

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)13-0061-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.13.013



延胡索乙素纳米乳制备及其体内外评价*

张建楠¹, 陈志兰², 蔡靛羽¹, 徐敏逸^{1△}, 邱立朋²

(1. 江苏省无锡市中医医院, 江苏 无锡 214071; 2. 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:目的 制备延胡索乙素(THP)纳米乳,并对其进行体内外评价。方法 采用相转变法制备THP纳米乳,通过THP溶解度筛选油相、表面活性剂、助表面活性剂具体介质,并两两组合筛选空白纳米乳;以表面活性剂与助表面活性剂质量比、表面活性剂与油相质量比、投药量为考察因素,以THP纳米乳的粒径和载药量为评价指标,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验法优选THP纳米乳处方,并考察其粒径、多分散性指数(PDI)、Zeta电位、包封率、载药量、体外释放度、离心稳定性和储存稳定性;将30只小鼠随机分为蒸馏水空白组(A组,每10g体质量0.1mL蒸馏水),THP混悬液组(B组,40mg/kg),THP纳米乳低、中、高剂量组(C_1 组、 C_2 组、 C_3 组,4,8,16mg/kg),各6只。各组小鼠均每日灌胃1次蒸馏水或相应药物,连续7d,之后通过0.9%冰醋酸构建疼痛模型小鼠,计算镇痛率,考察镇痛效果,并检测血清前列腺素 E_2 (PGE_2)和血清素/5-羟色胺(ST/5-HT)水平。结果 优选处方为油酸乙酯、吐温-80、1,2-丙二醇的质量比为1:3:1。粒径为 (20.78 ± 0.63) nm, PDI为 0.276 ± 0.011 , Zeta电位为 (-0.258 ± 0.144) mV,包封率为 $(37.63 \pm 3.74)\%$,载药量为 $(2.46 \pm 0.48)\%$,24h累积释放率为 $(27.17 \pm 0.03)\%$,4,25℃放置0d的粒径均为 (20.78 ± 0.63) nm。 B 组、 C_1 组、 C_2 组、 C_3 组小鼠镇痛率分别为42.41%,18.18%,48.50%,63.64%;与A组比较, B 组、 C_1 组、 C_2 组、 C_3 组小鼠的扭体次数均显著减少($P < 0.05$), B 组、 C_3 组小鼠的 PGE_2 和ST/5-HT水平均显著降低($P < 0.05$);与B组比较, C_1 组、 C_2 组小鼠的扭体次数相当($P > 0.05$), C_3 组小鼠的扭体次数显著减少($P < 0.05$), C_3 组小鼠的 PGE_2 和ST/5-HT水平均相当($P > 0.05$)。结论 制备的THP纳米乳粒径较小,分布均匀,缓释效果和低温下的稳定性良好,可能通过降低 PGE_2 和ST/5-HT水平而发挥镇痛效果。

关键词:延胡索乙素;纳米乳; $L_9(3^3)$ 正交试验法;工艺优选;镇痛效果

Preparation and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Tetrahydropalmatine Nanoemulsion

ZHANG Jiannan¹, CHEN Zhilan², CAI Liangyu¹, XU Minyi¹, QIU Lipeng²

(1. Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi, Jiangsu, China 214071; 2. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China 214122)

Abstract: Objective To prepare tetrahydropalmatine (THP) nanoemulsion, and to evaluate its quality and analgesic effect *in vitro* and *in vivo*. **Methods** THP nanoemulsion was prepared by the phase transformation method. The specific media of oil phase, surfactant, and co-surfactant were screened by THP solubility, and blank nanoemulsion was screened by pairwise combination. The mass ratio of surfactants to co-surfactants, the mass ratio of surfactants to oil phase, and the dosage were taken as evaluation factors, and the particle size and drug loading capacity of THP nanoemulsion were taken as evaluation indicators. The $L_9(3^3)$ orthogonal test was used to optimize the formulation of THP nanoemulsion, and its particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading capacity, *in vitro* drug release rate, centrifugal stability, and storage stability were investigated. A total of 30 mice were randomly divided into the distilled water blank group (group A, 0.1 mL of distilled water per 10 g of body weight), THP suspension group (group B, 40 mg / kg), and THP nanoemulsion low-, medium-, and high-dose groups (groups C_1 , C_2 , C_3 , 4, 8, 16 mg / kg), with six mice in each group. Mice in each group were orally administered distilled water or corresponding drugs once a day for 7 d. Then the pain model mice were constructed by 0.9% glacial acetic acid, and the analgesic rate was calculated to evaluate the analgesic effect. The serum levels of prostaglandin E_2 (PGE_2) and serotonin / 5-hydroxytryptamine (ST / 5-HT) were also detected. **Results** The optimal prescription was as follows: the mass ratio of ethyl oleate, Tween-80, and 1,2-propanediol was 1:3:1, the particle size was (20.78 ± 0.63) nm, the PDI was 0.276 ± 0.011 , the Zeta potential was (-0.258 ± 0.144) mV, the encapsulation efficiency was $(37.63 \pm 3.74)\%$, the drug loading was $(2.46 \pm 0.48)\%$, the cumulative release rate within 24 h was $(27.17 \pm 0.03)\%$, and the particle size after 0 d of storage at 4 °C and 25 °C was (20.78 ± 0.63) nm. The analgesic rates in groups B, C_1 , C_2 , and C_3 were 42.41%, 18.18%, 48.50%, and 63.64%, respectively. Compared with those in group A, the twisting frequency in groups B, C_1 , C_2 , and C_3 significantly reduced ($P < 0.05$), and the levels of PGE_2 and ST / 5-HT in groups B and C_3 significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the twisting frequency in groups C_1 and C_2 was comparable ($P > 0.05$), while the twisting frequency in group C_3 significantly

