

高良姜素-乳清蛋白纳米粒的制备、药动学及其对肝缺血再灌注损伤的保护作用

薛晓菲¹, 董鹏远², 许梦雅³, 王盼盼^{4*}

1. 郑州健康学院, 河南 郑州 450064

2. 河南省儿童医院郑州儿童医院, 河南 郑州 450008

3. 郑州大学第二附属医院, 河南 郑州 450014

4. 郑州大学, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 制备高良姜素-乳清蛋白纳米粒 (galangin-whey protein-nanoparticles, Gal-WP-NPs), 考察其体内口服药动学行为及其对肝缺血再灌注损伤的保护作用。方法 单因素实验考察各个处方工艺对 Gal-WP-NPs 的影响。采用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 得到 Gal-WP-NPs 最优处方工艺, 测定 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位等。冷冻干燥法制备 Gal-WP-NPs 粉末, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Gal-WP-NPs 微观形貌, X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法分析 Gal-WP-NPs 中高良姜素晶型。比较高良姜素及 Gal-WP-NPs 溶解度, 考察 Gal-WP-NPs 模拟胃肠液中的释药行为。按 150 mg/kg (以高良姜素计) ig 给予 SD 大鼠高良姜素和 Gal-WP-NPs, 计算主要药动学参数及 Gal-WP-NPs 相对生物利用度。建立 SD 大鼠肝脏缺血再灌注模型, 比较高良姜素和 Gal-WP-NPs 对肝缺血再灌注损伤的保护作用。结果 Gal-WP-NPs 最佳处方工艺: 反溶剂相与溶剂相体积比为 15.40 : 1, 乳清蛋白与高良姜素用量比为 15.05 : 1, 超声功率为 82.00 W。Gal-WP-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 $(94.07 \pm 0.98) \%$ 、 $(5.76 \pm 0.09) \%$ 、 $(197.39 \pm 4.46) \text{ nm}$ 和 $(-23.79 \pm 0.75) \text{ mV}$ 。Gal-WP-NPs 呈类球形纳米粒, 高良姜素在 Gal-WP-NPs 粉末中以无定形态存在, 溶解度得到极显著提高 ($P < 0.01$), Gal-WP-NPs 体外释药行为符合 Weibull 模型。Gal-WP-NPs 达峰时间 ($t_{\max}$) 延后至 $(2.17 \pm 0.64) \text{ h}$, 半衰期 ($t_{1/2}$) 增加至 $(5.11 \pm 0.95) \text{ h}$, 口服相对生物利用度提高至 6.58 倍。Gal-WP-NPs 极大提高了高良姜素对肝缺血再灌注损伤的保护作用。结论 Gal-WP-NPs 显著增加了高良姜素口服相对生物利用度, 增强了高良姜素对肝缺血再灌注损伤的保护作用。

关键词: 高良姜素; 乳清蛋白; 纳米粒; Box-Behnken 设计-效应面法; 药动学; 生物利用度; 肝缺血再灌注损伤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)18-7334-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.021

Preparation, pharmacokinetics and protective effect on hepatic ischemia reperfusion injury of galangin-whey protein-nanoparticles

XUE Xiaofei¹, DONG Pengyuan², XU Mengya³, WANG Panpan⁴

1. Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

2. Henan Children's Hospital Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450008, China

3. The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

4. Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To prepare galangin-whey protein-nanoparticles (Gal-WP-NPs), and study its oral pharmacokinetic behavior and protective effect on the hepatic ischemia reperfusion injury *in vivo*. **Methods** Single-factor experiments were conducted to investigate the effects of various formulation processes on Gal-WP-NPs. Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was used to obtain its optimal prescriptions. Entrapment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were determined. Gal-WP-NPs powder was prepared by freeze-drying method. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the

收稿日期: 2026-03-24

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目 (232102311023); 2023 年河南省高等教育教学改革研究与实践项目 (2023SJGLX125Y)

作者简介: 薛晓菲 (1989—), 女, 学士, 讲师, 研究方向为临床药学及康复治疗。E-mail: yibing0401@126.com

*通信作者: 王盼盼 (1991—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: wangpanpan@zzu.edu.cn

microstructure of Gal-WP-NPs. Galangin crystal in Gal-WP-NPs powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD). Solubility of galangin and Gal-WP-NPs powder were compared, and drug release behavior of Gal-WP-NPs in gastrointestinal fluid was determined. SD rats were administered galangin and Gal-WP-NPs via ig at a dose of 150 mg/kg (calculated as galangin), the main pharmacokinetic parameters and relative bioavailability of Gal-WP-NPs were calculated. The model of hepatic ischemia reperfusion injury was established, and then the protective effects of galangin and Gal-WP-NPs were compare on the hepatic ischemia reperfusion injury. **Results** Optimal formulation processes of Gal-WP-NPs: the volume ratio of the anti-solvent phase to the solvent phase was 15.40:1, the amounts ratio of whey protein to galangin was 15.05:1, and the ultrasonic power was 82.00 W. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(94.07 \pm 0.98)\%$, $(5.76 \pm 0.09)\%$, (197.39 ± 4.46) nm and (-23.79 ± 0.75) mV, respectively. Gal-WP-NPs are spherical nanoparticles. Galangin existed as an amorphous state in Gal-WP-NPs powder. Solubility of galangin was significantly increased ($P < 0.01$), and the release process of Gal-WP-NPs *in vitro* conformed to the Weibull model. The peak time ($t_{\max}$) of Gal-WP-NPs was delayed to (2.17 ± 0.64) h, half-life period ($t_{1/2}$) was increased to (5.11 ± 0.95) h, and oral relative bioavailability was increased to 6.58 times. Gal-WP-NPs significantly enhanced the protective effect of galangin on the hepatic ischemia reperfusion injury. **Conclusion** Gal-WP-NPs significantly increased the oral relative bioavailability of galangin and enhanced the protective effect on the hepatic ischemia reperfusion injury.

Key words: galangin; whey protein; nanoparticles; Box-Behnken design-response surface methodology; pharmacokinetics; bioavailability; hepatic ischemia reperfusion injury

肝移植、肝切除术及失血性休克等常会引起肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI), 进而诱发肝脏损伤、肝衰竭等疾病, 极大影响了患者康复进程, 是康复医学亟待解决的科学问题之一。化学药物常存在较多的不良反应^[1], 患者顺应性差, 因而毒性小、药效高的中药活性成分成为治疗 HIRI 的候选药物^[2]。高良姜素主要存在于高良姜、蜂胶、蜡菊等植物中, 属于黄酮类化合物。高良姜素对 HIRI 具有较强的保护作用^[3-4], 口服安全性高, 具有较高的研发价值及临床应用潜力^[5]。高良姜素在水及不同 pH 值磷酸盐缓释液中溶解度均低于 $4.0 \mu\text{g/mL}$ ^[6], 极强的疏水性导致高良姜素溶出度极低, 且高良姜素在肠道内易降解^[7], 口服吸收生物利用度不足 10%^[8], 限制了药效。目前有高良姜素固体分散体^[7]、纳米胶束^[9]、脂质纳米粒^[10]等报道, 相对生物利用度分别提高至 5.16、3.64、4.28 倍, 但仍有一定的提升空间。

牛血清白蛋白、人血清白蛋白等主要从血液制品中提取得到, 应用于递送药物时存在过敏、疾病传播及伦理等问题。乳清蛋白 (whey protein, WP) 主要来自牛奶, 贴近人类饮食习惯, 富含 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、免疫球蛋白等多种活性成分, 被认为是“蛋白之王”, 口服后有助于促进肠道、组织器官等疾病康复, 临床上常作为康复治疗的营养补充剂^[11], 使用安全性高。乳清蛋白分子结构中同时具有疏水性和亲水性基团, 因而使乳清蛋白良好乳化性、两亲性及自组装特点, 其中 β -乳球蛋白成分可与药物分子通过氢键、范德华力、疏水作用力等

