

三叶苷-磷脂复合物/壳聚糖纳米粒的制备、口服药动学及对急性肝损伤保护作用评价

姚杰¹, 姬新颖¹, 王赞华¹, 张体鹏¹, 时艳华¹, 杜娟¹, 尚慧杰¹, 张付利^{1,2*}

1. 郑州健康学院, 河南 郑州 450064

2. 河南大学, 河南 开封 475001

摘要: **目的** 制备三叶苷-磷脂复合物/壳聚糖纳米粒(trifolin-phospholipids complex/chitosan nanoparticles, Tri-PC/CS-NPs), 考察 Tri-PC/CS-NPs 体内药动学行为及对急性肝损伤的保护作用。**方法** 采用溶剂挥发法制备三叶苷-磷脂复合物(trifolin-phospholipids complex, Tri-PC)。采用单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法(Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM)优化 Tri-PC/CS-NPs 处方工艺。采用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察 Tri-PC/CS-NPs 形貌, X 射线粉末衍射法(X-ray powder diffraction, XRPD)分析 Tri-PC/CS-NPs 晶型。比较三叶苷、Tri-PC、Tri-PC/CS-NPs 的饱和溶解度、油水分分配系数及其在模拟胃肠液中的释药行为。SD 大鼠分别 ig 给予三叶苷、Tri-PC、Tri-PC/CS-NPs, 测定血药浓度, 计算主要药动学参数。建立急性肝损伤大鼠模型, 比较三叶苷、Tri-PC、Tri-PC/CS-NPs 对急性肝损伤大鼠的保护作用。**结果** Tri-PC/CS-NPs 最佳处方: 水相体积为 20.50 mL, Tri-PC 与壳聚糖质量比为 4.15:1, 泊洛沙姆 188 质量分数为 0.10%。Tri-PC/CS-NPs 的包封率、载药量、粒径及 ζ 电位分别为 $(84.80 \pm 1.21)\%$ 、 $(15.56 \pm 0.10)\%$ 、 (197.74 ± 5.58) nm 和 (32.69 ± 1.14) mV。Tri-PC/CS-NPs 外貌为类球形。三叶苷在 Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 中均以无定形形态存在。Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 极显著性提高了三叶苷的饱和溶解度及油水分分配系数($P < 0.01$)。Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 在 18 h 内累积释放率分别为 56.68% 和 88.45%。Tri-PC/CS-NPs 的释药行为符合 Weibull 模型。以三叶苷为参考, Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 相对生物利用度分别增加至 2.41 倍和 5.36 倍。Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 有效增强了三叶苷对急性肝损伤大鼠的保护作用, 且 Tri-PC/CS-NPs 效果优于 Tri-PC。**结论** Tri-PC/CS-NPs 改变了三叶苷的体内药动学行为, 有效促进了三叶苷的体内吸收, 并增强了三叶苷对急性肝损伤的保护作用。

关键词: 三叶苷; 磷脂复合物; 壳聚糖; 纳米粒; Box-Behnken 设计-效应面法; 溶解度; 油水分分配系数; 生物利用度; 急性肝损伤

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)17-6730-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.007

Trifolin-phospholipids complex/chitosan nanoparticles: Preparation, oral pharmacokinetics *in vivo* and evaluation of protective effect on acute liver injury

YAO Jie¹, JI Xinying¹, WANG Yunhua¹, ZHANG Tipeng¹, SHI Yanhua¹, DU Juan¹, SHANG Huijie¹, ZHANG Fuli^{1,2}

1. Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

2. Henan University, Kaifeng 475001, China

Abstract: Objective To prepare trifolin-phospholipids complex/chitosan nanoparticles (Tri-PC/CS-NPs), and investigate its *in vivo* pharmacokinetic behavior and protective effect on acute liver injury. **Methods** Trifolin-phospholipids complex (Tri-PC) was prepared by solvent evaporation method. Single factor experiments combined Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) were used to optimize the prescriptions of Tri-PC/CS-NPs. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe microscopic appearance of Tri-PC/CS-NPs, X-ray powder diffraction (XRPD) was used to analyze crystal form of Tri-PC/CS-NPs. Saturated solubility, oil/water partition coefficient and drug release behavior in simulated gastrointestinal fluids of trifolin, Tri-PC and

收稿日期: 2026-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81670088); 2025 年度郑州市医疗卫生领域科技创新指导计划项目(2025-421)

作者简介: 姚杰(1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学及中医学。Tel: (0371)86176371 E-mail: haihai2008001@126.com

*通信作者: 张付利(1965—), 男, 学士, 副教授, 研究方向为药学。Tel: (0371)23832014 E-mail: ZhangFL@126.com

Tri-PC/CS-NPs were compared. SD rats were administered intragastrically with trifolin, Tri-PC and Tri-PC/CS-NPs, respectively. Blood drug concentration was determined, and the main pharmacokinetic parameters were calculated. The model of acute liver injury was established, and the protective effect of trifolin, Tri-PC, Tri-PC/CS-NPs on acute liver injury were compared. **Results** Optimal formulations of Tri-PC/CS-NPs: the volume of water phase was 20.50 mL, the mass ratio of Tri-PC to chitosan was 4.15:1, and the mass fraction of Poloxamer 188 was 0.10%. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(84.80 \pm 1.21)\%$, $(15.56 \pm 0.10)\%$, (197.74 ± 5.58) nm and (32.69 ± 1.14) mV, respectively. The appearance of Tri-PC/CS-NPs were spherical. The state of trifolin changed into amorphous form in Tri-PC and Tri-PC/CS-NPs. Tri-PC and Tri-PC/CS-NPs significantly enhanced the saturated solubility and oil/water partition coefficient of trifolin ($P < 0.01$). Cumulative release rate of Tri-PC and Tri-PC/CS-NPs were 56.68% and 88.45% in 18 h, respectively. The drug release process of Tri-PC/CS-NPs conformed to the Weibull model. Compared with trifolin, the relative bioavailability of Tri-PC and Tri-PC/CS-NPs was enhanced to 2.41-fold and 5.36-fold, respectively. Tri-PC and Tri-PC/CS-NPs effectively enhanced the protective effect of trifolin against acute liver injury, and the protective effect of Tri-PC/CS-NPs was superior to that of Tri-PC. **Conclusion** Tri-PC/CS-NPs changed the pharmacokinetic behavior of trifolin *in vivo*, effectively promoted the absorption of trifolin, and enhanced the protective effect of trifolin on acute liver injury.

Key words: trifolin; phospholipids complex; chitosan; nanoparticles; Box-Behnken design-response surface methodology; solubility; oil/water partition coefficient; bioavailability; acute liver injury

木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun 是壳斗科柯属常绿乔木, 其性平, 味甘, 归肝经, 属于药食同源中药, 用药历史可追溯到南北朝时期。木姜叶柯具有润肺、护肝、抗氧化、保护心脑血管、免疫调节等多种功效, 常用于辅助治疗高血压、高血脂、糖尿病等疾病^[1], 且已实现人工栽培, 来源稳定。三叶苷是木姜叶柯的主要成分, 具有调节糖脂代谢、抗炎、调血脂、改善肝损伤及脂肪肝等活性^[1-2], 在医药、食品、化妆品等领域展现出广泛的应用前景。课题组前期研究表明, 三叶苷在 pH 2.0~7.4 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 中的溶解度均小于 3.0 mg/mL^[3], 在 1.0% 醋酸溶液中的溶解度仅 0.52 mg/mL, 且脂溶性也较差, 在 pH 7.4 PBS 中的油水分配系数甚至为负值^[3], 限制了三叶苷的体内吸收, 其大鼠口服生物利用度不足 1%^[4], 导致三叶苷的各种药理活性不能充分发挥, 限制了其临床应用。口服制剂具有携带方便、顺应性高等优势, 促进生物药剂学分类系统 IV 类药物的口服吸收程度, 首先需解决其溶解度、溶出度及亲脂性等缺陷^[5]。目前仅见三叶苷磷脂复合物的研究报道^[3], 但磷脂复合物黏性大, 分散性差^[6], 可能影响其溶出度及生物利用度提高幅度。

自组装纳米粒 (self-assembled nanoparticles) 系指药物与高分子材料之间通过氢键、范德华力、静电引力等作用力, 自发聚集形成的一种纳米级别的胶体分散体系^[7-8], 具有制备条件温和、设备要求低、处方组成简单、工艺重复性良好等优势, 是纳米制剂的研究热点之一。磷脂分子结构包含 1 个亲水的头部和 1 个疏水的尾部, 具有两亲性, 其头部基团

含有磷酸根 (PO_4^{3-}), 质子化后导致磷脂表面携带一定量的负电荷。药物与磷脂形成磷脂复合物 (phospholipids complex) 后不影响磷酸根 (PO_4^{3-}) 的性质^[9], 所以磷脂复合物表面也携带负电荷。壳聚糖是一种携带正电荷的多糖, 因而磷脂 (或磷脂复合物) 可与壳聚糖通过静电引力自组装形成纳米粒^[10]。磷脂和壳聚糖生物相容性良好, 具有较高的使用安全性, 且价格相对低廉, 开发成本低。

