

姜黄素自纳米乳分散后药物存在形式对肠吸收的影响

陈绪龙¹, 梁新丽¹, 刘欢¹, 周国平², 赵国巍¹, 温佳豪¹, 廖正根^{1*}

1. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西省药品检验检测研究院, 江西 南昌 330029

摘要: **目的** 研究姜黄素自纳米乳(Cur-SNEDDS)在人工胃肠液中分散后药物存在形式对肠吸收的影响。**方法** 以姜黄素浓度-时间曲线的变化趋势, 表示沉淀增长的变化, 利用偏振光显微镜(PLMC)、HPLC、紫外全波长(UV)扫描、X-射线粉末衍射(XRD)、差示扫描量热仪(DSC)、红外光谱(FT-IR)、拉曼光谱及核磁共振氢谱(¹H-NMR)对沉淀含量及存在形式进行研究, 同时采用大鼠外翻肠囊模型, 考察SNEDDS对姜黄素表观渗透系数(P_{app})的影响。**结果** Cur-SNEDDS分散后产生的沉淀中姜黄素含量约为姜黄素原料药的95%, 且未发生化学结构改变, 但晶型发生了改变, 产生了无定型沉淀, 姜黄素在分散体系中发生了分子间相互作用, 有氢键形成。与姜黄素原料药相比, Cur-SNEDDS显著提高了姜黄素体外释放的速度与程度, 并增强了姜黄素在十二指肠、空肠、回肠及结肠吸收, P_{app} 值分别增大了6.22、12.97、25.71、36.75倍。**结论** Cur-SNEDDS分散后改变了姜黄素原料药的晶体结构, 以游离、无定型和晶体形式存在, 显著提高了姜黄素的体外释放度和肠吸收。

关键词: 姜黄素; 自纳米乳; 人工胃肠液; 存在形式; 肠吸收; 表观渗透系数

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)18-4637-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.006

Effect of existing form of curcumin on intestinal absorption after Cur-SNEDDS dispersion

CHEN Xu-long¹, LIANG Xin-li¹, LIU Huan¹, ZHOU Guo-ping², ZHAO Guo-wei¹, WEN Jia-hao¹, LIAO Zheng-gen¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi Institute for Drug Control, Nanchang 330029, China

Abstract: Objective To study the relationship between the drug form of curcumin self-nano-emulsion (Cur-SNEDDS) after being dispersed in artificial gastrointestinal fluid and intestinal absorption in rats. **Methods** The change trend of curcumin concentration-time curve was used to express the change of precipitation growth. The content and existing form of precipitation were studied by polarized light microscope (PLMC), HPLC, UV full-wavelength (UV) scanning, X-ray powder diffraction (XRD), differential scanning calorimeter (DSC), infrared spectrum (FT-IR), Raman spectrum and nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum (¹H-NMR). At the same time, the rat valvulus intestinal sac model was used to investigate the effect of SNEDDS on the apparent permeability coefficient (P_{app}) of curcumin. **Results** The content of curcumin in the precipitation produced by Cur-SNEDDS dispersion was about 95% of that of curcumin API, and the chemical structure did not change, but the crystal form changed, resulting in amorphous precipitation. Curcumin intermolecular interaction occurred in the dispersion system, and hydrogen bonds were formed. Compared with curcumin, Cur-SNEDDS significantly increased the release rate and degree of curcumin *in vitro*, and enhanced the absorption of curcumin in duodenum, jejunum, ileum and colon, and the P_{app} value increased by 6.22, 12.97, 25.71 and 36.75 times, respectively. **Conclusion** After Cur-SNEDDS dispersion, the crystal structure of curcumin is changed, which exists in free, amorphous and crystal form, so as to significantly improve the *in vitro* release and intestinal absorption of curcumin.

Key words: curcumin; self-nano-emulsion; artificial gastrointestinal fluid; existing form; intestinal absorption; apparent permeability coefficient

收稿日期: 2020-04-01

基金项目: 江西省一流学科项目(JXSYLXK-ZHYAO059); 江西省卫生计生委科技计划项目(20181140)

作者简介: 陈绪龙(1984—), 男, 博士研究生, 专业方向为中药新剂型与新技术。Tel: 15180625699 E-mail: cxl_0517@163.com

*通信作者 廖正根(1967—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术的研究。Tel: (0791)87119011 E-mail: lyzlyg@163.com

自纳米乳给药系统 (self-nanoemulsifying drug delivery systems, SNEDDS) 是由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的各相同性且热力学稳定的混合体系, 在胃肠道的蠕动下自发形成粒径小于 100 nm 的 O/W 型微乳^[1]。SNEDDS 在胃肠道中形成高于药物平衡溶解度的过饱和溶液, 提高了水难溶性药物在体内的活度, 从而促进吸收, 是一种具有前景的提高水难溶性药物生物利用度的制剂^[1-3]。姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜黄、郁金和莪术等根茎中提取出来的一种多酚类化合物^[4-5], 具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎等多种药理作用^[6-9]。姜黄素在水中溶解度低, 仅为 11 ng/mL^[10], 渗透性差, 属于生物药剂学 IV 类^[11]化合物, 已有文献优选了 Cur-SNEDDS 处方并证明 SNEDDS 处方能够显著提高其溶解度和生物利用度^[12-14]。然而药物以分子形式存在于 SNEDDS 处方中, 其药物质量浓度远远高于分散液中的平衡溶解度, 从而在分散过程常伴随不同程度的药物析出, 产生沉淀^[15]。一般只有游离药物分子才能吸收入血, 但有研究发现 SNEDDS 体外分散消化过程中产生的药物沉淀为无定型, 能被迅速吸收, 且不影响口服生物利用度^[16]。目前对 SNEDDS 在分散过程中药物的存在状态以及沉淀的形式缺乏更为深入的认识。本研究以前期实验筛选出的 Cur-SNEDDS 为模型, 以姜黄素原料药为参比, 分析 Cur-SNEDDS 在人工胃肠液分散过程中姜黄素存在形式对体外释放及肠吸收的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; Agilent QTRAP 5500 三重四极杆-线性离子阱液质联用仪, 美国安捷伦公司; Malvern 纳米粒度仪, 英国马尔文公司; BAS124S 电子天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; VORTEX3 旋涡混匀器, 德国 IKA 公司; SIGMA3-18K 高速冷冻离心机, 德国 SIGMA 公司; Mshot 偏光显微镜, 广州市明美光电技术有限公司; Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 PerkinElmer 公司; Metage OPAL3000 便携拉曼光谱仪, 英国 METAGE 公司; UV-2550 紫外分光光度计, 岛津-GL 消耗品销售有限公司; ZRS-8G 智能溶出仪, 天津天大天发科技有限公司; D8 Advance X-射线衍射仪 (XRD), 德国布鲁克-AXS 公司; Diamond 型差示扫描量热分析仪 (DSC), 美国珀金埃尔默公司; AVANCE III HD 600 MHz 型

