

橙皮素与盐酸巴马汀共无定形的制备、表征及体外活性评价

梁玲, 李延广, 李闯, 陈力丰, 张燕杰, 娄本勇*

闽江学院材料与化学工程学院, 福州市药物制剂与检测行业技术创新中心, 福建 福州 350108

摘要:目的 制备橙皮素与盐酸巴马汀共无定形(hesperetin and palmatine hydrochloride co-amorphous system, Hes-PH CAS), 旨在开发橙皮素新固体形态、提高橙皮素溶解度和溶出度。方法 采用旋转蒸发法获得 Hes-PH CAS, 通过粉末 X 射线衍射仪、差示扫描量热仪、动态水蒸气吸附仪、固体核磁共振波谱仪等仪器分析技术对 Hes-PH CAS 的固态特性进行表征, 并利用高效液相色谱仪考察其溶解度及溶出行为, 并进一步通过自由基清除率、细胞增殖抑制率评估其抗氧化活性和抗肿瘤活性。结果 Hes-PH CAS 具有单一玻璃化转变温度(glass transition temperature, T_g , 104.5 °C)及分子间氢键作用。该共无定形同时改变了橙皮素和盐酸巴马汀 2 种药物的溶解度和溶出行为, 提高橙皮素的溶解度而降低盐酸巴马汀的溶解度, 促进橙皮素的释放而延缓盐酸巴马汀的释放。抗氧化及抗肿瘤实验结果表明, Hes-PH CAS 的自由基清除率和 HT-29/HCT 116 细胞增殖抑制率均高于原料药, 而且共无定形中 2 种药物对自由基清除率、细胞增殖抑制率具有一定的增效作用。结论 所制备的 Hes-PH CAS 提高了橙皮素溶解度和溶出度, 2 种药物组分展现出更好的抗氧化和抗肿瘤作用。

关键词: 橙皮素; 盐酸巴马汀; 共无定形; 溶解度; 溶出度; 体外活性; 抗氧化活性; 抗肿瘤活性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2536-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.010

Preparation, characterization and *in vitro* activity evaluation of hesperetin co-amorphous with palmatine hydrochloride

LIANG Ling, LI Yanguang, LI Chuang, CHEN Lifeng, ZHANG Yanjie, LOU Benyong

Technology Innovation Center of Fuzhou Pharmaceutical Preparations and Testing Industry, College of Materials and Chemical Engineering, Minjiang University, Fuzhou 350108, China

Abstract: Objective Hesperetin and palmatine hydrochloride co-amorphous system (Hes-PH CAS) was prepared to develop new solid forms and improve the solubility and dissolution of hesperetin. **Methods** Hes-PH CAS was obtained via the rotary evaporation method. The solid-state characteristics were characterized by powder X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, dynamic vapor sorption and solid-state nuclear magnetic resonance, respectively. The solubility and dissolution behavior were investigated by high-performance liquid chromatography. Furthermore, the antioxidant and antitumor activities were analyzed through radical scavenging assay and cell proliferation studies. **Results** Hes-PH CAS possessed a single glass transition temperature ($T_g = 104.5$ °C) and exhibited intermolecular interactions. The co-amorphous simultaneously influenced the solubility and dissolution of both drugs, increasing hesperetin solubility while decreasing palmatine hydrochloride solubility, and promoting hesperetin release while delaying palmatine hydrochloride release. The antioxidant and anti-tumor results demonstrated that the free radical scavenging rate and HT-29/HCT 116 cell inhibition rate of Hes-PH CAS were higher than those of the individual raw materials, indicating a synergistic effect between the two drugs in terms of both free radical scavenging and cell inhibition. **Conclusion** The prepared Hes-PH CAS improved the solubility and dissolution of hesperetin, with two pharmaceutical components exhibiting good antioxidant and antitumor effects.

Key words: hesperetin; palmatine hydrochloride; co-amorphous; solubility; dissolution; *in vitro* activity; antioxidant activities; antitumor activities

收稿日期: 2025-10-28

基金项目: 福州市科技计划项目(2024-SG-009); 闽江学院引进人才预研项目(MJY23007); 大学生创新训练项目(202410395034)

作者简介: 梁玲(1990—), 女, 博士, 实验师, 主要从事中药超分子化学研究。Tel: (0591)83763589 E-mail: liangling@mju.edu.cn

*通信作者: 娄本勇(1977—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物固态化学研究。Tel: (0591)83763589 E-mail: lby@mju.edu.cn

在药剂学领域,药物的溶解度和溶出速率是影响其口服生物利用度的关键因素^[1-2]。作为改善难溶性药物性能的重要策略,药物共无定形技术通过与配体分子间相互作用破坏药物的晶体结构,使药物分子处于热力学更稳定的无序状态,从而有效降低分子排列能垒^[3-4]。因其不仅显著增强难溶性药物溶解行为,还能改善无定形态的物理稳定性、抑制重结晶,并通过药物间协同作用提升疗效或降低不良反应而备受关注^[5]。例如,格列吡嗪与辛伐他汀^[6]、阿托伐他汀^[7]形成的共无定形表现出优异的稳定性;萘普生与利喹美辛形成共无定形后不但稳定性增强,溶出速率也显著加快^[8];而阿替洛尔与氢氯噻嗪形成的共无定形系统则同时优化了物理稳定性、溶出行为及体内吸收,其联合用药方案在高血压治疗中展现出更佳疗效^[9]。

橙皮素是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于柑橘类水果中,具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤及免疫调节等多重药理活性^[10-13]。然而,由于橙皮素极低的水溶性(16~40 μg/mL)^[14],其口服后胃肠道吸收极为有限,难以在全身循环中达到治疗浓度。尽管药物共无定形技术已在多种难溶性药物中展现出显著优势,但目前针对橙皮素的共无定形研究仍鲜有报道。

相比之下,近年来药物共晶技术在改善橙皮素溶解度和理化性质方面已引起关注,如诺氟沙星-橙皮素共晶可提升橙皮素在水中溶解度^[15];胡椒碱-橙皮素共晶能显著提升橙皮素生物利用度约6倍^[16];替莫唑胺-橙皮素共晶则表现出增强的吸湿性^[17]。本课题组前期通过药物共晶技术制备了盐酸巴马汀与橙皮素的共晶多晶型(Form I和Form II),二者化学组成相同且均存在O-H...Cl氢键作用,表现出较高的物理稳定性;然而,由于分子排列与氢键网络不同,两者的晶体堆积与晶格能存在显著差异,导致其溶解度表现迥异,其中Form II中盐酸巴马汀与橙皮素的溶解度均明显低于Form I^[18]。

