

花旗松素-磷脂/胆盐/聚维酮-K30 胶束的构建及对酒精性肝损伤的保护作用

张诗雨¹, 孙敬蒙², 李冬冬¹, 张欣¹, 张佳慧¹, 张炜煜^{1*}

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117; 2. 吉林大学第一医院临床药学部, 吉林 长春 130061)

摘要: 花旗松素 (taxifolin, Tax) 已被证实可作为药食同源的可食用物质, 具有保护酒精性肝损伤作用, 然而其亲水性和渗透性均较差, 阻碍了 Tax 的临床应用。本研究制备了花旗松素-磷脂/胆盐/聚维酮-K30 (taxifolin-phosphatidylcholine/sodium deoxycholate/PVP-K30 micells, Tax-MLs) 纳米胶束, 采用 Box-Behnken 试验得到最佳制备工艺, 以透射电镜、傅里叶红外光谱等对 Tax-MLs 进行表征; 测定临界胶束浓度、平衡溶解度及油水分配系数等理化参数, 并通过体外消化模拟试验探讨 Tax-MLs 的释放规律; 酒精性肝损伤模型探讨 Tax-MLs 的体内药效。结果显示, Tax-MLs 的平均粒径、多分散性指数及 zeta 电位分别为 36.90 ± 4.57 nm、 0.194 ± 0.01 及 -32.6 ± 0.35 mV, 透射电镜观测到 Tax-MLs 呈现大小均一, 分布均匀的类型球形, 差式扫描量热分析和傅里叶红外光谱等证明 Tax-MLs 的形成; 理化性质方面, Tax-MLs 相较于 Tax 在水中的溶解度提高了 92.02 倍, 其在水中的油水分配系数也从 0.43 增加到 1.14, 证明 Tax-MLs 能够提高其溶解度及渗透性; 体内药效学结果显示, 与 Tax 组相比, Tax-MLs 低、中、高剂量组肝脏指数及血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶水平显著降低 ($P < 0.05$), 增强肝组织中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽活性, 降低丙二醛水平的效果更明显。Tax-MLs 有效提高了药物的溶解度和渗透性, 并增强了对酒精性肝损伤的保护作用。本研究体内动物实验得到了长春中医药大学动物伦理委员会的批准 (批准号: 2023601)。

关键词: 花旗松素; 纳米胶束; 制备工艺; 酒精性肝损伤; 表征

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0488-10

Construction of Tax-PC/SDC/PVP-K30 micelles and their protective effect on alcoholic liver injury

ZHANG Shi-yu¹, SUN Jing-meng², LI Dong-dong¹, ZHANG Xin¹, ZHANG Jia-hui¹, ZHANG Wei-yu^{1*}

(1. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, Hospital No. 1, Jilin University, Changchun 130061, China)

Abstract: Taxifolin (Tax) has been proved to be a medicinal edible substance with protective effects against alcoholic liver injury, however, its poor hydrophilicity and permeability have hindered the clinical application of Tax. In this study, we prepared taxifolin-phosphatidylcholine/sodium deoxycholate/PVP-K30 micelles (Tax-MLs). Box-Behnken test was used to obtain the optimal preparation process, and Tax-MLs were characterised by transmission electron microscopy and fourier transform infrared spectroscopy. Physicochemical parameters such as proximate micelle concentration, equilibrium solubility and oil-water partition coefficient were determined, and the release pattern of Tax-MLs was investigated by *in vitro* digestion simulation. Alcoholic liver injury model to explore the *in vivo* efficacy of Tax-MLs. The results showed that the average particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of Tax-MLs were 36.90 ± 4.57 nm, 0.194 ± 0.01 and -32.6 ± 0.35 mV, respectively, and the uniform size

收稿日期: 2024-08-08; 修回日期: 2024-11-29.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202201ZYTS628); 研究生精品示范课程建设创新示范项目“新型给药系统专论” (2022JP06).

*通讯作者 E-mail: weiyuzhang2003@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0758

and distribution of Tax-MLs were observed by transmission electron microscopy. The formation of Tax-MLs was proved by differential scanning calorimetry and fourier transform infrared spectroscopy. In terms of physicochemical properties, the solubility of Tax-MLs in water increased by 92.02 times compared with Tax, and its oil-water partition coefficient in water increased from 0.43 to 1.14, which proved that Tax-MLs could improve its solubility and permeability. The *in vivo* pharmacodynamic results showed that compared with the Tax group, Tax-MLs low, medium and high dose groups showed a significant reduction in liver indices and serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) ($P < 0.05$), and enhanced the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH), and lowered the levels of malondialdehyde (MDA) more significantly in the hepatic tissues. Tax-MLs effectively improved drug solubility and permeability, and enhanced the protective effect against alcoholic liver injury. Animal experiments were conducted with approval from the Animal Ethics Committee of Changchun University of Traditional Chinese Medicine (approval number: 2023601).

Key words: taxifolin; micelle; preparation process; alcoholic liver injury; characterization

长期饮酒导致的酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化等是目前世界上常见的肝脏疾病,是肝脏损伤的主要危险因素之一^[1,2]。当酒精摄入超过肝脏酒精代谢能力的范围,乙醇及乙醛的积累会导致肝脏的损伤^[3],其原因是摄入酒精后会降低机体抗氧化能力,诱导肝脏发生脂质过氧化进而损坏肝细胞,导致肝损伤疾病的发生^[4]。因此,具有抗氧化活性的物质能够减轻酒精引起的肝脏损伤。

花旗松素 (taxifolin, Tax) 又称紫叶杉素、二氢槲皮素^[5],是一种重要的二氢黄酮类化合物^[6],广泛存在于花旗松、落叶松、洋葱、橙子和葡萄中,因结构中具有两个手性碳、多个酚羟基结构^[7-9],使其具有较强的抗氧化作用^[10]、抗炎作用^[11]、保肝作用^[12]等,是食品、药品的常用成分^[13,14]。然而因其属于水溶性和渗透性均较差,致使药物生物利用度低,阻碍了花旗松素的临床应用^[15-17]。

胶束是一种具有疏水核和亲水壳的自组装纳米胶体颗粒,因其可以将难溶性药物包封在疏水内核内,目前已被广泛应用为水不溶性药物的药物载体,且与其他载药系统相比,纳米胶束更为稳定,故在药物递送系统中应用广泛^[18-20]。胆盐与磷脂可形成混合胶束,能够负载难溶性药物,可促进难溶性药物溶解,提高其跨上皮细胞能力,故被广泛用作水溶性、渗透性差的药物的载体材料^[21,22]。但因二者均是低分子型表面活性剂,形成胶束核较小,导致胶束包载药量少,因此加入高分子非离子型表面活性剂—聚维酮-K30 (polyvinylpyrrolidone K30, PVP-K30),以负载更多药物。Zhang等^[23]使用牛磺胆酸钠/P123混合胶束负载黄芩素,使其溶解度急剧增加(从 $53.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加至 $10.2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。在Wistar大鼠的肠道灌注实验中证实了黄芩素混合胶束系统的吸收率更高。此外,与黄芩素混悬液相比,经口服给药时,其混合胶束的 $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ 增加1.5倍, T_{max} 增加1.6倍^[24]。

