

- 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 715.
- [ 2 ] Zheng N, Lin X, Wen Q, *et al.* Effect of 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione, isolated from *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) roots, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in type 2 diabetic KKAY mice[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 219(1): 77-84.
- [ 3 ] Wen Q W, Liang T, Qin F Z, *et al.* Lyoniresinol 3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside-mediated hypoglycaemia and its influence on apoptosis-regulatory protein expression in the injured kidneys of streptozotocin-induced mice [ J ]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e81772.
- [ 4 ] Wen Q W, Lin X, Liu Y Q, *et al.* Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *Averrhoa carambola* L. root[J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 12330-12340.
- [ 5 ] 黄桂红, 邓 航, 黄纯真, 等. 杨桃根多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究 [ J ]. *中成药*, 2009, 31 (9): 1438-1440.
- [ 6 ] 罗旭艳, 黄建春, 杨 欣, 等. 杨桃根多糖体外抗氧化作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4): 111-114.
- [ 7 ] 罗旭艳, 杨 欣, 王丽惠, 等. 杨桃根多糖片对糖尿病模型小鼠的降糖降脂作用 [ J ]. *医药导报*, 2016, 35 (S1): 1-3.
- [ 8 ] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 年版) [ J ]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(1): 81-117.
- [ 9 ] Kita A, Matsui H, Somoto A, *et al.* Substrate specificity and subsite affinities of crystalline  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*[ J ]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2327-2335.
- [ 10 ] 王小江, 单鑫迪, 胡明华, 等. 青钱柳叶多糖的结构表征及其抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性研究 [ J ]. *中草药*, 2017, 48 (8): 1524-1528.
- [ 11 ] 郭凤霞, 曾 阳, 李锦萍, 等. 沙棘多糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性及正常小鼠血糖的影响 [ J ]. *药学报*, 2013, 48 (4): 604-608.
- [ 12 ] 李玉萍, 皮小芳, 刘成梅, 等. 百合多糖降糖作用机理的体外研究 [ J ]. *时珍国医国药*, 2012, 23(8): 1964-1966.
- [ 13 ] 廖彭莹, 邱志彬, 卓生华. 柚寄生多糖的提取与含量的测定 [ J ]. *食品研究与开发*, 2014, 35(22): 74-77.
- [ 14 ] 李石军, 王凯平, 汪 柳, 等. 香菇多糖 LNT2 的提取分离纯化、结构及体外抗肿瘤活性研究 [ J ]. *中草药*, 2014, 45 (9): 1232-1237.

## 柚皮素纳米混悬剂的制备及其体内药动学行为

裴岩岩, 闫春生, 牛美兰, 郭志刚  
(黄河科技学院, 河南 郑州 450005)

**摘要:** 目的 制备柚皮素纳米混悬剂, 并考察其体内药动学行为。方法 高压均质法制备纳米混悬剂后, 测定其粒径、PDI、Zeta 电位、累积释放度。然后, 研究纳米混悬剂体内药动学行为, 计算主要药动学参数。结果 纳米混悬剂平均粒径为 (161.67 $\pm$ 4.23) nm, PDI 为 0.105 $\pm$ 0.011, Zeta 电位为 (-30.47 $\pm$ 1.15) mV, 40 min 内累积释放度大于 90%。与原料药比较, 纳米混悬剂  $t_{max}$  显著缩短 ( $P < 0.05$ ),  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  显著升高 ( $P < 0.01$ ), 相对生物利用度增加了 1.86 倍。结论 纳米混悬剂可有效改善柚皮素体内吸收, 明显提高其生物利用度。

**关键词:** 柚皮素; 纳米混悬剂; 制备; 体内药动学行为; 高压均质法

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2034-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.003

## Preparation and *in vivo* pharmacokinetic behaviors of naringenin nanosuspensions

PEI Yan-yan, YAN Chun-sheng, NIU Mei-lan, GUO Zhi-gang  
(Huanghe Science & Technology College, Zhengzhou 450005, China)

**ABSTRACT:** AIM To prepare naringenin nanosuspensions and to investigate the *in vivo* pharmacokinetic behav-

收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 河南省重大科技专项 (162102310003)