核磁共振波谱仪, 德国布鲁克公司。

1.2 药品与试剂

姜黄素, 西安昊轩生物科技有限公司, 质量分数 96.18%, 批号 JHS20180328; 姜黄素对照品, 成都埃法生物科技有限公司, 质量分数 99.91%, 批号 AF7111708; 丙二醇单辛酸酯 (Capryol 90)、二乙二醇单乙基醚 (Transcutol HP)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Kolliphor RH40) 购于法国嘉法赛公司; 氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 牛黄胆酸钠、蛋黄卵磷脂、马来酸均购于北京索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 德国默克公司; 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 220~250 g, 由江西中医药大学实验中心提供, 许可证号 SCXK (赣) 2018-003。标准环境下饲养 1 周, 本研究中动物实验方案已获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准。

2 方法与结果

2.1 Cur-SNEDDS 制备

前期实验筛选出 Cur-SNEDDS 处方^[17], 其质量比为 Capryol 90-Kolliphor RH40-Transcutol HP 7.93:66.71:25.36, 最大载药量为 65 mg/g。乳化为 19.64 s, 平均粒径为 15.06 nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.18, Zeta 电位-7.41 mV。同时基于前期 Cur-SNEDDS 体外分散相变研究结果, 选择姜黄素载药量为 90% (等于姜黄素在空白自纳米乳中平衡溶解度的 90%) 作为本研究的载药处方^[18]。按处方质量比精密称取 Capryol90、Kolliphor RH40 和 Transcutol HP 适量于 37 °C 水浴中超声、摇匀后作为空白自纳米乳。精密称取姜黄素原料药加入空白自纳米乳, 药物在处方中占比为 58.5 mg/g, 于 37 °C 水浴中超声溶解, 得黄色透明的 Cur-SNEDDS。

2.2 人工胃液 (SGF) 和人工肠液 (SIF) 的制备

参考文献配制方法^[15], SGF: 牛黄胆酸钠 80 $\mu\text{mol/L}$, 鸡蛋卵磷脂 20 $\mu\text{mol/L}$, 氯化钠 34.2 mmol/L, 胃蛋白酶 0.1 mg/mL, 盐酸调 pH 值至 1.6; SIF: 牛黄胆酸钠 3 mmol/L, 鸡蛋卵磷脂 200 $\mu\text{mol/L}$, 氯化钠 68.62 mmol/L, 马来酸 19.12 mmol/L, 氢氧化钠调 pH 值至 6.5。

2.3 Cur-SNEDDS 体外分散过程

2.3.1 姜黄素含量测定方法^[18-19] 色谱条件为 Phenomenex Luna 色谱柱 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5

μm); 流动相为乙腈-0.5%醋酸水溶液 (58:42); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL ; 检测波长 430 nm。姜黄素质量浓度 (X) 在 11.28~225.60 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积 (Y) 呈良好线性关系, 回归方程为 $Y=42.311 X-13.190$, $r=0.999 9$, 精密度与重复性实验考察 RSD 值均小于 2%, 加样回收率为 96.73%, RSD 为 1.65%。

2.3.2 沉淀生长变化 分别取空白自纳米乳 1 g 加入至 100 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 SGF 和 SIF 中, 搅拌桨转速为 100 r/min, 搅拌至分散均匀, 溶液体系为空白纳米乳溶液, 加入过量姜黄素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下饱和 24 h, 分别于 5、15、30、45、60、90、120 min 和 24 h (此处为考察姜黄素在含空白自微乳的人工胃肠液中的 24 h 平衡溶解度, 由于 30 min 后质量浓度不在上升, 故 2 h 后直接取 24 h 点) 取样 0.5 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液用甲醇稀释适当倍数,

HPLC 法测定含有空白自纳米乳的 SGF 和 SIF 溶液中姜黄素的平衡溶解度 (C_0); 取 Cur-SNEDDS 约 1 g 至 100 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 SGF、SIF 中, 搅拌桨转速为 100 r/min, 分别于 5、15、30、45、60、90、120 min 取样 0.5 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液用甲醇稀释适当倍数, HPLC 法测定在 Cur-SNEDDS 增溶作用下 SGF 和 SIF 溶液中姜黄素的质量浓度。

Graphpadprism 8.0 软件绘制时间-浓度曲线, 梯形法计算质量浓度-时间曲线下面积 (AUC) 结果见图 1。

由图 1 可知, 过量姜黄素在空白纳米乳的 SGF 和 SIF 体系中, 30 min 之后浓度不再上升, 即达到平衡溶解度, 图 1 中只保留了 120 min 的质量浓度曲线变化。Cur-SNEDDS 在 SGF、SIF 体系中 120 min 内 AUC 显著提高, 分别是姜黄素原料药 4.9 和 6.5 倍。姜黄素质量浓度在 15 min 内处于平稳上升的趋势, 之后开始下降, 在 30~45 min 出现了显著下降,

