

根皮素和缬沙坦共非晶的制备与评价

郭宇斐¹, 陈婷², 黄花¹, 钟雪萍¹, 刘耀¹, 胡春晖^{3*}, 严海英^{1*}

1. 青海大学 药学系, 青海 西宁 810001

2. 中国铁路青藏集团有限公司 社会保险部, 青海 西宁 810001

3. 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

摘要: 目的 根皮素(PT)为难溶性药物,且口服相对生物利用度低,通过与缬沙坦(VST)制备成共非晶(CA)提高其溶出速率,从而提高其口服相对生物利用度。方法 以VST为药物载体,PT为模型药物,采用喷雾干燥法制备CA。傅里叶红外图谱(FT-IR)观察样品的官能团结构及分子间相互作用力;差示扫描量热法(DSC)测定玻璃化转变温度(T_g)进一步验证PT和VST分子间的相互作用力;粉末X-射线衍射(PXRD)观察晶体学特性;扫描电子显微镜(SEM)观察样品的微观结构。考察药物在模拟胃液、模拟肠液中的本征溶出,计算溶出速率(IDR);考察CA在高温、不同湿度下的稳定性;考察CA、PT(200 mg·kg⁻¹)在大鼠体内药动学。结果 FT-IR和DSC表明CA中PT与VST有较强的分子之间相互作用力,PXRD和SEM证明CA为无定形态,表明PT与VST共喷雾形成了共非晶;CA本征溶出结果表明相较于PT,CA溶出速率有明显提升($P<0.05$);CA大鼠体内口服相对生物利用度相较原料药提高4.12倍, C_{max} 提高7.44倍。CA在高温条件(50±2)℃表现出良好的稳定性,但湿稳定性较差。结论 PT与VST成功制备成CA,明显的改善了PT的溶出及口服相对生物利用度,并且有较好的热稳定性。

关键词: 根皮素;缬沙坦;共非晶;本征溶出;相对生物利用度;稳定性

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2627-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.018

Preparation and evaluation of phloretin and valsartan co-amorphous

GUO Yufei¹, CHEN Ting², HUANG Hua¹, ZHONG Xueping¹, LIU Yao¹, HU Chunhui³, YAN Haiying¹

1. Department of Pharmacy, Qinghai University, Xining 810001, China

2. Social Insurance Department, China Railway Qinghai Tibet Group Co., Ltd., Xining 810001, China

3. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Xining 810016, China

Abstract: **Objective** Phloretin (PT) is an insoluble drug with low oral bioavailability. It is proposed to improve its dissolution rate by preparing co-amorphous (CA) with valsartan (VST), so as to improve its oral bioavailability. **Methods** CA was prepared by spray drying method with VST as drug carrier and PT as model drug. Fourier infrared spectroscopy (FT-IR) was used to observe the structure of functional groups and the intermolecular forces of the samples. The glass transition temperature (T_g) was determined by differential scanning calorimetry (DSC) to further verify the interaction between PT and VST molecules. The crystallographic properties of powder were observed by X-ray diffraction (PXRD). The microstructure of the sample was observed by scanning electron microscopy (SEM). Investigate the intrinsic dissolution of drugs in simulated gastric and intestinal fluids, and calculate the dissolution rate (IDR); Assess the stability of CA under high temperature and different humidity conditions; Investigating the pharmacokinetics of CA and PT (200 mg·kg⁻¹) in rats. **Results** FT-IR and DSC show that there is a strong interaction force between PT and VST in CA, and PXRD and SEM show that CA is amorphous, indicating that PT and VST are co-sprayed to form eutectic amorphous. The dissolution rate of CA is significantly higher than that of PT ($P<0.05$). The oral bioavailability *in vivo* was 4.12 times higher than that of the bulk drug, and the C_{max} was 7.44 times higher. CA showed good stability at high temperature (50±2)°C, but poor wet stability. **Conclusion** The CA prepared by PT and VST can obviously improve the dissolution rate and oral

收稿日期: 2024-07-10

基金项目: 2024年中央引导地方科技发展资金计划项目(2024ZY002);青海省基础研究计划项目(2022-ZJ-748)

第一作者: 郭宇斐,研究方向为物理药剂学。E-mail: YS221055001397@qhu.edu.cn

*共同通信作者: 胡春晖,研究方向为物理药剂学。E-mail: chunhuihu@hotmail.com

严海英,研究方向为天然药物中有效成分的研究。E-mail: 447182774@qq.com

bioavailability of PT, and has good thermal stability.

Key words: phloretin; Valsartan; co-amorphous; Intrinsic dissolution; oral bioavailability ,Stability

根皮素(PT)属于二氢查尔酮类,不仅大量存在于水果中,如苹果^[1-2],也在藏药(如俄色^[3]等)中大量存在。其具有较强的抗氧化^[4]、抗动脉粥样硬化^[5-6]、抗癌^[7-8]、抗炎^[9]、抗糖尿病^[10]等药理活性。其中抗动脉粥样硬化报道较多,其主要作用机制是通过抑制血小板衍生生长因子二聚体(PDGF-BB)诱导的主动脉平滑肌细胞(RASMCs)增殖和迁移及蛋白激酶B(Akt)和p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活化,并上调p27^{Kip1},下调PDGF-BB诱导的周期素依赖性激酶2(CDK2)、CDK4、黏附分子、基质金属蛋白酶9(MMP9)和Rb磷酸化。PT可显著减少颈动脉损伤后新生内膜形成,有良好的抗动脉粥样硬化的作用。但PT在常温下水中的溶解度仅为0.033 g·L⁻¹,水溶性较差,限制了在临床上的应用。因此需要通过有效制剂手段来改善PT的物理化学性质,增强溶解速率。

目前,小分子药物的水溶性和溶出速率差是药物开发中的最大挑战,提高小分子药物的溶出速率和口服相对生物利用度刻不容缓。如今提高难溶性药物溶出速率的手段有很多种,例如共非晶^[11-12]、无定形固体分散体^[13-14]、环糊精包合物^[15-17]、脂质体^[18-20]、纳米晶^[21-22]、成盐^[23]等。其中共非晶药物(Co-Amorphous, CA)是由Chieng等^[24]在2009年提出的概念,其为多组分单相体系,其中处于非晶态的组分可以是具有协同药理作用的药物-药物体系,也可以是药物-小分子辅料体系例如氨基酸^[25]、糖精^[26]、烟酰胺^[27]等。单纯非晶态的药物具有较高的热力学能,其可以有效的提高不溶性药物溶出速率和口服相对生物利用度^[28],然而这种方法有一定的局限性,极易重结晶^[29]。但是CA因为其由多组分非晶态物质构成,既可以增加稳定性,也可增强药理作用。

