

· 中药研究 ·

基于间接竞争性酶联免疫吸附法研究枳实炭碳点对芍药苷的药代动力学影响

李梦含, 王苏娜, 邹鹏, 黄燕, 何晨昕, 马华根, 赵琰, 孔慧*

北京中医药大学中医学院, 北京 100029

摘要 目的: 研究枳实炭碳点 (AFIC-CDs) 对芍药主要活性成分芍药苷 (PF) 的药代动力学影响。方法: 将雄性昆明小鼠随机分为 3 组, 高剂量 AFIC-CDs ($120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 PF 联用组 (H 组)、低剂量 AFIC-CDs ($60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 PF 联用组 (L 组)、单独 PF ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组 (S 组), 分别用高、低剂量 AFIC-CDs 与同一剂量 PF 制备的混合溶液及单独 PF 溶液灌胃, 采用抗 PF-单克隆抗体间接竞争性酶联免疫吸附法 (icELISA) 测定小鼠血液中的 PF 含量, 比较各组小鼠的 PF 药代动力学参数。结果: AFIC-CDs 与 PF 联合应用能增加 PF 的血药浓度和血药浓度时间曲线下面积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并且随 AFIC-CDs 的浓度增加而增加。相较于 PF 单独给药, 高、低剂量 AFIC-CDs 与 PF 联用组小鼠体内 PF 的 $C_{\max}$ 分别从 $(695.43 \pm 229.73) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加至 $(1\ 615.31 \pm 245.16) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(973.11 \pm 155.90) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; AUC_{0-1} 分别从 $(90\ 181.22 \pm 20\ 926.42) \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加至 $(257\ 510.74 \pm 26\ 729.64) \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(116\ 654.67 \pm 11\ 770.02) \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论: AFIC-CDs 可提高 PF 的生物利用度, 为临床联合用药从而提高疗效提供了科学依据。

关键词 枳实炭碳点; 芍药苷; 间接竞争性酶联免疫吸附法; 药代动力学; 生物利用度; 药物相互作用; 纳米药物

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1002-2392(2026)01-0033-07

DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.260006

药物间各种复杂成分的相互作用可以产生协同效应, 并减少一些潜在的副作用^[1]。为了阐明不同药物联合应用的药理机制, 药代动力学研究广泛开展, 并已获得了许多有价值的结果。枳实 (*Aurantii Fructus Immaturus*, AFI) 和芍药 (*Paeonia Lactiflora* Pall., PLP) 作为中医常用药对, 两者配伍具有行气解郁、活血化瘀、调和气血、调和肝脾的功效。《金匱要略》记载的枳实芍药散则首次将枳实高温炭化制成枳实炭 (*Aurantii fructus immaturus carbonisata*, AFIC) 后和芍药配伍应用, 现

代药理研究表明该方具有抗炎、抗抑郁、解痉止痛等作用, 并被广泛应用于妇产科、胃肠、神经精神系统疾病的治疗^[2]。然而 AFIC 和芍药之间的相互作用尚未有研究。

碳点是一种粒径 $< 10 \text{ nm}$ 的分散球形荧光碳纳米颗粒^[3-4], 具有丰富的生物活性, 广泛应用于生物医学领域中^[5-7]。本团队前期对多种中药炭药进行了研究, 发现炭药多样性药效的物质基础均与其所含的碳点有关, 例如, 丹参炭碳点在高胆红素血症小鼠模型中具有保肝作用^[8], 生地黄炭碳点可有效抑制和治疗大鼠溃疡性结肠炎^[9], 苦杏仁炭碳点具有抗肺炎作用^[10], 郁金炭碳点具有心脏保护作用^[11], 并发现枳实高温炮制成 AFIC 的过程中也产生了具有生物活性的碳点, 我们将其命名为枳实炭碳点 (AFIC-CDs)^[12], 该物质具有显著的抗抑郁活性^[13], 由此认为 AFIC-CDs 是 AFIC 发挥作用的重要物质基础。此外, AFIC-CDs 具有纳米结构, 该结构具有增强其在体内

收稿日期: 2024-09-07 修回日期: 2024-12-12

基金项目: 北京市自然科学基金-海淀原始创新联合基金资助项目 (L222132); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2024-JYB-JBZD-040)

作者简介: 李梦含 (1998-), 女, 硕士研究生, 主要从事经典方药现代应用的基础研究。

* 通信作者: 孔慧 (1976-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事经典方药现代应用的基础研究。

