

金银花-蒲公英提取液不同相态主要成分含量测定及其对痤疮丙酸杆菌抑制作用的有效相态筛选

赵氏淳, 陶 颖, 卢 艺, 朱卫丰, 刘丽丽, 陈丽华, 臧振中*, 管咏梅*

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

摘要: 目的 通过对金银花 *Lonicerae Japonicae Flos*-蒲公英 *Taraxaci Herba* 提取液的相态拆分, 研究提取液及不同相态(真溶液相态、纳米相态、沉淀相态)中存在的主要成分(绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C)含量及其对痤疮丙酸杆菌的抑制作用, 筛选金银花-蒲公英提取液治疗痤疮的“有效相态”。方法 采用透析-离心方法对金银花-蒲公英提取液进行相态拆分, 对其外观形态、粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)、 ζ 电位进行表征, 并通过 HPLC 法对各相态主要成分含量进行测定以及各相态对痤疮丙酸杆菌最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)及最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)进行测定。结果 金银花-蒲公英提取液各相态的粒径大小为总提取液>沉淀相态>纳米相态, 真溶液相态未测定到粒径; 各相态的 PDI 大小为纳米相态>总提取液>沉淀相态; 各相态 ζ 电位大小为沉淀相态>总提取液>纳米相态>真溶液相态; 各相态绿原酸质量分数排序为纳米相态>真溶液相态>沉淀相态; 菊苣酸质量分数排序为纳米相态>真溶液相态>沉淀相态; 异绿原酸 A 质量分数排序为纳米相态>真溶液相态>沉淀相态; 异绿原酸 C 质量分数排序为纳米相态>沉淀相态>真溶液相态; 金银花-蒲公英总提取液与纳米相态抑菌结果一致, 效果最好; 杀菌效果为总提取液最佳, 其次为纳米相态。结论 物理表征结果显示, 金银花-蒲公英提取液中纳米相态体系稳定性较差, 可能发生了团聚现象, 但其主要成分质量分数最高, 抑制痤疮丙酸杆菌效果最佳, 能够证实纳米相态为金银花-蒲公英提取液治疗痤疮的有效相态, 为中药提取工艺的科学性和合理性提供基础。

关键词: 金银花; 蒲公英; 有效相态; 痤疮丙酸杆菌; 纳米相态; 真溶液相态; 沉淀相态; 绿原酸; 菊苣酸; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 最小抑菌浓度; 最小杀菌浓度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6167-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.007

Determination of contents of major components in different phases of *Lonicerae Japonicae Flos-Taraxaci Herba* extract and screening of effective phases for its inhibitory effect on *Propionibacterium acnes*

ZHAO Shichun, TAO Ying, LU Yi, ZHU Weifeng, LIU Lili, CHEN Lihua, ZANG Zhenzhong, GUAN Yongmei
Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective Through the phase states splitting of Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*, LJF)-Pugongying (*Taraxaci Herba*, TH) extract, the content of the main components (chlorogenic acid, chicoric acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C) in the extract and different phase states (true solution phase, nano phase, precipitated phase) and their inhibitory effect on *Propionibacterium acnes* were studied, and the “effective phase state” of LJF-TH extract in the treatment of acne was screened. **Methods** The phase states separation of LJF-TH extract was carried out by dialysis-centrifugation method, and its appearance, particle size, polydispersity index (PDI), and ζ potential were characterized, and the contents of main components in each phase states were determined by HPLC, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *P. acnes* in each phase states were

收稿日期: 2024-03-06

基金项目: 江西中医药大学博士启动基金(2023WBZR-007); 2023 年度中药学重点学科项目(2023jzdxk016); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(国中医药人教函[2023]85 号); 江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC22S74); 2023 年全国中药特色技术人才培养项目(T20234832005)

作者简介: 赵氏淳, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: zhaoshichun01@163.com

