

·药学基础·

白虎汤相态拆分及不同相态中主要成分的含量测定

吕邵娃¹, 武印奇¹, 李英鹏², 王艳宏¹, 杨志欣¹, 王锐¹, 管庆霞¹, 李永吉^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193)

[摘要] 目的:对白虎汤药液进行相态拆分,并对白虎汤真溶液相态、纳米相态及沉淀相态中的芒果苷、新芒果苷、钙离子、甘草苷和甘草酸铵的含量进行测量,以明确白虎汤纳米粒子对其主要成分的增溶作用,从而阐释白虎汤强效解毒解热作用机制。**方法:**采用高速离心和透析技术对白虎汤进行相态拆分,并采用高效液相色谱法对白虎汤不同相态中的芒果苷、新芒果苷、甘草苷和甘草酸铵的含量进行测定。采用Diamondsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-25 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液梯度洗脱,检测波长257 nm,柱温30 °C,流速1.0 mL·min⁻¹。采用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液对白虎汤不同相态中钙离子浓度进行标定。**结果:**1 mL白虎汤纳米粒子中含有新芒果苷483.00 μg,芒果苷1 068.88 μg,甘草苷219.93 μg,甘草酸铵187.10 μg,其中新芒果苷和芒果苷的含量分别占1 mL白虎汤的89.4%和89.9%。纳米相态中新芒果苷和芒果苷分别是真溶液230.0倍和23.3倍,沉淀的8.5倍和14.4倍。白虎汤纳米相态中含有钙离子的含量较多,占白虎汤水煎液的86.9%,且白虎汤及白虎汤纳米相态中钙离子含量均高于石膏组。**结论:**白虎汤纳米相态的主要成分含量明显高于其他相态,白虎汤纳米粒子对于白虎汤中主要解热成分新芒果苷、芒果苷和钙离子以及解毒成分甘草酸和甘草次酸起到了增溶作用,白虎汤强效解毒解热作用机制与其形成的纳米粒子有关。

[关键词] 白虎汤; 相态; 纳米粒子; 含量测定

[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0154-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201212

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200306.1156.001.html>

[网络出版日期] 2020-3-6 15:13

Determination of Main Components in Baihutang with Separation of Different Phase States and Different Phase States

LYU Shao-wa¹, WU Yin-qi¹, LI Ying-peng², WANG Yang-hong¹, YANG Zhi-xin¹, WANG Rui¹,
GUAN Qing-xia¹, LI Yong-ji^{1*}

(1. Key Laboratory of Basic Research on Pharmacodynamics Substances of Traditional Chinese Medicine(TCM) and Natural Medicine in Heilongjiang Province, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. School of Chinese Material Medica, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** The phase separation of Baihutang was carried out. The content of mangiferin, new mangiferin, calciumion, glycyrrhizin and ammonium glycyrrhizinate in the solution phase, the nano phase and the precipitated phase of Baihutang were measured, so as to define the effect of nanometer particles of Baihutang on the growth of active components, and explain the mechanisms of Baihutang in potent detoxification and heat removal. **Method:** The phase separation of Baihutang was performed by high-speed centrifugation and

[收稿日期] 20191126(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673611)

[第一作者] 吕邵娃,博士,教授,硕士生导师,从事新药开发与研究工作,Tel:0451-87266916,E-mail:lswa5599@hotmail.com

[通信作者] *李永吉,博士,教授,博士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:0451-87267555,E-mail:Liyongji2009@163.com

