黄芩汤指纹图谱建立及不同相态抗皮肤癣菌活性谱效关系研究Δ

沈成英[1*]，吴文明[1]，侯雄军[1]，邓冯沂[2]，何　洁[1]，胡建新[1#]（1.江西省人民医院（南昌医学院第一附属医院）药学部，南昌　330006；2.江西省人民医院（南昌医学院第一附属医院）临床医学研究所，南昌　330006）

中图分类号　R932；R284　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）06-0687-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.06.09

摘　要　目的　建立黄芩汤（HQD）的指纹图谱，拆分相态并筛选抗皮肤癣菌活性相态，进行谱效关系研究。**方法**　采用高效液相色谱法，以黄芩苷为参照峰，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》绘制10批HQD的指纹图谱并进行相似度评价，确定共有峰；采用高速离心与透析相结合的方法对HQD进行相态拆分并对其进行表征，同时测定HQD及其不同相态抗皮肤癣菌的最小抑菌浓度（MIC）；以37个共有峰的峰面积为自变量，MIC为因变量，采用SPSS 21.0软件进行Pearson相关性分析。**结果**　10批HQD共有37个共有峰，相似度均大于0.99；共指认出10个成分，分别为芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、黄芩苷、千层纸素A苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸、汉黄芩素、千层纸素A。HQD共拆分成沉淀相态（HQD-P）、真溶液相态（HQD-S）和纳米相态（HQD-N）3个相态；HQD-P冻干粉呈不规则颗粒状，平均粒径为4.670～91.522 μm；HQD-S冻干粉呈均匀片状，未检测到粒径；HQD-N冻干粉呈球形，粒径为（129.0±12.9）nm。在同等给药剂量下，各相态抗皮肤癣菌MIC由低到高依次为HQD-N（4.64 mg/mL）＜HQD（5.85 mg/mL）＜HQD-P（7.37 mg/mL）＜HQD-S（12.89 mg/mL）。Pearson相关分析结果显示，37个共有峰中，有25个共有峰（含已指认的10个成分）峰面积与MIC呈显著负相关（相关系数绝对值＞0.95且P＜0.05）。**结论**　10批HQD的化学成分组成一致性较好；HQD-N为该方的活性相态，其中芍药苷、芹糖甘草苷、黄芩苷等10个成分可能是HQD抗皮肤癣菌的有效成分，且其抗皮肤癣菌作用强弱与这些成分含量及物理相态相关。

关键词　黄芩汤；指纹图谱；相态；抗皮肤癣菌作用；谱效关系

Fingerprint establishment of Huangqin decoction and study on spectrum-effect relationship of its antidermatophytic activity in different phase states

SHEN Chengying[1], WU Wenming[1], HOU Xiongjun[1], DENG Fengyi[2], HE Jie[1], HU Jianxin[1*] [1. Dept. of Pharmacy, Jiangxi Provincial People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Nanchang 330006, China; 2. Institute of Clinical Medicine, Jiangxi Provincial People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Nanchang 330006, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish the fingerprint of Huangqin decoction (HQD), to separate the phase states and screen the active phase states of antidermatophytic activity so as to study the spectrum-effect relationship. **METHODS** HPLC method was adopted using baicalin as reference, the fingerprints of 10 batches of HQD were drawn and the similarity evaluation was carried out using the *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of TCM* (2012 edition) to determine the common peak; the phase states of HQD were separated and characterized by high-speed centrifugation and membrane dialysis. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of HQD and its different phase states against *Trichophyton mentagrophytes* were determined simultaneously. Using the peak area of 37 common peaks as independent variable, MIC as dependent variable, Pearson correlation analysis was performed by using SPSS 21.0 software. **RESULTS** A total of 37 common peaks were obtained in HPLC fingerprints of 10 batches of HQD, with the similarity higher than 0.99. Ten components were identified, such as albiflorin, paeoniflorin, liquiritin apioside, baicalin, melaleuca glycoside A, wogonoside, baicalein, glycyrrhizic acid, wogonin and oroxylin A. HQD was split into 3 phase states, such as precipitation phase (HQD-P), solution phase (HQD-S) and nano phase (HQD-N). The morphology of HQD-P was irregular granular, and the average particle size was 4.670-91.522 μm. The morphology of HQD-S was uniform flakes, and no particle size was detected. HQD-N was spherical in shape and the particle size was (129.0±12.9) nm. MIC values of each phase state of HQD against *T. mentagrophytes* in different phase states were HQD-N (4.64 mg/mL) ＜HQD (5.85 mg/mL) ＜HQD-P (7.37 mg/mL) ＜HQD-S (12.89 mg/mL) at the same dosage. Pearson correlation analysis showed that the peak area of 25 of the 37 common peaks (including 10 identified components) was significantly negatively correlated

