

## 基于物相形态差异探究煎煮过程对红花-桃仁药对药效物质的传递作用

陶春晓<sup>1</sup>, 叶泰玮<sup>1</sup>, 李敏<sup>2</sup>, 张芳<sup>3</sup>, 谢燕<sup>1\*</sup>

1. 上海中医药大学公共健康学院, 上海 201203

2. 上海中医药大学专家委员会办公室, 上海 201203

3. 上海中医药大学创新中药研究院, 上海 201203

**摘要:**目的 以红花-桃仁药对汤液中相态差异为基础, 探究煎煮过程对该药对药效物质的传递作用。方法 采用超速离心和透析技术对红花-桃仁药对汤液进行相态拆分, 使用马尔文粒径仪、透射电子显微镜对各相态的粒径、 $\zeta$ 电位、微观形态进行表征, 选用气相色谱法、紫外分光光度法、HPLC法对各相态的脂肪酸、蛋白、糖类以及红花有效成分羟基红花黄色素A (hydroxysafflor yellow A, HSYA)、脱水红花黄色素B (anhydrosafflor yellow B, AHSYB)的含量进行测定; 拆分单煎液、分煎合并液及共煎液的相态, 并比较不同药液中同级相态的物质组成或微观形态的差异, 考察煎煮方式对相态形成的影响。结果 红花-桃仁药对汤液中分离得到了1个亲油性相态②和6个亲水性相态①③④⑤⑥⑧; 亲油性相态②由棕榈酸、棕榈油酸、十七烷酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、二十烷酸共8种脂肪酸组成; 亲水性相态粒径在20~1000 nm, 主要为混悬相态与胶体相态, 糖类、蛋白是亲水性相态的重要组成物质, HSYA、AHSYB主要分布于亲水性相态③⑥⑧中。共煎煮可形成亲油性相态, 其脂肪酸组成与桃仁油相近, 单煎液、分煎合并液及共煎液中亲水性相态⑥⑧粒子的形态有一定差异, 共煎液中相态⑥⑧粒子的粒径均一性、稳定性最佳。结论 物相形态是红花-桃仁药对药效物质传递的重要形式, 煎煮过程特别是共煎煮, 是该药对有效相态形成的重要步骤。

**关键词:** 中药药对; 红花; 桃仁; 煎煮过程; 相态; 超速离心; 透析技术; 脂肪酸; 蛋白; 糖类; 羟基红花黄色素A; 脱水红花黄色素B; 药效物质传递

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)17-5550-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.009

## Exploration of delivering effects of decocting process on pharmacodynamic substances of *Carthami Flos-Persicae Semen* herb pair based on variation of phase states

TAO Chun-xiao<sup>1</sup>, YE Tai-wei<sup>1</sup>, LI Min<sup>2</sup>, ZHANG Fang<sup>3</sup>, XIE Yan<sup>1</sup>

1. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. The Office of Experts Committee, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Innovative Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To explore the delivering effects of decocting process on the pharmacodynamic substances in *Carthami Flos-Persicae Semen* herb pair based on the phase state differences. **Methods** The phase states of the co-decoction were separated using ultracentrifugation and dialysis, and the particle size,  $\zeta$  potential, and microscopic morphology of each phase state were characterized by Zetasizer Nano ZS instrument and transmission electron microscope. The content of fatty acids, proteins, saccharine, hydroxysafflor yellow A (HSYA) and anhydrosafflor yellow B (AHSYB) were determined by gas chromatography, UV spectrophotometry and HPLC. The effects of decoction modes on phase states formation were investigated by splitting the phase states in single-, merged- and co-decoction and then comparing the composition or microscopic forms of phase states in different decoctions. **Results** One oleophilic

收稿日期: 2023-02-21

基金项目: 上海市卫生健康学科带头人项目(2022XD026)

作者简介: 陶春晓(2000—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂新技术的研究与应用。

\*通信作者: 谢燕(1978—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药制剂新技术的研究与应用。

Tel: (021)51322440 E-mail: rosexie\_2004@163.com

phase state ② and six hydrophilic phase states including ①, ③, ④, ⑤, ⑥, and ⑧ were isolated from *Carthami Flos-Persicae Semen* herb pair decoction; The oleophilic phase state consisted of eight fatty acids including palmitic acid, palmitoleic acid, margaric acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, arachidonic acid, and arachidic acid and the hydrophilic phases were mainly miscible or colloidal phase states with the particle size ranging from 20 to 1000 nm. Both saccharine and proteins are important constituents of the hydrophilic phases, and HSYA, AHSYB are predominantly distributed in the hydrophilic phases ③, ⑥ and ⑧. Co-decocting can form oleophilic phase state, whose fatty acid composition is similar to that of peach kernel oil. The microscopic morphology of hydrophilic phases ⑥ and ⑧ in single-, merged- and co-decoction are slightly different, and phases ⑥ and ⑧ in co-decoction present the good particle size uniformity and stability. **Conclusion** The phase state is an important form for delivering the pharmacodynamic substances in *Carthami Flos-Persicae Semen* herb pair, and the decocting process, especially the co-decocting, is the essential procedure for the formation of the effective phase states of this herb pair.

**Key words:** herb pairs; *Carthami Flos*; *Persicae Semen*; decocting process; phase state; ultracentrifugation; microdialysis technique; fatty acids; proteins; saccharine; hydroxysafflor yellow A; anhydrosafflor yellow B; pharmacodynamic substance delivery

红花、桃仁均为活血化瘀常用药味，两者配伍后入心可散血中之滞，入肝可理血中之雍，是体现“活血化瘀”治则的经典药对<sup>[1]</sup>。临床及实验研究表明，红花-桃仁药对确在心脉瘀阻、血滞经闭等病证及相关病理模型治疗中疗效显著<sup>[2-3]</sup>。汤剂是中药复方最常见的口服剂型，以红花-桃仁药对为基础的血府逐瘀汤、桃红四物汤、补阳还五汤等均以汤剂形式用药<sup>[4]</sup>；另有研究显示，汤剂的药效作用发挥与其煎煮方式密切相关<sup>[5-6]</sup>，因此，有必要研究红花-桃仁药对的煎煮过程，为合理阐释其药效作用提供支持。此外，《中国药典》2020年版第一部收载的成方制剂中，含有红花-桃仁药对的制剂共有34个，其中尿塞通片、根痛平颗粒、消栓口服液等18个制剂中红花-桃仁药对均以共煎入药<sup>[7]</sup>，因此，充分了解红花-桃仁药对汤液煎煮过程中的变化对相关中药制剂的质量提升也具有重要意义。

