

# HPLC 测定 PCL-g-PEI 载药胶束中葫芦素 B 的含量



胡欣悦, 史秀琳, 张毅\*

天津中医药大学中药学院, 天津 300193

**摘要:** 目的: 建立 PCL-g-PEI 聚合物载药胶束中葫芦素 B (Cuc B) 的含量测定方法。方法: 采用溶剂挥发法等制备 Cuc B 载药聚合物胶束, 采用 HPLC 测定载药胶束中 Cuc B 的含量。检测色谱条件: 采用 Agilent C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈/水/冰醋酸=45: 55: 0.1 (体积比); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 228 nm; 柱温: 25  $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ L。结果: Cuc B 在  $1 \times 10^{-6}$  ~ 0.1 mg/mL 浓度范围内线性关系良好 ( $r=0.9999$ ); 空白 PCI-g-PEI 载体无干扰; 该方法的精密度、稳定性、重复性以及回收率均符合要求。采用溶剂挥发法制备 Cuc B 载药胶束的包封率和载药量最高。结论: 本文建立的 Cuc B 测定方法专属性强, 有较好的精密度和重现性, 且加样回收率符合要求; 可定量检测 PCL-g-PEI 胶束中 Cuc B 的含量, 且可为中药 Cuc B 相关制剂的含量测定提供参考。

**关键词:** HPLC; 聚合物胶束; 葫芦素 B; PCI-g-PEI 共聚物

**DOI:** [10.57237/j.cse.2024.01.004](https://doi.org/10.57237/j.cse.2024.01.004)

## Determination of Cucurbitin B in PCL-g-PEI Micelle by HPLC

Hu Xinyue, Shi Xiulin, Zhang Yi\*

College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract:** Objective: To establish a method for the determination of Cucurbitin B in drug-loaded PCL-g-PEI polymer micelles. Methods: Cucurbitin B loaded micelles were prepared by solvent volatilization. HPLC method was used to determine the content of Cucurbitin B in PCL-g-PEI micelles. The separation was performed on Agilent C18 column (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m) with mobile phase consisted of acetonitrile/water/glacial acetic acid=45: 55: 0.1 (V/V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 228 nm, and the column temperature was 25  $^{\circ}$ C. Sample volume was 20  $\mu$ L. Result: The good linearity with Cucurbitin B concentration range was achieved in the rang of  $1 \times 10^{-6}$ ~0.1 mg/mL ( $r=0.9999$ ). Blank PCI-g-PEI micelle carrier had no interference. The precision, stability, repeatability and recovery of the method meet the requirements. Solvent volatilization method was employed to prepare Cucurbitin B drug-loaded micelle, which has the highest drug loading capacity among them. Conclusion: The method for the determination of Cucurbitin B established in this paper has strong specificity, good precision and reproducibility, and the recovery rate meets the requirements. The content of Cucurbitin B in drug-loaded polymer micelles can be

基金项目: 国家自然科学基金 (81202921).

\*通信作者: 张毅, 164122796@qq.com

收稿日期: 2024-02-05; 接受日期: 2024-03-15; 在线出版日期: 2024-03-18

<http://www.chemscieng.com>

quantitatively determined, which provides reference for the content determination of Cucurbitin B related preparations of Traditional Chinese medicine.

**Keywords:** HPLC; Polymeric Micelle; Cucurbitin B; PCL-g-PEI Polymer

## 1 引言

两亲性聚合物主要是通过共价键将它的亲水区域和疏水区域相连而形成的大分子聚合物。两亲性共聚物聚合物在选择性溶剂中可通过不同链段之间的非共价键相互作用自发构筑成各种有序组装体结构。由于各个链段的物理化学性质不同,共聚物在某些条件下可发生微相分离,在水溶液中能自组装形成胶束,疏水性的链段形成内核,亲水性的链段形成外壳,形成独特的壳-核结构聚合物胶束[1]。该胶束可作为疏水性药物的纳米容器,对疏水性药物具有增溶作用;利用其纳米级粒径增强药物对肿瘤组织血管壁的渗透,实现对肿瘤的被动靶向性释药行为;此外,对胶束的表面特征及粒径的合理设计有助于避免网状内皮系统的识别,延长药物在血液中的循环时间;可偶联靶向配体,使药物定位传递,实现主动靶向作用[2, 3]。

