

· 研究报告 ·

复方自微乳中姜黄素和胡椒碱的体外释放研究

任金妹, 李 曼, 王 晶, 顾申勇 (复旦大学附属中山医院青浦分院, 上海 201700)

[摘要] 目的 考察复方自微乳中姜黄素和胡椒碱的体外释放行为。方法 采用动态透析法, 分别以 pH 值为 4.8、7.5 的磷酸盐缓冲液并加入 0.75% 吐温-80 作为漏槽条件, 考察姜黄素和胡椒碱的体外释放特性。结果 姜黄素在 pH 4.8 和 pH 7.5 释放介质中 108 h 累积释放百分率分别为 94.85% 和 84.38%。胡椒碱在上述介质中 36 h 累积释放率分别为 92.85% 和 90.05%。结论 自微乳制剂中姜黄素和胡椒碱具有缓释特性, 且在肿瘤酸性环境中释放更多。

[关键词] 姜黄素; 胡椒碱; 复方自微乳; 体外释放; 缓释

[中图分类号] R943

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2022)01-0066-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202009090

In vitro release study on self-microemulsion of curcumin and piperine

REN Jinmei, LI Man, WANG Jing, GU Shenyong (Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China)

[Abstract] **Objective** To study the release profile of curcumin and piperine from the compound self-microemulsion. **Methods** The release of curcumin and piperine in vitro was investigated by dynamic dialysis under the condition of phosphate buffer of pH 4.8 and 7.5 with 0.75% Tween-80. **Results** The cumulative release rates of curcumin in pH 4.8 and pH 7.5 were 94.85% and 84.38% in 108 h, respectively. The cumulative release rates of piperine were 92.85% and 90.05% in 36 h, separately. **Conclusion** Curcumin and piperine in self-microemulsion have sustained release properties and released more in the acidic environment similar to the environment in tumors.

[Key words] curcumin; piperine; self-microemulsifying drug delivery; in vitro release; sustained release

姜黄素 (Cur) 是从姜科姜黄属植物中提取的多酚类化合物, 由于安全无毒, 被 WHO 和 FDA 批准为天然食品添加剂。姜黄素具有抗炎、抗肿瘤、抗抑郁等药理作用^[1-2], 但由于水中溶解度小, 口服难吸收, 且在肠道易转化, 目前仍处于临床实验阶段。如何提高姜黄素在体内的生物利用度是近年来的研究热点, 包括研制新剂型、改变其化学结构及联用生物利用度增强剂^[3-4]。胡椒碱 (Pip) 可作用于 P-gp, 通过调节胃肠道分泌等机制来增强其他药物的生物利用度^[5]。姜黄素与佐剂胡椒碱的联用是近几年的研究热点, 胡椒碱不仅能够改善姜黄素生物利用度, 还具有药理作用上的协同效果。自乳化药物传递系统 (SMEDDS) 由药物、油相、表面活性

剂和助表面活性剂组成, 在体内胃肠道温和蠕动下能够自发形成微乳^[6], 通过增加难溶性药物的溶解度, 从而促进药物在体内的吸收。

姜黄素与胡椒碱比例在各参考文献中不同, 本研究项目结合参考文献后尝试不同梯度的质量比, 以稳定性和载药量为指标, 最终优选姜黄素和胡椒碱的质量比为 4 : 1。本研究将姜黄素和胡椒碱同时包裹于自微乳制剂中, 制备成复方自微乳制剂 (Cur+Pip)-SMEDDS, 旨在提高姜黄素的溶解度和生物利用度。笔者建立了复方姜黄素自微乳制剂中姜黄素和胡椒碱含量的 HPLC 测定法, 考察药物的体外释放行为, 为姜黄素和胡椒碱的新剂型研究提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪; AG285 型电子天平 (Mettler Toledo 公司); KQ32(X)E 医用超声波清洗器; HJ-1 磁力搅拌器 (常州荣华仪器制造有限公司); PHSJ-4F 型实验室 pH 计 (上海仪电科