本课题组前期对三叶苷-磷脂复合物 (trifolin-phospholipids complex, Tri-PC) 制备工艺、结合机制等进行了研究^[3], 本研究使用壳聚糖作为正电荷供给体, 通过自组装行为, 来制备三叶苷-磷脂复合物/壳聚糖纳米粒 (trifolin-phospholipids complex/chitosan nanoparticles, Tri-PC/CS-NPs), 并使用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 Tri-PC/CS-NPs 处方工艺。以三叶苷原料药为参考, 比较 Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 口服药动学行为及其对急性肝损伤的改善作用, 期望为三叶苷研究开发提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ESJ208 型电子分析天平, 沈阳龙腾电子有限公司; UA03 型超声仪, 北京维根技术有限公司; JEM-2100 透射电子显微镜, 日本电子株式会社; TG16-WS 型高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; JB-11 型磁力搅拌器, 上海仪电科学仪器有限公司; 1200 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; LGJ-12A 型真空冷冻干燥机, 北京四环起航科技有

限公司; Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪, 英国马尔文公司; DW-86L829BPT 型冰箱, 海尔生物医疗仪器设备有限公司; 3.5 kD 型超滤管, 截留相对分子质量 3 500, 美国 Millipore 公司; DS-806 型溶出仪, 深圳华溶分析仪器有限公司; AutoChemB861 型全自动生化分析仪, 郑州安图生物工程股份有限公司; ARL EQUINIX 3000 型 X 射线粉末衍射仪, 美国 Thermo Fisher 公司; SKZ-2 型光学显微镜, 德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 原料与试剂

花旗松素对照品, 批号 BH0220719, 质量分数 98.5%, 西安玉泉生物科技有限公司; 三叶苷原料药, 批号 20230920, 质量分数 97.0%, 中山市迪欣化工有限公司; 三叶苷对照品, 批号 20230815, 质量分数 98.5%, 四川省维克奇生物科技有限公司; 壳聚糖, 批号 20230522, 国药集团化学试剂有限公司; 磷脂, 批号 231028, 上海辅必成医药科技有限公司; 泊洛沙姆 188, 批号 230425, 武汉荣灿生物科技有限公司; 对乙酰氨基酚, 批号 20240602, 上海源叶生物科技有限公司; 苏木素-伊红染色试剂盒, 批号 G1120, 北京索莱宝科技有限公司; 血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(批号分别为 C009-2-1、C010-2-1、A001-1-2、A003-1-2、H052-1-2、H007-1-2), 均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物

SD 大鼠购自河南省动物实验中心, 许可证号: SCXK(豫)2020-0001, 级别为 SPF 级, 体质量 180~200 g。遵循郑州健康学院有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则, 动物伦理审批号: 2023-SOLL-EC-20230915-1007-0000079。

2 方法与结果

2.1 Tri-PC/CS-NPs 的制备

2.1.1 Tri-PC 的制备^[3] 分别取磷脂 2.2 g 和三叶苷 1.0 g(物质的量比为 1.1:1), 置于 250 mL 茄形瓶中, 加入 80 mL 四氢呋喃。置于 50 °C 水浴中磁力搅拌 4 h, 得澄清透明溶液, 于 50 °C 下减压旋蒸, 除去四氢呋喃, 得半固体状物质, 即为 Tri-PC, 收集至表面皿中, 铺展后置于 30 °C 真空干燥箱中过

夜, 取出后立即密封保存。

2.1.2 Tri-PC/CS-NPs 的制备 取一定体积的 1% 醋酸至茄形瓶中, 加入处方量的壳聚糖和泊洛沙姆 188, 于 55 °C 下磁力搅拌至溶解澄清, 即得含壳聚糖和泊洛沙姆 188 的水溶液。取 50 mg Tri-PC 溶于 5 mL 无水乙醇中, 缓慢滴至水相中, 磁力搅拌一定时间后减压旋蒸 0.5 h, 即得带乳光的混悬液, 使用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 续滤液即为 Tri-PC/CS-NPs 混悬液。参考 Tri-PC/CS-NPs 处方, 分别称取磷脂、壳聚糖和泊洛沙姆 188, 同法制备阴性样品。

2.2 Tri-PC/CS-NPs 中三叶苷含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.5% 醋酸-甲醇(40:60); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 282 nm; 进样体积 20 μ L; 柱温 30 °C; 理论塔板数以三叶苷计不低于 6 000。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取三叶苷对照品适量, 使用甲醇配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液, 密封低温保存。使用 0.5% 醋酸-甲醇(40:60)作为稀释溶液, 配制质量浓度分别为 10.00、5.00、1.00、0.10、0.05 μ g/mL 的系列对照品溶液。

2.2.3 线性关系考察 取“2.2.2”项下各质量浓度三叶苷对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件分别进样 20 μ L 进行测试, 记录三叶苷各质量浓度(X)的峰面积(Y), 进行线性回归, 得标准曲线回归方程为 $Y=16.94X+1.37$, $r=0.9999$, 结果表明三叶苷在 0.05~10.00 μ g/mL 与对应的峰面积呈良好的线性关系。

2.2.4 Tri-PC/CS-NPs 供试品溶液的制备 精密吸取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 加甲醇 50 mL 超声 10 min(功率为 250 W、频率为 40 kHz), 放冷, 使用 0.5% 醋酸-甲醇(40:60)混合溶剂稀释定容, 混匀后精密吸取 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 使用 0.5% 醋酸-甲醇(40:60)混合溶剂稀释定容, 即得供试品溶液。

2.2.5 专属性考察 取阴性样品, 按照“2.2.4”项下方法制备阴性样品溶液, 另取三叶苷对照品溶液(5.00 μ g/mL)和“2.2.4”项下 Tri-PC/CS-NPs 供试品溶液, 分别进样 20 μ L 进行测试, 记录色谱图, 结果见图 1。结果表明, 三叶苷色谱峰专属性高, 不影响定量分析。

2.2.6 精密度考察 分别取 0.05、1.00、10.00 μ g/mL 三叶苷对照品溶液, 分别进样测定 6 次, 结果三叶

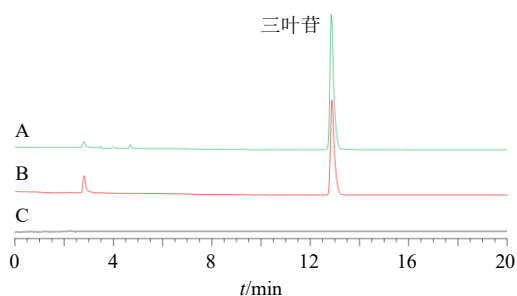


图 1 Tri-PC/CS-NPs (A)、三叶苷对照品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Tri-PC/CS-NPs (A), trifolin reference substance (B) and negative sample (C)

苷峰面积的 RSD 依次为 0.70%、0.46%、0.30%，表明该仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 吸取 Tri-PC/CS-NPs 供试品溶液，分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样测定，结果三叶苷峰面积的 RSD 为 0.96%，结果表明 Tri-PC/CS-NPs 供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性考察 取同一份 Tri-PC/CS-NPs 样品平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，结果三叶苷质量分数的 RSD 为 1.15%，结果表明该实验重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液至 100 mL 量瓶中，共 9 份，每份均为 0.5 mL，分成低、中、高 3 组，分别按照三叶苷含量的 80%、100% 和 120% 加入三叶苷对照品溶液，并按照“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，测定三叶苷总含量，根据加入量和测得量计算加样回收率，结果三叶苷的平均加样回收率为 98.66%，RSD 为 1.27%，结果表明该实验加样回收率较高。

2.3 Tri-PC/CS-NPs 粒径、 ζ 电位、包封率和载药量测定

取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液，使用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，除去三叶苷原料药。精密吸取 1 mL 续滤液至超滤管中，8 500 r/min 离心（离心半径 6.8 cm）5 min，取出超滤内管，置于 5 mL 甲醇，超声 10 min（功率为 250 W、频率为 40 kHz），以破坏 Tri-PC/CS-NPs 结构，使用 0.5% 醋酸-甲醇（40：60）混合溶剂定容至 10 mL，测定被包封三叶苷的质量（ $M_{\text{包封}}$ ）。根据制备 Tri-PC/CS-NPs 时三叶苷的投药量（ $M_{\text{投药量}}$ ），计算包封率。取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液直接冻干，称定质量（ $M_{\text{总质量}}$ ），计算载药量。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封}} / M_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封}} / M_{\text{总质量}}$$

取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液加至比色皿中，将外

壁擦拭干净，置于粒度测定仪上测定多分散性指数（polydispersity index, PDI）和粒径。取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液至 ζ 电位专用样品池中，将外壁擦拭干净，保持 U 型样品池两端液面齐平，测定 ζ 电位。

2.4 单因素考察 Tri-PC/CS-NPs 处方工艺

2.4.1 水相体积的考察 在 Tri-PC 与壳聚糖质量比 4：1，泊洛沙姆 188 质量分数为 0.10%，制备时间为 30 min 的条件下，考察水相体积对 Tri-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响。结果见表 1，随着水相体积逐渐增加，包封率和载药量均呈先增加后下降，可能是水相体积较小时会影响 Tri-PC 和壳聚糖质子化行为及表面电荷的稳定性^[1]，导致壳聚糖的正电荷无法有效地与 Tri-PC 的负电荷自组装形成 Tri-PC/CS-NPs；水相体积过大时，可能影响 Tri-PC/CS-NPs 结构稳定性，药物易进入水相，因而包封率和载药量下降。粒径呈先变小后增大趋势，但 ζ 电位均大于 30 mV。由于水相体积为 20 mL 时，包封率接近 80%，载药量大于 15%，粒径小于 200 nm，故后续以 20 mL 为中心对水相体积 15～25 mL 进行优化。

