 HPLC 色谱图

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取姜黄素-槲皮素混合对照品储备液 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 4.5 ml, 置于 5 ml 棕色量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,制成一系列混合对照品溶液。分别取上述溶液注入液相色谱仪,依法检测。以药物浓度为横坐标($X, \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$),峰面积为纵坐标(Y)进行线性拟合,计算得 CUR 和 QUE 的回归方程分别为: $Y = 2.99 \times 10^4 X - 6.74 \times 10^4$ ($r = 0.9998$) 和 $Y = 3.98 \times 10^4 X -$

8 680.2($r = 0.999\ 9$)。结果表明,CUR 和 QUE 分别在10.728 ~96.552 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和1.08 ~9.72 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.2.5 重复性试验 取 CUR-QUE-SMEDDS,照“2.2.2.4”项下方法制备 6 份供试品溶液,依法检测。测得 CUR 的平均含量为(32.08 ±0.52) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为1.62% ($n = 6$);QUE 的平均含量为(3.06 ±0.04) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为1.46% ($n = 6$);结果表明方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10 h 依法进样检测,计算得 CUR 和 QUE 峰面积的 RSD 均为0.02% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温避光条件下 10 h 内稳定性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取姜黄素对照品 10.0 mg和槲皮素对照品 1 mg,置于 50 ml 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制备回收率用混合对照品溶液(姜黄素浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,槲皮素浓度为 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$);然后取已知含量的 CUR-QUE-SMEDDS 25 mg,精密称定,平行 9 份,置于 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 ml,置于 5 ml 棕色量瓶中,分别加入混合对照品溶液0.4,0.6,0.8 ml,每个浓度平行操作 3 份,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成低、中、高 3 种浓度的混合溶液,依法检测,计算得姜黄素和槲皮素的平均回收率分别为99.98% ($RSD = 1.46\%$, $n = 9$)和 100.34% ($RSD = 1.06\%$, $n = 9$)。结果表明回收率均符合要求,方法的准确性良好。

2.3 CUR-QUE-SMEDDS 载药量和包封率的测定

取 CUE-QUE-SMEDDS 25 mg,精密称定,照“2.2.2.4”项下方法制备供试品溶液,依法进样检测,得到药物的含量 W_1 。取 CUE-QUE-SMEDDS 0.1 g,精密称定,置 5 ml 棕色量瓶中,加 37℃的纯化水溶解并稀释至刻度,摇匀,使自乳化浓缩液在外界动力下形成乳液,取约 4 ml,置于 5 ml 离心管中,4 500 ×g、4℃离心 20 min,精密量取上清液 1 ml,置于 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇适量,超声(200 W,40 kHz)助溶 10 min,冷却至室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀,依法进样检测,得到药物的含量 W_2 。按照下列公式计算载药量和包封率:

载药量(%) = $W_2 \times 100\%$

包封率(%) = $W_2 / W_1 \times 100\%$

结果如表 1 所示。

表 1 载药量和包封率检测结果($n = 3$)

批次	载药量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		包封率(%)	
	姜黄素	槲皮素	姜黄素	槲皮素
1	25.95	1.73	96.54	93.86
2	25.86	1.80	95.77	98.72
3	25.66	1.83	95.61	95.15
平均	25.82 ±0.15	1.80 ±0.05	95.97 ±0.50	95.91 ±2.52

3 讨论

在检测波长的选取上,分别对姜黄素和槲皮素对照品的甲醇溶液进行紫外扫描,结果显示,姜黄素和槲皮素分别在 423 nm 和 371 nm 波长处有最大吸收,与多数文献^[13,14]报道基本一致。考虑到样品中槲皮素含量较低,峰面积较小;而姜黄素在样品中的含量较高,在 370 nm 处亦有较大吸收,可以满足检测要求,且杂质干扰小,灵敏度较高,可达到理想的检测效果,因此本试验选择 370 nm 为检测波长,在同一色谱条件下同时测定姜黄素和槲皮素的含量。

在选择流动相时,根据多数文献^[15,16],最终采用乙腈-醋酸水溶液系统,通过调节流动相比比例,最终优选出乙腈-4% 醋酸水溶液(50 :50),在该流动相比比例条件下姜黄素的保留时间与姜黄素对照品保留时间一致,又能实现与槲皮素的完全分离(分离度 >1.5),峰形对称,保留时间适中,无杂质峰干扰,检测结果准确、可靠,且辅料对主药的检测无干扰。采用 HPLC 法同时检测姜黄素和槲皮素的含量,专属性强,准确度高,线性关系及重复性良好,测定溶液稳定,方法简便、高效,适合本复方自微乳中姜黄素和槲皮素的含量测定。