Δ **基金项目**　江西省卫生健康委科技计划项目（No.202310011）；江西省中医药中青年骨干人才（第四批）培养计划（No.赣中医药科教字〔2022〕7号）；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

＊ **第一作者**　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

with MIC (absolute values of correlation coefficient>0.95 and $P<0.05$). **CONCLUSIONS** The chemical composition of 10 batches of HQD is consistent; HQD-N is the active phase state of HQD. Ten components such as paeoniflorin, liquiritin apioside and baicalin may be the main active components of HQD. The antidermatophytic effect of HQD is closely related to its component content and physical phase state.

KEYWORDS Huangqin decoction; fingerprint; phase state; antidermatophytic activity; spectrum-effect relationship

真菌等微生物导致的感染严重危害人类健康。随着真菌感染性疾病的日益高发和超级耐药真菌的广泛流行，临床经典抗真菌药物的使用受到一定限制，因此寻找高效、低毒、低耐药的抗真菌药物具有重要意义。中药为天然抗真菌药物的研发提供了丰富的资源[1-3]。经典名方黄芩汤（Huangqin decoction，HQD）始载于汉代张仲景的《伤寒论》，由黄芩（君药）、芍药（臣药）、炙甘草（佐药）和大枣（使药）4味药材组成，具有抗菌、抗炎、解热、镇痛、解痉等作用[4]。本课题组前期研究发现，HQD能抑制须癣毛癣菌、红色毛癣菌、紫色毛癣菌、犬小孢子菌等皮肤癣菌的生长，其最小抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）为1.75～5.90 mg/mL（以生药总量计）[5]。可见，HQD具有治疗皮肤癣菌病的潜力，但其抗皮肤癣菌作用的药效物质基础尚不明确。

结构中药学理论认为，中药药效的发挥与其有效成分、存在形式及物相状态密切相关[6-7]。中药化学成分由于独特的结构、众多的修饰位点和丰富的资源，使其在煎煮过程中易发生络合、水解、氧化、还原等反应，形成了包括真溶液、胶体溶液、混悬液等不同相态的分散体系[8]。现代研究表明，仅部分相态的中药汤剂才具有特定生物活性，以白虎汤为例，其纳米相态对家兔血清炎症因子的下调作用最为明显，且解热作用也优于其他相态，是白虎汤发挥药效的关键[9-10]。谱效关系研究将指纹图谱与中药药效评价相结合，不仅能使指纹图谱的化学成分对应某一药效，还能阐明指纹图谱特征与药效的关系，以确定相应的药效物质基础[11]。基于此，本研究拟建立HQD的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱；通过高速离心与透析相结合的方法拆分HQD的不同相态，并对不同相态HQD抗皮肤癣菌作用的谱效关系进行评价，以确定HQD抗皮肤癣菌的主要成分及其活性相态，旨在为该方抗皮肤癣菌作用的物质基础研究及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-2010A型HPLC仪（日本Shimadzu公司），Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），SPX-25085H-Ⅱ型生化培养箱（上海新苗医疗器械制造有限公司），MS-H280-Pro型磁力搅拌器[大龙兴创实验仪器（北京）股份公司]，Mastersizer 2000型激光粒度仪、Nano-S型激光粒度分析仪、ZEM3600型Zeta电位分析仪（英国Marlvern Panalytical公司），HC-2517型高速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司），S-4800型扫描电子显微镜（日本Hitachi公司），SCIENTZ-10N型冷冻干燥机、SB-5200D型超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

黄芩苷对照品（批号HS81115B2）、黄芩素对照品（批号HR5717S1）、汉黄芩苷对照品（批号HR5125S1）、汉黄芩素对照品（批号HR20925W3）、千层纸素A对照品（批号HS17116S1）、千层纸素A苷对照品（批号HS14413B1）、芍药苷对照品（批号HR16106B1）、芍药内酯苷对照品（批号PS011455）、甘草酸对照品（批号HG4398S3）、芹糖甘草苷对照品（批号HS20101B1）均购自宝鸡辰光生物科技有限公司，纯度均不低于98%；磷酸（批号20210701）、磷酸二氢钾（批号210503）均购自西陇科学股份有限公司；葡萄糖（批号HB01BA0003）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；琼脂粉（批号HA25BA0008）购自北京索莱宝科技有限公司；酪蛋白水解物（批号R20T0601）购自上海抚生实业有限公司；RPMI 1640培养基（批号2230740）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；纤维素透析袋（截留分子量8 000～10 000）购自上海源叶生物科技有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯，甲醇为分析纯，水为超纯水。

