

芍药苷-甘草蛋白自组装纳米粒的制备及其肠吸收机制研究

杜超颖¹, 魏欣玲^{1,2}, 张年战^{1,2}, 黄冬梅³, 闵红燕⁴, 申宝德^{2*}, 沈成英^{1*}

1. 江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院)药学部, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330006

4. 南昌医学院药学院, 江西 南昌 330052

摘要: 目的 制备一种生物利用度良好的芍药苷-甘草蛋白自组装纳米粒(paeoniflorin-glycyrrhiza protein self-assembled nanoparticles, Pae-GP/SAN)并考察其肠吸收机制。方法 以甘草蛋白为载体,采用超声分散法制备 Pae-GP/SAN,以平均粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)、包封率、载药量为评价指标优化处方和制备工艺,并对制备的纳米粒进行表征。建立大鼠在体单向肠灌注模型,考察并对比芍药苷溶液(Pae/Sol)、芍药苷-甘草蛋白物理混合物(Pae-GP/PM)以及 Pae-GP/SAN 的肠吸收行为,并应用水淬灭 ACQ (aggregation-caused quenching) 荧光探针,通过激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察 GP/SAN 的肠吸收情况,初步阐明其促渗机制。结果 优化后 Pae-GP/SAN 粒径为(178.2±6.3) nm, PDI 为 0.1521±0.0112, ζ 电位为(-14.91±1.13) mV, 包封率为(36.45±2.32)%, 载药量为(21.70±1.30)%, 微观形态呈均一球状。肠灌注实验表明, Pae-GP/SAN 在回肠中的吸收效率优于空肠($P<0.05, 0.01$); 纳米粒的形成可显著促进芍药苷的吸收,且高质量浓度 Pae-GP/SAN 的吸收参数显著高于低质量浓度($P<0.001$),而质量浓度对 Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 的吸收无显著影响; 转运蛋白抑制剂干预实验显示, 吡哆美辛和利血平对 3 种制剂的吸收均无显著影响; 维拉帕米可显著提高 Pae/Sol 和 Pae-GP/PM 的吸收($P<0.01, 0.001$),而对 Pae-GP/SAN 无显著影响。CLSM 观察证实 GP/SAN 能够以完整纳米粒形式被肠道吸收。结论 Pae-GP/SAN 可通过完整纳米粒形式被肠道内吞吸收,有效规避 P-gp 外排蛋白的屏障作用,进而显著提升芍药苷的口服生物利用度。

关键词: 芍药苷; 甘草蛋白; 中药自组装纳米粒; 肠灌注; 肠吸收

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4582-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.007

Preparation and intestinal absorption mechanism of paeoniflorin-glycyrrhiza protein self-assembled nanoparticles

DU Chaoying¹, WEI Xinling^{1,2}, ZHANG Nianzhan^{1,2}, HUANG Dongmei³, MIN Hongyan⁴, SHEN Baode², SHEN Chengying¹

1. Department of Pharmacy, Jiangxi Provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Nanchang 330006, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China

4. School of Pharmacy, Nanchang Medical College, Nanchang 330052, China

Abstract: Objective To prepare paeoniflorin-glycyrrhiza protein self-assembled nanoparticles (Pae-GP/SAN) with good bioavailability and investigate its intestinal absorption mechanism. **Methods** In this study, glycyrrhiza protein (GP) was used as the carrier to prepare Pae-GP/SAN by ultrasonic dispersion method. The formulation and preparation process were optimized using average

收稿日期: 2025-12-24

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2403609); 国家自然科学基金项目(82260848); 江西省自然科学基金项目(20232BAB216139)

作者简介: 杜超颖, 药师, 研究方向为药物新剂型。E-mail: 18841430338@163.com

*通信作者: 沈成英, 副主任中药师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药纳米给药系统。E-mail: 984075899@qq.com

申宝德, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新型给药系统研究。E-mail: shenbaode@163.com

particle size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency, and drug loading as evaluation indicators, and the prepared nanoparticles were characterized. A rat *in situ* single-pass intestinal perfusion model was established to investigate and compare the intestinal absorption behaviors of paeoniflorin solution (Pae/Sol), paeoniflorin-glycyrrhiza protein physical mixture (Pae-GP/PM), and Pae-GP/SAN. Additionally, an aggregation-caused quenching (ACQ) fluorescent probe was used to observe the intestinal absorption of GP/SAN by confocal laser scanning microscopy (CLSM), aiming to initially clarify its penetration-enhancing mechanism. **Results** The optimized Pae-GP/SAN had an average particle size of (178.2 ± 6.3) nm, a PDI of 0.1521 ± 0.0112 , a ζ potential of (-14.91 ± 1.13) mV, an encapsulation efficiency of $(36.45 \pm 2.32)\%$, and a drug loading of $(21.70 \pm 1.30)\%$, with a uniform spherical micromorphology. Intestinal perfusion experiments indicated that the absorption efficiency of Pae-GP/SAN in the ileum was superior to that in the jejunum ($P < 0.05, 0.01$). The formation of nanoparticles significantly promoted the absorption of paeoniflorin. Moreover, the absorption parameters of high mass concentration Pae-GP/SAN were significantly higher than those of low mass concentration Pae-GP/SAN ($P < 0.001$), while mass concentration had no significant effect on the absorption of Pae/Sol and Pae-GP/PM. Transporter inhibitor intervention experiments showed that indomethacin and reserpine had no significant effect on the absorption of the three formulations. Verapamil significantly increased the absorption of Pae/Sol and Pae-GP/PM ($P < 0.01, 0.001$) but had no significant effect on Pae-GP/SAN. CLSM observations confirmed that GP/SAN can be absorbed by the intestine in the form of intact nanoparticles. **Conclusion** Pae-GP/SAN can be endocytosed and absorbed by the intestine as intact nanoparticles, effectively evading the barrier effect of P-gp efflux protein, thereby significantly improving the oral bioavailability of Pae.

Key words: paeoniflorin; glycyrrhiza protein; traditional Chinese medicine self-assembled nanoparticles; intestinal perfusion; intestinal absorption

芍药苷是白芍的主要活性成分，具有保肝、抗炎、抗癌等多种药理作用^[1-2]。但该成分水溶性强而脂溶性差，难以穿透细胞膜，且受肝脏首过效应及P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)影响，口服生物利用度极低，严重制约其临床转化与应用^[3-4]。近年来，纳米粒、脂质体、微球等新型给药系统被用于改善芍药苷的理化性质与吸收特性^[5-7]，然而这类制剂普遍存在载药量低、制备工艺繁琐、载体潜在毒性等缺陷。因此，研发高效低毒的芍药苷新型给药系统具有重要的现实意义与应用价值。

芍药甘草汤(Shaoyao Gancao Decoction, SGD)首载于汉代张仲景所著的《伤寒论》中，由芍药和甘草2味药材配伍而成，具有酸甘化阴、柔肝益脾、缓急止痛之功效^[8]。课题组前期研究证实，芍药与甘草配伍可显著促进芍药苷的吸收，增加其生物利用度，而究其原因，SGD中存在的自组装纳米粒(self-assembled nanoparticles, SAN)可能是其配伍增效的关键物质基础^[9]。中药成分体系复杂，容易在煎煮过程中通过非共价作用自发形成纳米结构，中药SAN的形成可以显著提高难吸收成分的生物利用度，且有利于组分之间的配伍作用^[10-12]。然而，汤剂SAN存在分离工艺复杂、收率低、稳定性差等问题，而人为构建中药SAN可能是解决上述瓶颈的有效策略^[13]。已有研究表明，SGD-SAN中富含多糖、蛋白质等大分子物质，其中蛋白成分主要来源于甘草，而提取所得的甘草蛋白已被证实具有优

