

黄芩总黄酮及其单体的溶解性及体外经皮渗透性能研究

李俊生¹, 吕佳佳¹, 王兴慧¹, 刘志辉^{2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 研究黄芩总黄酮及其单体成分的溶解性及体外经皮渗透性, 为其经皮给药研究与开发提供依据。**方法** 采用摇瓶法测定黄芩总黄酮及其单体成分的油水分配值; 体外扩散池法测定体外经皮渗透参数。**结果** 黄芩总黄酮难溶于水, 在丙三醇和 50%乙醇中溶解性最好; 在 pH 值 2.0~6.8 的磷酸盐缓冲溶液中, 黄芩总黄酮及其单体成分的溶解性均随着 pH 值增大而增大, 油水分配值 ($\lg P$) 随着 pH 值增大而减小, 当 pH 值为 7.4 和 8.0 时, 黄芩苷的溶解性逐渐降低, 总黄酮及其他单体成分的溶解性逐渐增大, 黄芩苷的 $\lg P$ 值逐渐增大, 其他单体成分的 $\lg P$ 值逐渐减小; 总黄酮、黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素体外累积透过率分别为 $(191.31 \pm 13.01) \times 10^{-4}$ 、 $(2.86 \pm 0.06) \times 10^{-4}$ 、 $(1.29 \pm 0.13) \times 10^{-4}$ 、 $(1.33 \pm 0.22) \times 10^{-4}$ 、 $(17.78 \pm 1.12) \times 10^{-4}$ 、 $(16.10 \pm 1.16) \times 10^{-4}$ 、 $(6.42 \pm 0.71) \times 10^{-4}$, 稳态透皮速率分别为 (18.14 ± 1.21) 、 (0.30 ± 0.01) 、 (0.13 ± 0.03) 、 (0.13 ± 0.04) 、 (1.92 ± 0.19) 、 (1.90 ± 0.25) 、 $(0.77 \pm 0.13) \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 。**结论** 黄芩总黄酮及其单体成分均有一定的经皮渗透性能, 为制备黄芩经皮给药制剂提供实验依据。

关键词: 黄芩总黄酮; 溶解性; 油水分配值; 经皮渗透性; 黄芩苷; 黄芩素

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0200-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.010

Solubility and percutaneous penetration of total flavones from *Scutellariae Radix* and their monomer composition

LI Jun-sheng¹, LV Jia-jia¹, WANG Xing-hui¹, LIU Zhi-hui²

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To study the solubility and percutaneous penetration characteristics of the total flavones from *Scutellariae Radix* (TFSR) and their monomer composition, and to provide the basis for the development of transdermal delivery. **Methods** Bottle-shaking method was used to determine the apparent oil/water distribution value, and *in vitro* diffusion cell method was used to measure the percutaneous penetration parameters of TFSR and their monomer composition. **Results** TFSR and their monomer composition slightly dissolved in water, and the solubility in glyceryl alcohol and 50% ethanol was the best. In the phosphate buffer solution (pH 2.0–6.8), the solubility of TFSR and their monomer composition increased with the pH value increasing, and the oil/water distribution value $\lg P$ decreased as the pH value increasing. As the pH values were 7.4 and 8, the solubility of baicalin decreased gradually, the solubility of flavonoids and other compounds increased gradually, $\lg P$ value of baicalin increased gradually, while the $\lg P$ values of other ingredients decreased. The *in vitro* cumulative permeation rates of the total flavonoids, baicalin, oroxylin-A-glucoside, wogonoside, baicalein, wogonin, and oroxylin were $(191.31 \pm 13.01) \times 10^{-4}$, $(2.86 \pm 0.06) \times 10^{-4}$, $(1.29 \pm 0.13) \times 10^{-4}$, $(1.33 \pm 0.22) \times 10^{-4}$, $(17.78 \pm 1.12) \times 10^{-4}$, $(16.10 \pm 1.16) \times 10^{-4}$, and $(6.42 \pm 0.71) \times 10^{-4}$, respectively. The percutaneous penetration rates were (18.14 ± 1.21) , (0.30 ± 0.01) , (0.13 ± 0.03) , (0.13 ± 0.04) , (1.92 ± 0.19) , (1.90 ± 0.25) , and $(0.77 \pm 0.13) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. **Conclusion** TFSR and their monomer composition have certain percutaneous permeability, which could provides the experimental basis for the preparation of *Scutellariae Radix* transdermal drug delivery.