表 1 水相体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of volume of water phase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水相体积/mL	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
10	63.69 $\pm$ 1.33	13.86 $\pm$ 0.10	253.75 $\pm$ 9.33	31.57 $\pm$ 1.50
15	69.90 $\pm$ 0.68	14.23 $\pm$ 0.12	231.00 $\pm$ 7.76	32.40 $\pm$ 1.72
20	79.07 $\pm$ 1.13	15.13 $\pm$ 0.08	192.42 $\pm$ 5.21	30.91 $\pm$ 0.82
25	74.63 $\pm$ 0.67	13.05 $\pm$ 0.14	213.51 $\pm$ 5.55	31.84 $\pm$ 2.84
30	71.39 $\pm$ 1.01	12.04 $\pm$ 0.16	240.55 $\pm$ 3.75	31.55 $\pm$ 1.54

2.4.2 Tri-PC 与壳聚糖质量比的考察 在水相体积 20 mL，泊洛沙姆 188 质量分数为 0.10%，制备时间为 30 min 的条件下，考察 Tri-PC 与壳聚糖质量比对 Tri-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响，结果见表 2。随着 Tri-PC 与壳聚糖质量比逐渐增加，Tri-PC/CS-NPs 包封率和载药量均呈先增加后下降趋势，可能是 Tri-PC 与壳聚糖质量比直接影响到磷脂与壳聚糖的质量比，对两者之间的自组装行为、Tri-PC/CS-NPs 结构稳定性等产生影响^[12]，进而影响了包封率及载药量。粒径呈先变小后增大趋势，但 ζ 电位均大于 30 mV。由于 Tri-PC 与壳聚糖质量比为 4.0：1 时，包封率大于 80%，载药量大于 15%，粒径相对较小，故后续以 4.0：1 为中心，对 Tri-PC 与壳聚糖质量比 3.5：1～4.5：1，进行后续优化。

表2 Tri-PC与壳聚糖质量比的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effects of mass ratio of Tri-PC to chitosan ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tri-PC与壳聚糖质量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
3.0:1	62.78 $\pm$ 1.25	11.80 $\pm$ 0.20	245.88 $\pm$ 4.98	31.83 $\pm$ 1.96
3.5:1	65.69 $\pm$ 1.15	12.32 $\pm$ 0.13	216.29 $\pm$ 4.65	32.84 $\pm$ 2.19
4.0:1	80.40 $\pm$ 0.59	15.17 $\pm$ 0.18	205.25 $\pm$ 9.87	31.16 $\pm$ 0.87
4.5:1	75.67 $\pm$ 1.24	14.31 $\pm$ 0.11	217.70 $\pm$ 4.71	32.62 $\pm$ 0.53
5.0:1	70.99 $\pm$ 0.61	13.75 $\pm$ 0.08	234.53 $\pm$ 6.58	32.18 $\pm$ 2.11

2.4.3 泊洛沙姆 188 质量分数的考察 在水相体积 20 mL, Tri-PC 与壳聚糖质量比 4.0:1, 制备时间为 30 min 的条件下, 考察泊洛沙姆 188 质量分数对 Tri-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 3。随着泊洛沙姆 188 质量分数的逐渐增加, 包封率和载药量呈先增加后下降趋势, 可能是因为泊洛沙姆 188 是一种表面活性剂, 在水相中充分水化后可形成较大的空间位阻, 包覆在 Tri-PC/CS-NPs 表面后起到稳定作用^[13], 因此适当增加泊洛沙姆 188 质量分数有利于增加 Tri-PC/CS-NPs 包封率和载药量。但泊洛沙姆 188 质量分数过大时, 在水相中形成胶束^[14], 在增溶作用下导致药物从 Tri-PC/CS-NPs 逃逸至水相, 使包封率和载药量下降。Tri-PC/CS-NPs 粒径随着泊洛沙姆质量分数而下降, 但 ζ 电位均大于 30 mV。当泊洛沙姆 188 质量分数为 0.10% 时, 包封率大于 80%, 载药量大于 15%, 粒径小于 200 nm, 故后续以 0.10% 为中心, 对泊洛沙姆 188 质量分数 0.07%~0.13% 进行后续优化。

2.4.4 制备时间的考察 在水相体积 20 mL, Tri-PC 与壳聚糖质量比 4.0:1, 泊洛沙姆 188 质量分数 0.10% 的条件下, 考察泊洛沙姆 188 质量分数对 Tri-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响。结果见表 4, 随着制备时间的延长包封率和载药量呈先增加后下降趋势, 可能是因为 Tri-PC 负电

表3 泊洛沙姆 188 质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effects of mass fraction of poloxamer 188 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

泊洛沙姆188质量分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
0.04	63.72 $\pm$ 1.51	14.38 $\pm$ 0.08	275.23 $\pm$ 7.44	31.65 $\pm$ 1.67
0.07	71.49 $\pm$ 0.72	14.72 $\pm$ 0.07	232.79 $\pm$ 10.80	31.66 $\pm$ 1.78
0.10	80.58 $\pm$ 0.59	15.28 $\pm$ 0.12	197.38 $\pm$ 9.02	30.56 $\pm$ 0.59
0.13	74.33 $\pm$ 0.72	13.10 $\pm$ 0.10	180.38 $\pm$ 3.45	31.38 $\pm$ 1.49
0.16	70.07 $\pm$ 1.10	12.06 $\pm$ 0.16	175.27 $\pm$ 6.07	32.54 $\pm$ 3.02

表4 制备时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of prepare time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
10	61.20 $\pm$ 1.60	11.93 $\pm$ 0.09	246.90 $\pm$ 7.75	32.31 $\pm$ 1.45
15	72.49 $\pm$ 0.73	13.75 $\pm$ 0.14	227.25 $\pm$ 4.73	31.01 $\pm$ 1.15
20	81.64 $\pm$ 1.39	15.22 $\pm$ 0.04	202.79 $\pm$ 4.35	32.96 $\pm$ 0.84
25	82.63 $\pm$ 0.56	15.35 $\pm$ 0.16	201.16 $\pm$ 5.46	31.80 $\pm$ 1.54
30	77.41 $\pm$ 1.13	14.55 $\pm$ 0.08	201.62 $\pm$ 10.49	31.28 $\pm$ 2.37

荷与壳聚糖正电荷自组装形成 Tri-PC/CS-NPs 需要一定的时间, 但磷脂存在易氧化、变质缺点, 制备时间过长时可能导致磷脂变性, 进而对 Tri-PC/CS-NPs 稳定性影响, 使包封率和载药量下降。粒径总体呈逐渐变小趋势, ζ 电位均大于 30 mV。当超声时间为 25 min 时, 包封率和载药量相对较高, 故确定该时间来制备 Tri-PC/CS-NPs。

2.5 BBD-RSM 优化 Tri-PC/CS-NPs 处方工艺

2.5.1 优化方案 水相体积、Tri-PC 与壳聚糖质量比、泊洛沙姆 188 质量分数是制备 Tri-PC/CS-NPs 的主要影响因素, 故作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 各自变量均设置高 (+1)、中 (0)、低 (-1) 3 水平。根据“2.4”项下单因素考察结果可知, 在一定范围内各自变量对 ζ 电位影响不大, 故不再纳入优化指标。将包封率、载药量和粒径作为因变量 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 , 并以三者的总评归一值 (overall desirability, OD) 进行处方优化, 以获得包封率和载药量较高、同时粒径较小的 Tri-PC/CS-NPs 处方。

OD 值计算过程: 以 17 组实验中包封率最大值 ($M_{\max}$) 和最小值 ($M_{\min}$) 为参考, 使用公式 $d_{\text{包封率}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$, 计算各个实际值 (M_i) 的 $d_{\text{包封率}}$, 同法计算 $d_{\text{载药量}}$; 以 17 组实验中粒径最大值 ($M_{\max}$) 和最小值 ($M_{\min}$) 为参考, 使用公式 $d_{\text{粒径}} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$, 计算各个实际值 (M_i) 的 $d_{\text{粒径}}$; 使用 $OD = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 计算得到各处方工艺下实际 OD 值。试验设计与结果见表 5。

2.5.2 模型拟合及方差分析 采用版本为 V11.0.2 的 Design Expert 软件对表 5 中结果进行拟合, 得到 OD 与 X_1 、 X_2 、 X_3 之间的 3 元 2 次拟合方程为 $OD = 0.91 + 1.75 \times 10^{-3} X_1 + 0.11 X_2 - 0.06 X_3 + 0.12 X_1 X_2 - 0.18 X_1 X_3 - 0.02 X_2 X_3 - 0.33 X_1^2 - 0.27 X_2^2 - 0.40 X_3^2$, 作为数学模型。对各项进行方差分析, 结果见表 6, 可见模型 $P < 0.000 1$, 说明该模型具有极显著的研究意义。模型判定系数 $R^2 = 0.979 1$, 调整判定系数

表 5 BBD-RSM 试验设计与结果 ($n=3$)

Table 5 Design and results of BBD-RSM test ($n=3$)