物相形态是指在非外力作用下，理化性质相同的物质相互作用形成的聚集态，简称相态<sup>[8]</sup>。随着超分子化学、纳米生物学等新兴学科在传统中药学研究的不断渗入，有学者发现药对如甘草-附子、马钱子-甘草等在煎煮过程中会产生新的物相形态，包括沉淀相（粒径 $>10\ \mu\text{m}$ ）、混悬相（粒径 $0.5\sim 10\ \mu\text{m}$ ）、胶体相（粒径 $1\sim 100\ \text{nm}$ ）等<sup>[9-10]</sup>，由不同成分在静电引力、氢键作用、亲-疏水作用等弱相互作用的诱导下从无序状态转变为有序的聚集态而引起<sup>[11]</sup>。另外，白虎汤、麻杏石甘汤中各相态药效结果表明，相态中成分含量、相互作用力的变化会引起药效活性的增强或削弱<sup>[12-13]</sup>。可见，相态可能是中药汤剂药效物质的重要传递形式，其维持与变化过程中伴随着药效物质的装载、释放和效应发挥。迄今，红花-桃仁药对汤液中的相态存在形式及变化

未见报道，值得探究。

因此，本实验拟通过过滤、透析、超速离心等物理分离方法对红花-桃仁药对共煎液进行物相形态拆分，并采用马尔文粒径仪（DLS）、透射电子显微镜（TEM）、气相色谱-质谱（GC-MS）及高效液相色谱（HPLC）等对所获得的相态进行粒径、 $\zeta$ 电位和形态表征，成分含量分析；进一步选取组成特殊或可负载药效物质的相态为研究对象，探究不同煎煮方式对红花-桃仁药对汤液相态形成的影响，以期探讨煎煮过程中红花-桃仁药对药效物质的传递规律，为中药复方制剂前处理过程研究提供一定的实验证据与借鉴。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

HH-4型数显式电热恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司；UV-2800型紫外-可见分光光度计，上海尤尼科仪器有限公司；Eppendorf Centrifuge 5424R型离心机，德国艾本德股份公司；SCIENTZ-12N型冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；YH型电热套，江苏近湖镇教学仪器厂；Optima XPN-100型超高速离心机，美国Beckman Coulter公司；Nano-ZS/ZEN-3600型粒径仪，英国马尔文公司；JEM-2100F型透射电子显微镜，日本电子株式会社；Agilent 8860/7697A型气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）、Agilent 1260 II型高效液相色谱仪，美国Agilent Technologies公司；Powerware XS型酶标仪，Biotek公司。

### 1.2 试剂

石油醚、正丁醇、蒽酮、浓硫酸均为分析纯，活性炭为试剂级，购自国药集团化学试剂有限公司；甲醇、冰醋酸为色谱纯，购于赛默飞世尔科技有限

公司; BCA 试剂盒, 购于上海碧云天生物技术有限公司; 14%三氟化硼甲醇溶液为试剂级, 购于上海泰坦科技有限公司; 水为超纯水, 由 Milli-Q 超纯水仪系统制备。

红花购于上海康桥中药饮片有限公司(产地新疆, 批号 211011), 经上海中医药大学中药研究所吴立宏研究员鉴定, 为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花; 桃仁购于上海康桥中药饮片有限公司(产地山东, 批号 211116), 经上海中医药大学中药研究所吴立宏研究员鉴定, 为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子。羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 对照品购自阿拉丁试剂(上海)有限公司, 批号 20191109, 质量分数 98.8%; 无水葡萄糖对照品购自成都乐美天医药科技有限公司, 批号 DSTDW000501, 质量分数 98.0%; 脱水红花黄色素 B (anhydrosafflor yellow B, AHSYB) 对照品购自上海诗丹德标准技术服务有限公司, 批号 184840-84-4,

质量分数 95.0%。

## 2 方法与结果

### 2.1 红花-桃仁药对共煎液的物相形态考察

**2.1.1 红花-桃仁药对共煎液的相态分离** 称取红花、桃仁(捣碎)药材各 50 g, 加 20 倍量水浸泡 30 min, 加热至微沸并保持 1 h, 趁热过七号筛滤除药渣, 如此煎煮 2 次, 合并药液得共煎液。共煎液 4 °C 静置过夜, 4000×g 离心 10 min, 得到相态①和上层液。相态①用少量水混悬收集, 上层液于分液漏斗中静置分层后, 上层加入水饱和正丁醇振摇萃取, 萃取液去除有机试剂得到相态②; 下层液体浓缩 10 倍后于相对分子质量 3500 的透析袋(按文献报道方法<sup>[15]</sup>预处理)中透析至外液无色, 透析外液浓缩得相态③。透析袋内样品于 100 000×g、200 000×g 梯度超速离心 90、120 min, 沉淀分别为相态④、⑤, 200 000×g 离心后上清液为相态⑥, 流程见图 1。取部分相态①③④⑤⑥留作形态鉴定样品, 其余冻干后储存于-20 °C。

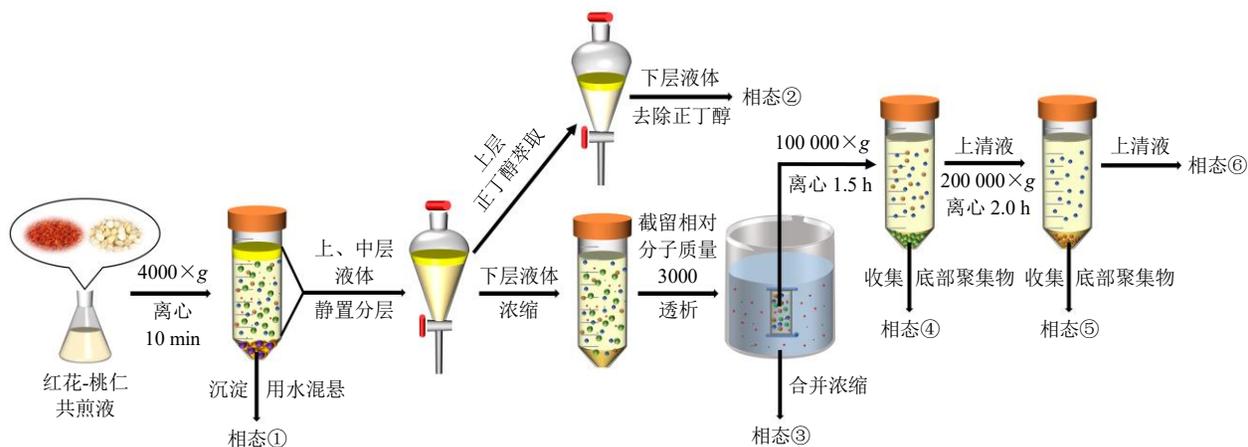


图 1 红花-桃仁药对共煎液物相形态拆分流程

Fig. 1 Flow chart of separating phase states for *Carthami Flos-Persicae Semen* herb pair co-decoction