外的稳定性或改善药物的溶出或释放行为的潜力^[14],然而,碳点材料在体内的具体代谢过程尚不清楚,这是目前药代动力学研究中的不足之处。此外,PF 具有抗癌^[15]、抗抑郁^[16]、镇痛^[17]、保肝^[18]、抗炎^[19]和免疫调节^[20]等药理特性,是评价芍药质量的首选指标,并且芍药中的 PF 含量较高,易于检测^[21]。因此本研究以 AFIC-CDs 和 PF 为研究对象,探索 AFIC-CDs 对 PF 吸收的影响,从而为含有 AFIC-CDs 的枳实炭或炒枳实与芍药配伍应用提供依据。

间接竞争性酶联免疫吸附法(icELISA)是一种基于单克隆抗体的免疫测定方法^[22],其具有特异性强、灵敏度高、样品处理简单、样品需求量少、检测速度快、对环境无污染等特点,非常适用于小动物的药代动力学研究^[23]。因此,本研究在前期制备 PF 单克隆抗体技术的基础上^[24],建立了 PF 的 icELISA 快速检测方法,高、低剂量 AFIC-CDs 与同一剂量 PF 制备的混合溶液及单独 PF 溶液灌胃后,通过比较小鼠血液中的 PF 含量,探讨 AFIC-CDs 与 PF 的相互作用,从而进一步揭示 AFIC 与芍药联合应用的代谢机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠,体质量(30.0 ± 2.0)g,购自北京斯贝福生物科技有限公司,动物许可证号:SYXK(京)2016-0002。实验前先于无特殊病原菌、温度(23.0 ± 2.0)℃、相对湿度 50%~60%、12 h 明暗交替的环境中适应性饲养 3 d,并自由饮水、摄食。实验前 12 h 禁止进食,但允许饮水。本实验所有动物研究均经北京中医药大学动物实验伦理委员会批准(BUCM-2024070405-3021),符合《实验动物护理和使用指南》,实验程序按照中华人民共和国国务院批

准的《实验动物管理条例》执行。

1.2 药品与试剂

枳实购自北京仟草饮片有限公司,由北京中医药大学中医药学院赵琰教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果;PF(纯度 $\geq 98\%$)购自上海纯优生物科技有限公司;HRP-羊抗鼠 IgG(批号 C1308)购自北京普利莱基因技术有限公司;肝素钠(批号 4143846)购自北京华威锐科化工有限公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)购自 SigmaAldrich 公司;脱脂奶粉购自美国 BD 公司;其他分析级化学试剂均购自国药化学试剂北京公司;AFIC-CDs、包被原、PF 单克隆抗体均由本实验室制备。

1.3 仪器

PXR-9 马弗炉(北京中科奥博科技有限公司);96 孔酶标板(Corning);ELx800 酶标仪(美国伯腾公司);HC-2518R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);MCO-5AC 恒温培养箱(Thermo 公司);YP2001N-2000 电子天平(上海屹利科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 AFIC-CDs 的制备

将 AFIC 放于马弗炉中 350℃ 中闷煨 1 h,自然冷却后得到 AFIC。然后将 AFIC 粉碎,加水煎煮两次,每次 1 h,用滤纸进行粗滤,再用 0.22 μm 的微孔滤膜进行精滤,将滤液混合并浓缩,随后,用 1 kDa 分子量的透析膜透析 72 h。收集透析袋内的溶液并浓缩至最终浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以 AFIC 的质量计)。高速离心后,收集上清液作为 AFIC-CDs 溶液,4℃ 保存^[12],见图 1。



图 1 枳实炭碳点的制备工艺流程图

2.2 包被原、PF 单克隆抗体的制备

按照本团队前期确定的条件,将含 37.5 mg PF 的甲醇溶液逐滴加入 3 mL 25% 的 NaIO_4 溶液中,缓慢搅拌 1 h 后,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液调节 pH,然后逐滴加入含 60 mg 鸡卵清白蛋白 OVA 的 CBS 溶液(或含 35 mg 牛血清白蛋白 BSA 的 CBS 溶液),再调节 pH 至 9.0 以上,搅拌 1 h 之后,蒸馏水透析 3 d,分别得到 PF-OVA(包被原)和 PF-BSA。以 PF-BSA 作为免疫抗原,免疫 BALB/c 小鼠;待血清检测阳性后,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 按 10:1 的比例融合;用 icELISA 法和有限稀释法进行单克隆杂交瘤细胞的筛选;用阳性细胞株诱导制备腹水抗体;用辛酸硫酸铵法纯化后即得 PF 单克隆抗体,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用^[24-25]。

2.3 缓冲液和溶液配制

磷酸盐缓冲液(PBS)由 NaCl ($137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 KCl ($2.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 KH_2PO_4 ($1.47 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组成, pH 7.4;碳酸盐缓冲液(Carbonate Buffer Solution, CBS)由 Na_2CO_3 ($15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 NaHCO_3 ($35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组成, pH 7.6;洗涤缓冲液(Phosphate Buffered Saline with Tween-20, PBST)由 PBS 配置成 0.05% Tween20 (PBS-T), pH 7.4;封闭液由去离子水配置成 5% 脱脂牛奶;TMB 底物溶液由 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液、0.75% H_2O_2 、 $2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TMB 和 $2.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 组成;反应终止液为 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 。

