

马来酰亚胺修饰延胡索乙素纳米粒的制备、药动学及其对急性肝损伤的保护作用研究

李梦雅¹, 丁 玉¹, 辛 娟¹, 孙晋鹏^{2,3}, 崔 锋^{2,3*}

1. 黄河科技学院, 河南 郑州 450005

2. 亳州高新科创医药产业技术研究院有限公司, 安徽 亳州 236839

3. 山西锦烁生物医药科技有限公司, 山西 晋中 030600

摘要: **目的** 使用马来酰亚胺-聚乙二醇-聚(乳酸羟基乙酸)共聚物(Mal-PEG-PLGA)为载体制备延胡索乙素纳米粒(MPP-THP-NPs), 考察其口服吸收生物利用度及其对急性肝损伤模型大鼠的保护作用。**方法** 溶剂挥发法制备 MPP-THP-NPs, 根据单因素实验结果, 选择载药比、水化时间、水相与有机相体积比为主要影响因素, 采用包封率、载药量和粒径的总评归一值(OD)为评价指标, 应用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 MPP-THP-NPs 处方工艺。测定包封率、载药量、粒径、多分散指数(PDI)值及 ζ 电位。透射电镜(SEM)观察微观形貌, X 射线粉末衍射法分析晶型, 透析法考察 MPP-THP-NPs 冻干粉模拟胃肠液中体外释药行为。参照最优工艺, 应用单甲氧基聚乙二醇-聚(乳酸羟基乙酸)(PEG-PLGA)制备延胡索乙素纳米粒(PP-THP-NPs)。ig 给予大鼠延胡索乙素、PP-THP-NPs、MPP-THP-NPs ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以延胡索乙素计), 测定血药浓度, 考察口服相对吸收生物利用度。建立急性肝损伤模型, 考察 MPP-THP-NPs 对急性肝损伤模型大鼠肝指数、脾指数以及血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平的影响。苏木素-伊红(HE)染色评估大鼠肝脏组织病理变化。**结果** MPP-THP-NPs 最佳处方: 载药比为 12.8:1.0, 水化时间为 45 min, 水相与有机相体积比为 10.6:1.0。MPP-THP-NPs 平均包封率为 $(91.80 \pm 1.37)\%$, 载药量为 $(6.66 \pm 0.19)\%$, 粒径为 $(58.51 \pm 4.19) \text{ nm}$, ζ 电位为 $(-18.83 \pm 2.21) \text{ mV}$ 。MPP-THP-NPs 呈球形或椭圆形, 16 h 累积释放率提高至 86.79%, 缓释特征明显。药动学结果显示, 与延胡索乙素相比, MPP-THP-NPs 相对口服生物利用度提高 4.08 倍, 提高幅度大于 PP-THP-NPs。与模型组相比, MPP-THP-NPs 高剂量 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组肝脏指数、脾脏指数、ALT、AST、MDA 水平均极显著性下降 ($P < 0.01$), SOD 极显著性增加 ($P < 0.01$), 且优于延胡索乙素、PP-THP-NPs 组 ($P < 0.05, 0.01$)。病理组织切片分析发现, MPP-THP-NPs 高剂量组大鼠肝脏病理损伤显著减轻。**结论** MPP-THP-NPs 极大提高了 THP 口服吸收生物利用度, 并增强了 THP 改善急性肝损伤作用。

关键词: 延胡索乙素; 纳米粒; 马来酰亚胺; 药动学; 生物利用度; 急性肝损伤

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)09-2565-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.09.017

Maleimide-modified tetrahydropalmatine nanoparticles: Preparation, pharmacokinetics and evaluation of protective effects on acute liver injury

LI Mengya¹, Ding Yu¹, XIN Juan¹, SUN Jinpeng^{2,3}, CUI Feng^{2,3}

1. Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450005, China

2. Bozhou Hi-tech Innovation Pharmaceutical Industry Technology Research Institute Co., Ltd., Bozhou 236839, China

3. Shanxi Jinshuo Biopharmaceutical Technology Co., Ltd., Jinzhong 030600, China

Abstract: Objective To prepare maleimide-modified tetrahydropalmatine nanoparticles (MPP-THP-NPs) using maleimide-poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer (Mal-PEG-PLGA) as carrier, and investigate its oral bioavailability and protective effects on acute liver injury. **Methods** Solvent evaporation method was employed to prepare MPP-THP-NPs. According to results of single factor experiments, carrier to drug ratio, hydration time, and volume ratio of water phase to organic phase selected

收稿日期: 2025-05-11

基金项目: 山西省中医药科技创新工程项目(2023kjzy009); 山西省中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2024B014)

作者简介: 李梦雅(1992—), 女, 讲师, 研究方向为中医学。E-mail: lmy1308316189@126.com

*通信作者: 崔 锋(1982—), 男, 副研究员, 研究方向为制药新技术。E-mail: CuiF1982@qq.com

were acted as main influencing factors, the overall desirability (OD) was used as evaluation index, Box-Behnken response surface design method was used to optimize its prescription process. Encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were determined. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the micro-appearance of MPP-THP-NPs, X-ray powder diffraction (XRPD) method was used to analyze the crystal form, and the dialysis method was used to investigate the *in vitro* drug release behavior of MPP-THP-NPs freeze-dried powder in simulated gastrointestinal fluids. According to the optimal process of MPP-THP-NPs, tetrahydropalmatine nanoparticles (PP-THP-NPs) were prepared by using methoxy polyethylene glycol-poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PEG-PLGA). TMP, PP-THP-NPs, and MPP-THP-NPs were given at a dose of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (calculated by THP), the blood concentration of THP was determined, the relative bioavailability of MPP-THP-NPs was also calculated. The model of acute liver injury was established, the effects of MPP-THP-NPs on the spleen coefficient, liver coefficient, levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) of serum in rats were investigated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes in rat liver tissue. **Results** The optimal prescription process of MPP-THP-NPs was as follows: carrier to drug ratio was 12.8 : 1.0, hydration time was 45 min, and volume ratio of water phase to organic phase was 10.6 : 1.0. MPP-THP-NPs shared average encapsulation efficiency of $(91.80 \pm 1.37) \%$, drug loading of $(6.66 \pm 0.19) \%$, particle size of $(58.51 \pm 4.19) \text{ nm}$ and ζ potential was $(-18.83 \pm 2.21) \text{ mV}$. MPP-THP-NPs were spherical or elliptical in shape, cumulative dissolution rate of MPP-THP-NPs was enhanced to 86.79% in 16 h, and the characteristics of sustained-release were obvious. Pharmacokinetic results showed that oral bioavailability of MPP-THP-NPs were increased to 4.08 times, and its enhancement degree was greater than that of PP-THP-NPs. Compared with THP group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), liver index, spleen index, ALT, AST, and MDA of MPP-THP-NPs ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group extremely significantly decreased ($P < 0.01$), and SOD was extremely significantly increased ($P < 0.01$), these effects were better than that of THP and PP-THP-NPs group ($P < 0.05, 0.01$). HE staining results of liver tissue showed that the pathological injury of rat liver in the high-dose group of MPP-THP-NPs was significantly reduced. **Conclusion** MPP-THP-NPs greatly enhanced the oral bioavailability of THP, and enhanced the effect of THP on improving acute liver injury.

Key words: tetrahydropalmatine; nanoparticles; maleimide-modified; pharmacokinetics; bioavailability; acute liver injury

肝脏作为人体不可或缺的核心器官, 肩负着免疫防御与物质代谢的双重关键职能。然而, 这一重要脏器易受到酒精、毒素、药物等因素的侵袭, 进而诱发急性肝损伤, 在当前临床治疗中, 化学药物虽能在一定程度上缓解肝损伤症状, 但往往伴随较高的不良反应风险; 与之相比, 毒性小、疗效确切的中药活性成分凭借其独特优势, 正受到学术界与医学界的高度关注。

延胡索(元胡)为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 干燥块茎^[1], 在我国有近千年的入药历史, 其主要成分是生物碱, 其中延胡索乙素(THP)是发挥药效的关键活性成分。据文献报道^[2], THP 可通过多种机制发挥急性肝损伤保护作用, 包括减少肝脏中炎症性巨噬细胞及中性粒细胞的浸润、抑制自由基与脂质过氧化物的生成、降低肝损伤细胞的凋亡水平等; 同时, THP 具有的止痛镇静作用还能在急性肝损伤治疗中提高患者的用药顺应性。然而, THP 存在显著的理化与生物药剂学局限性: THP 在水中溶解度仅为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3], 属于极微溶解药物, 导致药物溶出度低, 加之首关效应明显^[4], 口服吸收生物利用度仅 6.59%^[5], 限制了其药效发挥及临床应用。目前, 针对 THP 的脂质

纳米制剂研究已有报道, 如纳米结构脂质载体^[6]、聚乳酸纳米粒^[7]等, 但这些制剂对 THP 口服生物利用度的改善幅度有限(均小于 2.5 倍)。研究表明, 这可能与脂质纳米粒在肠道内结构稳定性差、滞留时间短等因素密切相关^[8-9]。

