

· 工艺与制剂 ·

黄芩不同提取物溶出度和抗氧化性能评价

史亚军^{1*}, 刘剑云², 杨明³

(1. 陕西中医学院 药学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 桂林市食品药品检验所, 广西 桂林 541002;

3. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**测定黄芩不同提取物的溶出度并评价其抗氧化性能。**方法:**根据前处理工艺收集含不同伴生物质的黄芩提取物(黄芩苷质量分数分别为19.75%, 62.83%, 84.55%, 98.0%),采用HPLC测定各提取物中黄芩苷的溶出度,流动相甲醇-水-磷酸(47:53:0.2),检测波长280 nm。利用DPPH模型测定不同黄芩提取物抗氧化的能力,检测波长516 nm。**结果:**不同伴生物质黄芩提取物中黄芩苷含量越高,溶出度降低;4种提取物的3 h累积溶出率分别为38.24%, 25.91%, 23.49%, 22.98%。抗氧化能力随着提取物中黄芩苷含量的增加而提高,当黄芩苷质量分数>85%时,抗氧化能力无明显变化。**结论:**不同质与量的伴生物质对黄芩提取物中黄芩苷的溶出度和抗氧化性能具有一定影响。

[关键词] 黄芩提取物; 溶出度; DPPH 自由基清除法; 抗氧化; 伴生物质

[中图分类号] R283.6; R284.2; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1103.004.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:03

Evaluation of Dissolution and Oxidation Resistance of Different Extracts Obtained from Scutellariae Radix

SHI Ya-jun^{1*}, LIU Jian-yun², YANG Ming³

(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Guilin Institute for Food and Drug Control, Guilin 541002, China;

3. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To determine dissolution of different extracts of Scutellariae Radix and investigate its oxidation resistance. **Method:** According to pre-treatment process to collect extracts of Scutellariae Radix containing different associated substances (The content of baicalin were 19.75%, 62.83%, 84.55% and 98.0%), HPLC was employed to determine dissolution of baicalin in each sample with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (47:53:0.2) and detection wavelength at 280 nm. Antioxidant capacity of different extracts of Scutellariae Radix was measured by DPPH, detection wavelength was set at 516 nm. **Result:** The higher baicalin content in different associated substances, the lower bioavailability; cumulative dissolution rates of these four extracts in 3 h were 38.24%, 25.91%, 23.49% and 22.98%. With increasing the content of baicalin in extracts, antioxidant capacity increased, there were no obvious changes in antioxidant capacity when

[收稿日期] 20140408(017)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-353);陕西省教育厅科研专项资助(11JK0680);陕西省中药制药重点学科项目(2013);陕西省重点科技创新团队研究项目(2013KCT-26)

[通讯作者] *史亚军, 博士, 副教授, 从事中药制剂研究, Tel:029-38185165, E-mail:328573751@qq.com

the content of baicalin reached above 85%. **Conclusion:** Different quality and quantity of associated substances have a certain effect on dissolution and oxidation resistance of baicalin.

[**Key words**] Scutellariae Radix extracts; dissolution; DPPH radical scavenging method; antioxidant; associated substances

黄芩具有抗氧化、抗微生物、抗炎、抗癌、抗过敏等药理作用,在中药方剂中出现频次极高,在成药制剂中多以煎煮入药为用,在诸多现代中药制剂中常以其不同纯度提取物进行投料,如《中国药典》2010 年版一部中双黄连颗粒和注射用双黄连中黄芩有不同的前处理方式^[1]。复方配伍作为中医用药的特色之一,在煎煮提取过程中,处方中各药材在溶剂环境中发生着复杂的物理化学反应,进而形成复杂的物质基础。同样,单味中药含有数量众多的化学成分,组分群在提取纯化过程中也同样发生组成成分与量的不断变化,这个变化过程会显著影响其有效成分的体外溶出特性和某些生物活性的变化。本实验拟通过对黄芩提取纯化工艺过程中不同工序所得产物进行体外溶出度和抗氧化性能的评价,为黄芩类药物制剂的前处理工艺研究提供参考。

1 材料

P680A 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),85-2型数显恒温磁力搅拌器(金坛市大地自动化仪器厂),PHS-3C 型数字酸度计(上海日岛科学仪器有限公司),UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津公司),BP-211D 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

