·药剂与工艺·

葛根多糖载葛根素纳米粒温敏凝胶的制备及其药动学研究

甘慧琴，梅陈松，关志宇*，谢树英，张紫霞，刘子鸣，吴文婷，朱卫丰

江西中医药大学，江西 南昌　330004

摘　要：目的　制备含葛根多糖载葛根素纳米粒的温敏凝胶（*Pueraria* polysaccharides-loaded puerarin nanoparticles thermosensitive gel，PN/Pur-NPs-Gel），以提高其生物利用度。**方法**　对葛根多糖进行氨基化修饰合成氨基化葛根多糖（*Pueraria* polysaccharides-NH_2，PN），并验证其结构；以 PN 为载体通过溶剂挥发法制备载葛根素纳米粒（PN/Pur-NPs），采用泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188 为凝胶基质，制备 PN/Pur-NPs-Gel，对 PN/Pur-NPs-Gel 的 pH 值、胶凝温度、流变学性质和体外释放进行考察；选用雄性大鼠对 PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 进行药动学研究。**结果**　通过傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectrometer，FTIR）和核磁共振氢谱（^{1}H nuclear magnetic resonance spectra，^{1}H-NMR）确认 PN 合成成功；制备的 PN/Pur-NPs 平均粒径为（140.47±0.75）nm、多分散指数（polydispersity index，PDI）为 0.202±0.011，ζ 电位为（−12.37±0.81）mV，包封率和载药量分别为（24.34±0.67）%、（15.63±0.23）%，且冻干后无明显变化，FTIR 研究证实其无新化合物形成；PN/Pur-NPs-Gel 的 pH 值为 6.50±0.02、胶凝温度为（32.17±0.32）℃，流变学特性考察结果表明，PN/Pur-NPs-Gel 的相变温度为 26 ℃、在鼻腔环境中能够迅速形成凝胶，体外释放研究结果证实，PN/Pur-NPs-Gel 可以有效结合纳米粒和凝胶的优势，具有较好的缓释作用；药动学研究结果表明，较葛根素原料药组，PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 的相对生物利用度分别提高到 184.64%、219.53%，且 $MRT_{0\sim t}$ 分别是葛根素原料药组的 1.47、1.80 倍。**结论**　将纳米技术和凝胶相结合后，制备的 PN/Pur-NPs-Gel 可以提高葛根素的生物利用度，并延长 PN/Pur-NPs 在鼻腔停留时间，为开发新的葛根素制剂提供实验基础。

关键词：葛根素；葛根多糖；鼻腔给药；纳米粒；温敏凝胶；药动学；生物利用度；缓释作用

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)21 - 7238 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.005

Preparation of *Pueraria* polysaccharides-loaded puerarin nanoparticles thermosensitive gel and its pharmacokinetics

GAN Huiqin, MEI Chensong, GUAN Zhiyu, XIE Shuying, ZHANG Zixia, LIU Ziming, WU Wenting, ZHU Weifeng

Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective　To prepare *Pueraria* polysaccharides-loaded puerarin nanoparticles thermosensitive gel (PN/Pur-NPs-Gel) in order to improve its bioavailability. **Methods**　Amino modified *Pueraria* polysaccharides were synthesised as *Pueraria* polysaccharides-NH_2 (PN) and their structures were verified; Puerarin-loaded nanoparticles (PN/Pur-NPs) were prepared by solvent volatilisation using PN as a carrier, and PN/Pur-NPs-Gel was prepared by using Porloxacin 407 and Porloxacin 188 as gel matrix, and the pH values, gelling temperature, rheological properties, and *in vitro* release were investigated; male rats were selected for pharmacokinetic studies of PN/Pur-NPs and PN/Pur-NPs-Gel. **Results**　The successful synthesis of PN was confirmed by Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and ^{1}H nuclear magnetic resonance spectra (^{1}H-NMR); the prepared PN/Pur-NPs had a particle

收稿日期：2024-05-04

基金项目：国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项（2018ZX09721002）；江西省人事厅博士后科研项目（252591）；江西省教育厅科学技术研究项目（GJJ211239）；江西中医药大学中药学一流学科科研项目（JXSYLXK-ZHYAO049）；江西省中医药管理局科技计划项目（2020B0366）

作者简介：甘慧琴，女，硕士研究生，从事药物新制剂与生物药剂学研究。E-mail: 1959932737@qq.com

***通信作者：**关志宇，男，博士后，教授，主要从事药物新制剂与生物药剂学研究。E-mail: yaoxueyuanc212@163.com

size of (140.47 ± 0.75) nm, a polydispersity index (PDI) of 0.202 ± 0.011, and a ζ potential of (−12.37 ± 0.81) mV, with encapsulation efficiency and drug loading of (24.34 ± 0.67)% and (15.63 ± 0.23)%, respectively, and no significant changes after lyophilisation. Infrared spectroscopy study confirmed that no new compounds were formed; the pH of PN/Pur-NPs-Gel was 6.50 ± 0.02, and the gelation temperature was (32.17 ± 0.32) ℃. The results of the rheological investigation showed that the phase transition temperature of PN/Pur-NPs-Gel was 26 ℃, and the gel could be formed rapidly in the nasal environment. The results of *in vitro* release confirmed that PN/Pur-NPs-Gel could effectively combine the advantages of nanoparticles and gels, and had a better sustained-release effect; the results of pharmacokinetic study showed that compared with the puerarin group, the relative bioavailability of PN/Pur-NPs and PN/Pur-NPs-Gel was increased to 184.64% and 219.53%, respectively, and the MRT_{0-t} was 1.47 and 1.80 times higher than that of puerarin group, respectively. **Conclusion** The prepared PN/Pur-NPs-Gel after combining nanotechnology and gel can improve the bioavailability of puerarin and prolong the residence time of PN/Pur-NPs in the nasal cavity, which provides an experimental basis for the development of new puerarin formulations.

