

橙皮苷磷脂复合物纳米混悬剂的制备、表征及口服药动学研究

李茜^{1,2,3}, 张文周^{1,2,3*}, 郝海军⁴

1. 郑州大学附属肿瘤医院/河南省肿瘤医院 药学部, 河南 郑州 450000

2. 河南省肿瘤精准用药及综合评价工程研究中心, 河南 郑州 450000

3. 河南省抗肿瘤药物研究医学重点实验室, 河南 郑州 450000

4. 上海市中药研究所, 上海 201401

摘要: 目的 制备橙皮苷磷脂复合物 (hesperidin phospholipids complex, HD-PC) 纳米混悬剂 (HD-PC nanosuspensions, HD-PC-NPs), 并考察在 SD 大鼠体内口服药动学行为。方法 将橙皮苷制备成 HD-PC, 以提高橙皮苷溶解度。采用纳米沉淀-高压均质法制备 HD-PC-NPs。在单因素实验基础上, 以稳定剂与 HD-PC 用量比、高压均质压力和均质次数为主要影响因素, 粒径、PDI 值和 ζ 电位的总评归一值 (OV) 作为考察指标, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 HD-PC-NPs 制备工艺, 并制备成冻干粉。采用透射电子显微镜 (TEM) 观察 HD-PC-NPs 形态, 透析袋法考察药物释放情况。SD 大鼠分为橙皮苷混悬液组、HD-PC 组和 HD-PC-NPs 组, HPLC 法测定大鼠血浆中的橙皮苷质量浓度, 计算主要药动学参数及相对口服吸收生物利用度。结果 HD-PC-NPs 的最处方工艺为稳定剂与 HD-PC 用量比为 3.2, 均质压力 95 MPa, 均质次数为 10 次, 制备温度为 50 °C。5%甘露醇制得的冻干粉外观饱满。HD-PC-NPs 呈球形或类球形, 平均粒径为 (268.62±18.14) nm, PDI 为 0.122±0.013, ζ 电位为 (-31.79±1.37) mV。HD-PC-NPs 将橙皮苷的溶解度提高至 77.06 倍, 6 h 累积释放率达到 94.68%。药动学结果显示, HD-PC-NPs 达峰时间显著性提前, 半衰期 ($t_{1/2}$) 延长至 (5.69±0.82) h, 达峰浓度 (C_{max}) 提高至 (1 213.96±149.88) ng/mL, 相对口服生物利用度提高至 3.09 倍。结论 HD-PC-NPs 可提高橙皮苷溶解度, 促进药物体外溶出及体内吸收。

关键词: 橙皮苷; 磷脂复合物; 纳米混悬剂; Box-Behnken 设计-效应面法; 生物利用度; 纳米沉淀-高压均质法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)24-7740-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.012

Preparation, characterization and *in vivo* oral pharmacokinetics of hesperidin phospholipids complex nanosuspensions

LI Xi^{1,2,3}, ZHANG Wen-zhou^{1,2,3}, HAO Hai-jun⁴

1. Department of Pharmacy, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University and Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450000, China

2. Henan Engineering Research Center for Tumor Precision Medicine and Comprehensive Evaluation, Zhengzhou 450000, China

3. Henan Provincial Key Laboratory of Anticancer Drug Research, Zhengzhou 450000, China

4. Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201401, China

Abstract: Objective To prepare hesperidin phospholipids complex (HD-PC) nanosuspensions (HD-PC-NPs) and study its pharmacokinetics behavior in SD rats. **Methods** Hesperidin was prepared into HD-PC to enhance its solubility. HD-PC-NPs were prepared by nano-precipitation and high pressure homogenization method. Based on single factor experiments, amounts ratio of stabilizer to HD-PC, homogenization pressure and frequency were used as influencing factors, overall values (OV) of average particles size, polydispersion index (PDI) and ζ potential were employed as evaluation indexes, the formulation of HD-PC-NPs was optimized by Box-Behnken design-response surface method. Lyophilized powder of HD-PC-NPs was prepared. Morphology of HD-PC-NPs was observed by transmission electron microscope (TEM). Dialysis bag method was employed to investigate the drug release. SD rats were

收稿日期: 2022-07-24

基金项目: 河南省二〇二一年科技发展计划 (202310325); 上海市科委项目 (21S21903400)

作者简介: 李茜 (1989—), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药动学、医院药学研究。Tel: (0371)65588378 E-mail: hnzlylixixi@126.com

*通信作者: 张文周 (1969—), 男, 学士, 主任药师, 主要从事医院药学研究。Tel: (0371)65588378 E-mail: hnzzzwz@sina.com

divided into hesperidin suspension group, HD-PC group and HD-PC-NPs group. Hesperidin concentration in plasma was analyzed by HPLC, main pharmacokinetic parameters and relative oral bioavailability were also calculated. **Results** Optimal preparation of HD-PC-NPs was as follows: amounts ratio of stabilizer to HD-PC was 3.2, homogenization pressure was 95 MPa, homogenization frequencies was 10 times and temperature was 50 °C. Lyophilized powder has a full appearance prepared by 5% mannitol. The morphology of HD-PC-NPs was spherical or quasi-spherical. Average particle size, PDI and ζ potential of HD-PC-NPs were (268.62 ± 18.14) nm, 0.122 ± 0.013 and (-31.79 ± 1.37) mV, respectively. Solubility of hesperidin was enhanced to 77.06 times and cumulative dissolution in 6 h was increased to 94.68% by HD-PC-NPs. The t_{max} of HD-PC-NPs was advanced significantly, $t_{1/2}$ was prolonged to (5.69 ± 0.82) h, C_{max} was increased to (1 213.96 ± 149.88) ng/mL and the oral bioavailability was enhanced to 3.09 times. **Conclusion** HD-PC-NPs could enhance solubility of hesperidin, and promote dissolution *in vitro* and absorption *in vivo*.