黄芩药材购于四川新荷花饮片有限公司,经陕西中医学院胡本祥教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根;黄芩苷对照品(批号 110715-200815,中国食品药品检定研究院),黄芩苷原料药(纯度 98%,上海景森生物科技有限公司),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,日本和光纯药工业株式会社),聚山梨酯-80(tween-80,天津市科密欧化学试剂有限公司),淀粉、糊精、乳糖等辅料均为药用规格,甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芩不同提取物的制备^[2] 取黄芩药材 3 kg,加 10 倍量水煎煮提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,量取 1/3 体积药液,减压浓缩干燥,粉碎成细粉,得样品 1,备用。剩余 2/3 体积药液于 80 °C 减压浓缩至 0.8 g·mL⁻¹,加入盐酸调节 pH 1~2,70 °C 保温 1 h,静置 12 h,滤过,加适量水洗涤沉淀,将沉淀加

10 倍量水分散均匀,用 20% 氢氧化钠调节 pH 7,将此溶液等分成 2 份,分别加入不同量乙醇,分别使含醇量达 10% 和 40%,静置 24 h,取上清液,用盐酸调节 pH 1~2,70 °C 保温 1 h,室温静置 24 h,分别收集沉淀,减压干燥,得样品 2(含醇量 10%)和样品 3(含醇量 40%)。另购买黄芩苷原料药作为样品 4。

2.2 黄芩苷的含量测定

^[1]

2.2.1 色谱条件 Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱(4.0 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-磷酸(47:53:0.2),检测波长 280 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液配制与测定 分别称取上述 4 种提取物适量,置于锥形瓶中,加入适量甲醇,超声处理 15 min,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。按 **2.2.1** 项下色谱条件测定各提取物中黄芩苷含量,结果 4 种提取物中黄芩苷质量分数分别为 19.75%,62.83%,84.55%,98.0%。

2.3 黄芩不同提取物溶出度测定 待研究的 4 种提取物均为粉体药物,为保证溶出度测定过程的可控性和均一性,减少系统误差,便于测定,将提取物制备成硬度一致的片剂,同时,为保证在片剂成型过程中辅料对结果可能会产生影响,辅料的选择采用相同品种。

2.3.1 片剂的制备 将上述 4 种提取物研细,过五号筛,分别取不同提取物适量(相当于黄芩苷 15 mg),按淀粉-糊精-乳糖(7:1:1)加入各辅料适量,混合均匀,以单糖浆为黏合剂,混合均匀,制软材,制粒,压片,片重 0.4 g,硬度控制在 30~40 N,制备得 4 种黄芩提取物片剂。

2.3.2 溶出度测定^[1,3] 参考 2010 年版《中国药典》二部附录溶出度测定法中桨法测定,溶出介质为经脱气处理的水 250 mL(含 1% tween-80),温度(37 ± 0.5) °C,转速 120 r·min⁻¹。分取上述 4 种药片置于溶出杯中,依法测定。取样时间为 10,30,60,90,120,180 min,每次取样 1 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,同时补充同体积同温度的溶出介质,按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,计算不同提取物片剂的

累积溶出率,见表1。结果表明黄芩提取物随着纯化程度的不断提高,黄芩苷累积溶出率呈现降低趋势,样品1的累积溶出度最高,各提取物片剂组在

90 min时基本达到溶出平衡。提示提取物中黄芩苷含量越高,其溶出度越低,说明提取物中含有不同质与量的伴生物质对黄芩苷的溶出具有显著影响。

表1 黄芩提取物片剂的体外溶出度测定($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

样品	累积溶出率					
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
1	13.62 ± 1.02	18.17 ± 0.99	35.17 ± 3.15	37.16 ± 2.51	38.09 ± 3.65	38.24 ± 4.03
2	7.02 ± 1.94	13.03 ± 1.62	18.92 ± 3.09	25.17 ± 2.94	26.34 ± 3.24	25.91 ± 2.96
3	5.12 ± 1.34	11.57 ± 2.06	16.73 ± 1.52	23.57 ± 2.01	23.02 ± 1.98	23.49 ± 2.25
4	6.03 ± 0.67	9.24 ± 1.32	15.61 ± 3.16	22.84 ± 2.64	23.12 ± 3.05	22.98 ± 2.17