良的自组装特性，是一种生物相容性良好的天然纳米载体^[13-16]。据此，本研究拟构建芍药苷-甘草蛋白纳米粒(paeoniflorin-glycyrrhiza protein self-assembled nanoparticles, Pae-GP/SAN)，以期解决芍药苷口服吸收困难的问题。本课题组前期以甘草蛋白为载体，采用超声分散法制备了Pae-GP/SAN，药动学预实验结果显示，Pae-GP/SAN可以有效提高芍药苷的口服生物利用度，但其吸收机制尚未明确。基于此，本研究将采用单因素法优化Pae-GP/SAN的处方与制备工艺；通过在体单向肠灌流模型和水淬灭ACQ(aggregation-caused quenching)荧光探针考察Pae-GP/SAN的肠吸收机制，以期为后续芍药苷新型制剂的开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

360ES 225SM-DR (E) 型号电子天平，普利赛斯称重设备有限公司；CSB23054 型金尼克超声波清洗器，合肥金尼克机械制造有限公司；SCIENTZ-18N/A 型冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Zetasizer Pro 型纳米粒度电位仪，马尔文帕纳科公司；Tecnai G2 F30 型透射电子显微镜(TEM)，荷兰FEI公司；BY-R20 型高速离心机，北京白洋医疗器械有限公司；HHS11-2-S 型电热恒温水浴锅，上海新苗医疗器械制造有限公司；L100-1S-1 型蠕动泵，保定兰格恒流泵有限公司；LC-2010A 型高效液相色谱仪，日本岛津公司。

1.2 试剂

甘草饮片, 批号 22051001, 产地内蒙古, 购自江西彭氏国药堂饮片有限公司, 经江西省人民医院药理学部应萍副主任中药师鉴定, 为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。芍药苷对照品, 批号 HR249W4, 质量分数 $\geq 98.0\%$, 购自宝鸡辰光生物科技有限公司; 对照品维拉帕米 (批号 D23231220)、利血平 (批号 A2510167)、吲哚美辛 (批号 L2301081), 质量分数均 $\geq 98.0\%$, 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磷酸 (批号 20210701)、NaCl (批号 2210122)、NaHCO₃ (批号 2210121)、KCl (批号 2306132)、NaH₂PO₃ (批号 2210121)、葡萄糖 (批号 2209051), 均购自西陇科学股份有限公司; MgCl₂, 批号 C15470962, 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; CaCl₂, 批号 C23PC199B, 购自北京普西唐生物科技有限公司; P4 荧光探针由复旦大学药学院吴伟课题组赠送; 甲醇 (批号 E2515692)、乙腈 (批号 H2218024), 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0005。所有大鼠饲养于恒温恒湿动物房 [温度 (25±2) °C, 相对湿度 60%, 12 h 昼夜节律], 自由摄食饮水。实验操作严格遵循实验动物福利伦理审查要求, 并经南昌医学院实验动物伦理委员会审批通过, 批准号 NYLLSC20250711。

2 方法与结果

2.1 甘草蛋白的提取与表征

采用改良的丙酮沉淀法从甘草饮片中提取甘草蛋白。具体步骤如下: 称取甘草粗粉末适量, 加入 5 倍量蒸馏水, 于 60 °C 下超声提取 30 min, 提取液经双层滤布滤过后, 以 4 000 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 15 min 去除残渣; 取上清液, 加入 1.5 倍体积的丙酮进行沉淀, 于 -20 °C 下静置 30 min, 4 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 挥干丙酮, 收集沉淀物, 冷冻干燥后即得甘草蛋白。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 对所得甘草蛋白进行检测。将蛋白质样品与上样缓冲液混合, 于 95 °C 加热 10 min 使蛋白质变

性; 变性后的蛋白质样品经 SDS-PAGE 电泳分离 (电压 80~120 V), 蛋白条带经考马斯亮蓝染色后, 与蛋白质标准品进行比对分析, 结果见图 1。结果显示甘草蛋白的条带位于 $2.5 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^4$ 。

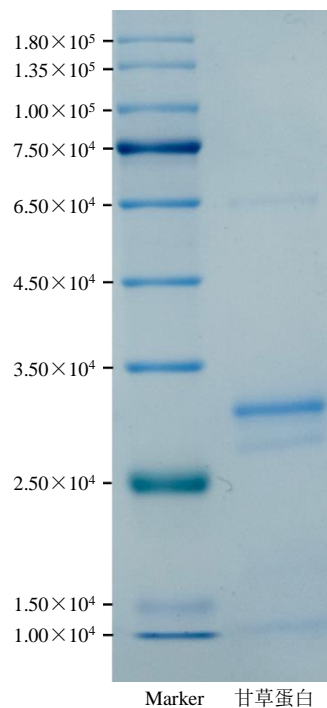


图 1 甘草蛋白的 SDS-PAGE 电泳条带

Fig. 1 SDS-PAGE bands of glycyrrhiza protein

2.2 甘草蛋白质量浓度的初筛

以 GP/SAN 的外观透明度、粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位为指标, 考察甘草蛋白形成 SAN 的适宜质量浓度。

2.2.1 不同质量浓度 GP/SAN 的制备 分别称取不同质量的甘草蛋白粉末, 置于 10 mL 西林瓶中, 加入蒸馏水 4 mL, 在功率 250 W、频率 50 Hz 的条件下超声 25 min, 即得不同质量浓度 GP/SAN。

2.2.2 粒径、PDI、 ζ 电位的测定 取“2.2.1”项中制得的 GP/SAN, 加适量蒸馏水稀释, 采用马尔文激光粒度仪, 测定上述不同质量浓度 GP/SAN 的粒径、PDI 及 ζ 电位, 结果见表 1。当甘草蛋白质量浓度低于 6 mg/mL 时, 甘草蛋白在超声作用下能够形成粒径小于 200 nm、分散性较好的纳米粒; 而当甘草蛋白质量浓度大于 6 mg/mL 时, 分散体变浑浊, 粒径增大。因此, 甘草蛋白质量浓度应不超过 6 mg/mL。

2.3 HPLC 法建立 Pae-GP/SAN 中芍药苷的含量测定方法

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-Pack GIS C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 磷

表1 GP/SAN 的表征 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Characterization of GP/SAN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甘草蛋白/ (mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	外观
1	127.7±5.1	0.174 6±0.007 2	-17.04±1.15	澄清, 有乳光
2	142.7±5.1	0.170 3±0.016 9	-14.88±0.95	澄清, 有乳光
3	150.4±7.4	0.157 7±0.014 5	-15.35±1.40	澄清, 有乳光
4	151.0±5.9	0.200 5±0.024 0	-13.89±1.41	澄清, 有乳光
5	159.2±8.3	0.215 4±0.027 8	-13.99±1.47	澄清, 有乳光
6	169.9±5.4	0.202 1±0.031 5	-13.66±1.67	澄清, 有乳光
7	214.0±8.9	0.257 2±0.023 1	-13.15±1.11	浑浊
8	249.1±11.3	0.340 3±0.033 6	-14.73±1.90	浑浊

酸水溶液 (17 : 83); 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 40 °C; 检测波长为 231 nm; 进样量为 10 μL; 理论塔板数以芍药苷峰计算不低于 6 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定芍药苷对照品 8.4 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得 840 μg/mL 对照品储备液。精密吸取该对照品储备液适量, 用甲醇稀释成 84.0、42.0、21.0、8.4、4.2 μg/mL 质量浓度的系列对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密吸取 0.1 mL Pae-GP/SAN 于 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀后, 使用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3.4 专属性考察 取“2.2.1”项下制备的空白 GP/SAN、芍药苷对照品溶液及 Pae-GP/SAN 供试品溶液适量, 分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果见图 2。结果表明, 空白 GP/SAN 对芍药苷的测定无干扰, 表明该方法专属性良好。

