

## 黄芩汤相态拆分及其抗皮肤癣菌作用研究

何沂灿<sup>1,2</sup>, 申宝德<sup>4</sup>, 沈成英<sup>2\*</sup>, 袁海龙<sup>1,3\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院)药学部, 江西 南昌 330006
3. 中国人民解放军空军特色医学中心 药学部, 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, 江西 南昌 330004

**摘要:**目的 对黄芩汤(Huangqin Decoction, HD)相态进行拆分并对不同相态抗皮肤癣菌作用进行考察。方法 采用高速离心结合膜透析法将黄芩汤拆分为沉淀相态(HD precipitation phase, HD-P)、真溶液相态(HD solution phase, HD-S)以及纳米相态(HD nano phase, HD-N),并对各相态进行表征;采用HPLC法、苯酚-硫酸法、二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)分别测定了黄芩汤中主要有效成分、多糖、蛋白在不同相态中的含量,采用Franz扩散池考察了不同相态中主要成分的释放特性;采用微量稀释法考察黄芩汤不同相态对4种临床常见皮肤癣菌的抗菌作用,并以须癣毛癣菌为模型菌株,系统考察了黄芩汤不同相态对其菌丝生长、孢子萌发、生物合成的影响。结果 10个主要成分(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)和蛋白、多糖主要分布在HD-N中;6个成分作为体外释放检测指标,芍药内酯苷、芍药苷的累积溶出率:HD-S>HD-N>黄芩汤>HD-P;芹糖甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸的累积溶出率:HD-N>黄芩汤>HD-S>HD-P;各相态最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC):HD-N(0.78~1.56 mg/mL)<黄芩汤(1.56~6.25 mg/mL)<HD-S(12.50~25.00 mg/mL)<HD-P(>100.00 mg/mL);黄芩汤不同相态对须癣毛癣菌菌丝生长、孢子萌发、生物合成的抑制作用:HD-N最佳( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),其次为黄芩汤、HD-S、HD-P。结论 黄芩汤不同相态的抗菌作用强弱与其主要成分分布、体外累积溶出密切相关且呈正相关关系,即主要成分含量越高、成分累积溶出率越高的相态抗菌作用越强。

**关键词:**黄芩汤;纳米相态;成分分布;体外溶出;抗皮肤癣菌作用;多糖;蛋白;须癣毛癣菌;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

中图分类号:R283.6 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2025)09-3099-10

DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.008

## Study on phase separation and anti-dermatophyte effect of Huangqin Decoction

HE Yican<sup>1,2</sup>, SHEN Baode<sup>4</sup>, SHEN Chengying<sup>2</sup>, YUAN Hailong<sup>1,3</sup>

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Department of Pharmacy, Jiangxi Provincial People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Nanchang 330006, China
3. Department of Pharmacy, Air Force Medical Center, PLA, Beijing 100142, China
4. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract: Objective** To disintegrate the phases of Huangqin Decoction (HD, 黄芩汤) and investigate the anti-dermatophyte effects of different phases. **Methods** HD was split into precipitation phase (HD-P), solution phase (HD-S) and nano phase (HD-N) by high-speed centrifugation combined with membrane dialysis, and each phase was characterized. The contents of HD active components, polysaccharides and proteins in different phases were determined by HPLC, phenol sulfuric acid method and bicinchoninic acid assay

收稿日期:2024-12-20

基金项目:江西省自然科学基金青年项目(20232BAB216124);江西省中医药中青年骨干人才培养对象(赣中医药科教字〔2022〕7号);赣鄱俊才支持计划-高层次高技能领军人才培养工程(赣人社字〔2024〕69号)

作者简介:何沂灿(2001—),女,硕士研究生,研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术应用研究。Tel:18083452487 E-mail:hychhh26@163.com

\*通信作者:沈成英,副主任药师,博士,硕士生导师,研究方向为中药纳米给药系统研究。Tel:(0791)86891529 E-mail:984075899@qq.com  
袁海龙,博士,研究员,博士生导师,研究方向为中药新型给药系统。Tel:(010)66928505 E-mail:yhlpharm@126.com

(BCA). The release characteristics of the main components in different phase states were investigated by Franz diffusion cell. Microdilution method was used to investigate the antifungal effects of different phases of HD on four common clinical dermatophytes, and *Trichophyton mentagrophytes* was used as the model strain. The effects of different phases of HD on mycelial growth, spore germination and biomass synthesis were studied. **Results** A total of 10 components (albiflorin, paeoniflorin, liquiritin apioside, baicalin, melaleuca glycoside A, wogonoside, baicalein, glycyrrhizic acid, wogonin and oroxylin A), protein and polysaccharide were mainly distributed in HD-N. The cumulative dissolution rate of albiflorin and paeoniflorin was HD-S > HD-N > HD > HD-P. The cumulative dissolution rate of liquiritin apioside, baicalin, wogonoside and glycyrrhizic acid was HD-N > HD > HD-S > HD-P; The minimum inhibitory concentration (MIC) of each phase was: HD-N (0.78—1.56 mg/mL) < HD (1.56—6.25 mg/mL) < HD-S (12.50—25.00 mg/mL) < HD-P (> 100.00 mg/mL); The inhibitory effects of different phases of HD on mycelium growth, spore germination and biomass synthesis were as follows: HD-N was the best ( $P < 0.05, 0.01$ ), followed by HD, HD-S and HD-P. **Conclusion** The antifungal activity of different phases of HD is closely and positively related to the distribution of main components and *in vitro* cumulative dissolution, that is, the higher the content of main components and the higher the cumulative dissolution rate of components, the stronger the antifungal effect of phase.

**Key words:** Huangqin Decoction; nano-phase state; component distribution; dissolution *in vitro*; anti-dermatophyte effect; polysaccharide; protein; *Trichophyton mentagrophytes*; albiflorin; paeoniflorin; liquiritin apioside; baicalin; melaleuca glycoside A; wogonoside; baicalein; glycyrrhizic acid; wogonin; oroxylin A

皮肤癣菌病是一类由皮肤癣菌侵犯人类和动物皮肤角质层、毛发、甲板等所引起的感染性疾病，临床上常表现为不同程度的红斑、水疱、鳞屑、角质增厚，并伴有剧烈的瘙痒<sup>[1-2]</sup>。该疾病反复发作、难以治愈，严重影响患者的生活质量。目前，临床上用于治疗皮肤癣菌病的药物主要有氟康唑、酮康唑、特比萘芬 (terbinafine, TBF) 等传统抗真菌药物<sup>[3-4]</sup>。但是这些药物长期使用易导致真菌耐药且不良反应大，其临床应用受到一定限制。因此，开发新型抗皮肤癣菌药物具有重要的临床意义。

