

## 大黄-黄芪组分自微乳的制备及在体肠吸收特性研究

侯雨, 朱琳, 张奇斌, 叶小凤, 柯俏颖, 徐志士, 魏颖慧\*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:** **目的** 研究大黄-黄芪多组分自微乳的处方与制备工艺, 评价制剂质量, 并考察其大鼠肠吸收特性。**方法** 通过溶解度实验、油相与乳化剂和助乳化剂配伍实验及伪三元相图的绘制, 筛选出最优处方组成; 并从自微乳的外观、形态、粒径、稳定性等方面对自微乳进行评价。通过大鼠在体单向肠灌注实验考察自微乳的肠吸收特性。**结果** 自微乳处方中油相为辛酸癸酸单双甘油酯、乳化剂为聚氧乙烯蓖麻油 35、助乳化剂为乙二醇。在微乳形成区选择各辅料用量, 采用适宜方法加入大黄总蒽醌及黄芪总皂苷制得的组分自微乳, 外观均一透明, 加水分散后形成黄色乳光的微乳液, 透射电镜显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 下观察到微乳分散均匀, 无黏连, 呈大小均一圆球形乳滴; 平均粒径为  $(33.01 \pm 0.12)$  nm、多分散指数 (polydispersion index, PDI) 为  $0.10 \pm 0.02$ 、电位为  $(-10.10 \pm 1.00)$  mV; 自微乳中大黄总蒽醌和黄芪总皂苷质量分数分别为 6.29、8.80 mg/g。自微乳中大黄总蒽醌在十二指肠、空肠段的吸收速率常数 ( $K_a$ ) 及表观吸收系数 ( $P_{app}$ ) 较回肠段均有显著提高; 黄芪总皂苷在小肠吸收良好, 各肠段间无显著性差异。**结论** 筛选出的自微乳处方对大黄-黄芪多组分具有良好的负载性能, 乳化效率高; 自微乳中大黄总蒽醌及黄芪总皂苷在小肠各段均有良好的吸收, 有望改善二者的生物利用度以更好地发挥其协同作用。

**关键词:** 大黄总蒽醌; 黄芪总皂苷; 自微乳给药系统; 处方研究; 伪三元相图; 在体肠吸收

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)12-3815-09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.008

## Preparation and *in-situ* intestinal absorption study of *Rhei Radix et Rhizoma-Astragali Radix* components loaded self-microemulsion

HOU Yu, ZHU Lin, ZHANG Qi-bin, YE Xiao-feng, KE Qiao-ying, XU Zhi-shi, WEI Ying-hui

School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** The present investigation focused on the formulation, preparation process and intestinal absorption characteristics of Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*, RRR)-Huangqi (*Astragali Radix*, AR) components loaded self-microemulsion. **Methods** The composition of the formula was screened through the solubility test, compatibility of the oil phase with emulsifier and co-emulsifier, and the quasi-ternary phase diagram. Particle size, polydispersion index (PDI) analysis and transmission electron microscopy (TEM) studies were used to evaluate the prepared self-microemulsion. Intestinal absorption of the microemulsion was characterized using rat single-pass intestinal perfusion technique. **Results** The optimized emulsion consists of Capmul MCM NF as an oil phase, polyoxyl castor oil EL-35 and ethylene glycol as an emulsifier and co-emulsifier respectively. The droplet size of RRR-AR components loaded microemulsion was  $(33.01 \pm 0.12)$  nm with their PDI  $(0.10 \pm 0.02)$ , zeta potential  $(-10.10 \pm 1.00)$  mV. As revealed by the observation under TEM, the microemulsion exhibited homogeneous dispersion and was a spherical emulsion droplet. The content of RRR total anthraquinone and AR total saponins was 6.29 mg/g and 8.80 mg/g, respectively. The microemulsion was stable at room temperature, without stratification or droplet change. The  $K_a$  and  $P_{app}$  of RRR total anthraquinone in duodenum and jejunum were significantly higher than those in ileum segments. AR total saponins was well absorbed in all of the small intestine segments. **Conclusion** A newly developed microemulsion exhibits high emulsification efficiency with high payload of RRR and AR components. The high intestinal absorption of RRR-AR components in all of the small intestine segments was observed by encapsulation in the emulsion, which is expected to improve the oral bioavailability of RRR-AR components.

收稿日期: 2022-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873018); 浙江省自然科学基金项目 (LY21H280007)

作者简介: 侯雨, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型新技术研究。Tel: (0571)61768157 E-mail: houyu9794@163.com

\*通信作者: 魏颖慧, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型新技术研究。Tel: (0571)61768157 E-mail: yhw\_nn@zcmu.edu.cn

**Key words:** rhubarb total anthraquinone; astragalus total saponins; self-microemulsion; prescription research; quasi-ternary phase diagram; *in-situ* intestinal absorption