作者简介: 裴岩岩 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为药理学。Tel: (0371) 68782349, E-mail: pyhkdyxy@126.com

iors. **METHODS** For the nanosuspensions prepared by high-pressure homogenization method, the particle size, PDI, Zeta potential and accumulative release rate were determined. Subsequently, their *in vivo* pharmacokinetic behaviors of nanosuspensions were studied, then the main pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The nanosuspensions demonstrated the particle size, PDI and Zeta potential of (161.67±4.23) nm, 0.105±0.011 and (-30.47±1.15) mV, respectively, and the accumulative release rate within 40 min was more than 90%. Compared with the raw medicine, the nanosuspensions displayed significantly shortened  $t_{max}$  ( $P<0.05$ ), and markedly elevated  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  ( $P<0.01$ ), the relative bioavailability was increased to 1.68 times. **CONCLUSION** Nanosuspensions can effectively improve naringenin *in vivo* absorption and obviously enhance the bioavailability.

**KEY WORDS:** naringenin; nanosuspensions; preparation; *in vivo* pharmacokinetic behaviors; high-pressure homogenization method

柚皮素是一种二氢黄酮类化合物,广泛存在于芸香科植物中,具有抗病毒、抗氧化、抗炎、镇咳、抗肿瘤、抗纤维化、预防动脉粥样硬化等多种药理活性<sup>[1-3]</sup>,显示出巨大的潜在利用价值,但其溶解度不理想<sup>[4]</sup>,导致体内吸收较差,口服后药效大打折扣<sup>[5]</sup>。

目前,纳米制剂技术包括固体脂质纳米粒<sup>[6]</sup>、脂质体<sup>[7]</sup>、纳米结构脂质载体<sup>[8]</sup>、自微乳等<sup>[9]</sup>,但都存在一定问题,如制备工艺复杂、载药量较低等。纳米混悬剂是指难溶性药物通过湿磨、均质匀化等制剂技术制备而成的一种“纯”药物胶态分散体系<sup>[10-13]</sup>,其制备工艺和处方简单,载药量大,适合工业化生产,有助于增加药物溶解度、促进药物吸收、提高生物利用度等,从而扩大临床应用范围。因此,本实验制备柚皮素纳米混悬剂,并考察其体内药动学行为,为相关制剂研发提供参考。

## 1 材料

Agilent 1260型高效液相色谱仪(配置DAD检测器,美国Agilent公司);AR2140型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);VORTEX-5型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);ATS型均质机(加拿大Seeker公司);RE5299型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);MD200-2型氮气吹扫仪(杭州奥威仪器有限公司);Master-sizer型粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

柚皮素原料药(批号20170223,含量98.7%,西安瑞迪生物科技有限公司);柚皮素对照品(批号Y-034-181217,成都瑞芬思生物科技有限公司);卵磷脂(批号PC-98T,辅必成上海医药科技有限公司);聚乙烯吡咯烷酮K30(PVP

K30,批号25000240379,亚什兰集团公司);肝素钠(批号20160511S,新泰市朝阳生化研究所)。

清洁级SD大鼠,雌雄兼用,体质量(300±20)g,河南省动物实验中心,动物许可证号SCXK(豫)2016-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 柚皮素含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil BDS-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇-水(65:35);体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;检测波长287 nm;进样量20 μL。

2.1.2 线性关系考察 精密称取柚皮素对照品20.00 mg,加入50 mL甲醇溶解,得400.0 μg/mL贮备液,甲醇稀释成200.0、100.0、50.0、10.0、1.0 μg/mL,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积(Y)对溶液质量浓度(X)进行回归,得方程为 $Y=40.056 3X+4.125 7$  ( $R^2=0.999 4$ ),在1.0~200.0 μg/mL范围线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液制备 精密量取纳米混悬液0.5 mL,加入10 mL甲醇超声5 min,即得。

2.1.4 方法学考察 取供试品溶液,于0、4、8、12、24、48 h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得柚皮素峰面积RSD为0.64%,表明溶液在48 h内稳定性良好。取1.0、100.0、200.0 μg/mL对照品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,连续6 d,测得日内精密密度RSD均小于0.52%,日间精密密度RSD均小于1.33%,表明该方法精密密度良好。平行制备6份供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得柚皮素峰面积RSD为1.39%,表明该方法重复性良好。空白纳米混悬液分别配制40、60、80 μg/mL,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得柚皮素平均加样回收率为99.36%,RSD