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题计划资助 (20174y0064); 上海市青浦区科技发展基金项目 (QKY2019-18); 青浦区卫生健康系统第四轮人才培养 (WY2019-17)

[作者简介] 任金妹, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向: 临床药学、药剂学, Email: renjinmei1988@163.com

[通信作者] 顾申勇, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, Email: gusy5555@163.com

学仪器有限公司); SHA-C 恒温水浴振荡器(金坛市国旺实验仪器厂)。

1.2 药材与试药

胡椒碱原料药(含量 98%, 陕西西安兰草生物科技有限公司); 胡椒碱对照品(纯度>99%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110775-201706); 姜黄素原料药(含量 95%, 陕西西安兰草生物科技有限公司); 姜黄素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110823-201706, 纯度>99%); 透析袋(截留分子量 14000, 西安罗森伯科技有限公司); pH=4.8、7.5 PBS 缓冲液; 吐温-80(天津市科密欧化学试剂开发中心); 甲醇、乙腈(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 水为超纯水; 其他试剂均为市售分析纯。复方姜黄素自微乳制剂及空白自微乳均为自制。

2 方法与结果

2.1 复方姜黄素自微乳制剂的制备

按照处方称取油酸乙酯: 吐温-80: 二乙二醇单乙基醚(Transcutol P)=30%: 55%: 15%, 置于 50 ml 烧杯中, 25 °C 超声混匀后, 得到空白自微乳制剂。称取适量空白自微乳制剂, 按照姜黄素 40 mg/g, 胡椒碱 10 mg/g 加入原料药, 于 30 °C 超声混合, 至药物完全溶解, 得到含姜黄素和胡椒碱的复方姜黄素自微乳制剂 (Cur+Pip)-SMEDDS, 外观见图 1。取本品约 1.0 g, 加水稀释至 10 ml, 使用 pH 计测定自乳化制剂 pH 值。空白自乳化制剂 pH 值为 5.37; 载药自乳化制剂 pH 值为 4.97。



图 1 空白自微乳溶液(左)和 (Cur+Pip)-SMEDDS 溶液(右)

2.2 复方姜黄素自微乳制剂的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil™ C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 4% 冰醋酸溶液=48: 52(V/V); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 °C; 姜黄素检测波长: 430 nm; 胡椒碱检测波长: 343 nm; 进样量: 20 μl。

2.2.2 溶液的制备

对照品溶液: 取姜黄素和胡椒碱对照品各约 10.0 mg, 精密称定, 置于 10 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配成 1.0 mg/ml 的标准母液备用。

样品溶液: 吸取适量 (Cur+Pip)-SMEDDS 溶液于 10 ml 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后稀释 10 倍作为样品溶液。

空白溶液: 吸取适量空白自微乳制剂于 10 ml 量瓶中, 按照样品溶液的配制方法处理, 作为不含药物的阴性样品溶液。

2.2.3 专属性试验

分别精密吸取空白微乳溶液、姜黄素和胡椒碱对照品溶液和 (Cur+Pip)-SMEDDS 样品溶液各 20 μl, 按照“2.2”项下依法操作, 记录色谱图, 考察辅料是否对药物的测定存在干扰。结果表明, 在此条件下, 高效液相色谱法专属性强, 辅料不干扰药物的测定(图 2)。

2.2.4 线性范围的考察

姜黄素的线性关系: 精密吸取姜黄素母液 10、100 μl, 1、2、4、6、8 ml 于 100 ml 量瓶中, 加流动相定容后混匀, 配制成系列浓度为 0.1、1.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 μg/ml 的姜黄素标准液。吸取胡椒碱母液 10、20、100 μl, 0.5、1、2、4 ml 于 100 ml 量瓶中, 配制成系列浓度为 0.1、0.2、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 μg/ml 的标准液。按照“2.2.1”项下依法操作, 记录姜黄素和胡椒碱峰面积。以峰面积为纵坐标, 以浓度为横坐标绘制标准曲线, 求得回归方程。