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 为世界重大公共卫生问题之一, 全球发病率为 10.0%~13.0%<sup>[1]</sup>, 其主要病理特征为各种原因导致的肾脏结构和功能发生改变<sup>[2-3]</sup>。目前, 临床药物治疗主要包括肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂、钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂和盐皮质激素受体拮抗剂等<sup>[4-6]</sup>, 但都仅能延缓 CKD 向终末期肾病的进展。因此, 继续探索 CKD 的有效治疗方法具有重大意义。中医将 CKD 归属为“虚劳”“水肿”“癃闭”“腰痛”“关格”等范畴, 临床治疗多以“补虚培本, 益肾健脾, 泄浊解毒, 化瘀通络”为法<sup>[7-9]</sup>, 常采用加味桃仁承气汤、尿毒清利汤、肾毒宁、健脾补肾汤、补脾化湿汤等经方、验方。这些方剂中常以大黄-黄芪配伍, 共奏攻邪补益之效。由二者配伍制成的医院制剂大黄黄芪胶囊用于治疗 CKD 氮质血症、尿毒症及肾纤维化已有数十年, 具有较明确的临床有效性及安全性<sup>[10]</sup>。然而, 由于大黄黄芪胶囊为第一代传统中药制剂 (两药均直接粉碎入药), 存在所含成分复杂、给药剂量大、物质基础及作用机制不明、释药行为不明、药动学性质不清晰、起效缓慢等问题<sup>[11]</sup>, 在很大程度上限制了大黄黄芪胶囊药效的发挥及广泛应用。研究表明, 大黄总蒽醌和黄芪总皂苷分别是大黄和黄芪治疗 CKD 的有效组分<sup>[12-15]</sup>。然而, 大黄总蒽醌与黄芪总皂苷较差的水溶性, 导致其口服生物利用度很低<sup>[16-17]</sup>, 且二者在理化性质、生物药剂学性质等方面也存在较大差异, 阻碍了二者协同作用的发挥。

近年来, 脂质药物递送系统 (固体脂质纳米粒、纳米结构脂质载体、纳米乳、纳米脂质体、自微乳等) 被广泛用于经胃肠道递送药物而提高其口服生物利用度<sup>[18-20]</sup>。其中自微乳因具有显著提高生物利用度、增加药物稳定性、降低药物毒性的优势而被广泛用于经胃肠道递送中药成分或有效部位<sup>[21]</sup>, 但大多用于递送中药单一成分或单组分<sup>[22-24]</sup>, 较少用于递送中药多组分。因此, 本研究拟制备大黄总蒽醌-黄芪总皂苷多组分自微乳, 以有效提高二者口服生物利用度, 并充分发挥二者的协同作用, 同时采用大鼠在体单向肠灌注实验评价自微乳的肠吸收特性, 为体内实验奠定基础, 并为中药多组分协同治疗 CKD 提供思路和方法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

SpectraMax M2e 型酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Nano-ZS 90 型激光粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; KQ-250DV 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; BT100-2J 型恒流泵, 保定兰格恒流泵有限公司; Waters 型高效液相色谱仪, 2998 全波长检测器, 2424 ELSD 检测器, 美国 Waters 公司; Eppendorf 5427R 型台式高速离心机, 德国 Eppendorf 有限公司; CP225D 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; Mill-Q 型超纯水器, 美国 Millipore 公司。

### 1.2 药品与试剂

大黄总蒽醌, 南京世洲生物科技有限公司, 质量分数 >50%, 批号 2021; 黄芪总皂苷, 成都锦泰和有限公司, 质量分数 >90%, 批号 AGS-98-21120; 对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、黄芪甲苷, 上海诗丹德有限公司, 质量分数 >98%, 批号分别为 6530、5996、5940、5834、5995、5081; 聚山梨酯 80、聚氧乙烯蓖麻油 35、聚乙二醇 400 (PEG400), 上海源叶生物科技有限公司; 聚山梨酯 20, 上海生工生物工程有限公司; 1,2-丙二醇, 上海凌峰化学试剂有限公司; 异丙醇, 广东光华科技有限公司; 丙三醇, 江苏强盛功能化学股份有限公司; 油酸乙酯, 广东翁江化学试剂有限公司; 肉豆蔻酸异丙酯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 橄榄油, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 辛酸癸酸单双甘油酯, 嘉法狮贸易有限公司。

### 1.3 动物

健康 SD 雄性大鼠, 体质量 (200±20) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0005。饲养环境: 室温 20~25 °C, 相对湿度 45%~60%, 适应性喂养 1 周后开始正式实验。动物实验经浙江中医药大学动物实验伦理/管理委员会批准, 批准文号 SYXK (浙) 2019-0024。

## 2 方法与结果

### 2.1 自微乳中药物含量测定方法的建立

#### 2.1.1 自微乳中大黄总蒽醌含量测定方法

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (85:15); 检测波长为 250 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL/min。

(2) 对照品溶液的制备: 分别精密称取减压干燥至恒定质量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得芦荟大黄素对照品储备液 (402 μg/mL)、大黄酸对照品储备液 (402 μg/mL)、大黄素对照品储备液 (376 μg/mL)、大黄酚对照品储备液 (400 μg/mL) 和大黄素甲醚对照品储备液 (392 μg/mL)。

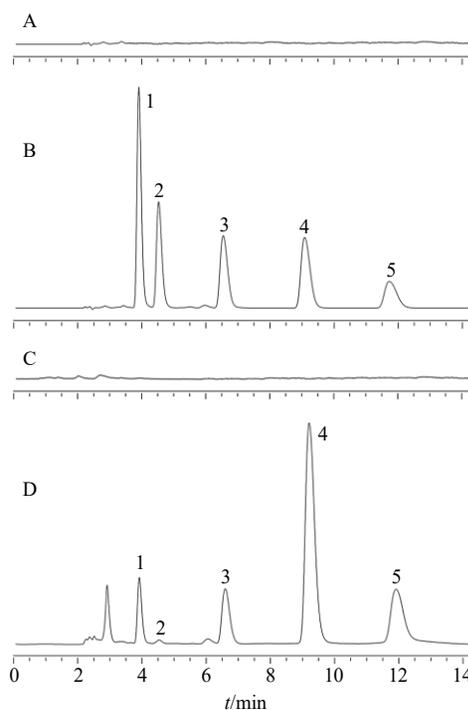
(3) 混合对照品溶液的制备: 分别精密量取芦荟大黄素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚各对照品储备液各 1.0 mL, 大黄酸对照品储备液 2.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得混合对照品溶液 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的质量浓度分别为 40.2、80.4、37.6、40.0、39.2 μg/mL)。