小于1.80%。取对照品溶液逐步稀释，测得检测限为0.5 ng/mL，定量限为1.2 ng/mL。

## 2.2 单因素试验

2.2.1 表面活性剂种类 在制备温度25℃、均质压力60 MPa、均质次数10次的条件下，考察PVP K30、卵磷脂、两者混合物(1:1)对纳米粒粒径的影响。结果，平均粒径分别为(281.42±5.93)、(224.79±6.07)、(182.50±4.11) nm，故选择PVP K30-卵磷脂混合物(1:1)作为表面活性剂。

2.2.2 制备温度 在表面活性剂PVP K30-卵磷脂(1:1)、均质压力60 MPa、均质次数10次的条件下，考察制备温度0、25、50℃对纳米粒粒径的影响，结果见图1。由图可知，在0℃时粒径最小，故选择其作为制备温度。

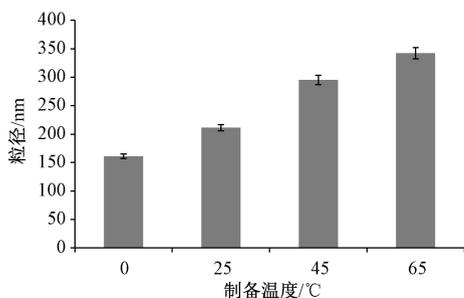


图1 制备温度对粒径的影响

Fig. 1 Effect of preparation temperature on particle size

2.2.3 均质压力 在表面活性剂PVP K30-卵磷脂(1:1)、制备温度0℃、均质次数为10次的条件下，考察均质压力40、60、80、100 MPa对纳米粒粒径的影响，结果见图2。由图可知，在均质压力40~80 MPa范围内粒径逐渐变小，但增大至100 MPa时反而上升，故选择80 MPa作为均质压力。

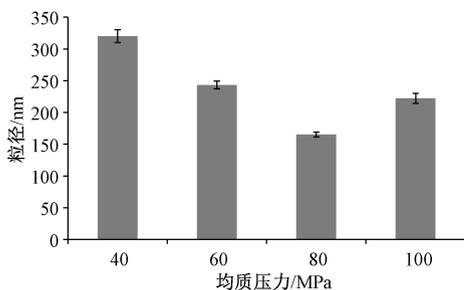


图2 均质压力对粒径的影响

Fig. 2 Effect of homogenization pressure on particle size

2.2.4 均质次数 在表面活性剂PVP K30-卵磷脂(1:1)、制备温度0℃、均质压力80 MPa的条件下，考察均质次数6、8、10、12、15、20次对纳

米粒粒径的影响，结果见图3。由图可知，随着均质次数增加粒径逐渐减小，在12次时最小，而15、20次时略有变大趋势，故选择12次作为均质次数。

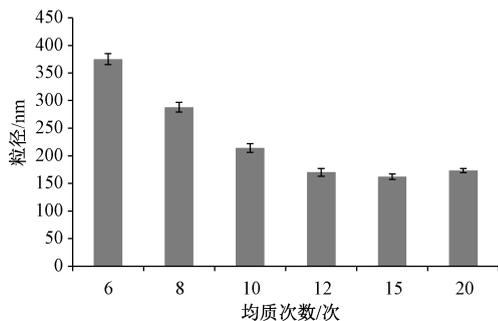


图3 均质次数对粒径的影响

Fig. 3 Effect of homogenization frequency on particle size

2.3 纳米混悬剂制备 根据“2.2”项下结果，确定最优制备工艺为取50 mg柚皮素溶于5 mL无水乙醇中，作为溶液A；称取泊洛沙姆、卵磷脂各0.1 g，加入50 mL蒸馏水溶解，作为溶液B，在制备温度0℃、转速800 r/min的条件下，将溶液A缓慢滴加到溶液B中，旋蒸约30 min以除去乙醇，浓缩后体积约为40 mL，在80 MPa均质压力下均质12次，即得。