Key words: hesperidin; phospholipids complex; nanosuspensions; Box-Behnken design-response surface method; bioavailability; nano-precipitation and high pressure homogenization method

橙皮苷又称柑果苷、陈皮苷，主要存在于柑桔属 *Citrus* L. 植物中，属于黄酮类化合物。国内外研究^[1-4]显示，橙皮苷有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗病毒、降血压、降血糖、提高免疫力等药理活性。橙皮苷在水中溶解度仅为 (6.32 ± 0.12) μg/mL，橙皮苷脂溶性也很差^[5]，在 pH 1.2~7.4 时油水分配系数波动区间为 0.071~1.280，lg*P* 值多为负值^[6]。容易受到体内各种代谢酶、肠道菌群等影响^[7]，口服吸收生物利用度仅为 3.51%^[6]。纳米技术可提高药物溶解度并促进药物吸收^[8]，目前，已有橙皮苷脂质体、纳米乳、自微乳等报道^[9-11]，但存在包封率及载药量低、使用大量表面活性剂等问题，临床应用受到一定限制。

磷脂复合物 (phospholipids complex, PC) 是难溶性药物与磷脂通过某种作用力 (如氢键、范德华力等) 结合在一起形成的一种物质，可同时改善水溶性及脂溶性，增加吸收^[12-16]。但 PC 的分散性及溶出度较差，可能限制生物利用度提高幅度，且黏性较大，不便于给药^[17]。纳米混悬剂 (nanosuspensions, NPs) 是将难溶性药物与稳定剂通过制剂手段制得的一种“纯”药物纳米制剂^[18-22]，制备工艺简单可靠。橙皮苷在乙醇等有机溶剂中溶解度很差，故本研究先将橙皮苷制备成橙皮苷磷脂复合物 (hesperidin phospholipids complex, HD-PC) 来改善其溶解度，为后续纳米制剂研究奠定基础。采用纳米沉淀结合高压均质法将 HD-PC 进一步制备成 HD-PC 纳米混悬剂 (HD-PC nanosuspensions, HD-PC-NPs)，并进行体内评价，为橙皮苷纳米制剂研究提供新思路。

1 仪器、试剂及动物

AL204 型电子天平，梅特勒托利多仪器公司；Agilent 1100 型高效液相色谱仪，美国安捷伦仪器公

司；LC-MS-M1 系列加热磁力搅拌器，上海力辰仪器科技有限公司；YYJZ-2 型高压均质机，上海永延纳米科技有限公司；Bettersize 3000 Plus 型粒度仪，丹东百特仪器有限公司；LGJ-10 型实验型冻干机，北京松源华兴生物技术有限公司；TD-SM 型台式高速离心机，艾莱宝生物技术有限公司；JC-220B 型氮吹仪，聚创华业仪器公司；Tallos F200X S/TEM 型透射电子显微镜 (TEM)，北京欧波同光学技术有限公司。

对照品橙皮苷 (批号 110721-202019，质量分数为 95.3%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111213-202015，质量分数为 98.2%)，国家食品药品检定研究院；橙皮苷原料药，批号 20201030，质量分数为 97%，北京百灵威生物医药有限公司；大豆磷脂，批号 C1256891，上海麦克林生化科技有限公司；聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS)，批号 20191108，西安海斯夫生物有限公司；甘露醇，批号 202005，嘉兴南箭生物材料有限责任公司。

SD 大鼠，清洁级，雌雄兼用，购自河南省动物实验中心，许可证号为 SCXK (豫) 2020-0001，实验室饲养至体质量为 (240 ± 20) g。所有动物实验遵循郑州大学附属肿瘤医院/河南省肿瘤医院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 HD-PC 的制备^[6]

取干燥后的橙皮苷原料药 0.5 g 和大豆磷脂 0.75 g 置于烧杯中，加入 80 mL 四氢呋喃。于 45 °C 水浴中磁力搅拌 4 h，得澄清溶液。同温度下减压旋转蒸发，即得 HD-PC。

2.2 HD-PC-NPs 的制备

纳米沉淀-高压均质法制备 HD-PC-NPs^[18-19]。溶解度实验显示，HD-PC 将橙皮苷在无水乙醇中溶解

度由 $(37.16 \pm 0.19) \mu\text{g/mL}$ 提高至 $(5.69 \pm 0.36) \text{mg/mL}$, 为制备 HD-PC-NPs 奠定基础。取 50 mg 的 HD-PC 超声溶于 6 mL 无水乙醇, 得有机相; 取一定量的稳定剂溶于 50 mL 蒸馏水, 得水相。在磁力搅拌速度为 1000 r/min、温度为 50 °C 条件下将有机相缓慢滴至水相, 超声 5 min 后减压旋蒸 20 min。循环均质数次, 补加蒸馏水至 50 mL, 采用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 HD-PC-NPs 混悬液。

2.3 橙皮苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Angilent SB C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长 283 nm; 流动相为乙腈-0.5%醋酸水溶液 (22:78); 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min。样品的理论塔板数按橙皮苷峰计均不低于 8000。

2.3.2 HD-PC 及 HD-PC-NPs 供试品溶液的配制 取 HD-PC 约 10 mg 置于 50 mL 量瓶中, 加 30 mL 有机溶剂 [乙腈-DMSO (9:1)] 超声 20 s, 放置至室温后加入流动相稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 HD-PC 供试品溶液。取 HD-PC-NPs 混悬液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加 30 mL 乙腈超声 20 s, 放置至室温后加入流动相稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 HD-PC-NPs 供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的配制 精密称取橙皮苷对照品 10 mg, 置于 250 mL 量瓶中, 加入 4 mL DMSO 超声溶解后乙腈稀释至刻度, 即得 40 $\mu\text{g/mL}$ 橙皮苷对照品储备液, 密封, 置于冰箱中, 冷藏备用。