试验号	X_1/mL	X_2	$X_3/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD 值
1	15	4.0 : 1	0.13	74.36	14.73	241.28	0.273
2	20	4.5 : 1	0.07	75.68	14.42	231.26	0.407
3	25	3.5 : 1	0.10	70.81	15.56	199.34	0.000
4	15	3.5 : 1	0.10	72.66	15.08	229.75	0.334
5	25	4.0 : 1	0.07	73.93	14.69	216.38	0.456
6	15	4.0 : 1	0.07	74.41	15.71	246.92	0.000
7	20	4.5 : 1	0.13	71.89	12.94	204.37	0.213
8	15	4.5 : 1	0.10	74.66	14.65	231.77	0.385
9	25	4.5 : 1	0.10	77.06	13.62	196.94	0.537
10	20	4.0 : 1	0.10	82.22	15.31	201.35	0.872
11	20	4.0 : 1	0.10	84.39	15.58	196.44	0.986
12	20	3.5 : 1	0.07	72.44	14.54	237.48	0.239
13	25	4.0 : 1	0.13	73.92	12.47	194.24	0.000
14	20	4.0 : 1	0.10	83.06	15.29	198.26	0.911
15	20	4.0 : 1	0.10	82.91	15.44	203.19	0.891
16	20	4.0 : 1	0.10	81.68	15.26	197.13	0.879
17	20	3.5 : 1	0.13	71.12	12.73	204.75	0.114

$R_{\text{adj}}^2=0.952\ 2$, 两者均大于 0.95, 说明该模型拟合值具有较高的参考价值, 仅 4.18% 的数据可能出现偏差。失拟项 $P=0.076\ 9$ ($P>0.05$), 说明干扰因素未对拟合结果产生显著性影响。模型中 X_3 、 X_1X_2 具有显著性差异 ($P<0.05$), X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异 ($P<0.01$)。

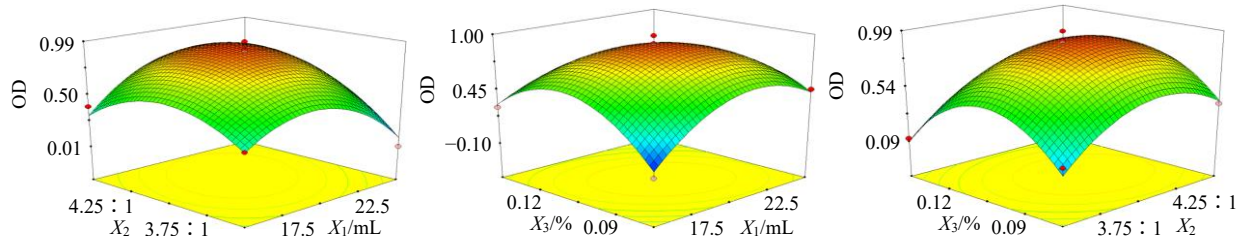


图 2 各因素对 OD 值的响应面

Fig. 2 Response surface of every factor on overall desirability

Tri-PC/CS-NPs, 各批次包封率、载药量、粒径和实际 OD 值结果见表 7, 根据预测 OD 值 (0.994), 3 批 OD 值相对偏差分别为 -3.12%、-0.70%、-1.11%, 说明 OD 数学模型拟合结果的参考意义较强。3 批 Tri-PC/CS-NPs 平均包封率为 $(84.80 \pm 1.21)\%$, 载药量为 $(15.56 \pm 0.10)\%$, 粒径为 $(197.74 \pm 5.58)\text{nm}$, 粒径分布见图 3-A。另测得 3 批 Tri-PC/CS-NPs 的 ζ 电位为 $(32.69 \pm 1.14)\text{mV}$, 说明 Tri-PC/CS-NPs 表面带正电荷, 主要与壳聚糖自身荷正电性有关^[10-11], ζ 电位见图 3-B。

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
模型	1.89	9	0.21	36.42	<0.000 1
X_1	2.45×10^{-7}	1	2.45×10^{-7}	4.23×10^{-5}	0.995 0
X_2	0.09	1	0.09	15.82	0.005 3
X_3	0.02	1	0.02	3.47	0.022 0
X_1X_2	0.06	1	0.06	10.22	0.015 1
X_1X_3	0.13	1	0.13	23.03	0.002 0
X_2X_3	1.13×10^{-3}	1	1.13×10^{-3}	0.20	0.671 3
X_1^2	0.45	1	0.45	78.06	<0.000 1
X_2^2	0.30	1	0.30	51.71	0.000 2
X_3^2	0.67	1	0.67	115.52	<0.000 1
残差	0.04	7	5.78×10^{-3}		
失拟项	0.03	3	0.01	5.01	0.076 9
纯偏差	8.50×10^{-3}	4	2.13×10^{-3}		
总离差	1.93	16			

2.5.3 响应面及处方工艺确定 使用版本为 V11.0.2 的 Design Expert 软件绘制响应面图, 结果见图 2, 响应面均呈抛物线变化趋势, DO 值随着 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 增加均呈先增加后下降趋势。DO 值越大, 表示 Tri-PC/CS-NPs 处方越理想, 故设置 OD 值优化目标为最大值, 得 Tri-PC/CS-NPs 最佳处方: 水相体积为 20.50 mL, Tri-PC 与壳聚糖质量比为 4.15 : 1, 泊洛沙姆 188 质量分数为 0.10%, OD 最大值为 0.994。

2.5.4 Tri-PC/CS-NPs 处方工艺验证 平行制备 3 批

表 7 Tri-PC/CS-NPs 处方工艺验证结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Verification results OF Tri-PC/CS-NPs prescription process ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD 值
第 1 批	84.33 ± 1.26	15.51 ± 0.09	196.59 ± 5.78	0.963
第 2 批	85.86 ± 0.77	15.56 ± 0.10	198.98 ± 5.70	0.987
第 3 批	84.22 ± 1.07	15.61 ± 0.13	197.66 ± 7.39	0.983

2.6 Tri-PC/CS-NPs 理化性质研究

2.6.1 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液 3 滴

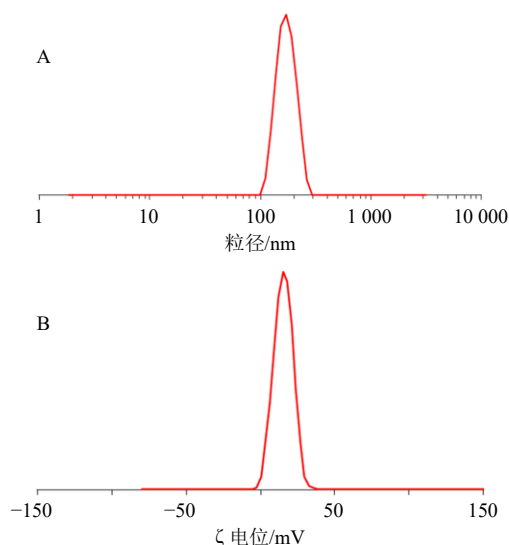


图 3 Tri-PC/CS-NPs 粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)
Fig. 3 Distribution diagram of particle size (A) and ζ potential (B) of Tri-PC/CS-NPs

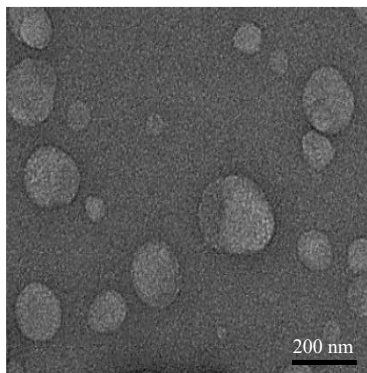


图 4 Tri-PC/CS-NPs 的 TEM 图 ($\times 14\,500$)
Fig. 4 TEM image of Tri-PC/CS-NPs ($\times 14\,500$)

至铜网上,振摇使之铺展开,加 1.0%磷钨酸钠,振摇使之染色均匀,晾干,固定在 TEM 样品台上,放大至 14 500 倍即可观察到 Tri-PC/CS-NPs 形貌。结果见图 4, Tri-PC/CS-NPs 外貌为类球形纳米颗粒,分散性良好,无黏连现象。

2.6.2 X 射线粉末衍射法(X-ray powder diffraction, XRPD) 分析 参考 Tri-PC/CS-NPs 处方,分别取三叶苷原料药、磷脂、壳聚糖和泊洛沙姆 188 进行简单混匀,得物理混合物。取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液直接冻干,得 Tri-PC/CS-NPs 固体粉末。取三叶苷原料药、磷脂、Tri-PC、壳聚糖、泊洛沙姆 188、物理混合物和 Tri-PC/CS-NPs 粉末适量,分别进行 XRPD 扫描,扫描速度为 $6^\circ/\text{min}$ 。结果见图 5。三叶苷在 4.1° 、 4.3° 处晶型衍射峰最强,在 $9^\circ \sim 30^\circ$ 出现大量相对较弱的衍射峰。在 Tri-PC 的 XRPD 图谱中三叶苷所有晶型衍射峰均消失,证明 Tri-PC 对

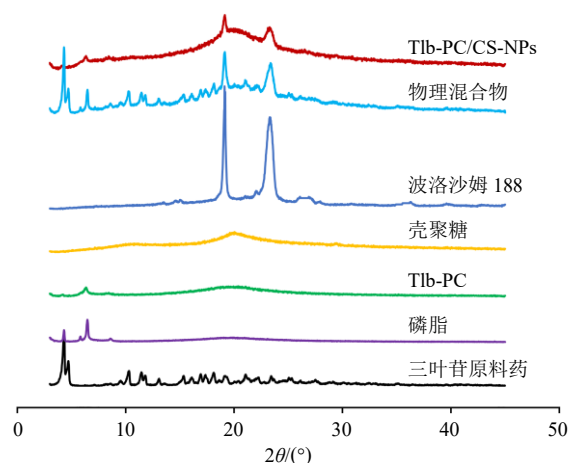


图 5 各个样品 XRPD 结果

Fig. 5 XRPD results of every sample

三叶苷晶型影响较大。壳聚糖未见特征晶型衍射峰,在物理混合物 XRPD 图谱中仍可见三叶苷、磷脂和泊洛沙姆 188 各自的特征晶型衍射峰。在 Tri-PC/CS-NPs 粉末 XRPD 图谱中三叶苷特征衍射峰均消失,泊洛沙姆 188 晶型衍射峰强度下降,说明三叶苷在 Tri-PC/CS-NPs 存在状态可能发生变化。