Key words: total flavones from *Scutellariae Radix*; solubility; oil/water distribution value; percutaneous penetration; baicalin; baicalein

收稿日期: 2013-07-31

基金项目: 江苏省高校优势学科建设项目资助 (PADA, 2011 年)

作者简介: 李俊生 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型。Tel: 15950567792 E-mail: junsheng330@126.com

*通信作者 刘志辉 Tel: 13951636711 E-mail: liuzh1008@126.com

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,性苦味寒,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎功效,为我国传统大宗药材之一^[1]。黄芩化学成分复杂,主要含黄酮类化合物^[2],如黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 苷和木蝴蝶素等。黄芩单味或复方外用制剂较多,包括凝胶剂、贴剂、巴布剂、软膏等。本实验对总黄酮及其单体成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 苷和木蝴蝶素的溶解性、油水分配规律和体外经皮渗透性等进行了研究,以期为黄芩总黄酮 (total flavones from *Scutellariae Radix*, TFSR) 外用制剂的进一步开发提供依据及其他药学研究提供参考。

1 仪器与材料

Agilent1260 型高效液相色谱仪, Agilent1260 Infinity 可变波长检测器(VWD, 美国 Agilent 公司); TT-6 (D) 透皮扩散试验仪(成都贝斯达仪器有限公司); Cary 50 紫外可见分光光度计(美国瓦里安); BP211D 型十万分之一天平; AR2140 型万分之一天平(奥豪斯仪器上海有限公司); 调速多用振荡器(上海知楚仪器有限公司); pH 计(上海雷磁仪器厂)。

黄芩总黄酮(自制); 对照品黄芩苷(批号 110328)、汉黄芩苷(批号 111014)、黄芩素(批号 110327)、汉黄芩素(批号 110729), HPLC 法测定质量分数均在 98% 以上, 均购于四川省维科奇生物科技有限公司; 对照品千层纸素 A 苷(批号 120927)、木蝴蝶素(批号 120910), HPLC 法测定质量分数均在 98% 以上, 均购于上海融禾医药科技有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、聚乙二醇 400 (PSN)、正辛醇(成都科龙化工试剂厂); 氯化钠、氢氧化钠(南京宁试化学试剂有限公司); 甲醇为色谱纯; 盐酸、乙醇、丙二醇、丙三醇均为分析纯, 水为超纯水。

ICR 小鼠, 雄性, 体质量 (25±5) g, 购自南京医科大学动物实验中心, 动物使用许可证号: scxk (苏) 20131-0005。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取经 P₂O₅ 减压干燥 12 h 的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 苷、木蝴蝶素对照品 12.4、10.56、11.48、11.18、10.45、11.19 mg, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得相应对照品的储备液。

2.2 供试品溶液的制备

黄芩总黄酮样品约 25 mg, 精密称量, 置于 50 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀即得。

2.3 UV 法测定黄芩总黄酮

根据紫外分光光度法绘制的黄芩苷标准曲线方程, 计算黄芩样品总黄酮质量浓度的方法。

2.3.1 黄芩苷标准曲线的绘制 精密吸取黄芩苷对照品储备液 2 mL, 甲醇稀释至 10 mL, 再分别移取 0.4、0.5、0.6、0.8、1.2 mL, 分别加甲醇定容至刻度, 以甲醇为空白对照, 在 280 nm 波长处测定吸光度 (*A*) 值。以对照品溶液质量浓度为横坐标 (*X*), *A* 值为纵坐标 (*Y*), 绘制标准曲线, 所得回归方程为 $Y=0.0581X+0.0198$, $r=0.9996$, 线性范围 3.968~11.90 μg/mL。

2.3.2 精密度试验 取黄芩苷对照品溶液 (5.952 μg/mL), 分光光度法连续测定 6 次, 记录 *A* 值。计算得黄芩苷 RSD 为 0.86%。表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取 6 份适量总黄酮样品, 用甲醇溶解, 按“2.3.1”项下方法测定, 计算得黄芩样品总黄酮平均质量分数为 87.49%, RSD 为 1.82%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性实验 取同一供试品溶液, 于室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按“2.3.1”项下方法测定, 记录 *A* 值并计算。结果黄芩苷 RSD 值为 1.08%, 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取已测定黄芩苷总黄酮的样品适量, 共 6 份, 分别精密加入一定量黄芩苷对照品, 按“2.3.1”项下方法测定, 计算得总黄酮平均回收率为 103.6%, RSD 为 2.26%。

2.4 HPLC 法测定黄芩总黄酮中各单体成分

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Sinochem ODS-BP 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~18 min, 55%甲醇; 18~21 min, 55%~75%甲醇; 21~35 min, 75%甲醇; 35~36 min, 75%~55%甲醇; 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 分别取对照品混合溶液及供试品溶液进样。结果黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素的保留时间分别为 8.3、12.9、13.8、22.9、26.4、27.5 min, 各成分之间在此色谱条件下测定互不干扰。理论塔板数均不低于 5 000, 分离度良好。色谱图见图 1。