大量研究表明,CA体系有良好的稳定性及增溶作用,如Samipillai等^[30]利用糖精分别与达沙替尼和奥氮平制备了CA,可有效增加二者的稳定性; Ainurofiq等^[31]采用熔融猝灭法制备了氯雷他定和苯甲酸的CA,不仅提高了CA的稳定性更提高了氯雷他定的溶解速率;Beyer A等^[32]用喷雾干燥法成功制备了蔡普生和吡哆美辛的CA,大幅度改善了其二者的物理稳定性。

目前已有报道缬沙坦(VST)具有抗动脉粥样硬

化^[33]的药理作用,其作用机制为VST逆转了血管紧张素II(Ang II)对动脉粥样硬化进展的影响,调节了CD4⁺ T淋巴细胞的活性并增加Th2和Treg细胞的频率,同时伴有GATA结合蛋白3(GATA3)和大鼠叉头框蛋白P3(FOXP3) mRNA的高表达,以及细胞因子白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-10、IL-33和转化生长因子-β1(TGF-β1)的高表达,因此VST可以改善动脉粥样硬化。VST可以与其他药物形成药物-药物体系的CA,Turek M等^[34]利用缬沙坦和烟酰胺制备了CA,既提高了VST的溶解速率,又使VST和烟酰胺二者发挥协同作用。Lodagekar A等^[35]利用VST与硝苯地平制备成CA,使硝苯地平的溶解速率明显提高,且硝苯地平的口服相对生物利用度也大幅度提升。

因此本研究基于PT与VST共有的药理活性,期望通过将2种药物共喷雾制备成药物-药物体系的CA,达到协同提高药物溶解度和药效学的目的,通过傅里叶红外图谱(FT-IR)、差示扫描量热法(DSC)、粉末X-射线衍射(PXRD)、扫描电子显微镜(SEM)等表征手段研究了CA中的相互作用力以及其微观结构。采用本征溶出速率(IDR)评价药物的增溶效果。口服相对生物利用度是制剂是否有效的关键因素,本研究通过药动学研究CA在大鼠体内的口服相对生物利用度。稳定性是CA一个重要的指标,在不同环境中都能稳定存在,才能发挥制剂的作用,因此最后考察了CA在不同环境中的稳定性。

1 材料

1.1 主要仪器

JSM-7900F场发射扫描电镜(日本电子株式会社);ESCALAB™XI+型X射线光电子能谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);STA449F3 Jupiter®同步热分析仪(德国耐驰仪器制造有限公司);Agilent1260 Series 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);喷雾干燥仪(日本东京大和科技有限公司);ADL311S;德国IKA®RT10型多点加热磁力搅拌器(广州仪科实验室技术有限公司);ZRS-8G智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);DZF-6021型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药物及试剂

根皮素(北京偶合科技有限公司,批号

20230509); 缙沙坦(北京偶合科技有限公司, 批号20230509); 甲醇(默克股份公司, 批号1163207, 色谱醇); 无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂, 批号20220208, 分析纯)。

1.3 动物

SPF级Wistar大鼠, 6~8周龄, 雌雄各半, 体重为 (180 ± 20) g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(京)2024-0001。实验经青海大学医学院动物伦理委员会批准, 伦理学审查批号2022-QHUIPC23041, 饲养于青海省高原医学中心重点实验室。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 物理混合物(PM)的制备 分别取PT-VST(质量比20:80)的粉末, 过80目筛混合, 得到PT/VST-PM。

2.1.2 CA的制备 PT-VST(质量比20:80)的样品粉末溶于无水乙醇中使其总质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 进行喷雾干燥制备CA。仪器操作参数: 进口温度 90°C , 出口温度 50°C , 进样速度 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 雾化氮气压力 0.1 MPa ^[36]。将所制备的CA置于 25°C 真空干燥箱中, 干燥24 h去除残留的有机溶剂, 室温下保存至干燥器中备用。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取1.12 mg的PT至10 mL量瓶中, 甲醇定容得质量浓度为 $112.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜备用。

2.2.2 供试品溶液的配制 取适量的CA至10 mL量瓶中, 用甲醇溶解定容, PT质量浓度为 $77.40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜备用。

2.2.3 阴性溶液的配制 取适量的VST至10 mL量瓶中, 用甲醇溶解定容, VST质量浓度为 $120.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜备用。

2.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(60:40); 进样量10 μL ; 检测波长280 nm; 体积流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 30°C 。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取PT对照品溶液和供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样, 结果显示PT与VST均有峰出现, 其二者对应峰保留时间一致, 表明该方法专属性良好, HPLC图谱见图1。

2.4.2 线性范围 精密称取1.12 mg的PT置于10 mL量瓶中, 甲醇溶解定容得质量浓度 $112.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

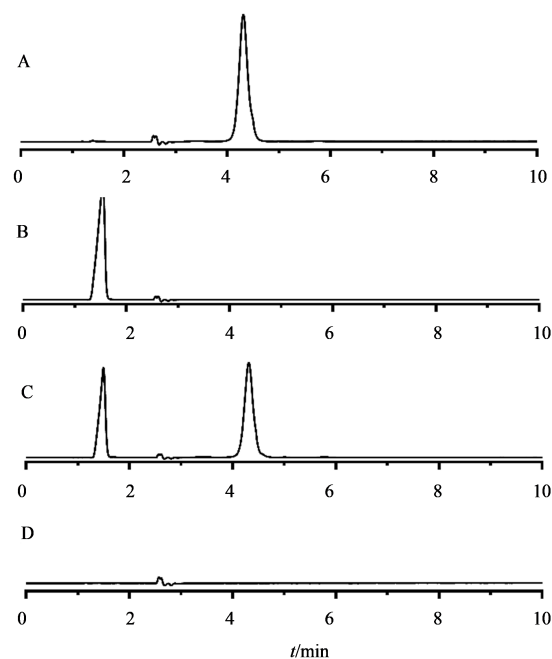


图1 PT(A)、VST(B)、CA(C)、空白溶剂(D)HPLC典型图谱
Fig. 1 HPLC chromatogram of PT(A), VST(B), CA(C), and blank solvent (D)