中药抗真菌具有疗效好、不良反应少、不易耐药等优势<sup>[5-7]</sup>。课题组前期研究发现经典名方黄芩汤 (Huangqin Decoction, HD) 能够显著抑制临床常见皮肤癣菌如红色毛癣菌、须癣毛癣菌、犬小孢子菌等的菌丝生长、生物量合成、孢子萌发等，表现出较好的抗皮肤癣菌活性<sup>[8]</sup>；在结构中药学理论的指导下，将黄芩汤进行了相态拆分并对黄芩汤不同相态抗皮肤癣菌作用的谱效关系进行了研究，初步证明了黄芩汤抗皮肤癣菌的作用强弱与其成分含量及物理相态相关，黄芩汤纳米相态 (HD nano phase, HD-N) 可能是黄芩汤抗菌的活性相态<sup>[9]</sup>。然而，黄芩汤不同相态对药效成分有何影响，HD-N 如何发挥抗皮肤癣菌作用等问题并不清楚。基于此，本研究对黄芩汤进行相态拆分，比较分析黄芩汤不同相态的物质组成及体外释放行为，探究汤剂相态结构对黄芩汤主要成分溶解和释放的影响；以须癣毛癣菌为模型菌种，评价黄芩汤不同相态对其菌丝生长、生物量合成及孢子萌发的抑制作用，进一步明

确 HD-N 的抗皮肤癣菌作用，为开发新型抗皮肤癣菌药物奠定实验基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

LC-2010A 型高效液相色谱仪，日本岛津公司；360ES 225SM-DR (E) 型号电子天平，普利赛斯称重设备有限公司；LX-B50L 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器，合肥华泰医疗设备有限公司；Multiskan FC 型酶标仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；MJX-160B-Z 型霉菌培养箱，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；SCIENTZ-18N/A 型冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；CSB23054 型金尼克超声波清洗器，合肥金尼克机械制造有限公司；精拓 TP-6 型智能透皮试验仪，天津市精拓仪器科技有限公司；S-4800 型扫描电子显微镜 (SEM)，日本 Hitachi 公司；98-1-B 型电子调温电热套，天津市泰斯特仪器有限公司；BY-R20 型高速离心机，北京白洋医疗器械有限公司；Mastersizer 2000 型激光粒度仪、Zetasizer Pro 型纳米粒度电位仪，马尔文帕纳科公司。

### 1.2 材料

黄芩饮片 (批号 24032511, 产地山西)、白芍饮片 (批号 23052506, 产地安徽)、炙甘草饮片 (批号 22051001, 产地内蒙古)、大枣饮片 (批号 23112115, 产地山东)，以上饮片均购自江西彭氏国药堂饮片有限公司。对照品芍药内酯苷 (批号 PS011455)，质量分数  $\geq 98\%$ ，购自成都普思生物科技股份有限公司；对照品芍药苷 (批号 HR16106B1)、蔗糖甘

草昔(批号 HR1718W9)、千层纸素 A 昔(批号 HS14413B1)、黄芩昔(批号 HS81115B1)、黄芩素(批号 HR5717S1)、汉黄芩昔(批号 HR5125S1)、千层纸素 A(批号 HS17116S1)、汉黄芩素(批号 HR20925W3)、甘草酸(批号 HG4398S3), 质量分数均为 98%, 均购自宝鸡辰光生物科技有限公司。二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)法总蛋白定量试剂盒(批号 20240824)购自南京建成生物工程研究所。纤维素透析袋(截留相对分子质量 8 000~10 000、3 500)、TBF(批号 M04HS177029, 质量分数 98%)均购自上海源叶生物科技有限公司; 硫酸, 批号 2021042601, 分析纯, 购自成都市科隆化学品有限公司; 葡萄糖对照品(批号 A501991-0500)、琼脂粉(批号 A505255-0250)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 3-吗啉丙磺酸, 批号 B2223455, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 蛋白胨, 批号 20221226, 购自北京奥博星生物技术有限公司; 磷酸(批号 20210701)、磷酸二氢钾(批号 2206161)、苯酚(批号 20190606)、氢氧化钠(批号 2110281), 分析纯, 均购自西陇科学股份有限公司; RPMI 1640 培养基(批号 2296521)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 吐温-20(批号 223Y011)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 菌株

须癣毛癣菌(编号 XM110)、紫色毛癣菌(编号 ZM2C)、犬小孢子菌(编号 QX11A)、红色毛癣菌(编号 STRB12)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 黄芩汤不同相态的拆分

**2.1.1 黄芩汤提取液的制备** 按质量比 3:2:2:2 称取黄芩 18 g、白芍 12 g、炙甘草 12 g、大枣饮片 12 g, 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, 趁热滤过; 合并 2 次滤液, 浓缩, 制备成含生药 1 g/mL 的黄芩汤提取液, 真空冷冻干燥 24 h, 得黄芩汤浸膏冻干粉。

**2.1.2 黄芩汤不同相态的制备** 按照“2.1.1”项下方法制备黄芩汤提取液, 在 12 000 r/min 离心半径 50 mm 条件下离心 30 min, 收集沉淀, 即得黄芩汤沉淀相态(HD precipitation phase, HD-P)。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 54 mL)中, 随即将透析袋装入加有 1 000 mL 水的烧杯中, 于 25 °C 下以 200 r/min

透析 30 min; 取出透析袋中的样品, 以 12 000 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, 即得黄芩汤真溶液相态(HD solution phase, HD-S)。透析袋中的样品即为黄芩汤纳米相态(HD nanophase, HD-N)。取 HD-P、HD-S、HD-N, 真空冷冻干燥 24 h, 得相应冻干粉, 得率分别为 8.90%、37.72%、49.53%。

### 2.2 黄芩汤不同相态的表征

**2.2.1 粒径测定** 取黄芩汤、HD-P、HD-S 和 HD-N 冻干粉适量, 加水超声(功率 50 W、频率 40 kHz) 5 min 分散后, 采用纳米粒度电位仪测定 HD-N 粒径和 ζ 电位, 激光粒度仪测定 HD-P、黄芩汤粒径及粒径分布 [span,  $span = (d_{0.9} - d_{0.1}) / d_{0.5}$ , 其中,  $d_{0.1}$  表示 10% 的粒子粒径,  $d_{0.5}$  表示 50% 的粒子粒径,  $d_{0.9}$  表示 90% 的粒子粒径]。HD-N 的平均粒径为 (116.50 ± 11.89) nm, 多分散度系数(polydispersity index, PDI) 为 0.34 ± 0.01, ζ 电位为 (-9.61 ± 0.66) mV。HD-S 未测定到粒径数据; HD-P、黄芩汤粒径如表 1 所示, 粒径分布 span 值均大于 1, 表明其粒子大小范围较大, 不均一。

表 1 黄芩汤、HD-P 的粒径及粒径分布 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Particle size and distribution of HD and HD-P ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	$d_{0.1}/\mu\text{m}$	$d_{0.5}/\mu\text{m}$	$d_{0.9}/\mu\text{m}$	span
黄芩汤	7.04 ± 0.02	30.22 ± 0.51	108.84 ± 5.23	3.37 ± 0.12
HD-P	13.22 ± 1.48	49.69 ± 7.67	137.61 ± 15.53	2.52 ± 0.14
HD-S	-	-	-	-