黄芩、白芍、炙甘草、大枣饮片均于2022年3月16日购自江西彭氏国药堂饮片有限公司，经江西省人民医院药学部胡建新主任药师鉴定，分别为唇形科植物黄芩*Scutellaria baicalensis* Georgi的干燥根、毛茛科植物芍药*Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根、豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎、鼠李科植物枣*Ziziphus jujuba* Mill.的干燥成熟果实。将不同产地或批号的4味饮片组合，按后续方法制得10批HQD饮片（编号S1～S10）。10批HQD饮片的来源信息见表1。

1.3 菌株

须癣毛癣菌（编号分别为xm109、xm110、xm111、xm112、xm113、xm114、xm115）由江西省人民医院临床医学研究所分离、鉴定、保存并提供。

2 方法与结果

2.1 HQD的制备

按照文献方法[12-13]制备HQD：按质量比3∶2∶2∶2称取黄芩、白芍、炙甘草、大枣饮片，混匀，加入10倍量水，煎煮1 h，趁热滤过；药渣加8倍量水，煎煮1 h，趁热滤

表1　10批HQD饮片的来源信息

编号	黄芩		白芍		炙甘草		大枣	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	内蒙古	21120803	安徽	21111910	内蒙古	21090302	山东	21082405
S2	内蒙古	21120803	安徽	21101407	内蒙古	21111201	山东	21082405
S3	内蒙古	21120803	安徽	21082604	内蒙古	21122305	山东	21082405
S4	山西	21123101	安徽	21111910	内蒙古	21090302	山东	21082405
S5	山西	21123101	安徽	21101407	内蒙古	21111201	山东	21082405
S6	山西	21123101	安徽	21082604	内蒙古	21122305	山东	21082405
S7	山西	21111105	安徽	21111910	内蒙古	21090302	山东	21082405
S8	山西	21111105	安徽	21101407	内蒙古	21111201	山东	21082405
S9	山西	21111105	安徽	21082604	内蒙古	21122305	山东	21082405
S10	山西	21111105	安徽	21082604	内蒙古	21090302	山东	21082405

过；合并2次滤液，浓缩，制成每1 mL含1 g生药的HQD，共制备10批（编号S1～S10），于－20 ℃保存，备用。

2.2　HQD的指纹图谱建立

2.2.1　色谱条件　以Shim-pack GIS C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～13 min，17%A；13～25 min，17%A→19%A；25～26 min，19%A→22%A；26～42 min，22%A→24%A；42～43 min，24%A→28%A；43～53 min，28%A；53～65 min，28%A→85%A；65～80 min，85%A→17%A）；流速为1 mL/min；柱温为40 ℃；检测波长为276 nm；进样量为10 μL。

2.2.2　混合对照品溶液的制备　取黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A、千层纸素A苷、芍药苷、芍药内酯苷、甘草酸、芹糖甘草苷对照品适量，精密称定，加甲醇溶解，制成上述各成分质量浓度分别为13、15、17、3.4、6.9、21.4、54、64、40、20 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液的制备　精密移取“2.1”项下HQD 1 mL，置于10 mL容量瓶中，加甲醇超声（功率300 W，频率40 kHz，下同）溶解并稀释至刻度，摇匀，精密移取1 mL，置于10 mL容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，混匀，经0.45 μm微孔滤膜滤过，即得。

2.2.4　方法学考察　（1）取“2.2.3”项下供试品溶液（编号S1），按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录色谱图。以黄芩苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，以考察方法精密度。结果显示，各共有峰相对保留时间的RSD均小于1%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3%（n=6），表明方法精密度良好。（2）按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液（编号S1），共6份，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以黄芩苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，以考察方法重复性。结果显示，各共有峰相对保留时间的RSD均小于1%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3%（n=6），表明方法重复性好。（3）取“2.2.3”项下供试品溶液（编号S1），分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以黄芩苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，以考察供试品溶液稳定性。结果显示，各共有峰相对保留时间的RSD均小于1%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3%（n=6），表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.5　HPLC指纹图谱的建立　取10批HQD供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，将图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》，以S1为参照图谱（峰数最多），采用中位数法，设置时间窗宽度为0.1 min，经多点校正和Mark峰匹配后，得到10批HQD的叠加指纹图谱和对照指纹图谱（R）。结果显示，10批HQD共有37个共有峰，详见图1。