的溶液。用甲醇稀释2、5、10、20、50、100、200、500倍, 得质量浓度56.000、22.500、11.200、5.600、2.250、1.120、0.560、0.225 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。以PT质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 33.921 X + 22.136$, $R^2 = 0.9998$, 线性范围为0.225~112.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 精密度试验 配制高、中、低(112.00、22.50、1.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)3个质量浓度的PT甲醇溶液, 按“2.3”项下色谱条件, 重复进样6次, 连续测定3 d, 分别考察日内精密度和日间精密度。日内精密度RSD分别为0.29%、0.23%、1.41%。日间精密度RSD分别为0.92%、0.27%、2.18%。结果表明, 该方法精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取供试品溶液室温放置, 于0、1、3、6、12、24 h取样测定, 得到峰面积并计算RSD。CA峰面积RSD为0.79%。结果表明, 该方法稳定性良好, 且供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.5 重复性试验 平行制备6份供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 得到峰面积并计算RSD。CA峰面积RSD为0.52%。结果表明, 该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 平行取6份供试品溶液与高、中、低对照品溶液混合, 按“2.3”项下色谱条件, 测定PT的含量, 计算回收率。高、中、低加样回收率分别为102.06%、100.23%、96.10%。RSD分别为0.17%、1.55%、1.33%。

2.5 表征分析

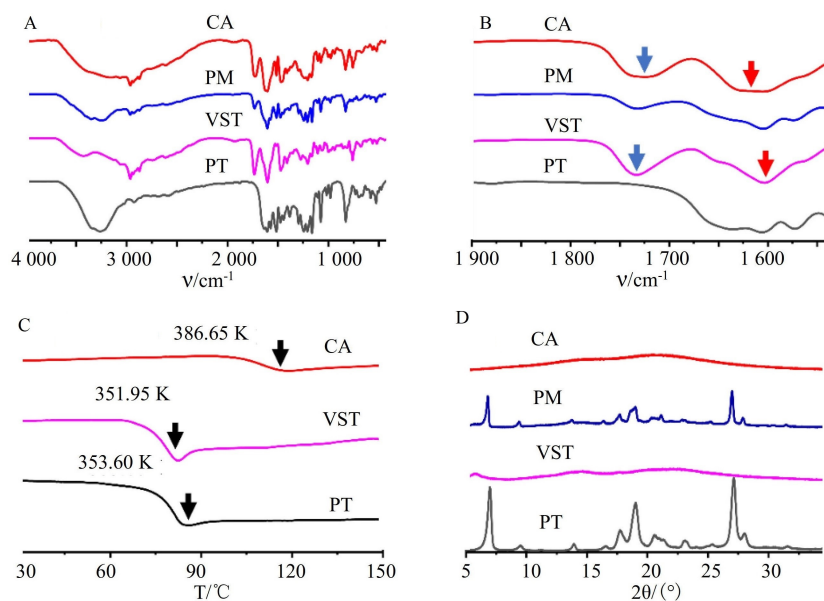
2.5.1 FT-IR 分析 FT-IR 可用于研究药物-药物分子间的相互作用。PT、VST、CA 及 PT/VST-PM 使用 FT-IR 测得谱图。准确地称出每个样品的质量,将它们放在玛瑙臼中,与 KBr 一起研磨,直到它们完全混合。混合后的样品在红外干燥机中干燥并压制。将样品放入样品池检测样品。检测范围为 $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,分辨率为 4 cm^{-1} 。

如图 2-A 所示,其中 PT 的主要特征峰为 $3\,261\text{ cm}^{-1}$ 处的 $-\text{OH}$ 伸缩振动峰, $1\,636\text{ cm}^{-1}$ 处的 $-\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰。VST 的主要特征峰为处于 $1\,600\text{ cm}^{-1}$ 处酰胺基和 $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 处羧基中 $-\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动峰, $3\,431\text{ cm}^{-1}$ 处的 $-\text{OH}$ 伸缩振动峰以及 $2\,964\text{ cm}^{-1}$ 处的 $-\text{NH}$ 伸缩振动峰。结果显示,与 CA 相比,PM 的吸收峰均为 PT 及 VST 红外吸收峰的简单叠加。CA 中 PT 的 $-\text{C}=\text{O}$ 吸收峰向低波数移动并与 VST 的酰胺基吸收峰合并,波数变为 $1\,603\text{ cm}^{-1}$,吸收峰明显变宽变钝(图 2-B 红色箭头)。值得一提的是 CA 中 VST 的羧基吸收峰波数为 $1\,735\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰也出现了明显的变钝变宽(图 2-B 蓝色箭头)。CA 中处于 $3\,267\text{ cm}^{-1}$ 处的 $-\text{OH}$ 吸收峰变宽变钝,其中 PT 的 $-\text{OH}$ 峰向高波数移动,VST 的 $-\text{OH}$ 峰向低波数移动。VST 中处于 $2\,964\text{ cm}^{-1}$ 处的 $-\text{NH}$ 峰并未发生明显的变化。综上所述,CA 中 PT 的 $-\text{C}=\text{O}$ 与 VST 中的 $-\text{OH}$ 可能产生了氢键相互作用,PT 的 $-\text{OH}$ 与 VST 的 $-\text{C}=\text{O}$ 可能产

生了氢键相互作用。

2.5.2 DSC 分析 将 $7.00\sim 15.00\text{ mg}$ 的样品装入铝坩锅中,盖子扎孔,样品以 $10\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率从 273 K 加热到 573 K 。玻璃化转变温度(T_g)的测定:首先加热 $273\sim 573\text{ K}$,平衡 5 min ,然后将样品从 573 K 以 $10\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ 冷却到 193 K ,氮气体积流量为 $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,再从 273 K 加热到 573 K ,升温速率为 $10\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ 。然后将实测 CA 的 T_g 与 Gordon-Taylor 方程^[37]预测的理论 T_g 值进行比较。