(4) 供试品溶液的制备: 精密称取自微乳液 0.100 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 于 4000 r/min 离心 10 min, 取上清, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

(5) 专属性试验: 分别取溶剂、混合对照品溶液、空白自微乳供试品溶液及自微乳供试品溶液各 20 μL, 按上述色谱条件进行测定, 并记录图谱 (图 1)。结果表明, 溶剂及辅料对自微乳中大黄总蒽醌的含量测定无干扰, 方法专属性良好。

(6) 线性范围考察: 分别精密吸取混合对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制备系列质量浓度的混合对照品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 分别以峰面积 (A) 对芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚质量浓度 (C) 进行线性回归, 得芦荟大黄素回归方程:  $A=98\ 186\ C+57\ 704$ ,  $R^2=0.999\ 3$  ( $n=6$ ), 线性范围为 1.26~40.2 μg/mL; 大黄酸回归方程:  $A=28\ 865\ C+12\ 325$ ,  $R^2=0.999\ 7$  ( $n=6$ ), 线性范围为 1.26~40.0 μg/mL; 大黄素回归方程:  $A=54\ 923\ C+46\ 656$ ,  $R^2=0.999\ 2$  ( $n=6$ ), 线性范围为 1.18~37.6 μg/mL; 大黄酚回归方程:  $A=79\ 146\ C+174.19$ ,  $R^2=0.999\ 9$  ( $n=6$ ), 线性范围为 1.25~40.0 μg/mL; 大黄素甲醚回归方程:  $A=56\ 073\ C+39\ 042$ ,  $R^2=0.999\ 1$  ( $n=6$ ), 线性范围为 1.22~39.2 μg/mL。

(7) 方法学考察: 参照《中国药典》2020 年版



1-芦荟大黄素 2-大黄酸 3-大黄素 4-大黄酚 5-大黄素甲醚  
1-aloe-emodin 2-rhein 3-emodin 4-chrysophanol 5-phycion

图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品 (B)、空白自微乳 (C)、大黄-黄芪组分自微乳 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank solvent (A), mixed reference substances (B), blank self-microemulsion (C) and RRR-AR components loaded self-microemulsion(D)

四部方法进行稳定性、重复性、精密性、加样回收率试验, 结果表明, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的日内精密性、日间精密性、稳定性及重复性 RSD 均小于 2.00%, 平均加样回收率为 103.20%, 该方法的精密性和准确度良好。

(8) 样品测定: 分别取适量样品溶液过 0.45 μm 微孔滤膜, 按“2.1.1”项下色谱条件分别测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚含量, 采用自定义权重系数法整合大黄总蒽醌含量<sup>[25-26]</sup>。具体方法: 根据大黄总蒽醌中 5 种主要成分的质量占比, 设定芦荟大黄素的加权系数为 15.0%、大黄酸的加权系数为 3.0%、大黄素的加权系数为 9.3%、大黄酚的加权系数为 61.5%、大黄素甲醚的加权系数为 11.2%, 则大黄总蒽醌的含量=芦荟大黄素的含量×15.0%+大黄酸的含量×3.0%+大黄素的含量×9.3%+大黄酚的含量×61.5%+大黄素甲醚的含量×11.2%。

## 2.1.2 自微乳中黄芪总皂苷的含量测定方法

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱

(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱程序: 0~15 min, 30%~70%乙腈; 16~20 min, 70%~30%乙腈; 检测时间为 20 min; 柱温 35 °C; 增益为 135 dB; 漂移管温度为 85 °C; 气体压力为 275.790 kPa (40 psi); 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL/min。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取黄芪甲苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得黄芪甲苷对照品储备液 (796 μg/mL)。

(3) 供试品溶液的制备: 同“2.1.1”项下“供试品溶液制备”。

(4) 专属性试验: 分别取溶剂、混合对照品溶液、空白自微乳供试品溶液及自微乳供试品溶液各 20 μL, 按上述色谱条件进行测定, 并记录图谱 (图 2)。结果表明, 溶剂及辅料对自微乳中黄芪总皂苷的含量测定无影响, 方法专属性良好。

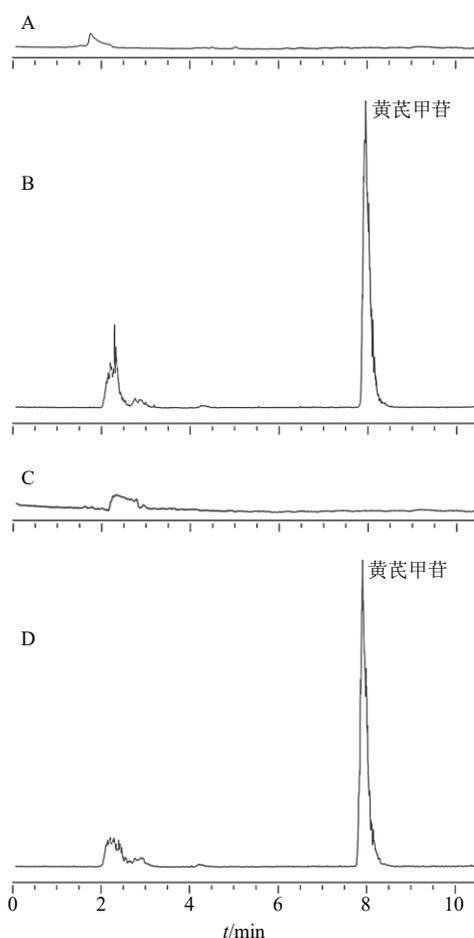


图 2 空白溶剂 (A)、黄芪甲苷对照品 (B)、空白自微乳 (C)、大黄-黄芪组分自微乳 (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of blank solvent (A), astragaloside IV reference substance (B), blank self-microemulsion (C) and RRR-AR components loaded self-microemulsion (D)

