

托伐普坦纳米结构脂质载体的制备与药动学研究

王丹, 任宁君, 史步新*

溧阳市人民医院 药剂科, 江苏 溧阳 213300

摘要: 目的 制备托伐普坦纳米结构脂质载体 (Tol-NLCs), 以提高托伐普坦 (Tol) 的口服生物利用度。方法 根据溶解度对辅料进行筛选, 包括固体脂质 (双硬脂酸甘油酯、山嵛酸甘油酯、聚乙二醇-8山嵛酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯和单亚油酸甘油酯)、液体脂质 (油酸聚乙二醇甘油酯、单油酸甘油酯、月桂酸聚乙二醇甘油酯和单辛酸丙二醇酯) 和表面活性剂 (聚山梨酯 80、聚氧乙烯蓖麻油、聚乙二醇-15羟基硬脂酸酯和泊洛沙姆 188), 采用乳化超声-低温固化法制备 Tol-NLCs, 并使用 Box-Behankn 效应面法优化处方; 分别采用电镜 (TEM) 观察、粒径分布及 Zeta 电位测定、差示扫描量热法 (DSC) 对制备的 Tol-NLCs 进行表征, 同时比较 Tol 原料药和 Tol-NLCs 体外药物释放特点、跨膜转运特征; 比较 Tol 混悬液和 Tol-NLCs 经大鼠 ig 给药后的体内药动学特征。**结果** 根据溶解度确定以山嵛酸甘油酯作为固体脂质, 单油酸甘油酯作为液体脂质, 聚乙二醇-15羟基硬脂酸酯作为表面活性剂, 通过优化得到 Tol-NLCs 的最佳处方: 总脂质质量浓度为 40.0 mgmL⁻¹, 表面活性剂质量浓度为 25.0 mg·mL⁻¹, 超声时间为 6 min。在透射电镜下可观察到制备的 Tol-NLCs 呈类球状, 分布均匀; Tol-NLCs 的平均粒径为 (106.2±14.7) nm, PDI 为 (0.196±0.004), Zeta 电位为 (-26.6±0.6) mV; 药物在 Tol-NLCs 中以非结晶形式存在。Tol-NLCs 在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中表现为前期药物释放较快, 后期药物释放平缓。Caco-2 细胞跨膜转运结果显示, Tol-NLCs 的 $P_{app (AP \rightarrow BL)}$ 值为 $(11.16 \pm 0.58) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $P_{app (BL \rightarrow AP)}$ 值为 $(4.51 \pm 0.46) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 与 Tol 溶液相比, $P_{app (AP \rightarrow BL)}$ 表现出明显增加趋势, $P_{app (BL \rightarrow AP)}$ 表现出明显降低趋势, 说明 Tol 包裹在 NLCs 中促进了药物吸收, 抑制了 P-糖蛋白 (P-gp) 的外排作用。与 Tol 混悬液相比, 大鼠 ig Tol-NLCs 后, Tol 生物利用度提高了 2.5 倍。**结论** 按优化处方制备的 Tol-NLCs, 能够显著提高药物的生物利用度。

关键词: 托伐普坦; 纳米结构脂质载体; 生物利用度; 乳化超声-低温固化法; 药动学; 细胞跨膜转运

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 04-0765-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.010

Preparation and pharmacokinetics of tolvaptan loaded nanostructured lipid carriers

WANG Dan, REN Ningjun, SHI Buxin

Department of Pharmacy, Liyang People's Hospital, Liyang 213300, China

Abstract: Objective To prepare tolvaptan loaded nanostructured lipid carriers (Tol-NLCs) for improving the oral bioavailability of tolvaptan. **Methods** Based on solubility, excipients were screened, including solid lipids (precircol ATO 5, campriitol 888 ATO, compritol HD5 ATO, glycerol monostearate, maisine CC), liquid lipids (labrafil M 1944 CS, peceol, gelucire 44/14, capryol 90) and surfactants (tween 80, cremophore EL, solutol HS15, poloxamer 188). Tol-NLCs were prepared using an emulsified ultrasound low-temperature curing method and the formulation was optimized using Box-Behankn effect surface methodology. The prepared Tol-NLCs were characterized by electron microscopy (TEM) observation, particle size distribution and Zeta potential measurement, and differential scanning calorimetry (DSC). At the same time, the *in vitro* drug release characteristics and transmembrane transport characteristics of Tol raw materials and Tol-NLCs were compared. Compare the *in vivo* pharmacokinetic characteristics of Tol suspension and Tol-NLCs after ig administration in rats. **Results** Based on the solubility, the optimal formula for Tol-NLCs was determined using glycerol valerate as a solid lipid, glycerol monooleate as a liquid lipid, and polyethylene glycol 15 hydroxystearate as a surfactant. Through optimization, the total lipid concentration was 40.0 mgmL⁻¹, the surfactant concentration was 25.0 mgmL⁻¹, and the ultrasound time was six minutes. Under transmission electron microscopy, the prepared Tol-NLCs can be observed to be

收稿日期: 2023-11-20

第一作者: 王丹, 本科, 副主任药师, 主要从事药学研究。E-mail: wangdan202311@163.com

*通信作者: 史步新 (1984—), 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事药学研究。E-mail: shibuxin1988@163.com

spherical in shape and evenly distributed. The average particle size of Tol-NLCs is (106.2 ± 14.7) nm, PDI is (0.196 ± 0.004) , and Zeta potential is (-26.6 ± 0.6) mV. The drug exists in an amorphous form in Tol-NLCs. Tol-NLCs exhibit faster drug release in the early stage and slower drug release in the later stage in pH 6.8 phosphate buffer. The results of Caco-2 cell transmembrane transport showed that the $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ value of Tol-NLCs was $(11.16 \pm 0.58) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, and the $P_{app(BL \rightarrow AP)}$ value was $(4.51 \pm 0.46) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Compared with Tol solution, $P_{app(AP \rightarrow BL)}$ showed a significant increase trend, while $P_{app(BL \rightarrow AP)}$ showed a significant decrease trend, indicating that Tol encapsulation in NLCs promoted drug absorption and inhibited the efflux of P-glycoprotein (P-gp). Compared with Tol suspension, the bioavailability of Tol increased by 2.5 times after ig of Tol-NLCs in rats. **Conclusion** Tol-NLCs prepared according to optimized prescription can significantly improve the bioavailability of drugs and have important value for the development of Tol dosage forms.

