技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)02-0195-03

复方辣椒碱纳米乳中辣椒碱包封率的测定方法研究

姜 展,刘 新,张桂平,郭 虎
(重庆医科大学药学院天然药物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立复方辣椒碱(Capsaicin)纳米乳中主药辣椒碱包封率的测定方法。方法:应用葡聚糖凝胶 G50 微型柱分离获取纳米乳,再采用 HPLC 测定纳米乳中的辣椒碱含量,换算包封率。结果:葡聚糖凝胶微柱获取纳米乳的平均回收率为 97.98%(n=9),纳米乳中辣椒碱含量测定方法显示,在浓度 5 ~ 80 μg/ml 浓度范围内,辣椒碱与其峰面积的线性关系良好(r=0.999 4),平均回收率为 98.17%(n=9),RSD=1.69%。3 批样品中辣椒碱的包封率分别为 83.17%、87.74%和 85.26%。结论:所建方法能有效地消除其他成分对测定的干扰,可用于复方纳米乳制剂中辣椒碱包封率的测定。

【关键词】辣椒碱;纳米乳;包封率
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-26

Determination of encapsulation efficiency of capsaicin in compound capsaicin nanoemulsion

JIANG Zhan, et al
(*Department of Nutural Medical Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method to determine the encapsulation efficiency of capsaicin in compound capsaicin nanoemulsion. *Methods*: Dextran Gel G50 mini-column was used to separate the nanoemulsion. The concentration of capsaicin in the nanoemulsion was detected by HPLC and converted into encapsulation efficiency. *Results*: The recovery of the Dextran Gel G50 mini-column was 97.98% (n=9).The linear range of capcaisin in the determination method was 5~80 μg/ml and the linear relationship was fine (r=0.999 4). The average recovery was 98.17% (n=9), and RSD =1.69%. The entrapment efficiencies of capsaicin of three groups of samples were 83.17%, 87.74%, and 85.26% respectively. *Conclusion*: This method can effectively eliminate the interference of the determination, which is suitable for the determination of encapsulation efficiency of capsaicin.

【Key words】capsaicin; nanoemulsion; encapsulation efficiency

辣椒碱(Capsaicin)具有有长效镇痛、抗炎等药理活性,临床用于治疗风湿性关节炎和骨关节炎等疼痛,为新型非成瘾性镇痛药,收载于美国药典 24 版。我国药品标准收载有复方辣椒碱乳膏[(Compound capsaicin cream,标准号:WS-10001-(HD-0124)-2002)]。普通乳剂中辣椒碱对皮肤刺激性较大,有效浓度下有皮肤烧灼、刺痛感,病人顺应性较差。为减轻药物对皮肤的刺激性,本实验参考文献报道[1-3]将复方辣椒碱乳膏由普通乳剂改剂成纳米乳剂。作为一种新型给药系统,纳米乳对难溶性药物有较强增溶能力,能有效提高药物的生物利用度,还可减轻辣椒碱的刺激性。

辣椒碱是一种水难溶性药物,纳米乳中难溶性药物的包封率是纳米乳制备工艺评价的主要指标之一[3]。目前尚未见到关于复方纳米乳剂中辣椒碱包封率的测定方法研究报道[4,5]。本实验针对复方纳米乳剂,采用高效液相色谱法结合葡聚糖微型凝胶柱,建立了复方纳米乳剂中辣椒碱包封率的测定方法,现报道如下。

作者介绍:姜 展(1985-),女,硕士,
研究方向:中药制剂、中药质量标准。
通信作者:刘 新,男,教授,Email:liuxin8829@sina.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UV-3150 紫外 - 可见分光光度计(日本岛津);LC-2010A 液相色谱仪(日本岛津);KQ218 超声清洗仪(昆山超声波仪器公司);85-2 磁力搅拌器(上海青浦沪西仪器厂);电热恒温水浴锅(上海仪表集团供销有限公司)。

1.2 试药

辣椒碱(青岛海瀚亚纳米新材料有限公司,含量 >98%,批号 LJ090216);葡聚糖凝胶(Dextran Gel G50,上海长征制药厂);自制复方辣椒碱纳米乳;甲醇为色谱纯;蒸馏水为自制;其余试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1 复方辣椒碱纳米乳药物组成与主要制备工艺