聚己内酯(PCL)是一种通过 $\varepsilon$ -己内酯在金属阴离子络合催化剂催化下开环聚合形成的一种可降解的合成高分子材料。它不溶于水,但可溶于多种有机溶剂,其降解产物为二氧化碳和水,对人体无毒且不会积蓄于体内,其最终降解产物将被机体吸收和排泄到体外,具有良好的透过性和生物相容性,是具有长效降解机制的疏水性聚合物,常作为两亲性聚合物的疏水性骨架和缓释药物载体材料[4, 5]。

葫芦素B(Cuc B)是从葫芦科等植物中分离得到的一类四环三萜类化合物,是葫芦素家族中含量最丰富的成员。现代研究表明,Cuc B有很强的药理活性,包括抗炎,降血糖,心血管效应,保肝作用[6-8]以及抗肿瘤活性等[9, 10],由于其水溶性差且不稳定,毒性较大,口服生物利用率低并出现以胃肠道为主的不良反应,极大的限制了它在临床医药方面的应用。近年来,国内外学者在不断创新研制新型Cuc B纳米制剂[11-15]。

本文采用两亲性聚合物PCL-g-PEI作为载体,Cuc B作为模型药物,采用溶剂挥发法等制备其胶束溶液,并建立了HPLC测定Cuc B的含量方法,且将该法用于测定载药胶束中Cuc B的含量。

## 2 实验部分

### 2.1 主要药品与试剂

试剂	来源
Cuc B 对照品	天津药物研究院
Cuc B 原料药	天津药物研究院
乙腈	北京百灵威科技有限公司
色谱纯甲醇	天津市康科德科技有限公司
丙酮	天津市康科德科技有限公司
二甲基亚砜(DMSO)	天津市康科德科技有限公司
PCI-g-PEI 聚合物	实验室自制

### 2.2 仪器

仪器	厂家
DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器	巩义市予华仪器有限责任公司
DS-7510DT 超声仪	上海生析超声仪器有限公司
FD-1C-50 冷冻干燥机	北京博医康实验仪器有限公司
电子分析天平	日本岛津公司
旋转蒸发器	上海亚荣生化仪器厂
高效液相色谱仪	日本岛津公司
马尔文电位粒径分析仪	马尔文仪器有限公司
低倍透射电子显微镜(TEM)	JEM 300

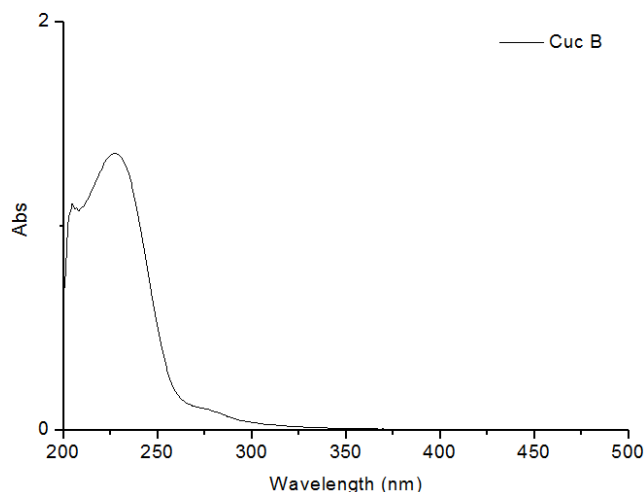


Figure 1 The maximum absorption wavelength of Cuc B

### 3 方法与结果

#### 3.1 检测波长的确定

配制适宜浓度的 Cuc B 对照品甲醇溶液, 以甲醇做为空白对照, 按照 UV-Vis 在 200-500 nm 波长范围内进行全波长扫描。记录 Cuc B 最大吸收波长。扫描结果如图 1 所示, 表明 Cuc B 最大吸收波长为 228 nm, 与相关文献中所记载的数据相符[16], 故选此波长作为 Cuc B 的检测波长。

#### 3.2 色谱条件

采用 HPLC 测定 Cuc B 的浓度。检测条件如下: 色谱柱为 C18 柱; 流动相为乙腈/水/冰醋酸 (体积比 45:55:0.1), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25 °C, 检测波长为 228 nm, 进样量为 20  $\mu$ L。

