

柚皮素磷脂酰胆碱复合物滴丸处方优化及口服药动力学评价

刘万路

威海海洋职业学院, 山东 威海 264300

摘要: 目的 优化柚皮素磷脂酰胆碱复合物滴丸 (naringenin-phosphatidylcholine complex dropping pills, Nar-PC-DPs) 处方, 考察口服药动力学行为及生物利用度。方法 溶剂挥发法制备柚皮素磷脂酰胆碱复合物 (naringenin-phosphatidylcholine complex, Nar-PC)。采用成型率和丸重差异为指标, 单因素实验联合 Box-Behnken 效应面法筛选 Nar-PC-DPs 处方。扫描电子显微镜 (SEM) 观察 Nar-PC-DPs 微观形态, X 射线粉末衍射法 (XRPD) 分析柚皮素在 Nar-PC-DPs 中存在状态, 测定 Nar-PC-DPs 溶解度和体外释药情况。比格犬分别给予柚皮素原料药、Nar-PC 和 Nar-PC-DPs, 测定血药浓度, 计算主要药动学参数。结果 Nar-PC-DPs 最佳处方工艺为聚乙二醇 4000 (PEG 4000) 占基质百分比为 49%, 基质与 Nar-PC 质量比为 5.2:1, 滴距为 8.2 cm。Nar-PC-DPs 外观圆整、光滑。柚皮素在 Nar-PC-DPs 中以无定型形式存在, 在不同介质中溶解度均明显增加。Nar-PC-DPs 在 60 min 内累积溶出度为 95.10%, 储存稳定性良好。药动学结果显示, Nar-PC-DPs 的达峰时间 ($t_{\max}$) 提前至 (0.95 ± 0.14) h, 半衰期 ($t_{1/2}$) 增加至 (6.85 ± 0.71) h, 达峰浓度 ($C_{\max}$) 增加至 3.25 倍, 相对口服吸收生物利用提高至 3.79 倍。结论 Nar-PC-DPs 增加了柚皮素溶解度, 促进了药物溶出, 提高了口服吸收生物利用度。

关键词: 柚皮素; 磷脂酰胆碱复合物; 滴丸; Box-Behnken 设计-效应面法; 体外溶出; 药动学行为

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)19-6253-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.007

Formulation optimization of naringenin-phosphatidylcholine complex dropping pills and oral pharmacokinetics evaluation

LIU Wan-lu

Weihai Ocean Vocational College, Weihai 264300, China

Abstract: Objective To optimize prescriptions of naringenin-phosphatidylcholine complex dropping pills (Nar-PC-DPs), and investigate its oral pharmacokinetic behavior and bioavailability. **Methods** Solvent evaporation method was employed to prepare naringenin-phosphatidylcholine complex (Nar-PC). Forming rate and weight difference were used as indexes, single factor investigation combined with Box-Behnken design response surface method was employed to investigate the optimal prescriptions of Nar-PC-DPs. Microscopic morphology of Nar-PC-DPs was observed by scanning electron microscope (SEM). Crystal form of naringenin in Nar-PC-DPs was analyzed by X ray powder diffraction (XRPD). Solubility and *in vitro* release behavior of Nar-PC-DPs were determined. Beagle dogs were administrated of naringenin suspension, Nar-PC and Nar-PC-DPs, respectively. Plasma concentrations were determined, and main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** Optimum prescriptions of Nar-PC-DPs: percentage of PEG 4000 in matrix was 49%, matrix to Nar-PC ratio was 5.2:1, dropping distance was 8.2 cm. Appearance of Nar-PC-DPs was round and smooth. Naringenin existed as an amorphous form in Nar-PC-DPs, and solubility in different media was enhanced greatly. Cumulative dissolution of Nar-PC-DPs reached 95.10% in 60 min, and storage stability was perfect. Pharmacokinetic results showed that the time to peak ($t_{\max}$) of Nar-PC-DPs was shift to (0.95 ± 0.14) h, half-life period ($t_{1/2}$) was extend to (6.85 ± 0.71) h, peak concentration ($C_{\max}$) was increased to 3.25 times and oral bioavailability was enhanced to 3.79 times. **Conclusion** Nar-PC-DPs increased the solubility of naringenin, promoted the drug dissolution and enhanced oral bioavailability.

Key words: naringenin; phosphatidylcholine complex; dropping pills; Box-Behnken design response surface method; dissolution *in vitro*; pharmacokinetic behavior

柚皮素属于二氢黄酮类化合物, 可从柚子、柑橘类水果以及蒲黄、枳实等中草药中提取得到^[1-2]。

柚皮素具有抗动脉硬化、抗炎、抗心律失常、降血脂、镇咳等药理活性^[2-3], 还可通过多途径促进宫颈

收稿日期: 2023-04-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (51804021)

作者简介: 刘万路 (1981—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为现代给药系统。Tel: (0631)7697687 E-mail: liuwanlu2010@126.com

癌细胞凋亡^[4], 抑制细胞增殖及迁移, 对卵巢癌、乳腺癌等妇科肿瘤也具较强的活性^[5]。研究显示^[6], 柚皮素大鼠口服半数致死量大于 5.0 g/kg, 表明毒性极低, 具有较大的临床应用潜力。

柚皮素属于生物药剂学分类中 II 类药物^[7], 在水中及正辛醇中饱和溶解度分别为 $(43.830 \pm 0.039) \mu\text{g/mL}$ 和 $(440.163 \pm 2.641) \mu\text{g/mL}$ ^[8], 水溶性和脂溶性均不高, 家兔口服吸收生物利用度仅约 4%^[9]。目前柚皮素有纳米混悬剂^[10]、脂质纳米粒^[11]、纳米晶^[12]、脂质体^[13-14]等研究, 但存在载药量低、处方工艺复杂、质量控制难度大、研发及生产成本高等缺陷, 不符合国内中药企业实际生产水平。

药物-磷脂复合物可有效地提高药物的体内吸收^[15-16], 但磷脂是一种混合物, 其中溶血磷脂酰胆碱具有溶血、诱发炎症等毒副作用^[17], 因此, 采用磷脂制备药物-磷脂复合物时具有安全隐患。磷脂主要成分是磷脂酰胆碱, 安全性及生物相容性高, 故本研究采用磷脂酰胆碱将柚皮素制备成柚皮素磷脂酰胆碱复合物 (naringenin-phosphatidylcholine complex, Nar-PC)^[18], 以提高其水溶性和脂溶性, 但 Nar-PC 黏性较大, 药物溶出速率及溶出度均差, 限制了生物利用度改善幅度。

滴丸 (dropping pills, DPs) 是将水溶性基质 (PEG 类辅料) 与难溶性药物加热成均一熔融液, 滴入不相混溶的冷凝液中冷却、收缩而成的一种丸剂, 溶出速率及溶出度均较高^[19-20], 该剂型患者顺应性高, 临床应用广泛^[21-22], 故采用滴丸来解决 Nar-PC 溶出速率及溶出度均差的问题。

本研究制备了柚皮素磷脂酰胆碱复合物滴丸 (naringenin-phosphatidylcholine complex dropping pills, Nar-PC-DPs)^[23], 单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 Nar-PC-DPs 制备工艺, 并对外观形态、晶型、体外溶出、储存稳定性等进行考察。以柚皮素原料药和 Nar-PC 为对比, 比较 Nar-PC-DPs 口服药动学行为, 为后续药效学评价奠定实验基础。目前, 国内外鲜见将磷脂复合物与滴丸联用的报道, 期望通过本研究为将来相关技术开发提供新策略。