2.3.4 线性关系考察 取橙皮苷对照品储备液, 采用乙腈依次稀释至 10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 进样测定。以橙皮苷峰面积为纵坐标 (Y), 橙皮苷质量浓度为横坐标 (X) 作线性回归, 得回归方程 $Y=14.2967X-0.6592$, $r=0.9998$, 可见橙皮苷在 0.05~10.00 $\mu\text{g/mL}$ 具有良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 取橙皮苷质量浓度为 10.00、1.00、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, 分别连续进样 6 次。结果显示橙皮苷峰面积的 RSD 依次为 0.43%、0.19%、0.52%, 可见仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取 HD-PC 和 HD-PC-NPs 混悬液供试品溶液, 于 0、3、6、9、18、24 h 时间点进样。结果显示 HD-PC 和 HD-PC-NPs 的橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.81%、1.15%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 按照“2.3.2”项下所述方法平行制备 6 份 HD-PC 和 HD-PC-NPs 供试品溶液, 分别进样测试橙皮苷的峰面积, 计算橙皮苷含量。结果显示, HD-PC 和 HD-PC-NPs 中橙皮苷含量的 RSD 分别为 1.54% 和 0.79%, 说明重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取 9 份约含 5 mg 橙皮苷的 HD-PC, 分成低、中、高 3 组, 分别按 80%、100%、120% 的水平加入橙皮苷对照品, 按“2.3.2”项下所述方法分别制备供试品溶液。进样测定橙皮苷含量并计算回收率。结果显示, HD-PC 平均加样回收率为 101.42%, RSD 为 0.86%。

分别取 9 份体积为 0.5 mL 的 HD-PC-NPs 混悬液, 分成低、中、高 3 组, 分别按 80%、100%、120% 的水平加入橙皮苷对照品, 按“2.3.2”同法操作制备供试品溶液后进样测定橙皮苷含量并计算回收率。结果显示, HD-PC-NPs 平均加样回收率依次为 99.17%, RSD 为 1.14%, 说明准确度较高。

2.4 HD-PC 的复合率测定^[6]

称 10 mg 的 HD-PC 置于 25 mL 量瓶中, 加入氯仿, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 减压旋转蒸发除去氯仿, 加入乙腈复溶, 测定参加复合反应的橙皮苷量 (M_1)。按“2.3.2”方法测定橙皮苷总量 (M_0)。计算复合率 (复合率 = M_1/M_0)。结果显示, 3 批 HD-PC 的平均复合率为 99.91%。

2.5 HD-PC 的 XRPD 研究

取橙皮苷、磷脂、物理混合物 (橙皮苷与磷脂比例同 HD-PC) 和 HD-PC 适量进行 XRPD 扫描, 采用 Cu-K α 靶, 扫描速度为 8°/min, 扫描范围 (2θ) 为 8°~45°, 结果见图 1。橙皮苷原料药在 8°、10.4°、10.5°、14.7°、14.9°、15.3°、15.8° 等处存在特征晶型峰。橙皮苷与磷脂简单混合制得的物理混合物 XRPD

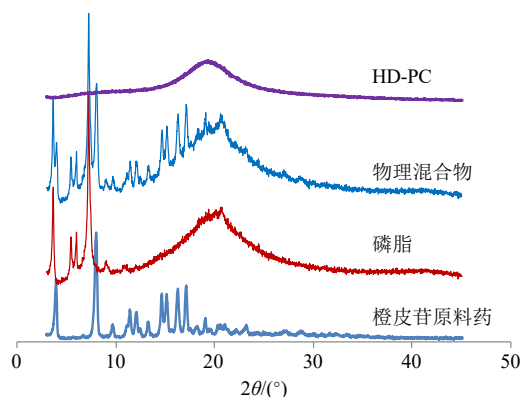


图 1 HD-PC 的 XRPD 图谱

Fig. 1 XRPD spectrum of HD-PC

图中仍可见橙皮苷原料药的晶型峰。而 HD-PC 的 XRPD 图谱中未见橙皮苷晶型衍射峰, 说明橙皮苷转变为无定型物质, 这也证明 HD-PC 制备成功。

2.6 HD-PC-NPs 粒径、多分散系数 (PDI) 与 ζ 电位的测定

取 HD-PC-NPs 混悬液 50 μ L, 加入 5 mL 蒸馏水混匀, 平行制备 3 份。取适量于粒度分析仪上分别测定 HD-PC-NPs 粒径、PDI 及 ζ 电位。

2.7 单因素实验

2.7.1 稳定剂种类的考察 固定 HD-PC 用量为 50 mg, 稳定剂与 HD-PC 用量比为 3 : 1, 超声功率为 200 W, 超声时间为 15 min, 均质压力为 70 mPa, 均质次数 10 次, 分别考察不同稳定剂对 HD-PC-NPs 的影响。结果见表 1, 采用泊洛沙姆 188、PVPK30 和聚山梨酯 80 制得的 HD-PC-NPs 粒径和 PDI 值均远大于 TPGS ($P < 0.01$)。PVPK30 和 TPGS 制得的 HD-PC-NPs 的 ζ 电位绝对值较为接近, 但两者无显著性差异, 故选择最终 TPGS 作为稳定剂来制备 HD-PC-NPs。

2.7.2 HD-PC 与 TPGS 用量比例的考察 固定药物用量 50 mg, TPGS 作为稳定剂, 超声功率为 200 W, 超声时间为 15 min, 均质压力 70 MPa, 均质次数 10 次, 分别考察 TPGS 与 HD-PC 不同用量比例对 HD-PC-NPs 的影响。结果见表 2, 随着 HD-PC 用量的增加, HD-PC-NPs 粒径和 PDI 值呈先减小再增大趋势。

表 1 稳定剂种类的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of stabilizer types ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	粒径/nm	PDI 值	ζ 电位/mV
泊洛沙姆 188	158.56 \pm 83.27	0.619 \pm 0.127	-23.82 \pm 2.07
PVP K30	754.95 \pm 55.14	0.363 \pm 0.054	-26.81 \pm 0.98
TPGS	305.17 \pm 34.07	0.236 \pm 0.023	-25.47 \pm 1.87
聚山梨酯 80	618.23 \pm 73.62	0.328 \pm 0.041	-19.46 \pm 1.15

表 2 稳定剂与 HD-PC 用量比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of ratio of stabilizer to HD-PC dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

TPGS 与 HD-PC 用量比	粒径/nm	PDI 值	ζ 电位/mV
4 : 1	371.73 \pm 17.72	0.471 \pm 0.077	-26.81 \pm 1.29
3 : 1	339.02 \pm 24.01	0.231 \pm 0.028	-25.93 \pm 1.78
2 : 1	374.21 \pm 37.51	0.351 \pm 0.038	-29.16 \pm 1.24
1 : 1	602.62 \pm 55.06	0.274 \pm 0.036	-18.25 \pm 0.99
1 : 2	1334.41 \pm 147.41	0.846 \pm 0.047	-10.24 \pm 1.17

