

## 鞣花酸纳米混悬剂的制备、表征及其体内药动学研究

秦芳芳<sup>1</sup>, 彭有梅<sup>2</sup>, 苏海波<sup>3\*</sup>, 高守甲<sup>3</sup>

1. 郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007

2. 河南省医药科学研究所, 河南 郑州 450052

3. 上海雷允上有限公司技术中心, 上海 201401

**摘要:** 目的 制备鞣花酸纳米混悬剂 (ellagic acid nanosuspensions, EA-NPs), 并考察在 SD 大鼠体内的药动学特征。方法 采用高压均质法制备 EA-NPs。在单因素实验基础上, 以稳定剂与药物用量比例、均质压力、均质次数为主要影响因素, 粒径和分散系数 (polydispersity index, PDI) 为考察指标, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 EA-NPs 制备工艺。采用透射电子显微镜 (TEM) 和 X 射线粉末衍射 (XRPD) 对 EA-NPs 进行表征, 透析袋法考察体外释药情况。SD 大鼠分别 ig 给予鞣花酸混悬液、物理混合物 (比例同 EA-NPs) 和 EA-NPs, HPLC 法测定大鼠血浆中的鞣花酸质量浓度, 并计算主要药动学参数。结果 EA-NPs 的最优工艺: 以磷脂-聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP) K30 (2:3) 为稳定剂, 稳定剂与药物比例 4:1, 制备温度为 25 °C, 均质压力 73 MPa, 均质次数为 11 次。EA-NPs 呈球形或类球形, 粒径为 70~400 nm, 平均粒径为 (148.16±7.61) nm, PDI 为 0.089±0.014, ζ 电位为 (-29.64±1.82) mV。鞣花酸在 EA-NPs 中以无定形状态存在, 6 h 内药物的累积释放率为 96.24%。药动学结果显示, EA-NPs 的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 延长至 (3.17±0.64) h, 达峰浓度 ( $C_{max}$ ) 提高至 (1 172.04±182.51) ng/mL, 相对口服生物利用度提高至 5.61 倍。结论 EA-NPs 可促进药物体外溶出, 提高鞣花酸在大鼠体内的口服生物利用度。

**关键词:** 鞣花酸; 纳米混悬剂; Box-Behnken 设计-效应面法; 表征; 溶出; 药动学; 高压均质法; 生物利用度

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)13-3980-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.011

## Preparation, characterization and *in vivo* pharmacokinetics of ellagic acid nanosuspensions

QIN Fang-fang<sup>1</sup>, PENG You-mei<sup>2</sup>, SU Hai-bo<sup>3</sup>, GAO Shou-jia<sup>3</sup>

1. Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China

2. Henan Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, China

3. Technical Center, Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China

**Abstract: Objective** To prepare ellagic acid nanosuspensions (EA-NPs) and study pharmacokinetics characteristics in SD rats.

**Methods** EA-NPs were prepared by high pressure homogenization method. Based on single factor experiments, ratio of stabilizer to drug, homogenization pressure and homogenization frequency were used as influencing factors, average particles size and polydispersion index (PDI) were employed as evaluation indexes, the formulation of EA-NPs was optimized by Box-Behnken design-response surface method. EA-NPs was characterized by transmission electron microscopy (TEM) and X-ray powder diffraction (XRPD). Dialysis bag method was employed to investigate the drug release *in vitro*. SD rats in each group were administered intragastrically with ellagic acid suspension, physical mixture (the proportion of excipients were consistent with EA-NPs) and EA-NPs group, respectively. Ellagic acid concentration in plasma was analyzed by HPLC and the main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The optimal preparation of EA-NPs: phospholipids-PVP K30 (2:3) was employed as stabilizer, the ratio of stabilizer to drug was 4:1, preparation temperature was 25°C, homogenization pressure was 73 MPa and homogenization frequencies was 11 times. The shape of EA-NPs was spherical or elliptical. Particle size distributed

收稿日期: 2022-01-17

基金项目: 河南省科技公关项目 (202102310159); 上海市科委项目 (21S21903400)

作者简介: 秦芳芳 (1985—), 女, 硕士, 从事医院药学研究。Tel: (0371)68520039 E-mail: qinfangfang2022@126.com

\*通信作者: 苏海波 (1984—), 男, 硕士, 从事药物临床及药理研发工作。Tel: (021)37565578 E-mail: subh@shlys.com

between 70 nm and 400 nm. Average particle size, PDI and  $\zeta$  potential of EA-NPs were  $(148.16 \pm 7.61)$  nm,  $0.089 \pm 0.014$  and  $(-29.64 \pm 1.82)$  mV, respectively. Ellagic acid existed in an amorphous state in EA-NPs, and the cumulative dissolution of drug was 96.24% in 6 h. The  $t_{1/2}$  of EA-NPs was prolonged to  $(3.17 \pm 0.64)$  h,  $C_{max}$  was increased to  $(1\ 172.04 \pm 182.51)$  ng/mL and the oral bioavailability was enhanced to 5.61 times. **Conclusion** EA-NPs could enhance cumulative dissolution of EA *in vitro* and improve oral bioavailability *in vivo*.

**Key words:** ellagic acid; nanosuspensions; Box-Behnken design-response surface method; characterization; dissolution; pharmacokinetics; high pressure homogenization method; oral bioavailability

鞣花酸是没食子酸的二聚衍生物,是一种多酚二内酯,广泛存在于石榴、草莓和五倍子等植物中<sup>[1]</sup>,在石榴皮中含量较高。研究显示<sup>[2-5]</sup>,鞣花酸具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、消炎、抗过敏、抗纤维化、调节雌激素分泌等药理活性。鞣花酸在水中溶解度仅为  $9.81\ \mu\text{g/mL}$ <sup>[6]</sup>,溶出度低,且药物本身渗透性差<sup>[7]</sup>,导致口服吸收生物利用度较低,不利于药效的发挥及临床应用。目前有研究者将其制成磷脂复合物<sup>[6]</sup>及固体分散体等<sup>[8]</sup>,但存在稳定性差的问题,生物利用度提高幅度有限。鞣花酸多聚物纳米粒<sup>[9]</sup>及纳米结构脂质载体<sup>[10]</sup>等纳米制剂存在制备工艺复杂、载药量较低等问题。Wang 等<sup>[11]</sup>对鞣花酸纳米微乳进行了研究,但处方中用到大量的表面活性剂,具有溶血风险,存在一定的安全隐患。因此,有必要开发一种制备工艺简单、载药量高的鞣花酸制剂。

纳米混悬剂(nanosuspensions, NPs)是难溶性药物与稳定剂[如磷脂、聚乙烯吡咯烷酮(PVP) K30、泊洛沙姆 188 等]通过某种制剂技术而得到的一种胶体分散体系<sup>[12-15]</sup>。该纳米制剂具有制备工艺简单、载药量高等优势。有效解决了药物溶解度及溶出度问题,可用于口服、静注、肺部、经皮和眼部等多种给药途径<sup>[16]</sup>,因此,NPs 技术备受国内外学者的广泛关注。美国 FDA 已批准的雅培制药的非诺贝特片、强生公司的棕榈酸帕利哌酮注射液等均采用了 NPs 技术,并成功实现上市。本研究采用反溶剂法联合高压均质法制备鞣花酸纳米混悬剂(ellagic acid nanosuspensions, EA-NPs),在单因素考察的基础上,采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化处方工艺,并进行表征。进一步考察口服药动学情况,为鞣花酸制剂新技术研究提供参考,也为后续研究奠定基础。