Key words: tolvaptan; nanostructured lipid carriers; bioavailability; emulsification ultrasound low-temperature curing method; pharmacokinetics; cell transmembrane transport

托伐普坦(tolvaptan, Tol)是一种选择性抗利尿素 V_2 受体拮抗剂,通过阻断 V_2 受体来抑制抗利尿激素的作用,从而降低水通道蛋白表达^[1],临床上用于治疗心力衰竭、肝硬化以及抗利尿激素分泌失调综合征(SIADH)患者的高容量性和正常容量性低钠血症^[2]。Tol属于生物药剂学分类系统(BCS)IV类药物,其在水中的溶解度低($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 25°C , pH 2~12)、渗透性差,在大鼠和犬体内的生物利用度仅为0.63%和2%^[3]。为了提高Tol的口服生物利用度,研究人员已将其开发成纳米晶体^[4]、固体分散体^[5]、自乳化释药系统^[3]和前药^[6]等。纳米结构脂质载体(NLCs)是采用可生物降解的固体和液体二元混合脂质作为载体,将脂溶性药物以分子形式溶解在混合脂质中,以提高难溶性药物的溶解度及口服生物利用度^[7-8]。因此,本研究将Tol制备成纳米结构脂质载体(Tol-NLCs),并通过大鼠体内药动学研究评价其口服生物利用度,为其进一步的开发应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

SM-650C 超声波纳米材料分散器(南京舜玛仪器设备有限公司);HWCL-3型集热式恒温磁力搅拌浴(郑州长城科工贸有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘鑫仪器仪表有限公司);VORTEX21 K 高速冷冻离心机(上海麦尚科学仪器有限公司);NS-90Z Plus 纳米粒度分析仪(英国 Malvern 公司);HT780 型透射电子显微镜(日本日立公司);DSC-600 型差示扫描量热仪(南京汇诚仪器仪表有限公司);透析袋(截留相对分子质量为 12 000,上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

Tol原料药(合肥信风科技开发有限公司,批号:20210917,质量分数:99.9%);双硬脂酸甘油酯、山

萘酸甘油酯、聚乙二醇-8 山萘酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、油酸聚乙二醇甘油酯、单亚油酸甘油酯、月桂酸聚乙二醇甘油酯、单油酸甘油酯、单辛酸丙二醇酯均由法国嘉法狮公司惠赠;聚山梨酯 80、聚氧乙烯蓖麻油、聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯、泊洛沙姆 188 均由德国巴斯夫有限公司惠赠;磷钨酸(上海麦克林生化科技股份有限公司);pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液为实验室自制;其他试剂均为分析级。

1.3 实验动物

SD 大鼠(SPF 级),体质量 200~250 g,雌雄各半,由苏州大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SYXK(苏)2021-0065。实验设计通过苏州大学实验动物伦理委员会批准,批准号:02308116。

1.4 细胞来源

Caco-2 细胞购自通派(上海)生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 处方筛选

2.1.1 固体脂质种类筛选 NLCs 中的固体脂质种类会影响到药物包载率、释药速率以及制剂的物理稳定性,因此需要对固体脂质种类进行筛选^[9]。精密称取所筛选的固体脂质(双硬脂酸甘油酯、山萘酸甘油酯、聚乙二醇-8 山萘酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯和单亚油酸甘油酯)各 1.0 g,分别加入到玻璃瓶中,再向每个玻璃瓶中加入 Tol 原料药 50 mg,在所选脂质熔点以上 $5 \sim 10^\circ \text{C}$ 的水浴中加热玻璃瓶,持续搅拌,观察药物溶解情况,若药物未完全溶解,再向玻璃瓶中加入对应的固体脂质,直至药物完全溶解,记录各固体脂质加入总量,粗略计算药物在各固体脂质中的溶解度^[10],结果见表 1。

选择对 Tol 溶解度较高的固体脂质制备纳米结构脂质载体,以提高载体的载药能力。所筛选的固

表1 Tol在不同固体脂质中的溶解度($\bar{x}\pm s, n=3$)

固体脂质	溶解度/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
双硬脂酸甘油酯	8.5±0.3
山嵛酸甘油酯	25.6±0.5
聚乙二醇-8山嵛酸甘油酯	19.4±0.4
单硬脂酸甘油酯	13.5±0.3
单亚油酸甘油酯	10.4±0.4

体脂质对 Tol 溶解度从大到小依次为山嵛酸甘油酯 > 聚乙二醇-8山嵛酸甘油酯 > 单硬脂酸甘油酯 > 单亚油酸甘油酯 > 双硬脂酸甘油酯。根据溶解度测定结果,本研究选择对 Tol 原料药溶解能力最大的山嵛酸甘油酯作为纳米结构脂质载体的固体脂质进行处方考察。

2.1.2 液体脂质种类筛选 液体脂质可使 NLCs 中的固体脂质原有的有序晶体结构遭到破坏,更多的药物被 NLCs 包载,且可以避免 NLCs 在存放期间的药物泄露^[11],因此需要对液体脂质种类进行筛选。精密称取所筛选的液体脂质(油酸聚乙二醇甘油酯、单油酸甘油酯、月桂酸聚乙二醇甘油酯和单辛酸丙二醇酯)各 1.0 g,分别加入到玻璃瓶中,再向每个玻璃瓶中加入过量的 Tol 原料药,密闭后在 37 °C 下以 150 r·min⁻¹ 连续搅拌 48 h,将药物脂质混合物经 5 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,分离上清液,适当稀释,经 HPLC 测定药物含量^[12],计算其在各液体脂质中的溶解度,结果见表 2。

表2 Tol在不同液体脂质中的表观溶解度($\bar{x}\pm s, n=3$)

液体脂质	溶解度/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
油酸聚乙二醇甘油酯	8.8±0.3
单油酸甘油酯	26.4±0.4
月桂酸聚乙二醇甘油酯	20.7±0.6
单辛酸丙二醇酯	11.3±0.2

所筛选的液体脂质对 Tol 溶解度从大到小依次为单油酸甘油酯 > 月桂酸聚乙二醇甘油酯 > 单辛酸丙二醇酯 > 油酸聚乙二醇甘油酯。根据溶解度测定结果,本研究选择对 Tol 原料药溶解能力最大的单油酸甘油酯作为纳米结构脂质载体的液体脂质进行处方考察。

