

石杉碱甲-木犀草素脂质立方液晶纳米粒离子敏感型凝胶 大鼠鼻腔给药药动学及脑靶向性研究

郑 钧, 吴少媛, 黄庆德*

(福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要: 目的 制备石杉碱甲-木犀草素脂质立方液晶纳米粒离子敏感型凝胶(HupA-Lut-LCLCNs-ISG), 并考察大鼠鼻腔给药后的体内药动学行为及脑靶向性。方法 建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法, 同时测定大鼠血浆和脑组织中石杉碱甲(HupA)和木犀草素(Lut)浓度, 以芍药苷(Pae)为内标, 采用乙酸乙酯萃取法进行样品前处理。选取健康SD大鼠105只, 采用随机数字表法分为尾静脉注射液组(55只)和HupA-Lut-LCLCNs-ISG鼻腔给药组(50只), 分别给予HupA-Lut静脉注射液和HupA-Lut-LCLCNs-ISG, 测定不同时间点血浆和脑组织中HupA和Lut浓度。采用非房室模型计算主要药动学参数, 分别提取2组药时曲线下面积(AUC_{0-t})、峰浓度(C_{max})、达峰时间(t_{max})、半衰期(t_{1/2})、平均滞留时间(MRT_{0-t}), 并分别计算脑靶向效率(DTE)、鼻脑直接传递百分比(DTP)和绝对生物利用度(F)。结果 所建立的UPLC-MS/MS分析方法专属性、线性关系、精密度、稳定性、回收率及基质效应均符合生物样品定量分析要求。药动学结果显示, HupA-Lut-LCLCNs-ISG鼻腔给药组给药后0.5 h, HupA和Lut在血浆及脑组织中的浓度均达C_{max}。与尾静脉注射液组比较, HupA-Lut-LCLCNs-ISG鼻腔给药组HupA和Lut血浆C_{max}均显著下降(P<0.05), Lut血浆AUC_{0-t}显著下降(P<0.05), HupA和Lut脑组织C_{max}和AUC_{0-t}均显著升高(P<0.05)。HupA-Lut-LCLCNs-ISG鼻腔给药组HupA和Lut的脑组织AUC_{0-t}分别为(1 418.19±137.06)、(1 653.96±216.26) ng·h/mL, DTE分别为(229.87±49.05)%、(182.55±17.98)%, DTP分别为(54.94±9.28)%、(44.75±6.04)%, F分别为94.43%、81.67%。结论 HupA-Lut-LCLCNs-ISG经鼻腔给药后全身吸收良好, 且能显著提高HupA和Lut在脑组织中的分布, 存在较高比例的鼻-脑直接转运途径, 具有优良的脑靶向性。

关键词: 阿尔茨海默病; 石杉碱甲; 木犀草素; 脂质立方液晶纳米粒; 离子敏感型凝胶; 鼻腔给药; 药动学; 脑靶向性

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种发病机制涉及多靶点的老年神经退行性疾病^[1-2]。研究表明, 应用不同药理活性的药物组合对AD不同靶点进行干预, 其作用较采用单一药物治疗更具优势^[3-6]。石杉碱甲(huperzine A, HupA)可通过抑制脑皮层和海马区的乙酰胆碱酯酶活性, 提高神经突触间隙乙酰胆碱水平, 进而兴奋胆碱能神经元, 从而改善AD相关的学习记忆和认知行为功能障碍^[7-8]。木犀草素(luteolin, Lut)可通过抑制星形胶质细胞过度激活和内质网应激, 抑制神经炎症反应, 从而改善AD动物模型认知损伤^[9-12]。基于HupA和Lut作用环节的差异, 本课题组拟联合应用HupA和Lut, 旨在通过二者的协同作用改善认知功能障碍并延缓AD病理进程。然而, 上述药物在应用中面临药物溶解度低、透膜性差导致药物难于透过血脑屏障及普通鼻用制剂生物黏附性低而在鼻腔滞留时间短等问题, 从而影响药物在脑组织中的分布。为此, 本课题组在前期处方工艺研究基础上, 优选了具备良好透膜性的脂质立方液晶纳米粒

(lipid cubic liquid crystalline nanoparticles, LCLCNs)作为药物共载载体^[13-14], 并复合具有良好生物黏附性的离子敏感型凝胶(ion-sensitive in-situ gel, ISG), 构建HupA-Lut-LCLCNs-ISG鼻-脑递药系统。在此基础上, 本实验以尾静脉注射组为对照, 初步考察该制剂经大鼠鼻腔给药后的药代动力学特征及脑靶向性, 旨在阐明LCLCNs技术对HupA和Lut鼻腔给药脑靶向性的影响, 从而为该复方制剂后续的药效学协同机制研究提供坚实基础。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级6~8周龄雄性SD大鼠105只, 初始体质量(220±20)g, 购自福州诺敦斯生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2022-0004, 实验动物合格证号: 20220004024321。大鼠饲养于福建中医药大学动物实验中心SPF级动物实验室, 实验动物使用许可证号: SYXK(闽)2019-0007。动物饲养于温度(22±1)℃、相对湿度50%、光照和黑暗各12 h交替的环境中, 大鼠自由进食与饮水。本研究已通过福建中医药大学实验动物伦理委员会审批(审批号: FJTICM IACUC 2023061)。

1.2 实验试剂 HupA对照品(纯度≥98%, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: H29D8J51963); HupA