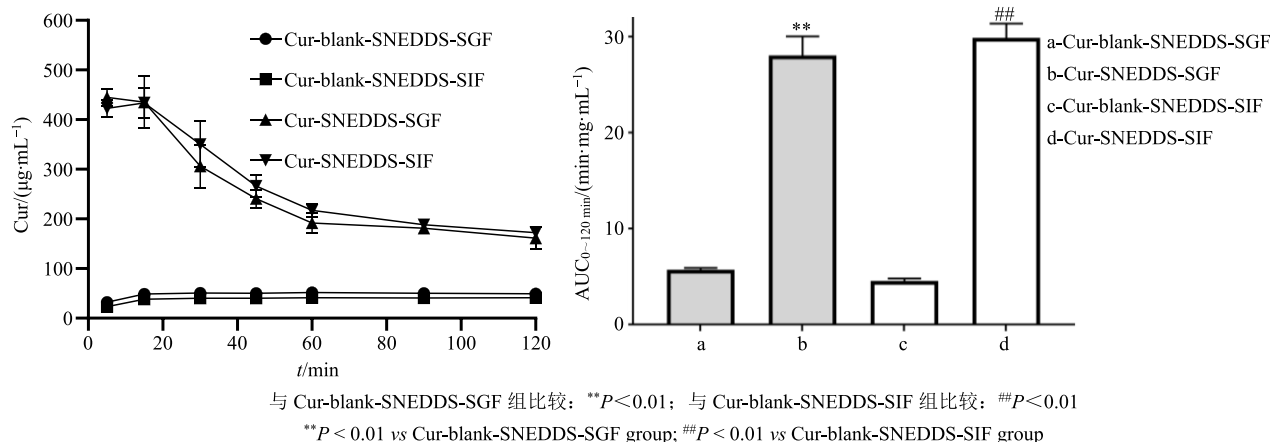


图 1 SGF 与 SIF 体系中姜黄素浓度-时间曲线及 AUC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Curcumin concentration-time curve and AUC in SGF and SIF system ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

推测 Cur-SNEDDS 在 15 min 内开始成核并产生沉淀, 随着晶核的产生加速破坏过饱和状态, 因此出现质量浓度显著降低。

2.3.3 偏光下沉淀形态观察 分别取 Cur-SNEDDS 和姜黄素原料药以质量比 1:100 分散于预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 SGF、SIF 中, 100 r/min 转速均速搅拌, 分别于 120 min 取 20 μL , 置载玻片, 在偏振光显微镜下观察, 结果见图 2。可以看出, Cur-SNEDDS 在 SGF 和 SIF 体系中沉淀在偏光下均可观察到明显的结晶。姜黄素原料药在偏光下呈黄色针簇状结晶, 与原料药相比, Cur-SNEDDS 沉淀的结晶呈圆球形或者片状。Cur-SNEDDS 对姜黄素结晶形态产生了改变。结晶型沉淀影响药物的口服吸收, 从而降低生物利用度, 因此需对沉淀进一步分析。

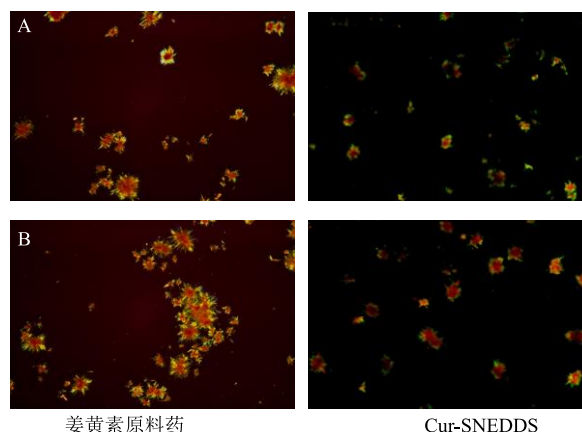


图 2 姜黄素原料药和 Cur-SNEDDS 在 SGF (A) 和 SIF (B) 结晶偏光图

Fig. 2 Polarization diagram of curcumin and Cur-SNEDDS crystals in SGF (A) and SIF (B)

2.4 沉淀含量测定与表征

2.4.1 沉淀处理方法 分别取姜黄素在含有空白自纳米乳的 SGF 和 SIF 中沉淀混悬液、Cur-SNEDDS 在 SGF 和 SIF 中沉淀混悬液适量至离心管, 4 000 r/min, 10 min, 倾去上清液后至真空干燥箱, 25 °C, 干燥 2 h, 得 Cur-blank-SNEDDS-SGF、Cur-blank-SNEDDS-SIF、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末。

2.4.2 沉淀含量测定 分别取经过恒温真空干燥至恒定质量的姜黄素原料药, Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末适量, 精密称定后, 用甲醇溶解稀释至刻度, HPLC 进行含量测定。姜黄素原

料药、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中姜黄素含量分别为 96.18%、91.57% 和 90.58%, Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中姜黄素含量分别为姜黄素原料药的 95.20% 和 94.17%。结果见图 3-A。

2.4.3 紫外全波长扫描 (UV) 分别取姜黄素原料药, Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀干燥粉的甲醇溶液在波长为 300~800 nm 进行紫外扫描。从图 3-B 可知, 姜黄素原料药、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀干燥粉紫外全波长吸收曲线基本完全重叠, 表明沉淀中姜黄素化学结构未发生改变。

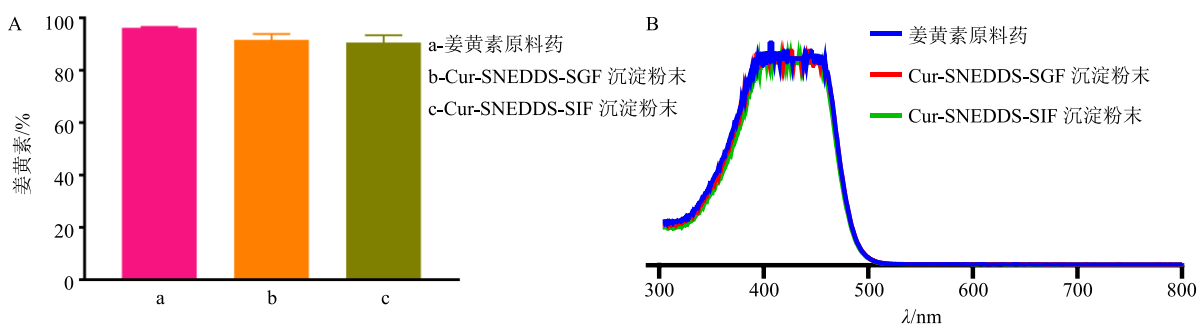


图3 Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中姜黄素含量 (A) 和紫外全波长扫描图谱 (B)

Fig. 3 Curcumin content of Cur-SNEDDS in SGF and SIF precipitated powder (A) and ultraviolet full wavelength scanning spectrum (B)

