

补阳还五汤煎煮过程 2 种相态与成分变化关系研究

高湘婷^{1,2}, 贺 鹏^{1,2}, 谯 茹^{1,2}, 李海英^{2,5}, 刘赛虎^{1,2}, 陈 旺^{1,2}, 肖雄坤^{1,2}, 贺福元^{1,2,3,4*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208
4. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 湖南 长沙 410208
5. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘 要: 目的 对不同煎煮时间的补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 的汤液进行相态拆分和表征, 探究汤剂煎煮过程中的相态变化及成分分布规律, 为阐明中药复方成分协同起效的物质基础提供参考。方法 分别煎煮 BHD 30、60、90、120 min 制得汤液, 采用“高速离心-透析”法分离得到混悬相态和纳米相态溶液; 通过马尔文粒径仪、紫外/红外光谱、透射电子显微镜表征 2 种相态; 测定 BHD 原汤及纳米相态、混悬相态的冻干粉得率, 并采用液质联用仪 (LC-MS/MS) 测定 BHD 原汤及 2 种相态中 15 种指标成分含量。结果 4 个煎煮时间点的 BHD 原汤、纳米相态、混悬相态均形成类球形颗粒, 其中纳米相态的粒径随着煎煮时间的延长, 由 314.7 nm (30 min) 降至 170.2 nm (120 min); 多糖主要富集于纳米相态, 而蛋白质主要富集于混悬相态; 光谱分析结果显示, 不同煎煮时间的 BHD 原汤和各相态的化学结构大致相似, 但官能团的含量存在差异; LC-MS/MS 结果显示, 15 种指标成分中多数成分在混悬相态中的平均含量高于纳米相态, 其中黄芩苷、异亮氨酸、阿魏酸、腺嘌呤、丹皮酚、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 9 种成分在各相态中的含量具有显著差异 ($P < 0.05$)。结论 煎煮的热力学过程是驱动 BHD 成分自组装形成不同相态的关键因素。BHD 成分在煎煮过程存在相互作用使药效成分在各相态间的含量呈现较大差异, 为研究中药汤剂煎煮的科学性提供物质基础。

关键词: 补阳还五汤; 相态; 纳米微粒; 煎煮时间; 分子自组装; 黄芩苷; 异亮氨酸; 阿魏酸; 腺嘌呤; 丹皮酚; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 物理表征

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)22-8113-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.006

Relationship between two phase states and component changes during decoction process of Buyang Huanwu Decoction

GAO Xiangting^{1,2}, HE Peng^{1,2}, QIAO Ru^{1,2}, LI Haiying^{2,5}, LIU Saihu^{1,2}, CHEN Wang^{1,2}, XIAO Xiongkun^{1,2}, HE Fuyuan^{1,2,3,4}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. Property and Pharmacodynamic Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. The First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

收稿日期: 2025-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274215); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (82404815); 湖南中医药大学 2022 年度校级“揭榜挂帅”专项 (2022-12-27-1)

作者简介: 高湘婷, 硕士研究生, 从事中药复方的物质基础与生物有效性研究。E-mail: hzygxt2023@163.com

*通信作者: 贺福元, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化研究。

Tel: (0731)88458231 E-mail: pharmsharking@163.com

Abstract: Objective To investigate phase separation and characterize the decoction of Buyang Huanwu Decoction (BHD, 补阳还五汤) prepared at different decoction times, exploring phase transitions and component distribution patterns during the decoction process. This study aims to provide insights into the material basis for synergistic effects among components in traditional Chinese medicine formulas. **Methods** Decoction extracts were prepared by boiling BHD for 30, 60, 90, and 120 min. The extracts were separated into suspension and nano-phase solutions using the “high-speed centrifugation-dialysis” method. Both phases were characterized using a Malvern particle size analyzer, UV/IR spectroscopy, and transmission electron microscopy. The freeze-dried powder yield was determined for the original decoction and the nano- and suspension-phase solutions. The content of 15 target components in the original decoction and the two phases was measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Results** Spherical-like particles formed in the original decoction, nano-phase, and suspension phase at all four decoction time points. The particle size of the nano-phase decreased from 314.7 nm (30 min) to 170.2 nm (120 min) with prolonged boiling. Polysaccharides were predominantly enriched in the nano-phase, while proteins were mainly concentrated in the suspension phase. Spectral analysis revealed that the chemical structures of the original decoction and each phase were broadly similar across different decoction times, though functional group contents varied. LC-MS/MS results indicated that the average content of most components in the suspension phase exceeded that in the nano-phase. Among these, baicalin, l-isoleucine, ferulic acid, adenine, paeonol, astragaloside IV, calycosin, formononetin, and kaempferol-3-*O*-rutinoside exhibited significant content differences across phases ($P < 0.05$). **Conclusion** The thermodynamic process of decoction is the key factor driving the self-assembly of BHD components into distinct phases. Interactions among components of the BHD during boiling cause significant variations in the content of active ingredients across different phases, providing a material basis for studying the science of boiling Chinese herbal decoctions.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; phase states; nanoparticles; decoction time; molecular self-assembly; baicalin; l-isoleucine; ferulic acid; adenine; paeonol; astragaloside IV; calycosin; formononetin; kaempferol-3-*O*-rutinoside; physical characterization

汤剂是中医临床用药中的常见剂型，其煎煮时间对于保障中药汤剂临床疗效和质量稳定性至关重要^[1]。已有大量研究表明中药汤剂在煎煮过程中，其单体成分会发生弱键诱导下的分子间相互作用，形成超分子聚集体，该结构对中药的药性、药效及中药成分在体内的药动学过程都会产生重要影响^[2-7]。

中药超分子的存在状态通常与汤剂的相态结构有关。中药汤剂的相态通常以真溶液相、胶体相、混悬相等混合复杂相态组成，不同复方或同一复方的不同成分溶出后的适宜存在形式和物相状态不完全相同^[8]。中药煎煮过程中的自沉淀现象常预示新相态生成，如芍药甘草汤中各成分会聚集形成粒径较大的沉淀相^[9]；白虎汤中纳米相态的形成与粳米密切相关^[10]。另有研究表明，煎煮的热力学过程会影响黄连-黄芩药对的超分子自组装的存在状态，并产生抗菌药效的差异性，说明煎煮过程会影响汤剂物相结构的稳定性及药效强弱^[11-12]。通过比较不同相态的化学成分含量差异，揭示煎煮过程中的相态变化及超分子形成规律，对于多维度阐明中药复方起效的作用机制具有重要意义^[13]。

补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 源于清代王清任的《医林改错·下卷·瘫痪论》，由黄芪、当归、川芎、赤芍、地龙、桃仁、红花 7 味药组成，具有补气活血通络之功，是治疗脑卒中及其

后遗症的代表方^[14]。目前，已有研究表明煎煮过程是红花-桃仁药对有效相态形成的重要步骤，且相态成为传递药效物质的主要形式^[15]。Liang 等^[16]研究表明，黄芪-当归共煎液中存在不规则的类球形超分子，并随着煎煮时间呈现动态的自组装过程。Zhao 等^[17]研究发现含有黄芪、川芎、当归、红花的脑络欣通方可分离出纳米颗粒，且该方的神经保护作用与纳米颗粒密切相关。因此，推测 BHD 各药材在煎煮过程中同样有相态变化和超分子的形成。现代研究表明，BHD 中的主要活性成分包括黄酮类、糖苷类、酚酸类、生物碱类、多糖类、挥发油类、蛋白质类^[18]，成分种类丰富，但目前对 BHD 的研究多为单体成分的分析，较少从物相结构的角度研究其煎煮过程中成分的变化。本研究拟采用高速离心、透析等方法对不同煎煮时间点的 BHD 汤剂进行相态拆分，并以液质联用仪 (LC-MS/MS)、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、粒径仪等对原汤及各相态进行表征和指标成分含量测定，探究煎煮时间对 BHD 各相态形成、稳定性及成分分布的影响，为阐明各成分在不同相态中的动态变化规律及药效物质基础提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Xevo TQ-S cronos 型三重四极杆超高效液相质