**2.2.2 形态观察** 取黄芩汤、HD-P、HD-S 和 HD-N 冻干粉适量, 涂于铜制样品台上, 表面减压喷金后, 于 SEM 下观察形态并拍照<sup>[9]</sup>。结果见图 1, HD-N 冻干粉呈均匀的球形颗粒, 大小为 100 nm 左右, 而 HD-P、黄芩汤冻干粉均呈不规则的大颗粒, 直径见表 1; 由于 HD-S 以分子形式存在, 冻干粉呈片状, 不成颗粒, 与粒径分析的结果一致。

### 2.3 HPLC 法测定黄芩汤中主要成分并考察其在各相态中的分布

**2.3.1 色谱条件** Shim-pack GIS C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱: 0~13 min, 17%乙腈; 13~25 min, 17%~19%乙腈; 25~26 min, 19%~22%乙腈; 26~42 min, 22%~24%乙腈; 42~43 min, 24%~28%乙腈; 43~53 min, 28%乙腈; 53~65 min, 28%~85%乙腈; 65~80 min, 85%~17%乙腈; 体积流量

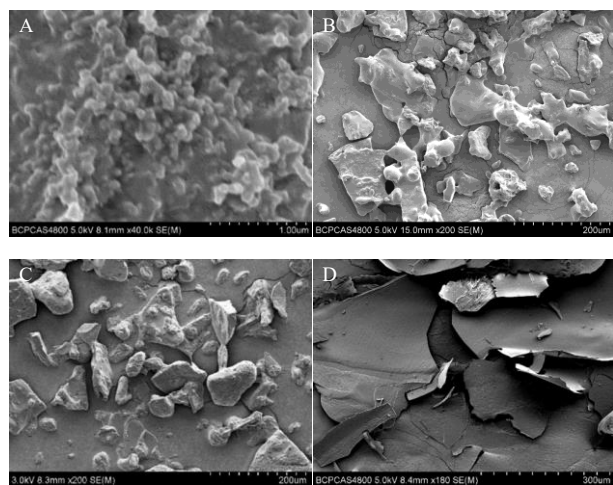


图1 HD-N (A)、HD-P (B)、黄芩汤 (C)、HD-S (D) 的 SEM 图

Fig. 1 SEM images of HD-N (A), HD-P (B), HD (C) and HD-S (D)

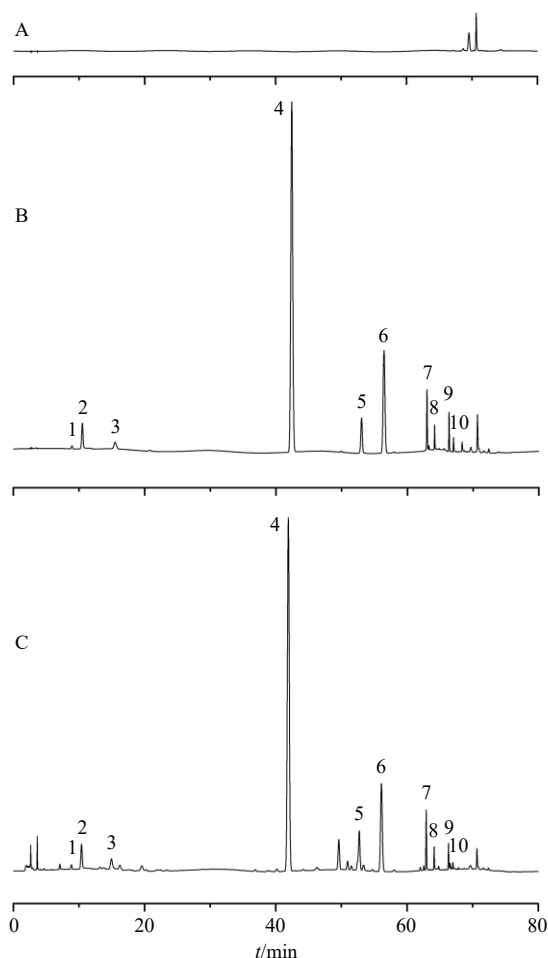
为 1 mL/min; 柱温为 40 °C; 检测波长为 231 nm (芍药内酯苷、芍药苷)、250 nm (甘草酸)、276 nm (芹糖甘草苷、黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A); 进样量为 10  $\mu$ L。

**2.3.2 混合对照品溶液的制备** 称取芍药内酯苷、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 对照品各约 5 mg, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声 (功率 50 W、频率 40 kHz) 5 min 溶解, 定容至刻度线, 摇匀即得各对照品母液。分别取上述 10 种对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 制备成质量浓度分别为 2.52、20.52、10.18、129.00、10.14、30.54、5.10、10.24、2.04、0.80  $\mu$ g/mL 的混合对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取“2.1”项下制备的黄芩汤、HD-P、HD-S、HD-N 冻干粉约 20、20、20、10 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声 (功率 50 W、频率 40 kHz) 溶解, 定容至刻度线, 摇匀, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜, 即得各供试品溶液。

**2.3.4 专属性考察** 取“2.3.2”“2.3.3”项下的混合对照品溶液和黄芩汤供试品溶液适量, 在“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果见图 2。可见 10 个成分的分离效果良好, 且无阴性干扰, 表明该方法专属性良好。

**2.3.5 线性关系考察** 取芍药内酯苷、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 对照品适量,



1-芍药内酯苷; 2-芍药苷; 3-芹糖甘草苷; 4-黄芩苷; 5-千层纸素 A 苷; 6-汉黄芩苷; 7-黄芩素; 8-甘草酸; 9-汉黄芩素; 10-千层纸素 A。  
1-albiflorin; 2-paeoniflorin; 3-liquiritin apioside; 4-baicalin; 5-melaleuca glycoside A; 6-wogonoside; 7-baicalin; 8-glycyrrhizic acid; 9-wogonin; 10-oroxylin A.

