

芍药甘草汤中自组装纳米粒形成对甘草主要成分体外释放和肠吸收的影响[△]

沈成英^{1,2*}, 李小芳², 朱君君³, 申宝德⁴, 袁海龙³, 胡建新^{1#}(1.江西省人民医院药学部,南昌 330006;2.成都中医药大学药学院,成都 611137;3.空军特色医学中心药剂科,北京 100142;4.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)03-0338-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.03.14



摘要 目的 研究芍药甘草汤中自组装纳米粒(SGD-SAN)形成对甘草主要成分体外释放和肠吸收的影响。方法 制备甘草单煎液(GSD)、芍药单煎液(SSD)、芍药-甘草单煎混合液(MSSGD)和SGD(即芍药、甘草合煎液),并对其中的SAN进行表征。采用高效液相色谱法测定甘草中7种主要成分(芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素)的含量。采用透析袋法,以pH1.2 HCl溶液和pH6.8磷酸盐缓冲液(PBS)为释放介质,考察SGD-SAN形成对甘草中7种主要成分体外释放的影响;采用在体单向肠灌注实验考察SGD-SAN形成对甘草中7种主要成分在大鼠肠段吸收的影响。结果 GSD、MSSGD和SGD中存在粒径为200~300 nm、多分散性指数为0.3~0.5的SAN;透射电镜观察结果显示,GSD-SAN、MSSGD-SAN呈棒状,SGD-SAN呈不规则球形。体外释放实验结果显示,在pH1.2 HCl溶液中,SGD-SAN形成能显著增加甘草素、异甘草素和甘草酸的体外释放,对其他成分的释放无明显影响;在pH6.8 PBS中,SGD-SAN形成对甘草中各成分的释放均没有明显影响。在体单向肠灌注实验结果显示,SGD-SAN形成能显著促进甘草中各成分在回肠的吸收。结论 SGD-SAN形成能显著改善甘草中难溶性成分的体外释放、促进甘草中主要成分的肠吸收,是芍药、甘草配伍增效的物理结构基础。

关键词 自组装纳米粒;芍药甘草汤;甘草;难溶性成分;体外释放;肠吸收

Effects of self-assembled nanoparticles from Shaoyao gancao decoction on the *in vitro* release and intestinal absorption of the main components of *Glycyrrhiza uralensis*

SHEN Chengying^{1, 2}, LI Xiaofang², ZHU Junjun³, SHEN Baode⁴, YUAN Hailong³, HU Jianxin¹ (1. Dept. of Pharmacy, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. Dept. of Pharmacy, Air Force Medical Center, the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100142, China; 4. Key Lab of Modern Traditional Chinese Medicine Preparation of the Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of self-assembled nanoparticles from Shaoyao gancao decoction (SGD-SAN) on the *in vitro* release and intestinal absorption of the main components of *Glycyrrhiza uralensis*. **METHODS** Gancao single decoction (GSD), Shaoyao single decoction (SSD), mixed suspension of Shaoyao and Gancao single decoction (MSSGD) and SGD (i.e. Shaoyao-Gancao decoction) were prepared, and SAN was characterized. HPLC method was adopted to determine the contents of 7 main components (liquiritin apioside, liquiritin, isoliquiritin apioside, isoliquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, isoliquiritigenin) in *G. uralensis*. The dialysis bag method was used to investigate the effects of the formation of SGD-SAN on *in vitro* release of 7 main components in *G. uralensis* with pH1.2 HCl solution and pH6.8 phosphate buffered solution (PBS) as release media. Single-pass intestinal perfusion study was performed to investigate the effects of the formation of SGD-SAN on the intestinal absorption of 7 main components from *G. uralensis*. **RESULTS** SAN with particle size of 200-300 nm and polydispersity index of 0.3-0.5 was found in GSD, MSSGD and SGD. GSD-SAN and MSSGD-SAN were in rod shape while SGD-SAN was irregularly spherical under transmission electron microscope. The results of *in vitro* release study showed that the formation of SGD-SAN could significantly increase *in vitro* release of liquiritigenin, isoliquiritigenin and glycyrrhizic acid, and had no effect on other components of *G. uralensis* in pH1.2 HCl solution. The formation of SGD-SAN also had no effect on the release of each

[△] 基金项目:江西省中医药重点研究室-中药制剂临床安全监测和转化应用重点研究室项目

* 主管中药师,博士。研究方向:中药新型给药系统。电话:0791-86891529。E-mail:984075899@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0791-86895684。E-mail:hjx0108@163.com

component from *G. uralensis* in pH6.8 PBS. The results of intestinal perfusion experiments showed that the formation of SGD-SAN could significantly promote the absorption of each component from *G. uralensis* in the ileum. **CONCLUSIONS** The formation of SGD-SAN significantly improves the *in vitro* release of poorly soluble components from *G. uralensis* and

promotes the intestinal absorption of main components from *G. uralensis*, which is the physical structure basis for the compatibility and synergy of *Paeonia lactiflora* and *G. uralensis*.