#### 3.3 Cuc B/PCL-g-PEI 载药胶束的制备

- (1) 透析法[17]: 2 mg PCL-g-PEI 和 2 mg 药物溶解于 10 mL DMSO 中, 在连续搅拌下逐渐滴入到 10 mL 蒸馏水中, 室温下搅拌 3 h 后, 将溶液转入透析袋中 (3500 D) 于去离子水中透析 48 h, 获得的载药胶束溶液 8000 rpm 下离心 10 min, 除去游离药物, 离心上清液过膜备用。
- (2) 薄膜水化法[18]: 2 mg PCL-g-PEI 和 2 mg 药物溶解于 10 mL 甲醇溶液中, 室温条件下搅拌过夜, 旋蒸除去有机溶剂, 使药物与载体的混合物于瓶壁上形成均匀的薄膜, 然后加入 10 mL 蒸馏水在 30 °C 连续搅拌下反应 24 h, 将所得载药溶液 8000 rpm 下离心 10 min, 除去游离药物, 离心上清液过膜备用。
- (3) 溶剂挥发法[19]: 2 mg PCL-g-PEI 溶于 10 mL 蒸馏水中, 2 mg 药物溶解于 10 mL 甲醇/丙酮 (v/v=5:5) 混合溶液中, 将有机相缓慢滴入水相中, 30 °C 条件下使有机溶剂自然挥发, 连续搅拌 3 天后, 旋蒸除去剩余有机溶剂, 将所得载药溶液 8000 rpm 下离心 10 min, 除去游离药物, 离心上清液过膜备用。

#### 3.4 专属性试验

精密吸取空白 PCL-g-PEI 载体 1 mg 于 10 mL 容量瓶中甲醇定容, 取此甲醇液适量加乙腈稀释定容, 摇匀后经 0.45  $\mu$ m 有机膜过滤, 吸取滤液 20  $\mu$ L 进样; 精

密吸取 Cuc B 载药胶束溶液适量, 乙腈稀释定容, 同法操作, 进样; 精密称取 Cuc B 对照品适量, 加少量甲醇溶解, 用乙腈稀释至适宜浓度, 同法操作, 进样。色谱图结果如图 2 所示, 由图中可看出, Cuc B 保留时间在 11 min 左右, 而空白胶束溶液在此时间内并无峰出现, 而载药胶束溶液在此时间出现的峰型较佳, 没有干扰因素, 说明 PCL-g-PEI 载体对 Cuc B 的含量测定无干扰, 符合分析要求, 方法专属性良好。

