

甘草新型自组装纳米粒的形成及抗炎作用评价

孟雨婷^{1,2}, 薛玉叶², 刘燕^{1,2}, 王志若², 高翠芸², 杭凌宇^{2*}, 袁海龙^{1,2*}

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

2. 空军军医大学 空军特色医学中心 药学部, 北京 100142

摘要: 目的 对传统中药煎煮自组装现象进行改良, 应用微沉淀法制备甘草新型自组装纳米粒 (glycyrrhiza novel self-assembled nanoparticles, GN-SAN), 将其与传统水煎煮形成的甘草 SAN (glycyrrhiza decoction self-assembled nanoparticles, GD-SAN) 进行系统比较, 进一步探究 GN-SAN 对 2,4-二硝基氯苯 (2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB) 诱导的小鼠特异性皮炎的治疗作用。方法 采用煎煮结合微沉淀法制备 GN-SAN, 以粒径、PDI 和 ζ 电位为评价指标, 通过单因素试验联合 Box-Behnken 设计-响应面法对煎煮时间、磁力搅拌转速、磁力搅拌时间、磁力搅拌温度、旋转蒸发温度以及生药质量浓度进行优化, 筛选最优处方工艺。将优化后的 GN-SAN 与 GD-SAN 进行比较, 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 和透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察形态; 高效液相色谱仪 (HPLC)、紫外分光光度计 (UV) 以及 bichinchonic acid (BCA) 试剂盒检测各 SAN 中小分子活性成分 (蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草查耳酮 A)、多糖以及蛋白的含量。采用 DNCB 对小鼠背部皮肤刺激, 建立特异性皮炎模型。将小鼠分为空白组, 模型组, 阳性药组, GN-SAN 凝胶低、中、高剂量组, 观察各小鼠背部皮肤皮损变化, 对皮损组织病理变化、炎症因子表达、脏器指数等指标进行检测。结果 GN-SAN 的最佳处方工艺: 甘草经 8 倍量水煎煮 1 h, 得 GD-SAN。再经 6 倍 70%乙醇煎煮 1 h 后得醇提液, 合并 2 次提取液, 600 r/min 磁力搅拌 20 min, 60 °C 旋转蒸发除醇并浓缩至 0.2 g/mL, 即得 GN-SAN。形成的 SAN 性质稳定, 为形态均一的圆球形纳米粒, 粒径为 (189.5±0.3) nm, 多分散指数为 0.138±0.130, ζ 电位为 (-31.4±0.8) mV。其粒径大小、均匀性、稳定性及有效成分转移率相对于传统 SAN 均提高, 且 GN-SAN 对皮炎有良好的治疗效果。结论 采用煎煮法结合微沉淀法制备 GN-SAN, 其工艺简单、主要成分含量高, 稳定性好; 制成的 GN-SAN 性能优良、抗炎作用显著, 为甘草纳米制剂进一步开发应用奠定基础。

关键词: 甘草; 自组装纳米粒; Box-Behnken 设计-响应面法; 物质基础; 特异性皮炎; 抗炎; 微沉淀法; 蔗糖甘草苷; 甘草苷; 蔗糖异甘草苷; 异甘草苷; 甘草酸; 甘草查耳酮 A; 多糖; 蛋白质

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)09-2912-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.006

Formation of novel self-assembled nanoparticles of *Glycyrrhiza uralensis* and anti-inflammatory evaluation

MENG Yuting^{1,2}, XUE Yuye², LIU Yan^{1,2}, WANG Zhiruo², GAO Cuiyun², HANG Lingyu², YUAN Hailong^{1,2}

1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Department of Pharmacy, Air Force Medical Center, Air Force Medical University, PLA, Beijing 100142, China

Abstract: Objective To refine the traditional decoction self-assembly phenomenon, the *Glycyrrhiza* novel self-assembled nanoparticles (GN-SAN) were constructed by microprecipitation method, and compared with *Glycyrrhiza* decoction self-assembled nanoparticles (GD-SAN) in detail, and to further explore the therapeutic effect of GN-SAN on 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced atopic dermatitis in mice. **Methods** GN-SAN was prepared by decoction combined with microprecipitation, and the particle size, PDI and ζ potential were used as evaluation indexes, and the decoction time, magnetic stirring speed, magnetic stirring time, magnetic stirring temperature, rotary steaming temperature and mass concentration of raw materials were optimized by single factor

收稿日期: 2023-11-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174074); 国家自然科学基金面上项目 (81873092); 优秀青年人才项目 (22YXQN027)

作者简介: 孟雨婷, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: uouuooy@163.com

*通信作者: 袁海龙, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新型给药系统。E-mail: yhlpharm@126.com

杭凌宇, 博士, 研究方向为中药新型给药系统。E-mail: 445914871@qq.com

test combined with Box-Behnken design-response surface method, and the optimal prescription process was screened. Compare the optimized GN-SAN with GD-SAN, the morphology of SAN was observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), and the contents of small molecule active components (liquiritin apioside, liquiritin, isoliquiritin apioside, isoliquiritin, glycyrrhetic acid, licochalcone A), polysaccharides and proteins were detected by high-performance liquid chromatography (HPLC), ultraviolet spectrophotometer (UV) and bicinchoninic acid (BCA) kit. DNCB was used to stimulate the dorsal skin of mice, and an atopic dermatitis model was established. The mice were divided into blank group, model group, positive drug group, GN-SAN gel low, medium and high dose groups, and the changes of skin lesions on the back of the mice were observed, and the histopathological changes, inflammatory factor expression, organ index and other indicators of skin lesions were detected.

Results The optimal prescription process of GN-SAN was as follows: *Glycyrrhiza uralensis* was decocted with 8 times the amount of water for 1 h to obtain the GD-SAN. After decoction of 6 times of 70% ethanol for 1 h, the alcohol extract was obtained. Combining the two extracts, stirring magnetically at 600 r/min for 20 min, removing alcohol by rotary evaporation at 60 °C and concentrating to 0.2 g/mL to obtain GN-SAN. The formed SAN is a stable spherical nanoparticle with a morphological homogeneous particle size of (189.5 ± 0.3) nm, a polydispersity index of 0.138 ± 0.130 , and a ζ potential of (-31.4 ± 0.8) mV. Compared with traditional SAN, the particle size, uniformity, stability and effective component transfer rate were improved, and GN-SAN had a good therapeutic effect on dermatitis. **Conclusion** The preparation of GN-SAN by decoction method combined with microprecipitation method is simple and the content of main components is high and stable, and the prepared GN-SAN has excellent performance and significant anti-inflammatory effect, which lays a foundation for the further development and application of *G. uralensis* nano-preparations.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; self-assembled nanoparticles; Box-Behnken design-response surface method; material basis; atopic dermatitis; anti-inflammatory; microprecipitation method; liquiritin apioside; liquiritin; isoliquiritin apioside; isoliquiritin; glycyrrhetic acid; licochalcone A; polysaccharides; proteins