Wu等^[25]构建的葛根素/大豆苷元混合胶束使降压效果显著提升。

本研究以改善水溶性和渗透性为目的,制备花旗松素-磷脂/胆盐/聚维酮K30 (taxifolin-phosphatidylcholine/sodium deoxycholate/PVP-K30 micells, Tax-MLs) 纳米胶束,并对其预防酒精性肝损伤作用进行研究,为后续提高Tax在临床上的使用提供理论基础。

材料与方法

材料 花旗松素 (20191208, 吉林健维天然生物科技有限公司); 花旗松素对照品 (111816-201102, 中国食品药品检定研究院); 脱氧胆酸钠 (牛)、聚维酮K30 (A28GS159030、20210726, 上海源叶生物科技有限公司); 大豆磷脂酰胆碱 (C10537755, 上海麦克林生化有限公司); 溴化钾、磷钨酸 (Q12GF-2019、202290529, 天津光复精细化工厂); 切片石蜡、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液套装、谷草转氨酶活性检测试剂盒、谷丙转氨酶活性检测试剂盒、超氧化物歧化酶测定试剂盒、丙二醛测定试剂盒、谷胱甘肽测定试剂盒 (YA0011、20230818、20230831、20230907、20230912、20230806、20230911, 北京索莱宝科技有限公司); 白酒 (20221209, 北京红星股份有限公司)。

仪器 超声波清洗器 (KQ200B, 昆山市仪器有限公司); 紫外可见分光光度计 (UV5100, 上海元析仪器有限公司); 数显恒温磁力搅拌器 (85-2, 常州江南实验仪器厂); 旋转蒸发器 (RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂); 高速台式离心机 (TGL-18C, 上海安亭科学仪器厂); 高效液相色谱仪 (Agilent 1200, 安捷伦科技有限公司); 傅里叶变换红外光谱、X射线衍射仪 (FT-IR-8400S、XRD-7000, SHIMADZU); 差示扫描量热仪 (DSC 3+, MEITLER TOLEDO); 透射电镜 (TECNAI SPIRIT, FEI); 粒径测定仪 (Nano-ZS, 马尔文帕纳科公

司); 酶标分析仪 (DR-200BS, 无锡华卫德朗仪器有限公司)。

动物 ICR 小鼠雄性 (体重 20 ± 5 g), 30 只, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号: SCXK (辽) 20230917050, 动物实验的研究方法获得长春中医药大学伦理委员会的批准, 且遵循《长春中医药大学实验动物管理条例》, 伦理批号为 2023601。

花旗松素-磷脂/胆盐/聚维酮 K30 纳米胶束的制备及基础处方 取 Tax、磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC)、脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate, SDC)、PVP-K30, 加入适量无水乙醇, 超声波溶解至澄清, 减压旋转蒸发, 室温常压下加入适量纯化水水化, 超声, 分散均匀, 即得 Tax-MLs 胶束。不加 Tax 其余步骤相同即得空白纳米胶束 (micells, MLs)。

Tax-MLs 制备工艺优化

HPLC 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm); 流动相为乙腈-水 (v/v, 30:70); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 290 nm; 流速: 1.0 mL \cdot min $^{-1}$; 进样量: 20 μ L。

标准曲线的建立 取适量花旗松素对照品, 加甲醇稀释至质量浓度为 1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 和 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的样品溶液, 0.22 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 按色谱条件进样分析, 并测定样品含量, 绘制标准曲线, 得回归方程, 横坐标为标准品质量浓度 (X), 纵坐标为峰面积 (Y)。Y = 47.974 X - 11.689, 相关系数 R 2 = 0.999 5。Tax 对照品质量浓度在 1.56~100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 内线性关系良好。

包封率 (encapsulation efficiency, EE)、载药量 (drug-loading rate, DL) 及渗漏率 (leak rate, LR) 的测定 根据离心过滤法^[26], 取 Tax-MLs 以 14 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液, 滤过, 即得 Tax-MLs, 加甲醇, 破坏 Tax-MLs 结构, 稀释适当倍数, HPLC 法测定, 根据公式 (1) (2) 分别计算 EE% 和 DL%。

$$EE\% = \frac{m_1}{m} \times 100\% \quad (1)$$

$$DL\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

其中, EE 为包封率; DL 为载药量; m 为花旗松素的总投药量; m $_1$ 为胶束中花旗松素的含量; m $_2$ 为纳米胶束总重。

另取 Tax-MLs 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内储存 48 h, 14 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液, 滤过, 取续滤液, 即得 Tax-MLs, 加甲醇, 破坏 Tax-MLs 结构, 稀释适当倍数, HPLC 法测定, 根据公式 (3) 计算 LR%。

$$LR\% = \frac{m_1 - m_{48}}{m_1} \times 100\% \quad (3)$$

其中, LR 为渗漏率; m $_{48}$ 为经 48 h 沉降后的纳米胶束中花旗松素含量; m $_1$ 为纳米胶束中花旗松素含量。

Box-Behnken (BBD) 响应面法优化试验 根据 Hassan 法^[27] 计算得到的总归一值 (overall desirability, OD) 作为工艺优化的评价指标, 采用数学转换计算归一值 (d), EE% 值和 DL% 值越大说明纳米胶束的包封及载药性能越好, LR% 值越小说明纳米胶束渗漏越少越稳定, 根据公式 (4) (5) 分别计算 d $_1$ 、d $_2$ 、d $_3$ 。

$$d_1 \text{ 或 } d_2 = \frac{Y_1 - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (4)$$

$$d_3 = \frac{Y_{\max} - Y_1}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (5)$$

其中, d $_1$ 、d $_2$ 、d $_3$ 分别是 Tax-MLs 的 EE%、DL% 及 LR% 的归一值; Y $_1$ 为各个处方的实测值; Y $_{\max}$ 和 Y $_{\min}$ 为各处方实际测得值中的最大值和最小值, 将各指标的 d 值根据公式 (6) 计算 OD。

$$OD = (d_1 \times d_2 \times d_3)^{1/3} \quad (6)$$

在单因素实验的基础上, 最终选择 Tax/PC+SDC+PVP-K30 质量比 (A)、PVP-K30/PC+SDC 质量比 (B)、PC/SDC 质量比 (C) 作为 BBD 实验的三个因素, 设定三个水平, 见表 1。