***通信作者:** 臧振中, 博士, 副教授, 主要从事中药制造新工艺和新装备研究。E-mail: zangzhenzhongvip@163.com

管咏梅, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新制剂与新技术研究。E-mail: guanyym2008@163.com

determined. **Results** The particle size of each phase states of LJF-TH extract was the total extract > precipitated phase > nano phase, and the particle size of the true solution phase was not measured. The size of the PDI of each phase states was nano phase > total extract > precipitated phase. The ζ potential magnitude of each phase states was precipitated phase > total extract > nano phase > true solution phase. The content of chlorogenic acid in each phase states was ranked as nano phase > true solution phase > precipitated phase. The order of cichoric acid content was nano phase > true solution phase > precipitated phase. The content of isochlorogenic acid A was ranked as nano phase > true solution phase > precipitated phase. The content of isochlorogenic acid C was ranked as nano phase > precipitated phase > true solution phase. The antibacterial results of the LJF-TH total extract were consistent with those of the nano phase, and the effect was the best. The sterilization effect was the best for the total extract, followed by the nano phase. **Conclusion** The physical characterization results showed that the nano phase system in LJF-TH extract was less stable and may have agglomerated phenomenon, but its main component content was the highest, and the inhibition effect of *P. acnes* was the best, which could confirm that the nano phase was an effective phase in the treatment of acne in LJF-TH extract, providing a basis for the science and rationality of extraction technology of traditional Chinese medicine.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; *Taraxaci Herba*; effective phase states; *Propionibacterium acnes*; nano phase; true solution phase; precipitated phase; chlorogenic acid; chicoric acid; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration

为了发挥中药间的协同或拮抗作用,传统中药通常按照君、臣、佐、使进行配伍组方。已有实验证实,中药单煎与合煎在化学成分、药效、临床疗效方面有一定差异^[1]。为了阐释中药药效物质基础,大多研究集中在中药化学成分的测定、药理活性测试、中药血清药物化学研究等^[2],往往忽略了煎煮过程中物理结构的改变。多数中药均含有黄酮类、生物碱类、皂苷类、多糖类、有机酸类等化合物,其中的分子可通过氢键、范德华力、 π - π 作用等非共价键的作用,使分子间自发形成聚集体^[3],形成游离态、结合态、络合态等多种结构形态。在一定环境下,成分间相互作用而形成的相对稳定的构造形式称为相态,这也是结构中药学领域研究的一部分^[4],对中药提取液相态进行研究,有利于为阐释中药药效物质基础提供新思路。金银花 *Lonicera japonica* Thunb.与蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz.具有清热解毒、消肿散结的功效,均可用于疮痈肿毒,二药配对,相须为用,作用效果更佳。五味消毒饮、银翘解毒汤及外用制剂复方黄柏涂剂、消痤膏在临床上治疗痤疮效果显著,其组方中均有金银花-蒲公英相须使用^[5-7]。通过筛选 2011—2020 年中国期刊全文数据库(CNKI)发表的中医药治疗痤疮的 369 条文献中,金银花和蒲公英的使用频数排在前 5 位,为治疗痤疮高频药物^[8]。说明两药相须使用用于治疗痤疮的前景广阔。目前,对于金银花-蒲公英提取研究仅局限于对其提取时间、提取次数、提取溶剂等工艺的优化^[9],但对于金银花-蒲公英有效成分在其提取过程中分子的存在形式研究较少。因此,本研究以金银花-蒲公英提取液为研究对象,

对其提取液进行相态拆分及表征,同时采用 HPLC 法对各相态中的主要成分绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 进行含量测定,并通过测定各相态对痤疮丙酸杆菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)及最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC),筛选出金银花-蒲公英提取液治疗痤疮的有效相态,为中药提取工艺的科学性和合理性提供基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZNCL-BS 型智能磁力搅拌器,河南胜博仪器设备有限公司;BSA124S 型分析天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;Zano-90 型马尔文激光粒径检测仪,英国 Malvern 公司;KQ3200E 型超声波清洗器,昆明市超声仪器有限公司;Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;TGL-20MC 型台式高速冷冻离心机,湖南湘鑫仪器仪表有限公司;N-1300 型旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;Bx53 型显微镜,日本 Olympus 公司;BHP-9272A 型立式电热恒温培养箱,上海丙林电子科技有限公司;JB-CJ-1FX 型超净工作台,苏州佳宝净化工程设备有限公司。

1.2 药物与试剂

蒲公英(批号 221127)、金银花(批号 221221)购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学邓可众教授鉴定,金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *L. japonica* Thunb.的花蕾,蒲公英为菊科蒲公英属植物蒲公英 *T. mongolicum* Hand. -Mazz.的干燥全草,各饮片质量经本课题组前期检测均符合要求;

痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* 购自商城北纳创联生物科技有限公司, 菌种编号 BNCC336649, 批号 220921。

