

本文引用: 李艳辉, 刘卫平, 李涛, 周颖倩, 陈园, 邹龙. 冰片负载黄芪、三七总皂苷共载脂质体的制备及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(8): 1559–1569.

冰片负载黄芪、三七总皂苷共载脂质体的制备及评价

李艳辉¹, 刘卫平¹, 李涛², 周颖倩², 陈园², 邹龙^{2*}

1.长沙医学院, 湖南 长沙 410200; 2.湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 构建冰片(Bor)负载黄芪总皂苷与三七总皂苷共载脂质体(Bor-TAS/PNS-Lip), 建立其含量的测定方法, 优化制备工艺并评价其理化性质及体外安全性。**方法** 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)同时测定黄芪总皂苷(TAS)与三七总皂苷(PNS)含量, 并进行专属性、线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率考察; 薄膜分散-超声法制备 Bor-TAS/PNS-Lip, 以 TAS 和 PNS 包封率为评价指标, 通过单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法优化处方工艺; 动态光散射法测定脂质体粒径、多分散性指数(PDI)及 Zeta 电位, 并通过透射电子显微镜观察其形貌; 评价脂质体的体外释放行为、溶血性能及细胞安全性。**结果** HPLC-ELSD 方法专属性良好, TAS 和 PNS 在考察范围内线性关系良好($r>0.999$), 精密度、重复性、稳定性及回收率均符合方法学要求。响应面分析结果表明, 药脂比、磷脂胆固醇比及水化温度对脂质体包封率具有显著影响($P<0.05$)。经 Box-Behnken 响应面法优化, 确定最佳处方工艺条件为药脂比 1:23、磷脂胆固醇质量比 7.6:1、水化温度 48 ℃。在此条件下制备的 Bor-TAS/PNS-Lip 中 TAS 和 PNS 包封率分别为 $75.37\% \pm 2.31\%$ 和 $63.37\% \pm 1.86\%$, 平均粒径为 (131.8 ± 2.8) nm, PDI 为 (0.17 ± 0.05) , Zeta 电位为 (-22.93 ± 0.81) mV。脂质体形态完整, 具有良好的体外缓释性能。溶血率低于 5%, 空白脂质体在 0.1~1.2 mg/mL 浓度范围内对 HT22 细胞活性及乳酸脱氢酶释放均无明显影响, 提示其具有良好的体外生物相容性。**结论** 建立的 HPLC-ELSD 含量测定方法准确可靠, 优化所得 Bor-TAS/PNS-Lip 具有较高包封率、良好的理化稳定性、生物相容性及缓释性能, 为 Bor-TAS/PNS-Lip 的制备及评价提供了实验依据。

[关键词] 冰片; 黄芪总皂苷; 三七总皂苷; 脂质体; 响应面法

[中图分类号] R283

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.08.003

Preparation and evaluation of borneol-loaded liposomes co-loaded with total Astragalus saponins and panax notoginseng saponins

LI Yanhui¹, LIU Weiping¹, LI Tao², ZHOU Yingqian², CHEN Yuan², ZOU Long^{2*}

1. Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410200, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To construct borneol-loaded liposomes co-loaded with total Astragalus saponins and Panax notoginseng saponins (Bor-TAS/PNS-Lip), establish a quantitative assay method, optimize the preparation procedure, and evaluate its physicochemical properties and in-vitro safety. **Methods** High-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection (HPLC-ELSD) was adopted for simultaneous determination of total Astragalus saponins (TAS) and panax notoginseng saponins (PNS). Methodological validations including specificity, linearity, precision, repeatability, stability, and sample-spiked recovery were performed. Bor-TAS/PNS-Lip was prepared by the film-hydration-sonication method. With the encapsulation efficiencies of TAS and

[收稿日期] 2026-06-30

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2026JJ81251); 湖南中医药大学研究生科研创新项目(2025CX092)。

[通信作者] * 邹龙, 男, 博士, 硕士研究生导师, 教授, E-mail: 002161@hnucm.edu.cn。

PNS as evaluation indices, formulation and processing parameters were optimized by single-factor experiments combined with Box-Behnken response-surface methodology. The particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential of liposomes were measured by dynamic light scattering, and the morphology was observed by transmission electron microscopy. *In vitro* release behavior, hemolytic property and cellular safety of liposomes were further evaluated. **Results** The established HPLC-ELSD method exhibited favorable specificity. TAS and PNS showed good linear relationships within the investigated concentration ranges ($r>0.999$). Precision, repeatability, stability, and recovery all met methodological requirements. Response surface analysis demonstrated that drug-to-lipid ratio, phospholipid-to-cholesterol ratio and hydration temperature exerted significant influences on encapsulation efficiency ($P<0.05$). The optimal formulation and technological conditions determined via Box-Behnken design were as follows: drug-to-lipid ratio of 1:23, phospholipid-to-cholesterol mass ratio of 7.6:1, and hydration temperature of 48 °C. Under these conditions, the encapsulation efficiencies of TAS and PNS in Bor-TAS/PNS-Lip were $75.37\%\pm2.31\%$ and $63.37\%\pm1.86\%$, respectively. The average particle size was (131.8 ± 2.8) nm, PDI was (0.17 ± 0.05) , and Zeta potential was (22.93 ± 0.81) mV. The liposomes possessed intact morphology and desirable *in-vitro* sustained-release performance. The hemolysis rate was lower than 5%. Blank liposomes showed no obvious effects on HT22 cell viability and lactate dehydrogenase release at concentrations ranging from 0.1 to 1.2 mg/mL, indicating favorable *in-vitro* biocompatibility. **Conclusion** The developed HPLC-ELSD assay is accurate and reliable. The optimized Bor-TAS/PNS-Lip possesses high encapsulation efficiency, satisfactory physicochemical stability, biocompatibility, and sustained-release property. It provides experimental evidence for the preparation and evaluation of borneol-loaded Bor-TAS/PNS-Lip.