dialysis. The contents of mangiferin, new mangiferin, glycyrrhizin and ammonium glycyrrhizinate in Baihutang were determined by HPLC. Chromatographic column Diamonsil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted, with acetonitrile-25 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution as the mobile phase, and eluted in a gradient mode. The detection wavelength was 257 nm, the column temperature was 30 °C, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. EDTA-2Na solution was used to calibrate the calcium concentration in different phase states of Baihutang. **Result:** 1 mL Baihutang nanoparticles contained 483.00 μg new mangiferin, 1 068.88 μg mangiferin, 219.93 μg glycyrrhizin and 187.10 μg ammonium glycyrrhizin, and the content of new mangiferin and mangiferin accounted for 89.4% and 89.9% respectively in 1 mL Baihutang. The new mangiferin and mangiferin in the nano phase were 230.0 and 23.3 times the true solution, and 8.5 and 14.4 times of the precipitation, respectively. The content of calcium ions in Baihutang in the nano phase was higher, accounting for 86.9% of Baihutang, and the content of calcium ions in Baihutang and Baihutang in the nano phase was higher than that in gypsum group. **Conclusion:** The content of main components in Baihutang in nanometer phase is significantly higher than that in other phases. The nanoparticles of Baihutang have a solubilizing effect on the main antipyretic components, such as mangiferin, mangiferin and calcium ions as well as the antitoxic components glycyrrhizic acid and glycyrrhizic acid. The mechanism of action of Baihutang is related to the formation of nanoparticles.

[Key words] Baihutang; phase behavior; nanoparticles; content determination

汤剂是最常见的临床剂型之一,在汤剂的制备过程中,可使药材中的有效成分通过在水中煎煮而溶解。虽然煎煮法可提高药材中不溶性物质的溶解度,但其生物活性成分是以何种形式分散在溶液中的还不为人所知^[1]。通过周建武等^[2]研究发现,在多种复方中药汤剂中均观察到直径在几十到几百纳米不等的纳米粒子,药液中的纳米粒子可通过氢键等方式结合难溶性有效成分来增强其难溶性成分的溶解度,从而增强药液的疗效。这让越来越多的研究者对纳米团聚体在汤剂中的作用产生深思。

白虎汤为汤剂经典名方,由石膏、知母、甘草以及粳米组成,在《伤寒杂病论》中被张仲景誉为“寒剂之组方”,在现代也常用于治疗高热型疾病^[3]。其中石膏作为难溶性药物在多数处方中均为先煎,而在此方中却是与其他药一同煎煮,使得人们对于白虎汤中的有效成分是在药液中分散的形态产生了一定的疑惑。因此本文将白虎汤进行相态拆分,并采用HPLC法对白虎汤真溶液相态、纳米相态及沉淀相态中清热药物知母含有的有效成分芒果苷、新芒果苷及解毒药物甘草含有的有效成分甘草苷和甘草酸铵4种成分进行了含量测定;采用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)滴定法对白虎汤纳米相态中清热药石膏的有效成分钙离子含量进行测定;从而进一步阐明白虎汤的高效解毒解热作用机制,同时为经典名方的研究以及中药复方制剂形成理论的

发展提供新的思路。

1 材料

AB265-S型分析天平(梅特勒公司),SB-5200D型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),H-2050R型超速低温离心机(湘仪离心机仪器有限公司),HZS-HA型水浴恒温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),UltiMate 3000型色谱仪(美国戴安公司),电热套(京市永光明医疗仪器厂),I1033透析袋(3 500 Da, BioSharp 生物科技),JYC-21HS33型电磁炉(九阳股份有限公司),JEM-2010HR型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

对照品芒果苷、新芒果苷、甘草苷、甘草酸铵(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为MUST-15070110, MUST-15061610, MUST-15082811, MUST-15081909,纯度均≥98%)。甲醇、乙腈(Dikma Pure, 色谱纯),磷酸二氢钾(天津市富宇精细化工有限公司,分析纯),EDTA-2Na(天津基准化学试剂有限公司),氢氧化钾(天津市凯通化学试剂有限公司),氯化钾(天津市天力化学试剂有限公司),酚酞(天津市巴斯夫化工有限公司),甲基红、钙黄绿素(沈阳先创化工有限公司),定性试纸(京天联和谐有限公司)、实验用水为娃哈哈纯净水。石膏、知母、炙甘草和粳米均购于哈尔滨同仁堂药店,经黑龙江中医药大学孙慧峰教授鉴定为正品石膏、百合科植物知母 *Anemarrhena*

asphodeloides 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的根及根茎,禾本科植物粳米 *Oryza sativa* 的去壳种仁。