原料药(纯度 $\geq 99\%$,西安普莱特生物工程有限公司,批号:HA20191102);Lut对照品(纯度 $\geq 99\%$,批号:111520-202107)、芍药苷(Pae)对照品(纯度 $\geq 99\%$,批号:110736-202145)均购自中国食品药品检定研究院;Lut原料药(纯度 $\geq 98\%$,批号:C12617611)、单油酸甘油酯(批号:M813316)、低酰基结冷胶(批号:G281481)、羟丙基甲基纤维素(批号:C10001744)均购自上海麦克林生化科技有限公司;泊洛沙姆407(德国BASF公司,批号:GNC21922B);乌拉坦(西陇科学股份有限公司,批号:180514);甲酸、水、甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司);实验用水为超纯水;其余试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 实验仪器 超高效液相色谱仪(型号:ACQUITY UPLC H-Class)、三重四级杆质谱仪(型号:Xevo TQ-S)、C18超高效液相色谱柱(型号:ACQUITY UPLC[®] BEH)均购自美国Waters公司;多管漩涡混合器(常州杰博森仪器有限公司,型号:UMV-2);十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,型号:XS205];低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,型号:SC-04);高速离心机(德国Eppendorf公司,型号:Centrifuge 5418);氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司,型号:HAC-1);高速样品制备仪(美国MP Biomedicals公司,型号:FastPrep-24TM 5G);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:SCIENTZ-II D)。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 HupA-Lut-LCLCNs的制备 精密称取750 mg单油酸甘油酯、10 mg HupA和26 mg Lut,溶解于6 mL无水乙醇中,超声处理15 min使其形成澄清透明的前体溶液,为A相;精密称取107 mg泊洛沙姆407于20 mL西林瓶中,加入10 mL超纯水使其充分溶解,为B相。500 r/min磁力搅拌,以250 μ L/min的恒定流速将A相缓慢滴加至B相中,持续搅拌2 h,将上述溶液置于圆底烧瓶中30 $^{\circ}$ C旋转蒸发30 min,挥尽乙醇,得HupA-Lut-LCLCNs粗品溶液。取HupA-Lut-LCLCNs粗品溶液,0~4 $^{\circ}$ C冰水浴条件下置于细胞超声破碎仪上超声5 min,超声功率为250 W,2 s/次,间隔1 s/次,即得HupA-Lut-LCLCNs。HupA-Lut-LCLCNs平均粒径为 (220.93 ± 1.20) nm,多分散指数(PDI)为 (0.176 ± 0.023) ,Zeta电位为-21.06 mV。

2.1.2 HupA-Lut-LCLCNs-ISG的制备 精密称取1.0 g低酰基结冷胶及0.75 g羟丙基甲基纤维素,置于250 mL烧杯中,加入纯化水100 mL,在600 r/min磁力搅拌下加热至80~90 $^{\circ}$ C使其充分溶胀并溶解,待其冷却至室温后得到澄清溶液,加纯化水补足水

量至100 mL,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中冷藏过夜,备用。精密吸取“2.1.1”项下制得的HupA-Lut-LCLCNs与上述溶液,按6:4(V/V)比例置于西林瓶中,300 r/min磁力搅拌20 min,混合均匀,即得HupA-Lut-LCLCNs-ISG。

2.2 大鼠血浆与脑组织中药物体内分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用ACQUITY UPLC[®] BEH C18色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μ m,Waters),以0.1%甲酸水溶液(A)与甲醇(B)为流动相,梯度洗脱(0~0.5 min,80%A;0.5~1.5 min,80%~15%A;1.5~3 min,15%A;3~3.1 min,15%~80%A;3.1~4 min,80%A);流速:0.25 mL/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:2 μ L。

2.2.2 质谱条件 离子源:电喷雾电离(ESI)源;离子模式:正负离子切换扫描;扫描方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:2.50 kV;Extractor:3.00 V;离子源温度:500 $^{\circ}$ C;去溶剂温度:500 $^{\circ}$ C;锥孔气体(氮气)流速:50 L/h;去溶剂气体(氮气)流速:800 L/h;碰撞气体:氩气;用于定量分析的离子对及相应参数:HupA采用正离子模式检测,离子形式为 $[M+H]^+$, m/z 243.33 $\rightarrow$ 134.15,锥孔电压30 V,碰撞能量25 eV;Lut采用负离子模式检测,离子形式为 $[M-H]^-$, m/z 285.10 $\rightarrow$ 133.12,锥孔电压30 V,碰撞能量30 eV;Pae采用负离子模式检测,离子形式为 $[M-H]^-$, m/z 525.16 $\rightarrow$ 121.02,锥孔电压28 V,碰撞能量25 eV。

2.2.3 对照品工作液与内标工作液的制备

2.2.3.1 HupA和Lut对照品工作液 精密称取HupA和Lut对照品各5 mg,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为500 μ g/mL的HupA和Lut对照品储备液。用甲醇逐步稀释上述储备液,制得浓度分别为0.1、0.5、1、10、50、100、500、1 000、2 000、5 000 ng/mL的HupA与Lut系列对照品工作液,4 $^{\circ}$ C冰箱避光保存。

2.2.3.2 内标工作液 精密称取Pae 5 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为500 μ g/mL的Pae内标储备液。用甲醇进一步稀释该储备液,制得Pae浓度为5 μ g/mL的内标工作液,4 $^{\circ}$ C冰箱避光保存。

2.2.4 血浆及脑组织的采集 选取健康SD大鼠105只,实验前禁食不禁水12 h,腹腔注射20%乌拉坦(0.7 mL/100 g)进行深度麻醉;麻醉后腹主动脉取血,血液置于含有肝素钠的采血管中,于室温下3 500 r/min离心15 min,分离上层血浆,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱冷冻保存;大鼠取血后,迅速开颅,完整剥离全脑,剔除表面血管及脑膜,用滤纸吸干残余血浆并用生理盐水冲洗;精密称定重量后,置于组织研磨

管中,按2 mL/g的比例加入冰生理盐水,在冰浴条件下利用高速样品制备仪进行充分匀浆;匀浆液于3 500 r/min离心15 min,取上清液,即得脑组织匀浆液,置于-20℃下冷冻保存备用。

2.2.5 样品前处理 ① 血浆样品处理:精密吸取大鼠血浆500 μL,加入Pae内标溶液10 μL,混匀;加入乙酸乙酯3 mL,涡旋振荡10 min,使其充分混匀并促进萃取完全;于室温下3 500 r/min离心10 min,精密移取全部上清液,于40℃下氮气吹干;残渣加入80%甲醇100 μL复溶,涡旋混合5 min,于室温下14 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。② 脑匀浆样品处理:精密吸取大鼠脑匀浆500 μL,后续内标加入、萃取、离心、吹干及复溶步骤均同“血浆样品处理”项下操作。