谱联用仪,美国沃特世公司;RE-52AA 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D(III)型循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;Nicolet IS5 型傅里叶红外光谱仪、Varioskan Flash 型多功能酶标仪, Thermo Fisher Scientific; UV1780 型紫外分光光度计,日本岛津公司;Scientz-10 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;CTB-A 型磁力搅拌器,河南爱博科技发展有限公司;SQP 型十万分之一分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;MA110 型电子天平,上海精宏实验设备有限公司;Zeta sizer Nano ZS90 型马尔文激光粒径仪,英国马尔文帕纳科有限公司;HT7800 型透射电子显微镜(TEM),日本日立公司;SB-5200DTD 型超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 药物与试剂

对照品黄芪甲苷(批号 N13HB201030)、阿魏酸(批号 G27A112112005)、芦丁(批号 JB241985)、琥珀酸(批号 Z10O11H126750)、黄芩苷(批号 N15GB167969)、儿茶素(批号 S22D6I7956)均购自上海源叶生物科技有限公司,对照品毛蕊异黄酮(批号 DST220226-012)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 DSTDM001301)、腺嘌呤(批号 DSTDP001301)、洋川芎内酯 I(批号 DST200805-009)购自成都德思特生物技术有限公司,对照品绿原酸(批号 110753-201817)、芒柄花素(批号 111703-201504)、异亮氨酸(批号 140683-201302)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号 200619-075)、丹皮酚(批号 110708-201407)均购自中国食品药品检定研究院,各对照品质量分数均 $\geq 98.0\%$ 。娃哈哈纯净水,批号 311522HY,杭州娃哈哈集团有限公司;甲醇(批号 24025082,色谱纯)、乙腈(批号 24036083,色谱纯)、甲酸(批号 C2203135,质谱级)、MD44 透析袋,截留相对分子质量 3 500,北京索莱宝科技有限公司。

黄芪(批号 RS25022001)、地龙(批号 2409274)、当归(批号 NG25021701)、赤芍(批号 ZR24112606)、桃仁(批号 2412300072)、红花(批号 ZR24121705)、川芎(批号 XH25012108)7 味饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,各药材饮片均经湖南中医药大学药学院中药炮制教研室石继连教授进行鉴定,赤芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,黄芪基原为豆科黄芪属草本植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,当归为伞形科

当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,地龙为钜蚓科环毛蚓属动物参环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) 的干燥体,川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,桃仁为蔷薇科桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子,以上各饮片均符合《中国药典》2025 年版相关标准。

2 方法与结果

2.1 BHD 水煎液的制备及相态拆分

2.1.1 BHD 各煎煮时间点水煎液样品的制备 前期预实验考察了 BHD 煎煮时间从 5 min 到 230 min 的每隔 10 min 的样品粒径变化,粒径呈现先增大后减小的动态变化趋势,因此,选取 30、60、90、120 min 4 个特征时间点进行实验。按照处方称取黄芪 60 g,川芎 6 g,当归、赤芍、地龙、桃仁、红花各 9 g,称取同批次的 BHD 药材饮片 4 份,每份约 111 g 中药饮片,置于 2 000 mL 圆底烧瓶中,加 8 倍量纯净水浸泡 30 min,加热至微沸时开始计时,分别煎煮 30、60、90、120 min,使用纱布趁热滤过,各得到 600 mL BHD 滤液。滤液减压浓缩至 80 mL 后分为等体积的 2 部分,分别为煎煮 30 min 原汤样品(YT-30 min)、煎煮 60 min 原汤样品(YT-60 min)、煎煮 90 min 原汤样品(YT-90 min)、煎煮 120 min 原汤样品(YT-120 min),另一部分滤液用于后续相态拆分。

2.1.2 BHD 水煎液的相态拆分 将煎煮 30、60、90、120 min 的水煎液,置于离心管中以 5 000 r/min 离心 30 min 后,将上清液转移到截留相对分子质量为 3 500 的透析袋中,置于盛有纯净水的烧杯中,磁力搅拌透析 12 h,每隔 2 h 更换透析外液,透析完成后取出透析袋中溶液,以 12 000 r/min 离心 30 min。该离心操作后的上清液即为纳米相态,分别得到煎煮 30 min 纳米相态样品(NM-30 min)、煎煮 60 min 纳米相态样品(NM-60 min)、煎煮 90 min 纳米相态样品(NM-90 min)、煎煮 120 min 纳米相态样品(NM-120 min)。

取出 12 000 r/min 离心操作后的下层沉淀,加入纯水超声分散后即混悬相态,分别得到煎煮 30 min 混悬相态样品(HX-30 min)、煎煮 60 min 混悬相态样品(HX-60 min)、煎煮 90 min 混悬相态样品(HX-90 min)、煎煮 120 min 混悬相态样品(HX-120 min)。相态拆分流程见图 1。

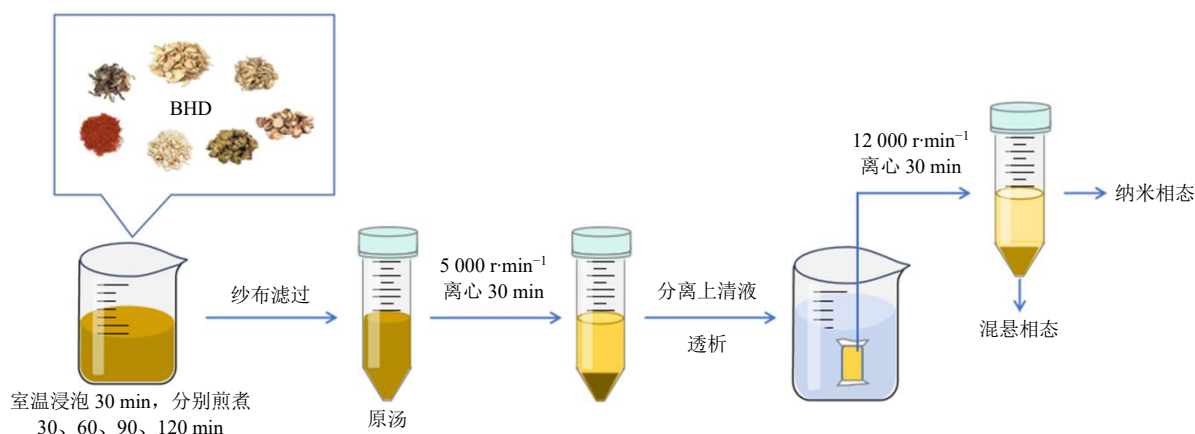


图 1 BHD 不同相态拆分流程图

Fig. 1 Separation flow chart of BHD resolution of different phases

2.2 BHD 原汤及不同相态表征

2.2.1 丁达尔效应 将 4 个煎煮时间点的 BHD 原汤、纳米相态、混悬相态样品溶液加至比色皿中，观察其外观形态，并用激光笔观察丁达尔效应，结果见图 2。BHD 不同煎煮时间点的原汤和混悬相态溶液均呈黄棕色的浑浊状态，纳米相态溶液呈现黄棕色的澄清透明的状态。拆分的不同相态及各煎煮时间点的纳米相态经激光笔照射后，纳米相态溶液中都呈现明显的光路，具有显著的丁达尔散射效应，说明纳米相态中有较多的纳米微粒。混悬相态和纯水中的丁达尔效应均不明显，而原汤中有微弱

的光路，但溶液较纳米相态浑浊，表明原汤是由多相态混合的复杂体系，采用“2.1.2”项下的方法能拆分出不同的相态。

2.2.2 粒径、多分散指数、 ζ 电位测定 取 BHD 煎煮过程中的各组原汤及各相态溶液稀释相同倍数后，分别取 1 mL 溶液加入样品池中，使用马尔文激光粒度仪测定样品的平均粒径、多分散性系数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位，平行重复 3 次，取平均值，结果见表 1 和图 3。4 个煎煮时间点的 BHD 原汤粒径集中在 1 000 nm 左右，并在煎煮时间为 90 min 时粒径达到最大值；纳米相态的粒径主要集中在 170~300 nm，且随着煎煮时间的延长，粒径逐渐变小，稳定在 170 nm 左右；混悬相态的粒径集中在 700 nm 附近。 ζ 电位和 PDI 是表征分散体系稳定性的重要参数。 ζ 电位与分散体系的稳定性有关，其绝对值越大，分散体系中的微粒间的斥力越大，表明体系的稳定性越强^[19]。本研究结果显示，在相同煎煮时间条件下，原汤及各相态 ζ 电位绝对值的大小排序为纳米相态 > 混悬相态 > 原汤，提示 BHD 纳米相态较原汤和混悬相态体系更稳定。同时，PDI 结果显示，各相态 PDI 值均在 0.25~0.86，其中原汤在 90 min 时 PDI 最低 (0.25 ± 0.02)，表明此时原汤体系中颗粒粒径分布最均一；而混悬相态在 60 min 时 PDI 最高 (0.86 ± 0.24)，提示该时间点混悬相态颗粒大小差异较大，均一性较差。纳米相态的 PDI 随煎煮时间呈现先升高后降低的趋势，反映出纳米颗粒在煎煮过程中经历了聚集-分散的动态重构过程，这与纳米相态粒径随时间逐渐减小的变化趋势一致，可能与热能驱动下超分子聚集体的解离与重组有关。