## 1 仪器、试剂及动物

FA1004B 型电子天平,上海精密仪器仪表有限公司;Agilent 1100 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Master-sizer 型粒度分析仪,英国马尔文仪器

有限公司;SJIA-S 型实验型冻干机,宁波市双嘉仪器有限公司;CL-200 系列加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器公司;Talos F200X S/TEM 型透射电子显微镜(TEM),北京欧波同光学技术有限公司;AH22 高压均质机,杭州纳均仪器有限公司;TMX-22R 型高速离心机,Beckman 公司;MD200-1/2 型氮吹仪,上海叶拓科技有限公司。

鞣花酸对照品,批号 P191020,质量分数为 99.2%,上海源叶生物科技有限公司;鞣花酸原料药,批号 20190428,质量分数为 97%,湖北弘景化工有限公司;大豆磷脂,批号 201208,上海辅必成医药科技有限公司;HMPC E50,批号 20211015,山东特耐斯化工有限公司;PVP K30,批号 E251529,东营市鸿亚化工有限公司;乳糖,批号 20190522,江苏道宁药业有限公司;甘露醇,批号 20200715,嘉兴南箭生物材料有限责任公司。

SD 大鼠购自河南省动物实验中心,许可证号 SCXK(豫)2016-0001,级别为清洁级,雌雄兼用,实验室饲养至体质量为  $(240 \pm 20)$  g 进行药动学研究。所有动物实验遵循郑州大学附属郑州中心医院有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

## 2 方法与结果

### 2.1 EA-NPs 的制备<sup>[13]</sup>

采用反溶剂法联合高压均质法制备 EA-NPs。称取 50 mg 的鞣花酸原料药,加入 5 mL 无水乙醇,超声 2 min 使溶解。取一定量的稳定剂加入到 50 mL 蒸馏水中溶解,在一定温度下,磁力搅拌溶解(转速为 1000 r/min),构成水相。将含有鞣花酸的乙醇溶液缓慢滴加到水相中,滴毕后减压旋蒸除去有机溶剂。在一定均质压力下循环数次,并补加蒸馏水至原体积,经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得 EA-NPs 混悬液。

### 2.2 鞣花酸的含量测定

**2.2.1 EA-NPs 供试品溶液的配制** 取 1 mL 的 EA-NPs 置于 50 mL 量瓶中,加适量甲醇超声溶解,放置 20 min 后定容。取适量  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,

精密吸取滤液 2 mL 置于 10 mL 量瓶中，流动相定容，摇匀即得 EA-NPs 供试品溶液。

**2.2.2 对照品溶液的配制** 精密称取 10 mg 鞣花酸对照品，置于 10 mL 量瓶中，加入一定量的甲醇超声溶解，并定容至刻度，即得 1.0 mg/mL 的鞣花酸对照品储备液，密封备用。

**2.2.3 色谱条件** 色谱柱为 WondaSil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；柱温为 30 °C；流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液 (40:60)；检测波长 254 nm；体积流量为 1.0 mL/min；理论塔板数按鞣花酸峰计不低于 8500。取空白样品溶液 (空白辅料配制，比例同 EA-NPs)、鞣花酸对照品溶液和供试品溶液进样，色谱图见图 1，可见该色谱条件下专属性较高，可用于鞣花酸含量测定。

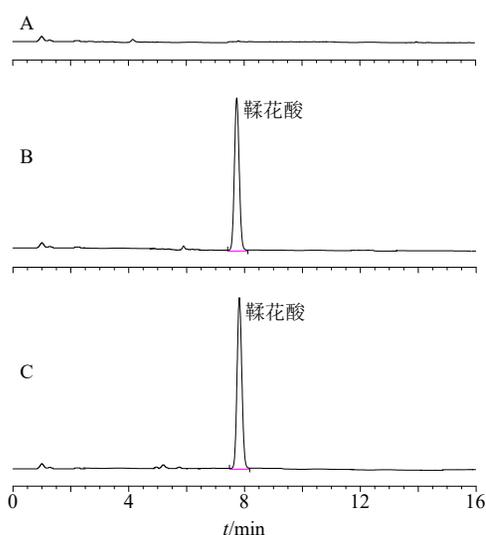


图 1 空白溶剂 (A)、鞣花酸对照品 (B) 和 EA-NPs 样品 (C) 的 HPLC 图

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

**2.2.4 线性关系考察** 取鞣花酸对照品溶液适量，流动相依次稀释至质量浓度为 10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg/mL。在“2.2.3”项下色谱条件下进样测定，以鞣花酸峰面积为纵坐标 (Y)，鞣花酸质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，得线性回归方程  $Y=23.1559X-0.7592$ ， $r=0.9996$ ，结果表明鞣花酸在 0.05~10.00 μg/mL 线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 取高、中、低 (10.00、1.00、0.05 μg/mL) 3 个质量浓度的鞣花酸对照品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件下分别连续进样 6 次。测定结果显示，高、中、低质量浓度下鞣花酸峰面积 RSD 分别为 0.21%、0.73%、0.50%，结果表明仪器精密

度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.2.3”项下色谱条件进样，测得鞣花酸峰面积 RSD 为 1.56%，表明 EA-NPs 的供试品溶液在 24 h 稳定性良好。

**2.2.7 重复性试验** 按照“2.2.1”项下方法平行制备 6 份 EA-NPs 供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件下分别进样。测定结果显示，鞣花酸质量浓度的 RSD 为 1.72%，因此该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 取供试品溶液 9 份，每份均为 0.5 mL，分别加入鞣花酸对照品储备液 (质量浓度为 100 μg/mL) 3、5、7 mL，制备供试品溶液。在“2.2.3”项下色谱条件下进样测定鞣花酸含量并计算回收率。结果显示，鞣花酸的低、中、高组平均加样回收率为 100.72%，RSD 平均值为 1.17%，表明回收率较高。

### 2.3 EA-NPs 粒径、PDI 与 ζ 电位的测定

取适量 EA-NPs 混悬液适量，用蒸馏水按照 1:10 比例稀释，混匀后于粒径分析仪上测定 EA-NPs 的平均粒径、PDI 及 ζ 电位。

### 2.4 单因素实验

**2.4.1 稳定剂种类的筛选** 首先对稳定剂进行筛选，固定药物用量 50 mg，稳定剂与药物用量比例为 4:1，制备温度 35 °C，均质压力 70 MPa，均质次数 10 次，分别考察磷脂、PVP K30、HMPC E50、磷脂-PVP K30 (1:1) 作为稳定剂时对 EA-NPs 的平均粒径、PDI、ζ 电位的影响，结果见表 1。单独以 HMPC E50 为稳定剂时，所制备的 EA-NPs 的平均粒径及 PDI 均较大，ζ 电位绝对值较小。单独以磷脂为稳定剂时制得 EA-NPs 的 PDI 稍大，平均粒径有所下降。单独以 PVP K30 为稳定剂时，虽粒径稍大，但 PDI 小于 0.3。而将磷脂与 PVP K30 联用后 (用量比 1:1) 平均粒径及 PDI 均最小，且 ζ 电位绝对值最大，故选择将两者联用作为制备 EA-NPs 稳定剂。