**2.1.2 红花-桃仁药对共煎液物相形态的鉴定与表征** 经观察, 相态②为可溶于石油醚的黄色黏稠状液体, 而相态①③~⑥为具有较明显丁达尔效应的亲水性液体, 故分为亲油型相态与亲水型相态两类进行表征。

(1) 亲水型相态中粒子粒径分布、ζ 电位及微观形态表征: 分别吸取适量相态①③~⑥溶液, 以超纯水稀释 10 倍后, 采用马尔文粒径仪测定各样品的粒径、ζ 电位; 同时将样品滴至铜网支持膜上, 阴干后于 TEM 下观察粒子形态, 结果如图 2 所示。

DLS 结果显示, 相态①④所含粒子从微米级至纳米级均有分布, 平均粒径在 2600 nm 左右, ζ 电

位约为-10 mV 且呈现多峰状; 相态③粒径偏小, 在纳米级别(70~200 nm), ζ 电位约为-30 mV; 而相态⑤⑥粒径主要集中在 250 nm 左右, ζ 电位为-30 mV 且呈现单峰。TEM 结果显示, 相态①中粒子由大小不一且不规则的白色、黑色粒子组成; 相态③中粒子为黑色球状颗粒; 相态④为白色类球状粒子; 相态⑤中粒子也为白色球状, 但粒径远小于相态④; 相态⑥所含粒子呈黑色圆球状, 且粒子内可见网状结构。值得注意的是, 相态⑤⑥中单个粒子聚集成团, 因此 DLS 测得粒径偏大, 但相态⑤⑥实际粒径与相态③相近。综上, 亲水型相态总体粒径在 20~1000 nm, 表明其主要由混悬相态和胶体相态组成,

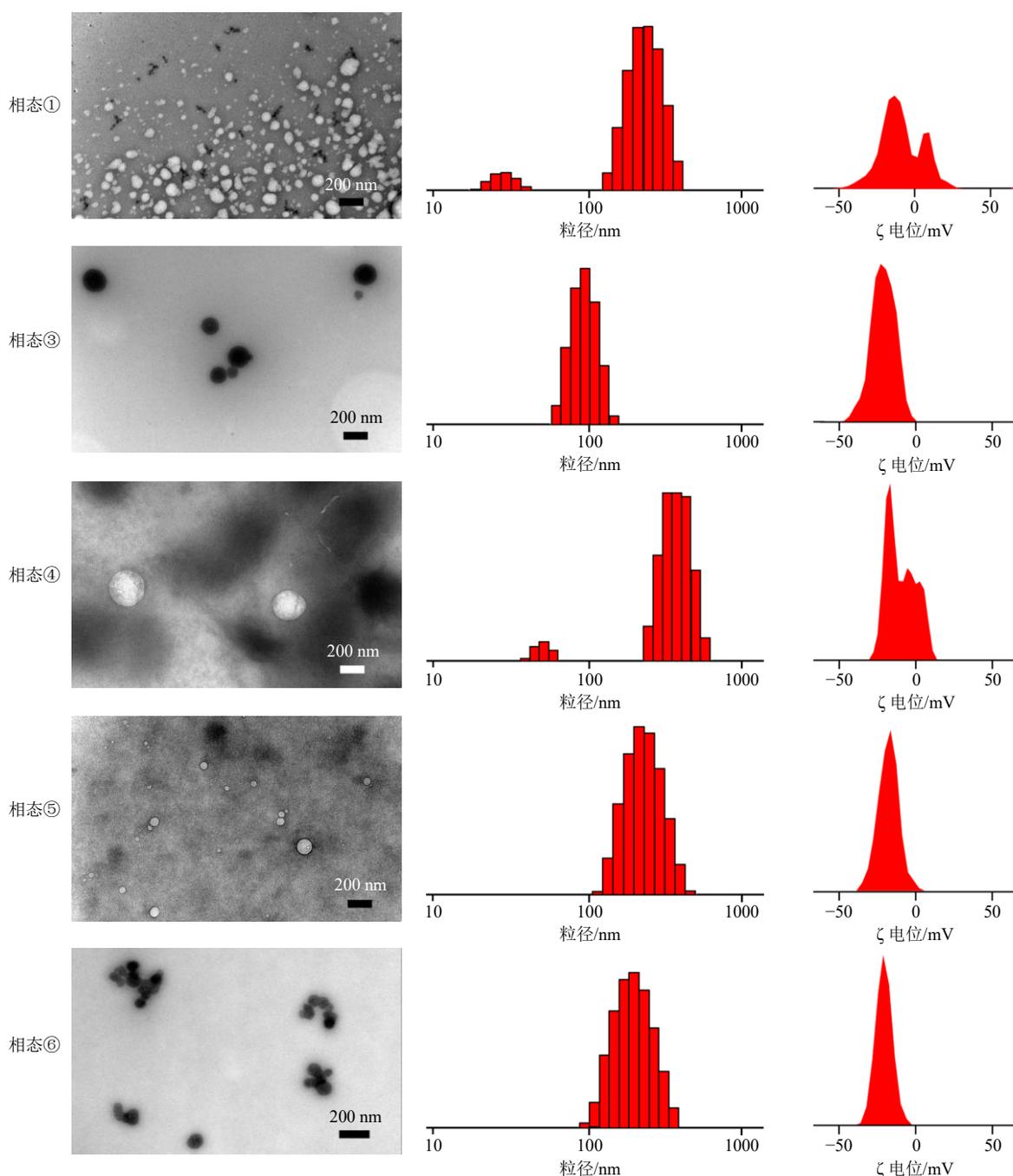


图2 共煎液中亲水型相态的微观形态、粒径分布及ζ电位

Fig. 2 Microscopic morphology, size distribution and ζ potential in hydrophilic phase states of co-decoction

其中相态①④包含有胶体相态和混悬相态；相态③⑤⑥粒径偏小，为胶体相态。

(2) 亲油型相态 GC-MS 定性分析：参照文献方法<sup>[14]</sup>及 GB 5009.168-2016 的方法，测定相态②中脂肪酸组成。

色谱条件：气相色谱柱为 VF-WAXMS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），载气为氦气；体积流量 1 mL/min；进样口温度 150 °C；分流比 10 : 1，升温程序及柱温如下：150 °C（20 °C/min）→220 °C

（3 °C/min）→250 °C，保持 5 min，进样量 0.3 μL。

质谱条件：电子轰击源 EI；离子源温度为 230 °C；四级杆温度为 150 °C；扫描质量范围  $m/z$  45~600，溶剂延迟为 3 min。

样品溶液的制备：称取适量相态②于圆底烧瓶中，加入 100 倍量的 0.5 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液，60 °C 恒温水浴 30 min，冷却后加入 14% 三氟化硼甲醇溶液，60 °C 恒温水浴 15 min，冷却后，加入适量正己烷，振摇后加入等量饱和氯化钠溶液，静置，

取正己烷层, 加入过量无水硫酸钠, 混匀并离心 (10 000×g, 10 min), 上清液进样检测即可。

所得 GC-MS 总离子流色谱图见图 3。由色谱图可知, 各成分已达到基本分离, 满足后续定性分析的要求。调用 NIST 化合物谱库, 解析总离子流图, 共得到 9 个成分, 其中脂肪酸类成分 8 个, 分别为