势。当 TPGS 与 HD-PC 用量比例为 3 : 1 时粒径相对较小, PDI 值小于 0.3, 但 ζ 电位绝对值仍小于 30 mV。因此, 后续需要对 TPGS 与 HD-PC 用量比例进行优化。

2.7.3 超声功率的考察 固定药物用量 50 mg, TPGS 与 HD-PC 用量比例为 3 : 1, 超声时间为 15 min, 均质压力 70 MPa, 均质次数 10 次, 分别考察不同超声功率对 HD-PC-NPs 的影响。结果见表 3, 随着超声功率逐渐增加, 粒径和 PDI 值先减小后增大, 提示超声功率可影响粒径大小及均一性。超声功率过大时体系温度较高, 可能影响 HD-PC 稳定性, 且粒径和 PDI 也开始变大, ζ 电位绝对值变小。综合 HD-PC-NPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位绝对值, 最终选择超声功率为 250 W。

表 3 超声功率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of ultrasonic power ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
100	621.96 \pm 64.17	0.342 \pm 0.072	-27.72 \pm 1.19
150	476.02 \pm 51.28	0.284 \pm 0.042	-29.47 \pm 1.49
200	321.27 \pm 43.56	0.233 \pm 0.043	-28.31 \pm 1.26
250	272.51 \pm 39.44	0.152 \pm 0.027	-30.14 \pm 1.52
300	365.22 \pm 46.46	0.221 \pm 0.045	-25.40 \pm 1.67

2.7.4 超声时间的考察 固定药物用量 50 mg, TPGS 与 HD-PC 用量比例为 3 : 1, 超声功率为 250 W, 均质压力 70 mPa, 均质次数 10 次, 分别考察不同超声时间对 HD-PC-NPs 的影响。结果见表 4, 随着超声时间的增加 HD-PC-NPs 粒径逐渐变小, 但过长的超声时间反而导致粒径变大。由于超声时间 15、20 min 时 HD-PC-NPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位绝对值无显著性差异 ($P > 0.05$), 为节约能源, 故选择超声时间为 15 min。

2.7.5 均质压力的筛选 固定药物用量 50 mg, TPGS

表 4 超声时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/h	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
5	552.87 \pm 57.46	0.211 \pm 0.039	-21.72 \pm 1.74
10	308.51 \pm 46.11	0.253 \pm 0.041	-28.09 \pm 1.71
15	269.84 \pm 41.60	0.146 \pm 0.031	-31.47 \pm 1.43
20	278.22 \pm 45.17	0.153 \pm 0.037	-30.40 \pm 1.22
25	313.17 \pm 53.14	0.272 \pm 0.040	-26.13 \pm 2.04

表 8 方差分析结果

Table 8 Variance analysis results

误差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	误差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	2.11	0.23	48.72	<0.000 1	X_1^2	1	0.76	0.76	157.18	<0.000 1
X_1	1	0.10	0.10	20.74	0.002 6	X_2^2	1	0.55	0.55	114.22	<0.000 1
X_2	1	0.01	0.01	2.33	0.171 1	X_3^2	1	0.32	0.32	66.17	<0.000 1
X_3	1	0.17	0.17	35.85	0.000 5	残差	7	0.03	0.03		
X_1X_2	1	2.5×10^{-7}	2.5×10^{-7}	5.20×10^{-5}	0.994 4	失拟项	3	0.03	0.03	5.48	0.076 0
X_1X_3	1	0.01	0.01	2.16	0.184 7	绝对误差	4	6.59×10^{-3}	6.59×10^{-3}		
X_2X_3	1	8.65×10^{-3}	8.65×10^{-3}	1.80	0.221 7	总和	16	2.14	2.14		

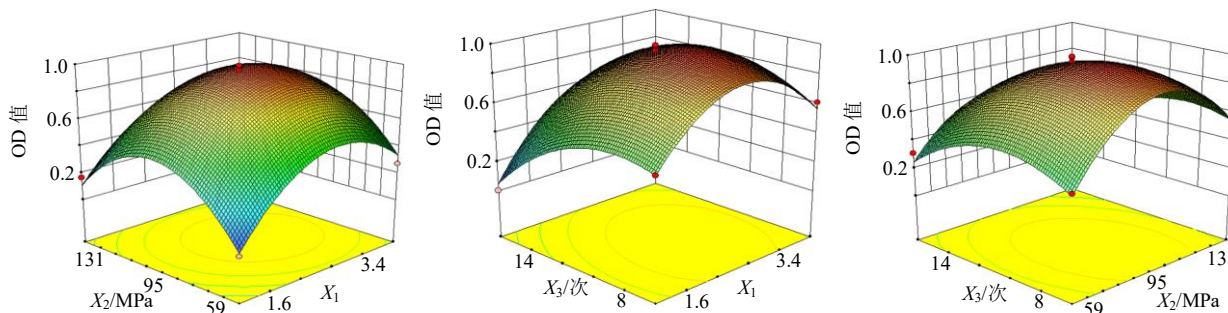


图 2 自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors and response values

TPGS 与 HD-PC 用量比为 3.24 : 1, 均质压力 95.29 MPa、均质次数为 10.29 次, 预测最佳处方的粒径、PDI 值和 ζ 电位绝对值分别为 261.84 nm、0.117 和 -32.87 mV。

2.9 HD-PC-NPs 处方验证

考虑到实际可操作性, 调整 TPGS 与 HD-PC 用量比为 3.2, 均质压力 95 mPa, 均质次数为 10 次。平行制备 3 份 HD-PC-NPs, 分别测定粒径、PDI 值和 ζ 电位, 并计算偏差 [偏差=(模型预测值-实际值)/模型预测值]。结果见表 9, HD-PC-NPs 粒径、PDI 值和 ζ 电位的相对偏差均小于 $\pm 5\%$, 说明该数学模型具有良好的预测性和重现性。HD-PC-NPs 的粒径及 ζ 电位图分别见图 3。