表 1 稳定剂种类的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effects of stabilizer types ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

稳定剂种类	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
磷脂	279.15±13.21	0.302±0.017	-19.74±1.58
PVP K30	356.27±22.67	0.256±0.025	-21.43±1.79
HMPC E50	613.86±68.04	0.479±0.037	-15.93±1.06
磷脂-PVP K30 (1:1)	258.94±17.62	0.184±0.015	-27.26±1.94

**2.4.2 混合稳定剂磷脂/PVP K30 比例的筛选** 固定药物用量 50 mg, 稳定剂与药物用量比例为 4 : 1, 制备温度 35 °C, 均质压力 70 MPa, 均质次数 10 次, 分别考察混合稳定剂磷脂/PVP K30 比例分别为 3 : 1、3 : 2、1 : 1、2 : 3、1 : 3 时对 EA-NPs 的平均粒径、PDI、 $\zeta$  电位的影响, 结果见表 2。由此可知, 随着 PVP K30 用量比例的增加, EA-NPs 的平均粒径及 PDI 值呈先减小后增大趋势, 但  $\zeta$  电位绝对值无显著性差异。综合考虑 EA-NPs 的平均粒径、PDI 值及  $\zeta$  电位, 最终选择混合稳定剂磷脂/PVP K30 用量为 2 : 3 作为制备 EA-NPs 稳定剂。

表 2 稳定剂磷脂/PVP K30 比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of phospholipids to PVP K30 ratio ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

磷脂与 PVP K30 比例	平均粒径/nm	PDI	$\zeta$ 电位/mV
3 : 1	272.61 ± 14.08	0.267 ± 0.031	-26.94 ± 1.67
3 : 2	249.84 ± 16.11	0.251 ± 0.028	-28.43 ± 1.69
1 : 1	263.14 ± 13.94	0.193 ± 0.024	-27.31 ± 1.44
2 : 3	252.37 ± 15.98	0.174 ± 0.027	-26.08 ± 1.58
1 : 3	312.08 ± 17.17	0.291 ± 0.021	-27.44 ± 1.39

**2.4.3 稳定剂与药物用量比例的筛选** 固定药物用量 50 mg, 稳定剂磷脂/PVP K30 (比例为 2 : 3), 制备温度 35 °C, 均质压力 70 MPa, 均质次数 10 次, 分别考察稳定剂与药物用量比例分别为 3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1 时, 对 EA-NPs 的平均粒径、PDI 及  $\zeta$  电位的影响, 结果见表 3。当稳定剂用量不足时, 稳定效果差, 导致 EA-NPs 平均粒径和 PDI 值均较大, 且  $\zeta$  电位值较低。随着稳定剂用量的增加, EA-NPs 的平均粒径及 PDI 值均呈先减小后增大趋势, 可能是由于稳定剂用量过多时附着在纳米粒表面, 从而使粒径增加, 且分布不均匀, 导致 PDI 值增加。可见稳定剂与药物用量比例对 EA-NPs 影响较大, 后续需要进一步优化。

表 3 稳定剂与药物用量比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of stabilizer to drug ratio ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

稳定剂与药物用量比例	平均粒径/nm	PDI	$\zeta$ 电位/mV
3 : 1	378.67 ± 23.10	0.349 ± 0.033	-19.38 ± 1.46
4 : 1	249.18 ± 18.63	0.187 ± 0.019	-28.17 ± 1.91
5 : 1	272.08 ± 15.24	0.241 ± 0.015	-25.43 ± 1.82
6 : 1	345.62 ± 17.91	0.318 ± 0.022	-29.54 ± 2.07

**2.4.4 制备温度的筛选** 固定药物用量 50 mg, 稳定剂与药物用量比例为 4 : 1, 稳定剂磷脂/PVP K30 (比例为 2 : 3), 均质压力 70 MPa, 均质次数 10 次, 分别考察制备温度为 15、25、35、45、55 °C 时对 EA-NPs 的平均粒径、PDI 和  $\zeta$  电位的影响, 结果见表 4。随着制备温度的升高, 制备的 EA-NPs 的平均粒径和 PDI 均呈增大趋势, 可能是由于温度越高, 纳米粒之间的相互碰撞并发生融合几率越大, 进而对平均粒径和 PDI 值产生影响。由于 15 °C 和 25 °C 条件下制备的 EA-NPs 的平均粒径和 PDI 差别不大, 且温度为 25 °C 时  $\zeta$  电位绝对值相对较高, 考虑到制备的便利性, 故选取制备温度为 25 °C。

表 4 制备温度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of preparation temperature ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

制备温度/°C	平均粒径/nm	PDI	$\zeta$ 电位/mV
15	187.08 ± 11.27	0.169 ± 0.012	-28.36 ± 1.99
25	193.34 ± 14.62	0.153 ± 0.017	-31.40 ± 2.06
35	258.54 ± 18.17	0.185 ± 0.015	-24.91 ± 1.43
45	354.19 ± 20.08	0.259 ± 0.020	-27.22 ± 1.70
55	431.81 ± 31.65	0.387 ± 0.026	-25.74 ± 1.67

**2.4.5 均质压力的筛选** 固定药物用量 50 mg, 稳定剂与药物用量比例为 4 : 1, 稳定剂磷脂/PVP K30 (比例为 2 : 3), 制备温度 25 °C, 均质次数 10 次, 分别考察均质压力为 40、70、100、130 MPa 时对 EA-NPs 的平均粒径、PDI 及  $\zeta$  电位的影响, 结果见表 5。随着均质压力的逐渐增加 EA-NPs 的平均粒径和 PDI 值均呈先减小后增大趋势, 可能是均质压力过高时体系温度急剧上升, 此时的 EA-NPs 在高温下可能具有一定的可变性, 纳米粒子相互碰撞后容易发生融合、聚集, 从而影响了平均粒径及 PDI 值。但均质压力不足时, EA-NPs 的平均粒径和 PDI 值相对较大, 且  $\zeta$  电位绝对值相对较低, 稳定性差。因此, 均质压力对 EA-NPs 各个指标影响较大, 后续有必要进一步优化。

**2.4.6 均质次数的筛选** 固定药物用量 50 mg, 稳

表 5 均质压力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of homogenization pressure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均质压力/MPa	平均粒径/nm	PDI	$\zeta$ 电位/mV
40	313.53 ± 23.15	0.382 ± 0.034	-21.39 ± 1.59
70	175.42 ± 15.07	0.168 ± 0.013	-28.17 ± 1.26
100	197.92 ± 16.28	0.191 ± 0.019	-25.08 ± 2.01
130	267.17 ± 20.19	0.253 ± 0.015	-27.64 ± 1.93