*基金项目:江苏省无锡市中医药管理局科技项目[ZYSKJ202101]。

第一作者:张建楠,男,博士,主任医师,研究方向为慢性疼痛中药制剂及机制,(电子信箱)zjn_wxzy@126.com。

△通信作者:徐敏逸,男,大学本科,主任医师,研究方向为临床中药学,(电子信箱)Xuminyi@yeah.net。

reduced ($P < 0.05$), and the levels of PGE_2 and ST / 5 - HT in group C_3 were comparable ($P > 0.05$). **Conclusion** The prepared THP nanoemulsion has a small particle size, uniform distribution, good sustained release effect, and stability at the low temperature. It may exert analgesic effects by reducing PGE_2 and ST / 5 - HT levels.

Key words: tetrahydropalmatine; nanoemulsion; $L_9(3^3)$ orthogonal test; process optimization; analgesic effect

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Gorydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 味辛、苦, 性温, 归肝、脾经^[1], 其医学和药理学研究广泛^[2]。延胡索乙素(THP)为延胡索中的一种异喹啉类生物碱, 具有镇静、镇痛、抗心肌缺血、抗肿瘤等药理学活性^[3-10]。THP亲脂性强, 水溶性弱, 口服给药的生物利用度不高, 限制了临床应用^[11-12]。前期试验中, 曾考察THP在pH 1.2盐酸溶液及pH分别为2.5, 6.8, 7.4, 8.0的磷酸盐缓冲液中的溶解度, 结果THP均处于微溶或极微溶状态。故将THP制成固体脂质纳米粒^[13]、固体分散体^[14]、环糊精包合物^[15]、纳米混悬剂^[16]、微乳^[17]等新型给药系统, 以提高其口服生物利用度。纳米乳是一种疏水药物递送系统^[18-22]。为粒径10~100 nm的乳液, 具有生物利用度高、稳定性好、给药途径多等优点^[23-24]。本研究中采用相转变法^[25-27]制备了THP纳米乳, 采用正交试验法筛选THP纳米乳的最优处方, 评价最优处方制备纳米乳的质量, 并通过建立炎性疼痛模型小鼠评价了THP纳米乳的镇痛效果。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

AX223ZH / E型电子天平(奥豪斯仪器 <常州> 有限公司, 精度为0.1 mg); KQ5200DV型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为100 W, 频率为40 kHz); HJ-4A型多头磁力搅拌器(江苏科析仪器有限公司); MINI-10K+C型微离心机(杭州米欧仪器有限公司); Centrifuge 5810 R型离心机(德国Eppendorf公司); D3024R型高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器 <北京> 股份有限公司); THZ-C型恒温振荡器(太仓市强乐实验设备有限公司); Vortex-Genie2型涡旋混合器(美国Scientific Industries公司); Zetasizer Nano ZS型纳米粒度仪(英国Malvern公司); UV-2550型紫外可见分光光度计(日本Shimadzu公司); MULTISKAN GO型酶标仪(英国Thermo公司)。

1.2 试药

THP标准品(上海源叶生物有限公司, 批号为G03D9L76182, 含量为98%); 吐温-80(批号为P1760181), 1,2-丙二醇(批号为P2148683), 均为分析纯, 购自上海泰坦化学有限公司; 乙酸乙酯(分析纯, 批号为20191104), 油酸乙酯(化学纯, 批号为20210927), 液体石蜡(化学纯, 批号为20230727), 曲拉通X-100