Table 1 Response surface experimental design and factor levels

Level	Factor		
	A	B	C
-1	1:3	1:1	1:2
0	1:4	2:1	1:1
1	1:5	3:1	2:1

验证实验 为验证最终工艺的可靠性, 按照 BBD 实验得到的最优制备工艺及处方, 制备 3 批 Tax-MLs, 比较实际 OD 值与预测 OD 值。

纳米胶束的表征分析

微观形态表征 将支持膜放在铜网上, 分别取稀释适当倍数后的空白胶束和 Tax-MLs 于支持膜上, 3% 磷钨酸染色 90 s, 干燥后将样品放置在样品架上, 于透射电镜下观察其微观形态。

粒径、zeta 电位、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 的测定 取 MLs、Tax-MLs 适量, 置于动态光散射仪样品池中, 测定 MLs、Tax-MLs 的粒径、zeta 电位及 PDI。

临界胶束浓度的测定 取适量尼罗红, 溶解于二氯甲烷中, 制成浓度为 1 μ mol \cdot L $^{-1}$ 的溶液, 置于 6 个棕色西林瓶中, 分别加入 20 μ L 上述溶液, 备用。制备空白胶束, 加纯化水稀释 SDC、PC、PVP-K30 这 3 种载体

质量浓度为0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 并分别将其加入至上述装有20 μL 尼罗红二氯甲烷溶液的棕色西林瓶中, 于避光条件下持续搅拌过夜, 使用酶标仪测定上述不同质量浓度纳米胶束的荧光强度, 设置激发波长为550 nm、发射波长为630 nm, 作图, 横坐标为纳米胶束的质量浓度, 纵坐标为不同质量浓度胶束的荧光强度, 两条切线的交点即为临界胶束浓度。

傅里叶红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析 采用KBr压片法将Tax、PC、SDC、PVP-K30、MLs冻干粉、Tax-MLs冻干粉分别与KBr以1:100比例研匀, 压片进行测定。

差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析 取Tax、PC、SDC、PVP-K30、MLs冻干粉、Tax-MLs冻干粉适量于坩埚中, 动态温度段的开始温度为25 $^{\circ}\text{C}$ 、结束温度为350 $^{\circ}\text{C}$ 、加热速率为每分钟升温10 $^{\circ}\text{C}$, N_2 流速为50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

X射线衍射法 (X-ray diffraction, XRD) 分析 采用检测条件为管流/管压 (20 mA/40 kV), 衍射范围 $3^{\circ} < 2\theta < 45^{\circ}$, 扫描速度 $8^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$ 分别对TAX、PC、物理混合物和Tax-MLs进行XRD分析。

纳米胶束理化性质的测定

平衡溶解度的测定 取过量Tax及Tax-MLs冻干粉分别加入到纯化水、pH 1.2盐酸溶液和pH 6.8磷酸缓冲溶液中, 涡旋混合10 min, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中, 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 连续振荡72 h, 在3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心10 min, 取上清液加甲醇稀释适当倍数, 0.22 μm 滤膜滤过, 进样测定, 计算Tax及Tax-MLs的平衡溶解度。

油水分配系数的测定 分别制备水、pH 1.2盐酸溶液、pH 6.8磷酸盐缓冲溶液与正辛醇的两相饱和溶液体系。取适量Tax、Tax-MLs分别加入上述不同水相饱和的正辛醇溶液中, 超声, 即得Tax、Tax-MLs正辛醇溶液。精密移取该溶液5 mL, 与5 mL正辛醇饱和不同水相溶液混合, 恒温水浴振荡 (37 $^{\circ}\text{C}$, 24 h), 离心 (转速: 3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 时间: 10 min), 分别取上层正辛醇溶液和下层水溶液并适当稀释后测定含量 (C), 根据公式 (7) 计算 $\text{Log}P$ 。

$$\text{Log}P = \text{Log} \frac{C_0}{C} \quad (7)$$

其中, C_0 上层为油相中的含量; C 为下层为水相中的含量。

体外释放研究 按表2的操作条件配置模拟胃液和模拟肠液, 分别取2 mL含有15 mg Tax的混悬液和含有15 mg Tax的Tax-MLs溶液, 与2 mL模拟胃液混合均匀, 调节pH至1.2 (1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸)后, 装入透析袋 (MWCO 3 500 Da), 并置于有100 mL释放介质 (乙醇

与不含胃蛋白酶的模拟胃液按1:1等体积混合)的锥形瓶内, 恒温振荡消化2 h, 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min终止消化。

Table 2 Simulated digestive solution composition and digestion conditions

Factor	Simulated gastric fluid	Simulated intestinal fluid
	pH = 1.2	pH = 7.0
Formation	2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl	6.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4
	3.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pepsin	1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Trypsin
	7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Bile acid salt
Conditional	37 $^{\circ}\text{C}$, 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 2 h	37 $^{\circ}\text{C}$, 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 h

取4 mL模拟肠液继续添加至含有上述混合物的透析袋中, 置于存有150 mL释放介质 (乙醇与不含胰蛋白酶的模拟肠液按1:1等体积混合)的锥形瓶中, 恒温振荡消化4 h; 全过程分别在10、30 min和1、2、3、4、5、6 h取适量释放介质, 并补充同温度同量的新鲜介质, 取样在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

Tax-MLs对酒精诱导的肝脏损伤的保护作用

动物模型建立与分组 参照文献^[28]方法并进行改良, 取30只雄性ICR小鼠, 明暗交替12 h, 适应性饲养7天, 期间保证自由饮水摄食, 适应性喂养后, 随机分为6组, 每组5只, 分别为正常组、模型组、Tax组、Tax-MLs低剂量组、Tax-MLs中剂量组、Tax-MLs高剂量组。其中Tax组的灌胃给药剂量为5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Tax-MLs低、中、高给药剂量分别为1、5、25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 正常组、模型组以等体积去离子水灌胃, 连续给药7天, 在最后一次给药4 h后, 除正常组外, 其余各组每只小鼠以56%食用酒精溶液14 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃, 连续3天, 建立急性酒精肝损伤模型。末次灌胃56%食用酒精后, 用乌拉坦麻醉, 摘眼球取血后离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 收集血清, 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$; 分离肝脏并称重, 部分肝脏固定于组织固定液中, 其余肝脏置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

肝指数的测定 将摘取的肝脏, 天平称重, 根据公式 (8) 计算肝脏指数。

$$\text{肝脏指数} (\%) = \frac{\text{湿肝质量}}{\text{体质量}} \times 100\% \quad (8)$$

生化指标分析 取血清, 严格按照试剂盒说明书操作步骤对血清中谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等活性进行测定。并使用EXCEL中 t 检验进行显著性分析。