1 仪器、材料与动物

FA2004B 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; 1200 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; HJ-2B 型数显控温磁力搅拌仪, 常州全禾仪器制造有限公

司; DWJ-S3 型全自动滴丸机, 烟台润龙制药机械设备有限公司; RC12AD 型智能溶出试验仪, 天大天发科技有限公司; JSM-IT800 型扫描电子显微镜, 日本电子株式会社; DLSB-2L 型旋转蒸发仪, 上海贤德实验设备有限公司; BJ-2 型崩解时限仪, 欧莱博科学仪器有限公司; LY-2150 型恒温恒湿箱, 广东立一科技有限公司; FRINGE EV 型 X 射线粉末衍射仪, 苏州浪声科学仪器有限公司; HSC-12A 型氮吹仪, 北京佳航博创科技有限公司。

柚皮素原料药, 批号 20200430, 质量分数 97.5%, 西安伍叶草生物科技有限公司; 柚皮素对照品, 批号 S-014-210908, 质量分数 99.2%, 成都瑞芬思生物科技有限公司; 赖诺普利对照品, 批号 20220412, 质量分数 99.0%, 上海甄准生物科技有限公司; 磷脂酰胆碱, 批号 20210608, 质量分数 99.0%, 上海辅必成医药科技有限公司; 聚乙二醇 4000 (PEG 4000, 批号 201025)、聚乙二醇 6000 (PEG 6000, 批号 210322), 陕西正一药用辅料有限公司; 二甲基硅油, 型号 H201-50, 批号 20210518, 国药集团化学试剂有限公司。

健康比格犬, 雌雄各半, 体质量 9.8~11.4 kg, 由吉林大学动物实验中心提供, 许可证号 SCXK(吉) 2020-007。所有动物实验均遵循威海海洋职业学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 Nar-PC 及其 Nar-PC-DPs 的制备

取柚皮素原料药 0.27 g 置于圆底烧瓶中, 加入磷脂酰胆碱 0.8 g 和四氢呋喃 100 mL。于 50 °C 下磁力搅拌 (800 r/min) 3 h, 于 40 °C 下减压旋蒸除去四氢呋喃, 即得 Nar-PC。称取适量 Nar-PC 和基质 (PEG 4000 和 PEG 6000 混合物) 置于滴丸机中, 70 °C 加热熔融, 设置机头转速为 100 r/min, 持续搅拌 10 min 得均匀熔融液。采用二甲基硅油为冷凝液, 调节滴距后滴制 Nar-PC-DPs (滴口外径和内径分别为 4.0 mm 和 2.5 mm), 收集 Nar-PC-DPs。同法制备空白滴丸 (不含柚皮素, 辅料比例同 Nar-PC-DPs)。

2.2 柚皮素含量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-水 (60:40); 进样体积为 10 μL; 检测波长为 289 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 理论塔板数以柚皮素峰计不低于 6000。

2.2.2 Nar-PC-DPs 供试品溶液的配制 随机取 20 粒 Nar-PC-DPs 置于研钵中研细成粉末, 精密称取约 40 mg 至三角烧瓶中, 加入 50%乙醇 50 mL 后密封, 立即称定质量。置于超声仪中超声 15 min (功率 250 W), 放置至室温, 加入 50%乙醇补足减失的质量。于高速离心机中 12 500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 20 min, 精密取上清液 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 流动相稀释, 定容, 即得 Nar-PC-DPs 供试品溶液。同法制备 Nar-PC 供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 取空白滴丸 (不含柚皮素, 其余辅料比例同 Nar-PC-DPs), 按“2.2.2”项下方法同法制备空白对照溶液。

2.2.4 对照品溶液的配制 精密称取柚皮素对照品 20.80 mg 至 100 mL 量瓶中, 加入约 80 mL 甲醇超声溶解并稀释至刻度, 得质量浓度为 208 $\mu\text{g/mL}$ 的柚皮素对照品储备液。

2.2.5 线性关系考察 使用流动相稀释成质量浓度为 10.400、5.200、2.600、1.300、0.650、0.065 $\mu\text{g/mL}$ 得系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。以柚皮素峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 作线性回归, 得回归方程 $Y=24.150\ 7X+0.289\ 2$, $r=0.999\ 8$, 结果表明柚皮素在 0.065~10.400 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.6 专属性考察 分别取空白对照溶液、柚皮素对照品溶液和 Nar-PC-DPs 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。结果见图 1, 结果表明辅料不干扰柚皮素色谱峰, 专属性高。

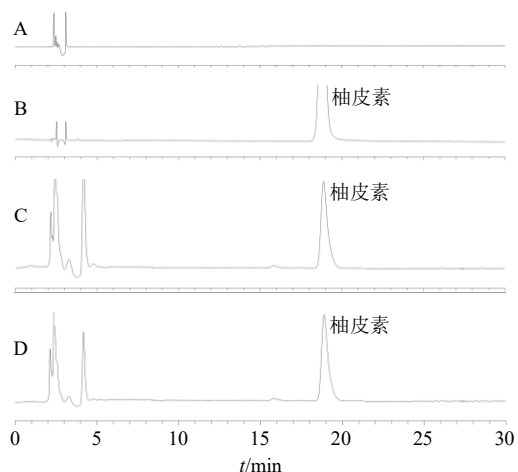


图 1 空白对照溶液 (A)、柚皮素对照品溶液 (B)、Nar-PC 供试品溶液 (C) 和 Nar-PC-DPs 供试品溶液 (D) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of negative solution (A), naringenin reference substance solution (B), Nar-PC sample solution (C) and Nar-PC-DPs sample solution (D)

2.2.7 稳定性考察 取“2.2.2”项下 Nar-PC-DPs 供试品溶液, 分别于 0、1、3、6、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得柚皮素峰面积的 RSD 为 0.60%, 结果表明 Nar-PC-DPs 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 精密度考察 取低、中、高质量浓度 (0.065、2.600、10.400 $\mu\text{g/mL}$) 对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别测定 6 次, 计算得柚皮素峰面积的 RSD 分别为 0.42%、0.18%、0.28%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.9 重复性考察 取同一批 Nar-PC-DPs, 按“2.2.2”项下方法操作, 平行制备 6 份 Nar-PC-DPs 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 计算得柚皮素质量分数的 RSD 为 1.37%, 表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率考察 精密称取 9 份 Nar-PC-DPs 粉末, 各约 20 mg, 分别置于三角烧瓶中, 分为高、中、低 3 组, 分别按柚皮素标示量的 50%、100%、150%加入柚皮素对照品, 按“2.2.2”项下方法制备 Nar-PC-DPs 供试品溶液并测定柚皮素含量, 计算得柚皮素的平均加样回收率为 99.85%, RSD 为 1.17%, 结果表明该法准确度较高。

2.3 Nar-PC-DPs 评价指标^[15]

取 20 粒 Nar-PC-DPs, 精密称定, 计算 Nar-PC-DPs 的平均丸质量 ($W_{\text{平均}}$), 分别称取各个 Nar-PC-DPs (W_i), 计算 Nar-PC-DPs 丸质量差异, 丸质量重差异越小越好。