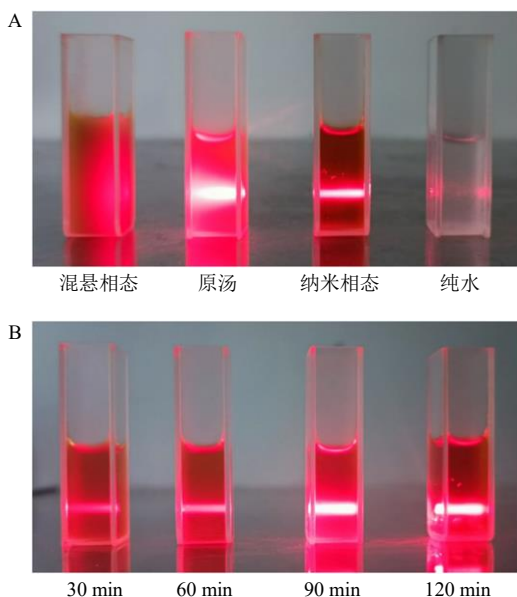


图 2 BHD 煎煮 120 min 后各相态 (A) 及不同煎煮时间纳米相态 (B) 的丁达尔效应

Fig. 2 Tyndall effect of each phase (A) after 120 min of BHD decoction and nano-phase (B) at different decoction times

表 1 不同煎煮时间的 BHD 原汤、纳米相态、混悬相态的粒径、PDI、 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Particle size, PDI, and ζ potential of original decoction, nano-phase, and suspension-phase of BHD at different decocting times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

煎煮时间/min	粒径/nm			PDI			ζ 电位/mV		
	原汤	纳米相态	混悬相态	原汤	纳米相态	混悬相态	原汤	纳米相态	混悬相态
30	925.07 $\pm$ 20.32	314.70 $\pm$ 20.78	747.80 $\pm$ 23.46	0.59 $\pm$ 0.26	0.61 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.43	-8.49 $\pm$ 0.53	-20.33 $\pm$ 0.25	-16.03 $\pm$ 0.38
60	1 052.67 $\pm$ 15.28	301.73 $\pm$ 17.20	777.80 $\pm$ 37.21	0.39 $\pm$ 0.15	0.67 $\pm$ 0.04	0.86 $\pm$ 0.24	-9.97 $\pm$ 0.57	-16.63 $\pm$ 0.25	-15.47 $\pm$ 0.60
90	1 291.0 $\pm$ 25.46	284.27 $\pm$ 16.24	757.07 $\pm$ 41.99	0.25 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.53	-8.50 $\pm$ 0.47	-15.13 $\pm$ 0.76	-12.57 $\pm$ 0.21
120	1 091.00 $\pm$ 59.40	170.20 $\pm$ 6.89	631.00 $\pm$ 23.72	0.80 $\pm$ 0.14	0.59 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.22	-7.92 $\pm$ 1.03	-14.83 $\pm$ 1.10	-13.17 $\pm$ 0.47

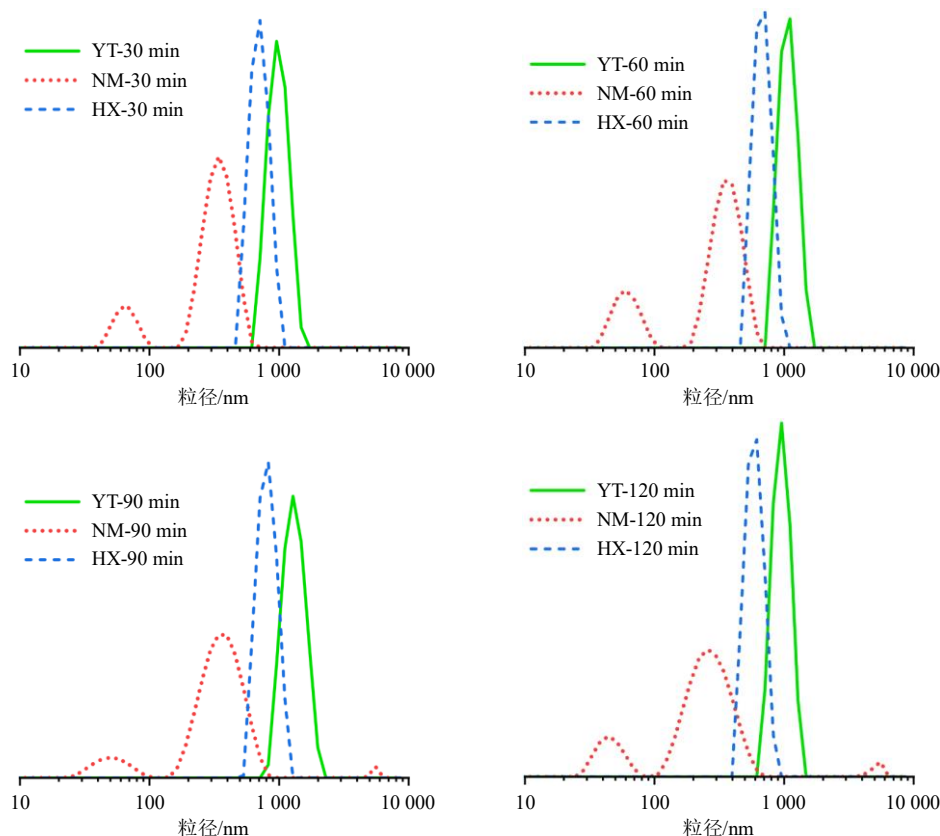


图 3 BHD 不同煎煮时间各相态粒径分布

Fig. 3 Distribution of particle size in each phase of BHD at different decocting times

进一步分析发现,随着煎煮时间延长,纳米相态与混悬相态的 ζ 电位绝对值较 30 min 时,均出现不同程度的降低,结合 PDI 的波动特征,表明 BHD 汤剂中的成分在热力学过程中不断发生分子间相互作用,其超分子聚集体的表面电荷分布及粒径均一性处于动态变化中,从而导致汤剂相态体系的不稳定性。

2.2.3 不同煎煮时间 BHD 纳米相态的光谱及 SEM 表征

(1) 紫外-可见分光光谱 (UV-vis): 由于中药大多数成分都具有紫外吸收特性,且中药成分溶出后分子间会发生相互作用,影响共轭基团的电子排布,

因此,可根据紫外光谱的吸收峰数目、峰位来推测多种成分的整体相互作用^[20-21]。将 BHD 原汤及各相态溶液冻干后,分别称取原汤及各相态冻干粉适量,用去离子水复溶至 0.6 mg/mL,过 0.22 μ m 微孔滤膜后转移至比色皿中,设置检测波长为 190~800 nm,以去离子水为参比溶液,进行全波长扫描,结果见图 4。不同煎煮时间的 BHD 纳米相态及煎煮 120 min 的原汤和混悬相态均在 209、267、329、402 nm 处有吸收峰,这与 BHD 中黄酮类成分的紫外吸收类似^[22-23]。各样品仅峰强度不同,说明各样品总体成分相似,但溶出成分的浓度有所不同。随着煎煮时间的延长,纳米相态的吸收峰略有降低,且煎