2.10 HD-PC-NPs 的 TEM 分析

取 0.1 mL 的 HD-PC-NPs 混悬液样品, 用蒸馏水按照 1 : 40 比例稀释, 混匀后滴在铜网上, 1.5%

表 9 实际值与预测值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Comparison of predicted values and measured values ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

评价指标	实际值	模型预测值	偏差/%
粒径/nm	268.62 ± 18.14	261.84	2.59
PDI 值	0.122 ± 0.013	0.117	-4.27
ζ 电位/mV	-31.79 ± 1.37	-32.87	3.28

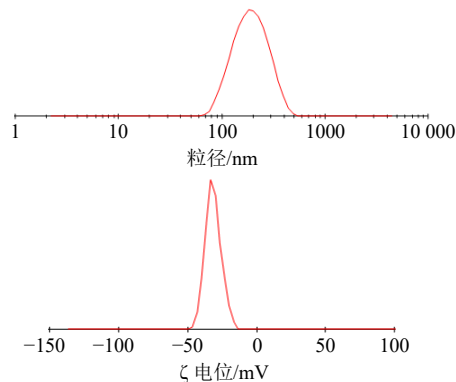


图 3 HD-PC-NPs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B) 图

Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of HD-PC-NPs

磷钨酸钠染色, 自然晾干后置于 TEM 下观察 HD-PC-NPs 外貌 ($\times 15\ 000$), 结果见图 4, 所得 HD-PC-NPs 大体呈类球形或球形, 粒子之间无粘连。

2.11 HD-PC-NPs 冻干粉研究

2.11.1 冻干保护剂种类及用量筛选 为增加 HD-PC-NPs 混悬液稳定性、便于储存及给药, 故将其制备成冻干粉。取 HD-PC-NPs 混悬液, 加入冻干保护剂, 震荡混匀, 于 $-65\ ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中预冻 24 h, 迅速置于 $-25\ ^\circ\text{C}$ 冷冻干燥机中冻干。以冻干粉外观、粒径及其 PDI 值进行评价, 结果见表 10, 采用 5% 或 7% 甘露醇作为冻干保护剂时, 冻干粉外观饱

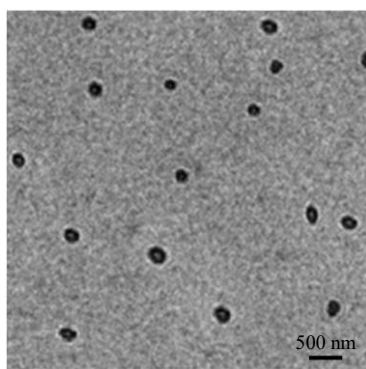


图 4 HD-PC-NPs 的 TEM 图

Fig. 4 TEM photograph of HD-PC-NPs

表 10 冻干保护剂种类及用量的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 10 Effect of types and dose for freeze-drying protectants ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂	外观	粒径/nm	PDI 值
冻干前	—	268.62±18.14	0.122±0.011
不加冻干保护剂	塌陷	1 024.19±108.85	0.794±0.118
3%乳糖	塌陷, 不均一	598.27±52.66	0.374±0.045
5%乳糖	塌陷	491.43±44.60	0.279±0.034
7%乳糖	饱满	410.74±38.08	0.282±0.027
3%甘露醇	轻微塌陷, 不均一	379.08±30.21	0.264±0.033
5%甘露醇	饱满	273.61±26.43	0.217±0.028
7%甘露醇	饱满	277.04±29.16	0.208±0.026
3%海藻糖	塌陷, 不均一	461.22±39.07	0.318±0.031
5%海藻糖	轻微塌陷, 不均一	389.70±36.28	0.269±0.029
7%海藻糖	饱满	392.97±33.67	0.257±0.028

满, 色泽均一, 且粒径及 PDI 值变化相对较小。由于采用 5%甘露醇时辅料用量相对较少, 故选之作为 HD-PC-NPs 的冻干保护剂 (外观见图 5)。另测得 HD-PC-NPs 冻干粉中含橙皮苷的质量分数为 (0.77±0.01)%。

2.11.2 冻干粉稳定性考察 取 HD-PC-NPs 冻干粉置于温度为 40 °C, 湿度为 65%恒温恒湿箱中, 第



冻干前 冻干粉 复溶后

图 5 HD-PC-NPs 外观

Fig. 5 Appearance of HD-PC-NPs

6 个月取适量冻干粉蒸馏水复溶后测得粒径为 (284.53±24.09) nm, PDI 值为 0.243±0.029。HD-PC-NPs 混悬液在相同条件下放置 1 个月即出现明显的沉淀现象, 所以制备成冻干粉后可增加 HD-PC-NPs 的稳定性。

2.12 HD-PC-NPs 冻干粉的 XRPD 研究

取橙皮苷原料药、空白辅料 (除不加橙皮苷外, 其他辅料比例同 HD-PC-NPs 冻干粉)、物理混合物 (橙皮苷与辅料比例同 HD-PC-NPs 冻干粉) 和 HD-PC-NPs 冻干粉适量, 按“2.5”项下条件分别进行 XRPD 扫描, 结果见图 6。物理混合物的 XRPD 图谱中仍可观察到橙皮苷原料药在 8.0°、10.4°、10.5°、14.7°、14.9°、15.3°、15.8°等处的特征晶型峰。但在 HD-PC-NPs 冻干粉 XRPD 图谱中橙皮苷的特征晶型峰完全消失, 仅可观察到辅料的 XRPD 图谱, 证明橙皮苷存在状态发生了改变, 转变为无定型物质。