病理组织学观察 取出肝脏后, 使用石蜡对肝脏标本进行包埋, 包埋后进行切片, 制备成薄片, 使用HE

进行染色后,将染色后的薄片标本制备成为玻片样本,在光学显微镜下进行观察分析。

数据处理 每个实验至少重复3次,结果表示为“平均值±标准差”,采用Origin 2019软件作图,Excel数据处理,统计差异通过单因素方差分析(ANOVA)确定,使用软件Design-Expert 12对响应面优化实验数据进行分析。

结果

1 Tax-MLs制备工艺优化

1.1 Box-Behnken 响应面试验 根据 Box-Behnken 响应面法,进行实验以得到最佳处方及制备工艺,结果见表3、图1,对数据进行分析结果可知,模型拟合 F 值为 13.97 ($P < 0.05$),失拟项 F 值为 4.11 ($P > 0.05$),表明所建模型可靠,可用于试验结果的分析,通过拟合得到的二次回归方程为: $OD = 0.874 0 - 0.147 5A - 0.136 2B + 0.103 8C + 0.010 0AB - 0.300 0AC + 0.112 5BC - 0.168 5A^2 - 0.173 2B^2 - 0.253 2C^2$ ($R^2 = 0.947 3$)。

方差分析表4显示,自变量 A 、 B 、 C 、 AC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对 OD 具有显著性,因此具有优化意义,最终通过软件分析优化得到最优处方为花旗松素/磷脂+胆盐+PVP-K30 质量比为 1:4、PVP-K30/磷脂+胆盐质量比为 2:3、

Table 3 Box-Behnken experimental design and results. EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug-loading rate; LR: Leak rate; OD: Overall desirability

No.	EE%	DL%	LR%	OD
1	72.05 ± 0.03	18.01 ± 0.01	0.57 ± 0.13	0.31
2	81.40 ± 0.04	16.28 ± 0.01	7.73 ± 0.28	0
3	98.61 ± 1.82	14.10 ± 0.26	7.36 ± 1.04	0
4	95.34 ± 2.05	13.63 ± 0.29	2.71 ± 0.91	0.26
5	72.05 ± 1.15	12.03 ± 0.19	20.19 ± 2.63	0.41
6	92.90 ± 0.56	13.28 ± 0.08	5.79 ± 3.78	0.52
7	87.70 ± 0.90	17.54 ± 0.18	2.01 ± 0.94	0.64
8	92.93 ± 1.62	23.23 ± 0.40	2.46 ± 0.12	0.83
9	82.93 ± 0.29	20.73 ± 0.07	3.52 ± 0.74	0.79
10	93.56 ± 3.42	18.71 ± 0.68	2.47 ± 0.28	0.77
11	90.49 ± 1.56	18.10 ± 0.31	0.78 ± 0.05	0.95
12	80.44 ± 0.49	16.09 ± 0.10	7.32 ± 0.02	0.67
13	90.05 ± 2.09	12.88 ± 0.30	2.74 ± 0.05	0.86
14	91.57 ± 1.03	18.31 ± 0.16	5.34 ± 0.17	0.6
15	96.53 ± 0.06	19.31 ± 0.13	2.27 ± 0.06	0.72
16	92.90 ± 1.12	18.58 ± 0.06	2.91 ± 0.25	0.87
17	97.39 ± 0.79	19.48 ± 0.12	4.67 ± 1.01	0.92

磷脂/胆酸钠质量比为 9:10, 预计 OD 值为 0.95。

1.2 最优处方验证实验结果 由表5可知,3批的 OD 值分别为 0.95、0.97、0.95, 平均 OD 为 $0.96 ± 0.1$, 相较预测值 0.95, 偏差 0.01, 偏差较小, 证明响应面法优化出 Tax-MLs 制备工艺条件重复性好, 模型可靠。

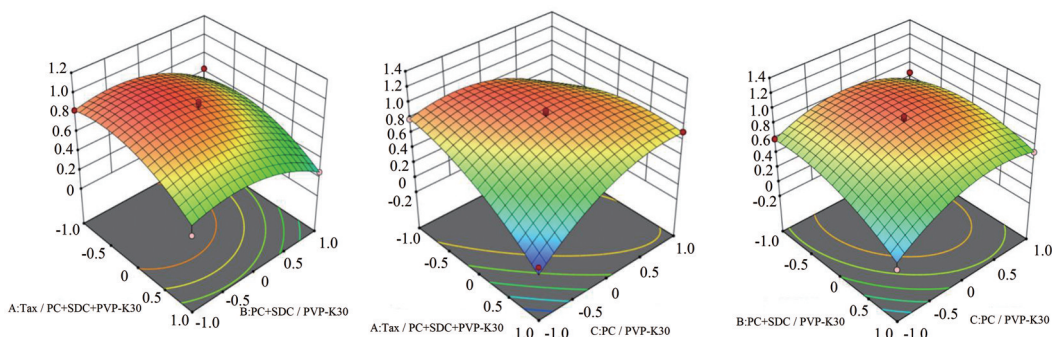


Figure 1 Three-dimensional response surface plots of factors on OD values

Table 4 ANOVA results for Box-Behnken design. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P > 0.05$

Source of variance	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F	P	Significance
Model	1.39	9	0.154 3	13.97	0.001 1	**
A	0.174 1	1	0.174 1	15.76	0.005 4	**
B	0.148 5	1	0.148 5	13.45	0.008 0	**
C	0.086 1	1	0.086 1	7.80	0.026 8	*
AB	0.000 4	1	0.000 4	0.036 2	0.854 5	
AC	0.360 0	1	0.360 0	32.60	0.000 7	**
BC	0.050 6	1	0.050 6	4.58	0.069 5	
A^2	0.115 7	1	0.115 7	10.48	0.014 3	*
B^2	0.126 4	1	0.126 4	11.45	0.011 7	*
C^2	0.270 0	1	0.270 0	24.46	0.001 7	**
Residual	0.077 3	7	0.011 0			
Misfit term	0.058 4	3	0.019 5	4.11	0.102 7	#
Pure error	0.018 9	4	0.004 7			
Total deviation	1.47	16				

Table 5 Examination results of the validation test

NO.	EE%	DL%	LR%	OD
1	95.16	19.20	1.26	0.95
2	96.63	19.42	1.45	0.97
3	95.97	19.31	1.54	0.95
Average	95.92	19.31	1.42	0.96

2 纳米胶束的表征分析

2.1 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 结果分析

实验结果如图2A所示, TEM下观察, MLs和Tax-MLs均为形态规整的类球形, 且无粘连聚集现象。

2.2 粒径、PDI与zeta电位的测定 Tax-MLs的平均粒径为 36.90 ± 4.57 nm (图2B)、PDI为 0.194 ± 0.01 及zeta电位分别为 -32.6 ± 0.35 mV。粒径、PDI均符合要求, zeta电位绝对值大于30 mV, 表明纳米胶束较稳定。

