

基于纳米材料角度研究石榴皮炭止泻作用物质基础

赵玉升¹, 李立杰^{2#}, 李伟洋², 刘楚妤², 赵金莉², 钟琪², 李郁茹¹, 孔慧^{2*}, 赵琰^{2*}, 屈会化^{3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 在石榴皮炭 *Granati Pericarpium Carbonisatum* 中发现并分离出新型纳米类成分, 并通过动物实验来研究其止泻作用。方法 利用高温热解法对生石榴皮进行炭化, 并对炭化产物进行萃取、滤过分离和透析得到一种具有水溶性的新型纳米类成分, 命名为石榴皮炭纳米类成分 (GPC-NCs)。采用透射电子显微镜、高分辨透射电子显微镜、傅里叶变换红外光谱、紫外光谱、荧光光谱、高效液相色谱、X 射线光电子能谱和 X 射线衍射对 GPC-NCs 进行表征。使用小鼠腹泻模型观察小鼠腹泻指数、腹泻潜伏期和肠道传输功能, 以此来评价和证实 GPC-NCs 的止泻作用。结果 从石榴皮炭中分离出来的 GPC-NCs 外形为类球形, 粒径均匀分布在 1.2~2.3 nm, 晶格间距为 0.321 nm, 荧光量子产率为 0.45%。GPC-NCs 能够减少小鼠腹泻指数和腹泻潜伏期时间, 并对番泻叶水煎剂所致的小肠运动功能亢进具有拮抗作用。结论 GPC-NCs 的显著止泻效果, 不仅为石榴皮炭的物质基础研究提供了一个新思路, 也为 GPC-NCs 在止泻领域的潜在生物医学和医疗保健应用提供了新的见解。

关键词: 石榴皮炭; 高温热解法; 纳米类成分; 表征; GPC-NCs; 止泻; 纳米材料

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1335-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.013

Material basis of *Granati Pericarpium Carbonisatum* for antidiarrheal effect from perspective of nanomaterials

ZHAO Yu-sheng¹, LI Li-jie², LI Wei-yang², LIU Chu-yu², ZHAO Jin-li², ZHONG Qi², LI Yu-ru¹, KONG Hui², ZHAO Yan², QU Hui-hua³

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To discover and isolate a novel type of nano-components in *Granati Pericarpium Carbonisatum* (GPC), and evaluate its antidiarrheal effect through animal experiments. **Methods** The Shiliupi (*Granati Pericarpium*) was carbonized by high-temperature pyrolysis, and the carbonized products were extracted, filtered and separated to obtain a novel type of water-soluble nano-components, named GPC-NCs. GPC-NCs were characterized by transmission electron microscopy, high resolution transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, fluorescence spectroscopy, high performance liquid chromatography, X-ray photoelectron spectroscopy and X-ray diffraction. The mouse diarrhea models were used to observe the mouse diarrhea index, diarrhea incubation period and intestinal transit function to evaluate and confirm the antidiarrheal effect of GPC-NCs. **Results** The GPC-NCs separated from the GPC were quasi-spherical in shape, with a uniform

收稿日期: 2020-10-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目/团队项目: 经典方剂的应用基础研究 (2019-JYB-TD-001)

作者简介: 赵玉升, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药炭药物物质基础研究。E-mail: 16688091339@163.com

*通信作者: 孔慧 (1976—), 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药炭药物物质基础研究。

Tel: (010)64286705 E-mail: doris7629@126.com

赵琰 (1973—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为经典方剂的配伍与应用及中药炭药的物质基础研究。

Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@bucm.edu.cn

屈会化 (1966—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药炭药物物质基础研究。Tel: (010)64286705 E-mail: quhuihuadr@163.com

#共同第一作者: 李立杰, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炭药物物质基础研究。E-mail: 1176796004@qq.com

particle size distribution of 1.2—2.3 nm, a lattice spacing of 0.321 nm, and a fluorescence quantum yield of 0.45%. GPC-NCs could reduce the diarrhea index and the incubation period of diarrhea in mice, and had an antagonistic effect on small intestinal hypermotility caused by senna decoction. **Conclusion** These results indicate the significant antidiarrheal effect of GPC-NCs not only provides a new idea for the material basis study of GPC, but also provides new insights for the potential biomedical and healthcare applications of GPC-NCs in the field of antidiarrheal.