2.4.4 差示扫描量热法 (DSC) 分别取姜黄素原料药, Cur-blank-SNEDDS-SGF、Cur-blank-SNEDDS-SIF、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末适量, 精密称定后, 进行 DSC 测定。测试温度: 25~200 °C/min, 升温速率 10 °C/min, 记录各个样品差示扫描量热曲线 (图 4)。DSC 图谱中, 姜黄素原料药在 180.36 °C 有尖锐熔融峰存在, 熔融过程中单位吸热量为 181.56 J/g, 说明姜黄素主要为晶体结构^[18]; Cur-blank-SNEDDS-SGF、Cur-blank-SNEDDS-SIF 沉淀粉末, 分别在 178.43、179.37 °C 处有明显的吸热峰, 单位吸收热量分别为 134.89、83.64 J/g, 与姜黄素原料药相比, 晶体吸热峰未有明显变化, 说明含空白纳米乳的分散体系对姜黄素晶体结构影响较小。Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末, 分别在 175.54、174.04 °C 有吸热峰, 单位吸收热量分别为 31.11、78.41 J/g, 其中 Cur-SNEDDS-SGF/SIF 沉淀粉末分别在 68.14、125.56 °C 位置出现凸起。与 Cur-blank-SNEDDS-SGF、Cur-blank-SNEDDS-SIF 沉淀粉末相比, Cur-SNEDDS 沉淀粉末吸热峰位置发现明显位移,

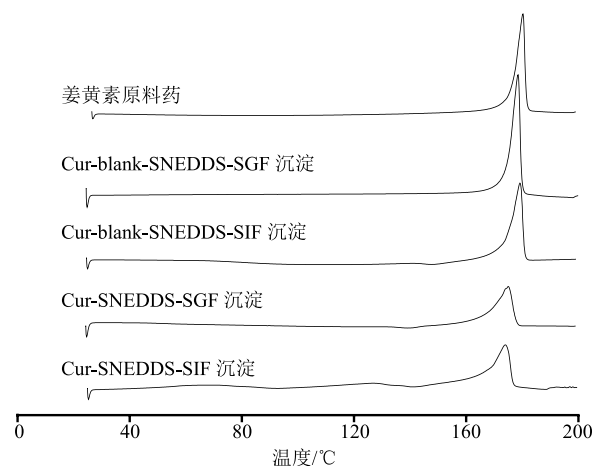


图4 姜黄素沉淀粉末 DSC 图谱

Fig. 4 DSC spectrum of curcumin precipitated powder

峰宽增大, 吸热强度进一步下降, 且有明显的无定型吸热峰。结果表明 Cur-SNEDDS 沉淀晶体结构已发生了明显变化, 部分以无定型或分子形式存在。

2.4.5 X 射线粉末衍射 (XRD) 分别取姜黄素原料药, Cur-blank-SNEDDS-SGF、Cur-blank-SNEDDS-SIF、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末适量, 进行 X 射线衍射分析。测定条

件: Cu 靶, 高压 40 kV, 单流 40 mA, 扫描 2θ 角度 $5^{\circ} \sim 60^{\circ}$, 扫描速度 $8^{\circ}/\text{min}$ 。记录样品 X 射线衍射曲线, 结果见图 5。从图 5 中可以看出, 姜黄素原料药粉末在衍射角 (2θ) 为 8.87° 、 17.22° 、 21.17° 、 23.26° 、 23.70° 、 24.69° 、 25.74° 等处均出现尖锐的衍射峰, 是典型的晶体衍射峰, 表明姜黄素原料药为晶体结构; Cur-blank-SNEDDS-SGF、Cur-blank-SNEDDS-SIF 沉淀中姜黄素结晶特征衍射峰都存在, 同时在 31.69° 、 45.44° 处出现新的晶体衍射峰, 说明空白纳米乳人工胃肠液分散体系对姜黄素晶体结构影响很小; Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀中姜黄素结晶特征衍射峰基本消失, 且强度减弱, 同时在衍射角 (2θ) 13.87° 处出现新的晶体衍射峰。姜黄素的特征结晶峰消失、强度减弱及形成新的晶体衍射峰, 表明 Cur-SNEDDS 在人工胃肠液分散体系中晶型结构已发生变化, 部分以无定型或分子存在^[18]。

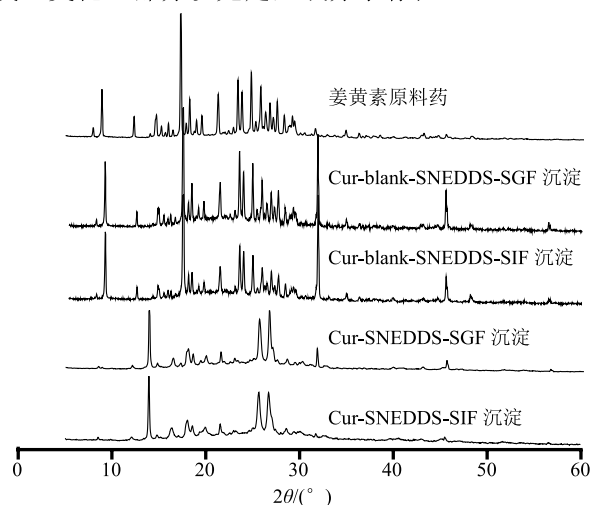


图 5 姜黄素沉淀粉末 X-ray 图谱

Fig. 5 X-ray spectrum of curcumin precipitated powder

表 1 姜黄素沉淀粉末中姜黄素的-OH、C=O、C=C 峰位置

Table 1 Peak positions of -OH, C=O and C=C of curcumin in curcumin precipitated powder

样品	-OH 峰位置 (cm^{-1})	C=O 峰位置 (cm^{-1})	C=C 峰位置 (cm^{-1})
姜黄素原料药	3 506、3 344	1 628	1 603
Cur-SNEDDS-SGF 沉淀粉末	3 457、3 396、3 220	1 630	1 589
Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末	3 441、3 400、3 224	1 629	1 588

SIF 沉淀粉末适量, 平铺于载玻片上, 利用紫外-可见-近红外拉曼光谱仪测定其拉曼光谱特征。测定条件: 功率 100 mW, 激发波长为 785 nm, 扫描范围 $800 \sim 1\,800 \text{ cm}^{-1}$, 扫描时间 5 s, 扫描 3 次, 结果见图 7。从图 7 中可以看出, 姜黄素特征吸收峰: 1 624 (C=O)、1 597、1 426 (C=C)、1 319、1 247、1 180、