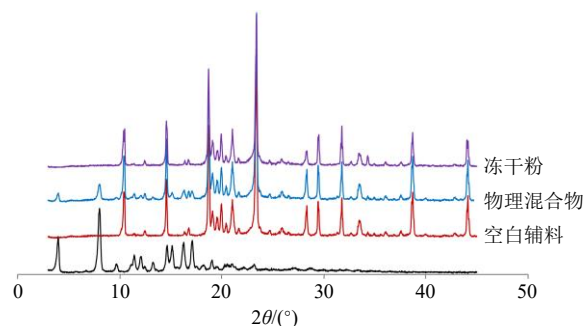


图 6 HD-PC-NPs 的 XRPD 图谱

Fig. 6 XRPD spectrum of HD-PC-NPs

2.13 溶解度考察

取过量的橙皮苷原料药、HD-PC、HD-PC-NPs 冻干粉及其物理混合物 (药物与辅料比例同 HD-PC-NPs 冻干粉) 置于蒸馏水中, 于 25 °C 下震荡 3 d (转速为 100 r/min)。取上层混悬液, 过 0.45 μm 微孔滤膜后测定, 结果见表 11。橙皮苷原料药溶解度仅为 (6.32±0.12) μg/mL, HD-PC 将其溶解度提高至 2.48 倍, 而 HD-PC-NPs 将其溶解度提高至 77.06 倍。从物理混合物溶解度数据可以看出, 辅料的增溶作用有限, 提高幅度远低于 HD-PC-NPs。

表 11 溶解度测试结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 11 Results of solubility test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	溶解度/(μg·mL ⁻¹)
橙皮苷原料药	6.32±0.12
HD-PC	15.67±0.32
HD-PC-NPs	487.04±3.63
物理混合物	7.86±0.14

2.14 HD-PC-NPs 体外释药考察

橙皮苷溶解度受 pH 值影响较小^[5]。测得橙皮苷在 1.0% SDS 水溶液中溶解度为 (114.67±3.18) μg/mL, 为达漏槽条件, 故选择体积为 900 mL, 浓度为 1.0% SDS 水溶液作为释药介质^[6]。取橙皮苷原料药、HD-PC、物理混合物 (橙皮苷与辅料比例同 HD-PC-NPs 冻干粉) 和 HD-PC-NPs 冻干粉样品 (相当于橙皮苷含量 20 mg), 加入空白释药介质 4 mL, 并置于透析袋中 (截留相对分子质量为 8000~12 000), 扎紧。设置温度为 (37.0±0.5) °C, 转速为 75 r/min, 于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、18.0、24.0、36.0 h 取样 4 mL, 并补加空白介质 4 mL。样品经 8000 r/min 离心 (离心半径为 8.6 cm) 5 min 后测定, 结果见图 7。橙皮苷原料药在 36 h 内累积释放率仅为 8.12%, 可能与橙皮苷原料药疏水性较强、颗粒较大有关。橙皮苷在物理混合物中的累积释放度略有提高 (9.68%), 可能与制剂中辅料增溶作用有关。HD-PC 各点累积释放率得到明显改善, 但 36 h 时仍未完全释药。而 HD-PC-NPs 冻干粉在 4 h 累积释放率达 90% 以上, 显著提高了橙皮苷释药速率及释放度。

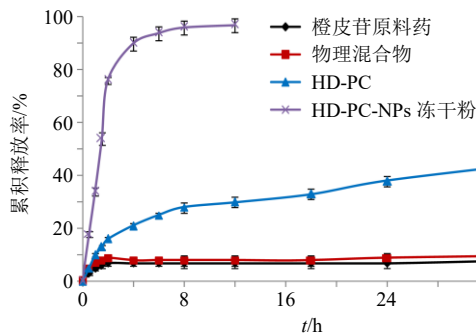


图 7 体外药物释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 In vitro release profiles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.15 体内药动学研究

2.15.1 给药方案及样品采集 取禁食 12 h 的 SD 大鼠 18 只, 随机分成橙皮苷原料药、HD-PC 和 HD-PC-NPs 冻干粉 3 组, 每组 6 只。采用 0.5% CMC-Na 水溶液配制灌胃液, 剂量均为 30 mg/kg (以橙皮苷含量计)。于 0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 h 于眼眶后静脉取血约 0.3 mL, 至肝素化离心管中 (肝素钠质量浓度为 1.5 mg/mL), 并于 3500 r/min 离心 (离心半径为 8.6 cm) 3 min。移取上层血浆至空白离心管中, 冷冻保存。

2.15.2 血浆样品处理^[6,23] 血浆样品解冻后精密移取 100 μL, 加入 50 μL 内标溶液和 1 mL 乙腈, 涡旋 3 min, 于离心机中 5000 r/min 离心 (离心半径为 8.6 cm) 5 min。取上层液至空白离心管中, 40 °C 水浴下的氮气吹干。加入 100 μL 乙腈复溶, 5000 r/min 离心 3 min, 即得。

2.15.3 血浆对照品线性考察 精密取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品, 乙腈稀释至质量浓度为 1200 ng/mL, 作为内标溶液。乙腈稀释配制质量浓度为 2000、1000、500、100、50、25 ng/mL 的橙皮苷对照品溶液, 各质量浓度取 100 μL, 分别加入内标溶液 50 μL, 混匀后于 40 °C 水浴中氮气缓慢吹干。于残渣中分别加入空白血浆 100 μL, 后续按“2.14.2”项下处理, 得血浆对照品溶液, 进样测定, 计算橙皮苷与内标峰面积比值。以橙皮苷质量浓度 (X) 对峰面积比值 (Y) 进行线性回归, 得橙皮苷回归方程 $Y=0.2219X+0.1017$, $r=0.9942$, 所以线性范围为 25~2000 ng/mL。

2.15.4 方法学考察 按“2.14.2”项下方法分别处理空白血浆和血浆样品, 测定结果见图 8, 血浆内源性物质未干扰内标和橙皮苷色谱峰, 专属性较高。取血浆样品于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 计算得橙皮苷和内标峰面积比值的 RSD 为 9.18%, 说明稳定性良好。取 2000 ng/mL (高)、500 ng/mL (中) 和 25 ng/mL (低) 血浆对照品溶液, 连续测定 6 次, 计算得橙皮苷和内标峰面积比值的 RSD 依次为 6.97%、7.84%、9.37%, 说明日内精密度良好。连续测定 6 d, 每天 1 次, 计算得峰面积比值的 RSD 依次为 4.49%、8.07%、6.14%, 说明日间精密度良好。分别配制 2000 ng/mL (高)、500 ng/mL (中) 和 25 ng/mL (低) 的橙皮苷对照品溶液, 按“2.14.2”项下方法处理后进样测定, 并与配制质量浓度比较, 计算回收率。结果显示, 平均回收率为 94.71%, RSD 为 5.90%, 说明准确度较高。