2.1.3 表面活性剂种类筛选 表面活性剂可降低 NLCs 中脂质与水介质间的界面张力,形成粒径较

小的 NLCs,并提高 NLCs 的物理稳定性,但是表面活性剂在达到临界胶束浓度后会形成胶束,更多的药物增溶在胶束中,会竞争性地降低药物在 NLCs 中的包载量,且长时间放置药物会发生泄露^[13],因此需要选择对药物溶解度较小的表面活性剂制备 NLCs。精密称取所筛选的表面活性剂(聚山梨酯 80、聚氧乙烯蓖麻油、聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯和泊洛沙姆 188) 10 mg,分别加入到玻璃瓶中,再分别加纯化水至 1.0 g,溶解后配制成 10 mg·g⁻¹ 的表面活性剂溶液;再向每个玻璃瓶中加入过量的 Tol 原料药,密闭后在 37 °C 下以 150 r·min⁻¹ 连续搅拌 48 h,经 5 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,分离上清液,适当稀释,经 HPLC 测定药物含量,计算其在各表面活性剂中的溶解度,结果见表 3。

表3 Tol在不同表面活性剂中的溶解度($\bar{x}\pm s, n=3$)

表面活性剂	溶解度/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
聚山梨酯 80	10.3±0.4
聚氧乙烯蓖麻油	14.6±0.5
聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯	2.1±0.2
泊洛沙姆 188	9.8±0.3

所筛选的表面活性剂对 Tol 溶解度从大到小依次为:聚氧乙烯蓖麻油 > 聚山梨酯 80 > 泊洛沙姆 188 > 聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯。根据溶解度测定结果,本研究选择对 Tol 原料药溶解能力最小的聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯作为纳米结构脂质载体的表面活性剂进行处方考察。

2.1.4 混合脂质比例筛选 选择 Tol 溶解度最高的固体脂质(山嵛酸甘油酯)和液体脂质(单油酸甘油酯)按不同比例(100:0、90:10、80:20、70:30、60:40)混合,脂质混合物在 80 °C 水浴中保温 30 min,使脂质混合物充分融化,静置 30 min 观察是否存在相分层;取出未分层的样品在室温下保存 24 h,采用差示扫描量热仪测定各组脂质的熔程^[14],测定方法为:取各组样品 3~5 mg 放置在铝锅中,加热温度为 25~85 °C,升温速度为 5 °C·min⁻¹,氮气体积流量为 50 mL·min⁻¹,同时用空铝锅作为对照;并按照“2.1.1”项下方法粗略测定药物在各比例混合脂质中的溶解度;同时以不同比例固体脂质与液体脂质配比制备 NLCs,按“2.3”项方法测定粒径分布,结果见表 4。

实验结果显示,不同比例的固体脂质和液体脂

表4 混合脂质性质评价($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 4 Property evaluation of mixed lipids ($\bar{x}\pm s, n=3$)

固体脂质-液体脂质	相分层	熔程/°C	溶解度/(mg·g ⁻¹)	粒径分布/nm
100:0		65~77	25.6±0.5	342.5±26.5
90:10	无分层	58~67	42.3±0.3	241.9±21.7
80:20	无分层	48~56	45.6±0.7	166.8±12.9
70:30	无分层	45~52	46.8±0.4	211.4±22.3
60:40	无分层	44~52	48.4±0.6	256.4±18.7

质在熔融状态互溶性良好,未出现相分离现象;随着液体脂质比例的增加(由100:0升至80:20),混合脂质的熔点呈降低趋势,再继续升高液体脂质比例(由80:20升至60:40),熔点降低趋势减缓;溶解度测定结果显示,随着液体脂质比例的增加,药物溶解度升高,这是由于液体脂质的加入破坏了固体脂质原有的有序晶体结构,提供了更多包的载药物的空间;而随着液体脂质占比增大,制备的NLCs的粒径先减小后增大。根据综合评估结果,本研究确定选择固体脂质与液体脂质比例为80:20制备纳米结构脂质载体。

2.2 Tol-NLCs的制备

采用乳化超声-低温固化法^[15]制备Tol-NLCs。按照质量比为80:20称取固体脂质(山嵛酸甘油酯)和液体脂质(单油酸甘油酯)于同一个玻璃试管中,在65 °C水浴中加热至脂质完全熔融,称取处方量Tol原料药加入到混合脂质中,搅拌至药物完全溶解,作为油相,备用;另配制表面活性剂(聚乙二醇-15羟基硬脂酸酯)水溶液,水浴加热至65 °C,作为水相,备用。将水相通过注射器缓慢滴加到油相中,并以3 000 r·min⁻¹连续搅拌30 min,形成初级乳液;通过超声波纳米材料分散器以200 W恒定功率超声一段时间,得到的胶体溶液在室温下缓慢冷却,即得到Tol-NLCs。

2.3 粒径分布测定

使用NS-90Z Plus纳米粒度分析仪测定Tol-NLCs的粒径分布。用移液枪移取Tol-NLCs 200 μL加入到厚度为10 mm的聚苯乙烯比色皿中,再加入蒸馏水800 μL进行稀释,轻轻振摇,采用动态光散射法测定粒径分布。测定参数设置如下:氦氛激光器,功率为4 mW,波长为633 nm,室温为25 °C,角度固定为90°。每份样品均测定3次,并取平均值。

2.4 包封率测定

使用低温超速离心法测定Tol-NLCs的包封率^[16]。移取Tol-NLCs溶液4.0 mL加入到超速离心

管中,固定到离心机中,设置离心温度为5 °C,10 000 r·min⁻¹离心30 min,收集上层澄清液体,移取1.0 mL加甲醇稀释至10 mL,作为游离药物待测液($C_{\text{游离}}$);另取Tol-NLCs溶液1.0 mL加甲醇稀释至100 mL,振摇溶解,作为总药物待测液($C_{\text{总}}$);取上述2种待测液,分别测定药物浓度,计算药物包封率。每份样品均测定3次,并取平均值。

$$\text{包封率} = (C_{\text{总}} \times 100 - C_{\text{游离}} \times 10) / (C_{\text{总}} \times 100)$$

2.5 处方优化

根据前期探索性实验研究结果,本研究以总脂质浓度(X_1)、表面活性剂浓度(X_2)和超声时间(X_3)作为自变量,以Tol-NLCs的粒径分布(Y_1)和包封率(Y_2)作为因变量,通过Box-Behnken实验设计优化Tol-NLCs处方。自变量水平值见表5,因变量 Y_1 目标为最小值,因变量 Y_2 目标为最大值。处方优化共需制备15个处方,每个处方的制备量为50 mL,并测定其粒径分布和包封率,结果见表6。