棕榈酸、棕榈油酸、十七烷酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、二十烷酸; 苯甲醛衍生物或烷类 1 个。采用峰面积归一化法计算其相对百分含量, 结果显示, 相态②中脂肪酸以油酸含量最高, 亚油酸、棕榈酸含量次之, 具体数据见表 1, 上述结果说明相态②为脂肪酸组成的油类物质。

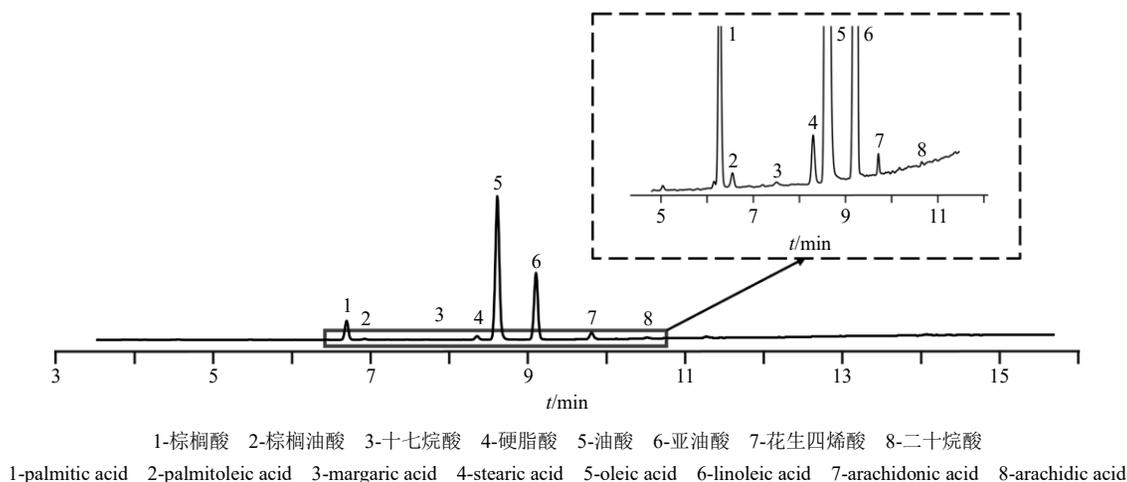


图 3 相态②脂肪酸类成分分析 GC-MS 总离子流图

Fig. 3 GC-MS total ion chromatograms of fatty acids in phase ②

表 1 相态②脂肪酸成分的相对含量

Table 1 Relative content of fatty acid in phase ②

$t_R$ /min	成分名称	分子式	相对分子质量	相对含量平均值/%
6.153	棕榈酸	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270.45	7.04
6.387	棕榈油酸	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268.43	0.32
7.390	十七烷酸甲酯	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284.48	0.05
7.838	硬脂酸	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298.50	1.39
8.141	油酸	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296.49	60.51
8.620	亚油酸	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294.47	27.07
9.938	花生四烯酸甲酯	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318.49	0.58
10.683	二十烷酸甲酯	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326.56	0.09
	苯甲醛衍生物、烷类			0.39

**2.1.3 亲水型相态物质组成分析及成分分布考察** 糖类、蛋白类物质在汤液相态形成中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>, 红花中多糖含量丰富且为主要药效物质, 桃仁中蛋白质占比达到 20%~30%<sup>[16]</sup>, 两者可能会参与相态形成, 故进行亲水型相态中蛋白质、总糖的定量分析; 同时, 以红花有效成分 HSYA、AHSYB 为代表考察小分子成分在亲水型相态中的分布情况。

(1) 相态中蛋白质、总糖含量测定: 样品溶液前处理: 称取适量相态①③~⑥冻干粉于 10 mL 量

瓶中, 平行 3 份, 加超纯水超声溶解并定容, 离心 (2800×g, 10 min), 取上清液进行蛋白质、总糖含量测定。

蛋白质含量测定: 取适量相态①③~⑥溶液, 平行 3 份, 加入 1%活性炭水浴脱色得样品溶液。按照试剂盒说明书配制 BCA 工作液及标准曲线, 吸取 2 μL 样品溶液于 96 孔板中, 超纯水补足至 20 μL, 加入 200 μL 工作液, 37 °C 孵育 30 min 后, 酶标仪测定 562 nm 的吸光度 ( $A$ ) 值, 代入标准曲线计算样品中蛋白含量, 结果见表 2。

总糖含量测定: 采用蒽酮-硫酸法<sup>[16]</sup>测定样品中总糖含量。配制质量浓度为 0.010~0.075 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液, 按体积比 4:1 将对照品溶液与 0.2%蒽酮-硫酸溶液混匀, 沸水浴 10 min, 冷却后于波长 625 nm 测定  $A$  值, 以葡萄糖质量浓度为横坐标、 $A$  值为纵坐标绘制标准曲线。取适量相态①③~⑥溶液, 平行 3 份, 按体积比 5:1 加 Sevig 试剂<sup>[17]</sup>除蛋白并加入 1%活性炭脱色后, 按上述操作反应, 测定  $A$  值并代入标准曲线计算样品中总糖含量, 结果见表 2。

实验结果: 相态①③⑥中总糖含量较高, 相态①③④中蛋白含量较高, 且相态③中 2 种物质含量最高, 相态①次之; 共煎液、相态①③④⑥中总糖

表2 共煎液及亲水型相态中蛋白、总糖及有效成分含量测定 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 2 Contents of protein, total sugars and active ingredient in hydrophilic phase states and co-decoction ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	总糖/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	蛋白/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	HSYA/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	AHSYB/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
共煎液	23 365.580 $\pm$ 3 344.000	517.320 $\pm$ 66.290	485.360 $\pm$ 2.920	57.860 $\pm$ 1.480
相态①	517.320 $\pm$ 66.290	11.120 $\pm$ 11.610	13.110 $\pm$ 0.250	3.880 $\pm$ 0.440
相态③	13 127.120 $\pm$ 1 107.000	210.160 $\pm$ 20.280	328.900 $\pm$ 7.920	24.540 $\pm$ 1.600
相态④	27.960 $\pm$ 2.540	4.450 $\pm$ 2.270	0.020 $\pm$ 0.010	0.090 $\pm$ 0.030
相态⑤	8.660 $\pm$ 0.670	0.020 $\pm$ 0.004	0.003 $\pm$ 0.001	0.013 $\pm$ 0.006
相态⑥	435.060 $\pm$ 40.150	0.650 $\pm$ 0.050	0.620 $\pm$ 0.080	0.960 $\pm$ 0.330

含量分别为蛋白的45、47、62、7、100倍。以上结果表明糖类、蛋白在煎煮过程中溶出良好,且两者均是相态①③④的重要组成物质;相态⑥的形成仅与糖类密切相关,蛋白参与较少。