姜黄素: $Y=36.07X-12.75$, ($n=7$, $r=0.9998$);

胡椒碱: $Y=34.296X+4.4423$, ($n=7$, $r=0.9999$)。

结果表明, 姜黄素在 0.1 ~ 80 μg/ml 浓度范围内, 胡椒碱在 0.1 ~ 40 μg/ml 浓度范围内, 峰面积与测定浓度呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验

分别精密吸取适量姜黄素和胡椒碱低、中、高 3 种浓度的药物溶液, 进行 HPLC 分析。于 1 d 内重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算日内精密度。连续进样 5 d, 测定峰面积, 计算日间精密度。姜黄素和胡椒碱的日内、日间精密度 RSD 均 < 2.0% ($n=6$)。说明该方法精密度良好, 满足测定的要求。

2.2.6 稳定性试验

取供试品溶液 (Cur+Pip)-SMEDDS, 分别于 0、2、4、6、8、12、24、48 h 进样测定, 测定峰面积, 计算 RSD 以考察供试品稳定性。结果显示姜黄素和胡椒碱在 48 h 内 RSD 分别为 1.7% 和 1.75%, 表明

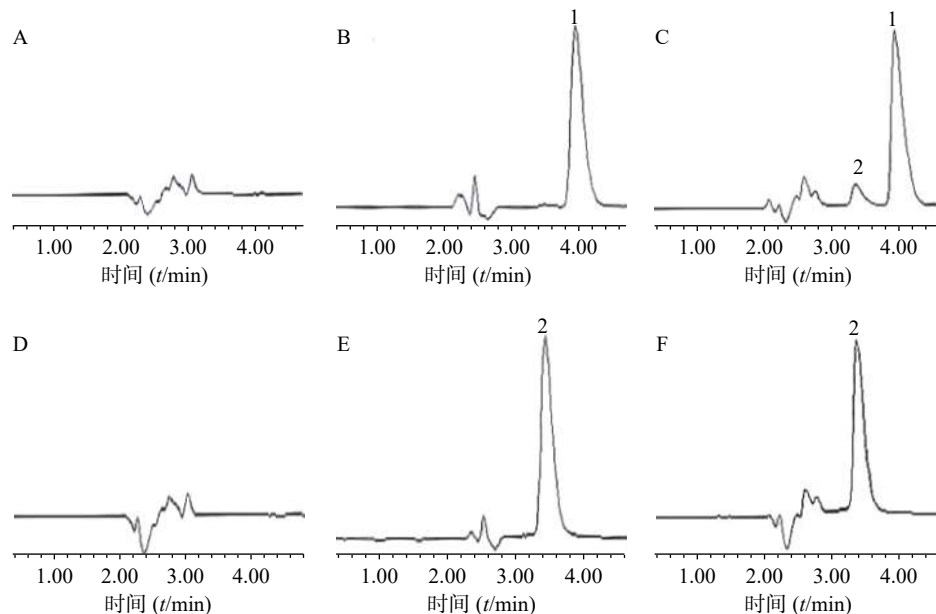


图 2 不同波长条件下复方自微乳 HPLC 图

A.空白微乳; B.Pip 对照品; C.(Cur+Pip)-SMEDDS; D.空白微乳; E.Cur 对照品; F.(Cur+Pip)-SMEDDS; 1.胡椒碱; 2.姜黄素
注: A、B、C 检测波长 343 nm; D、E、F 检测波长 427 nm。

供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验

取 3 批样品 (批号: 20190604、20190608、20190612), 按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 姜黄素平均含量为 81.6 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 0.82% ($n=6$); 胡椒碱平均含量为 14.58 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 0.76% ($n=6$), 结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 回收率试验