2.3 临界胶束浓度 图2C结果表明, Tax-MLs的临界胶束质量浓度为 $27.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明在质量浓度为 $27.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时即可形成胶束, 且临界胶束浓度较小, 表明Tax-MLs具有良好的稳定性及抗稀释能力。

2.4 FT-IR 分析 FT-IR 谱图如图3A所示, Tax中

3549 和 3396 cm^{-1} 属于Tax的-OH吸收特征峰; PC中 2926 和 2850 cm^{-1} 为脂肪酸酯- CH_2 -的不对称振动吸收峰, 1739 cm^{-1} 为C=O吸收峰, 465 、 1246 cm^{-1} 为P=O伸缩振动峰; SDC中 2939 和 2864 cm^{-1} 处的2个强吸收峰为C-H伸缩振动, 1560 、 1448 cm^{-1} 处的吸收峰为SDC中C=O的不对称和对称伸缩振动, 1043 、 619 cm^{-1} 处的吸收峰为C-OH的伸缩和C-H平面弯曲振动; PVP-K30中 1670 cm^{-1} 为C=O键的吸收峰, 3479 cm^{-1} 有一宽峰这是-OH的伸缩振动峰; PM中 3549 cm^{-1} 对应Tax的特征峰, 3390 cm^{-1} 峰形较宽为PVP-K30、SDC、Tax的特征峰, 2926 、 2854 cm^{-1} 为PC、SDC的C-H伸缩振动, 1741 cm^{-1} 为PC的C=O吸收峰, 1467 、 1253 cm^{-1} 为PC的P=O伸缩振动峰; MLs与Tax-MLs的各个特征峰相似, 二者均保留一定的PC、SDC、PVP-K30特征峰, 但峰形、峰位等发生了一定的改变且与物理混合物不同, PC的P=O特征峰移至 1560 、 1294 cm^{-1} , Tax的特征峰消失, 说明了Tax-MLs将Tax封装, 而不是单一的物理混合物。

2.5 DSC 分析 DSC分析实验结果如图3B所示, Tax在 $241.67 \text{ }^\circ\text{C}$ 时出现强吸热峰, PC在 128.33 、 $181.67 \text{ }^\circ\text{C}$

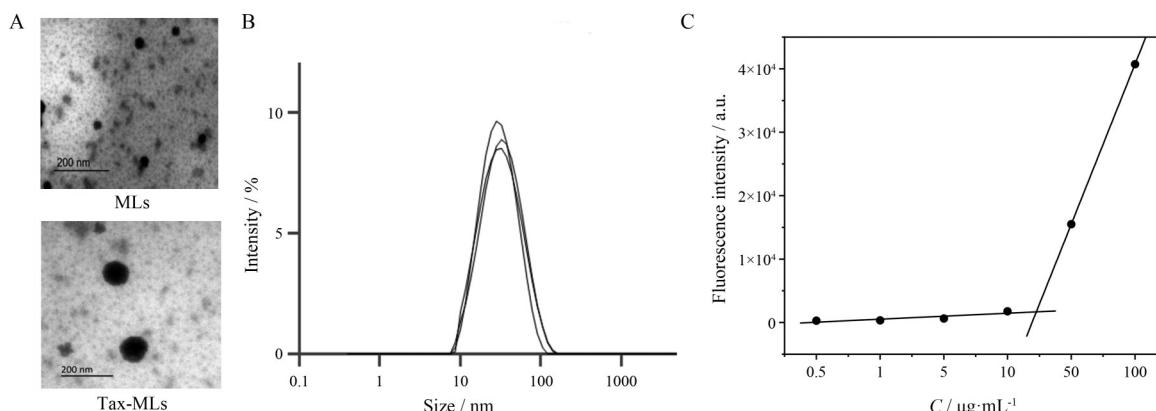


Figure 2 Characterisation of taxifolin-phosphatidylcholine/sodium deoxycholate/PVP-K30 micells (Tax-MLs). A: Results of transmission electron microscope for MLs and Tax-MLs (Scale bar: 200 nm); B: Particle size distribution of Tax-MLs ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$); C: Critical micelle concentration map

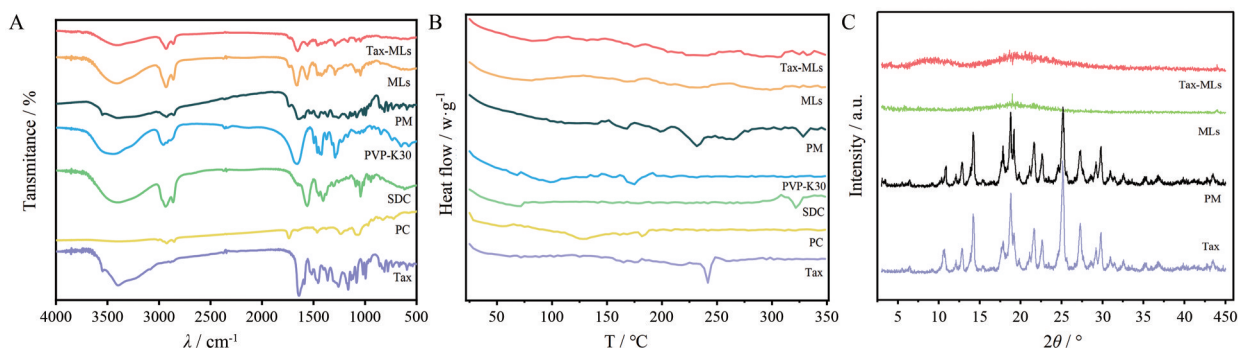


Figure 3 Characterisation of Tax-MLs. A: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) spectra of each substance; B: Differential scanning calorimetry (DSC) plots of each substance; C: X-ray diffraction (XRD) plots of each substance

出现吸热峰, SDC 在 321.67 °C 出现吸热峰, PVP-K30 的吸热峰在 168.33 °C, 在物理混合物中出现了明显的加成性, 168.33 °C 来自 PVP-K30, 328.33 °C 来自 SDC 贡献, 231.667 °C 时出现了 Tax 的特征吸热峰, 考虑为投入量的影响峰值变小, 而在空白胶束和载药胶束中均未出现该特征峰, 且呈现平稳的曲线, 显示了药物的非晶化, 推测在 Tax 与 PC、SDC、PVP-K30 之间可能存在氢键作用或范德华力等弱分子间相互作用, 使 Tax-MLs 形成。

2.6 XRD 分析 XRD 分析实验结果如图 3C 所示, Tax 存在明显的晶体衍射峰, 表明 Tax 是以结晶型存在的物质。物理混合物中具有与 Tax 晶体衍射峰相似的结构, 说明单纯的物理混合并不会影响 Tax 的结晶状态。而 Tax-MLs 中, Tax 的晶体衍射峰消失, 说明 Tax 已由结晶型转为无定型, 进一步验证了 Tax-MLs 的形成。