(2) 亲水型相态中有效成分含量测定:参照文献中液相色谱方法<sup>[18]</sup>,测定亲水型相态中HSYA和AHSYB的含量。

色谱条件:色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为0.7%乙酸水溶液-甲醇,梯度洗脱:0~10 min, 20%甲醇;10~14 min, 20%~35%甲醇;14~20 min, 35%~44%甲醇;20~30 min, 44%~50%甲醇;后运行时间5 min;检测波长403 nm;体积流量1 mL/min;柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量10  $\mu\text{L}$ 。

对照品溶液的配制:分别取HSYA、AHSYB对照品适量,加25%甲醇制成质量浓度为51.8、88.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HSYA和AHSYB对照品溶液。

样品溶液配制:称取适量相态①③~⑥冻干粉于5 mL量瓶中,平行3份,加超纯水超声溶解并定容,10 000 $\times g$ 离心10 min,取上清液进样检测并计算各样品HSYA、AHSYB的含量,结果见表2。由表2可知,红花-桃仁共煎液中HSYA含量为AHSYB的8倍。HSYA和AHSYB主要存在于相态①③⑥,其在相态③中的含量分别为共煎液总量的68%和42%,相态①中分别为共煎液总量的3%和8%,说明在混悬、胶体相态形成过程中,共煎液中的HSYA、AHSYB在不同相态间进行了重新分布。另外,图2显示相态①③⑥均含有黑色纳米粒,提示纳米粒可能是HSYA、AHSYB的主要传递形式,为验证该推论,本实验将相态①进一步分离并考察HSYA、AHSYB在其中的分布情况。

(3) 相态①分离及有效成分的分布情况考察:取相态①,加适量超水分散后,滤过,得到滤饼为相态⑦,滤液为相态⑧,并对相态⑧进行粒径分

布、 $\zeta$ 电位及微观形态表征,分离过程及表征结果见图4。取相态①⑦⑧溶液适量,平行3份,按“2.1.3(2)”项下方法测定样品中HSYA、AHSYB的含量,结果见表3。结果显示,相态⑧为100~200 nm的小粒子,且相态①中超过80%的HSYA、AHSYB集中分布于相态⑧,表明相态⑧是HSYA、AHSYB的主要传递形式。

综上,本实验从红花-桃仁共煎液中分离得到了1个亲油型相态和6个亲水型相态,亲水型相态包括混悬相态与胶体相态;对相态进行化学组成分析发现亲油型相态由8种脂肪酸组成,糖类、蛋白是亲水型相态的重要组成物质,小分子有效成分HSYA、AHSYB主要分布于亲水型相态③⑥⑧中。以上结果表明,红花、桃仁中脂肪酸、糖类和蛋白等物质按不同比例相互作用形成了多种相态,其中相态③⑥⑧是红花有效成分HSYA、AHSYB在汤液中的重要传递形式。

## 2.2 不同煎煮方式对红花-桃仁药对物相形态的影响

据报道,中药复方经单煎、分煎合并、共煎提取所得汤液中的成分种类、含量及理化性质均存在差异<sup>[5]</sup>,提示煎煮方式对相态的形成具有一定影响。本实验以亲油型相态②、亲水型相态⑥⑧为研究对象,通过考察红花-桃仁药对单煎、分煎合并及共煎汤液的相态差异,探究煎煮方式对红花-桃仁药对汤液相态形成的影响。

### 2.2.1 样品制备

(1) 红花、桃仁单煎液和分煎合并液中相态的分离:分别称取50 g红花、桃仁(捣碎),加20倍量水浸泡30 min,加热回流至微沸并保持1 h,趁热滤除药渣,各煎煮2次后合并药液,得2味药材的单煎液。所得单煎液冷却后将其等量混合,得红花桃仁分煎合并液。按“2.1.1”项下分离方法将单煎液、分煎合并液分离得到各相态。

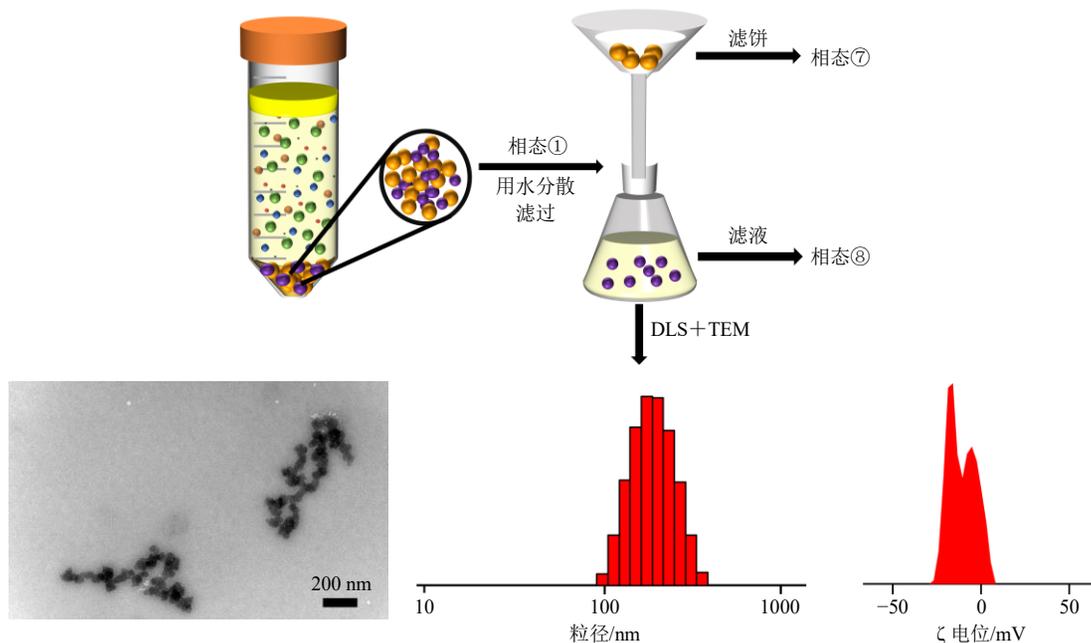


图4 相态①的分离及相态③的形貌表征

Fig. 4 Separation of phase ① and morphological characterization of phase ③

表3 相态①⑦⑧有效成分含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Contents of active ingredient in phase ①⑦⑧ ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