Key words: puerarin; *Pueraria* polysaccharide; nasal administration; nanoparticles; thermosensitive gel; pharmacokinetics; bioavailability; sustained-release effect

葛根素（puerarin）具有抗炎、抗氧化、神经保护等药理作用[1]，对高血压、动脉硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、脑缺血等心血管疾病和脑部疾病有治疗作用。然而，由于其属于生物药剂学分类系统（biopharmaceutics classification system，BCS）IV 类药物[2]，口服生物利用度低，注射给药患者依从性差，并且可能导致过敏及对肝、肾损害等不良反应[3-4]，限制了其在临床上的应用[5]。鼻腔给药可以有效避免首过效应，且具有给药剂量小、起效快、不良反应少、生物利用度高等优点[6]。然而，以溶液状态通过鼻腔给药，存在鼻腔内黏液和纤毛对药物的清除作用[6-8]。原位凝胶是一种新型的药物传递系统，可以在溶液状态下给药于鼻腔，并在体内迅速转变为半固体凝胶状态[9-10]，有效延长药物在鼻腔内的停留时间，提高药物的生物利用度与疗效[9]。

天然多糖因其生物相容性好、生物可降解性和低毒性等特点，常用于纳米载体中，如壳聚糖、透明质酸、淀粉、普鲁兰等[11-12]。葛根多糖（*Pueraria* polysaccharides，PPS）在具有抗炎、抗氧化等药理活性的同时[13-14]，其分子结构中富含的亲水性羟基，通过物理或化学等方式修饰后，可以合成载体以负载药物制成纳米粒[15]。在多糖修饰的方法中，氨基化修饰具有简单、高效、副反应少等优点，通过在 PPS 的分子结构中引入氨基，制备氨基化葛根多糖（*Pueraria* polysaccharides-NH_2，PN）。可以利用 PN 负载葛根素制备成纳米粒，从而有效提高其的溶解度和生物利用度[16]。此外，低相对分子质量的修饰剂具有较小的细胞毒性[17]，可减少修饰剂在生物体内的免疫反应和毒性，从而提高其作为药物载体的安全性[18]。

本研究在对 PPS 进行氨基化修饰的基础上，将纳米技术和温敏凝胶相结合，通过溶剂挥发法和冷溶法，成功制备了葛根多糖载葛根素纳米粒温敏凝胶（*Pueraria* polysaccharides-loaded puerarin nanoparticles thermosensitive gel，PN/Pur-NPs-Gel），在增加葛根素的溶解度和渗透性的同时，延长制剂在鼻腔中的停留时间，进一步提高其生物利用度，为其后续脑内靶向研究提供基础，并为葛根素的应用及其新制剂的开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TS-110X50 型水浴恒温振荡器，上海施锐贸易有限公司；TGL-20MC 型台式高速冷冻离心机，湖南湘鑫仪器仪表有限公司；Nano S 型马尔文纳米粒度仪，英国马尔文公司；UV-1750 型紫外可见分光光度计，日本岛津公司；SJIA-5FE 型冷冻干燥机，宁波双嘉仪器有限公司；MDS-DCY12Q 型方形氮气吹干仪，迈德施（上海）分析仪器有限公司；Bruker AM 600 MHz 型核磁共振仪，德国 Bruker 公司；Sprucm Two 型傅里叶变换红外光谱仪，美国 Perkin-Elmer 公司；DF-101S 型磁力搅拌器，上海力辰邦西仪器科技有限公司；Triple QUDA 5200 型液相质谱联用仪，美国 AB Sciex 公司；HT7700 型透射电子显微镜（TEM），日本 Hitachi 公司；PHS-2F 型 pH 计，上海仪电科学仪器股份有限公司；MCR101 型流变仪，奥地利安东帕公司。

1.2 试剂

PPS（实验室自制，质量分数＞95%）、*N*,*N*-碳基二咪唑（*N*,*N*-carbonyldiimidazole，CDI，批号 RH443717）、二乙烯三胺（diethylenetriamine，DETA，批号 RH368806），上海易恩化学技术有限公司；葛根素原料药，批号 18082401，质量分数＞98%，成

都普菲德生物技术有限公司；葛根素对照品（批号 110752-201816，质量分数＞95.5%）、兰索拉唑（批号 18082401，质量分数＞99.6%），中国食品药品检定研究院；泊洛沙姆 407（Poloxamer 407，P407，批号 WPAJ508B）、泊洛沙姆 188（Poloxamer 188，P188，批号 WPAK524B），德国 BASF 公司。四氢呋喃（tetrahydrofuran，THF，批号 17400101）、乙腈（批号 75-05-8），分析纯，西陇科学股份有限公司；甲酸、甲醇、乙腈，色谱纯，美国 Tedia 公司。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠，体质量（200±20）g，由江西中医药大学实验动物中心提供，许可证号 SCXK（赣）2018-0003。动物实验经江西中医药大学动物研究伦理委员会批准（批准号 JZLLSC20240010）。

2 方法与结果

2.1 PN 的合成及表征

采用简单温和的方法制备 PN。精密称取 200 mg PPS 置于圆底烧瓶中，加入 10 mL 的纯水，超声溶解。另称取 600 mg 的 CDI 于烧杯中，加入 3 mL 乙腈，超声溶解。随后将 CDI 溶液完全滴入 PPS 溶液中，室温持续搅拌 30 min 后，缓慢滴加 1 mL 的 DETA，持续反应。反应完成后，透析冻干，即得 PN。通过傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectrometer，FTIR）和核磁共振氢谱（^{1}H nuclear magnetic resonance spectra，^{1}H-NMR）对 PN 进行结构确认。根据图 1 中的 FTIR 图谱，对 PPS、PN 的结构进行对比分析。PN 除了在 3 380、2 932、1 152～1 022 cm^{-1} 处存在 PPS 的特征峰外，在 1 700、1 546、1 264 cm^{-1} 处出现了 PPS 不具备的特征吸收峰，分别为酰胺键的羰基（-C=O）伸缩振动吸收峰、-NH-和-CN-的变形振动吸收峰。

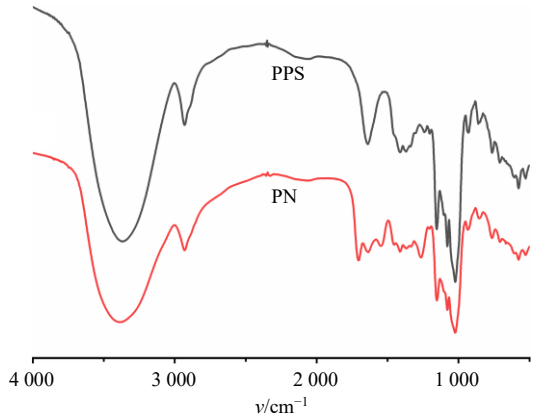


图 1 PPS 和 PN 的 FTIR

Fig. 1 FTIR of PPS and PN

图 2 结果显示，PN ^{1}H-NMR 谱图中除了出现 PPS 的共振峰外，还出现了 DETA 基团中-CH_2-的核磁共振峰（δ 3.0～3.5：-CONH-CH_2-；δ 2.5～3.0：-CH_2-NH_2），进一步证实 DETA 基团与 PPS 分子发生了偶联。通过以上分析表明成功合成了 PN。