2.4 建立 PF 的 icELISA 检测法

2.4.1 PF 竞争抑制曲线的建立

包被:96 孔酶标板中加入经 CBS 1:1 000 稀释的包被原,每孔 100 μL ,恒温培养箱 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,取出后用 PBST 洗板 3 次,每次 1~2 min。封闭:用配制好的 5% 脱脂奶粉 200 μL /孔进行封闭 1 h。一抗孵育:空白小鼠摘除眼球取血后,用 PBS 将血液稀释 10 倍,静置后取上清得到血浆;将血浆与 PF 标准品混合,配制成不同浓度梯度的 PF 溶液,将 PF 溶液以 50 μL /孔加入 96 孔酶标板,阳性对照孔添加等量不含 PF 的小鼠血浆;将 PF 单克隆抗体 1:10 000 稀释后,每孔 50 μL 加入 96 孔酶标板,于培养箱 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,用 PBST 洗板 3 次。二抗孵育:用 PBS 1:10 000 稀释酶标二抗后,以 100 μL /孔加入,培养箱 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗板 3 遍后,拍干。显色:每孔加入 100 μL TMB 显色液,于培养箱 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min。终止:每孔加入 50 μL 反应终止液。检测:通过酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度。竞争抑制率的计算公式:竞争

抑制率 = $[(A_0 - A)/A_0] \times 100\%$ (A 为检测孔 OD 值, A_0 为阳性对照孔 OD 值)。

2.4.2 精密度检测

用 PF 标准品与空白小鼠血浆配制质量浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PF 溶液,参照“2.4.1”建立的 icELISA 法测定其 OD 值,每个浓度设立 6 个平行复孔,每个试验重复 6 次(连续测定 6 块板),分别计算出板内和板间的变异系数,这些均用 RSD(%) 表示,以考察该方法的精密度,保证检测结果的准确性。

2.4.3 加样回收率检测

用 PF 标准品与空白小鼠血浆配制质量浓度分别为 50、100、200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PF 溶液,参照“2.4.1”建立的 icELISA 法测定其 OD 值,每个浓度测定 3 次,代入标准曲线线性方程计算 PF 实际检测值。回收率计算公式:回收率 = (PF 实际检测值/PF 加入样本值) $\times 100\%$ 。

2.5 动物实验药物配制

将 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AFIC-CDs 溶液和 PF 标准品,用去离子水分别配制成原炭药浓度 $240 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AFIC-CDs 溶液(A 液),以及 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PF 溶液(B 液)。

高剂量 AFIC-CDs 与 PF 混合溶液:取 A 液 50 mL、B 液 50 mL,混合均匀,配制成含 AFIC-CDs 浓度 $120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、PF 浓度 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

低剂量 AFIC-CDs 与 PF 混合溶液:取 A 液 25 mL、B 液 50 mL,去离子水 25 mL,混合均匀,配制成含 AFIC-CDs 浓度 $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、PF 浓度 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

单独 PF 溶液:取 B 液 50 mL,用等体积去离子水稀释成浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PF 溶液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.6 动物分组及给药

为了研究 AFIC-CDs 对雄性昆明小鼠体内 PF 药代动力学的影响,将 18 只雄性昆明小鼠随机分为 3 组,每组 6 只,分别为高剂量 AFIC-CDs 与 PF 混合给药组(H 组)、低剂量 AFIC-CDs 与 PF 混合给药组(L 组)、单独 PF 给药组(S 组)。分别给予“2.5”配制的药液,给药方式均为灌胃给药,灌胃体积为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.7 检测样本采集

采用肝素钠抗凝毛细玻璃管于给药后 10、20、40、60、90、120、180、240、300、360 min,采集每只小鼠尾部血样(10 μL)。样品用 PBS 稀释 10 倍, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存至进一步分析。