3 纳米胶束理化性质的测定结果

3.1 平衡溶解度的测定 将 Tax 制备成纳米胶束后, 在水中 Tax 的平衡溶解度由 0.650 ± 0.002 增加到 59.81 ± 1.020 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 提高了 92.02 倍; 在 pH 1.2 盐酸溶液中 Tax 的平衡溶解度由 0.588 ± 0.014 增加到 26.90 ± 2.600 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 提高了 45.75 倍; 在 pH 6.8 磷酸缓冲溶液中 Tax 的平衡溶解度由 0.992 ± 0.010 增加到 70.82 ± 1.340 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 提高了 71.45 倍, 初步表明制成纳米胶束后能够提高 Tax 的平衡溶解度。

3.2 油水分配系数的测定 Tax 在水、pH 1.2 盐酸溶液和 pH 6.8 磷酸溶液中的 Log*P* 值分别 0.43、0.40 和 0.24; 制成 Tax-MLs 后, 其脂溶性得到明显提高, Log*P* 值分别为 1.14、1.12、1.85。Log*P* > 1 适宜药物的胃肠道吸收, 而 Tax-MLs 的 Log*P* 值均大于 1, 初步表明纳米胶束能够提高药物渗透性, 实现改善药物吸收能力的目的。

4 体外模拟消化释放结果

为探究 Tax 和 Tax-MLs 在胃肠道的释放过程, 研究设定胃部模拟消化时间为 2 h, 选取 5 个节点 5、15、30 min 和 1、2 h 检测它们的累积释放率。经过 2 h 胃部消化, 实验结果如图 4 所示, Tax 和 Tax-MLs 的累积释放率分别为 $(25.78 \pm 1.98)\%$ 和 $(15.14 \pm 1.47)\%$, 结果表明, 胃部的吸收效率相对较低, Tax-MLs 的释放速率小于 Tax, 这可能是由于将 Tax 制成纳米胶束后, Tax 存在于胶束的疏水内核, 能够使其在胃蛋白酶的作用下逐渐释放, 故 Tax-MLs 的释放速率在胃中较 Tax 缓慢。而在肠道消化环境中, 4 h 内的模拟消化过程中, Tax 和 Tax-MLs 的释放行为发生了显著变化。在 1、2、3 和 4 h 的检测中, 它们的释放率明显提升, 表明大部分药物在

肠道内被吸收, 与前面关于 Tax 吸收机制的研究相吻合。Tax-MLs 在肠道消化中的表现优于 Tax, 因为其纳米胶束在胰蛋白酶和 SDC 的协同作用下迅速解体, 释放药物的速度加快。同时, 肠道中的脂质成分如 PC 有助于加速药物的消化过程。最终, Tax 和 Tax-MLs 在肠道内累积的释放率分别达到了 $(63.24 \pm 2.34)\%$ 和 $(89.46 \pm 1.72)\%$ 。综上, Tax 主要在肠道消化, Tax-MLs 弱化了药物在胃部吸收过程但提高了药物在肠道部位的定位释放, 从而达到优化 Tax 吸收的效果。

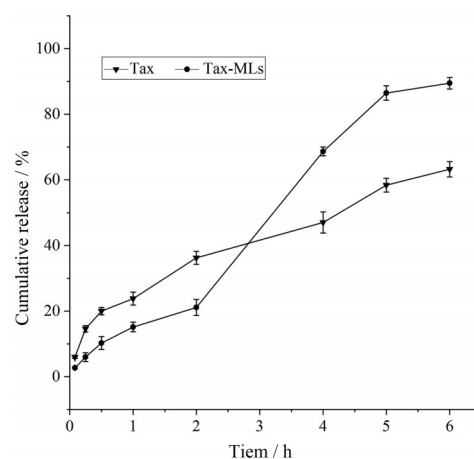


Figure 4 Release of Tax, Tax-MLs in simulated gastro-small intestinal digestive fluids

5 Tax-MLs 对酒精诱导的肝脏损伤的保护作用

5.1 肝脏指数测定结果 肝脏指数试验结果如图 5A 所示, 模型组小鼠肝脏指数明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 说明酒精诱导了小鼠的肝损伤; 与模型组相比, Tax 组、Tax-MLs 低、中、高剂量组均能显著降低肝指数, 与 Tax 组相比, Tax-MLs 低、中、高剂量组降低肝指数的效果具有显著性 ($P < 0.01$), 能够减轻酒精对肝脏的损伤, 且 Tax-MLs 低剂量组也能显著降低肝指数 ($P < 0.05$)。

5.2 生化指标分析结果 生化指标分析研究表明, 肝细胞在受损的情况下会减少白蛋白的合成, 引起 ALT、AST 水平的上升, 所以在本实验中, 对 ALT、AST 在小鼠血浆中的表达水平进行了测定。结果如图 5B、C 所示, 表明模型组小鼠 ALT 及 AST 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 说明酒精诱导了小鼠的肝损伤, 与模型组相比, Tax 组、Tax-MLs 低、中、高剂量组均能显著降低 ALT 及 AST 值, 且与 Tax 组相比, Tax-MLs 低、中、高组效果具有显著性, 高剂量效果小于中剂量, 可能是由于在一定范围内 Tax 预防小鼠酒精性肝损伤效果最佳。故将 Tax 制成纳米胶束后保护肝脏损伤的效果更佳。