选出外观光滑圆整的 Nar-PC-DPs, 计数, 并与 Nar-PC-DPs 的总数量相比计算 Nar-PC-DPs 成型率。

$$\text{丸质量差异} = (W_i - W_{\text{平均}}) / W_{\text{平均}}$$

$$\text{成型率} = \text{外观光滑圆整数量} / \text{总数量}$$

2.4 Nar-PC-DPs 处方工艺单因素考察

2.4.1 PEG 4000 占基质百分比考察 采用 PEG 4000 与 PEG 6000 混合物作为 Nar-PC-DPs 基质, 固定基质与 Nar-PC 质量比为 6:1, 滴速为 40 滴/min, 冷凝液温度为 8 $^{\circ}\text{C}$, 滴距为 8 cm 不变, 分别考察 PEG 4000 百分比对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异的影响, 结果见表 1。单独 PEG 4000 作为基质时形成的熔融液黏度过小, 单独采用 PEG 6000 作为基质时形成的熔融液黏度过大, 熔融液黏度过小或过大均会影响滴速、熔融液滴大小等^[24], 进而影响 Nar-PC-DPs 成型率及丸质量差异, 故采用 PEG 4000 和 PEG 6000 混合物作为 Nar-PC-DPs 基质。随着

表 1 PEG 4000 占基质百分比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Investigation on percentage of PEG 4000 in matrix ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PEG 4000 占基质比/%	成型率/%	丸质量差异/%
30	74.23 $\pm$ 2.26	19.42 $\pm$ 1.36
40	79.89 $\pm$ 1.89	11.46 $\pm$ 0.89
50	88.97 $\pm$ 1.96	9.92 $\pm$ 0.75
60	83.10 $\pm$ 2.04	14.89 $\pm$ 1.28
70	77.16 $\pm$ 1.87	20.03 $\pm$ 1.67

PEG 4000 在基质中比例逐渐增加, Nar-PC-DPs 成型率呈先增加后下降趋势, 而丸质量差异呈先下降后增加情况。为获得较高的成型率、较低丸质量差异的 Nar-PC-DPs 处方工艺, 需对 PEG 4000 占基质比 40%~60%进行优化。

2.4.2 基质与 Nar-PC 质量比的考察 固定 PEG 4000 占基质比 50%, 滴速为 40 滴/min, 冷凝液温度为 8 ℃, 滴距为 8 cm 不变, 分别考察基质与 Nar-PC 质量比对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异的影响, 结果见表 2。Nar-PC-DPs 成型率随着基质用量的增加呈先增加后下降趋势, 而丸质量差异呈先下降后增大趋势, 可能由于基质与 Nar-PC 不同质量比会导致形成的熔融液黏度存在差异^[25], 进而对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异产生影响。为获得较高的成型率、较低丸质量差异的 Nar-PC-DPs 处方工艺, 需对基质与 Nar-PC 质量比 4:1~6:1 进行优化。

2.4.3 冷凝温度的考察 固定 PEG 4000 占基质比 50%, 基质与 Nar-PC 质量比 5:1, 滴速为 40 滴/min, 冷凝液温度为 8 ℃, 滴距为 8 cm 不变, 分别考察冷凝温度对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异的影响, 结果见表 3。冷凝温度较低时 Nar-PC-DPs 熔融液尚未完全收缩成规则球形即被冷却凝固, 易出现拖尾现象, 导致 Nar-PC-DPs 成型率较低。冷凝温度较高时导致 Nar-PC-DPs 熔融液冷却凝固较慢, 在

表 2 基质与 Nar-PC 质量比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Investigation on mass ratio of matrix to Nar-PC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

基质与 Nar-PC 质量比	成型率/%	丸质量差异/%
3:1	71.80 $\pm$ 2.17	18.88 $\pm$ 1.32
4:1	80.06 $\pm$ 2.09	15.92 $\pm$ 0.95
5:1	90.12 $\pm$ 2.23	10.07 $\pm$ 0.81
6:1	86.54 $\pm$ 1.83	13.43 $\pm$ 1.02
7:1	83.69 $\pm$ 1.40	12.71 $\pm$ 1.11

表 3 冷凝温度的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Investigation on condensate temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冷凝温度/℃	成型率/%	丸质量差异/%
6	75.27 $\pm$ 1.92	8.89 $\pm$ 1.17
7	80.54 $\pm$ 2.00	7.92 $\pm$ 0.64
8	92.63 $\pm$ 2.31	8.47 $\pm$ 0.71
9	91.84 $\pm$ 1.86	10.04 $\pm$ 0.78
10	86.31 $\pm$ 1.75	9.12 $\pm$ 0.94

冷凝液下沉过程中易发生形变, 从而导致成型率下降。但冷凝温度对丸质量差异影响不大(均小于 12%)。冷凝温度为 8 ℃时 Nar-PC-DPs 成型率最高, 故确定冷凝温度为 8 ℃。

2.4.4 滴速的考察 固定 PEG 4000 占基质比 50%, 基质与 Nar-PC 质量比 5:1, 冷凝液温度为 8 ℃, 滴距为 8 cm 不变, 分别考察滴速对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异的影响, 结果见表 4。滴速过慢时熔融态液滴较大, 在重力作用下 Nar-PC-DPs 容易变形^[26], 且丸质量差异较大。滴速达 50 滴/min 时 Nar-PC-DPs 容易发生黏连, 导致成型率下降, 丸质量差异上升。当滴速为 40、45 滴/min 时, Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异无显著性差异($P < 0.05$), 由于 45 滴/min 制备效率相对较高, 故确定滴速为 45 滴/min。

2.4.5 滴距的考察 固定 PEG 4000 占基质比 50%, 基质与 Nar-PC 质量比 5:1, 滴速为 45 滴/min, 冷凝液温度为 8 ℃不变, 分别考察滴距对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异的影响, 结果见表 5。当滴距过小时 Nar-PC-DPs 熔融态液滴未完全收缩成型即进入冷凝液, 导致滴丸成型率较低, 丸质量差异较大。滴距过大时熔融态液滴在重力作用下撞击冷凝液面容易发生形变甚至跌散, 导致 Nar-PC-DPs 成型率下降, 丸质量差异变大。因此, 滴距对 Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异影响较大, 为获得较高的成型率、较低丸质量差异的 Nar-PC-DPs 处方工艺,

表 4 滴速的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Investigation on dropping speed ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

滴速/(滴·min ⁻¹)	成型率/%	丸质量差异/%
30	77.33 $\pm$ 2.19	21.03 $\pm$ 1.36
35	88.14 $\pm$ 2.12	13.84 $\pm$ 1.15
40	95.04 $\pm$ 2.33	9.27 $\pm$ 0.79
45	94.12 $\pm$ 1.86	9.54 $\pm$ 0.85
50	90.27 $\pm$ 1.19	14.16 $\pm$ 0.90

表 5 滴距的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Investigation on dropping distance ($\bar{x} \pm s, n=3$)

滴距/cm	成型率/%	丸质量差异/%
4	78.03±1.78	15.03±1.22
6	83.89±2.06	13.86±1.17
8	92.11±1.98	10.90±0.84
10	94.31±1.77	9.91±0.78
12	87.86±1.40	12.26±1.14
14	82.24±1.54	13.35±1.63

表 6 Box-Behnken 试验设计与结果 ($n=3$)

Table 6 Experiment design and results of Box-Behnken design ($n=3$)