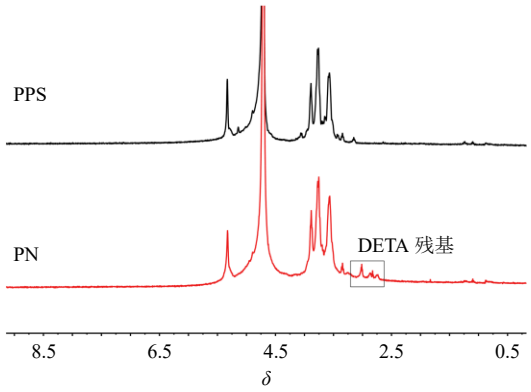


图 2 PPS 和 PN 的 ^{1}H-NMR

Fig. 2 ^{1}H-NMR of PPS and PN

2.2 PN/Pur-NPs 的制备与表征

2.2.1 PN/Pur-NPs 的制备 基于前期研究，采用溶剂挥发法制备 PN/Pur-NPs[19]。精密称取 10 mg PN，配制成质量浓度为 2 mg/mL 的水溶液；精密称取 5 mg 葛根素，配制成质量浓度为 2.5 mg/mL 的 THF 溶液。将葛根素溶液滴入 PN 溶液中，设置转速为 200 r/min，在避光环境中搅拌至 THF 挥发完全。将样品转移至超滤离心管中，以 10 000 r/min 离心（离心半径 6.2 cm）10 min 后，吸取滤管内样品、冻干，得到 PN/Pur-NPs。

2.2.2 理化性质 使用马尔文纳米粒度仪测定 PN/Pur-NPs 的粒径、多分散指数（polydispersity index，PDI）和 ζ 电位，平行 3 次。结果可见 PN/Pur-NPs 分散均匀，平均粒径为（140.47±0.75）nm（图 3-A），PDI 为 0.202±0.011，ζ 电位为（−12.37±0.81）mV（图 3-B）。

根据文献方法[20]，利用紫外可见分光光度法在 250 nm 处测定葛根素吸光度，在质量浓度 2～12 μg/mL 得回归方程为 Y=0.080 5 X+0.002 3，R^2=0.999 1。按照以下两式分别计算 PN/Pur-NPs 样品中葛根素的包封率和载药量，结果见表 1。测得 PN/Pur-NPs 样品中葛根素的包封率为（24.34±0.67）%，载药量为（15.63±0.23）%。冻干后复溶的 PN/Pur-NPs 样品的粒径、PDI、包封率和载药量见表 1，由表 1 可知，冻干后样品的平均粒径、PDI、包封率和载药量，与新鲜制备的 PN/Pur-NPs 混悬液相比变化不大，

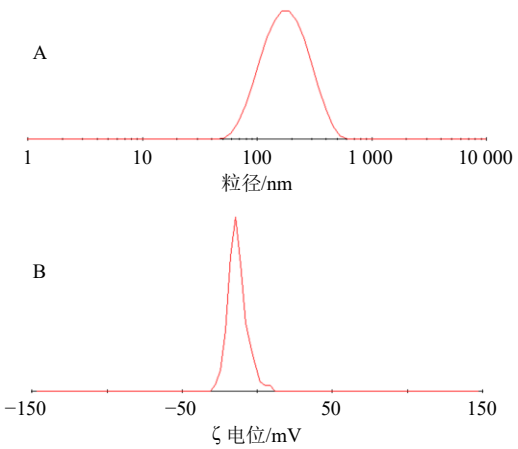


图 3　PN/Pur-NPs 的粒径分布（A）和 ζ 电位（B）

Fig. 3　Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of PN/Pur-NPs

结果表明 PN/Pur-NPs 的冻干稳定性较好。

包封率＝($W_{总}$－$W_{上}$)/$W_{总}$

载药量＝($W_{总}$－$W_{上}$)/($W_{总}$－$W_{上}$＋$W_{载}$)

$W_{总}$为葛根素总质量，$W_{上}$为离心后上清液中葛根素的质量，$W_{载}$为载体的质量

TME 结果如图 4 所示，新鲜制备的 PN/Pur-NPs 形态完整、分散性好（图 4-A）；冻干复溶后的 PN/Pur-NPs 有一定聚集倾向（图 4-B），可能是由于 PN 是 PPS 修饰合成的，从而具有一定的黏附作用。

2.2.3　傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）分析　利用 FTIR 对 PN 和葛根素的相互作用进行分析研究。由图 5 可知，物理混合物（葛根素原料药和 PN 二者粉末混合均匀）基本上是葛根素和 PN FTIR 特征峰的叠加，其中葛根素在 1 530、1 482、891 cm^{-1} 处特征峰的位置和强弱均未发生明显变化。但在 PN/Pur-NPs 中，葛根素的特征峰发生了偏移且强度有所减弱，结果表明 PN/Pur-NPs 中葛根素和 PN 间没有生成新的化合键，无新化合物形成。

表 1　冻干前、后 PN/Pur-NPs 的平均粒径、PDI、包封率和载药量　($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1　Average particle size, PDI, encapsulation rate and drug loading of PN/Pur-NPs before and after lyophilization ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PN/Pur-NPs	平均粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
冻干前	140.47±0.75	0.202±0.011	24.34±0.67	15.63±0.23
冻干后复溶	158.93±2.59	0.226±0.001	23.35±0.25	15.28±0.45

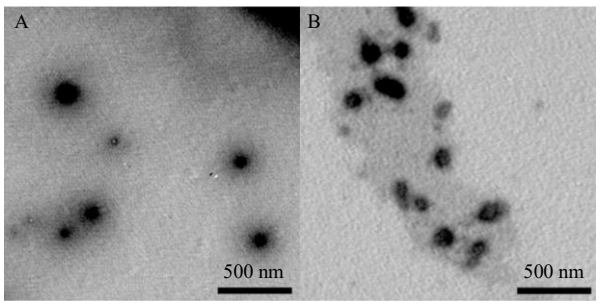


图 4　PN/Pur-NPs 冻干前（A）和冻干后复溶后（B）的 TEM 图

Fig. 4　TEM images of PN/Pur-NPs before freeze-drying (A) and after freeze-drying (B)

