

根皮素磷脂复合物的制备、表征及体内外溶出行为评价

黄 珊, 翟秉涛, 杨 洁, 邹俊波, 程江雪, 张小飞, 史亚军, 郭东艳*

陕西中医药大学, 秦药特色资源研究与开发国家重点实验室(培育)/陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西
西安 712046

摘要: 目的 制备根皮素磷脂复合物(Phl-PC)并探讨其形成机制,以改善根皮素的经皮渗透性,提高其生物利用度。
方法 采用溶剂挥发法制备 Phl-PC,选择药脂比、药物浓度,反应温度作为 Box-Behnken 设计-响应面法考察因素,以复合率为指标优选最佳工艺;扫描电子显微镜(SEM)、差示扫描量热法(DSC)、X射线衍射(XRD)、红外光谱(FT-IR)法分析复合物的形成机制,并考察其溶解度、经皮渗透性及体内药动学特性。**结果** 最佳制备工艺为以乙醇为复合溶剂,Phl的质量浓度为 1.7 mg/mL,与磷脂质量比为 1:1.6,反应温度为 56 °C,验证实验得到复合率为 $(94.30 \pm 1.13)\%$;SEM、DSC、XRD 和 FT-IR 的结构表征显示磷脂复合物的形成是由于根皮素分子与磷脂的极性末端存在弱的分子间作用力所致,根皮素以无定形态分散在磷脂中,形成磷脂复合物;溶解度实验结果显示,与根皮素相比,Phl-PC 在水和正辛醇中的溶解度分别提高了 4.90、2.20 倍,油水分配系数由 1.22 提高到 2.03;溶出度实验结果显示制成磷脂复合物后,累积释药率由 72.07% 提高到 86.34%;体外经皮渗透实验结果显示,Phl-PC 在 24 h 内累积渗透药量(Q_n)是根皮素的 2.06 倍;药动学研究显示 Phl-PC 的 $AUC_{0-\infty}$ 是根皮素的 2.15 倍。**结论** 制备的 Phl-PC 可显著改善根皮素的经皮渗透性,提高其生物利用度。
关键词: 根皮素; 磷脂复合物; Box-Behnken 设计-响应面法; 溶解度; 经皮渗透; 溶出; 生物利用度; 溶剂挥发法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5543-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.008

Preparation, characterization and dissolution behavior evaluation *in vivo* and *in vitro* of phloretin phospholipid complex

HUANG Shan, ZHAI Bing-tao, YANG Jie, ZOU Jun-bo, CHENG Jiang-xue, ZHANG Xiao-fei, SHI Ya-jun, GUO Dong-yan

State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Fundamentals and New Drugs Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: Objective To prepare phloretin phospholipid complex (Phl-PC) and explore its formation mechanism to improve the transdermal permeability of phloretin and increase its bioavailability. **Methods** The drug-lipid ratio, drug concentration and reaction temperature were selected as the factors of the Box-Behnken design-response surface method in the preparation of Phl-PC by solvent volatilization, and the best process was optimized with the compound rate as the index. Scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FT-IR) methods were used to analyze the formation mechanism of the complex, and to investigate its solubility, transdermal permeability and *in vivo* pharmacokinetic properties. **Results** The optimum preparation technology of Phl-PC was as follows: ethanol was used as compound solvent, the concentration of Phl was 1.7 mg/mL, the mass ratio of phospholipid to phloretin was 1.6:1, and the reaction temperature was 56 °C and the recombination rate was $(94.30 \pm 1.13)\%$. SEM, DSC, XRD and FT-IR structural characterization showed that the formation of phospholipid complex was due to the weak intermolecular force between the phloretin molecule and the

收稿日期: 2021-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202905); 陕西中医药大学学科创新团队(2019-YL11); 陕西省教育厅科研项目(15JF015)

作者简介: 黄 珊(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂新剂型及体内过程研究。

Tel: (029)38185180 E-mail: 1045637858@qq.com

*通信作者: 郭东艳(1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药制剂新剂型及体内过程研究。

Tel: (029)38185180 E-mail: xmc2051080@163.com

polar end of the phospholipid, and the phloretin was dispersed in the phospholipid in an amorphous state. The solubility test results showed that compared with phloretin, the solubility of PHL-PC in water and *n*-octanol was increased by 4.90 and 2.20 times, respectively, and the oil-water partition coefficient was increased from 1.22 to 2.03. *In vitro* solubility test results showed that the cumulative percentage of drug release increased from 72.07% to 86.34% after making phospholipid complexes. The results of percutaneous permeation test showed that the cumulative permeation dose of PHL-PC within 24 h was 2.06 times higher than that of phloretin. Pharmacokinetic studies showed that the $AUC_{0-\infty}$ of PHL-PC was 2.15 times of the phloretin. **Conclusion** The prepared PHL-PC can significantly improve the transdermal permeability of phloretin and increase its bioavailability.