结合在一起形成纳米聚合物^[12-13], 从而促进药物吸收、增强药效等^[14]。基于此, 本研究制备了高良姜素-乳清蛋白纳米粒 (galangin-whey protein-nanoparticles, Gal-WP-NPs), 使用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化处方工艺, 并考察 Gal-WP-NPs 理化性质、药动学及体内药效, 为高良姜素应用于 HIRI 康复治疗提供研究依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZNCL-BS 型磁力搅拌仪, 上海越众仪器设备有限公司; 1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; YM-080S 型超声仪, 深圳市方奥微电子有限公司; DZF-60900 型真空干燥箱, 上海目尼实验设备有限公司; MS204TS/02 型电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; EYELY N-1100 型旋转蒸发仪, 上海豫明仪器有限公司; Nano ZS90 型纳米粒度仪, 英国 Malvern 仪器公司; 10 kDa 型超滤离心管, 截留相对分子质量 10 000, 德国 Merck Millipore 公司; H7650 型透射电子显微镜, 日本日立公司; RCY-1400T 型智能溶出试验仪, 欧莱博技术有限公司; LGJ-10C 型冷冻干燥机, 四环福瑞科仪科技发展有限公司; D8 Venture 型 X-射线粉末衍射仪, 瑞士 Bruker 仪器公司; Vet Test 8008 型生化分析仪, 美国 IDEXX 生物科技公司; SKZ-2 型光学显微镜, 德国 CZ 公司。

1.2 材料

高良姜素对照品, 批号 21061401, 质量分数

99.0%，北京中科质检生物技术有限公司；高良姜素原料药，批号 230210，质量分数 98.0%，成都锦泰和生物科技有限公司；漆黄素对照品，批号 RP300120，质量分数 98.8%，成都麦德生科技有限公司；乳清蛋白，批号 S27484，质量分数 97.0%，杭州吉工生物科技有限公司；磷酸缓冲盐溶液 (PBS)，批号 P301984，青海莱茵尔生物科技有限责任公司；联苯双酯，批号 19J210705，万邦德制药集团有限公司；大鼠血清天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒 (批号分别为 SBJ-M0078、SBJ-M0650)，购自南京森贝伽生物科技有限公司；超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛测试盒 (批号 A001-3、A003-1)，购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠，体质量为 (220 ± 20) g，雌雄兼具，河南省动物实验中心提供 [许可证号 SCXK (豫) 2020-0001]，实验前禁食 12 h。实验过程遵循郑州健康学院动物伦理委员会相关规定，伦理批准号 2023-SQLL-EC-20230915-1007-0000084。

2 方法与结果

2.1 Gal-WP-NPs 的制备

取 20 mg 高良姜素溶于 2 mL 乙醇，作为溶剂相。取处方量乳清蛋白溶于一定体积的纯化水中，静置过夜，使乳清蛋白充分水化，作为反溶剂相。将反溶剂相置于 45 °C 水浴中，在 700 r/min 磁力搅拌条件下，将含高良姜素的溶剂相滴加至含乳清蛋白的反溶剂相中，恒温磁力搅拌至无醇味。将混悬液于一定功率下超声一定时间，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，补加纯化水至原始体积，即得 Gal-WP-NPs 混悬液。

2.2 高良姜素定量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；检测波长 266 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 °C；流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (55:45，混匀后单泵运行)；进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 称取高良姜素对照品适量，精密称定，用甲醇配制含高良姜素 200 μg/mL 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取 Gal-WP-NPs 混悬液 2 mL 至 50 mL 量瓶中，加甲醇超声 10 min (功率为 250 W、频率为 35 kHz) 后稀释定容，以

10 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 10 min，除去沉淀物。精密吸取上清液 2 mL 至 10 mL 量瓶中，加甲醇-0.2%磷酸水溶液混合溶剂 (55:45) 稀释定容，即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 吸取“2.2.2”项下制备的高良姜素对照品溶液，采用甲醇-0.2%磷酸水溶液混合溶剂 (55:45) 稀释成质量浓度分别为 20.00、10.00、5.00、1.00、0.50、0.05 μg/mL 的系列高良姜素对照品溶液，测定各质量浓度 (X) 对应的峰面积 (Y)，以 Y 对 X 进行线性回归，得回归方程 $Y = 20.6547X + 0.6184$ ， $r = 0.9999$ ，结果表明高良姜素线性区间为 0.05~10.00 μg/mL。

2.2.5 专属性考察 参考 Gal-WP-NPs 处方称取乳清蛋白粉末，按照“2.1”项下方法制备阴性样品，按照“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液。另精密吸取 Gal-WP-NPs 供试品溶液和 5.00 μg/mL 高良姜素对照品溶液各 20 μL，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，结果见图 1。结果表明，乳清蛋白未干扰高良姜素色谱峰，专属性高。

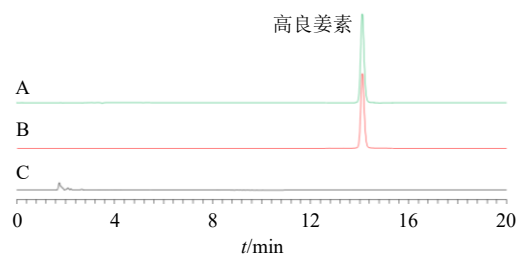


图1 Gal-WP-NPs (A)、高良姜素对照品 (B) 和空白样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of Gal-WP-NPs (A), galangin reference substance (B) and blank sample solution (C)

2.2.6 精密度考察 取质量浓度分别为 0.05、5.00、10.00 μg/mL 高良姜素对照品溶液，分别连续进样 6 次，计算得高良姜素峰面积的 RSD 分别为 0.60%、0.44%、0.42%，结果表明该仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 取“2.2.3”项下制备的 Gal-WP-NPs 供试品溶液，分别于制备后 0、3、6、12、18、24 h 进样测定，计算得高良姜素峰面积的 RSD 为 0.83%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性考察 取同一份 Gal-WP-NPs 样品，按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，根据随行标准曲线计算得高良姜素质量浓度的 RSD 为 1.19%，结果表明该实验重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密吸取 Gal-WP-NPs 0.5

mL 至 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分成 3 组, 按标示量的 50%、100%、150% 分别加入高良姜素对照品, 测定其总含量, 参考加入高良姜素对照品的量计算高良姜素回收率。9 份样品中高良姜素的平均加样回收率为 101.34%, RSD 为 1.78%, 结果表明该实验准确度较高。

2.3 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径和 ζ 电位的测定

取 Gal-WP-NPs 混悬液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 精密吸取 1.0 mL 至超滤离心管中, 10 000 r/min 离心 (离心半径 5.4 cm) 10 min, 测定超滤离心管内高良姜素的量 (m_1), 根据高良姜素总投药量 (m_0) 计算包封率。根据 Gal-WP-NPs 中高良姜素和乳清蛋白总用量 (m_2) 计算载药量。取稀释后的 Gal-WP-NPs 混悬液, 使用粒度分析仪记录平均粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位。

$$\text{包封率} = m_1/m_0$$

$$\text{载药量} = m_1/m_2$$

2.4 Gal-WP-NPs 处方工艺单因素考察

2.4.1 反溶剂相与溶剂相体积比的考察 乳清蛋白与高良姜素用量比为 15 : 1、超声功率为 80 W, 超声时间为 6 min 条件下, 考察反溶剂相与溶剂相体积比对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 1。随着反溶剂相与溶剂相体积比的增加, Gal-WP-NPs 的包封率和载药量均先增加后下降, 可能是反溶剂相与溶剂相

体积比较低时, 体系中乙醇比例较大, 易导致乳清蛋白发生变性^[15], 从而影响载药。反溶剂相与溶剂相体积比较高时, 体系中乙醇比例过低, 影响了去溶剂化作用^[16], 故使包封率及载药量下降。Gal-WP-NPs 的平均粒径和 PDI 值总体呈下降趋势, 可能是反溶剂相与溶剂相体积比越高, 体系中溶剂体积越大, 减少了 Gal-WP-NPs 相互融合、粘连几率所致。 ζ 电位绝对值呈先增大后下降趋势, 可见水相与有机相体积比对 Gal-WP-NPs 影响较大。反溶剂相与溶剂相体积比为 15 : 1 时包封率、载药量和 ζ 电位绝对值相对较大, 且粒径和 PDI 相对较小, 故后续以 15 : 1 为中心, 对反溶剂相与溶剂相体积比 10 : 1~20 : 1 进行优化。

2.4.2 乳清蛋白与高良姜素用量比的考察 反溶剂相与溶剂相体积比 15 : 1、超声功率为 80 W, 超声时间为 6 min 条件下, 考察乳清蛋白与高良姜素用量比对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 2。随着乳清蛋白与高良姜素用量比的增加, Gal-WP-NPs 包封率总体呈增加趋势, 但载药量总体呈下降趋势, 说明增加乳清蛋白与高良姜素用量比有利于提高包封率, 但应控制乳清蛋白用量, 以提高载药量。Gal-WP-NPs 平均粒径和 PDI 值先变小后增大, 但对 ζ 电位影响程度相对较小。乳清蛋白与高良姜素用量比为 15 : 1 时包封率、载药量和 ζ 电位绝对值相对较大, 且粒径和 PDI 相对较小, 故后续以 15 : 1 为中心,