[**Keywords**] borneol; total Astragalus saponins; Panax notoginseng saponins; liposomes; response surface methodology

黄芪与三七是临床常用中药配伍,具有益气活血的协同作用。黄芪总皂苷 (total Astragalus saponins, TAS) 和三七总皂苷 (Panax notoginseng saponins, PNS) 是二者的重要活性成分,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡以及改善微循环等多种药理作用^[1-3]。研究表明, TAS 能够通过调控氧化应激及炎症相关信号通路发挥神经保护作用, PNS 则可通过调节氧化应激、炎症反应、细胞凋亡及血管功能等多种途径改善组织损伤^[4-6]。现代药理研究显示, 黄芪-三七药对可通过多靶点、多通路发挥协同作用, 在增强保护效应的同时改善单一活性成分作用有限的问题, 体现了中药复方配伍的优势^[7]。然而, TAS 及 PNS 均存在成分复杂、生物利用度较低、体内稳定性不足以及有效递送效率有限等问题, 这些缺陷限制了其药理作用的充分发挥。因此, 开发适宜的递药系统以提高活性成分的稳定性及递送效率, 对于促进其应用具有重要意义。

脂质体是一类由磷脂双分子层构成的纳米递药载体, 具有良好的生物相容性、生物可降解性及药物包载能力。其独特的结构特点能够同时负载亲脂性和亲水性成分, 适用于多成分中药复方的联合递送。脂质体可通过提高药物稳定性、改善药物释放行为以及调节体内分布特征, 为中药活性成分的递送提供新的策略^[8]。冰片作为传统芳香开窍药的代表成分, 具有引药上行、促进药物吸收的传统应

用特点。现代研究表明, 冰片可通过调节紧密连接蛋白表达、影响外排转运过程及改善微循环等途径, 提高部分药物的生物利用度及递送效率, 在递药系统构建中具有潜在应用价值^[9-10]。因此, 将冰片引入脂质体体系, 有望发挥其辅助递送作用, 提高 TAS 和 PNS 的递送效率。基于此, 本研究采用薄膜分散-超声法构建冰片负载黄芪总皂苷与三七总皂苷共载脂质体 (borneol-loaded total Astragalus saponins and Panax notoginseng saponins co-loaded liposomes, Bor-TAS/PNS-Lip), 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法 (high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection, HPLC-ELSD) 用于 TAS 和 PNS 含量测定, 以 TAS 和 PNS 包封率为评价指标, 通过单因素实验结合 Box-Behnken 响应面法优化处方及制备工艺, 并对所得脂质体的粒径、多分散性指数 (polydispersity index, PDI)、Zeta 电位、体外释放及安全性等质量属性进行评价, 以期为冰片辅助型中药复方脂质递药系统的构建及后续递送性能研究提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂与药物

TAS (总皂苷含量 $\geq 98\%$)、PNS (总皂苷含量 $\geq 98\%$)、黄芪甲苷 (Astragaloside IV, AS-IV, 纯度 $\geq$

98%)、大豆卵磷脂(Soybean phosphatidylcholine, 含磷脂酰胆碱 $\geq 90\%$)、胆固醇(Cholesterol, AR $\geq 95\%$) (上海源叶生物科技有限公司, 批号:N13HB201030、SO5HB193585、25F10T81373、KS385387、KS340036); 麦格 Viskase 干型透析袋(北京麦格生物医学有限公司, 批号:202603018); 人参皂苷 Rg1(纯度 $\geq 98\%$)、无菌抗凝血兔血(成都埃法生物科技有限公司, 批号:AZ22051611、20260505)。HT22 细胞株、DMEM 高糖培养基、0.25%胰酶-EDTA 消化液、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(武汉普诺赛公司, 批号:CL-0697、PM150210、BC-CE-003、PM164210、PB180120); CCK-8 检测试剂盒(美国 APEX BIO Technology LLC, 批号:K1018); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 活性检测试剂盒(北京盒子生工科技有限公司, 批号:20260417); 乙腈(色谱纯)(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号:34851); 甲醇、三氯甲烷(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司, 批号:10014118、10006818); 实验用水为超纯水。

1.2 主要仪器

SYBR Green qPCR Mix(货号:4472920, 美国 Applied Biosystems 公司), 配备蒸发光散射检测器(ELSD); 01A418 型超声细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); Zetasizer NanoZS90 型激光粒度分析仪(英国 Malvern Panalytical 公司); HT-7800 透射电镜(日立科学仪器有限公司); Varioskan Flash 型多功能酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

1.3 数据处理软件

单因素实验数据分析及图表绘制采用 Graph-Pad Prism 10.1.2 软件; Box-Behnken 响应面实验设计、二次多项式回归模型建立及方差分析, 采用 Design-Expert 13 软件完成。

2 方法与结果

2.1 HPLC-ELSD 含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 采用 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为水(A)-乙腈(B), 采用梯度洗脱, 洗脱条件详见表 1。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L。漂移管温度: 100 $^{\circ}$ C; 雾化氮气压力: 35 psi; 增益: 8。

2.1.2 对照品溶液、供试品溶液及阴性溶液的制备

表 1 HPLC-ELSD 含量测定方法的梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of HPLC-ELSD

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~3	80	20
3~12	80~65	20~35
12~14	65~52	35~38
14~25	52~58	38~42
25~26	58~20	42~80
26~27	20	80
27~28	20~80	80~20
28~30	80	20

本方法选择 TAS 和 PNS 中的代表性指标成分进行含量测定, 其中 TAS 以 AS-IV 为定量指标, PNS 以人参皂苷 Rg1 为定量指标。分别精密称取 AS-IV 与 人参皂苷 Rg1 对照品各 5 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容, 制备成约 0.5 mg/mL 的混合对照品溶液。精密移取 Bor-TAS/PNS-Lip 样品 2 mL 加入甲醇定容至 10 mL 破乳, 静置过夜, 超声 30 min, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 备用。以同样的方法处理空白脂质体样品, 作为阴性溶液。

2.1.3 专属性考察 分别精密量取混合对照品溶液、Bor-TAS/PNS-Lip 供试品溶液及阴性对照溶液各适量, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。结果如图 1 所示, 在混合对照品溶液(图 1A)与供试品溶液(图 1B)中, 峰 1(人参皂苷 Rg1)与峰 2(AS-IV)均在各自对应的保留时间处出现清晰、对称的主峰, 且与辅料等相邻杂质峰达到良好的基线分离; 而阴性对照溶液(图 1C)在相应时间窗口内未观察到任何色谱峰干扰。以上研究结果表明, 本方法专属性良好, 空白脂质体辅料对 AS-IV 与 人参皂苷 Rg1 的测定无干扰, 能够准确区分目标化合物与其他干扰物质。

2.1.4 线性关系考察 精密量取“2.1.2”项下的混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 配制质量浓度分别为 25、50、100、250、500 μ g/mL 的系列混合对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件, 固定进样体积 10 μ L 分别进样测定, 记录各目标成分的色谱峰面积。由于 ELSD 响应信号常呈非线性关系, 故采用双对数变换进行线性回归, 以进样质量浓度 C(μ g/mL)的常用对数值 lgC 为横坐标, 色谱峰面积 A 的常用对数值 lgA 为纵坐标建立数学模型。以上研究结果表明, AS-IV 的回归方程为 $\lg A = 1.292 \lg C + 1.214 (R^2 = 0.999 2)$;