中药自组装是近年各学者研究与探讨的热门话题, 中药在煎煮过程中, 大量化合物从中药材转移到汤剂中, 化学分子之间发生相互作用并形成自组装纳米粒 (self-assembled nanoparticles, SAN) [1-2]。研究表明 SAN 可以包封难溶性小分子, 提高溶解度及生物利用度, 增强药效[3-5]。如黄连汤中的 SAN, 能够促进细胞旁小檗碱运输, 并通过主动运输和胞吞作用改善细胞间小檗碱运输[6]。甘草通过煎煮可以包裹芍药有效成分形成聚集体, 增加其溶解度, 延长在体内发挥作用的时间[7-8]。从白虎汤汤液中发现的纳米聚集体的解热作用强于水溶液, 该部位的细胞摄取率和靶向性也显著增强[9]。中药在经过煎煮中天然成分自组装形成纳米粒很可能是一个很有前途现代制剂研究方向。

然而中药 SAN 的临床可行性、稳定性是评估药物是否可能用于临床应用的关键指标, 由于传统方式煎煮获得的 SAN 在常温水相下长时间放置也会出现粒径、 ζ 电位的变化[10-11]。若要保证中药 SAN 的结构稳态与均一性, 则需要在调控温度、煎煮时间、pH 值等因素变化, 更重要的是, 传统水煎煮往往存在难溶性成分转移率低的问题, 限制了中药活性成分的有效递送。因此, 需要通过有效的制剂技术, 提高 SAN 的稳定性及有效成分转移率。

甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza*

uralensis Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat.或光果甘草 *G. glabra* L.的干燥根和根茎[12], 具有解毒、调和诸药、祛风止痒的功效。甘草及其活性成分制剂作为经验用药在临床上被广泛应用于治疗多种皮肤病, 具有良好的抗病毒、抗炎、抗变态反应等功效, 效果显著[13-15]。本课题组前期研究发现, 甘草经水煎煮可形成 SAN, 但在进一步应用过程中发现其存在稳定性不佳, 难溶性成分转移率较低等问题。采用微沉淀法改良自组装过程, 即药材经水煎煮后, 以适当浓度乙醇提取药渣, 水提液和醇提液合并, 磁力搅拌后除醇, 水煎液和醇提液发生分子识别并在过饱和驱动力下形成自组装纳米粒[16]。该方法有效解决了 SAN 稳定性差, 易聚集及难溶性成分转移率低的问题。本研究通过控制关键形成条件, 并进一步应用微沉淀法制备甘草新型自组装纳米粒 (*Glycyrrhiza* novel self-assembled nanoparticles, GN-SAN), 考察不同煎煮时间、磁力搅拌转速、磁力搅拌时间、旋转蒸发温度和生药质量浓度对 SAN 形成的影响, 优化最佳 GN-SAN 工艺。从粒径分布、 ζ 电位、SAN 形态、有效成分转移率等方面, 对传统水煎煮形成的甘草 SAN (*Glycyrrhiza* decoction self-assembled nanoparticles, GD-SAN) 与 GN-SAN 进行系统对比研究, 进一步探究 GN-SAN 抗皮炎活性药效, 以期中药天然纳米制剂的发展提供新的

思路及见解。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BT125D 型电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 98-1-B 型电子恒温电热套, 天津市泰斯特仪器有限公司; N-1300D 型旋转蒸发器, 上海爱朗仪器有限公司; SHB-III 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; DZF-6020 型真空干燥箱, 北京陆希科技有限公司; Lab-1A-50 型冻干机, 北京博医康实验仪器有限公司; DF101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 北京恒丰长伟科技有限公司; TDA-8002 型电热恒温水浴锅, 余姚市东方电工仪器厂; Nanotrac Wave II 型纳米粒度电位仪, 美国麦奇克有限公司; LC-2030C 3D Plus 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Tecnai G2 F30 型场发射高分辨透射电子显微镜(TEM), 美国 FEI 公司; S-4800 扫描电子显微镜(SEM), 日本日立公司; CBGT-48 型高速组织研磨机, 上海测博科技有限公司。

1.2 药物与试剂

对照品蔗糖甘草苷(批号 PS011457)、甘草苷(批号 PS012028)、异甘草苷(批号 PS020442), 质量分数均>98%, 成都普思生物科技股份有限公司; 对照品甘草酸(批号 HP200644F1)、蔗糖异甘草苷(批号 HR5168W4)、甘草查耳酮A(批号 HS1970B1), 质量分数均>98%, 宝鸡市辰光生物科技有限公司。

甘草购自北京任草中药饮片有限公司, 经空军特色医学中心袁海龙研究员鉴定, 为豆科甘草属植物胀果甘草 *G. inflata* Bat. 的干燥根和根茎。1-氯-2,4-二硝基苯, 批号 GL100072, 萨恩化学技术(上海)有限公司; 丁酸氢化可的松, 批号 23011009, 天津金耀药业有限公司; 卡波姆 940, 批号 20230812, 广州佰宇生物科技有限公司; 薇婷脱毛膏, 批号 C261122001, 利洁时家化有限公司; 小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6, 批号 AK04JBN85267)、IL-1 β (批号 PA048H480024)、免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE, 批号 PA054RX65181)酶联免疫吸附测定试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号 KL07J8J64980), 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。甲醇、乙腈色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

BALB/c 小鼠, 雄性, 体质量 18~22 g, SPF 级,

由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。许可证号: SCXK(京)2019-0010。动物实验伦理经中国人民解放军空军特色医学中心伦理委员会批准, 批准号: 空特(科研)第 2023-98-PJ01。

2 方法与结果

2.1 GD-SAN 和 GN-SAN 的制备

2.1.1 GD-SAN 的制备 采用传统煎煮工艺提取 GD-SAN。取甘草 15 g, 打碎成粗粉, 加 9 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 回流提取 1 h, 趁热滤过, 滤液迅速放入冷水中搅拌冷却; 药渣重复提取 1 次, 趁热滤过; 合并 2 次滤液, 减压浓缩至 0.2 g/mL, 即得 GD-SAN。

2.1.2 GN-SAN 的制备 采用微沉淀法^[6]制备 GN-SAN。取甘草 15 g, 打碎成粗粉, 加 8 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 回流提取 1 h, 趁热滤过。取甘草水提后的药渣, 加 6 倍 70%乙醇回流提取 1 h, 滤过, 得醇提液。合并 2 次提取液, 600 r/min、25 °C 条件下磁力搅拌 20 min, 60 °C 旋转蒸发除醇, 并浓缩至 0.2 g/mL, 即得 GN-SAN。

2.1.3 甘草药材溶液的制备 取甘草粉末(过三号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 指标成分检测方法的建立