Key words: phloretin; phospholipid complex; Box-Behnken design-response surface optimization; solubility; transdermal permeability; dissolution; bioavailability; solvent volatilization method

根皮素(phloretin),化学名为 2,4,6-三羟基-3-(4-羟基苯基)苯丙酮,是一种二氢查耳酮类的多酚化合物。主要分布于苹果、荔枝等多汁水果的果皮及根皮中^[1-2]。具有广泛的生物活性,如抗氧化^[3]、抗炎^[4]、抗肿瘤^[5]等活性。此外,根皮素还具有美白保湿、延缓衰老等多种美容功效,在食品、药品、化妆品等领域具有广泛的应用前景^[6],但其溶解性差、生物利用度低严重限制了进一步开发利用^[7]。

磷脂复合物是指药物与磷脂分子在非质子溶剂中反应所形成的稳定化合物或络合物,形成复合物后能改变药物的理化性质、增强皮肤和组织的渗透性,提高生物利用度,如咖啡酸磷脂复合物^[8]、熊果苷磷脂复合物^[9]。目前,对根皮素磷脂复合物(phloretin phospholipid complex, PHL-PC)的研究多集中在口服给药,而关于经皮给药研究较少^[10]。基于根皮素在抗炎、抗氧化方面的应用前景,本实验拟采用 Box-Behnken 响应面法优化 PHL-PC 制备工艺,并对其理化性质、经皮渗透性及药动学特征进行考察,以期解决根皮素溶解性及经皮渗透性差、生物利用度低的问题,为该原料的进一步开发应用奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 仪器

DF-101S 型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;N-1200B 型旋转蒸发仪,东京理化器械株式会社;SHZ-B 型水浴恒温振荡器,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;Gene Speed X1 型离心机,美国 Gene Company;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;DZF-6050 真空干燥箱,上海欣齐科学仪器有限公司;TP-6 智能透皮扩散仪,天津市精拓仪器科技有限公司;LC-2030CD3 PLUS 岛津高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司;TESCAN-VEGA3 钨丝灯扫描电子显微镜(SEM),上海泰斯肯贸易有限公司;

TAQ 2000 差示扫描量热仪(DSC),德国耐驰公司;Ultima IV 普通 X 射线衍射仪(XRD),日本理学电机株式会社;TENSOR-27 傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR),德国布鲁克公司。

1.2 试药

根皮素对照品,批号 20180712,质量分数 $\geq 98\%$,成都普菲德生物技术有限公司;大豆卵磷脂,批号 C11362919,质量分数 $\geq 98\%$,上海麦克林生化科技有限公司;乙腈、甲醇为色谱级;水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 雄性大鼠,体质量(240 ± 20) g;购自成都达硕实验动物有限公司,动物生产许可证号 SCXK(川)2020-030,动物实验经陕西中医药大学动物实验伦理委员会批准,所有动物实验遵循陕西中医药大学有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 PHL-PC 的制备及复合率测定

称取根皮素和大豆卵磷脂于圆底烧瓶中,加入无水乙醇作为复合溶剂,置恒温磁力搅拌器搅拌 2 h,旋转蒸发除去乙醇。再加入氯仿复溶,滤过,收集滤渣干燥后称定质量。滤液经减压蒸干溶剂并真空干燥,即得 PHL-PC。复合率计算公式如下。

$$\text{复合率} = (M_1 - M_2) / M_1$$

M_1 为根皮素投药量, M_2 为滤纸上残留根皮素的质量

2.2 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shimadzu C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(45:55);柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长为 280 nm;体积流量 0.8 mL/min;进样量 10 μ L。HPLC 图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取根皮素对照品 10 mg,加入色谱纯甲醇溶解,定容至 10 mL,得

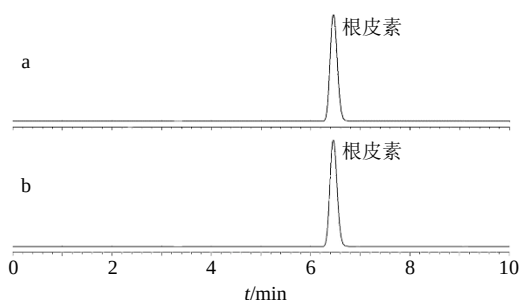


图 1 根皮素对照品 (a) 及供试品 (b) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of phloretin reference substance (a) and test sample (b)

1 mg/mL 根皮素对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取 10 mg PHL-PC，加入 10 mL 色谱甲醇溶解，再精密吸取 1 mL 上述溶液，加色谱甲醇稀释并定容至 10 mL，得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 取“2.2.2”项下对照品溶液，用甲醇稀释成 20、40、60、80、100、120、200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，以进样质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，得回归方程为 $Y=45\,072X+48\,436$ ， $r=0.999\,7$ ，结果表明根皮素在 20~200 $\mu\text{g/mL}$ 时，质量浓度与峰面积具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取对照品溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$)，在“2.2.1”项色谱条件下进行测定，连续进样 6 次，记录峰面积，计算得根皮素峰面积的 RSD 为 0.19%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 按“2.2.3”项下方法制备的供试品溶液 6 份，依“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，计算得根皮素质量分数的 RSD 为 0.23%，表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、8、10 h，依“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得根皮素峰面积的 RSD 为 0.29%，表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定的样品 9 份，分为 3 组，分别加入相当于样品中根皮素含量 80%、100%、120% 的对照品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，依“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得平均加样回收率为 98.52%，RSD 为 2.64%，表明该方法准确度良好。

2.3 Box-Behnken 设计-响应面法优化 PHL-PC 制备工艺

根据前期单因素实验结果，选择不同药脂比 (药

物与磷脂质量比， X_1)、药物质量浓度 (X_2)、反应温度 (X_3) 作为考察因素，通过 Design Expert 12 分析软件的 Box-Behnken 设计-响应面法进行试验设计，以复合率 (Y) 为评价指标筛选最佳工艺并进行验证，各因素水平、试验安排及结果见表 1。

表 1 Box-Behnken 响应面法因素水平、试验安排及结果
Table 1 Experimental arrangement and results of Box-Behnken response surface method