2.8 icELISA 法检测 PF 含量

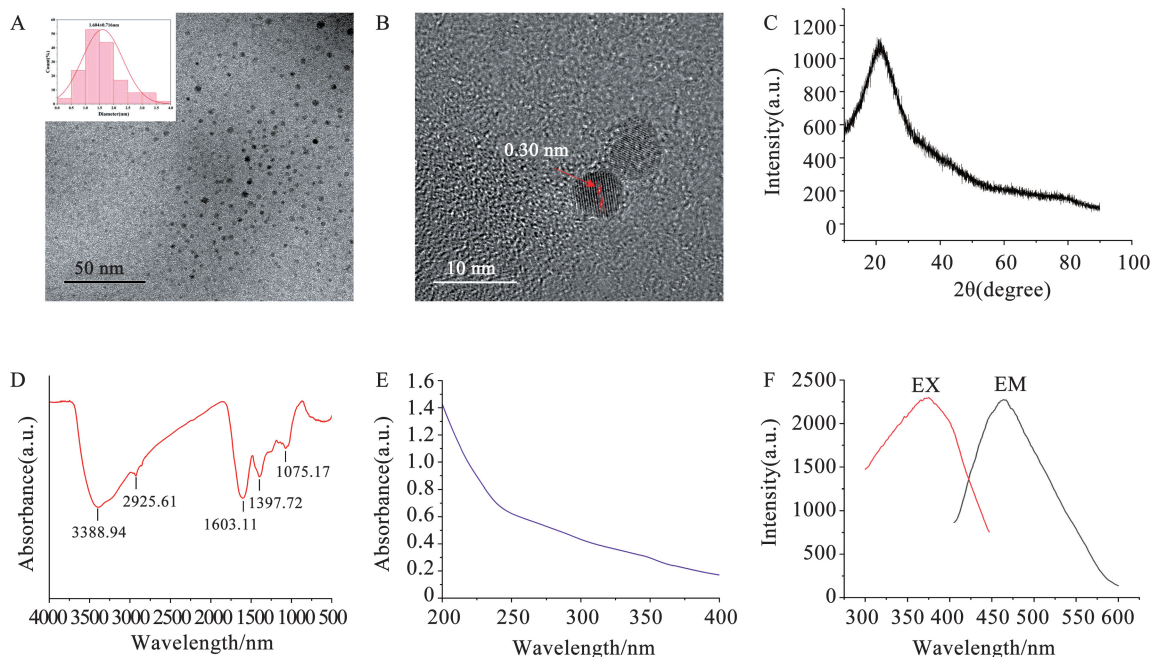
采用本实验“2.4.1”建立的 icELISA 法,检测不同时间点血浆及各组织样本在 450 nm 波长处的吸光度,并代入 PF 标准曲线回归方程,计算 PF 的含量。

2.9 统计分析

采用 Phoenix WinNonlin 8.1 软件非房室模型计算每组动物的药代动力学相关参数,如平均最大血药浓度($C_{\max}$)、最大浓度时间($T_{\max}$)、药时曲线下面积(AUC_{0-1})和平均停留时间(MRT)。采用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件分析各组数据差异,两组之间的统计学差异采用单因素方差分析(ANOVA)计算,然后采用 LSD 事后检验,所有数值均以($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 AFIC-CDs 的表征



注:A. TEM 图;B. HR-TEM 图;C. XRD 图;D. 红外光谱图;E. 紫外光谱图;F. 荧光光谱图。

图 2 AFIC-CDs 表征结果

3.2 PF 竞争抑制曲线的建立

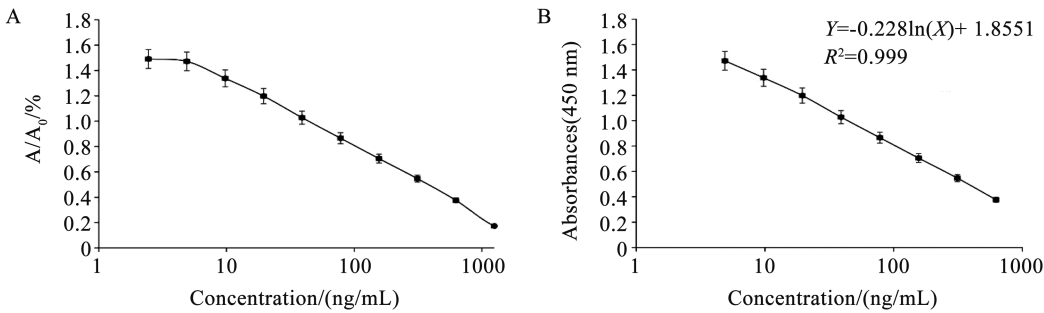
icELISA 检测 PF 的竞争抑制曲线如图 3 所示,PF 标准品质量浓度在 $2.44 \sim 10\,000\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,以 PF 对照品浓度(X)为横坐标,其对应的 A/A_0 (A 为检测孔 OD 值, A_0 为阳性对照孔 OD 值) (Y) 为纵坐标,绘制出 PF 单克隆抗体竞争抑制曲线及标准曲线(图 3),计算得出 PF icELISA 线性范围为 $4.88 \sim 625\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,求得回归方程: $Y = -0.228 \ln X + 1.8551$, $R^2 = 0.999$ 。