本研究旨在通过药物共无定形技术开发新的固体形态改善难溶性橙皮素的溶解行为。通过优化实验条件,选择合适的制备方法,最终以甲醇为溶剂采用旋转蒸发法成功制备了橙皮素与盐酸巴马汀共无定形(hesperetin and palmatine hydrochloride co-amorphous system, Hes-PH CAS),并利用粉末X射线衍射仪、差示扫描量热仪、固体核磁共振波谱仪、动态水蒸气吸附仪等对其固体形态进行系统考

察,并利用高效液相色谱仪等评估其溶解度、溶出速率等理化性质,进一步通过自由基清除和细胞增殖抑制实验评估了其体外抗氧化与抗肿瘤活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Smart Lab SE型粉末X射线衍射仪,日本理学株式会社;DSC 214 Nevio型差示扫描量热仪、TG 209 F3型热重分析仪,德国耐驰仪器制造有限公司;Intrinsic Plus型动态水蒸汽吸附仪,英国Surface Measurement Systems公司;Nicolet iS 50型衰减全反射傅里叶红外光谱仪、DXR2拉曼光谱仪,美国赛默飞世尔科技公司;AVANCE III核磁共振波谱仪,德国布鲁克公司;LC-20AD型高效液相色谱,日本岛津仪器有限公司;SPECTROstar Nano多功能酶标仪,德国BMG LABTECH科技有限公司;LHH-150SD型综合药品稳定性试验箱,上海一恒科学仪器有限公司;RC806ADK型溶出度测试仪,天津市天大天发科技有限公司。

1.2 材料

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,质量分数≥97.0%)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS,质量分数≥98.0%),上海麦克林生化科技股份有限公司;原料药橙皮素、盐酸巴马汀三水合物,质量分数≥97.0%,大连美仑生物技术有限公司;过硫酸钾(质量分数≥99.0%),西陇科学股份有限公司;甲醇(色谱级),上海泰坦科技股份有限公司;磷酸(色谱纯),阿拉丁试剂(上海)有限公司。其他试剂均为分析纯,购自国药集团药业股份有限公司。人结肠癌细胞HT-29(目录号TCHu103)、HCT116(目录号TCHu99),中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 Hes-PH CAS的制备 将220.9 mg盐酸巴马汀三水合物(0.5 mmol)与橙皮素151.1 mg(0.5 mmol)置于80 mL甲醇中,超声处理直至全部溶解,0.45 μm滤膜滤过。滤液于40 °C水浴、100 r/min转速条件下减压旋蒸,所得固体于真空干燥箱中干燥,即得Hes-PH CAS,避光保存于干燥器中。

2.1.2 Form I和Form II的制备 将盐酸巴马汀三水合物(221.3 mg, 0.5 mmol)与橙皮素(151.7 mg, 0.5 mmol)的混合物悬浮于10 mL乙醇中,持续搅拌48 h。滤过后,经室温干燥得到橙黄色粉末状产

物, 即得 Form I 共晶。除使用甲醇替代乙醇外, Form II 共晶制备的其余条件与 Form I 的制备类似。

2.2 固态表征

2.2.1 粉末 X 射线衍射 (powder X-ray diffraction, PXRD) 分析 将样品置于单晶硅样品台上, 压成表面光滑后放在旋转台上。采用 Cu-K α 射线作为入射光束, 工作电压 40 kV, 工作电流 15 mA, 扫描范围 2θ 为 $5^\circ\sim 50^\circ$, 步长 0.02° 。结果如图 1 所示, 盐酸巴马汀与橙皮素原料药在 $5^\circ\sim 45^\circ$ 呈现一系列强而尖锐的特征衍射峰, 表明其为高度结晶态。通过旋转蒸发法制备的 Hes-PH CAS 无特征衍射峰, 仅存在一宽泛弥散峰, 为无定形态。与通过悬浮法制备的 HES-PCI 共晶 Form I 和 Form II^[18] 明显不同。

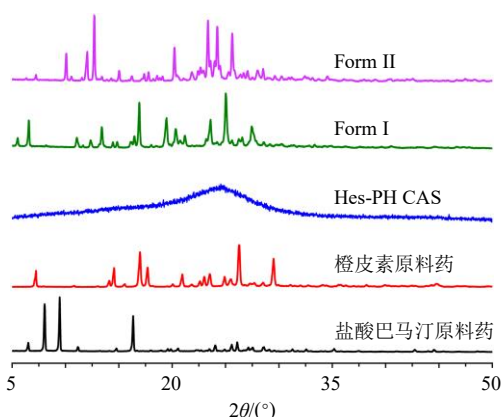


图 1 盐酸巴马汀、橙皮素、Hes-PH CAS、Form I 与 Form II 的 PXRD 图谱

Fig. 1 PXRD patterns of palmatine hydrochloride, hesperetin, Hes-PH CAS, Forms I and II

2.2.2 差示扫描量热/热重分析 (differential scanning calorimetry/thermal gravity analysis, DSC/TGA) 称样品置于铝制坩埚中, 密封并打孔后进行测试。以形同空坩埚作为参比, 测试条件: 温度范围 $30\sim 300^\circ\text{C}$, 升温速率 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 氮气保护, 体积流量 $40\text{ mL}/\text{min}$ 。结果如图 2-a 所示, 橙皮素原料药在 229.8°C 处出现吸热熔融峰, 盐酸巴马汀原料药在 204.3°C 处亦呈现吸热峰; 而 Hes-PH CAS 则无任何晶体熔融峰, 仅具有单一的玻璃化转变温度 (glass transition temperature, T_g) 104.5°C , 表明盐酸巴马汀与橙皮素经减压旋转蒸发后形成均相的共无定形。TGA 结果 (图 2-b) 显示, Hes-PH CAS 在 150°C 前无明显质量损失, 说明无残留溶剂, 其 T_g 值测定未受干扰。

2.2.3 衰减全反射傅里叶变换红外光谱 (attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy,

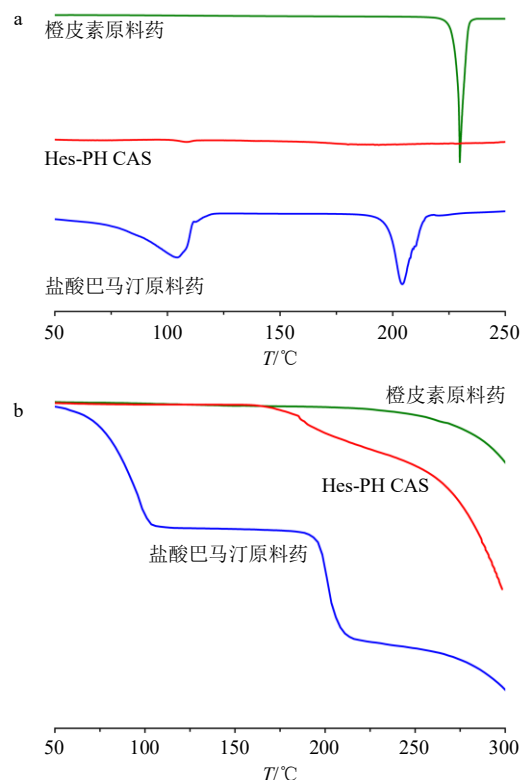


图 2 盐酸巴马汀、橙皮素与 Hes-PH CAS 的 DSC 曲线 (a) 与 TGA 曲线 (b)