对照品绿原酸 (批号 RDD-L007001908029)、菊苣酸 (批号 RDD-D09602012028)、异绿原酸 A (批号 RDD-Y06802109007)、异绿原酸 C (批号 RDD-Y07002105012) 均购自成都普菲德生物技术有限公司, 所有对照品质量分数均大于 98%; 碳酸氢钠 (批号 20220115) 购自西陇科学股份有限公司; 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA- Na_2 , 批号 20200103) 购自国药集团化学试剂有限公司; 哥伦比亚血平板 (批号 20230405) 购自商城北纳创联生物科技有限公司; 200 D 透析袋 (截留相对分子质量 200)、革兰染色试剂盒 (批号 20230508) 购自北京索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 购自美国 Tedia 公司; 硫乙醇酸盐流体培养基购自广东环凯微生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 金银花-蒲公英提取液相态拆分

2.1.1 透析袋前处理 将截留相对分子质量 200 的透析袋剪成 20 cm 的小段, 在 1 000 mL 含有 2% 碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA- Na_2 (pH 8) 中将透析袋煮沸 10 min, 蒸馏水彻底清洗透析袋, 洗净后放在 1 mmol/L 的 EDTA- Na_2 (pH 8) 中煮沸 10 min。冷却后, 放在 50% 乙醇中 4 ℃ 保存, 确保透析袋始终浸没在溶液内, 待用。

2.1.2 金银花-蒲公英总提取液的制备 参考中药饮片标准汤剂研究策略^[10], 金银花、蒲公英饮片各称定 5 g, 置于圆底烧瓶中, 加 12 倍量水浸泡 30 min, 回流提取 30 min, 趁热滤过, 药渣加 10 倍量水回流提取 20 min, 趁热用 200 目滤布滤过, 合并滤液, 减压浓缩至 0.5 g/mL (每毫升提取液相当于 0.5 g 饮片), 平行 2 份。金银花-蒲公英提取液相态拆分流程图见图 1。

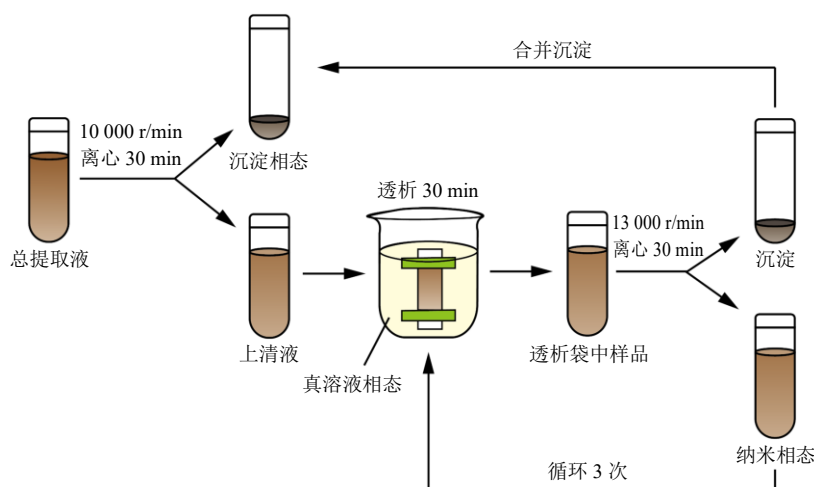


图 1 金银花-蒲公英提取液相态拆分流程图

Fig. 1 Splitting flow chart of *Lonicerae Japonicae Flos* (LJF)-*Taraxaci Herba* (TH) extract liquid phases

2.1.3 沉淀相态的制备 参考文献方法^[11-14], 在室温下, 将“2.1.2”项下适量提取液作为总提取液, 10 000 r/min 离心 (离心半径 9.7 cm) 30 min, 取沉淀即为沉淀相态。

2.1.4 纳米相态的制备 将“2.1.3”项下离心后的上清液加入到透析袋 (截留相对分子质量 200) 后, 放置于装有 200 mL 超纯水的烧杯中透析 30 min, 取出透析袋中样品, 13 000 r/min 高速离心 (离心半径 9.7 cm) 30 min, 吸取上清液, 微量沉淀合并于沉淀相态中, 此过程记作 1 次, 实验考察了透析-离心 1~4 次对各相态粒径的影响, 发现透析-离心 2 次以内时, 纳米相态粒径分布部分处于 1 000 nm 左