Key words: *Granati Pericarpium Carbonisatum*; pyrolysis; nano-components; characterization; GPC-NCs; antidiarrheal; nanomaterials

石榴皮 *Granati Pericarpium* 为石榴科石榴属植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 均系栽培, 主产于江苏、湖南、四川等地。果实将成熟时采摘, 剥取果皮, 或于食用石榴时剥取果皮, 晒干即得。性温、涩、酸, 主入大肠经, 具有涩肠止泻、止血、驱虫之效^[1]。石榴皮炭是石榴皮高温炭化的产物, 被《中国药典》2020 年版^[2]所收入, 具有涩肠止泻的功效。石榴皮炭良好的止泻作用与其高温炮制过程密不可分, 炭化的过程赋予了比原药材更好的止泻疗效, 现代研究^[3-4]也证实了高温炭化能赋予众多中药抗炎止血的功效。

多年来, 现代学者试图从小分子化合物的角度来阐明中药炭药高温炭化后药性增强或改变的机制, 例如钙、镁等离子的变化起到了止血作用^[5]; 鞣质、黄酮等小分子成分含量的改变与其生物活性的变化有密切联系^[6-7]; 炭素的提出^[8]; 但这些结果并不令人满意, 这种困境和挑战迫使本课题组将注意力转向纳米材料学, 以此来研究炭药炮制加工后的物质基础变化。诸如荧光半导体量子点之类的纳米材料作为用于体内分子和细胞成像的荧光探针, 对大型医学研究者具有吸引力^[9]。近年来, 对其自身生物活性的研究备受关注, 但仍处于起步阶段。据报道^[10], 通过体内和体外实验, CdTe 量子点被确认为核转录因子 κB (nuclear transcription factor κB , NF- κB) 通路途径的有效抑制剂, 这为量子点发展新型的抗癌、抗炎以及抗病毒方法提供了基本的证据。在另一项研究中, 发现氧化石墨烯量子点对乙醇的不良影响具有拮抗作用^[11]。作为纳米材料的另一重要成员, 碳点是一种以碳为骨架结构且尺寸小于 10 nm 的零维纳米材料, 碳点具有比其他纳米材料更加优越的性能, 如超细尺寸、优异的光致发光性能、良好的生物相容性和优良电子转移能力^[12-14]。然而, 碳点的医学研究^[15]主要集中在合成和荧光探针上, 碳点的潜在生物学性能和生物活性尚未引起足够的重视。

本研究从纳米材料学角度出发, 从石榴皮炭的

水溶液中发现并分离了新型纳米类成分, 并且将其命名为石榴皮炭纳米类成分 (GPC-NCs)。利用低分辨透射电子显微镜 (TEM) 与高分辨透射电子显微镜 (HR-TEM) 获取 GPC-NCs 的形态大小、粒径分布及晶格间距等特征; 利用 HPLC 排除小分子发挥药效作用的干扰; 利用紫外光谱 (UV-Vis)、荧光光谱 (FL)、红外光谱 (FTIR)、X 射线光电子能谱 (XPS) 等方法来解析 GPC-NCs 的化学基团信息; 利用小鼠腹泻模型观察小鼠腹泻指数、腹泻潜伏期和肠道传输功能, 以此来评价和证实 GPC-NCs 的止泻作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PXR-9 马弗炉, 北京中科澳博科技股份有限公司; TecnaiG220 透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司; JEN-1230 高分辨透射电子显微镜 (HR-TEM), 日本电子株式会社; CECIL 紫外分光光度计, 英国 Cambridge 公司; F-4500 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; Agilent 1260 系列高效液相色谱仪, 美国 Agilent Technologies 公司; Escalab 250Xi X 射线光电子能谱分析 (XPS) 仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; D8-Advanced X 射线衍射仪, 德国 Bruker AXS 公司。

1.2 药品和试剂

石榴皮 (产地江苏, 批号 200814002, 经北京中医药大学赵琰教授鉴定, 为石榴科石榴属植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮) 和番泻叶 (产地广东, 批号 200801005, 经北京中医药大学赵琰教授鉴定, 为豆科山扁豆属植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahi 的干燥小叶) 药材采购于北京仟草中药饮片有限公司; 盐酸洛哌丁胺胶囊, 规格 2 mg/片, 批号 H10910085, 购于天津博福益普生公司; 相对分子质量 (M_w) 1000 透析膜购于北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 乙醇和其他分析级化学试剂均购于北京化学试剂公司。所有实验用水均为去离子水。

1.3 动物

SPF 级雌性昆明种小鼠 54 只, 体质量 (30.0±2.0) g, 质量合格证编号 110324201102533442。实验动物均购于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 许可证号为 SCXK(京)2016-0038; 实验环境为北京中医药大学西校区动物房屏障系统, 保持室温 (24.0±1.0) °C, 相对湿度 55%~65%, 12 h 明暗交替, 通风良好, 饲养期间内自由进水、进食, 实验前 12 h 小鼠禁食不禁水。所有动物实验遵循北京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法

2.1 GPC-CDs 的制备

称取石榴皮干燥药材 100 g, 放于坩埚中, 铝箔纸密封并加盖于马弗炉中烧制。马弗炉程序升温: 第 1 阶段 5 min 升温至 70 °C, 保温 25 min; 第 2 阶段 25 min 升温至 350 °C, 保温 1 h。将烧制好的石榴皮炭置于粉碎机中粉碎。称取炭粉末 50 g, 于 10 倍去离子水中煎煮 3 次, 温度为 100 °C, 时间为 1 h。用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过残渣, 合并 3 次滤液, 浓缩并选用 M_w 1000 的透析膜透析 7 d。烘干后获取 GPC-NCs 粉末 27 mg, 于 4 °C 保存, 留置待用。