Fig. 2 DSC curves (a) and TGA curves (b) of palmatine hydrochloride, hesperetin and Hes-PH CAS

ATR-FTIR) 与拉曼光谱 (Raman spectroscopy) 将待测样均匀铺于红外光谱仪 iD7 ATR 附件表面, 扫描次数 32 次, 分辨率 4 cm^{-1} , 波数范围为 $1\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$ 。对于拉曼测试, 将少量样品铺于载玻片上 (或毛细管) 上, 激光波长 785 nm , 激光能量 30 mW , 曝光次数 4 次, 曝光时间 4 s , 扫描范围 $1\ 000\sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$ 。FTIR 与拉曼光谱分析显示 (图 3), Hes-PH CAS 的谱图与原料药存在显著差异, 与所制备的共晶亦明显不同。与橙皮素和盐酸巴马汀相比, Hes-PH CAS 中橙皮素的 O-H 伸缩振动峰从 $3\ 492\text{ cm}^{-1}$ 偏移至 $2\ 940\text{ cm}^{-1}$, 弯曲振动峰从 $1\ 170\text{ cm}^{-1}$ 移至 $1\ 158\text{ cm}^{-1}$, 说明分子间作用模式发生改变。进一步对比发现, Hes-PH CAS 的 FTIR 谱图与共晶 Form I 更为相似, 如 O-H 伸缩峰位置相近 (图 3-a)。同样, 拉曼图谱显示 Hes-PH CAS 中部分特征峰消失或偏移, 如橙皮素 $1\ 259$ 、 $1\ 299\text{ cm}^{-1}$, 盐酸巴马汀 $1\ 363\text{ cm}^{-1}$, 且未出现 Form II 特有的 $1\ 183$ 、 $1\ 582\text{ cm}^{-1}$ 峰, 而与 Form I 拉曼图谱更为接近 (图 3-b)。这些结果提示, Hes-PH CAS 可能保留了与 Form I 相似的局部氢键作用, 但整体分子排列已完

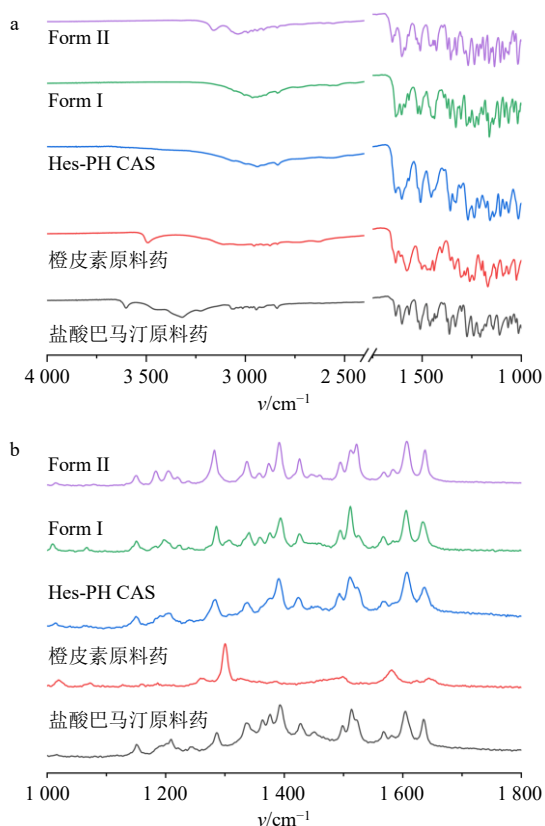


图3 盐酸巴马汀、橙皮素、Hes-PH CAS、Form I与Form II的ATR-FTIR图谱(a)和拉曼图谱(b)
Fig. 3 ATR-FTIR spectra (a) and Raman spectra (b) of palmatine hydrochloride, hesperetin, Hes-PH CAS, Forms I and II

全无序化。

2.2.4 固体核磁 (solid-state NMR spectroscopy, ss-NMR) 测试时, 样品装入 4 mm 转子, 以 10.0 kHz 旋转速率进行魔角旋转, 并使用 KBr 法校准魔角设置。CP/MAS 双脉冲相位调制在质子场 H_{1H} 满足公式 $\omega_{1H}/2\pi = \gamma_H H_{1H}/2\pi = 60$ Hz 的获取时间内对异核解偶; 检测共振频率为 100.625 MHz, 所有样品均采集 480 次扫描以获得足够的信噪比。化学位移校准以外部二级标准甘氨酸的亚甲基碳 (δ_C 甘氨酸 = 43.3) 为参考, 并重新校准至 TMS 标度; 所有 ssNMR 实验均在室温下进行。结果如图 4 所示, 与橙皮素-盐酸巴马汀物理混合物 (hesperidin and palmatine hydrochloride physical mixtures, Hes-PH PM) 相比, Hes-PH CAS 中多个碳信号发生显著偏移或消失。在 δ_C 50~60, 橙皮素的 C-16 甲氧基碳和盐酸巴马汀的 C18'、C19'、C21' 和 C20' 4 个甲氧基碳的信号发生变化; 特别是在 δ 150 处, 橙皮素原料药的 C-12、C-13 苯基碳和盐酸巴马汀的 C2'、C8'、C3' 和