2 方法与结果

2.1 白虎汤及不同相态的制备及纳米相态元素分析 称取石膏 50 g(打碎,纱布包煎),知母 18 g,炙甘草 6 g 投入砂锅中,加水 200 mL,室温浸泡 30 min,再加水 200 mL,加粳米约 9 g 于上述砂锅中,调节火力至武火,加热至沸,调至文火加热至煮米熟^[4],煎煮期间需不定时搅拌,冷却至室温,经四

层纱布(用前润湿)过滤至烧杯中,得白虎汤(I)。然后将白虎汤水煎剂经 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,得沉淀相态(II),上清液经抽滤、过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜处理。然后将上述液体加至透析袋二分之一处,随即将透析袋装入加有 200 mL 水的烧杯中,于水浴恒温振荡器 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震荡 30 min。取出透析袋中白虎汤样品,于 $1\text{万 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,上述透析-超速离心操作重复 4 次,烧杯中液体为真溶液相态(III),透析袋中液体即为纳米相态(IV),流程见图 1。

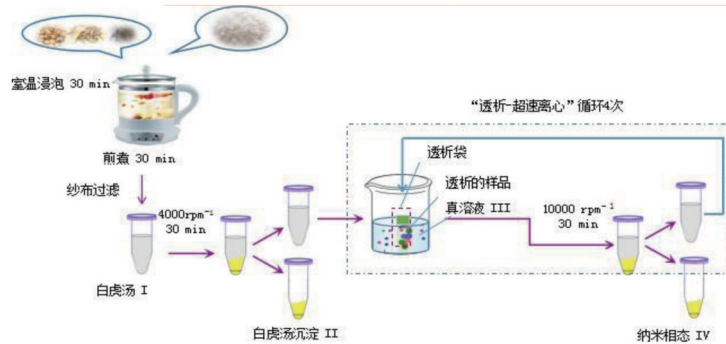


图 1 白虎汤中纳米相态的拆分工艺流程

Fig. 1 Flow diagram of separation of aggregate in Baihutang

按照此拆分工艺制备白虎汤纳米相态 3 批,考察各批次白虎汤纳米相态的粒径大小及形态。结果表明,粒径均主要集中在 50 nm 左右,电位为 -3.22 V ,聚合物分散系数(PDI)为 1,透射电子显微镜(TEM)图像清晰可见球状团聚物,图像良好,见图 2;说明该拆分工艺的重现性良好,工艺可行。

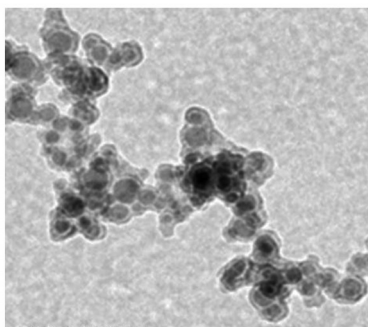


图 2 白虎汤纳米相态的 TEM

Fig. 2 TEM of nano phase in Baihutang

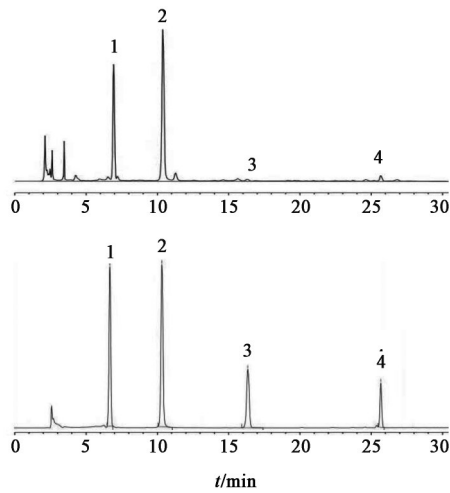
2.2 芒果苷、新芒果苷、甘草苷和甘草酸铵的含量测定

2.2.1 对照品供试液的制备 精密称量新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵对照品适量,加入甲醇配置成质量浓度分别为 $0.2, 0.3, 0.1, 0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用。

2.2.2 供试液的制备 精密量取白虎汤及白虎汤中不同相态溶液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度处,超声 10 min,取出放冷后,加入甲醇补充至刻度线处, $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液至 10 mL 量瓶中,补充甲醇至刻度线处,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得。