2.2 GPC-CDs 的表征

利用 TEM 观察 GPC-NCs 的形貌、粒径分布和微观结构特征; 利用 HR-TEM 和 X 射线衍射仪 (XRD) 观察其晶格间距等内部结构详细特征。利用紫外分光光度计和红外分光光度计分析 GPC-NCs 的结构特征和表面的官能团信息; 利用荧光分光光度计分析 GPC-NCs 的光学特征。利用 X 射线光电子能谱分析仪分析 GPC-NCs 中所含有元素及其可能连接方式。

2.3 HPLC 指纹图谱分析

利用 HPLC 比较所获得的 GPC-NCs 和石榴皮生药在成分上的区别。称取石榴皮生药 2 g, 加入 40 mL 甲醇超声处理 30 min, 获得生药材溶液; 将上述制备的 GPC-NCs 用水稀释至 1 g/mL (按炭药量计算), 获得 GPC-NCs 稀释液。所有样品在进样前使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

本实验中高效液相色谱仪采用四元泵-二极管阵列检测器, 自动进样器; 色谱柱为 Reliasil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2% 磷酸-乙腈, 等度洗脱程序: 0~50 min, 21% 乙腈; 进样量

10.0 μL; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长设定为 254 nm; 柱温 25 °C^[16]。

2.4 荧光量子产率 (fluorescence quantum yield, FQY) 测定

荧光物质经过吸光后发射荧光的光子数与其所吸收的激发光光子数的比值即为 FQY。本实验中测定的结果为 GPC-NCs 的相对 FQY, 参比物质选择硫酸奎宁^[17]。荧光光谱扫描时激发波长 (λ_x) 与发射波长 (λ_m) 的狭缝宽度皆为 10 nm。根据公式 $FQY_{NCs} = FQY_R I_{NCs} A_R \eta_{NCs}^2 / (I_R A_{NCs} \eta_R^2)$ 对 GPC-NCs 的 FQY 进行计算, 公式中 I 为发射光谱下的峰面积, A 为 365 nm 时的吸光度值, η 为溶剂的折射率, 下标 NCs 和 R 代表 GPC-NCs 和参照物。为了使重吸收效应最小化, A_R 和 A_{NCs} 应该保证在 0.05 以下^[18]。

2.5 GPC-NCs 对小鼠腹泻模型腹泻指数及腹泻潜伏期的作用研究

2.5.1 造模、分组及给药 小鼠实验前 3 d 适应性饲养。将小鼠随机分为模型组、盐酸洛哌丁胺组 (2 mg/kg) 及 GPC-NCs 高、中、低剂量 (7.2、3.6、1.8 mg/kg) 组, 每组 9 只。造模药使用番泻叶水煎剂 (45 g 生药加 150 mL 去离子水煎煮制备) 实验时小鼠单只单笼, 鼠笼笼底垫有滤纸, 造模前 12 h 小鼠禁食不禁水。各组小鼠 ig 给予番泻叶水煎剂 (4 g/kg), 随后放入鼠笼记录各行为指标。

2.5.2 观察指标 稀便率是指每只小鼠所排的稀便数与总便数之比; 稀便级表示小鼠所排稀便的程度, 以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级, 级数分为 4 级, 标准如下: 粪便污迹直径 <1.0 cm 为等级 1, 1.0~1.9 cm 为等级 2, 2.0~3.0 cm 为等级 3, >3.0 cm 为等级 4, 统计时先逐个统计每处稀便的级数, 然后将该小鼠所有稀便级数相加, 除以稀便次数得到稀便的平均级数, 简称稀便级; 腹泻指数是指稀便率与稀便级的乘积。腹泻潜伏期是指在给药后, 观察小鼠第 1 次出现稀便或第 1 次出现成型粪便但外部带有肉眼可见黏液为出现腹泻的时间, 从给完番泻叶水煎剂后开始计时, 至出现稀便或黏液便时之间的时间为腹泻潜伏期时间, 连续观察 3 h。参考文献方法^[19]观察稀便率、稀便级、腹泻指数及腹泻潜伏期。

2.6 GPC-NCs 对小鼠腹泻模型肠道传输功能的作用研究

2.6.1 造模、分组及给药 小鼠实验前 3 d 适应性饲养。将小鼠随机分为对照组、模型组、盐酸洛哌

丁胺组 (2 mg/kg) 及 GPC-NCs 高、中、低剂量 (7.2、3.6、1.8 mg/kg) 组, 每组 9 只。动物造模方法同“2.5.1”项。在给自制混合灌胃液 (50% 墨汁与蒸馏水、盐酸洛哌丁胺及高、中、低质量浓度 GPC-NCs 溶液制成对应质量浓度混合溶液) 后将各组小鼠在 30 min 后脱臼处死。立即剖腹取出全部小肠肠管 (上自幽门, 下至回盲部)。