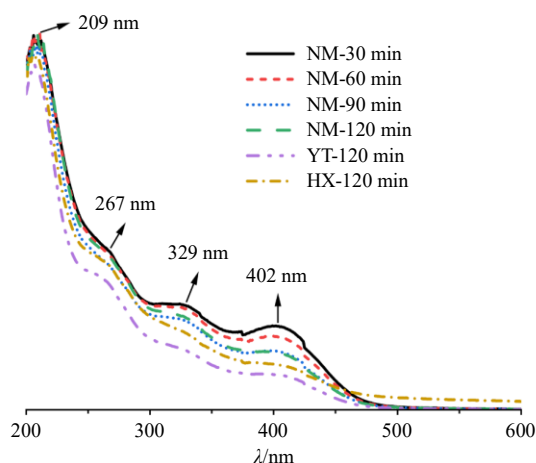


图4 BHD 不同煎煮时间各相态的 UV-vis

Fig. 4 UV-vis of each phase of BHD at different decocting times

煮时间为 120 min 时, 纳米相态的吸收峰高于混悬相态和原汤, 推测 BHD 的黄酮类成分会在煎煮过程发生分子间自组装, 富集在纳米相态中, 煎煮时间的延长会促进分子自组装, 使得纳米相态的紫外吸收略减弱。

(2) 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR): 设置红外光谱仪的扫描范围为 $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 以空气为背景进行扫描, 称取原汤及各相态冻干粉适量置于测样区, 每个样本平均扫描 32 次, 光谱分辨率为 4 cm^{-1} 。使用光谱软件 OMNIC 记录和存储 FT-IR 图, 结果见图 5。FT-IR 图中, 在 $3\,281.7\text{ cm}^{-1}$ 附近的宽吸收峰表明, 样品中存在 O-H 或 N-H 的伸缩振动, $2\,935$ 、 $1\,408\text{ cm}^{-1}$ 为甲基的伸缩振动和面内弯曲振动^[24]; $1\,747\text{ cm}^{-1}$ 为羰基 C=O 的伸缩振动峰, $1\,612\text{ cm}^{-1}$ 为羧酸基团的 C-O 伸缩振动; $1\,045$ 、 992 、 927 、 833 cm^{-1} 均为 C-O-C 伸缩振动吸收峰, 通常为糖类

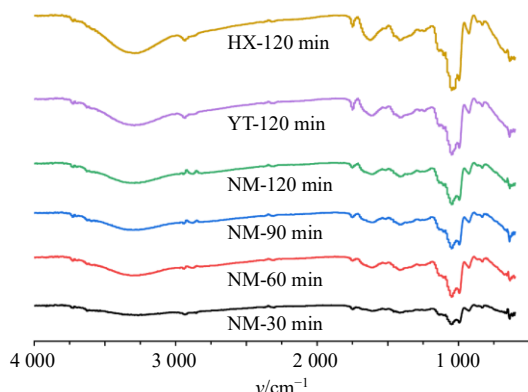


图5 BHD 不同煎煮时间各相态的 FT-IR 光谱

Fig. 5 FT-IR spectra of each phase of BHD at different decocting times

物质的特征吸收峰^[25-26]。不同煎煮时间的纳米相态与煎煮 120 min 的原汤、混悬相态冻干粉的 FT-IR 图峰形相似而峰强度不同, 表明 BHD 各相态均含有相同的化学键类型, 但表面官能团的含量不同; 其中各煎煮时间点纳米相态的峰强度较低, 推测汤剂中含有丰富的糖类物质, 且多糖类成分在煎煮过程中参与纳米颗粒结构的形成, 这使得糖类物质的特征吸收峰强度降低。

(3) TEM 表征: 分别称取原汤及各相态冻干粉末适量, 用少量去离子水分散至适宜浓度后, 移取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 样品溶液滴于铜网支持膜上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥后将样品置于 TEM 下观察, 结果见图 6。BHD 原汤、混悬相态、纳米相态均形成稳定的纳米颗粒, 但微粒形态有所不同。原汤以分散球形及不规则颗粒为主; 混悬相态呈现微粒的簇状聚集结构, 而纳米相态多以类球形颗粒为主。煎煮 30 min 时, 纳米相态微粒多呈不规则类球形形态, 随着煎煮时长的增加, 分子间发生相互作用, 逐渐形成粒径递减的圆球形纳米粒。纳米相态的粒径大多在 $100\sim 400\text{ nm}$, 与粒径仪测得结果大致相同。

2.3 BHD 原汤及各相态多糖、蛋白质含量及冻干粉得率测定

2.3.1 各相态样品中的多糖含量^[26] 配制质量浓度分别为 5、10、20、40、60、80、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖对照品溶液, 各取 1 mL 对照品溶液于试管中, 分别加入 5% 苯酚水溶液 1 mL , 充分混匀后迅速加入硫酸 5 mL , 摇匀, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min , 冰水浴静置 10 min , 使用分光光度计, 于 490 nm 处测定吸光度 (A) 值。以 A 值为纵坐标 (Y)、葡萄糖质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=11.963X+0.0307$, $R^2=0.9990$, 线性范围为 $5\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。将样品稀释至适宜质量浓度, 取 1 mL 于试管中, 加入步骤同上, 平行 3 份。根据标准曲线计算样品中的多糖含量。结果见表 2, 4 个煎煮时间点下, 多糖含量大小排序均为纳米相态 > 原汤 > 混悬相态, 且在纳米相态中多糖含量显著高于混悬相态 ($P<0.01$)。随着煎煮时间的延长, 原汤中的多糖含量逐渐下降, 而混悬相态中的多糖含量逐渐升高, 但在煎煮时间达到 120 min 后, 多糖含量有所下降。

2.3.2 各相态样品中的蛋白质含量^[9] 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各样品中的蛋白质含量。将 BCA 试剂 A 和 B 按照体积比 50:1 混合, 配制

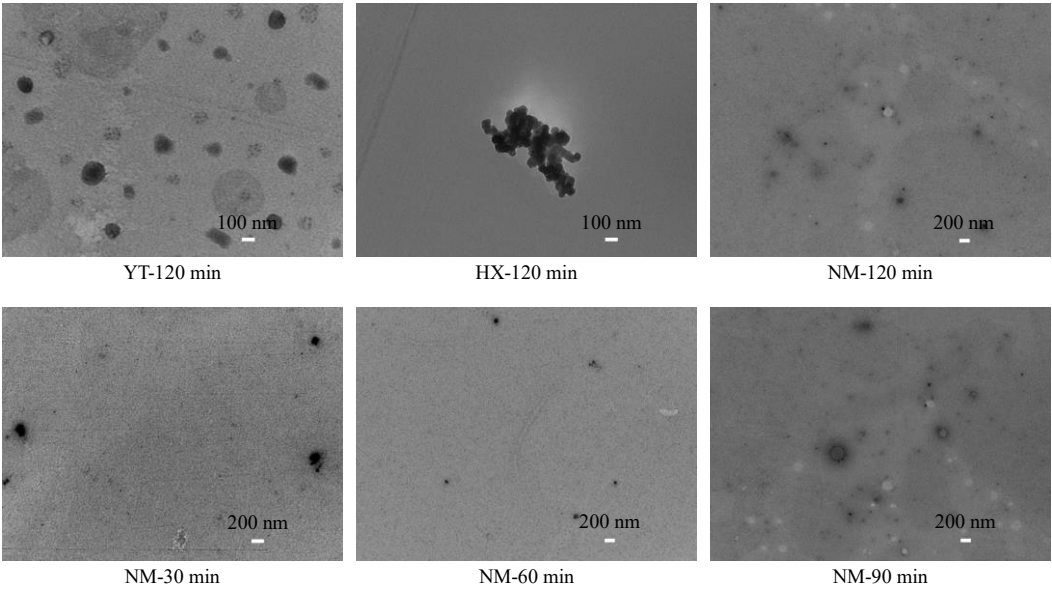


图 6 BHD 不同煎煮时间各相态的 TEM
 Fig. 6 TEM of each phase of BHD at different decocting times

表 2 不同煎煮时间的 BHD 原汤、纳米相态、混悬相态的蛋白质、多糖含量及冻干粉得率测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 2 Determination of protein, polysaccharide content and freeze-dried powder yield of original decoction, nano-phase and suspension-phase of BHD at different decoction times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