(分析纯, 批号为C10368921), 司盘-80(化学纯, 批号为20241025), 无水乙醇(分析纯, 批号为20230210), 冰醋酸(分析纯, 批号为20181115), 均购自国药集团化学试剂有限公司; 前列腺素 E_2 (PGE_2)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号为J420AD0356), 血清素/5-羟色胺(ST/5-HT)ELISA试剂盒(批号为J609AD0362), 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 0.9%氯化钠注射液(过0.22 μ m滤膜), 水为超纯水。

1.3 动物

BALB/c小鼠30只, 雄性, 4~6周龄, 体质量(20 ± 2)g。均购自斯贝福(苏州)生物技术有限公司, 动物质量合格证号为NO. 202350592。饲养于温度20~26 $^{\circ}$ C、相对湿度40%~70%、照度15~20 lx的环境下, 小鼠自由摄食和饮水, 适应性喂养1周。

2 方法与结果

2.1 检测波长确定

取THP标准品10 mg, 精密称定, 置100 mL容量瓶中, 加甲醇定容, 超声使溶解, 即得质量浓度为0.098 mg/mL的标准品溶液, 4 $^{\circ}$ C温度下保存。取适量, 加甲醇稀释, 于200~800 nm波长范围内扫描, 以甲醇为空白对照。结果THP在282.2 nm波长处有最大吸收, 故确定THP的检测波长为282.2 nm。

2.2 空白纳米乳处方确定

各相介质筛选: 精密量取1 mL油相(乙酸乙酯、油酸乙酯、液体石蜡)、表面活性剂(曲拉通X-100、吐温-80、司盘-80)、助表面活性剂(1,2-丙二醇、无水乙醇), 置2 mL离心管中, 加适量THP形成过饱和溶液, 涡旋10 min, 置恒温振荡器(温度为37 $^{\circ}$ C、转速为100 r/min)中振荡72 h, 离心(转速为10 000 r/min)10 min, 0.22 μ m微孔滤膜滤过, 取上清液适量, 置离心管中, 加适量甲醇稀释, 于282.2 nm波长下测定吸光度。结果THP在液体石蜡和司盘-80中的溶解度较低, 不利于纳米乳的制备。详见表1。

表1 延胡索乙素在不同相介质中的溶解度($\bar{X} \pm s$, mg/mL)

Tab. 1 Solubility of tetrahydropalmatine in different phase media ($\bar{X} \pm s$, mg/mL)

相	介质	溶解度	相	介质	溶解度
油相	乙酸乙酯	32.535 \pm 0.097	表面活性剂	吐温-80	27.595 \pm 0.085
	油酸乙酯	5.784 \pm 0.000		司盘-80	7.696 \pm 0.043
	液体石蜡	1.224 \pm 0.005		助表面活性剂	1,2-丙二醇
表面活性剂	曲拉通X-100	61.363 \pm 0.256		无水乙醇	9.894 \pm 0.022

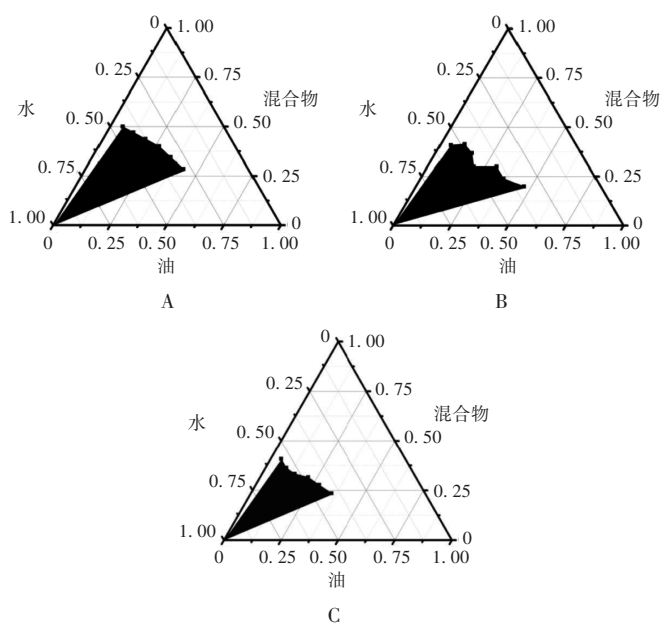
各相具体介质确定:将油相、表面活性剂、助表面活性剂进行分组组合,将油相和表面活性剂于室温下搅拌1 h,混匀后加助表面活性剂,再搅拌4 h,混匀后加水,从外观初步筛选纳米乳处方的各相,若体系澄清,伴转相过程,并有蓝色乳光,即表示该方可形成纳米乳。故最终确定纳米乳处方为油酸乙酯、吐温-80、1,2-丙二醇分别作为油相、表面活性剂和助表面活性剂。详见表2。