2.15.5 药动学结果 橙皮苷原料药、HD-PC 和 HD-PC-NPs 组的血药浓度-时间曲线, 结果见图 9。DAS2.0 软件包拟合数据, 结果见表 12。橙皮苷制备成 HD-PC 后 $t_{1/2}$ 延长至 (4.71±0.66) h, C_{max} 增加至 (511.70±105.04) ng/mL, 生物利用度提高至 1.48 倍。HD-PC-NPs 组药动学行为发生了更大变化, 主要药动学参数与橙皮苷原料药或物理混合物相比均具有极显著性差异 ($P<0.01$), 其中 t_{max} 提前至 (1.04±0.33) h, $t_{1/2}$ 延长至 (5.69±0.82) h,

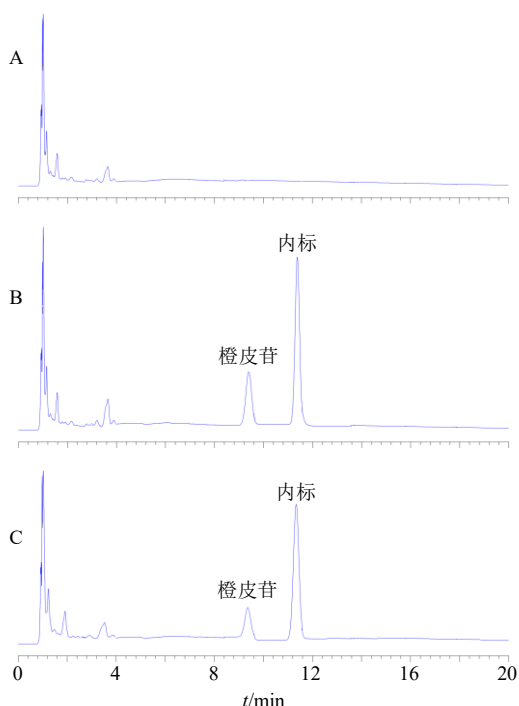


图 8 空白血浆 (A)、血浆样品 (B) 和橙皮苷+空白血浆 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of blank plasma (A), plasma sample (B) and hesperidin + blank plasma (C)

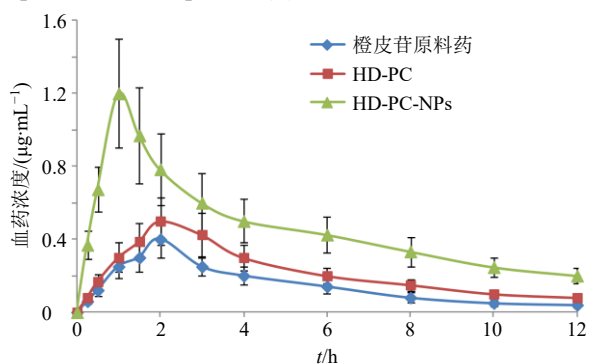


图 9 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Profiles of plasma concentration-time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 12 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 12 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	橙皮苷	HD-PC	HD-PC-NPs
t_{max}	h	2.09 ± 0.37	2.18 ± 0.41	1.04 ± 0.33 ^{***}
$t_{1/2}$	h	4.09 ± 0.52	4.71 ± 0.66 [*]	5.69 ± 0.82 ^{***}
C_{max}	ng·mL ⁻¹	408.61 ± 76.18	511.70 ± 105.04 [*]	1 213.96 ± 149.88 ^{****}
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	1 744.53 ± 205.61	2 591.82 ± 314.07 ^{**}	5 395.72 ± 759.84 ^{****}
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	1 803.03 ± 213.97	2 702.36 ± 341.16 ^{**}	5 534.12 ± 793.24 ^{****}

与橙皮苷比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 HD-PC 比较: ^{##} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs hesperidin; ^{##} $P < 0.01$ vs HD-PC

并与 TPGS 一同起到稳定作用^[27]。

HD-PC 提高了橙皮苷溶解度及溶出度, 但改善

C_{max} 增加至 (1 213.96 ± 149.88) ng/mL, 相对生物利用度提高至 3.09 倍, 其提高幅度大于 HD-PC, 说明 HD-PC-NPs 促吸收作用更为显著。

3 讨论

在制备 PC 时一般采用非质子溶剂作为反应介质, 所以质子溶剂如甲醇、乙醇可能会干扰 PC 的形成, 影响复合率^[6]。四氢呋喃属于非质子溶剂, 沸点较低, 易于除去, 且橙皮苷在四氢呋喃中溶解度相对较高, 因而选为反应溶剂。PC 中药物与磷脂摩尔比一般按照 1 : 1 结合在一起^[13-14], 为使药物与磷脂完全形成 PC, 故在制备 HD-PC 时橙皮苷与磷脂的物质的量比控制为 1 : 1.2, 此时的复合率基本达 100%。

橙皮苷原料药难溶于水及各种有机溶剂。龙家英等^[24]采用高速剪切联合高压均质法制备了橙皮苷纳米混悬剂, ζ 电位为 (-23.16 ± 1.12) mV, 绝对值不足 30 mV, 稳定性不高, 可能与稳定剂种类过于单一有关^[18]。前期研究发现, 采用介质研磨法^[25]直接将橙皮苷制备成 NPs 时, 平均粒径达到 (653.04 ± 49.96) nm, 粒径大小对药物体内吸收存在较大影响^[21]。另外, 橙皮苷热稳定性较差^[26], 采用介质研磨法制备 HD-NPs 时研磨介质之间的机械能转化成大量的热能, 可能影响橙皮苷的稳定性。本研究将橙皮苷制备成 HD-PC 来提高其溶解度, 为后续 HD-PC-NPs 的制备奠定基础。

本研究以 HD-PC 形式制得 HD-PC-NPs 粒径为 (268.62 ± 18.14) nm, 为难溶性药物 NPs 处方工艺研究提供了新的思路。HD-PC-NPs 处方中的磷脂发挥 2 方面的作用: ①形成 HD-PC 后增加药物的溶解度, 为制备 HD-PC-NPs 奠定基础; ②磷脂是一种两性亲表面活性剂, 可吸附于 NPs 表面提供负电荷,