透射电镜(TEM)分析显示,AFIC-CDs 为类球形颗粒,尺寸集中在 1.604 nm 左右(图 2A)。高分辨率 TEM(HRTEM) 图像显示 AFIC-CDs 的晶格间距为 0.30 nm(图 2B)。X 射线衍射(XRD) 图谱表明,AFIC-CDs 在衍射角度 $2\theta = 26.351^\circ$ 有一个强衍射峰,为石墨化碳(002) 特征峰,该结果与 HRTEM 结果一致(图 2C)。傅里叶变换红外(FTIR) 光谱显示,在 3388.94 nm、2925.61 nm、1603.11 nm、1397.72 nm 和 1075.17 nm 处存在多处吸收峰,推测 AFIC-CDs 表面存在氨基、羟基和羧基等多功能基团(图 2D)。紫外-可见(UV-vis) 吸收光谱表明,AFIC-CDs 的水溶液具有较宽的吸收光谱,无明显吸收峰(图 2E)。AFIC-CDs 荧光光谱的最大发射波长和激发波长分别为 464 nm 和 375 nm(图 2F)。

以竞争抑制率达到 50% 时所对应的 PF 质量浓度为 icELISA 灵敏度 IC_{50} ,结果表明该单克隆抗体抗 PF 灵敏度为 $96\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 精密度检测

精密度检测结果见表 1,板内 RSD 值为 1.9% ~ 3.2%,板间 RSD 值为 2.7% ~ 4.6%,数据均 $\leq 5\%$,这些结果表明,该检测方法具有较高的精密度。



注:A. PF 单克隆抗体竞争抑制曲线;B. PF 单克隆抗体标准曲线。

图3 PF 单克隆抗体竞争抑制曲线及标准曲线

表 1 PF 标准溶液的精密密度检测结果 (n = 6)

PF 浓度/(ng · mL ⁻¹)	板内差 RSD/%	板间差 RSD/%
2.5	1.9	2.7
5	2.4	3.2
10	2.6	3.4
20	2.7	3.5
40	2.9	4.1
80	3.2	4.6

3.4 加样回收率检测

加样回收率检测结果见表 2,3 个浓度样本的加样回收率分别为 106.62%、101.22%、99.90%,能够满足检测要求。

3.5 AFIC-CDs 对 PF 在 小鼠体内药代动力学的影响

如图 4、表 3 所示,AFIC-CDs 对小鼠体内的 PF 血药浓度有明显影响,L 组、S 组都在给药后约 70 min 达到 PF 吸收高峰,H 组则稍有延长,约在 80 min 后达到 PF 吸收高峰。与 S 组比较,L 组 C_{max}、AUC_{0-t} 升高 (P<0.05),H 组 C_{max}、AUC_{0-t} 显著升高 (P<0.01)。这些结果表明,AFIC-CDs 可以提高 PF 的生物利用度,并且在高剂量的 AFIC-CDs 中观察到更明显的效果。

表 2 PF 标准溶液的加样回收率检测结果 (n = 3)

加入样本值/(ng · mL ⁻¹)	实际检测值/(ng · mL ⁻¹)	加样回收率/%
50	53.31 ± 0.79	106.62
100	101.22 ± 1.11	101.22
200	199.79 ± 2.14	99.90

表 3 各 PF 联合 AFIC-CDs 组的 PF 药代动力学参数

组别	C _{max} /(ng · mL ⁻¹)	T _{max} /min	AUC _{0-t} /(ng · min · mL ⁻¹)	MRT/min
H 组	1 615.31 ± 245.16 **	80 ± 15.49	257 510.74 ± 26 729.64 **	144.90 ± 7.84
L 组	973.11 ± 155.90 *	70 ± 15.49	116 654.67 ± 11 770.02 *	130.69 ± 9.11 *
S 组	695.43 ± 229.73	70 ± 15.49	90 181.22 ± 20 926.42	142.82 ± 9.46