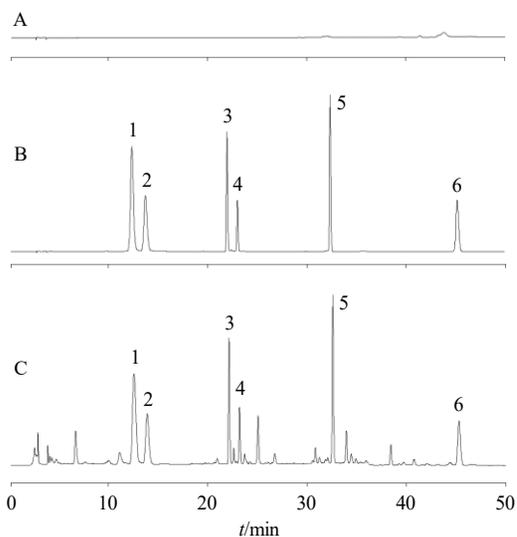
2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Inertsil® ODS-3 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液, 进行梯度洗脱: 0~10 min, 19%乙腈; 10~12 min, 19%~20%乙腈; 12~21 min, 20%~33%乙腈; 21~35 min, 33%~51%乙腈; 35~46 min, 51%乙腈; 46~50 min, 51%~19%乙腈; 变波长检测: 0~15 min, 275 nm; 15~30 min, 360 nm; 30~35 min, 250 nm; 35~50 min, 375 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μ L。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸和甘草查耳酮 A 对照品适量, 加入甲醇配制成质量浓度分别为 783.0、296.0、148.0、54.5、1 391.0、99.0 μ g/mL 的混合对照品溶液, 4 °C 冰箱冷藏, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.2.1”项下的 GN-SAN 溶液 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解后, 定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜,

即得供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 分别取空白甲醇溶液（阴性对照组）、混合对照品溶液、GN-SAN 供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，结果见图 1。空白溶液未出现干扰峰，且 GN-SAN 供试品溶液和混合对照品溶液中各个成分的出峰时间一致，表明该色谱方法专属性良好。



1-芹糖甘草苷; 2-甘草苷; 3-芹糖异甘草苷; 4-异甘草苷; 5-甘草酸; 6-甘草查耳酮 A。

1-liquiritin apioside; 2-liquiritin; 3-isoliquiritin apioside; 4-isoliquiritin; 5-glycyrrhetic acid; 6-licochalcone A。

图 1 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和 GN-SAN 供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC profiles of blank solution (A), mixed reference solution (B) and GN-SAN test solution (C)

2.2.5 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下制备的混合对照品溶液，等比稀释，加甲醇定容至刻度，摇匀。HPLC 进样分析，以峰面积为纵坐标 (Y)，各成分的质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程：芹糖甘草苷 $Y=12\ 725.0 X+40\ 450.0$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 48.94~783.00 $\mu\text{g/mL}$; 甘草苷 $Y=191\ 861.0 X+20\ 573.0$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 18.50~296.00 $\mu\text{g/mL}$; 芹糖异甘草苷 $Y=30\ 883.0 X+23\ 264.0$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 9.25~148.00 $\mu\text{g/mL}$; 异甘草苷 $Y=36\ 666.0 X+9\ 073.5$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 3.41~54.50 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $Y=7\ 847.7 X-54\ 818.0$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 86.94~1\ 391.00 $\mu\text{g/mL}$; 甘草查耳酮 A $Y=44\ 516.0 X+15\ 686.0$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 6.19~99.00 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明 6 个成分在各自的质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取质量浓度分别为芹糖甘草苷 783.0 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 296.0 $\mu\text{g/mL}$ 、芹糖异甘草苷 148.0 $\mu\text{g/mL}$ 、异甘草苷 54.5 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 1\ 391.0 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草查耳酮 A 99.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，平行测定 6 次，计算得到芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草查耳酮 A 峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.41%、0.39%、0.40%、0.39%、0.37%，表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密量取 GN-SAN 供试品溶液，分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，测定峰面积，计算得到芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草查耳酮 A 峰面积的 RSD 分别为 1.39%、1.35%、1.88%、0.72%、1.36%、1.86%，表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 精密量取同一批 GN-SAN 供试品溶液 6 份，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，测定峰面积。计算得到芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草查耳酮 A 质量浓度的 RSD 分别为 0.94%、0.94%、1.18%、1.19%、1.20%、1.18%，表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密吸取适量已测定指标成分质量浓度的供试品溶液 9 份，根据样品中各成分质量浓度的 80%、100%、120% 的比例加入各对照品，涡旋混合均匀后，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，计算得到芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草查耳酮 A 的平均加样回收率分别为 101.99%、101.19%、101.33%、101.00%、100.95%、100.29%，RSD 分别为 0.53%、0.75%、1.64%、0.63%、0.77%、1.18%，表明该方法准确度良好。

2.3 BBD-RSM 因素和水平设计（单因素实验）

前期实验表明，甘草用水和乙醇各提取 1 次，有效成分转移率可达到 60% 以上，因此固定提取次数各 1 次，以 GN-SAN 的平均粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位为评价指标，对甘草煎煮时间、磁力搅拌转速、磁力搅拌时间、磁力搅拌温度、旋转蒸发温度和生药质量浓度进行单因素考察，初步筛选对 GN-SAN 制备过程中影响较大的实验因素。

2.3.1 煎煮时间的影响 固定磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌时间 20 min、磁力搅拌温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、

旋转蒸发温度 60 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL, 考察煎煮时间分别为 10、20、30、60、90、120 min 时对 GN-SAN 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 1。可知, 不同煎煮时间对 SAN 的粒径影响较大, 在 10~60 min 内, 随着煎煮时间的增加, 粒径逐渐减小; 60 min 之后, 煎煮时间越长, 粒径越大。当煎煮时间为 60 min 时, SAN 粒径最小, 且粒子分布均匀。故选择煎煮时间 60 min。

表 1 煎煮时间考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Investigation of decocting time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

煎煮时间/min	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
10	390.0±3.5	0.333±0.018	13.9±2.3
20	264.4±2.6	0.360±0.031	15.5±1.6
30	239.5±4.7	0.160±0.074	17.5±1.8
60	189.5±1.9	0.053±0.045	23.3±2.4
90	287.7±3.5	0.097±0.019	16.2±0.9
120	313.0±2.8	0.105±0.082	14.0±3.2

2.3.2 磁力搅拌转速的考察 固定煎煮时间为 60 min, 磁力搅拌时间 20 min、磁力搅拌温度 25 °C、旋转蒸发温度 60 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL, 考察磁力搅拌转速为 400、600、800 r/min 时对 GN-SAN 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 2。当磁力搅拌转速从 400 r/min 增至 600 r/min 时, 粒径和 PDI 无明显变化, ζ 电位增加粒子趋于稳定; 继续增加磁力搅拌速度, 粒径增加, 并且稳定性降低。故选择磁力搅拌转速为 600 r/min。

2.3.3 磁力搅拌时间的考察 固定煎煮时间为 60 min, 磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌温度 25 °C、旋转蒸发温度 60 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL。考察磁力搅拌时间为 10、20、30 min 时对 GN-SAN 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 3。当磁力搅拌时间从 10 min 增至 20 min 时, 平均粒径无明显变化, 稳定性增加。但搅拌时间增加至 30 min 时, 较长的搅拌时间破坏了纳米体系的稳定性, 导致粒径显著增大, 故选择搅拌时间为 20 min。

2.3.4 磁力搅拌温度的考察 固定煎煮时间为 60 min,

表 2 磁力搅拌转速考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Investigation of magnetic stirring speed ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