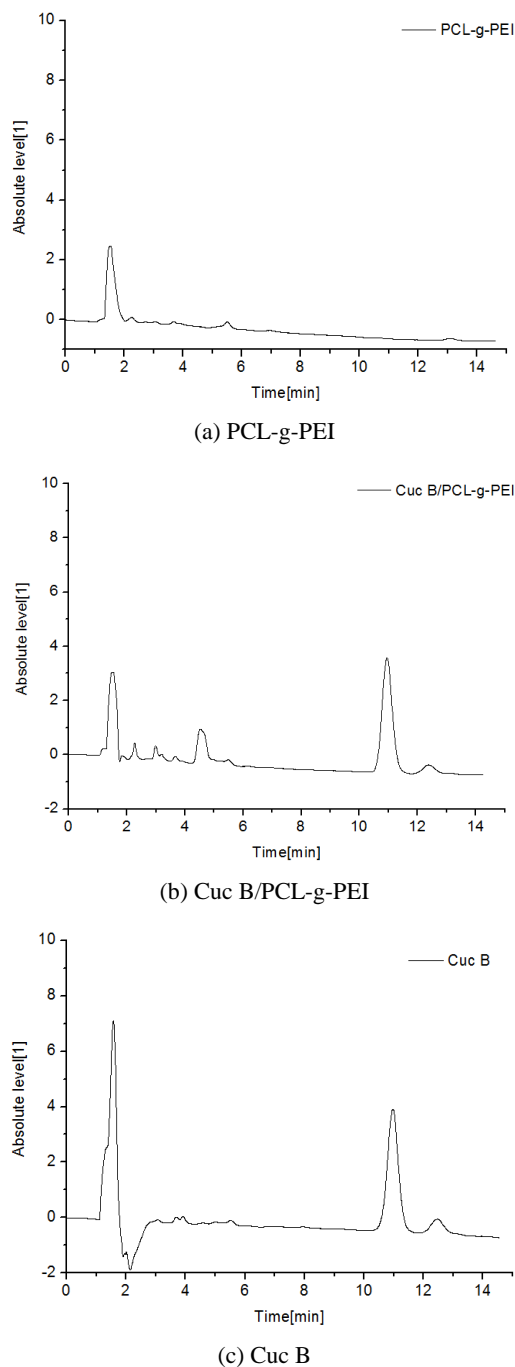


Figure 2 HPLC chromatogram

### 3.5 线性关系考察

精密称取 Cuc B 标准品适量, 加入甲醇溶解定容得浓度为 1.0 mg/mL 的标准贮备液; 精密移取一定量的此贮备液置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容得一系列浓度的标准品溶液, 各取 20  $\mu$ L 进样。以 Cuc B 的浓度为横坐标、峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见图 3。以最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线:  $y=7.6\times 10^6x+2718.0$ ,  $R^2=0.9999$ 。结果表明 Cuc B 在  $1\times 10^{-6}\sim 0.1$  mg/mL 浓度范围内浓度与峰面积的线性良好。

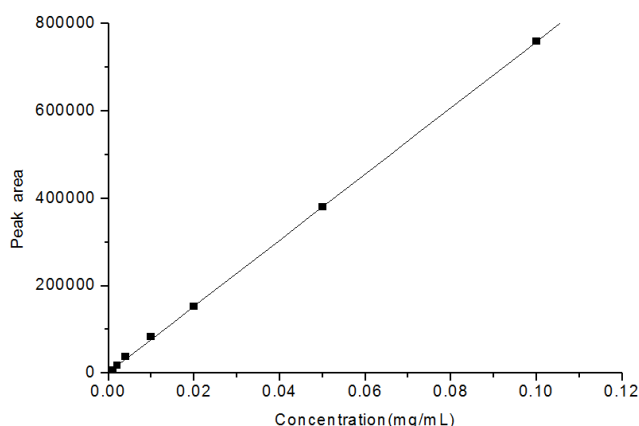


Figure 3 The standard curve of Cuc B

### 3.6 精密度考察

精密称取 Cuc B 2.5 mg, 置 25 mL 容量瓶中甲醇定容, 得储备液。精密移取储备液 1 mL、1 mL、2 mL, 分别置于 25 mL、10 mL、10 mL 容量瓶中甲醇定容, 得到 0.004 mg/mL、0.01 mg/mL、0.02 mg/mL 低、中、高三个浓度的 Cuc B 溶液。每份溶液分别在一日内日进样 5 次, 计算相对标准偏差 (RSD)。结果详见表 1, 由表中数据可以看出, 日内相对标准偏差皆小于 2%, 表明该方法精密度良好。

Table 1 Precision of HPLC method to determine Cuc B (n=5)

Addition ( $\mu$ g/mL)	Measured value ( $\mu$ g/mL)					Mean ( $\mu$ g/mL)	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
4	2.925	2.965	2.966	3.029	2.975	2.968	1.18
10	8.181	8.093	8.148	8.147	8.165	8.147	0.41
20	16.46	16.37	16.45	16.51	16.48	16.45	0.32

### 3.7 重复性实验

精密量取 6 份相同条件下制备的载药胶束溶液, 过膜后, 于相同的色谱条件下进样, 记录峰面积, 计

算 RSD 为 1.66%, 表明该方法重复性良好。

### 3.8 回收率实验

精密移取空白载体 PCL-g-PEI 甲醇溶液 3 份适量于容量瓶中, 加入 2.5 中所述 Cuc B 储备液, 分别配制成浓度为 0.004 mg/mL、0.01 mg/mL、0.02 mg/mL 的溶液, 取 20  $\mu$ L 进样, 平行 3 次, 测定回收率, 具体数据见表 2。从计算结果中可以看出, 方法回收率良好。

Table 2 The recovery of Cuc B with blank micelle (n=3)