图2 溶剂甲醇 (A)、混合对照品溶液 (B) 和黄芩汤样品 (C) 的专属性 HPLC 图

Fig. 2 Specific HPLC profiles of solvent methanol (A), mixed reference solution (B) and HD sample (C)

精密称定, 经甲醇溶解, 逐级稀释制成系列质量浓度梯度的混合对照品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以对照品的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 进行线性回归, 得回归方程分别为芍药内酯苷  $Y=12\ 147.0X-181.51$ ,  $r=0.999\ 2$ , 线性范围 0.25~5.03  $\mu$ g/mL; 芍药苷  $Y=12\ 931.0X+1\ 051.0$ ,  $r=0.999\ 6$ , 线性范围 2.05~41.04  $\mu$ g/mL; 芹糖甘草苷  $Y=12\ 010.0X+4\ 253.30$ ,  $r=0.999\ 2$ , 线性范围 1.02~20.36  $\mu$ g/mL; 黄芩苷  $Y=36\ 895.0X+6\ 249.80$ ,  $r=1.000\ 0$ , 线性范围 12.90~258.00  $\mu$ g/mL; 千层纸素 A 苷  $Y=37\ 797.0X-3\ 753.40$ ,  $r=0.999\ 9$ , 线性范围 1.01~20.28  $\mu$ g/mL; 汉黄芩苷  $Y=$

43 711.0 $X$ +2 436.40,  $r=1.000 0$ , 线性范围 3.05~61.08  $\mu\text{g/mL}$ ; 黄芩素  $Y=52 653.0 X+3 798.0$ ,  $r=0.999 2$ , 线性范围 0.51~10.20  $\mu\text{g/mL}$ ; 甘草酸  $Y=7 996.8 X+1 822.20$ ,  $r=0.999 5$ , 线性范围 1.02~20.48  $\mu\text{g/mL}$ ; 汉黄芩素  $Y=72 677.0 X+775.55$ ,  $r=1.000 0$ , 线性范围 0.20~4.08  $\mu\text{g/mL}$ ; 千层纸素 A  $Y=66 586.0 X+607.96$ ,  $r=0.999 9$ , 线性范围 0.08~1.60  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.3.6 精密度试验** 取“2.3.2”项下混合对照品溶液适量,在“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次,测定各成分的峰面积,计算芍药内酯苷、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 峰面积的 RSD 分别为 1.90%、0.53%、1.02%、0.62%、1.53%、0.67%、2.08%、0.81%、0.71%、0.43%,表明该仪器精密度良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取同一批黄芩汤样品适量,按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录各成分峰面积,计算得到芍药内酯苷、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 峰面积的 RSD 分别为 4.70%、4.61%、3.26%、1.31%、1.65%、1.53%、4.05%、3.43%、5.53%、2.14%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

**2.3.8 重复性试验** 取同一批黄芩汤样品适量,按照“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件对各成分进行测定,计算得到芍药内酯苷、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 质量分数的 RSD 分别为 2.87%、1.50%、1.96%、1.14%、0.88%、1.31%、1.65%、1.43%、1.12%、3.26%,表明该方法重复性良好。

**2.3.9 加样回收率试验** 取已测知 10 个成分含量的同一批黄芩汤样品 6 份,每份 5 mg,精密称定,按 1:1 的比例精密加入各对照品(503  $\mu\text{g/mL}$  芍药内酯苷 20  $\mu\text{L}$ 、513  $\mu\text{g/mL}$  芍药苷 105  $\mu\text{L}$ 、509  $\mu\text{g/mL}$  芹糖甘草苷 70  $\mu\text{L}$ 、516  $\mu\text{g/mL}$  黄芩苷 725  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$  千层纸素 A 73  $\mu\text{L}$ 、509  $\mu\text{g/mL}$  汉黄芩苷 150  $\mu\text{L}$ 、510  $\mu\text{g/mL}$  黄芩素 28  $\mu\text{L}$ 、512  $\mu\text{g/mL}$  甘草酸 50  $\mu\text{L}$ 、510  $\mu\text{g/mL}$  汉黄芩素 8  $\mu\text{L}$ 、500  $\mu\text{g/mL}$  芍药内酯苷 2.6  $\mu\text{L}$ ),加适量甲醇溶解,并定容至 5 mL,摇匀过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,按“2.3.1”项下色谱条

件进行测定,记录各成分峰面积,并计算其加样回收率。结果显示芍药内酯苷、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 的平均加样回收率分别为 94.47%、98.50%、100.43%、100.10%、96.08%、96.79%、103.58%、100.88%、96.04%、99.74%,RSD 分别为 4.58%、3.32%、4.96%、2.43%、2.89%、3.36%、0.99%、5.51%、6.04%、1.95%,表明该方法的准确度良好。

**2.3.10 黄芩汤中主要成分在各相态中的分布考察** 取黄芩汤、HD-P、HD-S、HD-N 冻干粉各 3 批,分别取 20、20、20、10 mg 并精密称定,按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录各成分峰面积,并计算各成分在各相态中的质量分数(质量分数 a=各成分在黄芩汤或相态中总质量/饮片总质量;质量分数 b=各成分在相态中总质量/各成分在黄芩汤中总质量)。结果见表 3,黄芩汤中主要成分主要集中在 HD-N 中;但是各成分的含量在各相态中的占比与其成分极性相关,芍药内酯苷和芍药苷为水溶性成分,有 20%~30%存在于 HD-S 中,约有 60%分布于 HD-N 中;而其余难溶性成分超过 75%存在于 HD-N 中。

## 2.4 黄芩汤中蛋白和多糖在不同相态中的分布考察

**2.4.1 BCA 法测定蛋白含量** 参考文献报道的测定蛋白含量方法<sup>[10]</sup>,精密称取黄芩汤、HD-P、HD-S、HD-N 各 5 mg,置于 10 mL 量瓶中,加蒸馏水超声溶解并定容至刻度线,摇匀,作为样品,蒸馏水作为空白对照,524  $\mu\text{g/mL}$  蛋白作为对照品。依据 BCA 试剂盒说明书操作,将试剂一应用液和试剂二按体积比 50:1 混合均匀作为 BCA 工作液,分别取蒸馏水、对照品、样品各 10  $\mu\text{L}$ ,分别与 250  $\mu\text{L}$  BCA 工作液混合均匀后,于 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 30 min,在 562 nm 波长下测定吸光度(A)值,通过公式  $C_{\text{样品}}=(A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}}-A_{\text{空白}})\times C_{\text{对照}}$  计算各样品中蛋白含量(C)。结果如表 4 所示,结果显示 HD-P、HD-S、HD-N 中蛋白分别占浸膏中蛋白总量的 8.12%、21.52%、76.13%,蛋白主要分布在 HD-N 中,其次是 HD-S、HD-P。

**2.4.2 苯酚-硫酸法测定多糖含量** 精密称定葡萄糖对照品 10 mg 置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水超声溶解并定容至刻度线,作为 0.1 mg/mL 葡萄糖对照品溶液。分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 葡萄糖对照品溶液,置于试管中并用蒸馏水补足至 1 mL,

表3 10个成分在黄芩汤及其各相态中的含量分布 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Content distribution of 10 components in HD and its different phase states ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	质量分数a/(mg·g <sup>-1</sup> )									
	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
黄芩汤	0.80±0.04	4.28±0.09	3.57±0.14	31.21±0.50	3.13±0.09	6.57±0.03	1.10±0.02	2.74±0.24	0.27±0.01	0.06±0.00
HD-P	0.07±0.01	0.34±0.04	0.27±0.02	2.35±0.25	0.23±0.02	0.48±0.05	0.11±0.01	0.29±0.05	0.02±0.00	0.01±0.00
HD-S	0.24±0.02	1.06±0.08	0.31±0.02	3.00±0.25	0.30±0.02	0.57±0.04	0.04±0.01	0.27±0.01	0.02±0.00	0.00±0.00
HD-N	0.49±0.04	2.78±0.04	2.93±0.09	23.99±0.44	2.53±0.07	5.22±0.13	0.99±0.08	2.28±0.33	0.24±0.01	0.06±0.00