表2 空白纳米乳处方筛选结果

序号	油相	表面活性剂	助表面活性剂	外观性状
1	乙酸乙酯	曲拉通X-100	1,2-丙二醇	澄清透明,无转相过程,无蓝色乳光
2	乙酸乙酯	曲拉通X-100	无水乙醇	澄清透明,无转相过程,无蓝色乳光
3	乙酸乙酯	吐温-80	1,2-丙二醇	偏黄透明,无转相过程,无蓝色乳光
4	乙酸乙酯	吐温-80	无水乙醇	偏黄透明,无转相过程,无蓝色乳光
5	油酸乙酯	曲拉通X-100	1,2-丙二醇	乳白色浑浊,静置分层,有蓝色乳光
6	油酸乙酯	曲拉通X-100	无水乙醇	白色不透明,静置分层,无蓝色乳光
7	油酸乙酯	吐温-80	1,2-丙二醇	澄清透明,有转相过程,有蓝色乳光
8	油酸乙酯	吐温-80	无水乙醇	浑浊,无转相过程,有蓝色乳光

米氏常数(K_m)值筛选:分别取质量比为9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9的油相和混合表面活性剂(K_m 值分别为1,2,3)进行搅拌,混匀后边加水边搅拌,观察体系的状态变化(纳米乳外观应为澄清透明溶液),直到体系变浑浊的前1滴,滴加完毕后持续搅拌,记录加水量,并检测粒径和分散指数(PDI)。结果9:1,8:2,7:3 3个质量比无法形成纳米乳,不能测定粒径和PDI,不做进一步分析。按油、水、混合表面活性剂在临界点的质量百分含量绘制伪三元相图。结果 K_m 值为1,2,3时均易形成纳米乳;随着 K_m 值由1至3,纳米乳区域面积逐渐缩小,即随着表面活性剂的增加,纳米乳逐渐趋向体系不稳定。详见图1。

各相质量比确定:为筛选处方各相的质量比,采用粒径仪检测不同 K_m 值下不同油相-混合表面活性剂质量比形成的空白纳米乳的粒径及PDI。结果显示,当



A. $K_m = 1:1$ B. $K_m = 2:1$ C. $K_m = 3:1$

图1 表面活性剂和助表面活性剂混合物/油/水的伪三元相图

A. $K_m = 1:1$ B. $K_m = 2:1$ C. $K_m = 3:1$

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of surfactant and co-surfactant mixture / oil / water

K_m 值为1:1和2:1时,空白纳米乳的粒径较大,可能导致稳定性降低;当 K_m 值为3,油相与混合表面活性剂的质量比为1:9和2:8时,纳米乳的粒径较小(< 100 nm),可形成稳定性及热稳定性均较好的纳米乳,而当油相与混合表面活性剂的质量比为2:8时,空白纳米乳的PDI更小,溶液的均一性更好。故选择质量比为2:8,此时空白纳米乳处方为油酸乙酯、吐温-80、1,2-丙二醇的质量比为1:3:1,即油相0.5 g,表面活性剂1.5 g,助表面活性剂0.5 g。详见表3。

2.3 $L_9(3^3)$ 正交试验优选THP纳米乳处方

因素与水平:以表面活性剂与助表面活性剂质量比(因素A)、表面活性剂与油相质量比(因素B)、投药量(因素C)为考察因素,以THP纳米乳的粒径和载药量为评价指标,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验法优选THP纳米乳处方。因素与水平见表4。

表3 K_m 值为3时空白纳米乳的粒径与多分散指数(PDI)

质量比	粒径($\bar{X} \pm s$, nm)			PDI($\bar{X} \pm s$)			外观性状		
	$K_m = 1:1$	$K_m = 2:1$	$K_m = 3:1$	$K_m = 1:1$	$K_m = 2:1$	$K_m = 3:1$	$K_m = 1:1$	$K_m = 2:1$	$K_m = 3:1$
1:9	177.47 ± 1.11	116.90 ± 1.56	35.27 ± 8.01	0.142 ± 0.029	0.201 ± 0.009	0.321 ± 0.080	浅黄澄清透明	浅黄澄清透明	浅黄澄清透明
2:8	269.87 ± 3.59	129.73 ± 1.70	73.50 ± 0.29	0.101 ± 0.018	0.133 ± 0.010	0.167 ± 0.011	浅黄澄清透明	浅黄澄清透明	浅黄澄清透明
3:7	301.27 ± 0.83	200.37 ± 1.23	148.07 ± 0.26	0.034 ± 0.015	0.088 ± 0.024	0.121 ± 0.006	浅黄澄清透明	浅黄澄清透明	略浑浊半透明
4:6	311.40 ± 2.76	221.5 ± 1.04	162.83 ± 0.45	0.143 ± 0.008	0.032 ± 0.022	0.120 ± 0.007	乳白色浑浊	乳白色浑浊	乳白色浑浊
5:5	360.60 ± 2.83	340.70 ± 5.24	270.80 ± 3.93	0.106 ± 0.020	0.249 ± 0.004	0.233 ± 0.004	乳白色浑浊	乳白色浑浊	乳白色浑浊
6:4	296.63 ± 1.55	374.10 ± 3.42	222.40 ± 2.25	0.145 ± 0.013	0.201 ± 0.023	0.205 ± 0.007	乳白色浑浊	乳白色浑浊	乳白色浑浊