将樟脑、薄荷脑混合使之共熔，再加入冬青油混合均匀，取辣椒碱，加入上述混合油中，使溶解并混匀，作为纳米乳剂中的油相。取配方规定量的表面活性剂及助表面活性剂加入到油相中，混匀，将混合物置 60℃～65℃水浴上，在搅拌（200 r/min）下逐滴加入配方规定量的水相，搅拌乳化 30 min，保温 3 h，即得。

空白复方纳米乳为去除辣椒碱，按以上方法步骤制备而得。

2.2　辣椒碱含量测定方法的建立

2.2.1　色谱条件与系统适用性　色谱柱：Diamonsil C18 分析柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水/0.1%磷酸（70∶30）；检测波长 280 nm。进样量 20 μl。辣椒碱和样品中相邻色谱峰的分离度大于 1.5，理论板数按辣椒碱峰应计不低于 4×10^3 个。

2.2.2　测定方法与专属性考察　精密称取辣椒碱对照品适量，加甲醇制成 50 μg/ml 的对照品溶液。取复方辣椒碱纳米乳和不含辣椒碱的空白复方纳米乳各 0.4 ml，置 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液和空白供试品溶液。按 2.2.1 项下色谱条件分别进样测定。结果见图 1（A-C）。结果表明，空白供试品溶液在辣椒碱色谱峰位处无吸收峰，所用方法对样品中辣椒碱的含量测定具有专属性。

2.2.3　线性关系考察　精密称取辣椒碱对照品适量，用甲醇溶解并稀释配制成系列浓度的溶液（5、20、40、60、80 μg/ml），按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，在 5～80 μg/ml 浓度范围内，辣椒碱（X）与其色谱峰面积（Y）的线性关系良好，回归方程为：$Y = 9\,788.9X + 24\,041$（$r = 0.999\,4$）。

2.2.4　精密度试验　取浓度为 50 μg/ml 的对照品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件重复进样 5 次，计算辣椒碱的含量，结果的 RSD 为 0.86%，结果显示仪器精密度良好。

2.2.5　稳定性考察　取供试品溶液，室温放置 0、2、4、6 h 和 8 h 后，按 2.2.1 项下色谱条件测定辣椒碱的含量，结果的RSD 为 0.87%，结果表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

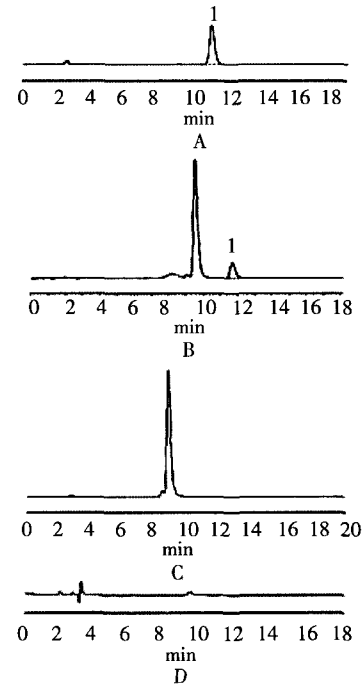
2.2.6　重现性试验　取同一批复方辣椒碱纳米乳 5 份，按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件测定辣椒碱含量，结果的 RSD 为 1.85%，结果表明方法重现性良好。

2.2.7　回收率试验　精密吸取空白复方纳米乳，每份 0.4 ml，置 10 ml 容量瓶中，分别加入辣椒碱对照品 400、500 μg和 600 μg（甲醇溶液），混匀，用甲醇定容制成每 1 ml 含辣椒碱 40、50 μg和 60 μg 的 3 种供试品溶液各 3 份，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定辣椒碱含量，计算得平均回收率为 98.17%（n=9），RSD 为 1.69%。