定剂与药物用量比例为 4 : 1, 稳定剂磷脂/PVP K30 (比例为 2 : 3), 制备温度 25 °C, 均质压力 70 MPa, 分别考察均质次数为 5、10、15、20 时对 EA-NPs 的平均粒径、PDI 及 ζ 电位的影响, 结果见表 6。适当增加均质次数有利于 EA-NPs 的平均粒径及 PDI 减小, 但均质次数达到 15 次时, 平均粒径及 PDI 反而稍有增大, 这可能是由于频繁的均质导致 EA-NPs 之间融合、聚集所致。可见均质次数过少或过大均会对 EA-NPs 产生影响, 后续需要进一步优化。

表 6 均质次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of homogenization times ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均质次数	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
5	231.88±26.14	0.204±0.21	-25.36±2.14
10	169.64±20.06	0.161±0.17	-29.61±1.96
15	221.18±18.25	0.189±0.19	-26.27±1.56
20	354.94±28.07	0.241±0.23	-28.84±1.80

## 2.5 Box-Behnken 效应面法优化制备工艺

**2.5.1 Box-Behnken 试验设计** 对 NPs 来讲, 粒径大小对药物的生物利用度、药效等影响较大<sup>[12]</sup>, 并且期望获得的纳米制剂粒径分布较为集中, 因此选择 EA-NPs 的平均粒径 ( $Y_1$ ) 和 PDI 值 ( $Y_2$ ) 作为评价指标。根据 EA-NPs 的单因素试验结果, 发现稳定剂与药物用量比 ( $X_1$ )、均质压力 ( $X_2$ ) 和均质次数 ( $X_3$ ) 对 EA-NPs 的平均粒径和 PDI 值影响较大, 故作为主要影响因素, 并参考单因素考察结果确定各因素继续优化的水平见表 7。按照 Box-Behnken 效应面法给出的实验方案, 分别制备不同处方工艺下的 EA-NPs 混悬液, 并记录粒径和 PDI 值, 结果见表 7。

**2.5.2 二次多元回归模型的建立及显著性分析** 利用 Box-Behnken 软件(版本为 Design Expert V8.0.6)对 17 组的试验结果进行拟合, 得到粒径  $Y_1$  的 2 次多元回归方程为  $Y_1 = 152.72 + 6.80 X_1 + 14.82 X_2 + 11.86 X_3 - 2.96 X_1 X_2 - 2.72 X_1 X_3 - 1.81 X_2 X_3 + 5.87 X_1^2 + 13.56 X_2^2 + 14.69 X_3^2$ ,  $R^2 = 0.994 5$ , 模型  $P < 0.000 1$ ;  $Y_2 = 0.110 + 0.019 X_1 + 0.028 X_2 + 0.023 X_3 + 2.813 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 4.938 \times 10^{-3} X_1 X_3 + 2.5 \times 10^{-3} X_2 X_3 + 0.011 X_1^2 + 0.11 X_2^2 + 0.20 X_3^2$ ,  $R^2 = 0.993 5$ , 模型  $P < 0.000 1$ 。从 2 种数学模型的  $P$  值和  $R^2$  可以看出, 建立的模型均具有极显著性水平, 拟合度良好, 试验误差小, 失拟度均  $> 0.05$ , 说明未知因素

表 7 Box-Behnken 试验设计结果

Table 7 Experiments results of Box-Behnken

试验号	$X_1$	$X_2$ /MPa	$X_3$ /次	$Y_1$ /nm	$Y_2$
1	3.0 (-1)	70 (0)	15 (+1)	210.6	0.172
2	4.5 (0)	70 (0)	10 (0)	150.6	0.093
3	3.0 (-1)	100 (+1)	10 (0)	220.3	0.196
4	3.0 (-1)	40 (-1)	10 (0)	230.9	0.216
5	4.5 (0)	70 (0)	10 (0)	147.2	0.082
6	4.5 (0)	100 (+1)	15 (+1)	210.2	0.173
7	4.5 (0)	40 (-1)	15 (+1)	250.7	0.144
8	4.5 (0)	70 (0)	10 (0)	140.9	0.091
9	3.0 (-1)	70 (0)	5 (-1)	235.9	0.297
10	4.5 (0)	40 (-1)	5 (-1)	293.1	0.272
11	4.5 (0)	100 (+1)	5 (-1)	281.5	0.261
12	6.0 (+1)	70 (0)	5 (-1)	267.4	0.218
13	4.5 (0)	70 (0)	10 (0)	144.4	0.091
14	6.0 (+1)	70 (0)	15 (+1)	198.6	0.172
15	6.0 (+1)	100 (+1)	10 (0)	192.7	0.164
16	4.5 (0)	70 (0)	10 (0)	146.3	0.094
17	6.0 (+1)	40 (-1)	10 (0)	250.6	0.139

干扰可忽略不计, 因此可用该模型对 EA-NPs 的处方工艺进行优化和预测。方差分析结果见表 8, 对于  $Y_1$  模型来说  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  是显著或极显著项。对于  $Y_2$  模型来说  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  是显著或极显著项。

**2.5.3 响应面分析、优化与预测** 分别固定稳定剂与药物用量比例 ( $X_1$ )、均质压力 ( $X_2$ )、均质次数 ( $X_3$ ) 中因素之一, 绘制其他 2 个因素对粒径 ( $Y_1$ ) 及 PDI 值 ( $Y_2$ ) 的三维曲面图, 结果见图 2, 可见两两因素对 EA-NPs 评价指标影响较为复杂, 说明采用 Box-Behnken 效应面法优化 EA-NPs 处方工艺的必要性。

设置粒径最小值为 50 nm, 最大值为 300 nm, PDI 最小值为 0.05, 最大值为 0.3, 得到 EA-NPs 的最佳处方为稳定剂与药物比例为 4.06 : 1, 均质压力 72.76 MPa、均质次数为 11.21 次, 在此条件下平均粒径及 PDI 值的预测值分别为 142.71 nm 和 0.082。考虑到实际操作的便捷性, 调整稳定剂与药物比例为 4 : 1, 均质压力 73 MPa, 均质次数为 11 次。