(5) 线性范围考察: 分别精密吸取黄芪甲苷对照品储备液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制备系列质量浓度的黄芪甲苷对照品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 以黄芪甲苷峰面积 ( $A$ ) 对质量浓度 ( $C$ ) 进行线性回归, 得黄芪甲苷回归方程:  $A=7\,743.3\,C-177\,156$ ,  $R^2=0.999\,8$  ( $n=6$ ), 线性范围为 25.9~414.0 μg/mL。

(6) 方法学考察: 参照《中国药典》2020 年版四部方法进行稳定性、重复性、精密性、加样回收率试验, 结果表明, 黄芪甲苷的日内精密性 RSD 为 1.62%、日间精密性 RSD 为 1.64%, 稳定性 RSD 为 1.58%, 重复性 RSD 为 1.31%, 平均加样回收率为 101.08%, 该方法的精密性和准确度良好。

(7) 样品测定: 分别取适量样品溶液过 0.45 μm 微孔滤膜, 按“2.1.2”项下色谱条件分别测定黄芪甲苷含量。因黄芪甲苷为黄芪总皂苷代表性活性成分, 因此本实验以黄芪甲苷含量表征黄芪总皂苷含量<sup>[27-28]</sup>。

## 2.2 组分自微乳的制备及处方优化

**2.2.1 溶解度试验** 分别于 1 g 油相、乳化剂及助乳化剂中加入过量大黄总蒽醌或黄芪总皂苷, 涡旋混合均匀密封后, 置于 37 °C、180 r/min 恒温振荡器中振荡 24 h, 至平衡后, 5000 r/min 离心 (离心半径为 5 cm) 10 min, 吸取适量上清加甲醇稀释至适当质量浓度, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 按照“2.1”项下方法测定大黄总蒽醌及黄芪总皂苷含量, 计算大黄总蒽醌及黄芪总皂苷在各油相、乳化剂及助乳化剂中的溶解度。结果见表 1。结果表明, 大黄总蒽醌在各油相中的溶解度大小为油酸乙酯>辛酸癸酸单双甘油酯>肉豆蔻酸异丙酯>橄榄油; 黄芪总皂苷在此 4 种油相中的溶解度均极低, 且油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、橄榄油会干扰黄芪总皂苷的测定, 因此, 选择辛酸癸酸单双甘油酯作为油相。大黄总蒽醌在各乳化剂中的溶解度大小为聚山梨酯 20>聚氧乙烯蓖麻油 35>聚山梨酯 80; 黄芪总皂苷在 3 种乳化剂中的溶解度无显著性差异, 因此该 3 者均作为备选乳化剂; 对于助乳化剂, 大黄总蒽醌及黄芪总皂苷在乙二醇、1,2-丙二醇及聚乙二醇 400 中溶解度均较高, 因此, 乙二醇、1,2-丙二醇及聚乙二醇 400 均作为备选助乳化剂。

**2.2.2 乳化剂筛选** 为进一步优选乳化剂并考察辅料的相容性, 将辛酸癸酸单双甘油酯 (油相) 与聚氧乙烯蓖麻油 35、聚山梨酯 20 及聚山梨酯 80 分别

表 1 大黄总蒽醌与黄芪总皂苷在各辅料中的溶解度 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Solubility of RRR total anthraquinone and AR total saponins in different excipients ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

种类	名称	溶解度/(mg·g <sup>-1</sup> )	
		大黄总蒽醌	黄芪总皂苷
油相	辛酸癸酸单双甘油酯	6.19±0.01	0.24±0.23
	肉豆蔻酸异丙酯	5.93±0.01	—
	橄榄油	5.39±0.01	—
	油酸乙酯	8.07±0.01	—
乳化剂	聚山梨酯 20	17.53±0.01	0.91±0.07
	聚山梨酯 80	12.00±0.02	0.71±0.24
	聚氧乙烯蓖麻油 35	12.27±0.01	0.73±0.10
助乳化剂	异丙醇	3.78±0.01	0.48±0.06
	丙三醇	1.17±0.01	1.23±0.07
	聚乙二醇 400	18.92±0.01	3.70±0.10
	1,2-丙二醇	4.71±0.01	13.38±0.06
	乙二醇	4.02±0.01	6.99±0.06

以 1:9、2:8、3:7、4:6 比例混合, 涡旋均匀后, 吸取 50 μL 于磁力搅拌下滴加至 5 mL 超纯水中, 观察自乳化情况并测定乳滴粒径及分散系数 (polymer dispersity index, PDI)。将自乳化情况按照以下 5 个级别进行评定: a) 澄清或略泛蓝光; b) 略浑浊, 呈蓝白色; c) 不透明, 蓝白色液体; d) 色泽灰暗, 呈灰白色; e) 难以乳化, 有油浮于液面。

自乳化情况结果表明, 以聚氧乙烯蓖麻油 35、聚山梨酯 80 为乳化剂时, 油/乳化剂比例为 4:6、3:7、2:8、1:9 时, 微乳自乳化情况均为 a 级; 以聚山梨酯 20 为乳化剂时, 油相/乳化剂比例为 4:6、3:7、1:9 时, 自乳化情况均为 a 级。此外, 以聚氧乙烯蓖麻油 35 为乳化剂时, 形成的微乳具有较小的粒径及 PDI, 结果见表 2。因此, 选择乳化效

表 2 含不同乳化剂微乳粒径及 PDI ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Particle size and PDI of emulsion containing different emulsifiers ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