2.6.2 观察指标 肠道传输功能表现为肠道内容物在肠道中推进的情况, 其实质是肠平滑肌的蠕动情况, 对肠道传输功能的影响与是否能够反映药物的止泻机制。当肠蠕动尤进, 肠道传输加快, 肠内容物不易保留, 从而发生腹泻, 反之则可视为止泻作用。肠道传输功能通常用炭末推进距离或墨汁推进距离来表示。参考文献方法^[20]用直尺测量小肠肠道全长及墨汁在肠道内推进长度, 肠道传输功能为墨汁推进率 (墨汁推进率 = 墨汁在肠道内推进长度 / 小肠肠管总长度)。

2.7 统计方法

实验数据采用 SPSS 20.0 专用统计软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用方差分析。单因素 ANOVA 分析方法用于实验数据服从正态分布, 同时方差齐。组间差异则运用 LSD 方法统计。

3 结果

3.1 GPC-NCs 制备和表征结果

通过高温炭化、粉碎、提取、分离、滤过、浓缩、透析等一系列步骤制备过程获得 GPC-NCs 溶液。利用 HPLC 指纹图谱分析了石榴皮甲醇提取液和 GPC-NCs 溶液的成分差异, 从图 1-a 中可以观察到石榴皮甲醇提取液包含一系列小分子化合物, 如鞣花酸等鞣质类化合物, 但如图 1-b 所示, 在 GPC-NCs 溶液中并没有检测到小分子的存在, 这在一定程度上排除了小分子作为 GPC-NCs 溶液活性物质

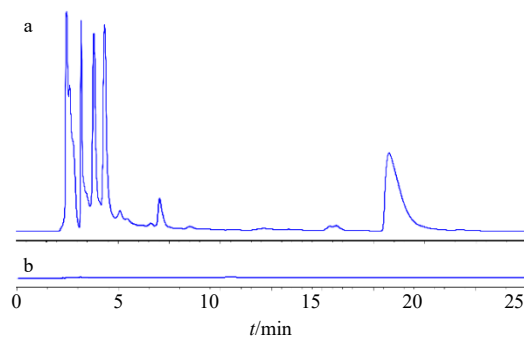


图 1 石榴皮 (a) 和 GPC-NCs (b) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC profile of *Granati Pericarpium* (a) and GPC-NCs (b)

的可能性。

GPC-NCs 的形貌、粒径分布、晶格间距等微观结构特征利用 TEM、HRTEM、XRD 来观察。TEM 观察结果 (图 2-a) GPC-NCs 呈类球形且分散性良好, 该纳米类成分的粒径分布 (图 2-b) 大小主要集中在 1.2~2.3 nm, 具有一定的均一稳定性。为了更深一步的研究 GPC-NCs 的具体结构信息, 利用 HRTEM 来研究单一纳米颗粒的晶格间距大小, 图 1-a 表明 GPC-NCs 的晶格结构清晰可见, 晶格间距为 0.321 nm。另外, 利用 X 射线衍射仪进一步分析 GPC-NCs 内部原子在空间分布的状态, 从图 2-d 上可以观察到一个典型的非晶体衍射峰, 衍射角度 $2\theta = 26.603^\circ$, 经专业软件分析, 该衍射角度其对应的晶格间距约为 0.335 nm, 据此可推测出 GPC-NCs 是由高度无定形的碳结构所构成的^[21-22]。GPC-NCs 的 XRD 数据分析与其 HR-TEM 的测试结果基本吻合, 侧面印证了该纳米颗粒的均一稳定性。

进一步研究 GPC-NCs 的光学性质。如图 3-a 所示, 紫外图谱显示 GPC-NCs 在 260 nm 处有 1 个强烈的吸收峰, 这可能是由于含有杂原子的不饱和基团 (如 C=O 双键等) 引起的 $n-\pi^*$ 跃迁所导致,