生物黏附性给药制剂以具有黏附性的高分子聚合物作为药物载体, 借助载体的生物黏附性促进药物与黏膜组织结合, 并通过改变黏膜通透性、延长药物肠道滞留时间、提高药物梯度浓度等方式促进药物在体内的吸收^[8-9], 是当前纳米制剂研究热点之一。肠道黏液层富含黏蛋白, 而黏蛋白中含大量游离巯基。研究表明, 游离巯基可与马来酰亚胺基团之间共价结合^[8], 因此, 采用含马来酰亚胺基团的纳米材料将药物制成纳米粒, 能够赋予其肠道黏附性^[8-9]。

本研究使用马来酰亚胺-聚乙二醇-聚(乳酸羟基乙酸)共聚物 [Mal-PEG2000-PLGA3000 (MPP)] 作为 THP 纳米载体, 采用薄膜-超声法制备马来酰亚胺修饰的延胡索乙素纳米粒 (MPP-THP-NPs), Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化 MPP-THP-NPs 处方工艺。采用单甲氧基聚乙二醇-聚(乳酸羟基乙酸) [PEG2000-PLGA3000 (PP)]

制备延胡索乙素纳米粒 (PP-THP-NPs), 在同一条条件下比较 MPP-THP-NPs 和 PP-THP-NPs 结构稳定性、体外释药、药动学行为及急性肝损伤保护作用等, 为 THP 及其他中药活性成分新制剂的研究开发提供新策略。

1 材料

1.1 仪器

MSE125P-CE 分析天平, 瑞士赛多利斯公司; RG-18 磁力搅拌器, 河南金博仪器制造有限公司; 1290-6410B 型高效液相色谱-三重四级杆质谱联用、1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; RE-100 型旋转蒸发仪, 郑州卓成仪器科技有限公司; MDS-2008D 溶出试验仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; APD 2000 型 X 射线粉末衍射仪 (XRPD), 北京利曼科技有限公司; SJY92-IIN 超声波粉碎仪, 上海净信实业发展有限公司; Mastersizer 3000 激光粒度分析仪, 马尔文公司; 西林瓶封口机, 温州市广鑫包装机械有限公司; HT7700 型透射电子显微镜 (TEM, 日本日立公司); CTFD-10PT 型冻干机 (青岛永合创信电子科技有限公司); KHVORTEX-5 漩涡混合器, 北京中慧天诚科技有限公司; HNDK200-2 氮气吹扫仪, 上海汗诺仪器有限公司; SKZ-2 型光学显微镜, 德国 Carl Zeiss 公司; Chemray-240 型全自动生化分析仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 试剂与材料

THP 原料药 (批号 220709, 质量分数 97.0%), 杭州甫洛生物科技有限公司; MPP (批号 Y21P01S24)、PP (批号 Y22P19S05), 上海炎怡生物科技有限公司; 白屈菜红碱对照品 (批号 20220411, 质量分数 98.5%), 成都瑞芬思生物科技有限公司; THP 对照品 (批号 110726-202020, 质量分数 98.7%), 中国食品药品检定研究院; 甘露醇 (批号 202106), 四川博利恒药业有限公司; 模拟胃液 (批号 20240122)、模拟肠液 (批号 20231205), 上海起发实验试剂有限公司; 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 检测试剂盒 (批号 C011-1-1)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测试剂盒 (批号 C012-2-2)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 A001-3-2)、丙二醛 (MDA, 批号 A003-1-1), 南京建成生物工程研究所; 对乙酰氨基酚 (批号 20250109), 上海源叶生物科技有限公司。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 220~250 g,

购自河南省动物实验中心, 生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0001, 饲养环境温度为 25 ℃, 湿度为 45%。本研究遵循黄河科技学院有关实验动物管理和使用的规定, 动物伦理批准号 2025-035。

2 方法与结果

2.1 MPP-THP-NPs 混悬液的制备

溶剂挥发法制备 MPP-THP-NPs (避光操作)。取 30 mg THP 置于梨型瓶中, 加入处方量 MPP 材料和 3 mL 有机溶剂 (氯仿: 乙醇=1:1), 超声 5 min 溶解。加入一定体积的纯化水, 600 r·min⁻¹ 磁力搅拌水化一定时间 (水浴温度为 45 ℃), 150 W 超声 1 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 MPP-THP-NPs 混悬液。同法不加 THP 制备空白纳米粒混悬液。

2.2 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Waters SymmetryShield RPC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液 (6:4, 三乙胺调节 pH 值至 5.8); 检测波长为 280 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 2 mL 的 MPP-THP-NPs 混悬液至 50 mL 棕色量瓶中 (避光操作), 加 20 mL 有机溶剂 (丙酮: 乙醇=1:1) 超声 5 min, 放冷后加流动相混匀定容。精密量取 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 加流动相定容, 即得供试品溶液。同法制备空白纳米粒溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密称取 THP 适量, 用甲醇配制成质量浓度为 0.15 mg·mL⁻¹ 的 THP 对照品储备液, 采用流动相稀释成质量浓度分别为 10.00、5.00、2.50、1.00、0.50、0.05 μg·mL⁻¹ 的 THP 对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定。以 THP 质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行回归, 拟合回归方程为 $Y=13.6681X-0.2694$, $r=0.9999$, 线性范围 0.05~10.00 μg·mL⁻¹。

2.2.4 专属性考察 取 MPP-THP-NPs 供试品溶液、THP 对照品溶液 (0.5 μg·mL⁻¹) 和空白纳米粒溶液, 按“2.2.1”项下方法进样测定, 结果见图 1, THP 色谱峰色谱峰未受杂质干扰, 专属性良好。

2.2.5 重复性考察 取 MPP-THP-NPs 混悬液, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份 MPP-THP-NPs 供试品溶液, 测得 THP 含量的 RSD 为 1.27%, 表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性考察 取 MPP-THP-NPs 供试品溶液

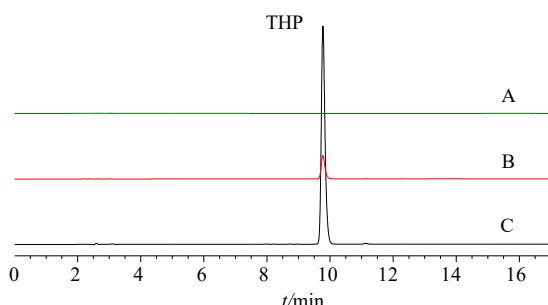


图 1 空白纳米粒 (A)、MPP-THP-NPs 供试品 (B) 和 THP 对照品 (C) 溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank nanoparticles (A), MPP-THP-NPs (B) and THP reference substance (C)

分别于配制 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,测得 THP 质量浓度的 RSD 为 0.49% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 精密度考察 取 0.05、2.50、10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,分别按“2.2.1”项下条件检测,计算得峰面积 RSD 分别为 0.45%、0.37%、0.18% ($n=6$);连续测定 6 d,计算得 THP 峰面积 RSD 为 1.36%、0.65%、0.47% ($n=6$),表明仪器日内、日间精密度良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密吸取 0.5 mL MPP-THP-NPs 混悬液,共 9 份,分为低、中、高 3 组,分别加入 THP 对照品储备液 1.0、2.0、3.0 mL,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.2.1”项下方法进样测定,计算得回收率分别为 101.14%、98.96%、100.86%,RSD 分别为 0.81%、0.43%、0.69%,表明该法准确度较高。

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

取 MPP-THP-NPs 混悬液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,精密量取 2 mL 续滤液置于超滤离心管中(截留相对分子质量为 10 000),10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心机腔体温度为 4 $^{\circ}\text{C}$),超滤离心管内为 MPP-THP-NPs,加入有机溶剂(丙酮:乙醇=1:1)使 THP 完全释放,进样测定包封 THP 的质量浓度,根据体积计算被包封的 THP 质量 ($M_{\text{包封}}$),根据投药量 ($M_{\text{投药量}}$) 计算包封率。取 MPP-THP-NPs 混悬液冷冻干燥,精密称定质量 ($M_{\text{总质量}}$),计算 MPP-THP-NPs 载药量^[10]。

采用纯化水将 MPP-THP-NPs 混悬液稀释 40 倍,取适量装样至样品池中测定粒径和分散性指数 (PDI),另取适量装样至电槽中测定 ζ 电位。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封}} / M_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封}} / M_{\text{总质量}}$$

2.4 单因素考察 MPP-THP-NPs 处方工艺

2.4.1 载药比考察 载药比即 MPP 与 THP 的用量比。固定水化时间为 45 min,水相与有机相体积比为 10:1,按“2.1”项方法制备 MPP-THP-NPs,考察载药比对包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 1。

表 1 不同载药比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Influence of different carrier drug ratios ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

载药比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
5:1	62.78 $\pm$ 0.59	10.38 $\pm$ 0.18	61.54 $\pm$ 2.26
10:1	66.14 $\pm$ 1.82	6.16 $\pm$ 0.10	58.86 $\pm$ 1.45
15:1	86.20 $\pm$ 2.02	5.34 $\pm$ 0.10	60.29 $\pm$ 4.85
20:1	91.60 $\pm$ 1.09	4.31 $\pm$ 0.12	98.16 $\pm$ 4.93
25:1	92.91 $\pm$ 0.74	3.60 $\pm$ 0.06	115.00 $\pm$ 4.51