2.2.3 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱 ($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\ \mu\text{m}$);流动相 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(A)-乙腈(B),进行梯度洗脱(0~18 min, 10%~28%B; 18~20 min, 28%~33%B; 20~26 min, 33%~39%B);进样量 $10\ \mu\text{L}$,检测波长 257 nm,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。按照上述的色谱条件,分别取对照品、白虎汤供试液进样测定。结果表明,新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵的保留时间依次为 6.483, 10.047, 15.307, 24.34 min,白虎汤供试液得到较好的分离,见图 3。

2.2.4 标准曲线的考察 精密量取混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,分别精密量取 $20\ \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,按照色谱条件测定,以进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,对照品面积 Y 为纵坐标,建立色谱峰面积对主要成分含量的线性回归方程,结果见表 1。



A. 白虎汤样品; B. 混合对照品; 1. 新芒果苷; 2. 芒果苷; 3. 甘草苷; 4. 甘草酸铵

图3 白虎汤样品的HPLC

Fig. 3 Chromatogram of mixture of standard compounds and Baihutang

表1 新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵的线性关系

Table 1 Linear range neomangiferin, mangiferin, glycyrrhizic acid and ammonium glycyrrhizinate

| 对照品 | 标准曲线 | R^2 | 线性范围/ μg |
|------|---------------------|--------|---------------------|
| 新芒果苷 | $Y=23.6560X+0.7480$ | 0.9999 | 0.04~4.00 |
| 芒果苷 | $Y=48.8732X-0.7480$ | 0.9998 | 0.06~6.00 |
| 甘草苷 | $Y=8.3118X-0.1881$ | 0.9999 | 0.02~2.00 |
| 甘草酸铵 | $Y=7.1224X+0.0738$ | 0.9997 | 0.02~2.00 |

2.2.5 精密度试验 精密吸取新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵4种对照品溶液10 μL ,连续进样6次,考察精密度。按照上述的色谱条件测定峰面积,其RSD分别为1.9%,1.1%,2.2%,1.9%。结果表明,仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称量白虎汤原方6份,按上述供试液进行制备。分别进样,测定4种主要成分的峰面积。结果新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵的平均质量分数分别为540.09,1185.97,251.59,230.31 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,RSD分别为0.9%,0.5%,2.0%,0.5%。表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密量取同一白虎汤供试液10 μL ,分别于0,2,4,8,16,24 h注入液相色谱仪,记录各色谱峰的峰面积,新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵RSD分别为1.6%,1.0%,1.2%,1.4%。表明白虎汤在24 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取制备的白虎汤供试液6份,每份1 mL,分别加入混合对照品溶液1 mL,按照上述的色谱条件进行测定,测定4种主要

成分的峰面积,计算各成分的含量、加样回收率以及RSD,结果见表2~5。

表2 新芒果苷加样回收率试验

Table 2 Mean recovery of neomangiferin

| 样品中量/ μg | 测得量/ μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| 270.03 | 540.06 | 100.01 | 100.29 | 1.4 |
| 269.85 | 540.34 | 100.18 | | |
| 261.95 | 540.45 | 103.15 | | |
| 271.32 | 539.78 | 99.43 | | |
| 269.81 | 538.92 | 99.67 | | |
| 269.73 | 537.85 | 99.30 | | |

注:加入量均为270.00 μg 。

表3 芒果苷的加样回收率试验

Table 3 Mean recovery of mangiferin

| 样品中量/ μg | 测得量/ μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| 599.13 | 1192.13 | 98.83 | 99.92 | 1.7 |
| 592.73 | 1190.78 | 99.68 | | |
| 598.23 | 1194.42 | 99.37 | | |
| 575.45 | 1194.56 | 103.19 | | |
| 603.21 | 1196.23 | 98.84 | | |
| 599.13 | 1196.67 | 99.59 | | |

注:加入量均为600.00 μg 。

表4 甘草苷的加样回收率试验

Table 4 Mean recovery of glycyrrhizic acid

| 样品中量/ μg | 测得量/ μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| 127.85 | 259.78 | 101.48 | 102.36 | 2.0 |
| 124.46 | 259.64 | 103.98 | | |
| 121.35 | 258.64 | 105.61 | | |
| 127.14 | 258.31 | 100.90 | | |
| 128.64 | 259.08 | 100.34 | | |
| 127.68 | 260.08 | 101.85 | | |