2.4.6 傅里叶转换红外光谱法 (FT-IR) 分别取姜黄素原料药, Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末适量, 采用溴化钾压片法, 进行红外光谱分析。测定条件如下: 扫描波数范围 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率 2 cm^{-1} 。结果见图 6 和表 1。姜黄素的结构主要包括苯环、酚羟基、不饱和双键和二酮, 从图 6 中可以看出, $3\,506 \text{ cm}^{-1}$ 为 -OH 的伸缩振动; $2\,970$ 、 $2\,843$ 、 $2\,944 \text{ cm}^{-1}$ 分别为 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2$ 的伸缩振动, 其吸收峰强度较小; $1\,628 \text{ cm}^{-1}$ 为 α , β 不饱和 C=O 的吸收峰; $1\,603 \text{ cm}^{-1}$ 为 C=C 的吸收峰, 由于 C=C 和 C=O 以及左右对称结构形成的共轭体系, 使得羰基峰明显红移; $1\,509$ 、 $1\,461 \text{ cm}^{-1}$ 为苯环 C-C 骨架振动。表 1 结果显示, 与姜黄素原料药相比, Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中 -OH 峰发生了明显的红移, 其他特征峰未有迁移, 说明沉淀中姜黄素化学结构并没有发生改变, 但可能有氢键形成。

2.4.7 拉曼光谱 (Raman spectroscopy) 测定 分别取姜黄素原料药、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-

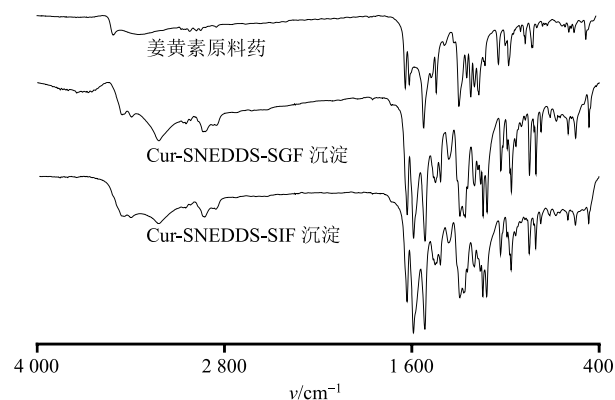


图 6 姜黄素沉淀粉末 FT-IR 图

Fig. 6 FT-IR spectra of curcumin precipitated powder

1 148 (C-O)、 $957 (-\text{OH}) \text{ cm}^{-1}$; Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中 C=O 峰在 $1\,637 \text{ cm}^{-1}$ 、C=C 峰在 $1\,591$ 、 $1\,524$ 、 $1\,414 \text{ cm}^{-1}$, -OH 的峰减弱甚至消失。与姜黄素原料药相比, Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中 C=O 峰出现了明显的蓝移, C=C 峰明显的红移, -OH 峰很弱甚至

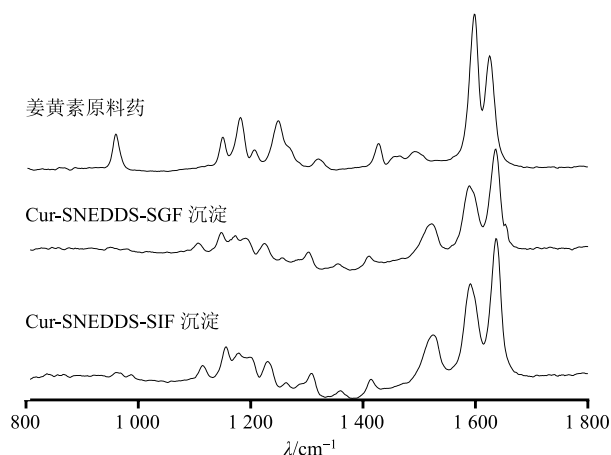


图7 姜黄素沉淀粉末拉曼光谱图

Fig. 7 Raman spectroscopy of curcumin precipitated powder

消失,提示分子之间发生了相互作用,可能形成了氢键。

2.4.8 核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 测定 分别取姜黄素原料药、Cur-SNEDDS-SGF、Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末适量溶解于 $\text{DMSO-}d_6$ 中。利用核磁共振波谱仪测定姜黄素的核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$), 对比分析不同状态下姜黄素的表面基团, 结果见图 8。

$^1\text{H-NMR}$ 分析结果, 姜黄素原料药在 δ : 9.68 (2H, s, 8, 8'-OH), 7.55 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, 4, 4'-=CH), 7.33 (2H, s, H-6, 6'), 7.16 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, 9, 9'=CH), 6.83 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-10, 10'), 6.77 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, 3, 3'-=CH), 6.07 (1H, s, H-1), 3.85 (6H, s, 7, 7'-OCH₃)。由于两边羰基 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$) 的影响, H 较活跃, 出现脱 H, 因此 $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ 中 $-\text{CH}_2-$ 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中只有 1 个 H; Cur-SNEDDS-SGF 沉淀粉末 δ : 9.70 (2H, s, 8, 8'-OH), 7.56 (2H, dd, $J = 8.0$, 15.8 Hz, 4, 4'-=CH), 7.33 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6, 6'), 7.16 (2H, m, 9, 9'=CH), 6.85 (2H, m, H-10, 10'),

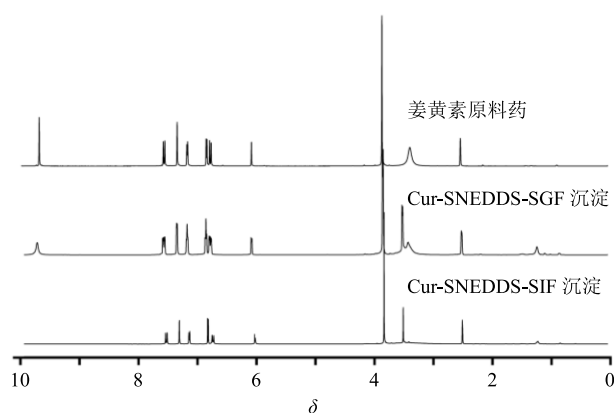


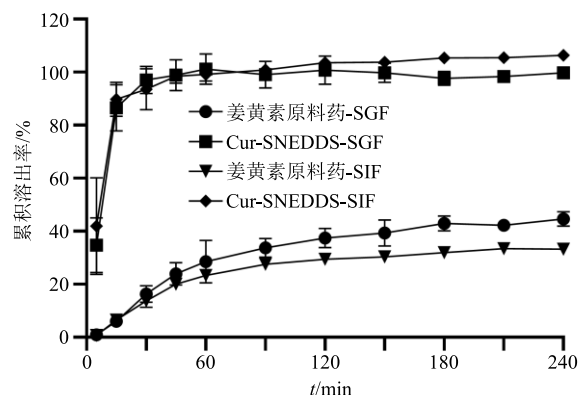
图8 姜黄素沉淀粉末核磁共振氢谱

Fig. 8 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of curcumin precipitated powder