样品	质量分数b/%									
	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
HD-P	8.29	8.01	7.60	7.53	7.44	7.25	10.24	10.61	9.17	10.55
HD-S	30.50	24.85	8.60	9.63	9.64	8.72	3.42	9.92	6.17	4.87
HD-N	61.57	65.02	82.10	76.88	80.77	79.57	90.77	83.39	92.23	91.48

表4 蛋白、多糖在黄芩汤及其各相态中的含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Content of protein and polysaccharide in HD and its different phase states ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	质量分数a/(mg·g <sup>-1</sup> )		质量分数b/%	
	蛋白	多糖	蛋白	多糖
黄芩汤	175.02±8.45	174.50±4.92		
HD-P	14.21±1.27	12.70±1.84	8.12	7.28
HD-S	37.65±0.40	66.90±2.86	21.52	37.88
HD-N	133.23±4.42	77.80±8.09	76.13	44.59

加入5%苯酚1 mL,混匀,加入5.0 mL硫酸,摇匀,在100℃条件下水浴30 min,冰水浴至冷却。紫外全波长扫描葡萄糖对照品溶液,确定其最大吸收波长为485 nm<sup>[11]</sup>。在485 nm波长下测定各质量浓度葡萄糖对照品的A值,以葡萄糖对照品质量浓度为横坐标(X),A值为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.0115X-0.0148$ , $r=0.9958$ ,线性范围20~100 μg/mL。

精密称定黄芩汤、HD-P、HD-S、HD-N各5 mg,每个样品平行3份,置于50 mL量瓶中,加蒸馏水超声溶解并定容至刻度线,摇匀作为样品。在485 nm波长下测定样品A值并计算其含量。结果如表4所示,结果显示HD-P、HD-S、HD-N中多糖分别占浸膏的7.28%、37.88%、44.59%,多糖在各相态中分布依次为HD-N>HD-S>HD-P。

### 2.5 黄芩汤不同相态的体外释放实验

采用Franz扩散池法考察黄芩汤不同相态对其主要成分的体外释放行为的影响。扩散池的有效扩散面积为1.33 cm<sup>2</sup>,接收池容量16 mL。设置水浴温度为32℃,转速350 r/min<sup>[12-13]</sup>。以透析袋(截留相对分子质量为3 500)作为滤膜,磷酸盐缓冲液

(phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4作为释放介质。称取黄芩汤、HD-P、HD-S、HD-N适量,加蒸馏水分散使其质量浓度均为20 mg/mL,吸取2 mL置于供给室中,排除接收池中滤膜下的气泡,开启搅拌,分别于0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h各取样1 mL,经0.45 μm微孔滤膜滤过后,按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定,同时补充同温同体积的PBS。记录芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸6个成分(由于其余4个成分为难溶性成分且于各相态中含量极低,并且在体外释放实验中释放量极低,HPLC无法检测出)的峰面积,计算累积溶出率。结果见表5和图3,实验结果表明,芍药内酯苷、芍药苷累积溶出率:HD-S>HD-N>黄芩汤>HD-P;芹糖甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸累积溶出率:HD-N>黄芩汤>HD-S>HD-P。

### 2.6 黄芩汤不同相态抗皮肤癣菌作用评价

2.6.1 黄芩汤不同相态样品抗皮肤癣菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum fungicidal concentrations,

表5 黄芩汤及其各相态中6种成分24 h体外累积溶出率

Table 5 Cumulative dissolution rates of six active constituents in HD and its different phase states during 24 h *in vitro* testing

样品	24 h体外累积溶出率/%					
	芍药内酯苷	芍药苷	芹糖甘草苷	黄芩苷	汉黄芩苷	甘草酸
黄芩汤	77.48	69.52	63.32	52.91	57.54	32.46
HD-P	55.80	56.30	47.24	41.35	43.62	24.45
HD-S	100.00	97.97	54.82	49.62	51.84	26.34
HD-N	90.83	72.68	75.77	62.00	69.09	40.04