2.3.5 线性关系考察 精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录相应的色谱峰峰面积, 以芍药苷质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得标准曲线回归方程 $Y = 13\ 199 X + 18\ 949$, $R^2 = 0.999$, 结果表明芍药苷在 4.2~84.0 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.6 精密度考察 精密吸取“2.3.2”项下芍药苷对照品溶液适量, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 1 d 内平行测定 6 次, 考察其精密度。计算得芍药苷的精密度 RSD 为 0.75%, 表明精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 取供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录相应的色谱峰峰面积, 考察其稳定性, 计算得芍药苷峰面积的 RSD 为 0.79%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定性良好。

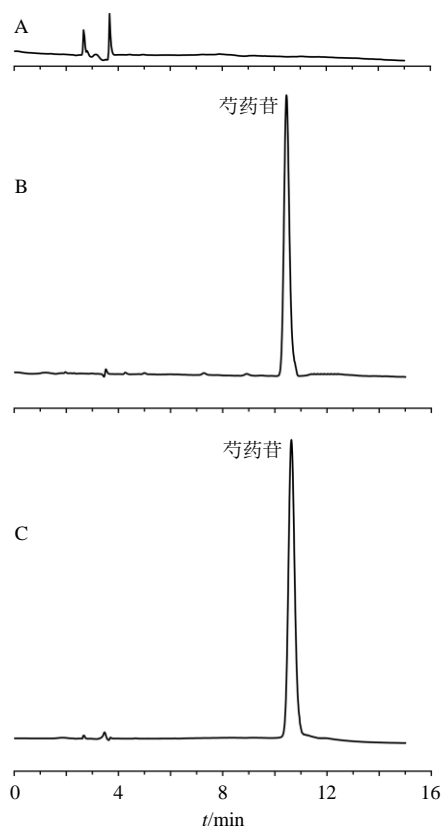


图2 空白 GP/SAN (A)、对照品溶液 (B) 和 Pae-GP/SAN 供试液 (C) 的专属性 HPLC 图

Fig. 2 Specific HPLC chromatograms of blank GP/SAN (A), reference substance solution (B), and Pae-GP/SAN test solution (C)

2.3.8 重复性考察 平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。结果显示重复性试验 RSD 为 1.89%, 表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 精密移取供试品溶液 6 份, 加入样品量 100% 的芍药苷对照品后, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录相应的色谱峰峰面积, 计算芍药苷的加样回收率。结果显示, 芍药苷的加样回收率为 95.35%~104.01%, RSD 为 3.31%, 表明该方法准确度良好。

2.4 Pae-GP/SAN 的制备及优化

2.4.1 粒径和 PDI 的测定 方法同“2.2.2”项下。

2.4.2 包封率和载药量的测定 采用超滤离心法测定 Pae-GP/SAN 的包封率和载药量。

取 100 μL Pae-GP/SAN 至 5 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 按照“2.3”项下 HPLC 方法进样分析, 作为 Pae-GP/SAN 中总芍药苷质量 ($W_{总}$); 取 0.4 mL Pae-

GP/SAN 加入超滤离心管 (0.5 mL, 截留相对分子质量 3 000) 的上层, 8 000 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 10 min, 取下层溶液 100 μL 置于 5 mL 量瓶中, 加水稀释定容, 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 按照“2.3”项下 HPLC 方法进样分析, 作为 Pae-GP/SAN 中未包封的芍药苷质量 ($W_{未}$)。

$$\text{包封率} = (W_{总} - W_{未}) / W_{总}$$

$$\text{载药量} = (W_{总} - W_{未}) / (W_{总} - W_{未} + W_{甘草蛋白})$$

2.4.3 Pae-GP/SAN 的处方优化 称取甘草蛋白粉末 24 mg, 置于 10 mL 西林瓶中, 分别加入芍药苷原料药 2~14 mg, 加入蒸馏水 4 mL, 功率 250 W、频率 50 Hz 的条件下超声 25 min, 室温放置冷却后, 0.8 μm 微孔滤膜滤过。分别测定 Pae-GP/SAN 的粒径、PDI 及包封率和载药量, 结果见表 2。当固定甘草蛋白质量浓度为 6 mg/mL 时, 芍药苷加入量对 SAN 的粒径和 PDI 无显著影响。包封率和载药量均随着芍药苷质量浓度的增加先升高后降低, 包封率在芍药苷质量浓度为 2~3 mg/mL 时较高, 而载药量在芍药苷质量浓度为 3 mg/mL 时最高。综合分析, 暂定芍药苷质量浓度为 3 mg/mL。

表 2 芍药苷质量浓度对 Pae-GP/SAN 粒径、PDI、包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of paeoniflorin mass concentration on particle size, PDI, encapsulation efficiency and drug loading of Pae-GP/SAN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

芍药苷/ (mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
0.5	171.0±7.8	0.175 9±0.011 8	21.69±4.59**	2.35±0.35***
1.0	170.7±9.1	0.178 9±0.016 3	21.63±2.01***	4.38±0.37***
1.5	172.7±5.7	0.181 9±0.007 4	26.83±2.68**	7.64±0.81***
2.0	176.3±7.6	0.175 1±0.006 4	34.95±2.30	12.54±0.90***
2.5	172.7±6.5	0.177 0±0.011 8	35.59±0.16	15.57±0.40***
3.0	174.7±9.6	0.176 6±0.011 4	36.11±0.52	18.25±0.17
3.5	175.0±13.0	0.182 6±0.008 5	29.48±1.60**	17.17±0.83

与芍药苷 3.0 mg·mL⁻¹ 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs paeoniflorin 3.0 mg·mL⁻¹ group.

称取芍药苷原料药 12 mg, 置于 10 mL 西林瓶中, 分别加入甘草蛋白粉末 12、16、20、24 mg, 加入蒸馏水 4 mL, 在功率 250 W、频率 50 Hz 的条件下超声 25 min, 室温放置冷却后, 0.8 μm 微孔滤膜滤过。分别测定 Pae-GP/SAN 的粒径、PDI 及包封率和载药量, 结果见表 3。当芍药苷的质量浓度固定为 3 mg/mL 时, 甘草蛋白质量浓度对 SAN 的粒径和 PDI 无显著影响。包封率随着甘草蛋白质量

表 3 甘草蛋白质量浓度对 Pae-GP/SAN 粒径、PDI、包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of glycyrrhiza protein mass concentration on particle size, PDI, encapsulation efficiency and drug loading of Pae-GP/SAN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甘草蛋白/ (mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
3	179.0±5.3	0.171 4±0.002 7	25.97±2.20**	20.69±1.31
4	177.7±6.1	0.170 4±0.008 9	35.46±2.47	21.09±1.24
5	179.7±7.1	0.174 1±0.013 9	36.11±0.52	18.25±0.17*
6	177.0±7.2	0.177 4±0.010 0	37.24±0.93	15.84±0.27**

与甘草蛋白 4 mg·mL⁻¹ 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs glycyrrhiza protein 4 mg·mL⁻¹ group.

浓度的增加而升高, 载药量则先升高后降低, 当甘草蛋白质量浓度为 4 mg/mL 时, SAN 同时具有较高的包封率和载药量。综合考虑, 暂定甘草蛋白质量浓度为 4 mg/mL。

2.4.4 Pae-GP/SAN 的工艺优化 称取甘草蛋白粉末 16 mg 和芍药苷原料药 12 mg, 置于 10 mL 西林瓶中, 加入蒸馏水 4 mL, 在功率 250 W、频率 50 Hz 的条件下超声 25 min 后, 不进行磁力搅拌或分别于 400、600、800 r/min 磁力搅拌 0.5 h, 测定 Pae-GP/SAN 的粒径、PDI 及包封率和载药量。结果如表 4 所示, 搅拌时间为 0.5 h 时, 磁力搅拌的转速对 SAN 的粒径和 PDI 无显著影响, 而包封率和载药量则随着转速的增加而降低, 无磁力搅拌组的包封率和载药量最高, 说明磁力搅拌作用会使 SAN 中包封的芍药苷泄露。

固定转速 400 r/min, 进一步考察不同搅拌时间对 SAN 的影响。结果如表 5 所示, 搅拌时间对 SAN 粒径及 PDI 无明显影响, 而包封率和载药量均随着搅拌时间的延长而降低。综合分析, SAN 的制备过

表 4 磁力搅拌转速对 Pae-GP/SAN 粒径、PDI、包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of magnetic stirring speed on particle size, PDI, encapsulation efficiency and drug loading of Pae-GP/SAN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磁力搅拌速 度/(r·min ⁻¹)	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
无磁力搅拌	176.0±7.2	0.164 1±0.006 9	35.46±2.47	21.09±1.24
400	176.7±10.0	0.181 4±0.010 1	26.14±2.48**	16.50±1.42*
600	176.3±7.4	0.173 3±0.010 6	18.25±2.44**	12.12±1.50**
800	175.7±9.1	0.186 6±0.007 4	13.93±1.07***	9.48±0.63***

与无磁力搅拌组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs group without magnetic stirring.