6.77 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, 3, 3'-=CH), 6.08 (1H, s, H-1), 3.85 (6H, s, 7, 7'-OCH₃); Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末 δ : 7.53 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, 4, 4'-=CH), 7.30 (2H, s, H-6, 6'), 7.14 (2H, d, $J = 9.4$ Hz, 9, 9'=CH), 6.82 (2H, d, $J = 9.4$ Hz, H-10, 10'), 6.74 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, 3, 3'-=CH), 6.03 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-1), 3.84 (6H, s, 7, 7'-OCH₃)。与姜黄素原料药相比, Cur-SNEDDS-SGF 沉淀粉末中对应化合物 6, 6'-Ar-H 产生耦合裂分为双重峰, 10, 10'-和 9, 9'=CH 出现多重峰; Cur-SNEDDS-SIF 沉淀粉末中对应化合物 8, 8'-OH 信号消失, 6, 6'-Ar-H 产生耦合裂分为双重峰。因此, 推测在人工胃肠液环境中姜黄素发生了分子间相互作用, 且在肠液环境中可能形成了氢键。

2.5 体外释药评价

体外释药评价采用《中国药典》2015 年版四部 0931 溶出度与释放度测定法, 分别以 SGF (含 0.5% SDS) 和 SIF (含 0.5% SDS) 作为溶出介质, 测定方法为溶出介质 500 mL, 温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 搅拌桨转速为 (100 ± 1) r/min。为模拟自纳米乳剂体内过饱和状态, 因此本溶出在非漏槽条件下进行, 即姜黄素质量浓度高于溶出介质中平衡溶解度。精密称取约 35 mg 姜黄素原料药、0.6 g Cur-SNEDDS 加入到 0 号胶囊壳中, 开启溶出仪, 将胶囊加入到溶出杯中, 开始计时, 在不同时间点取样 1 mL, 同时补加等温、等体积空白介质, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, HPLC 测定药物含量, 计算药物累积溶出率。结果见图 9。姜黄素原料药在 SGF 和 SIF 体系中 15 min 内分别溶出 6.03%、6.54%, 120 min 内累积释放度低于 45%; Cur-SNEDDS 在 SGF 和 SIF 体系中 15 min 累积释放度达 85%以上, 显著提

图9 姜黄素原料药、Cur-SNEDDS 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 9 *In vitro* release profile of curcumin API and Cur-SNEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

高了姜黄素的溶出速度和程度,且体外释放过程中没有沉淀产生。

2.6 Cur-SNEDDS 对姜黄素大鼠肠吸收的影响

2.6.1 溶液配制 Krebs 液的制备 称取 CaCl_2 0.28 g, 分别加少量蒸馏水溶解;再称取 NaCl 6.9 g、 KCl 0.35 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g、 NaH_2PO_4 0.16 g 和 NaHCO_3 2.1 g, 加蒸馏水溶解后与溶解的 CaCl_2 和葡萄糖 2 g 混匀, 蒸馏水定容至 1 L, 备用; 供试液的配制姜黄素原料药组: 称取姜黄素原料药 0.52 g, 加 Krebs 液配制成 200 mL 溶液; Cur-SNEDDS 组精密称取约 9 g, 加 Krebs 液配制成 200 mL 溶液。

2.6.2 外翻肠囊模型制备 取健康的 SD 大鼠禁食 12 h, ip 10%水合氯醛, 待大鼠麻醉后固定在手术板上; 剖开腹腔, 分别取出十二指肠、空肠、回肠和结肠各约 10 cm, 置于冰浴的空白 Krebs 液中, 清洗后, 用玻片去除肠系膜、脂肪。用小玻璃棒将肠段轻柔翻转, 使小肠黏膜面向外, 浆膜侧向内, 结扎肠肛侧端, 将肠段上端固定于取样口。用注射器从取样口处向肠内注满空白 Krebs 液, 作为受药体系。然后将其肠囊垂直放入含有 15 mL 含药 Krebs 液的试管中, 将整个装置放入 37 °C 水浴锅中^[20]进行实验 2 h。实验结束后, 将肠囊取出, 放入冰冷的 Krebs 液中清洗 2 次, 洗去肠黏膜上吸附的药液, 收集肠囊内液, 并测量肠内径及长度。

2.6.3 样本处理方法 取肠囊内液样品 20 μL , 加内标(替硝唑)溶液 10 μL , 涡旋 60 s, 加入 170 μL 甲醇涡旋 120 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 采用 LC-MS/MS 测定。

2.6.4 储备液、姜黄素标准工作液配制 精密称量的姜黄素(10 mg)和替硝唑(5 mg)对照品溶解在适量甲醇中, 制备成质量浓度为 1、0.4 mg/mL 储备液, 用甲醇稀释姜黄素储备液, 制备成质量浓度分别为 5、10、20、50、250、500、2 500、5 000、7 500、10 000 ng/mL 系列的姜黄素标准工作液。

2.6.5 LC-MS/MS 条件

(1) 色谱条件: ACE Excel 2 C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱 0~1 min, 20%乙腈; 1~1.2 min, 20%~75%乙腈; 1.2~3.5 min, 75%~95%乙腈; 3.5~3.6 min, 95%~20%乙腈; 3.6~6 min, 20%乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 25 °C, 进样量 2 μL 。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子化源(ESI)进行正离子检测, 检测模式为多反应检测(MRM),

离子化电压(IS) 5.5 kV; 离子源温度(TEM) 为 550 °C; 气帘气为 241.317 kPa (35 psi); 喷雾气(GS1) 为 344.738 kPa (50 psi); 辅助加热气(GS2) 为 310.264 kPa (45 psi), 扫描方式为多离子反应监控(MIM), 用于定量分析的监控离子为 m/z 369.1~284.9 (姜黄素)、248.0~120.8 (替硝唑)。

2.6.6 分析方法专属性考察 分别取空白肠囊液、含内标的空白肠囊液、姜黄素对照品肠囊液、混合对照品肠囊液、肠囊液样品进行分析, 考察空白肠囊液和内标对出峰时间是否有干扰。检测结果见图 10, 姜黄素出峰时间为 2.9 min, 内标物出峰时间为 2.5 min, 空白肠囊液和内标对出峰时间无干扰, 此方法可行。