通过 FT-IR 观察到 CA 中 PT 和 VST 可能存在氢键相互作用。为了进一步确定 PT 和 VST 的相互作用力,DSC 测定了 PT、VST 和 CA 的 T_g 如图 2-C。Gordon-Taylor 方程已被广泛用于分析二元非晶体系的 T_g ,该方程假定 2 种组分是可混相的,可以用来评价 2 种组分在非晶混合物中的相互作用力。Gordon-Taylor 方程所预测的 T_g 值与实测 T_g 值之间的正负偏差可以表明非晶混合物是否形成均一体系并表明混合组分之间的作用力。若 CA 体系的实测 T_g 大于 Gordon-Taylor 方程的预测值,则表明混合物中 2 种组分相互作用力的强度大于单个组分之间的力。反之,如果实测值小于理论值,则单组分之间的作用力大于药物之间的作用力,不利于 CA 的形成。本研究中,DSC 实际测量纯 PT 和 VST 的 T_g 分别为 353.60 K 和 351.95 K ,Gordon-Taylor 方程得出 CA 的预测 T_g 为 352.24 K ,实际测量 T_g 为 386.65 K ,大于理论 T_g 。因此证明了 PT 与 VST 之间存在较强



蓝色箭头-CA 和 VST 中羧基吸收峰;红色箭头-CA 和 VST 中酰胺基吸收峰;黑色箭头- T_g 。

Blue arrow-carboxyl absorption peaks in CA and VST; Red arrow-amide absorption peaks in CA and VST; Black arrow- T_g .

图 2 FT-IR (A、B)、DSC (C)、PXRD (D) 表征分析

Fig. 2 FT-IR (A, B), DSC (C), and PXRD (D) characterization analysis

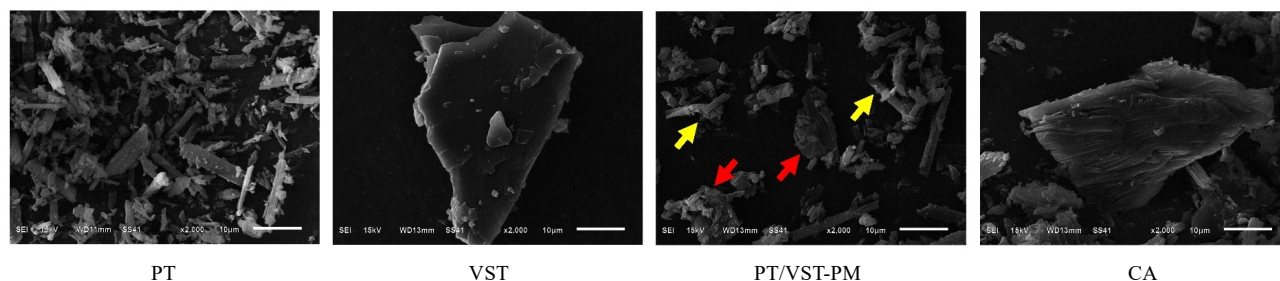
的分子间氢键相互作用。

2.5.3 PXRD 分析 分别取适量PT、VST、CA和PT/VST-PM采用粉末X-射线衍射仪Cu-K α 靶测定,扫描范围为 $2\theta=5^{\circ}\sim 35^{\circ}$,扫描速度为 $1(^{\circ})\cdot\text{min}^{-1}$ 。

PT、VST、CA及PT/VST-PM的PXRD光谱如图2-D所示。图中所示的PT衍射图显示出许多尖锐的峰,表明药物为结晶态。相反,VST的光谱中没有明显尖锐的晶体峰,表明其为非晶态。图中物理PM的衍射图样为PT和VST的叠加。与纯PT和VST的衍射图相比,CA所示的衍射图与VST相似并没有尖锐的峰存在。这些结果表明,PT和VST共喷雾后,因为其二者的相互作用力,PT从晶体态转变为非晶体态,并与VST形成了均一体系的CA。

2.5.4 SEM分析 利用SEM观察PT、VST、CA和PT/VST-PM固体粉末的微观结构和表面形貌。样品放置于平台上,镀金,工作电压为10 kV。

图3为PT、VST、PT/VST-PM和CA的SEM图像。PT可以清晰地看到长而扁平的针状晶体,VST的形态为表面光滑且无规则的非晶体态。PT/VST-PM则表现为既有形状规则的针状晶体(黄色箭头),又有形态不规则表面光滑的非晶体(红色箭头),是二者简单的物理混合。CA则表现为表面粗糙且性状不规则的非晶体,PT从晶体态转化为非晶体态。进一步证明PT和VST共同组成的CA为均一体系的共非晶体系。



黄色箭头-PT晶体;红色箭头-VST固体。
Yellow arrow-PT crystal; Red arrow-VST solid.

图3 SEM典型图片

Fig. 3 Typical SEM images

2.6 本征溶出

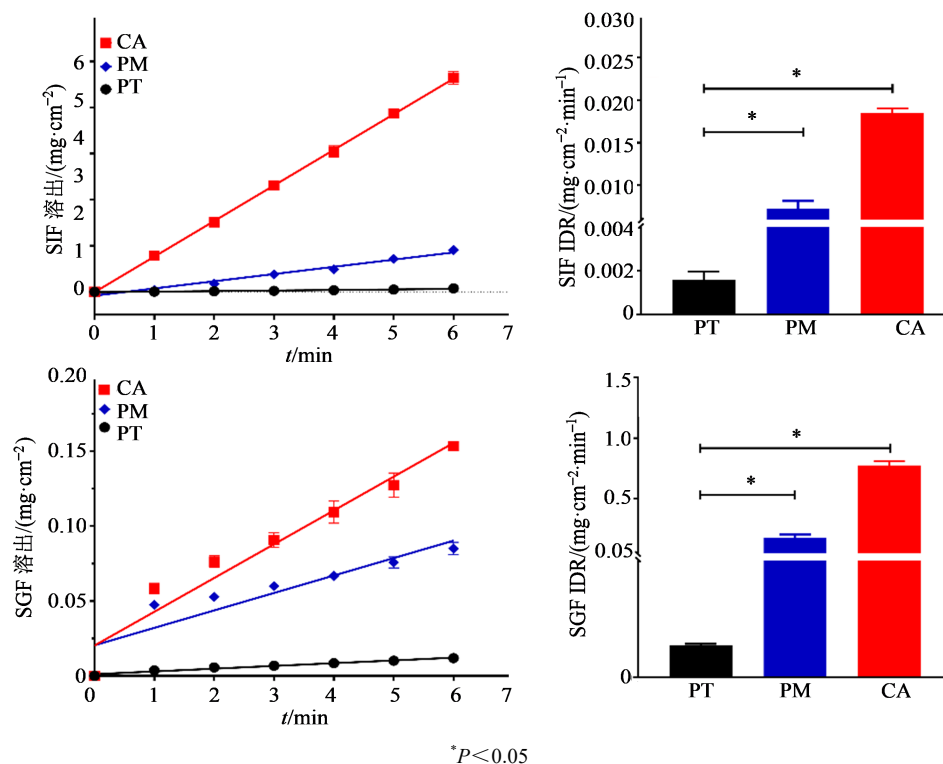
比较PT、PT/VST-PM和CA的IDR,使用本征溶出。分别称取约100.00 mg的纯PT、PT/VST-PM和CA于压片机压制成圆柱形,药片直径为10 mm,压力为12 MPa,持续1 min。将药片一侧用石蜡密封于注射器中,只暴露一个表面,以保证每个药片具有相同的溶出表面积。在25 mL烧杯中加入20 mL的溶出介质,以 $400\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率搅拌下每隔1 min抽取0.3 mL溶液。样品以 $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,取上清液HPLC分析。