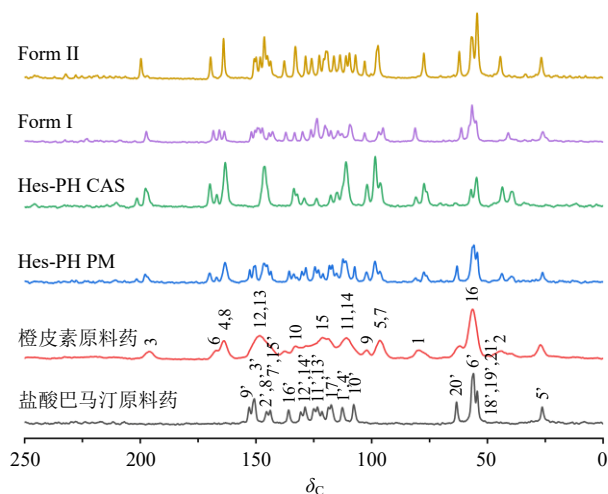
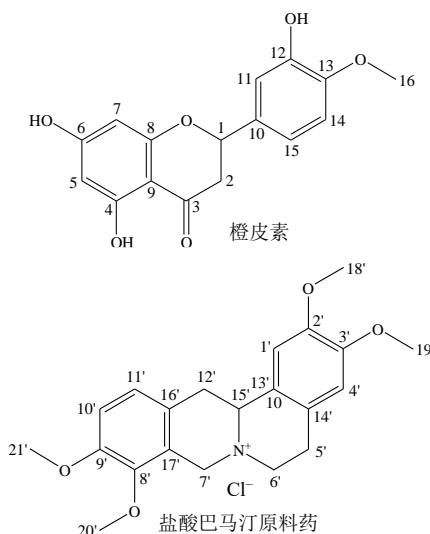


图4 盐酸巴马汀、橙皮素、Hes-PH PM、Hes-PH CAS、Form I 与 Form II 共晶的 ^{13}C ssNMR 谱图
Fig. 4 ^{13}C ssNMR image of palmatine hydrochloride, hesperetin, Hes-PH PM, Hes-PH CAS, Forms I and II

C9' (连接甲氧基的 4 个苯基碳) 信号亦发生改变。这些核磁谱信号的差异表明, 橙皮素与盐酸巴马汀分子间可能存在 O-H...O 氢键作用或短程结构。特别地, 在 δ_C 160~170, Form I 与 Hes-PH CAS 均呈现 3 个核磁峰 (分别归属为橙皮素中连接 3 个氧原子的 C-6、C-4 和 C-8 苯基碳), 而 Form II 仅显示 2 个; 且 Form II 在 δ 195 处向低场方向偏移, 这些差异进一步表明 Hes-PH CAS 与 Form I 在局部相互作用模式上更为相似, 但整体仍为无定形态。此外, 相较于 Form I 和 Form II, Hes-PH CAS 在橙皮素的 C-2、C-1 化学位移位置具有 2 个核磁信号, 这一特征提示共无定形中可能存在与共晶不同的分子间作用力。

2.2.5 稳定性分析 将适量的 Hes-PH CAS 置于药

品综合稳定性试验箱中,分别在光照强度为 4 500 lx、温度为 60 °C 条件下储存 30 d,随后进行 PXRD 表征。PXRD 图谱显示光照及高热(4 500 lx, 60 °C)条件下储存 30 d 后的 Hes-PH CAS 仍为无定形态(图 5-a),表明其具有良好的光、热稳定性。进一步考察湿度对其稳定性影响,将样品置于 40 °C、75% 相对湿度(relative humidity, RH)处理不同时间(图 5-b)。结果表明,置于 40 °C、75% RH 10 h 后, Hes-PH CAS 出现衍射峰;随着时间延长,24 h 后在衍射角 7.9°、16.0°、24.7°及 25.9°处衍射峰信号增强,其中 24.7°、25.9°处衍射峰与 Form II 的特征峰(图 1)基本一致,证实无定形态的 Hes-PH CAS 在受高湿作用后可能向 Form II 型转变。

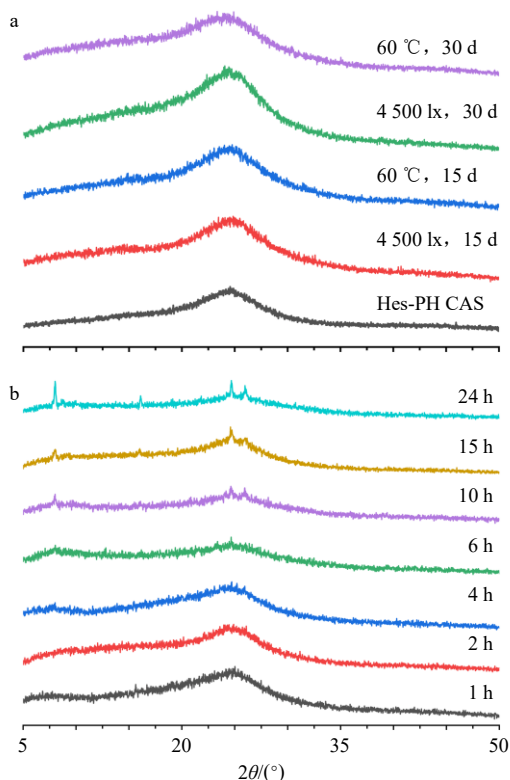


图 5 置于不同光热条件后 (a) 和置于 40 °C 75% RH 1~24 h 后 (b) 的 Hes-PH CAS 的 PXRD 图谱

Fig. 5 PXRD patterns of Hes-PH CAS after exposure to different photothermal conditions (a), or after treatment at 40 °C and 75% RH for 1—24 h (b)

2.2.6 动态水蒸气吸附 (dynamic vapor sorption, DVS) 采用动态水蒸气吸附仪对样品的吸湿性能进行表征,称取适量待测样品,在 25 °C 恒温条件下,以 200 mL/min 的氮气流量为载气,选择全循环吸附-脱附模式,设置步长为 5%,以粉体质量变化率 (dm/dt) $\leq 0.002\%/min$ 作为平衡标准。结果如图

6 所示,在 RH 低于 60% 时,盐酸巴马汀的吸湿量随湿度升高而显著增加,而橙皮素、Form I 和 Form II 吸湿量则基本保持不变;在 0~95% RH 吸附过程中, Hes-PH CAS 吸湿量随 RH 增加而逐渐上升,当 RH 达到 95% 时,其吸湿量为 12.8%,高于 Form I 和 Form II,但低于盐酸巴马汀原料药。表明形成共无定形后,橙皮素能够抑制盐酸巴马汀的吸湿行为。

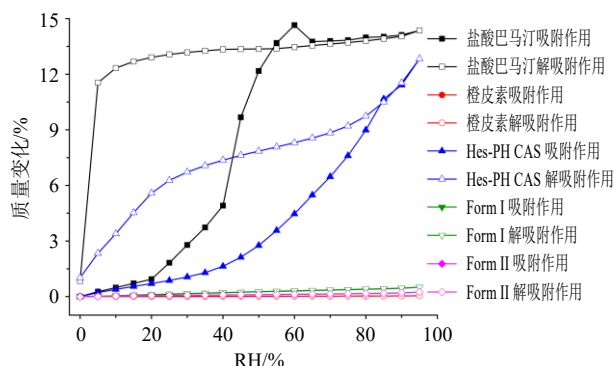


图 6 盐酸巴马汀、橙皮素、Hes-PH CAS、Form I 与 Form II 的 DVS 曲线

Fig. 6 DVS curves of palmatine hydrochloride, hesperetin, Hes-PH CAS, Form I and Form II