乳化剂	油/乳化剂比例	平均粒径/nm	PDI
聚氧乙烯蓖麻油 35	1:9	11.87±0.18	0.08±0.03
	2:8	12.66±0.23	0.12±0.04
	3:7	19.92±0.10	0.10±0.01
聚山梨酯 20	4:6	41.37±0.27	0.19±0.01
	1:9	18.27±0.39	0.31±0.01
	2:8	80.76±0.06	0.60±0.00
聚山梨酯 80	3:7	73.98±0.07	0.29±0.01
	4:6	11.14±0.39	0.22±0.02
	1:9	10.78±0.26	0.19±0.02
聚山梨酯 80	2:8	13.66±0.26	0.20±0.02
	3:7	17.54±0.03	0.18±0.01
	4:6	42.80±0.15	0.27±0.00

果好的聚氧乙烯蓖麻油 35 为乳化剂。

2.2.3 助乳化剂筛选 将聚氧乙烯蓖麻油 35 与各助乳化剂分别以 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 比例混合后, 再将辛酸癸酸单双甘油酯与混合乳化剂分别以 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 比例旋涡混合均匀后吸取适量于磁力搅拌下滴加至 5 mL 超纯水中, 记录相变点, 采用 Origin 8.5 软件绘制伪三元相图。结果见图 3。

结果表明, 以乙二醇为助乳化剂时, 形成的微乳区域最大, 因此选用乙二醇作为助乳化剂。

2.2.4 组分自微乳的制备 在伪三元相图中微乳形成区任选一点处方比例制备大黄总蒽醌-黄芪总皂苷自微乳。称取处方量的聚氧乙烯蓖麻油 35 及乙二醇于烧杯中, 加入大黄总蒽醌及黄芪总皂苷, 超声 2 h, 混合均匀; 另称取处方量辛酸癸酸单双甘油酯, 于磁力搅拌下加入上述混合溶液, 混合均匀

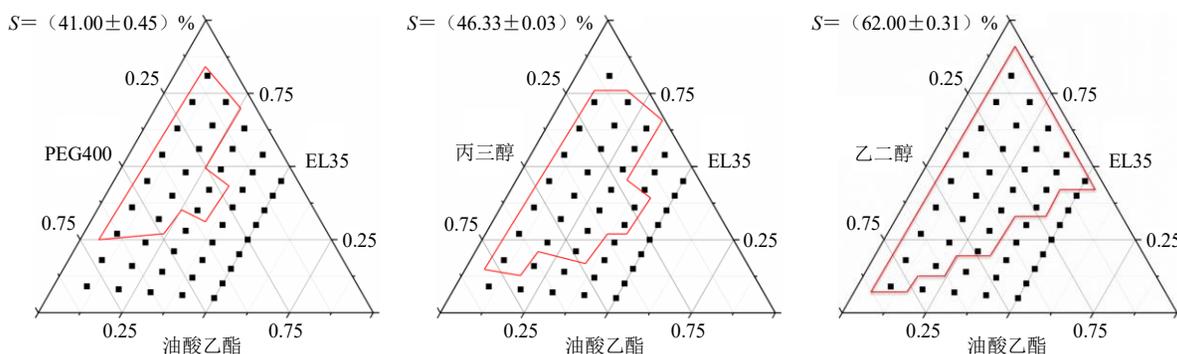


图 3 不同助乳化剂 (PEG400、丙三醇、乙二醇) 制备的自微乳的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram of emulsion containing different cosurfactants (PEG400, glycerol, ethylene)

后超声 2 h, 即得组分自微乳。

### 2.3 组分自微乳的质量评价

**2.3.1 微乳粒径、 $\zeta$  电位及形态** 称取所制备的自微乳适量, 搅拌下滴加至超纯水中, 形成带黄色乳光的微乳液, 以超纯水适当稀释后, 采用 Nano-ZS 90 激光粒度分析仪测定微乳粒径、PDI 及  $\zeta$  电位, 结果表明, 所得微乳平均粒径为  $(33.01 \pm 0.12)$  nm, PDI 为  $0.10 \pm 0.02$ ,  $\zeta$  电位为  $(-10.10 \pm 1.00)$  mV ( $n=3$ )。将适量微乳液滴加至铜网上, 铺展均匀后滴加 2.0% 磷钨酸溶液, 负染 10 min, 从边缘吸去多余微乳液, 室温条件下自然晾干, 于 TEM 下观察微乳的形貌, 结果表明, 自微乳乳化后形成的微乳为分散均匀, 无黏连, 大小均一圆球形乳滴。TEM 见图 4。

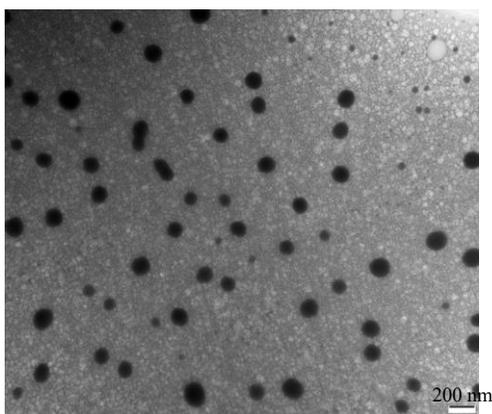


图 4 组分微乳液的 TEM 图

Fig. 4 Morphology of RRR total anthraquinone-AR total saponins-loaded microemulsion

**2.3.2 自微乳中大黄总蒽醌和黄芪总皂苷含量测定** 平行制备 3 批组分自微乳, 分别按“2.1.1”和“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件进样测定, 计算得自微乳中大黄总蒽醌的质量分数为  $(6.29 \pm 0.07)$  mg/g, 黄芪总皂苷的质量分数为  $(8.80 \pm 0.11)$  mg/g。