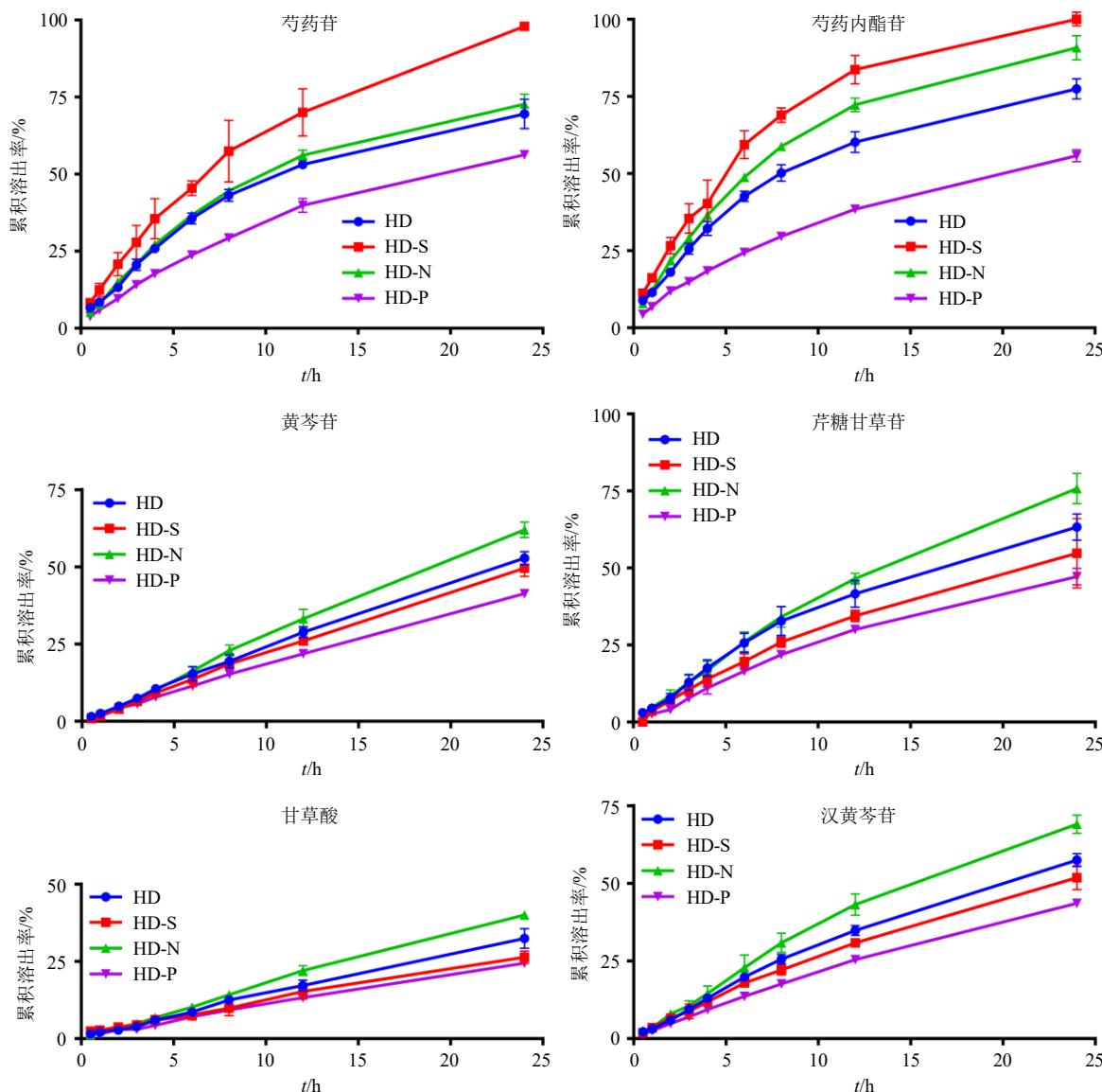


图3 黄芩汤及其各相态中6种主要成分的体外溶出曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 *In vitro* dissolution profiles of six major components in HD and its different phase states ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

MFC) 测定 参照美国临床和实验室标准协会的《丝状真菌肉汤稀释抗真菌药敏试验的参考方法》(M61 1st) 方法, 测定黄芩汤不同相态对皮肤癣菌的 MIC 值和 MFC 值。将须癣毛癣菌、紫色毛癣菌、犬小孢子菌、红色毛癣菌 4 种临床常见皮肤癣菌接种于沙氏葡萄糖琼脂 (Sabouraud dextrose agar, SDA) 培养基中, 在 28 °C 的霉菌培养箱中培养 5~7 d, 采用 1% 聚山梨酯-20 的 0.85% NaCl 无菌溶液分散并收集真菌, 通过 RPMI 1640 培养液将真菌悬液稀释至  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$  CFU/mL, 备用。称取适量黄芩汤、HD-P、HD-S、HD-N, 加入 RPMI 1640 培养液超声溶解, 制备成质量浓度均为 200 mg/mL 的溶液, 同时制备 TBF 4 μg/mL 作为阳性药对照。

取无菌 96 孔板, 每个孔中加入 RPMI 1640 培养基 100 μL, 通过移液枪移取 100 μL 药物至 96 孔板的第 1 孔, 混匀后吸取 100 μL 至第 2 孔, 依次稀释至第 10 孔, 使第 1~10 孔中药物的质量浓度分别为 100~0.195 mg/mL, 阳性药对照组第 1~10 孔中药物的质量浓度分别为 2.000~0.003 9 μg/mL。将已备好的菌悬液 100 μL 加入第 1~10 孔及第 12 孔, 第 11 孔作为阴性对照 (即空白对照, 不加菌悬液不加药, 仅 RPMI 1640 培养基), 第 12 孔作为阳性对照 (TBF), 配制好的药敏板置于 28 °C 霉菌培养箱中培育 5~7 d, 通过肉眼观察读数, 结果如表 6 所示, 无菌丝生长的澄清孔对应质量浓度则为抗菌的 MIC 值。移取 96 孔板中澄清透明孔内的液体 200 μL, 均

表6 黄芩汤及其不同相态样品抗皮肤癣菌的 MIC 值和 MFC 值

Table 6 MIC and MFC values of of HD and its samples in different phase states against dermatophytes

相态	MIC/(mg·mL <sup>-1</sup> )				MFC/(mg·mL <sup>-1</sup> )			
	须癣毛癣菌	紫色毛癣菌	犬小孢子菌	红色毛癣菌	须癣毛癣菌	紫色毛癣菌	犬小孢子菌	红色毛癣菌
黄芩汤	6.25	6.25	1.56	3.13	25.00	25.00	25.00	6.25
HD-P	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00
HD-S	25.00	25.00	12.50	12.50	100.00	100.00	100.00	12.50
HD-N	1.56	1.56	0.78	0.78	12.50	12.50	12.50	3.13
TBF	1.56×10 <sup>-5</sup>	2.50×10 <sup>-4</sup>	1.25×10 <sup>-4</sup>	1.25×10 <sup>-4</sup>	1.56×10 <sup>-5</sup>	2.50×10 <sup>-4</sup>	1.25×10 <sup>-4</sup>	1.25×10 <sup>-4</sup>

均匀铺于 SDA 培养基中，在 28 °C 条件下培养 5~7 d，以不长菌落的最低药物质量浓度为 MFC 值，结果见表 6。黄芩汤抗 4 种皮肤癣菌的 MIC 值分别为 1.56~6.25 mg/mL，HD-N 为 0.78~1.56 mg/mL，HD-S 为 12.50~25.00 mg/mL，HD-P 在设定的质量浓度范围内均未抑制 4 种皮肤癣菌的生长，HD-N 的抑制作用强于黄芩汤，其次是 HD-S、HD-P；抗 4 种皮肤癣菌的 MFC 值分别为 HD-N(3.125~12.50 mg/mL) > 黄芩汤 (6.25~25.00 mg/mL) > HD-S (12.50~100.00 mg/mL) > HD-P (>100.00 mg/mL)，这与主要成分在各相态中分布及其体外释放的规律一致。

**2.6.2 黄芩汤不同相态样品对须癣毛癣菌菌丝生长的影响** 依据文献报道<sup>[14]</sup>，将试验分为阴性对照组、阳性对照组 (TBF, 0.015 6 μg/mL)、黄芩汤组 (6.25 mg/mL)、HD-N 组 (1.56 mg/mL)、HD-P 组

(100.00 mg/mL)、HD-S 组 (25.00 mg/mL)，将药物与培养基混合均匀并铺于培养皿中，制备为各实验组相应质量浓度的药物培养基。将须癣毛癣菌接种于 SDA 培养基中培养 5~7 d，使用直径为 12 mm 的圆形打孔器取下菌块放置于含药物的培养基中培养 6 d，每天观察癣菌生长情况，并采用交叉法测量菌丝长度，每日菌丝生长长度 (mm) = (菌丝长度 - 12)/2，结果见表 7；药物对菌丝生长的抑制率 = (阴性对照组菌丝长度 - 药物组菌丝长度) / 阴性对照组菌丝长度，结果见表 7。通过黄芩汤组和 3 个相态组与 TBF 组比较，显示各组的抑制率于第 5 天趋于平稳。与阴性对照组比较，菌丝生长长度，TBF 组、黄芩汤组、HD-N 组 HD-S 组、HD-P 组第 6 天的菌丝长度均有显著性抑制 (P<0.05)，且 HD-N 组比 HD-P 组、HD-S 组对菌丝生长的抑制效果更好 (P<0.05)。

表7 黄芩汤不同相态对须癣毛癣菌菌丝长度和抑制率的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 7 Effects of different phase states of HD on hyphal length and inhibitory rates of *T. mentagrophytes* in various groups (x̄ ± s, n = 3)