转速/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
400	191.5±5.2	0.051±0.016	19.2±1.7
600	191.4±2.7	0.057±0.013	22.6±0.3
800	223.5±4.0	0.559±0.026	16.0±2.2

表 3 磁力搅拌时间考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Investigation of magnetic stirring time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/min	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
10	209.4±1.9	0.079±0.037	21.8±2.6
20	200.3±2.0	0.086±0.062	27.1±1.1
30	267.6±0.8	0.149±0.048	12.6±2.5

乙醇体积分数 70%, 磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌时间 20 min、旋转蒸发温度 60 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL。考察磁力搅拌温度为 25、50、75 °C 时对 GN-SAN 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 4。磁力搅拌温度对粒径和 ζ 电位都没有显著影响, 故选择磁力搅拌温度为 25 °C。

表 4 磁力搅拌温度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Investigation of magnetic stirring temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磁力搅拌温度/°C	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
25	201.5±3.7	0.271±0.062	24.3±1.5
50	207.6±5.2	0.191±0.037	27.1±2.8
75	199.5±4.6	0.330±0.059	26.9±1.7

2.3.5 旋转蒸发温度的考察 固定煎煮时间为 60 min, 磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌时间 20 min、磁力搅拌温度 25 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL。考察旋转蒸发温度为 40、60、80 °C 时对 GN-SAN 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 5。旋转蒸发温度对粒径无显著影响; 当旋转蒸发温度从 40 °C 增加至 60 °C 时, ζ 电位明显增大, 继续升高温度对 ζ 电位无显著影响。故选择旋转蒸发温度为 60 °C。

2.3.6 生药质量浓度的考察 固定煎煮时间为 60 min, 乙醇体积分数 70%, 磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌时间 20 min、磁力搅拌温度 25 °C 和旋转蒸发温度 60 °C。考察生药质量浓度为 0.1、0.2、0.3 g/mL 时对 GN-SAN 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位的影响, 结果见表 6。有研究发现^[17], 中药汤剂中化学成分达到一定质量浓度即临界生药质量浓度时才

表 5 旋转蒸发温度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Investigation of rotating evaporation temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

旋转蒸发温度/°C	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
40	211.5±4.2	0.028±0.037	10.6±2.6
60	183.8±8.2	0.034±0.065	28.9±3.1
80	204.5±7.1	0.055±0.014	27.0±2.9

表 6 生药质量浓度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Investigation of mass concentration of raw materials ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

生药质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	平均粒径/ nm	PDI	ζ 电位/ mV
0.1	276.1±8.7	0.311±0.042	23.1±2.5
0.2	189.5±6.4	0.111±0.051	26.8±3.1
0.3	331.0±6.6	0.424±0.011	19.0±2.8

会聚集形成 SAN, 当大于临界生药质量浓度时, 小分子过度聚集导致粒径增大。由表 6 可知, 当质量浓度为 0.2 g/mL 时, GN-SAN 处于临界生药质量浓度, 粒子粒径最小且趋于稳定; 继续增大质量浓度, SAN 的粒径和 PDI 都显著增加, 并且电位降低, 粒子变大且稳定性降低。故选择质量浓度为 0.2 g/mL。

表 7 Box-Behnken 实验设计和结果

Table 7 Design and results of Box-Behnken experiment

试验号	X ₁ /min	X ₂ /min	X ₃ /(g·mL ⁻¹)	Y ₁ /nm	Y ₂	试验号	X ₁ /min	X ₂ /min	X ₃ /(g·mL ⁻¹)	Y ₁ /nm	Y ₂
1	60	20	0.2	190.6	0.156	10	90	10	0.2	272.2	0.271
2	60	20	0.2	187.4	0.156	11	30	10	0.2	247.8	0.243
3	30	20	0.1	234.4	0.211	12	30	20	0.3	246.2	0.262
4	90	20	0.1	242.1	0.217	13	60	10	0.3	274.2	0.264
5	60	20	0.2	188.1	0.156	14	60	20	0.2	188.3	0.164
6	90	30	0.2	256.9	0.206	15	60	30	0.1	227.8	0.131
7	60	30	0.3	247.7	0.243	16	30	30	0.2	236.2	0.192
8	60	20	0.2	189.2	0.160	17	90	20	0.3	287.5	0.267
9	60	10	0.1	237.5	0.235						

4.20 X₂X₃+35.15 X₁²+29.40 X₂²+28.68 X₃², R₁²=0.998 9, R_{adj1}²=0.997 5, P<0.000 1; Y₂=0.16+0.006 15 X₁-0.028 X₂+0.029 X₃-0.004 825 X₁X₂-0.000 225 X₁X₃+0.019 X₂X₃+0.045 X₁²+0.026 X₂²+0.036 X₃², R₂²=0.992 2, R_{adj2}²=0.982 1, P<0.000 1。拟合方程 R²均大于 0.9, 由此可证明模型拟合良好。各因素之间具有良好的相关性。自变量与响应值的三维图如图 2 所示。

根据 Design-Expert V8.0.6 实验设计软件综合评价后给出的最佳制备条件: 煎煮时间 57.35 min, 磁力搅拌时间 23.07 min, 生药质量浓度 0.17 g/mL, 3 批验证试验与模型优选的最佳处方条件, 测得 GN-SAN 的粒径和 PDI。

2.4.3 优化处方及验证 为了方便实验操作, 根据 Design-Expert V8.0.6 实验设计软件综合评价后给出的 GN-SAN 的最佳制备工艺和处方进行相应调整, 将最佳工艺参数修正为煎煮时间 57 min, 磁力搅拌

2.4 Box-Behnken 设计优化实验

2.4.1 Box-Behnken 设计实验因素 基于单因素实验结果, 选择对 GN-SAN 制备过程中影响较大的 3 个因素作为考察因素, 分别为煎煮时间 (X₁)、磁力搅拌时间 (X₂) 和生药质量浓度 (X₃), 以平均粒径 (Y₁) 和 PDI (Y₂) 2 者作为评价指标, 使用 Design-Expert V8.0.6 软件对数据进行拟合, 并验证优化后的工艺。因素与水平见表 7。

2.4.2 回归模型方差分析及显著性检验 以 Box-Behnken 响应面法优化其工艺参数^[18], 因素水平及实验结果见表 7。采用 Design-Expert V8.0.6 软件进行数学模型拟合。以 Y₁ 和 Y₂ 作为响应值, X₁、X₂ 和 X₃ 为自变量, 建立的 2 次回归方程为 Y₁=188.72+11.76 X₁-7.89 X₂+14.22 X₃-0.93 X₁X₂+8.40 X₁X₃-

时间 23 min, 生药质量浓度 0.17 g/mL。按照“2.2”项下方法制备最优处方 GN-SAN 3 批, 分别测定 GN-SAN 平均粒径和 PDI, 计算偏差 [偏差=(预测值-实际值)/预测值], 实测值与模型预测值结果见表 8, 可知实测值和模型预测值比较接近, 说明模型预测性良好, 可靠性高。