2.2.6　共有峰的指认　取“2.2.2”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图（图2），并与对照指纹图谱进行比对，共指认10个共有峰，分别为芍药内酯苷（2号峰）、芍药苷（3号峰）、芹糖甘草苷（5号峰）、黄芩苷（14号峰）、千层纸素A苷（19号峰）、汉黄芩苷（22号峰）、黄芩素（27号峰）、甘草酸（28号峰）、汉黄芩素（32号峰）、千层纸素A（34号峰）。

2.2.7　相似度评价　采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》对10批HQD的指纹图谱进行相似度评价。结果显示，10批HQD指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于0.99，表明10批样品的质量差异较小，化学成分组成一致性较好。

2.3　不同相态HQD的表征

2.3.1　相态拆分　（1）按“2.1”项下方法制备HQD（编号S1）。取上述HQD样品适量，以13 000 r/min离心30 min，取沉淀，即得HQD沉淀相态（precipitation phase，P）。（2）取上清液，经0.45 μm微孔滤膜抽滤后，将滤液加至透析袋（每次5 mL，共40 mL）中，随即将透析袋装入加有水200 mL的烧杯中，于25 ℃下以500 r/min磁力搅拌30 min；取出透析袋中的样品，以13 000 r/min离心30 min。上述透析-离心操作重复2次，收集烧杯中液体，即得HQD真溶液相态（solution phase，S）。（3）透析袋中的样品即为HQD纳米相态（nano phase，N）。取HQD、HQD-P、HQD-S、HQD-N，真空冷冻干燥24 h，得相应冻干粉，质量分别为（20.34±1.72）、（1.67±0.09）、（2.15±0.17）、（15.93±1.11）g，HQD-P、HQD-S、HQD-N在HQD中的质量占比分别为8.21%、10.59%、78.33%。按上述方法制备HQD不同相态冻干粉3批，保存，备用。

2.3.2　相态表征　（1）取HQD-P、HQD-S、HQD-N冻干粉适量，加水复溶后，采用激光粒度（分析）仪测定粒径和Zeta电位。结果显示，HQD-P中10%粒子的粒径（$D_{0.1}$）为（4.670±0.051）μm、50%粒子的粒径（$D_{0.5}$）为（20.939±0.091）μm、90%粒子的粒径（$D_{0.9}$）为（91.522±0.530）μm；以（$D_{0.9}$－$D_{0.1}$）/$D_{0.5}$计算得到HQD-P的粒径分布宽度为4.148±0.018（分布宽度越接近1，表示粒子分