组别	剂量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	菌丝长度/mm					抑制率/%					
		2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
阴性	-	3.25±0.33	6.13±0.54	9.04±1.05	11.42±1.59	15.25±1.00	0	-	-	-	-	-
TBF	1.56×10 <sup>-5</sup>	0.92±0.25 <sup>#</sup>	2.95±0.49 <sup>#</sup>	5.08±0.61 <sup>#</sup>	7.88±0.43 <sup>#</sup>	10.58±0.80 <sup>#</sup>	0	71.79±7.71 <sup>##</sup>	51.84±8.03	43.87±6.78 <sup>#</sup>	31.02±3.72 <sup>##</sup>	30.60±5.27 <sup>##</sup>
黄芩汤	6.25	1.58±0.19 <sup>*</sup>	3.67±0.13 <sup>*</sup>	6.63±0.59 <sup>*</sup>	9.38±0.33 <sup>*</sup>	12.63±0.41 <sup>*</sup>	0	51.54±5.81	40.14±2.05	26.73±6.54	17.88±2.90	17.21±2.70
HD-N	1.56	1.52±0.15 <sup>*</sup>	3.55±0.26 <sup>*</sup>	6.42±0.41 <sup>*</sup>	9.36±0.55 <sup>*</sup>	12.17±0.29 <sup>*</sup>	0	53.33±4.64	42.04±4.32	29.03±4.50	18.03±4.78	20.22±1.89
HD-S	25.00	1.95±0.27 <sup>##</sup>	4.31±0.34 <sup>##</sup>	6.88±0.54 <sup>*</sup>	10.21±0.29	13.90±0.38 <sup>##</sup>	0	40.00±8.32 <sup>#</sup>	29.66±5.48 <sup>#</sup>	23.87±5.96	10.58±2.52 <sup>#</sup>	8.85±2.48 <sup>##</sup>
HD-P	100.00	2.78±0.22 <sup>#</sup>	5.45±0.50 <sup>#</sup>	8.39±0.43 <sup>#</sup>	10.75±0.53 <sup>#</sup>	13.92±0.38 <sup>#</sup>	0	14.36±6.89 <sup>##</sup>	11.02±8.15 <sup>##</sup>	7.19±4.81 <sup>##</sup>	5.84±4.61 <sup>##</sup>	8.74±2.50 <sup>##</sup>

与阴性对照组比较: \*P<0.05; 与 HD-N 组比较: <sup>#</sup>P<0.05 <sup>##</sup>P<0.01。

<sup>\*</sup>P < 0.05 vs negative control group; <sup>#</sup>P < 0.05 <sup>##</sup>P < 0.01 vs HD-N group.

**2.6.3 黄芩汤不同相态对须癣毛癣菌孢子萌发的影响** 试验分组与“2.6.2”项下一致，实验参照花琳等<sup>[15]</sup>的测定方法，将适量药液和癣菌悬液加到无菌试管中充分混匀使癣菌浓度为 5×10<sup>5</sup> CFU/mL，在湿润，28 °C 条件下培养 24 h。培养后，吸取一定量 (200 μL) 到含有沙氏葡萄糖液体培养基

(Sabouraud dextrose broth, SDB) 的血球计数板上，用显微镜观察孢子的发芽情况，计数萌发孢子数及未萌发孢子数，通过公式孢子萌发率 = 孢子萌发数 / 孢子总数计算孢子萌发率。结果如表 8 所示，与阴性对照组比较，TBF 组、黄芩汤组、HD-N 组、HD-S 组孢子萌发率均显著降低 (P<0.01)。HD-N 组相



表 8 各组皮肤癣菌须癣毛癣菌孢子萌发率、生物量、抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Sporulation rate, biomass, and inhibition rate of dermatophyte *T. mentagrophytes* in different experimental groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	孢子萌发率/%	生物量/mg	抑制率/%
阴性对照	-	44.07±5.01	21.55±1.82	-
TBF	1.56×10 <sup>-5</sup>	6.49±2.24**	12.20±1.03**	43.39±4.76
黄芩汤	6.25	7.95±1.81**	14.33±1.28**	33.49±5.92
HD-N	1.56	6.30±1.94**	12.92±2.41**	40.06±11.18
HD-S	25.00	30.22±2.97***	17.75±2.31***	17.63±10.70##
HD-P	100.00	39.06±3.71##	20.02±1.62##	7.12±7.50##

与阴性对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与 HD-N 组比较: \*\*\* $P < 0.01$ 。  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs negative control group; \*\*\* $P < 0.01$  vs HD-N group.

较于 HD-P、HD-S 组, 抑制孢子萌发的效果更显著 ( $P < 0.01$ )。

**2.6.4 黄芩汤不同相态对须癣毛癣菌生物合成的影响** 试验分组与“2.6.2”项下一致, 参照 Luo 等<sup>[16]</sup>的测定方法, 癣菌与 SDB 培养基混合均匀使其浓度为  $5 \times 10^5$  CFU/mL, 药物与 SDB 混合均匀后取 5 mL 药液和 1 mL 菌悬液加入摇菌管中, 在 28 °C、200 r/min 恒温震荡的条件下培养 7 d。使用无菌水将菌丝体润洗后滤过, 烘干, 干燥后称定质量, 其质量为癣菌生物量, 计算抑制率 [抑制率=(阴性对照组生物量-药物组癣菌生物量)/阴性对照组生物量], 结果如表 8 所示。TBF 组、黄芩汤组、HD-N 组、HD-S 组生物量与阴性对照组比较均显著性减少 ( $P < 0.05, 0.01$ ), HD-N 组与 HD-P 组、HD-S 组生物量比较, 其生物量明显减少 ( $P < 0.01$ )。HD-N 对皮肤癣菌抑制率为 (40.06±11.18)%, 表明 HD-N 对皮肤癣菌生物合成有较好的抑制效果。

**2.6.5 统计学处理** 采用 IBM SPSS Statistics 25 软件对数据进行统计分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用多组间方差分析。

### 3 讨论

中药复方煎煮过程中大量成分从饮片中溶出后因分子间相互作用或化学反应, 产生自组装或聚集现象, 形成包括溶液、胶体(或纳米)、混悬、沉淀等多种相态共存的汤液, 即复杂多相态体系<sup>[17-19]</sup>。不同相态所表现出的化学组成、理化特性及功能作用不同; 其中, 纳米相态的形成能够显著影响中药有效成分的溶出、吸收及药理活性, 可能是中药复方功效发挥的关键物理结构基础<sup>[20-21]</sup>。在前期初步

揭示黄芩汤抗皮肤癣菌的作用与其成分含量及物理相态的相关性的基础上<sup>[9]</sup>, 本研究进一步明确了 HD-N 的形成对有效成分溶解、溶出及抗皮肤癣菌活性的影响。