注:与 S 组比较,* P<0.05,** P<0.01。

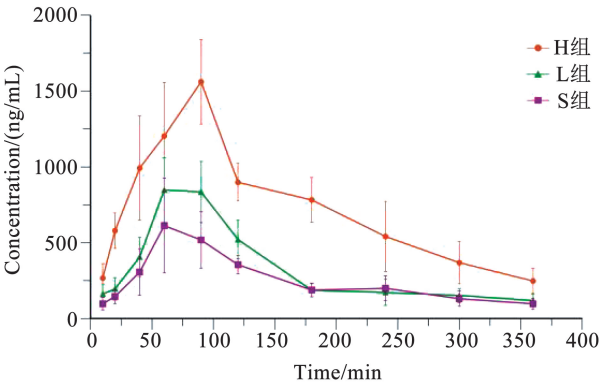


图 4 各 PF 联合 AFIC-CDs 组的 PF 药时曲线

4 讨论

为了全面、准确地描述中药复杂成分在体内的药代动力学过程,诠释中药多成分、多靶标、多途径的特

点,首先必须采用适宜的分析技术^[26]。随着各种混合串联高分辨质谱(Q-TOF,LTQ FT,Q-Exactive)的发展,液相色谱-高分辨质谱(LC-HRMS)已成为中药多组分药代动力学分析的主流方法^[27],但这些方法需要的样本量相对较大,每个时间点至少需要 200 μL 血液样本^[28],在短时间内从小鼠身上获得足够的血液样本以进行精确的时间浓度分析是一个挑战。因此,本研究采用课题组前期建立的具有更高检测灵敏度、适用于小型动物药代动力学研究的间接竞争性酶联免疫吸附法(icELISA)^[29-30]。实验中每个时间点仅需 10 μL 的血液样本,就可以长期监测同一小鼠体内的 PF 代谢情况。相关方法学考察结果表明,该方法的板内精密密度差异为 1.9%~3.2%,板间精密密度差异为 2.7%~4.6%,平均回收率为 102.58%,线性范围为 4.88~625 ng · mL⁻¹,均符合分析方法的要求,说明采

用 icELISA 检测实际样品中 PF 含量的可行性。

选择合适的检测指标组分也是进行体内药代动力学研究的关键^[31]。PF 是芍药的主要有效成分已为学界共识,团队前期研究发现 AFIC - CDs 是 AFIC 的主要有效物质,故本研究选用 AFIC - CDs 代表 AFIC,PF 代表芍药,探索用 AFIC - CDs 对 PF 药代动力学的影响,以期阐明枳实炭与芍药配伍的科学内涵。同时,不同药物间的配伍剂量可导致复方功效强弱、性质等方面发生变化^[32],因此实验中设置高、低两个不同剂量的 AFIC - CDs,以进一步探索 AFIC - CDs 剂量对 PF 产生的影响。

各组小鼠的 PF 药代动力学参数结果显示,AFIC - CDs 剂量的变化会显著影响 PF 的药代动力学特性。与单独使用 PF 相比,联合使用 AFIC - CDs 和 PF 能显著提高 $C_{\max}$ 和 AUC_{0-360} 值,且高剂量 AFIC - CDs 的作用更为显著,但对 $T_{\max}$ 和 MRT 参数无显著影响。这表明 AFIC - CDs 可以显著提高 PF 的生物利用度,而不会影响 PF 的吸收和代谢效率。大量研究表明口服 PF 的直接吸收率低,生物利用度低,主要与肠首过效应有关^[33-34]。大部分 PF 在肠道细菌的作用下转化为代谢物,芍药代谢素 I、芍药代谢素 II 和芍药代谢素 III^[35-36]。由此可以推测,联合使用 AFIC - CDs 和 PF 组 $C_{\max}$ 值的增加可能由于 PF 被 AFIC - CDs 包载并维持稳定状态,从而提升了 PF 的溶解度及其在体内的稳态浓度;而联合使用 AFIC - CDs 和 PF 组 AUC_{0-360} 值的增加可能归因于避免了首过代谢,AFIC - CDs 的包载可能阻碍了 PF 受化学和酶的降解,间接延缓了其在体内的代谢,使其以未代谢形式存在,从而改善了 PF 的药代动力学特性。此外,多种天然材料已被用于合成碳点,用于药物递送以治疗各种疾病。例如,SARKAR^[37]等开发了一种靶向 CD44 的透明质酸功能化氧化石墨烯量子点(GOQD - HA)纳米复合材料,增加了二甲双胍的靶向性和生物利用度,用于治疗肥胖诱导的脂肪组织和肝脏元炎症。ELZO-HEIRY 等^[38]设计了一个银纳米颗粒(AgNPs)并包被姜黄素 - 壳聚糖的混合物,以克服姜黄素不溶性的问题,并使其在治疗小鼠肝纤维化模型中具有更高的生物利用度。这些研究表明,如果临床上需要增加某一特定成分的吸收,不仅可以通过增加该成分的临床剂量来实现,还可以通过调整处方中其他相关化合物的剂量来促进吸收。

综上,本研究利用 icELISA 检测法从 PF 体内药代动力学角度,探讨 AFIC - CDs 与 PF 之间的相互作用。发现相较于 PF 单独应用,AFIC 的活性成分 AFIC - CDs 可提高 PF 的生物利用度,且 PF 随着 AFIC - CDs

的含量增加而增加,这一结果印证了枳实炭和芍药之间相辅相成、协同增效的关系。但本研究仅聚焦于 AFIC - CDs 与芍药的协同作用,后续将对 AFIC - CDs 与其他中药成分在不同疾病模型中的联合效应进行考察,并进一步研究 AFIC - CDs 对其他中药成分在小鼠体内组织分布的影响,为临床枳实炭(或炒枳实)和芍药的联合应用提供科学依据,也为开发绿色生物碳点以提高生物利用度的生物制药应用奠定了研究基础。