随着载药比的增加,MPP-THP-NPs 包封率逐渐增加,两者比例超过 20:1 时包封率增加趋势渐缓,但载药量呈逐渐下降趋势。粒径随着载药比的增加而逐渐增大,可能是 MPP 用量过大时 MPP-THP-NPs 之间易发生黏连所致^[8]。《中国药典》2020 年版 9014 项下规定微粒制剂包封率应大于 80%,为兼顾载药量及粒径,故选择载药比 10:1~20:1 进行优化。

2.4.2 水化时间考察 固定载药比为 15:1,水相与有机相比为 10:1,按“2.1”项方法制备 MPP-THP-NPs,考察水化时间对包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 2。

表 2 不同水化时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Influence of different hydration times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

水化时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
15	52.18 $\pm$ 1.96	3.43 $\pm$ 0.04	110.10 $\pm$ 4.91
30	64.49 $\pm$ 1.68	4.23 $\pm$ 0.11	106.75 $\pm$ 4.10
45	88.76 $\pm$ 1.38	5.95 $\pm$ 0.15	74.31 $\pm$ 4.27
60	85.34 $\pm$ 1.07	5.61 $\pm$ 0.06	91.63 $\pm$ 3.17
75	82.04 $\pm$ 1.63	5.42 $\pm$ 0.07	116.60 $\pm$ 6.44

随着水化时间的延长,MPP-THP-NPs 包封率和载药量均先增大后减小,说明适当延长水化时间利于 MPP-THP-NPs 载药,但水化时间过长时可能影响 MPP-PEG-PLGA 化学稳定性及 MPP-THP-NPs 结构稳定性^[8,10],导致药物泄漏。粒径随着水化时间延长呈现先变小后增长趋势,说明水化时间对 MPP-THP-NPs 质量影响较大。由于水化时间为 45 min 时

MPP-THP-NPs 包封率和载药量相对较大,粒径相对较小,故后续以 45 min 为中心,对水化时间 30~60 min 进行优化。

2.4.3 水相与有机相比比例考察 固定载药比为 15:1,水化时间为 45 min,按“2.1”项方法制备 MPP-THP-NPs,考察水相与有机相比对包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 3。

表 3 水相与有机相体积比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 3 Influence of volume ratio between aqueous phase and organic phase ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

水相与有机相体积比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
2:1	33.83±1.55	2.22±0.10	124.59±4.75
5:1	67.07±1.69	4.54±0.08	113.63±6.35
10:1	88.78±1.27	6.12±0.22	76.71±2.88
15:1	82.01±1.77	5.54±0.11	75.84±2.91
20:1	78.48±1.38	5.06±0.12	65.96±4.56

随着水相与有机相比比例的增加,包封率和载药量均先增大后减小,可能是水相体积较小时 MPP 材料在水相中舒展程度不足^[8],进而影响载药量;水相体积过大时 THP 易进入水相,影响了 MPP-THP-NPs 包封率和载药量^[8,10]。粒径随着水相与有机相比比例的增加而逐渐下降,可能是由于较大的水相降低了 MPP-THP-NPs 之间的黏连及融合几率所

致^[10]。由于水相与有机相体积为 10:1 时 MPP-THP-NPs 包封率和载药量相对较大,粒径相对较小,故后续以 10:1 为中心,对水相与有机相体积比 5:1~15:1 进行优化。

2.5 BBD-RSM 优化 MPP-THP-NPs 处方工艺

2.5.1 实验设计及结果 根据单因素实验考察结果,选择载药比 (X_1)、水化时间 (X_2)、水相与有机相体积比 (X_3) 分别作为自变量,包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 的总评归一值 (OD) 为因变量,根据 BBD-RSM 进行 3 因素 3 水平共计 17 次实验,对 MPP-THP-NPs 处方工艺进行优化,实验因素水平、设计及结果见表 4。

$$d_{\text{包封率}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{载药量}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{粒径}} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$$

M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为包封率、载药量和粒径实测值、最大值和最小值

$$OD = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$$

2.5.2 模型拟合与方差分析 使用 Design Expert V12.0.3 对表 4 数据进行拟合,得 OD 多元二次项拟合方程: $OD = 0.91 - 0.18 X_1 - 0.08 X_2 + 0.081 X_3 - 0.097 X_1 X_2 - 3.70 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 0.15 X_2 X_3 - 0.19 X_1^2 - 0.30 X_2^2 - 0.39 X_3^2$, 该方程的 $R^2 = 0.974 0$, 表明该数学模型可反映 97.40% 响应值的变化; $R_{\text{adj}}^2 =$

表 4 BBD-RSM 试验因素水平、设计及结果
Table 4 BBD-RSM factor level, test design and results

序号	X_1	X_2/min	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD
1	20:1 (1)	60 (1)	10:1 (0)	85.49	4.11	118.93	0.157
2	20:1	45	15:1 (1)	84.61	3.92	116.87	0.212
3	20:1	45	5:1 (-1)	74.43	3.47	119.82	0.000
4	15:1 (0)	45	10:1	90.72	5.47	66.69	0.899
5	15:1	45 (0)	10:1	92.28	5.73	61.24	0.962
6	10:1 (-1)	45	15:1	65.79	5.86	66.04	0.662
7	15:1	30 (-1)	5:1	65.77	4.01	117.98	0.141
8	15:1	45	10:1	89.63	5.46	73.78	0.835
9	20:1	30	10:1	84.12	3.95	96.91	0.424
10	15:1	45	10:1	90.18	5.66	60.84	0.938
11	15:1	60	15:1	52.36	3.27	74.23	0.000
12	15:1	45	10:1	89.19	5.54	57.41	0.931
13	10:1	30	10:1	61.82	5.56	84.75	0.490
14	15:1	30	15:1	76.94	4.77	91.96	0.541
15	10:1	45	5:1	62.31	5.66	97.54	0.435
16	15:1	60	5:1	68.43	4.21	116.71	0.194
17	10:1	60	10:1	63.70	5.69	66.88	0.608

0.940 6, 表明该模型可信度高。方差结果见表 5, 拟合方程失拟项 P 值为 0.071 0 >0.05 , 说明未知因素干扰可忽略。模型 P 值 $<0.000 1$, 表明数学模型可靠性高, 对 MPP-THP-NPs 处方研究指导意义

强。数学模型中, X_2 、 X_3 具显著差异 ($P<0.05$), 而 X_1 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 具有极显著性差异 ($P<0.01$)。根据 F 值判断, 各因素对 OD 值影响顺序为 $X_1>X_3>X_2$ 。

表 5 方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.79	9	0.20	29.14	$<0.000 1$	X_1^2	0.16	1	0.16	22.93	0.002 0
X_1	0.25	1	0.25	35.99	0.000 5	X_2^2	0.38	1	0.38	55.80	0.000 1
X_2	0.05	1	0.05	7.50	0.029 0	X_3^2	0.65	1	0.65	95.55	$<0.000 1$
X_3	0.05	1	0.05	7.66	0.027 8	残差	0.05	7	6.82×10^{-3}		
X_1X_2	0.37	1	0.37	5.48	0.051 8	失拟项	0.04	3	0.01	5.23	0.071 0
X_1X_3	5.47×10^{-5}	1	5.47×10^{-5}	8.02×10^{-3}	0.931 2	纯偏差	9.70×10^{-3}	4	2.43×10^{-3}		
X_2X_3	0.09	1	0.09	12.95	0.008 8	总离差	1.67	16			

使用 Design Expert V12.0.3 绘制相应曲面图, 结果见图 2, 随着其中两因素的增加 OD 值均呈先增加后下降趋势。设定 OD 为最大值, 取值范围为 0~1, 得 MPP-THP-NPs 最佳处方为载药比为 12.84 : 1.00, 水化时间为 43.60 min, 水相与有机相体积比为

10.61 : 1.00, 预测 OD 值为 0.952。为便于实际操作, 将 MPP-THP-NPs 处方工艺略作调整: 载药比调整为 12.8 : 1.0, 水化时间为调整为 45 min, 水相与有机相体积比为 10.6 : 1.0。

2.5.3 最佳处方验证 平行制备 3 批 MPP-THP-NPs,

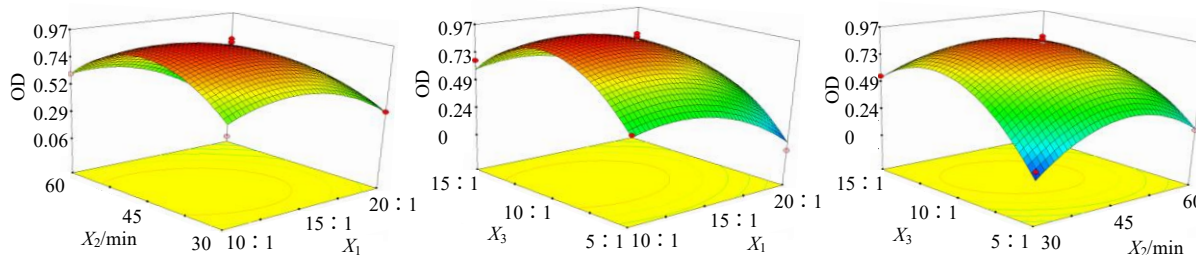


图 2 自变量与 OD 值的响应面图

Fig. 2 Response surface plot of independent factors and OD values

测定包封率、载药量和粒径, 并按“2.5.1”项下方法计算 OD 值。结果表明 3 批 MPP-THP-NPs 平均包封率、载药量、粒径和 OD 值分别为 $(91.80\pm 1.37)\%$ 、 $(6.66\pm 0.19)\%$ 、 (58.51 ± 4.19) nm 和 0.948 ± 0.06 , 与预测值 OD 值 (0.952) 为参考, 实测 OD 值相对偏差为 -0.42% , 说明该数学模型预测性良好, 具有较强的指导意义。MPP-THP-NPs 粒径分布图见图 3-A, 平均 PDI 值为 0.103 ± 0.09 ; 平均 ζ 电位为 (-18.83 ± 2.21) mV, 见图 3-B。