2.6.3 Tri-PC/CS-NPs 溶解度及 $\lg P$ 值测定 取过量三叶苷原料药、Tri-PC 和“2.6.2”项下制备的物理混合物和 Tri-PC/CS-NPs 粉末,分别置于纯化水中,450 W 功率超声 30 min,确保低层仍有三叶苷沉淀。置于 25°C 水浴中磁力搅拌 2 d (速度为 700 r/min),经 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过各个样品,取上清液测定三叶苷质量浓度。分别制备水饱和的正辛醇及正辛醇饱和的水相,取过量三叶苷原料药、Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 粉末,分别置于 10 mL 水相饱和的正辛醇中,置于 25°C 水浴中磁力搅拌 2 d,经 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过各个样品,测定各样品在水相饱和正辛醇中的溶解度 (C_o)。分别取 5 mL,加入正辛醇饱和的水相 10 mL,置于 25°C 水浴中磁力搅拌 2 d,经 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过各个样品在正辛醇饱和水相中的溶解度 (C_w)^[3]。油水分配系数 (P) = $(C_o - C_w)/C_w$, 计算 $\lg P$ 值,结果见表 8。

可见, Tri-PC、物理混合物和 Tri-PC/CS-NPs 均极显著性提高了三叶苷的溶解度 ($P < 0.01$),与 Tri-PC 相比,物理混合物溶解度仍具有极显著性提高 ($P < 0.01$),可能与泊洛沙姆 188 的增溶作用有关。与物理混合物相比, Tri-PC/CS-NPs 溶解度的提高仍具有极显著性差异 ($P < 0.01$),因此, Tri-PC/CS-NPs 提高三叶苷的溶解度更具优势。与三叶苷原料药相比, Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 的 $\lg P$ 值得到极

表 8 溶解度及 $\lg P$ 值结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Results of solubility and $\lg P$ value ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	$\lg P$ 值
三叶苷原料药	2.59±0.06	0.24±0.02
Tri-PC	6.10±0.07**	2.66±0.10**
物理混合物	58.79±2.48***	-0.53±0.05***
Tri-PC/CS-NPs	134.22±4.20*** ^{ΔΔ}	1.09±0.09*** ^{ΔΔ}

与三叶苷原料药比较: ** $P < 0.01$; 与 Tri-PC 比较: *** $P < 0.01$; 与物理混合物比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs trifolin crude drug; *** $P < 0.01$ vs Tri-PC; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs physical mixture.

显著性增加 ($P < 0.01$), 说明三叶苷脂溶性得到明显改善, 而物理混合物的 $\lg P$ 值极显著性下降 ($P < 0.01$), 可能是由于物理混合物对水溶性的提高幅度远大于脂溶性所致。当药物 $\lg P > 2$ 时, 可能因药物脂溶性过强而影响胃肠道吸收^[15], 由于 Tri-PC 的 $\lg P$ 值达 2.66 ± 0.10 , 故推测 Tri-PC 可能影响生物利用度提高幅度。与 Tri-PC 相比, Tri-PC/CS-NPs 的 $\lg P$ 值表现出极显著性下降 ($P < 0.01$), 这是由于 Tri-PC/CS-NPs 对水溶性的提高作用, 远大于脂溶性所致, Tri-PC/CS-NPs 下调了 Tri-PC 的 $\lg P$ 值, 可能更利于药物吸收。

2.7 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉的制备及分散性能考察

取 Tri-PC/CS-NPs 混悬液 50 mL (外观见图 6-A), 加入甘露醇 1 g 和乳糖 1 g, 振荡溶解后分装至西林瓶中, -55°C 下预冻 3 d, 敞口置于冷冻干燥机的样品盘上, 盖上真空罩后抽真空, 3 d 后取出即得色泽均一的 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉 (外观见图 6-B)。于 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉中加入纯化水, 振荡复溶, 混悬液外观见图 6-C, 使用激光笔照射冻干粉复溶后混悬液可见丁达尔现象 (外观见图 6-D), 说明复溶后的混悬液是一种胶体分散体系, Tri-PC/CS-NPs 冻干粉可被还原到冻干前的状态。Tri-PC/CS-NPs 冻干粉复溶后的包封率、粒径、PDI 和 ζ 电位分别为



图 6 Tri-PC/CS-NPs 混悬液 (A)、冻干粉 (B)、纯化水复溶后混悬液 (C) 及其丁达尔效应 (D)

Fig. 6 Tri-PC/CS-NPs suspension (A), freeze-dried powder (B) and suspension after redissolved by purified water (C) and Tyndall effect (D)

(82.11 ± 0.60)%、(217.33 ± 5.27) nm、 0.169 ± 0.010 和 (33.21 ± 0.88) mV。复溶后包封率有所下降, 但仍大于 80%。粒径和 PDI 值有所增长, 但 PDI 值仍小于 0.3, 说明粒径分布较为均一。 ζ 电位基本未变化, Tri-PC/CS-NPs 表面仍带正电荷。

2.8 体外释药行为研究

取三叶苷原料药、Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉适量 (三叶苷含量均为 25 mg), 置于透析袋中 (截留相对分子质量 3 500), 加入 pH 2.0 PBS (含 0.5% SDS) 5 mL, 使用尼龙绳将透析袋两端扎紧, 振摇得到混悬液。取 pH 2.0 PBS (含 0.5% SDS) 1 L, 置于溶出杯中, 开启溶出仪使释药介质恒温至 (37.0 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$, 转篮转速为 75 r/min, 取样时间点分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 h, 取样体积为 5 mL, 每次取样后补加 pH 2.0 PBS (含 0.5% SDS) 5 mL。2 h 后将释药介质更换为温度 (37.0 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 、体积为 1 L 的 pH 6.8 PBS (含 0.5% SDS), 取样时间点分别为 3、4、6、8、12、18 h, 取样体积和补液体积均为 5 mL。取样结束后, 将各个样品经 8 500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 20 min, 测定上清液中三叶苷含量, 并绘制释药曲线, 结果见图 7。Tri-PC 将三叶苷的 18 h 累积释放率由 41.71% 提高至 56.68%, 主要是 Tri-PC 提高了三叶苷的溶解度、改变存在状态所致, 但 Tri-PC 黏性较大, 故对药物释放产生了较大影响。Tri-PC/CS-NPs 在 18 h 累积释放率增加至 88.45%, 有利于接近三叶苷体内吸收瓶颈。释放模型拟合结果见表 9, Tri-PC/CS-NPs 释药行为与 Weibull 模型相关性最高, 因此释药过程包含快速和缓慢释药期。

2.9 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉稳定性考察

取新制备密封在西林瓶中的 Tri-PC/CS-NPs 冻

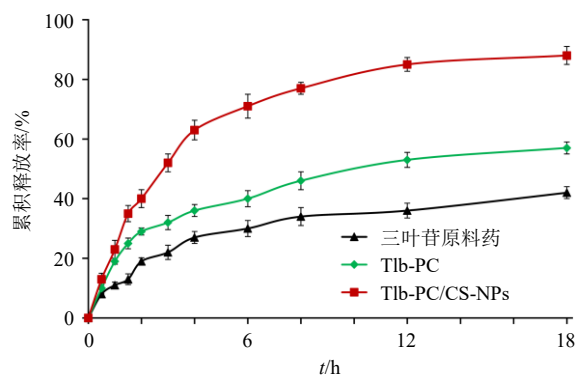


图 7 各样品在模拟胃肠液体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Release profiles *in vitro* of every sample in simulate gastrointestinal fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表9 Tri-PC/CS-NPs 释放模型

Table 9 Fitting release model of Tri-PC/CS-NPs

释放模型	拟合方程	R^2
一级	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.119\,3\,t-0.283\,2$	0.916\,5
Higuchi	$M_t/M_\infty=0.013\,0\,t^{1/2}-0.060\,7$	0.975\,4
Weibull	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.735\,3\,\ln t-1.207\,0$	0.980\,1

t 代表时间, M_t 和 M_∞ 分别为 t 和 ∞ 时的累积释放度, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

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

干粉,测定复溶后的包封率、粒径、PDI 和 ζ 电位,作为对比标准。将 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉置于 -10°C 冰箱中,分别于冷藏 0、1、2、3、6 个月取样,同法测试相同的质量指标^[16]。结果见表 10,第 6 个月 Tri-PC/CS-NPs 粉末复溶后的包封率、粒径、PDI 和 ζ 电位与新制备样品相比,无显著性变化 ($P>0.05$),结果表明 Tri-PC/CS-NPs 粉末在低温条件下稳定性良好,为储存条件选择提供了参考。

表 10 Tri-PC/CS-NPs 冻干粉稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 10 Stability results of freeze-dried powder of Tri-PC/CS-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$t/\text{月}$	包封率/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	82.11 ± 0.60	217.33 ± 5.27	0.169 ± 0.010	33.21 ± 0.88
1	82.17 ± 0.91	220.16 ± 3.11	0.171 ± 0.070	34.06 ± 1.27
2	81.82 ± 1.13	219.84 ± 6.04	0.166 ± 0.013	32.89 ± 0.84
3	81.20 ± 0.88	223.67 ± 5.28	0.163 ± 0.110	33.17 ± 1.52
6	80.84 ± 0.97	225.93 ± 4.96	0.173 ± 0.090	32.74 ± 1.39