表5 磁力搅拌时间对 Pae-GP/SAN 粒径、PDI、包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of magnetic stirring time on particle size, PDI, encapsulation efficiency and drug loading of Pae-GP/SAN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磁力搅拌时间/h	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
无磁力搅拌	174.3±4.7	0.163 2±0.006 5	34.68±1.55	20.68±0.67
0.25	177.7±3.1	0.184 0±0.005 5	28.32±1.23**	17.72±0.73**
0.50	178.7±2.1	0.173 9±0.004 5	25.21±1.72**	15.97±1.01**
1.00	176.0±9.6	0.187 6±0.009 8	17.61±2.66***	11.77±1.64***

与无磁力搅拌组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs group without magnetic stirring.

程中不进行磁力搅拌。

2.4.5 Pae-GP NPs 的处方工艺验证 称取芍药苷原料药 12 mg 和甘草蛋白粉末 16 mg, 置于 10 mL 西林瓶中, 加入蒸馏水 4 mL, 在功率 250 W、频率 50 Hz 的条件下超声 25 min, 室温放置冷却后, 0.8 μm 微孔滤膜滤过。使用该方法重复制备 3 批 Pae-GP/SAN, 分别测定其粒径、PDI 及包封率和载药量。结果如表 6 所示, 所制备的纳米粒粒径均一, 该制备方法具有良好的重复性。

表6 3批验证结果

Table 6 Results of three batches of verification

批次	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
1	185.5	0.161 2	37.17	22.23
2	169.3	0.158 7	36.30	21.68
3	181.2	0.173 2	37.25	21.84
平均值	178.7±8.4	0.164 4±0.007 8	36.91±0.53	21.91±0.28

2.5 Pae-GP/SAN 的表征与稳定性

2.5.1 粒径分布与 ζ 电位的测定 采用纳米激光粒度仪测定 Pae-GP/SAN 的粒径分布与 ζ 电位, 方法同“2.2.2”项。结果见图 3, Pae-GP/SAN 的平均粒径为 (178.2±6.3) nm, PDI 为 0.152 1±0.011 2, ζ 电位为 (-14.91±1.13) mV ($n=3$)。

2.5.2 形态观察 取 Pae-GP/SAN 适量, 用超纯水稀释后, 滴于有碳膜的铜网上, 自然干燥后, 于透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下观察形貌特征, 结果见图 4。Pae-GP/SAN 外观呈球状结构, 且形态较均匀, 粒径在 50~250 nm, 与纳米激光粒度仪检测结果一致。

2.5.3 包封率和载药量 测定 Pae-GP/SAN 的包封率和载药量, 方法同“2.4.2”项下。Pae-GP/SAN 的包封率为 (36.45±2.32) %, 载药量为 (21.70±

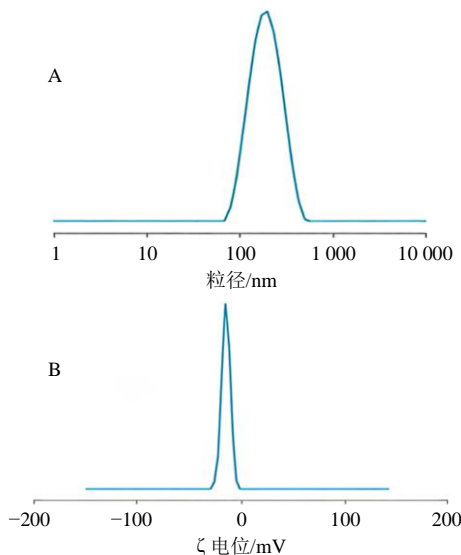


图3 Pae-GP/SAN 的粒径分布 (A) 与 ζ 电位 (B)
Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Pae-GP/SAN

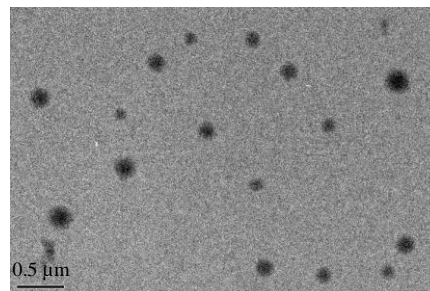


图4 Pae-GP/SAN 的 TEM 图
Fig. 4 TEM image of Pae-GP/SAN

1.30) % ($n=3$)。

2.5.4 稳定性考察 测定并比较 Pae-GP/SAN 冻干前后的粒径、PDI 及 ζ 电位, 方法同“2.2.2”项下。将 Pae-GP/SAN 冻干粉置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏, 分别于贮藏 0、1、2、3、6 个月取样, 测定其粒径、PDI、 ζ 电位及载药量, 方法同“2.2.2”与“2.4.2”项下。结果分别如表 7、8 所示, 冻干前后纳米粒粒径和 ζ 电位无显著变化, 冻干后 PDI 显著增加 ($P < 0.05$), 但仍小于 0.25, 具有较好的分散性。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏 6 个月内, Pae-GP/SAN 冻干粉复溶后粒径、PDI、 ζ 电位及载药量均无显著变化, 具有良好的稳定性。

表7 Pae-GP/SAN 冻干前后的表征 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Characterization of Pae-GP/SAN before and after lyophilization ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
冻干前	178.2±6.3	0.152 1±0.011 2	-14.91±1.13
冻干后	179.0±11.5	0.210 1±0.008 5*	-15.69±0.47

与冻干前相比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs group before lyophilization.

表8 Pae-GP/SAN冻干粉6个月内贮藏稳定性考察结果
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Storage stability of Pae-GP/SAN lyophilized powder within six months ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/月	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV	载药量/%
0	192.4±7.7	0.216 8±0.010 1	-14.97±0.49	21.42±0.16
1	183.3±10.8	0.216 7±0.019 7	-14.89±0.03	21.67±0.06
2	179.9±11.5	0.219 1±0.012 0	-15.77±0.18	20.96±0.38
3	189.2±15.2	0.209 8±0.027 9	-14.89±0.57	20.98±0.27
6	189.2±13.1	0.228 6±0.010 3	-15.75±0.84	20.83±0.31

2.6 肠灌流实验中相关溶液的配制

2.6.1 K-R 缓冲液的配制 称取 0.37 g CaCl₂, 加少量水超声溶解后, 称取 7.80 g NaCl, 0.35 g KCl, 1.37 g NaHCO₃, 0.32 g NaH₂PO₃, 0.02 g MgCl₂, 1.4 g 葡萄糖, 加少量水超声溶解后, 与 CaCl₂ 混匀, 定容至 1 L, 充分摇匀即得 K-R 溶液, 现配现用。

2.6.2 空白肠灌流液的配制 将 K-R 缓冲液于 37 °C 预热后, 进行肠灌流, 收集流出液, 即得空白肠灌流液。

2.6.3 对照品溶液的配制 精密称取芍药苷对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 配制成质量浓度为 505 μg/mL 的对照品母液, 备用。