试验号	X_1	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_3/^\circ\text{C}$	$Y/\%$
1	1.5	2.0	55	94.6
2	1.0	2.0	45	80.4
3	1.0	3.0	55	83.5
4	2.0	3.0	55	84.7
5	1.5	1.0	45	87.2
6	2.0	2.0	45	88.0
7	2.0	1.0	55	90.0
8	2.0	2.0	65	86.2
9	1.0	1.0	55	84.0
10	1.5	1.0	65	88.3
11	1.5	2.0	55	93.1
12	1.5	3.0	45	80.3
13	1.5	3.0	65	86.0
14	1.5	2.0	55	93.4
15	1.0	2.0	65	88.0
16	1.5	2.0	55	90.2
17	1.5	2.0	55	91.4

以 Y 为响应值进行二次方程模型拟合，得出拟合方程 $Y=92.54+1.63X_1-1.87X_2+1.57X_3-1.20X_1X_2-2.35X_1X_3+1.15X_2X_3-3.40X_1^2-3.60X_2^2-3.49X_3^2$ ， $r^2=0.951\,8$ ， $P<0.001$ ，对二次回归方程进行方差分析，结果见表 2。由表 2 可知，模型的 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具有显著性，失拟性检验不显著 ($P>0.05$)，表明该模型拟合程度良好，能较好地预测实际值。

根据二次回归方程拟合结果，绘制响应面的等高线图和 3D 效应曲面图，结果见图 2。图 2 可以直观地反映 2 因素的交互作用对复合率的影响。由图 2 可知， X_1 、 X_3 因素的等高线图呈椭圆形且其 3D 效应曲面图弯曲程度大，说明其交互作用强，为影响复合率的主要因素。

根据软件预测的最佳工艺处方药脂比为 1.63，药物质量浓度为 1.71 mg/mL，反应温度 55.9 $^\circ\text{C}$ 。结合实际条件，进行验证试验，重复 3 次，计算复

合率, 结果见表 3。表明该模型具有良好的预测性, 且工艺稳定可行。

2.4 PHL-PC 的表征

2.4.1 SEM 观察 取适量样品均匀涂布于铝箔表面

表 2 试验结果方差分析

Table 2 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	离差平方和	F值	P值	方差来源	平方和	自由度	离差平方和	F值	P值
模型	274.76	9	30.53	15.39	0.000 8	X_1^2	48.53	1	48.53	24.46	0.001 7
X_1	21.13	1	21.13	10.65	0.013 8	X_2^2	54.42	1	54.42	27.43	0.0012
X_2	28.12	1	28.12	14.18	0.007 0	X_3^2	51.43	1	51.43	25.93	0.001 4
X_3	19.84	1	19.84	10.00	0.015 9	残差	13.89	7	1.98		
X_1X_2	5.76	1	5.76	2.90	0.132 2	失拟项	1.82	3	0.60	0.20	0.891 1
X_1X_3	22.09	1	22.09	11.13	0.012 5	净误差	12.07	4	3.02		
X_2X_3	5.29	1	5.29	2.67	0.146 5	总离差	288.65	16			

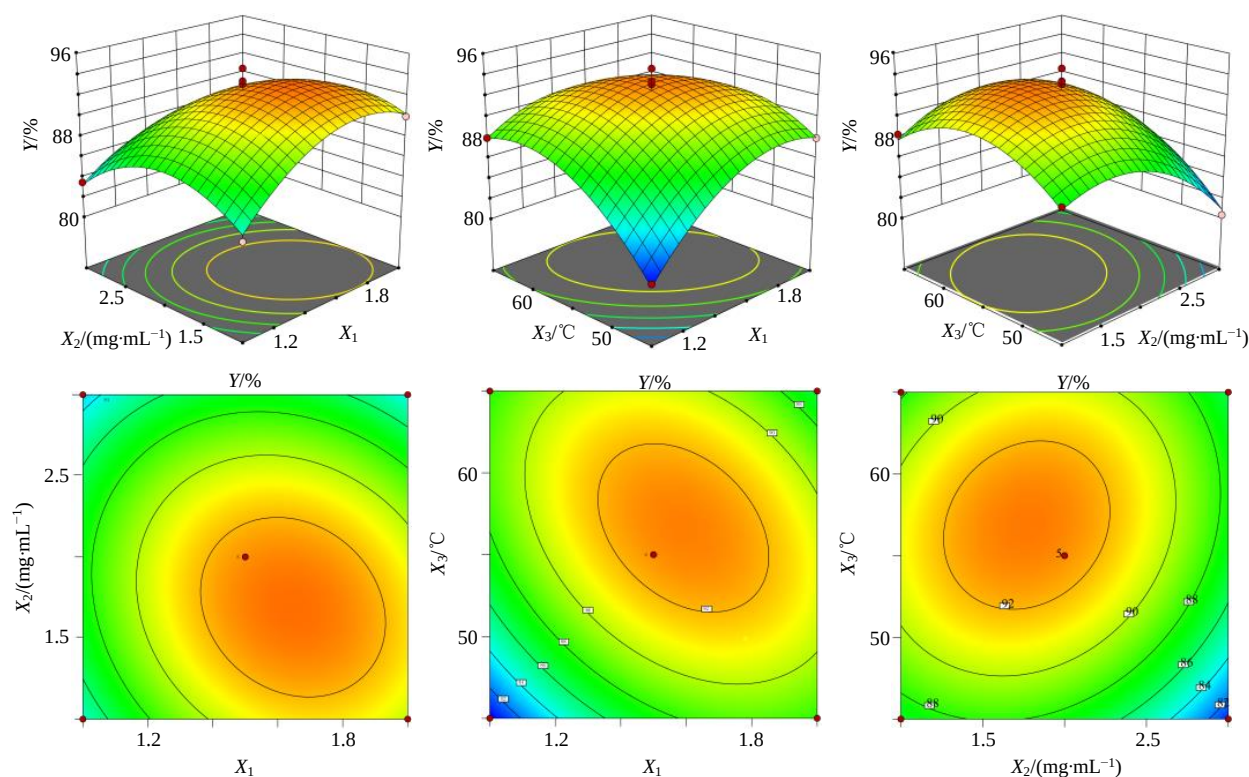


图 2 PHL-PC 制备工艺中各因素交互作用的等高线图和 3D 效应面图

Fig. 2 Contour map and 3D effect surface map of interaction of various factors in preparation process of PHL-PC