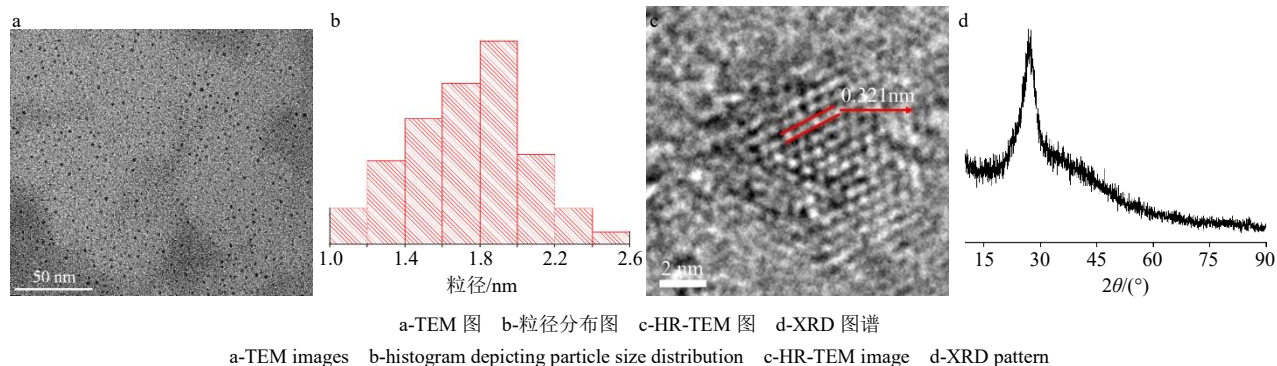


图 2 GPC-NCs 的微观结构组图

Fig. 2 Microstructure diagrams of GPC-NCs

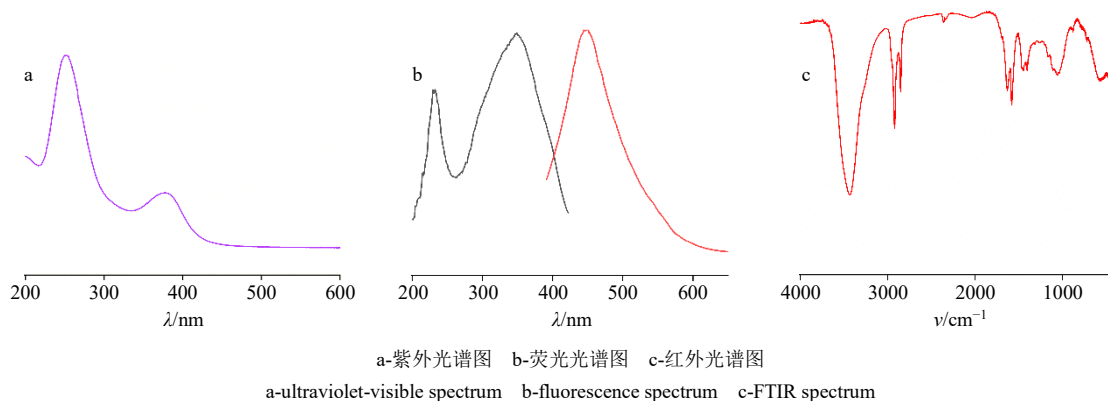


图 3 GPC-NCs 的光谱特征组图

Fig. 3 Spectral characteristics diagrams of GPC-NCs

380 nm 处也有 1 个小的吸收峰,这可能是由于含有大量 C=C 双键而产生共轭作用,从而向低能量方向移动,产生红移^[23]。GPC-NCs 的发射光谱显示,在激发波长 348 nm 的情况下,最大发射波长为 450 nm (图 3-b)。用硫酸奎宁作为 NCs 在水溶液中的参考物,并计算出在最大激发波长 348 nm 下 GPC-NCs 的 FQY 为 0.45%。用红外光谱法(图 3-c)测定了 GPC-NCs 表面化学基团信息,GPC-NCs 的红外光谱(图 3-c)显示吸收峰为 3434、2921、2852、1631、1580、1444、1403、1055 cm⁻¹,其中 3434 cm⁻¹提示-O-H 键的存在,2921、2852 cm⁻¹可能为-CH₂-的伸缩振动峰,1631 cm⁻¹的吸收峰提示可能含有-C=O 键,1580 cm⁻¹的吸收峰提示-NH-键的存在,1444 cm⁻¹和 1403 cm⁻¹附近出现 2 个不明显的双峰,这提示可能是-CH-键的弯曲振动峰,1055 cm⁻¹处的吸收峰提示可能含有-C-O-C-键^[24-25]。可以得出 GPC-NCs 表面含有羟基、羧基和氨基等官能团。

利用 X 射线光电子能谱来进一步研究 GPC-NCs 的表面组成和元素分析。如图 4-a 所示,284.8、399.61、532.69 eV 处有明显的峰,表明该量子点主要由 C(68.4%)、O(28.08%)以及少量的 N(3.52%)元素组成。C1s 谱带(图 4-b)显示 284.73、285.80 eV 2 个峰,与之对应为 C-N、C=O。O1s 谱带(图 4-c)显示 531.44、533.08 eV 2 个峰,与之对应为 C-O、O-C=O。N1s 谱带(图 4-d)显示 399.59、401.70 eV 2 个峰,与之对应为 C-N-C、(C)₃-N^[26-27]。