右, 说明分离不完全, 透析-离心 3 次及以上, 纳米相态分布于 1~100 nm, 符合纳米体系粒径要求, 则重复操作 3 次, 上清液为纳米相态。

2.1.5 真溶液相态的制备 取“2.1.4”项下透析袋外溶液, 即为真溶液相态。

2.1.6 冻干粉的制备 将“2.1”项下制备的总提取液及拆分到的各个相态冷冻干燥 (先 -20 ℃ 预冻 24 h, 冷冻干燥 48 h, 冷冻温度 -50 ℃, 真空度 10~15 Pa), 得到总提取液、真溶液相态、沉淀相态、纳米相态冻干粉, 各个相态冻干粉在总提取液冻干粉中的质量占比分别为 29.94%、6.69%、56.03%, 按照此方法拆分相态 3 批, 保存备用。

2.2 金银花-蒲公英提取液不同相态的表征

2.2.1 性状 对“2.1”项下金银花-蒲公英的总提取液、沉淀相态、纳米相态、真溶液相态进行外观形态观察，并使用激光笔进行丁达尔效应观察。由图 2 可知，金银花-蒲公英总提取液呈棕褐色，液体

较浑浊，采用激光笔照射，丁达尔效应较弱；拆分后的真溶液相态澄清透明，激光笔照射无丁达尔效应出现；纳米相态呈棕色较澄清，且丁达尔效应较强；沉淀相态为棕褐色，液体浑浊，静置后有沉淀产生，丁达尔效应较弱。

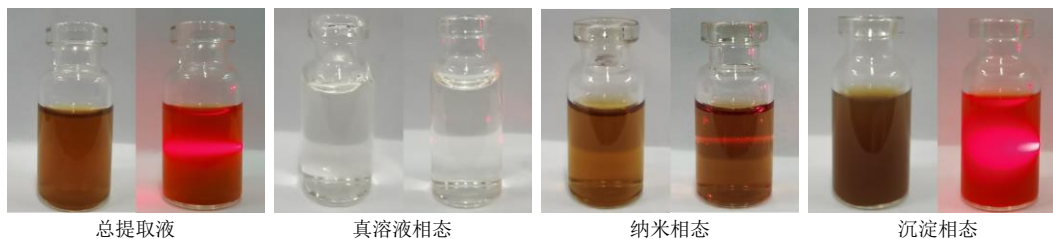


图 2 金银花-蒲公英提取液不同相态外观形态及其丁达尔效应图

Fig. 2 Appearance and morphology of different phase states of LJF-TH extract and their Tyndall effects

2.2.2 不同相态粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位的测定 室温下使用激光粒度仪测定“2.1”项下 3 批金银花-蒲公英总提取液、沉淀相态、纳米相态、真溶液相态的粒径、PDI 及 ζ 电位，每个样品重复测量 3 次，测定结果见表 1，粒径分布见图 3。各相态粒径平均值为金银花-蒲公英总提取液>沉淀相态>纳米相态，真溶液相态未测定到粒径，各相态粒径大小与各分散体系微粒大小要求一致；各相态 PDI 平均值为纳米相态>总提取液>沉淀相态，已知 PDI 越小，表明粒径越均匀，纳米相态 PDI 为 1，说明纳米相态体系中可能出现了团聚现象，沉淀相态 PDI 较小，体系粒径较均匀；各相态 ζ 电位平均值为沉淀相态>总提取液>纳米

相态>真溶液相态， ζ 电位越大，颗粒间的电荷排斥力也越大，越不容易发生凝聚，此结果与 PDI 结果一致，真溶液相态体系不稳定，纳米相态容易出现团聚现象，沉淀相态相对于其他相态较为稳定。

2.3 金银花-蒲公英提取液不同相态中主要成分含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品绿原酸 0.48 mg、菊苣酸 0.44 mg、异绿原酸 A 0.45 mg、异绿原酸 C 0.49 mg 分别置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度线，摇匀；各取 2 mL 至 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度线，摇匀，得到含有绿原酸 9.60 $\mu\text{g/mL}$ 、菊苣酸 8.98 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 A 8.90 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 C 9.80 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称定“2.1.6”项下总提取液、沉淀相态、纳米相态、真溶液相态冻干粉各 2 mg，置于 10 mL 量瓶中，加水定容至刻度线，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.3.3 色谱条件 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱：0~11 min, 11%乙腈；11~13 min, 11%~17%乙腈；13~24 min, 17%~20%乙腈；24~30 min, 20%~30%乙腈；30~35 min, 30%~100%乙腈；检测波长为 327 nm；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量 1.0 mL/min；进样量 5 μL 。