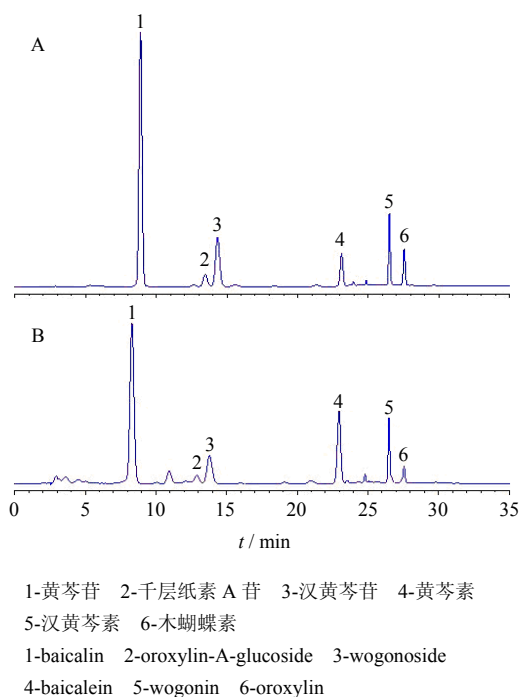


图1 混合对照品溶液 (A) 和黄芩总黄酮溶液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A) and TFSR solution (B)

2.4.2 单体成分标准曲线的绘制 分别精密量取黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素 6 个对照品储备液 15、1.1、4、1.5、1.5、1.1 mL，混合于 25 mL 量瓶中，加色谱甲醇稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品储备液。再分别从混合对照品储备液中取 0.5、1、2、4、5 mL 分别定容至 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度。以含不同质量浓度的黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素混合对照品溶液各 10 μ L 分别进样，按照“2.3.1”项下色谱条件测定，以峰面积为纵坐标 (Y)，进样质量浓度为横坐标 (X)，得到各单体成分回归方程：黄芩苷 $Y=34.548 X-31.788$, $r=0.9999$, 线性范围 14.85~297.0 μ g/mL；千层纸素 A 苷 $Y=36.52 X-14.006$, $r=0.9996$, 线性范围 0.93~18.58 μ g/mL；汉黄芩苷 $Y=38.122 X-21.268$, $r=0.9999$, 线性范围 3.67~73.47 μ g/mL；黄芩素 $Y=52.671 X-12.358$, $r=0.9999$, 线性范围 1.34~26.80 μ g/mL；汉黄芩素 $Y=62.639 X-3.1045$, $r=0.9999$, 线性范围 1.25~25.03 μ g/mL；木蝴蝶素 $Y=46.829 X+0.0646$, $r=0.9998$, 线性范围 0.83~19.69 μ g/mL。

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液

10 μ L，按“2.4.1”项下色谱条件重复进样 6 次。计算得黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和木蝴蝶素峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.73%、0.64%、0.34%、0.35%、0.24%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取总黄酮样品 6 份适量，用甲醇溶解，按“2.4.1”项下色谱条件进行测定。根据各组分峰面积计算得黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素平均质量分数分别为 41.29%、3.48%、9.0%、11.89%、2.97%、1.23%，RSD 分别为 1.68%、1.50%、1.21%、1.64%、2.52%、0.99%，表明方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液，于室温放置，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样，依法测定。计算得黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和木蝴蝶素在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 0.32%、0.87%、0.73%、0.62%、0.68%、0.53%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已测定的样品适量，共 6 份，分别精密加入一定量黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和木蝴蝶素对照品，依法制备供试品溶液，计算加样回收率。结果黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和木蝴蝶素的平均加样回收率分别为 101.6%、100.9%、99.5%、102.5%、100.7%、97.6%，RSD 分别为 0.82%、1.67%、0.98%、1.05%、1.43%、1.00%。

2.5 黄芩总黄酮及其单体成分在不同溶媒中溶解性的考察

称取 8 份适量黄芩总黄酮于 100 mL 锥形瓶中，分别加入水、甲醇、50%乙醇、PSN、生理盐水、40% PSN 生理盐水、丙二醇、丙三醇各 50 mL，配制成过饱和溶液，置于摇床中，在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下 100 r/min 振摇 24 h，取上清液，适当稀释，依法测定，计算溶解度。平行操作 3 份，结果见表 1。可知：(1) 总黄酮及其单体成分在水中的溶解性最小，在甲醇、40% PSN 生理盐水、丙二醇中溶解性较好，在 50%乙醇和丙三醇的溶解性相对最好，且总黄酮及其单体成分在水性溶媒的溶解性均小于有机溶媒。(2) 除千层纸素 A 苷外 (下降 28.32%)，PSN 对总黄酮、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、木蝴蝶素均有一定的助溶作用，溶解度分别提高 33.59%、8.08%、76.19%、9.73%、181.64%、181.76%，其对苷元的助溶作用大于苷类。