KEYWORDS self-assembled nanoparticles; Shaoyao gancao decoction; *Glycyrrhiza uralensis*; insoluble component; *in vitro* release; intestinal absorption

芍药甘草汤(Shaoyao Gancao decoction, SGD)是历代中医最常用的经典方剂之一,源于张仲景的《伤寒论》,由芍药和炙甘草等比例组成^[1]。方中芍药酸寒,养血敛阴、柔肝止痛;甘草甘温,健脾益气、缓急止痛;二药相伍,酸甘化阴、调和肝脾,有柔筋止痛之效,临床广泛用于治疗痉挛性疾病、疼痛性疾病、炎症性疾病等^[2]。现代研究表明,SGD的主要有效成分有芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸、甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素、异甘草素等^[3]。然而,这些成分均为黄酮类或苷类成分,在胃肠道往往较难吸收,口服生物利用度低。研究发现,芍药和甘草配伍能够显著促进芍药苷、甘草酸等成分的吸收,但现有研究只是从不同角度证实了芍药和甘草配伍的合理性,而关于两药配伍促吸收的机制并未得到较好阐释^[4-5]。

近年来,中药化学成分分子间的相互作用,尤其是化学成分的分子识别与自组装受到越来越广泛的关注^[6]。由于中药化学成分具有独特的结构、众多的修饰位点和丰富的来源,在煎煮过程中易于通过非共价键结合而形成自组装纳米粒(self-assembled nanoparticles, SAN),进而产生促进成分煎出、吸收等作用^[6-8]。相关文献报道,中药在煎煮过程中溶出的化学成分常常通过非共价键结合形成SAN,并且该SAN能促进有效成分在机体的吸收,对汤剂的功效起重要作用^[9-13]。比如,Lu等^[14]研究发现,白虎汤的主要有效成分以SAN形式存在于水煎液中,且相比白虎汤的其他部位(溶液、沉淀),白虎汤SAN具有更好的解热作用、更容易被细胞摄取、更容易在肺和脑中富集。再如,Lin等^[15]研究发现,葛根芩连汤在煎煮过程中有SAN形成,该SAN能显著提高有效成分黄芩苷的肠吸收。上述研究从新的视角揭示了SAN可能是中药复方配伍的重要物质基础之一,有助于诠释中药配伍理论的科学内涵。

本课题组前期研究发现,芍药与甘草在合煎过程中形成了SAN(即SGD-SAN),且该SAN通过包裹芍药成分(芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷),使芍药成分具有一定的缓释作用,并可促进这些成分在肠道的吸收;同时,本课题组也验证了SGD-SAN主要是由甘草成分主导,芍药共煎后其成分的掺入使SAN形态由棒状转变成了球形^[16]。本文在前期研究基础上,进一步探讨由于配伍引起的SAN形态变化对甘草主要成分体外释放和吸收的影响,即同时研究SGD、甘草单煎液(Gancao single decoction, GSD)及芍药-甘草单煎混合液(mixed suspension of Shaoyao and Gancao single decoction, MSSGD)中甘草主要成分(甘草酸、甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、

芹糖异甘草苷、甘草素、异甘草素)的体外释放和肠吸收情况,并进行对比分析,以探讨芍药与甘草配伍后水煎液中SAN形成对甘草主要成分体外释放和吸收的影响,为全面阐释芍药和甘草配伍促进有效成分吸收的科学内涵奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有LC-20AD型高效液相色谱(HPLC)仪(日本岛津公司)、98-1-B型电子调温加热套(天津市泰斯特仪器有限公司)、RT10型恒温磁力搅拌器(德国IKA公司)、FiveEasy型实验室pH计(瑞士Mettler Toledo公司)、SHZ-C型水浴恒温振荡器(上海浦东物理光学仪器厂)、ZRS-8G型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)、BS210s型电子天平(德国Sartorius公司)、Zetasizer型纳米激光粒度仪(英国Malvern公司)、LSP01-1A型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)、Tecnai G2 F30型场发射透射电镜(美国FEI公司)。

1.2 药品与试剂

白芍饮片(批号190918001,产地为安徽)、炙甘草饮片(批号190712001,产地为新疆)购自北京仟草中药饮片有限公司;芹糖甘草苷对照品(批号20190630)、芹糖异甘草苷对照品(批号20190226)、异甘草苷对照品(批号20190810)购自宝鸡市辰光生物科技有限公司,纯度均不低于98.0%;异甘草素对照品(批号20190603)、甘草素对照品(批号20190330)、甘草酸对照品(批号20190301)购自成都普思生物科技股份有限公司,纯度均不低于98.0%;甘草苷对照品(批号111610-201806,纯度 $\geq 98.0\%$)购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