2.3.4 线性关系考察 分别精密称取绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量，采用甲醇将绿原酸配制成质量浓度分别为 37.00、18.50、9.25、4.63、2.31、1.16、0.58 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液；将菊苣酸配制成质量浓度分别为 49.60、24.80、

Table 1 Measurement results of particle size, PDI, and ζ potential of each phase of LJF-TH extract ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
总提取液	2 027.00 $\pm$ 16.25	0.37 $\pm$ 0.03	-17.10 $\pm$ 0.31
真溶液相态	—	—	-9.07 $\pm$ 1.41
纳米相态	38.51 $\pm$ 0.74	1.00 $\pm$ 0.00	-10.00 $\pm$ 0.25
沉淀相态	1 489.00 $\pm$ 13.89	0.23 $\pm$ 0.03	-21.00 $\pm$ 0.17

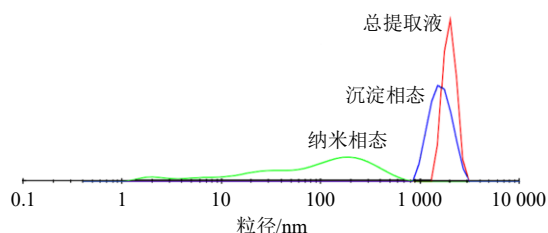


图 3 金银花-蒲公英总提取液及不同相态的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of LJF-TH total extract and different phases

12.40、6.20、3.10、1.55 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液；将异绿原酸 A 配制成质量浓度分别为 55.30、27.65、13.83、6.91、3.46、1.73、0.86 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液；将异绿原酸 C 配制成质量浓度分别为 57.20、28.60、14.30、7.15、3.58、1.79、0.89 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。按“2.3.3”项下方法操作，测定峰面积。以各对照品质量浓度为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ）建立线性回归方程，结果分别为绿原酸 $Y=9.0375X-35.152$ ， $R^2=0.9997$ ，线性范围 0.58~37.00 $\mu\text{g/mL}$ ；菊苣酸 $Y=13.4090X-153.190$ ， $R^2=0.9996$ ，线性范围 1.55~49.60 $\mu\text{g/mL}$ ；异绿原酸 A $Y=9.9793X-77.713$ ， $R^2=0.9998$ ，线性范围 0.86~55.30 $\mu\text{g/mL}$ ；异绿原酸 C $Y=8.5554X-68.344$ ， $R^2=0.9997$ ，线性范围 0.89~57.20 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度考察 精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液 0.5 mL，按“2.3.3”项下方法操作，测定峰面积，连续测定 6 次，计算绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 0.10%、0.18%、0.23%、0.10%，结果表明方法精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取“2.3.2”项下总提取液冻干粉制备的供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定，计算绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 0.18%、0.41%、0.40%、0.85%，结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 精密称定“2.1.6”项下总提取液冻干粉 6 份，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件进样测定峰面积，计算得绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 质量分数的 RSD 分别为 0.08%、0.32%、0.17%、0.33%，结果表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 精密称定“2.1.6”项下总提取液冻干粉 6 份，每份 1 mg，分别加入一定量混合对照品溶液（含绿原酸 18.5 $\mu\text{g/mL}$ 、菊苣酸 24.8 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 A 27.65 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 C 28.6 $\mu\text{g/mL}$ ）1 mL，按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件进行测定，记录色谱峰面积，计算得绿原酸的平均加样回收率为 101.90%，RSD 为 1.52%；菊苣酸的平均加样回收率为 97.21%，RSD 为 1.39%；异绿原酸 A 的平均加样回收率为 102.31%，RSD 为 0.98%；异绿原酸 C 的平均加样回收率为 102.97%，RSD 为 1.67%。