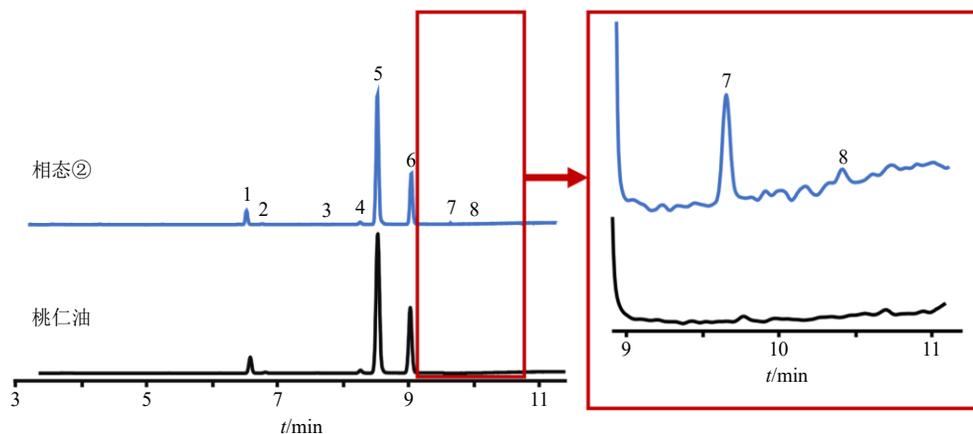
样品	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	HSYA	AHSYB
相态①	41.59 ± 0.85	12.89 ± 0.72
相态⑦	5.47 ± 0.67	5.38 ± 0.57
相态⑧	38.33 ± 1.45	10.79 ± 0.44

相态分离过程中发现,单煎液、分煎合并液均未得到相态②。表1结果显示,相态②为油类物质,且桃仁含有30%~60%的油类物质,故以桃仁油为

对照,考察煎煮过程对相态②形成的影响。

(2) 桃仁油提取:采用石油醚提取法<sup>[14]</sup>提取桃仁油:称取捣碎后过一号筛的桃仁粉适量,置于索氏提取器中,按料液比1:15加入石油醚,加热回流一定时间,滤过并脱除溶剂,即得黄色清亮的桃仁油。

2.2.2 桃仁油与共煎液相态②成分比较 将桃仁油与相态②按“2.1.2 (2)”项下方法处理并检测,所得总离子流图如图5所示。结果表明,桃仁油含有棕榈酸、棕榈油酸、十七烷酸、硬脂酸、油酸、亚油酸共6个脂肪酸成分,3个苯甲醛衍生物和1个



1-棕榈酸 2-棕榈油酸 3-十七烷酸 4-硬脂酸 5-油酸 6-亚油酸 7-花生四烯酸 8-二十烷酸  
1-palmitic acid 2-palmitoleic acid 3-margaric acid 4-stearic acid 5-oleic acid 6-linoleic acid 7-arachidonic acid 8-arachidic acid

图5 桃仁油与相态②脂肪酸类成分分析 GC-MS 总离子流图

Fig. 5 GC-MS total ion chromatograms of fatty acids in *Prunus persica* oil and phase ②

烷类。与相态②进行对比可知，两者脂肪酸组成相近，但相态②中存在少量花生四烯酸及二十烷酸，这可能与红花中花生酸、二十烷烯酸的溶出<sup>[19]</sup>有关。该结果说明共煎促进桃仁、红花中油类成分分离，并与其他结构物质相互作用，形成稳定存在于汤液中的相态②。

**2.2.3 相态⑥的差异分析** 按“2.1.2 (1)”项测定红花-桃仁单煎、分煎合并液、共煎液中相态⑥的粒径、 $\zeta$  电位及粒子形态，结果如图 6 所示。共煎液相态⑥为粒径分布均匀（平均粒径约 150 nm）、大小相近的类球形粒子；与之相比，桃仁、红花单煎液相态⑥的平均粒径较大，分别在 360、440 nm 左右，粒径分布范围也更广，且形貌均为大小不一的球形粒子；分煎合并液相态⑥也与共煎液有区别，其粒径分布近似于 2 种单煎液的简单相加，平均粒径约为 317 nm，不规则小粒子和球形粒子共存于相

态中。另外，与共煎液相态⑥的单峰、负  $\zeta$  电位 ( $< -30$  mV) 不同，桃仁单煎液相态⑥带正电荷 ( $> 30$  mV)，红花单煎液与分煎合并液为双峰、负  $\zeta$  电位 ( $> -10$  mV)，由于  $\zeta$  电位绝对值越大则粒子稳定性越好<sup>[20]</sup>，因此共煎液与桃仁单煎液中相态⑥稳定性更佳。上述结果表明共煎所得相态⑥与单煎液、分煎合并液中相态⑥在形貌、电荷负载方面存在较大差异，且共煎液相态⑥粒子均一性、稳定性更佳，提示共煎时红花、桃仁发生了单煎、分煎合并中不存在的物理化学变化，从而形成了与之不同的相态。

**2.2.4 相态⑧的差异分析** 按“2.1.2 (1)”测定红花-桃仁单煎、分煎合并液、共煎液中相态⑧的粒径、 $\zeta$  电位并观察粒子形态，结果如图 7 所示。从粒径及形貌来看，共煎液相态⑧粒径约为 200 nm，由不规则小粒子组成，桃仁单煎液相态⑧粒径较大（约 400 nm），为具光晕的类球状粒子；红花单煎液相态