2.3 溶解度及溶出度分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为中谱蓝 XR-C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm),采用双波长模式,橙皮素吸收波长 280 nm,盐酸巴马汀的吸收波长 345 nm,体积流量 1 mL/min,进样量 5 μL,柱温 30 °C,流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (60:40),洗脱方式为等度洗脱。

2.3.2 供试品溶液的配制 精密称取 10 mg Hes-PH CAS 置于 10 mL 量瓶中,加入适量色谱甲醇超声至完全溶解,放至室温后甲醇定容,得 1 mg/mL 的供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的配制 精密称取橙皮素 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀即得 1 mg/mL 橙皮素对照品储备液。同法制备 1 mg/mL 盐酸巴马汀对照品储备液。

2.3.4 专属性考察 取稀释后的对照品溶液、供试品溶液,分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,结果见图 7,供试品溶液在保留时间为 2.0、4.1 min 处分别与对照品盐酸巴马汀、橙皮素有相同色谱峰,分离度大于 1.5,峰形良好,表明该色谱条件适用性良好。

2.3.5 线性关系考察 取“2.3.3”项下配制的质量

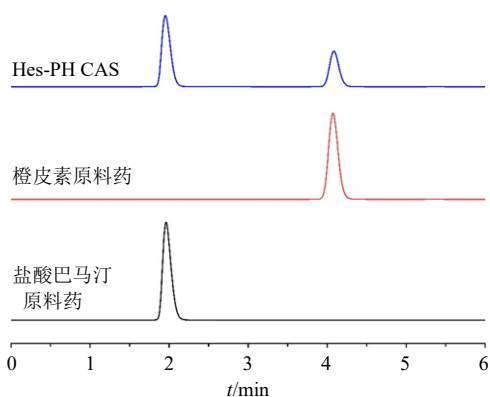


图7 Hes-PH CAS与原料药的色谱图

Fig. 7 Chromatogram of Hes-PH CAS and raw materials

浓度均为 1 mg/mL 的盐酸巴马汀、橙皮素对照品溶液，使用甲醇（色谱级）分别稀释至 500、200、100、50、20、10、5 μg/mL，0.45 μm 微孔滤膜滤过后进行 HPLC 检测，以峰面积 (*A*) 对质量浓度 (*C*) 进行线性拟合，得到盐酸巴马汀线性回归方程为 $A = 23\,679\,C + 1\,822$, $R^2 = 1.000\,0$ ；橙皮素线性回归方程为 $A = 15\,954\,C + 23\,535$, $R^2 = 0.999\,9$ ；结果表明橙皮素、盐酸巴马汀均在 5~500 μg/mL 线性关系良好。

2.3.6 精密度考察 取“2.3.2”项下供试品溶液进行稀释，制成 Hes-PH CAS 质量浓度为 50 μg/mL 的供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果橙皮素和盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 0.35%、0.67%，表明该仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 取“2.3.2”项下供试品溶液进行稀释，制成 Hes-PH CAS 质量浓度为 50 μg/mL 的供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件，分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，记录峰面积，24 h 内橙皮素和盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 2.51%、2.39%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 取 Hes-PH CAS 样品，按照“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，分别进行稀释，制成 Hes-PH CAS 质量浓度为 50 μg/mL 的供试品溶液，分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。结果橙皮素和盐酸巴马汀质量分数的 RSD 分别为 1.14%、0.97%，表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 取 Hes-PH CAS 样品，制成含橙皮素质量浓度为 50 μg/mL 的储备液。精密

量取 9 份该储备液 1 mL，加入等体积质量浓度分别为 40、50、60 μg/mL 的橙皮素对照品溶液，各平行 3 份。按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算橙皮素的加样回收率。同法计算盐酸巴马汀的加样回收率。结果橙皮素、盐酸巴马汀的平均加样回收率分别为 $(102.48 \pm 9.63)\%$ 、 $(98.26 \pm 2.62)\%$ ，表明该方法准确度良好。

2.3.10 平衡溶解度考察 分别称取适量样品置于纯水中，直至样品未全部溶解获得过饱和溶液，37 °C 振荡 48 h，取上层溶液 0.45 μm 微孔滤膜滤过后，进行 HPLC 检测，记录峰面积并计算平衡溶解度，结果如表 1 所示。在纯水中，原料药橙皮素与盐酸巴马汀的平衡溶解度分别为 (21.22 ± 0.58) μg/mL 与 (24.13 ± 0.67) mg/mL。而在共无定形中，两者的溶解度发生了显著变化。橙皮素平衡溶解度提升至 (105.42 ± 6.50) μg/mL、盐酸巴马汀溶解度则降低至 (10.06 ± 0.14) mg/mL。而且，橙皮素与盐酸巴马汀的溶解度差异在共无定形中显著降低，从原料药的约 1 100 倍降至 95 倍。值得注意的是，共无定形中橙皮素与盐酸巴马汀的溶解度均介于 Form I 与 Form II 溶解度之间，说明所制备的共无定形分子堆积模式所导致的能量状态也处于 2 种共晶的中间。在溶解度实验后收集残渣进行 PXRD 测试进一步探究其固体形态，图谱结果显示，该残渣呈现明显衍射峰信号（图 8），经与 Form II 衍射图谱对比，其衍射峰分布及相对强度均与之基本一致，说明 Hes-PH CAS 在溶解过程中向 Form II 型转变。

2.3.11 溶出速率考察 实验采用小杯浆法，水作为溶出介质，体积 250 mL，转速 75 r/min，温度 37 °C。待介质温度稳定后将待测样品投入介质中。设置多个时间点进行取样，每次取样后立即补充等体积介质。所取样品 0.45 μm 微孔滤膜滤过后进行 HPLC 检测，每组均设置 3 个平行样。结果如图 9

表 1 盐酸巴马汀、橙皮素、Hes-PH CAS、Form I 与 Form II 在纯水中的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Solubility of palmatine hydrochloride, hesperetin, Hes-PH CAS, Form I and Form II in water ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	盐酸巴马汀溶解度/ (mg·mL ⁻¹)	橙皮素溶解度/ (μg·mL ⁻¹)
原料药	24.13 ± 0.67	21.22 ± 0.58
Hes-PH CAS	10.06 ± 0.14	105.42 ± 6.50
Form I	13.32 ± 0.17	120.90 ± 1.60
Form II	5.27 ± 0.10	44.50 ± 1.37