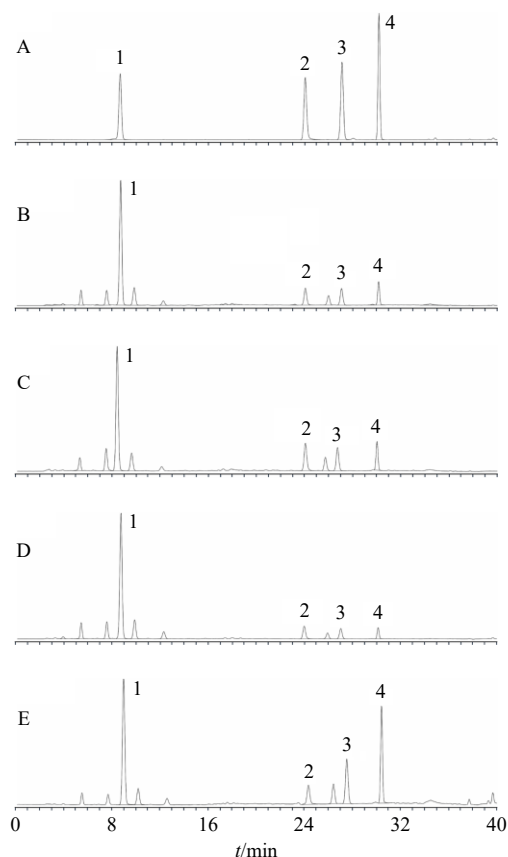
2.3.9 主要成分含量测定 取总提取液及各个相态

各 3 份，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.3”项下色谱条件进样测定峰面积，计算金银花-蒲公英提取液及各个相态中 4 种主要成分的含量。色谱图见图 4，测定结果见表 2。

各相态中绿原酸质量分数排序为纳米相态>真溶液相态>沉淀相态；菊苣酸质量分数排序为纳米相态>真溶液相态>沉淀相态；异绿原酸 A 质量分数排序为纳米相态>真溶液相态>沉淀相态；异绿原酸 C 质量分数排序为纳米相态>沉淀相态>真溶液相态；可见，金银花-蒲公英提取液中纳米相态的主要成分含量最高。

2.4 金银花-蒲公英提取液不同相态对痤疮丙酸杆菌的抑制作用

2.4.1 痤疮丙酸杆菌的活化与菌液的制备 将痤疮丙酸杆菌冻干粉安瓿管表面消毒后在安全柜中打



A-混合对照品；B-总提取液；C-纳米相态；D-真溶液相态；E-沉淀相态；1-绿原酸；2-菊苣酸；3-异绿原酸 A；4-异绿原酸 C。
A-mixed reference substances; B-total extract; C-nano phase; D-true solution phase; E-precipitated phase; 1-chlorogenic acid; 2-chicoric acid; 3-isochlorogenic acid A; 4-isochlorogenic acid C.

图 4 金银花-蒲公英总提取液及不同相态 HPLC 图
Fig. 4 HPLC graphs of LJF-TH total extract and different phase states

表 2 金银花-蒲公英总提取液及不同相态主要成分含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Determination results of content of main components of LJF-TH total extract and different phase states ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取液组分	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	绿原酸	菊苣酸	异绿原酸 A	异绿原酸 C
总提取液	11.14±0.03	1.56±0.00	1.29±0.04	1.26±0.10
纳米相态	6.51±0.36	0.99±0.05	0.74±0.04	0.68±0.03
真溶液相态	2.34±0.09	0.28±0.01	0.17±0.11	0.13±0.01
沉淀相态	0.69±0.02	0.12±0.00	0.13±0.01	0.30±0.01

开, 吸取已置于厌氧环境中平衡 24 h 的无菌水 0.5 mL, 打入冻干管中, 充分溶解菌粉后, 吸取菌液打入已灭菌的哥伦比亚血平板中, 无氧条件下于 37 ℃培养 72 h 后, 挑取血平板上的单个菌落采用革兰染色, 显微镜下观察, 呈微弯、棒状、一端钝圆、另一端尖细的革兰阳性杆菌, 连续培养至第 3 代, 备用。用生理盐水洗脱第 3 代痤疮丙酸杆菌, 制成菌液, 取部分菌液稀释之后进行培养计数, 得出菌液浓度。使用磷酸盐缓冲液稀释菌液至一定倍数后, 使终浓度达到 1×10^6 CFU/mL 备用。