**2.3.3 自微乳初步稳定性** 取所制备的自微乳 3 份, 分别于搅拌下滴加至超纯水中, 均匀乳化后, 分别于 0、2、4、8、12、24、48、96、144 h 后测定所得微乳粒径、PDI 及  $\zeta$  电位, 结果如表 3 所示, 自微乳均匀乳化后在测定时间内粒径 PDI 与  $\zeta$  电位均几无变化, 表明微乳的稳定性良好。

### 2.4 大鼠在体单向肠灌注实验

取健康 SD 大鼠 12 只 (实验前 12 h 禁食不禁水), 随机分为 3 组 (十二指肠组、空肠组、回肠组)。ip 20% 乌拉坦 (1 g/kg), 麻醉后固定在实验台上,

表 3 不同储存时间自微乳粒径、PDI 及  $\zeta$  电位 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 3 Variation of particle size, PDI and  $\zeta$  potential of RRR total anthraquinone-AR total saponins microemulsion on different days ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间/h	平均粒径/nm	$\zeta$ 电位/mV	PDI
0	$31.64 \pm 0.95$	$-7.13 \pm 0.35$	$0.13 \pm 0.01$
2	$32.39 \pm 0.35$	$-6.55 \pm 0.32$	$0.12 \pm 0.00$
4	$32.90 \pm 0.35$	$-8.23 \pm 0.65$	$0.10 \pm 0.02$
8	$33.86 \pm 0.19$	$-7.80 \pm 0.17$	$0.11 \pm 0.02$
12	$32.32 \pm 0.25$	$-8.54 \pm 0.62$	$0.10 \pm 0.01$
24	$32.02 \pm 0.20$	$-6.76 \pm 0.16$	$0.14 \pm 0.01$
48	$32.26 \pm 0.36$	$-7.77 \pm 0.15$	$0.15 \pm 0.01$
96	$32.69 \pm 0.55$	$-8.46 \pm 0.36$	$0.13 \pm 0.01$
144	$32.79 \pm 0.19$	$-8.89 \pm 0.73$	$0.13 \pm 0.02$

沿腹中线剪开腹腔, 结扎胆管, 仰卧固定于保温垫上 ( $37^\circ\text{C}$ ), 手术剪刀沿腹部正中线打开腹腔, 依次小心分离大鼠的十二指肠、空肠、回肠和结肠, 分别于各肠段两端切口, 插入硅胶管并用细线结扎, 进口端连接蠕动泵, 出口端连接已知质量的离心管, 开口处以生理盐水浸润的纱布覆盖保湿, 电热毯保温。先用生理盐水冲洗肠道至洗出物澄清后, 再使用预热至  $37^\circ\text{C}$  的 K-R 溶液以  $1\text{ mL/min}$  灌流肠段平衡 15 min, 采用供试液继续平衡 30 min 后, 调节体积流量为  $0.2\text{ mL/min}$  进行恒速灌流, 并分别在 0、15、30、45、60、75、90、105、120 min 更换离心管收集流出液, 记录离心管质量后, 取出  $0.5\text{ mL}$  灌流液, 加甲醇  $0.5\text{ mL}$ , 涡旋混匀后于  $4000\text{ r/min}$  离心 (离心半径为  $7\text{ cm}$ )  $10\text{ min}$ , 上清液过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜后, 按“2.1”项下色谱条件分别测定灌流液中大黄总蒽醌及黄芪总皂苷含量。试验结束后, 剪下灌流肠段并记录直径及长度, 测量其长度与周长, 测量 3 次周长计算平均内径。按公式 (1) (2) 计算吸收速率常数 ( $K_a$ ) 及表观吸收系数 ( $P_{\text{app}}$ )。

$$K_a = (1 - C_{\text{out}}V_{\text{out}}/C_{\text{in}}V_{\text{in}})Q/2\pi r l \quad (1)$$

$$P_{\text{app}} = Q \ln(C_{\text{in}}V_{\text{in}}/C_{\text{out}}V_{\text{out}})/2\pi r l \quad (2)$$

$C_{\text{in}}$ 、 $C_{\text{out}}$  分别为肠道进出口灌流液中药物质量浓度,  $V_{\text{in}}$ 、 $V_{\text{out}}$  分别为肠道灌流进出口灌流液体积,  $r$  为灌流肠段横截面半径,  $l$  为灌流肠段的长度,  $Q$  为灌流体积流量 ( $0.2\text{ mL/min}$ )

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行正态分布、方差齐性检验后采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  判定为差异具有统计学意义。

组分自微乳在大鼠各肠段吸收参数见表 4。自

表4 自微乳中大黄总蒽醌、黄芪总皂苷在不同肠段的吸收参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Absorption parameters of RRR total anthraquinone and AR total saponins in different intestinal segments ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

肠段	药物	$K_a/(\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	芦荟大黄素	16.42±0.02 <sup>##</sup>	4.104±0.001 <sup>##</sup>
	大黄酸	8.45±0.01 <sup>##</sup>	1.878±0.001 <sup>##</sup>
	大黄素	25.36±0.06 <sup>*#</sup>	7.458±0.003 <sup>*#</sup>
	大黄酚	17.68±0.03	4.446±0.001
	大黄素甲醚	31.21±0.07	12.300±0.006
	大黄总蒽醌	21.28±0.04 <sup>#</sup>	5.694±0.001 <sup>#</sup>
空肠	黄芪总皂苷	9.88±0.02	2.250±0.001
	芦荟大黄素	14.04±0.05	3.636±0.002
	大黄酸	10.73±0.02 <sup>&amp;</sup>	2.466±0.001 <sup>&amp;</sup>
	大黄素	13.45±0.04	3.312±0.001
	大黄酚	12.36±0.04	3.060±0.001
	大黄素甲醚	32.66±0.06 <sup>&amp;</sup>	11.376±0.003 <sup>&amp;</sup>
回肠	大黄总蒽醌	18.53±0.01 <sup>&amp;</sup>	4.764±0.001 <sup>&amp;</sup>
	黄芪总皂苷	8.53±0.05	1.932±0.001
	芦荟大黄素	10.49±0.02	2.388±0.001
	大黄酸	5.97±0.01	1.284±0.001
	大黄素	12.11±0.04	2.880±0.001
	大黄酚	17.04±0.02	4.200±0.001
回肠	大黄素甲醚	23.79±0.04	6.858±0.002
	大黄总蒽醌	14.52±0.02	3.492±0.001
	黄芪总皂苷	10.81±0.03	2.478±0.001