## 2.6 处方验证

根据 EA-NPs 最佳处方工艺平行制备 3 份 EA-NPs, 分别测定平均粒径及 PDI 值, 并分别与预测

表 8  $Y_1$  和  $Y_2$  方差分析结果  
Table 8 Variance analysis for  $Y_1$  and  $Y_2$

项目	自由度	$Y_1$				$Y_2$			
		平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	40 642.00	4 515.78	139.45	<0.000 1	0.073	$8.116 \times 10^{-3}$	118.96	<0.000 1
$X_1$	1	379.27	379.27	11.71	0.011 1	$2.869 \times 10^{-3}$	$2.869 \times 10^{-3}$	42.06	0.000 3
$X_2$	1	1 803.02	1 803.02	55.68	0.000 1	$6.583 \times 10^{-3}$	$6.583 \times 10^{-3}$	96.49	<0.000 1
$X_3$	1	1 154.37	1 154.37	35.65	0.000 6	$4.275 \times 10^{-3}$	$4.275 \times 10^{-3}$	62.66	<0.000 1
$X_1X_2$	1	559.32	559.32	17.27	0.004 3	$5.062 \times 10^{-4}$	$5.062 \times 10^{-4}$	7.42	0.029 6
$X_1X_3$	1	473.06	473.06	14.61	0.006 5	$1.560 \times 10^{-3}$	$1.560 \times 10^{-3}$	22.87	0.002 0
$X_2X_3$	1	208.80	208.80	6.45	0.038 7	$4.000 \times 10^{-4}$	$4.000 \times 10^{-4}$	5.86	0.046 0
$X_1^2$	1	2 324.77	2 324.77	71.79	<0.000 1	$8.679 \times 10^{-3}$	$8.679 \times 10^{-3}$	127.21	<0.000 1
$X_2^2$	1	12 390.70	12 390.70	382.64	<0.000 1	$7.840 \times 10^{-3}$	$7.840 \times 10^{-3}$	114.92	<0.000 1
$X_3^2$	1	14 531.66	14 531.66	448.76	<0.000 1	0.026	0.026	386.65	<0.000 1
残差	7	226.67	32.38			$4.776 \times 10^{-4}$	$6.822 \times 10^{-5}$		
失拟项	3	175.48	58.49	4.57	0.0881	$3.868 \times 10^{-4}$	$1.289 \times 10^{-4}$	5.68	0.063 3
绝对误差	4	51.19	12.80			$9.080 \times 10^{-5}$	$2.270 \times 10^{-5}$		
总和	16	40 868.68				0.074			

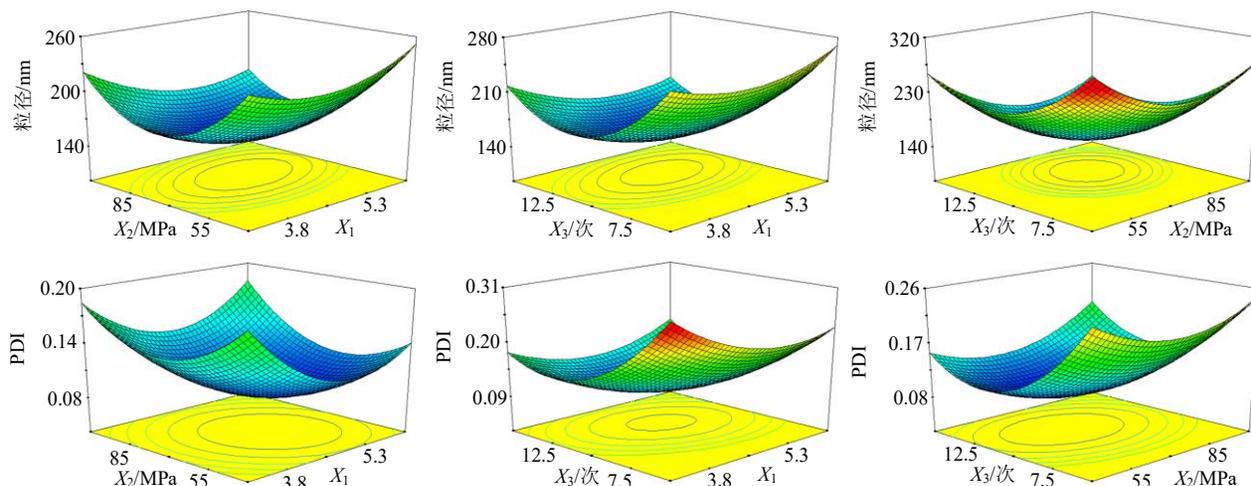


图 2 自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors and response values

值进行比较, 计算偏差 [偏差=(模型预测值-实际值)/模型预测值]。结果见表 9, 测得 EA-NPs 的平均粒径为  $(148.16 \pm 7.61)$  nm ( $n=3$ ), 粒径分布见图 3; 平均 PDI 值为  $0.089 \pm 0.014$  ( $n=3$ ), 实际值

表 9 实际值与模型预测值的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 9 Comparison of predicted values and measured values ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

评价指标	粒径/nm	PDI 值
实际值	$148.16 \pm 7.61$	$0.086 \pm 0.014$
模型预测值	142.71	0.082
偏差/%	-3.82	-4.88

与模型预测值的相对偏差均小于  $\pm 5\%$ , 说明采用 Box-Behnken 响应面法优化 EA-NPs 处方工艺时具有良好的预测性和重现性。另测得 EA-NPs 最佳处方下的  $\zeta$  电位为  $(-29.64 \pm 1.82)$  mV ( $n=3$ ),  $\zeta$  电位见图 4。

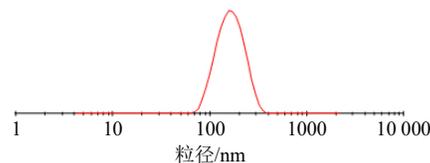


图 3 EA-NPs 的粒径分布图

Fig. 3 Particle size distribution of EA-NPs

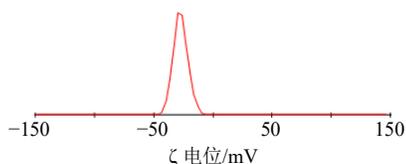


图4 EA-NPs的ζ电位

Fig. 4 ζ potential of EA-NPs

### 2.7 EA-NPs载药量测定及形态观察

**2.7.1 载药量的测定** 精密取 5 mL 制备好的 EA-NPs 混悬液, 不添加保护剂进行直接冻干, 精密称取冻干粉质量 ( $M_1$ )。向冻干粉中加入 50 mL 甲醇, 超声 10 min 使其完全溶解, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 精密量取 5 mL 置于 100 mL 量瓶中, 流动相定容, 进样测定鞣花酸含量 ( $M_2$ ), 计算 EA-NPs 的载药量 (载药量 =  $M_2/M_1$ )。结果显示, 3 批 EA-NPs 平均载药量为 (20.53 ± 1.17) %。

**2.7.2 形态观察** 取 0.1 mL 的 EA-NPs 混悬液样品, 用蒸馏水按照 1:30 比例稀释, 混匀后滴在铜网上, 采用 1.5% 磷钨酸钠进行染色, 自然晾干, 滤纸吸掉多余水分, 置于 TEM 下观察 EA-NPs 外貌形态, 结果见图 5。所得 EA-NPs 大体呈类球形或球形, 粒子之间无粘连。