表5 Box-Behnken实验设计中自变量水平

Table 5 Level of independent variables in Box-Behnken experimental design

自变量	水平		
	低(-1)	中(0)	高(+1)
X_1 /(mg·mL ⁻¹)	20.0	40.0	60.0
X_2 /(mg·mL ⁻¹)	10.0	20.0	30.0
X_3 /min	3	6	9

Y_1 采用多元二次(Quadratic)模型拟合较为合适($P < 0.05$, F 值为14.25),失拟项不显著($P > 0.05$, F 值为0.022),预测 R^2 为0.964 3,调整 R^2 为0.966 7,二者基本一致,表明模型预测可信度较高。由方差分析可知(表7), X_1 、 X_2 为显著模型项($P < 0.05$),即对 Y_1 有显著影响,其余模型项对 Y_1 无显著影响($P > 0.05$),3D效应面图见图1。

同样, Y_2 采用多元二次(Quadratic)模型拟合较为合适($P < 0.05$, F 值为84.35),失拟项不显著($P >$

表6 Box-Behnken实验设计及结果
Table 6 Results of experimental design

编号	自变量			因变量	
	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	X_3/min	Y_1/nm	$Y_2/\%$
1	60.0	20.0	9	186.4	75.8
2	20.0	30.0	6	64.8	65.9
3	40.0	10.0	3	242.7	81.3
4	60.0	20.0	3	202.9	89.4
5	40.0	30.0	9	79.8	71.0
6	20.0	20.0	3	151.6	67.4
7	20.0	10.0	6	192.7	59.6
8	40.0	10.0	9	202.8	68.8
9	60.0	30.0	6	129.5	89.6
10	60.0	10.0	6	279.2	87.5
11	40.0	20.0	6	164.7	81.8
12	20.0	20.0	9	89.6	51.8
13	40.0	20.0	6	107.1	83.9
14	40.0	20.0	6	113.2	84.6
15	40.0	20.0	6	108.6	83.6

表7 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Y_1 影响的方差分析Table 7 ANOVA results for effect of X_1 , X_2 and X_3 on Y_1

来源	平方和	自由度	平均值	F值	P值	显著性
模型	53 048.15	9	5 894.24	14.250	0.004 6	显著
X_1	11 197.56	1	11 197.56	27.070	0.003 5	显著
X_2	35 738.01	1	35 738.01	86.400	0.000 2	显著
X_3	2 708.48	1	2 708.48	6.550	0.050 7	不显著
X_1X_2	118.81	1	118.81	0.290	0.615 0	不显著
X_1X_3	517.56	1	517.56	1.250	0.314 2	不显著
X_2X_3	30.80	1	30.80	0.074	0.795 8	不显著
X_1^2	128.86	1	128.86	3.120	0.137 8	不显著
X_2^2	1 408.80	1	1 408.80	3.410	0.124 3	不显著
X_3^2	415.52	1	415.52	1.000	0.363 3	不显著
残差	2 068.14	5	413.63			
失拟项	65.74	3	21.91	0.022		不显著
纯误差	2 002.41	2	1 001.20			
总和	55 116.29	14				

有碳膜铜网格上,接着在铜网格上加入 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磷钨酸溶液染色,放置到阴凉处风干,样品在透射电镜下观察并拍摄照片(图3)。电镜观察结果显示,Tol-NLCs呈类球状,均匀分散,无聚集,粒径大多数在 100 nm 左右。

2.6.2 粒径分布及Zeta电位测定 采用NS-90Z Plus纳米粒度分析仪测定Tol-NLCs的粒径分布、多聚分散系数(PDI)与Zeta电位。取新制备的Tol-NLCs,按照“2.3”项下方法测定粒径分布,每份样品均测定3次,并取平均值。Zeta电位通过电泳光散

射原理测定,用移液枪移取Tol-NLCs $500\text{ }\mu\text{L}$ 加入到Zeta电位样品池中,设定折射率为1.330,介电常数为79,电流为 5 mA 。每份样品均测定3次,并取平均值。

0.05, F 值为1.24),预测 R^2 为0.981 7,调整 R^2 为0.962 7,二者基本一致,表明模型预测可信度较高。由方差分析可知(表8), X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 为显著模型项($P<0.05$),即对 Y_2 有显著影响,其余模型项对 Y_2 无显著影响($P>0.05$),3D效应面图见图2。

以制备的Tol-NLCs的粒径最小化,包封率最大化为目标,经Box-Behnken实验软件优化获得的最优处方为:总脂质质量浓度为 $40.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、表面活性剂质量浓度为 $25.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,超声时间为 6 min ,其预测Tol-NLCs的粒径为 104.6 nm ,包封率为 85.6% 。按照最优处方连续制备3批Tol-NLCs,其粒径分布为 $(106.2\pm 14.7)\text{ nm}$,包封率为 $(86.3\pm 1.6)\%$,实验值与预测值基本一致,模型预测准确性良好。

2.6 Tol-NLCs质量评价

2.6.1 微观形态电镜(TEM)观察 取适量Tol-NLCs用去离子稀释,取少量稀释液铺展到 300 目涂

图4结果显示,Tol-NLCs的平均粒径为 $(106.2\pm 14.7)\text{ nm}$,PDI为 (0.196 ± 0.004) ,Zeta电位为 $(-26.6\pm 0.6)\text{ mV}$ 。

2.6.3 差示扫描量热法(DSC) 采用DSC对优化后的Tol-NLCs进行热分析。分别称取Tol原料药、Tol与空白NLCs冻干粉物理混合物以及Tol-NLCs