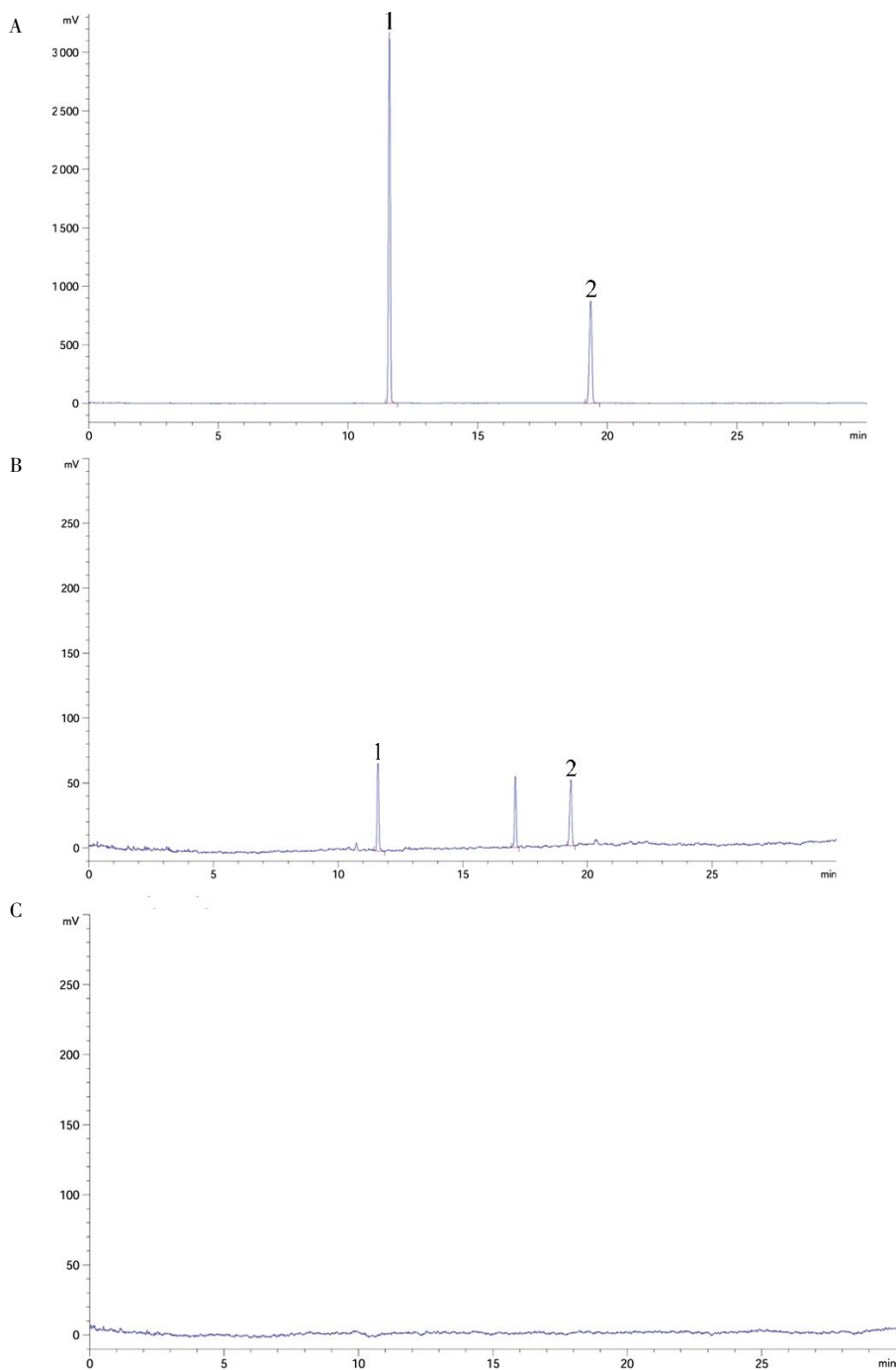


图 1 HPLC-ELSD 法专属性考察色谱图

Fig.1 Specificity chromatograms obtained by HPLC-ELSD

注:A.混合对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液。峰 1 为人参皂苷 Rg1;峰 2 为 AS-IV。

人参皂苷 Rg1 的回归方程为 $\lg A = 1.211 \lg C + 1.445$ ($R^2 = 0.9991$)。两者在 25~500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内均表现出良好的线性关系。同时,通过对各浓度标定点进行回代计算,其相对误差(relative error, RE)均在允许范围内,证实该标准曲线具有良好的准确度。

2.1.5 精密度试验 精密量取低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液(25、100、500 $\mu\text{g/mL}$),按“2.1.1”项下色谱条件分别连续进样测定 6 次($n=6$),记录

色谱峰面积。以上研究结果表明,AS-IV 在低、中、高浓度下的峰面积 RSD 分别为 0.58%、0.47%、0.34%;人参皂苷 Rg1 的峰面积 RSD 分别为 0.42%、0.22%、0.38%。各项 RSD 值均远小于 2.0%,表明该仪器与方法的精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于室温下放置 0、1、2、4、8、16、24 h,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱峰面积;相应 RSD 与 n 值

应重新统计。结果显示,AS-IV 与人参皂苷 Rg1 峰面积的 RSD 分别为 0.39%、0.48%($n=6$)。各项 RSD 均小于 2.0%,以上研究结果表明,供试品溶液在室温条件下放置 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批次 Bor-TAS/PNS-Lip 样品,按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样分析,记录色谱峰面积。结果显示,AS-IV 与人参皂苷 Rg1 峰面积的 RSD 分别为 1.73%、1.18%($n=6$)。各项 RSD 值均小于 2.0%,以上研究结果表明,该含量的测定方法及样品前处理过程具有良好的重复性。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的 Bor-TAS/PNS-Lip 样品溶液共 9 份,分为 3 组,分别按 80%、100%、120%的比例精密加入混合对照品溶液。按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定并计算加样回收率。结果显示,AS-IV 在低、中、高三个加样水平下的平均回收率分别为 99.97%、99.94%、100.32%,对应的 RSD 分别为 0.96%、0.88%、0.99%($n=3$);人参皂苷 Rg1 的平均回收率分别为 99.64%、100.27%、100.35%,对应的 RSD 分别为 0.91%、0.91%、0.76%($n=3$)。AS-IV 与人参皂苷 Rg1 的总平均加样回收率分别为 99.97%(总 RSD=0.77%, $n=9$)与 100.09%(总 RSD=0.82%, $n=9$)。以上研究结果表明,本含量测定方法准确度极高,无基质干扰。