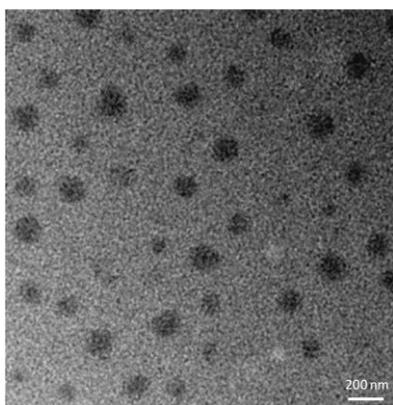


图5 EA-NPs的TEM图

Fig. 5 TEM photographs of EA-NPs

### 2.8 EA-NPs冻干粉的制备

取 EA-NPs 混悬液分成若干份, 每份 3 mL, 加入一定量的冻干保护剂 (乳糖、甘露醇及两者等量混合物), 混匀, 置于 -45 °C 超低温冰箱中 2 d。迅速置于 -30 °C 冷冻干燥机中冻干 1 d, 即得 EA-NPs 冻干粉。以冻干粉外观饱满度及复溶时间进行评价, 选出合适种类及用量的冻干保护剂。结果见表 10, 当 EA-NPs 冻干粉外观达饱满状态时, 由于乳糖-甘露醇 (等量混合物) 用量为 6% 时所需复溶时间最短, 故选之作为 EA-NPs 的冻干保护剂。EA-NPs

冻干前后的外观见图 6。取适量 EA-NPs 冻干粉, 蒸馏水复溶后粒径为 (173.93 ± 10.17) nm ( $n=3$ ), ζ 电位为 (-26.69 ± 1.71) mV ( $n=3$ )。

表 10 冻干保护剂种类及用量的考察 ( $n=3$ )

Table 10 Effect of types and dose for freeze-drying protectants ( $n=3$ )

编号	冻干保护剂种类及用量			考察项	
	乳糖/ %	甘露醇/ %	乳糖-甘露醇 (等量混合物) /%	外观	复溶时间/ s
1	4			塌陷	60~75
2	6			塌陷	75~85
3	8			饱满	>120
4		4		轻微塌陷	40~45
5		6		饱满	60~70
6		8		饱满	85~95
7			4	轻微塌陷	35~40
8			6	饱满	45~50
9			8	饱满	70~80



图6 EA-NPs混悬液及冻干粉外观

Fig. 6 Appearance of EA-NPs suspension and lyophilized powder

### 2.9 EA-NPs冻干粉晶型研究

采用 X 粉末射线衍射仪 (XRPD) 进行晶型分析。分别取鞣花酸原料药、空白辅料 (磷脂 + PVP K30)、物理混合物 (鞣花酸原料药 + 空白辅料, 比例同后者) 和 EA-NPs 冻干粉样品适量, 置于玻璃槽中, 玻璃片轻轻压制平整, 刮去多余样品, 置于 XRPD 下进行扫描。扫描条件: 管压 40kV, 铜靶, 扫描范围 3°~45°, 速度为 8°/min。结果见图 7, 鞣花酸原料药呈结晶状态, 与空白辅料简单混合后仍可观察到鞣花酸在 9.8°、12.1°、17.3°、27.6° 等处的衍射峰。而在 EA-NPs 冻干粉样品仅可观察到空白辅料的衍射峰, 说明鞣花酸在 EA-NPs 冻干粉存在状态发生了改变, 转变成无定型物质。

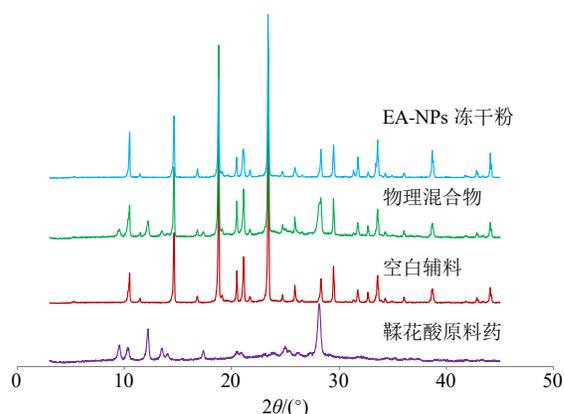


图7 XRPD结果  
Fig.7 Results of XRPD

### 2.10 体外释放及模型拟合

采用透析袋法进行考察。取鞣花酸原料药及EA-NPs冻干粉样品(以鞣花酸计含量均为20 mg),加入空白释药介质制成混悬液,分别转入活化透析袋中(截留相对分子质量8000~12000)中,两端扎紧,并固定于搅拌桨上。溶出介质为1000 mL 1.0% SDS水溶液,介质温度为(37.0±0.5)℃,转速为100 r/min,分别于0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、18.0、36.0 h取样2 mL,同时补足等温等量的空白释药介质。样品经0.45 μm微孔滤膜滤过,HPLC测定鞣花酸质量浓度,计算各取样点的累积释放率<sup>[17]</sup>,绘制释放度曲线,见图8。鞣花酸原料药在36 h内累积释放率仅为36.43%,可能是由于鞣花酸原料药颗粒较大,疏水性强等原因,导致药物溶出困难;而EA-NPs冻干粉在6 h累积释放度高达96.24%,基本释放完全,说明将鞣花酸制成EA-NPs能显著提高药物溶出速率及累积释放率,为提高生物利用度奠定基础。

### 2.11 体内药动学研究

2.11.1 给药方案及样品采集 取SD大鼠18只,随

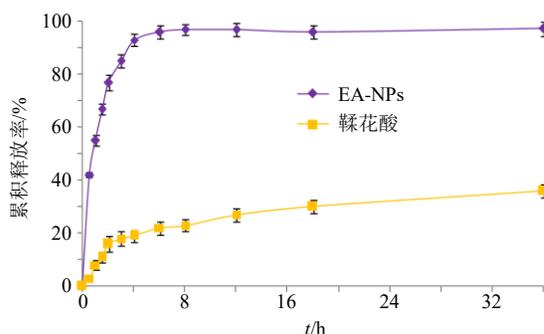


图8 EA-NPs和鞣花酸的体外药物释放曲线( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig.8 In vitro release profiles of EA-NPs and EA ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

机分成鞣花酸组、物理混合物组和EA-NPs组,每组6只,给药前空腹12 h,自由饮水。采用0.5% CMC-Na配制ig用样品,各组SD大鼠ig剂量均为80 mg/kg(以鞣花酸含量计)。鞣花酸组和物理混合物组给药后分别在0、0.167、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、5、8 h经眼眶后静脉取血0.2~0.3 mL,置肝素化的离心管中。EA-NPs组增加10、12 h取血点。血浆样品均经3000 r/min离心2 min(防止溶血现象),取上层血浆至空白离心管中,密封置冰箱冷冻层中。

2.11.2 血浆样品处理 血浆样品于室温中解冻,精密移取100 μL,加入1 mL有机溶剂(甲醇-乙腈1:1),涡旋5 min,6000 r/min离心(离心半径9.6 cm)5 min,沉淀蛋白。取上层澄清有机溶剂,采用40℃的氮气缓慢吹干,得残渣。再加入100 μL甲醇复溶,继续6000 r/min离心(离心半径9.6 cm)3 min,进HPLC测定。