2.6 TEM 观察

取 MPP-THP-NPs 混悬液, 加纯化水稀释 30 倍, 滴至铜网上, 1%磷钨酸钠染色, 置 30 ℃真空干燥箱中至无水分, 于透射电镜下观察 MPP-THP-NPs 形貌 ($\times 15\,000$)。结果见图 4, MPP-THP-NPs 外貌

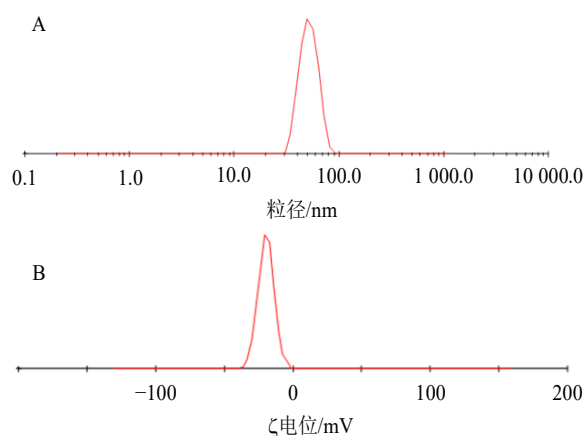


图 3 MPP-THP-NPs 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Particle size (A) and ζ potential (B) of MPP-THP-NPs

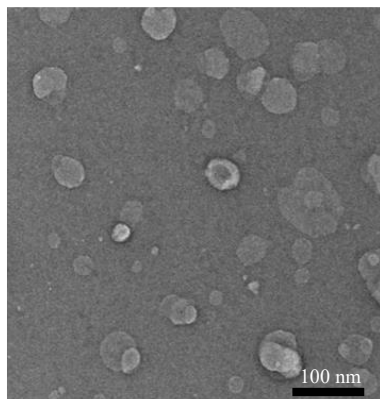


图 4 MPP-THP-NPs TEM 图

Fig. 4 TEM image of MPP-THP-NPs

呈圆形或椭圆形。

2.7 MPP-THP-NPs 冻干粉制备及沉降率和溶解度测定

2.7.1 冻干粉的制备 取 MPP-THP-NPs 混悬液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 超滤(截留相对分子质量为 10 000)后加纯化水重悬, 加入 5%甘露醇, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱下预冻 3 d, 立即真空冷冻干燥 3 d, 取出即得 MPP-THP-NPs 冻干粉。MPP-THP-NPs 冻干粉外观均饱满, 复溶后澄清度良好, 且带乳光, 样品外观见图 5。加纯化水复溶后测得 MPP-THP-NPs 平均包封率、载药量、粒径、PDI 值和 ζ 电位分别为 $(88.91 \pm 0.96)\%$ 、 $(6.43 \pm 0.13)\%$ 、 $(66.71 \pm 4.59)\text{ nm}$ 、 0.119 ± 0.13 和 $(-17.60 \pm 1.69)\text{ mV}$ 。

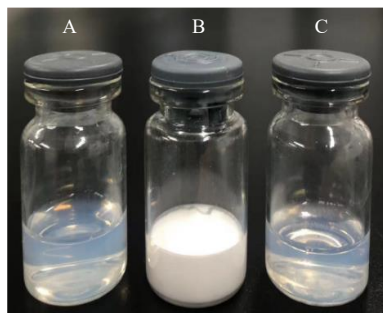


图 5 MPP-THP-NPs 混悬液(A)、冻干粉(B)和水复溶后(C)的样品外观

Fig. 5 Appearance of MPP-THP-NPs suspension (A), freeze-dried powder (B) and dissolved by water (C)

2.7.2 MPP-THP-NPs 冻干粉沉降率的测定 取 MPP-THP-NPs 混悬液测定 THP 含量(M_1)。取 MPP-THP-NPs 冻干粉加纯化水复溶, 测定 THP 含量(M_2)。结果显示, 3 批 MPP-THP-NPs 冻干粉平均沉降率仅为 $(0.79 \pm 0.08)\%$, 说明 MPP-THP-NPs

冻干粉处方工艺可行。

$$\text{沉降率} = (M_1 - M_2) / M_1$$

2.7.3 MPP-THP-NPs 冻干粉饱和溶解度的测定 取过量 THP 原料药和 MPP-THP-NPs 冻干粉分别置于纯化水中, 超声 15 min (底部仍有药物沉淀), 置 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器震荡 2 d, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液测定 THP 溶解度。结果显示, THP 原料药和 MPP-THP-NPs 冻干粉饱和溶解度分别为 (274.76 ± 3.18) 、 $(1\,689.75 \pm 9.07)\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, MPP-THP-NPs 冻干粉将 THP 饱和溶解度提高了 6.15 倍。

2.8 MPP-THP-NPs 冻干粉晶型研究

XRPD 测试条件: 扫描速度为 $4^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$, 角度(2θ)为 $3^{\circ}\sim 45^{\circ}$, 发射源为 Cu-K α 靶。取 THP 原料药、空白辅料(MPP 材料与甘露醇混合, 比例与 MPP-THP-NPs 冻干粉一致)、物理混合物(比例与 MPP-THP-NPs 冻干粉一致)和 MPP-THP-NPs 冻干粉适量进行扫描测试, 见图 6。THP 在 5.9° 、 7.9° 、 11.8° 、 12.8° 、 13.5° 等处出现特征晶型峰, 这些特征晶型峰在物理混合物 XRPD 图谱中仍可见, 说明 THP 晶态未发生改变, 但强度有所下降。MPP-THP-NPs 冻干粉 XRPD 图谱中 THP 特征晶型峰均消失, 说明 THP 在 MPP-THP-NPs 冻干粉中晶态可能转变为无定型状态。

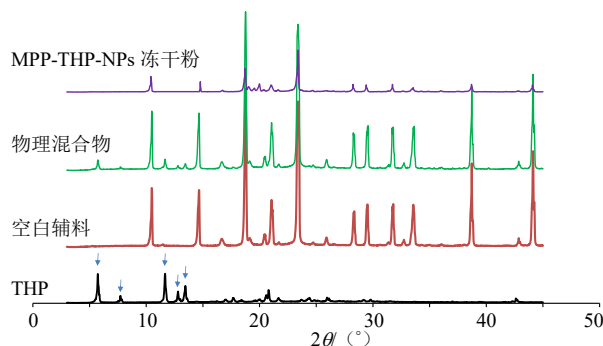


图 6 XRPD 结果

Fig. 6 Results of XRPD

2.9 MPP-THP-NPs 冻干粉稳定性考察

2.9.1 储存稳定性考察 取 MPP-THP-NPs 冻干粉(密封于西林瓶)置恒温恒湿箱(温度和湿度分别为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 65%), 于 0、1、2、3、6 个月取样, 分别测定 MPP-THP-NPs 冻干粉复溶后的沉降率、包封率、粒径和溶解度。结果表明(表 6), MPP-THP-NPs 冻干粉储存 6 个月后, 沉降率略有增大, 但仍小于 2%; 包封率略下降, 但仍大于 85%; 粒径略有增大,

表 6 储存稳定性实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 6 Experimental results of stability ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

取样时间/个月	沉降率/%	包封率/%	粒径/nm	溶解度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0	0.71 $\pm$ 0.12	89.67 $\pm$ 1.04	60.19 $\pm$ 4.88	1 682.09 $\pm$ 12.07
1	0.64 $\pm$ 0.17	90.10 $\pm$ 0.78	61.73 $\pm$ 5.04	1 694.55 $\pm$ 17.32
2	0.92 $\pm$ 0.09	89.27 $\pm$ 1.26	59.74 $\pm$ 3.86	1 687.50 $\pm$ 10.78
3	1.29 $\pm$ 0.14	89.42 $\pm$ 1.33	64.09 $\pm$ 4.15	1 689.83 $\pm$ 14.64
6	1.37 $\pm$ 0.18	88.73 $\pm$ 0.98	65.85 $\pm$ 4.90	1 678.96 $\pm$ 10.17