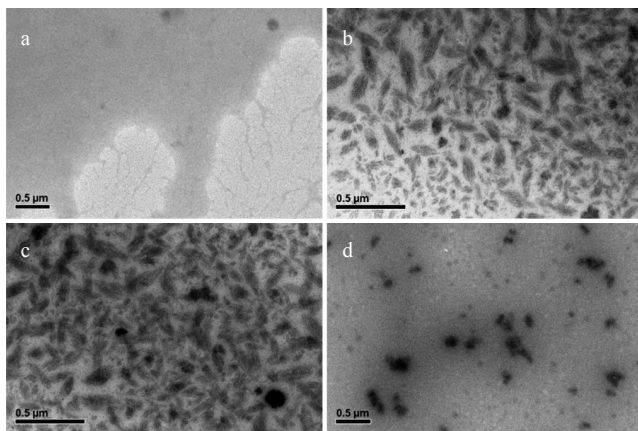
本研究所用动物为SPF级健康雄性SD大鼠,共36只,体质量为180~220 g,由北京科宇动物养殖中心提供,生产许可证号为SCXK(京)2018-0010。大鼠购入后饲养于温度为(25±2)℃、相对湿度为50%~60%的动物房中。本研究中动物实验方案经空军特色医学中心实验动物伦理委员会审查批准后实施[批准号为空特(科研)第2020-117-PJ01]。

2 方法与结果

2.1 各药物水煎液的制备及其中SAN的表征

参照文献[16]方法,制备芍药单煎液(Shaoyao single decoction, SSD)、GSD、MSSGD和SGD(即芍药和甘草的合煎液)并测定各水煎液中SAN的粒径和多分散性指数(polydispersity index, PDI),同时采用透射电镜进行

形态观察。结果显示,SSD中未读取到粒径分布数据,可能是形成的SAN较少(图1a);GSD中存在粒径为 (213 ± 28) nm、PDI为 0.41 ± 0.18 的棒状或梭形SAN(图1b);MSSGD中存在粒径为 (242 ± 20) nm、PDI为 0.42 ± 0.04 的棒状或梭形SAN,形态与GSD中SAN一致(图1c);SGD中存在粒径为 (255 ± 12) nm、PDI为 0.36 ± 0.09 的不规则球形SAN(图1d)。



a:SSD;b:GSD;c:MSSGD;d:SGD

图1 4种水煎液的透射电镜图

2.2 SGD-SAN形成对甘草中主要成分体外释放的影响

2.2.1 含量测定方法的建立 采用HPLC法进行含量测定,色谱条件及溶液制备方法参考文献[16]。参照2020年版《中国药典》(四部)分析方法验证指导原则及文献[16]进行方法学考察。专属性试验结果显示,供试品溶液与混合对照品溶液在相同保留时间处有相同色谱峰出现,各待测成分色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于1.5,且阴性对照溶液对测定无干扰,表明本方法的专属性较好(图略)。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归后,得到芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素的回归方程分别为 $Y=14\ 495X-4\ 719.2(R^2=1.000\ 0)$ 、 $Y=18\ 407X-11\ 852(R^2=0.999\ 9)$ 、 $Y=10\ 913X-1\ 380.3(R^2=0.999\ 2)$ 、 $Y=10\ 454X-816.53(R^2=0.999\ 5)$ 、 $Y=20\ 080X+287.64(R^2=0.999\ 2)$ 、 $Y=5\ 622.2X+7\ 428.4(R^2=0.999\ 7)$ 、 $Y=11\ 585X+688.82(R^2=0.999\ 9)$,上述成分质量浓度分别在 $3.76 \sim 150.40$ 、 $3.24 \sim 129.60$ 、 $0.72 \sim 28.80$ 、 $0.68 \sim 27.20$ 、 $0.14 \sim 5.60$ 、 $6.04 \sim 241.60$ 、 $0.44 \sim 17.60$ $\mu\text{g/mL}$ 范围内与其峰面积线性关系良好。上述7种成分精密度试验的RSD分别为0.29%、0.59%、0.83%、1.91%、1.95%、1.52%、1.51% ($n=6$);重复性试验的RSD分别为2.67%、3.19%、3.71%、3.62%、4.01%、3.60%、4.05% ($n=6$);稳定性试验(室温放置24 h)的RSD分别为1.68%、0.98%、0.89%、0.34%、1.97%、0.26%、1.23% ($n=6$);平均加样回收率分别为96.91%~98.87% (RSD为1.00%, $n=6$)、96.90%~102.52% (RSD为2.81%, $n=6$)、99.06%~105.02% (RSD为2.92%, $n=6$)、96.28%~98.68% (RSD

为1.23%, $n=6$)、101.39%~105.85% (RSD为2.15%, $n=6$)、97.53%~104.23% (RSD为3.32%, $n=6$)、100.18%~105.62% (RSD为2.65%, $n=6$)。