2.6.7 标准曲线的制备 分别量取系列质量浓度的

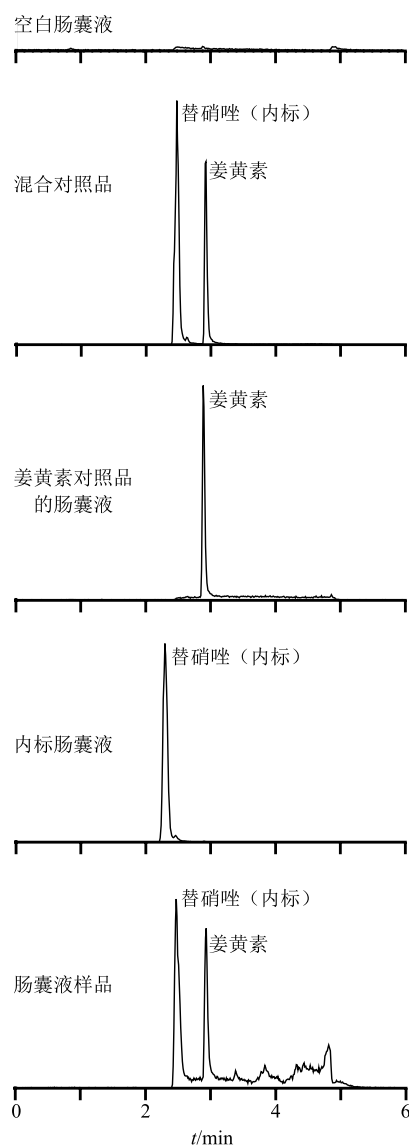


图 10 姜黄素液质联用色谱图

Fig. 10 LC-MS/MS chromatography of curcumin

姜黄素标准工作液 20 μL 、内标溶液 10 μL ，加入 Krebs 液 20 μL 涡旋 60 s，再加甲醇 150 μL 涡旋 120 s，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液按“2.6.5”项下方法进行测样。以姜黄素质量浓度为横坐标 (X)，所得不同质量浓度姜黄素的峰面积与内标峰面积之比为纵坐标 (Y)，结果显示回归方程为 $Y=0.028\ 1\ X-0.311\ 7$ ， $r^2=0.998\ 4$ ，姜黄素血浆质量浓度在 0.5~1 000.0 ng/mL 线性关系良好，姜黄素定量下限为 0.5 ng/mL。

2.6.8 提取回收率与基质效应 取姜黄素标准工作液制备低、中、高质量浓度 (2、50、750 ng/mL) 的姜黄素质控样品 (平行 5 份)。取姜黄素标准工作液 20 μL 、内标溶液 10 μL ，加入 Krebs 液 20 μL ，涡旋 60 s，再加甲醇 150 μL 涡旋 120 s，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液，按“2.6.5”项下方法测定，该组峰峰面积结果为 A ；取 Krebs 液 20 μL ，加甲醇 150 μL 涡旋 60 s，再加姜黄素标准工作液 20 μL 、内标 10 μL 涡旋 120 s，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液按“2.6.5”项下方法进行测样，该组峰峰面积结果为 B ；取姜黄素标准工作液 20 μL ，内标 10 μL 涡旋 60 s，再加 170 μL 的甲醇涡旋 120 s，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液，按“2.6.5”项下方法进行测样，该组峰峰面积结果为 C 。 A/B 为提取回收率， B/C 为基质效应。结果显示，姜黄素 3 个质量浓度的提取回收率分别为 87.66%、89.40%、94.48%，RSD 分别为 2.47%、9.53%、5.10%；姜黄素 3 个质量浓度的基质效应分别为 93.34%、94.50%、91.80%，RSD 分别为 4.49%、6.90、8.69%。

2.6.9 精密度试验 按“2.6.8”项方法制备低、中、高质量浓度 (2、50、750 ng/mL) 的姜黄素质控样品。每个样品质量浓度平行制备 5 个样品，按“2.6.5”项下方法测定，连续测定 3 次计算日内精密度，再连续进样 3 d 考察分析方法的日间精密度。结果显示，姜黄素 3 个质量浓度的日内精密度 RSD 分别为 11.29%、14.67%、3.13%；日间精密度 RSD 分别为 11.67%、14.85%、8.52%。

2.6.10 数据处理 本实验均采用渗透系数 (P_{app} ， 10^{-8} cm/s) 来评价 Cur-SNEDDS 对姜黄素在各肠段的吸收促进作用。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

$$P_{\text{app}} = dQ / (A C_0 dt)$$

P_{app} 为化合物的表观渗透系数， dQ/dt 为单位时间内药物转运量， C_0 为供液体系中药物的质量浓度， A 为肠面积

P_{app} 数据 (图 11) 表明，姜黄素在整个肠段吸

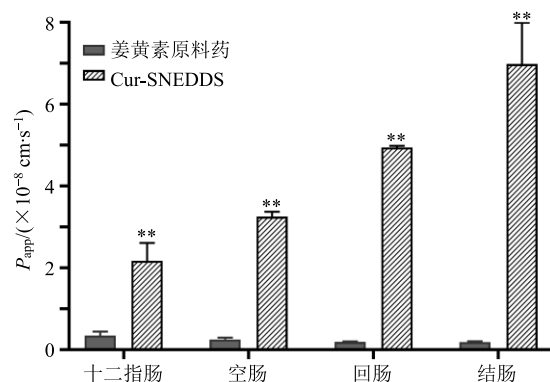


图 11 Cur-SNEDDS 对姜黄素在不同肠段吸收的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 11 Effect of Cur-SNEDDS on absorption of curcumin in different intestines ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

收均较小，制备成 Cur-SNEDDS 后，十二指肠、空肠、回肠及结肠的吸收均显著增强， P_{app} 值分别增大了 6.22、12.97、25.71、36.75 倍。

3 讨论

本实验采用 PLMC、XRD、DSC、UV、FT-IR、Raman 和 $^1\text{H-NMR}$ 对 Cur-SNEDDS 体外分散过程中沉淀进行表征，发现与原料药相比，姜黄素在含有 blank-SNEDDS 的人工胃肠液中沉淀的晶体结构无显著变化，说明 blank-SNEDDS 的人工胃肠液分散体系对姜黄素晶体结构影响较小，同时也表明本研究中沉淀处理方法有效去除分散介质中辅料对检测的干扰。与姜黄素在含 blank-SNEDDS 的人工胃肠液沉淀相比，Cur-SNEDDS 在人工胃肠液中沉淀含有无定型和结晶型两种存在形式，且晶体结构发生了明显改变，这说明 Cur-SNEDDS 改变了姜黄素在分散过程中的存在形式。