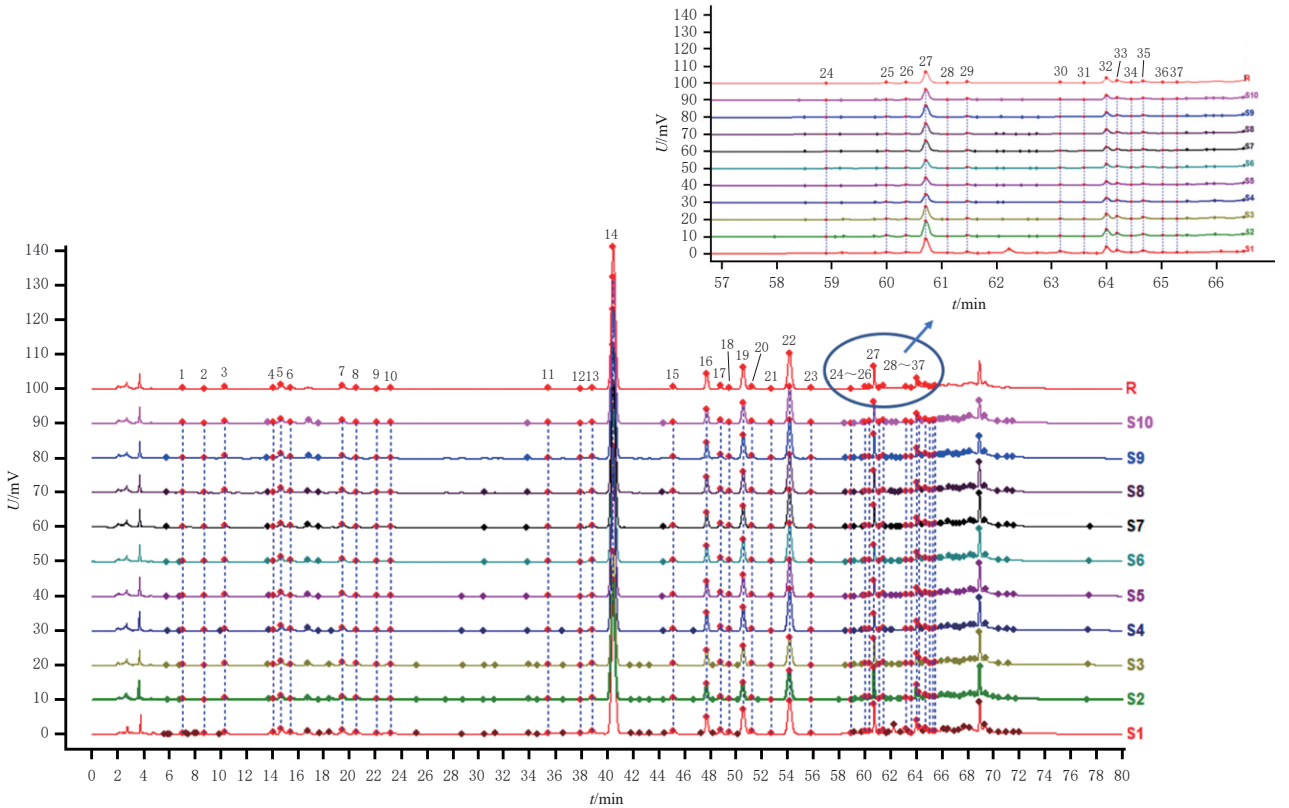
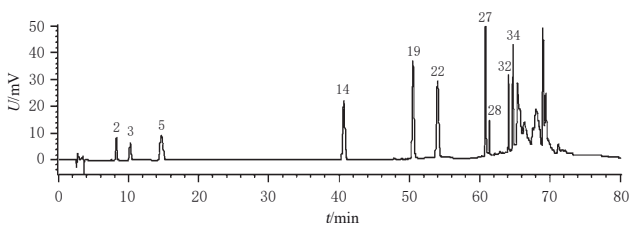
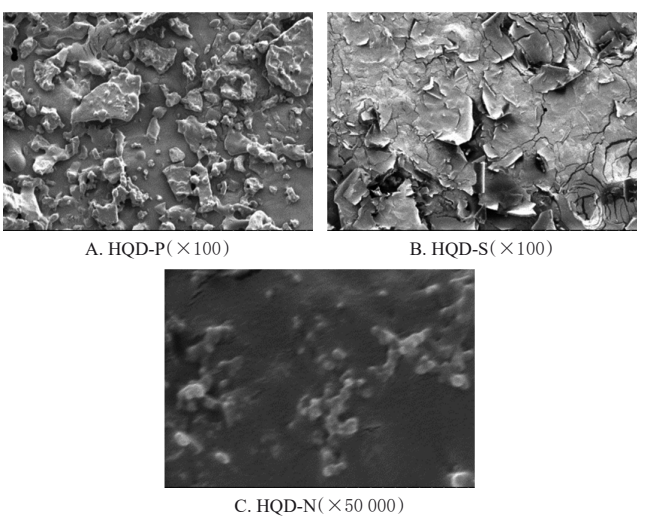


图1　10批HQD的HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱



2：芍药内酯苷；3：芍药苷；5：芹糖甘草苷；14：黄芩苷；19：千层纸素A苷；22：汉黄芩苷；27：黄芩素；28：甘草酸；32：汉黄芩素；34：千层纸素A

图2　混合对照品的HPLC图



A. HQD-P（×100）　B. HQD-S（×100）　C. HQD-N（×50 000）

图3　不同相态HQD的电子显微镜图

散度越小，粒子大小越均一[14]），表明HQD-P的粒子分布范围较广；HQD-S未检测到粒径；HQD-N的粒径为（129.0±12.9）nm，多分散度系数为0.228（＜0.25），表明HQD-N的粒径分布较窄，大小均一[15]。HQD-P、HQD-S、HQD-N的Zeta电位分别为（－12.93±0.49）、（－12.60±0.82）、（－12.13±0.23）mV。（2）取HQD-P、HQD-S、HQD-N冻干粉适量，涂于铜制样品台上，表面减压喷金，于扫描电子显微镜下观察其形态并拍照。结果显示，HQD-P冻干粉呈不规则颗粒状，粒子大小数十微米；HQD-S冻干粉呈均匀的片状，表面未见颗粒；HQD-N冻干粉可观察到球形纳米粒，大小约100 nm，与粒径分析结果基本一致。结果见图3。