试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/cm	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/cm	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/cm	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	60 (+1)	6 : 1 (+1)	9 (0)	80.42	15.83	7	50	5 : 1	9	94.92	9.26	13	50	5 : 1	9	92.37	9.16
2	40 (-1)	4 : 1 (-1)	9	78.91	14.12	8	40	5 : 1	12 (+1)	84.64	19.73	14	50	5 : 1	9	95.49	8.73
3	60	4 : 1	9	75.94	16.97	9	50	5 : 1	9	92.49	9.82	15	40	5 : 1	6	86.24	12.44
4	40	6 : 1	9	81.63	17.22	10	50	6 : 1	12	81.91	15.14	16	50	4 : 1	6	87.98	14.88
5	60	5 : 1 (0)	6 (-1)	84.35	18.33	11	60	5 : 1	12	79.63	16.26	17	50	5 : 1	9	92.74	8.43
6	50 (0)	6 : 1	6	86.77	13.61	12	50	4 : 1	12	81.13	14.62						

不同处方工艺下的 Nar-PC-DPs, 每份样品均平行制备 3 份, 并测定成型率和丸质量差异, 结果见表 6。

2.5.2 数学模型的建立及方差分析 采用 Design Expert 12.0.3.0 软件拟合得出 Y_1 二次多元回归方程为 $Y_1 = 93.60 - 1.38 X_1 + 0.97 X_2 - 2.13 X_3 + 0.44 X_1 X_2 - 0.78 X_1 X_3 + 0.75 X_2 X_3 - 7.68 X_1^2 - 6.70 X_2^2 - 2.21 X_3^2$, $R^2 = 0.9697$, $R_{adj}^2 = 0.9307$; Y_2 二次多元

需对滴距 6~12 cm 进行优化。

2.5 BBD-RSM 优化 Nar-PC-DPs 制备工艺

2.5.1 BBD-RSM 试验设计 参考“2.4”项下 Nar-PC-DPs 单因素考察结果, 发现 PEG 4000 占基质百分比 (X_1)、基质与 Nar-PC 质量比 (X_2) 及滴距 (X_3) 对 Nar-PC-DPs 影响较大, 故作为主要影响因素, 即自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 各自变量水平见表 6。以成型率和丸质量差异作为响应值, 即因变量 Y_1 和 Y_2 , 采用 BBD-RSM 对 Nar-PC-DPs 处方工艺进行优化。制备

回归方程为 $Y_2 = 9.08 + 0.49 X_1 + 0.15 X_2 + 0.81 X_3 - 1.06 X_1 X_2 - 2.34 X_1 X_3 + 0.45 X_2 X_3 + 4.54 X_1^2 + 2.41 X_2^2 + 3.07 X_3^2$, $R^2 = 0.9800$, $R_{adj}^2 = 0.9543$ 。方差分析结果见表 7, Y_1 的 X_1 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_1^2 具显著性或极显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 建立的 Y_1 模型具极显著差异 ($P < 0.01$), 而失拟项不显著 ($P > 0.05$)。 Y_2 的 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_1^2 具显著

表 7 Y_1 和 Y_2 方差分析结果

Table 7 Variance analysis for Y_1 and Y_2

误差来源	自由度	Y_1				Y_2			
		平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	564.12	62.68	24.89	0.000 2	201.63	22.40	38.11	<0.000 1
X_1	1	15.35	15.35	6.09	0.042 9	1.88	1.88	3.20	0.116 7
X_2	1	7.55	7.55	3.00	0.127 0	0.18	0.18	0.31	0.594 3
X_3	1	36.25	36.25	14.40	0.006 8	5.27	5.27	8.96	0.020 1
$X_1 X_2$	1	0.77	0.77	0.31	0.596 5	4.49	4.49	7.65	0.027 9
$X_1 X_3$	1	2.43	2.43	0.97	0.358 3	21.90	21.90	37.26	0.000 5
$X_2 X_3$	1	2.24	2.24	0.89	0.377 5	0.80	0.80	1.36	0.281 3
X_1^2	1	248.33	248.33	98.61	<0.000 1	86.83	86.83	147.71	<0.000 1
X_2^2	1	188.86	188.86	75.00	<0.000 1	24.53	24.53	41.73	0.000 3
X_3^2	1	20.51	20.51	8.15	0.024 5	39.65	39.65	67.45	<0.000 1
残差	7	17.63	2.52			4.11	0.59		
失拟项	3	8.83	2.94	1.34	0.384 5	2.98	0.99	3.52	0.128 0
总偏差	4	8.80	2.20			1.13	0.28		
总离差	16	581.74				205.75			

性或极显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)，建立的 Y_2 模型具极显著差异 ($P < 0.01$)，而失拟项不显著 ($P > 0.05$)。因此建立的数学模型未知因素干扰很小，可信度较高，可用于 Nar-PC-DPs 处方工艺进行优化。

2.5.3 RSM 分析结果与预测 固定 PEG 4000 占基质比 (X_1)、基质与 Nar-PC 质量比 (X_2) 及滴距 (X_3)

因素之一，分别绘制另外 2 因素对响应值（成型率或丸质量差异）的三维曲面图，结果见图 2。各个因素对响应值影响情况较为复杂，采用 BBD-RSM 优化 Nar-PC-DPs 制备工艺是必要的。设置成型率为最大值，丸质量差异为最小值，得到的 Nar-PC-DPs 的最佳处方为 PEG 4000 占基质比为 49.03%，

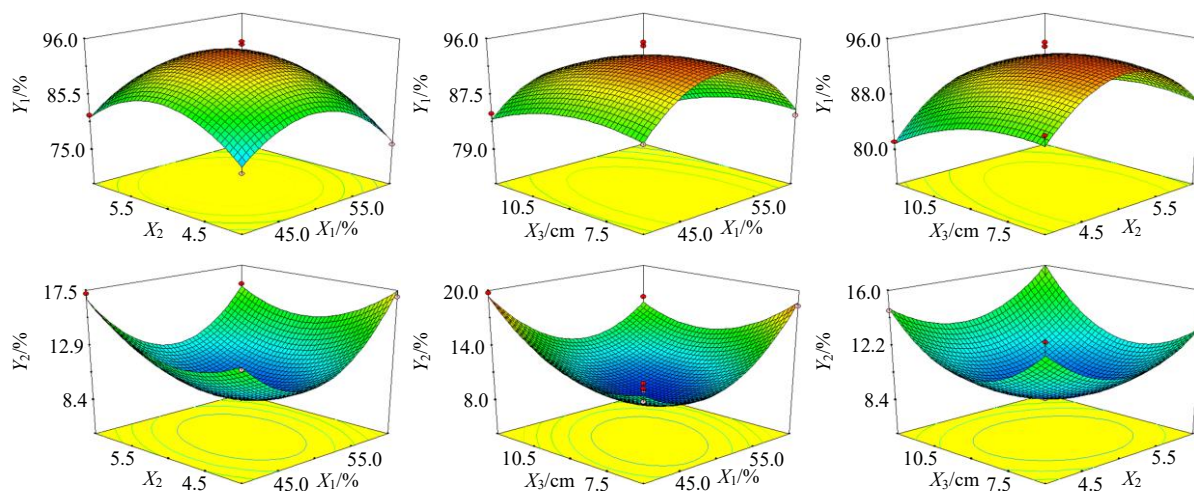


图 2 自变量与响应值的三维图

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

基质与 Nar-PC 质量比为 5.22 : 1，滴距为 8.23 cm，预测 Nar-PC-DPs 最佳处方的成型率和最大丸质量差异分别为 94.06% 和 9.02%。