参考文献:

- [1] JIA W W, LU C, LIN G, et al. Editorial: pharmacokinetics of herbal medicines and herb - drug interactions[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1107777.
- [2] 王博龙, 刘志强. 枳实芍药散“成分 - 靶点 - 通路”的网络药理学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 586 - 594.
- [3] CUI L, REN X, SUN M T, et al. Carbon dots: synthesis, properties and applications[J]. Nanomaterials, 2021, 11(12): 3419.
- [4] JING H H, BARDAKCI F, AKGÖL S, et al. Green carbon dots: synthesis, characterization, properties and biomedical applications[J]. J Funct Biomater, 2023, 14(1): 27.
- [5] BELZA J, OPLETALOVÁ A, POLÁKOVÁ K. Carbon dots for virus detection and therapy[J]. Mikrochim Acta, 2021, 188(12): 430.
- [6] BAYDA S, AMADIO E, CAILOTTO S, et al. Carbon dots for cancer nanomedicine: a bright future[J]. Nanoscale Adv, 2021, 3(18): 5183 - 5221.
- [7] LI D, XU K Y, ZHAO W P, et al. Chinese medicinal herb - derived carbon dots for common diseases: efficacies and potential mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 815479.
- [8] 郭颖慧, 陈瑞, 曹天佑, 等. 丹参炭纳米类成分的发现及其对高胆红素血症致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中医药导报, 2023, 29(1): 6 - 11, 18.
- [9] 陈瑞, 赵金莉, 孔若岚, 等. 生地黄炭纳米类成分的发现及其对溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中草药, 2023, 54(16): 5172 - 5181.
- [10] ZHAO Y S, ZHANG Y, KONG H, et al. Protective effects of carbon dots derived from *Armeniacae Semen* amarum carbonisata against acute lung injury induced by lipopolysaccharides in rats[J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 1 - 14.
- [11] DONG L Y, ZHAO Y F, LUO J, et al. Carbon dots derived from *Curcumae radix* and their heartprotective effect[J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19: 3315 - 3332.
- [12] WANG S N, ZHANG Y, KONG H, et al. Antihyperuricemic and anti - gouty arthritis activities of *Aurantii fructus immaturus* carbonisata - derived carbon dots[J]. Nanomedicine, 2019, 14(22): 2925 - 2939.
- [13] LI X P, DAI E T, LI M H, et al. *Aurantii fructus immaturus* carbonisata - derived carbon dots and their anti - depression effect[J]. Front Mol Biosci, 2023, 10: 1334083.
- [14] 付淑军, 黄芳华, 顾景凯, 等. 纳米药物非临床药代动力学的研究策略及关注要点[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(8): 842 - 850.
- [15] GAO M, ZHANG D J, JIANG C H, et al. Paeoniflorin inhibits hepatocellular carcinoma growth by reducing PD - L1 expression[J]. Biomedicine Pharmacother, 2023, 166: 115317.
- [16] CHEN J H, ZHU W W, ZENG X X, et al. Paeoniflorin exhibits antidepressant activity in rats with postpartum depression via the TSPO and BDNF - mTOR pathways[J]. Acta Neurobiol Exp, 2022, 82(3): 347 - 357.
- [17] ANDOH T, GOTO M. Repeated topical paeoniflorin attenuates postoperative pain and accelerates cutaneous fibroblast proliferation in mice[J]. J Pharmacol Sci, 2023, 151(2): 84 - 87.