实验结果与 FT-IR 表征一致,FT-IR 和 XPS 分析表明 GPC-NCs 含有羟基、羧基、氨基的存在可归因于各种含氧官能团的多光子活性过程^[28]。

3.2 药理实验结果

利用小鼠腹泻模型观察小鼠腹泻指数、腹泻潜

伏期和肠道传输功能来评价 GPC-NCs 的止泻作用,从表 1 中可以看出,与模型组相比,阳性药组、GPC-NCs 高剂量组对腹泻具有显著抑制作用,GPC-NCs 中、低剂量组也具有一定的疗效,并且差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。从腹泻潜伏期上(表 1)分析,与模型组相比,阳性药组及 GPC-NCs 高、中剂量组具有显著抑制疗效,低剂量组也具有一定的疗效,并且差异具有统计学意义($P<0.01$)。

利用墨汁推进率来观察小鼠肠道运输功能也能间接反映药物的止泻效果,由表 1 中可以看出,与对照组相比较,模型组小鼠肠道墨汁推进率明显提高,证明本实验造模成功,结果具有统计学意义;与模型组相比较,阳性药组及 GPC-NCs 低剂量组对腹泻具有显著抑制作用,GPC-NCs 高、中剂量组也具有一定的疗效,并且差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。这些实验结果表明,GPC-NCs 对于番泻叶水煎剂所引起的小鼠腹泻模型具有很好地治疗效果,GPC-NCs 发挥止泻作用的机制也是下一步的实验方向。

4 讨论

长期以来,中医炭药的研究重点一直是止血,这与中医经验论密切相关。然而,对药物炭化处理后的研究有限。通过前期工作,本课题组证明了纳米类成分是炭药发挥药效作用的物质基础^[29]。本团队已成功利用卷柏炭^[30]和绵马贯众炭^[31]等炭药制备出纳米类成分,并证明了这些纳米类成分具有良好的止血效果。

此外,本团队也已经证明了炭药纳米类成分的其他药理活性,比如桑蚕蚕茧提取的纳米类成分具有抗炎作用^[32]、焦三仙制备的纳米类成分具有降血糖作用^[33]、枳实炭纳米类成分具有抗高尿酸血症和