2.11.3 血浆对照品的配制及线性关系考察 采用甲醇配制浓度为800 ng/mL的芍药苷对照品溶液,作为内标溶液。采用甲醇配制质量浓度为1500、1000、500、100、50、20 ng/mL的鞣花酸对照品溶液,各个质量浓度精密量取100 μL,并加入50 μL内标溶液,采用40℃的氮气缓慢吹干,得残渣,分别加入100 μL空白血浆,按“2.11.2”项下处理血浆样品。参考“2.2.3”项下色谱条件,将流动相调整为甲醇-0.1%甲酸溶液(38:62),其他条件不变,进样测定血浆样品,记录鞣花酸及内标的峰面积。以鞣花酸和内标峰面积比(Y)对鞣花酸质量浓度(X)进行线性回归,得血浆标准曲线方程 $Y=0.1918X+0.1142$ , $r=0.9935$ ,因此鞣花酸在20~1500 ng/mL线性关系良好。

2.11.4 方法学考察 空白血浆、血浆样品溶液(鞣花酸混悬液给药8 h)和鞣花酸+空白血浆(质量浓度为20 ng/mL),按照“2.11.2”项下方法处理,进样,结果见图9,血浆内源性物质不干扰鞣花酸血浆样品测定,专属性高。

取高、中、低(1500、500、20 ng/mL)3个质量浓度的血浆对照品溶液,同1 d连续进样6次,测定鞣花酸与内标峰面积,两者比值的RSD依次为4.56%、3.89%、6.27%,说明日内精密度良好;每天测定1次,连续测定6 d,测定鞣花酸与内标峰面积,两者比值的RSD依次为7.15%、5.35%、6.18%,说明日间精密度良好。取给药后鞣花酸原料药给药

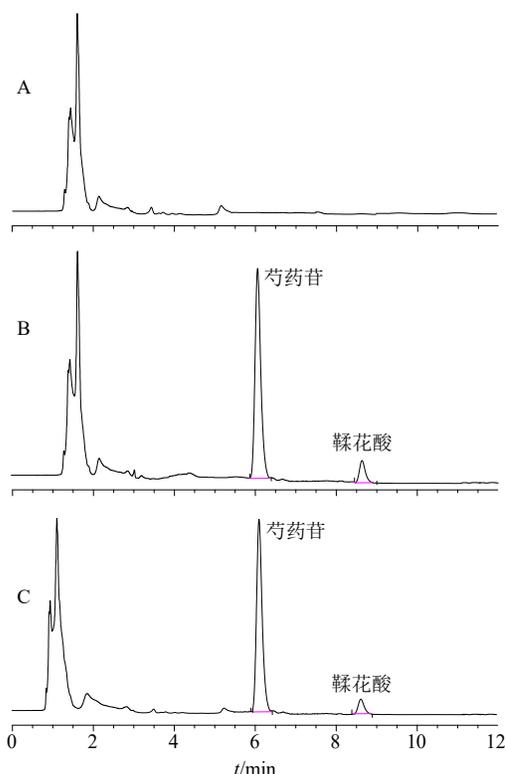


图 9 空白血浆 (A)、血浆样品 (B) 和鞣花酸+空白血浆 (C) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC of blank plasma (A), plasma sample (B), and ellagic acid + blank plasma (B)

1 h 血浆样品, 25 °C 下解冻后分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样测定, 测定鞣花酸与内标峰面积, 两者比值的 RSD 为 6.92%, 表明血浆样品在 24 h 内稳定性良好。取空白血浆, 分别配制高、中、低 (1500、500、20 ng/mL) 3 个质量浓度的样品溶液, 按“2.11.2”项下处理血浆样品, 进样测定, 并与实际质量浓度进行比较, 计算回收率。结果显示, 高、

中、低 3 个质量浓度下鞣花酸的回收率分别为 (95.16±0.79)%、(92.71±0.93)%、(93.29±0.77)%, RSD 值依次为 3.14%、4.62%、3.97%, 说明该方法回收率较高。

**2.11.5 药动力学结果** 取鞣花酸原料药、EA-NPs 冻干粉样品及物理混合物(药物与辅料比例同 EA-NPs 冻干粉)的血浆样品, 按照“2.11.2”项方法处理后进样测定, 绘制血药浓度-时间曲线, 结果见图 10。DAS 2.0 软件包拟合数据, 主要药动力学参数见表 11。由此可知, 鞣花酸原料药的  $t_{max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$  分别为 (1.14±0.29) h、(2.16±0.42) h、(337.16±67.28) ng/mL 和 (693.02±92.45) ng·h/mL, 物理混合物仅  $C_{max}$  有显著性变化, 可能是辅料有一定的促吸收作用所致。而 EA-NPs 组的  $t_{max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$  与鞣花酸原料药或物理混合物相比均具有极显著性差异 ( $P<0.01$ ),  $t_{max}$  提前至 (0.56±0.18) h,  $t_{1/2}$  延长至 (3.17±0.64) h, 相对生物利用度提高至 5.61 倍。物理混合物虽有一定程度提高, 但无显著性差异。

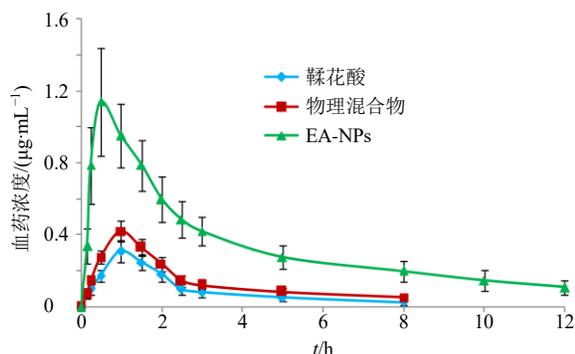


图 10 药-时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

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

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

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

参数	单位	鞣花酸	物理混合物	EA-NPs
$t_{max}$	h	1.14±0.29	1.01±0.32	0.56±0.18***
$t_{1/2}$	h	2.16±0.42	2.29±0.46	3.17±0.64***
$C_{max}$	ng·mL <sup>-1</sup>	337.16±67.28	424.89±78.16*	1 172.04±182.51***
$AUC_{0-t}$	ng·h·mL <sup>-1</sup>	693.02±92.45	842.81±104.71	3 889.43±697.05***
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL <sup>-1</sup>	731.84±112.37	893.07±112.23	4 149.23±787.16***

与鞣花酸比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与物理混合物比较: \*\*\* $P<0.01$   
\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs EA; \* $P<0.05$  \*\*\* $P<0.01$  vs physical mixture

### 3 讨论

将鞣花酸制备成 EA-NPs, 制备工艺简单, 辅料种类少, 载药量达到 (20.53±1.17) %。前期分

别对磷脂、PVP K30、HMPC E50 等进行了考察, 发现单独采用 HMPC E50 稳定剂时制备的 EA-NPs 的粒径及 PDI 值均较大, 这可能是因为 HMPC E50