注:加入量均为130.00 μg 。

2.2.9 含量测定 取白虎汤及白虎汤中不同相态各3份,进行供试液的制备,按照上述的色谱条件进行含量测定,记录色谱图。计算白虎汤及白虎汤中不同相态中4种主要成分的含量。结果表明,白虎汤真溶液及白虎汤沉淀中所含上述成分较少,白虎汤纳米相态中4种主要成分的含量较多,其中,新芒果苷和芒果苷的质量分数占白虎汤的89.4%,89.9%,结果见表6,图4。

表5 甘草酸铵的加样回收率试验

Table 5 Mean recovery of ammonium glycyrrhizinate

| 样品中量/ μg | 测得量/ μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| 114.93 | 229.35 | 99.50 | 100.30 | 1.4 |
| 113.74 | 230.72 | 101.72 | | |
| 117.63 | 231.27 | 98.82 | | |
| 115.67 | 230.02 | 99.43 | | |
| 113.06 | 230.63 | 102.23 | | |
| 113.82 | 228.93 | 100.10 | | |

注:加入量均为115.00 μg 。

表6 白虎汤及不同相态中新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵的质量分数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Contents of neomangiferin, mangiferin, glycyrrhizic acid and ammonium glycyrrhizinate in BHT and different phase ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 成分 | 白虎汤 | 纳米相态 | 沉淀相态 | 真溶液相态 |
|------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| 新芒果苷 | 540.03 \pm 10.36 | 483.00 \pm 10.55 | 56.78 \pm 4.90 | 2.10 \pm 0.19 |
| 芒果苷 | 1 188.40 \pm 1.04 | 1 068.88 \pm 9.67 | 74.22 \pm 6.90 | 45.80 \pm 3.55 |
| 甘草苷 | 255.42 \pm 5.82 | 219.93 \pm 7.08 | 24.18 \pm 0.84 | 6.72 \pm 1.53 |
| 甘草酸铵 | 230.33 \pm 7.79 | 187.10 \pm 7.02 | 32.34 \pm 2.60 | 0.87 \pm 0.03 |

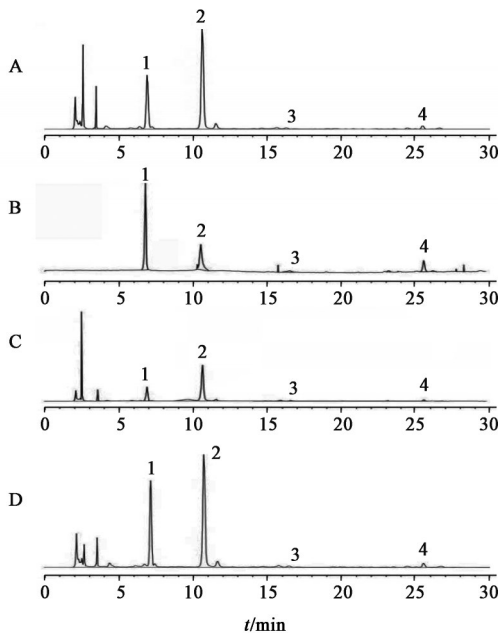


图4 白虎汤及不同相态溶液的HPLC
A.白虎汤纳米相态(N-BHT);B.白虎汤真溶液(D-BHT);C.白虎汤沉淀(S-BHT);D.白虎汤(BHT);1.新芒果苷;2.芒果苷;3.甘草苷;4.甘草酸铵

图4 白虎汤及不同相态溶液的HPLC

Fig. 4 Representative HPLC chromatograms in the order were BHT, N-BHT, D-BHT and S-BHT