但仍小于 100 nm; 溶解度未见明显下降, 表明 MPP-THP-NPs 冻干粉稳定性良好。

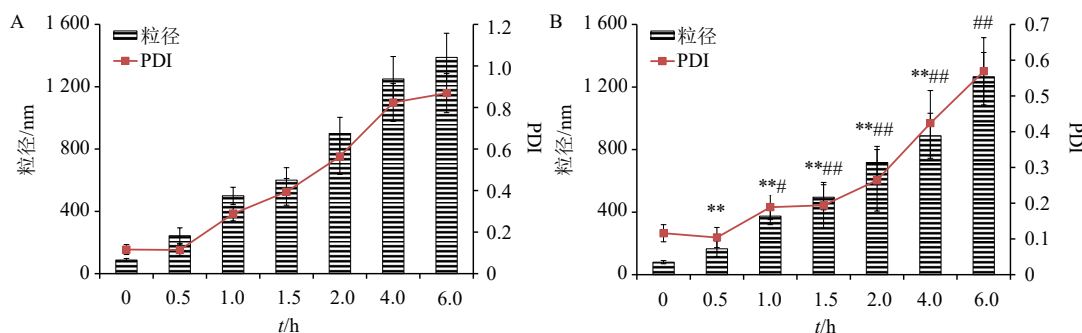
2.9.2 在模拟胃肠液中结构稳定性考察

(1) PP-THP-NPs 冻干粉的制备: 参考“2.5.3”项下 MPP-THP-NPs 确定的处方工艺, 将 MPP 替换为 PP 制备非肠道黏附纳米粒即 PP-THP-NPs, 测得 PP-THP-NPs 平均包封率、载药量、粒径、PDI 值、 ζ 电位分别为 (87.43 $\pm$ 1.25) %、(6.32 $\pm$ 0.21) %、(43.55 $\pm$ 4.07) nm、0.094 $\pm$ 0.07、(-20.52 $\pm$ 1.79) mV。按“2.7.1”项下同法制备 PP-THP-NPs 冻干粉。

(2) 结构稳定性考察结果: 当纳米结构发生变化时粒径及 PDI 值会随之变化^[8], 故以粒径及 PDI 值变化情况来比较 PP-THP-NPs 和 MPP-THP-NPs 结构稳定性。分别取 PP-THP-NPs、MPP-THP-NPs

冻干粉 300 mg 置于 1 000 mL 模拟胃液中, (37.0 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 以 75 r $\cdot$ min $^{-1}$ 搅拌, 别于 0.5、1.0、1.5、2.0 h 取样 5 mL, 取样后立即将介质替换为模拟肠液, 于 4、6 h 分别同法取样。分别测试 PP-THP-NPs 和 MPP-THP-NPs 粒径和 PDI 值, 结果见图 7。

随着时间的延长, PP-THP-NPs 和 MPP-THP-NPs 粒径随之增大, 与 PP-THP-NPs 粒径相比, MPP-THP-NPs 在 0.5、1.0、1.5、2.0 和 4.0 h 具有极显著性下降 ($P<0.01$); 与 PP-THP-NPs PDI 值相比, MPP-THP-NPs 在 1 h 具有显著性下降 ($P<0.05$), 在 1.5、2.0、4.0 和 6.0 h 具有极显著性下降 ($P<0.01$), 说明 MPP-THP-NPs 在一定时间内结构稳定性高于 PP-THP-NPs, 可能与 MPP-THP-NPs 表面马来酰亚胺基团提供的空间位阻、静电排斥力等因素有关^[8]。



与 PP-THP-NPs 粒径比较: ** $P<0.01$; 与 PP-THP-NPs PDI 值比较: # $P<0.05$ ### $P<0.01$
** $P<0.01$ vs particle size of PP-THP-NPs; # $P<0.05$ ### $P<0.01$ vs PDI value of PP-THP-NPs

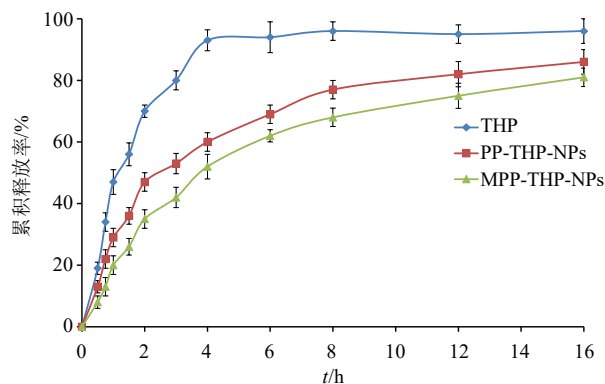
图 7 PP-THP-NPs (A) 和 MPP-THP-NPs (B) 的稳定性考察 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Stability study of PP-THP-NPs (A) and MPP-THP-NPs (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.10 模拟胃肠液中体外释药行为的比较

取 THP 原料药, PP-THP-NPs、MPP-THP-NPs 冻干粉 (THP 均为 10 mg), 加入 3 mL 模拟胃液即得混悬液, 转移至透析袋中 (截留相对分子质量为 10 000), 平行制备 6 份。采用 1 000 mL 模拟胃液作为释放介质, 转速和温度分别为 75 r $\cdot$ min $^{-1}$ 和 (37.0 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$, 于 0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 h 取样 5 mL,

并补充模拟胃液 5 mL。取样完成后立即将释放介质替换为模拟肠液, 于 3、4、6、8、12、16 h 同法取样并补加释药介质。各点取样 3 mL 后 8 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 5 min, 按“2.2.1”项方法测定 THP 含量, 结果见图 8。MPP-THP-NPs 和 PP-THP-NPs 在 16 h 累积释放率分别为 80.66% 和 86.79%, 与 THP 相比, 两种纳米粒均呈现缓释特点^[11], 且 MPP-THP-NPs

图 8 体外释药曲线的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 8 Comparison of drug release curves *in vitro*
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

缓释特征优于 PP-THP-NPs。

2.11 药动学研究

2.11.1 实验方案 取 THP 原料药、PP-THP-NPs、MPP-THP-NPs 冻干粉适量, 采用 0.5% 的 CMC-Na 溶液配制 ig 液, THP 质量浓度均为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 18 只过夜禁食的 SD 大鼠, 随机分成 3 组, 分别 ig 给药 (THP 均为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) [6]。THP 组分别于 0、0.25、0.75、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、6.00、8.00 h 大鼠眼眶后静脉丛取血约 0.25 mL, 因该组 10 h 时血药浓度已低于标准曲线下限, 故不再取血。血样震荡混匀后, 以 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 移取上层淡黄色血浆样品至空白离心管, 置于 -15°C 冰箱保存。根据预试验检测结果, PP-THP-NPs 组增加 10 h 取血点, MPP-THP-NPs 组增加 10 h 和 16 h 取血点。

2.11.2 内标溶液的配制及血浆样品溶液的制备 精密称取白屈菜红碱适量, 用甲醇配制成质量浓度为 $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。取血浆样品 100 μL , 加入 3 mL 乙醚、50 μL 内标溶液和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液 50 μL [6], 密封涡旋 5 min。8500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上层至空白离心管中, 于 37°C 氮吹仪中吹干, 加入 100 μL 甲醇震荡溶解即得。

2.11.3 色谱及质谱条件 采用 Phenomenex C₁₈ (4 mm $\times$ 2 mm, 5 μm) 型预柱、Perkin Elmer C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.01% 甲酸铵水溶液 (50:50); 柱温 30°C ; 体积流量 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样器温度 4°C ; 进样体积 5 μL 。电喷雾电离 (ESI) 源, 正离子模式; 喷雾电压为 5.0 kV; 扫描方式为多重反应检测模式 (MRM); 毛细管温度为 350°C ; 气帘气为 206 kPa;

检测离子对分别为 m/z 356.6 $\rightarrow$ 321.1 (THP) 和 m/z 348.4 $\rightarrow$ 308.3 (白屈菜红碱)。

2.11.4 线性关系考察 精密称取 THP 适量, 用空白血浆配制 2500、1500、500、100、20、10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 分别取 100 μL 按照“2.11.2”项下制备 2500、1500、500、100、20、10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (白屈菜红碱质量浓度均为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 血浆对照品 (含内标) 溶液, 按“2.11.3”项下条件测定, 以 THP 质量浓度 (X) 为横坐标, 白屈菜红碱与 THP 峰面积比 (Y) 为纵坐标, 拟合方程为 $Y=0.0339X-2.0469$, $r=0.9948$, 线性范围 10~2500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.11.5 专属性考察 取大鼠空白血浆、血浆对照品 (含内标, THP 质量浓度为 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和血浆样品 (MPP-THP-NPs 给药 16 h) 溶液按“2.11.3”项下测定。结果见图 9, THP 和白屈菜红碱保留时间分别为 2.4 min 和 4.2 min, 专属性良好。

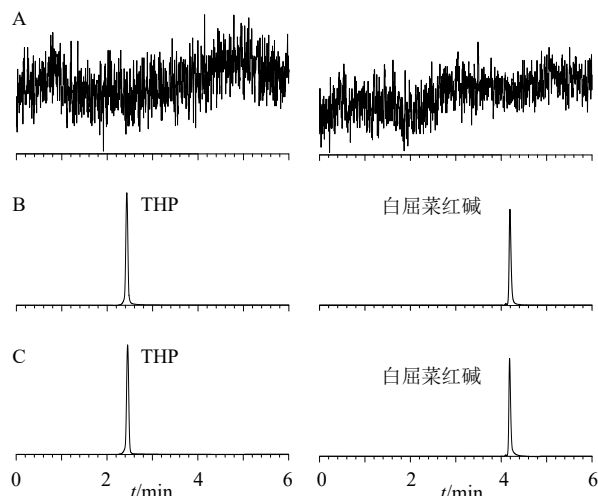


图 9 空白血浆 (A)、血浆对照品溶液 (含内标, B)、血浆样品溶液 (含内标, C) 的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 9 UPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma (A), plasma reference solution (including internal standard, B) and plasma sample solution (including internal standard, C)