2.6.4 不同质量浓度含药肠灌流液的配制 精密称取芍药苷、芍药苷-甘草蛋白物理混合物 (paeoniflorin-glycyrrhiza protein physical mixture, Pae-GP/PM) 和 Pae-GP/SAN 适量, 用 K-R 缓冲液稀释并定容, 配制成含芍药苷 5、10、20 μg/mL 的肠灌流芍药苷溶液 (paeoniflorin solution, Pae/Sol)、Pae-GP/PM 和 Pae-GP/SAN。

2.6.5 含化学抑制剂的肠灌流液的配制 分别精密称取维拉帕米 (P-gp 抑制剂)、吡哌美辛 [多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) 抑制剂]、利血平 [乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 抑制剂] 适量, 按照“2.6.4”项用 Pae/Sol、Pae-GP/PM 和 Pae-GP/SAN (含 20 μg/mL 芍药苷) 肠灌流液溶解, 使维拉帕米、吡哌美辛的终浓度为 100 μmol/L, 利血平的终浓度为 50 μmol/L。

2.6.6 供试品溶液的配制 收集大鼠在体肠灌流流出液后, 精密吸取 200 μL, 加 200 μL 甲醇稀释处理, 涡旋 3 min, 离心 10 min 后取上清液, 备用。

2.7 HPLC 法建立肠灌流液中芍药苷含量测定

2.7.1 色谱条件 Shim-Pack GIS C₁₈ 色谱柱 (250

mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~20%乙腈; 10~18 min, 20%~21%乙腈; 18~19 min, 21%~23%乙腈; 19~35 min, 23%~40%乙腈; 35~40 min, 40%~50%乙腈; 40~50 min, 50%乙腈; 50~53 min, 50%~10%乙腈; 53~60 min, 10%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C; 进样体积 10 μL; 检测波长为 231 nm; 理论塔板数以芍药苷峰计算不低于 6 000。

2.7.2 专属性考察 取空白肠灌流液、对照品溶液及 Pae-GP/SAN 灌流液, 分别按照“2.7.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果见图 5, 结果表明空白肠灌流液对芍药苷的测定无干扰, 表明该方法专属性良好。

2.7.3 线性关系考察 精密吸取“2.6.3”项下对照品母液, 加 K-R 缓冲液定容, 配制成含芍药苷 0.81、1.62、4.04、8.08、12.12、16.16、32.32 μg/mL 的对照品溶液, 按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定, 记录相应的色谱峰峰面积, 以药物质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得芍药

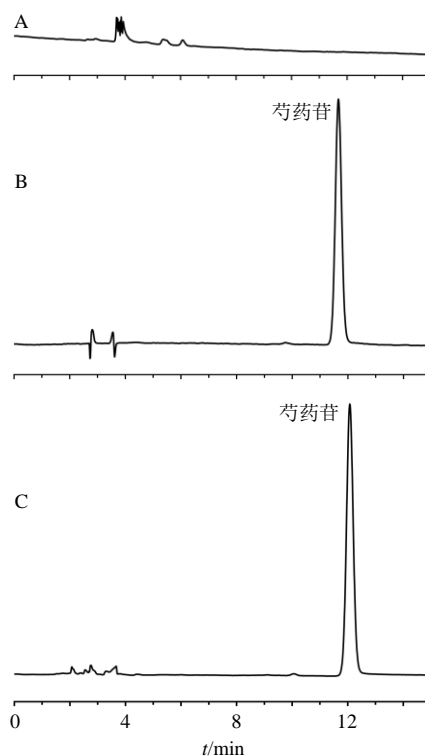


图5 空白肠灌流液 (A)、芍药苷对照品溶液 (B) 和 Pae-GP/SAN 灌流液 (C) 的专属性 HPLC 图

Fig. 5 Specific HPLC chromatograms of blank intestinal perfusate (A), paeoniflorin reference solution (B), and Pae-GP/SAN perfusate (C)

昔回归方程 $Y=15\,547.0X+2\,575.7$, $R^2=0.999\,6$, 结果表明, 芍药苷在 $0.81\sim 32.32\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.7.4 精密度试验 精密吸取“2.7.3”项下芍药苷质量浓度为 $8.08\ \mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, 按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定, 1 d 内平行测定 6 次, 考察其精密度。计算得芍药苷的精密度 RSD 为 0.17%, 表明该仪器的精密度良好。

2.7.5 重复性试验 使用 K-R 缓冲液平行配制 6 份 $20\ \mu\text{g/mL}$ 的 Pae-GP/SAN, 按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。结果显示, RSD 为 1.83%, 表明该方法重复性良好。

2.7.6 稳定性试验 使用 K-R 缓冲液配制 $20\ \mu\text{g/mL}$ 的 Pae-GP/SAN, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 取样, 按“2.6.6”项下处理, 按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定, 记录相应的色谱峰峰面积, 考察其稳定性。计算得芍药苷的稳定性 RSD 值为 1.62%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定性良好。

2.7.7 加样回收率试验 精密移取 Pae-GP/SAN 肠灌流液 6 份, 加入样品中芍药苷量 100% 的芍药苷对照品, 超声溶解后, 1:1 甲醇稀释处理, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定, 记录相应的色谱峰峰面积, 计算得芍药苷的平均加样回收率为 $(101.37\pm 1.84)\%$, RSD 值为 1.82%, 表明该方法准确度良好。

2.7.8 酶降解和物理吸附 按照“2.6.2”项下方法收集空白肠灌流液, 平行配制 3 份 Pae-GP/SAN 肠灌流液 (芍药苷质量浓度为 $20\ \mu\text{g/mL}$), 密封后置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中孵化, 分别于 0、0.25、2.00 h 取样, 按照“2.6.6”项下方法处理后, 按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定, 记录芍药苷色谱峰峰面积, 分别以 0.25、2.00 h 芍药苷的峰面积与 0 min 的峰面积的比值作为剩余百分数, 考察酶降解的影响。结果见表 9, 在实验时间内, 大鼠肠道酶作用对芍药

苷质量浓度变化均小于 2%, 表明酶降解作用对芍药苷的含量测定影响不大。

将禁食不禁水 12 h 的 SD 大鼠麻醉后沿腹中线剪开小口, 剪取小肠段剖开洗净, 置于 Pae-GP/SAN 肠灌流液 (芍药苷质量浓度为 $20\ \mu\text{g/mL}$), $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中孵育 2 h, 分别于 0、0.25、2.00 h 时取样, 按照“2.6.6”项下方法处理样品后, 按照“2.7.1”项下色谱条件进样, 测定孵育前、后芍药苷的峰面积, 以孵育后芍药苷峰面积与孵育前峰面积的比值作为剩余百分数, 考察物理吸附的影响。结果见表 9, 在实验时间内, 芍药苷质量浓度变化均小于 2%, 表明肠道对芍药苷的吸附作用可忽略不计。

2.8 大鼠在体单向肠灌流实验

采用在体单向肠灌流技术, 研究不同吸收部位 (空肠、回肠)、不同药物质量浓度 ($5、10、20\ \mu\text{g/mL}$, 以芍药苷计) 及不同转运蛋白抑制剂 (维拉帕米、吡哆美辛、利血平) 对药物肠吸收的影响。

实验前大鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉后沿腹中线剪开小口, 选取需要考察的肠段约 10 cm, 两端插入硅胶管, 用灭菌的手术线结扎固定。用浸有生理盐水的纱布覆盖肠组织保湿, 采用红外灯照射保温。用预热至 $37\ ^\circ\text{C}$ 的生理盐水排净肠道内容物后, 用空白 K-R 溶液以 $0.2\ \text{mL/min}$ 灌流 15 min 平衡肠段, 之后用 $37\ ^\circ\text{C}$ 的供试液, 以 $0.2\ \text{mL/min}$ 平衡 30 min 后开始计时, 于出口段放置已知质量的小瓶, 每 15 分钟收集流出液 1 次, 同时记录供试液小瓶与收集液小瓶的质量, 共收集 6 份。灌流结束后将大鼠处死并测量灌流肠道的长度与内径。