表 1 不同溶媒中黄芩总黄酮及其单体成分溶解性考察结果 ($n=3$)Table 1 Solubility of TFSR and their components in different solvents ($n=3$)

溶 媒	溶解度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	总黄酮	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩苷	汉黄芩素	千层纸素 A 苷	木蝴蝶素
水	945.1	417.7	154.0	94.6	79.8	37.6	28.3
生理盐水	2 507.7	1 200.2	187.7	248.8	46.3	103.8	17.0
PSN	2 851.6	1 234.2	151.7	263.4	117.5	105.2	43.8
40% PSN 生理盐水	3 350.1	1 297.2	330.7	273.0	130.4	74.4	47.9
丙二醇	3 256.5	1 307.7	391.9	262.8	120.4	93.5	42.7
甲醇	3 468.7	1 259.0	425.0	250.9	131.7	96.9	48.0
丙三醇	3 547.8	1 480.7	408.5	304.1	126.8	111.0	46.6
50%乙醇	3 623.0	1 390.3	417.0	277.2	138.0	113.5	50.8

2.6 黄芩总黄酮及其单体成分在不同 pH 值磷酸盐缓冲液中溶解性的考察

精密称取 5 份适量黄芩总黄酮置于 100 mL 的锥形瓶中, 分别加入 50 mL pH 2.5、5.0、6.8、7.4、8.0 的磷酸盐缓冲溶液 (按照《中国药典》2010 年版二部附录 XV D 配制), 置于摇床中, 在 $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ 下 100 r/min 振摇 24 h, 取上清液, 依法测定, 计算溶解度。平行操作 3 份, 结果见表 2。可知: (1)

除黄芩苷外, 在 pH 值 2.5~8.0 时, 总黄酮及其单体成分溶解性随着 pH 值增大而增大, 单体成分间溶解性呈“平行”关系, 而总黄酮的溶解性远大于各单体成分。(2) 黄芩苷在 pH 值 2.5~5.0 时, 溶解性随着 pH 增大而增大; pH 值 5.0~6.8 时几乎不变; pH>6.8 时, 逐渐减小。(3) 黄芩总黄酮在 pH 值 2.5~5.0 时, 溶解性增幅较大; 在 pH 值 5.0~8.0 时, 其溶解性虽呈增大趋势, 但增幅平缓。

表 2 不同 pH 磷酸盐缓冲液对黄芩总黄酮及其单体成分溶解性考察结果 ($n=3$)Table 2 Effects of phosphate buffers with different pH values on solubility of TFSR and their monomer composition ($n=3$)

pH 值	溶解度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	总黄酮	黄芩苷	千层纸素 A 苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	木蝴蝶素
2.5	617.0	260.4	22.7	52.8	46.9	14.2	4.4
5.0	2 864.0	1 290.9	99.2	270.8	246.9	67.1	25.4
6.8	2 932.7	1 310.5	117.6	287.4	264.5	81.1	31.2
7.4	2 987.4	651.4	139.8	291.6	318.3	103.2	37.1
8.0	3 037.9	17.2	148.2	274.6	357.6	106.8	37.6

2.7 黄芩总黄酮及其单体成分在不同介质中油水分配值的测定

将蒸馏水、不同 pH 值磷酸盐缓冲溶液与正辛醇混合后置于摇床中, $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ 下 100 r/min 振摇 24 h, 再静置 24 h, 分层后得水饱和的正辛醇溶液和正辛醇饱和的水溶液及磷酸盐缓冲液饱和的正辛醇和正辛醇饱和的磷酸盐缓冲液。

分别称取 6 份黄芩总黄酮适量, 置于水、不同 pH 磷酸盐缓冲液饱和的正辛醇溶液中, 配制成含药物的正辛醇溶液, 分别精密量取该溶液 5 mL 于 15 mL 离心管中, 再精密量取 5 mL 正辛醇饱和的水溶液及 pH 磷酸缓冲溶液, 缓慢加入, 涡旋混合, 再