2.6 Nar-PC-DPs 处方验证

考虑到操作便捷性，将 BBD-RSM 得到的 Nar-PC-DPs 最佳处方略作调整（调整幅度小于 $\pm 1\%$ ），即 PEG 4000 占基质比调整为 49%，基质与 Nar-PC 质量比调整为 5.2 : 1，滴距调整为 8.2 cm。平行制备 3 份 Nar-PC-DPs，外观光滑，圆整，色泽均一，结果图 3。分别测定成型率和丸质量差异，并计算偏差 [偏差 = (实际值 - 模型预测值) / 模型预测值]。结果见表 8，Nar-PC-DPs 成型率和丸质量差异均小于 $\pm 5\%$ 。另测得平均丸质量为 (39.82 ± 0.32) mg，平均直径为 (4.08 ± 0.07) mm。



图 3 Nar-PC-DPs 外观

Fig. 3 Appearance of Nar-PC-DPs

表 8 实际值与预测值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Comparison of predicted values and measured values ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

评价指标	成型率/%	最大丸质量差异/%
实际值	94.31 ± 1.04	9.34 ± 0.18
模型预测值	94.06	9.02
偏差/%	0.26	3.55

2.7 Nar-PC 和 Nar-PC-DPs 表征

2.7.1 溶解度及油水分配系数的测定 取过量的柚皮素原料药、Nar-PC、物理混合物（柚皮素和各种辅料质量比同 Nar-PC-DPs）和 Nar-PC-DPs 加至 10 mL 蒸馏水中，置于 25 °C 水浴中，800 r/min 转速下磁力搅拌 2 d。取上层混悬液 12 500 r/min 高速离心（离心半径为 6.8 cm）20 min，取上清液测定溶解度。同法测定在 pH 2.0 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液（PBS）中溶解度，结果见表 9，Nar-PC 和 Nar-PC-DPs 均提高了柚皮素在不同介质中的溶解度，Nar-PC-DPs 提高幅度远大于 Nar-PC。

取蒸馏水 200 mL 加入 200 mL 正辛醇，置于 (37.0 ± 0.5) °C 的恒温振荡器中振摇 2 d，即得水相饱和正辛醇及正辛醇饱和的水相。取水相饱和正辛醇 10 mL，加入过量的柚皮素原料药，相同条件下振摇 2 d，12 500 r/min 高速离心 20 min（半径为 6.8

cm), 测定上清液中柚皮素质量浓度 (C_o)。

精密吸取 5 mL 上清液, 加入正辛醇饱和水相 10 mL, 相同条件下振摇 2 d, 取水层测定质量浓度 (C_w), 计算油水分配系数 [P , $P=(C_o-C_w)/C_w$], 并计算 $\lg P$ 。同法测定 Nar-PC 和物理混合物的 $\lg P$ 值。结果见表 9, 将柚皮素制备成 Nar-PC 后在不同

表 9 溶解度及油水分配系数测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

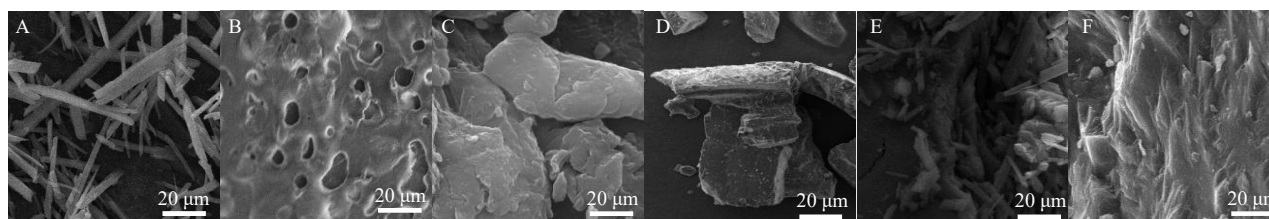
Table 9 Results of solubility and oil-water partition coefficient ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	介质	溶解度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\lg P$ 值
柚皮素原料药	pH 2.0 PBS	35.12 ± 0.79	1.07 ± 0.06
	水	76.16 ± 0.25	1.15 ± 0.08
	pH 6.8 PBS	194.32 ± 3.04	1.26 ± 0.11
物理混合物	pH 2.0 PBS	37.69 ± 1.02	1.10 ± 0.09
	水	80.55 ± 0.19	1.27 ± 0.10
	pH 6.8 PBS	214.38 ± 3.11	1.34 ± 0.13
Nar-PC	pH 2.0 PBS	120.71 ± 2.12	2.31 ± 0.22
	水	152.72 ± 1.01	2.24 ± 0.19
	pH 6.8 PBS	253.80 ± 2.89	2.67 ± 0.27
Nar-PC-DPs	pH 2.0 PBS	493.34 ± 3.78	1.73 ± 0.13
	水	582.40 ± 2.76	1.56 ± 0.14
	pH 6.8 PBS	729.85 ± 5.10	1.82 ± 0.11

介质中 $\lg P$ 值得到明显增加, 说明柚皮素脂溶性得到明显改善, 将 Nar-PC 进一步制备成 Nar-PC-DPs 后在不同介质中的 $\lg P$ 值反而下降, 可能是由于 Nar-PC-DPs 大幅增加了柚皮素水溶性所致^[15]。

2.7.2 扫描电子显微镜 (SEM) 分析 取柚皮素原料药、柚皮素与磷脂酰胆碱物理混合物 (比例同 Nar-PC)、Nar-PC、空白基质 (PEG 4000 和 PEG 6000 简单混合, PEG 4000 百分比为 49%)、柚皮素与各种辅料物理混合物 (比例同 Nar-PC-DPs) 和 Nar-PC-DPs 分别研细, 用双面胶带固定至 T 型台上, 喷金 60 s (真空度为 3.2 Pa), 置于 SEM 上观察, 结果见图 4。柚皮素原料药呈针状晶体 (图 4-A), 柚皮素与磷脂酰胆碱物理混合物 SEM 图中可观察到原料药包埋于磷脂酰胆碱中, 两者仅是简单混合 (图 4-B), Nar-PC 未见原料药的针状晶体 (图 4-C), 说明柚皮素在 Nar-PC 中存在状态发生了改变。空白基质呈片状晶体 (图 4-D), 物理混合物的 SEM 图谱中可观察到柚皮素原料药与各种辅料仅是简单混合, 原料药针状晶体仍清晰可见 (图 4-E), Nar-PC-DPs 未观察到原料药针状晶体 (图 4-F), 证明柚皮素在 Nar-PC-DPs 中仍以无定型状态存在。

2.7.3 晶型分析 晶型扫描条件: Cu-K α , 靶扫描速度 6°/min, 范围 (2θ) 为 3°~45°。取柚皮素原料药、



A-柚皮素原料药 B-柚皮素与磷脂酰胆碱物理混合物 C-Nar-PC D-空白基质 E-柚皮素与辅料物理混合物 F-Nar-PC-DPs
A-naringenin raw material B-physical mixture of naringenin and phosphatidylcholine C-Nar-PC D-blank matrix E-physical mixture of naringenin and excipients F-Nar-PC-DPs

图 4 SEM 结果

Fig. 4 Results of SEM

Nar-PC、空白基质 (PEG 4000 和 PEG 6000 简单混合, PEG 4000 百分比为 49%)、物理混合物 (柚皮素与各种辅料比例同 Nar-PC-DPs) 和 Nar-PC-DPs 样品分别进行 XRPD 扫描, 结果见图 5。柚皮素在 5.1°、7.8°、11.7°、12.3°、13.4°、20.4°等处出现特征晶型峰, 物理混合物的 XRPD 图谱中柚皮素晶型峰仍可见, 证明简单混合物未使柚皮素晶型状态改变。将柚皮素制备成 Nar-PC 后柚皮素特征晶型峰均消失, 表明柚皮素以无定型存在于 Nar-PC 中。Nar-PC 进一步制备成 Nar-PC-DPs 后仍未出现柚皮素特征