2.4　谱效关系研究

2.4.1　图谱分析　分别称取HQD、HQD-P、HQD-S、HQD-N冻干粉20 mg，置于10 mL容量瓶中，加甲醇超声溶解并定容，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图（图4）。结果显示，HQD图谱中共有峰峰面积由高到低依次为HQD-N＞HQD＞HQD-P＞HQD-S。同时，根据“2.3.1”项下各相态冻干粉的质量占比，提示HQD中黄芩苷、芍药苷等活性成分大多集中在HQD-N中。

2.4.2　抗皮肤癣菌活性评价　取须癣毛癣菌，于毛癣菌培养基1号（由葡萄糖、酪蛋白水解物、磷酸二氢钾、无水硫酸镁、琼脂粉组成）中培养传代2次，以纯化菌落、增强活力。随后，将须癣毛癣菌置于28 ℃的生化培养箱中培养7～10 d。参照《丝状真菌抗真菌药敏试验的参考标准》的方法[16]制备须癣毛癣菌菌悬液：取菌株，加入含1%聚山梨酯20的无菌生理盐水3 mL，使用L型涂布棒

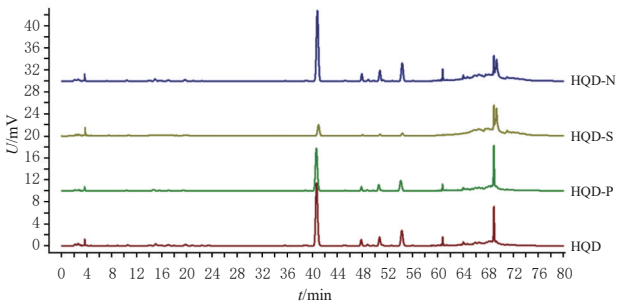


图4　HQD及其不同相态HQD的HPLC图

刮取菌株的孢子和菌丝，并转移至无菌离心管中，静置20 min；将上层悬液移至另一无菌离心管中，使用细胞计数器调整菌悬液的浓度，使终浓度为1×10⁴～5×10⁴CFU/mL（CFU表示菌落形成单位），备用。另取96孔板12块（规格12×8，横向标记1～12孔，纵向标记xm109～xm115），1～10孔依次加入质量浓度分别为100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.781、0.391、0.195 mg/mL（以浸膏量计）[5]的HQD及其不同相态HQD各100 μL和须癣毛癣菌菌悬液100 μL；11孔加入RPMI 1640培养基200 μL，作为阴性对照；12孔加入RPMI 1640培养基100 μL和须癣毛癣菌菌悬液100 μL，作为阳性对照。将96孔板置于生化培养箱中，于28 ℃下培养3～5 d，观察各孔真菌的生长情况，并与阳性、阴性对照比较，以观察到无真菌生长的MIC为终点，每株菌种平行3次。结果显示，HQD、HQD-P、HQD-S、HQD-N的MIC分别为5.85、7.37、12.89、4.64 mg/mL。可见，在同等给药剂量下，抗皮肤癣菌活性由高到低依次为HQD-N＞HQD＞HQD-P＞HQD-S。

2.4.3　Pearson相关性分析　以37个共有峰峰面积为自变量（记为X_1、X_2、X_3……X_{37}），采用SPSS 21.0软件对HQD、HQD-P、HQD-S、HQD-N的37个变量与各自MIC（因变量）进行Pearson相关性分析。结果显示，37个变量中，有35个变量与MIC的相关系数绝对值（$|r|$）＞0.8，其中25个变量与MIC呈显著负相关（$|r|$＞0.95且P＜0.05），这25个变量包括已指认的芍药苷、芦糖甘草苷、黄芩苷等10个成分，提示这些成分可能是HQD抗皮肤癣菌的重要活性成分。结果见表2。