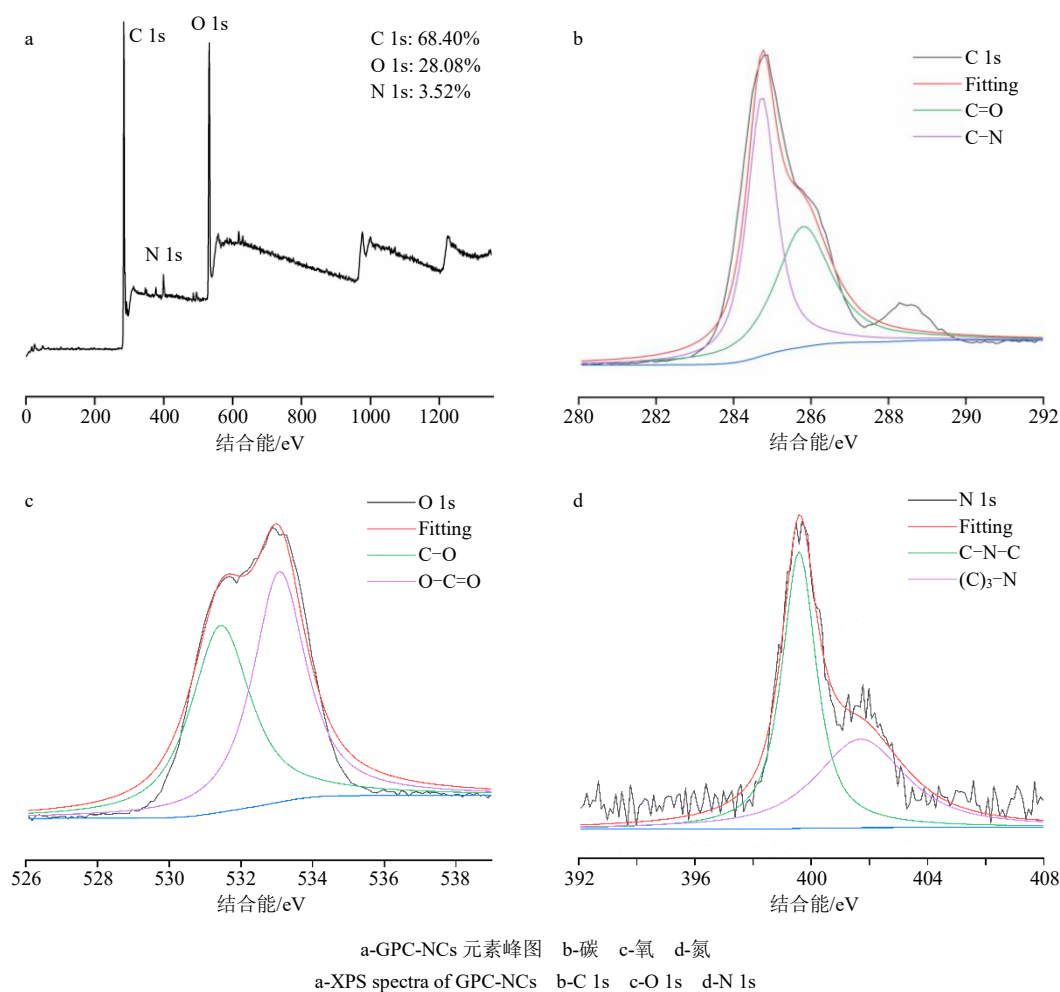


图 4 基于 X 射线光电子能谱分析技术 (XPS) 的 GPC-NCs 表面基团和元素组成分析

Fig. 4 Surface composition and elemental analysis of GPC-NCs by XPS

表 1 小鼠腹泻指数、腹泻潜伏期和肠道传输功能实验 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)Table 1 Mouse diarrhea index, diarrhea incubation period and intestinal transit function experiment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	腹泻指数	腹泻潜伏期/min	墨汁推进率/%
对照	—	—	—	90.82±0.11
模型	4000	1.16±0.25	158.75±12.93	98.15±0.04 [#]
阳性药	2	0.60±0.23 ^{**}	108.20±11.63 ^{**}	83.97±0.06 ^{**}
GPC-NCs	7.2	0.74±0.25 [*]	115.00±8.93 ^{**}	90.56±0.06 ^{**}
	3.6	0.83±0.21 [*]	120.25±8.93 ^{**}	90.90±0.05 [*]
	1.8	0.87±0.18 ^{**}	127.40±13.62 ^{**}	83.23±0.07 ^{**}

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组比较: $\#P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\#P < 0.05$ vs control group

痛风性关节炎活性^[21]等。因此, 后续研究更侧重于炭药止血作用以外的其他药理活性研究。

石榴皮炭作为一味传统的炭药, 在临床治疗腹泻疾病方面有着悠久的历史, 但其活性成分尚不清楚。以往的研究试图从原始植物中的类黄酮、挥发油等小分子来解释石榴皮炭的生物活性, 但得到的

信息很少。有研究表明, 高温燃烧后的粗晶是主要的活性成分^[34]。现代医学研究从纳米角度揭示了炭药的生物活性和药理作用, 启发了本团队开展本研究。在实验初期, 发现与石榴皮水煎剂相比, 石榴皮炭水提液有荧光现象, 这说明在炭化过程中产生了新的物质。

在本研究中,从石榴皮炭水溶液中发现并分离出了新型纳米类成分。用 TEM、HRTEM、FTIR、UV Vis 和荧光光谱对 GPC-NCs 进行了表征。此外,为了评价成分变化,排除小分子有机化合物的干扰,采用 HPLC 法对石榴皮提取物和 GPC-NCs 的化学成分进行了比较研究。GPC-NCs 的前体药材石榴皮主要由鞣质类、黄酮类、生物碱等成分组成,然而,HPLC 结果显示,这些小分子成分和其他有机物在煅烧后消失。因此,表征结果证实了 GPC-NCs 是一种荧光量子产率为 0.45%且直径在 1.2~2.3 nm 的类球形颗粒,表面上具有羟基、羧基、氨基等活性基团,从而使其具有良好的溶解性和生物活性。