置于摇床中 $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ 下 100 r/min 振摇 24 h, 离心 (4 000 r/min, 10 min), 取下层水相, 依法测定药物在水相中的质量浓度。再精密吸取 0.5 mL 含药物的正辛醇溶液, 氮气吹干, 加甲醇定容至 10 mL, 取上清液过微孔滤膜, 依法测定, 计算油水分配值 $[\lg P, P=(C-C_0)/C_0]$, C 为药物在正辛醇相中的原始质量浓度, C_0 为萃取后药物在水相中的质量浓度。平行操作 3 次, 结果见表 3。可知: (1) 除黄芩苷外, 当 pH 值 2.5~7.4 时, 随着 pH 值的增加, 总黄酮及各单体成分的 $\lg P$ 值逐渐减小。(2) 黄芩苷在 pH 值 2.5~5.0 时, $\lg P$ 随着 pH 值增大而减小, pH 值大于 5.0 时, 其 $\lg P$ 值逐渐增大。(3) 黄芩苷

类成分在水溶液的 $\lg P$ 值接近 0, 苷元类成分 $\lg P$ 值均大于 2。

2.8 黄芩总黄酮及其单体成分体外经皮渗透性能研究

2.8.1 供给室溶媒的选择 称取 7 份黄芩总黄酮适量, 置于锥形瓶中, 再分别加入不同比例的丙三醇和 50%乙醇二元溶液系统, 配制成过饱和溶液, 置

于摇床中, 在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下 100 r/min 振摇 24 h, 取上清液, 依法测定, 计算溶解度。结果见表 4。由表 4 得出, 随着丙三醇体积分数的增大, 黄芩总黄酮及单体成分的溶解性也逐渐增大, 但增幅不大, 当丙三醇体积分数为 70%时, 其溶解性最大, 故选择丙三醇-50%乙醇 (70:30) 二元溶剂系统作为透皮试验的供给室溶剂。

表 3 黄芩总黄酮及其单体成分在不同介质中的油水分配规律 ($n=3$)

Table 3 Oil/water distribution law of TFSR and their monomer composition in different media ($n=3$)

溶 媒	$\lg P$						
	总黄酮	黄芩苷	千层纸素 A 苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	木蝴蝶素
水	0	0.11	0.30	-0.23	2.38	2.76	3.15
pH 2.5	0.42	0.46	0.91	1.17	2.34	2.43	3.02
pH 5.0	-0.09	-0.08	-0.08	-0.14	2.11	2.20	2.98
pH 6.8	-0.16	-0.06	-0.06	-0.14	0.61	2.21	2.68
pH 7.4	-0.16	-0.02	-0.07	-0.15	0.23	2.15	2.52
pH 8.0	-1.51	0.04	-0.10	-0.14	0.10	2.05	2.46

表 4 不同比例丙三醇和 50%乙醇对总黄酮及单体成分溶解性考察结果 ($n=3$)

Table 4 Effects of glyceryl alcohol and 50% ethanol with different ratios on solubility of TFSR and their monomer composition ($n=3$)

丙三醇-50%乙醇	溶解度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	总黄酮	黄芩苷	千层纸素 A 苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	木蝴蝶素
20:80	3 157.5	1 414.3	107.2	286.5	366.9	113.7	40.4
30:70	3 275.6	1 425.7	108.2	288.2	372.8	115.1	40.5
40:60	3 425.9	1 442.9	114.5	298.0	387.6	121.5	42.6
50:50	3 435.5	1 441.3	113.0	301.5	380.9	118.4	42.4
60:40	3 570.6	1 519.1	116.5	309.1	401.0	125.0	45.1
70:30	4 653.2	1 866.6	142.1	377.1	507.2	156.7	56.5
80:20	3 574.9	1 441.9	108.3	298.6	407.6	125.4	45.3

2.8.2 供试液制备 称取黄芩总黄酮适量, 分别按总体积的 70%、30%加入丙三醇和 50%乙醇, 溶解混匀即得 (10 mg/mL)。

2.8.3 接收液的筛选^[3] 根据黄芩总黄酮及其单体成分的溶解性筛选出满足漏槽条件的接收液。常用的透皮扩散接受液有不同 pH 值的磷酸盐缓冲液、生理盐水、40% PSN 生理盐水及不同浓度乙醇生理盐水等。不同 pH 值的磷酸盐缓冲液、生理盐水以及 40% PSN 生理盐水在“2.5”项和“2.6”项都已考察, 以下对总黄酮及其单体成分在不同体积分数乙醇生理盐水中的溶解性进行考察。

称取 5 份适量黄芩总黄酮置于 100 mL 的锥形

瓶中, 分别加入 50 mL 含乙醇为 20%、30%、40%、50%、60%生理盐水中, 配制过饱和溶液, 置于摇床中, 在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下 100 r/min 振摇 24 h, 取上清液, 依法测定, 计算溶解度。结果见表 5。由表 5 可知, 不同体积分数乙醇生理盐水对黄芩总黄酮及其单体成分都有较好的溶解性, 但以 30%乙醇生理盐水溶解性最好。