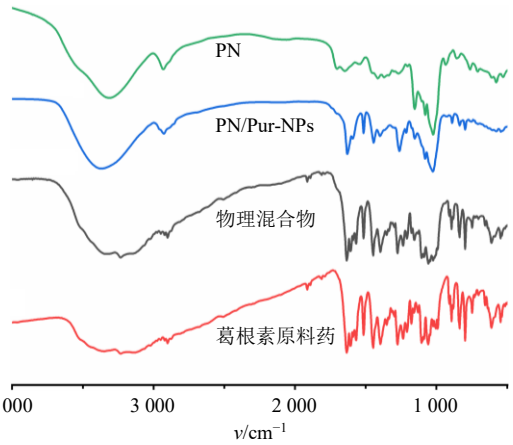


图 5　物理混合物、葛根素原料药、PN/Pur-NPs 和 PN 的 FTIR

Fig. 5　FTIR of physical mixture, puerarin bulk drug, PN/Pur-NPs and PN

2.3　PN/Pur-NPs-Gel 的制备和体外性质评价

2.3.1　PN/Pur-NPs-Gel 的制备　根据单因素实验和星点设计-效应面法确定的空白凝胶的处方[21-23]为 21.20% P407、2.30% P188，使用冷溶法[21]制备含有 PN/Pur-NPs 的温敏凝胶（PN/Pur-NPs-Gel）。首先，先后加入处方量的 P188 和 P407，并将其放入冰箱冷藏，溶胀过夜；随后将凝胶转移至溶有 PN/Pur-NPs 的烧杯中，补充适量的水至所需体积，即得 PN/Pur-NPs-Gel。

2.3.2　pH 值和胶凝温度测定　PN/Pur-NPs-Gel 的凝胶复合体系 pH 值为 6.50±0.02；采用试管倒置法[24]测定 PN/Pur-NPs-Gel 的胶凝温度为（32.17±0.32）℃。

2.3.3　流变学特性考察

（1）凝胶线性黏弹区：凝胶线性黏弹区测试结果的相对大小可以反映样品中凝胶结构的完整性和稳定性。测试结果如图 6 所示，当剪切应力（γ）＞1%，储能模量（G'）开始下降，当 G'＝损耗模量（G''）时，凝胶结构被破坏，稳定性降低。因此，所有的

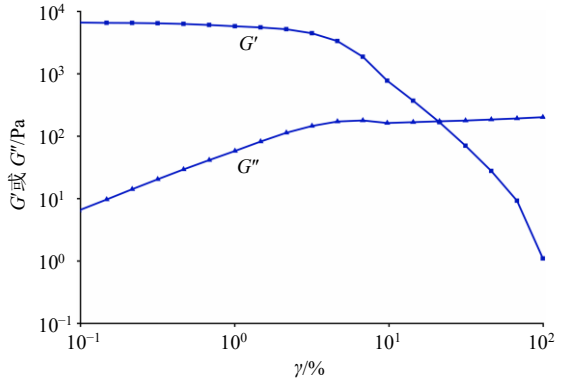


图 6　PN/Pur-NPs-Gel 的线性黏弹区

Fig. 6　Linear viscoelastic interval of PN/Pur-NPs-Gel

动态振荡实验都需控制 γ（应变）在 1%以内。

（2）相变温度：采用振荡模式对温敏凝胶的相变温度进行测定，在 20～50 ℃以 1 ℃/min 的速率升高温度。结果如图 7 所示，在较低温度下温敏凝胶的 $G''>G'$，表明 PN/Pur-NPs-Gel 具有流体性质，可以流动；当温度到达 26 ℃，G''与 G'相交，此时的温度即为 PN/Pur-NPs-Gel 从溶胶到凝胶开始发生转变的相变温度。随着温度一直升高，G'始终大于 G''，表明此时一直在转变为凝胶的过程中，且凝胶弹性特征占优势；当温度升高至 32.20 ℃后，G'与 G''变化开始平缓，表明此时黏弹性趋于稳定，并且已经转变为主要是弹性特征的半固体凝胶状态。

（3）G'：G'是可以间接反映凝胶强度的一种重要指标[25-26]。根据图 7 所示，在温敏凝胶胶凝的过程中，G'呈现出 S 形的上升趋势。当 PN/Pur-NPs-Gel 在完全凝胶的状态下，其 G'值为 1.2 kPa。这一结果表明温敏凝胶具有良好的凝胶强度。

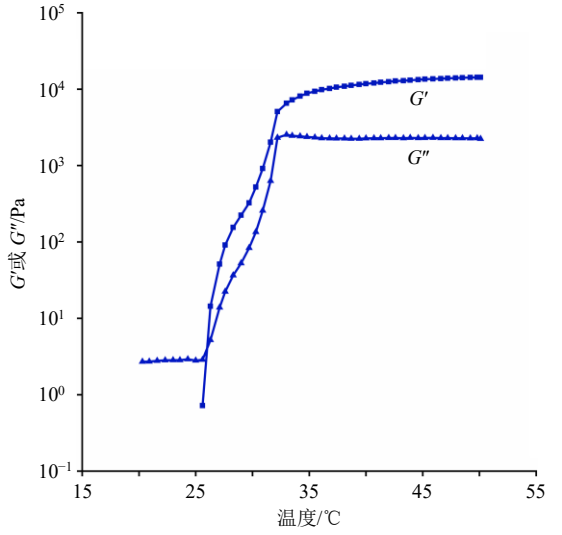


图 7　PN/Pur-NPs-Gel 的 G'和 G''随温度变化曲线

Fig. 7　Plot of PN/Pur-NPs-Gel G' and G'' versus temperature

（4）黏度：黏度是描述温敏凝胶流变学特性的重要参数之一。在 35 ℃下测定温敏凝胶的复合黏度（η^*），结果见图 8，PN/Pur-NPs-Gel 的 η^*为 311 Pa·s。随后的时间内，η^*不再发生明显变化，表明凝胶已经完全胶凝，说明 PN/Pur-NPs-Gel 在鼻腔内环境中可以迅速发生胶凝，并且能够更好地停留在鼻腔黏膜上，提高药物在鼻腔内的滞留时间。