程度有限^[6]。根据 Ostwald-Freundlich 方程, 药物粒径对溶解度有很大影响, 当粒径减小时, 比表面积

急剧增大,药物的溶解度会显著增大。同时也对药物溶出速率及累积溶出率产生积极影响。因而 HD-PC-NPs 与 HD-PC 相比,具有更高的溶解度、更快的溶出速率及更大的累积溶出度。

HD-PC 将其生物利用度提高至 1.48 倍,但 HD-PC-NPs 的提高幅度更大(3.09 倍)。HD-PC-NPs 的 t_{\max} 显著性提前,可能是由于 HD-PC-NPs 加快了橙皮苷的释药速率,缩短了经胃肠道黏膜吸收时间所致。HD-PC-NPs 的 C_{\max} 显著性增大可能是由于在 HD-PC-NPs 中引入 PC 技术后增加了药物的透膜能力所致,也与 HD-PC-NPs 极大提高了药物的累积溶出度有关。

HD-PC-NPs 相对口服吸收生物利用度极显著性提高至 3.09 倍,可能是由于纳米药物比表面积急剧增大,有效增加了与胃肠道接触面;橙皮苷在 HD-PC-NPs 中以无定型形式存在,而无定型药物往往具有更高的生物利用度^[28];纳米药物与胃肠道黏附性较强,有益于橙皮苷透膜吸收^[29];橙皮苷在体内胃肠道稳定性较差,附着于 HD-PC-NPs 表面的稳定剂可能增加了药物的稳定性^[19];HD-PC-NPs 处方中的辅料如磷脂和 TPGS 等本身具有促进药物吸收的作用^[12,30]。后续还需进一步完善 HD-PC-NPs 质量标准,评价 HD-PC-NPs 冻干粉稳定性,继续对药效学和毒理学等进行研究,为橙皮苷纳米制剂研究开发提供更为全面、可靠的研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhao J, Li Y L, Gao J F, et al. Hesperidin inhibits ovarian cancer cell viability through endoplasmic reticulum stress signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5569-5574.
- [2] Shokoochi M, Khaki A, Shoorei H, et al. Hesperidin attenuated apoptotic-related genes in testicle of a male rat model of varicocele [J]. *Andrology*, 2020, 8(1): 249-258.
- [3] 张恒,饶坤林,向韩. 橙皮苷药理活性研究进展 [J]. *中南药学*, 2016, 14(10): 1097-1100.
- [4] 刘沁如,向茗,瞿昊宇,等. 陈皮黑茶颗粒提取工艺条件对降糖降脂活性成分的影响 [J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(12): 66-73.
- [5] 林桂梅,张国锋,张建军. 枳实生品与麸炒品中 4 个黄酮类成分表观油水分配系数的比较研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(6): 1417-1419.
- [6] 牛晓磊,贾润霞,谈秀凤. 橙皮苷磷脂复合物固体分散体的制备、表征及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2255-2259.
- [7] 陈彦,王晋艳,贾晓斌,等. 枳实中主要二氢黄酮类成分肠道吸收代谢及与药物相互作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(9): 1564-1566.
- [8] 高彩芳,夏加璇,朱颖,等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2754-2762.
- [9] 熊传爽,田黎明,洪怡,等. 橙皮苷脂质体凝胶的制备及其透皮吸收研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(5): 511-518.
- [10] 廖艳梅,李小芳,刘罗娜,等. 橙皮苷纳米乳剂的制备及其稳定性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2312-2318.
- [11] 凡小燕. 橙皮苷自微乳的制备与评价 [D]. 合肥:安徽医科大学,2011.
- [12] 张留超,刘勇华. 鞣花酸磷脂复合物的制备及其口服生物利用度研究 [J]. *中成药*, 2021, 43(7): 1685-1690.
- [13] 黄珊,翟秉涛,杨洁,等. 根皮素磷脂复合物的制备、表征及体内外溶出行为评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(18): 5543-5551.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 邓向涛,郝海军,陈晓峰,等. 木犀草素 2 种固体分散体制备、表征和大鼠体内药动学行为研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5787-5793.
- [17] 郝海军,张红芹,贾幼智,等. 采用制剂新技术提高中药磷脂复合物的溶出度和生物利用度研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(17): 2474-2479.
- [18] 张亚林,喻海洋,黄涛. 大黄酸纳米混悬剂的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(11): 2829-2834.
- [19] 毛艳婷,陶兴茹,张胜男,等. 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(4): 393-398.
- [20] 黄甜甜,沈一平,路丽康,等. 高载药量雷公藤红素纳米混悬剂的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2125-2133.
- [21] 杭凌宇,申宝德,沈成英,等. 不同粒径波棱甲素纳米混悬剂的制备及药动学研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(7): 1898-1905.
- [22] 李怡静,敖惠,李好文,等. 西瑞香素纳米混悬剂的制备及其体外抗肿瘤作用研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(2): 231-237.
- [23] 相聪坤,温俊霞,闫宝环,等. 陈皮汤中橙皮苷大鼠体内药动学分析方法的研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(18): 1542-1546.
- [24] 龙家英,李小芳,王娴,等. 茶皂素用于稳定橙皮苷纳

- 米混悬剂及其机制研究 [J]. 药学报, 2021, 56(11): 3159-3165.
- [25] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [26] 文赤夫, 李国章, 董爱文, 等. 橙皮苷的提取及其稳定性分析 [J]. 生物质化学工程, 2006, 40(3): 37-40.
- [27] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 42-51.
- [28] 梁宇, 邢逞, 周启蒙, 等. 米非司酮 3 种晶型的制备及其在大鼠体内药动学研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(19): 2251-2259.
- [29] 王小霞, 张智强. 鞣花酸纳米结构脂质载体处方优化和口服生物利用度研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3862-3871.
- [30] 宋婷婷, 蔡荣珊, 王宏, 等. TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体的制备及质量评价 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3522-3529.

[责任编辑 郑礼胜]