2.2 Bor-TAS/PNS-Lip 的制备

采用薄膜分散-超声法^[1]制备 Bor-TAS/PNS-Lip。按特定处方比例精密称取适量大豆卵磷脂、胆固醇、冰片及 TAS,置于圆底烧瓶中,加入适量三氯甲烷-甲醇(3:1, v/v)充分溶解,形成均匀有机相。根据前期研究和预实验结果确定处方中冰片、TAS 与 PNS 的质量比为 7.5:10:25。将圆底烧瓶连接旋转蒸发仪,于 45 °C 水浴下减压旋转蒸发除去有机溶剂,使脂质及 TAS 在烧瓶壁形成均匀、半透明的薄膜。精密称取处方量的 PNS,溶解于适量纯化水中,作为水化液。将水化液加入上述脂质薄膜中,于 50 °C 水浴下常压旋转水化 1 h,使薄膜充分剥离并形成初级共载脂质体悬液。随后将悬液置于冰水浴中进行超声处理(超声波细胞破碎机,功率 200 W,工作 2 s,间歇 5 s,总超声时间 20 min),最后通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,获得均一的淡蓝色 Bor-TAS/PNS-Lip

混悬液。空白脂质体的制备除水相中不加 PNS,有机相不加 TAS 和冰片,其余操作相同。

2.3 Bor-TAS/PNS-Lip 包封率的测定

采用超滤离心法^[12]测定 Bor-TAS/PNS-Lip 包封率,该法准确性较高。精密量取适量 Bor-TAS/PNS-Lip 混悬液,置于 10 kDa 超滤离心管中,于 4 °C、6 000×g 条件下离心 15 min。收集下层超滤液,加甲醇定容至一定体积,作为游离药物供试品溶液。另取等量同批次脂质体混悬液,按“2.1.2”项下方法破乳并以甲醇定容,作为总药物供试品溶液。

按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录 AS-IV 和人参皂苷 Rg1 的峰面积,并代入相应回归方程,分别计算系统中游离药物含量及总药物含量。以 AS-IV 作为 TAS 的指标成分,以人参皂苷 Rg1 作为 PNS 的指标成分,分别计算 TAS 和 PNS 的包封率。包封率=[(总药量-游离药量)/总药量]×100%。

2.4 Bor-TAS/PNS-Lip 制备工艺的单因素考察

2.4.1 药物与磷脂质量比 考察了药脂质量比分别为 1:10、1:15、1:20 与 1:25 时的脂质体特征。结果显示,当药脂质量比由 1:10 调整至 1:20 时,TAS 包封率由 36.6%提高至 74.7%,PNS 包封率由 38.9%提高至 63.8%,粒径由 142.0 nm 减小至 131.8 nm,PDI 降至 0.157。药脂质量比继续调整为 1:25 时,TAS 包封率变化不明显,而 PNS 包封率下降至 51.2%,粒径增大至 139.5 nm,PDI 升高至 0.204。以上研究结果表明,适当增加脂质用量有利于药物包载,但过量脂质不能进一步提高包封效果,反而会影响体系稳定性。因此,确定药脂质量比为 1:20。

2.4.2 磷脂与胆固醇质量比 胆固醇在脂质体处方中主要用于调节膜的刚性与流动性。考察了磷脂与胆固醇质量比为 3:1、6:1、9:1 与 12:1 时的影响。结果显示,当磷脂与胆固醇质量比由 3:1 增加至 9:1 时,脂质体粒径由 184.8 nm 降至 130.8 nm,PDI 由 0.322 降至 0.157,TAS 和 PNS 包封率分别提高至 74.9%、64.5%。当比例进一步增加至 12:1 时,两种药物包封率均明显下降。适量胆固醇有利于形成稳定致密的脂质膜结构,而过高或过低均不利于药物包载。以上研究结果表明,磷脂与胆固醇质量比为 9:1。

2.4.3 超声时间 超声处理能够促进脂质体粒径减小并改善粒径分布。当超声时间由 10 min 延长至

20 min 时, 粒径由 289.0 nm 降至 127.8 nm, PDI 由 0.348 降至 0.144, 同时 TAS 和 PNS 包封率分别达到 75.5%、64.6%。继续延长超声时间至 30 min 时, 粒径进一步减小至 99.0 nm, 但 PDI 升高至 0.255, 两种药物包封率明显下降。可能是长时间超声导致脂质膜结构受到破坏, 引起药物泄漏。以上研究结果表明, 选择 20 min 作为最佳超声时间。

2.4.4 脂质质量浓度 随着脂质质量浓度由 5 mg/mL 增加至 15 mg/mL, TAS 和 PNS 包封率分别由 57.1%、41.4% 提高至 74.6%、64.0%, PDI 由 0.289 降至 0.153, 表明适当提高脂质浓度有利于脂质体形成及药物包载。当脂质浓度增加至 20 mg/mL 时, 粒径增大至 151.5 nm, PDI 升高至 0.225, 体系均一性下降。以上研究结果表明, 脂质质量浓度为 15 mg/mL。

2.4.5 水化时间 水化时间对脂质膜的充分剥离及脂质体形成具有重要影响。当水化时间由 0.5 h 延长至 1.0 h 时, 粒径由 162.2 nm 降至 127.1 nm, PDI 由 0.310 降至 0.165, TAS 和 PNS 包封率分别达到 74.5%、64.1%。继续延长水化时间至 2.0 h 后, 各项

指标变化不明显。以上研究结果表明, 1.0 h 已能够满足脂质薄膜充分水化及自组装的需要, 因此确定最佳水化时间为 1.0 h。

2.4.6 水化温度 水化温度能够影响磷脂分子的流动性及脂质体形成过程。当水化温度由 40 ℃ 升高至 50 ℃ 时, 粒径由 (279.3±9.5) nm 减小至 (133.2±3.7) nm, PDI 由 0.354±0.050 降至 0.160±0.006, TAS 和 PNS 包封率分别提高至 74.8%±2.0%、64.3%±2.1%。继续升高至 55 ℃ 时, 虽然粒径略有减小, 但 PDI 增大至 0.272±0.031, 两种药物包封率均有所下降。说明适当升高温度有利于脂质膜形成, 而过高温可能导导致脂质体结构稳定性降低。以上研究结果表明, 最佳水化温度为 50 ℃。单因素实验结果见表 2。

2.5 Box-Behnken 响应面分析法

2.5.1 Box-Behnken 响应面设计与优化 在单因素考察结果的基础上, 选取对 Bor-TAS/PNS-Lip 理化性质影响较为显著的 3 个关键因素: 磷脂-胆固醇比 (X_1)、水化温度 (X_2) 和药脂比 (X_3) 作为考察自变量, 以 AS-IV 与人参皂苷 Rg1 的包封率按公式 $Y=0.5\times$

表 2 单因素实验结果 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Single-factor experimental results ($\bar{x}\pm s$)