2.2.2 体外释放实验 采用透析袋法考察SGD-SAN对甘草中主要成分体外释放的影响。分别取“2.1”项下GSD、MSSGD和SGD各3 mL,分别置于截留分子量为8 000~14 000 Da的透析袋中,两端扎紧后,放入释放介质[200 mL pH1.2的HCl溶液或200 mL pH6.8的磷酸盐缓冲液(PBS)]中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下以100 r/min进行搅拌。分别于搅拌5、15、30 min和1、2、4、6、8、10、12、24 h时,取释放溶液1 mL,同时补充相同温度、相同体积的释放介质。将释放溶液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,然后采用HPLC法进样分析,计算各成分的累积释放量并绘制释放曲线。甘草中7种主要成分在pH1.2 HCl溶液和pH6.8 PBS中的体外释放曲线分别见图2、图3。

由图2可知,在pH1.2 HCl溶液中,甘草与芍药配伍后对甘草中芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草苷和异甘草苷的体外释放均没有明显影响,而对甘草素、异甘草素和甘草酸的体外释放影响较大。甘草素在GSD中的24 h累积释放量仅为25.85%,但在MSSGD中能达到80.52%,在SGD中能达到100%;异甘草素在GSD中的24 h累积释放量为0,而在MSSGD中为14.55%,在SGD中为20.98%;甘草酸在GSD中的24 h累积释放量为6.74%,而在MSSGD中为11.06%,在SGD中为16.83%。以上结果说明,当甘草与芍药配伍后,能显著增加甘草难溶性成分(如甘草素、异甘草素、甘草酸)在pH1.2 HCl溶液中的溶解度,加速药物的释放,且两药合煎的效果优于单煎液混合;但对于溶解性较好的成分(如芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷),甘草与芍药配伍后对其体外释放影响不大。

由图3可知,在pH6.8 PBS中,甘草中7种成分的24 h累积释放量均达到100%,芍药成分对其体外释放均没有影响。

2.3 SGD-SAN形成对甘草中主要成分在肠段吸收的影响

2.3.1 含量测定方法的建立 采用HPLC法进行含量测定,色谱条件及溶液制备方法参考文献[16]。参照2020年版《中国药典》(四部)分析方法验证指导原则及文献[16]进行方法学考察。专属性试验结果显示,供试品溶液与混合对照品溶液在相同保留时间处有相同色谱峰出现,各待测成分色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于1.5,且阴性对照溶液对测定无干扰,表明本方法的专属性较好(图略)。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归后,得到芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素的回归方程分别为 $Y=14\ 253X-6\ 612.9(R^2=0.999\ 6)$ 、 $Y=18\ 407X-11\ 852(R^2=0.999\ 8)$ 、 $Y=10\ 515X-1\ 041.4$