表 1 反溶剂相与溶剂相体积比对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect investigation of volume ratio of anti-solvent phase to solvent phase on encapsulation efficiency, drug loading, average particle size, PDI and ζ potential of Gal-WP-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

反溶剂相与溶剂相体积比	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
5 : 1	64.67 $\pm$ 0.79	4.07 $\pm$ 0.05	306.24 $\pm$ 10.51	0.319 $\pm$ 0.016	-20.55 $\pm$ 0.41
10 : 1	70.65 $\pm$ 1.60	4.41 $\pm$ 0.03	250.11 $\pm$ 4.00	0.233 $\pm$ 0.008	-22.80 $\pm$ 0.91
15 : 1	88.54 $\pm$ 1.71	5.48 $\pm$ 0.03	217.95 $\pm$ 9.19	0.116 $\pm$ 0.005	-25.41 $\pm$ 0.69
20 : 1	82.77 $\pm$ 0.56	5.06 $\pm$ 0.04	205.23 $\pm$ 4.66	0.115 $\pm$ 0.008	-24.74 $\pm$ 0.92
25 : 1	78.66 $\pm$ 1.65	4.76 $\pm$ 0.05	204.30 $\pm$ 8.68	0.115 $\pm$ 0.010	-24.18 $\pm$ 0.97

表 2 乳清蛋白与高良姜素用量比对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect investigation of amounts ratio of whey protein to galangin on encapsulation efficiency, drug loading, average particle size, PDI and ζ potential of Gal-WP-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

乳清蛋白与高良姜素用量比	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
5 : 1	41.74 $\pm$ 1.50	6.71 $\pm$ 0.06	337.21 $\pm$ 6.15	0.226 $\pm$ 0.007	-23.39 $\pm$ 0.19
10 : 1	68.10 $\pm$ 1.77	6.08 $\pm$ 0.04	258.89 $\pm$ 7.22	0.123 $\pm$ 0.004	-24.25 $\pm$ 0.89
15 : 1	88.75 $\pm$ 0.94	5.49 $\pm$ 0.08	207.86 $\pm$ 3.25	0.114 $\pm$ 0.010	-24.16 $\pm$ 0.91
20 : 1	88.88 $\pm$ 0.87	4.27 $\pm$ 0.05	228.82 $\pm$ 3.07	0.117 $\pm$ 0.008	-24.21 $\pm$ 1.12
25 : 1	89.65 $\pm$ 0.43	3.34 $\pm$ 0.10	245.25 $\pm$ 5.90	0.126 $\pm$ 0.004	-24.38 $\pm$ 0.65

对乳清蛋白与高良姜素用量比 10:1~20:1 进行优化。

2.4.3 超声功率的考察 乳清蛋白与高良姜素用量比为 15:1、反溶剂相与溶剂相体积比 15:1、超声时间为 6 min 条件下,考察超声功率对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响,结果见表 3。随着超声功率的增加, Gal-WP-NPs 包封率和载药量均先增大后下降,可能是超声功率较

小时,影响了去溶剂化效应及乳清蛋白结构变性程度^[13],进而影响载药;超声功率过大时,可能破坏 Gal-WP-NPs 结构,使药物泄露进入水相,进而使包封率和载药量下降。粒径和 PDI 值呈先变小后增大趋势,超声功率过大时会导致 ζ 电位绝对值下降。超声功率为 80 W 时包封率、载药量和 ζ 电位绝对值相对较大,且粒径和 PDI 相对较小,故后续以 80 W 为中心,对超声功率 60~100 W 进行优化。

表 3 超声功率对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect investigation of ultrasonic power on encapsulation efficiency, drug loading, average particle size, PDI and ζ potential of Gal-WP-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
40	76.50±0.58	4.65±0.06	286.68±9.40	0.253±0.008	-23.86±1.22
60	79.76±1.04	4.89±0.09	246.97±3.39	0.192±0.007	-22.74±1.13
80	88.01±0.29	5.50±0.05	204.05±8.45	0.114±0.007	-24.24±1.21
100	82.71±1.24	5.02±0.08	228.77±9.72	0.131±0.006	-24.26±0.84
120	77.29±1.40	4.67±0.09	245.62±7.87	0.139±0.006	-20.33±0.38

2.4.4 超声时间的影响 乳清蛋白与高良姜素用量比为 15:1、反溶剂相与溶剂相体积比 15:1、超声功率 80 W 条件下,考察超声时间对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响,结果见表 4。不进行超声时, Gal-WP-NPs 包封率和载药量均相对较低,粒径相对较大, ζ 电位绝对值较小,所以制备 Gal-WP-NPs 时引入超声工艺是必要的。随着超声时间的增加, Gal-WP-NPs 包封率和

载药量均增加后下降,可能是超声时间较短时影响了去溶剂化效应及乳清蛋白载药^[13],但超声时间过长时,可能破坏 Gal-WP-NPs 结构,导致药物泄漏。随着超声时间的延长, Gal-WP-NPs 粒径逐渐变小后趋稳,而 PDI 值先变小后增大。由于超声时间为 4 min 时, Gal-WP-NPs 包封率大于 90%,载药量相对较大,粒径更接近 200 nm,故最终确定超声时间为 4 min。

表 4 超声时间对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量、平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect investigation of ultrasonic time on encapsulation efficiency, drug loading, average particle size, PDI and ζ potential of Gal-WP-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	83.16±0.95	4.98±0.10	307.05±25.27	0.316±0.013	-16.38±1.43
2	86.34±0.54	5.29±0.08	261.65±12.77	0.197±0.008	-22.36±1.15
4	92.17±1.03	5.66±0.05	204.08±4.30	0.118±0.006	-23.56±0.64
6	89.58±1.35	5.46±0.11	207.65±10.11	0.147±0.006	-23.91±1.14
8	86.66±0.66	5.22±0.04	206.52±5.28	0.148±0.005	-23.55±0.99

2.5 BBD-RSM 优化 Gal-WP-NPs 处方工艺

2.5.1 试验方案 反溶剂相与溶剂相体积比 (X_1)、乳清蛋白与高良姜素用量比 (X_2) 和超声功率 (X_3) 对 Gal-WP-NPs 包封率、载药量和平均粒径影响较大,分别作为 3 个自变量,各自变量低、中、高 3 水平设置见表 5。在自变量优化区间内 ζ 电位变化相对较小,而 PDI 值均小于 0.3,故不再将 ζ 电位和 PDI 值作为优化指标。采用包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和平均粒径 (Y_3) 作为优化指标,期望 Gal-WP-

NPs 包封率及载药量相对较高,同时粒径相对较小,故使用这 3 个质量指标的归一值 (overall desirability, OD) 进行优化。OD 值计算过程为①包封率和载药量计算公式为 $d_{\max} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$; 粒径计算公式为 $d_{\min} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$, 式中 M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别代表实测值、最大值及最小值;② $OD = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 。结果见表 5。

2.5.2 模型拟合、效应面及优化结果 使用 Design

Expert 软件 (V11.0.2) 建立自变量与响应值之间的数学关系, 得拟合方程: $OD=0.76+0.03 X_1-7.06 \times 10^{-4} X_2+0.04 X_3+0.06 X_1 X_2+0.10 X_1 X_3-5.75 \times 10^{-3} X_2 X_3-0.21 X_1^2-0.29 X_2^2-0.37 X_3^2$, 作为数学模型。方差分析见表 6, 该数学模型 $P=0.0003$, 具有极显

著性差异; 失拟项 $P=0.0669$, 无显著性差异; $R^2=0.9628$, $R_{adj}^2=0.9150$, 均大于 0.9, 表明该数学模型能准确地预测实验数据, 拟合结果参考价值高。数学模型方程中, $X_1 X_3$ 具有显著性意义 ($P<0.05$), X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均有极显著性意义 ($P<0.01$)。

表 5 Gal-WP-NPs 处方工艺设计及试验结果 ($n=3$)

Table 5 Process design and test results of Gal-WP-NPs prescription ($n=3$)