表2　37个变量与MIC的Pearson相关性评价结果

自变量	r	P	自变量	r	P	自变量	r	P
X_1	−0.978[a]	0.022	X_{14}	−0.988[a]	0.012	X_{27}	-0.997[b]	0.003
X_2	−0.952[a]	0.048	X_{15}	−0.992[b]	0.008	X_{28}	−0.965[a]	0.035
X_3	−0.955[a]	0.045	X_{16}	−0.987[a]	0.013	X_{29}	−0.885	0.115
X_4	−0.986[a]	0.014	X_{17}	−0.994[b]	0.006	X_{30}	−0.900	0.100
X_5	−0.992[b]	0.008	X_{18}	−0.995[b]	0.005	X_{31}	−0.904	0.096
X_6	−0.989[a]	0.011	X_{19}	−0.992[b]	0.008	X_{32}	−0.997[b]	0.003
X_7	−0.989[a]	0.011	X_{20}	−0.996[b]	0.004	X_{33}	−0.951[a]	0.049
X_8	−0.288	0.712	X_{21}	−0.984[a]	0.016	X_{34}	−0.961[a]	0.039
X_9	−0.811	0.189	X_{22}	−0.986[a]	0.014	X_{35}	−0.874	0.126
X_{10}	−0.810	0.190	X_{23}	−0.805	0.195	X_{36}	−0.821	0.179
X_{11}	−0.991[b]	0.009	X_{24}	−0.801	0.199	X_{37}	−0.885	0.115
X_{12}	−0.265	0.735	X_{25}	−0.989[a]	0.011			
X_{13}	−0.999[b]	0.001	X_{26}	−0.991[b]	0.009			

a：在0.05水平（双侧）显著相关；b：在0.01水平（双侧）显著相关

3　讨论

本研究参考相关文献[12]建立了HQD的HPLC指纹图谱，方法学考察结果显示，该方法精密度、重复性、稳定性均较好。相似度评价结果表明，不同批次的HQD化学成分组成一致性较好，质量差异较小。通过与混合对照品比对，指认了芍药内酯苷、芍药苷、芦糖甘草苷、黄芩苷、千层纸素A苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸、汉黄芩素、千层纸素A共10个成分。

本研究采用高速离心分离得到HQD-P，以不产生肉眼可见沉淀为终点判断标准，经过粒径分析和形态观察确认了HQD-P的平均粒径为4.670～91.522 μm。透析是为了分离汤剂中的HQD-S和HQD-N，即分离由分子或离子组成的相态，若透析时间过短，难以除去全部的游离成分；若透析时间过长，则会导致纳米粒的稳定性降低[17]。本课题组前期以黄芩苷的释放速率为指标，对不同透析时间（15、30、45、60、90 min）进行了考察，结果显示，随着透析时间的延长，黄芩苷的释放速率先升高后降低，且以60 min为转折点，因此笔者推测60 min前主要是释放游离的黄芩苷，60 min后则是释放部分纳米粒中的黄芩苷；随后，本课题组又以透析袋中纳米粒的粒径为指标，对不同透析次数（60 min透析1次，或30 min透析2次，或15 min透析4次）进行了考察，结果显示，透析次数对纳米粒的粒径影响较大，60 min透析1次后透析袋中样品的粒径约为750 nm，30 min透析2次或15 min透析4次后样品的粒径约为120 nm，为减少透析-离心过程中样品的损失并获得理想的粒径，本研究选择了30 min透析2次。形态观察结果显示，HQD-S冻干粉呈均匀的片状，表面未见颗粒；HQD-N冻干粉可观察到球形纳米粒，表明采用该方法能较好地分离HQD的不同相态。

抗皮肤癣菌活性评价及Pearson相关分析结果显示，在相同的质量浓度下，HQD-N的抗皮肤癣菌作用最强，其次依次为HQD、HQD-P、HQD-S，表明HQD-N为该方的活性相态；37个共有峰中有25个峰与MIC呈显著负相关，这25个峰包括了已指认的芍药苷、芦糖甘草苷、黄芩苷等10个成分峰，表明HQD的抗皮肤癣菌作用强弱与这些成分含量高低显著相关，即含量越高，抗真菌作用越强。

综上所述，10批HQD的HPLC指纹图谱的相似度较高，化学成分组成一致性较好；HQD-N为HQD的活性相态，其中芍药苷、芦糖甘草苷、黄芩苷等10个成分可能是HQD抗皮肤癣菌的有效成分，且其抗皮肤癣菌作用强弱与上述成分含量及物理相态相关。

参考文献

[1] 冯佳佳，陶元勇. 中药抗真菌作用的研究进展[J]. 实用皮肤病学杂志，2019，12(1)：34-37.

[2] LIU X，MA Z M，ZHANG J X，et al. Antifungal compounds against *Candida* infections from traditional Chinese medicine[J]. Biomed Res Int，2017，2017：4614183.