2.11.6 稳定性考察 配制质量浓度为 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 THP 血浆样品, 作为质控样品。保存于 -15°C 冰箱, 取出于 37°C 水浴中反复冻融 6 次, 每次取样 100 μL 按“2.11.2”项下处理得到供试品溶液, 测定 THP 和内标峰面积, 计算得 THP 质量浓度的 RSD 为 6.69% ($n=6$); 取血浆样品溶液于 0、3、6、9、12、24 h 测定 (温度和湿度分别为 25°C 和 45%), 测定 THP 和内标峰面积, 计算得 THP 质量浓度的 RSD 为 4.16% ($n=6$), 表明稳定性良好。

2.11.7 精密度考察 取 THP 质量浓度为 10 (低)、500 (中)、2 500 ng·mL⁻¹ (高) 血浆对照品 (含内标) 溶液分别测试 THP 和内标峰面积, 结果显示 THP 质量浓度的 RSD 值依次为 4.16%、5.03% 和 2.22% ($n=6$); 连续测试 6 d, 每天测试 1 次, 测得 THP 质量浓度的 RSD 值依次为 3.76%、1.96% 和 3.09% ($n=6$), 表明日内及日间精密度良好。

2.11.8 提取回收率和基质效应考察 取 10、500、2 500 ng·mL⁻¹ 的 THP 血浆样品 (均含质量浓度为 600 ng·mL⁻¹ 白屈菜红碱), 按“2.11.2”处理后测定峰面积 (A); 分别取空白血浆 100 μ L, 共 9 份, 除不加白屈菜红碱外按“2.11.2”项下处理, 加入 THP 对照品溶液和白屈菜红碱, 涡旋 2 min, 使 THP 最终质量浓度为 10、500、2 500 ng·mL⁻¹, 白屈菜红碱质量浓度为 600 ng·mL⁻¹, 进样测定峰面积 (B), 采用 A/B 计算提取回收率, 结果显示低、中、高质量浓度 THP 及内标提取回收率分别为 94.11%、91.68%、96.07%、93.71%。取质量浓度为 10、500、2 500 ng·mL⁻¹ 的 THP 对照品溶液 (均含质量浓度为 600 ng·mL⁻¹ 白屈菜红碱), 测定峰面积 (C), 以 B/C 计算基质效应。低、中、高质量浓度 THP 及白屈菜红碱基质效应分别为 96.19%、100.24%、95.84%、101.08%。表明该方法 THP 和白屈菜红碱的提取回收率高, 且基质效应较小。

2.11.9 药动力学结果 采用 3P97 软件非房室模型的统计矩法对药动力学数据进行处理, 采用 SPSS 19.0 软件

检验各组数据之间的显著性, 达峰时间 ($t_{\max}$) 和半衰期 ($t_{1/2}$) 采用非参数法秩和检验, 达峰浓度 ($C_{\max}$) 和药-时曲线下面积 (AUC) 经对数转换后采用独立样本 t 检验, 药-时曲线见图 10, 药动力学结果见表 7。

与 THP 相比, PP-THP-NPs 的 $C_{\max}$ 增加 3.19 倍, $t_{\max}$ 延后至 (2.16 $\pm$ 0.37) h, $t_{1/2}$ 延长至 (4.43 $\pm$ 0.59) h, 相对口服生物利用度增加 2.72 倍。MPP-THP-NPs 的 $t_{\max}$ 延后至 (3.19 $\pm$ 0.74) h, $t_{1/2}$ 延长至 (6.57 $\pm$ 0.81) h, $C_{\max}$ 增加 3.32 倍, 相对口服生物利用度增加 4.08 倍。与 PP-THP-NPs 相比, MPP-THP-NPs 的 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、MRT、AUC_{0- t} 、AUC_{0- ∞} 均显著增大 ($P<0.05$ 、0.01), 说明 MPP-THP-NPs 口服药动力学行为发生了更大改变, 口服吸收程度的提高幅度更大。

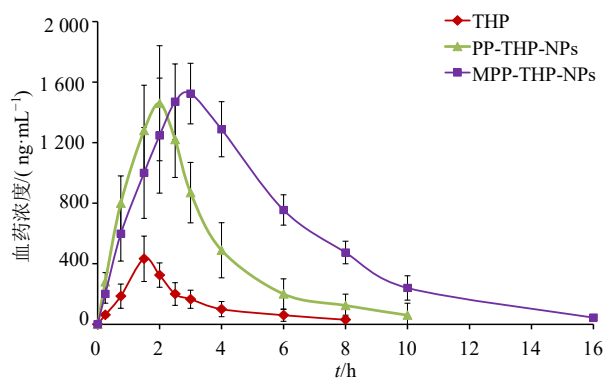


图 10 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Plasma concentration-time curves ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 7 主要药动力学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 7 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

参数	单位	THP	PP-THP-NPs	MPP-THP-NPs
$t_{\max}$	h	1.48 $\pm$ 0.28	2.16 $\pm$ 0.37*	3.19 $\pm$ 0.74***
$t_{1/2}$	h	2.63 $\pm$ 0.39	4.43 $\pm$ 0.59*	6.57 $\pm$ 0.81***
MRT	h	3.02 $\pm$ 0.63	5.29 $\pm$ 1.67*	7.72 $\pm$ 2.15***
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	458.68 $\pm$ 83.87	1 463.07 $\pm$ 471.26**	1 524.06 $\pm$ 419.82**
AUC _{0-t}	h·ng·mL ⁻¹	1 542.19 $\pm$ 312.34	4 192.41 $\pm$ 874.95**	6 298.67 $\pm$ 1024.51***
AUC _{0-∞}	h·ng·mL ⁻¹	1 628.35 $\pm$ 326.07	4 315.22 $\pm$ 917.61**	6 520.94 $\pm$ 1067.03***

与 THP 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 PP-THP-NPs 比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs THP; # $P<0.05$ vs PP-THP-NPs。

2.12 急性肝损伤保护作用研究

2.12.1 样品配制 采用 0.9%氯化钠溶液配制质量浓度为 30 mg·mL⁻¹ 对乙酰氨基酚注射液, 现配现用。采用 0.5% CMC-Na 溶液配制 THP、 N -乙酰半胱氨酸、PP-THP-NPs 和 MPP-THP-NPs 的 ig 液。

2.12.2 分组及给药 取健康 SD 大鼠 48 只, 分为

模型组 (0.5% CMC-Na 溶液)、对照组 (0.5% CMC-Na 溶液)、 N -乙酰半胱氨酸 (阳性药, 150 mg·kg⁻¹) 组^[12]、THP (30 mg·kg⁻¹) 组、PP-THP-NPs (30 mg·kg⁻¹) 组及 MPP-THP-NPs 低、中、高剂量 (10、20、30 mg·kg⁻¹) 组, 各组 SD 大鼠均雌雄各半, 每天 12:00 时 ig 给药 1 次, 连续 7 d。第 7 天给药 3 h 后, 对照组

ip 0.9%氯化钠溶液,其余各组均 ip 对乙酰氨基酚溶液 ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[12],造成急性肝损伤模型。6 h 后 ip 2.5%戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠,记录大鼠体质量,在昏迷状态下摘除眼球取血后脱颈进行处死,迅速取出肝脏和脾脏,0.9%氯化钠溶液清洗,置于滤纸上吸干表面水分,称质量。各组分别取部分肝脏组织浸泡于 4%多聚甲醛,石蜡包埋,制备切片,脱水后采用二甲苯透明处理,并用苏木素-伊红 (HE) 染色,中性树胶封固后观察肝组织病理状态。

2.12.3 肝脏指数和脾脏指数考察 根据肝脏、脾脏和体质量分别计算肝脏指数和脾脏指数,结果见图 11。与对照组相比,模型组肝脏指数和脾脏指数

均极显著性增加 ($P < 0.01$),表明模型组动物的肝脏和脾脏受到严重损伤。与模型组相比,各给药组的肝脏指数和脾脏指数均有显著性或极显著性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明大鼠肝脏和脾脏得到有效的保护作用。与 THP 组相比,PP-THP-NPs 组肝脏指数和脾脏指数均有显著性下降 ($P < 0.05$),随着给药剂量的增加,MPP-THP-NPs 组大鼠肝脏指数和脾脏指数也随之下降,表现出剂量相关性。与 PP-THP-NPs 组相比,MPP-THP-NPs 高剂量组肝脏指数和脾脏指数均显著性下降 ($P < 0.05$),这可能与 MPP-THP-NPs 具有更高的生物利用度有关。