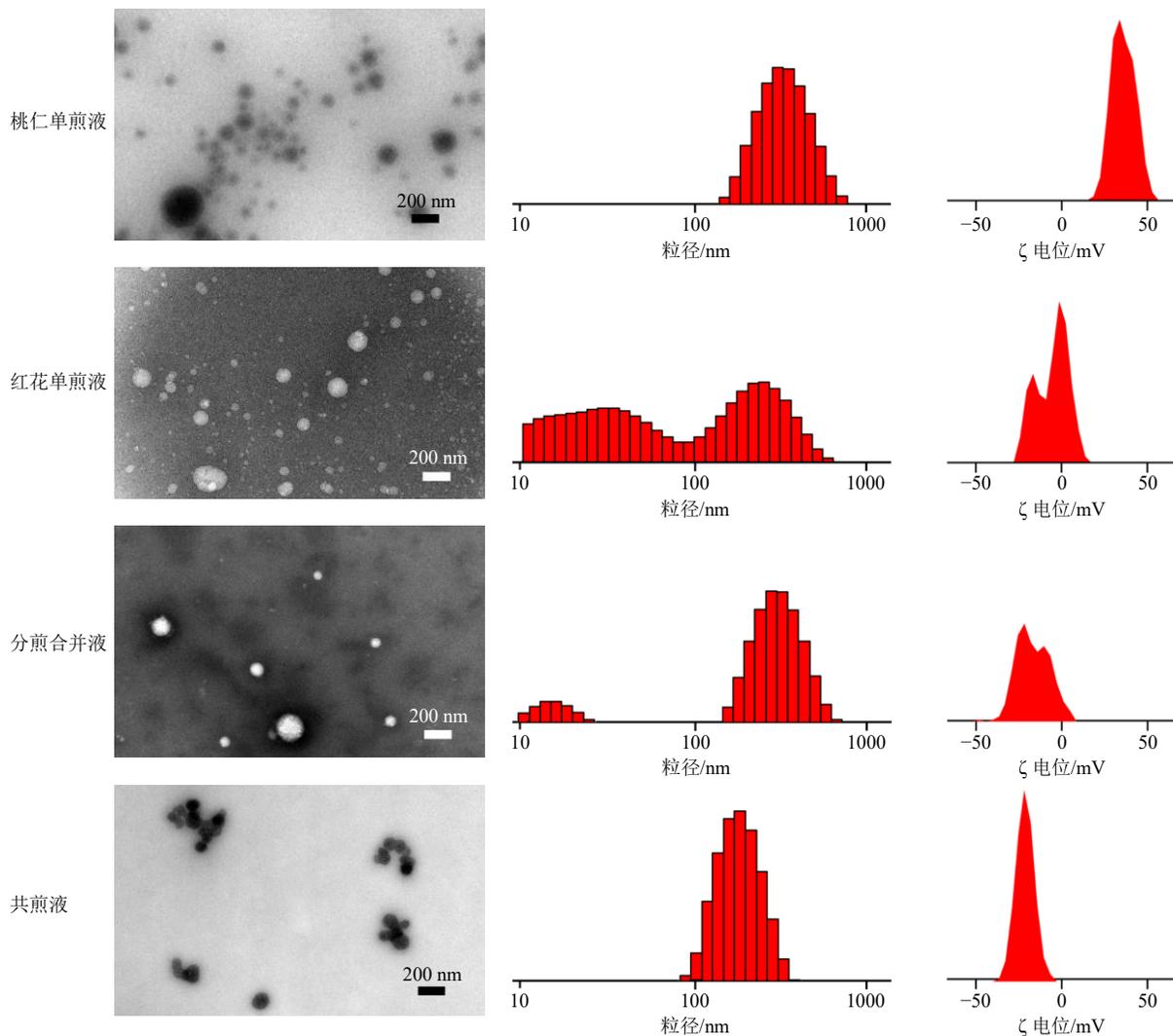


图 6 单煎液、分煎合并液和共煎液中相态⑥的微观形态、粒径分布及  $\zeta$  电位

Fig. 6 Microscopic morphology, size distribution and potential of phase ⑥ separated from single-, merged- and co-decoction

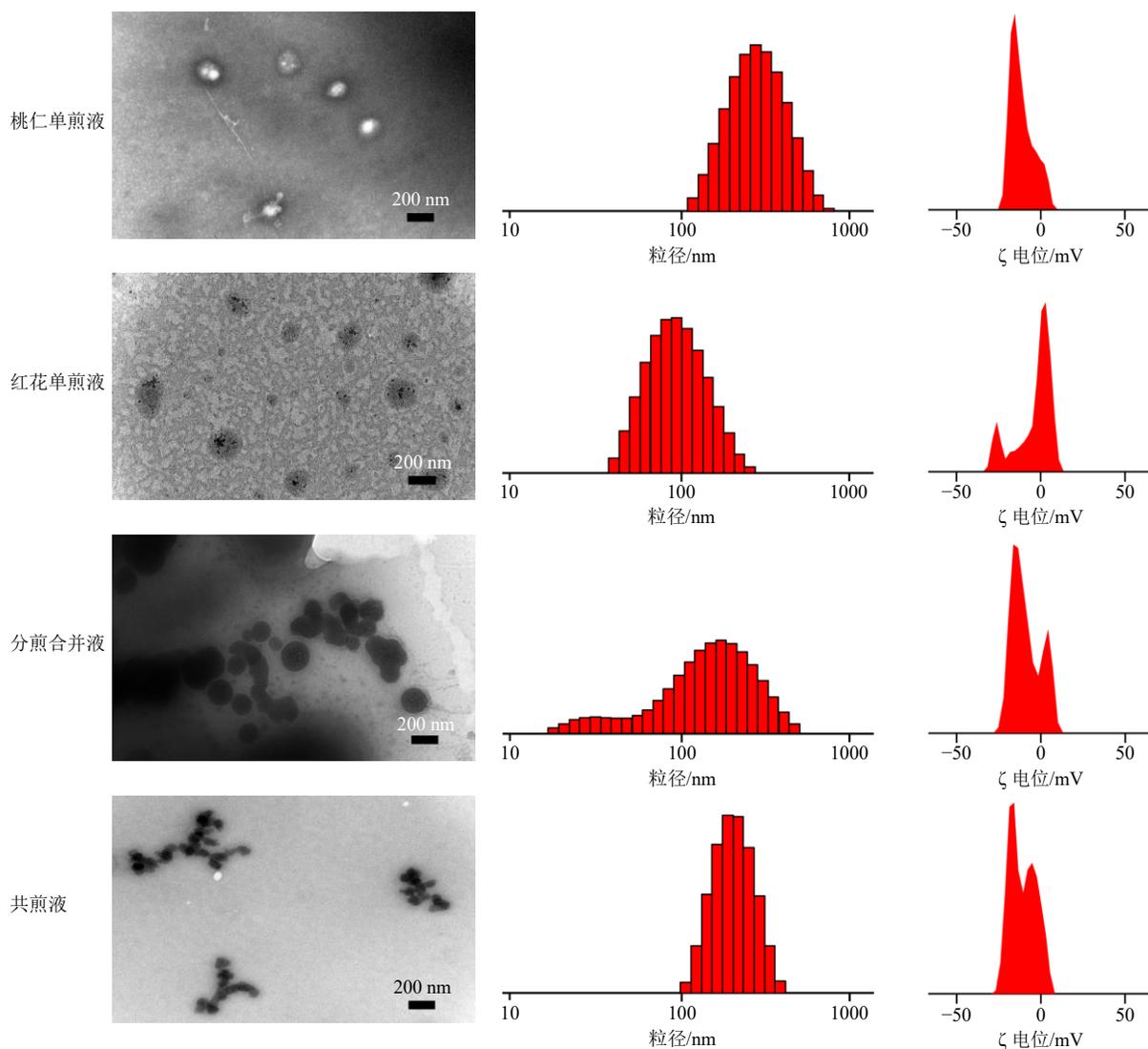


图7 单煎液、分煎合并液和共煎液相态⑧的微观形态、粒径分布及 $\zeta$ 电位

Fig. 7 Microscopic morphology, size distribution and  $\zeta$  potential of phase ⑧ separated from single-, merged- and co-decoction

⑧粒径偏小 ( $<120$  nm), 为大小、形状不一, 内部含晶状粒子的聚集物; 分煎合并液粒径分布最广, 与单煎液相态⑧相似的类型球状粒子与聚集物均有出现; 分析 $\zeta$ 电位图可得, 各相态⑧均带负电荷, 以红花单煎液相态⑧ $\zeta$ 电位绝对值最小, 分煎合并液次之, 桃仁单煎液与共煎液相态⑧ $\zeta$ 电位绝对值最大, 两者具有较好的稳定性。上述结果进一步说明红花-桃仁药对共煎形成相态的原理与单煎、分煎合并不同, 共煎所得相态均一性及稳定性更佳。