一定量的药物在一定介质中、单位面积和单位时间的溶出质量被称为药物的本征溶出,往往用IDR来表示。IDR并非溶解平衡,它与溶解速率和体内溶出动力学的相关性更大^[38]。本研究为更好的探究CA在体内的溶出过程,分别用模拟胃液(SGF,pH 1.2)^[39]以及模拟肠液(SIF,pH 6.5)^[40]来作为本征溶出的溶出介质。如图4所示,分别对比了PT、PT/VST-PM和CA在SIF和SGF中的IDR,从图中可以看到无论是在酸性条件还是碱性条件,CA体系均较PT的IDR显著升高($P<0.05$),在2种

不同的溶出介质中PT的IDR均最小[SGF中 $(0.002\pm 0.001)\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$,SIF中 $(0.014\pm 0.001)\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$],CA的IDR最大[SGF中 $(0.018\pm 0.001)\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$,SIF中 $(0.774\pm 0.033)\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$],CA相较纯的PT提高了9.55倍,这可能是由于PT和VST在CA中有较强的相互作用力,使得CA中PT的溶出速率得到了极大的改善,为CA体系在改善体外溶出和口服相对生物利用度提供了可能。值得一提的是,不论是纯PT还是CA在SGF中的IDR均整体低于SIF,这可能是因为PT的溶解速率有pH值相关性,在碱性条件溶出速率较快,导致其在肠道的吸收更好。

2.7 药动学

2.7.1 血浆样品的采集 用Wistar大鼠雌雄各半($n=6$),平均体质量约为200 g,进行体内药动学评价。禁食24 h,自助饮水。CA、PT以PT剂量 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$ 给药。给药后2、5、10、15、30、45、60、120、240、360、480、720、1 440 min采集500 μL 的血样,以 $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心

图4 溶出率($n=3$)Fig. 4 Dissolution rate($n=3$)

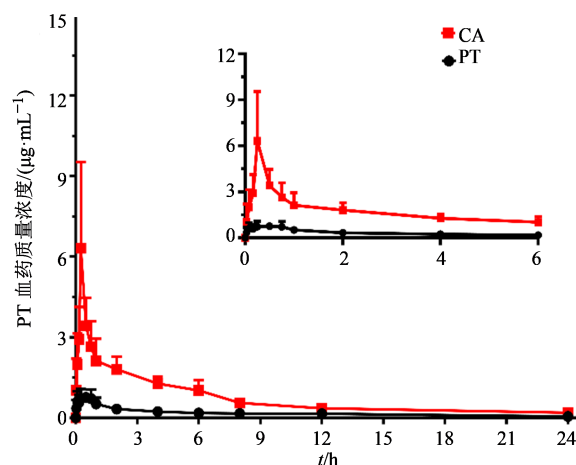
10 min, 取上层血浆保存在 -80°C 待处理。

2.7.2 血浆样品的处理 精密取 $100\ \mu\text{L}$ 血浆样品于离心管中, 加入 $300\ \text{mL}$ 色谱级甲醇, 涡旋 $3\ \text{min}$, $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C 离心 $10\ \text{min}$, 取上清液过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜后进行HPLC分析^[41]。

2.7.3 血药浓度-时间曲线 如图5所示, 在几乎所有的时间点, CA的血药浓度均高于纯PT, 表明CA制剂能有效地提高PT的血药浓度。与纯PT相比, CA经ig给药后 $C_{\max}$ 和 AUC_{0-7} 值均有明显提高。经统计学处理, 如表1中所示CA中PT的 $C_{\max}$ 为 $6.368 \pm 3.135\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 比纯PT中的 $C_{\max}$ ($0.855 \pm 0.260\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 提高了7.45倍 ($P < 0.05$)。值得一提的是, CA的 AUC_{0-7} [$(1\ 033.469 \pm 180.760)\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] 比纯PT [$(250.690 \pm 28.891)\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] 提高了4.12倍 ($P < 0.05$), 表明PT与VST制备成CA后的口服相对生物利用度提高了4.12倍。CA中PT相对生物利用度的提高可能归因于CA相较于纯PT在胃肠道中较高的溶出速率, 使药物在胃肠道中的吸收得以提高。这表明CA是一种改善难溶性药物在体内口服相对生物利用度很好的策略。

2.8 固态稳定性

热稳定性遵循《中国药典》2020年版药物与制剂稳定性试验指导原则, 热稳定性试验将供试品开

图5 PT制剂的血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 5 Blood concentration time curve of PT formulation ($\bar{x} \pm s, n=6$)

口置适宜的恒温设备中, 设置温度为 $(50 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 考察时间为 $30\ \text{d}$, 分别于 $0, 5, 10, 15, 30\ \text{d}$ 取样。不同湿度试验将样品开口置于 25°C 、相对湿度(RH) 10%、30%、60%的恒湿密闭容器中, 分别于 $0, 5, 10\ \text{d}$ 等取样。