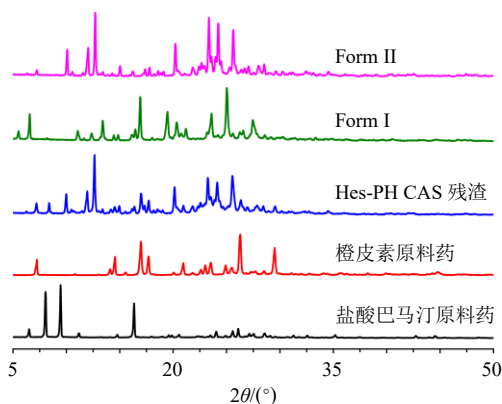


图8 Hes-PH CAS 溶解度测试后残渣与 Form I、Form II 的 PXRD 图谱

Fig. 8 PXRD patterns of Hes-PH CAS residual, Form I, and Form II

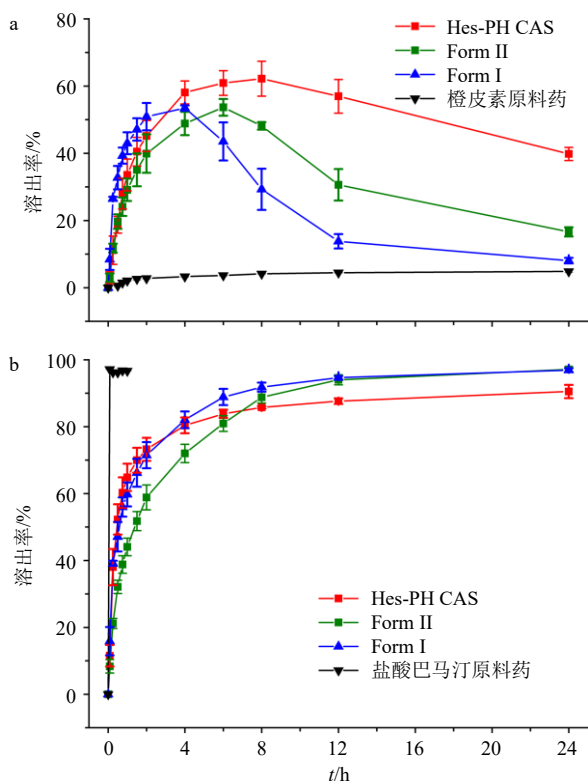


图9 橙皮素 (a) 和盐酸巴马汀 (b) 在 Hes-PH CAS、Form I 与 Form II 中的溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Dissolution curves of hesperetin (a) and palmitine hydrochloride (b) from Hes-PH CAS, Form I, and Form II ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

所示, 盐酸巴马汀原料药表现出显著的快速溶解特性, 5 min 内几乎完全溶解; 而橙皮素原料药溶出释放缓慢, 4 h 后最大溶出率仅约 4%。形成共无定形后显著改变了两者的溶出行为, 盐酸巴马汀初始溶出速率较快, 4 h 后逐渐减缓并趋于平衡, 最终在 24 h 的溶出率约为 90.5%; 橙皮素的溶出率与溶出速

率均显著提高, 在 4~12 h 维持较高的溶出水平, 有效延长了药物浓度维持时间, 8 h 左右达到最大溶出率 (62.2%)。

进一步与 Form I、Form II 比较发现, 共无定形中盐酸巴马汀在 4 h 前的溶出速率同 Form II 接近, 但在 4 h 后溶出速率变缓; 而共无定形中橙皮素的溶出率较 Form I 与 Form II 有所提高, 尤其是 8 h 时均高于 2 个共晶的最大溶出率。

2.4 抗氧化性考察

通过 DPPH 和 ABTS 自由基清除法测定样品抗氧化能力, 具体实验方法如下: DPPH 自由基清除实验中, 先用乙醇配制浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 溶液, 分别取 100 μL 不同浓度的待测样品和 DPPH 溶液加入到 96 微孔板中, 设置 3 组平行样, 避光反应 30 min 后, 用酶标仪测定 517 nm 处吸光度 (A) 值; ABTS 自由基清除实验中, 先将 7 mmol/L ABTS 储备溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液混合制得 ABTS^+ 溶液, 使用前于室温避光放置 16 h, 并用无水乙醇稀释至 734 nm 处 A 值约为 0.7, 然后分别取 100 μL 不同浓度的测试样品和 ABTS^+ 溶液加入到 96 微孔板, 混合 30 min 后测定 734 nm 处 A 值。自由基清除率均按照公式清除率 = $(A_b - A_s)/A_b$ 计算, 其中 A_b 和 A_s 分别为空白孔和样品孔 A 值。结果如表 2 所示, 橙皮素与 Hes-PH CAS 对 2 种自由基清除率均随着样品浓度增加而增加。在 12.5~400.0 $\mu\text{mol/L}$, Hes-PH CAS 的自由基清除活性均高于 2 种原料药, 说明共无定形中 2 种药物能够更好地对自由基清除发挥作用。

2.5 体外抗肿瘤实验

肿瘤细胞抑制作用通过 MTT 试验测定, 选用人结肠癌细胞 HT-29 和 HCT116 作为模型。将细胞以 4.0×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板中, 在 CO_2 培养箱中孵育过夜后, 用不同浓度的样品处理细胞 48 h, 随后每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 溶于 PBS) 孵育 4 h, 移去上清液后加入 200 μL DMSO 振荡 10 min, 最后用酶标仪测量 570 nm 波长处 A 值。细胞增殖抑制率按公式 [抑制率 = $(A_c - A_s)/(A_c - A_b)$] 计算, 其中 A_c 、 A_s 和 A_b 分别是对照孔、样品孔和空白孔 A 值。结果如图 10 所示, HT-29 和 HCT 116 细胞的增殖抑制率均随 Hes-PH CAS 浓度增加而逐渐增加, 在 6.25~400.00 $\mu\text{mol/L}$, Hes-PH CAS 对 2 种细胞的增殖抑制率均显著高于橙皮素和盐酸巴马汀原料药。通过拟合数据分析发现, Hes-PH CAS 对