精密称取已知含量的同一批复方姜黄素自微乳样品 (批号: 20190612) 9 份, 约 28 mg, 分别准确加入对照品溶液 (其中, 姜黄素 10 $\mu\text{g/ml}$, 胡椒碱 5 $\mu\text{g/ml}$) 为 5、25、50 ml 各 3 份, 稀释定容至 100 ml, 按照“2.2”项下依法测定。结果显示, 低、中、高 3 个浓度的姜黄素和胡椒碱溶液在空白自微乳中的回收率在 98.0% ~ 102.0% 之间, 结果表明回收率满足分析方法的要求, 表明该方法准确性良好。

2.2.9 样品含量测定

分别取 3 批不同批号 (20190604、20190608、20190612) 的样品, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 依法测定峰面积, 计算样品中姜黄素和胡椒碱的含量, 见表 1。

2.3 复方自微乳制剂的体外释放行为考察

2.3.1 漏槽条件的建立

由于姜黄素和胡椒碱溶解度低, 因此选择合适的表面活性剂置于透析液中, 通过增加药物的溶解度来建立体外释放的漏槽条件。将不同浓度乙醇、吐温-80、十二烷基硫酸钠 (SDS) 加到磷酸盐缓冲

表 1 3 批自微乳制剂的含量测定结果

批号	姜黄素 ($\mu\text{g/ml}$)	胡椒碱 ($\mu\text{g/ml}$)
20190604	81.64	14.52
20190608	80.72	13.78
20190612	81.96	14.95
均值	81.34 $\pm$ 0.056	14.42 $\pm$ 0.068
RSD (%)	0.96	1.15

溶液中, 加入过量的药物, 放入恒温水浴箱中振荡, 72 h 后离心取上清液进 HPLC 仪, 计算药物饱和溶解度, 见表 2。

结果显示药物在 0.75% 吐温-80 中溶解度较大且稳定性良好, 故选择加入 0.75% 吐温-80 的磷酸盐缓冲液作为漏槽条件。

2.3.2 复方自微乳制剂的体外释放行为考察

吸取 3 ml 复方自微乳溶液装于透析袋中, 将透析袋置于 200 ml 释放介质中 ($n=3$), 于 37.2 $^{\circ}\text{C}$, 100 次/min 振荡的条件下进行药物体外释放行为的考察。分别于不同时间点取 3 ml 释放介质, 过滤后使用 HPLC 测定药物浓度, 同时补充相同体积的空白介质。根据 HPLC 法进行含量测定, 计算药物浓度及累积释放率 (Q)。结果见图 3、图 4。

由于肿瘤微环境呈酸性, pH 值较低, 本研究使用 pH 4.8 的释放介质来模拟肿瘤环境。由图可知, 药物在 pH 4.8 酸性环境中释放更完全, 表明该自微乳制剂中的药物能够在肿瘤部位释放。姜黄素在 pH 4.8 和 pH 7.5 释放介质中 108 h 累积释放率分

表 2 不同溶出介质中姜黄素和胡椒碱的溶解度

释放介质	溶解度(mg/ml)	
	姜黄素	胡椒碱
10% 乙醇	0.104	0.094
20% 乙醇	0.245	0.136
30% 乙醇	0.312	0.198
磷酸盐缓冲液	0.08×10^{-3}	0.03×10^{-3}
0.05%吐温-80	0.016	0.015
0.2%吐温-80	0.085	0.064
0.5%吐温-80	0.199	0.095
0.75%吐温-80	0.332	0.260
0.05%SDS	0.044	0.052
0.2%SDS	0.085	0.092
0.5%SDS	0.108	0.312
0.75%SDS	0.198	0.485