序号	X_1	$X_2/\%$	X_3/W	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD 值	序号	X_1	$X_2/\%$	X_3/W	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD 值
1	15:1 (0)	15:1 (0)	80 (0)	91.15	5.63	209.98	0.693	10	15:1	20:1 (+1)	100	85.85	4.05	235.95	0.226
2	10:1 (-1)	15:1	60 (-1)	81.34	5.02	241.18	0.263	11	15:1	20:1	60	83.94	3.81	246.12	0.000
3	10:1	10:1 (-1)	80	79.81	7.13	236.78	0.326	12	20:1	10:1	80	78.36	7.29	225.39	0.218
4	20:1 (+1)	15:1	100 (+1)	83.17	5.22	243.94	0.300	13	10:1	15:1	100	82.11	5.13	256.38	0.000
5	15:1	10:1	60	78.04	7.04	250.86	0.000	14	15:1	10:1	100	79.61	6.96	250.77	0.203
6	15:1	15:1	80	92.94	5.71	196.75	0.780	15	20:1	15:1	60	79.47	4.32	239.74	0.154
7	15:1	15:1	80	93.44	5.74	206.71	0.763	16	10:1	20:1	80	83.46	4.22	246.83	0.185
8	15:1	15:1	80	92.23	5.64	204.49	0.740	17	20:1	20:1	80	84.98	4.27	218.96	0.329
9	15:1	15:1	80	94.07	5.79	198.13	0.822								

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.31	9	0.15	20.13	0.0003	X_1^2	0.19	1	0.19	26.41	0.0013
X_1	6.47×10^{-3}	1	6.47×10^{-3}	0.89	0.3759	X_2^2	0.34	1	0.34	47.34	0.0002
X_2	3.98×10^{-6}	1	3.98×10^{-6}	5.50×10^{-4}	0.9819	X_3^2	0.58	1	0.58	79.97	<0.0001
X_3	0.01	1	0.01	1.68	0.2364	残差	0.05	7	7.24×10^{-4}		
$X_1 X_2$	0.02	1	0.02	2.20	0.1817	失拟项	0.04	3	0.01	5.33	0.0699
$X_1 X_3$	0.04	1	0.04	5.79	0.0470	绝对误差	0.01	4	2.53×10^{-3}		
$X_2 X_3$	1.32×10^{-4}	1	1.32×10^{-4}	0.02	0.8963	总和	1.36	16			

2.5.3 响应面及最佳处方工艺 $X_1 X_1$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 与 OD 值的响应面分别见图 2, 均呈典型的抛物线形态, OD 值存在理论最大值。选择 OD 值最大值为优化目标, Gal-WP-NPs 最佳制备工艺: 反溶剂相与溶剂相体积比为 15.40:1, 乳清蛋白与高良姜素用量比为 15.05:1, 超声功率为 82.00 W, 数学模型预测的 OD 值为 0.834。

2.5.4 处方工艺验证 平行制备 3 批 Gal-WP-NPs, 分别测定包封率、载药量及粒径, 计算验证试验的

OD 值, 并以最佳处方工艺的预测 OD 值 (0.834) 为参考, 计算各批次验证试验 OD 值的相对偏差, 结果见表 7。3 批 Gal-WP-NPs 验证试验的 OD 值相对偏差仅-1.56%, 说明该数学模型实用价值高。Gal-WP-NPs 平均包封率、载药量及粒径分别为 $(94.07 \pm 0.98)\%$ 、 $(5.76 \pm 0.09)\%$ 和 (197.39 ± 4.46) nm。粒径分布图见图 3-A, PDI 值为 (0.109 ± 0.007) ; ζ 电位为 (-23.79 ± 0.75) mV, 见图 3-B。

相对偏差=(验证值-预测值)/预测值

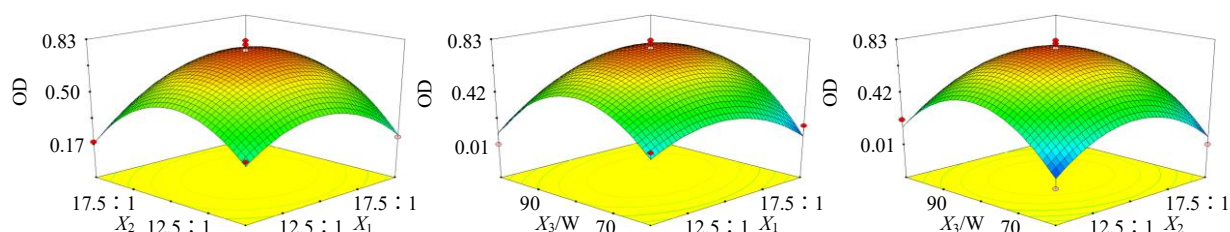


图 2 不同因素对 OD 值的效应面

Fig. 2 Response surface of different factor on OD value

表 7 处方验证结果及相对偏差 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Results of prescription validation and relative deviation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	OD 值	OD 均值	OD 值相对偏差/%
第 1 批	93.89±1.01	5.75±0.09	197.16±4.22	0.818	0.821	-1.56
第 2 批	94.90±0.78	5.79±0.04	201.88±5.17	0.818		
第 3 批	93.42±0.92	5.74±0.07	193.13±4.06	0.826		

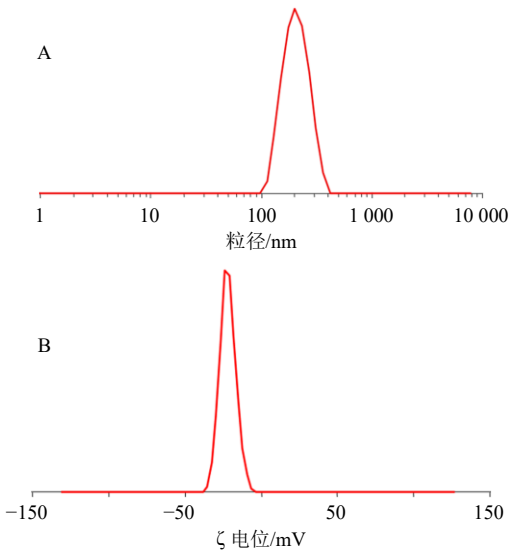


图 3 Gal-WP-NPs 粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Particle distribution (A) and ζ potential (B) of Gal-WP-NPs

2.6 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)

取 Gal-WP-NPs 混悬液 50 μL 滴至铜网上, 铺展后滴加 1.0% 磷钨酸钠溶液 50 μL , 混合均匀, 静置至干燥。固定在 TEM 样品台上, 调节放大倍数, 直至观察到 Gal-WP-NPs 形貌。结果见图 4, Gal-WP-NPs 外貌呈类球形。

2.7 Gal-WP-NPs 粉末的制备

乳清蛋白水溶性良好, 且可作为冻干保护剂^[17],

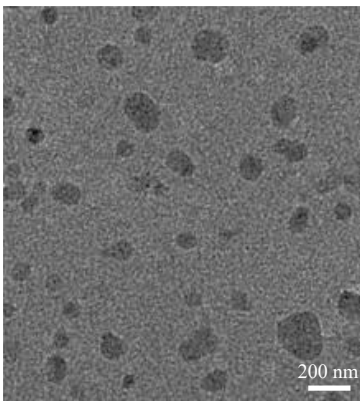


图 4 Gal-WP-NPs 的 TEM 图片 ($\times 14\,500$)

Fig. 4 TEM image of Gal-WP-NPs ($\times 14\,500$)

为减少辅料种类, 故使用乳清蛋白作为冻干保护剂。取 Gal-WP-NPs 混悬液分装至西林瓶, 加入 10% 乳清蛋白, 在 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱下预冻 3 d, 使之完全呈冰冻状态, 置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥机, 3 d 后取出即得 Gal-WP-NPs 粉末。样品外观见图 5, Gal-WP-NPs 混悬液及粉末复溶后均带蓝色乳光, Gal-WP-NPs 粉末呈疏松状, 均一性良好。取 Gal-WP-NPs 粉末复溶后混悬液, 使用绿色激光侧面照射, 可观测到明亮光路, 即丁达尔现象, 说明 Gal-WP-NPs 粉末复溶后混悬液中存在大量的纳米粒。Gal-WP-NPs 粉末复溶后平均包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 $(92.96 \pm 1.13)\%$ 、 $(5.64 \pm 0.06)\%$ 、 $(203.16 \pm 7.65)\text{ nm}$ 和 $(-24.06 \pm 0.17)\text{ mV}$, 与冻干前相比 4 个质量指标均无显著性变化 ($P > 0.05$), 说明冻干过程未显著影响 Gal-WP-NPs 质量, 没有引起颗粒聚集。