表 3 最佳工艺制备下 PHL-PC 的复合率预测值及实验值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Predicted value and actual value of recombination rate of PHL-PC under optimum preparation process ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

项目	X_1	$X_2/(mg \cdot mL^{-1})$	$X_3/^\circ C$	Y/%
预测值	1.63	1.71	55.9	93.09
实验值	1.6	1.7	56	93.80
	1.6	1.7	56	95.60
	1.6	1.7	56	93.50

上, 室温下自然干燥, 使用 SEM 观察根皮素、大豆卵磷脂、物理混合物 (physical mixture, PM) 和 PHL-PC 的表面形态。结果如图 3 所示, 根皮素为细长的棒状结构, 在 PM 中也保留了这种形态, 但在 PHL-PC 中, 并未出现根皮素的结构。表明根皮素已高度分散在磷脂中, 形成磷脂复合物。

2.4.2 差示扫描量热 (DSC) 法分析 采用 DSC 法研究根皮素、大豆卵磷脂、PM 和 PHL-PC 的热性能。选择 30~350 $^\circ C$ 的温度范围, 并在恒定氮气流下以 10 $^\circ C/min$ 的加热速率扫描样品。各样品的

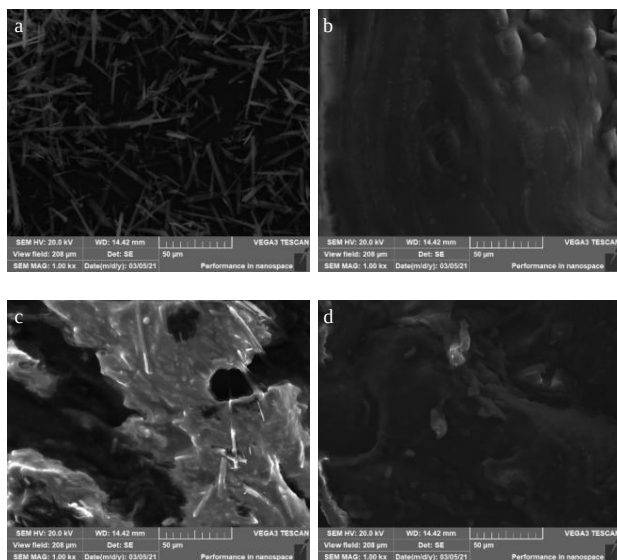


图 3 根皮素 (a)、大豆卵磷脂 (b)、PM (c) 和 PHL-PC (d) 的 SEM 图

Fig. 3 SEM diagrams of phloretin (a), soybean lecithin (b), PM (c) and PHL-PC (d)

DSC 曲线图见图 4。从图 4 可以看出，根皮素的热图在 270 °C 左右显示出 1 个明显的吸热峰，说明根皮素以结晶状态存在。PM 的热图中也在该位置出现了 1 个类似的根皮素峰，表明混合物分子间有微弱作用或完全没有相互作用。但是与 PM 相比，PHL-PC 的热图中，并未出现该峰，这可能是由于复合物中存在弱分子力引起的，说明根皮素失去了原有的结晶性，根皮素以分子或无定型状态均匀的分散在磷脂复合物中。

2.4.3 X 射线衍射 (XRD) 法分析 通过 XRD 法研究磷脂复合物中根皮素的存在状态。铜 K 辐射源

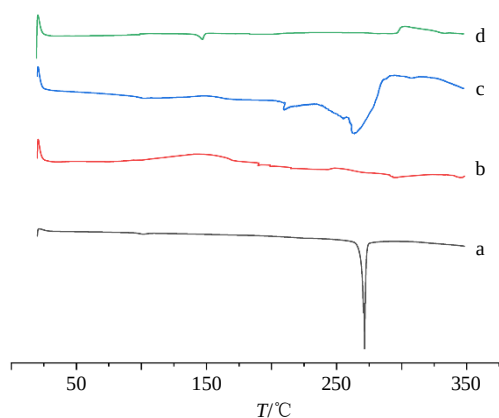


图 4 根皮素 (a)、大豆卵磷脂 (b)、PM (c) 和 PHL-PC (d) 的 DSC 图

Fig. 4 DSC diagrams of phloretin (a), soybean lecithin (b), PM (c) and PHL-PC (d)

固定在 40 kV 和 40 mA，扫描范围 2θ 为 $10^{\circ}\sim 80^{\circ}$ ，扫描速度 $2^{\circ}/\text{min}$ 。根皮素、大豆卵磷脂、PM 和 PHL-PC 的 XRD 图谱如图 5 所示。根皮素和 PM 的图谱中都在 $10^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 出现强的衍射峰，表明 PM 中根皮素的形态和根皮素粉末中相同，仍以结晶状态存在，但是，与 PM 相比，PHL-PC 的图谱中并未出现该衍射峰。表明根皮素的晶体结构发生了显著变化，根皮素以无定型态高度分散在磷脂中，形成磷脂复合物，这与 DSC 结果一致。