2.4 粒径、PDI、Zeta电位测定 取纳米混悬剂100 μL，3.5 mL蒸馏水稀释，测定粒径、PDI、Zeta电位，平行6次，取平均值，测得三者分别为(161.67±4.23) nm、0.105±0.011、(-30.47±1.15) mV。见图4~5。

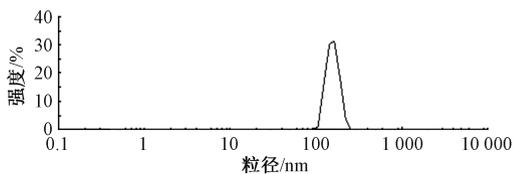


图4 纳米混悬剂粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of nanosuspensions

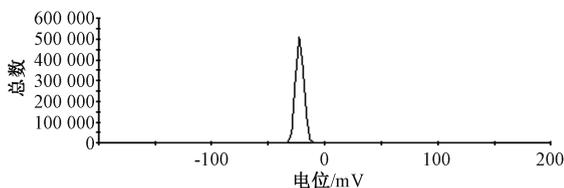


图5 纳米混悬剂Zeta电位

Fig. 5 Zeta potential of nanosuspensions

2.5 冻干粉制备 取纳米混悬液若干份，每份4 mL，以5%甘露醇-乳糖(3:2)为冻干保护剂，

按照表1程序进行预冻、升华、解析,即得纳米混悬液冻干粉。取0.2 g, 0.5 mL蒸馏水复溶,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项下方法进样测定,测得含有量为2.22%,再按照纳米混悬剂处方比例称取柚皮素、辅料,加入蒸馏水、6%甘露醇-乳糖(3:2),同法冻干,即得物理混合物冻干粉。

表1 冻干粉冻干程序

Tab. 1 Freeze-drying procedure for freeze-dried powder

| 程序   | 温度/℃ | 时间/h |
|------|------|------|
| 预冻阶段 | -60  | 6    |
| 升华阶段 | -50  | 2    |
|      | -45  | 12   |
|      | -35  | 2    |
|      | -20  | 2    |
| 解析阶段 | 0    | 2    |
|      | 10   | 2    |
|      | 25   | 6    |

2.6 体外释药行为 取纳米混悬剂、物理混合物冻干粉各0.2 g(以柚皮素计,含有量为4.44 mg),装入胶囊,按2015年版《中国药典》四部0931项下二法进行考察,温度(37±1)℃,转速100 r/min,溶出介质100 mL超声水,于0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 min各取样3.0 mL,并补足至3.0 mL,溶液经0.22 μm微孔滤膜过滤,HPLC法测定柚皮素含有量,计算累积释放度,绘制溶出曲线,见图6。由图可知,纳米混悬剂冻干粉在40 min时基本完全溶出,而物理混合物冻干粉在90 min时仅为35.60%。

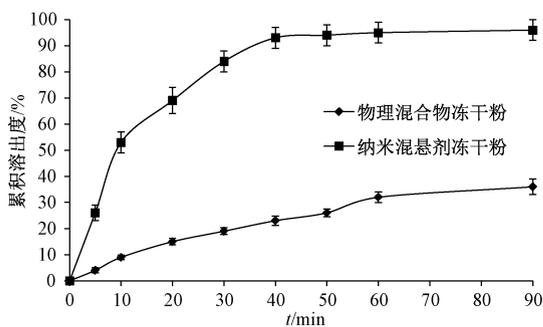


图6 样品体外释放曲线

Fig. 6 In vitro release curves for samples

## 2.7 药动学行为研究

2.7.1 灌胃液制备 取纳米混悬剂、物理混合物冻干粉(以柚皮素计5 mg)各228 mg,置于3 mL蒸馏水中,混匀,即得。

2.7.2 给药方案及血浆采集 12只大鼠随机分为2组,每组6只,给药剂量15 mg/kg,于0、5、10、15、30、45、60、90、180、240、360 min眼眶采血各约0.3 mL,置于肝素化离心管中,3 500 r/min离心5 min,分取上层血浆置于另一空白离心管中,-20℃冰箱中保存。