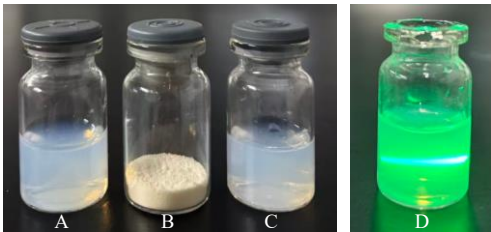


图 5 Gal-WP-NPs 混悬液 (A)、粉末 (B) 和粉末复溶后 (C) 外观及其丁达尔现象 (D)

Fig. 5 Appearance of Gal-WP-NPs suspension (A), powder (B), powder reconstitution (C) and its Tyndall effect (D)

2.8 XRPD 研究 Gal-WP-NPs 粉末晶态

参考 Gal-WP-NPs 处方, 分别称取乳清蛋白和高良姜素适量, 使两者用量比为 15.05 : 1, 仅作简单混合。取高良姜素、乳清蛋白、物理混合物、和 Gal-WP-NPs 粉末适量, 使用 Cu-K α 靶对 $3^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 进行 XRPD 扫描, 结果见图 6。高良姜素在 5.8° 、 8.0° 、 12.0° 、 13.1° 、 25.9° 、 28.0° 等处出现特征晶型衍射峰, 乳清蛋白仅在 10.5° 和 22.5° 2 处出现宽而钝的衍射峰, 未出现尖锐的晶型衍射峰, 说明乳清蛋白是一种无定形辅料。物理混合物 XRPD 图谱中仍可观察高良姜素的尖锐特征晶型峰, 而在 Gal-WP-NPs 粉

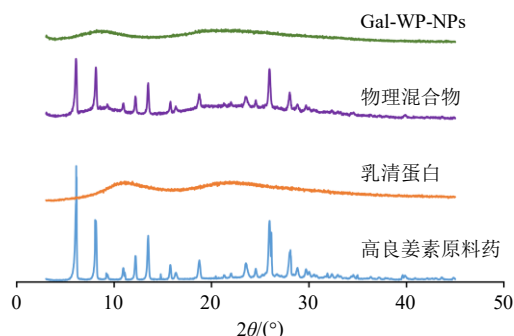


图 6 各个样品的 XRPD 结果

Fig. 6 XRPD result of each sample

末 XRPD 图谱中未观察尖锐晶型峰, 仅见乳清蛋白 XRPD 基本轮廓, 说明高良姜素可能以非结晶形式存在, 推测可能是高良姜素被无定形辅料乳清蛋白包裹所致^[13]。

2.9 Gal-WP-NPs 粉末溶解度测定

取过量的高良姜素、物理混合物和 Gal-WP-NPs 粉末, 分别置于蒸馏水及 pH 2.0 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 于 25 °C 恒温振荡器中振荡 3 d 取出, 10 000 r/min 离心 10 min (半径为 5.4 cm), 测定上清液中高良姜素浓度。结果见表 8, 与高良姜素相比, 高良姜素在物理混合物中溶解度均极显著增加 ($P < 0.01$), 可能是与乳清蛋白具有良好的乳化能力有关^[11-12], 从而对高良姜素起到了增溶作用。与物理混合物相比, 高良姜素在 Gal-WP-NPs 中的溶解度进一步极显著性增加 ($P < 0.01$), 说明 Gal-WP-NPs 增溶作用远高于物理混合物。

表 8 不同介质中各样品中高良姜素溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Galangin solubility of each sample in different media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	高良姜素溶解度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	蒸馏水	pH 2.0 PBS	pH 6.8 PBS
高良姜素原料药	1.96 ± 0.04	1.08 ± 0.07	1.17 ± 0.05
物理混合物	54.26 ± 2.34**	36.13 ± 1.30**	40.87 ± 2.45**
Gal-WP-NPs	684.14 ± 13.68***	547.52 ± 12.65***	633.07 ± 7.19***

与高良姜素原料药比较: ** $P < 0.01$; 与物理混合物比较: *** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs galangin bulk drug; *** $P < 0.01$ vs physical mixture.

2.10 Gal-WP-NPs 释药行为研究

取高良姜素原料药、物理混合物和 Gal-WP-NPs 粉末适量 (高良姜素含量均为 10 mg), 置于活化后的透析袋中 (截留相对分子质量为 8 000~12 000), 加入 5 mL pH 2.0 PBS (含 1% SDS), 两端扎紧密封。取 900 mL pH 2.0 PBS (含 1% SDS) 作为释药介质, 待介质恒温至 37 °C 后开启溶出仪, 转篮转

速为 75 r/min, 分别于 0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 h 取样 5 mL, 补加 5 mL 空白介质。2 h 后将释药介质更换为 900 mL pH 6.8 PBS (含 1% SDS), 分别于 3、4、6、8、12、18 h 同法取样并补加空白介质。各个样品于 10 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 10 min, 测定高良姜素含量, 结果见图 7。高良姜素 18 h 累积释放度仅为 (17.71 ± 1.90)%, 可能与高良姜素溶解度差、粒度大、肠液中易降解等原因有关^[9]。高良姜素在物理混合物中 18 h 累积释放度增加至 (36.11 ± 2.36)%, 说明乳清蛋白可增加高良姜素释放度。Gal-WP-NPs 在 18 h 累积释放度增加至 (83.46 ± 3.15)%, 远大于高良姜素及其物理混合物。Gal-WP-NPs 释药行为与 Weibull 模型拟合度最高, 结果见表 9, 表明 Gal-WP-NPs 体外释药符合双相动力学特征^[6]。

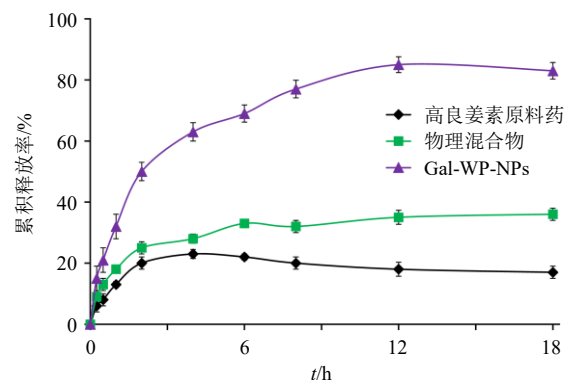


图 7 各个样品的释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Release curve of each sample ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 9 Gal-WP-NPs 的释放模型和相关系数

Table 9 Fitting release model and coefficient of Gal-WP-NPs

模型	拟合方程	R^2
一级	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.0983t - 0.4138$	0.8415
Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.1934t^{1/2} + 0.1531$	0.8984
Weibull	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.6043 \ln t - 0.9355$	0.9832

t 为取样时间; M_t 为 t 时间累积释放度; M_∞ 为 ∞ 时累积释放度;

M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

t is sampling time, M_t is accumulative drug-release at time t , M_∞ is accumulative drug-release at time ∞ , M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t .

2.11 Gal-WP-NPs 粉末稳定性考察

取 Gal-WP-NPs 粉末密封, 置于 -8 °C 冰箱, 分别于 0、1、3、6 个月取样, 加纯化水复溶, 测定主要质量指标及累积释放度, 结果见表 10。第 6 个月时 Gal-WP-NPs 粉末复溶后包封率和载药量均有所下降, 但包封率仍大于 90%; 粒径有所增长, 但增

表 10 Gal-WP-NPs 粉末稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 10 Stability study of Gal-WP-NPs powder ($\bar{x} \pm s, n=6$)

t/月	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	累积释放度/%
0	92.96 $\pm$ 1.13	5.64 $\pm$ 0.06	203.16 $\pm$ 7.65	-24.06 $\pm$ 0.17	83.46 $\pm$ 3.15
1	92.59 $\pm$ 0.80	5.65 $\pm$ 0.07	201.22 $\pm$ 5.22	-23.86 $\pm$ 0.45	82.96 $\pm$ 4.19
3	92.19 $\pm$ 1.07	5.58 $\pm$ 0.09	208.85 $\pm$ 6.88	-23.27 $\pm$ 0.66	82.70 $\pm$ 4.02
6	90.74 $\pm$ 1.19	5.54 $\pm$ 0.05	211.76 $\pm$ 1.66	-23.13 $\pm$ 0.86	82.03 $\pm$ 2.99