表4 因素与水平

Tab. 4 Factors and their levels

水平	因素A	因素B	因素C(mg)
1	1	1	10
2	2	2	20
3	3	3	30

试验设计与结果:由表5可知,以粒径为评价指标时,各因素的最优水平组合为A₃B₃C₃;以载药量为评价指标时,各因素的最优水平组合为A₂B₂C₂。根据正交试验结果,投药量对粒径和载药量的影响最低,故选择以粒径作为响应的最优组合A₃B₃C₃,即油酸乙酯、吐温-80、1,2-丙二醇的质量分别为0.5,1.5,0.5g,THP投药量为30mg。

表5 L₉(3³)正交试验设计与结果

Tab. 5 Design and results of the L₉(3³) orthogonal test

序号	因素A	因素B	因素C	粒径($\bar{X} \pm s$, nm)	载药量($\bar{X} \pm s$, mg/g)
1	1	1	1	536.900 ± 11.440	11.270 ± 0.041
2	1	2	2	361.300 ± 5.813	14.270 ± 0.000
3	1	3	3	81.540 ± 12.050	16.860 ± 0.041
4	2	1	2	283.000 ± 3.807	20.550 ± 0.029
5	2	2	3	90.620 ± 1.792	21.990 ± 0.082
6	2	3	1	37.140 ± 1.123	17.360 ± 0.092
7	3	1	3	150.300 ± 1.514	16.050 ± 0.097
8	3	2	1	148.100 ± 2.765	20.970 ± 0.121
9	3	3	2	18.840 ± 0.2862	20.840 ± 0.000
粒径	K ₁	979.74	970.20	722.14	
	K ₂	410.76	600.02	663.14	
	K ₃	317.24	137.52	322.46	
	\bar{K}_1	326.58	323.40	240.71	
	\bar{K}_2	136.92	200.01	221.05	
	\bar{K}_3	105.75	45.84	107.49	
	R	220.83	277.56	133.22	
载药量	K ₁	42.40	47.87	49.60	
	K ₂	59.90	57.23	55.66	
	K ₃	57.86	55.06	54.90	
	\bar{K}_1	14.13	15.96	16.53	
	\bar{K}_2	19.97	19.08	18.55	
	\bar{K}_3	19.29	18.35	18.30	
	R	5.84	3.12	2.02	

验证试验:按上述优选工艺制备3批THP纳米乳,结果粒径为(20.02 ± 0.37)nm,载药量为(2.38 ± 0.13)%。

2.4 THP纳米乳制备

分别取油酸乙酯0.5g和吐温-80 1.5g,精密称定,置同一烧杯中,置磁力搅拌器上搅拌1h使形成均一溶液,加1,2-丙二醇0.5g,搅拌4h使均匀后加水至出现蓝色乳光,再加30mg THP标准品,室温搅拌1h,

离心(转速为10 000 r/min)20 min,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.5 THP纳米乳质量评价

粒径、PDI与Zeta电位:采用纳米粒度仪检测,结果THP纳米乳的粒径为(20.78 ± 0.63)nm,PDI为0.276 ± 0.011,Zeta电位为(-0.258 ± 0.144)mV。表明THP纳米乳的粒径较小,分布均匀,表面带负电位增加稳定性。

包封率与载药量:取THP纳米乳适量,加甲醇破乳,采用紫外-可见分光光度法测定,按公式(1)计算包封率(EE),按公式(2)计算载药量(DL)。式中,W_{包封}为被包裹于纳米乳中THP的质量,W_总为THP总投药量,W_{载体}为除水后纳米乳空白载体的质量。结果THP纳米乳的包封率为(37.63 ± 3.74)%,载药量为(2.46 ± 0.48)%,表明其能较好地包载药物。