2.2.6 专属性试验 分别取大鼠空白血浆和空白脑匀浆各500 μL作为空白基质样品;另取大鼠空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,加入HupA对照品工作液作为空白基质加HupA对照样品;另取大鼠空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,加入Lut对照品工作液作为空白基质加Lut对照样品;另取大鼠空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,加入Pae工作液作为空白基质加Pae内标样品;另取大鼠给药后血浆和给药后脑匀浆各500 μL,加入Pae内标工作液作为给药样品。上述样品均按“2.2.5”项下自“加入乙酸乙酯3 mL”起的步骤处理,进行超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析。

2.2.7 标准曲线与线性关系考察 分别取空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,分别加入“2.2.3”项下HupA和Lut系列对照品工作液10 μL及Pae内标工作液10 μL,按“2.2.5”项下处理方法操作,制备得到含HupA与Lut浓度分别为0.01、0.05、0.1、1、5、10、50、100、200、500 ng/mL的系列标准曲线溶液。通过UPLC-MS/MS分析,记录HupA、Lut及Pae的峰面积(A_{HupA} 、 A_{Lut} 、 A_{Pae})。以待测物与内标的峰面积比值($A_{\text{HupA}}/A_{\text{Pae}}$ 、 $A_{\text{Lut}}/A_{\text{Pae}}$)为纵坐标(Y),以HupA和Lut浓度与Pae浓度比值($C_{\text{HupA}}/C_{\text{Pae}}$ 、 $C_{\text{Lut}}/C_{\text{Pae}}$)为横坐标(X),采用加权最小二乘法进行线性回归拟合,设置权重为 $w=1/X^2$,分别建立HupA和Lut在血浆及脑匀浆中的回归方程。定量下限(LLOQ)依据信噪比($S/N \geq 10$)初步确定。

2.2.8 精密度试验 精密吸取空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,分别加入HupA和Lut对照品工作液,制备得到低、中、高浓度(10、100、250 ng/mL)水平的血浆样品溶液和脑匀浆样品溶液。每个浓度水平平行配制5份独立样品,按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行UPLC-MS/MS分析。在同一日内完成上述样品的独立制备与测定,计算实测浓度的相对标准偏差(RSD),以考察日内精密度;连续独立配制并测定3 d,以考察日间精密度。

2.2.9 稳定性试验 精密吸取空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,加入10 μL浓度为1 000 ng/mL的HupA和Lut对照品工作液,混匀。将上述样本分别置于以下条件下进行测试:① 室温放置24 h以考察短期暴露稳定性;② -20℃冰箱放置72 h反复冻融3次以考察样品反复冻融稳定性。按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行UPLC-MS/MS分析。

2.2.10 方法回收率试验 按“2.2.8”项下方法配制得到HupA和Lut浓度为10、100、250 ng/mL的低、中、高浓度水平血浆和脑匀浆样品溶液,每个浓度平行配制3份。按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行UPLC-MS/MS分析。记录HupA、Lut及Pae峰面积,计算药物含量,按公式计算方法回收率,方法回收率=实测量/对照品加入量×100%。

2.2.11 提取回收率和基质效应试验 A组:精密吸取空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,加入对应浓度水平的HupA和Lut对照品工作液10 μL,配制成HupA和Lut浓度为10、100、250 ng/mL的低、中、高浓度水平的血浆和脑匀浆样品溶液,每个浓度平行配制3份。按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行UPLC-MS/MS分析,记录各待测物的色谱峰面积(A)。B组:精密吸取空白血浆和空白脑匀浆各500 μL,加入乙酸乙酯3 mL萃取,在萃取所得上清液中加入与A组等量的对应浓度水平对照品溶液10 μL,按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行UPLC-MS/MS分析,记录各待测物的色谱峰面积(B)。C组:直接以甲醇配制含有相应浓度HupA和Lut的纯溶剂对照品溶液,其药物终浓度应与A、B组复溶后的理论进样浓度一致,按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行UPLC-MS/MS分析,记录各待测物的色谱峰面积(C)。计算提取回收率与基质效应,提取回收率=(A/B)×100%,基质效应=(B/C)×100%。

2.3 大鼠鼻腔给药的药动学与脑靶向性评价

2.3.1 HupA-Lut尾静脉注射液的制备 精密称取1.5 mg HupA和4 mg Lut,置于烧杯中,加入3 mL无水乙醇溶解。随后加入7 mL生理盐水,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得HupA质量浓度为0.15 mg/mL、Lut质量浓度为0.4 mg/mL、澄明的HupA-Lut尾静脉注射液^[15-16]。

2.3.2 分组、给药及取材 选取健康SD大鼠105只,采用随机数字表法分为2组:尾静脉注射液组(55只)、HupA-Lut-LCLCNs-ISC鼻腔给药组(50只)。2组大鼠给药前禁食不禁水12 h。① 尾静脉给药组:腹腔注射20%乌拉坦(0.7 mL/100 g)对大鼠进行麻醉,尾静脉注射0.24 mL含HupA 36 μg、Lut 96 μg的HupA-Lut尾静脉注射液,分别于给药后的0.033、0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24 h时,在大鼠麻醉状态下行腹主动脉采血并完整剥离脑组织,样

本处理和保存方法同“2.2.4”项下操作。② HupA-Lut-LCLCNs-ISG 鼻腔给药组:腹腔注射 20% 乌拉坦对大鼠进行麻醉(0.7 mL/100 g),取仰卧位,固定头部和四肢于手术板上,剖开颈部并暴露食管,结扎食管以防止药液流失。以鼻腔给药方式,分别用平头微量注射器给予大鼠鼻腔 60 μ L HupA-Lut-LCLCNs-ISG(含 HupA 36 μ g 和 Lut 96 μ g),分别于给药后的 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24 h 时,在大鼠麻醉状态下行腹主动脉采血并完整剥离脑组织,样本处理和保存方法同“2.2.4”项下操作。