晶型峰, 表明柚皮素在 Nar-PC-DPs 中仍以无定型状态存在。XRPD 研究结果与 SEM 结果相互佐证。

2.7.4 Nar-PC-DPs 溶散时限检查 取 6 粒 Nar-PC-DPs 置于崩解时限仪的网篮中 (孔径为 2.0 mm), 崩解介质为 1000 mL 蒸馏水, 待温度恒定至 37 °C 后进行测定。结果显示, 3 批 Nar-PC-DPs 溶散时限为 (6.64 ± 0.21) min。

2.8 Nar-PC-DPs 体外溶出度研究

取柚皮素原料药、物理混合物 (柚皮素与各种辅料比例同 Nar-PC-DPs)、Nar-PC 和 Nar-PC-DPs 样

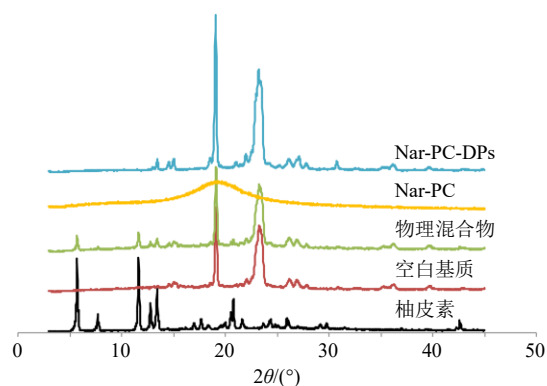
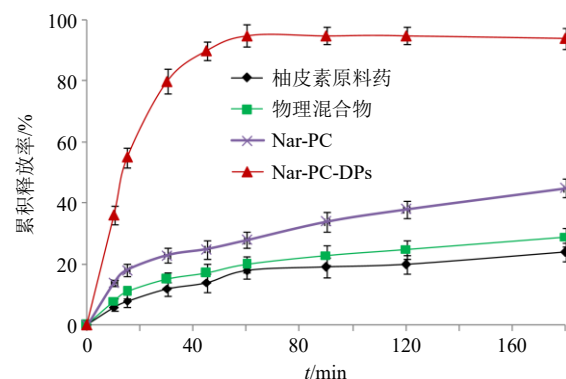


图 5 XRPD 结果

Fig. 5 Results of XRPD

品适量,使柚皮素含量均为 10 mg。分别置于溶出仪中,介质为 1000 mL 蒸馏水,介质温度和搅拌浆转速分别为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和 100 r/min,分别于 10、15、30、45、60、90、120、180 min 取样 5 mL,立即补加 5 mL 蒸馏水。

样品经 12 000 r/min 离心(离心半径为 6.8 cm) 20 min,取上清液进行测定,结果见图 6。柚皮素原料药和物理混合物在 180 min 内累积溶出率分别为 24.33% 和 29.03%,而 Nar-PC 在 180 min 内累积溶出率提高至 44.87%。Nar-PC-DPs 在 60 min 时累积

图 6 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 6 Release profile *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

溶出率达 95.10%,溶出速率和累积溶出率均得到明显提高。

2.9 稳定性考察

取 Nar-PC-DPs 密封于药瓶中,置于恒温恒湿箱[温度 $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度 $(65 \pm 5)\%$],分别于 0、1、2、3、6 个月取样观察外观,并测定丸质量差异、溶散时限、水分、含量和累积溶出率。结果见表 10, Nar-PC-DPs 放置 6 个月后外观仍光滑,圆整,色泽均一,最大质量差异仍小于 10%,溶散时限仍小于 8 min,说明 Nar-PC-DPs 储存稳定性良好。

表 10 稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 10 Stability study ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/月	外观	最大质量差异/%	溶散时限/min	水分/%	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	累积溶出率/%
0	光滑,圆整,色泽均一	9.34 ± 0.18	6.64 ± 0.21	4.36 ± 0.30	40.51 ± 0.08	95.10 ± 1.34
1	光滑,圆整,色泽均一	9.64 ± 1.41	7.12 ± 0.32	4.57 ± 0.23	40.46 ± 0.12	95.27 ± 0.95
2	光滑,圆整,色泽均一	8.92 ± 0.98	7.33 ± 0.23	4.68 ± 0.26	40.49 ± 0.09	94.89 ± 1.07
3	光滑,圆整,色泽均一	9.79 ± 1.07	6.91 ± 0.21	4.79 ± 0.29	40.53 ± 0.11	95.02 ± 1.13
6	光滑,圆整,色泽均一	9.94 ± 1.39	7.83 ± 0.40	5.08 ± 0.32	40.46 ± 0.12	94.43 ± 0.87

2.10 口服药动学比较

2.10.1 试验方案及采血 实验前对 Beagle 犬进行编号,依次为 1~6 号,双号为雌性,单号为雄性。分 3 个周期完成实验,实验第 1 周期对 1~2 号 ig 给予柚皮素原料药,3~4 号 ig 给予 Nar-PC,5~6 号 ig 给予 Nar-PC-DPs。第 2 周期和第 3 周期交换给药剂型,每次实验完成后洗脱期均为 1 周,ig 剂量均为 15 mg/kg (以柚皮素计)。各组实验动物于 0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、12、18、24 h 使用采血针于前肢静脉采血 0.5 mL,置于肝素浸润的离心管中,涡旋混匀,立即 4000 r/min 离心(离心半径为 6.8 cm) 5 min,取上层血浆至另一离心管中密封,冷冻保存。

2.10.2 血浆对照品标准曲线制备 采用乙腈配制赖诺普利质量浓度为 1500 ng/mL,作为内标溶液。取质量浓度为 2000 ng/mL 柚皮素对照品溶液,用乙腈稀释配制成 1000、500、250、100、50 ng/mL,分别精密取 100 μL ,于 45°C 水浴中氮气吹干,并加入 100 μL 空白血浆和 50 μL 内标溶液,涡旋 30 s 混匀,后续按照“2.10.1”项下方法处理。柚皮素质量浓度为横坐标(X),柚皮素与赖诺普利峰面积比为纵坐标(Y),进行线性回归得回归方程为 $Y = 0.0027X + 0.0844$, $r = 0.9968$,线性范围为 50~2000 ng/mL。

2.10.3 血浆样品的处理^[27] 精密取 100 μL 血浆样品,加入内标溶液(赖诺普利质量浓度为 1500 ng/mL) 50 μL 和乙腈 1 mL,涡旋 30 s,立即 12 000

r/min 离心 (离心半径为 6.8 cm) 10 min, 取上层有机相至另一离心管中, 于 45 °C 氮气缓慢吹干, 加入 100 μ L 乙腈复溶, 即得, 密封待测。

2.10.4 专属性考察 取空白血浆、血浆对照品溶液 (含柚皮素和内标, 柚皮素质量浓度为 50 ng/mL) 和血浆样品 (含内标, Nar-PC 组给药 18 h), 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 结果见图 7, 赖诺普利及柚皮素色谱峰未受杂质干扰, 专属性较高。