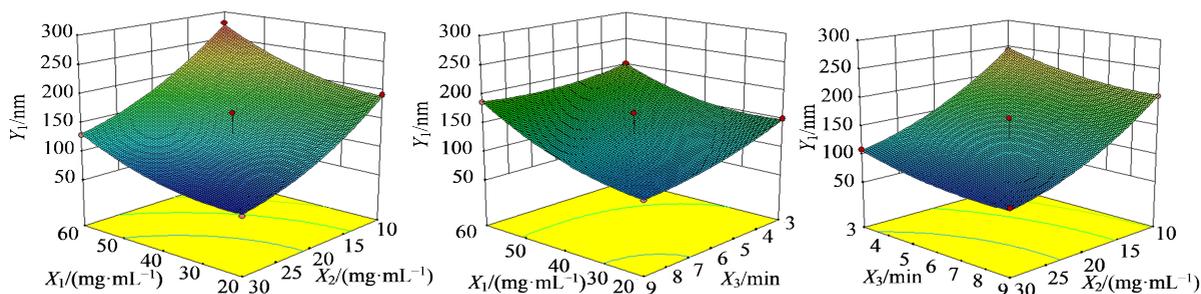


图1 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Y_1 影响的3D效应面图

Fig. 1 3D effect surface diagram of influence of X_1 , X_2 and X_3 on Y_1

表8 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Y_2 影响的方差分析

Table 8 ANOVA results for effect of X_1 , X_2 and X_3 on Y_2

来源	平方和	自由度	平均值	F值	P值	显著性
模型	1 847.64	9	205.29	84.35	<0.000 1	显著
X_1	1 190.72	1	1 190.72	489.24	<0.000 1	显著
X_2	20.80	1	20.80	8.55	0.032 9	不显著
X_3	368.56	1	368.56	151.43	<0.000 1	显著
X_1X_2	4.41	1	4.41	1.81	0.236 1	不显著
X_1X_3	1.00	1	1.00	0.41	0.549 7	不显著
X_2X_3	0.002 5	1	0.002 5	0.001 0	0.975 7	不显著
X_1^2	152.62	1	152.62	62.71	0.000 5	不显著
X_2^2	6.77	1	6.77	2.78	0.156 2	不显著
X_3^2	128.71	1	128.71	52.88	0.000 8	不显著
残差	12.17	5	2.43			
失拟项	7.92	3	2.64	1.24	0.474 7	不显著
纯误差	4.25	2	2.12			
总和	1 859.81	14				

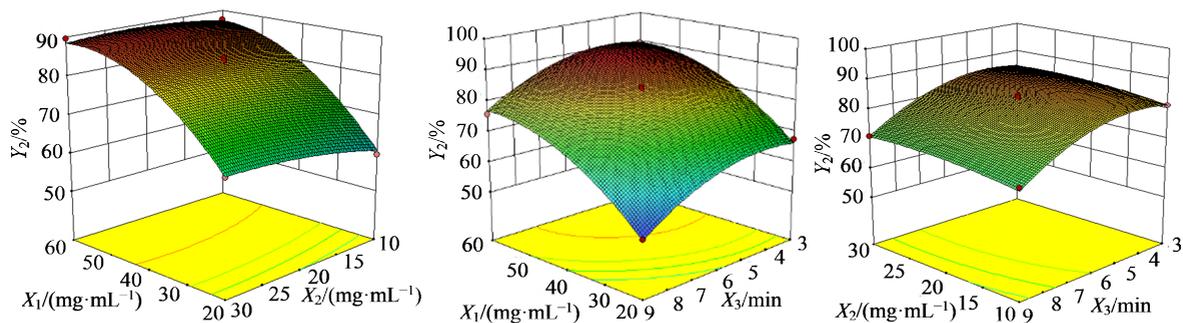


图2 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Y_2 影响的3D效应面图

Fig. 2 3D effect surface diagram of influence of X_1 , X_2 and X_3 on Y_2

冻干粉各约5~7 mg,加入到铝质坩埚中,密封,并以另一个密封空铝质坩埚作为对照,使用差示扫描量热仪在30~300 °C内进行热分析,氮气体积流量为50 mL·min⁻¹,升温速度为5 °C·min⁻¹,结果见图5。

测定结果显示,Tol原料药与物理混合物均在

221 °C出现一个明显的吸热熔融峰,该特征峰为药物熔点,说明原料药均为结晶态;而Tol-NLCs在221 °C附近的药物吸热熔融峰消失,可推测Tol是以无定型态存在于NLCs之中。

2.6.4 体外药物释放 采用透析袋法(截留相对分子质量为12 000)比较Tol-NLCs和Tol原料药的体

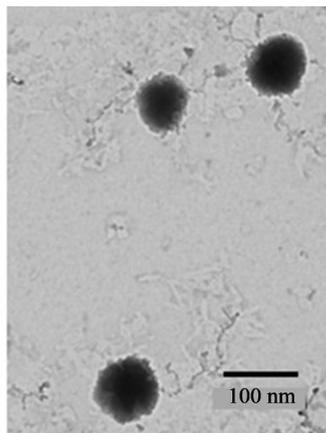


图3 Tol-NLCs透射电镜观察结果
Fig. 3 Observation results of Tol-NLCs by transmission electron microscopy

外释放速率。将透析袋在蒸馏水中浸泡24 h使其充分活化。分别将Tol-NLCs(含Tol 10 mg)和Tol原料药(10 mg)加入到上述透析袋中,系紧两端,在37 °C下加入到pH 6.8介质溶液中(体积为250 mL),磁力搅拌速度为75 r·min⁻¹,每隔一定时间(0.5、1、2、4、6、8、12、24 h)从烧杯中取出5 mL释放介质,0.45 μm滤膜滤过,经适当稀释后检测药物含量,计算在各时间点的累积释放率。

体外释放曲线如图6所示,可以观察到Tol-NLCs中药物呈双相释放模式,即最初的药物呈爆发式释放,大约55%的药物在前4 h内从制剂中释放出来,随后相对较慢的释放持续到24 h。爆发式释放的药物主要是来自于富集在纳米粒子的外表面或浅表面,这部分药物向释放介质的扩散路径较

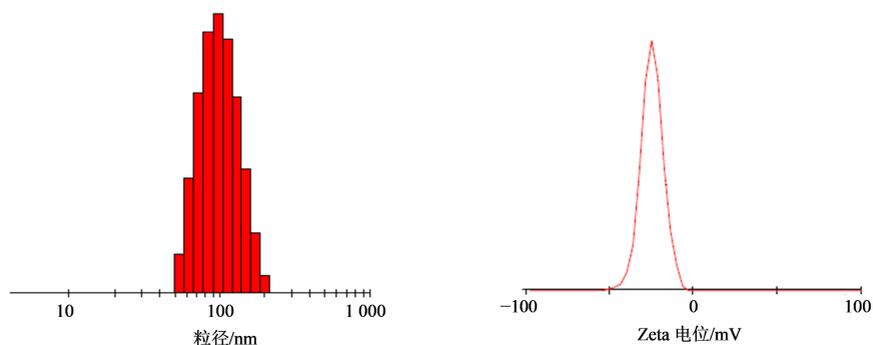


图4 Tol-NLCs的粒径分布和Zeta电位
Fig. 4 Particle size distribution and Zeta potential of Tol-NLCs