因素	水平	粒径/nm	PDI	TAS 包封率/%	PNS 包封率/%
药脂比	1:10	142.0±4.5	0.264±0.020	36.6±3.5	38.9±2.5
	1:15	136.5±4.2	0.188±0.011	59.3±2.7	54.7±2.2
	1:20	131.8±2.8	0.157±0.005	74.7±1.9	63.8±2.0
	1:25	139.5±3.7	0.204±0.019	74.2±2.2	51.2±2.7
磷脂-胆固醇比	3:1	184.8±5.0	0.322±0.034	63.4±3.2	54.9±4.1
	6:1	160.0±4.3	0.187±0.017	69.1±3.2	56.7±3.1
	9:1	130.8±2.7	0.157±0.005	74.9±2.4	64.5±2.3
	12:1	120.5±4.2	0.239±0.025	60.1±2.9	52.0±3.5
超声时间/min	10	289.0±10.2	0.348±0.039	54.6±4.3	56.8 ± 4.0
	15	211.9±10.4	0.241±0.019	65.1±3.0	59.3±3.4
	20	127.8±4.2	0.144±0.006	75.5±1.9	64.6±1.9
	30	99.0±5.3	0.255±0.030	52.8±3.5	45.2±3.7
脂质浓度/(mg/mL)	5	115.7±5.1	0.289±0.023	57.1±3.2	41.4±3.3
	10	122.2±2.7	0.213±0.018	65.0±2.3	55.4±2.9
	15	132.6±3.5	0.153±0.006	74.6±2.3	64.0±2.3
	20	151.5±4.6	0.225±0.017	70.7±2.8	65.8±2.4
水化时间/min	0.5	162.2±7.0	0.310±0.029	59.8±4.0	51.3±3.0
	1.0	127.1±4.3	0.165±0.005	74.5±2.4	64.1±2.2
	1.5	132.8±4.8	0.175±0.012	71.8±3.0	58.8±3.0
	2.0	124.4±3.8	0.193±0.015	72.9±2.6	58.5±2.6
水化温度/℃	40	279.3±9.5	0.354±0.050	51.5±3.5	33.8±4.1
	45	210.5±7.7	0.271±0.022	69.0±3.8	65.2±3.7
	50	133.2±3.7	0.160±0.006	74.8±2.0	64.3±2.1
	55	90.9±4.7	0.272±0.031	65.9±3.8	53.3±3.8

EETAS+0.5×EEPNS 计算综合包封率,并作为响应值。根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,采用 Design-Expert 软件设计 3 因素 3 水平响应面优化实验。共包含 17 个实验点(其中 12 个为析因点,5 个为中心零点以评估实验误差)。实验设计与结果见表 3—4。

表 3 实验因素与水平设计

Table 3 Design of experimental factors and levels

水平	X_1	X_2	X_3
-1	6:1	45	1:15
0	9:1	50	1:20
+1	12:1	55	1:25

表 4 实验设计与结果

Table 4 Experimental design and corresponding results

实验号	X_1	X_2	X_3	Y
1	6:1	45	1:20	59.65
2	6:1	55	1:20	56.35
3	12:1	45	1:20	55.95
4	12:1	55	1:20	52.45
5	6:1	50	1:15	62.00
6	6:1	50	1:25	57.95
7	12:1	50	1:15	58.05
8	12:1	50	1:25	54.50
9	9:1	45	1:15	66.35
10	9:1	45	1:25	63.35
11	9:1	55	1:15	64.25
12	9:1	55	1:25	60.40
13	9:1	50	1:20	70.85
14	9:1	50	1:20	70.35
15	9:1	50	1:20	68.35
16	9:1	50	1:20	69.10
17	9:1	50	1:20	69.95

2.5.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert 13.0 软件,以 Y 为响应值, X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量,进行二次多项式回归拟合。回归方程为: $Y=69.72-1.88X_1-1.48X_2-1.81X_3-0.05X_1X_2+0.13X_1X_3-0.21X_2X_3-9.54X_{12}-4.08X_{22}-2.05X_{32}$ 。方差分析结果表明,回归模型 $P<0.0001$,失拟项不显著($P>0.05$),且决定系数 $R^2=0.992$,说明模型拟合良好,未发现明显的失拟因素。此外, X_1 、 X_2 、 X_3 对 Y 均具有极显著影响($P<0.01$),各因素之间的交互作用不显著($P>0.05$),且各因素对响应值均具有极显著的二次效应($P<0.01$),详见表 5。以综合包封率为评价指标的各因素交互作用响应图,详见图 2。利用 Design-Expert 13.0

软件对上述建立的数学模型进行综合分析,在保证响应值 Y 最大的前提下,最终确定了各因素的最佳取值:磷脂胆固醇比 7.6:1、水化温度 48 ℃、药脂比 1:23。

表 5 回归模型方差分析结果

Table 5 ANOVA for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	577.39	9	64.15	101.01	<0.0001
X_1	28.13	1	28.13	44.28	0.0003
X_2	17.55	1	17.55	27.64	0.0012
X_3	26.10	1	26.10	41.09	0.0004
失拟项	0.46	3	0.15	0.15	0.9224
残差	4.45	7	0.64	—	—

2.5.3 最优处方工艺的验证 按上述优化后的处方参数,采用薄膜分散-超声法,以磷脂与胆固醇质量比 7.6:1、药脂质量比 1:23 称取相应原辅料,加入三氯甲烷-甲醇(3:1, v/v)充分溶解,于 45 ℃水浴条件下减压旋转蒸发至溶剂完全挥干,瓶壁上形成均匀的脂质薄膜。精密加入含药纯化水,于 48 ℃水浴下常压旋转水化 1 h,随后置于冰水浴中经超声波细胞破碎机探头超声处理,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得最优处方的 Bor-TAS/PNS-Lip 混悬液。按此条件平行制备 3 批样品并测定包封率,结果显示,TAS 与 PNS 的平均包封率分别为 75.37%±2.31%和 63.37%±1.86%,计算得综合包封率平均值为 69.87%($n=3$),与模型预测的理论值 69.72%($n=3$)较为接近,相对偏差低于 3%。以上结果表明,所建立的 Box-Behnken 响应面模型预测性良好,优化得到的处方工艺稳定、合理且可行。

2.6 Bor-TAS/PNS-Lip 的理化性质表征及体外评价

2.6.1 透射电子显微镜观察 在室温下观察按最佳工艺制备得到的 Bor-TAS/PNS-Lip 混悬液,其外观澄清透明,呈淡蓝色乳光。取该脂质体溶液适量,滴加于有碳支持膜的铜网上,静置 5 min 后用滤纸吸去边缘多余液体,随后滴加 2%磷钨酸溶液负染 2 min。用滤纸吸干多余染液,室温干燥后,置于透射电子显微镜下观察脂质体的微观形态。结果显示,Bor-TAS/PNS-Lip 呈规则的球形。详见图 3。