2.3.3 药代动力学考察 取“2.3.2”项下采集的血浆及脑组织样品,按“2.2.5”项下方法处理样品,并进行 UPLC-MS/MS 分析。根据回归方程计算各时间点血浆和脑组织中 HupA 和 Lut 浓度。以时间(t)为横坐标、血浆中药物浓度(C)为纵坐标,分别绘制 HupA 和 Lut 血药浓度-时间曲线及脑药浓度-时间曲线。将“浓度-时间”数据导入 DAS 2.0 药动学软件,采用非房室模型计算统计矩参数[达峰时间($t_{\max}$)、峰浓度($C_{\max}$)、半衰期($t_{1/2}$)、血药浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})、平均滞留时间(MRT_{0-t})],提取相关组别 AUC_{0-t} ,按以下公式分别计算脑靶向效率(DTE)、鼻脑直接传递百分比(DTP)和绝对生物利用度(F)^[17-18]。

$$DTE = \frac{(AUC_{\text{脑组织}}/AUC_{\text{血浆}})_{i.n.}}{(AUC_{\text{脑组织}}/AUC_{\text{血浆}})_{i.v.}} \times 100\%$$

$$DTP = \frac{(AUC_{\text{脑组织}})_{i.n.} - \frac{(AUC_{\text{脑组织}})_{i.v.}}{(AUC_{\text{血浆}})_{i.v.}} \times (AUC_{\text{血浆}})_{i.n.}}{(AUC_{\text{脑组织}})_{i.n.}} \times 100\%$$

$$F = \frac{AUC_{i.n.}}{AUC_{i.v.}} \times 100\%$$

注:i.n.表示鼻腔给药,i.v.表示静脉给药。

2.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血浆与脑组织中药物体内分析方法的建立

3.1.1 专属性试验 在选定的色谱和质谱条件下,各组分色谱峰形对称性良好,HupA、Lut、Pae 的出峰时间分别约为 2.23、2.84、2.51 min,三者各自通道内互不干扰,且血浆及脑组织中的内源性物质对测定无干扰,本分析方法具有优良的专属性。见图 1~2。

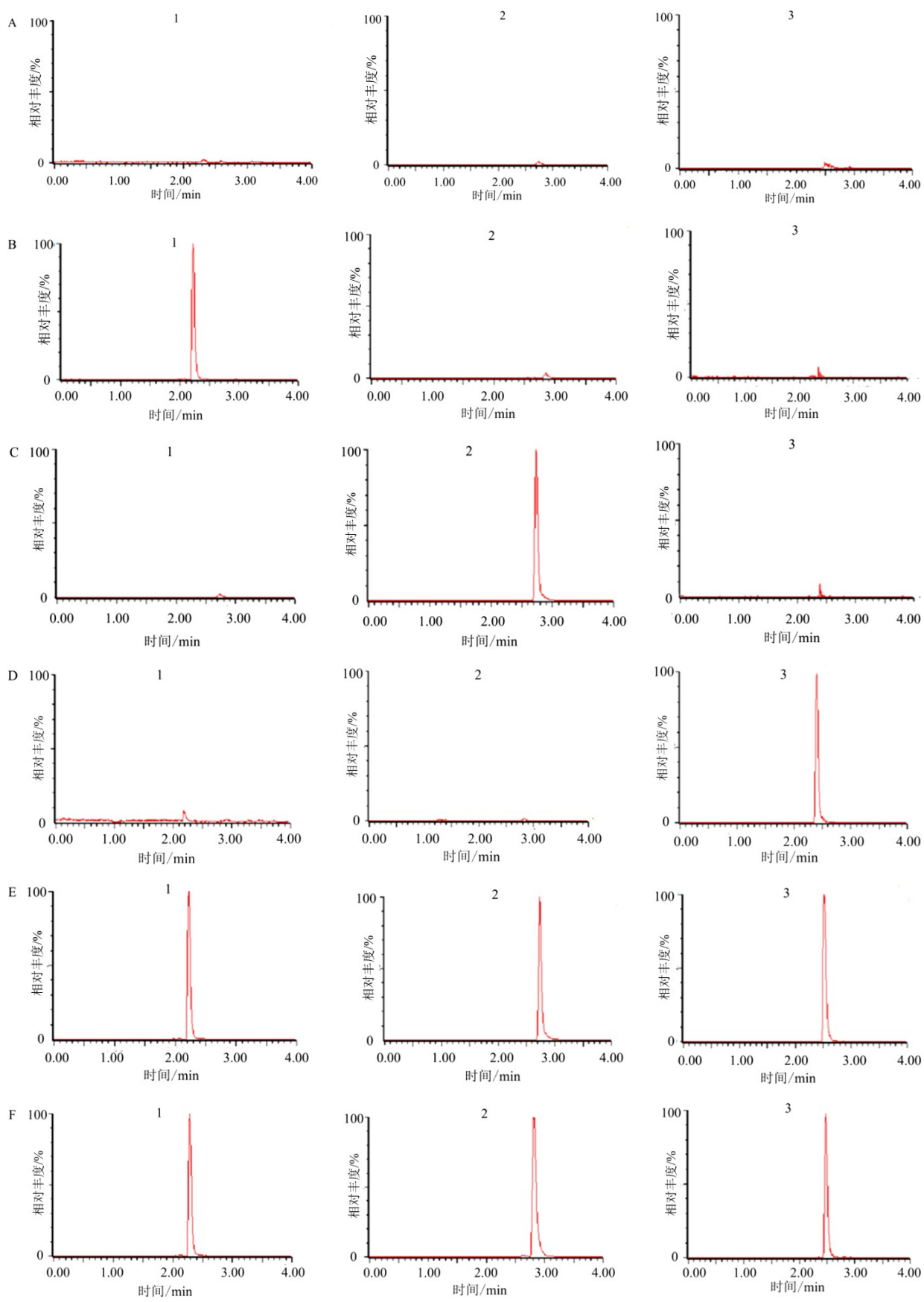
3.1.2 标准曲线与线性关系考察 HupA 在血浆中的回归方程为 $Y = 0.0234X + 0.1159$, $r = 0.9945$;在脑组织中的回归方程为 $Y = 0.0279X + 0.0383$, $r =$

0.9962。Lut 在血浆中的回归方程为 $Y = 0.0165X + 0.034$, $r = 0.9984$;在脑组织中的回归方程为 $Y = 0.0146X - 0.0795$, $r = 0.9972$ 。结果表明,HupA 在 0.01~500 ng/mL 浓度范围内、Lut 在 0.05~500 ng/mL 浓度范围内,于血浆及脑组织基质中均呈现良好线性关系。HupA 和 Lut 的 LLOQ 分别为 0.01 ng/mL ($S/N = 11.19$) 和 0.05 ng/mL ($S/N = 10.34$)。