2.10 口服药动力学研究

2.10.1 给药及采血方案 分别取三叶苷原料药、Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs 粉末适量,分散于 2 mL 0.5% CMC-Na 水溶液中,其中三叶苷和 Tri-PC 混悬液配制时超声 15 s (功率为 250 W、频率为 40 kHz),使之分散均匀。取 SD 大鼠 18 只,随机分成 3 组,每组各 6 只,按 100 mg/kg 剂量 (以三叶苷计) ig。分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0 h,将待取血大鼠置于含乙醚的容器中,10 s 后呈麻醉状态,固定大鼠后于眼眶后静脉丛采血约 0.2 mL,置含肝素的离心管中,3 000 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 2 min,取血浆冷冻保存。

2.10.2 内标溶液的配制及血浆样品的处理 精密称取花旗松素对照品适量,使用甲醇超声溶解后继续稀释至 500 ng/mL,作为内标溶液,精密吸取 100 μL 置于离心管中,加入血浆样品 100 μL 和甲醇 500 μL ,密封涡旋 2 min。8 000 r/min 离心 (离心半径

6.8 cm) 5 min,收集上层有机相至另一空白离心管中,40 $^\circ\text{C}$ 氮气将甲醇吹干,密封。测定前加入 100 μL 甲醇,超声 1 min (功率为 250 W、频率为 40 kHz),复溶后进样。

2.10.3 线性曲线考察 使用空白血浆配制三叶苷质量浓度为 1 200、600、300、120、30 ng/mL,各质量浓度精密吸取 100 μL ,按照“2.10.2”项下方法制备三叶苷血浆对照品溶液 (含花旗松素质量浓度 500 ng/mL)。参考“2.2.1”项下色谱条件进样 20 μL 测定,计算三叶苷和花旗松素峰面积的比值 (Y),与三叶苷质量浓度 (X) 进行线性回归,得回归方程 $Y=0.068\,3\,X+0.021\,1$, $r=0.998\,8$,说明在以花旗松素为内标的前提下,三叶苷在 30~1 200 ng/mL 呈良好的线性关系。

2.10.4 专属性考察 取空白血浆,按照“2.10.2”项下方法制备空白血浆溶液,另取质量浓度 30 ng/mL 三叶苷血浆对照品溶液 (含花旗松素,质量浓度 500 ng/mL) 和三叶苷给药 12 h 血浆样品溶液,参考“2.2.1”项下色谱条件进样 20 μL ,记录色谱图,结果见图 8。结果表明,三叶苷和花旗松素色谱峰专属性较高。

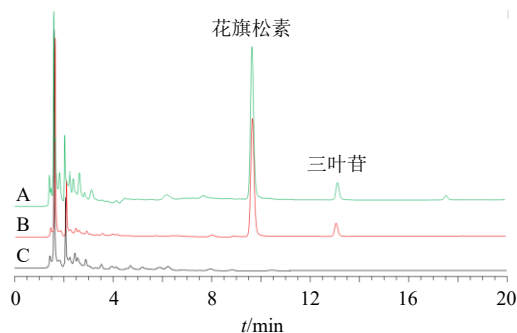


图 8 血浆样品 (A)、空白血浆+三叶苷+内标 (B) 和空白血浆溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of plasma sample (A), blank plasma + trifolin + internal standard (B) and blank plasma solution (C)

2.10.5 精密度试验 取三叶苷质量浓度分别为 30、600、1 200 ng/mL 质控样品溶液 (含花旗松素,质量浓度 500 ng/mL),连续测定 6 次,记录三叶苷和花旗松素峰面积,两者比值的 RSD 分别为 7.03%、3.94%、4.17%,结果表明该实验精密度良好。

2.10.6 稳定性试验 取质量浓度为 600 ng/mL 三叶苷的质控样品溶液 (含花旗松素,质量浓度 500 ng/mL),分别于 0、3、6、9、12、24 h 进样测定,记录三叶苷和花旗松素峰面积,两者比值的 RSD 为 6.30%,结果表明血浆样品溶液稳定性良好。

2.10.7 提取回收率和基质效应试验 取质量浓度分别为 30、600、1 200 ng/mL 质控样品（含花旗松素质量浓度 500 ng/mL），按照“2.10.3”项下方法处理得到质控样品溶液，测定三叶苷和花旗松素峰面积（*a*）；取 100 μ L 空白血浆置于离心管中，加入甲醇 500 μ L，密封涡旋 2 min。8 000 r/min 离心（离心半径 6.8 cm）5 min，收集上层有机相至另一空白离心管中，40 $^{\circ}$ C 氮气将甲醇吹干，加入三叶苷和花旗松素对照品溶液，使三叶苷最终质量浓度为 30、600、1 200 ng/mL（含花旗松素，质量浓度 500 ng/mL），测定三叶苷和花旗松素峰面积（*b*）；取三叶苷质量浓度分别为 30、600、1 200 ng/mL 对照品溶液（不含血浆，花旗松素质量浓度 500 ng/mL），测定三叶苷和花旗松素峰面积（*c*）。提取回收率=*a/b*，低、中、高质量浓度三叶苷提取回收率分别为 96.64%、103.71%、94.49%，花旗松素提取回收率 96.13%，表明三叶苷和花旗松素提取回收率均较高。基质效应=*b/c*，低、中、高质量浓度三叶苷基质效应分别为 97.11%、96.56%、104.03%，花旗松素基质效应为 97.36%，结果表明三叶苷及花旗松素基质效应均小。

2.10.8 药动力学考察结果 各个样品的药-时曲线见图 9。采用 DAS 2.0 软件分析数据，非房室模型统计矩法计算三叶苷原料药、Tri-PC 和 Tri-PC/CS-NPs

的药动力学参数，结果见表 11。与三叶苷原料药相比，Tri-PC 的 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 无显著性差异（ $P>0.05$ ）， $C_{\max}$ 显著性提高（ $P<0.05$ ）， $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 极显著性提高（ $P<0.01$ ），说明 Tri-PC 可促进三叶苷体内吸收，相对生物利用度为 2.41 倍。Tri-PC/CS-NPs 的 $t_{\max}$ 极延后（ $P<0.01$ ）， $t_{1/2}$ 极显著性延长（ $P<0.01$ ）， $C_{\max}$ 极显著性增加（ $P<0.01$ ），表明 Tri-PC/CS-NPs 改变了三叶苷药动力学行为，相对生物利用度增加至 5.36 倍。与 Tri-PC 相比，Tri-PC/CS-NPs 主要药动力学参数均具有极显著性改变（ $P<0.01$ ），表明 Tri-PC/CS-NPs 促三叶苷体内吸收更具优势。

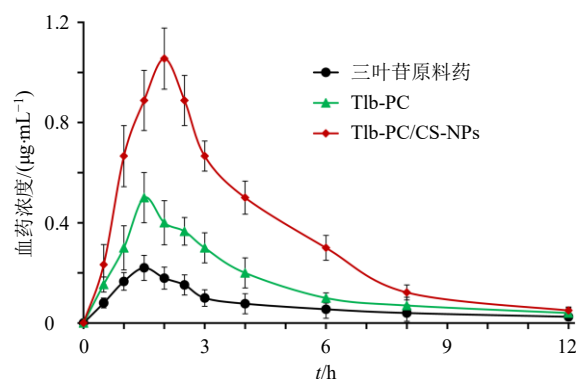


图 9 各样品的药-时曲线（ $\bar{x} \pm s$, $n=6$ ）

Fig. 9 Plasma concentration-time profiles of every sample ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

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

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

样品	$t_{\max}/h$	$t_{1/2}/h$	$C_{\max}/(ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0\sim t}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0\sim\infty}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$
三叶苷原料药	1.33 ± 0.29	3.07 ± 0.43	239.03 ± 40.55	783.29 ± 86.14	796.40 ± 93.92
Tri-PC	1.39 ± 0.37	3.39 ± 0.56	$390.65 \pm 46.86^*$	$1\,891.33 \pm 184.99^{**}$	$1\,929.04 \pm 202.84^{**}$
Tri-PC/CS-NPs	$2.38 \pm 0.57^{***}$	$5.11 \pm 0.85^{***}$	$1\,114.50 \pm 259.13^{***}$	$4\,194.71 \pm 427.63^{***}$	$4\,286.03 \pm 497.46^{***}$

与三叶苷原料药比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与 Tri-PC 比较：*** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs trifolin crude drug；*** $P<0.01$ vs Tri-PC.