2.8.1 吸收参数的计算与数据处理 采用重量法对灌流液流入和流出体积进行校正, 消除灌流过程中肠道吸收水分, 导致灌流液体积变化对结果的影响。按照下式分别计算药物吸收速率常数 (K_a) 和药物有效渗透系数 (P_{eff})。

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

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

C_{in} 和 C_{out} 分别为入肠液和出肠液中待测成分的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), V_{in} 和 V_{out} 分别为入肠液和出肠液的体积 (mL), Q 为入肠液的灌流体积流量 ($0.2\ \text{mL/min}$), r 和 l 分别是实验肠段的内径 (cm) 和长度 (cm)

2.8.2 大鼠不同肠段对药物吸收的影响 分别以空肠和回肠作为灌流部位, 以 $0.2\ \text{mL/min}$ 的体积流量灌流 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN ($20\ \mu\text{g/mL}$, 以芍药苷计), 持续灌流 90 min。采用重量法校正,

表 9 酶降解和物理吸附对 Pae-GP/SAN 中芍药苷含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effects of enzymatic degradation and physical adsorption on paeoniflorin content in Pae-GP/SAN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理方法	剩余占比/%		
	0	0.25 h	2.00 h
酶降解	100.00±0.00	101.29±0.42	101.76±0.56
物理吸附	100.00±0.00	99.91±0.94	100.27±0.69

比较 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 肠灌流液在不同肠段吸收的 K_a 和 P_{eff} 差异, 结果见表 10。Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 在空肠与回肠中的吸收无显著性差别, 而 Pae-GP/SAN 在回肠中的吸收优于空肠, 吸收参数显著高于空肠段 ($P < 0.05$ 、 0.01)。相同肠段中, Pae-GP/PM 的吸收较 Pae/Sol 略有增加, 而 Pae-GP/SAN 的吸收在 2 种肠段中均显著强于其余 2 种制剂, K_a 与 P_{eff} 值显著升高, 说明 Pae-GP/SAN 的形成显著提高了芍药苷的肠吸收。

表 10 不同肠段中 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 中芍药苷的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 10 Absorption parameters of paeoniflorin in Pae/Sol, Pae-GP/PM, and Pae-GP/SAN in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

肠段	$K_a / (\times 10^{-4} s^{-1})$		
	Pae/Sol	Pae-GP/PM	Pae-GP/SAN
空肠	2.95 ± 0.51***	4.51 ± 1.19**	7.02 ± 1.48
回肠	2.65 ± 0.13###	4.06 ± 1.24###	9.93 ± 2.04*

肠段	$P_{eff} / (\times 10^{-5} cm \cdot s^{-1})$		
	Pae/Sol	Pae-GP/PM	Pae-GP/SAN
空肠	2.55 ± 0.44***	3.61 ± 0.98**	6.00 ± 0.93
回肠	2.11 ± 0.27###	2.96 ± 0.84###	8.84 ± 1.30**

与 Pae-GP/SAN 组空肠段比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 Pae-GP/SAN 组回肠段比较: ### $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs jejunum segment of Pae-GP/SAN group; ### $P < 0.001$ vs ileum segment of Pae-GP/SAN group。

2.8.3 质量浓度对药物吸收的影响 用 K-R 溶液配制芍药苷药量分别为 5、10、20 $\mu g/mL$ 的 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 灌流液, 以回肠为灌流部位, 灌流体积流量 0.2 mL/min, 持续灌流 90 min。采用重量法校正, 比较不同质量浓度的 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 肠灌流液在回肠段吸收的 K_a 和 P_{eff} 差异, 结果见表 11。不同质量浓度的 Pae/Sol 和 Pae-GP/PM 在回肠段的吸收无显著性差异, 而高质量浓度 Pae-GP/SAN 的 K_a 和 P_{eff} 显著高于低质量浓度组 ($P < 0.001$)。

2.8.4 转运蛋白抑制剂对药物吸收的影响 分别用含有 100 $\mu mol/L$ 维拉帕米、吲哚美辛和 50 $\mu mol/L$ 利血平的 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN (20 $\mu g/mL$, 以芍药苷计) 灌流液, 以回肠为灌流部位, 灌流速度 0.2 mL/min, 持续灌流 90 min。采用重量法校正, 比较不同转运蛋白抑制剂对 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 肠灌流液在回肠段吸收的影响, 结果见表 12。维拉帕米、吲哚美辛和利血平分

表 11 不同质量浓度 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 中芍药苷的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 11 Absorption parameters of paeoniflorin in Pae/Sol, Pae-GP/PM and Pae-GP/SAN at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度/ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	$K_a / (\times 10^{-4} s^{-1})$		
	Pae/Sol	Pae-GP/PM	Pae-GP/SAN
5	1.91 ± 0.95	3.37 ± 0.93	5.87 ± 0.38
10	2.13 ± 0.68	3.08 ± 0.91	6.83 ± 2.22
20	2.65 ± 0.13	4.06 ± 1.24	9.93 ± 2.04***

质量浓度/ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	$P_{eff} / (\times 10^{-5} cm \cdot s^{-1})$		
	Pae/Sol	Pae-GP/PM	Pae-GP/SAN
5	1.52 ± 0.79	2.12 ± 0.45	4.78 ± 0.17
10	1.74 ± 0.51	2.38 ± 0.22	6.60 ± 2.69
20	2.11 ± 0.27	2.96 ± 0.84	8.84 ± 1.30***

与 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ Pae-GP/SAN 组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ Pae-GP/SAN group。

表 12 含转运抑制剂的 Pae/Sol、Pae-GP/PM、Pae-GP/SAN 中芍药苷的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 12 Absorption parameters of paeoniflorin in Pae/Sol, Pae-GP/PM and Pae-GP/SAN containing transport inhibitors ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

抑制剂	$K_a / (\times 10^{-4} s^{-1})$		
	Pae/Sol	Pae-GP/PM	Pae-GP/SAN
无抑制剂	2.65 ± 0.13	4.06 ± 1.24	9.93 ± 2.04
维拉帕米	4.87 ± 0.35***	6.77 ± 0.87**	12.20 ± 2.89
吲哚美辛	3.02 ± 1.04	4.30 ± 1.93	10.05 ± 0.24
利血平	2.32 ± 0.55	3.87 ± 1.01	9.63 ± 1.46

抑制剂	$P_{eff} / (\times 10^{-5} cm \cdot s^{-1})$		
	Pae/Sol	Pae-GP/PM	Pae-GP/SAN
无抑制剂	2.11 ± 0.27	2.96 ± 0.84	8.84 ± 1.30
维拉帕米	4.11 ± 0.98**	5.52 ± 0.65***	9.28 ± 2.32
吲哚美辛	2.56 ± 0.99	3.15 ± 1.39	8.35 ± 2.66
利血平	2.17 ± 0.44	3.18 ± 1.17	7.51 ± 0.78

与无抑制剂组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs inhibitor-free group。

别是外排转运蛋白 P-gp、MRP2 和 BCRP 的抑制剂。加入维拉帕米之后, Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 组的 K_a 与 P_{eff} 均显著提高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而加入吲哚美辛与利血平后, 2 组的肠吸收参数与未加抑制剂时相比无显著性差异, 提示 Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 可能是 P-gp 的底物, 而非 MRP2 和 BCRP 的底物。对于 Pae-GP/SAN 组, 3 种抑制剂均对其肠吸收无显著影响, 表明 Pae-GP/SAN 可能不是这 3 种外排转运蛋白的底物。