长率仅 4.23%; ζ 电位绝对值和 18 h 累积释放度未发生明显变化, 表明 Gal-WP-NPs 粉末在低温条件下稳定性良好。

2.12 口服药动力学研究

2.12.1 试验方案 取高良姜素、物理混合物和 Gal-WP-NPs 粉末, 分别分散至含 0.5% 的 CMC-Na 溶液中, 摇匀即得 ig 溶液, 高良姜素质量浓度均为 20 mg/mL。取 18 只 SD 大鼠随机分为高良姜素组、物理混合物组和 Gal-WP-NPs 组 (每组雌雄各半), ig 剂量均为 150 mg/kg (以高良姜素计)。高良姜素和物理混合物组分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.5、6.0、8.0 h, 于眼眶后静脉丛采血约 0.2 mL。前期预实验发现, Gal-WP-NPs 极大地提高了高良姜素血药浓度, 在 12 h 时仍可被有效检测出来, 为反映 Gal-WP-NPs 体内实际药动力学情况, 故另增加 12.0 h 取血点。血样置于肝素浸润的离心管, 3 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 3 min, 取血浆冷冻保存。

2.12.2 血浆样品的处理^[7] 乙腈配制质量浓度为 500 ng/mL 漆黄素对照品溶液, 备用。将血浆样品解冻, 精密吸取 100 μ L 漆黄素对照品溶液和 100 μ L 血浆样品置于离心管中, 加入 1.5 mL 乙腈, 涡旋 5 min 使蛋白沉淀, 将混悬液 10 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 10 min, 取上清液使用氮气吹干, 加入 100 μ L 乙腈复溶后测定。

2.12.3 血浆对照品溶液的配制及标准曲线方程建立 使用空白血浆配制高良姜素质量浓度为 2 500、2 000、1 000、500、100、25 ng/mL 血浆对照品, 分别精密吸取 100 μ L, 按照“2.12.2”项下方法制备血浆对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定漆黄素和高良姜素峰面积, 使用两者峰面积比值和高良姜素质量浓度分别作为纵坐标 (Y) 和横坐标 (X), 得回归方程: $Y=0.002\ 6\ X-0.501\ 9$, $r=0.998\ 4$, 因此在以漆黄素为内标的情况下, 高良姜素在 25~2 500 ng/mL 呈良好的线性关系。

2.12.4 专属性考察 取空白血浆, 除不加漆黄素

外, 按照“2.12.2”项下方法操作制备空白血浆溶液, 另取高良姜素血浆样品溶液 (漆黄素质量浓度为 500 ng/mL) 和 25 ng/mL 的高良姜素血浆对照品溶液 (漆黄素质量浓度为 500 ng/mL), 分别按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定。色谱图见图 8, 结果表明高良姜素和漆黄素色谱峰专属性较高。

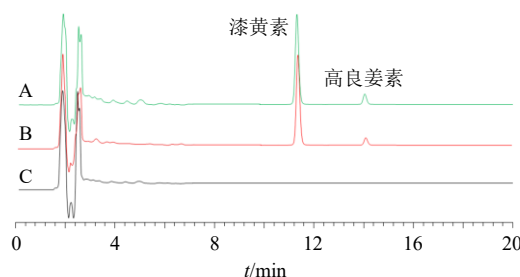


图 8 血浆样品 (A)、血浆对照品 (B) 和空白血浆样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC spectrum of plasma sample (A), plasma control sample (B) and blank plasma sample solution (C)

2.12.5 精密度考察 取质量浓度分别为 25、1 000、2 500 ng/mL 高良姜素血浆对照品溶液, 分别连续测定 6 次, 记录漆黄素和高良姜素峰面积, 两者比值的 RSD 分别为 4.14%、2.89%、2.90%, 结果表明该仪器精密度良好。

2.12.6 稳定性考察 配制 1 000 ng/mL 高良姜素血浆质控样品 (漆黄素质量浓度为 500 ng/mL), 置于 -8 $^{\circ}$ C 冰箱中, 分别于 0、2、4、6、8、12 d 取样, 并制备血浆质控样品溶液, 测得漆黄素和高良姜素峰面积比值的 RSD 为 8.03%; 将高良姜素血浆质控样品 (漆黄素质量浓度为 500 ng/mL), 反复融冻 6 次, 并制备血浆质控样品溶液, 测得漆黄素和高良姜素比值的 RSD 为 7.33%; 高良姜素血浆质控样品溶液 (漆黄素质量浓度为 500 ng/mL), 分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样测定, 漆黄素和高良姜素峰面积比值的 RSD 为 5.81%。可见血浆质控样品冰箱保存 12 d、反复融冻、样品溶液在室温 24 h 保存时均具有良好的稳定性。

2.12.7 重复性考察 取 1 000 ng/mL 高良姜素血浆质控样品 (漆黄素质量浓度为 500 ng/mL), 平行制备 6 份血浆质控样品溶液, 测定漆黄素和高良姜素峰面积, 根据随行标准曲线计算得高良姜素质量分数的 RSD 为 4.19%, 结果表明该实验重复性良好。

2.12.8 提取回收率和基质效应考察 取 25、1 000、2 500 ng/mL 高良姜素血浆质控样品 (漆黄素质量浓度均为 500 ng/mL), 制备成血浆质控样品溶液, 测

定高良姜素和漆黄素峰面积 (A)；取 100 μL 空白血浆和 1.5 mL 乙腈，按照“2.12.2”项下方法处理成残渣，加入高良姜素和漆黄素对照品溶液，使高良姜素质量浓度为 25、1 000、2 500 ng/mL（漆黄素质量浓度均为 500 ng/mL），进样测定高良姜素和漆黄素峰面积 (B)，采用 A/B 计算 2 种成分的提取回收率。结果显示，低、中、高质量浓度高良姜素及漆黄素的提取回收率分别为 96.11%、104.03%、95.20%、101.97%。使用乙腈配制质量浓度为 25、1 000、2 500 ng/mL 高良姜素对照品溶液（不含血浆，漆黄素质量浓度均为 500 ng/mL），测定高良姜素和漆黄素峰面积 (C)， B/C 计算基质效应。结果显示，低、中、高质量浓度高良姜素及漆黄素的基质效应分别为 101.09%、96.63%、103.72%、97.05%。因此，高良姜素和漆黄素提取回收率高，且基质效应小。

2.12.9 药动力学结果 使用 DAS 3.0 药动力学软件非房室模型进行处理，药-时曲线见图 9，药动力学参数见表 11。

与高良姜素相比，物理混合物的达峰时间 (peak time, $t_{\max}$) 和半衰期 (half-life time, $t_{1/2}$) 未发生显著性变化 ($P > 0.05$)，但达峰浓度 (peak concentration, $C_{\max}$) 有显著性提高 ($P < 0.05$)，0~

t 时间-曲线下面积 (area under time curve, $\text{AUC}_{0\sim t}$) 和 0~ ∞ 时间-曲线下面积 (area under time curve, $\text{AUC}_{0\sim\infty}$) 有极显著性提高 ($P < 0.01$)，相对口服吸收生物利用度提高至 1.63 倍。Gal-WP-NPs 的 $t_{\max}$ 显著性延后 ($P < 0.05$)， $t_{1/2}$ 极显著性延长 ($P < 0.01$)，且 $C_{\max}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ 均极显著性增加 ($P < 0.01$)，相对口服吸收生物利用度提高至 6.58 倍。与物理混合物相比，Gal-WP-NPs 的 $t_{\max}$ 存在显著性差异 ($P < 0.05$)，而 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ 均存在极显著性差异 ($P < 0.01$)，说明 Gal-WP-NPs 对高良姜素促吸收作用更具明显。

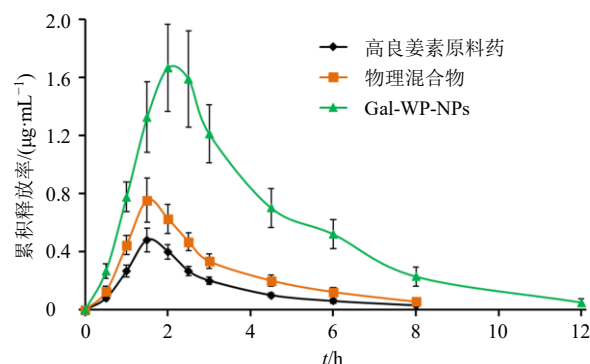


图 9 各个样品药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Drug concentration-time curve of each sample ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 11 各个样品的主要药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 11 Main pharmacokinetic parameters of each sample ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	$t_{\max}/\text{h}$	$t_{1/2}/\text{h}$	$C_{\max}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{AUC}_{0\sim t}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{AUC}_{0\sim\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$
高良姜素原料药	1.43 ± 0.51	2.80 ± 0.62	477.14 ± 95.83	$1\ 032.57 \pm 201.46$	$1\ 088.12 \pm 223.57$
物理混合物	1.53 ± 0.55	3.02 ± 0.69	$626.78 \pm 164.33^*$	$1\ 681.03 \pm 327.17^{**}$	$1\ 719.99 \pm 363.04^{**}$
Gal-WP-NPs	$2.17 \pm 0.64^{*}\#$	$5.11 \pm 0.95^{**}\#\#$	$1\ 671.50 \pm 316.98^{**}\#\#\#$	$6\ 798.16 \pm 966.43^{**}\#\#\#$	$7\ 110.90 \pm 1\ 078.55^{**}\#\#\#$

与高良姜素原料药比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与物理混合物比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs galangin bulk drug; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs physical mixture.