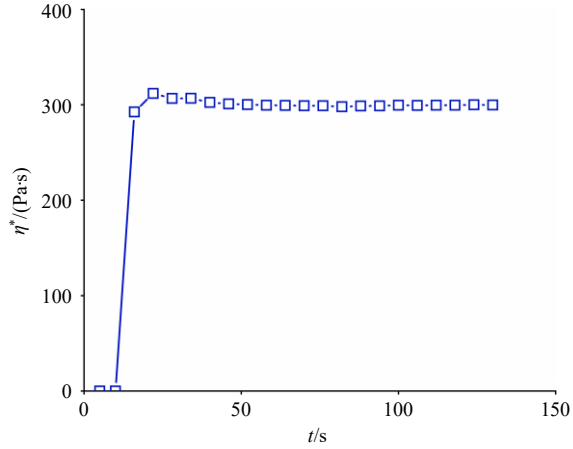


图 8　PN/Pur-NPs-Gel 的 η^*随时间变化曲线

Fig. 8　Plot of composite viscosity (η^*)of PN/Pur-NPs-Gel versus time

2.3.4　体外释放研究

（1）透析袋法：精密量取 2 mL 相当量葛根素的葛根素原料药溶液、含葛根素的温敏凝胶（Pur-Gel，制备方法同“2.3.1”项）、PN/Pur-NPs 以及 PN/Pur-NPs-Gel，并将其分别置于游离的葛根素能够透过的相对分子质量为 3500 的透析袋中。为了模拟鼻腔环境，以 pH 6.5 的 PBS 作为释放介质。设置转速为 100 r/min、温度为（35.0±0.5）℃，分别于 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL，同时补充等量等温释放介质。结果如图 9 所示，葛根素原料药在 6 h 内的累积释放率即达到 95.52%。与葛根素原料药相比，Pur-Gel、PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 体外释放速度均较缓慢。对累积释放率进行数学模型拟合，结果如表 2 所示，Pur-Gel、PN/Pur-NPs 和和 PN/Pur-NPs-Gel 的体外释放均符合一级动力学方程，表现出良好的缓释效果，可以有效延长药物的释放时间。此外，PN/Pur-NPs-Gel 结合了纳米粒和凝胶 2 种制剂的释放优势，表现出较 Pur-Gel 和 PN/Pur-NPs 更好的缓释效果，这为进一步优化药物释放系统提供了重要参考。

（2）Franz 扩散池法：在扩散池的供给池与接收

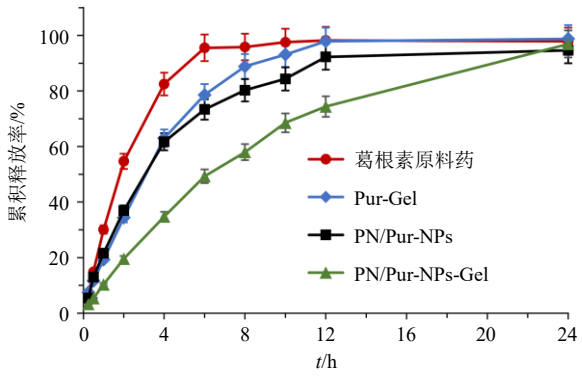


图 9 葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 的透析袋法体外释放曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 9 *In vitro* release profiles of puerarin bulk drug, Pur-Gel, PN/Pur-NPs, PN/Pur-NPs-Gel by dialysis bag method ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

池之间，放入能够透过葛根素的相对分子质量 3 500 的透析膜。为了模拟鼻腔环境，以 pH 6.5 的 PBS 作为释放介质，加入 PBS 在容积为 10 mL 的接收池中，并设置转速为 100 r/min、温度为（35.0±0.5）℃。随后将 1 mL 相当量葛根素的葛根素原料药溶液、Pue-Gel、PN/Pur-NPs 以及 PN/Pur-NPs-Gel，分别加入供给池中，并分别于 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL，同时补充等量等温释放介质。结果如图 10 和表 3 所示，与透析袋法结果相似。葛根素原料药在 4 h 内的累积释放率即达到 86.31%。与葛根素原料药相比，Pur-Gel、PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 体外释放速度均较缓慢，符合一级动力学方程，表现出良好的缓释效果，可以有效延长药物的释放时间。此外，PN/Pur-NPs-Gel 结合了纳米粒和凝胶 2 种制剂的释放优势，表现出较 Pur-Gel 和 PN/Pur-NPs 更好的缓释效果。

表 2 葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 的透析袋法体外释放模型拟合结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 2 *In vitro* release fitting formulas for puerarin bulk drug, Pur-Gel, PN/Pur-NPs, PN/Pur-NPs-Gel by dialysis bag method ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	模型	拟合方程	R^2
葛根素原料药	零级释放	M_t＝2.04 t＋50.97	0.323 1
	一级释放	M_t＝99.66 (1－$e^{-0.40\,t}$)	0.994 9
	Higuchi	M_t＝16.92 $t^{1/2}$＋26.51	0.607 2
	Weibull	M_t＝100 (1－exp{−[−0.41 (x−0.014)]$^{1.13}$})	0.998 2
Pur-Gel	零级释放	M_t＝4.13 t＋31.34	0.605 6
	一级释放	M_t＝102.25 (1－$e^{-0.24\,t}$)	0.996 2
	Higuchi	M_t＝25.06 $t^{1/2}$＋3.11	0.850 7
	Weibull	M_t＝100 (1－exp{−[0.22 (x−0.33)]$^{1.26}$})	0.993 4
PN/Pur-NPs	零级释放	M_t＝2.26 t＋38.80	0.509 8
	一级释放	M_t＝94.37 (1－$e^{0.25\,t}$)	0.996 8
	Higuchi	M_t＝17.44 $t^{1/2}$＋25.05	0.778 7
	Weibull	M_t＝100 (1－exp{−[0.23 (x−0.105)]$^{0.85}$})	0.995 7
PN/Pur-NPs-Gel	零级释放	M_t＝2.73 t＋21.11	0.755 8
	一级释放	M_t＝100.14 (1－$e^{0.11\,t}$)	0.999 1
	Higuchi	M_t＝19.35 $t^{1/2}$－3.18	0.940 0
	Weibull	M_t＝100 (1－exp{−[0.11 (x−0.22)]$^{1.11}$})	0.998 9

2.4 药动学研究

2.4.1 实验方案 将 24 只健康 SD 大鼠随机分成葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 鼻腔给药 4 组，给药剂量均为葛根素 10 mg/kg。在大鼠麻醉后，用 100 μL 微量进样器单侧鼻孔给药，分别于给药 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 h 后，眼眶静脉取血 0.3 mL，置于含有肝素钠的抗凝管中，将抗凝管放入离心机中，设置转速为 4 000 r/min 离心（离心半径 6.2 cm）10 min，分离血浆，冷冻保存。

2.4.2 血浆样品处理 取 100 μL 血清，加入 200 μL 色谱纯甲醇和 100 μL 内标（含兰索拉唑 100 ng/mL）溶液，涡旋混匀后，12 000 r/min 离心（离心半径 6.2 cm）10 min，取全部上清液氮吹。加入 100 μL 甲醇充分复溶，涡旋，12 000 r/min 离心（离心半径 6.2 cm）10 min，取上清液进行 LC-MS 分析。

2.4.3 LC-MS/MS 条件

（1）色谱条件：色谱柱为 Agilent Poroshell 120

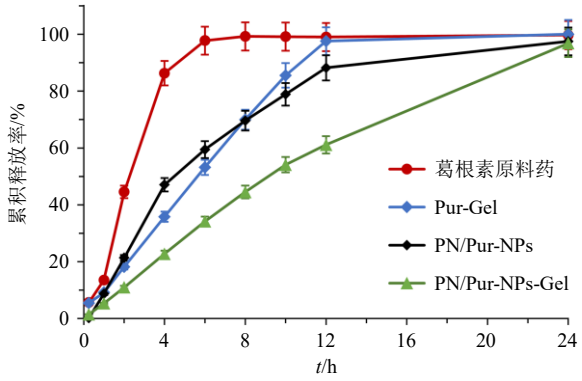


图 10　葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 的扩散池法体外释放曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 10　*In vitro* release plots of puerarin bulk drug, Pur-Gel, PN/Pur-NPs, PN/Pur-NPs-Gel by diffusion cell method ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