3.1.3 精密度的考察 考察低、中、高(10、100、250 ng/mL)3 个浓度水平质控样品的精密度。结果显示,血浆样品 HupA 的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 4.48%~12.63% 和 3.97%~9.78%;Lut 的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 1.98%~5.45% 和 3.60%~6.30%。脑组织样品 HupA 的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 4.09%~9.34% 和 3.13%~9.07%;Lut 的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 1.43%~6.78% 和 2.55%~6.39%。各质控样品的日内精密度和日间精密度 RSD 均 $< 15\%$,表明本提取与测定方法稳定可靠,符合《中华人民共和国药典:四部》通则 9012“生物样品定量分析方法验证指导原则”的相关要求^[19]。

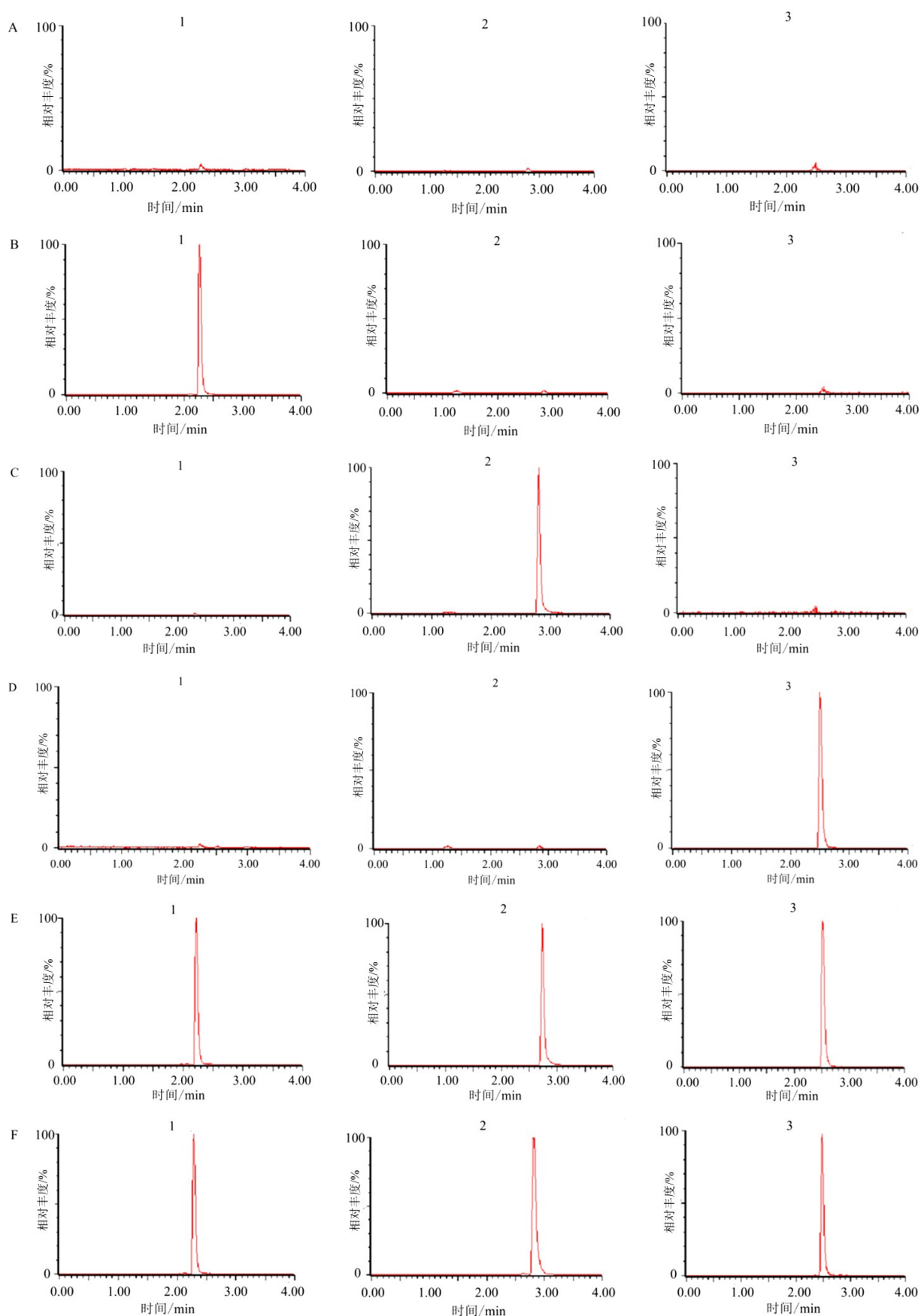
3.1.4 稳定性试验 对照品血浆质控样品在室温放置 24 h 及经 -20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次后,HupA 浓度的 RSD 分别为 5.48% 和 6.49%,Lut 浓度的 RSD 分别为 8.84% 和 6.87%;对照品脑组织质控样品在相同条件下,HupA 浓度的 RSD 分别为 6.19% 和 2.90%,Lut 浓度的 RSD 分别为 5.92% 和 7.03%。各稳定性样本实测浓度为初始浓度的 90%~100%,且 $RSD < 10\%$,表明 HupA 和 Lut 在血浆及脑组织样品中经室温放置、冷冻及反复冻融条件下稳定性符合《中华人民共和国药典:四部》通则 9012“生物样品定量分析方法验证指导原则”的相关要求^[19]。

3.1.5 方法回收率试验 考察低、中、高(10、100、250 ng/mL)3 种浓度水平质控样品的方法回收率。结果表明,对照品血浆质控样品中 HupA 的方法回收率分别为 101.62%、94.85%、99.39%,RSD 分别为 4.24%、4.33%、2.18%;对照品脑组织质控样品中 HupA 的方法回收率分别为 90.78%、90.98%、99.67%,RSD 分别为 5.69%、1.63%、1.40%。对照品血浆质控样品中 Lut 的方法回收率分别为 96.54%、98.86%、100.16%,RSD 分别为 6.61%、6.94%、3.23%;对照品脑组织质控样品中 Lut 的方法回收率分别为 86.08%、93.53%、99.42%,RSD 分别为 1.15%、4.28%、2.13%。以上低、中、高浓度的含药基质样品中,HupA 与 Lut 的方法回收率均处于 85%~115% 范围内,且 $RSD < 7\%$,表明本分析方法准确度良好,符合《中华人民共和国药典:四部》通则 9012“生物样品定量分析方法验证指导原则”的相关要求^[19]。