通过单因素分析对制备工艺进行优化, 最终得出 GN-SAN 的最佳制备方法为采用传统煎煮工艺结合微沉淀法优化 GN-SAN, 取甘草 15 g, 打碎成粗粉, 加 8 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 回流提取 1 h, 趁热滤过得甘草 SAN。取甘草水提后药渣, 加 6 倍 70%乙醇回流提取 1 h, 滤过, 得醇提液。合并 2 次提取液, 600 r/min 磁力搅拌 20 min, 60 ℃旋转蒸发除醇并浓缩至 0.2 g/mL, 即得 GN-SAN。

2.5 GD-SAN 和 GN-SAN 的表征

2.5.1 粒径分析 取适量 GD-SAN、GN-SAN 溶液, 加超纯水稀释后, 测定平均粒径、PDI 及 ζ 电位。

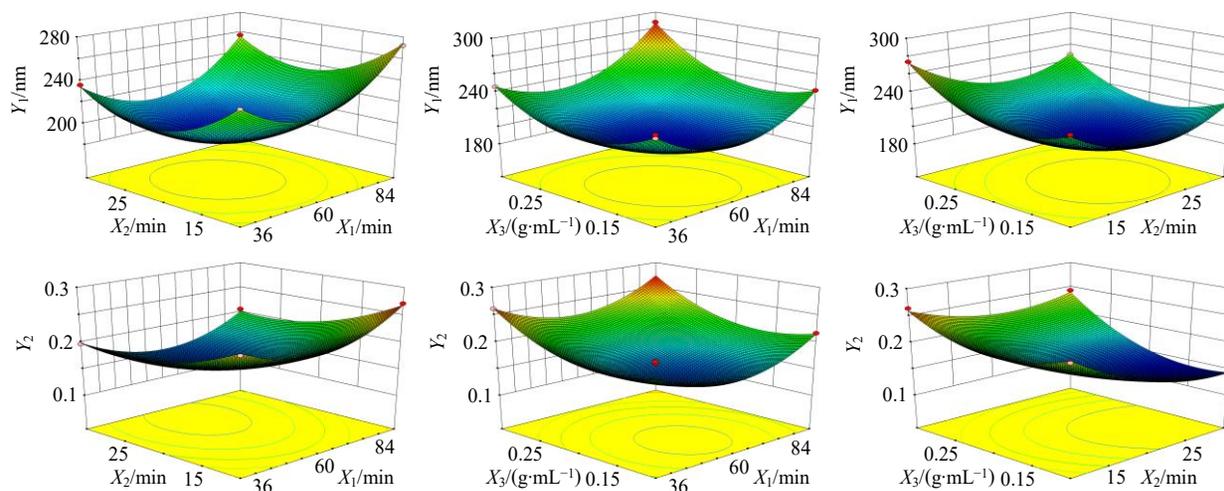


图2 自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent variable and response values

表8 预测值和实际值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Comparison of predictive value and actual value

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

项目	Y_1/nm	Y_2
预测值	187.4	0.145
实测值	189.9 ± 6.7	0.138 ± 0.130
偏差/%	-1.30	4.56

其粒径分布见图3。GD-SAN的粒径平均粒径为 (320.5 ± 2.3) nm, PDI为 0.116 ± 0.090 , ζ 电位值为 (-20.4 ± 2.8) mV。GN-SAN的粒径分布较为均一, 体系较为稳定, 平均粒径为 (189.5 ± 0.3) nm, PDI为 0.138 ± 0.130 , ζ 电位值为 (-31.35 ± 0.80) mV。

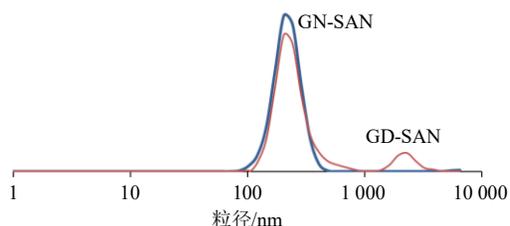


图3 GD-SAN和GN-SAN的粒径分布

Fig. 3 Size distribution of GD-SAN and GN-SAN

2.5.2 SEM形态观察 取适量GD-SAN、GN-SAN溶液, 适当稀释后滴于锡箔纸上, 室温下自然干燥, 喷金处理后, 于SEM下观察其形态, 结果见图4。

2.5.3 TEM形态观察 取适量GD-SAN、GN-SAN溶液滴于铜网上, 用滤纸吸去边缘多余液体, 红外灯干燥后TEM观察形态, 结果见图5。所制备的GN-SAN粒径在100~300 nm, 形态完整, 呈规则的圆球形, 分布均匀。GD-SAN粒径在200~500 nm, 形态也呈规则的圆球形, 但有聚集现象。

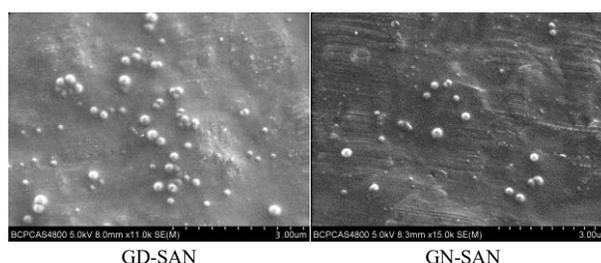


图4 GD-SAN和GN-SAN的SEM图

Fig. 4 SEM images of GD-SAN and GN-SAN

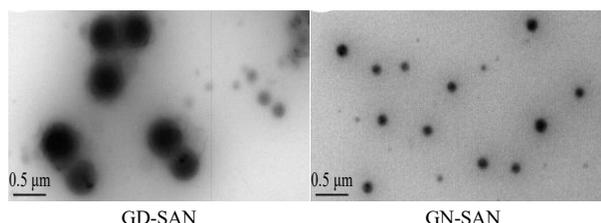


图5 GD-SAN和GN-SAN的TEM图

Fig. 5 TEM images of GD-SAN and GN-SAN

2.6 含量测定

2.6.1 小分子活性成分 取按“2.1”项下方法制备的GD-SAN、GN-SAN溶液各0.5 mL, 加甲醇定容至10 mL, 按“2.2.1”项下HPLC方法测定其中6种活性成分含量, 记录色谱图。计算所含活性成分的含量, 结果见表9。

2.6.2 蛋白质的含量 使用BCA试剂盒测定汤剂中蛋白类成分的含量。以牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)为标准品, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)稀释至标准品质量浓度分别为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL。取“2.1”项下制备的GD-SAN、GN-SAN溶液各3份, 用PBS稀释10倍, 精密吸取20 μL 至96孔板, 每个样品

表 9 各组分有效成分的含量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Content analysis of effective components of each component ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)							
	蔗糖甘草苷	甘草苷	蔗糖异甘草苷	异甘草苷	甘草酸	甘草查耳酮 A	蛋白质	多糖
GD-SAN	4.65±0.05	1.61±0.03	0.67±0.01	0.27±0.01	7.98±0.06	0.07±0.01	15.24±0.78	23.81±0.32
GN-SAN	4.17±0.03	1.41±0.01	0.80±0.12	0.31±0.01	8.23±0.02	0.45±0.01	18.69±1.25	30.09±0.16