表 2 Hes-PH CAS 与原料药的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 DPPH and ABTS⁺ radical scavenging rates of Hes-PH CAS and raw materials ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	DPPH 自由基清除率/%					
	12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	200.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
盐酸巴马汀原料药	2.78 ± 1.15	2.44 ± 1.32	2.47 ± 1.18	2.52 ± 0.91	2.90 ± 1.45	2.55 ± 1.26
橙皮素原料药	4.29 ± 1.23	5.54 ± 1.43	12.90 ± 1.38	20.04 ± 2.71	29.53 ± 2.41	42.77 ± 1.35
Hes-PH CAS	4.73 ± 1.02	8.33 ± 1.14 ^{##}	17.30 ± 2.91 ^{##}	27.98 ± 3.34 ^{*##}	36.33 ± 3.25 ^{*##}	49.65 ± 0.64 ^{**##}
样品	ABTS ⁺ 自由基清除率/%					
	12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	200.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
盐酸巴马汀原料药	4.28 ± 4.60	1.14 ± 1.11	4.27 ± 6.21	5.55 ± 3.64	8.42 ± 3.11	15.78 ± 1.82
橙皮素原料药	12.08 ± 4.29	23.15 ± 2.62	49.08 ± 5.76	59.70 ± 6.85	69.01 ± 9.78	70.53 ± 5.02
Hes-PH CAS	23.77 ± 0.36 ^{*#}	37.81 ± 0.85 ^{**##}	62.35 ± 1.52 ^{*##}	79.31 ± 1.52 ^{*##}	85.87 ± 0.98 ^{##}	88.87 ± 1.51 ^{*##}

与橙皮素原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与盐酸巴马汀原料药比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs hesperidin bulk drug; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs palmatine hydrochloride bulk drug.

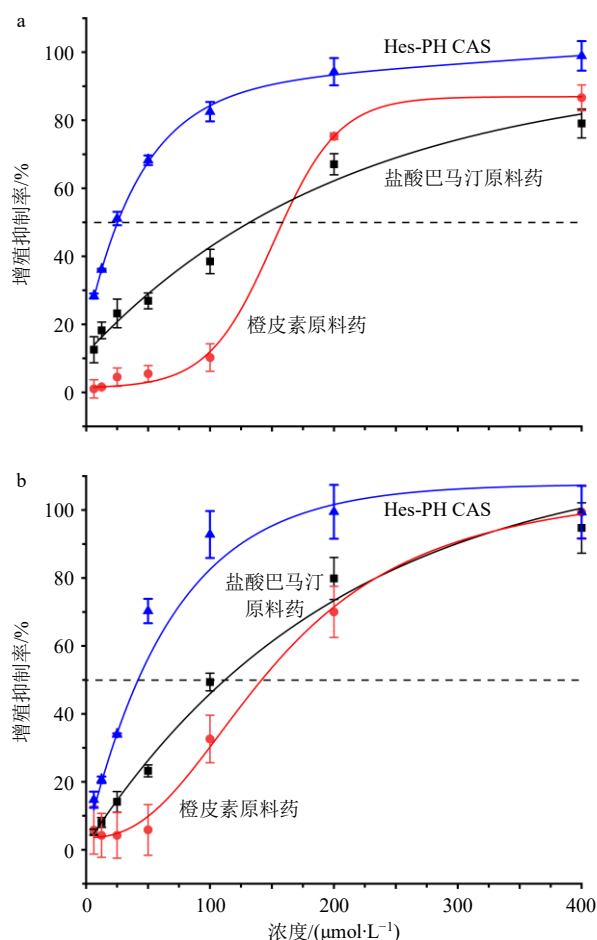


图 10 Hes-PH CAS 与原料药对 HT-29 细胞 (a) 和 HCT 116 细胞 (b) 的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 HT-29 cell (a) and HCT 116 cell (b) growth inhibition of Hes-PH CAS and raw materials ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

HT-29 和 HCT 116 细胞半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 26.1、43.6 $\mu\text{mol/L}$, 明显低于橙皮素和盐酸巴马汀原料药。结

果表明橙皮素与盐酸巴马汀形成共无定形后, 其抗肿瘤细胞增殖效果显著优于原料药。

3 讨论

本研究通过筛选溶剂和制备方法, 优化溶剂体积、旋蒸温度与转速、研磨时间与转速等条件, 最终以甲醇为溶剂、利用旋转蒸发法成功制备了橙皮素与盐酸巴马汀的无定形固体形态。与分别以乙醇、甲醇为溶剂悬浮法制备的结晶态共晶 Form I 和 Form II 不同, 盐酸巴马汀和橙皮素在甲醇溶剂中经减压旋转蒸发后发生非晶化转变, 为无定形态。热分析结果显示在 104.5 °C 存在唯一的玻璃化转变温度, 且在 150 °C 前未发现样品有明显的质量损失。FTIR 图谱及拉曼图谱均证实该无定形与 Form I 间可能存在相似的氢键作用或短程结构。

而且 Hes-PH CAS 部分谱峰较 Form I 存在宽化和轻微偏移现象, 这可能是由于无定形结构长程无序, 键长、键角的振动范围更大, 使得每个振动原子间存在不同的局部环境, 表现为特征峰的宽化、弱化与合并。ssNMR 谱图进一步表明共无定形与 Form I 间可能存在相似的氢键作用或短程结构。尽管 Hes-PH CAS 可能保留了与共晶 Form I 相似的局部氢键或短程有序结构, 但整体分子排列已高度无序, 使其在溶解性与物理稳定性方面表现出与共晶截然不同的特性。

无定形是热力学上的不稳定状态, 容易受到外界环境影响发生重结晶^[19], 尤其对湿度更为敏感, 药物共无定形通过分子间相互作用能够改善无定形的稳定性^[20]。Hes-PH CAS 在 4 500 lx、60 °C 存储 30 d 后仍为无定形态, 证实其具有优异的光热稳定性。当置于 40 °C、75% RH 处理 10 h 后, Hes-

PH CAS 发生转晶且可能向 Form II 转变。在吸附过程中, Hes-PH CAS 吸湿量随 RH 增加均小于盐酸巴马汀, 说明形成共无定形后, 橙皮素能够抑制盐酸巴马汀吸湿行为。但相比于 Form I、Form II, 共无定形吸湿性仍较高, 这一现象源于无定形药物的普遍性结晶度低, 内部呈疏松多孔结构, 更易被水分子渗入; 同时其较高的表面自由能也使得无定形更容易吸附水分子^[21]。后续将通过优化药物组成比例、选择低吸湿性共形成剂构建三元共无定形等策略提升其对环境湿度的耐受性^[22]。