2.13 Gal-WP-NPs 对 HIRI 保护作用研究

2.13.1 HIRI 模型建立与分组 SD 大鼠过夜禁食，按 45 mg/kg 剂量 ip 戊巴比妥钠麻醉，固定在保温垫上。用手术刀沿腹正中线打开腹腔，分离肝中叶和肝左叶肝蒂，血管夹夹闭肝蒂。保持肝缺血 30 min 后撤掉血管夹，恢复血供应，肉眼可见肝组织由苍白色逐渐变红润，立即关闭腹腔，用碘伏消毒手术区域。假手术组仅打开腹腔，然后立即关闭腹腔。各只 SD 大鼠术后均单笼饲养，并注意碘伏消毒及保暖。将 36 只大鼠随机分为假手术 (0.5% CMC-Na 溶液) 组、模型 (0.5% CMC-Na 溶液) 组、阳性对照 (联苯双酯，150 mg/kg) 组^[4]、高良姜素 (150

mg/kg) 组^[4]、Gal-WP-NPs 低剂量 (75 mg/kg) 和高剂量 (150 mg/kg) 组，每组 6 只。手术后次日给药，ig 溶液均使用 0.5% CMC-Na 溶液配制，每日 ig 1 次，连续 ig 14 d。末次给药 4 h 后，将大鼠麻醉后腹动脉取血 5 mL，3 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 2 min，得血清样本。迅速处死大鼠，摘取肝脏，生理盐水清洗后滤纸吸干，保存于 4% 多聚甲醛。

2.13.2 生化指标检测 取血清，用生化分析仪检测 ALT、AST、丙二醛和 SOD 水平，结果见表 12。与假手术组相比，模型组 ALT、AST 和丙二醛水平均极显著性升高 ($P < 0.01$)，而 SOD 水平极显著性下降 ($P < 0.01$)，说明建模成功^[18]。与模型组相比，

表 12 各组大鼠血清指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 12 Serum indicators of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	丙二醛/(μmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	68.48 ± 6.46	104.23 ± 15.65	43.87 ± 7.37	458.78 ± 27.50
模型	—	730.72 ± 52.47**	1 373.20 ± 112.94**	414.02 ± 49.20**	132.48 ± 17.84**
阳性对照	150	204.65 ± 19.03 ^{##}	276.13 ± 35.59 ^{##}	145.80 ± 18.15 ^{##}	434.08 ± 48.12 ^{##}
高良姜素	150	472.32 ± 19.41 ^{##}	588.42 ± 79.58 ^{##}	328.78 ± 24.96 ^{##}	241.40 ± 14.18 ^{##}
Gal-WP-NPs	75	355.40 ± 26.61 ^{##ΔΔ}	380.32 ± 44.80 ^{##ΔΔ}	261.70 ± 19.12 ^{##ΔΔ}	346.62 ± 26.20 ^{##ΔΔ}
	150	222.63 ± 25.40 ^{##ΔΔ}	285.52 ± 19.57 ^{##ΔΔ}	176.68 ± 21.17 ^{##ΔΔ}	404.37 ± 23.16 ^{##ΔΔ}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与高良姜素组比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

* $P < 0.01$ vs sham surgery group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs galangin group.

各给药组 ALT、AST 和丙二醛水平均极显著性下降 ($P < 0.01$), SOD 水平极显著性升高 ($P < 0.01$), 说明 HIRI 所致肝损伤得到有效缓解。与高良姜素 (150 mg/kg) 组相比, Gal-WP-NPs 低剂量 (75 mg/kg)、高剂量 (150 mg/kg) 组 ALT、AST 和丙二醛水平均极显著性下降 ($P < 0.01$), 而 SOD 水平极显著性升高 ($P < 0.01$), 说明 Gal-WP-NPs 增强了高良姜素药效。

2.13.3 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色
取浸泡在 4% 多聚甲醛中的肝组织, 梯度乙醇脱水 (70%、80%、95%), 石蜡包埋, 切片, PBS 冲洗, HE 染色, 透明, 封片后于光学显微镜下观察病理情况, 结果见图 10。假手术组大鼠肝组织病理学正常,

细胞大小均匀, 界限分明, 排列有序。模型组大鼠肝组织中炎性细胞浸润严重, 肝细胞界限不明显, 出现水肿及点状坏死等病理现象, 说明 HIRI 所致肝损伤较为严重。高良姜素 (150 mg/kg) 组仍可见炎性细胞浸润现象, 部分肝细胞界限不明显, 说明高良姜素可缓解 HIRI 所致肝组织损伤, 但保护作用欠佳。Gal-WP-NPs 低剂量 (75 mg/kg) 和高剂量 (150 mg/kg) 组细胞边界分明, 肝组织细胞浸润程度均低于高良姜素 (150 mg/kg) 组, 随着 Gal-WP-NPs 给药剂量的增加肝组织细胞浸润程度逐渐减轻, 未见坏死现象, 呈现量效关系, 说明 Gal-WP-NPs 有效缓解了 HIRI 所致肝损伤。Gal-WP-NPs 高剂量组 (150 mg/kg) 病理情况接近于阳性对照组。

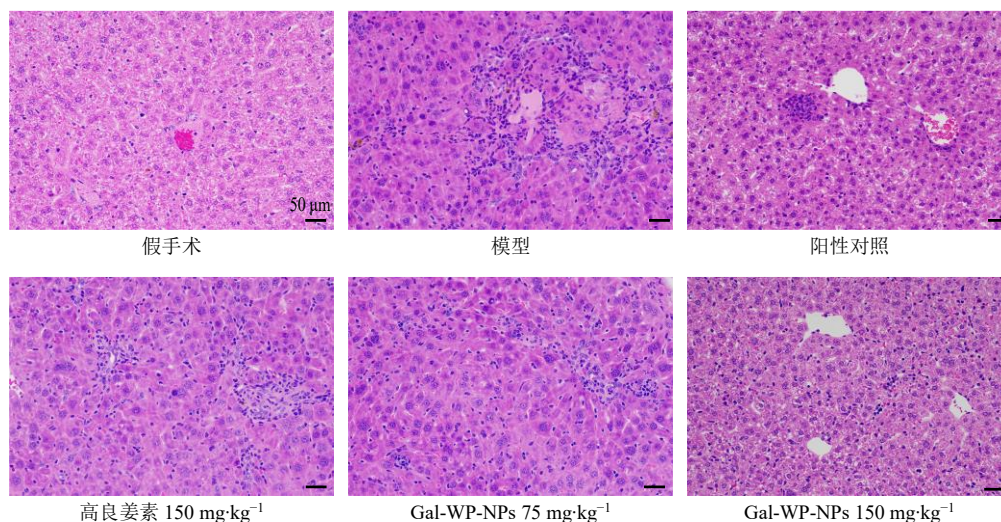


图 10 HE 染色结果 (×400)

Fig. 10 Hematoxylin-eosin (HE) staining results (× 400)

2.14 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 Turkey's 为事后检验的单因素方法分析被用于比较多组间的差异, 独立样本 t 检验被用于比较两组间的差异, $P < 0.05$ 判定组间存在显

著差异。

3 讨论

乳清蛋白富含 8 种人体必需氨基酸及各种活性肽, 口服后易于体内吸收, 可增强免疫力、缓解疲劳、抗氧化、降血糖、抗炎等^[19], 具有很高的营养

价值,有助于辅助机体康复治疗。乳清蛋白是良好的乳化剂和稳定剂,独特的两亲性结构及丰富的营养组成决定了其优越的功能特性,将乳清蛋白应用于药物传递领域具有一定的创新性,有助于提高患者免疫力、确保制剂安全性、降低研发成本等。与其他白蛋白相比,乳清蛋白作为载体制备纳米粒时具有包封率更高、粒径更小等优势^[14],更具推广及研究价值。