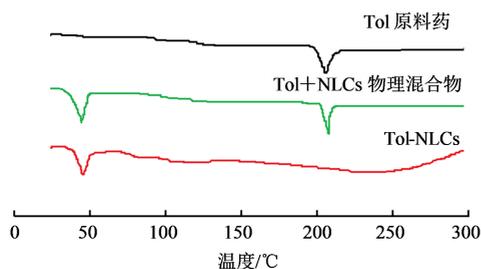


图5 差示扫描量热图
Fig. 5 Differential scanning calorimetry

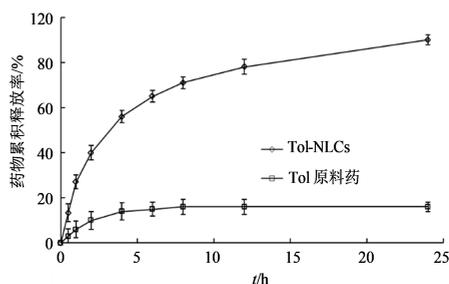


图6 Tol-NLCs和Tol原料药在pH 6.8介质溶液中的体外药物释放曲线($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 In vitro drug release profiles of TOL-loaded NLCs and Tol in pH 6.8 medium solution ($\bar{x}\pm s, n=3$)

短,因此表现为释药速度较快;此外,处方中加入的表面活性剂也会加速药物向介质中释放。而后期药物以恒定速率持续缓慢释放,这部分药物主要来源于纳米粒子的深层,通过扩散和脂质溶蚀使药物释放达到平台。

2.7 Tol-NLCs细胞跨膜转运研究

取出Caco-2细胞株的冻存管在37 °C水浴中迅速摇晃解冻,吸出细胞悬液转移至含有4 mL

DMEM细胞培养基的离心管中,用移液枪轻轻吹打10~20次,混合均匀,2 000 r·min⁻¹下离心3 min,弃上清,加适量DMEM细胞培养基轻轻吹打,使细胞重新分散后转移至细胞培养瓶中,将培养瓶放置在培养箱(37 °C、5%CO₂)中培养3周,加入HBSS(pH 7.4)轻轻吹下细胞,并于2 000 r·min⁻¹下离心3 min,

弃掉上清液,再向Caco-2细胞中加HBSS(pH 7.4)新鲜培养基,轻轻摇晃,混匀。取Caco-2细胞以每孔 5.0×10^5 个细胞的密度接种到0.4 mm孔的12 mm Transwell 聚碳酸酯膜表面,在接种后第5天后更换培养基(供给池1 mL,接收池2 mL),每2天更换1次,直至21 d,得到Caco-2细胞单层,测量上皮电阻(TEER)值,选择TEER值大于 $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 的单层膜用于细胞跨膜转运研究^[17]。用含有 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砜的HBSS(pH 7.4)配制Tol溶液,使用HBSS(pH 7.4)稀释Tol-NLCs,2份药液的最终药物质量浓度均为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;分别取上述2种药液各1.0 mL加入到细胞膜的顶端(AP),作为供给池,再取HBSS(pH 7.4)溶液各2.0 mL加入到细胞膜基底外侧(BL),作为接收池,考察从AP至BL的跨膜转运能力;同样方式,分别取上述2种药液各1.0 mL加入到细胞膜BL侧,作为供给池,再取HBSS(pH 7.4)溶液各2.0 mL加入到AP侧,作为接收池,考察从BL至AP的跨膜转运能力;在预设时间点从接收池中取出接收液,适当稀释后检测药物含量,计算表观渗透率(P_{app}),结果见表9。

$$P_{\text{app}} = dQ/dt \times 1/A \times 1/C_0$$

dQ/dt 为单位时间药物转运量($\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$), A 为Transwell聚碳酸酯膜面积(4.67 cm^2), C_0 为供给液中药物初始质量浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

表9 Tol和Tol-NLCs在Caco-2细胞中的 P_{app} 值($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 9 Apparent permeability coefficients of Tol and Tol-NLCs in Caco-2 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$	
	$P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$	$P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$
Tol溶液	3.26 ± 0.16	5.47 ± 0.37
Tol-NLCs	11.16 ± 0.58	4.51 ± 0.46

Caco-2细胞跨膜转运结果显示,Tol溶液的 $P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 值为 $(3.26 \pm 0.16) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,而 $P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 值为 $(5.47 \pm 0.37) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,表明Tol为P-糖蛋白(P-gp)的底物,Tol被肠细胞吸收后又会外排至肠道内;而Tol-NLCs的 $P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 值为 $(11.16 \pm 0.58) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 值为 $(4.51 \pm 0.46) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,与Tol溶液相比, $P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 表现出明显增加趋势, $P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 表现出明显降低趋势,说明Tol包裹在NLCs中促进了药物吸收,抑制了P-gp的外排作用,这主要归因于2个方面^[18]:①Tol-NLCs的粒径较小,可直接经细胞旁转运进入体循环;②包裹

在NLCs内部的药物在进入细胞内后不会被P-gp识别,降低了P-gp对药物的外排作用。

2.8 Tol-NLCs药动学研究

取12只SD大鼠,雌雄各半,7周龄,体质量190~220 g,实验前12 h禁食不禁水,实验期间禁食禁水。将大鼠随机分为A、B组,用数字编号。A组ig给予Tol混悬液(用0.5%羧甲基纤维素钠作为分散介质),B组ig给予Tol-NLCs,Tol剂量均为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,分别在给药后0.5、1、2、4、6、8、12 h从大鼠眼眶后静脉丛取血约0.5 mL至肝素钠涂层的离心管中,血样在 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心5 min,分离上层血浆样品至 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。将血浆放置在室温中解冻,用移液枪精密移取血浆200 μL 至离心管中,加入水杨酸苄酯10 μL (质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为内标,涡旋混合5 min,再加入醋酸乙酯2 mL和氢氧化钠溶液40 μL (浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),涡旋混合5 min,以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离有机层至尖底离心管中,在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮气流下干燥,残留物用100 μL 流动相溶解,取上清液30 μL 进样高效液相色谱系统检测药物含量^[12],色谱条件:选择安捷伦Eclipse XDB-C₁₈柱($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$)色谱柱,流动相为乙腈-水-乙酸(55:45:1),体积流量为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为265 nm,柱温为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。药动学参数使用WinNonlin药动学软件进行计算,结果见表10。