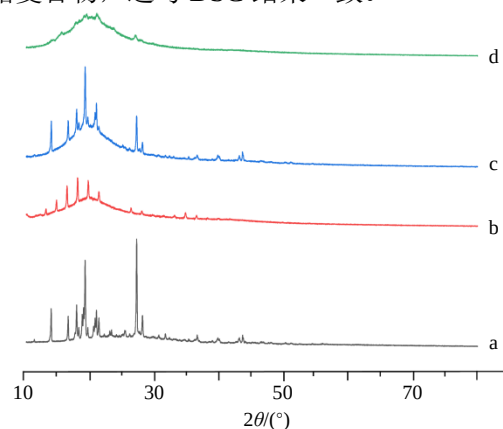


图 5 根皮素 (a)、大豆卵磷脂 (b)、PM (c) 和 PHL-PC (d) 的 XRD 衍射图

Fig. 5 XRD diagrams of phloretin (a), soybean lecithin (b), PM (c) and PHL-PC (d)

2.4.4 傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 法 采用 KBr 压片法研究各样品的红外吸收光谱。称取适量根皮素、大豆卵磷脂、PM 和 PHL-PC，分别与 KBr 粉末按照 1:100 的质量比混合后压片，在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 波数处进行 FT-IR 分析，结果如图 6 所示。根皮素的谱图中，特征峰为 1634 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$)；大豆卵磷脂的特征峰为 1740 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$)、 1067 cm^{-1} ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$)；PM 的谱图为根皮素和大豆卵磷脂谱图的简单叠加，说明两者只是混合，并未发生分子间作用；而在 PHL-PC 的图谱中，根皮素的特征峰 ($\text{C}=\text{O}$) 由 1634 cm^{-1} 红移至 1606 cm^{-1} 且峰强显著减弱，表明根皮素与大豆卵磷脂之间可能存在氢键缔合，形成磷脂复合物。

2.5 平衡溶解度研究

称取过量等量的根皮素和 PHL-PC 粉末 (以根皮素含量计)，各加入至 5 mL 蒸馏水或正辛醇中， 37°C 恒温摇床 (100 r/min) 震荡 24 h 后，各取 1 mL 样品， $13\,500\text{ r/min}$ 离心 10 min，上清液甲醇稀释后进样测根皮素含量，计算溶解度，结果见表 4。根皮素制成磷脂复合物后，在水和正辛醇中的溶解度

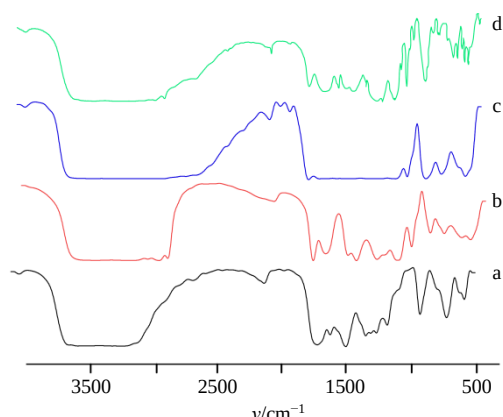


图6 根皮素 (a)、大豆卵磷脂 (b)、PM (c) 和 PHL-PC (d) 的 FTIR 光谱图

Fig. 6 FTIR spectra of phloretin (a), soybean lecithin (b), PM (c) and PHL-PC (d)

表4 根皮素和 PHL-PC 的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Solubility of phloretin and PHL-PC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	溶解度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	蒸馏水	正辛醇
根皮素	72.13 $\pm$ 0.35	729.44 $\pm$ 0.67
PHL-PC	353.34 $\pm$ 0.21	1 604.17 $\pm$ 0.40

分别提高到 4.90、2.20 倍。

2.6 表观油水分配系数 (P) 的测定

称取适量等量根皮素和 PHL-PC 粉末 (以根皮素含量计), 分别加入 2 mL 油相 (水过饱和的正辛醇) 中, 超声溶解, 5000 r/min 离心 10 min 得油相溶液, 定量稀释后, 进样测根皮素含量, 记为 C_0 , 精密量取 1 mL 上述油相溶液, 再加 1 mL 水相 (正辛醇过饱和的水), 37 °C 恒温摇床 (100 r/min) 震荡 24 h 后, 离心取上清液, 甲醇定量稀释后, 进样测根皮素含量, 记为 C_1 。按照公式 $P = C_1 / (C_0 - C_1)$ (其中 C_0 为正辛醇中药物的初始含量, C_1 为分配平衡时药物在油相中的含量, $C_0 - C_1$ 为分配平衡时药物在水相中的含量) 计算油水分配系数。结果如表 5 所示, 制成磷脂复合物后根皮素脂溶性明显提高。

2.7 体外溶出度研究

精密称取等量根皮素和 PHL-PC, 溶解于 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中 (以根皮素含量计,

表5 根皮素和 PHL-PC 的 P 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 P values of phloretin and PHL-PC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

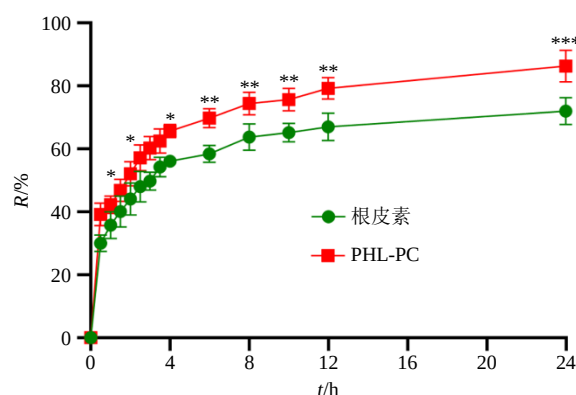
样品	P	$\lg P$
根皮素	17.78 $\pm$ 1.26	1.22 $\pm$ 0.03
PHL-PC	107.98 $\pm$ 2.09	2.03 $\pm$ 0.01