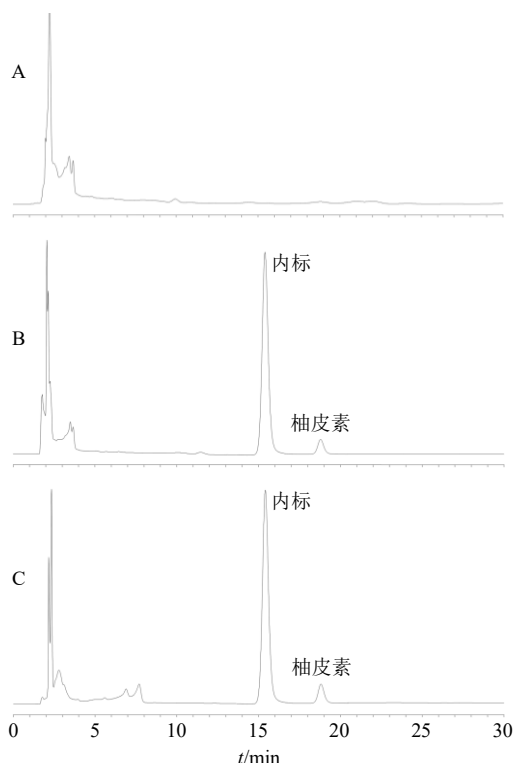


图 7 空白血浆 (A)、血浆+对照品溶液 (B)、血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of blank plasma (A), plasma + reference solution (B) and plasma sample (C)

2.10.5 精密度考察 取低、中、高质量浓度 (50、500、2000 ng/mL) 柚皮素血浆对照品溶液, 同 1 d 内连续测试 6 次, 计算得柚皮素与赖诺普利峰面积比 RSD 分别为 3.54%、2.96%、4.02%, 表明日内精密度良好; 低、中、高质量浓度连续测定 6 d, 每天测试 1 次, 计算得柚皮素与赖诺普利峰面积比的 RSD 分别为 5.17%、4.08%、4.15%, 表明日间精密度良好。

2.10.6 稳定性考察 取 Nar-PC 给药 2 h 血浆样品置于室温环境 (温度 25 °C, 湿度 55%), 于 0、2、4、8、12、24 h 测定, 计算得柚皮素与赖诺普利峰面积比 RSD 值为 6.90%, 表明血浆样品至少在 24 h 内稳定性良好。

2.10.7 准确度考察 空白血浆配制柚皮素质量浓度为 50 ng/mL (低)、500 ng/mL (中)、2000 ng/mL (高) 血浆样品, 每个平行 3 组, 按“2.10.2”处理后测定柚皮素与赖诺普利峰面积, 计算柚皮素测得质量浓度, 并与柚皮素的实际配制质量浓度对比计算回收率。结果显示, 平均加样回收率 97.24%, RSD 为 9.02%, 试验表明准确度较高。

2.10.8 定量限与检测限考察 取质量浓度为 50 ng/mL 血浆对照品溶液, 逐步稀释并进样检测, 分别以信噪比为 10:1 和 3:1 作为定量限和检测限, 结果显示定量限和检测限分别为 10、5 ng/mL。

2.10.9 药动力学结果 柚皮素原料药、Nar-PC 和 Nar-PC-DPs 的药-时曲线见图 8。采用 3P97 程序统计矩模型计算主要药动力学参数, 结果见表 11。达峰时间 ($t_{\max}$) 及半衰期 ($t_{1/2}$) 采用非参数法秩和检验, 峰浓度 ($C_{\max}$) 和药-时曲线下面积 (AUC) 经对数转换后进行独立样本 t 检验。与柚皮素原料药组相比, Nar-PC 的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 参数均有显著性差异 ($P<0.05$), $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 1.42 倍和 1.96 倍, 说明 Nar-PC 具有一定的促吸收作用。Nar-PC-DPs 的 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 等参数与柚皮素原料药相比有极显著性差异 ($P<0.01$), $t_{\max}$ 提前至 (1.95 ± 0.44) h, $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用分别提高至 3.25 倍和 3.79 倍。Nar-PC-DPs 与 Nar-PC 相比, Nar-PC-DPs 的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 等参数有极显著性差异 ($P<0.01$), 表明 Nar-PC-DPs 促吸收作用大于 Nar-PC。

3 讨论

药物与磷脂一般按物质的量比 1:1 形成磷脂复合物^[28-29], 何小燕等^[7]报道柚皮素磷脂复合物处方中柚皮素物质的量用量远大于磷脂, 会严重影响

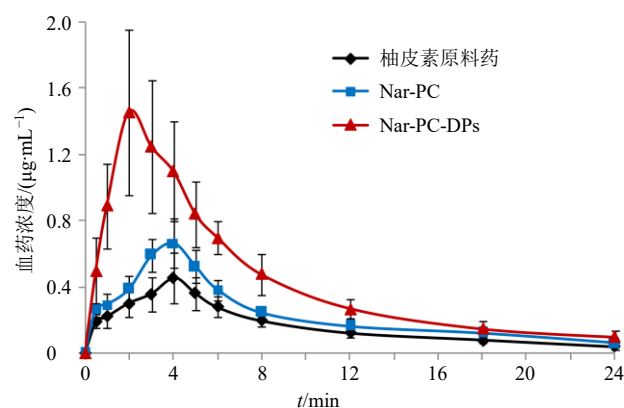


图 8 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Drug-time curve ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 11 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 11 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	柚皮素原料药	Nar-PC	Nar-PC-DPs
$t_{\max}$	h	4.06 ± 0.65	4.14 ± 0.76	$1.95 \pm 0.44^{***}$
$t_{1/2}$	h	6.79 ± 1.22	6.97 ± 1.40	6.85 ± 0.71
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	458.24 ± 76.97	$652.71 \pm 126.05^*$	$1\,486.99 \pm 453.81^{***}$
$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2\,014.65 \pm 504.76$	$3\,954.23 \pm 808.07^*$	$7\,644.30 \pm 1\,390.75^{***}$
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2\,107.06 \pm 532.44$	$4\,081.52 \pm 894.69^*$	$7\,807.14 \pm 1\,483.29^{***}$

与柚皮素组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Nar-PC 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs naringenin group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs Nar-PC

复合率, 因此该处方可能存在一定问题。磷脂复合物可改善难溶性药物水溶性及脂溶性, 利于体内吸收, 但磷脂复合物本身黏性较大, 疏水性强, 导致溶出速率及溶出度受到较大限制。为改善磷脂复合物自身缺陷, 有研究者引入固体分散体、纳米混悬剂等来加以改善^[30-31]。固体分散体易发生吸潮、析晶等现象^[32], 稳定性不高, 后续还需压片等制剂工艺才可供临床使用。

磷脂复合物在水相稳定性不高, 故将磷脂复合物制备成纳米制剂过程中可能会使磷脂复合物发生解离现象^[21], 固化成粉末时需添加冻干保护剂, 因而增加了制剂中辅料种类及用量, 且不符合目前国内中药企业实际生产水平。本研究将 Nar-PC 制备成滴丸, 在制剂过程中未与水相接触, 可避免 Nar-PC 发生解离, 且滴丸制备工艺简单, 适合中药企业大规模生产, 期望为临床提供一种质量易控、安全有效、价格低廉的柚皮素口服制剂。

水溶性滴丸一般采用液体石蜡和二甲基硅油作为冷凝液, 采用二甲基硅油时 Nar-PC-DPs 成型率远大于液体石蜡, 可能是由于二甲基硅油黏度较大^[19], 沉降速度适中, 表面张力小, 利于 Nar-PC-DPs 收缩成型, 故选为冷凝液。Nar-PC-DPs 的 XRPD 图谱中未观察到柚皮素特征晶型峰, SEM 图谱中也未观察到柚皮素的针状晶体, 说明将 Nar-PC 制备成 Nar-PC-DPs 并未使 Nar-PC 解离析出原型药物, 未改变 Nar-PC 的无定型状态, 该存在形式利于增加柚皮素溶解度及溶出度。