根据“2.5”项中生理盐水、40% PSN 生理盐水和“2.6”项不同 pH 值的磷酸盐缓冲液及不同体积分数乙醇生理盐水对黄芩总黄酮及其单体成分溶解性的考察, 得出 30%乙醇生理盐水的溶解性最好。故选择 30%乙醇生理盐水作为黄芩总黄酮及其单体

表 5 黄芩总黄酮及其各单体成分在不同体积分数乙醇生理盐水中的溶解性考察结果

Table 5 Effects of ethanol saline with different volume fraction on solubility of TFSR and their monomer composition

乙醇体积分数 / %	溶解度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	总黄酮	黄芩苷	千层纸素 A 苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	木蝴蝶素
20	3 512.1	1 411.5	104.2	284.0	410.2	125.8	46.8
30	3 636.0	1 465.0	110.9	299.7	422.6	130.9	47.2
40	3 441.0	1 468.0	108.5	299.9	406.0	125.5	45.5
50	3 362.3	1 398.8	100.0	279.4	402.1	127.5	45.7
60	3 398.4	1 375.8	97.5	276.5	407.7	124.2	44.2

成分体外经皮渗透试验的接收液。

2.8.4 离体皮肤的制备 将 ICR 种小鼠麻醉, 剪去小鼠胸腹部毛, 断颈处死后, 剪下腹部皮肤, 去除其皮下脂肪及黏液组织后洗净, 置于生理盐水中, 冰箱 4 °C 保存备用, 1 周内用完。

2.8.5 体外透皮实验 将小鼠皮肤固定在改良的 Franz 扩散池的上、下两室之间, 角质层朝上, 供试液紧密接触, 接收池 (扩散面积 $S=2.1\text{ cm}^2$, 容积为 13.5 mL) 中加入 30% 乙醇生理盐水作为接收液, 且接收液与皮肤真皮层刚好接触, 接收池内置一磁力搅拌棒, 将接收池置于磁力搅拌器上, 搅拌速率为 300 r/min, 水浴温度为 $(32\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h 从接收池中吸取 5 mL, 同时补充等量接收液, 以满足漏槽条件。取出的接收液依法测定, 计算药物累积透过量 (Q_n)。根据文献方法^[4-5], 透皮实验结束后, 取下皮肤, 用接收液将皮肤表面残留的供给液洗净, 剪碎, 用 5

mL 甲醇超声提取 2 次, 每次 30 min, 取上清液, 置 10 mL 量瓶中, 定容, 测定, 计算药物的皮肤滞留量 (Q_s) 和药物累积透过量 (Q)。平行操作 3 份, 结果见表 6。以药物 24 h 的累积透过量 ($Q_{24}, \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 对取样时间 t 作曲线, 并对曲线中的直线部分进行线性回归, 求出的直线斜率即为稳态透皮速率 [$J_s, \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$], 直线与 x 轴的交点为时滞 (t_{lag}, h)。

$$Q_n = (V\rho_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_i\rho_i) / A$$

A 为有效扩散面积, V 为接收液总体积, ρ_n 为第 n 次取样时接收液中药物的质量浓度, ρ_i 为第 i 次取样时接收液中药物的质量浓度, V_i 为取样体积