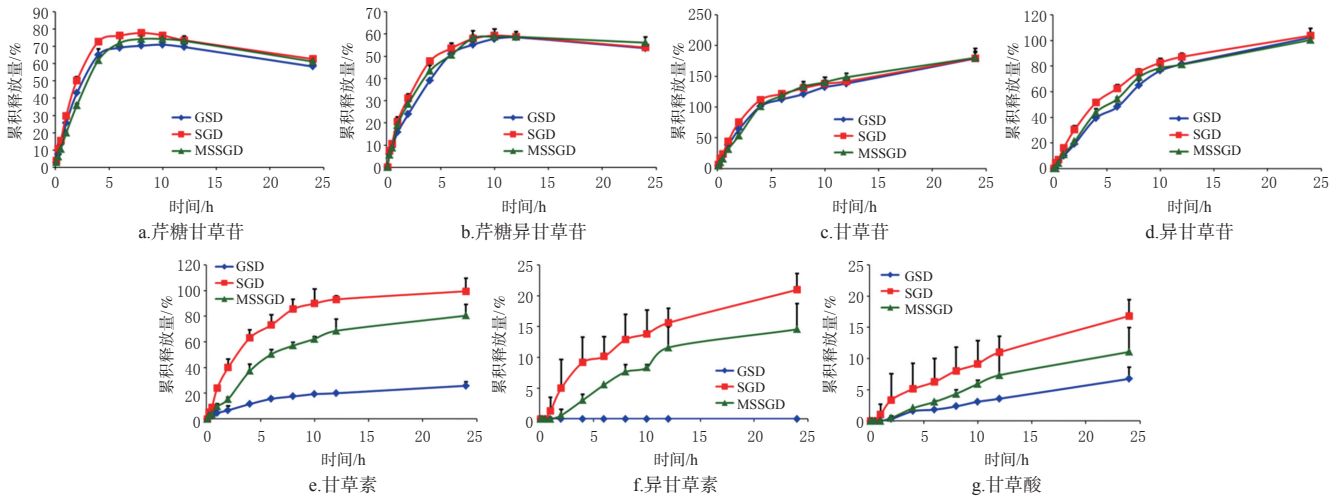


图2 甘草中7种主要成分在pH1.2 HCl溶液中的体外释放曲线

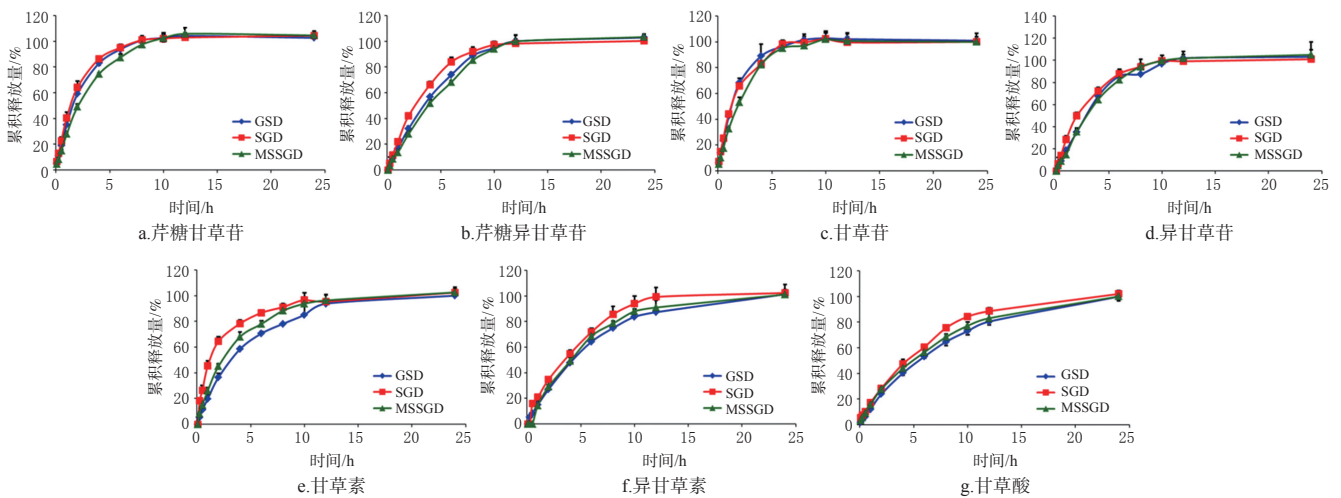


图3 甘草中7种主要成分在pH6.8 PBS中的体外释放曲线

($R^2=0.999\ 3$)、 $Y=13\ 617X-886.92$ ($R^2=0.999\ 5$)、 $Y=29\ 509X-1\ 182.1$ ($R^2=0.998\ 6$)、 $Y=5\ 596.3X-16\ 445$ ($R^2=0.999\ 8$)、 $Y=15\ 490X-2\ 190.6$ ($R^2=0.998\ 9$), 上述成分质量浓度分别在 3.928~78.560、3.984~79.680、0.608~12.160、0.472~9.440、0.280~5.600、28.560~571.200、0.499~9.980 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与其峰面积的线性关系良好。上述7种成分高、中、低浓度的日内精密度试验的RSD分别为0.67%~2.58%、0.38%~1.41%、0.98%~2.66%、0.73%~1.92%、1.07%~2.74%、0.36%~1.33%、1.45%~2.18% ($n=3$), 日间精密度试验的RSD分别为0.70%~2.37%、0.80%~2.02%、0.93%~1.98%、1.33%~2.09%、0.53%~1.86%、0.53%~2.06%、1.30%~2.67% ($n=3$); 重复性试验的RSD分别为0.85%、1.63%、1.59%、1.49%、1.81%、1.85%、1.69% ($n=6$); 稳定性试验(室温放置24 h)的RSD分别为0.37%、0.26%、0.24%、1.65%、1.30%、0.36%、0.91% ($n=6$); 高、中、低浓度上述成分的空白回收率分别为99.83%~107.23% (RSD为0.69%~2.23%, $n=3$), 99.85%~107.22% (RSD为0.78%~1.87%, $n=3$), 98.10~106.49% (RSD为

0.91%~1.84%, $n=3$), 97.54%~105.31% (RSD为1.32%~1.94%, $n=3$), 86.67%~104.63% (RSD为0.52%~1.75%, $n=3$), 106.27%~113.58% (RSD为0.47%~1.99%, $n=3$), 100.56%~114.76% (RSD为1.26%~2.30%, $n=3$)。

2.3.2 在体单向肠灌流实验 取SD大鼠36只, 采用随机数字表法分为3组, 分别是GSD组、MSSGD组和SGD组, 每组12只。实验前大鼠先禁食不禁水12 h, 以水合氯醛麻醉后, 沿腹中线剪开腹腔3~4 cm, 小心剥离肠管同肠系膜, 于幽门往下15~25 cm段(空肠)或盲肠往上10~20 cm的肠段(回肠)两端切口插管并结扎。将肠段结扎后放回腹腔, 自肠道近端至远端单向灌流, 用预热至37 $^{\circ}\text{C}$ 的生理盐水快速灌流肠段(2 mL/min), 最后用空气排空生理盐水。伤口处于红外灯下以生理盐水浸润的纱布保湿、保温, 然后使用预热至37 $^{\circ}\text{C}$ 的K-R溶液以0.2 mL/min灌流30 min平衡肠段; 将“2.1”项下的GSD、MSSGD、SGD分别用K-R溶液稀释2倍后, 以0.2 mL/min灌流30 min平衡肠段, 然后用已称定质量的装有灌流液(含上述水煎液)的EP管进行灌流, 同时于出