EC-C_{18} 柱（100 mm×2.1 mm，5 μm）；流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱程序：0～2.0 min，10%乙腈；2.0～2.1 min，10%～60%乙腈；2.1～4.0 min，60%乙腈；4.0～4.1 min，60%～95%乙腈；4.1～6.0 min，95%～10%乙腈；进样量 2 μL；柱温 30 ℃。

（2）质谱条件：电喷雾离子源正离子扫描模式，通过多反应扫描的方式进行监测。葛根素和内标兰索拉唑的定量离子对分别为 *m*/*z* 417.1/297.1、370.1/251.9；去簇电压 103 V；碰撞能量（CE）37 eV；电喷雾电压 5 500 V；喷雾气（GS1）413.685 kPa（60 psi）；气帘气（CUR）103.421 kPa（15 psi）；辅助加热气体（GS2）413.685 kPa（60 psi）；离子化温度（TEM）550 ℃。

2.4.4　线性关系考察　取 10、50、100、200、400、800、1 600、3 200 ng/mL 的葛根素对照品溶液各 10 μL，加入到 100 μL 空白血浆中，按照“2.4.2”项下方法处理样品并进样分析，以葛根素峰面积与内标峰面积比值为纵坐标（*Y*），葛根素质量浓度为横坐标（*X*），进行线性回归分析，得到线性回归方程为 $Y = 0.007X + 0.121$，$R^2 = 0.997\,8$，线性范围 1～320 ng/mL。

表 3　葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 的扩散池法体外释放拟合公式（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 3　*In vitro* release fitting formulas for puerarin bulk drug, Pur-Gel, PN/Pur-NPs, PN/Pur-NPs-Gel by diffusion cell method ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	模型	拟合方程	R^2
葛根素原料药	零级释放	$M_t = 3.61\,t + 44.68$	0.383 4
	一级释放	$M_t = 104.44\,(1 - e^{0.33\,t})$	0.960 7
	Higuchi	$M_t = 24.32\,t^{1/2} + 12.98$	0.664 8
	Weibull	$M_t = 100\,(1 - \exp\{-[0.32\,(x - 0.41)]^{2.17}\})$	0.997 9
Pur-Gel	零级释放	$M_t = 4.44\,t + 19.58$	0.736 7
	一级释放	$M_t = 113.59\,(1 - e^{0.12\,t})$	0.969 3
	Higuchi	$M_t = 26.28\,t^{1/2} - 10.64$	0.899 2
	Weibull	$M_t = 100\,(1 - \exp\{-[0.09\,(x - 3.89)]^{2.76}\})$	0.997 0
PN/Pur-NPs	零级释放	$M_t = 4.15\,t + 21.29$	0.757 3
	一级释放	$M_t = 103.26\,(1 - e^{0.014\,t})$	0.992 1
	Higuchi	$M_t = 25.05\,t^{1/2} - 8.12$	0.922 6
	Weibull	$M_t = 100\,(1 - \exp\{-[0.16\,(x - 0.25)]^{1.07}\})$	0.996 8
PN/Pur-NPs-Gel	零级释放	$M_t = 4.11\,t + 6.07$	0.962 5
	一级释放	$M_t = 150.504\,(1 - e^{0.04\,t})$	0.999 1
	Higuchi	$M_t = 8.23\,t^{1/2} - 3.179\,9$	0.967 2
	Weibull	$M_t = 100\,(1 - \exp\{-[0.08\,(x - 1.08)]^{1.53}\})$	0.995 6

2.4.5　专属性考察　取空白血浆样品、含内标的血浆样品、含葛根素的血浆样品、含内标和葛根素的血浆样品，进样分析，结果见图 11，空白血浆对测定结果无干扰，该方法专属性良好。

2.4.6　精密度考察　取含葛根素 5、20、80 ng/mL 的血浆对照品溶液，分别于日内进样 5 次，测得日内精密度 RSD 分别为 2.54%、2.40%、1.93%，因此日内精密度良好；分别连续测定 5 d，每天同一时间进样 1 次，测得日间精密度 RSD 分别为 2.05%、4.22%、5.71%。

2.4.7　稳定性考察　取含葛根素 5、20、80 ng/mL 的血浆对照品溶液，分别考察葛根素血浆样品−20 ℃冷冻保存，冻融循环 3 次，复融后血浆样品

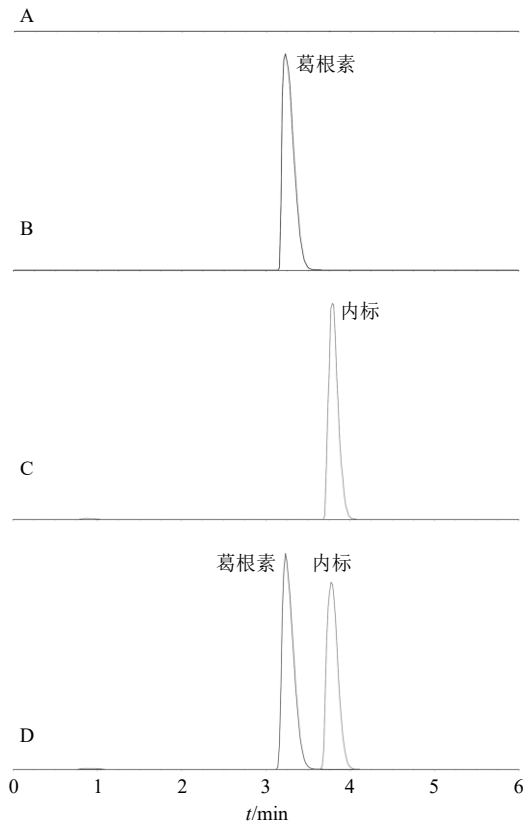


图 11 空白血浆（A）、葛根素＋空白血浆（B）、内标＋空白血浆（C）、葛根素＋内标＋空白血浆（D）的 HPLC 图

Fig. 11 HPLC of blank plasma (A), puerarin + blank plasma (B), internal standard + blank plasma (C), puerarin + internal standard + blank plasma (D)

溶液室温放置 6 h，进样测定其 RSD 为 2.61%，表明稳定性良好。

2.4.8 回收率考察 取含葛根素 5、20、80 ng/mL 的血浆对照品溶液，进样测定，记录峰面积（*A*）；取空白血浆 100 μL，按“2.4.2”项下方法处理后，加入葛根素对照品溶液配制成同质量浓度的样品，进样测定，记录峰面积（*B*），*A*/*B* 即为回收率。回收率 RSD 分别为 2.54%、2.43%、1.96%，表明该方法准确度良好。