$$Q_s = V\rho / A$$

$$Q = (Q_{24}\cdot A) / M$$

V 为皮肤提取液总体积, ρ 为皮肤提取液中药物的质量浓度, M 为供给室药液质量

由表 6 可知: (1) 除 t_{lag} 外, 总黄酮的各项指

表 6 黄芩总黄酮及其单体成分体外经皮渗透参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 In vitro percutaneous penetration parameters of TFSR and their monomer composition ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	Q - t 方程	r	$Q_{24} / (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$Q / 10^{-4}$	$J_s / (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$t_{\text{lag}} / \text{h}$	$Q_s / (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
总黄酮	$Q=18.317 t+31.962$	0.900 9	182.20 ± 12.39	191.31 ± 13.01	18.14 ± 1.21	1.75 ± 0.09	58.44 ± 3.63
黄芩苷	$Q=0.304 8 t-0.143 8$	0.994 6	2.73 ± 0.06	2.86 ± 0.06	0.30 ± 0.01	0.46 ± 0.30	2.66 ± 0.28
千层纸素 A 苷	$Q=0.127 9 t-0.072 2$	0.968 3	1.23 ± 0.12	1.29 ± 0.13	0.13 ± 0.03	0.74 ± 0.59	0.77 ± 0.04
汉黄芩苷	$Q=0.127 0 t-0.092 6$	0.974 1	1.26 ± 0.21	1.33 ± 0.22	0.13 ± 0.04	0.67 ± 0.34	0.78 ± 0.25
黄芩素	$Q=1.919 9 t-4.165 3$	0.941 1	16.93 ± 1.07	17.78 ± 1.12	1.92 ± 0.19	2.19 ± 0.32	11.34 ± 1.11
汉黄芩素	$Q=1.897 7 t-3.705 6$	0.971 6	15.33 ± 1.11	16.10 ± 1.16	1.90 ± 0.25	1.95 ± 0.14	5.62 ± 0.79
木蝴蝶素	$Q=0.768 4 t-1.506 5$	0.959 1	6.12 ± 0.68	6.42 ± 0.71	0.77 ± 0.13	1.94 ± 0.15	2.26 ± 0.39

标均远高于各单体成分, 如渗透性、 J_s 、 Q_{24} 和 Q_s 。(2) 苷类成分渗透性不及苷元类成分, 单体成分渗透性大小顺序为黄芩素>汉黄芩素>木蝴蝶素>黄芩苷>汉黄芩苷>千层纸素 A 苷。(3) Q_s 与 J_s 、 Q_{24} 呈正相关。(4) 总黄酮及单体成分都有一定的时滞

性, 苷元类成分较苷类成分时滞长, 尤以黄芩素时间最长, 总黄酮的时滞介于苷元与苷之间。

3 讨论

黄芩黄酮类成分复杂, 目前从黄芩中分离并鉴定的黄酮类化合物有 60 多个^[6-7], 本实验以总黄酮

及其主要单体成分(黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素)为对象,研究了其理化性质及体外渗透性,并对其进行探讨。

3.1 黄芩总黄酮来源及质量分数

黄芩总黄酮目前尚无法定或公认的质量标准,不同工艺及方法所得质量可能不同。本实验所用黄芩总黄酮纯化物为自制,是用 50%乙醇提取,再经过大孔树脂纯化、减压干燥所得。紫外测定所得总黄酮质量分数为 87.49%,HPLC 测定单体成分,其中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 苷、木蝴蝶素质量分数分别为 41.29%、11.89%、9.0%、2.97%、3.48%、1.23%。

3.2 黄芩总黄酮及单体成分溶解性

混合物并无溶解度一说,本实验采用溶解性来表述与研究黄芩总黄酮的某些理化性质,目的是便于选择合适的“点”(类似溶解度,但实际上这可能是在某研究条件下的总黄酮中某个目标成分或非目标成分的溶解度),便于研究与探索,否则就不能对总黄酮“理化性质”进行研究,作为最好效应物质的进一步研究也无法成为可能。从预试验的结果及正式实验的结果来看,黄芩总黄酮与单体成分的“溶解性”有较好的相关性,趋势几乎一致,呈“平行”状态。

本实验对总黄酮及单体成分溶解性考察时发现,其在水性溶媒的溶解性均小于有机溶媒。根据计算,溶解的总黄酮与单体成分的溶解量具有加和性,但单体成分之间的增溶性、抑溶性或是否也为加和性,未进行研究。黄芩总黄酮及单体成分水溶性较差,疏水性强,若制备成外用制剂,需通过物理方法(如离子导入法等)或化学方法(透皮促进剂),以增加其透皮渗透性。

由于人体表皮内为弱酸性 pH 4.2~5.6,真皮内 pH 7.4,故经皮制剂较为合理的 pH 值为 6.0~8.0,偏酸偏碱都会对皮肤带来一定程度的刺激。从实验考察结果来看,不同 pH 值(2.5~8.0)磷酸缓冲液对黄芩总黄酮及其单体成分溶解性也不同:pH 值在 2.5 时,总黄酮与单体成分溶解性均最差,只有 pH 5.0~6.8 的 20%,但总黄酮与单体成分之间的溶解量具有加和性;pH 5.0~6.8,总黄酮与单体成分的溶解性呈略有增加趋势,总黄酮的溶解量与单体成分的溶解量也具有加和性;但 pH 7.4~8.0 时,除黄芩苷外(黄芩苷在碱性条件下不稳定,这是由于黄芩苷含多个酚羟基,显弱酸性,在碱性条件下会逐