十二指肠 vs 空肠: \* $P < 0.05$ ; 十二指肠 vs 回肠: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 空肠 vs 回肠: <sup>&</sup> $P < 0.05$   
 duodenum vs jejunum: \* $P < 0.05$ ; duodenum vs ileum: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; jejunum vs ileum: <sup>&</sup> $P < 0.05$

微乳中大黄总蒽醌及黄芪总皂苷在整个小肠肠段均有较好的吸收。其中大黄总蒽醌在十二指肠与空肠段较在回肠段的吸收更好 ( $P < 0.05$ )；黄芪总皂苷在各小肠段吸收无显著性差异。此外，大黄总蒽醌中的芦荟大黄素及大黄素的吸收以十二指肠最高；大黄酸及大黄素甲醚吸收以空肠段最高；大黄酚在各小肠段的吸收无显著性差异。

### 3 讨论

自微乳可与脂蛋白结合形成乳糜微粒后通过肠道淋巴系统进入血液循环，也可以直接通过细胞旁途径、肠上皮细胞和肠道相关淋巴组织的内吞作用进入肠道淋巴系统，因此，可显著提高难溶性药物的口服生物利用度<sup>[29-30]</sup>。本研究将大黄-黄芪组分

(大黄总蒽醌和黄芪总皂苷)制备成自微乳以提高二者的口服生物利用度以利于多组分发挥协同作用。前期研究中，参考大黄黄芪胶囊原方中大黄与黄芪剂量比及大黄中总蒽醌含量、黄芪中总皂苷含量，设置了大黄总蒽醌与黄芪总皂苷比例 (1:0.6、1:1.0、1:1.4、1:2.0、1:5.0)，采用 NRK-49F 及 HK-2 细胞模型，确定了二者协同比，因此，本研究所制备的自微乳中大黄总蒽醌与黄芪总皂苷的质量比为 1:1.4。

此外，因大黄总蒽醌在聚氧乙烯蓖麻油 35 中的溶解度，黄芪总皂苷在乙二醇中的溶解度远高于二者在各油相中的溶解度，故在载药自微乳的制备中采用了将大黄总蒽醌及黄芪总皂苷先溶于聚氧乙烯蓖麻油 35 及乙二醇中，再与油相进行混合的制备工艺。结果表明，所制得的自微乳外观澄清、透明，乳化后形成的微乳平均粒径为 (33.01±0.12) nm，粒度分布均匀，稳定性良好。

在体单向肠灌流具有保证肠道神经、血管和内分泌系统的完整性的优点，可在一定程度上代表人体肠道蠕动的生理状态，因此，本实验采用该模型进行大黄-黄芪组分自微乳肠吸收特性研究。在肠灌流过程中，各肠段不仅会吸收药物，同时也会吸收和分泌水分，造成灌流液浓度的变化<sup>[31]</sup>，本研究采用重量分析法进行校正，消除体积变化对肠灌流实验结果的影响；预试验时发现管路对药物有明显的吸附，故在正式实验中相应延长了供试液的平衡时间。本研究考察了自微乳在大鼠不同肠段的吸收，结果表明，制备自微乳后大黄总蒽醌在大鼠十二指肠的  $K_a$  及  $P_{app}$  较空肠段及回肠的  $K_a$  及  $P_{app}$  高，这与多数文献报道结果不一致。

一般认为，自微乳稀释微乳化后主要通过淋巴途径吸收，在富有集合淋巴结的回肠吸收最好。本研究所得结果为自微乳中大黄总蒽醌在十二指肠吸收最好，原因可能是当微乳到达十二指肠后，会刺激含有胆酸盐、胆固醇、卵磷脂等成分胆汁的分泌，降低自微乳表面张力，有利于脂肪消化，从而促进药物在十二指肠的吸收<sup>[32]</sup>；其次 P-糖蛋白在大鼠十二指肠、空肠、回肠的表达依次增加，从而在一定程度上抑制了自微乳中大黄总蒽醌在小肠中下段的吸收。因在体单向灌流实验要求药物必须是溶液，而大黄总蒽醌及黄芪总皂苷组分本身在 K-R 溶液中不溶，导致无法进行组分本身的肠吸收实验。本研究以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄

素甲醚为测定指标, 根据质量权重系数折算成大黄总蒽醌的  $K_a$  与  $P_{app}$  值进行比较, 使数据结果更为科学合理<sup>[33]</sup>。