Gal-WP-NPs 继承了乳清蛋白的自组装特性^[20],因而 Gal-WP-NPs 在水相中可形成纳米聚集体^[11]。Gal-WP-NPs 极大提高了高良姜素的溶解度,主要与高良姜素粒度下降、晶型转变、亲水性增加等因素有关^[6]。SDS 临界胶束浓度为 0.22%,在释放介质中添加 1% SDS 时可聚集形成胶束结构。体外释药试验是将 Gal-WP-NPs 密封于透析袋内部,可有效阻止 Gal-WP-NPs 经透析袋进入释药介质,释药介质中胶束也无法透过透析袋进入内部,避免了胶束结构对 Gal-WP-NPs 稳定性的影响,所以在释放介质中添加 1% SDS 不会影响 Gal-WP-NPs 结构^[7]。Gal-WP-NPs 释药过程是典型的双相动力学特征,这可能是由于分布在 Gal-WP-NPs 表层或浅表层的药物与乳清蛋白的结合力相对较弱(如物理吸附等)^[21-22],且更易与释药介质直接接触,释药阻力相对较小,能够迅速溶解或扩散从而释放出来,因而在释药初期出现快速释药情况。包裹在 Gal-WP-NP 内部的药物需要克服乳清蛋白载体基质的阻滞作用,因而释药阻力相对较大,从而在后期出现持续、缓慢释放阶段。

物理混合物在一定程度上促进了高良姜素口服吸收,可能是由于乳清蛋白具有一定的乳化能力及增溶作用,增加了高良姜素的溶解度及溶出度;乳清蛋白可降低消化酶活性^[23],降低了消化酶对高良姜素的降解,因而使高良姜素 $C_{\max}$ 显著性提高($P < 0.05$),同时使 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 显著性提高($P < 0.01$)。与物理混合物相比, Gal-WP-NPs 药动学行为发生了更大变化, $t_{\max}$ 显著性延后,一方面可能与 Gal-WP-NPs 缓释过程有关;另一方面可能是 Gal-WP-NPs 对高良姜素的包裹作用降低了消化酶对药物的降解几率,增加了后期吸收量,最终对 Gal-WP-NPs 的 $t_{\max}$ 产生了影响。同时也使 Gal-WP-NPs 的 $t_{1/2}$ 显著性延长,有助于使高良姜素吸收更加充分。Gal-WP-NPs 生物利用度得到极大提高,可能是由于 Gal-WP-NPs 处方中乳清蛋白本身具有一定的促

吸收作用; Gal-WP-NPs 粒径仅约 200 nm,极大增加了高良姜素的比表面积及与胃肠道黏膜接触几率,利于药物经淋巴转运、胞间转运等吸收途径进入体循环^[24],提高了吸收效率; Gal-WP-NPs 对高良姜素的包裹作用降低了降解几率,利于增加吸收量; Gal-WP-NPs 使高良姜素由结晶状态转变为无定形状态,无定形药物比晶型药物更易体内吸收^[9-10],最终使 Gal-WP-NPs 极大促进了高良姜素体内吸收。临床上对于急性肝损伤患者治疗一般需要数周时间^[25],故本研究设置治疗时间为 2 周。Gal-WP-NPs 增强了高良姜素对 HIRI 所致肝损伤的保护作用,可能与 Gal-WP-NPs 增加了高良姜素生物利用度^[26]、乳清蛋白辅助机体器官康复^[19]等原因有关。

本研究完成了 Gal-WP-NPs 粉末制备工艺研究,在密封、低温条件下储存稳定性良好。Gal-WP-NPs 提高了高良姜素溶解度及释放度,解决了体内吸收瓶颈,增加了口服吸收生物利用度,并增强了 HIRI 所致肝损伤的保护作用,而且乳清蛋白本身也可作为 HIRI 患者的术后康复提供营养支持,本研究为评价 Gal-WP-NPs 成药性及临床转化提供了必要的研究数据。乳清蛋白应用于药物传递领域具有较大优势,但也仍面临挑战,如长期稳定性、规模化生产重现性等,这也是后续需要重点研究方向。本研究为推动 Gal-WP-NPs 在 HIRI 康复治疗中应用奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李东良,周晓玲,敖秀兰. 间接型药物性肝损伤: 新类型与新挑战 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(5): 921-926.
- [2] 姜卫星,索成云,王亚博. 白芍总苷调节 RhoA/ROCK1 信号通路对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(6): 1375-1383.
- [3] 游斯棋. 高良姜素通过 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路保护大鼠肝缺血再灌注损伤 [D]. 衡阳: 南华大学, 2023.
- [4] 段冬竹. 高良姜素对酒精性肝损伤的保护作用及其对肠道菌群的影响 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2025.
- [5] 张数数,霍仕霞,李滨,等. 基于斑马鱼模型的高良姜素安全性评价研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 1919-1928.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Ye W J, Sun W, Chen R J, *et al.* Pharmacokinetics in rat plasma and tissue distribution in mice of galangin determined by UHPLC-MS/MS [J]. *Acta Chromatogr*, 2019, 31(2): 120-125.
- [9] 栗忠强, 决利利, 万亚存, 等. 高良姜素纳米胶束制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2023, 45(5): 1410-1416.
- [10] 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.
- [11] 胡文梅, 李慧雪, 孙亚鹏, 等. 乳清蛋白纳米载体递送生物活性物质研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2024, 24(11): 424-437.
- [12] Ni Z J, Liu C B, Xue Y, *et al.* Enhanced protection and bioavailability of *Lycium barbarum* leaf extract through encapsulation in whey protein isolate and bovine serum albumin nanoparticles [J]. *Food Chem*, 2025, 463: 141506.
- [13] 梁秀萍. 乳清蛋白偶联体系的构建及其对紫檀芪递送稳态与功能特性的调节 [D]. 无锡: 江南大学, 2025.
- [14] 杨代容. 虾青素乳清蛋白纳米复合物治疗溃疡性结肠炎的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2022.
- [15] 田莉, 李伟宏, 张付利. 木犀草素磷脂复合物白蛋白纳米粒的制备及口服药动学评价 [J]. *中草药*, 2024, 55(10): 3280-3290.
- [16] 邓鸿丹, 张倩, 刘芳, 等. Box-Behnken 响应面优化厚朴酚-分离乳清蛋白自组装纳米粒制备工艺及体外评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2025(9): 77-82.
- [17] 王磊卿. 槲皮素微胶囊与唾液乳杆菌联用对老龄蛋鸡生产性能、肝脂代谢和肠道健康的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2025.
- [18] 施阳扬, 李智, 王昕, 等. 注射用丹参多酚酸对 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(2): 345-353.
- [19] 王晔, 王若男, 刘双, 等. 乳清蛋白在运动营养中的功效研究进展 [J]. *中国乳品工业*, 2024, 52(12): 45-52.
- [20] 张春燕, 李燕红, 陈乾, 等. 以牛血清白蛋白为稳定剂制备紫檀芪聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒及口服药动学研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4481-4492.
- [21] 刘娇娇. 虾青素白蛋白纳米复合物的制备及其初步体内外评价 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [22] 王酪, 张佩琛, 范高洁, 等. 玉米肽负载芹菜素纳米粒的制备、口服药动学及对高血压大鼠的治疗作用 [J]. *药物评价研究*, 2026, 49(2): 603-616.
- [23] 敖敏. 酪蛋白-乳清蛋白-大豆蛋白复配物的消化吸收特性以及对大鼠骨骼肌肉作用的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2025.
- [24] 郑光艳, 吴文丽, 刘泽梅, 等. 微流控技术制备槲皮素纳米晶及其大鼠体内药动学研究 [J]. *中国医药工业杂志*, 2024, 55(4): 519-526.
- [25] 魏胜林, 刘文影. 艾沙康唑不良反应文献分析 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(12): 3236-3241.
- [26] 郑妮媚, 谢燕, 范明松, 等. 基于“药辅合一”的香菇多糖-土木香内酯纳米晶制备、药动学及对 H1N1 流感病毒感染小鼠的治疗作用 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(12): 3627-3640.

[责任编辑 郑礼胜]