2.9 激光扫描共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 下观察 GP/SAN 的肠吸收

2.9.1 P4 水淬灭组的制备 取 50 μL P4 探针二氯甲烷溶液 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 10 mL 棕色西林瓶中, 通风橱内吹干, 加入 4 mL 蒸馏水, 超声 25 min, 样品过 0.8 μm 的滤膜, 即得。

2.9.2 P4-GP/SAN 的制备 取 50 μL P4 探针二氯甲烷溶液 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 10 mL 棕色西林瓶中, 通风橱内吹干, 加入 GP/SAN 16 mg 和 4 mL 蒸馏水, 超声 25 min, 样品过 0.8 μm 的滤膜, 即得。

2.9.3 GP/SAN 在肠段内的吸收行为 用 K-R 溶液配制 1 mg/mL P4-GP/SAN 灌流液, 灌流方法同“2.8”项。灌流结束后, 通入空气以排净肠道内残留灌流液, 用剪刀将肠段剪为约 1 cm 长的肠环, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜, 经蔗糖脱水处理后取

出, 滴加 OCT 冷冻包埋剂进行包埋, 使用冷冻切片机对包埋样品进行切片, 切片厚度设定为 10 μm 。将切片贴附于载玻片上, 随后进行 DAPI 染色。使用 FV3000 激光共聚焦显微镜观察切片, 具体仪器参数设置如下: DAPI 激发波长 405 nm, 发射波长 461 nm, 信号颜色为蓝色; P4 探针激发波长 640 nm, 发射波长 665 nm, 信号颜色为红色。将切片倒置于显微镜载物台, 调节焦平面至视野清晰, 采用 10 \times 物镜观察, 图像扫描分辨率为 1024 \times 1024 像素, 所得图像均通过 FV3000 专用软件进行图像处理。结果如图 6 所示, DAPI 蓝色信号代表小肠细胞核, P4 水淬灭组肠切片未观察到红色荧光信号, 表明 P4 探针的淬灭溶液不会和肠道脂质结合; 而 P4-GP/SAN 组肠绒毛侧和基底侧都可清晰观察到红色荧光信号, 表明 GP/SAN 能以完整结构的形式透过小肠屏障。

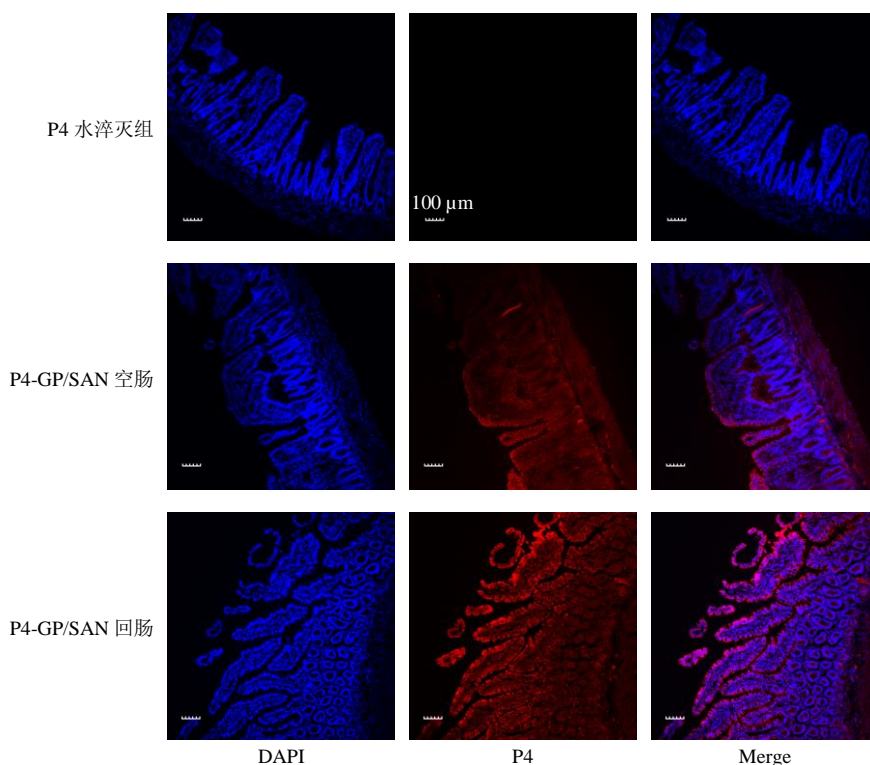


图 6 P4-GP/SAN 在小肠的分布情况

Fig. 6 Distribution of P4-GP/SAN in small intestine

3 讨论

超声分散法是制备纳米粒的常用方法之一。研究表明, 超声能够对蛋白质的理化性质产生影响, 改变蛋白质二级、三级结构, 使其粒径变小, 溶解性增强^[17-18]。粒径、包封率和载药量是纳米粒的重要评价指标。更小粒径 (<200 nm) 和 PDI (<0.2) 的纳米粒, 通常具有更好的稳定性、安全性和有效

性^[19]。包封率和载药量直接影响制剂的药效和毒性, 提高包封率和载药量通常意味着有效成分含量的增加, 减少药物在运输途中的提前泄露, 保证更多的药物能够递送至组织。

在对甘草蛋白质量浓度初筛的过程中发现, 当甘草蛋白质量浓度超过 6 mg/mL 时, 甘草蛋白出现聚沉趋势, 无法形成均一稳定的纳米结构。因此本

研究先设定甘草蛋白的质量浓度为 6 mg/mL, 再通过单因素试验法对芍药苷、甘草蛋白的用量以及磁力搅拌的参数进行优化。结果表明, 上述影响因素对纳米粒粒径和 PDI 均无显著影响, 但使包封率和载药量发生了变化。随着芍药苷用量的增加, 包封率和载药量整体呈现先增加后减小的趋势, 当芍药苷质量浓度为 3 mg/mL 时, 已经达到 GP/SAN 能包载的药量上限, 因此, 选定 3 mg/mL 为芍药苷质量浓度。以初筛时甘草蛋白质量浓度 6 mg/mL 为基准, 进一步降低甘草蛋白用量, 结果发现, 当甘草蛋白质量浓度低于 4 mg/mL 时, 载体质量浓度过低, 使得包封率显著降低; 当甘草蛋白质量浓度超过 4 mg/mL 时, 对于选定的 3 mg/mL 芍药苷, 包封率也不再具有显著性升高, 且随着载体用量的增加, 载药量显著下降。进一步对制备工艺优化时发现, 磁力搅拌会破坏纳米粒的结构, 使得包封的芍药苷泄露, 因此在制备过程中不进行磁力搅拌。基于以上结果筛选出的最佳处方及工艺: 芍药苷质量浓度为 3 mg/mL, 甘草蛋白质量浓度为 4 mg/mL, 不进行磁力搅拌, 在功率 250 W、频率 50 Hz 的条件下超声 25 min。所制备的 Pae-GP/SAN 粒径为 (178.2 ± 6.3) nm, PDI 为 0.1521 ± 0.0112 , ζ 电位为 (-14.91 ± 1.13) mV, 包封率为 $(36.45 \pm 2.32)\%$, 载药量为 $(21.70 \pm 1.30)\%$, 呈均一的球形结构。该方法重现性良好, 工艺简单, 所制备的纳米粒粒径均一, 性质稳定, 包封率和载药量较高。

基于以上分析, 课题组进一步研究发现, Pae-GP/SAN 可以显著提高芍药苷在大鼠体内的口服生物利用度^[20], 而其具体肠吸收机制尚不清楚。在体单向灌流法目前被广泛用于考察口服药物的吸收情况, 实验条件与真实情况接近, 操控性好, 损伤性小, 与人体具有良好的相关性^[21], 因此, 本实验采用该方法来研究 Pae-GP/SAN 的吸收特性。结果表明, Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 在空肠与回肠中的吸收无显著性差异, 而 Pae-GP/SAN 在回肠段的吸收显著优于空肠段 ($P < 0.05$ 、 0.01), 这可能与回肠段中存在派伊尔结有关。派伊尔结是分布于回肠淋巴组织集合体, 由淋巴滤泡、T 细胞区和覆盖其表面的 M 细胞 (微皱褶细胞) 组成, 药物可通过该结构进行淋巴转运, 避免首过效应和肝毒性^[22], 其中 M 细胞还可以识别摄取纳米粒, 对药物吸收具有促进作用^[23-24]。在 $5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ (以芍药苷计) 时, 质量浓度对 Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 的吸收参数无显著