总之, 红花-桃仁药对共煎液与单煎液、分煎合并液在相态的种类、微观形态等方面存在明显差异, 亲油型相态仅见于共煎液, 又以共煎所得亲水型相态的粒子粒径均一性、稳定性最优, 此类相态或在汤液药效物质传递过程中发挥重要作用, 因此, 共煎是红花-桃仁药对汤液相态生成的重要步骤。

### 3 讨论

中药汤液属于多相态体系, 现有研究多以相态系统中的微粒粒径为参考指标进行中药汤液的相态分离, 常用的分离方法有离心法、透析法、场流分离法、过滤法和凝胶色谱法等<sup>[21]</sup>。本实验以微粒溶解性和粒径为指标, 结合离心法、透析法和过滤法从红花-桃仁药对共煎液中分离得到了1种亲油型相态和6种亲水型相态, 使用该方法得到的相态种类更为全面, 且操作简单、高效。

进一步地, 采用GC-MS法进行亲油型相态成分分析发现, 其组成与桃仁油相近, 推测两药共煎过程中桃仁油在多糖、皂苷等具有良好界面吸附能力的物质<sup>[22]</sup>作用下乳化, 并作为疏水性成分的传递形式稳定存在于汤液中; HPLC和紫外光谱法测定结果显示, 3种亲水型相态中糖类、蛋白及小分子

活性成分 HSYA、AHSYB 的含量较高,可能是红花多糖、桃仁蛋白发生美拉德反应或自组装形成胶束或纳米粒<sup>[15]</sup>后装载小分子活性成分,从而成为汤液中药效物质的主要传递形式。

已有研究表明,药对配伍共煎时原有化学成分会发生取代、氧化还原、异构化等多种反应,从而生成新的化合物或使原有化合物消失<sup>[23]</sup>。而本实验研究发现,红花-桃仁药对共煎形成了单煎、分煎合并液中不存在的亲油型相态,且共煎液中亲水型相态的粒子形貌也不同于单煎、分煎合并液,提示汤液相态的形成可能与药对中物质成分在共煎时发生的化学反应相关。除共煎、单煎和分煎合并等煎煮方式外,煎煮容器、煎煮时间、煎煮用水量和浸泡处置等亦会影响中药汤剂的药效发挥<sup>[24]</sup>;考察上述因素对汤液相态形成的影响,是中药汤液相态研究的重要补充,将有助于充分阐释中药复方煎煮这一传统中药制药方式的科学内涵,促进中药复方煎煮工序的理论化、规范化。

综上,本实验拆分了红花-桃仁药对汤液中的亲油型及亲水型相态,对所得相态进行微观形貌和物质组成分析,并发现共煎是该药对汤液相态形成的重要工序,为中药复方制药工艺合理性研究提供了新的思路。红花-桃仁药对相态形成过程中物质成分的相互作用机制,以及相态中药效成分的溶出、吸收方式及量效关系等问题尚需进一步探究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 姚子昂,侯炜,张解玉,等.探析《医林改错》中活血化瘀的组方规律[J].中医药导报,2019,25(20):99-101.
- [2] 梁子成,龙依萍,张曾宇,等.气滞血瘀型肝癌用药规律分析及核心药对作用机制的网络药理学研究[J].中医药导报,2021,27(9):171-175.
- [3] 毛应岚.桃仁-红花对气滞血瘀证肝癌模型大鼠微环境的影响[D].咸阳:陕西中医药大学,2021.
- [4] 林家冉,卫若楠,马将.红花的临床应用及其用量探究[J].长春中医药大学学报,2021,37(6):1212-1215.
- [5] 王晓军.葛根芩连汤合煎、分煎及共煎对其有效化学成分的影响[J].新中医,2016,48(8):218-219.
- [6] 蒋志,蒋丽霞,李智韬,等.中药汤剂煎煮方法及影响因素研究进展[J].广州中医药大学学报,2022,39(2):458-462.
- [7] 中国药典[S].一部.2020:1082,1443,1535.
- [8] 安立佳,陈尔强,崔树勋,等.中国改革开放以来的高分子物理和表征研究[J].高分子学报,2019,50(10):1047-1067.
- [9] 郭玉岩,马文保,肖洪彬,等.基于UPLC-MS技术分析马钱子-甘草药对配伍汤液不同相态中毒效物质的变化规律[J].中草药,2017,48(23):4880-4884.
- [10] 陈秋薇,章津铭,季宁平,等.附子-甘草药对配伍前后汤液相态对比[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(2):92-95.
- [11] 李文,王志家,林晓钰,等.基于弱键诱导的超分子体系探讨甘草和合黄连“性-味-效”物质基础[J].药学报,2022,57(6):1901-1908.
- [12] 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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6水平的影响[J].国际药学研究杂志,2020,47(10):870-875.
- [13] 吕邵娃,武印奇,李英鹏,等.白虎汤相态拆分及不同相态中主要成分的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(11):154-160.
- [14] 陶春晓,叶泰玮,张芳,等.桃仁油提取工艺及其理化性质、组成研究[J].中成药,2022,44(12):3914-3919.
- [15] 肖航,黄菊,孟祥瑞,等.中药大分子口服吸收起效:物相结构新角度及研究模式[J].中国中药杂志,2023,48(2):285-291.
- [16] 任丽君,袁洁,姚军.新疆不同产地红花多糖含量测定及抗氧化活性研究[J].新疆医科大学学报,2018,41(2):229-233.
- [17] 杨斌旺,刘平古,刘龙飞,等.药桑叶多糖的脱蛋白工艺与抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2020,41(10):156-160.
- [18] 艾散江·艾海提,王瑾,关明.高效液相色谱法分离分析药食同源红花中羟基红花黄色素A[J].食品科学,2016,37(12):152-155.
- [19] 梁慧珍,许兰杰,余永亮,等.红花籽油中脂肪酸组成评价与分析[J].食品科学,2021,42(6):244-249.
- [20] 谭宁,杜守颖,薛宇涛,等.几种辅料对葛根素液晶纳米颗粒粒径、电位、包封率的影响[J].天津中医药,2017,34(10):703-708.
- [21] 何传琦.板蓝根汤剂纳米颗粒的分离与表征[D].福州:福州大学,2013.
- [22] 王善勇,项舟洋,祁海松.基于天然多糖的绿色表面活性剂[J].精细化工,2020,37(10):1965-1976.
- [23] 赖长江生,陈泽炎,邱子栋,等.中药煎煮的化学反应机制研究现状[J].中国中药杂志,2023,48(4):890-899.
- [24] 蒋志,蒋丽霞,李智韬,等.中药汤剂煎煮方法及影响因素研究进展[J].广州中医药大学学报,2022,39(2):458-462.

[责任编辑 郑礼胜]