包封率的测定方法根据药物性质和载体不同,主要有凝胶柱层析法^[17]、超速离心法、透析法^[18]等。本研究中 CUE-QUE-SMEDDS 的药物成分姜黄素和槲皮素均为疏水性药物,几乎不溶于水(姜黄素溶解度约为 11 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[19,20];槲皮素溶解度约为 90 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[21])。取 CUE-QUE-SMEDDS 加水稀释 50 倍后,采用玻璃离心管 4 500 ×g 离心 20 min 能够实现游离药物和微乳的有效分离,又可最大限度地减少塑料制品对姜黄素和槲皮素的吸附,减少检测误差,操作简便、省时,成本低。

试验结果表明该色谱方法准确可靠、简单快速,可用于 CUR-QUE-SMEDDS 中姜黄素、槲皮素的包封率和载药量的检测,为后期处方工艺研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

1 Ni HB,Jin W,Zhu TS. Curcumin modulates TLR4/NF-κB inflammatory signaling pathway following traumatic spinal cord injury in rats[J]. J Spinal Cord Med, 2015, 38(2): 199-206

2 Ghalandarlari N, Alizadeh AM, Ashkani-Esfahani S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:1-23

3 Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions[J]. Anticancer Res, 2001, 21(4B): 2895-2900

4 Hoehle SI, Pfeiffer E, Metzler M. Glucuronidation of curcuminoids by human microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases[J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(8): 932-938

5 Sharma V, Nehru B, Munshi A, et al. Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylene-tetrazol in epileptic rats[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2010, 32(4):227-232

- 6 Suresh D, Srinivasan K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats[J]. Indian J Med Res, 2010, 131(5): 682-691
- 7 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88
- 8 Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JC, et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? [J]. Redox Biol, 2015, 6: 617-639
- 9 Han M, Song Y, Zhang X. Quercetin Suppresses the Migration and Invasion in Human Colon Cancer Caco-2 Cells Through Regulating Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Pathway [J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12(Suppl 2): S237-S244
- 10 Endale M, Park SC, Kim S, et al. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells[J]. Immunobiology, 2013, 218(12): 1452-1467
- 11 Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, et al. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 1-15
- 12 杨婷玉, 刘亚妮, 师少军. 槲皮素对药物代谢酶调控作用的研究进展[J]. 中国药师, 2016, 19(3): 555-559
- 13 Ang LF, Yam MF, Fung YT, et al. HPLC Method for Simultaneous Quantitative Detection of Quercetin and Curcuminoids in Traditional Chinese Medicines[J]. J Pharmacopuncture, 2014, 17(4): 36-49
- 14 Tan BJ, Liu Y, Chang KL, et al. Perorally active nanomicellar formulation of quercetin in the treatment of lung cancer[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 651-661
- 15 邓俊刚, 马林, 杨春晓, 等. 高效液相色谱法测定姜黄素清蛋白纳米粒中药物含量与包封率[J]. 医药导报, 2013, 32(7): 936-938
- 16 许贵军, 李迪, 吴宏娟. 抗癌灵缓释滴丸中姜黄素和槲皮素含量测定[J]. 科技传播, 2013, (15): 117-118
- 17 张林, 韩丽妹, 王建新. HPLC-ELSED 法测定载银杏内酯 B 的 PEG-PLGA 纳米粒的包封率和载药量[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 21(3): 137-140
- 18 盛欢欢, 杨涛, 李岩. HPLC 法测定穿心莲总内酯固体脂质纳米粒载药量与包封率[J]. 中成药, 2012, 34(3): 458-462
- 19 Yu HL, Huang QR. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch [J]. Food Chem, 2010, 119(2): 669-674
- 20 Kaminaga Y, Nagatsu A, Akiyama T, et al. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of Catharanthus roseus [J]. FEBS letters, 2003, 555(2): 311-316
- 21 陈丽娜, 任晓亮, 刘亚男. 槲皮素平衡溶解度的测定及热力学计算[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1006-1009

(2016-11-15 收稿 2016-12-19 修回)