2.4.2 MIC 及 MBC 的测定 采用微量肉汤稀释法测定^[15], 称取金银花-蒲公英各相态冻干粉用硫乙醇酸盐流体培养基稀释成 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20 mg/mL。将稀释后的药液 100 μL 依次加入 96 孔板中, 第 11 孔和第 12 孔加入 100 μL 硫乙醇酸盐液体培养基。将 1~10 孔和 12 孔中每孔中加入 10 μL 的痤疮丙酸杆菌菌液, 混合均匀后, 以第 11 孔为阴性对照, 第 12 孔为阳性对照。置恒温培养箱中于 37 ℃无氧环境中恒温培养 72 h, 观察结果, 通过肉眼观察, 药物最大稀释管中菌株不生长者为 MIC。将 $\geq$ MIC 药物质量浓度的含菌培养液涂布于哥伦比亚血平板中, 置恒温培养箱中于 37 ℃无氧环境中恒温培养 72 h, 观察有无细菌生长, 以平板计数 ≤ 5 个菌落的质量浓度为 MBC。通过观察实验 96 孔板, 结果见表 3, 可知金银花-蒲公英总提取液、纳米相态、真溶液相态、沉淀相态对痤疮丙酸杆菌的 MIC 分别为 25、25、50、100 mg/mL, 总提取液与纳米相态抑痤疮丙酸杆菌的 MIC 结果一致, 较为明显。总提取液 MBC 为 25 mg/mL, 纳米相态 MBC 为 50 mg/mL, 真溶液相态及沉淀相态 MBC 为 100 mg/mL, 总提取液杀菌效果最佳, 其次为纳米相态。

表 3 金银花-蒲公英提取液各相态对痤疮丙酸杆菌 MIC 测定结果

Table 3 Determination results of MIC on *P. acnes* in each phase of LJF-TH extracts

药物质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	总提取液		纳米相态		真溶液相态		沉淀相态	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
100.00	-	-	-	-	-	-	-	-
50.00	-	-	-	-	-	+	+	+
25.00	-	-	-	+	+	+	+	+
12.50	+	+	+	+	+	+	+	+
6.25	+	+	+	+	+	+	+	+
3.13	+	+	+	+	+	+	+	+
1.56	+	+	+	+	+	+	+	+
0.78	+	+	+	+	+	+	+	+
0.39	+	+	+	+	+	+	+	+
0.20	+	+	+	+	+	+	+	+

“-”表示无菌生长; “+”表示有菌生长。
“-” indicates sterile colonies; “+” indicates colonies.

3 讨论

汤剂作为传统经典剂型之一, 在临床上应用广泛, 具有多效性、吸收快等优势。已有研究发现中药提取液中的成分之间能够相互作用从而发生聚集或自组装形成聚集体, 其中自组装纳米成分存在较为普遍^[16]。此外纳米相态粒径较小, 对提高制剂载药量、促进药物吸收、提高药物生物利用度均有明显优势^[17]。本研究表明, 金银花-蒲公英提取液纳米相态主要成分含量占比最大, 且抑菌效果与总提取液相当, 因此通过拆分总提取液纳米相态能够合理解决总提取液颜色较深、制备成外用剂型时总提取液的载药量限度等问题, 为下一步制剂成型研究奠定基础。中药提取液中富含的皂苷、多糖、生物碱、黄酮、氨基酸等成分在纳米自组装过程中都起着一定的作用, 例如皂苷在一定情况下能够自组装形成胶束, 因皂苷具有亲脂性, 糖链具有亲水性, 皂苷表面活性会将疏水药物包裹于疏水心中, 从而作为药物的载体发挥增溶作用; 多糖中亲水性聚合物链与疏水段接枝时能够形成两亲性共聚物, 与水接触时其两亲分子会通过疏水基团之间进行分子内或分子间的关联自发形成胶束^[3]。而金银花-蒲公英中富含黄酮类、萜类、皂苷类、多糖类等成分^[18-19], 猜测此类成分可能参与了纳米相态形成过程。