煎煮时 间/min	多糖/(mg·g ⁻¹)			蛋白质/(mg·g ⁻¹)			冻干粉得率/%		
	原汤	纳米相态	混悬相态	原汤	纳米相态	混悬相态	原汤	纳米相态	混悬相态
30	443.94±0.70	471.17±0.68	377.98±0.94 [#]	40.61±1.60	47.74±2.17	114.50±7.00 ^{##}	24.72±0.01	9.82±0.01	0.22±0.00 ^{##}
60	438.07±0.00 ^{**}	461.40±1.02 ^{**}	411.25±0.60 ^{**##}	40.26±4.91	45.88±3.13	106.25±10.95 ^{##}	26.11±0.00	9.76±0.00	0.28±0.00 ^{##}
90	421.72±0.39 ^{**}	471.45±1.01	408.28±0.13 ^{**##}	42.87±1.41	42.53±1.58 [*]	88.42±15.39	26.39±0.01 [*]	8.05±0.02	0.23±0.00 [#]
120	423.41±0.40 ^{**}	461.47±0.38 ^{**}	385.42±0.35 ^{**##}	41.60±3.28	50.10±2.12	116.33±20.03	26.27±0.00	7.72±0.01	0.24±0.00 ^{##}

与同一相态 30 min 煎煮时间比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与同一煎煮时间纳米相态比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。
^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs the decoction time of 30 min in the same phase; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs the nano-phase state at the same decoction time.

成工作液。配制 0、25、125、250、500、750、1 000、1 500、2 000 μg/mL 蛋白质标准溶液，分别吸取 20 μL 标准溶液于 96 孔板中，加入 200 μL BCA 工作液，混匀，37 ℃放置 30 min，采用酶标仪测定 562 nm 处的 A 值，以 A 值为纵坐标 (Y)，蛋白质质量浓度为横坐标 (X)，计算出标准曲线的回归方程为 $Y = 0.000\ 8 X + 0.037\ 8$ ， $R^2 = 0.995\ 7$ ，线性范围为 20~2 000 μg/mL。取 20 μL 稀释至适宜质量浓度的样品溶液于 96 孔板中，按上述操作测定 A 值，带入标准曲线中计算各样品的蛋白质含量，结果见表 2。4 个煎煮时间点下，蛋白质含量排序均为混悬相态>纳米相态>原汤，混悬相态中的蛋白质含量远高于原汤及纳米相态($P < 0.001$)。不同煎煮时间下，纳米相态及混悬相态的蛋白质含量无显著性差别，表明煎煮时间对 BHD 汤剂各相态的蛋白质含量影响不大。

2.3.3 各相态样品的冻干粉得率 将“2.1.2”项下的不同煎煮时间的 BHD 原汤、纳米相态及混悬相态样品在-20 ℃下冷冻 4 h 后，置于真空冷冻干燥机中冻干，样品平行重复 3 次，取平均值，计算冻干粉得率。由表 2 可知，4 个煎煮时间点的冻干粉得率排序为原汤>纳米相态>混悬相态。使用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析，不同煎煮时间的 BHD 原汤、纳米相态、混悬相态的冻干粉得率无显著差异，表明药材成分在短时间内溶出较完全。

冻干粉得率=冻干粉质量/冻干粉对应中药饮片总质量

2.4 BHD 原汤及各相态小分子成分含量测定
2.4.1 供试品溶液的制备 称取不同煎煮时间的 BHD 原汤、纳米相态、混悬相态冻干粉各 0.2 g，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加 50%甲醇至刻度，超声(功率 250 W、频率 40 kHz，40 ℃)30 min 溶解后，加 50%甲醇补足减失的质量，过 0.22 μm 微

孔滤膜，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 精密称取腺嘌呤、琥珀酸、异亮氨酸、洋川芎内酯 I、丹皮酚、儿茶素、芦丁、阿魏酸、黄芩苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、绿原酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芒柄花素、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮对照品适量，分别置于 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇定容至刻度，制成质量浓度为 0.11、0.19、0.14、0.12、0.12、0.10、0.15、0.17、0.18、0.11、0.14、0.11、0.11、0.11、0.11 g/L 的对照品储备溶液。吸取适量母液稀释一定倍数后，配制成混合对照品溶液。

2.4.3 检测条件

(1) 色谱条件：色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)；流动相为 0.01% 甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0~3

min, 1.0% 乙腈；3~4 min, 1.0%~7.0% 乙腈；4~8 min, 7.0%~12.5% 乙腈；8~12 min, 12.5%~25.0% 乙腈；12~20 min, 25.0%~80.0% 乙腈；20~22 min, 80.0%~1.0% 乙腈；22~26 min, 1.0% 乙腈；柱温 25 ℃；进样量 1 μL；体积流量 0.20 mL/min。

(2) 质谱条件：采用电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI)，扫描模式为多反应检测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式，以高纯氮气为雾化器和辅助气，氦气为碰撞气，离子源温度 400 ℃，离子传输管温度 250 ℃，接口温度 300 ℃，干燥气体积流量 10 L/min，加热气体积流量 10 L/min，雾化气体积流量 2.7 L/min。各成分质谱参数见表 3。各样品及混合对照品正、负离子模式下总离子流图见图 7。

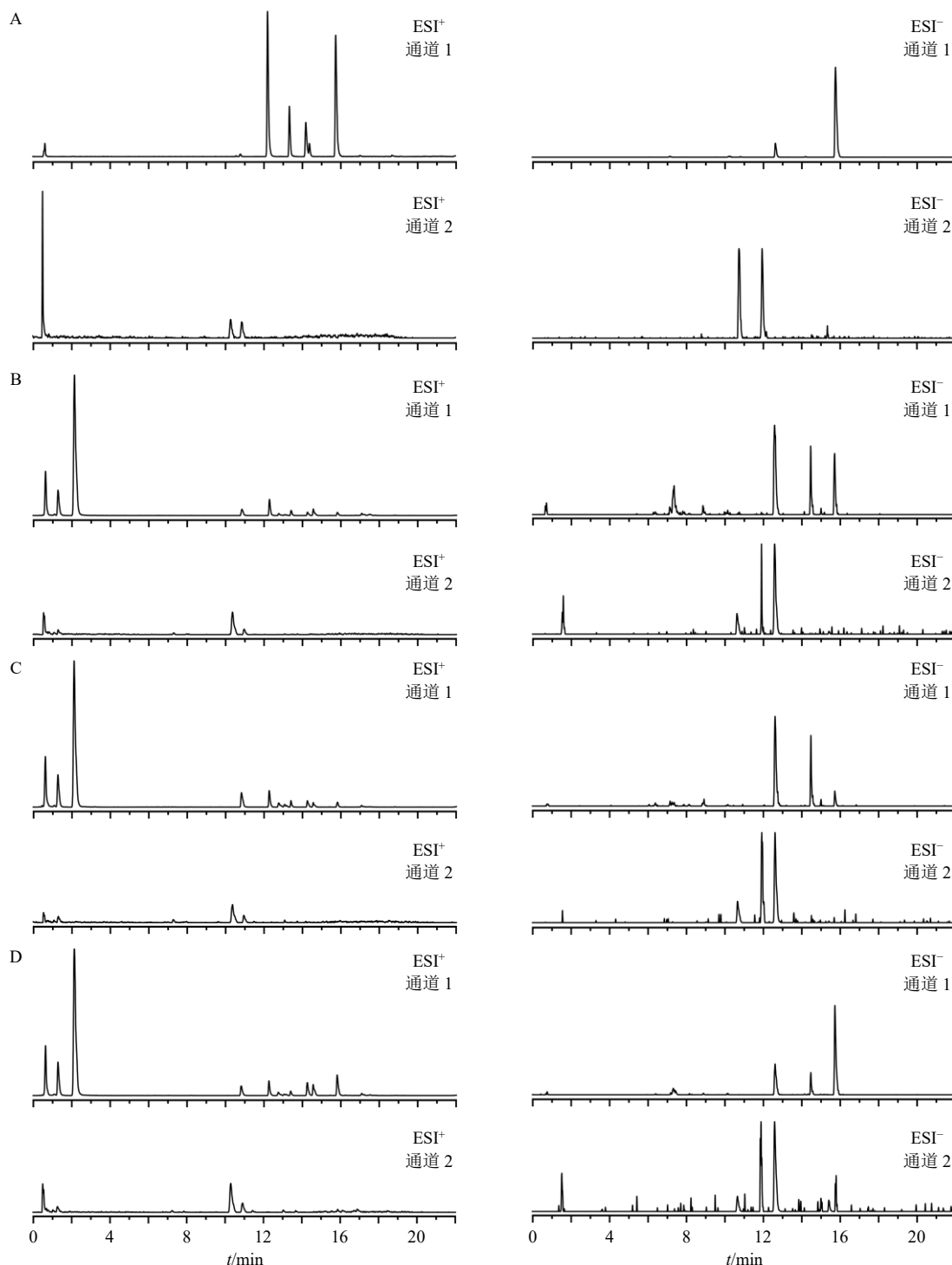
2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.2”项下混合