表10 Tol和Tol-NLCs大鼠体内药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 10 Pharmacokinetic parameters of Tol and Tol-NLCs in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	Tol混悬液	Tol-NLCs
$C_{\text{max}}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	176.2 ± 45.6	$436.7 \pm 57.9^*$
t_{max}/h	4.6 ± 0.6	$2.3 \pm 0.3^*$
$t_{1/2}/\text{h}$	6.3 ± 0.9	7.3 ± 1.2
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}/(\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	986.5 ± 124.6	$2452.9 \pm 498.7^*$

与Tol混悬液比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs Tol suspension.

大鼠ig Tol混悬液和Tol-NLCs后的血浆浓度-时间曲线如图7所示,在各时间点,Tol-NLCs组大鼠血浆中Tol浓度均显著高于Tol混悬液组;表10给出了各自的药动学参数,由结果可知,Tol-NLCs组的药时曲线下面积($\text{AUC}_{0 \sim \infty}$)是Tol混悬液组的2.5倍,表明Tol-NLCs可提高Tol的口服生物利用度。

3 讨论

目前,Tol已被开发成新型给药系统,如杨晨^[4]将Tol制备成纳米晶口崩片,其药物溶出速度与市

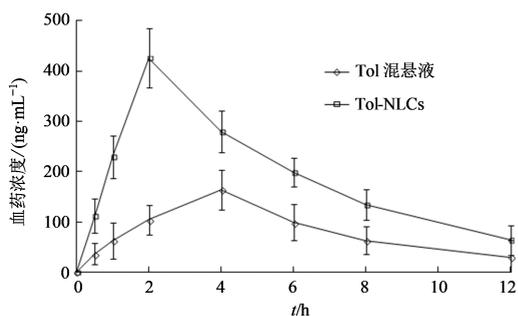


图7 Tol和Tol-NLCs平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 7 Mean plasma concentration-time profiles of Tol suspensions and Tol-NLCs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

售制剂相比得到了明显提高,但纳米晶的物理稳定性较差,且制备工艺复杂,需要特殊设备,不利于放大生产;黄健^[5]通过喷雾干燥工艺将Tol制备成固体分散体,其药物溶出速度也同样得到明显改善,但是固体分散体存在老化现象,长期存放药物会由无定型转化为晶体,药物溶出速率会降低;Lee等^[3]将Tol制备成自乳化释药系统后,改善了药物的溶出速率,同时其口服生物利用度相对于原料药提高了23倍,极大地提高了药物吸收速度与程度,然而药物吸收快速达峰以及达峰浓度过高也促进了药物的副作用产生。Fujiki等^[6]将Tol开发成前药后显著提高了药物的溶解度,然而,Tol制备成前药,其药理作用是否会发生改变,还有待深入研究。基于目前现有研究结果,本研究将Tol制备成纳米结构脂质载体,以提高Tol的口服生物利用度。

固体脂质、液体脂质和表面活性剂的种类、用量以及制备工艺是影响纳米结构脂质载体质量的关键因素,因此本研究首先筛选了Tol在不同固体脂质、液体脂质和表面活性剂的溶解度,并根据相容性结果确定了固体脂质与液体脂质的比例,并通过Box-Behnken实验设计优化Tol-NLCs处方。由3D效应面可知,粒径分布与总脂质浓度呈正相关,即粒径随着总脂质浓度的增加而增大,这可能是由于随着总脂质浓度增加,体系黏度增加、界面张力增大所致^[19];粒径分布与表面活性剂浓度和超声时间呈负相关,即粒径随着表面活性剂浓度增加或超声时间的延长而减小,这可能是由于表面活性剂浓度增加时,界面张力降低,更容易降低粒子粒径,同时抑制粒子间融合^[20];延长超声时间可提供更多的能量减小粒子的粒径。包封率与总脂质浓度和表面活性剂浓度呈正相关,这可能是由于药物在脂质基质中的溶解能力增强,包封率随着总脂质浓度的

增加而增加;而随着表面活性剂浓度的增加,降低了整个体系的界面张力,药物更易进入脂质内核^[21]。包封率与超声时间呈负相关,这可能是由于延长超声时间促使药物析出。最终优化得到Tol-NLCs的处方为:总脂质质量浓度为40.0 mg·mL⁻¹、表面活性剂质量浓度为25.0 mg·mL⁻¹,超声时间为6 min。通过微观形态、DSC分析、体外药物释放等方法初步评价了Tol-NLCs的制剂性质,结果显示,Tol-NLCs呈类球状,均匀分散,粒径大多数在100 nm左右;Tol是以无定型态存在于NLCs之中,可增加药物的溶解性;在pH 6.8介质溶液中呈双相释放模式,这有利于药物进入体内后快速提高血药浓度,后期维持稳定的血药浓度,起到缓释效果,提高药物生物利用度。

药动学结果显示,大鼠ig Tol-NLCs后,其AUC_{0~∞}明显提高,是Tol混悬液的2.5倍($P < 0.05$),推测这可能归因于以下几方面:①Tol-NLCs中的表面活性剂可使细胞膜变形,并打开肠上皮细胞的紧密连接,增加了肠膜渗透性^[22];②Tol-NLCs的粒径较小,增强与胃肠道壁的黏附性或进入肠绒毛间隙,延长与胃肠道的作用时间,有利于药物吸收^[23];③药物包裹在NLCs中,进入胃肠道后可以避免被酶水解代谢,提高了药物利用率^[24]。

纳米结构脂质载体通过将脂溶性药物以分子形式溶解在脂质中,已成为提高难溶性药物的溶解度及口服生物利用度的一种有效手段^[25-26]。但是该给药系统也面临着一些挑战,如无法提高亲水性药物的包封率和载药量;在储存过程中药物容易渗漏,析出沉淀;药物释放存在突释现象等。相信随着研究的深入以及技术的进一步发展,上述问题将会迎刃而解,在不久的将来,纳米结构脂质载体将会得到更加广泛的应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡洋洋, 张兴, 王亚东, 等. 精氨酸加压素V2受体拮抗剂托伐普坦治疗肝硬化腹水的研究进展[J]. 中华内科杂志, 2023, 62(7): 881-884.
Hu Y Y, Zhang X, Wang Y D, et al. Research progress of arginine vasopressin V2 receptor antagonist tolvaptan in the treatment of cirrhotic ascites [J]. Chin J Intern Med, 2023, 62(7): 881-884.
- [2] Miyazaki T, Fujiki H, Yamamura Y, et al. Tolvaptan, an orally active vasopressin V(2)-receptor antagonist -