设置 3 个复孔。根据对照品孔和样品孔数量,将 BCA 试剂 A 和 BCA 试剂 B 按体积比为 50 : 1 配制适当体积的工作液,充分混匀,精密吸取 200 μL 至各标准品孔和样品孔中,37 °C 孵育 0.5 h 后,562 nm 波长下测定吸光度 (*A*) 值,根据 *A* 值绘制标准曲线,并计算样品中蛋白质含量。

按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的说明书操作,将 10 μL 待测样品加入到微孔板中,并用 PBS 补足到 20 μL,向微孔板中加入 200 μL 工作液,混匀,37 °C 放置 30 min,在 562 nm 波长处测定 *A* 值,并记录读数;以 BSA 质量浓度为横坐标 (*X*),*A* 值为纵坐标 (*Y*),绘制标准曲线,得到 BSA 的线性回归方程为 $Y=0.7888 X+0.1222$; $R^2=0.9960$,线性范围为 0.025~1 000 μg/mL。将样品的 *A* 值代入线性方程,计算 GD-SAN、GN-SAN 溶液中蛋白含量,结果见表 9。

2.6.3 糖类成分的含量 以苯酚-硫酸法测定 GD-SAN、GN-SAN 中多糖含量^[19]。精密称取适量的无水葡萄糖,置 25 mL 量瓶中,加水溶解并定容,得到质量浓度为 103.6 μg/mL 的葡萄糖对照品溶液。分别吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 对照品溶

液至试管中,加蒸馏水补足至 1 mL,分别加 4% 苯酚溶液 1 mL,混匀,迅速加入硫酸 7 mL,摇匀,40 °C 水浴 30 min 后,冰水浴 5 min,充分摇匀,放置 25 min,以不含对照品的溶液为空白,使用紫外分光光度法,在 490 nm 波长处测定不同质量浓度对照品的 *A* 值,以对照品质量浓度为横坐标 (*X*),*A* 值为纵坐标 (*Y*),绘制标准曲线并计算回归方程。结果葡萄糖的回归方程为 $Y=5.700 X+0.101$, $R^2=0.9998$,结果表明葡萄糖在 10.36~103.60 μg/mL 线性关系良好。

取“2.1”项下制备的 GD-SAN、GN-SAN 溶液 3 份,稀释至适宜质量浓度,照标准曲线的制备项下方法,自“加 4% 苯酚溶液 1 mL”起,依法测定 *A* 值,计算样品的多糖含量,结果见表 9。

2.7 转移率测定

取按“2.1”项下制备的 GD-SAN、GN-SAN、甘草药材溶液,按“2.2.1”项下 HPLC 方法测定,计算 6 种活性成分由甘草药材到 GD-SAN、GN-SAN 溶液的转移率,结果见表 10。

转移率 = GD-SAN 或 GN-SAN 中指标成分的含量 / 甘草药材中指标成分的含量

表 10 转移率计算结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Calculation results of transfer rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	转移率/%					
	蔗糖甘草苷	甘草苷	蔗糖异甘草苷	异甘草苷	甘草酸	甘草查耳酮 A
GD-SAN	74.70±0.82	72.60±1.28	61.10±0.42	69.40±0.71	63.30±0.46	8.40±0.03
GN-SAN	78.80±0.55	73.10±0.55	84.40±0.64	92.60±0.28	75.30±0.16	65.30±0.64

2.8 GN-SAN 治疗特应性皮炎小鼠的药效评价

2.8.1 不同质量浓度 GN-SAN 凝胶的制备 取卡波姆 940 加水至卡波姆 940 质量浓度为 2%^[20],充分溶胀均匀,按“2.2”项下方法分别制备质量浓度为 0.1、0.2、0.3 g/mL 的 GN-SAN 溶液加入已溶胀均匀的凝胶体系中,边加边搅拌均匀,滴加三乙醇胺调节值至 pH 5.5~6.5,可得低、中、高剂量 GN-SAN 凝胶样品,平行制备 3 份。

2.8.2 分组 将经检疫合格的 SPF 级 BALB/c 小鼠

48 只,随机分为 6 组,每组 8 只,分别为空白组,模型组,阳性对照(丁酸氢化可的松)组,凝胶低、中、高剂量组。

2.8.3 造模 小鼠经 2 d 适应性喂养后,建立经典的 DNCB 诱导特应性皮炎样皮损模型^[21]。在实验前一天使用脱毛膏脱去背部毛发(约 2 cm×2 cm 面积)。空白组小鼠每日在背部皮肤涂抹生理盐水。模型组及各给药组在第 1、3 天用 200 μL 1% DNCB (溶解在 3 : 1 的丙酮和橄榄油的混合物)涂抹小鼠

的背部皮肤，在第 5、7、9、11、13、15、17、19 天采用同法涂抹 200 μL 0.5% DNCB 基质溶液于小鼠背部相同位置。

2.8.4 给药 根据小鼠与人的剂量换算，GN-SAN 凝胶低、中、高剂量 0.2 g，丁酸氢化可的松乳膏剂量为 0.1 g^[22]，造模第 5 天开始给药，空白组背部单位面积涂抹生理盐水，每天 1 次，连续 10 d，隔 1 d 拍照 1 次，记录小鼠背部皮肤情况。连续 20 d 边造模边给药，最后一次给药后，将小鼠脱颈处死。

2.8.5 小鼠背部皮损评分 每天对小鼠背部皮肤拍照留存并按照皮损面积和严重程度（psoriasis area and severity index, PASI）评分标准对皮损部位红斑/出血，干燥、结痂，剥脱/糜烂，水肿 4 个方面进行评分。PASI 评分标准如下：0，无明显症状；1，轻度；2，中度；3，重度。症状评分之和即为皮损严重程度，得分越高，皮损越严重。各组小鼠第 20 天

皮损情况见图 6。空白组小鼠皮肤脱毛处毛发生长正常；模型组小鼠致敏皮肤处有红斑、局部水肿并大量结痂、无新生毛发，表明造模成功；阳性对照组小鼠皮肤生长良好，AD 样症状消失；GN-SAN 凝胶低、中剂量组红肿缓解，有少量出血点、表皮结痂逐渐开始掉落、新生皮肤良好；GN-SAN 凝胶高剂量组未见出血，结痂大部分脱落，皮肤水肿缓解；给药组小鼠皮损显著改善，且随着给药质量浓度增大，治疗效果越明显。

各实验组在第 2、4、6、8、12、16、18 天皮损严重程度评分比较见表 11。实验第 0 天，各组小鼠皮肤正常，评分均为 0 分。在实验第 8 天，各组小鼠评分达到最高，明显有炎症症状，说明造模成功。实验第 18 天，与模型组相比，凝胶组和阳性对照组 PASI 评分均有所降低（ $P < 0.01$ ）。随着剂量增大，凝胶组 PASI 评分逐渐降低。