2.4.9 药动学考察结果 大鼠给药后的药-时曲线如图 12 所示，采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数，结果如表 4 所示。

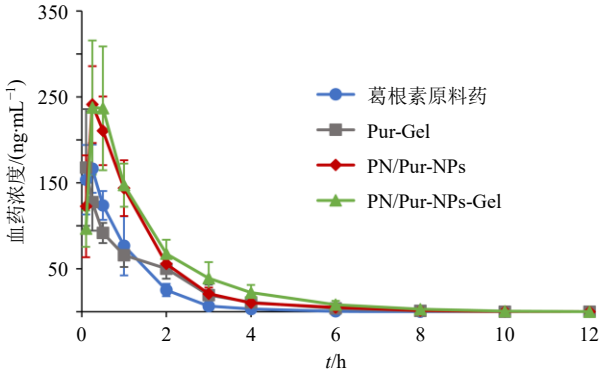


图 12 葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 药-时曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 12 Drug-time curves of puerarin bulk drug, Pur-Gel, PN/Pur-NPs, PN/Pur-NPs-Gel ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 4 葛根素原料药、Pur-Gel、PN/Pur-NPs、PN/Pur-NPs-Gel 的药动学参数（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Table 4 Pharmacokinetic parameters of puerarin bulk drug, Pur-Gel, PN/Pur-NPs, PN/Pur-NPs-Gel ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	葛根素原料药	Pur-Gel	PN/Pur-NPs	PN/Pur-NPs-Gel
$AUC_{0\sim t}$	μg·h·L^{-1}	192.187±45.917	224.314±38.412$^{\#\#}$	354.847±21.97**	421.906±60.863$^{**\#}$
$AUC_{0\sim\infty}$	μg·h·L^{-1}	193.919±46.116	228.395±41.375$^{\#\#}$	356.799±21.569**	425.532±62.167$^{**\#}$
$MRT_{0\sim t}$	h	0.919±0.112	1.542±0.255**	1.355±0.209**	1.650±0.227$^{**\#}$
$MRT_{0\sim\infty}$	h	0.973±0.122	1.659±0.302**	1.420±0.212**	1.707±0.234$^{**\#}$
半衰期（$t_{1/2z}$）	h	0.683±0.176	1.262±0.353*	1.336±0.542**	1.320±0.193**
达峰时间（t_{max}）	h	0.200±0.077	0.150±0.077	0.333±0.129	0.375±0.137
C_{max}	μg·L^{-1}	183.726±30.083	194.844±35.293$^{\#\#}$	264.150±15.279**	301.324±18.29$^{**\#}$

与葛根素原料药比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$；与 PN/Pur-NPs 比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$。

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* puerarin bulk drug; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* PN/Pur-NPs.

PN/Pur-NPs 组的药-时曲线下面积（$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$）、平均滞留时间（$MRT_{0\sim t}$ 和 $MRT_{0\sim\infty}$）、最大血药浓度（C_{max}）分别是葛根素原料药的 1.85、1.84、1.47、1.46、1.44 倍，相对生物利用度提高到原料药的 184.64%；PN/Pur-NPs-Gel 组的 $AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$、$MRT_{0\sim t}$、$MRT_{0\sim\infty}$、C_{max} 分别是葛根素组的 2.20、2.19、1.80、1.75、1.64 倍，相对生物利用度提高到 219.53%，表明 PN/Pur-NPs 可以有效提高葛根素的生物利用度。

另外，PN/Pur-NPs-Gel 的 $AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$、C_{max} 较 PN/Pur-NPs 有所升高（$P<0.05$），表明凝胶可以延长葛根素在鼻腔中的滞留时间，并增加葛根素的滞留量，而 PN/Pur-NPs 以溶液状态存在，则会在鼻腔中被鼻纤毛和鼻黏液清除。

3 讨论

本研究以 PN 为载体，通过溶剂挥发法制备了粒径较小的 PN/Pur-NPs，提高了葛根素的溶解度，延缓了其释放。然而，在以溶液状态通过鼻腔给药的过程中，PN/Pur-NPs 容易流失和清除。温敏凝胶作为原位凝胶中一种常用的环境响应型聚合物体系，其在体外和体内均具有实际优势[27]。泊洛沙姆作为一种温敏凝胶基质，因其无毒、安全性高、适用性广而被广泛使用[28]，其是由 2 个亲水性聚乙烯氧化物（PEO）嵌段和 1 个疏水性聚丙烯氧化物（PPO）嵌段组成。当温度升高时，P407（70% PEO 和 30% PPO）溶液中的 PPO 脱水，发生凝胶化[28]。添加 P188（约 84% PEO 和 16% PPO）会降低 PPO 的比例，导致分子间氢键范围更广，从而提高凝胶温度，可通过调节 P407 和 P188 的比例控制凝胶的胶凝温度。因此本研究选用泊洛沙姆为凝胶基质，通过冷溶法制备了 PN/Pur-NPs-Gel，其 pH 值符合鼻腔条件，胶凝温度为（32.17±0.32）℃，在室温下是可以方便进行给药的流动液体状态，而当温度升至胶凝温度时发生凝胶化，形成凝胶，可以避免被鼻腔中的纤毛和黏液清除，从而增加 PN/Pur-NPs-Gel 在鼻腔中的滞留时间。

透析袋法和 Franz 扩散池法的体外释放结果均显示，PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 中的葛根素未发生爆发性释放，且 PN/Pur-NPs-Gel 结合了纳米粒和凝胶 2 种制剂的释放优势，表现出较 Pur-Gel 和 PN/ Pur-NPs 更好的缓释效果，实现了葛根素的缓释作用。

药动学研究结果表明，PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 的相对生物利用度较葛根素原料药分别提高了 184.64%、219.53%，另外，PN/Pur-NPs-Gel 的 $AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$和 C_{max} 较 PN/Pur-NPs 均有所升高（$P<0.05$），表明 PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 可显著提高葛根素的生物利用度，且 PN/Pur-NPs-Gel 可避免 PN/Pur-NPs 在鼻腔中被鼻纤毛和鼻黏液清除。另外，PN/Pur-NPs-Gel 的 $MRT_{0\sim t}$、$MRT_{0\sim\infty}$、$t_{1/2}$ 较 Pur-Gel 有所延长，但无显著性差异。