1 mg/mL)。精密吸取各溶液 5 mL 添加至透析袋中 (截留相对分子质量 14 500), 透析袋置于 20 mL 释放介质中, 37 °C 恒温搅拌 (100 r/min) 进行体外溶出度试验。分别于 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL, 同时补充等量溶出介质。HPLC 测根皮素含量, 计算累积释药率 (R)。

$$R = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_s) / Q_0$$

C_n 代表第 n 个取样点根皮素质量浓度, C_i 代表当前取样点之前的各取样点质量浓度, V 和 V_s 分别代表释放介质体积和取样体积, Q_0 代表根皮素的初始量

根皮素和 PHL-PC 累积释放曲线如图 7 所示, 根皮素及 PHL-PC 的累积释药率在 24 h 分别达到 72.07% 和 86.34%, 表明复合物的体外溶出性明显优于根皮素, 这可能是因为磷脂复合物具有两亲性, 加速了根皮素的溶出。



与根皮素组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs phloretin group

图7 根皮素和 PHL-PC 体外累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 In vitro release curve of phloretin and PHL-PC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 PHL-PC 的经皮渗透性考察

2.8.1 离体鼠皮的制备 大鼠处死, 腹部脱毛后取皮肤, 去除皮下组织和脂肪, 选取无破损皮肤浸泡于生理盐水中, 4 °C 冰箱保存备用。实验前仔细检查鼠皮是否损伤, 以确保皮肤完整性。

2.8.2 药物溶液的制备 称取等量的根皮素和 PHL-PC (以根皮素含量计), 溶解于 pH 7.4 的 PBS 介质中, 制成 2 mg/mL 的供试液, 用于透皮实验。

2.8.3 皮肤渗透实验 使用 Franz 扩散池研究 PHL-PC 的体外皮肤渗透。大鼠皮水平放置, 角质层面面向供给池, 真皮层面面向接收池。以 pH 7.4 的 PBS 为接收介质, 在接收室内加入磁子持续磁力搅拌 24 h 以确保药物分散均匀, 将扩散池置于恒温磁

力搅拌器上,固定转速 350 r/min, 37 ℃ 水浴加热,平衡 30 min。将供试液 (1 mL) 分别添加到各供给池内,并用封口膜覆盖,以避免蒸发。在 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 吸取 0.5 mL 的接收液,同时补充等量的新鲜接收液。精密吸取 100 μL 接收液,加 200 μL 甲醇,4000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按“2.2.1”项下方法测定峰面积,计算接收液中根皮素含量,并根据下式计算累积渗透量 (Q_n)。

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_i C_i) / A$$

C_n 、 C_i 分别代表接收介质中第 n 、 i 时测得的根皮素质量浓度, A 为有效扩散面积 (0.785 cm²), V 和 V_i 分别代表接收池体积 (15 mL) 和取样体积 (0.5 mL)

根皮素和 PHL-PC 的经皮渗透曲线如图 8 所示, 24 h 后, 根皮素和复合物的 Q_n 分别为 16.97、35.02 μg/cm²。结果表明制成磷脂复合物显著提高了根皮素在皮肤中的 Q_n , 改善经皮渗透性能。

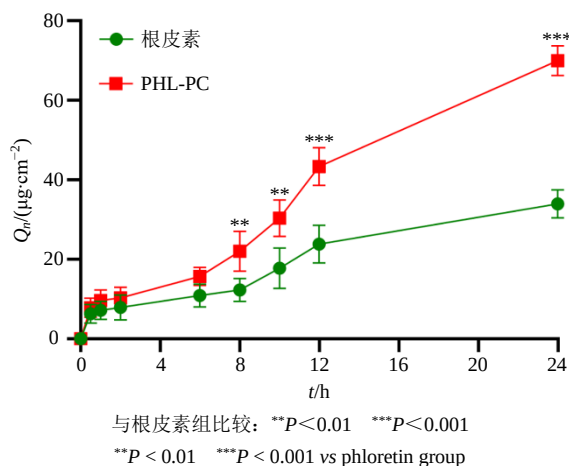


图 8 根皮素和 PHL-PC 经皮渗透曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Transcutaneous permeation curve of phloretin and PHL-PC ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.9 药动学研究

2.9.1 分析方法的建立

(1) 色谱条件: 同“2.2.1”项下。

(2) 标准工作液的配制: 精密称取根皮素对照品 10 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容至刻度, 制备 100 μg/mL 的根皮素对照品溶液, 4 ℃ 保存备用。

(3) 系列标准溶液的制备: 将“2.9.2”项下的标准工作液加入空白血浆逐级稀释, 使得根皮素终浓度为 10 000、5000、1000、500、250、50、25、5 ng/mL。4 ℃ 保存备用。

(4) 专属性: 通过比较空白血浆、根皮素标准工作液及血浆样品的谱图, 发现血浆对根皮素的检测未发生干扰, 结果如图 9 所示, 表明该方法的专属性良好。

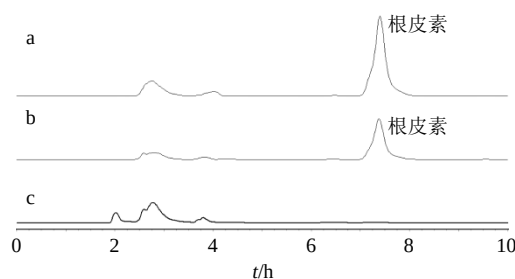


图 9 空白血浆加根皮素对照品(a)、样品 (b)、空白血浆 (c) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC of blank plasma (a), sample (b), and blank plasma spike (c)