2.6.2 粒径、PDI 与 Zeta 电位的测定 取 Bor-TAS/PNS-Lip 适量,用马尔文粒度测定分析仪于 25 ℃下

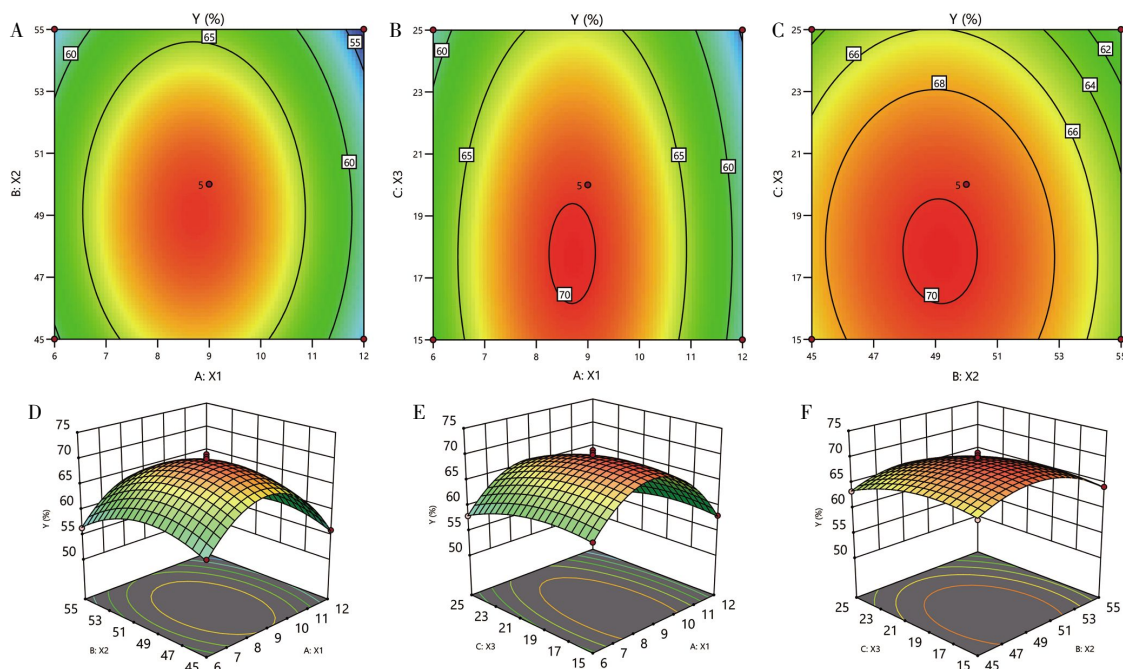


图 2 各因素间相互作用的响应图

Fig.2 Response surface plots showing the interactions among different factors

注:A、D为 X_1 与 X_2 的交互作用;B、E为 X_1 与 X_3 的交互作用;C、F为 X_2 与 X_3 的交互作用。

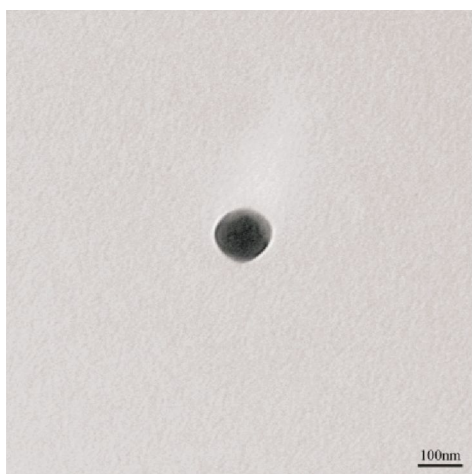


图 3 Bor-TAS/PNS-Lip 的射电子显微镜图

Fig.3 TEM micrographs of Bor-TAS/PNS-Lip

测定其粒径、PDI 及 Zeta 电位。平行测定 3 次,结果表明该最优脂质体的平均粒径为 $(131.8 \pm 2.8) \text{ nm}$,多分散系数为 0.17 ± 0.05 ,表明其粒度分布较窄、体系均匀;Zeta 电位为 $(-22.93 \pm 0.81) \text{ mV}$ 。适度的表面负电荷有利于通过静电排斥作用维持脂质体在溶液中的物理稳定性。

2.6.3 体外释放性能考察 体外释放性能考察采用透析扩散法^[13]测定 Bor-TAS/PNS-Lip 与游离 TAS/PNS 混合液的释放行为。精密量取各样品 2 mL,分别装入透析袋(截留分子量:10 kDa),置于含 100 mL

PBS($\text{pH}=7.4$)释放介质的恒温振荡器中, 37°C ,振荡转速 100 r/min。按设定时间点(0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48 h)取出 1 mL 释放介质,用甲醇破乳后立即补加等体积 37°C PBS。采用“2.1.1”测定 TAS 与 PNS 浓度,并计算累积释放率($Q\%$),公式如下。以累积释放率(Q)对时间(t)绘制曲线并进行方程拟合,见表 6、图 4。结果显示,游离 TAS 与 PNS 溶液在 12 h 时累积释放率已分别达 $97.84\% \pm 0.24\%$ 与 $99.12\% \pm 0.13\%$,呈明显突释特征;而 Bor-TAS/PNS-Lip 在 12 h 时 TAS 与 PNS 的累积释放率分别为 $68.44\% \pm 0.19\%$ 与 $76.29\% \pm 0.11\%$;48 h 后 Bor-TAS/PNS-Lip 中 TAS 与 PNS 的累积释放率分别为 $87.53\% \pm 0.09\%$ 和 $93.43\% \pm 0.04\%$,达到最大累积释放率。相比于游离药物溶液,Bor-TAS/PNS-Lip 表现出明显的缓释特性。此外,根据表 6 的拟合结果可知,Bor-TAS/PNS-Lip 中两种成分的释放行为均更符合 Higuchi 动力学模型(R^2 分别为 0.947 与 0.996),具有优良的缓释控释性能。

$$Q\% = (V_{\text{补}} + \sum_{i=1}^{n-1} C_i + C_n V_{\text{总}}) / M \times 100\%$$

式中 $V_{\text{补}}$ 表示释放介质补加的体积(mL); $V_{\text{总}}$ 表示释放介质的总体积(mL); C_i 表示第 i 次取样时释放介质中药物的浓度($\mu\text{g/mL}$); C_n 表示第 n 次取样