肝脏指数 = 肝脏质量/体质量

脾脏指数 = 脾脏质量/体质量

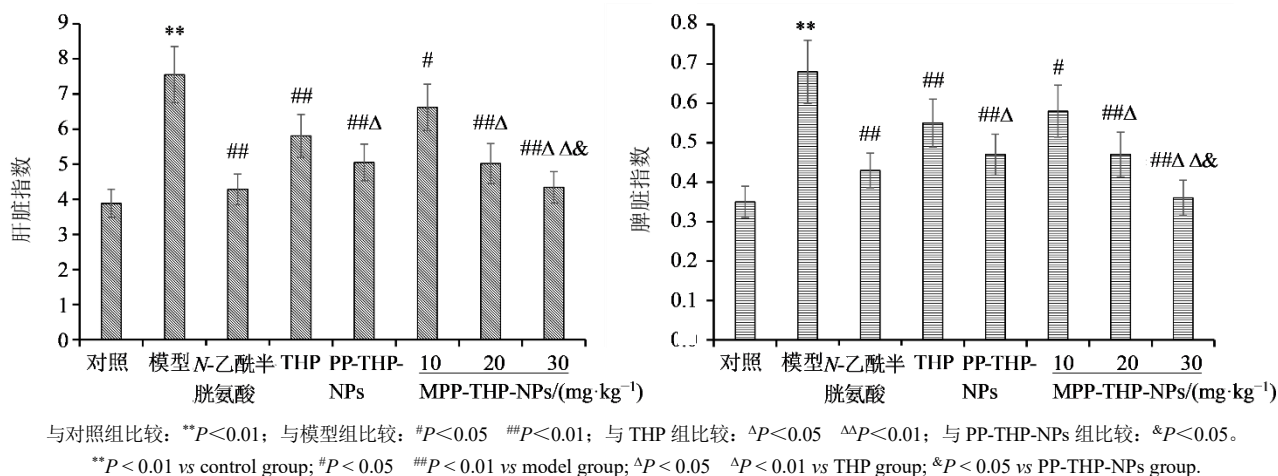


图 11 各组大鼠的肝脏指数和脾脏指数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 11 Liver index and spleen index of each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.12.4 ALT、AST、MDA 和 SOD 的测定 取各组血液样品, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液于全自动生化分析仪检测上检测 ALT 和 AST。取肝脏左叶组织约 0.2 g, 加入 0.9%氯化钠制成 10%肝组织匀浆液, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 按试剂盒说明书测定 MDA 和 SOD 水平, 结果见表 8。与对照组相比, 模型组 ALT、AST 和 MDA 水平极显著性升高 ($P < 0.01$), 而 SOD 水平极显著性下降 ($P < 0.01$), 提示对乙酰氨基酚诱导 SD 大鼠肝脏严重损伤, 这是急性肝损伤特征之一^[2]。与模型组相比, 除 MPP-THP-NPs 低剂量组 MDA 无显著性差异外, 各给药组 ALT、AST 和 MDA 均显著性或极显著性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), SOD 显著性或极显著性升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明各给药组具有急性肝损伤保护作用。与 THP 组相比, PP-THP-NPs 组 ALT、AST、MDA 和 SOD 具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明 PP-

THP-NPs 增强了 THP 急性肝损伤保护作用; 随着 MPP-THP-NPs 剂量的增加 ALT、AST 及 MDA 均随之下降, SOD 随之增加, 表现出剂量相关性。与 PP-THP-NPs 组相比, MPP-THP-NPs 高剂量组的 ALT、AST、MDA 和 SOD 均具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明 MPP-THP-NPs 急性肝损伤保护作用优于 PP-THP-NPs。

2.12.5 各组大鼠肝脏病理切片结果 结果见图 12。对照组大鼠肝细胞轮廓清晰, 排列整齐, 未见空泡现象及炎症细胞浸润; 模型组大鼠肝组织病理可见大量空泡现象, 正常细胞明显减少, 排列紊乱, 肝组织受损严重; N-乙酰半胱氨酸组肝排列较规则, 未见空泡现象及炎症细胞浸润, 表明 N-乙酰半胱氨酸治疗效果显著; THP 和 PP-THP-NPs 在一定程度上改善了肝组织损伤, 但仍存在空泡现象; MPP-THP-NPs 低、中、高剂量组随着给药剂量的增

表 8 各组大鼠 ALT、AST、MDA 和 SOD 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 8 Results of ALT, AST, MDA and SOD of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	66.16±6.28	98.25±8.11	0.37±0.04	188.15±9.99
模型	—	201.75±19.24**	240.16±18.14**	0.72±0.09**	109.12±8.13**
N-乙酰半胱氨酸	—	78.28±7.95##	117.90±9.66##	0.50±0.03##	153.77±7.45##
THP	30	139.43±11.57##	155.83±11.19##	0.56±0.06#	126.46±6.85#
PP-THP-NPs	30	108.89±8.23##ΔΔ	128.02±10.73##ΔΔ	0.47±0.08#Δ	137.39±7.79#Δ
MPP-THP-NPs	10	138.06±10.12##	162.75±14.05##	0.61±0.07	129.07±8.03#
	20	95.42±8.30##ΔΔ&	133.44±8.52##ΔΔ	0.45±0.04#Δ	144.18±7.82##Δ
	30	80.11±6.95##ΔΔ&&	113.36±8.77##ΔΔ&	0.41±0.05##ΔΔ&	156.91±7.46##ΔΔ&

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与 THP 组比较: Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$; 与 PP-THP-NPs 组比较: & $P<0.05$ && $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group; Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$ vs THP group; & $P<0.05$ && $P<0.01$ vs PP-THP-NPs group.

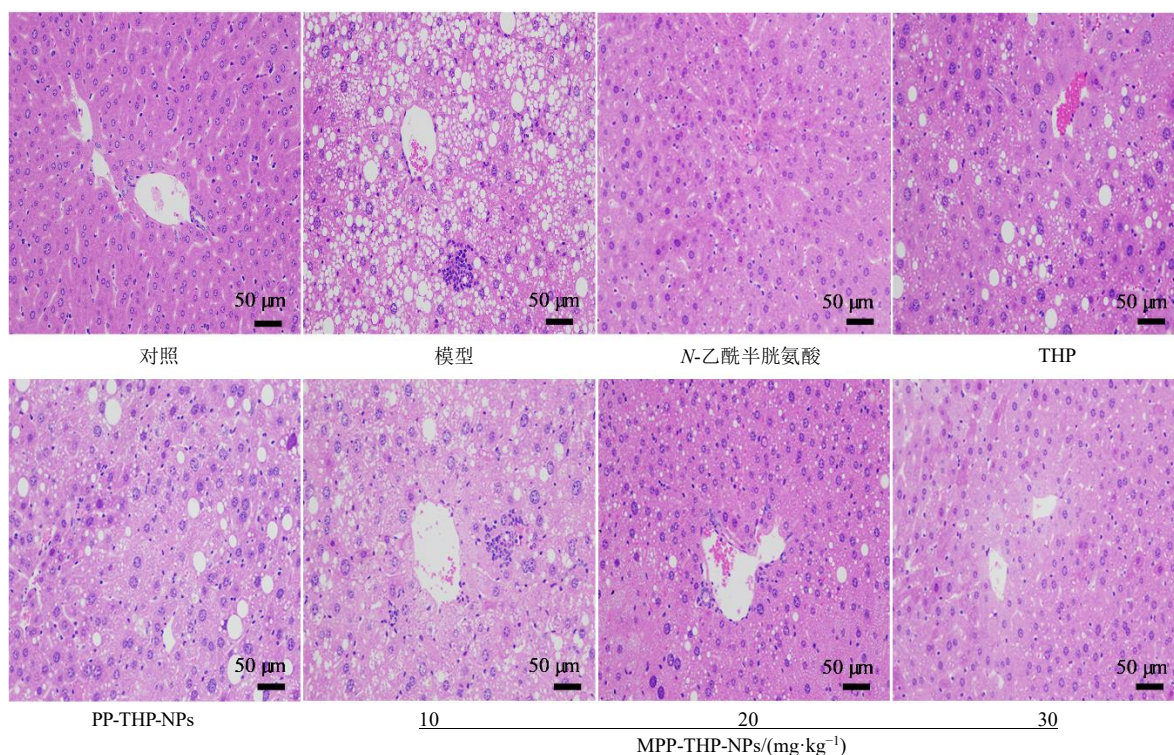


图 12 各组大鼠肝脏病理切片 (×200)
Fig. 12 Hepatic pathologic sections of every group of rats (×200)

加, 病理组织中空泡、变异细胞和炎症细胞浸润现象逐渐减少, 表明肝损伤改善效果逐渐提高, 其中 MPP-THP-NPs 高剂量组病理结果趋向于阳性组和对照组, 保护效果最优。

3 讨论

THP 在超过 60 °C 时容易降解^[12], 产生大量 THP 衍生物或杂质, 这一细节往往被制剂研究者忽视^[6], 进而影响制剂的安全性及有效性。本研究在制备 MPP-THP-NPs 时, 将温度控制在 45 °C 以避

免 THP 降解。包封率、载药量、粒径是纳米制剂重要的质量指标, 其中包封率对纳米制剂的释药行为影响显著, 也是保障制剂有效性及安全性的重要基础; 载药量关系到制剂的生产成本、给药效率及药效发挥, 在纳米制剂的设计和优化中需重点考量; 粒径不仅与纳米制剂的物化性质密切相关, 还直接影响其体内组织分布、药动学行为及药效学效果。本研究通过单因素实验考察了载药比、水化时间、水相与有机相体积比对 MPP-THP-NPs 上述 3 个质

量指标的影响,明确了各影响因素的水平范围,为后续 BBD-RSM 优化 MPP-THP-NPs 处方工艺提供了参考。鉴于包封率、载药量及粒径对 MPP-THP-NPs 同等重要,故将三者转换成总评归一值,最终得到包封率及载药量较高,同时粒径较小的处方工艺,不仅降低了 MPP-THP-NPs 制备成本,还有助于保障其安全性与有效性。