表 3 BHD 中 15 种成分的质谱参数
Table 3 Mass spectrometry parameters of 15 components in BHD

成分	<i>t</i> _R / min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞 能/ <i>V</i>	锥孔电 压/ <i>V</i>	分类	来源
琥珀酸	0.54	119.08	72.12	13	10	脂肪酸类	地龙
腺嘌呤	0.58	136.13	118.81	20	20	生物碱类	地龙、红花、当归、川芎、黄芪、桃仁
异亮氨酸	0.65	132.17	85.83	15	30	氨基酸类	地龙、黄芪
洋川芎内酯 I	0.73	223.25	204.55	10	11	苯酞类	川芎、当归
丹皮酚	1.08	167.17	120.49	25	30	挥发油类	赤芍
阿魏酸	10.16	195.18	144.77	15	10	酚酸类	川芎、当归
儿茶素	10.39	611.63	491.49	20	20	黄酮类	红花
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	10.79	491.45	283.34	25	18	黄酮类	黄芪
芦丁	11.99	609.51	179.01	30	20	黄酮类	红花、黄芪
绿原酸	12.15	351.08	113.43	28	16	酚酸类	川芎、红花、黄芪、桃仁
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	12.67	593.51	284.59	25	20	黄酮及其苷类	桃仁、红花
毛蕊异黄酮	12.87	285.26	133.72	30	30	黄酮类	黄芪
黄芩苷	13.30	455.07	113.48	20	20	黄酮类	红花
芒柄花素	14.54	267.26	90.48	40	30	黄酮类	黄芪
黄芪甲苷	15.44	829.36	783.44	15	23	皂苷类	黄芪

对照品溶液，加入 50% 甲醇，按 5 倍等比稀释成混合对照品溶液，制得 7 个不同质量浓度的系列混合对照品溶液，按照“2.4.3”项下检测条件进样分析。以混合对照品溶液的质量浓度为横坐标 (*X*)，对照品峰面积为纵坐标 (*Y*)，建立 15 种指标成分的回归方程、相关系数 (*R*²) 和线性范围分别为琥珀酸 $Y=48.475 X+41\ 614$, $R^2=0.999\ 6$, 线性范围 18.80~18 800.00 ng/mL；腺嘌呤 $Y=3\ 049.4 X+32\ 862$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 0.90~11 300.00 ng/mL；异亮氨酸 $Y=182.81 X+36\ 054$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围

14.20~14 200.00 ng/mL；洋川芎内酯 I $Y=1.434\ 9 X-675.06$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 480.00~12 000.00 ng/mL；丹皮酚 $Y=32.294 X+115\ 03$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 0.93~11 600.00 ng/mL；阿魏酸 $Y=168.92 X+8\ 311.5$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 1.34~16 800.00 ng/mL；儿茶素 $Y=1.495 X+1\ 887.7$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 2 060.00~10 300.00 ng/mL；毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=10.692 X+1\ 710.1$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 85.60~10 700.00 ng/mL；芦丁 $Y=17.619 X+2\ 528.7$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 119.20~14 900.00 ng/mL；



A-混合对照品正、负离子流图；B-YT-120 min 样品正、负离子流图；C-NM-120 min 样品正、负离子流图；D-HX-120 min 样品正、负离子流图。
A-positive and negative ion flow chart of mixed reference substances; B-positive and negative ion flow chart of YT-120 min sample; C-positive and negative ion flow chart of NM-120 min sample; D-positive and negative ion flow diagram of HX-120 min sample.

图 7 混合对照品、BHD 不同相态的总离子流图

Fig. 7 Total ion chromatograms of mixed reference substances and BHD of different phases

绿原酸 $Y=1\,049.7X+953\,42$, $R^2=0.999\,3$, 线性范围 $14.40\sim14\,400.00$ ng/mL; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 $Y=29.111X+1\,265$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 $22.60\sim11\,300.00$ ng/mL; 芒柄花素 $Y=98.236X+8\,501.3$,

$R^2=0.999\,7$, 线性范围 $11.40\sim11\,400.00$ ng/mL; 毛蕊异黄酮 $Y=237.91X+22\,340$, $R^2=0.999\,3$, 线性范围 $0.90\sim11\,300.00$ ng/mL; 黄芩苷 $Y=48.977X+6\,650.8$, $R^2=0.999\,6$, 线性范围 $736.00\sim18\,400.00$

ng/mL; 黄芪甲苷 $Y=91.698X-55.825$, $R^2=0.9998$, 线性范围 4.64~9 280.00 ng/mL; 结果表明, 15 种成分在线性范围内显示良好的线性关系。

2.4.5 精密度试验 取按照“2.4.1”项下方法制备的 BHD 原汤冻干粉供试品溶液, 按照“2.4.3”项检测条件连续进样 6 次, 测定各指标成分峰面积, 计算其 RSD 值。结果各指标成分琥珀酸、腺嘌呤、异亮氨酸、洋川芎内酯 I、丹皮酚、阿魏酸、儿茶素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、绿原酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、黄芩苷、黄芪甲苷峰面积的 RSD 值分别为 4.05%、5.21%、4.84%、4.26%、4.72%、4.92%、3.07%、3.61%、2.19%、2.72%、5.12%、4.83%、3.16%、4.79%、5.17%。

2.4.6 稳定性试验 按照“2.4.1”项下方法制备同一批次 BHD 原汤冻干粉供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h, 按照“2.4.3”项下检测条件进样分析, 测定各指标成分峰面积, 计算其 RSD 值。结果各指标成分琥珀酸、腺嘌呤、异亮氨酸、洋川芎内酯 I、丹皮酚、阿魏酸、儿茶素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、绿原酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、黄芩苷、黄芪甲苷峰面积的 RSD 值分别为 5.48%、7.47%、3.63%、6.87%、6.71%、3.78%、3.69%、6.10%、3.51%、3.97%、4.51%、6.87%、5.74%、6.67%、3.57%。

2.4.7 重复性试验 按照“2.4.1”项下方法平行制备 6 份同一批次 BHD 原汤冻干粉供试品溶液, 按照“2.4.3”项下检测条件进样分析, 测定各指标成分的峰面积, 计算其质量分数的 RSD 值。结果各指标成分琥珀酸、腺嘌呤、异亮氨酸、洋川芎内酯 I、丹皮酚、阿魏酸、儿茶素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、绿原酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、黄芩苷、黄芪甲苷质量分数的 RSD 值分别为 3.01%、4.99%、3.49%、3.99%、2.73%、3.67%、6.82%、3.93%、6.48%、1.36%、2.28%、5.27%、1.89%、3.34%、3.39%。

2.4.8 加样回收率试验 取同一批次 BHD 原汤冻干粉样品 6 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 按照样品中各指标成分的含有量, 精密加入等量的 15 种对照品混合溶液, 按照“2.4.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4.3”项下检测条件进行检测, 测定各指标成分含量, 计算其加样回收率和 RSD 值, 各指标成分琥珀酸、腺嘌呤、异亮氨酸、洋川芎内酯 I、丹皮酚、阿魏酸、儿茶素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、

芦丁、绿原酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、黄芩苷、黄芪甲苷的平均加样回收率分别为 106.50%、87.89%、96.51%、94.72%、87.69%、88.61%、106.35%、96.50%、107.27%、94.00%、96.37%、97.21%、97.00%、96.66%、92.74%, RSD 值分别为 7.33%、6.96%、3.63%、4.56%、7.14%、7.89%、5.07%、6.59%、4.79%、6.66%、1.66%、5.76%、6.92%、3.05%、3.75%。