2.7.3 样品处理<sup>[6]</sup> 取血浆样品100 μL,加入2%甲酸30 μL,涡旋3 min,继续加入乙酸乙酯1.5 mL,涡旋8 min提取后12 000 r/min离心15 min,上清液转移至另一空白离心管中,45℃氮气吹干,100 μL甲醇复溶,置于进样瓶内衬管中,在“2.1.1”项条件下进样20 μL测定。

2.7.4 方法学考察 配制500、400、250、100、50、20 ng/mL对照品溶液,各取300 μL,氮气吹干后加入300 μL空白血浆,振荡混匀,即得对照品溶液,在“2.1.1”项条件下进样20 μL测定,以峰面积(Y)对溶液质量浓度(X)进行线性回归,得方程为 $Y=0.1127X+9.6872$ ( $R^2=0.9986$ )。取20、250、500 ng/mL对照品溶液,在“2.1.1”项条件下进样测定6次,测得柚皮素日内精密密度RSD均小于1.92%,表明该方法精密密度良好。取处理后的血浆样品溶液,48 h内设置6次进样点,在“2.1.1”项条件下进样测定,测得柚皮素峰面积RSD为1.88%,表明溶液在48 h内稳定性良好。取500、250、50 ng/mL血浆对照品溶液,在“2.1.1”项条件下进样测定,测得回收率在91.38%~96.52%之间。

2.7.5 测定结果 绘制血药浓度-时间曲线,通过3P97程序统计矩模型计算主要药动学参数,结果见图7、表2。由此可知,纳米混悬剂 $t_{max}$ 较柚皮素显著提前( $P<0.05$ ), $C_{max}$ 由(203.81±30.41) ng/mL提高至(378.24±81.53) ng/mL, $AUC_{0-t}$ 为后者的1.86倍。

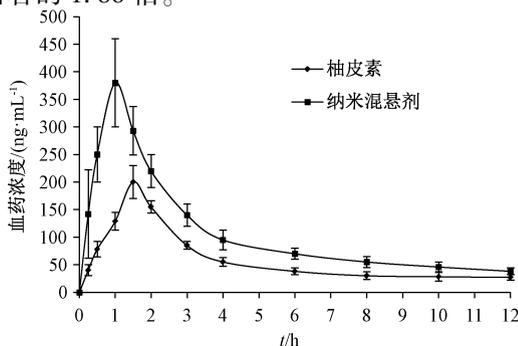


图7 样品血药浓度-时间曲线

Fig. 7 Plasma concentration-time curves for samples

表2 样品主要药动学参数 ( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 2 Main pharmacokinetic parameters for samples ( $\bar{x}\pm s$ )

| 参数                 | 单位                     | 柚皮素          | 纳米混悬剂            |
|--------------------|------------------------|--------------|------------------|
| $t_{max}$          | h                      | 1.96±0.37    | 1.08±0.19*       |
| $C_{max}$          | ng·mL <sup>-1</sup>    | 203.81±30.41 | 378.24±81.53**   |
| AUC <sub>0-t</sub> | ng·mL <sup>-1</sup> ·h | 706.57±81.54 | 1318.19±143.79** |
| AUC <sub>0-∞</sub> | ng·mL <sup>-1</sup> ·h | 719.34±84.17 | 1406.44±150.91** |

注:与柚皮素比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

### 3 讨论

在制备纳米混悬剂过程中,有机溶剂与水互溶程度越高,搅拌条件下两相混合时扩散越快,越有利于小粒径纳米粒快速形成,综合考虑溶解度、毒性等因素,选择无水乙醇作为制备溶剂。据报道<sup>[14]</sup>,沉淀法制备纳米粒是放热过程,温度较高时会增加纳米粒子之间碰撞机会,容易出现晶体成长和纳米粒聚集,故较低的制备温度有助于获得粒径、PDI均较小的纳米混悬剂,本实验选择0℃(冰水混合物)。

另外,制备时需加入一定量表面活性剂,通过吸附于药物粒子表面来提供电荷排斥作用或立体位阻作用,从而防止纳米粒聚集,提高稳定性。前期预实验对泊洛沙姆188、聚山梨酯80、聚乙烯醇等进行了筛选,发现所得纳米粒粒径均较大,其原因可能是这些表面活性剂不能吸附于纳米粒表面,无法提供电荷排斥作用或立体位阻作用<sup>[15]</sup>。由于表面活性剂联合应用可提高纳米粒长期稳定性<sup>[16]</sup>,故实验选择PVP K30-卵磷脂(1:1),此时所制备的纳米粒粒径较小。