- pharmacology and clinical trials [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007, 25(1): 1-13.
- [3] Lee J H, Lee G W. Formulation approaches for improving the dissolution behavior and bioavailability of tolvaptan using SMEDDS [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 415.
- [4] 杨晨. 托伐普坦纳米晶口崩片的制备与质量评价 [J]. *西北药学杂志*, 2023, 38(3): 116-120.
- Yang C. Preparation and quality evaluation of Tolvaptan Nanocrystalline Orally Disintegrating Tablets [J]. *Northwest Pharm J*, 2023, 38(3): 116-120.
- [5] 黄健. 喷雾干燥制备托伐普坦固体分散体及其评价 [J]. *广东化工*, 2019, 46(15): 75-76.
- Huang J. Preparation and evaluation of tolvaptan solid dispersions by spray drying process [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2019, 46(15): 75-76.
- [6] Fujiki H, Matsunaga M, Furukawa M, et al. *In vitro* and *in vivo* pharmacological profile of OPC-61815, a water-soluble phosphate ester pro-drug of tolvaptan [J]. *J Pharmacol Sci*, 2022, 150(3): 163-172.
- [7] Ghosh S, Tiwari T, Nagaich U, et al. A detailed insight into nanostructured lipid carriers: A versatile drug delivery system [J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2023, 17(4): 284-306.
- [8] Gaba B, Fazil M, Ali A, et al. Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(6): 691-700.
- [9] Khan S, Shaharyar M, Fazil M, et al. Tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers for oral delivery - Optimization of production and characterization [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 108: 277-288.
- [10] Unnisa A, Chettupalli A K, Alazragi R S, et al. Nanostructured lipid carriers to enhance the bioavailability and solubility of ranolazine: Statistical optimization and pharmacological evaluations [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 16(8): 1151.
- [11] Sartaj A, Annu, Biswas L, et al. Ribociclib nanostructured lipid carrier aimed for breast cancer: Formulation optimization, attenuating *in vitro* specification, and *in vivo* scrutinization [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 6009309.
- [12] Furukawa M, Yamasaki Y, Hirao Y, et al. Enantioselective analysis of tolvaptan in rat and dog sera by high-performance liquid chromatography and application to pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 965: 112-118.
- [13] Mohanty D, Alsaidan O A, Zafar A, et al. Development of atomoxetine-loaded NLC *in situ* gel for nose-to-brain delivery: Optimization, *in vitro*, and preclinical evaluation [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(7): 1985.
- [14] Kaithwas V, Dora C P, Kushwah V, et al. Nanostructured lipid carriers of olmesartan medoxomil with enhanced oral bioavailability [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 154: 10-20.
- [15] 李旻, 陈晨, 方志文. 吡罗昔康纳米结构脂质载体的制备及体外透皮特性研究 [J]. *中国药师*, 2017, 20(3): 416-420.
- Li Y, Chen C, Fang Z W. Preparation and transdermal absorption *in vitro* of piroxicam nanostructured lipid carrier [J]. *China Pharm*, 2017, 20(3): 416-420.
- [16] 陈观凤, 杨馥桢, 郑中杰, 等. 黄藤素脂质体的制备及其体外透皮研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(1): 115-119.
- Chen G F, Yang F Z, Zheng Z J, et al. Preparation and *in vitro* transdermal properties of palmatine liposomes [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2022, 33(1): 115-119.
- [17] 廖萍, 张景辰, 李帅, 等. 关于Caco-2细胞单层渗透性测定评价标准的共识性建议 [J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(4): 517-519.
- Liao P, Zhang J C, Li S, et al. Consensus recommendations on the standardization for permeability evaluation in caco-2 cell monolayer [J]. *Chin J Pharm*, 2020, 51(4): 517-519.
- [18] Hu M, Zhang J J, Ding R, et al. Improved oral bioavailability and therapeutic efficacy of dabigatran etexilate via Soluplus-TPGS binary mixed micelles system [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(4): 687-697.
- [19] Cunha S, Costa C P, Loureiro J A, et al. Double optimization of rivastigmine-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for nose-to-brain delivery using the quality by design (QbD) approach: Formulation variables and instrumental parameters [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(7): 599.
- [20] Lakhani P, Patil A, Wu K W, et al. Optimization, stabilization, and characterization of amphotericin B loaded nanostructured lipid carriers for ocular drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2019, 572: 118771.
- [21] Wang H J, Hong W, Li X Y, et al. Optimization of nanostructured lipid carriers of fenofibrate using a box-behken design for oral bioavailability enhancement [J]. *Curr Drug Deliv*, 2022, 19(7): 773-787.
- [22] Pham T M A, Lee D H, Na Y G, et al. Enhancement of S (+)-zaltoprofen oral bioavailability using nanostructured lipid carrier system [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2022, 45(11): 822-835.
- [23] Murthy A, Ravi P R, Kathuria H, et al. Oral bioavailability enhancement of raloxifene with nanostructured lipid carriers [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(6): 1085.

- [24] Agarwal S, HariKumar S L, Negi P, et al. Quetiapine fumarate loaded nanostructured lipid carrier for enhancing oral bioavailability: Design, development and pharmacokinetic assessment [J]. Curr Drug Deliv, 2021, 18(2): 184-198.
- [25] 高羚毓, 贾瑞欣, 毕野, 等. 丹参酮II_A 聚合物脂质纳米粒制备及脑部药物递送研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 909-917.
- Gao L Y, Jia R X, Bi Y, et al. Study on preparation of tanshinone II_A polymer lipid nanoparticles and brain delivery [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(5): 909-917.
- [26] 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.
- Zhong M, Hu H H, Miao M X, et al. Research progress and problem strategy analysis of *in vivo* analysis methods and pharmacokinetics of nanopharmaceutical preparations [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(7): 1413-1425.

[责任编辑 刘东博]



•公益广告•