为反映清除自由基和抗氧化的能力, 本研究测定

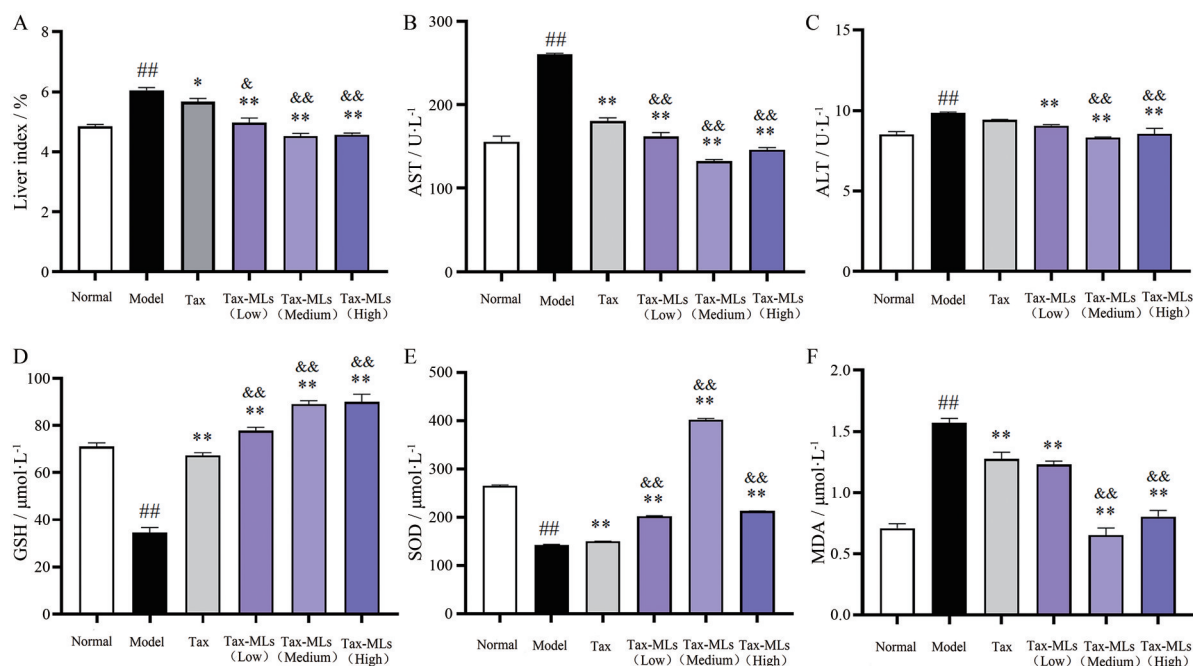


Figure 5 Effect of Tax-MLs on alcoholic liver injury in mice. A: Liver index of mice in different groups; Expression of AST (B), ALT (C), GSH (D), SOD (E), and MDA (F) in plasma of different groups of mice. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs normal group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$ vs Tax group

了调节细胞内氧化还原反应的GSH活性、能够清除体内活性氧自由基的SOD活性及自由基作用于脂质发生过氧化反应的产物MDA活性,结果如图5D~F所示。研究表明,模型组小鼠的MDA指标高于正常组,GSH和SOD指标低于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$),对小鼠进行不同干预后,与模型组比较,小鼠血浆GSH含量显著提高,与Tax组相比,Tax-MLs低、中、高剂量组的小鼠肝脏GSH含量显著提高;与模型组相比Tax组,Tax-MLs组均对小鼠血清中SOD含量可显著提高,其中Tax-MLs中剂量组对小鼠血清中SOD含量降低效果最为显著;与模型组相比Tax组、Tax-MLs低剂量组对小鼠血清MDA含量可显著降低,Tax-MLs中、高剂量组对小鼠血清中MDA含量降低更为显著。

综上所述结果表明,Tax对小鼠酒精肝损伤有一定的保护作用,提示Tax可提升肝损伤中的抗氧因子水平,其保肝作用可能与调节肝组织中的氧化应激水平有关。将其制备成纳米胶束后,治疗效果更好,且效果显著好于Tax组,可能是由于制成纳米胶束后有较小的粒径,使Tax的溶解度显著提高,且选用的胆酸盐能够促进肠道渗透,进一步提高药物的渗透性,从而达到提高生物利用度的目的。

5.3 小鼠肝脏的病理改变 小鼠肝脏组织观察结果如图6所示,正常小鼠肝组织具有完整清晰的结构,且

其细胞形态规则无凋亡,这与正常组的形态吻合,而模型组中可以看到明显的炎性浸润,肝脏组织结构被破坏,Tax组、Tax-MLs低、中、高剂量组肝脏细胞的破坏得到缓解,且Tax-MLs低、中、高剂量组均与Tax组相比效果更为显著,值得注意的是当Tax-MLs为低剂量时就可达到比Tax组更好的效果,Tax-MLs中剂量组完全消失,肝组织炎性细胞浸润和脂肪样病变程度较模型度和预测程度都较理想,且与生化指标测定结果一致。

讨论

本课题组利用单因素试验和Plackett-Burman试验考察了反应温度、超声时间、减压旋转时间、水化时间等因素对Tax-MLs的包封率、载药量以及渗漏率的影响,最终发现花旗松素/磷脂+胆盐+PVP-K30质量比、PVP-K30/磷脂+胆盐质量比和磷脂/胆酸钠质量比对Tax-MLs具有显著性影响($P < 0.05$),后续进行Box-Behnken响应面试验确定最佳处方及制备工艺,得到最优处方的EE%为 $(95.92 \pm 0.74)\%$ 、DL%为 $(19.31 \pm 0.11)\%$ 、平均LR%为 $(1.42 \pm 0.01)\%$,通过表征验证Tax与PC、SDC、PVP-K30分子间可能通过氢键作用形成了Tax-MLs。使Tax的在水中的溶解度提高了92.02倍,较花旗松素磷脂复合物白蛋白纳米粒^[17]、花旗松素包合物^[29]、花旗松素磷脂复合物^[30]的溶解度显著提高。

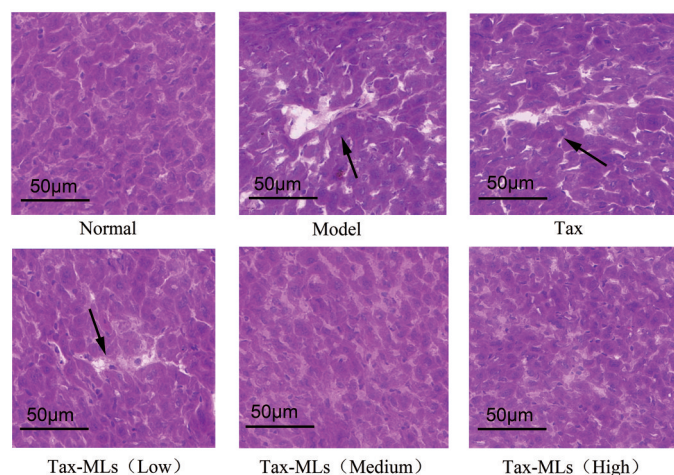


Figure 6 Effect of Tax-MLs on histomorphology of alcoholic liver injury. Scale bar: 50 µm

花旗松素属于二氢黄酮醇类化合物,可通过酚羟基和自由基反应生成较稳定的半醌式自由基,参与调节和提高体内抗氧化酶的活性。SOD为抗氧化酶类,其值越高说明肝脏抗氧化性损伤的效果越好,MDA为肝细胞脂质过氧化的代谢产物,其值越低说明肝损伤的程度越低^[31]。本实验的结果表明,模型组小鼠的SOD活性明显降低($P < 0.01$),MDA水平显著升高($P < 0.01$);给予花旗松素能将显著提高SOD活性,降低MDA水平,说明花旗松素的保肝作用可能与调节肝组织中的氧化应激水平有关。HE染色显示,酒精诱导的急性肝损伤小鼠肝细胞损伤伴有中性粒细胞浸润,而将Tax制成纳米胶束后可改善肝损伤效果明显增强。