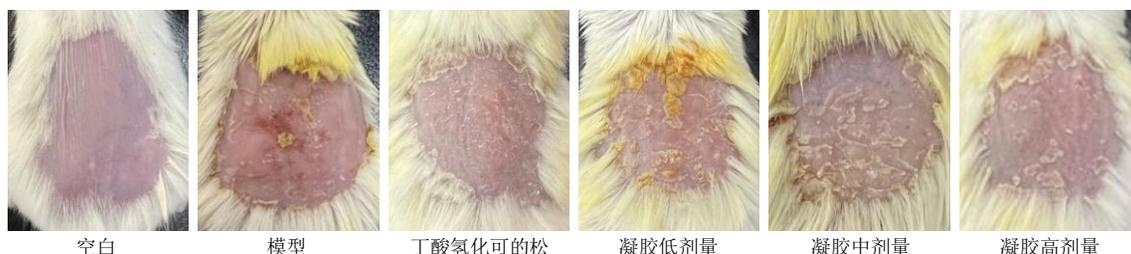


图 6 各组 AD 模型小鼠皮损情况

Fig. 6 Skin lesions of atopic dermatitis model mice in each group

表 11 各组小鼠皮损 PASI 评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 11 Comparison of PASI scores of skin lesions in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ g	PASI 评分						
		2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	16 d	18 d
空白	-	0	0	0	0	0	0	0
模型	-	1.88 ± 0.64	6.50 ± 0.76	10.38 ± 0.52	11.75 ± 0.46	10.75 ± 0.46 ^{##}	8.38 ± 0.52 ^{##}	5.75 ± 0.71 ^{##}
丁酸氢化可的松乳膏	0.1	1.50 ± 0.53	6.13 ± 0.64	10.00 ± 0.53	11.63 ± 0.52	8.13 ± 0.64 ^{**}	6.38 ± 0.52 ^{**}	3.50 ± 0.76 ^{**}
GN-SAN 凝胶 0.1 mg·mL ⁻¹	0.2	1.38 ± 0.52	6.25 ± 0.71	10.25 ± 0.71	11.63 ± 0.52	9.00 ± 0.76 ^{**}	7.13 ± 0.64 ^{**}	4.50 ± 0.53
GN-SAN 凝胶 0.2 mg·mL ⁻¹	0.2	1.50 ± 0.53	6.38 ± 0.74	10.50 ± 0.76	11.50 ± 0.53	8.75 ± 0.46 ^{**}	6.88 ± 0.83 ^{**}	4.00 ± 0.76 ^{**}
GN-SAN 凝胶 0.3 mg·mL ⁻¹	0.2	1.75 ± 0.89	6.13 ± 0.64	10.38 ± 0.74	11.63 ± 0.52	8.50 ± 0.53 ^{**}	6.63 ± 0.52 ^{**}	3.75 ± 0.46 ^{**}

与空白组比较：^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{**} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs normal group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

2.8.6 小鼠皮损组织病理变化 小鼠脱颈处死后，剪下一半皮损组织，放在 4% 多聚甲醛中固定，而后经过脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色，每个标本选 3 张切片进行观察并拍照。各组鼠染色结果见图 7。HE 染色结果显示，正常组小鼠皮肤组织结构完整清晰，真皮层无血管扩张及炎症细胞。模型组角质层角化过度，颗粒层明显减少，棘细胞间水肿，棘

层肥厚并伴有表皮突起延伸，真皮层可见毛细血管增生和明显炎性细胞浸润现象。氢化可的松阳性对照组表皮层较为完整，少量表皮突起下延，炎性细胞浸润明显减少。SAN 各剂量组表皮增厚降低，表皮突起延伸、毛细血管增生、炎性细胞浸润明显减少，且呈现出剂量相关现象。

2.8.7 小鼠血清和组织中炎症因子含量测定 小鼠摘

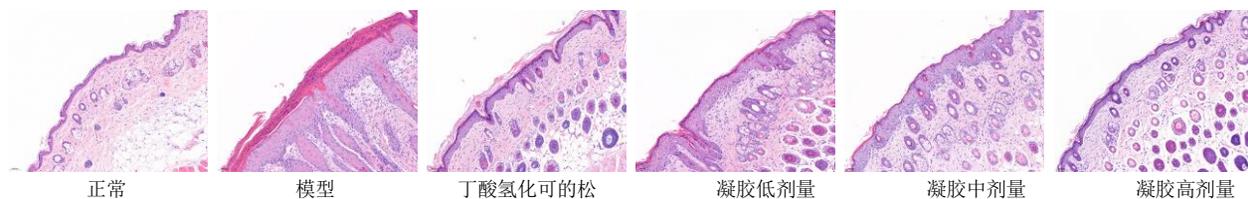


图7 各组小鼠皮损组织病理变化

Fig. 7 Histopathological changes of skin lesions in each group of mice

眼球取血，血液流尽时脱颈处死小鼠，采集后的全血立即放入离心管中，室温静置 30 min 后，在相对离心力 14000×g 下离心血样 15 min，用移液枪吸取分离上层血清，按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IgE 的含量。将小鼠余下皮损组织放在试管中置于 -20 °C 冰箱中保存。实验前提前取出解冻，称定质量后剪碎，按 1 : 9 加入生理盐水，再往试管中加入钢珠，用组织匀浆机进行破碎，离心后取上清液，采用 ELISA 法检测其中炎症因子 IL-1β、IL-6 的含量，结果见表 12。由表可知，与空白组相比，模型组小鼠 3 种炎症因子含量均显著增加 (P<0.01)，说明造模成功。与模型组相比，阳性对照组与凝胶各剂量组炎症因子含量显著降低 (P<0.01)，差异均具有统计学意义。

2.8.8 小鼠脏器指数测定 小鼠称定质量后处死，依次取出脾脏、胸腺并记录其质量，按公式计算脏器指数。各组小鼠脾脏、胸腺指数变化见表 12。由表可知，与空白组相比，模型组脾脏指数显著升高 (P<0.01)，说明造模成功；与模型组相比，阳性对照组、SAN 凝胶高中低剂量组脾脏指数均显著降低 (P<0.01)。与空白组相比，模型组胸腺指数显著降低 (P<0.01)；与模型组相比，阳性对照组胸腺指数降低 (P<0.01)，而其余各给药组胸腺指数变化不明显，无统计学意义。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

2.8.9 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行分析，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组间均数比较采用 t 检验，P<0.01 认为差异有统计学意义。

表 12 各组小鼠 IgE、IL-1β 和 IL-6 的含量比较及脏器指数变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 12 Comparison of IgE, IL-1β and IL-6 contents and changes of organ indexes in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g	IgE/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
空白	-	759.89 ± 43.86	260.33 ± 39.03	270.40 ± 19.49	3.74 ± 0.38	1.01 ± 0.10
模型	-	6 263.33 ± 67.88 ^{##}	644.40 ± 32.67 ^{##}	1 884.61 ± 38.89 ^{##}	11.56 ± 0.99 [#]	0.59 ± 0.14 [#]
丁酸氢化可的松乳膏	0.1	2 187.63 ± 82.07 ^{**}	378.94 ± 40.34 ^{**}	787.33 ± 19.49 ^{**}	6.67 ± 0.38 [*]	1.09 ± 0.43 [*]
GN-SAN 凝胶 0.1 mg·mL ⁻¹	0.2	4 908.52 ± 64.95 ^{**}	517.06 ± 34.74 ^{**}	1 569.08 ± 18.60 ^{**}	9.46 ± 0.71 [*]	0.74 ± 0.31 [*]
GN-SAN 凝胶 0.2 mg·mL ⁻¹	0.2	3 115.86 ± 86.67 ^{**}	432.26 ± 38.04 ^{**}	1 232.77 ± 42.16 ^{**}	8.60 ± 0.83 [*]	1.06 ± 0.03 [*]
GN-SAN 凝胶 0.3 mg·mL ⁻¹	0.2	2 432.43 ± 82.58 ^{**}	394.81 ± 31.02 ^{**}	883.68 ± 21.99 ^{**}	7.32 ± 0.22 [*]	0.93 ± 0.15 [*]

与空白组比较：^{##}P<0.01；与模型组比较：^{**}P<0.01。

^{##}P<0.01 vs normal group；^{**}P<0.01 vs model group.