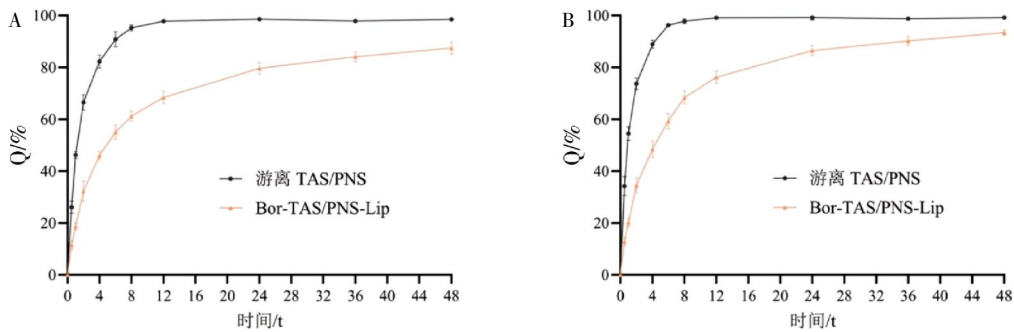


图 4 Bor-TAS/PNS-Lip 中 TAS 和 PNS 的体外累积释放曲线

Fig.4 *In-vitro* cumulative release profiles of TAS and PNS from Bor-TAS/PNS-Lip

表 6 Bor-TAS/PNS-Lip 中 TAS 和 PNS 体外释放动力学模型拟合结果

Table 6 *In vitro* release kinetic model fitting results of TAS and PNS from Bor-TAS/PNS-Lip

拟合方程	TAS		PNS	
	游离 TAS/PNS	Bor-TAS/PNS-Lip	游离 TAS/PNS	Bor-TAS/PNS-Lip
零级方程	$Q=1.237t+58.29$	$Q=1.508t+31.29$	$Q=1.169t+60.22$	$Q=1.624t+33.33$
	$R^2=0.342$	$R^2=0.643$	$R^2=0.313$	$R^2=0.647$
一级方程	$\ln(100-Q)=-0.324t+4.23$	$\ln(100-Q)=-0.069t+4.36$	$\ln(100-Q)=-0.359t+4.18$	$\ln(100-Q)=-0.077t+4.39$
	$R^2=0.939$	$R^2=0.905$	$R^2=0.918$	$R^2=0.924$
Higuchi 方程	$Q=39.52t^{1/2}+4.19$	$Q=17.36t^{1/2}+4.75$	$Q=35.43t^{1/2}+9.47$	$Q=25.21t^{1/2}-1.85$
	$R^2=0.969$	$R^2=0.947$	$R^2=0.936$	$R^2=0.996$

时释放介质中药物的浓度(μg/mL);*M* 表示传递中药物的含量(μg)。

2.6.4 溶血性评价 依据《中华人民共和国药典》(2025 年版四部)^[14]通则关于静脉注射制剂溶血与凝聚检查的方法,考察 Bor-TAS/PNS-Lip 及空白脂质体(Lip)对红细胞的溶血情况,为后续静脉给药提供依据。取洁净透明试管 18 支,分为 3 组,每组 9 支,编号,每组 1~6 号管为供试品管,7 号管为阴性对照管,8 号管为阳性对照管,9 号管为供试品对照管。精密加入 2%兔红细胞悬液及相应样品溶液、生理盐水(阴性对照)和去离子水(阳性对照),轻轻混匀后,于(37±0.5)℃恒温箱中温育 30 min。温育结束后,使用紫外分光光度法测定上清液吸光度,根据吸光度计算溶血率。结果显示,Bor-TAS/PNS-Lip 的溶血率均低于 5%,与阴性对照差异不显著,符合药典对静脉注射制剂的安全要求,以上研究结果表明脂质体体系在体外具有良好的血液相容性。详见表 7。

2.6.5 体外细胞安全性评价 以 HT22 小鼠神经细胞为模型,采用 CCK-8 法和 LDH 释放实验评价空白脂质体的体外细胞相容性。将对数生长期 HT22 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后

表 7 溶血性实验设计和结果

Table 7 Experimental design and results of hemolysis test

实验号	Bor-TAS/PNS-Lip		Lip	
	吸光度	溶血率/%	吸光度	溶血率/%
1	0.049	0.48	0.047	0.16
2	0.049	0.48	0.049	0.48
3	0.048	0.32	0.048	0.32
4	0.049	0.48	0.047	0.16
5	0.050	0.64	0.050	0.64
6	0.051	0.79	0.052	0.95
7	0.046	0.00	0.046	0.00
8	0.685	100.00	0.696	100.00

加入不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 和 2.0 mg/mL)的空白脂质体溶液,培养 24 h 后采用 CCK-8 法检测细胞吸光度(optical density, OD),计算细胞存活率;同时收集细胞培养上清液,按照 LDH 检测试剂盒说明书检测 LDH 释放水平,以评价细胞膜损伤情况。结果显示,空白脂质体作用 24 h 后,HT22 细胞存活率在 0.1~2.0 mg/mL 浓度范围内均保持较高水平,与对照组相比无明显降低($P>0.05$);LDH 释放实验结果表明,在 0.1~1.2 mg/mL 浓度范围内,各组 LDH 水平与对照组相比无显著差异($P>0.05$),提示空白脂质体未引起明显细胞膜损伤。详见图 5。

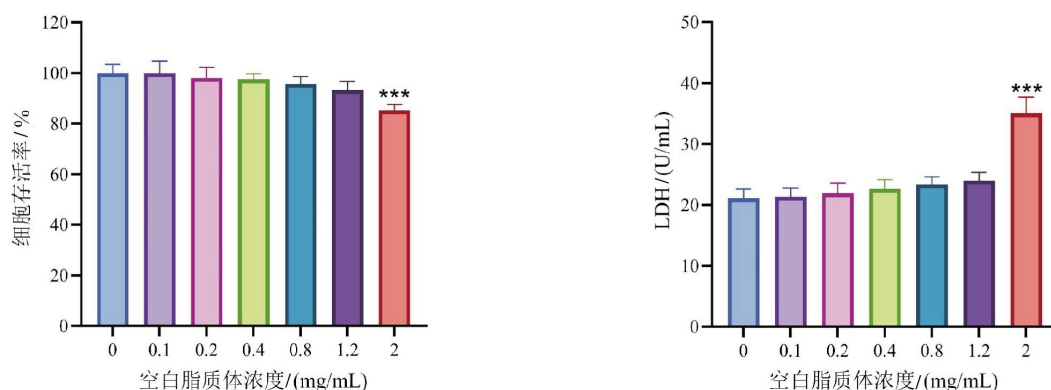


图 5 空白脂质体对 HT22 细胞安全性的影响

Fig.5 Effects of blank liposomes on the safety of HT22 cells

注:与 0 mg/mL 比较,*** $P<0.001$ 。

综上所述,所制备的空白脂质体在 0.1~1.2 mg/mL 浓度范围内表现出良好的细胞相容性,未造成明显细胞活力下降及膜损伤,为后续 Bor-TAS/PNS-Lip 制剂的体外研究及安全性评价提供实验依据。