综上所述,花旗松素是天然强效抗氧化剂,具有抗氧化、抗炎、预防肝损伤等多种生理作用,在医学领域具有一定的应用潜力,但一直以来存在水溶性差,不易吸收的缺点,本研究制备的花旗松素-磷脂/胆盐/聚维酮K30胶束成功改善了其缺点,相关研究结果也为花旗松素的进一步研究和开发提供了有益参考。

作者贡献: 张诗雨负责文献查阅、总体实验设计和实施、论文撰写;孙敬蒙和李冬冬负责制备工艺的优化及表征;张欣和张佳慧参与文章图表格式处理及论文修改;张炜煜参与理论指导、论文修改及论文定稿。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Wang FJ, Tu PF, Zeng KW, et al. Protective effects of the total glycosides of *Cistanche deserticola* Y.C. Ma in alcoholic liver injury in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2528-2535.
- [2] Liu C, Ding JX, Zhou Y, et al. Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against acute alcoholic liver injury in rats based on network pharmacology [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 4531-4540.
- [3] Yang F, Huo ZW, Zhu W, et al. Optimization of ultrahigh pressure assisted micellar extraction of taxifolin from larch [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2023, 44: 175-183.
- [4] Sang J, Qu H, Liu D, et al. Beneficial effects of probiotics on liver injury caused by chronic alcohol consumption [J]. Fermentation, 2024, 10: 1-11.
- [5] Zhou BJ, Liu PP, Yao XG, et al. Hepatoprotective effects of peach gum polysaccharides against alcoholic liver injury: moderation of oxidative stress and promotion of lipid metabolism [J]. Front Nutr, 2024, 10: 1325450.
- [6] Suhail R, Tayyaba A, Asad U, et al. Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. BMC Cancer, 2018, 18: 1043.
- [7] Wang XD, Meng MX, Gao LB, et al. Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp [J]. Int J Pharm, 2009, 378: 1-8.
- [8] Jin LC, Yang Y, Yang K, et al. Extraction, bacteriostatic effect and synergistic mechanism of bacteriostatic effect of taxifolin in larch in combination with leucocyanidin [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2024, 45: 128-136.
- [9] Su H, Ruan YT, Li Y, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory activity of taxifolin on three digestive enzymes [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150: 31-37.
- [10] Radava M, Jelena SK, Anđelija M, et al. Fast inverted photoprotective o/w emulsions loaded with dihydroquercetin and β -carotene: an innovative approach to *in vitro* assessment of antioxidant activity in a bioenvironment [J]. Nat Prod Commun, 2022, 17: 1-10.
- [11] Bruić M, Pirković A, Borozan S, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of taxifolin in H_2O_2 -induced oxidative

- stress in HTR-8/SVneo trophoblast cell line [J]. *Reprod Toxicol*, 2024, 126: 108585.
- [12] Chen JJ, Sun X, Xia TT, et al. Pretreatment with dihydroquercetin, a dietary flavonoid, protected against concanavalin A-induced immunological hepatic injury in mice and TNF- α /ActD-induced apoptosis in HepG2 cells [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 2341-2352.
- [13] Lu Y, Liu XL, Zhao T, et al. Synthesis of taxifolin-loaded polydopamine for chemo-photothermal-synergistic therapy of ovarian cancer [J]. *Molecules*, 2024, 29: 1042.
- [14] Dominique T, Jean-Louis B, Barbara B, et al. Statement on the safety of taxifolin-rich extract from dahurian larch [J]. *EFSA J*, 2017, 15: e05059.
- [15] Varlamova EG, Uspalenko NI, Khmil NV, et al. A comparative analysis of neuroprotective properties of taxifolin and its water-soluble form in ischemia of cerebral cortical cells of the mouse [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 11436.
- [16] Terekhov RP, Ilyasov IR, Beloborodov VL, et al. Solubility enhancement of dihydroquercetin *via* "green" phase modification [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 15965.
- [17] Zhang JH, Sun JM, Zhang X, et al. Construction and intestinal absorption of taxifolin phospholipid complex albumin nanoparticles [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2023, 54: 8043-8054.
- [18] Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives [J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 1-16.
- [19] Verma P, Gupta GD, Markandeywar TS, et al. A critical sojourn of polymeric micelles: technological concepts, recent advances, and future prospects [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2023, 21: 31-47.
- [20] Ali A, Rahul, Jori C, et al. Sinapic acid-pullulan based inflammation responsive nanomicelles for the local treatment of experimental inflammatory arthritis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 278: 134903.
- [21] Vahid MF, Mattias O, Katarina E, et al. Investigation of the enhanced ability of bile salt surfactants to solubilize phospholipid bilayers and form mixed micelles [J]. *Soft Matter*, 2021, 17: 7769-7780.
- [22] Hendradi E, Obata Y, Isowa K, et al. Effect of mixed micelle formulations including terpenes on the transdermal delivery of diclofenac [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 1739-1743.
- [23] Zhang HQ, Zhao LL, Chu LJ, et al. Preparation, optimization, characterization and cytotoxicity *in vitro* of baicalin-loaded mixed micelles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 434: 40-47.
- [24] Zhang HQ, Yang XY, Zhao LL, et al. *In vitro* and *in vivo* study of baicalin-loaded mixed micelles for oral delivery [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23: 1933-1939.
- [25] Wu WT, Guo ZL, Ge SC, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tissue distribution of oral co-loaded puerarin/daidzein mixed micelles in rats [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2023, 48: 5068-5077.
- [26] Mo YY, Sun JM, Fang CC, et al. Construction and characterization of candesartan cilexetil P123/F127 mixed micelle delivery system [J]. *Herald Med (医药导报)*, 2022, 41: 1828-1835.
- [27] Hang LQ, Shi XM, Wang JR, et al. Preparation and polarization activity research of astragalus polysaccharide-superparamagnetic iron oxide nanocomposite [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 779-788.
- [28] Yan ZF, Ren KL, Meng XL, et al. Protective effect of water extract of cassiae semen on acute alcoholic liver injury in mice [J]. *Food Drug (食品与药品)*, 2023, 25: 440-445.
- [29] Xu YP, Yang BW, Pan RB, et al. Interaction between dihydroquercetin and cyclodextrin and the preparation of their inclusion complexes [J]. *China Food Addit (中国食品添加剂)*, 2024, 35: 33-39.
- [30] Huo WK, Sun JM, Zhang X, et al. Preparation, optimization and *in vitro* simulated digestion release of taxifolin phospholipid complex [J]. *Food Ferment Ind (食品与发酵工业)*, 2024, 50: 162-168.
- [31] Zhao X, Gou XJ, Chen L, et al. Metabonomic study of the preventive effects of taxifolin on CCl₄-induced acute liver injury in rats [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志)*, 2017, 51: 82-86.