影响, 表明该实验条件下 Pae/Sol 和 Pae-GP/PM 主要以单纯扩散的方式吸收; 高质量浓度 Pae-GP/SAN 的 K_a 和 P_{eff} 显著高于低质量浓度组 ($P < 0.001$), 这说明形成纳米粒之后, 药物的转运方式发生改变, 以其他非单纯扩散的转运方式为主。

肠道内广泛分布着 ABC 转运蛋白, 可以识别并转运多种物质, 与耐药性和药物的外排现象密切相关, 严重影响药物的体内命运^[25]。本研究选取肠道内常见的转运蛋白 P-gp、MRP2 和 BCRP 为代表, 考察 Pae-GP/SAN 受外排转运蛋白的影响。研究发现, MRP2 抑制剂吡喹美辛和 BCRP 抑制剂利血平对 Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 的吸收没有影响, 而 P-gp 抑制剂维拉帕米可以显著增加这二者的吸收 ($P < 0.01$ 、 0.001), 说明 Pae/Sol 与 Pae-GP/PM 可能是 P-gp 的底物, 但不是 MRP2 和 BCRP 的底物。而对于 Pae-GP/SAN, 这 3 种抑制剂均不对其吸收产生影响, 即 Pae-GP/SAN 可能不是 P-gp、MRP2 和 BCRP 的底物。这说明形成纳米粒之后药物的转运方式发生改变, Pae-GP/SAN 可能通过某种方式规避 P-gp 的外排作用来增加药物的吸收。

ACQ 荧光探针具有水淬灭性, 将其包裹进纳米粒时, 可以发出荧光信号, 当纳米粒降解, 探针释放, 遇水团聚, 使得荧光淬灭。因此, ACQ 荧光探针可以用来标记、定位纳米粒子, 在揭示纳米粒体内命运方面具有独特的优势^[26-27]。本研究通过 CLSM 观察到, P4 探针标记的 GP/SAN 的红色信号贯穿小肠绒毛端和基底侧, 证实 GP/SAN 能以完整结构的形式透过小肠屏障, 这可能也是 Pae-GP/SAN 肠吸收增加的原因之一。

综上, 本研究采用超声分散法制备了一种 Pae-GP/SAN, 优化其处方及制备工艺, 并通过在体单向肠灌流实验及 ACQ 探针发现, Pae-GP/SAN 可通过规避 P-gp 的外排作用, 并以整体形式在小肠内被吸收的方式来增加芍药苷的吸收。目前本研究仅在动物层面对 Pae-GP/SAN 的肠吸收机制进行考察, 机制研究还不够深入, 后续将建立多种细胞模型, 在细胞层面考察 Pae-GP/SAN 的细胞摄取与转运行为, 进一步阐明其吸收机制, 为今后提高芍药苷生物利用度的研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 耿飞飞, 曲彤, 李宁, 等. 青风藤-白芍药对不同配伍比例化学成分与抗炎活性变化规律研究 [J]. 中草药,

- 2025, 56(1): 98-107.
- [2] Zhou Y, Liu X, Gao Y H, *et al.* Paeoniflorin affects hepatocellular carcinoma progression by inhibiting Wnt/ β -catenin pathway through downregulation of 5-HT1D [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(9): 1246-1253.
- [3] 严爱娟, 黄琴伟, 杨颖欣, 等. 壳聚糖季铵盐对白芍总苷口服生物利用度及肠道吸收的影响 [J]. *中药材*, 2025, 48(2): 443-448.
- [4] Zhou Y X, Gong X H, Zhang H, *et al.* A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110505.
- [5] Yang C, Yang S S, Fang S M, *et al.* PLGA nanoparticles enhanced cardio-protection of scutellarin and paeoniflorin against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats [J]. *Int J Pharm*, 2023, 648: 123567.
- [6] Wang D Y, Yang F, Shang W, *et al.* Paeoniflorin-loaded pH-sensitive liposomes alleviate synovial inflammation by altering macrophage polarity via STAT signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101: 108310.
- [7] Liu J R, Chen S Q, Zhang Z J, *et al.* The oxidized hyaluronic acid hydrogels containing paeoniflorin microspheres regulates the polarization of M1/M2 macrophages to promote wound healing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282: 137107.
- [8] 高翠霞, 黄玲玲, 曹雯娟. 芍药和甘草配伍的研究进展 [J]. *中医研究*, 2023, 36(8): 92-95.
- [9] 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.
- [10] 黄菊, 朱禹, 肖航, 等. 中药自组装纳米策略在肿瘤治疗中应用的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(24): 185-193.
- [11] 沈成英, 胡菲, 朱君君, 等. 中药自组装纳米粒的形成及应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(19): 4875-4880.
- [12] 卢凯, 苏贝贝, 魏闪闪, 等. 中药自组装的研究策略、影响因素及应用前景 [J]. *药物评价研究*, 2026, 49(3): 1071-1081.
- [13] 袁海龙, 朱煜文. 中药制剂研究新方向: 改良自组装纳米粒的构建及应用 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(13): 3569-3573.
- [14] 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.
- [15] Zhou J W, Zhang J, Gao G Z, *et al.* Boiling licorice produces self-assembled protein nanoparticles: A novel source of bioactive nanomaterials [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(33): 9354-9361.
- [16] Wang H Q, Song B B, Zhou J W, *et al.* Fabrication and characterization of curcumin-loaded nanoparticles using licorice protein isolate from *Radix Glycyrrhizae* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 255: 128235.
- [17] Hu H, Wu J H, Li-Chan E C Y, *et al.* Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions [J]. *Food Hydrocoll*, 2013, 30(2): 647-655.
- [18] Jiang L Z, Wang J, Li Y, *et al.* Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates [J]. *Food Res Int*, 2014, 62: 595-601.
- [19] Gul O, Saricaoglu F T, Besir A, *et al.* Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil [J]. *Ultrason Sonochem*, 2018, 41: 466-474.
- [20] Shen C Y, Wei X L, Du C Y, *et al.* Comparative evaluation of nano-assemblies from Shaoyao Gancao Decoction on paeoniflorin bioavailability [J]. *Int J Nanomed*, 2025, 20: 14313-14328.
- [21] Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, *et al.* Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2007, 10(3): 368-379.
- [22] Reboldi A, Cyster J G. Peyer's patches: Organizing B-cell responses at the intestinal frontier [J]. *Immunol Rev*, 2016, 271(1): 230-245.
- [23] Elz A S, Trevaskis N L, Porter C J H, *et al.* Smart design approaches for orally administered lipophilic prodrugs to promote lymphatic transport [J]. *J Control Release*, 2022, 341: 676-701.
- [24] Taheri A, Bremmell K E, Joyce P, *et al.* Battle of the milky way: Lymphatic targeted drug delivery for pathogen eradication [J]. *J Control Release*, 2023, 363: 507-524.
- [25] 何宇臻, 王辉, 方家豪, 等. ABC 转运蛋白家族介导的中药-化药相互作用研究进展 [J]. *药学学报*, 2021, 56(7): 1778-1788.
- [26] Shen C Y, Yang Y Q, Shen B D, *et al.* Self-discriminating fluorescent hybrid nanocrystals: Efficient and accurate tracking of translocation via oral delivery [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(1): 436-450.
- [27] Shen B D, Shen C Y, Zhu W F, *et al.* The contribution of absorption of integral nanocrystals to enhancement of oral bioavailability of quercetin [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(4): 978-988.