综上所述, 本研究制备了大黄总蒽醌-黄芪总皂苷多组分自微乳, 所得的自微乳具有良好负载中药多组分的能力, 自微乳中大黄总蒽醌及黄芪总皂苷在大鼠各小肠段均吸收良好, 预测可以有效改善二者口服生物利用度问题, 使其更好地发挥协同抗肾纤维化作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sundström J, Bodegard J, Bollmann A, *et al.* Prevalence, outcomes, and cost of chronic kidney disease in a contemporary population of 2.4 million patients from 11 countries: The CaReMe CKD study [J]. *Lancet Reg Health Eur*, 2022, 20: 100438.
- [2] Campbell V K, Gately R P, Krishnasamy R, *et al.* Midkine and chronic kidney disease-associated multisystem organ dysfunctions [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2021, 36(9): 1577-1584.
- [3] Tinti F, Lai S, Noce A, *et al.* Chronic kidney disease as a systemic inflammatory syndrome: Update on mechanisms involved and potential treatment [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(5): 419.
- [4] Kalantar-Zadeh K, Jafar T H, Nitsch D, *et al.* Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2021, 398(10302): 786-802.
- [5] Brown E, Heerspink H J L, Cuthbertson D J, *et al.* SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists: Established and emerging indications [J]. *Lancet*, 2021, 398(10296): 262-276.
- [6] Tanabe K, Jun W D, Sato Y. Targeting angiogenesis and lymphangiogenesis in kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 289-303.
- [7] 谢统, 朱丽婷, 王如琰, 等. 程锦国基于肠-肾轴理论论治慢性肾脏病撷菁 [J]. *浙江中医杂志*, 2023, 58(5): 320-322.
- [8] 饶向荣. 活血化瘀在慢性肾脏病治疗中的应用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(6): 666-668.
- [9] 邵建彬, 张玉倩, 刘孟瑞, 等. 赵玉庸运用“通肾络八法”治疗慢性肾脏病经验 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(8): 714-719.
- [10] Zeng X, Cai G Z, Liang T L, *et al.* Rhubarb and *Astragalus* capsule attenuates renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction by alleviating apoptosis through regulating transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1)/p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920720.
- [11] 贾晓斌, 杨冰, 封亮, 等. 中药药剂学研究前沿: 组分剂技术基础与关键科学问题 [J]. *药科学报*, 2018, 53(12): 1943-1953.
- [12] 花慧莲, 凌亚, 李进冬. 基于 mTOR 通路的大黄素对肾小管上皮细胞转分化的干预作用机制研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(17): 1729-1733.
- [13] Guan Y, Wu X X, Duan J L, *et al.* Effects and mechanism of combination of Rhein and danshensu in the treatment of chronic kidney disease [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1381-1400.
- [14] Zhou X T, Zou J J, Ao C, *et al.* Renal protective effects of astragaloside IV, in diabetes mellitus kidney damage animal models: A systematic review, meta-analysis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105192.
- [15] 杨茹茜, 徐倩, 杨旖, 等. 黄芪甲苷对肾纤维化小鼠 Toll/MyD88 依赖性通路的作用研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3775-3782.
- [16] 谢臻, 周媛, 陈勇, 等. 配伍药物与 pH 值环境对大黄蒽醌类成分溶出变化的影响规律 [J]. *中草药*, 2013, 44(24): 3476-3481.
- [17] Xi Y H, Wang W H, Ma L, *et al.* Alendronate modified mPEG-PLGA nano-micelle drug delivery system loaded with astragaloside has anti-osteoporotic effect in rats [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 2386-2402.
- [18] Ashkar A, Sosnik A, Davidovich-Pinhas M. Structured edible lipid-based particle systems for oral drug-delivery [J]. *Biotechnol Adv*, 2022, 54: 107789.
- [19] 崔鲜伟, 邓桂明, 欧阳林旗, 等. 纳米脂质体制剂提高苦参碱去活化肝星状细胞作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(1): 63-69.
- [20] Plaza-Oliver M, Santander-Ortega M J, Lozano M V. Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, 11(2): 471-497.
- [21] Tan O J, Loo H L, Thiagarajah G, *et al.* Improving oral bioavailability of medicinal herbal compounds through lipid-based formulations - A scoping review [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153651.
- [22] 马祖兵, 李小芳, 谢龙, 等. 大黄素自微乳-微丸的制备及其体外评价 [J]. *中药材*, 2019, 42(1): 144-149.
- [23] 仲粒, 李小芳, 廖艳梅, 等. 甘草黄酮自微乳化释药系统的制备及其质量评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3044-3051.
- [24] 樊丽雅, 胡丽, 张璐, 等. 苦杏仁苷自微乳的制备及理化性质的研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(4): 475-479.
- [25] 王子禹, 刘洋, 张鑫, 等. 基于抗炎活性的葛根芩连片

- 整体的中药生物药剂学分类系统研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3662-3671.
- [26] 覃红萍, 鲁静, 林瑞超. HPLC-ELSD 法测定黄芪药材中黄芪皂苷 I、II、III、IV [J]. 中草药, 2009, 40(3): 471-473.
- [27] 李东辉, 吴红伟, 李国峰, 等. 大黄总多酚、总蒽醌含量测定及体外抗氧化作用的谱效关系研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(4): 541-552.
- [28] 周超, 何轶, 林瑞超, 等. 黄芪 4 种皂苷提取物的制备及其在黄芪总皂苷含量测定中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 56-59.
- [29] Chatterjee B, Hamed Almurisi S, Ahmed Mahdi Dukhan A, *et al.* Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(9): 3639-3652.
- [30] Vithani K, Jannin V, Pouton C W, *et al.* Colloidal aspects of dispersion and digestion of self-dispersing lipid-based formulations for poorly water-soluble drugs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 142: 16-34.
- [31] 胡律江, 赵晓娟, 郭慧玲, 等. 基于大鼠在体单向肠灌注模型研究四制香附主成分肠吸收机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1392-1396.
- [32] 周树瑶, 关延彬, 贾永艳, 等. 姜黄素自微乳释药系统的大鼠在体小肠吸收研究 [J]. 中成药, 2017, 39(4): 825-828.
- [33] 刘丹, 封亮, 宋婕, 等. 中药组分整体生物药剂学分类系统研究思路与策略 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4831-4835.

[责任编辑 郑礼胜]