3 讨论

中药复方制剂中活性成分组成复杂,建立准确可靠的含量测定方法是制剂质量控制的重要基础。TAS 和 PNS 的主要活性成分均属于三萜皂苷类化合物,结构中缺乏强紫外吸收发色团,采用紫外检测器测定时易受到流动相与杂质峰干扰,从而影响测定结果的准确性。蒸发光散射检测器属于质量型通用检测器,不依赖化合物紫外吸收特性,适用于皂苷类成分的分析测定。白雁等^[15]采用 HPLC-ELSD 法测定盾叶薯蓣中皂苷类成分含量,证明该方法具有良好的专属性和重复性。本研究建立的 HPLC-ELSD 方法能够同时测定 TAS 和 PNS 含量,且方法学考察结果显示线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率均符合分析要求,可满足 Bor-TAS/PNS-Lip 质量评价及包封率测定的需要。

脂质体的形成与稳定性受磷脂组成、胆固醇含量以及药物性质等多种因素共同影响^[16]。胆固醇是维持脂质双分子层稳定的重要组成部分,适量胆固醇能够降低膜流动性并增强膜刚性,从而减少药物渗漏,而过量胆固醇则可能影响药物包载能力^[17]。本研究单因素及响应面分析结果表明,磷脂胆固醇比、水化温度及药脂比均对包封率产生显著影响,其中磷脂胆固醇比约为 9:1 时获得了较高的综合包封率。TAS 具有一定脂溶性,更易嵌入脂质双分子层

中;PNS 则具有较好的亲水性,主要分布于脂质体内水相,因此形成了“膜-腔协同载药”模式,在适宜药脂比条件下可同时获得较高的包封效率。Tong 等^[18]研究发现,冰片负载的脂质体不仅能够提高脑靶向递送能力,同时对纳米载体稳定性具有积极作用。本研究中冰片的加入未影响脂质体形成,所得制剂粒径分布均匀、Zeta 电位稳定,提示冰片与脂质膜体系具有良好的相容性。

药物释放行为及生物相容性是评价纳米递药系统应用潜力的重要指标。脂质体包载后,药物需先从脂质双分子层或内水相扩散释放,再进入外部介质,因此通常表现出一定的缓释特征^[19]。本研究体外释放结果显示,Bor-TAS/PNS-Lip 相较游离药物呈现一定的缓释特征,能在较长时间内维持药物持续释放。纳米制剂进入血液循环后可能与红细胞发生相互作用,因此其血液相容性尤为重要。本次结果显示,Bor-TAS/PNS-Lip 的溶血率均低于 5%,符合《中华人民共和国药典》^[14]对静脉给药制剂的要求。HT22 细胞安全性评价进一步结合 CCK-8 法及 LDH 释放实验进行分析。结果显示,在 0.1~1.2 mg/mL 浓度范围内,空白脂质体处理后细胞活率无明显下降,同时 LDH 释放水平未出现显著升高,表明该脂质体载体未引起明显细胞膜损伤,具有良好的细胞相容性,为后续体内应用奠定了基础。

综上所述,本研究成功构建了冰片负载黄芪三七总皂苷共载脂质体,并建立了稳定可靠的质量评价方法。所得脂质体具有较高的包封率、适宜的粒径、良好的稳定性及体外安全性,为冰片辅助型中药复方脂质递药系统的构建提供了实验基础。由于本

研究尚未开展体内脑组织分布及脑靶向评价实验,后续研究将结合缺血性脑卒中动物模型,进一步评价其体内分布特征、脑部递送效率及神经保护作用,并深入阐明其发挥抗脑缺血效应的分子机制。

参考文献

- [1] 欧阳波, 刘晓丹, 杨筱倩, 等. 冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷通过 Notch 信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤模型的神经保护作用[J]. 中草药, 2020, 51(23): 5990–5997.
- [2] 欧阳波, 刘晓丹, 杨筱倩, 等. 冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤神经元的保护作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(10): 1210–1215.
- [3] Costa I M, Lima F O V, Fernandes L C B, et al. Astragaloside IV supplementation promotes a neuroprotective effect in experimental models of neurological disorders: A systematic review[J]. Current Neuropharmacology, 2019, 17(7): 648–665.
- [4] Wu J, Chen X, Lin X, et al. Protective effects of Panax notoginseng saponins on cerebral ischemia/reperfusion injury: Insights into SIRT1/NRF2/HO-1 pathway activation[J]. Physiological Research, 2025, 74(2): 313–326.
- [5] Li L, Gan H Y, Jin H Q, et al. Astragaloside IV promotes microglia/macrophages M2 polarization and enhances neurogenesis and angiogenesis through PPAR γ pathway after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. International Immunopharmacology, 2021, 92: 107335.
- [6] 张建平, 储利胜, 陶水良, 等. 黄芪甲苷和三七总皂苷配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠海马 NSCs 的保护作用[J]. 中成药, 2017, 39(11): 2372–2376.
- [7] 徐思思. 再灌注治疗后脑出血转化危险因素分析及黄芪三七的干预实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [8] 张谦, 王斯柔, 黄志华. 纳米药物递送系统在缺血性脑卒中治疗中的研究进展[J]. 生理科学进展, 2024, 55(3): 199–206.
- [9] Zheng Q, Chen Z X, Xu M B, et al. Borneol, a messenger agent, improves central nervous system drug delivery through enhancing blood–brain barrier permeability: A preclinical systematic review and meta-analysis[J]. Drug Delivery, 2018, 25(1): 1617–1633.
- [10] 赵洋洋, 郭玉洪, 黄汕梅, 等. 冰片引经作用的探讨及其分子机制研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 150–155.
- [11] 邢宇, 李雄, 于颖. 银杏内酯 B 脂质体的处方与制备工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 697–703.
- [12] 张艺, 杭太俊, 宋敏. 载药脂质体包封率测定方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(2): 245–252.
- [13] 宋波, 黄莺, 郭盈杉. 脂质体体外释放行为评价方法研究进展[J]. 医药导报, 2023, 42(3): 384–389.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2025 年版四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
- [15] 白雁, 左春芳, 谢彩侠, 等. HPLC–ELSD 测定盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 84–86.
- [16] Nsairat H, Ibrahim A A, Jaber A M, et al. Liposome bilayer stability: Emphasis on cholesterol and its alternatives[J]. Journal of Liposome Research, 2024, 34(1): 178–202.
- [17] Kaddah S, Khreich N, Kaddah F, et al. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 113: 40–48.
- [18] Tong Z R, Jie X L, Chen Z W, et al. Borneol and lactoferrin dual-modified crocetin-loaded nanoliposomes enhance neuroprotection in HT22 cells and brain targeting in mice[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 276: 116674.
- [19] D'Souza S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms[J]. Advances in Pharmaceutics, 2014, 2014: 304757.

(本文编辑 田梦妍)