渐发生化学分解),总黄酮及其单体成分溶解性也略有增加。

3.3 黄芩总黄酮及其单体成分油水分配值

根据相关文献报道^[8-10],油水分配值 $\lg P$ 是表达药物在吸收阶段的跨膜吸收能力的一种参数,它反映了物质在油水两相中的分配情况。一般脂溶性药物较水溶性药物更易穿透皮肤,但组织液是极性的。因此,药物必须具有适宜的油水分配值,即具有一定油溶性和水溶性的药物穿透作用较理想^[11]。有研究表明^[12],过低的 $\lg P$ 值($\lg P < -2$),化合物不能穿过脂质膜;而过高的 $\lg P$ 值($\lg P > 3$),化合物因为脂溶性强而难以从细胞另一侧的膜释放出来,最适宜经皮吸收的 $\lg P$ 值为 2.6。由表 3 可知,总黄酮的 $\lg P$ 值在 $-1.51 < \lg P < 0.42$,黄芩苷在 $-0.02 < \lg P < 0.11$,千层纸素 A 苷在 $-0.10 < \lg P < 0.91$,汉黄芩苷在 $-0.23 < \lg P < 1.17$,黄芩素在 $0.1 < \lg P < 2.38$,汉黄芩素在 $2.05 < \lg P < 2.76$,木蝴蝶素在 $2.46 < \lg P < 3.15$ 。表明黄芩苷类成分水溶性较好,苷元类成分脂溶性较强,黄芩素和汉黄芩素皮肤透过性较好,而木蝴蝶素相对黄芩素、汉黄芩素,皮肤透过性可能较弱,苷类成分皮肤透过性不及苷元成分。而根据表 6 结果,也得出苷元类成分透过性均大于苷类成分。

3.4 黄芩总黄酮及其单体成分体外透皮渗透性

一般来讲,油水分配值应与其体外药物透过总量之间有良好的线性关系,通过测定药物的油水分配值可以预测其体外的透皮吸收性能,但药物透皮吸收受到药物相对分子质量、分子体积、熔点,解离度等众多因素的影响,故仅用油水分配值来预测药物通透性有较大的局限性。本研究预想研究油水分配值与经皮渗透速率的相关性,但实验发现,两者并非线性相关。可能经皮渗透速率受到油水分配值和皮肤层结构等因素的共同影响。

在“2.5”项溶解性考察结果中,丙三醇和 50%乙醇对黄芩总黄酮及其单体成分溶解性均最好,同时丙三醇属于油性溶液,加入 50%乙醇可增加溶液的流动性,故选择此二元溶剂系统作为供给室溶媒。

体外透皮实验得出黄芩总黄酮及其单体成分累计透过率较低,且有一定的时滞,若将黄芩总黄酮及其单体成分开发成经皮给药制剂,可根据成分的特点、剂型及工艺的需要,进行研究,如加一定量的表面活性剂、增溶剂、透皮促进剂或物理方法来增强药物的经皮吸收。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈佩东, 徐丹洋, 孔祥鹏, 等. 黄芩中黄酮类成分的分
离鉴定及其体外对凝血系统的影响 [J]. 中草药, 2012,
43(12): 2333-2336.
- [3] 魏 敏, 周莉玲, 黄春青, 等. 以主药溶解性能筛选体
外经皮渗透试验中的接收液 [J]. 中药材, 2005, 28(4):
332-334.
- [4] 郑俊民. 经皮给药新剂型 [M]. 北京: 人民卫生出版
社, 2006.
- [5] 王 森, 朱卫丰, 欧水平, 等. 促透剂对良肤乳膏中丹
皮酚、白鲜碱、桉酮和甘草次酸的体外透皮吸收及皮
肤滞留量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14):
14-19.
- [6] 温华珍, 肖盛元, 王义明, 等. 黄芩化学成分及炮制
学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6):
575-580.
- [7] 张 文, 周延升. 黄芩中多糖的提取及含量分析 [J].
微量元素与健康研究, 2004, 21(2): 21-22.
- [8] 杨小明, 梁摇健, 王驰芳, 等. 银杏酸平衡溶解度和表
观油水分配系数的测定 [J]. 时珍国医国药, 2010,
21(10): 2586-2587.
- [9] 贾 媛, 马兴苗, 恽 菲, 等. 金丝桃苷油水分配系数
及大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中草药, 2012,
43(5): 934-939.
- [10] 杨建宏, 王 莉, 王 彤. 苦参碱平衡溶解度及表观油
水分配系数测定 [J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(5):
498-499.
- [11] 王亚乐, 贾晓斌, 陈 彦, 等. 淫羊藿苷平衡溶解度和
表观油水分配系数的测定 [J]. 中华中医药杂志, 2008,
23(9): 777-779.
- [12] 薛 璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤甲素表观油水分
配系数的测定及其对吸收预测的研究 [J]. 中国药学杂
志, 2009, 44(20): 1560-1563.