2.3　复方辣椒碱纳米乳中辣椒碱包封率的测定

2.3.1　复方辣椒碱纳米乳制剂中已包封与未包封辣椒碱的分离　取葡聚糖凝胶 Dextran Gel G50 0.5 g，用蒸馏水充分溶胀后，装柱（柱直径 1.2 cm，柱高 5 cm）。精密吸取复方辣椒碱纳米乳 0.4 ml，经葡聚糖凝胶微柱分离，收集洗脱液。前 15 ml 用蒸馏水洗脱，之后用 50%甲醇洗脱，每份收集 1 ml，再用等量的甲醇稀释，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，绘制复方辣椒碱纳米乳中辣椒碱的洗脱曲线。结果见图 2。洗脱曲线显示，纳米乳中辣椒碱分别于水洗脱的 2～6 ml 之间流出，以及 50%甲醇洗脱的 15~23 ml 之间流出，显示经葡聚糖凝胶柱，纳米乳中包封的与未包封的辣椒碱能完全分开。

再精密称取辣椒碱对照品适量，甲醇溶解并稀释制成与复方辣椒碱纳米乳含相同浓度辣椒碱的对照品溶液。同法经葡聚糖凝胶微柱分离，用蒸馏水洗脱，收集洗脱液前 6 ml 并转入 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，结果见图 1（D）。结果表明游离辣椒碱在此条件下没有被洗脱，可以确认洗脱液中前 6 ml 为包封有辣椒碱的纳米乳。



A. 辣椒碱对照品；B. 复方辣椒碱纳米乳；C. 空白复方纳米乳；D. 通过葡聚糖凝胶微柱后的辣椒碱对照品溶液；1.辣椒碱

图 1　辣椒碱及纳米乳高效液相色谱图

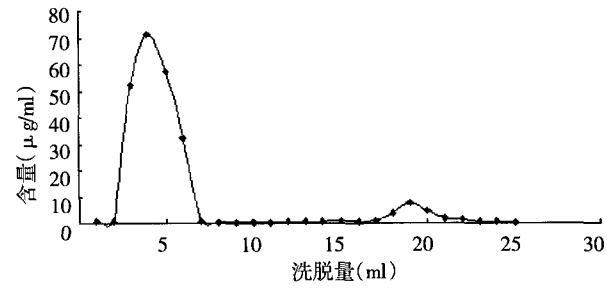


图 2　复方辣椒碱纳米乳的洗脱曲线

2.3.2 葡聚糖凝胶微柱柱回收率试验 精密吸取复方辣椒碱纳米乳 0.4 ml，按 2.3.1 项下方法，经葡聚糖凝胶微柱分离，前 15 ml 用蒸馏水洗脱，15 ml 后用 50%甲醇洗脱。收集 25 ml 内的洗脱液，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，计算含量，得洗脱后的辣椒碱总量W_1。

另取 0.4 ml 的复方辣椒碱纳米乳，置 25 ml 的容量瓶中，加蒸馏水 20 ml，甲醇定容，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。同法测定，计算含量，得洗脱前的辣椒碱总量 W_2。

按公式计算柱回收率：柱回收率 $=W_1/W_2\times 100\%$。

配制辣椒碱浓度分别为 1.00、1.25、1.50 mg/ml 的 3 种复方辣椒碱纳米乳各 3 份，依法测定，平均回收率为 97.98%(n=9)。

2.3.3 包封率的测定方法 精密吸取复方辣椒碱纳米乳 0.4 ml，按 2.3.1 项下方法，经葡聚糖凝胶微柱分离，以蒸馏水为洗脱液，收集洗脱液前 6 ml 并转入 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，计算含量，得复方辣椒碱纳米乳剂中被包封的辣椒碱的浓度 C_1。

另取复方辣椒碱纳米乳 0.4 ml，置 10 ml 的容量瓶中，加蒸馏水 6 ml，用甲醇定容，摇匀。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。同法测定，计算含量，得复方辣椒碱纳米乳剂中辣椒碱的总浓度 C_2。