注: 1 HupA 通道; 2 Lut 通道; 3 Pae 通道; A 空白血浆; B 空白血浆+HupA 对照品溶液; C 空白血浆+Lut 对照品溶液; D 空白血浆+Pae 内标溶液; E 空白血浆+HupA 对照品溶液+Lut 对照品溶液+Pae 内标溶液; F 给药血浆。

图 1 大鼠血浆样品 UPLC-MS/MS 图



注: 1 HupA 通道; 2 Lut 通道; 3 Pae 通道; A 空白脑组织; B 空白脑组织+HupA 对照品溶液; C 空白脑组织+Lut 对照品溶液; D 空白脑组织+Pae 内标溶液; E 空白脑组织+HupA 对照品溶液+Lut 对照品溶液+Pae 内标溶液; F 给药脑组织。

图 2 大鼠脑组织样品 UPLC-MS/MS 图

3.1.6 提取回收率与基质效应 考察低、中、高(10、100、250 ng/mL)3个浓度水平质控样品的提取回收率与基质效应。结果显示,对照品血浆质控样品中 HupA 的提取回收率分别为 91.48%、88.40%、95.62%,RSD 分别为 11.26%、1.75%、3.91%;对照品脑组织质控样品中 HupA 的提取回收率分别为 91.07%、89.99%、98.24%,RSD 分别为 6.54%、2.95%、5.95%。对照品血浆质控样品中 Lut 的提取回收率分别为 91.13%、101.88%、95.20%,RSD 分别为 8.18%、7.41%、4.08%;对照品脑组织质控样品中 Lut 的提取回收率分别为 90.85%、93.11%、98.86%,RSD 分别为 7.96%、3.84%、5.80%。对照品血浆质控样品中 HupA 的基质效应分别为 96.74%、101.26%、98.32%,RSD 分别为 6.02%、8.91%、5.03%;对照品脑组织质控样品中 HupA 的基质效应分别为 107.73%、100.88%、100.04%,RSD 分别为 6.15%、3.03%、3.59%。对照品血浆质控样品中 Lut 的基质效应分别为 96.41%、93.04%、97.52%,RSD 分别为 7.28%、5.48%、6.27%;对照品脑组织质控样品中 Lut 的基质效应分别为 89.72%、97.02%、96.59%,RSD 分别为 3.28%、7.24%、0.59%。结果表明,HupA 和 Lut 在血浆及脑组织基质中的提取回收率稳定且重现性好,基质效应均控制在 85%~115% 范围内,不存在显著的内源性离子增强或抑制现象,符合《中华人民共和国药典:四部》通则 9012“生物样品定量分析方法验证指导原则”的相关要求^[19]。

3.2 大鼠鼻腔给药的药动学与脑靶向性评价

3.2.1 药代动力学考察 HupA-Lut-LCLCNs-ISC 鼻腔给药组 0.5 h HupA 和 Lut 在血浆及脑组织中均

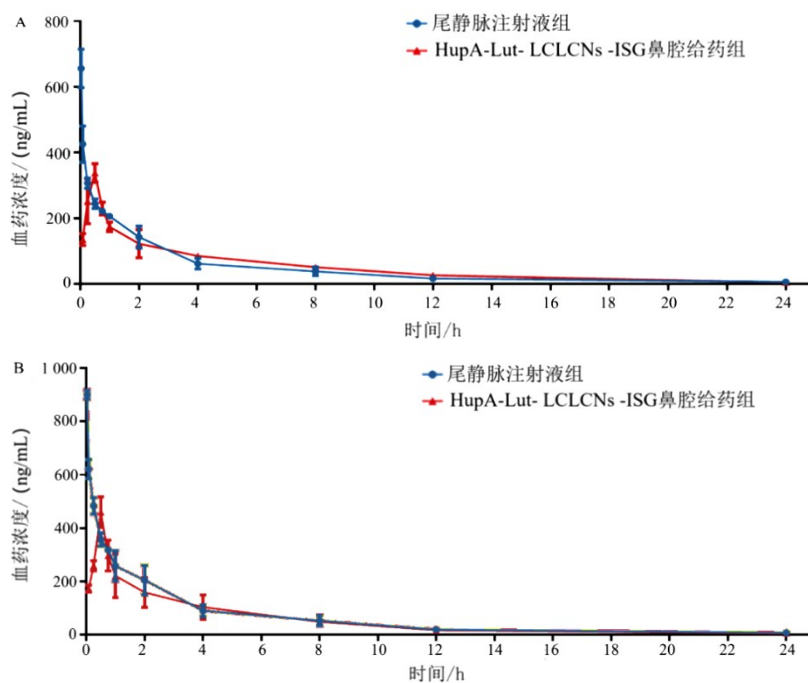
达 $C_{\max}$ 。见图 3~4。与尾静脉注射液组比较,HupA-Lut-LCLCNs-ISC 鼻腔给药组 HupA 和 Lut 血浆 $C_{\max}$ 均显著下降($P<0.05$),Lut 血浆 AUC_{0-4} 显著下降($P<0.05$),HupA 和 Lut 脑组织 $C_{\max}$ 和 AUC_{0-4} 均显著升高($P<0.05$)。见表 1~2。