$$EE(\%) = W_{包封} / W_{总} \times 100\% \quad (1)$$

$$DL(\%) = W_{包封} / (W_{包封} + W_{载体}) \times 100\% \quad (2)$$

体外释放度:按2.4项下方法制备THP纳米乳,取1 mL,置分子量为1 000的透析袋中,将透析袋置含10 mL pH 7.4磷酸盐缓冲液的50 mL离心管中,置恒温振荡培养箱(温度为37 °C,转速为100 r/min)中培养,分别于0,0.5,1.0,2.0,6.0,8.0,12.0,24.0 h时各取出1 mL,并补充1 mL释放介质,按公式(3)计算累积释放率(Er)。式中,m_{THP}为载药纳米乳中THP的质量,V₀为释放介质的总体积,V_e为每次取出的释放介质体积,C₀为第1次取样时的药物浓度,C_i为第i次取样时的药物浓度。结果见图2,表明THP纳米乳的缓释效果较好。

$$Er(\%) = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_0}{m_{THP}} \times 100\% \quad (3)$$

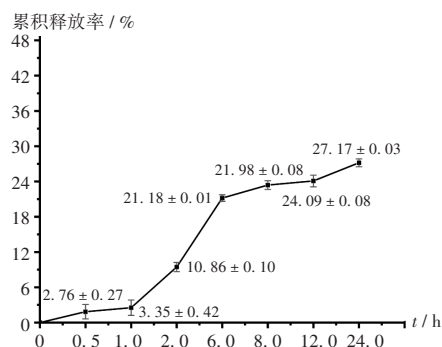


图2 延胡索乙素纳米乳累积释放率

Fig. 2 Cumulative release rate of tetrahydropalmitine nanoemulsion

离心稳定性:按2.4项下方法制备THP纳米乳,取适量,置离心管中,离心(转速为10 000 r/min)30 min,观察外观。结果刚制备的THP纳米乳未见分层,表明其离心稳定性较优。详见图3。

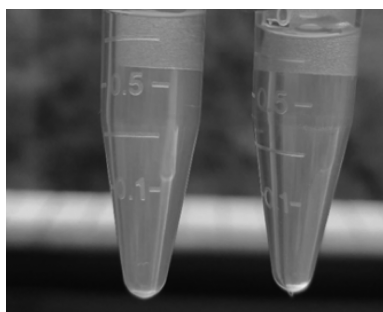


图3 延胡索乙素纳米乳离心前(左)后(右)外观

Fig. 3 The appearance of tetrahydropalmatine nanoemulsion

before (left) and after (right) centrifugation

储存稳定性:按2.4项下方法制备THP纳米乳,分别置4,25,37℃条件下,分别于第0,2,4,6,8,10,12,14天时取样检测其粒径,以考察其储存稳定性。结果刚制备好的THP纳米乳放置于4,25℃均较稳定,但随着放置时间的延长,其粒径有增大趋势。详见表6。THP纳米乳放置于37℃时,较短时间内微乳颜色变黄,并有粒子凝聚现象,无法准确测定粒径,稳定性较差,故THP纳米乳不能室温储存。

表6 延胡索乙素纳米乳储存稳定性试验粒径考察结果($\bar{X} \pm s, nm$)

Tab. 6 Results of the storage stability test for particle size investigation of tetrahydropalmatine nanoemulsion ($\bar{X} \pm s, nm$)

放置天数	4℃	25℃	放置天数	4℃	25℃
0d	20.78 ± 0.63	20.78 ± 0.63	8d	115.40 ± 1.18	121.00 ± 1.27
2d	65.45 ± 1.93	72.90 ± 0.12	10d	122.10 ± 0.59	122.70 ± 0.50
4d	93.21 ± 1.23	100.30 ± 2.19	12d	132.70 ± 3.15	127.50 ± 1.33
6d	105.40 ± 2.82	110.20 ± 2.61	14d	154.20 ± 1.71	133.80 ± 3.76

2.6 THP 纳米乳的镇痛作用评价

统计学处理:采用Origin 2021软件处理。计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

分组、给药与建模:将30只小鼠随机分为蒸馏水空白组(A组,每10g体质量0.1mL蒸馏水),THP水混悬液组(B组,40mg/kg),THP纳米乳低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组,4,8,16mg/kg),各6只。各组小鼠常规饲养,每日灌胃蒸馏水或相应药物1次,连续7d。末次灌胃结束60min后,均腹腔注射0.9%冰醋酸诱导扭体反应,腹腔内凹、后肢伸展、臀部抬高即为存在扭体反应。

镇痛效果:记录注射冰醋酸后30min内小鼠的扭体次数,计算镇痛率,镇痛率(%) = (空白组平均扭体次数 - 给药组平均扭体次数) / (空白组平均扭体次数) × 100%。结果显示,与A组比较,B组、C₁组、C₂组、C₃组小鼠的扭体次数均显著减少($P < 0.05$);与B组比较,C₁组、C₂组小鼠的扭体次数相当($P > 0.05$),C₃组小鼠的扭体次数显著减少($P < 0.05$)。表明高剂量THP纳米乳能显著抑制醋酸导致的小鼠疼痛反应。详见表7。