2.4.9 BHD 原汤及各相态中 15 种指标成分含量差异比较 取按照“2.4.1”项下方法制备的各供试品溶液, 按照“2.4.3”项下检测条件进样测定, 根据峰面积与标准曲线结果计算各样品中 15 种指标成分的总含量及质量分数, 样品平行制备 3 份, 取平均值, 结果见表 4 和图 8。结果显示, BHD 原汤、纳米相态、混悬相态中均含有 15 种指标成分。15 种成分在 BHD 原汤和不同相态中的含量差异较大, 而不同煎煮时间对指标成分含量的影响较小。煎煮 30 min 时, 与纳米相态相比, 除山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷外, 其余 13 种成分的含量在混悬相态中的平均含量较高, 表明汤液中形成的络合物容易聚集沉淀, 分布于混悬相态中。随着煎煮时间的延长, 汤液中的 15 种成分含量处于动态变化中, 在各个相态中的含量不一, 表明煎煮的热力学过程会影响汤液成分自组装状态的稳定性。在同一煎煮时间下, 15 种成分中多数成分在混悬相态的含量高于纳米相态。在煎煮过程中, 黄芩苷、异亮氨酸、阿魏酸、腺嘌呤、丹皮酚、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 9 种成分在 BHD 原汤及各相态中的含量差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 推测这 9 种成分在煎煮过程中发生分子间的自组装, 形成超分子聚集体, 导致成分在不同相态的分布具有差异性。

2.5 统计学分析

用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 多组间的比较采用单因素方差分析, 采用最小显著性差异 (LSD) 法进行多组间的两两比较, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 讨论

由于中药复方的成分繁杂, 水溶性成分会以分子状态分散在汤剂中, 而难溶性成分会以颗粒形式存在, 脂溶性成分会以乳化状态存在^[27]。煎煮过程中, 理化性质不同的成分, 在静电吸引、范德华力、疏水作用及氢键等多重非共价键的协同驱动下通过

表 4 不同煎煮时间的 BHD 及各相态 15 种成分含量 (n = 3)

Table 4 Contents of 15 components in BHD and each phase at different decoction times (n = 3)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)														
	琥珀酸	腺嘌呤	异亮氨酸	洋川芎内酯 I	丹皮酚	阿魏酸	儿茶素	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芦丁	绿原酸	山柰酚-3-O-芸香糖苷	芒柄花素	毛蕊异黄酮	黄芩苷	黄芪甲苷
YT-30 min	0.079	0.178	0.221	1.672	0.661	0.032	0.715	0.842	0.695	0.052	0.187	0.201	0.071	0.367	0.027
YT-60 min	0.077	0.088	0.090	1.624	0.620	0.033	0.620	0.603	0.600	0.060	0.138	0.134	0.041	0.434	0.029
YT-90 min	0.076	0.152	0.114	1.564	0.579	0.032	0.661	0.734	0.721	0.046	0.139	0.080	0.034	0.439	0.037
YT-120 min	0.097	0.113	0.147	1.764	0.602	0.036	0.709	0.781	0.787	0.056	0.140	0.134	0.025	0.665	0.040
NM-30 min	0.079	0.088	0.129	1.046	0.356	0.007	0.357	0.429	0.906	0.048	0.284	0.234	0.083	0.365	0.047
NM-60 min	0.115	0.080	0.108	1.098	0.387	0.007	0.368	0.399	0.846	0.049	0.228	0.172	0.087	0.370	0.038
NM-90 min	0.116	0.096	0.149	0.877	0.302	0.008	0.375	0.371	1.045	0.051	0.205	0.129	0.053	0.341	0.032
NM-120 min	0.127	0.089	0.121	0.838	0.232	0.008	0.272	0.276	1.142	0.061	0.228	0.158	0.034	0.390	0.039
HX-30 min	0.184	0.112	0.133	1.529	0.633	0.037	0.607	0.491	0.780	0.054	0.159	0.300	0.092	0.593	0.127
HX-60 min	0.191	0.084	0.094	1.405	0.643	0.033	0.634	0.443	0.779	0.044	0.177	0.195	0.070	0.349	0.128
HX-90 min	0.169	0.123	0.184	1.464	0.644	0.048	0.559	0.482	0.816	0.072	0.160	0.233	0.056	0.493	0.168
HX-120 min	0.195	0.084	0.153	1.427	0.596	0.040	0.666	0.553	0.866	0.045	0.136	0.123	0.060	0.577	0.125

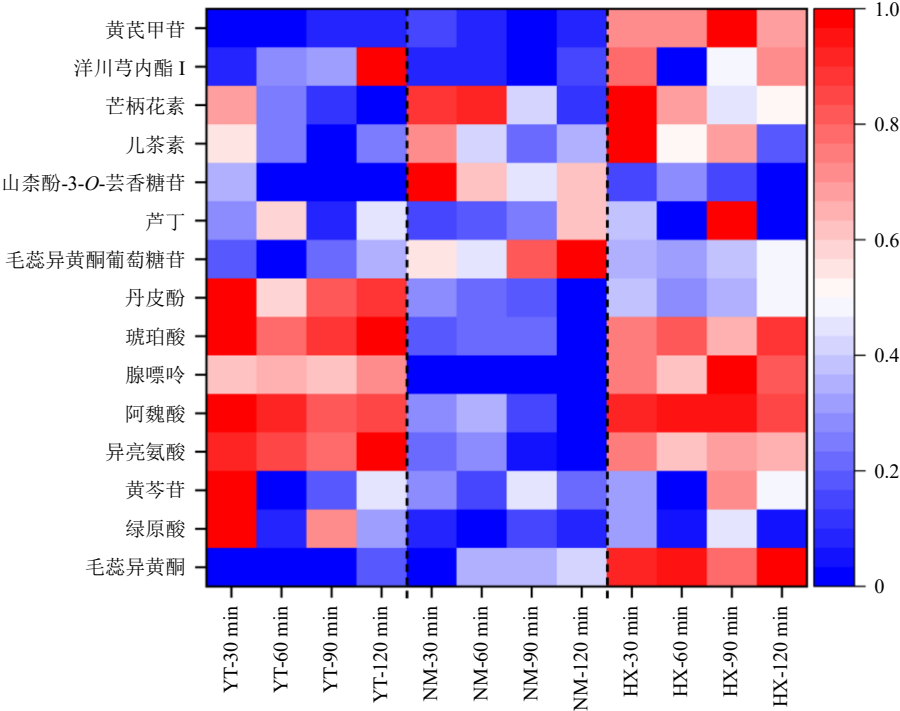


图 8 BHD 原汤及不同相态中 15 种成分含量归一化图

Fig. 8 Normalized diagram of 15 components contents in original decoction and different phases of BHD

分子自组装形成胶体颗粒、自沉淀等相态的变化^[28]。本研究通过“高速离心-透析”法成功分离了 BHD 煎煮液中的纳米相态和混悬相态。通过物理表征发现，煎煮过程中 BHD 原汤的粒径先减小后增大，在 90 min 时粒径最大，混悬相态的粒径在 60 min 时达到最大。纳米相态的粒径随煎煮时间的延长而逐渐减小，且纳米相态的 ζ 电位随煎煮时间的延长逐渐降低，溶液稳定性降低，表明煎煮的加热过程

会促进成分之间的粘连或聚集，形成粒径较大的颗粒，从而导致自沉淀的发生。通过 UV-vis 与 FT-IR 表征各相态成分的自组装特征，结果表明各相态煎煮时间的延长并没有导致 BHD 特征峰的位置发生改变，仅峰强度有所不同，说明煎煮时间不会明显影响汤剂成分的自组装方式。

LC-MS/MS 的结果表明，各煎煮时间点的原汤、纳米相态及混悬相态的化学成分种类一致，仅含量

有差别。15 种指标成分中多数成分在混悬相态的平均含量高于纳米相态,说明 BHD 的沉淀组分可能是汤剂成分形成超分子聚集体后进一步沉降所产生^[29]。Chen 等^[30]鉴定出黄连解毒汤上清液与沉淀中的 109 种成分,发现沉淀中的黄芩苷和小檗碱多于上清液,而黄芩苷和小檗碱是黄连解毒汤的重要活性成分。另有研究表明中药复方合煎的自沉淀具有“体外沉积、体内缓释”的特点,阐明中医理论中强调“顿服”的合理性^[31],表明沉淀组分在中药汤剂的研究过程中同样应予以重视。“结构中药学”理论认为中药的化学成分和物理结构共同影响中药的药效物质基础^[32]。