口处收集灌流液,每15 min更换1次收集小瓶,称定质量,连续收集4次^[16]。精密取1 mL灌流液至50 mL量瓶中,加甲醇溶液超声(功率100 W,频率40 kHz)20 min后,以甲醇溶液定容,然后用0.22 μm微孔滤膜滤过,收集滤液。取上清液,采用“2.3.1”项下HPLC法进样分析,测定灌流液中各成分的质量浓度。将大鼠处死,从入口处和出口处剪下肠段,测量各肠段的周长与长度,并按照文献^[16]方法计算吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app}),结果见表1。

表1 甘草与芍药配伍前后肠灌流样品中7种成分的吸收参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	组别	空肠		回肠	
		$K_a/(\times 10^{-4} s)$	$P_{app}/(\times 10^{-5} cm/s)$	$K_a/(\times 10^{-4} s)$	$P_{app}/(\times 10^{-5} cm/s)$
蔗糖甘草苷	GSD组	4.43 ± 0.94	4.36 ± 0.93	3.56 ± 0.95	3.93 ± 0.45
	SGD组	4.98 ± 0.97	5.39 ± 0.96	7.14 ± 1.02 ^{abc}	9.96 ± 1.61 ^{abc}
	MSSGD组	4.67 ± 0.78	5.34 ± 0.70	4.83 ± 0.57 ^a	5.61 ± 0.89 ^a
甘草苷	GSD组	4.71 ± 0.57	4.49 ± 0.45	3.51 ± 0.67 ^c	3.98 ± 0.63
	SGD组	5.12 ± 0.75	5.11 ± 0.90 ^a	7.04 ± 1.21 ^{abc}	9.65 ± 1.36 ^{abc}
	MSSGD组	4.89 ± 0.87	4.93 ± 0.59	4.95 ± 0.82 ^a	5.77 ± 0.85 ^a
蔗糖异甘草苷	GSD组	4.05 ± 0.86	4.26 ± 0.87	3.75 ± 0.66	4.13 ± 0.79
	SGD组	4.86 ± 0.67	5.11 ± 0.83 ^{ab}	7.54 ± 1.43 ^{abc}	10.50 ± 1.74 ^{abc}
	MSSGD组	4.28 ± 0.61	4.82 ± 0.63	5.21 ± 1.01 ^a	6.13 ± 0.75 ^{ac}
异甘草苷	GSD组	4.27 ± 0.72	4.35 ± 0.70	3.87 ± 0.81	3.97 ± 0.54
	SGD组	4.92 ± 0.67	5.07 ± 0.60 ^a	7.79 ± 1.46 ^{abc}	11.70 ± 1.77 ^{abc}
	MSSGD组	4.51 ± 0.54	4.82 ± 0.43	5.31 ± 0.67 ^{ac}	6.12 ± 0.82 ^{ac}
甘草素	GSD组	6.25 ± 0.90	6.08 ± 0.84	4.44 ± 0.59 ^c	4.92 ± 0.81 ^c
	SGD组	6.86 ± 1.22	6.98 ± 0.99 ^a	6.55 ± 1.14 ^{ab}	8.41 ± 1.17 ^{abc}
	MSSGD组	6.30 ± 0.98	6.56 ± 0.83	5.52 ± 0.60 ^a	6.15 ± 1.16 ^a
甘草酸	GSD组	4.29 ± 0.65	4.20 ± 0.72	3.04 ± 0.95 ^c	3.66 ± 0.56
	SGD组	5.01 ± 0.68	4.92 ± 0.78	6.93 ± 1.30 ^{abc}	8.70 ± 1.02 ^{abc}
	MSSGD组	4.68 ± 0.67	4.92 ± 0.66	5.64 ± 0.87 ^a	6.71 ± 1.06 ^{ac}
异甘草素	GSD组	6.24 ± 0.85	6.61 ± 0.68	4.37 ± 0.95 ^c	5.00 ± 0.76 ^c
	SGD组	6.38 ± 0.93	7.13 ± 0.62	6.53 ± 1.26 ^{ab}	8.58 ± 0.94 ^{abc}
	MSSGD组	6.31 ± 0.94	6.82 ± 1.09	5.33 ± 0.44 ^c	6.31 ± 0.93 ^a