按公式计算包封率：辣椒碱的包封率 $=C_1/C_2\times 100\%$。

2.3.4 复方辣椒碱纳米乳中辣椒碱包封率的测定结果 按 2.2.1 和 2.3.3 项下方法，测定 3 批样品的包封率。

3 批样品的包封率结果为 83.17%，87.74%，85.26%，均符合药典包封率 >80%的规定(参照药典 2005 版 2 部 附录XIX E 181~192 对分散在液体介质中的微球微囊脂质体的包封率的要求)。

3 讨 论

3.1 辣椒碱含量测定方法的选择

有文献报道可用紫外检测法测定辣椒碱的含量[4,5]，但因本品为复方制剂，紫外扫描显示，在甲醇中辣椒碱于 203、227 和 280 nm 处有最大吸收，而冬青油最大吸收在 207、237 和 306 nm 处，樟脑最大吸收峰在 289 nm 处，且处方中冬青油和樟脑含量相对辣椒碱较高，对辣椒碱的紫外检测造成了明显干扰，故采用 HPLC 法测定本品中辣椒碱的含量。

3.2 色谱条件的选择

辣椒碱在 203 nm 和 227 nm 的吸收峰接近末端吸收，故选择 280 nm 为检测波长。文献报道分离辣椒碱的流动相有多种[6]，本实验以磷酸水与甲醇的混合物为流动相，调整二者比例可获得不同分离效果及保留时间。以甲醇－水 /0.1%磷酸(70:30)为流动相时，辣椒碱峰与相邻峰的分离较好。

3.3 关于纳米乳破乳的方法

在建立测定方法的回收率试验中，无需对样品进行破乳即可进样测定。因 HPLC 流动相和供试品制备中定容的甲醇都能破乳。

3.4 葡聚糖凝胶微柱的分离原理

葡聚糖凝胶柱是利用分子筛的原理，使混合组分依据分子的大小不同而得到分离。纳米乳中包封了辣椒碱的纳米颗粒比游离辣椒碱分子大，不易进入凝胶的内部而先被洗脱，游离辣椒碱进入葡聚糖凝胶颗粒内部而后被洗脱。文献报道分离辣椒碱纳米乳多采用微柱离心法[5]，本实验在实际操作中发现，由于离心机启动达到转数与停止皆需要一段时间，且文献报道所需离心时间又非常短，造成对离心时间的控制存在较大的误差，对准确度有一定影响，故没采用离心加速洗脱。

3.5 关于纳米乳中药物包封率的要求

目前对于纳米乳并未有具体的药物包封率要求，但药典 2005 版 2 部 附录 XIX E 181~192 对分散在液体介质中的微球微囊脂质体的包封率有要求。分散在液体介质中的微球与脂质体等与纳米乳结构非常类似，且均属于微粒给药系统，结合其他文献报道[3,7,8]，本文最终以药典对脂质体等的包封率的规定作为参考。

参 考 文 献

[1] 于 力，张钧寿，周建平.纳米乳的研究及其在制剂学领域的应用[J].药学进展，2006，30(11)：491-496.

[2] 蔡 霞，吕竹芬，陈燕忠.纳米乳在透皮给药系统中的应用概况[J].广东药学院学报，2009，25(4)：429-432.

[3] 卢秀霞，龙晓英，丁 钢，等.辣椒碱纳米乳注射剂的制备及其体外评价[J].广东药学院学报，2009，25(1)：1-6.

[4] 洪 彗，龙晓英，李力任，等.葡聚糖微型凝胶柱测定辣椒碱柔性脂质体包封率的条件探讨[J].广东药学院学报，2005，21(2)：120-123

[5] 汤佩莲，龙晓英，林 丹，等.应用葡聚糖微型凝胶柱与一阶导数光谱法测定辣椒碱柔性脂质体的包封率[J].中药材，2005，28(8)：719-720.

[6] Barbero G F，Liazid A，Palma M，et al.Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column[J].Food Chemistry，2008，107(3)：1276-1282

[7] 朱 琨，刘晓红.脂质体分离及包封率测定方法[J]. 江苏教育学院学报，2009，26(2)：33-36.

[8] 张翠霞，王东凯，赵 鹏，等.尼莫地平亚微乳包封率的测定[J].药物分析杂志，2007，27(4)：539-554.

(责任编辑：冉明会)