易溶性盐酸巴马汀与难溶性橙皮素形成共无定形后, 橙皮素溶解度在纯水中显著提升、盐酸巴马汀溶解度显著降低, 说明将水溶性较高药物与难溶性药物形成的共无定形实现了两者溶解行为的协同调控。溶解度测定后的 Hes-PH CAS 残渣分析结果表明, 该共无定形在过饱和和溶液环境中向 Form II 的转晶, 证实 Form II 是 HES-PCI 固体形态中热力学相对稳定的晶型^[18]。同时, 由于溶解过程中, Form II 与共无定形同时存在, 使得 Hes-PH CAS 共无定形的溶解度介于 Form I 与 Form II 之间。在溶出实验中, Hes-PH CAS 与 Form I、Form II 中橙皮素溶出释放均先增加后下降, 呈明显的“弹簧-降落伞”现象^[5,23], 然而橙皮素在 Hes-PH CAS 的最大溶出释放量明显高于 Form I 和 Form II, 进一步证实橙皮素不同固体形态的理化性质也不尽相同。

在抗氧化与抗肿瘤活性方面, Hes-PH CAS 中 2 种药物组分均表现出一定的增效作用, 可能涉及多靶点、多通路机制^[24-26]。此外, 该共无定形同时改变了 2 种药物的溶解度和溶出行为, 使得橙皮素与盐酸巴马汀的溶解度差异在共无定形体系中显著降低, 橙皮素分子在共无定形体系中溶出呈现“弹簧-降落伞”现象延长其有效作用时间, 均有利于 2 种药物同时发挥作用^[5,27-28]、更好地发挥抗氧化和抗肿瘤功效。

综上, 本研究通过将结晶态盐酸巴马汀和橙皮素制备为共无定形, 并与共晶 Form I 和 Form II 进行性质对比分析, 不仅揭示了不同固体形态对药物理化性质的显著影响, 也为开发具有高溶解性、协同作用的新型药物固体形态提供了重要实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Liu Y F, Liang Y S, Jing Y H, *et al.* Advances in nanotechnology for enhancing the solubility and

bioavailability of poorly soluble drugs [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 1469-1495.

[2] Pinal R. Enhancing the bioavailability of poorly soluble drugs [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(6): 758.

[3] 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.

[4] Han J W, Wei Y F, Lu Y, *et al.* Co-amorphous systems for the delivery of poorly water-soluble drugs: Recent advances and an update [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17(10): 1411-1435.

[5] Shelke R, Velagacherla V, Nayak U Y. Recent advances in dual-drug co-amorphous systems [J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29(2): 103863.

[6] Löbmann K, Strachan C, Grohgan H, *et al.* Co-amorphous simvastatin and glipizide combinations show improved physical stability without evidence of intermolecular interactions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81(1): 159-169.

[7] Renuka, Singh S K, Gulati M, *et al.* Stable amorphous binary systems of glipizide and atorvastatin powders with enhanced dissolution profiles: Formulation and characterization [J]. *Pharm Dev Technol*, 2017, 22(1): 13-25.

[8] Löbmann K, Laitinen R, Grohgan H, *et al.* Coamorphous drug systems: Enhanced physical stability and dissolution rate of indomethacin and naproxen [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(5): 1919-1928.

[9] Moinuddin S M, Ruan S D, Huang Y T, *et al.* Facile formation of co-amorphous atenolol and hydrochlorothiazide mixtures via cryogenic-milling: Enhanced physical stability, dissolution and pharmacokinetic profile [J]. *Int J Pharm*, 2017, 532(1): 393-400.

[10] Yang H L, Chen S C, Senthil Kumar K J, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: An *ex vivo* approach [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(1): 522-532.

[11] Wang R, Li W H, Fang C, *et al.* Extraction and identification of new flavonoid compounds in dandelion *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. with evaluation of antioxidant activities [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 2166.

[12] Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of the *Citrus* flavonoids hesperidin and hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(3): 323-331.

- [13] Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, *et al.* Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases [J]. *Life Sci*, 2015, 124: 64-74.
- [14] Ferreira O, Schröder B, Pinho S P. Solubility of hesperetin in mixed solvents [J]. *J Chem Eng Data*, 2013, 58(9): 2616-2621.
- [15] Qiu S L, Deng X Z, Qian K, *et al.* Study on the structure, solubilities, antibacterial activities and *in vivo* toxicity of hesperetin and norfloxacin cocrystal [J]. *Pharm Chem J*, 2024, 58(5): 765-774.
- [16] Liu Y J, Yang F, Zhao X H, *et al.* Crystal structure, solubility, and pharmacokinetic study on a hesperetin cocrystal with piperine as coformer [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(1): 94.
- [17] Wang J, Dai X L, Lu T B, *et al.* Temozolomide-hesperetin drug-drug cocrystal with optimized performance in stability, dissolution, and tabletability [J]. *Cryst Growth Des*, 2021, 21(2): 838-846.
- [18] Zhang Y J, Li Y G, Liu L, *et al.* Two cocrystal polymorphs of palmitate chloride with racemic hesperetin [J]. *Cryst Growth Des*, 2022, 22(2): 1073-1082.
- [19] Zhang G G Z, Law D, Schmitt E A, *et al.* Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(3): 371-390.
- [20] Knapik-Kowalczyk J, Chmiel K, Jurkiewicz K, *et al.* Physical stability and viscoelastic properties of co-amorphous ezetimibe/simvastatin system [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 12(1): 40.
- [21] Ohta M, Tozuka Y, Oguchi T, *et al.* Water vapor adsorption properties of amorphous cefditoren pivoxil evaluated by adsorption isotherms and microcalorimetry [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, 26(6): 643-649.
- [22] Ueda H, Wu W Q, Löbmann K, *et al.* Application of a salt coformer in a co-amorphous drug system dramatically enhances the glass transition temperature: A case study of the ternary system carbamazepine, citric acid, and l-arginine [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(5): 2036-2044.
- [23] Thakuria R, Sarma B. Drug-drug and drug-nutraceutical cocrystal/salt as alternative medicine for combination therapy: A crystal engineering approach [J]. *Crystals*, 2018, 8(2): 101.
- [24] Slika H, Mansour H, Wehbe N, *et al.* Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112442.
- [25] Ji Z K, Deng W, Chen D, *et al.* Recent understanding of the mechanisms of the biological activities of hesperidin and hesperetin and their therapeutic effects on diseases [J]. *Heliyon*, 2024, 10(5): e26862.
- [26] Shang X F, Yang C J, Morris-Natschke S L, *et al.* Biologically active isoquinoline alkaloids covering 2014—2018 [J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(6): 2212-2289.
- [27] Qin H X, Wang J, Peng J H, *et al.* A novel temozolomide-myricetin drug-drug cocrystal: Preparation, characterization, property evaluations [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(7): 906.
- [28] Wang X J, Du S Z, Zhang R, *et al.* Drug-drug cocrystals: Opportunities and challenges [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2021, 16(3): 307-317.

[责任编辑 郑礼胜]