药理实验结果表明 GPC-NCs 具有显著止泻效果,本研究是对 GPC-NCs 的止泻活性的初步评价,需要进一步的研究来阐明这些作用的更深层次的潜在机制。但是本实验中石榴皮炭中新型纳米类成分发现及其止泻活性的证明,为石榴皮炭和其他炭药的材料研究提供了新的理论基础。这不仅为石榴皮炭的物质基础研究提供了一个新思路,也为 GPC-NCs 在止泻领域的潜在生物医学和医疗保健应用提供了新的见解,并为未来的药物发现奠定了坚实的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐云凤,赵胜娟,费鹏,等.石榴皮提取物的抑菌作用及应用研究进展[J].食品与机械,2020,<https://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20200928.1603.006.html>.
- [2] 中国药典[S].一部.2020:97-98.
- [3] Wu J, Zhang M, Cheng J, et al. Effect of *Lonicerae Japonicae Flos Carbonisata*-Derived carbon dots on rat models of fever and hypothermia induced by lipopolysaccharide [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 4139-4149.
- [4] 石典花,戴衍朋,苏本正,等.侧柏叶“炒炭存性”科学内涵初探[J].中草药,2020,51(23):5963-5971.
- [5] 李诗佳,贾舒杰,杨柳,等.山楂炒炭前后微结构及凝血成分的变化研究[J].时珍国医国药,2019,30(6):1352-1354.
- [6] 张向阳,魏红,韩建国.地榆炭烘法炮制工艺实验研究[J].河北中医,2014,36(7):1065-1067.
- [7] 王永红,冉茂娟,姜艳,等.槐角黄酮栓抗炎、止血、抗溃疡作用的实验研究[J].现代生物医学进展,2014,14(27):5247-5252.
- [8] 孟江,许舒娅,陈磊,等.干姜“炒炭存性”质量标准初探[J].中国中药杂志,2012,37(4):453-456.
- [9] Drummen G P C. Quantum dots-from synthesis to applications in biomedicine and life sciences [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(1): 154-163.
- [10] Hu Z L, Song B, Xu L, et al. Aqueous synthesized quantum dots interfere with the NF- κ B pathway and confer anti-tumor, anti-viral and anti-inflammatory effects [J]. *Biomaterials*, 2016, 108: 187-196.
- [11] Sun A, Mu L, Hu X. Graphene oxide quantum dots as novel nanozymes for alcohol intoxication [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(14): 12241-12252.
- [12] Shen L M, Liu J. New development in carbon quantum dots technical applications [J]. *Talanta*, 2016, 156/157: 245-256.
- [13] Wang K, Gao Z, Gao G, et al. Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8(1): 122.
- [14] Feng T, Ai X Z, An G H, et al. Correction to charge-convertible carbon dots for imaging-guided drug delivery with enhanced *in vivo* cancer therapeutic efficiency [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(5): 5587.
- [15] Shi H, Wei J, Qiang L, et al. Fluorescent carbon dots for bioimaging and biosensing applications [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(10): 2677-2699.
- [16] Li J, He X, Li M, et al. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC [J]. *Food Chem*, 2015, 176: 7-11.
- [17] Yang L, Jiang W, Qiu L, et al. One pot synthesis of highly luminescent polyethylene glycol anchored carbon dots functionalized with a nuclear localization signal peptide for cell nucleus imaging [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(14): 6104-6113.
- [18] Zhang M, Cheng J, Zhang Y, et al. Green synthesis of *Zingiberis Rhizoma*-based carbon dots attenuates chemical and thermal stimulus pain in mice [J]. *Nanomedicine*, 2020, 15(9): 851-869.
- [19] 杨丽萍,胡瑶,苏芯,等.粳米米汤止泻物质基础及其机制[J].成都医学院学报,2015,10(5):559-562.
- [20] 李楠,漆重阳,韩玲玲,等.复方地榆勾儿茶散止泻作用的初步研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017(10):137-139.
- [21] Wang S, Zhang Y, Kong H, et al. Antihyperuricemic and anti-gouty arthritis activities of *Aurantii Fructus Immaturus Carbonisata*-derived carbon dots [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(22): 2925-2939.
- [22] Li L S, Jiao X Y, Zhang Y, et al. Green synthesis of

- fluorescent carbon dots from Hongcaitai for selective detection of hypochlorite and mercuric ions and cell imaging [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2018, 263: 426-435.
- [23] Yang Y, Wang X, Liao G, *et al.* iRGD-decorated red shift emissive carbon nanodots for tumor targeting fluorescence imaging [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2018, 509: 515-521.
- [24] Kumar A, Chowdhuri A R, Laha D, *et al.* Green synthesis of carbon dots from *Ocimum sanctum* for effective fluorescent sensing of Pb^{2+} ions and live cell imaging [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2017, 242: 679-686.
- [25] Bhamore J R, Jha S, Singhal R K, *et al.* Facile green synthesis of carbon dots from *Pyrus pyrifolia* fruit for assaying of Al^{3+} ion via chelation enhanced fluorescence mechanism [J]. *J Mol Liq*, 2018, 264: 9-16.
- [26] Saha A K, Sharma P, Sohn H B, *et al.* Fe doped CdTeS magnetic quantum dots for bioimaging [J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1(45): 6312-6320.
- [27] Li Y, Li S, Wang Y M, *et al.* Electrochemical synthesis of phosphorus-doped graphene quantum dots for free radical scavenging [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19(18): 11631-11638.
- [28] Hu G K, Ge L, Li Y Y, *et al.* Carbon dots derived from flax straw for highly sensitive and selective detections of cobalt, chromium, and ascorbic acid [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2020, 579: 96-108.
- [29] Zhao Y, Zhang Y, Liu X, *et al.* Novel carbon quantum dots from egg yolk oil and their haemostatic effects [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4452.
- [30] Zhao Y, Zhang Y, Kong H, *et al.* Haemostatic nanoparticles-derived bioactivity of from *Selaginella Tamariscina Carbonisata* [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 9-12.
- [31] 熊威, 赵琰, 成金俊, 等. 绵马贯众炭中新型碳点的发现及其止血作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1388-1394.
- [32] Wang X, Zhang Y, Kong H, *et al.* Novel mulberry silkworm cocoon-derived carbon dots and their anti-inflammatory properties [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 68-76.
- [33] Sun Z, Lu F, Cheng J, *et al.* Hypoglycemic bioactivity of novel eco-friendly carbon dots derived from traditional Chinese medicine [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(12): 2146-2155.
- [34] 何燕飞, 周祺, 陈华, 等. 中药炭药的临床应用及作用机理研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2015, 37(3): 1-6.

[责任编辑 郑礼胜]