a: 与GSD组比较, $P < 0.05$; b: 与MSSGD组比较, $P < 0.05$; c: 与同组空肠比较, $P < 0.05$

结果显示, GSD组7种成分在空肠的 K_a 和 P_{app} 均高于回肠, 其中甘草苷(K_a)、甘草素(K_a, P_{app})、异甘草素(K_a, P_{app})、甘草酸(K_a)差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明GSD中这几个成分在空肠的吸收优于回肠; 且无论是在空肠还是在回肠, 甘草素和异甘草素的 K_a, P_{app} 均高于其他成分。相比GSD组, MSSGD组甘草中蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸和异甘草素在回肠的吸收均增加, MSSGD组上述成分的 K_a 分别增加至GSD组的1.36、1.41、1.39、1.37、1.24、1.85、1.13倍, P_{app} 分别增加至GSD组的1.43、1.45、1.48、1.54、1.25、1.83、1.26倍, 但上述成分在空肠的吸收无明显变化。总体而言, 芍药成分能够促进甘草中有效成分的肠吸收。相比MSSGD组, SGD组甘草中上述成分在回肠的吸收进一步增加, SGD组上述成分的 K_a 分别增加至MSSGD组的1.48、1.42、1.45、1.47、1.19、1.23、1.32倍, P_{app} 分别增加至MSSGD组的1.78、1.67、1.71、1.80、1.37、1.30、1.36倍。

3 讨论

在pH1.2 HCl溶液中, 甘草与芍药配伍后对甘草中蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷、甘草苷和异甘草苷的体外释放无明显影响, 可能是因为这4种成分在该介质中溶解度较好, 200 mL pH1.2 HCl溶液能满足其漏槽条件; 但是甘草与芍药配伍后对甘草中甘草素、异甘草素和甘草酸的体外释放影响较大, GSD中这3种成分的24 h累积释放量分别为25.85%、0、6.74%, 说明这3种成分在pH1.2 HCl溶液中的溶解度很差, 而芍药成分的存在显著增加了其体外释放, 说明芍药成分对其有增溶作用, 且共煎的促进作用优于分别单煎后混合的效果。笔者推测, 这可能是因为芍药成分参与了甘草成分SAN的形成, 更加有利于甘草成分的溶出。在pH6.8 PBS中, 甘草与芍药配伍后对甘草中蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷、甘草苷、异甘草苷的体外释放仍然无明显影响。因甘草酸结构中含有羧基而显酸性, 甘草素、异甘草素结构中含有酚羟基而显弱酸性, 其溶解度都随pH的增大而增大, 所以甘草酸、甘草素、异甘草素在pH6.8 PBS中的24 h累积释放量均能达到100%, 芍药成分对其体外释放均没有明显影响。这说明甘草成分在满足漏槽条件的释放介质中, 芍药成分对其体外释放无明显影响。但体内胃液、肠液体积十分有限, 药物口服后并不一定能满足其漏槽条件, 故在体内, 芍药配伍甘草后仍可能促进甘草中有效成分的释放。

同时, 本研究发现蔗糖甘草苷在最大累积释放量达到75%左右时即开始下降, 蔗糖异甘草苷在累积释放量达到60%左右时即开始下降; 但甘草苷的累积释放量在4 h达到100%后继续增加, 在24 h时其累积释放量达到了180%左右。这可能是因为在酸性条件下, 各成分相互间发生了转化。比如据文献^[17]报道, 甘草在炒制过程中, 其中的蔗糖甘草苷与蔗糖异甘草苷之间、甘草苷与异甘草苷之间、甘草素与异甘草素之间均会发生异构化, 蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷又会发生苷键断裂转化成甘草苷、异甘草苷, 后者进一步苷键断裂又能转化成甘草素、异甘草素。在本研究中, 酸性条件下的各成分间可能也发生了上述变化, 但具体是哪几种成分发生了何种转化, 值得下一步深入研究。

GSD组中甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素4种成分在空肠的 K_a, P_{app} 均大于回肠, 这与文献报道的甘草成分的主要吸收部位在空肠一致^[18-20]。甘草素和异甘草素在空肠和回肠的吸收均大于其他成分, 这与其理化性质相关: 甘草素($lgP=2.95$)和异甘草素($lgP=2.50$)均属于脂溶性较好、渗透性高的成分^[21]。回肠部位的派伊尔结中存在大量的M细胞, 有利于纳米粒的摄取^[22-23]。虽然GSD中成分也形成了纳米粒(图1b), 但是GSD-SAN形成对于甘草中成分在回肠的吸收却没有形成优势, 这可能与纳米粒的形态、成分组成有关。与GSD组相比, MSSGD组中甘草成分在回肠的吸收增加, 各成分的 K_a