本研究结果显示,9 种可能导致汤剂相态变化的成分中,黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素在混悬相态中的含量显著高于纳米相态。黄芪甲苷作为黄芪的标志性有效成分,具有增强免疫、改善微循环等补气通络作用;毛蕊异黄酮和芒柄花素为黄芪中主要的黄酮类成分,可协同发挥抗氧化、抗炎活性^[33]。3 种成分在各相态含量差异提示黄芪的核心药效成分可能更倾向于通过混悬相态中的聚集体形式存在,结合沉淀组分的缓释特性,这与黄芪长效的补气作用相一致。川芎、当归的关键药效成分阿魏酸具有抑制血小板聚集、改善血液流变性等活血作用^[34],其在混悬相态的含量显著较高,推测可增强混悬相态的缓慢溶出特性或可增强其活血通络的长效性。地龙中的腺嘌呤、异亮氨酸在混悬相态中富集,有利于稳定发挥地龙的“通络”药效。

此外,芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和山柰酚-3-O-芸香糖苷在煎煮过程中主要富集于纳米相态,其含量高于原汤和混悬相态。其原因可能是汤剂中的多糖类成分能提高难溶性的黄酮类成分的水溶性和稳定性^[35],且由于大多数黄酮苷类成分呈酸性或中性,在煎煮过程中易与生物碱类成分发生酸碱络合反应自组装成纳米颗粒^[36]。进一步分析各相态中的多糖及蛋白质含量,发现多糖及蛋白质类大分子物质明显高于小分子物质;多糖类物质主要分布在纳米相态,而蛋白质主要分布于混悬相态;煎煮时间的延长会导致多糖类物质含量有所下降,而对蛋白质影响较小,可以推测多糖及蛋白质同样参与汤剂成分的自组装过程,宏观体现在各相态含量的差异上。已有研究表明汤剂的纳米相态和混悬相态在药效上存在差异,2 种相态协同维持药效的不同方面^[37]。

在实际煎煮和应用过程中,纳米相态和混悬相态是以混合状态共存于汤剂中,中药复方的药效并非单一相态或成分的作用,而是多相态、多成分的协同效应。本研究旨在解析相态形成与成分分布的规律,为理解中药复方汤剂复杂体系的形成机制及阐明其药效物质基础提供了重要的超分子动态视角,后续将从相态不同成分间作用的具体机制及药效验证方面开展更深入的研究,进一步明确 BHD 煎煮过程超分子形成的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Zhao G D, Hong L, Liu M M, *et al.* Isolation and characterization of natural nanoparticles in Naoluo Xintong Decoction and their brain protection research [J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1511.
- [3] Wang Z J, Li W, Lu J H, *et al.* Revealing the active ingredients of the traditional Chinese medicine decoction by the supramolecular strategies and multitechnologies [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115704.
- [4] 陈旺, 谯茹, 贺鹏, 等. 基于因子旋转法与超分子“印迹模板”的活血化瘀中药“物质单元”解析 [J]. 中草药, 2025, 56(17): 6159-6172.
- [5] 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.
- [6] 刘小靖, 李桐, 袁枝花, 等. 基于弱键诱导的小檗碱-黄酮苷类超分子“结构-构象-形态-活性”传导关系探讨中药配伍理论科学内涵 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7001-7009.
- [7] 张喜武, 刘美欣, 李秋晗, 等. 以有效相态为视角探讨中药复方药性传递规律 [J]. 中医药学报, 2018, 46(2): 1-4.
- [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] 高源, 郭琴, 王欢欢, 等. 基于中药大分子探讨芍药甘草汤镇痛的物质基础及作用机制 [J]. 药学报, 2023, 58(5): 1138-1148.
- [10] 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.
- [11] Huang X M, Liu X J, Lin X Y, *et al.* Thermodynamics driving phytochemical self-assembly morphological

- change and efficacy enhancement originated from single and co-decoction of traditional Chinese medicine [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 527.
- [12] 瞿钟欢, 杨艳君, 杨冰, 等. 基于“物相结构”特征的中药品质调控新视角 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(13): 3579-3588.
- [13] 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]. 中国药理学杂志, 2024, 59(20): 1917-1924.
- [14] 亓鹏浩. 补阳还五汤治疗脑中风的理论溯源及研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(7): 208-212.
- [15] 陶春晓, 叶泰玮, 李敏, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5550-5559.
- [16] Liang P, Bi T, Zhou Y N, *et al.* Insights into the mechanism of supramolecular self-assembly in the *Astragalus membranaceus*-*Angelica sinensis* decoction [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2023, 15(41): 47939-47954.
- [17] Zhao G D, Hong L, Liu M M, *et al.* Isolation and characterization of natural nanoparticles in Naoluo Xintong Decoction and their brain protection research [J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1511.
- [18] 李海英, 贺鹏, 李文姣, 等. 补阳还五汤化学成分、药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4575-4587.
- [19] 王琴, 袁成业, 江勇, 等. 基于“汤剂相态-纳米组装”的气血双补方抗慢性心衰炮制增效机理研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(11): 1185-1190.
- [20] 李文栋, 朱卫丰, 李哲, 等. 中药固体制剂多成分溶出研究方法进展 [J]. 中成药, 2020, 42(7): 1842-1847.
- [21] 魏吉昌, 林晓钰, 张景怡, 等. 基于相态变化探讨煎煮方式对黄芩-黄连超分子物质基础及配伍“和合”机制的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(24): 8366-8378.
- [22] 周惠芬, 邢攀科, 张宇燕, 等. HPLC 与 UV-VIS 联用对补阳还五汤总黄酮质量控制 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(12): 2641-2643.
- [23] 田燕. 紫外-可见光谱在黄酮类鉴定中的应用 [J]. 大连医科大学学报, 2002, 24(3): 213-214.
- [24] 曾东. 当归及其提取物化学成分红外光谱法分析 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(4): 287-288.
- [25] 李芳, 李钦, 顾志荣, 等. 基于 FTIR 的黄芪药材产地鉴别及预测研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(11): 1712-1717.
- [26] 卫修来, 卢雨晴, 程钢. 不同煎煮时间对茯苓饮片水溶性多糖含量的影响 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(1): 190-193.
- [27] Gao Y, Dong Y Y, Guo Q, *et al.* Study on supramolecules in traditional Chinese medicine decoction [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3268.
- [28] 沈成英, 胡菲, 朱君君, 等. 中药自组装纳米粒的形成及应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 4875-4880.
- [29] 田学浩, 张昊, 李桐, 等. 中药配伍理论科学内涵的外在表象: 复方水煎自沉淀 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4778-4783.
- [30] Chen M, Wang P L, Li T, *et al.* Comprehensive analysis of Huanglian Jiedu Decoction: Revealing the presence of a self-assembled phytochemical complex in its naturally-occurring precipitate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195: 113820.
- [31] 李美慧, 冯熙, 罗欣雨, 等. 经典名方四逆汤复方合煎过程中自沉淀的形成机制探析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(22): 145-152.
- [32] 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.
- [33] 张梅僊, 刘海龙, 王瑞琼, 等. 黄芪化学成分和药理作用及 Q-marker 预测分析 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(4): 410-419.
- [34] 王立霞, 王枫, 陈欣, 等. 阿魏酸钠的心脑血管药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 772-777.
- [35] Yang B, Wu X C, Zeng J Q, *et al.* A multi-component nano-co-delivery system utilizing *Astragalus* polysaccharides as carriers for improving biopharmaceutical properties of *Astragalus* flavonoids [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 6705-6724.
- [36] 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.
- [37] He C, Zhou J W, Zhang W J, *et al.* Study on the bioactive components of Banxia Xiexin Decoction with different decocting methods and its effects on ulcerative colitis rats from the perspective of phase states [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118626.

[责任编辑 郑礼胜]