[3] LIU Q F，LUYTEN W，PELLENS K，et al. Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine[J]. J Ethnopharmacol，2012，143(3)：772-778.

[4] 汤鑫淼，崔悦，朱鹤云，等. 黄芩汤的化学成分与药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报，2022，43(1)：59-61.

[5] 沈成英，邓冯沂，侯雄军，等. 黄芩汤对临床常见真菌的体外抑菌效果初步观察[J]. 解放军药学学报，2022，35(6)：479-481.

[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] 乔宏志，狄留庆，平其能，等. 结构中药学：中药药效物质基础研究的新领域[J]. 中国中药杂志，2021，46(10)：2443-2448.

[8] 何朝，浦益琼. 中药复方汤液的相态差异分析研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(15)：259-266.

[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]. Biomedecine Pharmacother，2020，124：109826.

[10] 吕邵娃，武印奇，李英鹏，等. 白虎汤不同相态对发热模型家兔血清中TNF-α、IL-1β及IL-6水平的影响[J]. 国际药学研究杂志，2020，47(10)：870-875.

[11] 王 静，王 杰，阿娜尔，等. 枸杞类胡萝卜素指纹图谱的建立及其抗氧化活性谱效关系研究 [J]. 中国药房，2022，33(5)：575-578.

[12] 李涛. 黄芩汤物质基础与药代动力学特征研究[D]. 北京：中国中医科学院，2013.

[13] 张会会. 黄芩汤抗炎药效及其作用机制研究[D]. 北京：中国中医科学院，2014.

[14] SHEN C Y，LI R S，SHEN B D，et al. Influence of drug physicochemical characteristics on *in vitro* transdermal absorption of hydrophobic drug nanosuspensions[J]. Drug Dev Ind Pharm，2015，41(12)：1997-2005.

[15] 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.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal suscepibility testing of filamentous fungi，1st ed：CLSI supplement M61[M]. Wayne，Pennsylvania：Clinical and Laboratory Standards Institute，2017：1-10.

[17] 刘元芬，王亚晶，周咏梅，等. 纳米给药系统中药物体外释放度测定方法及体内外相关性评价研究进展[J]. 中国药房，2019，30(4)：548-553.

（收稿日期：2022-07-26　修回日期：2023-02-03）

（编辑：陈　宏）

（上接第686页）

[7] 刘遥，刘丽敏，熊远根，等. 风轮菜属植物研究进展[J]. 中国中药杂志，2020，45(18)：4349-4357.

[8] 陈月圆，黄永林，文永新，等. 细风轮菜挥发油成分的GC-MS分析[J]. 精细化工，2009，26(8)：770-772，812.

[9] 王圣男，余世春，许旭东，等. 风轮菜属三萜皂苷与黄酮研究进展及波谱特征[J]. 波谱学杂志，2013，30(3)：447-460.

[10] 王凌天，孙忠浩，钟明亮，等. 风轮菜酚酸类化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2017，42(13)：2510-2517.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：293，315，340-341.

[12] 上海市卫生局. 上海市中药材标准[M]. 上海：上海市卫生局，1994：304.

[13] 上海市卫生局. 上海市中药饮片炮制规范：1980[M]. 上海：上海科学技术出版社，1983：305.

[14] 吴建章，郁建平，赵东亮. 迷迭香酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2005，17(3)：383-388.

[15] 曹雯，张文娟，潘金凤，等. 迷迭香酸药理作用的研究进展[J]. 广西中医药，2019，42(1)：54-58.

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：61，114，230-232，234.

[17] 陈华林，徐俊，蔡晓洋，等. 藏药奥色折布的质量标准研究[J]. 中国药房，2020，31(21)：2609-2614.

[18] 项振锋，许清遥，程宏，等. 微波辐射预处理提取细风轮菜三萜皂苷工艺及生物活性研究[J]. 丽水学院学报，2020，42(2)：24-32.

[19] YAMAMOTO A，MIYASE T，UENO A，et al. Clinoposaponins Ⅰ-Ⅴ，new oleanane-triterpene saponins from *Clinopodium gracile* O. Kuntze[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo)，1993，41(7)：1270-1274.

[20] 毛丽旦·阿扎提，王莹，兰卫. HPLC法测定唇香草中迷迭香酸与芦丁的含量[J]. 化学与生物工程，2022，39(1)：64-68.

（收稿日期：2022-08-18　修回日期：2023-02-03）

（编辑：张元媛）