3.2.2 脑靶向性评价 见表 3。

4 讨论

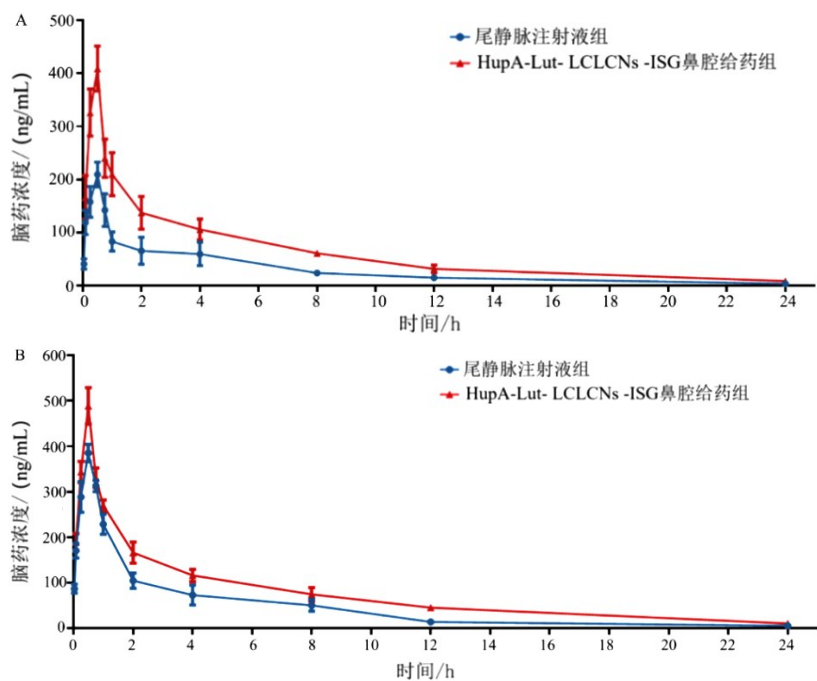
制剂脑靶向性评价实验的可行性及结果的可信度,主要取决于脑组织样品采集方法的规范性和生物样品含量测定方法的可靠性。此外,还应选择适宜的评价参数对实验数据进行处理,以准确评价制剂的脑靶向性。

4.1 样品采集方式的选择 目前,评价药物脑靶向性的体内采样策略主要包括穿刺单点法、脑部微透析法和脑组织药物浓度法。其中,穿刺单点法每个动物只能取一个样品,且操作难度较大,对实验技术要求较高;脑部微透析法具有实时、动态、连续取样和微创等优点,但是对仪器设备要求较高,实验成本较高,不利于开展大批量样品检测^[20];脑组织药物浓度法是通过分离脑组织并测定其中药物浓度,以脑组织匀浆中药物浓度近似反映脑内药物暴露水平。该方法虽可能受到脑血管残留血液中药物的影响,不能完全准确反映药物在脑实质中的真实浓度,但可通过脑组织药物浓度、血浆药物浓度及其相关比值评价药物脑分布特征,在一定程度上反映药物的脑靶向性,且具有操作相对简便、成本较低等优点^[17]。因此,本研究采用脑组织药物浓度法评价 HupA-Lut-LCLCNs-ISC 鼻腔给药组的脑靶向性。



注: A HupA; B Lut。

图3 2组大鼠体内平均血浆药物浓度-时间曲线



注：A HupA；B Lut。
图 4 2 组大鼠体内平均脑组织药物浓度-时间曲线

表 1 2 组血浆中 HupA 和 Lut 的药代动力学参数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	药物	$t_{\max}/h$	$C_{\max}/(ng/mL)$	$t_{1/2}/h$	$AUC_{0-t}/(ng\cdot h/mL)$	MRT_{0-t}/h
尾静脉注射液组	5	HupA	0.033 ± 0.000	566.14 ± 90.02	4.35 ± 1.04	$1\,181.34\pm 67.74$	5.10 ± 0.74
	5	Lut	0.033 ± 0.000	850.30 ± 112.48	3.90 ± 0.63	$1\,557.19\pm 103.78$	4.07 ± 0.67
HupA-Lut-LCLCNs-ISG 鼻腔给药组	5	HupA	0.500 ± 0.000	$338.09\pm 28.37^{1)}$	4.57 ± 1.06	$1\,115.52\pm 116.84$	4.92 ± 0.62
	5	Lut	0.500 ± 0.000	$460.15\pm 16.59^{1)}$	3.73 ± 1.08	$1\,271.78\pm 85.33^{1)}$	3.94 ± 1.15

注：与尾静脉注射液组比较，1) $P<0.05$ ；鉴于静脉注射不存在吸收过程，静脉注射组与鼻腔给药组的 $t_{\max}$ 未进行统计学比较。

表 2 2 组脑组织中 HupA 和 Lut 的药代动力学参数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	药物	$t_{\max}/h$	$C_{\max}/(ng/mL)$	$t_{1/2}/h$	$AUC_{0-t}/(ng\cdot h/mL)$	MRT_{0-t}/h
尾静脉注射液组	5	HupA	0.50 ± 0.00	196.46 ± 35.75	4.37 ± 0.94	673.83 ± 117.09	5.02 ± 1.02
	5	Lut	0.50 ± 0.00	363.69 ± 50.21	5.01 ± 1.30	$1\,108.21\pm 79.34$	4.36 ± 0.81
HupA-Lut-LCLCNs-ISG 鼻腔给药组	5	HupA	0.50 ± 0.00	$408.74\pm 11.30^{1)}$	5.38 ± 1.01	$1\,418.19\pm 137.06^{1)}$	5.30 ± 0.90
	5	Lut	0.50 ± 0.00	$488.26\pm 9.36^{1)}$	5.84 ± 1.47	$1\,653.96\pm 216.26^{1)}$	5.70 ± 1.60

注：与尾静脉注射液组比较，1) $P<0.05$ ；鉴于静脉注射不存在吸收过程，静脉注射组与鼻腔给药组的 $t_{\max}$ 未进行统计学比较。

表 3 HupA-Lut-LCLCNs-ISG 鼻腔给药组的脑靶向性评价 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	药物	$AUC_{0-t}/(血浆)/$ $(ng\cdot h/mL)$	$AUC_{0-t}/(脑组织)/$ $(ng\cdot h/mL)$	DTE/%	DTP/%	F/%
尾静脉注射液组	5	HupA	$1\,181.34\pm 67.74$	673.83 ± 117.09	100.00 ± 0.00	—	—
	5	Lut	$1\,557.19\pm 103.78$	$1\,108.21\pm 79.34$	100.00 ± 0.00	—	—
HupA-Lut-LCLCNs-ISG 鼻腔给药组	5	HupA	$1\,115.52\pm 116.84$	$1\,418.19\pm 137.06$	229.87 ± 49.05	54.94 ± 9.28	94.43
	5	Lut	$1\,271.78\pm 85.33$	$1\,653.96\pm 216.26$	$182.55\pm 17.98^{1)}$	44.75 ± 6.04	81.67