体外溶出试验表明, Nar-PC 在 180 min 内累积溶出率为 44.87%, 制备成 Nar-PC-DPs 后 60 min 时累积溶出率达 95.10%, 溶出速率和累积溶出率明显高于 Nar-PC。可能是由于 Nar-PC-DPs 中 PEG 类基质增加了 Nar-PC 可润湿性、亲水性及分散性, 从而促进了药物溶出, 为进一步提高 Nar-PC 的体内吸

收生物利用度奠定基础。

口服药动学结果显示, Nar-PC 生物利用度得到一定程度的提高, 可能与 Nar-PC 增加了柚皮素水溶性、油水分配系数及溶出度有关^[7,15], 但由于 Nar-PC 黏性较大、溶出度低、油水分配系数过大等因素, 限制了 Nar-PC 生物利用度提高幅度^[15]。将 Nar-PC 制备成 Nar-PC-DPs 后, $t_{\max}$ 显著性提前 ($P < 0.05$), 可能是由于 Nar-PC-DPs 加快了药物溶出速率所致。Nar-PC-DPs 的 $C_{\max}$ 显著性增加, 可能与 Nar-PC-DPs 大幅提高柚皮素的累积溶出度有关, 从而使进入血液循环的药量增加。Nar-PC-DPs 极大地促进了柚皮素吸收, 这可能由多种因素共同影响的结果: Nar-PC-DPs 改善了柚皮素的溶解度、溶出速率及溶出度, 解决了吸收瓶颈^[23]; Nar-PC-DPs 融合了磷脂复合物和滴丸的双重促吸收优势^[23], 增加了柚皮素体内吸收量; 柚皮素在 Nar-PC-DPs 以无定型状态存在, 无定型药物往往更易吸收^[16]; Nar-PC-DPs 调节了柚皮素油水分配系数, 利于口服吸收^[15]。综上, 本研究通过单因素试验结合 BBD-RSM 优化了 Nar-PC-DPs 制备工艺, 工艺简单, 重复性及稳定性良好, 适合我国目前中药生产企业大规模生产, 且有效提高了柚皮素生物利用度, 为增强药效奠定了坚实基础。后续需对 Nar-PC-DPs 中试、放大生产等进行研究, 并评价其药效, 为 Nar-PC-DPs 提供更为全面的研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈习霞, 郭晓倩, 袁琳, 等. 柚皮素的提取、结构衍生和药理作用研究进展 [J]. 山东化工, 2023, 52(1): 85-87.
- [2] 唐镜, 谭若兰, 吕中建, 等. 柚皮素的提取及其抗癌作用研究进展 [J]. 绿色科技, 2019(8): 240-244.
- [3] 徐楠, 冯健, 邹坪益. 柚皮素治疗高血脂症的系统评价 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(10): 1030-1035.

- [4] 赖银璇, 王明蕊, 杨海丽, 等. 柚皮素通过 ROS/JNK/Bcl2 通路抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖和迁移 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 40-43.
- [5] 王锐, 王明月, 王向涛, 等. 柚皮素纳米制剂的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1923-1929.
- [6] Ortiz-Andrade R R, Sánchez-Salgado J C, Navarrete-Vázquez G, *et al.* Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10(11): 1097-1104.
- [7] 何小燕, 彭颖, 何婉莹, 等. 柚皮素磷脂复合物的制备及其理化性质的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 137-142.
- [8] Semalty A, Semalty M, Singh D, *et al.* Preparation and characterization of phospholipid complexes of naringenin for effective drug delivery [J]. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2010, 67(3): 253-260.
- [9] Hsiu S L, Huang T Y, Hou Y C, *et al.* Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits [J]. *Life Sci*, 2002, 70(13): 1481-1489.
- [10] 裴岩岩, 闫春生, 牛美兰, 等. 柚皮素纳米混悬剂的制备及其体内药动学行为 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2034-2038.
- [11] 王小明, 张智强. 柚皮素-PLGA 纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 356-362.
- [12] 赵涵, 戎欣玉, 刘爽, 等. 柚皮素纳米晶体的制备及药剂学性质研究 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3026-3032.
- [13] 王元文. 柚皮素脂质体的制备及其特性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [14] 王锐, 王明月, 王向涛, 等. 柚皮素纳米制剂的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1923-1929.
- [15] 陈晓敏, 曹伶俐, 崔伟峰. 鼠李素磷脂复合物的处方工艺优化、表征及体外溶出度考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 399-403.
- [16] 李君霞, 曹亚蕊, 王金涛, 等. 延胡索乙素磷脂复合物及其固体分散体、油制剂、纳米混悬剂的制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4307-4316.
- [17] 王剑霞, 黄光亮, 陈禧翎, 等. HPLC 同时测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱含量 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(6): 564-566.
- [18] Thapakorn T, Chalermrat S, Prapasiri P, *et al.* L-ascorbic acid and phosphatidylcholine complex vesicles: Formation and elucidation of their biological activities, and their molecular interactions [J]. *J Microencapsul*, 2022, 44(9): 2757-2762.
- [19] 果秋婷, 张小飞. 汉防己甲素滴丸的制备工艺优化及溶出度考察 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1056-1060.
- [20] Wu K R, Chuo W H, Huang Y T. Optimization of formulation parameters in preparation of *Fructus Ligustri Lucidi* dropping pills by solid dispersion using 2^3 full experimental design [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(11): 1433.
- [21] 李东红, 徐翠珊, 韩德恩, 等. 复方麝香黄芪滴丸中 7 个活性成分在正常大鼠和脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4746-4754.
- [22] 迟航, 刘凯, 赵英强, 等. 基于真实世界的银杏酮酯滴丸用药安全性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2768-2775.
- [23] Mei L, Ji Q Y, Jin Z, *et al.* Nano-microencapsulation of tea seed oil via modified complex coacervation with propolis and phosphatidylcholine for improving antioxidant activity [J]. *LWT*, 2022, doi: 10.1016/J.LWT.2022.113550.
- [24] 王苗苗, 章一, 吴桐, 等. 瑞格列奈滴丸制备及体内外评价 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2021, 41(3): 278-284.
- [25] 刘骁虎, 杨静. 和厚朴酚滴丸的制备与体外溶出度研究 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36(1): 86-89.
- [26] 钟芮娜, 汪小涵, 万露, 等. 石菖蒲挥发油自纳米乳滴丸的制备及其对急性心肌缺血损伤的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1357-1362.
- [27] Wen J, Qiao Y, Yang J, *et al.* UPLC-MS/MS determination of paeoniflorin, naringin, naringenin and glycyrrhetic acid in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Si-Ni-San Decoction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 66: 271-277.
- [28] 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.
- [29] 胡悦, 孙敬蒙, 张炜煜. 羟甲香豆素磷脂复合物的制备工艺及形成机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(15): 1496-1501.
- [30] 宋文颖, 于雅琴. 芹菜素磷脂复合物纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(2): 357-363.
- [31] 仲曼, 胡慧慧, 缪明星, 等. 纳米药物制剂体内分析方法及药动学研究进展和问题策略分析 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1413-1425.
- [32] 黄子婷, 张圣英, 常金花, 等. 不同载体木犀草素固体分散体的制备及溶出度测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(5): 494-500.