稳定性考察结果显示,MPP-THP-NPs 冻干粉在加速条件下储存 6 个月后稳定性良好,为其成药性评价提供了数据支持。PP-THP-NPs 体外释药过程显示,前 2 h 释药相对较快,即快速释药阶段,可能是 PP-THP-NPs 浅表层药物释放阻力较小所致;而在 2~16 h 呈明显的缓释特征,即缓慢释药阶段,这是因为 PP-THP-NPs 内部药物需要克服载体的阻滞作用才能释放出去^[6,13]。MPP-THP-NPs 同样呈现相似的双相释药特征,且缓释作用更显著,推测其表面修饰的马来酰亚胺基团覆盖在 MPP-THP-NPs 表面形成修饰层^[8],进而对药物释放产生额外阻滞作用,故其缓释效果较 PP-THP-NPs 更突出。

MPP-THP-NPs 口服吸收生物利用度显著提高,可能与以下因素相关:一是提高了 THP 的溶解度,改善了吸收瓶颈问题^[14];二是延长了药物在肠道黏液层的滞留时间,有利于减少直接排泄,促进 THP 充分吸收^[15];THP 易被胃肠道各种消化酶破坏^[4],三是其表面的马来酰亚胺基团和 mPEG 长链的双修饰,减少了 THP 与消化酶接触机会,提高了 THP 体内稳定性^[16];四是纳米药物可通过被肠上皮细胞摄取、细胞旁路转运、派伊尔氏结 M 细胞等途径被吸收^[14,17-18],实现高效转运;五是无定形药物通常更易吸收,生物利用度更高^[18-19],在上述多因素共同作用下,THP 的口服吸收显著增强。与 PP-THP-NPs 相比,MPP-THP-NPs 的 $t_{1/2}$ 显著延长,相对口服吸收生物利用度进一步提升,证明对纳米粒表面进行马来酰亚胺基团修饰具有必要性^[9]。药效学结果显示,在相同给药剂量下,MPP-THP-NPs 对急性肝损伤的保护作用显著优于 PP-THP-NPs,这主要与其更高的生物利用度有关^[20-21],因此,MPP-THP-NPs 具有更高的研究开发价值。

综上所述,本研究制备的 MPP-THP-NPs 具有较高包封率,粒径小于 100 nm,纳米结构稳定性良好,缓释特征显著,可促进 THP 口服吸收并增强其对急性肝损伤的保护作用,为 THP 新型给药系统的研究提供了新策略。后续将继续开展毒理学、长期

稳定性等评价研究,以进一步丰富 MPP-THP-NPs 研究资料,为其成药性评价提供必要的参考数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨梦萍,陈晓瑶,张悦健,等.基于文献计量学的延胡索研究现状及热点分析[J].药物评价研究,2023,46(7):1406-1416.
Yang M P, Chen X Y, Zhang Y J, et al. Research status and hot spot analysis of *Corydalis Rhizoma* based on bibliometrics [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(7): 1406-1416.
- [2] 轩园园.延胡索乙素防治急、慢性肝损伤及纤维化的作用机制研究[D].广州:广东药科大学,2021.
Xuan Y Y. Study on the mechanism of tetrahydropalmatine in preventing and treating acute and chronic liver injury and fibrosis [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2021.
- [3] 赵芳,杨云汉,赵雪秋,等.延胡索乙素与 β -环糊精及其衍生物的包合行为研究[J].中草药,2018,49(15):3609-3618.
Zhao F, Yang Y H, Zhao X Q, et al. Study on inclusion behavior and properties of tetrahydropalmatine with β -cyclodextrin and its derivatives [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(15): 3609-3618.
- [4] 梁新丽,祝婧云,廖正根,等.肠道菌群法研究延胡索、白芷配伍对延胡索乙素代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(4):92-94.
Liang X L, Zhu J Y, Liao Z G, et al. Study on the effect of compatibility of *Rhizoma Corydalis* and *Radix Angelicae Dahuricae* on tetrahydropalmatine metabolism by intestinal flora method [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16(4): 92-94.
- [5] 刘雪赞.延胡索乙素大鼠体内药动学研究[J].南京中医药大学学报,2012,28(6):555-557.
Liu X Y. Pharmacokinetics of tetrahydropalmatine in rats [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2012, 28(6): 555-557.
- [6] 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.
Li J X, Cao Y R, Wang J T, et al. Preparation and pharmacokinetics of tetrahydropalmatine phospholipid complex, and its solid dispersion, oil preparation and nanosuspension [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(14): 4307-4316.
- [7] 荆玲,范炎峰,邹梦梦,等.延胡索乙素聚乳酸纳米粒的制备及其体内药动学研究[J].中成药,2021,43(3):579-584.

- Jing L, Fan Y F, Zou M M, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of tetrahydropalmatine poly(lactic acid) nanoparticles [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(3): 579-584.
- [8] 陈永顺, 杨斌. 马来酰亚胺修饰的柠檬苦素纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 487-498.
Chen Y S, Yang B. Maleimide-modified limonin nanoparticles: Preparation, characterization and its oral pharmacokinetics study [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(2): 487-498.
- [9] Andrews G P, Laverty T P, Jones D S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71(3): 505-518.
- [10] 卢慧芳, 刘艳美, 王荷香, 等. 穿心莲内酯甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸纳米粒处方优化及体外释药考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(19): 2034-2039.
Lu H F, Liu Y M, Wang H X, et al. Formulation optimization of andrographolide mPEG-PLGA nanoparticles and *in vitro* release study [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(19): 2034-2039.
- [11] 王丹, 任宁君, 史步新. 托伐普坦纳米结构脂质载体的制备与药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 765-775.
Wang D, Ren N J, Shi B X. Preparation and pharmacokinetics of tolvaptan loaded nanostructured lipid carriers [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(4): 765-775.
- [12] 张维, 雷欢, 张运超, 等. 姜黄素调控 Trx-1/TXNIP 复合体防治对乙酰氨基酚诱导小鼠肝损伤的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(9): 91-98, 120.
Zhang W, Lei H, Zhang YC, et al. Study on curcumin-modulating Trx-1/TXNIP complex in the treatment of acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2024(9): 91-98, 120.
- [13] 曹伶俐, 刘素梅. 甜菊糖苷-高良姜素纳米复合物的制备及其理化性质评价 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(6): 1506-1514.
Cao L L, Liu S M. Preparation and physicochemical property evaluation of stevioside-galangin nanocomposites [J]. Chem Res Appl, 2025, 37(6): 1506-1514.
- [14] 周敬, 郑宝玉, 李阳杰, 等. 聚乙二醇修饰高良姜素纳米结构脂质载体处方优化及口服药动学评价 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4455-4466.
Zhou J, Zheng B Y, Li Y J, et al. Formulation optimization of pegylated galangin nanostructured lipid carriers and oral pharmacokinetics evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(14): 4455-4466.
- [15] 丁玉, 张艳慧, 辛娟, 等. 岩白菜素纳米结构脂质载体制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(12): 3865-3871.
Ding Y, Zhang Y H, Xin J, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of bergenin nanostructured lipid carriers [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(12): 3865-3871.
- [16] 毛利紧, 朱家豪, 郝海军. 芒果苷纳米囊泡的制备、表征和药动学研究 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(6): 1389-1397.
Mao L J, Zhu J H, Hao H J. Preparation, characterization and pharmacokinetic study of mangiferin nanovesicles [J]. Drugs Clin, 2025, 40(6): 1389-1397.
- [17] 何运杰, 奉建芳, 金一, 等. 纳米粒口服吸收跨肠上皮细胞膜机制的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(23): 2138-2144.
He Y J, Feng J F, Jin Y, et al. Advances in the mechanism of nanoparticles of oral absorption across the enterocyte [J]. Chin Pharm J, 2023, 58(23): 2138-2144.
- [18] 房伟, 王彦阁, 王奎鹏, 等. 木犀草素磷脂复合物介孔二氧化硅纳米粒的制备、表征和药动学研究 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(2): 330-340.
Fang W, Wang Y G, Wang K P, et al. Luteolin phospholipids complex mesoporous silica nanoparticles: Preparation, characterization and pharmacokinetics study [J]. Drugs Clin, 2025, 40(2): 330-340.
- [19] 尚慧杰, 王颖慧, 郝海军. 三叶苷-磷脂复合物处方工艺优化及理化性质的初步研究 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(11): 2724-2730.
Shang H J, Wang Y H, Hao H J. Formulation optimization of tilobatin-phospholipids complex and preliminary study of its physicochemical properties [J]. Chem Res Appl, 2024, 36(11): 2724-2730.
- [20] 孙丽, 李瑞华, 吉媛媛, 等. 高良姜素自胶束化固体分散体的制备、口服药动学和降血糖作用评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 143-156.
Sun L, Li R H, Ji Y Y, et al. Preparation, oral pharmacokinetic and glucose-decreasing effects evaluation of Galangin-loaded self-micelle solid dispersion [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(1): 143-156.
- [21] 姚杰, 姬新颖, 张体鹏, 等. 聚乙二醇和八聚精氨酸双修饰漆黄素脂质体的制备、表征及体内评价 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1564-1579.
Yao J, Ji X Y, Zhang T P, et al. PEG and R8 co-modified fisetin liposomes: Preparation, characteratation and *in vivo* evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(5): 1564-1579.

[责任编辑 孙英杰]