Addition ( $\mu$ g/mL)	Measured value ( $\mu$ g/mL)	Recovery rate (%)	Mean $\pm$ SD (%)	RSD (%)
4	3.963	99.08	98.45 $\pm$ 1.01	1.02
4	3.996	99.90		
4	3.994	99.86		
10	9.792	97.92		
10	9.878	98.78		
10	9.829	98.29		
20	19.38	96.88		
20	19.43	97.15		
20	19.64	98.21		

### 3.9 聚合物胶束的形态与粒径

采用低倍透射电子显微镜 (TEM) 观察各共聚物胶束的形态。具体操作方法为: 将载药胶束水溶液滴于铜网上, 待溶剂基本挥发完后, 以磷钨酸染色, 室温下烘干溶剂后, 放入样品台, 通过 TEM 对粒子形态进行观察, 如图 4 所示, 载药胶束呈较规则的球形, 具有纳米级尺度且分散性良好。

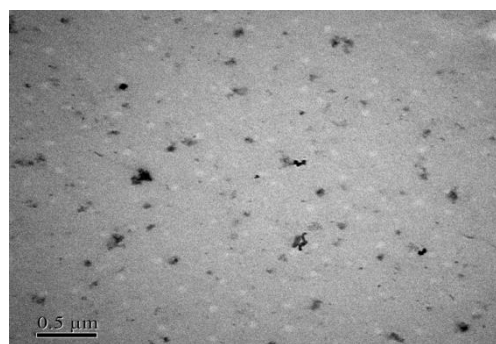


Figure 4 TEM photographs of drug-loaded PCL-g-PEI micelle

采用激光粒度仪对聚合物胶束粒径及其分布进行测定。以超纯水为溶剂, 配制适宜浓度 (大于聚合物的临界胶束浓度) 的空白胶束以及载药胶束样品稀溶液, 经 0.45  $\mu$ m 孔径水膜过滤后进行测定, 如图 5 所示, 载药聚合物胶束溶液的粒径较小, 100 nm 左右, 且分散性良好。

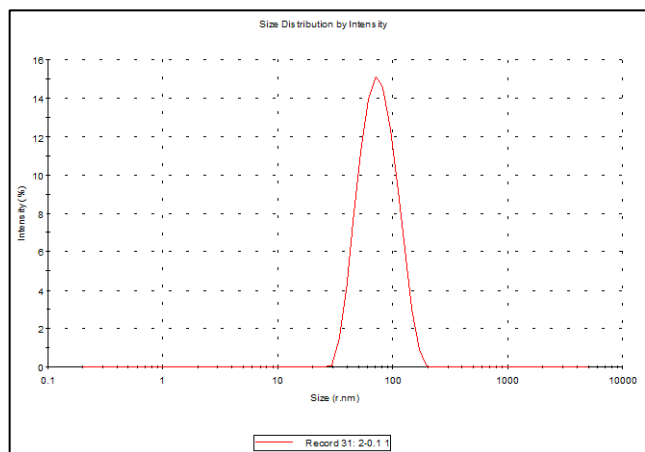


Figure 5 Size distribution of drug-loaded PCL-g-PEI micelles

### 3.10 Cuc B 载药胶束的包封率和载药量的测定

采用 HPLC 测定透析法、薄膜水化法及溶剂挥发法所制备的 Cuc B@PCL-g-PEI 胶束中 Cuc B 的含量。按下面的公式计算包封率和载药量:

$$\text{包封率} = (\text{胶束中的药物含量} / \text{投药量}) \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (\text{胶束中的药物含量} / \text{聚合物载体与药物的总量}) \times 100\%$$