- [18] LIU T, ZHANG N, KONG L Y, et al. Paeoniflorin alleviates liver injury in hypercholesterolemic rats through the ROCK/AMPK pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 968717.
- [19] CAO Y W, XIONG J L, GUAN X P, et al. Paeoniflorin suppresses kidney inflammation by regulating macrophage polarization via KLF4-mediated mitophagy[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154901.
- [20] ZHANG Z H, ZHANG Y, ZHAO Z F, et al. Paeoniflorin drives the immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells by regulating Th1/Th2 cytokines in oral lichen planus[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 18678.
- [21] LI P, SHEN J, WANG Z Q, et al. Genus *Paeonia*: a comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities, clinical application, and toxicology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269: 113708.
- [22] KOHL T O, ASCOLI C A. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017, 2017(7): pdb. prot093740.
- [23] MONTAGNA M, VISAI L, COMITE A D, et al. Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for palivizumab serum determination [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26(2): 503–510.
- [24] 屈会化, 赵妍, 苏歆, 等. 芍药苷人工抗原的合成与鉴定[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(11): 2043–2046.
- [25] YAN X, ZHAO Y, ZHANG Y, et al. Monoclonal antibodies and immunoassay for medical plant-derived natural products: a review [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 355.
- [26] SHI P Y, LIN X H, YAO H. A comprehensive review of recent studies on pharmacokinetics of traditional Chinese medicines (2014–2017) and perspectives [J]. *Drug Metab Rev*, 2018, 50(2): 161–192.
- [27] BAI X, ZHU C Y, CHEN J Y, et al. Recent progress on mass spectrum based approaches for absorption, distribution, metabolism, and excretion characterization of traditional Chinese medicine [J]. *Curr Drug Metab*, 2022, 23(2): 99–112.
- [28] YING X X, WANG F, CHENG Z Z, et al. Pharmacokinetics of vitexin-4''-O-glucoside in rats after intravenous application [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37(2): 109–115.
- [29] CHENG J J, ZHANG Y, LIU S C, et al. A sensitive and specific indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of icariin [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 411–416.
- [30] SUN Y, QU H H, SAI J Y, et al. Determination of baicalin and ginsenoside Re in Banxia-Xixin Decoction using pharmacokinetics and icELISA analysis in mice. Effects of interaction between prescription herbs on the pharmacokinetics of compounds [J]. *Anal Methods*, 2015, 7(7): 3048–3053.
- [31] TANG S Q, CHEN Y H, CHEN X P, et al. *In vivo* effect of guiding-herb *radix platycodonis* and *radix cyathulae* on paeoniflorin pharmacokinetics of Xuefu Zhuyu Tang in rats [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017, 14(4): 289–296.
- [32] QIAN P, ZHANG Y B, YANG Y F, et al. Pharmacokinetics studies of 12 alkaloids in rat plasma after oral administration of Zuojin and fan-Zuojin formulas [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 214.
- [33] TAKEDA S, ISONO T, WAKUI Y, et al. Absorption and excretion of paeoniflorin in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47(12A): 1036–1040.
- [34] TAKEDA S, ISONO T, WAKUI Y, et al. *In vivo* assessment of extrahepatic metabolism of paeoniflorin in rats: relevance to intestinal flora metabolism [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1997, 49(1): 35–39.
- [35] HATTORI M, SHU Y Z, SHIMIZU M, et al. Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(9): 3838–3846.
- [36] HEIKAL O A, AKAO T, TAKEDA S, et al. Pharmacokinetic study of paeonimetabolin I, a major metabolite of paeoniflorin from peony roots [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(5): 517–521.
- [37] SARKAR K, BANK S, CHATTERJEE A, et al. Hyaluronic acid-graphene oxide quantum dots nanoconjugate as dual purpose drug delivery and therapeutic agent in meta-inflammation [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 246.
- [38] ELZOHEIRY A, AYAD E, OMAR N, et al. Anti-liver fibrosis activity of curcumin/chitosan-coated green silver nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 18403.

Pharmacokinetics of Paeoniflorin Influenced by Aurantii Fructus Carbon Quantum Dots Based on Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

LI Menghan, WANG Suna, ZOU Peng, HUANG Yan, HE Chenxin, MA Huagen, ZHAO Yan, KONG Hui

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

Abstract Objective: To investigate the pharmacokinetic effects of Aurantii Fructus Carbon Quantum Dots (AFIC-CDs) on paeoniflorin (PF), the main active component of *Paeonia*. Methods: Male Kunming mice were randomly divided into three groups: high-dose AFIC-CDs (120 mg · mL⁻¹) and PF co-administration group (H), low-dose AFIC-CDs (60 mg · mL⁻¹) and PF co-administration group (L), and PF alone (2.0 mg · mL⁻¹) group (S). Mice were orally administered mixed solutions of high or low-dose AFIC-CDs with the same dose of PF, or PF alone. Paeoniflorin levels in the mouse blood were determined by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) using anti-PF monoclonal antibodies, and pharmacokinetic parameters of PF were compared among the groups. Results: Co-administration of AFIC-CDs with PF significantly increased PF blood concentration and the area under the blood concentration-time curve (AUC-t) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with increases observed as the AFIC-CDs concentration increased. Compared to PF administration alone, the C_{max} of PF in the high-dose and low-dose AFIC-CDs + PF groups increased from (695.43 ± 229.73) ng · mL⁻¹ to (1 615.31 ± 245.16) ng · mL⁻¹ and (973.11 ± 155.90) ng · mL⁻¹, respectively. The AUC-t increased from (90 181.22 ± 20 926.42) ng · min · mL⁻¹ to (257 510.74 ± 26 729.64) ng · min · mL⁻¹ and (116 654.67 ± 11 770.02) ng · min · mL⁻¹, respectively. Conclusion: AFIC-CDs can enhance the bioavailability of PF, providing scientific evidence for clinical co-medication to improve therapeutic efficacy.

Key words Aurantii fructus carbon quantum dots; Paeoniflorin; Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay; Pharmacokinetics; Bioavailability; Drug interaction; Nanomedicine