3 讨论

中药水煎液中普遍存在自组装聚集体，不仅可以发挥生物活性，也可作为天然载体用于药物递送，提高药物的生物利用度，对药效发挥起到重要作用，具有广泛的应用前景。甘草经煎煮后中药化学成分间发生相互作用，形成甘草 SAN，从而发挥增溶、增效的作用，但粒径较大且稳定性不高的问题有待解决。本研究采用微沉淀法改良传统汤剂的自组装过程，系统地对新型纳米粒 GN-SAN 及传统水煎煮 SAN 进行了比较，研究表明所形成的新型纳米粒 GN-SAN 粒径远小于 GD-SAN，且大小均一，呈现

圆球型结构，其 ζ 电位高于 GD-SAN，稳定性增强。新型纳米粒 GN-SAN 的有效成分转移率均大于 GD-SAN，其中黄酮类小分子成分的转移率显著提升，异甘草苷的转移率在 GN-SAN 中可达到 92.6%，是 GD-SAN 的 1.33 倍；甘草查耳酮 A 的转移率是 GD-SAN 的 7.8 倍。新型 GN-SAN 有效改善了传统汤剂自组装纳米粒粒径大、不稳定以及转移率不高的问题。药效实验显示，与模型组相比，氢化可的松组、SAN 凝胶各剂量组 PASI 评分、炎症因子含量、脾脏指数均显著降低 (P<0.05)。且 SAN 组各项指标显示，SAN 凝胶高剂量组略优于低、中剂量组。皮

损病理变化结果显示, 氢化可的松组和 SAN 各剂量组表皮厚度降低, 表皮突起下延、炎性细胞浸润及毛细血管增生减少。可见甘草 SAN 凝胶对 DNCB 诱导的特应性皮炎小鼠具有显著的治疗作用, 并且有剂量依赖性。本研究在甘草提取物的基础上, 改良了传统汤剂自组装过程, 优化 GN-SAN 的制备工艺, 提高了中药 SAN 的稳定性及难溶性成分转移率, 对其进行药效学评价及初步作用机制探讨。为中药药效物质基础的高效利用提供了制剂学思路。对于 GN-SAN 具体的形成机制及体内过程, 有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Peng A, Lin L Z, Zhao M M. Chemical basis and self-assembly mechanism of submicroparticles forming in chrysanthemum tea infusion [J]. *Food Chem*, 2023, 427: 136745.
- [2] Chen M, Wang P L, Li T, *et al.* Comprehensive analysis of Huanglian Jiedu Decoction: Revealing the presence of a self-assembled phytochemical complex in its naturally-occurring precipitate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195: 113820.
- [3] Zhang C Z, Zhao R, Yan W Q, *et al.* Compositions, formation mechanism, and neuroprotective effect of compound precipitation from the traditional Chinese prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1094.
- [4] Zheng J, Fan R, Wu H Q, *et al.* Directed self-assembly of herbal small molecules into sustained release hydrogels for treating neural inflammation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1604.
- [5] Tian X H, Wang P L, Li T, *et al.* Self-assembled natural phytochemicals for synergistically antibacterial application from the enlightenment of traditional Chinese medicine combination [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(9): 1784-1795.
- [6] Wu J J, Yang Y, Yuan X Y, *et al.* Role of particle aggregates in herbal medicine decoction showing they are not useless: Considering *Coptis chinensis* decoction as an example [J]. *Food Funct*, 2020, 11(12): 10480-10492.
- [7] 沈成英, 朱君君, 戴博, 等. 芍药甘草汤自组装纳米粒的形成及其对白芍主要成分释放和吸收的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(9): 2190-2196.
- [8] 秦祉剑, 闫巧, 杭凌宇, 等. 芍药甘草汤自组装纳米粒的分离、表征及抗小鼠银屑病的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(8): 2116-2125.
- [9] Ping Y, Li Y P, Lü S W, *et al.* A study of nanometre aggregates formation mechanism and antipyretic effect in Bai-Hu-Tang, an ancient Chinese herbal decoction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109826.
- [10] 武印奇, 吕邵娃, 李英鹏, 等. 白虎汤中纳米相态的分离与表征 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(12): 121-124.
- [11] Ke L J, Gao G Z, Shen Y, *et al.* Encapsulation of aconitine in self-assembled licorice protein nanoparticles reduces the toxicity *in vivo* [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2015, 10(1): 449.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 88-89.
- [13] Dong L S, Lee J H, Jo E H, *et al.* Effects of varying ratios of *Glycyrrhiza uralensis* and donkey hide gelatin water extracts on dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/nga mice [J]. *Nutrients*, 2023, 15(9): 2094.
- [14] Wu Q, Mo X M, Lin Y, *et al.* Inhibitory effects of isoliquiritin on an atopic dermatitis model through the CD177/JAK2/STAT pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(18): 980.
- [15] Hou D D, Wang X X, Li S J, *et al.* Glycyrrhizic acid suppresses atopic dermatitis-like symptoms by regulating the immune balance [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2022, 21(12): 7090-7099.
- [16] 朱煜文, 邓翔, 陈莉, 等. 波棱瓜子新型自组装纳米粒的构建及评价 [J]. *药学学报*, 2024, 59(2): 448-454.
- [17] Duan D, Doak A K, Nedyalkova L, *et al.* Colloidal aggregation and the *in vitro* activity of traditional Chinese medicines [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(4): 978-988.
- [18] 刘欣欣, 黄甜甜, 付婧欣, 等. Box-Behnken 效应面法优化小豆蔻明纳米混悬剂处方工艺及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1419-1428.
- [19] 郭琴. 基于蛋白自组装探讨芍药-甘草药对配伍的物质基础 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2022.
- [20] 李绍林. 湿疹方微乳凝胶制备及其质量评价的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [21] Kim K M, Kim S Y, Mony T J, *et al.* *Moringa concanensis* L. alleviates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β in BALB/c mice [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(10): 1217.
- [22] 尚芸, 张莉, 王强, 等. 基于网络药理学探究敦煌茵草膏减轻荨麻疹小鼠皮肤瘙痒的机制 [J]. *中成药*, 2023, 45(4): 1339-1344.

[责任编辑 郑礼胜]