结果如图 6 所示。

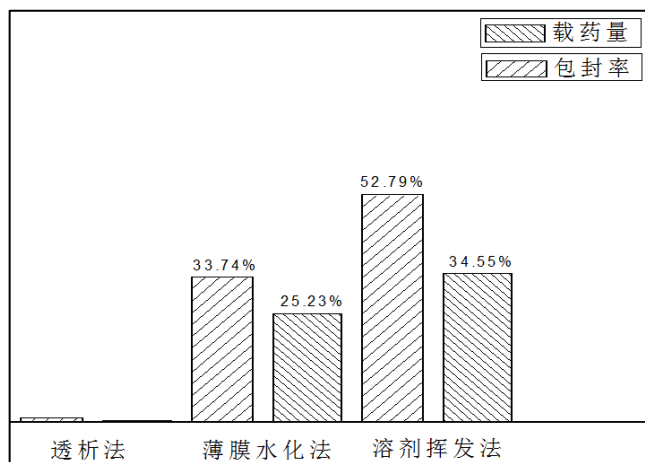


Figure 6 Cuc B Loading efficiency by different drug@micelle preparation method

## 4 讨论

### 4.1 含量测定方法的选择

目前中药 Cuc B 的含量测定方法有 UV 和 HPLC

法, 本次实验选择的是 HPLC 法, 由 UV-Vis 全波长扫描可知 Cuc B 的最大吸收波长是 228nm, 在此波长下载体 PCL-g-PEI 也有一定的吸收, 虽然可以通过以空白载体溶液作为空白对照来排除载体吸收的干扰, 但是相较于 HPLC 定量不够精准, 此外在 Cuc B 的原料药中存在的杂质也会对其吸收产生干扰, 所以 UV 的方法专属性和灵敏度低于 HPLC, 故本次实验选择的是 HPLC 法测定 Cuc B 的含量。

### 4.2 色谱条件的确定

文献报道的 HPLC 法测定 Cuc B 的含量的流动相有甲醇水, 乙腈水, 乙腈水加少量冰醋酸, 乙腈水加少量磷酸, 乙腈水加少量甲酸等。考虑到峰形和保留时间, 以及流动相中加入少量冰醋酸能有效地改善 Cuc B 的峰型, 防止其拖尾, 故本次实验选择乙腈水加少量冰醋酸作为流动相, 选择了最佳配比乙腈/水/冰醋酸 (体积比 45:55:0.1), 结果表明, 峰形较为尖锐, 分离度较好, 峰无拖尾现象, 拖尾因子 0.95~1.05, 且保留时间约 11min 左右。故检测条件为: 色谱柱为 C18 柱; 流动相为乙腈/水/冰醋酸 (体积比 45:55:0.1), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25℃, 检测波长为 228 nm, 进样量为 20 μL。

### 4.3 专属性考察

本实验分别精密称取空白 PCL-g-PEI、Cuc B 载药胶束及 Cuc B 对照品, 用适宜溶剂溶解、稀释定容至适宜浓度后经 0.45 μm 有机膜过滤, 吸取滤液 20 μL 进样, 可得出 Cuc B 保留时间在 11 min 左右, 载药胶束溶液在 11 min 时出现的峰型较为尖锐, 分离度较好, 峰无拖尾现象, 没有干扰, 且而空白胶束溶液在此时间内并无峰出现, 说明 PCL-g-PEI 载体对 Cuc B 的含量测定无干扰, 符合分析要求, 方法专属性良好。

### 4.4 聚合物胶束的形态、粒径表征

本实验采用选择溶剂挥发法制备载药胶束, 采用 TEM 观察各共聚物胶束的形态。通过 TEM 对载药胶束粒子形态进行观察, 可见载药胶束呈较规则的球形, 具有纳米级尺度且分散性良好。

本实验进一步采用激光粒度仪对共聚物胶束粒径及其分布进行测定。测试结果显示载药胶束的粒径为 100nm 左右, 且分散性良好。

## 4.5 Cuc B 载药胶束的包封率、载药量的测定

本实验分别采用透析法、薄膜水化法及溶剂挥发法制备了 Cuc B@PCL-g-PEI 载药胶束, 并以载药量和包封率作为评价指标筛选最佳载药方法。通过对不同载药方法的主要影响因素进行考察, 筛选出每种方法的最佳工艺。然后固定加入 Cuc B 和 PCL-g-PEI 的质量, 分别用三种最佳工艺的载药方法制备 Cuc B 载药胶束, 结果显示透析法制得的载药胶束包封率与载药量几乎为零, 薄膜水化法的包封率与载药量分别为 33.74% 和 25.23%, 溶剂挥发法的包封率与载药量最高, 分别为 52.79% 和 34.55%。综合上述, 我们选择溶剂挥发法制备载药胶束。