2.3 纳米相态中钙离子含量的测定

2.3.1 供试品溶液的制备

取石膏50 g(打碎,纱

布包煎),知母18 g,炙甘草6g投入砂锅中,加水200 mL,室温浸泡30 min,再加水200 mL,加粳米约9 g于上述砂锅中,调节火力至武火,加热至沸,调至文火加热至煮米熟,煎煮期间需不定时搅拌,冷却至室温,经四层纱布(用前润湿)过滤至烧杯中,即得白虎汤水煎液。白虎汤水煎液按2.1项方法下制备得到白虎汤纳米相态。另取石膏50 g,按照上述方法过程煎煮,经纱布过滤,得石膏水煎液。将白虎汤水煎液、白虎汤纳米相态及石膏水煎液定容至250 mL后,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3.2 指示剂的制备

钙对照溶液的制备:称取干燥恒重2份 CaCO_3 ,每份0.30 g,记录精确质量。0.30 g CaCO_3 放入250 mL烧杯中,加少量蒸馏水于 CaCO_3 使其表面湿润,随即将表面皿盖于烧杯之上,沿烧杯尖嘴处慢速加入适量盐酸,立刻盖上表面皿,待烧杯中 CaCO_3 完全溶解后,加热至无气泡产生,冷却至室温后用蒸馏水洗涤表面皿,将溶液转移至250 mL量瓶定容刻度线处,充分混匀后备用。

钙黄绿素指示剂的制备:称取钙黄绿素0.20 g,酚酞0.07 g和氯化钾20.00 g三者于研钵中同时研磨至均匀。

甲基红指示液的制备:称取甲基红0.10 g和浓度为0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaOH溶液7.4 mL使其完全溶解后转移至200 mL量瓶,加入蒸馏水至刻度线即得。其变色范围pH在4.2~6.3(颜色由红色至黄色)。

2.3.3 EDTA-2Na溶液的标定

用移液管精密移取钙对照溶液25 mL置于烧杯中,然后加入水150 mL,搅拌均匀后,加20%氢氧化钾溶液、钙黄绿素指示剂适量,用EDTA-2Na对照溶液滴定溶液至黄绿色消失,显橙色。平行测定3次后取均值,经计算EDTA-2Na对照溶液的浓度为0.049 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.4 石膏中含水硫酸钙含量的测定方法

称取石膏0.20 g于烧杯中,加稀盐酸10 mL加热使其充分溶解,加水100 mL与甲基红指示液1滴,搅拌均匀后,加20%氢氧化钾溶液至溶液显浅黄色,再加5 mL,加钙黄绿素指示剂适量,用EDTA-2Na对照溶液滴定溶液黄绿色消失,显橙色,平行测量3次后取平均值。

2.3.5 供试液中钙离子含量的测定方法

分别取白虎汤水煎液、白虎汤纳米相态、石膏水煎液等供试品20 mL于锥形瓶中,加入稀盐酸5 mL和2滴甲基红指示液,加入20%氢氧化钾溶液至溶液呈现黄色,多加氢氧化钾5 mL,加入适量钙黄绿素指示

剂,用EDTA-2Na对照溶液分别滴定上述溶液至黄绿色消失,显橙色^[5]。平行测定3次后取均值,记录下来。根据EDTA-2Na对照溶液的用量计算白虎汤水煎液、白虎汤纳米相态及石膏水煎液中钙离子的含量。计算公式为:

$$X = (V_E \times C_E \times M_{Ca} \times 1000) / V_{样品}$$

式中 X 为钙离子含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V_E 为EDTA-2Na对照溶液的体积(mL); C_E 为EDTA-2Na对照溶液的浓度($0.049 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); M_{Ca} 为钙离子的相对分子质量; $V_{样品}$ 为样品体积(mL)。

2.3.6 数据分析 石膏中钙离子含量的测定结果表明,本实验中石膏中含水硫酸钙3次质量分数的结果分别为96.07%,95.23%,95.66%,平均值为95.66%,标准差为0.44%,符合2015年版《中国药典》中关于石膏含水硫酸钙不少于95%的规定。

供试液中钙离子含量的测定结果表明,白虎汤纳米相态中钙离子质量分数为 $1\,539.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,白虎汤中钙质量分数为 $1\,770.53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,纳米相态中钙离子占白虎汤中钙总量的86.9%。与石膏水煎液相比,白虎汤及白虎汤纳米相态中钙离子质量分数明显增加,见表7。