2.11 急性肝损伤保护作用比较

2.11.1 分组及给药 联苯双酯通过增加肝脏的解毒功能、抗氧化等作用来治疗各种因素导致的肝损伤^[17]，是现阶段临床常用的护肝药物，在急性肝损伤药效研究中常采用该药物作为阳性对照。取 42 只 SD 大鼠，分成对照组（ig 生理盐水）、模型组（ig 生理盐水）、阳性药组（联苯双酯，200 mg/kg）^[17]、三叶苷组（100 mg/kg）、Tri-PC 组（以三叶苷计，100 mg/kg）及 Tri-PC/CS-NPs 低、高剂量组（以三叶苷计，50、100 mg/kg），各组大鼠均 6 只，每天 9:00 时进行 ig 给药，连续 7 d。最后 1 次给药 6 h 后，对照组 ip 生理盐水，其余各组 ip 对乙酰氨基

酚溶液（300 mg/kg）造模^[18]。6 h 后对各只大鼠称定质量，然后 ip 2.5%戊巴比妥钠麻醉，摘除眼球取血，收集血液样品，置于-10 $^{\circ}$ C 冰箱保存。脱颈处死大鼠，迅速解剖取出肝脏和脾脏，清洗后吸干表面水分，称定质量。取肝脏组织浸泡于 4%多聚甲醛，石蜡包埋，制备切片，二甲苯透明处理，经无水乙醇（5 min） $\rightarrow$ 95%乙醇（3 min） $\rightarrow$ 80%乙醇（3 min）处理，使用苏木素-伊红（HE）染色 5 min，置于光学显微镜下观察病理情况。

2.11.2 肝脏系数和脾脏系数的计算及结果 急性肝损伤发生时机体处于应激状态，脾脏作为免疫器官可出现适应性功能增强，导致体积增大，因此有

必要测定脾脏系数。各组动物测得结果见表 12。与对照组相比,模型组肝脏系数和脾脏系数均极显著性增加 ($P<0.01$),说明模型组肝脏和脾脏均发生肿大,建模成功。与模型组相比,阳性药组、三叶苷组、Tri-PC 组及 Tri-PC/CS-NPs 低、高剂量组的肝脏系数和脾脏系数均有极显著性下降 ($P<0.01$),说明各给药组均可保护肝脏及脾脏。与三叶苷组相比, Tri-PC 组和 Tri-PC/CS-NPs 低剂量组肝脏系数和脾脏系

表 12 各组大鼠肝脏系数和脾脏系数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 12 Liver index and spleen index of every group of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肝脏系数	脾脏系数
对照	—	4.23±0.45	0.33±0.09
模型	—	8.17±0.75**	0.70±0.13**
阳性药	200	4.87±0.66 ^{##}	0.47±0.07 ^{##}
三叶苷	100	6.52±0.39 ^{##}	0.57±0.07 ^{##}
Tri-PC	100	5.65±0.41 ^{##Δ}	0.48±0.13 ^{##Δ}
Tri-PC/CS-NPs	50	5.73±0.67 ^{##Δ}	0.48±0.11 ^{##Δ}
	100	4.97±0.56 ^{##ΔΔ&}	0.37±0.11 ^{##ΔΔ&}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;
与三叶苷组比较: ^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$; 与 Tri-PC 组比较: [&] $P<0.05$ ^{&&} $P<0.01$; 表 13 同。

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group;
^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$ vs trifolin group; [&] $P<0.05$ ^{&&} $P<0.01$ vs
Tri-PC group; Same as table 13.

表 13 大鼠血清各项指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 13 Determination results of various indicators in rat serum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	丙二醛/ (mmol·mL ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(pg·L ⁻¹)
对照	—	64.20±7.00	98.97±10.84	100.55±10.75	2.03±0.29	58.48±8.79	92.83±6.99
模型	—	203.23±14.29**	268.65±14.61**	62.12±8.30**	10.02±0.77**	148.40±12.32**	417.22±48.94**
阳性药	200	80.20±9.12 ^{##}	118.97±11.30 ^{##}	92.47±11.90 ^{##}	4.13±0.54 ^{##}	76.02±5.75 ^{##}	147.42±16.22 ^{##}
三叶苷	100	138.20±9.36 ^{##}	195.32±17.41 ^{##}	78.15±7.03 [#]	7.62±0.61 ^{##}	103.40±9.74 ^{##}	268.17±51.27 ^{##}
Tri-PC	100	118.89±10.18 ^{##Δ}	157.20±8.49 ^{##ΔΔ}	85.13±4.94 ^{##Δ}	6.85±0.72 ^{##Δ}	87.08±7.61 ^{##Δ}	246.85±25.08 ^{##Δ}
Tri-PC/CS-NPs	50	121.61±15.01 ^{##Δ}	152.23±14.85 ^{##ΔΔ}	84.23±8.74 ^{##Δ}	6.90±0.62 ^{##Δ}	82.67±7.65 ^{##ΔΔ}	208.57±16.84 ^{##ΔΔ}
	100	79.52±7.63 ^{##ΔΔ&&}	126.63±15.54 ^{##ΔΔ&}	94.15±5.11 ^{##ΔΔ&}	4.37±0.81 ^{##ΔΔ&&}	70.82±12.94 ^{##ΔΔ&}	166.03±15.76 ^{##ΔΔ&&}

2.11.4 各组大鼠肝脏病理切片结果 如图 10 所示,对照组大鼠肝细胞轮廓清晰,排列整齐,无炎症细胞浸润;模型组大鼠肝组织细胞索紊乱,大量炎症细胞浸润,急性肝损伤特征明显;阳性药组肝细胞排列较规则,肝组织病理趋向对照组;三叶苷组(100 mg/kg)存在一定数量的变形细胞,炎症细胞浸润得到改善,但治疗效果远低于阳性药组; Tri-PC 组(100 mg/kg)和 Tri-PC/CS-NPs 低剂量组(50

数均显著性下降 ($P<0.05$), Tri-PC/CS-NPs 高剂量组有极显著性下降 ($P<0.01$)。与 Tri-PC 组相比, Tri-PC/CS-NPs 高剂量组肝脏系数显著性下降 ($P<0.05$),脾脏系数极显著性下降 ($P<0.01$),可能与 Tri-PC/CS-NPs 具有更高生物利用度有关^[3]。

肝脏系数=肝脏质量/体质量

脾脏系数=脾脏质量/体质量

2.11.3 血清中各项指标测定与结果 取血液样品, 3 500 r/min (离心半径为 6.0 cm) 离心 5 min, 取上清液,于全自动生化分析仪检测上测定 ALT、AST、SOD、丙二醛、TNF-α 和 IL-6 水平。测定结果见表 13,与对照组相比,模型组血清 SOD 极显著性下降 ($P<0.01$),其他各项指标均极显著性增加 ($P<0.01$),说明建模成功。与模型组相比,各给药组血清中 SOD 显著性或极显著性升高 ($P<0.05$ 、 0.01),其他各项指标均极显著性下降 ($P<0.01$),说明各给药组治疗效果明显。与三叶苷组相比, Tri-PC 组、Tri-PC/CS-NPs 低及高剂量组血清中 SOD 显著性或极显著性升高 ($P<0.05$ 、 0.01),其他各项指标均显著性或极显著性下降 ($P<0.05$ 、 0.01)。与 Tri-PC 组相比, Tri-PC/CS-NPs 高剂量组血清中 SOD 显著性升高 ($P<0.05$),其他各项指标均显著性或极显著性下降 ($P<0.05$ 、 0.01),可见 Tri-PC/CS-NPs 治疗作用高于 Tri-PC。

mg/kg)改善了肝损伤,但仍存在一定数量的变形细胞。Tri-PC/CS-NPs 高剂量组(100 mg/kg)未见明显的变形细胞和炎症细胞浸润现象,肝组织病理趋向于阳性药组和对照组。

3 讨论

一些研究利用磷脂和壳聚糖自组装特性来包载药物^[11-12],但并不能改善药物的亲脂性,可能不利于药物穿透胃肠道吸收^[19-20]。本研究首先将三叶

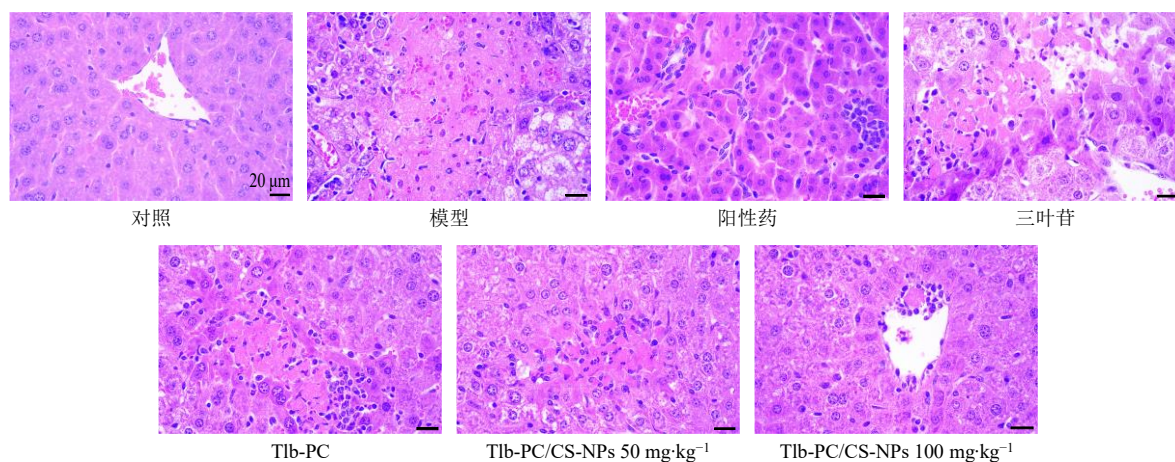


图 10 各组大鼠肝脏病理切片 (×400)

Fig. 10 Hepatic pathologic sections of various groups of rats (× 400)

苷制备成 Tri-PC, 进一步构建 Tri-PC/CS-NPs, 不仅改善了三叶苷亲脂性, 而且利于增加 Tri-PC/CS-NPs 包封率及体内吸收^[21]。本研究利用 Tri-PC 和壳聚糖表面所带电荷的差异, 采用自组装法将 Tri-PC 制备成 Tri-PC/CS-NPs。壳聚糖溶于 1% 乙酸时, 壳聚糖分子中的氨基和羧基等功能团发生质子化而导致表面带正电荷^[22]; 磷脂自身带负电荷, Tri-PC 继承了磷脂的负电荷性质^[23], 因而在水相中可与带正电荷的壳聚糖通过静电引力作用自组装形成 Tri-PC/CS-NPs。Tri-PC/CS-NPs 包封率大于 80%, 载药量大于 15%, 为减少给药频率、提高药物生物利用度及药效奠定基础^[24]。