药物通过鼻腔给药后可快速入血，药动学结果显示，PN/Pur-NPs-Gel 的 t_{max} 较 Pur-Gel 有所延长，但无显著性差异，可能是因为 2 组葛根素的血药浓度在升高的同时被迅速消除；另外，本研究在开展组织分布的预实验时发现，PN/Pur-NPs-Gel 在脑组织中葛根素含量相对 Pur-Gel 更高，可能是因为 PN/Pur-NPs-Gel 中葛根素在入血后，具有更快地进入脑组织的速率，这可能是 PN/Pur-NPs-Gel 的 $MRT_{0\sim t}$、$MRT_{0\sim\infty}$、$t_{1/2}$ 较 Pur-Gel 的有所延长，但无显著性差异的又一原因。

葛根素从鼻腔输送到大脑的主要方式有 2 种：一种是体循环通路，其中葛根素被吸收到血液中，然后通过血脑屏障（blood brain barrier，BBB）到达大脑；另一种是通过嗅觉、三叉神经和血管周围空间的鼻脑路径到达大脑[29]；而鼻腔给药可以绕过 BBB。另外，纳米粒能够帮助药物在体内长时间停留，且具有良好的生物相容性，并能够渗透过鼻黏膜[30]。因此，基于以上研究，之后可对 PN/Pur-NPs 和 PN/Pur-NPs-Gel 的药效学、脑内靶向性及其通过鼻嗅上皮绕过 BBB 的可能机制进行深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 杨敏, 丁传波, 马葭葭. 葛根素药理活性研究进展 [J]. 人参研究, 2021, 33(6): 62-64.

[2] Li H W, Dong L, Liu Y, *et al*. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1/2): 133-138.

[3] 解晓帅, 董运茁, 穆殿平, 等. 葛根素注射液临床使用安全性的评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3956-3961.

[4] Hou S Z, Su Z R, Chen S X, *et al*. Role of the interaction between puerarin and the erythrocyte membrane in puerarin-induced hemolysis [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 192(3): 184-192.

[5] Wu J Y, Li Y J, Yang L, *et al*. Borneol and A-asarone as adjuvant agents for improving blood-brain barrier permeability of puerarin and tetramethylpyrazine by activating adenosine receptors [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1858-1864.

[6] Kiran P, Debnath S K, Neekhra S, *et al*. Designing nanoformulation for the nose-to-brain delivery in Parkinson's disease: Advancements and barrier [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2022, 14(1): e1768.

[7] Huang Q Q, Chen X, Yu S X, *et al*. Research progress in brain-targeted nasal drug delivery [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1341295.

[8] 魏珍珍, 方晓艳, 樊帅珂, 等. 基于"鼻-脑"通路的中药防治脑缺血损伤的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4800-4805.

[9] Karavasili C, Fatouros D G. Smart materials: *In situ* gel-

forming systems for nasal delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(1): 157-166.

[10] 骆慧婷, 欧阳威, 高司琪, 等. 新型中药凝胶剂的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2022, 37(5): 573-578.

[11] Kou T T, Faisal M, Song J, *et al*. Polysaccharide-based nanosystems: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(1): 1-15.

[12] Sumaila M, Marimuthu T, Kumar P, *et al*. Lipopolysaccharide nanosystems for the enhancement of oral bioavailability [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(7): 242.

[13] Baranyika J B, Bakire S, Pu S C, *et al*. Optimization of ultrasonic extraction, structural characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from *Radix Pueraria Lobata*, a Chinese medicinal plant [J]. *Results Chem*, 2023, 5: 100989.

[14] Zhang Z, Cui Y S, Ouyang H, *et al*. *Radix Pueraria lobata* polysaccharide relieved DSS-induced ulcerative colitis through modulating PI3K signaling [J]. *J Funct Foods*, 2023, 104: 105514.

[15] Gong H X, Li W N, Sun J L, *et al*. A review on plant polysaccharide based on drug delivery system for construction and application, with emphasis on traditional Chinese medicine polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 211: 711-728.

[16] Gong F R, Lv R Y, Ma J Y, *et al*. Synthesis and characterization of water soluble diethylenetriamine-β-cyclodextrin/ethinylestradiol inclusion complex [J]. *Chem Select*, 2022, 7(37): e202201790.

[17] Lan B Y, Wu J F, Li N, *et al*. Hyperbranched cationic polysaccharide derivatives for efficient siRNA delivery and diabetic wound healing enhancement [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 855-865.

[18] Cavallaro G, Sardo C, Scialabba C, *et al*. Smart inulin-based polycationic nanodevices for siRNA delivery [J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(2): 224-230.

[19] Gao F, Chen Z Y, Zhou L, *et al*. Preparation, characterization and *in vitro* study of bellidifolin nano-micelles [J]. *RSC Adv*, 2022, 12(34): 21982-21989.

[20] 赵庭, 贾运涛, 张良珂. 载葛根素聚乙烯亚胺/海藻酸钠自组装纳米粒的制备及性能研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3523-3528.

[21] Wang F Y, Yang Z Z, Liu M L, *et al*. Facile nose-to-brain delivery of rotigotine-loaded polymer micelles thermosensitive hydrogels: *In vitro* characterization and *in vivo* behavior study [J]. *Int J Pharm*, 2020, 577: 119046.

[22] Chen L, Han X, Xu X, *et al*. Optimization and evaluation of the thermosensitive *in situ* and adhesive gel for rectal delivery of budesonide [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21(3): 97.

[23] Huang W, Zhang N, Hua H, *et al*. Preparation, pharmacokinetics and pharmacodynamics of ophthalmic thermosensitive *in situ* hydrogel of betaxolol hydrochloride [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 107-113.

[24] 刘新国, 舒翔. 星点设计-效应面法优选磷酸川芎嗪鼻用原位凝胶基质处方的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(21): 2168-2171.

[25] Wang X Q, Liu Y L, Lin L F, *et al*. Rheology and *in vitro* release properties of thermosensitive *in situ* gel of Yihuang Decoction and its common gel for vaginal use [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(3): 539-547.

[26] Xu L F, Zhang Y, Wang S R, *et al*. Thermoresponsive gel for sustained release of BMP4 to inhibit corneal neovascularization [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 194: 111167.

[27] Kaur P, Garg T, Rath G, *et al*. *In situ* nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(4): 1167-1176.

[28] Wang Q W, Wong C H, Edwin Chan H Y E, *et al*. Statistical Design of Experiment (DoE) based development and optimization of DB213 *in situ* thermosensitive gel for intranasal delivery [J]. *Int J Pharm*, 2018, 539(1/2): 50-57.

[29] Khan A R, Liu M R, Khan M W, *et al*. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route [J]. *J Control Release*, 2017, 268: 364-389.

[30] 范容晖, 阳志强, 李勃深, 等. 中药纳米技术靶向治疗脑部疾病研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 128-140.

[责任编辑 郑礼胜]