体内药动学研究结果显示,柚皮素纳米混悬剂相对生物利用度较原料药提高了1.68倍,其原因可能如下:纳米粒口服后一部分可在伊派尔结(约占整个胃肠道黏膜的1/4)中聚集,并通过淋巴结中的M细胞最终进入血液循环<sup>[17-18]</sup>;增加了药物与胃肠道的接触面积,同时其黏附性使药物在胃肠道停留时间延长,有助于充分吸收;纳米混悬剂技术提高了柚皮素溶解度和溶出度,有助于溶解后的药物顺利吸收进入血液循环;处方中表面活性剂也具有促进药物吸收的作用。据报道<sup>[19]</sup>,纳米混悬剂生物利用度提高程度还受难溶性药物基本性质(分子量大小、脂溶性、熔点、晶型、分子极性表面积等)、纳米混悬剂本身理化性质(稳定性、溶解度、粒径分布等)、机体生理特性等因素影响,故将不同难溶性药物制成纳米混悬剂后,其生物利用度提高程度存在较大差别,值得研究人员关注。

### 参考文献:

[1] Mir I A, Tiku A B. Chemopreventive and therapeutic potential of "naringenin," a flavanone present in citrus fruits[J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(1): 27-42.

[2] Orhan I E, Nabavi S F, Daglia M, et al. Naringenin and atherosclerosis: a review of literature [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 16(3): 245-251.

[3] 杨颖,罗晖,吕湛. 柚皮苷与柚皮素对ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉粥样硬化斑块形成的作用[J]. *医药导报*, 2016, 35(11): 1181-1185.

[4] 王建筑,李菲,毕研平,等. 柚皮素磷脂复合物的制备和表征[J]. *中成药*, 2018, 40(7): 1612-1614.

[5] Khan A W, Kotta S, Ansari S H, et al. Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(5): 772-779.

[6] 卞龙艳. 柚皮素固体脂质纳米粒制剂的制备、表征及药动学评价[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(12): 1424-1430.

[7] 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.

[8] 李静静,贾涛涛,田睿,等. 柚皮素纳米结构脂质载体的处方优化和初步评价[J]. *中草药*, 2015, 46(2): 211-215.

[9] 王章姐,胡容峰,王国凯,等. Box-Behnken设计-效应面法优化柚皮素自微乳给药系统[J]. *中草药*, 2014, 45(17): 2461-2466.

[10] 周时光,林雯,陈晨,等. 格列本脲纳米片的制备及溶出度考察[J]. *医药导报*, 2014, 33(11): 1509-1513.

[11] 和素娜,杨晖,段冷昕,等. 利培酮纳米混悬原位凝胶的制备与释药特性研究[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(10): 1207-1212.

[12] 石森,张洪,吕舰,等. 氯雷他定纳米混悬剂的制备与稳定性考察[J]. *医药导报*, 2018, 37(11): 1381-1385.

[13] 贾欣,张超锋,张青青,等. 2-甲氧基雌二醇纳米混悬剂的安全性实验[J]. *医药导报*, 2016, 35(9): 934-937.

[14] 吴浩天,赵京华,贾德超,等. 莜术醇纳米混悬剂的制备和体外释药研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2017, 34(8): 623-628.

[15] 申献玲,张洪,彭锐. 泊那替尼纳米混悬剂的表面活性剂筛选及其稳定性考察[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(12): 1147-1149.

[16] Müller R H, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique[J]. *Int J Pharm*, 1998, 160(2): 229-237.

[17] 徐凯,魏永鸽. 高乌甲素磷脂复合物纳米粒的制备、表征及药动学研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(5): 870-874.

[18] 杨金枝,孙文霞,王姣姣,等. 白杨素固体脂质纳米粒的制备及其药动学行为[J]. *中成药*, 2018, 40(1): 76-80.

[19] 李炜. 难溶性药物理化性质对其纳米混悬剂生物利用度的影响[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2013.