Tri-PC 提高了三叶苷溶解度及油水分配系数, 改变了晶型 (转变为无定形), 利于解决三叶苷体内吸收瓶颈。将 Tri-PC 进一步制备成 Tri-PC/CS-NPs 后三叶苷的溶解度进一步提高, 因而使 Tri-PC/CS-NPs 的 $\lg P$ 值下降, 更利于透过胃肠道黏膜进入血液循环。Tri-PC 在一定程度上提高了三叶苷的累积释放度, 但由于 Tri-PC 存在分散性差、黏性大缺陷, 故对三叶苷释药速率、累积释放度及药动学行为等产生较大影响^[20]。Tri-PC/CS-NPs 在 18 h 累积释放率增加至 88.45%, 远大于 Tri-PC 累积释放度 (56.68%), 所以将 Tri-PC 制备成 Tri-PC/CS-NPs 是非常必要的, 利于进一步增加三叶苷体内吸收。Tri-PC/CS-NPs 释药过程包含快速和缓慢释药期, 是一种典型的双相释药行为, 因而对体内三叶苷的药动学行为产生较大影响。

大鼠 ig 40~120 mg/kg 即可表现出护肝、调血脂、减肥等药效^[2,25], 且均未发现毒性反应。本研究结合前期三叶苷体内药效考察及药动学检测情况,

最终选择三叶苷 ig 剂量 100 mg/kg 进行药动学及药效学研究。药动学结果显示, Tri-PC 提高了三叶苷的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ ($P<0.01$), 生物利用度得到明显提高, 这是由于三叶苷水溶性和脂溶性均较差, Tri-PC 改善了三叶苷溶解度及油水分配系数, 促进了溶出, 因而在一定程度上解决了体内吸收瓶颈。但 Tri-PC 过高的亲脂性、较差的分散性, 限制了生物利用度提高幅度。Tri-PC/CS-NPs 的 $t_{\max}$ 显著性延后, 可能与 Tri-PC/CS-NPs 缓释特点有关, 控制了药物的释放速度, 从而影响了三叶苷进入血液循环速度; 壳聚糖可提高 Tri-PC/CS-NPs 的黏附性, 可能会被黏液层捕获, 延长了其胃肠道滞留时间^[26], 从而最终影响了 $t_{\max}$, 同时也导致 Tri-PC/CS-NPs 的 $t_{1/2}$ 增加^[11]。Tri-PC/CS-NPs 相对口服生物利用度显著性提高, 可能是由于 Tri-PC/CS-NPs 处方中壳聚糖和泊洛沙姆 188 具有促吸收作用; Tri-PC/CS-NPs 改变了三叶苷晶型, 提高了三叶苷溶解度和溶出度, 利于体内吸收^[11]; Tri-PC/CS-NPs 具有较大的比表面积, 更有效地穿透生物屏障, 提高药物吸收效率^[27], 因而在多种因素共同影响下 Tri-PC/CS-NPs 提高了三叶苷生物利用度, 且促吸收优势比 Tri-PC 更加明显。

与三叶苷 (100 mg/kg) 相比, Tri-PC (100 mg/kg) 肝脏系数、脾脏系数及血清各项指标水平均发生显著或极显著性变化 ($P<0.05$ 、 0.01), 肝组织病理损伤得到明显缓解, 说明 Tri-PC 可提高三叶苷药效。Tri-PC/CS-NPs 对模型大鼠急性肝损伤改善效果更为显著, 主要是 Tri-PC/CS-NPs 促吸收作用高于 Tri-PC, 更利于三叶苷充分发挥药效^[18,28], 证明将 Tri-PC 制备成 Tri-PC/CS-NPs 是非常必要的。

综上, Tri-PC/CS-NPs 处方组成较为简单, 制备条件温和, 且包封率和载药量较高, 其冻干粉在低温储存时具有良好的稳定性。Tri-PC/CS-NPs 口服后改变了三叶苷体内药动学行为, 并显著促进三叶苷口服吸收、增强了对急性肝损伤的治疗作用, 为评价 Tri-PC/CS-NPs 成药性提供了参考资料。后续将对 Tri-PC/CS-NPs 制备规模进行研究, 积累小试及中试生产经验, 并开展非临床安全性评价, 进一步丰富 Tri-PC/CS-NPs 研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘鸿基, 曾琛悦, 曾霞, 等. 甜茶木姜叶柯及其主要活性成分三叶苷药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2024, 40(3): 129-135.
- [2] 李曦. 三叶苷对急性肝损伤的保护作用及促肝细胞增殖作用的实验研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [3] 尚慧杰, 王颖慧, 郝海军. 三叶苷-磷脂复合物处方工艺优化及理化性质的初步研究 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(11): 2724-2730.
- [4] 淳泽利, 陈兴艳, 郭延垒, 等. 基于三重四极杆质谱技术的三叶苷大鼠体内药动学和体内代谢研究 [J]. 药物分析杂志, 2025, 45(2): 237-245.
- [5] 钟雪萍, 章勇, 郭宇斐, 等. 阿苯达唑-盐酸盐的制备、表征及口服生物利用度的评价 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(3): 557-565.
- [6] 房伟, 王奎鹏, 韩德恩. 漆黄素纳米结构脂质载体制备及其体内药动学评价 [J]. 中成药, 2025, 47(6): 1796-1804.
- [7] 魏闪闪, 张晓宇, 卢凯, 等. 黄芪多糖-皂苷纳米聚集体对心肾共损伤小鼠心肾功能的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(10): 2863-2878.
- [8] 尚丹, 张广辉, 李晓婷, 等. 基于“药辅合一”的甜菊素-隐丹参酮自胶束化固体分散体制备、表征及体内评价 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4621-4633.
- [9] 胡悦. 基于磷脂复合物的羟甲香豆素磷脂-壳聚糖纳米粒的制备研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [10] Saha P, Singh P, Kathuria H, et al. Self-assembled lecithin-chitosan nanoparticles improved rotigotine nose-to-brain delivery and brain targeting efficiency [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 851.
- [11] 刘艳菊, 武月丹, 位小杰, 等. 包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 819-830.
- [12] 沈英, 黄雅菲, 宋帆帆, 等. 利格列汀壳聚糖-磷脂自组装纳米粒的制备及体内外评价 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(2): 345-352.
- [13] 闫秋丽, 章勇, 刘耀, 等. 以泊洛沙姆 188 或聚乙二醇 8000 为载体制备槲皮素晶体分散体系的表征及体外溶出行为研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(1): 100-107.
- [14] 阳小龙, 朱晓雯, 魏育彩, 等. 泊洛沙姆 407 胶束作为抗原载体的免疫效果评价 [J]. 中国兽医杂志, 2025, 61(12): 67-73.
- [15] 周斌, 宋选飞, 谢欢, 等. 丹参提取物平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. 现代中医药, 2024, 44(2): 79-86.
- [16] 周正江, 蒋兴娇, 罗延凯, 等. 乳清蛋白负载茶黄素纳米颗粒的制备和性能 [J]. 湖北农业科学, 2025, 64(3): 122-128.
- [17] 邹祥, 毛占存, 王星. 黄芩苷对小鼠急性肝损伤的作用及机制研究 [J]. 药学研究, 2025, 44(8): 750-755.
- [18] 李梦雅, 丁玉, 辛娟, 等. 马来酰亚胺修饰延胡索乙素纳米粒的制备、药动学及其对急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(9): 2565-2578.
- [19] 王丽, 高小玲, 李思翰, 等. 五味子乙素-磷脂酰胆碱复合物制备工艺优化及理化性质研究 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(7): 2115-2123.
- [20] 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.
- [21] 杨金枝, 崔晓鸽, 郝海军. TPGS 表面修饰岩白菜素固体脂质纳米粒的制备与口服生物利用度研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4144-4156.
- [22] 黄昱梵. 绿原酸-壳聚糖共聚物基乳液体系的构建及其应用研究 [D]. 漳州: 闽南师范大学, 2024.
- [23] 胡赛赛, 胡晓凤, 崔锋. 辣椒素-磷脂酰胆碱复合物的制备及其降血糖与抗胃黏膜刺激性作用评价 [J]. 中国现代应用药学, 2026, 43(7): 1126-1136.
- [24] 金磊, 王帅, 于卫华, 等. 齐墩果酸-壳聚糖纳米颗粒的制备及其对 BRL-3R 细胞氧化应激水平的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(9): 1268-1273.
- [25] 沈海亮. 多穗柯三叶苷对高脂饮食诱导的肥胖大鼠的减肥作用及机理研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [26] 王涛丽, 李登云, 张莉, 等. 壳聚糖包覆芒果苷脂质体的制备、表征及口服药动学评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(18): 2122-2128.
- [27] 李秋艳, 谢鹏. 硝苯地平纳米晶体的制备及其在大鼠体内的药动学评价 [J]. 中国药师, 2024, 27(4): 570-579.
- [28] 姚杰, 姬新颖, 张体鹏, 等. 聚乙二醇和八聚精氨酸双修饰漆黄素脂质体的制备、表征及体内外评价 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1564-1579.

[责任编辑 郑礼胜]