分别增加至 GSD 组的 1.13~1.41 倍、 P_{app} 分别增加至 GSD 组的 1.25~1.83 倍;而相比 MSSGD 组,SGD 组中甘草各成分在回肠的吸收进一步增加,各成分的 K_a 分别增加至 MSSGD 组的 1.19~1.48 倍、 P_{app} 分别增加至 MSSGD 组的 1.30~1.80 倍。这说明芍药成分参与了 SAN 的形成,比芍药成分与 SAN 物理混合更有利于甘草成分在肠段的吸收。有文献报道,纳米粒的形态对其肠道吸收亦有影响,球形纳米粒比棒状纳米粒更容易吸收^[24]。本研究在对各水煎液进行形态观察时发现,MSSGD 中存在棒状或梭形 SAN,而 SGD 中存在球形 SAN,这也可能是 SGD 中甘草成分比 MSSGD 中甘草成分在肠道中吸收更好的原因之一。

综上所述,相比 GSD、MSSGD,SGD 能显著改善甘草中难溶性成分的体外释放、促进甘草主要成分在回肠的吸收,说明 SGD-SAN 形成可能是芍药、甘草配伍增效的物理结构基础。

参考文献

[1] 陈平,曾瑾,杨安东,等.古代经典名方芍药甘草汤的处方及关键信息考证[J/OL].中药药理与临床,2021-05-24[2021-11-10].<https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20210524.001>.

[2] 曲缘章,马生军,朱广伟,等.芍药甘草汤的历史沿革与现代研究[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(6):216-225.

[3] 吴玲芳,李雨桐,唐迎紫,等.芍药甘草汤化学成分及药理作用研究进展[J].药物评价研究,2021,44(6):1354-1360.

[4] BI X L, GONG M R, DI L Q. Review on prescription compatibility of Shaoyao Gancan decoction and reflection on pharmacokinetic compatibility mechanism of traditional Chinese medicine prescription based on *in vivo* drug interaction of main efficacious components[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 208129.

[5] 郭珊珊,王谦,白立川,等.芍药-甘草配伍的研究进展[J].中草药,2014,45(10):1481-1485.

[6] 王蕾,曹雪晓,栗焕焕,等.中药化学成分的分子识别与自组装在中药研究中的应用[J].中草药,2020,51(2):516-521.

[7] LI T, WANG P L, GUO W B, et al. Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application[J]. ACS Nano, 2019, 13(6):6770-6781.

[8] 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.

[9] HU J, WU Z S, YAN J J, et al. A promising approach for understanding the mechanism of traditional Chinese medicine by the aggregation morphology[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123(2):267-274.

[10] ZHOU J W, LIU J, LIN D, et al. Boiling-induced nanoparticles and their constitutive proteins from *Isatis indigotica*

Fort. root decoction: purification and identification[J]. J Tradit Complement Med, 2016, 7(2):178-187.

[11] ZHOU J W, GAO G Z, CHU Q P, et al. Chromatographic isolation of nanoparticles from Ma-Xing-Shi-Gan-Tang decoction and their characterization[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(3):1116-1123.

[12] ZHUANG Y, YAN J J, ZHU W, et al. Can the aggregation be a new approach for understanding the mechanism of traditional Chinese medicine?[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117(2):378-384.

[13] 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.

[14] LÜ S, SU H, SUN S, et al. Isolation and characterization of nanometre aggregates from a Bai-Hu-Tang decoction and their antipyretic effect[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):12209.

[15] LIN D, DU Q, WANG H Q, et al. Antidiabetic micro-/nanoaggregates from Ge-Gen-Qin-Lian-Tang decoction increase absorption of baicalin and cellular antioxidant activity *in vitro*[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017:9217912.

[16] 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.

[17] 鲁亚奇,罗寒燕,王丽霞,等.甘草炒制过程中主要成分的含量变化及转化规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(10):100-106.

[18] 吕鹏,卞广兴,温利青,等.甘草素在体肠吸收及体外血脑屏障通透性研究[J].中国新药杂志,2008,17(8):661-666.

[19] 苏红,王新春,黄志巧,等.单向灌注法研究异甘草素在大鼠体肠吸收[J].中成药,2010,32(11):1908-1910.

[20] 马婷婷,贺蕊,龚慕辛,等.不同配伍比例芍药甘草汤成分的肠吸收研究[J].中国中药杂志,2015,40(21):4268-4274.

[21] WANG X X, LIU G Y, YANG Y F, et al. Intestinal absorption of triterpenoids and flavonoids from Glycyrrhizae radix et rhizoma in the human Caco-2 monolayer cell model[J]. Molecules, 2017, 22(10):1627.

[22] JIANG T, SINGH B, LI H S, et al. Targeted oral delivery of BmpB vaccine using porous PLGA microparticles coated with M cell homing peptide-coupled chitosan[J]. Biomaterials, 2014, 35(7):2365-2373.

[23] RAJAPAKSA T E, STOVER-HAMER M, FERNANDEZ X, et al. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery[J]. J Control Rel, 2010, 142(2):196-205.

[24] ERNSTING M J, MURAKAMI M, ROY A, et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles[J]. J Control Release, 2013, 172(3):782-794.

(收稿日期:2021-09-15 修回日期:2021-12-20)
(编辑:林 静)