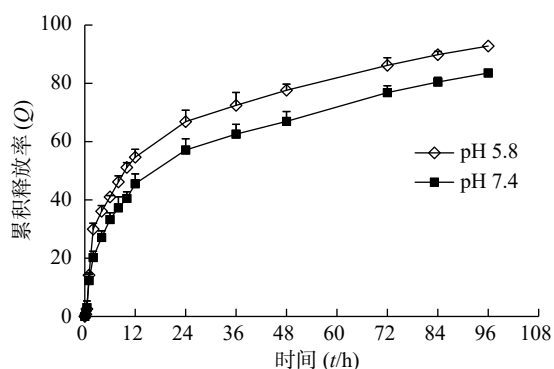


图 3 姜黄素在不同溶出介质中的释放曲线图

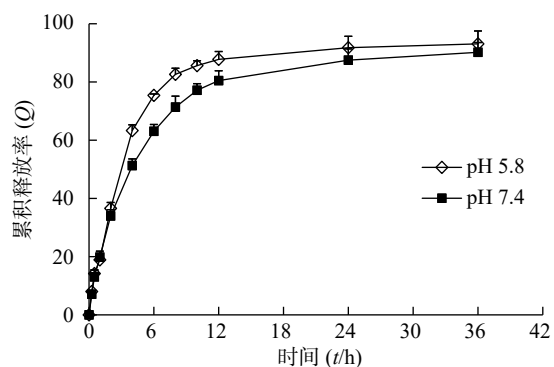


图 4 胡椒碱在不同溶出介质中的释放曲线图

别为 94.85% 和 84.38%。胡椒碱比姜黄素释放更完全,可能由于胡椒碱在 0.75% 吐温-80 中的溶解度较高,因此释放量较多。胡椒碱在 pH 4.8 和 pH 7.5 释放介质中 36 h 累积释放率分别为 92.85% 和 90.05%。36 h 后,在释放介质中几乎测定不到胡椒碱,而姜黄素能够缓慢释放到 108 h。结果表明自微乳制剂具有缓释特性,能够缓慢释放姜黄素。

3 讨论

姜黄素具有明确的抗肿瘤效果,但是其水溶性差,体外不稳定等缺点限制了临床应用。本研究将姜黄素和其代谢酶抑制剂胡椒碱制备成自微乳制剂,增加了姜黄素的溶解度以及生物利用度。本研究建立的反相高效液相色谱法能够在同一色谱条件下测定 (Cur+Pip)- SMEDDS 中姜黄素和胡椒碱的含量,该方法专属性良好、精密度、重复性和准确性均能够满足测定要求。本研究制备的自微乳制剂能够缓慢释放姜黄素和胡椒碱,发挥长效作用,避免突释效应,为进一步体内研究奠定理论基础。

3.1 方法学的建立

本研究中姜黄素和胡椒碱的浓度相差较大及仪器的限制,排除使用紫外分光光度法,选择反相高效液相色谱法同时测定药物含量。为了能够高效检测,本研究采用在同一色谱条件下,不同波长 (430 和 343 nm) 条件下对姜黄素和胡椒碱进行测定^[7]。本研究考察多种不同流动相后,结合参考文献 [8],优选乙腈-4% 冰醋酸溶液 (48 : 52) 作为测定两种药物的流动相。结果显示,在该色谱条件下姜黄素衍生物去甲氧基和双去甲氧基姜黄素不干扰姜黄素的测定,同时,姜黄素和胡椒碱的色谱峰可以达到较好的分离,该方法的精密度、回收率等均符合测定要求,可以用来测定自微乳中的药物含量。

3.2 体外释放的考察

通过体外释放行为的考察,证实该制剂具有一定的缓释特性。释放结果显示前 30 min 存在一定的突释效应,可能是微乳表面的游离药物迅速释放到介质中,造成了突释^[9],而胡椒碱的体外突释现象更为明显,与其具有较低的载药量相关,胡椒碱载药量低导致微乳表面具有较多的游离药物。两种药物均显示出在酸性环境中释放较完全,由此推测,在进行抗肿瘤疗效研究时,在酸性的肿瘤部位释放药物较多,具有一定靶向作用,从而能够发挥持久的抗肿瘤效果。但体内和体外研究可能具有差异性,需要进一步进行体内研究来证实其缓释以及靶向作用^[10]。

4 结论

本研究建立的 HPLC 方法学专属性好,精密度和回收率均满足测定方法的要求。制备的 (Cur+Pip)-SMEDDS 具有缓释特性,且在肿瘤的酸性环境下释放较正常组织中更多,为进一步进行体内试