不能稳定地吸附于纳米粒子表面,无法提供足够的空间阻力或电荷排斥作用,从而导致EA-NPs容易发生聚集。采用磷脂和PVP K30联合作为稳定剂时效果较好,这可能是由于磷脂作为一种两亲性离子表面活性剂,可有效降低表面张力,有利于形成较小粒径的EA-NPs,而且易于吸附在纳米混悬剂表面,提供一定量的电荷,从而使纳米粒子之间由于电荷斥力而有利于维持稳定状态。PVP K30相对分子质量较大,遇水溶解后可形成网状结构,进而为EA-NPs提供了巨大的空间阻力,发挥稳定剂作用。由于磷脂与PVP K30发挥稳定作用的机理不同,因而将两者联用后有利于形成较小粒径且稳定的EA-NPs。

由于EA-NPs后续会进一步制备成冻干粉,故Box-Behnken效应面法优化制备工艺时未将 $\zeta$ 电位纳入优化指标,以减少确定EA-NPs最优处方的干扰。EA-NPs直接冻干时不利于其结构稳定,加入冻干保护剂后可降低预冻及升华等过程对其结构的影响。良好的冻干粉制剂应满足<sup>[18]</sup>:①玻璃态存在,使纳米粒子免受冰晶破坏作用;②升华过程中不塌陷,外观饱满,致密。经考察发现,乳糖和甘露醇联合作为冻干保护剂时效果最佳。这可能是因为乳糖作为糖类保护剂,本身是一种无定型物质,可诱导玻璃态的形成,但单独使用时外观不佳。甘露醇本身支撑能力较强,容易获得饱满的外观,但甘露醇结晶容易破坏纳米粒子。因而将两者联用后可实现优势互补,制得的EA-NPs冻干粉外观饱满,复溶后粒径为 $(173.93 \pm 10.17)$  nm,复溶时间为45~50 s。

鞣花酸的口服给药剂量一般在30~200 mg/kg<sup>[7,9-10,17]</sup>,本研究鞣花酸的口服剂量为80 mg/kg。体内药动学研究表明,EA-NPs的 $t_{\max}$ 显著性提前,可能是由于EA-NPs加快了释药速率,进而影响了入血速度所致。其相对口服吸收生物利用度均显著高于鞣花酸及物理混合物,原因可能有以下几个方面:①药物纳米化后,粒径显著减小,比表面积增大,增加了与胃肠道接触面,利于鞣花酸透膜吸收<sup>[19-20]</sup>;②纳米级别的药物与肠道黏附性较强<sup>[21]</sup>,导致EA-NPs的 $t_{1/2}$ 延长,增加了滞留时间,间接促进了药物吸收;③鞣花酸在EA-NPs中转变为无定型物质<sup>[13,22]</sup>,且NPs增强了药物的透膜渗透性<sup>[16]</sup>,有利于药物吸收;④EA-NPs处方中磷脂<sup>[23-24]</sup>及PVP K30<sup>[25]</sup>本身具有一定的促吸收作用。目前本

研究完成了EA-NPs制剂学及口服药动学评价,接下来需继续进行注射药动学、药效学、毒理学评价等研究,为EA-NPs提供更为全面的研究资料,为鞣花酸新制剂研究开发提供有价值的参考。

**利益冲突**所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 李佳璇,赵姗姗,盛尊来. 田口法优化石榴皮中3种活性成分的提取工艺 [J]. 食品工业, 2021, 42(1): 174-178.
- [2] 张葵之,陈艳梅,张燕,等. 鞣花酸改善2型糖尿病小鼠脂肪组织胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(5): 544-547.
- [3] Ortiz-Ruiz C V, Berna J, Tudela J, et al. Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway [J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 82(2): 115-122.
- [4] 韩奇亨,张春红,龚雪,等. 鞣花酸类化合物在野牡丹科植物中的分布与药理活性研究 [J]. 中药材, 2018, 41(12): 2962-2967.
- [5] Neamatallah T, El-Shitany N, Abbas A, et al. Nano ellagic acid counteracts cisplatin-induced upregulation in OAT1 and OAT3: A possible nephroprotection mechanism [J]. *Molecules*, 2020, 25(13): 3031.
- [6] 施洋,孙芸,谢莉,等. 石榴皮中活性成分鞣花酸的平衡溶解度与油水分配系数的测定 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(2): 145-148.
- [7] 张留超,刘勇华. 鞣花酸磷脂复合物的制备及其口服生物利用度研究 [J]. 中成药, 2021, 43(7): 1685-1690.
- [8] 姚洁玉. 鞣花酸固体分散体对带鱼氧化和品质劣变的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [9] Mady F M, Shaker M A. Enhanced anticancer activity and oral bioavailability of ellagic acid through encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 7405-7417.
- [10] 王小霞,张智强. 鞣花酸纳米结构脂质载体处方优化和口服生物利用度研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3862-3871.
- [11] Wang S T, Chou C T, Su N W. A food-grade self-nanoemulsifying delivery system for enhancing oral bioavailability of ellagic acid [J]. *J Funct Foods*, 2017, 34: 207-215.
- [12] 杭凌宇,申宝德,沈成英,等. 不同粒径波棱甲素纳米混悬剂的制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 1898-1905.
- [13] 毛艳婷,陶兴茹,张胜男,等. 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. 中国医院药理学杂志, 2022, 42(4): 393-398.
- [14] 张亚林,喻海洋,黄涛. 大黄酮纳米混悬剂的制备及其

- 体内药动学研究 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2829-2834.
- [15] 毛艳婷, 马姝丽, 白朝辉, 等. 木犀草素纳米结构脂质载体及其冻干粉制备和体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(23): 2423-2429.
- [16] 申宝德, 沈成英, 徐玲霞, 等. 难溶性中药纳米混悬剂的体内外行为研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3828-3833.
- [17] 管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 951-961.
- [18] 陈蓓, 陈春燕, 高惠静, 等. 阿苯达唑纳米脂质体冻干粉的制备及性质考察 [J]. 中国药房, 2017, 28(7): 967-970.
- [19] 郜娜, 范明松, 杨庆宇, 等. 二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4060-4067.
- [20] 高彩芳, 夏加璇, 朱颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2754-2762.
- [21] 董丹丹, 焦红军, 郝海军, 等. 吴茱萸碱纳米结构脂质载体处方优化和 SD 大鼠体内口服药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 60-70.
- [22] Qiao H Z, Chen L H, Rui T Q, *et al.* Fabrication and in vitro/in vivo evaluation of amorphous andrographolide nanosuspensions stabilized by *d*- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate/sodium lauryl sulfate [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 1033-1046.
- [23] 马记平, 刘丹花, 郝海军, 等. 根皮素磷脂复合物的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2020, 42(6): 1577-1580.
- [24] 付金芳, 高青, 胡瑞瑞, 等. 蒙花苷磷脂复合物的制备及其药动学评价 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(16): 2039-2043.
- [25] 邓向涛, 郝海军, 陈晓峰, 等. 木犀草素 2 种固体分散体制备、表征和大鼠体内药动学行为研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5787-5793.

[责任编辑 郑礼胜]