表7 白虎汤及白虎汤纳米相态、石膏水煎液中钙离子质量分数($n=3$)

| 次数 | 白虎汤 | 纳米相态 | 石膏水煎液 |
|----|----------|----------|----------|
| 1 | 1 764.00 | 1 554.93 | 1 437.33 |
| 2 | 1 803.20 | 1 502.67 | 1 430.80 |
| 3 | 1 744.40 | 1 561.47 | 1 450.40 |

3 讨论

本实验中上述成分在真溶液、纳米和沉淀3种不同相态中含量差异较大,1 mL白虎汤纳米粒子中含有新芒果苷 $483.00 \mu\text{g}$,芒果苷 $1\,068.88 \mu\text{g}$,甘草苷 $219.93 \mu\text{g}$,甘草酸铵 $187.10 \mu\text{g}$ 和钙离子 1.539 mg ,其中新芒果苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸铵以及钙离子的含量分别占1 mL白虎汤的89.4%,89.9%,86.1%,81.2%和86.9%。纳米相态中新芒果苷、芒果苷、甘草苷和甘草酸铵分别是真溶液230.0,23.3,32.7,215.1倍,沉淀的8.5,14.4,9.1,5.8倍。3种相态的总和等于白虎汤中各成分的含量。以上数据表明,白虎汤中所测的5种主要有效成分在纳米相态中的含量占总体含量的80%~90%,每种成分的占比相差不大,白虎汤中的有效成分绝

大多数存在于纳米相态中。

芒果苷在白虎汤解热方面具有显著成效,但水溶性较差,仅为1.2%^[6],白虎汤中芒果苷的溶解度提升1.37倍。因此,可推测白虎汤对难溶性成分具有增溶作用。上述研究结果表明,新芒果苷和芒果苷主要的分布与白虎汤纳米相态息息相关,也就是说,纳米相态中包含更多的难溶性成分。透析法是依赖于分子的不同大小而实现成分的分离,新芒果苷、芒果苷、甘草苷和甘草酸铵都有较小的相对分子质量,分别为584.5,422.3,418.4,840.0 Da^[7-8],然而,却都被截留于透析袋中,唯一合理的解释为这些活性成分与纳米粒子有关。类似的研究有麻杏甘石汤中发现纳米粒子,荷载大量的麻黄碱和伪麻黄碱等活性成分,主要是由于麻黄碱和伪麻黄碱这类两性分子可能通过氢键,静电作用和范德华引力等吸附在纳米粒上^[9]。

然而新芒果苷和芒果苷并非两性分子,那么这些有效成分是如何被吸附到白虎汤中的纳米粒子上的呢?白虎汤中芒果苷的溶解度的增加可能是通过与其他成分形成纳米粒子有关,经相关研究报道^[10-11],知母和石膏中含有一定量的铁元素, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 以一定比例形成铁氧化物或铁氢氧化物,以其为中心核,此核有大比表面积,高表面能以及磁化效应,因此趋向于聚集状态,难溶性成分可能高度富集在核的周围,起到良好的增溶作用。有关铁氧化物形成溶胶的研究工作也有相关报道,例如荷载喜树碱的四氧化三铁的纳米粒对喜树碱显著增溶^[12]。目前,含有铁氧化物核的超顺磁纳米粒子具有以铁氧化物为核,大分子物质为壳的核-壳结构,具有官能团密度升高、良好的缓释等特性,显著提高病变部位的药物浓度,实现靶向,增强了治疗效果^[13]。其次,粳米在煎煮过程中产生的蛋白、糖类生物大分子^[14],能够形成高分子溶液,对于铁溶胶来说,能够起到良好的保护作用,在纳米研究过程中也有很多类似的研究报道。例如在嵌段共聚物纳米粒和纳米脂质载体等合成的纳米粒的研究过程中,常添加大分子溶液物质,可改善脂溶性材料的亲水性,提高药物的生物利用度^[15]。再次,表面活性物质经常是纳米粒形成过程中的重要组成成分^[16],在本实验中,甘草中存在着大量皂苷类成分,如甘草酸、甘草次酸等,这些成分的增溶作用均有研究报道^[17]。最后,无机离子在纳米粒的形成中也是不可或缺的成分。这些活性成分被吸附在纳米粒子中,无机元素作为Zeta电位的调节剂发挥着