## 5 结论

本文采用溶剂挥发法等制备了 Cuc B@PCL-g-PEI 胶束, 并建立了 HPLC 用于载药聚合物胶束中 Cuc B 的包封含量的测定方法。载药胶束呈较规则的球形, 具有纳米级粒径, 为 100 nm 左右, 且载药胶束分散性良好。溶剂挥发法制得 Cuc B 载药胶束的包封率与载药量分别为 52.79% 和 34.55%。此方法灵敏度高、重现性好、分离度好, 符合样品分析要求, 该研究也可为相关中药制剂中 Cuc B 含量测定提供准确可靠的分析方法。

## 参考文献

- [1] Selianitis D, Pispas S. P. (MMA-co-HPMA)-b-POEGMA copolymers: synthesis, micelle formation in aqueous media and drug encapsulation [J]. *Polymer International*, 2021, 70(10): 1508-1522.
- [2] Jianfeng W, Cui Y, Guping T, et al. Glucose-functionalized multidrug- conjugating nanoparticles based on amphiphilic terpolymer with enhanced anti-tumorous cell cytotoxicity [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 441(2): 291-298.
- [3] M. Ghezzi, S. Pescina, C. Padula, et al. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions [J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 332(10): 312-336.
- [4] Neha R, Rakesh P, Jasmine K K, et al. Polycaprolactone-based materials in wound healing applications, 2022, 79: 7041-7063.
- [5] 高扬, 陈磊, 杨来侠, 等. 聚己内酯药物控释载体结构及制备方法研究进展 [J]. *高分子通报*, 2021(09): 19-30.
- [6] Kim M, Park S Y, Jin M L, et al. Cucurbitacin B inhibits immunomodulatory function and the inflammatory response in macrophages [J]. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 2015, 37(5): 473-480.
- [7] Sang J, Dhakal S, Lee Y. Cucurbitacin B Suppresses Hyperglycemia Associated with a High Sugar Diet and Promotes Sleep in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecules and cells*, 2021, 44(2): 68-73.
- [8] Dai S, Wang C, Zhao X, et al. Cucurbitacin B: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187, 106587.
- [9] Yuan R, Zhao W, Wang Q Q, et al. Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer in vivo and in vitro by triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis [J]. *Pharmacological research*, 2021, 170: 105748.
- [10] Ma W, Xiang Y, Yang R, et al. Cucurbitacin B induces inhibitory effects via the CIP2A/PP2A/C-KIT signaling axis in t (8; 21) acute myeloid leukemia [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2019, 139(4): 304-310.
- [11] Leng J, Dai X, Cheng X, et al. Biomimetic Cucurbitacin B-Polydopamine Nanoparticles for Synergistic Chemo-Photothermal Therapy of Breast Cancer [J]. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022, 10, 841186.
- [12] Bakar Ates F, Ozkan E, Sengel Turk C T. Encapsulation of cucurbitacin B into lipid polymer hybrid nanocarriers induced apoptosis of MDAMB231 cells through PARP cleavage [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 586: 119565.
- [13] 胡瑞瑞, 张家梁, 郝海军. 葫芦素 B 磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备 [J]. *中成药*, 2019, 41(11): 2571-2576.
- [14] 方宁. 葫芦素B-聚乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒的构建与药效学评价 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(08): 1557-1562.
- [15] Wang Q, Zhang C. Inhibitory Role of Cucurbitacin B with Poly(lactic Acid) Nanoparticles Carrying Long Non-Coding RNA (LncRNA) Cancer Susceptibility Candidate 2c (CASC2c) in Oral Cancer Cell Migration and Invasion Through Targeting of Signal Transcription and Activator of Transcription (STAT) Signaling Pathway [J]. *Science of Advanced Materials*, 2021, 13(10): 1892-1898.
- [16] 贾莉, 陈文, 赵辉. HPLC 法测定葫芦素胶束药物含量测定 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2013, 34(15): 2270-2271.
- [17] 肖艳, 陈洋, 严金良, 等. 不同内核结构 PEG-b-PCL 胶束的制备及其载药性能的研究 [J]. *高分子学报*, 2015(05): 524-534.
- [18] 胡慧中, 郑晓君, 胡巧红. 姜黄素—甘草次酸-PEI-PLGA 纳米粒的制备及工艺优化 [J]. *山东医药*, 2015, 55(16): 8-11.
- [19] 杨君, 梁慧敏, 丁平田, 等. 聚合物载药胶束的制剂学性质考察 [J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(12): 1578-1581.