(下转第 75 页)

- 2004, 24(20): 4832-4839.
- [12] HAINS B C, KLEIN J P, SAAB C Y, et al. Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(26): 8881-8892.
- [13] GONZÁLEZ-CANO R, TEJADA M Á, ARTACHO-CORDÓN A, et al. Effects of tetrodotoxin in mouse models of visceral pain[J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(6): E188.
- [14] 于丽华, 周力, 谢克勤. 河豚毒素对小鼠镇痛作用的实验研究[J]. 山东医科大学学报, 1999, 37(2): 120-121, 126.
- [15] 徐英, 耿兴超, 韩继生, 等. 河豚毒素单用及与吗啡合用对大鼠福尔马林致痛的影响[J]. *中国海洋药物*, 2003, 22(2): 39-41, 56.
- [16] MARCIL J, WALCZAK J S, GUINDON J, et al. Antinociceptive effects of tetrodotoxin (TTX) in rodents[J]. *Br J Anaesth*, 2006, 96(6): 761-768.
- [17] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [18] KAYSER V, VIGUIER F, IOANNIDI M, et al. Differential anti-neuropathic pain effects of tetrodotoxin in sciatic nerve-versus infraorbital nerve-ligated rats - Behavioral, pharmacological and immunohistochemical investigations[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2): 474-487.
- [19] ENTRENA J M, COBOS E J, NIETO F R, et al. *Sigma*-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective *Sigma*-1 ligands and *Sigma*-1 knockout mice[J]. *Pain*, 2009, 143(3): 252-261.
- [20] NIETO F R, ENTRENA J M, CENDÁN C M, et al. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice[J]. *Pain*, 2008, 137(3): 520-531.
- [收稿日期] 2021-05-10 [修回日期] 2021-05-10
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 69 页)

验奠定了理论基础。本实验只对复方自微乳制剂的体外释放做了研究, 体内试验还需进一步考察。

【参考文献】

- [1] MBESE Z, KHWAZA V, ADERIBIGBE B A. Curcumin and its derivatives as potential therapeutic agents in prostate, colon and breast cancers[J]. *Molecules*, 2019, 24(23).
- [2] SALEHI M, MOVAHEDPOUR A, TAYARANI A, et al. Therapeutic potentials of curcumin in the treatment of non-small-cell lung carcinoma[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(10): 2557-2576.
- [3] 任金妹, 李曼, 谢宁, 等. 提高姜黄素口服生物利用度方法的研究进展[J]. *中国药房*, 2018, 29(23): 3303-3308.
- [4] KARTHIKEYAN A, SENTHIL N, MIN T. Nanocurcumin: a promising candidate for therapeutic applications[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 487.
- [5] TANG J L, JI H Y, REN J M, et al. Solid lipid nanoparticles with TPGS and Brij 78: a co-delivery vehicle of curcumin and piperine for reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *in vitro*[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 389-395.
- [6] PANDEY V, KOHLI S. Lipids and surfactants: the inside story of lipid-based drug delivery systems[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2018, 35(2): 99-155.
- [7] 李秋萍, 戴俊东, 翟文文, 等. 单纯形网格法优化设计姜黄素-胡椒碱复方自微乳制剂处方[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(20): 3936-3944.
- [8] 任金妹. 载姜黄素和胡椒碱固体脂质纳米粒给药系统的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨医科大学, 2014.
- [9] KAZI M, SHAHBA A A, ALRASHOUD S, et al. Bioactive self-nanoemulsifying drug delivery systems (bio-SNEDDS) for combined oral delivery of curcumin and piperine[J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1703.
- [10] SLIKA L, MOUBARAK A, BORJAC J, et al. Preparation of curcumin-poly (allyl amine) hydrochloride based nanocapsules: piperine in nanocapsules accelerates encapsulation and release of curcumin and effectiveness against colon cancer cells[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 109: 110550.
- [收稿日期] 2020-09-27 [修回日期] 2021-03-23
[本文编辑] 李睿旻