表7 各组小鼠镇痛效果与抗炎效果比较($n = 6$)

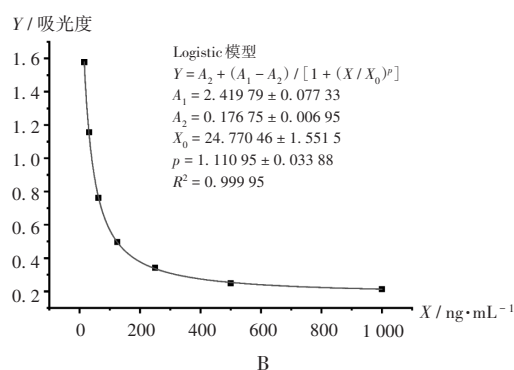
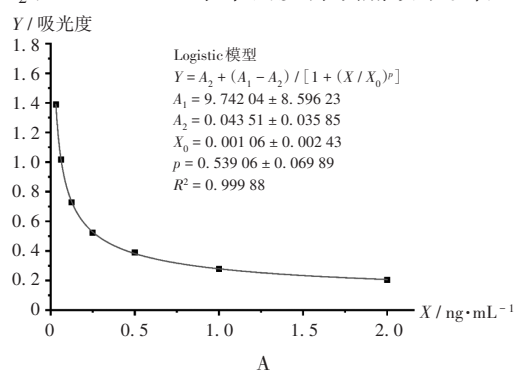
Tab. 7 Comparison of analgesic and anti-inflammatory effects in each group ($n = 6$)

组别	剂量	镇痛效果		炎症因子水平($\bar{X} \pm s, ng/mL$)	
		扭体次数(次)	镇痛率(%)	PGE ₂	ST/5-HT
A组		22.00		0.52 ± 0.08	222.94 ± 27.13
B组	40 mg/kg	12.67*	42.41	0.37 ± 0.17*	215.15 ± 7.60*
C ₁ 组	4 mg/kg	18.00*	18.18		
C ₂ 组	8 mg/kg	11.33*	48.50		
C ₃ 组	16 mg/kg	8.00*#	63.64	0.44 ± 0.09*	162.20 ± 92.37*

注:与A组比较,* $P < 0.05$;与B组比较,# $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in group A, * $P < 0.05$; Compared with those in group B, # $P < 0.05$.

抗炎效果:观察小鼠扭体行为30min后,摘除眼球,采血,置1.5mL离心管中,室温静置4h,1000g离心20min,取血清,保存于-80℃。采用ELISA法测定,通过Logistic模型绘制PGE₂和ST/5-HT的标准曲线(图4),并计算表达水平。结果显示,与A组比较,B组、C₃组小鼠的PGE₂和ST/5-HT水平均显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C₃组小鼠的PGE₂和ST/5-HT水平均相当($P > 0.05$)。表明THP混悬液和THP纳米乳均通过降低PGE₂和ST/5-HT水平而发挥镇痛效果。详见表7。



A. PGE₂ B. ST/5-HT

图4 标准曲线

A. PGE₂ B. ST/5-HT

Fig. 4 Standard curves

3 讨论

THP属异喹啉类生物碱,本身为叔胺结构,疏水性强,在水中几乎不溶,口服生物利用度低,临床应用受

限。将THP制成纳米乳,可增大其溶解度,提高生物利用度。在相转变法制备纳米乳的过程中,要把握好溶液状态,将水相缓慢滴加到油相与表面活性剂、助表面活性剂混合体系中,随着水相体积的增加,可观察到混合体系由澄清变浑浊且溶液变得非常黏稠,若继续向混合体系滴加水相,溶液会再变澄清,流动性逐渐增强,且呈蓝色乳光,此时相转变的过程表明纳米乳制备成功。

体外评价中,本研究中通过考察粒径、PDI、Zeta电位、包封率、载药量、体外释放度、稳定性等发现,制备的TPH纳米乳的粒径较小,分布均匀,缓释效果良好,能较好地包封药物,储存于4,25℃的稳定性良好,但要临用新配。体内评价中,本研究中通过评价低、中、高剂量TPH纳米乳在炎性疼痛模型小鼠中的镇痛作用发现,中、高剂量THP纳米乳能减少小鼠的扭体次数,镇痛效果明显。即使B组的给药剂量最高,但THP混悬液表现出的镇痛效果仍弱于C₁组。这可能是由于THP经纳米乳包载,溶解度提高,且乳剂在胃肠道中能快速吸收,故镇痛效果更好。PGE₂是与疼痛相关的炎性因子,醋酸致炎后的小鼠体内炎性因子水平升高,诱发疼痛^[28]。5-HT在外周神经系统中属痛觉神经递质,其血清水平一般与疼痛呈正相关^[29]。本研究结果显示,THP纳米乳通过降低PGE₂和ST/5-HT水平而发挥镇痛作用。