4.2 样品前处理方式的选择 由于生物样品组成复杂，且药物含量低，样品中的基质、内源性物质及代谢产物等均会影响药物测定。为提高生物样品中药物提取率，减少基质干扰，本研究在前期预实验中，系统考察了有机溶剂萃取法、蛋白沉淀法、酸化-蛋白沉淀法和蛋白沉淀与有机溶剂萃取结合法对大鼠血浆及脑组织样本的处理效能。结果显示，采用有机溶剂萃取法和酸化-蛋白沉淀法处理生物样品，其各项方法学验证指标均能达到 85%~115% 的合格要求。考虑到有机溶剂萃取法较酸化-蛋白

沉淀法操作步骤简便,且能满足大鼠血浆和脑组织含量测定要求,因此选择有机溶剂萃取法,以乙酸乙酯为萃取溶剂进行血浆和脑组织样品的前处理。该方法处理后样品杂质少,大大降低了对待测成分的干扰,且符合生物样品定量分析方法验证要求。

4.3 药动学和脑靶向性评价 HupA-Lut-LCLCNs-*ISG* 给药系统结合了 LCLCNs 良好的透膜性和 *ISG* 良好的生物黏附性,有效延长了药物在鼻腔黏膜的滞留时间,从而显著提高了药物的全身生物利用度及脑靶向递送效率。在靶向性评价中,通常以鼻腔给药和静脉给药的脑/血浆暴露量比值($AUC_{\text{脑组织}}/AUC_{\text{血浆}}$)为基准来判断^[21]。DTE 是评价制剂脑靶向性的参数。DTE > 100% 提示制剂具有一定的脑靶向优势。本研究中, HupA-Lut-LCLCNs-*ISG* 鼻腔给药组 HupA 和 Lut 的 DTE 分别为 229.87% 和 182.55%,提示药物除经体循环跨越血脑屏障进入脑组织外,还可经鼻-脑通路直接进入脑组织,表现出较好的脑靶向性。DTP 用于评价药物经鼻-脑通路直接转运至脑组织的比例。本研究中, HupA 和 Lut 的 DTP 分别为 54.94% 和 44.75%,提示经鼻腔给药后,约 54.94% 的 HupA 和 44.75% 的 Lut 可能通过鼻-脑通路直接转运至脑组织。

综上所述,本实验结果表明 HupA-Lut-LCLCNs-*ISG* 经大鼠鼻腔给药具有较高的生物利用度,且可显著提高药物的脑靶向性。本研究尚未设置口服给药组,后续可增加口服给药对照组,从药动学及脑靶向性角度进一步评价 HupA-Lut-LCLCNs-*ISG* 鼻腔给药的应用优势。

参考文献

- [1] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. *IJN*, 2019, 14: 5541-5554.
- [2] ATHAR T, AL BALUSHI K, KHAN S A. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(7): 5629-5645.
- [3] PRADEEP S, JAIN A S, DHARMASHEKARA C, et al. Alzheimer's disease and herbal combination therapy: a comprehensive review [J]. *J Alzheimers Dis Rep*, 2020, 4(1): 417-429.
- [4] 陈建立. 抗痴呆药的临床评价与联合用药优势的研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2017, 17(7): 1006-1008.
- [5] YANG X, WEI H M, HU G Y, et al. Combining antioxidant astaxanthin and cholinesterase inhibitor huperzine A boosts neuroprotection [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1043-1050.
- [6] 叶茂盛, 潘锋, 蒋蓝英, 等. 姜黄素联合多奈哌齐治疗老年性痴呆患者疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017(12): 1052-1054.
- [7] 李琳, 杜岩. 中药有效成分石杉碱甲治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 实用老年医学, 2017, 31(7): 613-616.
- [8] 黄雪萍, 邵碧云, 黄泓, 等. 石杉碱甲对乙酰胆碱酯酶活性选择性抑制作用及促智作用[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2006, 3(2): 89-91.
- [9] 伊金月, 张智博, 姚远, 等. 木犀草素对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞氧化应激及 Tau 蛋白磷酸化的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(2): 22-25.
- [10] ZHANG J X, XING J G, WANG L L, et al. Luteolin inhibits fibrillary β -Amyloid₁₋₄₀-induced inflammation in a human blood-brain barrier model by suppressing the p38 MAPK-mediated NF- κ B signaling pathways [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 334.
- [11] 张永亮, 陈海龙, 王婷梅, 等. 木犀草素对东莨菪碱所致大鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(2): 33-37, 49.
- [12] KOU J J, SHI J Z, HE Y Y, et al. Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(4): 840-849.
- [13] BADIE H, ABBAS H. Novel small self-assembled resveratrol-bearing cubosomes and hexosomes: preparation, characterization, and *ex vivo* permeation [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 44(12): 2013-2025.
- [14] LI J C, ZHU N, ZHU J X, et al. Self-assembled cubic liquid crystalline nanoparticles for transdermal delivery of paeonol [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3298-3310.
- [15] 龙友琦, 王兰, 尚京川, 等. 木犀草素及其磺丁基醚- β -环糊精包合物在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(2): 282-287.
- [16] 涂亮星, 杨如月, 刘佳丽, 等. 不同剂量木犀草素在大鼠体内药动学的比较[J]. 中成药, 2022, 44(12): 3753-3757.
- [17] SHERRY CHOW H H, CHEN Z, MATSUURA G T. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats [J]. *J Pharm Sci*, 1999, 88(8): 754-758.
- [18] ZHANG Q Z, JIANG X G, JIANG W M, et al. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain [J]. *Int J Pharm*, 2004, 275(1/2): 85-96.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466-471.
- [20] CHOU K J, DONOVAN M D. Lidocaine distribution into the CNS following nasal and arterial delivery: a comparison of local sampling and microdialysis techniques [J]. *Int J Pharm*, 1998, 171(1): 53-61.
- [21] 刘建春, 杨婉芳, 季新燕, 等. 中药鼻腔给药的脑靶向性探讨[J]. 中医杂志, 2014, 55(15): 1284-1287.