本研究采用离心结合透析法, 将黄芩汤分离成 HD-N、HD-S 和 HD-P 3 个相态, 不同相态的粒径及冻干粉形貌差异显著。不同相态的定量分析结果显示, 黄芩汤中各成分在不同相态中分布不同, 但均以 HD-N 中的含量最高。其中, 水溶性成分芍药内酯苷和芍药苷约 60% 分布于 HD-N, 而其余难溶性成分超过 75% 甚至 90% 存在于 HD-N 中。溶出结果显示, 芍药内酯苷、芍药苷在各相态中的 24 h 体外累积溶出率呈现如下顺序: HD-S > HD-N > 黄芩汤 > HD-P; 而蔗糖甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸在各相态中的 24 h 体外累积溶出率顺序为 HD-N > 黄芩汤 > HD-S > HD-P。

上述结果表明, 各成分溶解性不同, 在不同相态中的分布和释放不同。这可以用纳米制剂的包封作用及增溶原理进行解释, 汤液中形成的纳米相态类似于纳米制剂, 可以对不同成分进行包封, 从而影响各成分的溶解和溶出。纳米粒对水溶性成分的包封率相对偏低, 并延缓其体外释放<sup>[22]</sup>, 而对难溶性成分的包封率较高, 能够增加其体外释放<sup>[23]</sup>, 这与本研究中纳米相态中各成分的含量占比及体外释放结果一致。

刘维达等课题组系统回顾了我国大陆近 30 年来有关皮肤癣菌病及皮肤癣菌的流行病学研究, 发现皮肤癣菌中, 最常见致病菌为红色毛癣菌, 占比高达 69.48%, 其次为须癣毛癣菌 (16.45%)、犬小孢子菌 (8.09%)、絮状表皮癣菌 (1.67%)、石膏样小孢子菌 (1.60%) 和紫色毛癣菌 (1.36%)<sup>[24]</sup>。为选取代表性的菌株及实验室可获取等原因, 本研究选择了红色毛癣菌、须癣毛癣菌、犬小孢子菌及紫色毛癣菌为模型菌种进行药敏实验。须癣毛癣菌虽作为第 2 大皮肤癣菌, 但其生长快, 实验周期短, 菌丝生长、生物合成等指标易观察, 因此, 选择其为模型菌株作为下一步的抗皮肤癣菌作用研究。药敏及抗菌实验结果显示, HD-N 的抗皮肤癣菌活性及对须癣毛癣菌的菌丝生长、孢子萌发、生物合成的抑制作用优于 HD-P 和 HD-S。一方面, HD-N 的形成能够增加黄芩苷、甘草酸等难溶性成分的溶解和释放, 有利于真菌细胞的摄取, 从而更好地发挥抗皮肤癣菌的作用; 另一方面, HD-N 中的纳米粒

可能被真菌细胞整体摄取而发挥抗皮肤癣菌作用。然而, HD-N 这一特定聚集相态的形成机制以及高抗菌活性是来源于不同成分的药效协同还是特定物理结构的贡献等问题并不清楚, 值得更进一步深入研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Numan R S, Farhan M S, Abdullah B A, *et al.* Review of the clinical types of dermatophytes [J]. *J Res Appl Sci Biotechnol*, 2024, 3(3): 104-112.
- [2] Deng R X, Wang X W, Li R Y. Dermatophyte infection: From fungal pathogenicity to host immune responses [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1285887.
- [3] Gupta A K, Foley K A, Versteeg S G. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes [J]. *Mycopathologia*, 2017, 182(1/2): 127-141.
- [4] Sardana K, Sharath S, Khurana A, *et al.* An update on the myriad antifungal resistance mechanisms in dermatophytes and the place of experimental and existential therapeutic agents for *Trichophyton* complex implicated in *Tinea corporis* and *cruris* [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2023, 21(9): 977-991.
- [5] 唐姗姗, 吴然. 中药治疗浅部真菌病研究进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2023, 18(2): 172-177.
- [6] Jiang B C, Shen J Y, Wu J, *et al.* *In vitro* antifungal activity of 163 extracts from traditional Chinese medicine herbs [J]. *Eur J Integr Med*, 2020, 39: 101213.
- [7] Liu Y, Zhao Y, Guo D L, *et al.* Synergistic antimicrobial activity of berberine hydrochloride, baicalein and borneol against *Candida albicans* [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 353-357.
- [8] 沈成英, 罗忠, 章佩, 等. 黄芩汤的抗须癣毛癣菌活性及作用机制研究 [J]. 中国药房, 2024, 35(3): 311-315.
- [9] 沈成英, 吴文明, 侯雄军, 等. 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 [J]. 中国药房, 2023, 34(6): 687-692.
- [10] 孟雨婷, 薛玉叶, 刘燕, 等. 甘草新型自组装纳米粒的形成及抗炎作用评价 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2912-2922.
- [11] 张清华, 陈玲芳, 郭小藤, 等. 黄蜀葵花药材总多糖含量测定方法研究 [J]. 山东化工, 2024, 53(18): 136-138.
- [12] Lane M E. *In vitro* permeation testing for the evaluation of drug delivery to the skin [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2024, 201: 106873.
- [13] Wang Y Z, Liu M X, Li J J, *et al.* Preparing a novel baicalin-loaded microemulsion-based gel for transdermal delivery and testing its anti-gout effect [J]. *Saudi Pharm J*, 2024, 32(6): 102100.
- [14] Shen C Y, Luo Z, Zhan P, *et al.* Antifungal activity and potential mechanism of action of Huangqin Decoction against *Trichophyton rubrum* [J]. *J Med Microbiol*, 2024, doi: 10.1099/jmm.0.001805.
- [15] 花琳, 吴敏, 章纬, 等. 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的抗菌作用机制 [J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1035-1046.
- [16] Luo N X, Jin L, Yang C Q, *et al.* Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *Trichophyton rubrum* [J]. *J Antibiot*, 2021, 74(3): 206-214.
- [17] 王凤霞, 陈芳雯, 沈成英, 等. 中药汤剂煎法的科学内涵研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(4): 994-999.
- [18] 杨勋玥, 简龄龙, 杨梅, 等. 中药汤剂中相态的形成表征及其药效作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2024, 59(20): 1917-1924.
- [19] 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.
- [20] Pi W M, Han N N, Wu L Y, *et al.* Discovery, traceability, formation mechanism, metal and organic components analysis of supramolecules from Maxing Shigan Decoction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 234: 115532.
- [21] 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]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109826.
- [22] Shen C Y, Shen B D, Zhu J J, *et al.* Glycyrrhizic acid-based self-assembled micelles for improving oral bioavailability of paeoniflorin [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2021, 47(2): 207-214.
- [23] 田莉, 李伟宏, 张付利. 木犀草素磷脂复合物白蛋白纳米粒的制备及口服药动学评价 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3280-3290.
- [24] 宋歌. 中国地区皮肤癣菌病流行病学回顾性分析及红色毛癣菌与紫色毛癣菌致病差异性的机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.

[责任编辑 郑礼胜]