本研究中制备的THP纳米乳粒径较小,分布均匀,缓释效果良好,可能通过降低PGE₂和ST/5-HT水平而发挥镇痛作用。但仍存在不足,如THP纳米乳制备步骤较多,导致包封率不高,后续应通过处方和工艺优化进一步提高包封率;THP纳米乳在低温中的稳定性较好,但37℃温度下其性状会改变,应注意保存条件,并考虑制成纳米乳的冻干固体粉,以增加稳定性;此外,还应在细胞水平和更多动物疼痛模型中深入研究抗疼痛效果。

参考文献

[1] 谭丽盈. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定醋延胡索药材中4种黄曲霉毒素[J]. 化学分析计量, 2021, 30(10): 27-32.
[2] 冯自立, 赵正栋, 刘建欣. 延胡索化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 2000-2008.
[3] XIA XH, HE JC, LIU B, et al. Targeting ER α degradation by *L*-Tetrahydropalmatine provides a novel strategy for breast cancer treatment[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(12): 2192-2204.
[4] YIN XZ, ZHANG JX, ZHAO WJ, et al. Combined Levo-tetrahydropalmatine and diphenylethylammonium chloride enhances antitumor activity in hepatocellular carcinoma [J]. Pharmacol Res, 2022, 179: 106219.
[5] LIU YY, WANG TX, ZHOU JC, et al. Dopamine D₁ and D₂ receptors mediate analgesic and hypnotic effects of *L*-tetrahydropalmatine in a mouse neuropathic pain model[J]. Psychopharmacology (Berl), 2019, 236(11): 3169-3182.
[6] WANG Y, WANG RR, SUN W, et al. Analgesic effect of *dl*-THP on inflammatory pain mediated by suppressing spinal

TRPV1 and P2X3 receptors in rats [J]. Front Biosci (LandmarkEd), 2021, 26(5): 1-10.
[7] CUI HR, YANG XX, WANG ZD, et al. Tetrahydropalmatine triggers angiogenesis via regulation of arginine biosynthesis [J]. Pharmacol Res, 2021, 163: 105242.
[8] 李燕, 王慧凯, 王滨, 等. 复方延胡索微乳凝胶贴膏的提取及镇痛抗炎作用[J]. 滨州医学院学报, 2022, 45(2): 144-150.
[9] 关秀锋, 王锐, 曲秀芬, 等. 延胡索的化学成分与药理作用研究进展[J]. 化学工程师, 2020, 34(3): 57-60.
[10] 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.
[11] DU QY, MENG XL, WANG SH. A comprehensive review on the chemical properties, plant sources, pharmacological activities, pharmacokinetic and toxicological characteristics of tetrahydropalmatine [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 890078.
[12] 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.
[13] 谢燕, 崔晓鸽, 张智强. 延胡索乙素固体脂质纳米粒缓释片制备及工艺优化[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(21): 2134-2140.
[14] 施婷婷, 洪超, 韩丽妹, 等. 元胡止痛方两种有效组分固体分散体的制备与评价[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(9): 1151-1157.
[15] 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.
[16] 连王权, 沈成英, 申宝德, 等. 微型化介质研磨法制备延胡索乙素纳米混悬剂[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(3): 202-209.
[17] TUNG N T, TRAN CS, PHAM TM, et al. Development of solidified self-microemulsifying drug delivery systems containing *L*-tetrahydropalmatine: design of experiment approach and bioavailability comparison [J]. Int J Pharm, 2018, 537(1/2): 9-21.
[18] MUSHTAQ A, WANI SM, MALIK AR. Recent insights into nanoemulsions: Their preparation, properties and applications [J]. Food Chem X, 2023, 18: 100684.
[19] KOMAIKO JS, MCCLWMENTS DJ. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2016, 15(2): 331-352.
[20] LI YR, ZHANG T, HUAI JX, et al. Pharmacokinetic study of three different formulations of *L*-tetrahydropalmatine in brain tissues of rats [J]. Biomedical Chromatogr, 2021, 35(5): e5066.
[21] ZHU Y, XU W, ZHANG JJ, et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral delivery of limonene: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* Evaluation [J]. AAPS Pharma Sci Tech, 2019, 20(4): 1-11.
[22] WANG LZ, YAN WR, TIAN YR, et al. Self-microemulsifying drug delivery system of phillygenin: formulation develop-