UV、FT-IR、Raman 和 $^1\text{H-NMR}$ 对沉淀的分析结果进一步表明，Cur-SNEDDS 分散过程中产生的沉淀基本为姜黄素原料药，且化学结构没有发生改变，但姜黄素在人工胃肠液环境中发生了分子间相互作用，形成了氢键。

有研究显示^[21-22]，SNEDDS 体外分散与消化后产生沉淀的处方不影响其体内生物利用度。本实验以姜黄素浓度-时间曲线表示 Cur-SNEDDS 在 SGF 和 SIF 中分散过程，发现体外分散过程中产生了大量沉淀，1 h 内沉淀率接近 50%，然而与姜黄素原料药相比，Cur-SNEDDS 在十二指肠、空肠、回肠及结肠的 P_{app} 值分别增大了 6.22、12.97、25.71、36.75 倍，显著增强了肠吸收。Cur-SNEDDS 体外释放实验发现，Cur-SNEDDS 显著提高了姜黄素的溶出的

速度与程度,且体外释放过程中没有产生沉淀。分析认为,Cur-SNEDDS在胃肠液中快速分散^[23]及其与环境中表面活性剂、磷脂及胆酸盐等发生了分子间相互作用,形成了氢键等,产生无定型沉淀^[24]。无定型沉淀的快速溶解,促进了药物的吸收,这也解释了姜黄素体外释放达平衡后未引起浓度波动。

综上,Cur-SNEDDS改变了姜黄素原料药在体外分散过程中的存在形式,其主要以游离、无定型和结晶型形式存在,显著提高了姜黄素的体外释放度和大鼠肠吸收。本研究基于Cur-SNEDDS在体外分散后药物存在形式的角度,分析了沉淀物存在形式对体外释药及肠吸收的影响,是一种有效的评价方法,但影响药物体内吸收的因素较为复杂。因此,下一步将从吸收机制角度深入研究。

参考文献

- [1] Feeney O M, Crum M F, McEvoy C L, *et al.* 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 101: 167-194.
- [2] Bibette J, Calderon F L, Poulin P. Emulsions: Basic principles [J]. *Rep Prog Phys*, 1999, 62(6): 969-1033.
- [3] Callender S P, Mathews J A, Kobernyk K, *et al.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2017, 526(1/2): 425.
- [4] 刘调调, 杨白雪, 郭瑛玉, 等. 表面活性剂的复配对姜黄素的增溶及保护作用 [J]. *药学报*, 2019, 54(1): 8-13.
- [5] Kumar A, Kaur G, Kansal S K, *et al.* Enhanced solubilization of curcumin in mixed surfactant vesicles [J]. *Food Chem*, 2016, 199: 660-666.
- [6] Pan M H, Huang T M, Lin J K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(4): 486-494.
- [7] Yallapu M M, Jaggi M, Chauhan S C. Curcumin nanoformulations: A future nanomedicine for cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(1/2): 71-80.
- [8] Yallapu M M, Othman S F, Curtis E T, *et al.* Curcumin-loaded magnetic nanoparticles for breast cancer therapeutics and imaging applications [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7(1/2): 1761-1779.
- [9] Cui J, Yu B, Zhao Y, *et al.* Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2009, 371(1): 148-155.
- [10] Tønnesen H H, Másson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability [J]. *Int J Pharm*, 2002, 244(1/2): 127-135.
- [11] Ipar V S, Dsouza A, Devarajan P V. Enhancing curcumin oral bioavailability through nanoformulations [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 44(4): 459-480.
- [12] Petchsomrit A, Sermkaew N, Wiwattanapatapee R. Self-microemulsifying, reconstituted granules for oral administration of curcumin: Development and *in vitro* characterization [J]. *Lat Am J Pharm*, 2018, 37(4): 740-747.
- [13] Liu Y, Huang P, Hou X, *et al.* Hybrid curcumin-phospholipid complex-near-infrared dye oral drug delivery system to inhibit lung metastasis of breast cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 3311-3330.
- [14] Li Q, Zhai W, Jiang Q, *et al.* Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy [J]. *Int J Pharm*, 2015, 490(1/2): 22-31.
- [15] 赖章婷, 丁海波, 蒋且英, 等. 水飞蓟宾过饱和自微乳给药系统的制备及体外质量评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4091-4099.
- [16] Sassene P J, Knopp M M, Hesselkilde J Z, *et al.* Precipitation of a poorly soluble model drug during *in vitro* lipolysis: Characterization and dissolution of the precipitate [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(12): 4982-4991.
- [17] 陈绪龙, 梁新丽, 丁海波, 等. 姜黄素过饱和自纳米乳的制备与体外质量评价[J]. *中国中药杂志*, 2020, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20200523.305.
- [18] 陈绪龙, 梁新丽, 刘欢, 等. 不同载药量姜黄素自纳米乳体外分散后相行为与稳定性的相关性考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201949.
- [19] 李翔, 刘亚丽, 张鹏, 等. 姜黄素眼用纳米混悬凝胶剂对大鼠视网膜内障的治疗作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22): 9-13.
- [20] 孔小强, 蒋且英, 罗云, 等. 基于外翻肠囊模型的黄芪-附子配伍对附子6种生物碱肠吸收的影响研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(23): 4928-4934.
- [21] Larsen A T, Ohlsson A G, Polentarutti B, *et al.* Oral bioavailability of cinnarizine in dogs: Relation to SNEDDS droplet size, drug solubility and *in vitro* precipitation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48(1/2): 339-350.
- [22] Larsen A T, Åkesson P, Juréus A, *et al.* Bioavailability of cinnarizine in dogs: Effect of SNEDDS loading level and correlation with cinnarizine solubilization during *in vitro* lipolysis [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(12): 3101-3113.
- [23] Thomas N, Holm R, Müllertz A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* performance of novel supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (super-SNEDDS) [J]. *J Control Release*, 2012, 160(1): 25-32.
- [24] Humberstone A J, Porter C J, Charman W N. Sciences CWJJop. A physicochemical basis for the effect of food on the absolute oral bioavailability of halofantrine [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(5): 525-529.