非晶态可以有效提高原料药在水中的溶解度和溶解速率, 然而由于其较高的自由能, 物理稳定性易受到损害。在非晶态药物制剂的制造或储存过程中, 有时会发生结晶和相分离。因此, 本研究

表1 PT和CA的相关药动学参数

Table 1 Relevant pharmacokinetic parameters of PT and CA

参数	单位	PT	CA
$AUC_{0\sim t}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	250.690 ± 28.891	$1\,033.469\pm 180.760^*$
$AUC_{0\sim\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	302.647 ± 37.954	$1\,117.569\pm 185.025^*$
$MRT_{0\sim t}$	min	439.866 ± 51.890	368.899 ± 81.841
$MRT_{0\sim\infty}$	min	719.756 ± 168.457	577.775 ± 202.304
$t_{1/2}$	min	634.089 ± 259.610	455.763 ± 210.332
$t_{\max}$	min	22.500 ± 8.216	17.500 ± 6.124
CL_{p}/F	$\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.670 ± 0.088	$0.183\pm 0.032^*$
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.855 ± 0.260	$6.368\pm 3.135^*$

与PT组比较: * $P<0.05$ 。* $P<0.05$ vs PT group.

分别对CA的热稳定性和湿稳定性做了探究。通过FT-IR、PXRD及IDR来考察其稳定性。

如图6所示,在高温条件下,CA 30 d内FT-IR图谱未发生变化,即未发生相分离;PXRD图谱中30 d内CA一直处于非晶态,并无重结晶现象;本征溶出的IDR在30 d内并未有显著性差异,CA热稳定性

在30 d良好。

对于CA体系,湿度是影响其稳定性重要的因素,水分子作为一个极性溶剂和高效塑化剂^[42],水对CA内的非晶态药物-药物相互作用和分子流动性有极大影响^[43],易使CA中非晶态的药物出现相分离或重结晶,使制剂失去其增溶作用。因此,本

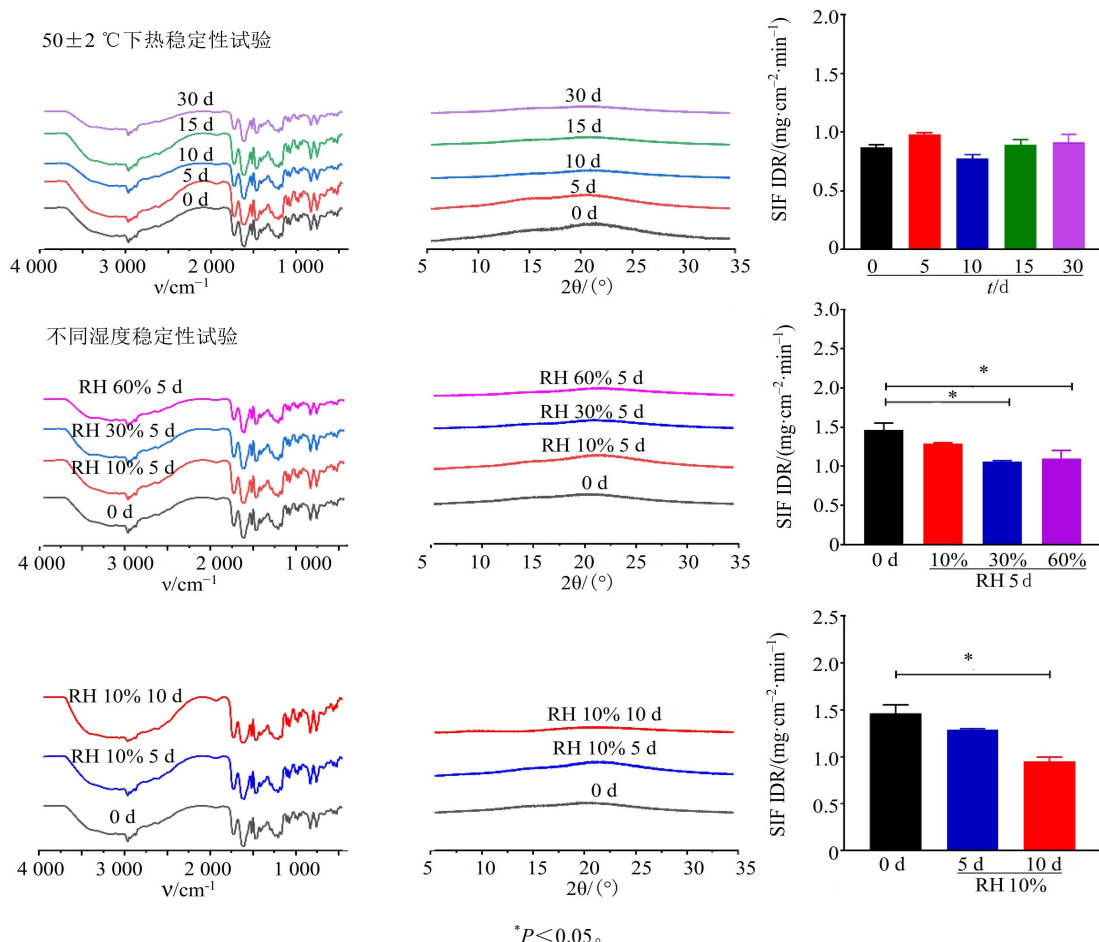


图6 热稳定性及不同湿度稳定性试验

Fig. 6 Thermal stability and different humidity stability tests

研究不同的湿度环境 10%、30%、60% 来探究 CA 的湿稳定性。湿度对 CA 的影响较大,在 RH 30%、60% 的环境下,5 d 内虽然从 FTIR 和 PXRD 未判断出其有明显相分离和重结晶,但是本征溶出 IDR 的降低 ($P < 0.05$),表明其共非晶体系已发生改变,可能出现了一定的相分离。虽然 RH 为 10% 时,CA 在 5 d 内并未受影响,但在第 10 天时,本征溶出发生了显著性变化 ($P < 0.05$),说明其第 10 天共非晶体系已经发生了改变。CA 在 RH 较低的环境下,可以短暂的稳定,但是在 RH 较高的情况下稳定性较差。

2.9 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,测量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本的比较采用方差分析。采用 DAS 3.2.8 进行非房室模型分析,评价药动学参数。