(5) 线性关系考察: 取“2.9.3”项下系列标准溶液 200 μL, 加入 600 μL 甲醇涡旋混匀, 离心吸取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.9.1”项下方法测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 7.5405X + 635.79$, $r = 0.9998$ 。结果表明, 根皮素在 25~10 000 ng/mL, 质量浓度与峰面积具有良好的线性关系。

(6) 精密度的试验: 取低、中、高质量浓度的质控样品 (50、500、5000 ng/mL), 分别测定日内和日间精密度, 计算得日内 RSD 均 < 1.71%, 日间 RSD 均 < 6.03%, 表明根皮素在所测范围内精密度良好。

(7) 提取回收率与基质效应: 低、中、高质量浓度 (50、500、5000 ng/mL) 样品的基质效应分别为 92.68%、92.44%、94.05%, RSD 值分别为 5.24%、6.46%、5.31%; 提取回收率分别为 89.77%、88.99%、87.25%, RSD 值分别为 5.21%、6.47%、5.54%。基质效应均 > 90%, 提取回收率均 > 80%, 表明该方法符合生物样品检测要求。

2.9.2 经皮给药供试品制备 精密称取一定量等量的根皮素和 PHL-PC 粉末, 分别加入 PBS 重新分散后, 加入适量的卡波姆 934, 使卡波姆最终含量为 1%, 磁力搅拌溶胀过夜使成凝胶状, 即得。

2.9.3 药动学实验 SD 雄性大鼠实验前禁食 12 h, 自由饮水。随机分为 2 组, 每组 6 只, 分别为根皮素组和 PHL-PC 组。大鼠背部脱毛面积为 5 cm × 5 cm, 一组涂抹根皮素凝胶, 另一组涂抹等剂量的 PHL-PC 凝胶 (100 mg/kg, 以根皮素含量计)。给

药后于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 眼眶采血,置于肝素钠抗凝离心管中。高速冷冻离心 15 min (13 500 r/min、4 °C),吸取上清血浆, -20 °C 保存备用。

2.9.4 血浆样品的处理 精密吸取血浆样品 200 μ L,加入 600 μ L 甲醇沉淀蛋白,涡旋混匀后,13 500 r/min 离心 15 min。吸取上清液 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,按“2.9.1”项下色谱条件测定峰面积。

2.9.5 实验结果 药-时曲线见图 10,采用 DAS 3.2 药动学软件计算药动学参数结果见表 6。结果显示,与根皮素相比,复合物的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 升高 ($P<0.05$), $t_{1/2}$ 与 $t_{\max}$ 延长,但无统计学意义 ($P>0.05$)。与根皮素相比,复合物的 $AUC_{0\sim\infty}$ 为 12.07 μ g·h/mL,是根皮素的 2.15 倍,表明制成磷脂复合物后不仅延长了药物作用时间且显著提高根皮素的生物利用度。

3 讨论

实验室前期对复合溶剂、药脂比、药物浓度、复合时间及复合温度进行了单因素考察,最终筛选出对复合率影响最大的 3 个因素:药脂比、药物浓

度和复合温度进行 Box-Behnken 响应面法分析优化最佳制备工艺条件。在制备过程中发现,乙醇作为反应溶剂的复合率较高且具有无毒、成本低等优点;反应温度在 55 °C 复合率最高,60 °C 时复合率有所下降,这可能与磷脂在 60 °C 以上不稳定、易氧化有关;随着药脂比和药物浓度的增大,复合率呈先增高再降低,这可能是由于随着磷脂用量或药物浓度的增大,溶液呈现过饱和状态,复合率又下降^[11-12]。接着,为了考察各因素之间交互作用对复合率的影响,通过最少的实验次数精准获取因素与效应之间的关系,采用 Box-Behnken 响应面法进行优化。优选的制备工艺为药脂比为 1.6:1、药物质量浓度为 1.7 mg/mL、反应温度为 56 °C。

通过 SEM、DSC、XRD 和 FT-IR 对 PHL-PC 进行表征,发现复合物中并未形成新的化学键,磷脂复合物的形成是由于根皮素分子与磷脂的极性末端存在弱的分子间作用力所致,根皮素以无定形状分散于复合物中。无定形状是一种高能无序状态,具有溶解度高和溶出速率快的优点,通常用来改善药物溶解性,提高生物利用度^[13]。本实验根皮素制成磷脂复合物后,根皮素在水和正辛醇中的溶解度得到了改善,生物利用度提高。

药物经皮渗透经过 2 个阶段,首先通过角质层,再经活性表皮层继而被吸收。角质层为亲脂性,脂溶性药物易通过;活性表皮层为水性组织,水溶性药物易透过,因此,药物既需要有一定脂溶性又需要一定水溶性才能用于经皮渗透^[14-15]。油水分配系数 ($\lg P$) 作为药物理化性质和渗透性的重要参数,在药物透过生物膜过程中具有关键作用, $\lg P$ 值越大,说明该物质越亲油,反之,越小,则越亲水,即水溶性越好^[16]。一般认为, $\lg P<-2$, 化合物为亲水性,不能穿过脂质膜; $\lg P>3$, 化合物因脂溶性太强而难以从细胞膜一侧释放出来。有文献表明^[17], 药物透皮给药的最佳 $\lg P$ 值为 2~3。根皮素制成磷脂复合物后, $\lg P$ 值由 1.22 增加到 2.03,显著改善了根皮素的脂溶性。经皮渗透实验结果表明将根皮素制成磷脂复合物既提高水溶性又提高脂溶性,显著增加其累积透皮吸收量。