通过对金银花-蒲公英各相态的粒径、PDI、ζ 电位测定结果来看, 纳米相态 PDI 为 1, ζ 电位较小, 代表纳米相态体系并不均匀稳定, 有纳米团聚现象

发生,其原因可能是水加热煎煮过程中,大分子成分与同类成分或小分子成分间剧烈相互作用破坏了原热力学平衡态并发生了二次平衡,生成不同粒径的纳米相态聚集体结构^[20],但有研究显示,这些聚集体能够维持胃肠道环境,并且与药效靶点活性相关^[21]。从金银花-蒲公英各相态主要成分含量测定结果分析,纳米相态中绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 分别占总提取液的 58.44%、63.46%、57.36%、53.97%,均超过总体含量的 50%,说明金银花-蒲公英提取液中主要成分绝大部分存在于纳米相态中。在提取过程中,浸泡时间、提取时间等因素可能会影响各相态中的主要成分含量,还需进一步探究。绿原酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对分子质量分别为 354.31、474.37、516.45、516.45,本研究所选透析袋截留相对分子质量为 200,能够最大限度保留主要成分,且这些主要成分可能会通过分子间的作用吸附于纳米粒上,从而保留于纳米相态中。金银花-蒲公英均具有抗菌作用,在相同质量浓度下,抑制痤疮丙酸杆菌结果与含量测定结果一致,均为纳米相态最优,说明对痤疮丙酸杆菌的抑制作用与所选主要成分呈正相关。

综上所述,本研究通过透析-离心法成功对金银花-蒲公英提取液进行了相态拆分,通过分析总提取液及不同相态(真溶液相态、纳米相态、沉淀相态)中存在的主要成分含量及其对痤疮丙酸杆菌的抑制作用,筛选出金银花-蒲公英提取液纳米相态为治疗痤疮的“有效相态”,为中药提取工艺的科学性和合理性提供基础,同时为金银花-蒲公英药物制剂的开发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 崔景朝,赵自明. 中药配方颗粒研究进展 (II): 中药单煎与合煎对比研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 240-245.
- [2] 宋紫腾,卜睿臻,韩彦琪,等. 基于体外细胞模型的痹祺胶囊药效物质基础研究 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7673-7686.
- [3] 管庆霞,周小影,吕邵娃,等. 中药复方汤剂多成分自组装纳米相态的形成原理及现状探析 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29(11): 872-880.
- [4] 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.
- [5] 张明明,马定建,宁星,等. 中医经典方剂治疗痤疮的现代临床应用 [J]. 中国医疗美容, 2024, 14(03): 123-125.
- [6] 郑沪淋,郑锦秀,谢雪榕. 复方黄柏涂剂湿敷对肺胃热盛证面部脂溢性皮炎的临床疗效分析 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2022, 21(5): 433-436.
- [7] 范晓明. 清热消痤汤配合中药外敷治疗痤疮临床研究 [J]. 中医学报, 2016, 31(12): 2007-2010.
- [8] 张新荣. 中医药治疗痤疮的数据挖掘及其 Meta 分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [9] Sun Y, Ding S, Huang H, et al. Ionic liquid-based enzyme-assisted extraction of chlorogenic acid from *Flos Lonicera Japonicae* [J]. *BIOB*, 2017, 4(1): 45.
- [10] 岳倩侠,孙叶芬,杨爽,等. 基于药材-饮片-标准汤剂质量传递过程的白芍质量标志物研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 553-560.
- [11] 郭玉岩,李春成,孙爽,等. “甘草-马钱子”配伍前后及其拆分相态指纹图谱对比研究 [J]. 中医药学报, 2020, 48(10): 1-6.
- [12] 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.
- [13] 尚尔雨,马晓乾,于新,等. 六君子汤相态拆分及表征研究 [J]. 药学研究, 2021, 40(4): 216-220.
- [14] 窦金金,张喜武,王璐璇,等. 以有效相态为视角的生脉饮有效迭代相态研究及药效学验证 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 993-999.
- [15] 朱梅芳,唐宇,郑琴,等. 不同提取方式对连翘、荆芥、薄荷挥发油成分及抗菌活性的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2845-2854.
- [16] 胡静雯,贾国香,董亚倩,等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7307-7316.
- [17] 余文静,陈丹,熊朝栋,等. 三叶青地上部分抗炎提取物固体纳米晶生物利用度及药动学研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 385-392.
- [18] 关秀锋,王锐,李晓龙,等. 金银花的化学成分与药理作用研究新进展 [J]. 化学工程师, 2020, 34(4): 59-62.
- [19] 许先猛,董文宾,卢军,等. 蒲公英的化学成分和功能特性的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1623-1627.
- [20] 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.
- [21] Zhuang Y, Yan 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.

[责任编辑 郑礼胜]