重要作用。例如聚苯乙烯阳离子型纳米粒^[18]等。

石膏是一种主要成分为 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的矿物类中药,味辛甘寒,临床上常用于清解阳明内热症,属于治疗阳明热证的用药范畴。白虎汤是《伤寒论》阳明病篇中的代表方剂,近年来,对其的实验研究多集中于退热作用以及机制方面,众多文献对清热机制也未做出明确的阐述。其中关于石膏的认识有如下几种,白虎汤中起清热作用的可能是石膏中的硫酸钙或石膏中的微量物质、微量元素^[19]。因此,本研究对白虎汤中不同相态的溶液中微量物质钙离子的含量进行测定,结果表明,白虎汤纳米相态中含有钙离子的含量较多,且白虎汤及白虎汤纳米相态中钙离子含量均高于石膏组,可见白虎汤复方可使钙离子实现增溶。

综上所述,白虎汤纳米粒子可对白虎汤中主要解热成分新芒果苷、芒果苷和钙离子以及解毒成分甘草酸和甘草次酸起到增溶作用,是白虎汤强效解热机制的关键。对于白虎汤纳米粒子的研究,不仅为经典名方白虎汤的继承和发扬提供帮助,也将有助于为现代纳米制剂技术提供新的思路,但白虎汤中所形成的纳米粒子结构复杂,对其形态分析和作用机制还需进一步的研究。

[参考文献]

[1] 林渊,周良良,吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 264-266.

[2] 周建武,柯李晶,邵彪,等. 汤的威力-食品科学新知[J]. 中国食品学报, 2011, 11(8): 9-15.

[3] 张保国,程铁锋,刘庆芳. 白虎汤药效及现代临床研究[J]. 中成药, 2009, 31(8): 1272-1275.

[4] 李春来,李伟东,吴育,等. HPLC同时测定白虎汤中4种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 78-80.

[5] 郭峰. 农用硫酸钾中钙离子、镁离子和硫酸根离子含量的测定方法[J]. 化肥工业, 2016, 43(4): 82-84.

[6] 郭小珍. 1、芒果苷及苷元的体内过程研究 2、基于体内过程的三消汤降糖药效物质研究[D]. 北京:中国科学院大学, 2019.

[7] 杨东升. “西陵知母”有效成分动态积累研究及知母多糖类成分研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2009.

[8] 赵艳敏,刘素香,张晨曦,等. 基于HPLC-Q-TOF-MS技术的甘草化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.

[9] ZHOU J Y, GAO G Z, CHU Q Q. Chromatographic isolation of nanoparticles from Ma-Xing-Shi-Gan-Tang decoction and their characterization [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(3): 1116-1123.

[10] 王薇,周才新,张义生,等. 不同产地石膏中微量元素的比较分析[J]. 中国药师, 2014, 17(6): 972-974.

[11] 钟可,王文全,靳风云,等. 知母药材矿质元素特征及其与道地性的关系[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(4): 472-476.

[12] 许光宇. 磁性四氧化三铁纳米微球的制备及在药物输送中的应用研究[D]. 开封:河南大学, 2015.

[13] 郭萍. 顺磁纳米铁核素(PNINs)的物理靶向和富集特征研究[D]. 长沙:中南大学, 2010.

[14] 李娟,魏春红. 碱法提取碎梗米中蛋白质工艺条件的优化[J]. 农产品加工(学刊), 2014(4): 27-31.

[15] 柳阳,朱艳华,孙佳琳,等. 聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸嵌段共聚物载药纳米粒制备方法的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2274-2277.

[16] 李敏. 双子表面活性剂为模板制备中空二氧化硅纳米球及其载药性能研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.

[17] 杨璇. 甘草对葛根、黄芩增溶作用和机理的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.

[18] 陈浩,邹其超,余欢,等. 粒径可控阳离子型聚苯乙烯纳米粒子的制备及表征[J]. 应用化学, 2012, 29(1): 29-36.

[19] 李兴发,邱明山. 生石膏应用综述[J]. 亚太传统医药, 2019, 14(10): 201-203.

[责任编辑 顾雪竹]