根皮素由于具有较强的抗氧化、抗衰老作用,在药品及化妆品领域具有广泛的应用前景。查阅文献发现目前根皮素经皮给药制剂主要有根皮素微乳及微乳凝胶剂^[18]等,但是发现其研究大多为制备工艺,未见经皮渗透及药动学特征的相关研究。凝胶

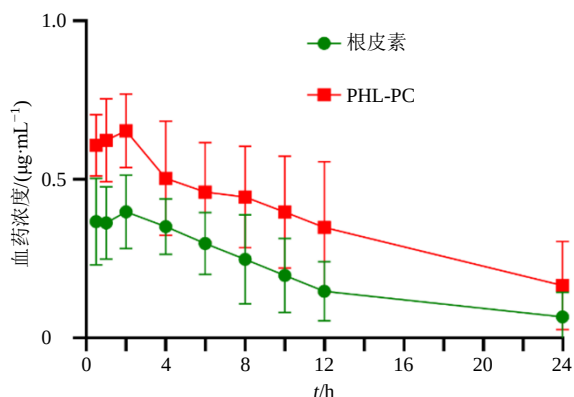


图 10 根皮素和 PHL-PC 的药-时曲线图 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 10 Concentration-time curves for phloretin and PHL-PC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 6 根皮素和 PHL-PC 的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Pharmacokinetic parameters for phloretin and PHL-PC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	根皮素	PHL-PC
$t_{1/2}$	h	7.40 ± 2.54	10.52 ± 4.66
$t_{\max}$	h	1.33 ± 0.75	1.42 ± 0.66
$C_{\max}$	μ g·mL ⁻¹	0.42 ± 0.10	0.69 ± 0.09**
$AUC_{0\sim t}$	μ g·h·mL ⁻¹	4.41 ± 2.35	8.94 ± 3.74*
$AUC_{0\sim\infty}$	μ g·h·mL ⁻¹	5.61 ± 2.08	12.07 ± 5.91*

与根皮素组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs phloretin group

剂具有生物相容性好、黏附性好及对皮肤和黏膜无刺激性且易于经皮给药的优点^[19]，因此，实验中将根皮素和 PHL-PC 制成凝胶剂经皮给药，对比研究其药动学特性。药动学研究结果显示，与根皮素相比，制成磷脂复合物可以显著提高其生物利用度。有关磷脂复合物是否为根皮素经皮给药的最佳载药形式，后续有必要进一步开展磷脂复合物与其他载药形式的比较研究，为今后开发根皮素经皮给药制剂提供实验依据。

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.
- [2] Mariadoss Arokia V A, Vinyagam R, Rajamanickam V, et al. Pharmacological aspects and potential use of phloretin: A systemic review [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2019, 19(13): 1060-1067.
- [3] Huang W C, Lai C L, Liang Y T, et al. Phloretin attenuates LPS-induced acute lung injury in mice via modulation of the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 98-105.
- [4] Cambeiro-Pérez N, González-Gómez X, González-Barreiro C, et al. Metabolomics insights of the immunomodulatory activities of phlorizin and phloretin on human THP-1 macrophages [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 787.
- [5] 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.
- [6] 崔树梅, 曹孟岑, 杨雪晨, 等. 根皮素在化妆品中的应用 [J]. 日用化学工业, 2018, 48(2): 113-118.
- [7] Liu J, Guo D Y, Fan Y, et al. Experimental study on the antioxidant activity of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd extracts *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(7): 11878-11889.
- [8] Shubhada M, Pranav S, Sonali N, et al. Phytophospholipid complex of caffeic acid: Development, *in vitro* characterization, and *in vivo* investigation of antihyperlipidemic and hepatoprotective action in rats [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2021, 22(1): 28.
- [9] 祝上宾, 王英飒, 敬凡尘, 等. 熊果苷磷脂复合物的制备、表征及理化性质研究 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5698-5704.
- [10] 马记平, 刘丹花, 郝海军, 等. 根皮素磷脂复合物的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2020, 42(6): 1577-1580.
- [11] 王瑜, 史亚军, 邹俊波, 等. 红花提取物磷脂复合物的制备及其透膜性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4084-4090.
- [12] 翟秉涛, 李佳, 柳小莉, 等. 星点设计-效应面法优化太白榭木总皂苷磷脂复合物制备工艺 [J]. 中药材, 2016, 39(6): 1361-1364.
- [13] 施秦, 蔡挺. 无定形态药物结晶行为的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 654-662.
- [14] 王春柳, 穆珺, 刘洋, 等. 儿茶素磷脂复合物的制备及其经皮渗透性 [J]. 中药材, 2018, 41(5): 1156-1160.
- [15] Tian Q, Guo J B, Zhang Q, et al. Development and evaluation of cucurbitacin B microemulsion: The effect of oil phase and aqueous phase on drug percutaneous absorption based on ATR-FTIR spectroscopy and molecular modeling [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2020, 21(7): 258.
- [16] Zhang Q, Wang X, Xue H, et al. Determination and comparison of the solubility, oil-water partition coefficient, intestinal absorption, and biliary excretion of carvedilol enantiomers [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2021, 22(1): 43.
- [17] Nishida N, Taniyama K, Sawabe T, et al. Development and evaluation of a monolithic drug-in-adhesive patch for valsartan [J]. *Int J Pharmaceut*, 2010, 402(1/2): 103-109.
- [18] 刘彩云, 王卓娅, 罗欣茹, 等. 根皮素抗氧化剂自微乳及微乳凝胶剂的研究 [J]. 香料香精化妆品, 2017(3): 49-53.
- [19] 沈成英, 申宝德, 徐平华, 等. 灵芝三萜纳米混悬凝胶剂的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2770-2775.

[责任编辑 郑礼胜]