3 讨论

PT 拥有广泛的药理活性,但是由于其在水中的溶解度低,使其应用范围受到了限制,目前已开发出较多的剂型来提高其溶解度。如董丹丹等^[44]利用聚乙二醇-聚乳酸与 PT 制备成纳米胶束,使其口服相对生物利用度提高 3.34 倍。Lu 等^[45]利用烟酰胺与 PT 制备了共晶,一定程度的提高了 PT 的溶解度。禹瑞等^[46]利用 PT 制备成脂质体,较大的提高了 PT 的水溶性,且口服相对生物利用度提高了 2.44 倍。

非晶化的物质相较于晶体物质拥有较高的自由能,本研究使 PT 从晶体态转变为非晶体态,并与 VST 形成共非晶。相较于 PT 与烟酰胺共晶,本研究既利用 VST 与 PT 形成 CA,又利用二者对抗动脉粥样硬化不同的作用机制。不仅提高了 PT 的溶出速率和口服相对生物利用度,也提升了 2 种药物的协同药理作用。

本研究通过 PT 与 VST 共喷雾制备 CA,通过 FT-IR 发现了 PT 和 VST 之间可能有相互作用力,利用 DSC 实际测量 T_g 值和 Gordon-Taylor 方程预测的理论值比较,证实了 PT 和 VST 有较强的相互作用力,从而二者可以共同处于非晶态,并提高 PT 的溶出速率。PXRD 和 SEM 可以看到,PT 与 VST 晶体态彻底转变为非晶体态,微观形貌从有规则形状的针状晶转变为表面粗糙且形状不规则的非晶态固体。体外溶出发现,不论什么环境,CA 的溶出速率均高于纯 PT,这也与体内的口服相对生物利用度是一致的。相对于纯的 PT,CA 的体内口服相对生物利用度提高了 4.12 倍。进一步探究了 CA 的稳定性,通过高温试验和不同湿度的试验,得知 CA 具有

较好的热稳定性,并可以在低湿度环境短暂的稳定。

CA 是一种成功的制剂,可以提高 PT 在体外的溶出速率,进而提高 PT 在体内的口服相对生物利用度。当然 CA 也有一定的缺陷,湿度是影响 CA 稳定存在的最大影响因素。今后可以引入不同的载体材料,形成三元^[47]甚至多元均一的共非晶体系,从而解决 CA 在高湿度环境中的稳定性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐凯, 吕海涛. 苹果皮中根皮素的提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(12): 109-112.
Xu K, Lv H T. Technique of extracting phloretin in apple pericarp [J]. Food Res Dev, 2009, 30(12): 109-112.
- [2] 张宏宇, 周武喜, 赵余庆. 根皮素衍生化的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4353-4360.
Zhang H Y, Zhou W X, Zhao Y Q. Research progress on synthesis of phloretin derivatives [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(20): 4353-4360.
- [3] 夏冬梅, 李敏, 王道清, 等. 藏药俄色叶中根皮苷、根皮素含量分析 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(8): 618-622.
Xia D M, Li M, Wang D Q, et al. Quantification analysis of phloridzin, phloretin in Tibetan medicine "eseye" [J]. Mod Chin Med, 2014, 16(8): 618-622.
- [4] Vasantha Rupasinghe H P, Yasmin A. Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin [J]. Molecules, 2010, 15(1): 251-257.
- [5] Stangl V, Lorenz M, Ludwig A, et al. The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets [J]. J Nutr, 2005, 135(2): 172-178.
- [6] Wang D, Wang Q J, Yan G L, et al. Phloretin inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced rat aortic smooth muscle cell proliferation, migration, and neointimal formation after carotid injury [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2015, 65(5): 444-455.
- [7] Yang K C, Tsai C Y, Wang Y J, et al. Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human hep G2 cells [J]. Mol Carcinog, 2009, 48(5): 420-431.
- [8] Tuli H S, Rath P, Chauhan A, et al. Phloretin, as a potent anticancer compound: From chemistry to cellular interactions [J]. Molecules, 2022, 27(24): 8819.
- [9] Chang W T, Huang W C, Liou C J. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in

- lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages [J]. Food Chem, 2012, 134(2): 972-979.
- [10] Hassan M, El Yazidi C, Landrier J F, et al. Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 208-213.
- [11] Dengale S J, Grohgan H, Rades T, et al. Recent advances in co-amorphous drug formulations [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 100: 116-125.
- [12] Kasten G, Lobo L, Dengale S, et al. *In vitro* and *in vivo* comparison between crystalline and co-amorphous salts of naproxen-arginine [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2018, 132: 192-199.
- [13] Szabó E, Záhonyi P, Brecka D, et al. Comparison of amorphous solid dispersions of spironolactone prepared by spray drying and electrospraying: The influence of the preparation method on the dissolution properties [J]. Mol Pharm, 2021, 18(1): 317-327.
- [14] Takano R, Maurer R, Jacob L, et al. Formulating amorphous solid dispersions: Impact of inorganic salts on drug release from tablets containing itraconazole-HPMC extrudate [J]. Mol Pharm, 2020, 17(8): 2768-2778.
- [15] Buchter V, Priotti J, Leonardi D, et al. Preparation, physicochemical characterization and *in vitro* and *in vivo* activity against *Heligmosomoides polygyrus* of novel oral formulations of albendazole and mebendazole [J]. J Pharm Sci, 2020, 109(5): 1819-1826.
- [16] Aytac Z, Uyar T. Core-shell nanofibers of curcumin/cyclodextrin inclusion complex and polylactic acid: Enhanced water solubility and slow release of curcumin [J]. Int J Pharm, 2017, 518(1/2): 177-184.
- [17] Cutrignelli A, Sanarica F, Lopalco A, et al. Dasatinib/HP- β -CD inclusion complex based aqueous formulation as a promising tool for the treatment of paediatric neuromuscular disorders [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 591.
- [18] Askarizadeh A, Butler A E, Badiie A, et al. Liposomal nanocarriers for statins: A pharmacokinetic and pharmacodynamics appraisal [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1219-1229.
- [19] Shi J Y, Zhang Y, Zhang X M, et al. Remodeling immune microenvironment in periodontitis using resveratrol liposomes as an antibiotic-free therapeutic strategy [J]. J Nanobiotechnol, 2021, 19(1): 429.
- [20] Wang Q L, Wei C M, Weng W, et al. Enhancement of oral bioavailability and hypoglycemic activity of liquiritin-loaded precursor liposome [J]. Int J Pharm, 2021, 592: 120036.
- [21] Bonaccorso A, Gigliobianco M R, Pellitteri R, et al. Optimization of curcumin nanocrystals as promising strategy for nose-to-brain delivery application [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(5): 476.
- [22] Imono M, Uchiyama H, Yoshida S, et al. The elucidation of key factors for oral absorption enhancement of nanocrystal formulations: *In vitro-in vivo* correlation of nanocrystals [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2020, 146: 84-92.
- [23] Park C, Meghani N M, Shin Y, et al. Investigation of crystallization and salt formation of poorly water-soluble telmisartan for enhanced solubility [J]. Pharmaceutics, 2019, 11(3): 102.
- [24] Chieng N, Aaltonen J, Saville D, et al. Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71(1): 47-54.
- [25] Chavan R B, Thipparaboina R, Kumar D, et al. Co amorphous systems: A product development perspective [J]. Int J Pharm, 2016, 515(1/2): 403-415.
- [26] Gao Y, Liao J, Qi X, et al. Coamorphous repaglinide-saccharin with enhanced dissolution [J]. Int J Pharm, 2013, 450(1/2): 290-295.
- [27] Shayanfar A, Ghavimi H, Hamishekar H, et al. Coamorphous atorvastatin calcium to improve its physicochemical and pharmacokinetic properties [J]. J Pharm Pharm Sci, 2013, 16(4): 577-587.
- [28] van Den Abeele J, Kostantini C, Barker R, et al. The effect of reduced gastric acid secretion on the gastrointestinal disposition of a ritonavir amorphous solid dispersion in fasted healthy volunteers: An *in vivo* - *in vitro* investigation [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 151: 105377.
- [29] Wang X L, Zhang L, Ma D Y, et al. Characterizing and exploring the differences in dissolution and stability between crystalline solid dispersion and amorphous solid dispersion [J]. AAPS PharmSciTech, 2020, 21(7): 262.
- [30] Samipillai M, Mirmehrabi M, Rohani S. Co-amorphous solids of dasatinib and olanzapine by saccharin with promising physicochemical properties [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2021, 66: 102800.
- [31] Ainurofiq A, Mauludin R, Mudhakir D, et al. A novel desloratadine-benzoic acid co-amorphous solid: Preparation, characterization, and stability evaluation [J]. Pharmaceutics, 2018, 10(3): 85.
- [32] Beyer A, Radi L, Grohgan H, et al. Preparation and recrystallization behavior of spray-dried co-amorphous naproxen-indomethacin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2016, 104: 72-81.

- [33] Meng K, Zeng Q T, Lu Q H, et al. Valsartan attenuates atherosclerosis via upregulating the Th2 immune response in prolonged angiotensin II-treated ApoE^{-/-} mice [J]. Mol Med, 2015, 21(1): 143-153.
- [34] Turek M, Różycka-Sokołowska E, Koprowski M, et al. Role of hydrogen bonds in formation of co-amorphous valsartan/nicotinamide compositions of high solubility and durability with anti-hypertension and anti-COVID-19 potential [J]. Mol Pharm, 2021, 18(5): 1970-1984.
- [35] Lodagekar A, Chavan R B, Chaitanya Mannava M K C, et al. Co amorphous valsartan nifedipine system: Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 139: 105048.
- [36] 曾慧玲, 蒋且英, 赵国巍, 等. 基于共无定形技术葛根素改善黄芩苷物理稳定性和溶出度及其机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6423-6430.
- Zeng H L, Jiang Q Y, Zhao G W, et al. Analysis on improvement of physical stability and dissolution of amorphous baicalin by puerarin and its mechanism in puerarin-baicalin co-amorphous system [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(20): 6423-6430.
- [37] Xu X Y, Grohgan H, Rades T. Influence of water on amorphous lidocaine [J]. Mol Pharm, 2022, 19(9): 3199-3205.
- [38] Chen Y J, Wang S J, Wang S, et al. Initial drug dissolution from amorphous solid dispersions controlled by polymer dissolution and drug-polymer interaction [J]. Pharm Res, 2016, 33(10): 2445-2458.
- [39] Maltais A, Remondetto G E, Subirade M. Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds [J]. Food Hydrocoll, 2009, 23 (7): 1647-1653.
- [40] Qian F, Wang J, Hartley R, et al. Solution behavior of PVP-VA and HPMC-AS-based amorphous solid dispersions and their bioavailability implications [J]. Pharm Res, 2012, 29(10): 2765-2776.
- [41] Yuan Y Z, Yu F, Mei W, et al. Studies on pharmacokinetic properties and absorption mechanism of phloretin: *In vivo* and *in vitro* [J]. Biomed Pharm, 2020, 132: 110809.
- [42] Li N, Gilpin C J, Taylor L S. Understanding the impact of water on the miscibility and microstructure of amorphous solid dispersions: An AFM-LCR and TEM-EDX study [J]. Mol Pharm, 2017, 14(5): 1691-1705.
- [43] Liu J W, Rades T, Grohgan H. The influence of moisture on the storage stability of co-amorphous systems [J]. Int J Pharm, 2021, 605: 120802.
- [44] 董丹丹, 焦红军, 郝海军. 根皮素聚乙二醇-聚乳酸纳米胶束的制备、表征及口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 779-788.
- Dong D D, Jiao H J, Hao H J. Preparation and characterization of phloretin-mPEG-PLA nanomicelles and oral pharmacokinetic study [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(3): 779-788.
- [45] Lu Z Y, Chen H K, Mo J X, et al. Cocrystal of phloretin with isoniazid: Preparation, characterization, and evaluation [J]. RSC Adv, 2023, 13(16): 10914-10922.
- [46] 禹瑞, 杨璞, 崔晓鸽, 等. 根皮素前体脂质体制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3173-3179.
- Yu R, Yang P, Cui X G, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of phloretin proliposomes [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(10): 3173-3179.
- [47] Knapik-Kowalczyk J, Kramarczyk D, Jurkiewicz K, et al. Ternary eutectic ezetimibe-simvastatin-fenofibrate system and the physical stability of its amorphous form [J]. Mol Pharm, 2021, 18(9): 3588-3600.

[责任编辑 兰新新]