2.4 黄芩提取物体外抗氧化活性考察

2.4.1 试剂及提取物配制 精密称取 DPPH 10.96 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入适量甲醇,超声 30 min 使其完全溶解,加甲醇定容至刻度,取该溶液加甲醇稀释 5 倍后作为储备液($87.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),得 DPPH 溶液^[4-5]。取乙酸钠 5.4 g,加水 50 mL 使溶解,用冰乙酸调节 pH 5.5,加水稀释至 600 mL,得乙酸-乙酸钠缓冲液。分别精密称取样品 4,3,2 26.55,24.22,25.19 mg,加适量甲醇超声溶解,分别定容于 25 mL 量瓶中,取该溶液 1 mL,用甲醇稀释并定容于 50 mL 量瓶中,作为供试品贮备液。由于样品 1 中杂质较多,在选定的检测波长处吸收干扰较大,故未对其进行测定。

2.4.2 检测波长选择 取 DPPH 溶液和黄芩提取物溶液适量,于 200 ~ 700 nm 进行扫描,结果提示 DPPH 溶液在 516 nm 和 325 nm 处有最大吸收峰,而黄芩提取物在 278 nm 处有最大吸收,325 nm 处也有一定吸收,但在 516 nm 处无吸收,故选择检测波长 516 nm。

2.4.3 抗氧化性能评价指标 抗氧化性能选择清除率进行评价,计算公式为清除率 = $[1 - (A_1 - A_2)/A_3] \times 100\%$,式中 A_1 为样品液与 DPPH 作用后的吸光度, A_2 为样品液与甲醇作用后的吸光度, A_3 为甲醇与 DPPH 作用后的吸光度。在实际工作中,常以清除 50% 浓度的清除率作为评价指标,表示为 IC_{50} 。

2.4.4 DPPH 质量浓度与吸光度关系考察 分别精密吸取 DPPH 溶液 6 份,每份 1 mL,分别加入甲醇 2,3,4,5,7,9 mL 稀释,浓度分别为 29.22,21.92,17.53,14.61,10.96,8.77 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,摇匀,避光,常温反应 30 min,于 516 nm 处测定吸光度(A),以甲醇作为空白溶剂,以 A 为纵坐标,质量浓度(C)

为横坐标,得线性方程 $A = 21.499C - 0.015$ ($r = 0.9995$),线性范围 8.77 ~ 22.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据 A 检测限度要求,选择 29.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液作为反应试剂。

2.4.5 DPPH 反应时间对抗氧化活性的影响 量取样品 4 的供试品贮备液 500 μL ,共 6 份,各加入甲醇 0.5 mL,乙酸钠缓冲液 1.0 mL 和 DPPH 溶液 2.0 mL,摇匀,避光,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,分别反应 10,20,30,40,50,60 min,于 516 nm 处测定 A_1 ,同法测定 A_2 和 A_3 ,按 2.4.3 项下公式计算清除率分别为 36.15%,40.10%,41.37%,41.42%,41.28%,41.01%,结果提示 20 min 即反应完全,故确定反应时间 30 min。

2.4.6 DPPH 反应温度对抗氧化活性的影响 取样品 4 的供试品贮备液 500 μL ,共 3 份,加入甲醇 0.5 mL,乙酸钠缓冲液 1.0 mL 和 DPPH 溶液 2.0 mL,摇匀,避光,分别置于 25,37,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min,按 2.4.3 项下公式计算清除率分别为 39.24%,41.82%,41.73%,结果表明反应温度对清除率影响较小,结合在体清除自由基的条件,设定反应温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.7 不同提取物抗氧化性能测定 分别量取黄芩不同提取物贮备液 50,100,200,300,400,500,800,1000 μL ,各加入甲醇稀释至 1 mL,加入乙酸钠缓冲液 1.0 mL 和 DPPH 溶液 2 mL,摇匀,避光,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min,按 2.4.3 项下公式计算清除率。以清除率为纵坐标,提取物质量为横坐标,结果样品 4,3,2 的线性方程分别为 $Y = 4.2352X - 3.1933$ ($r = 0.999$), $Y = 3.8941X + 0.8728$ ($r = 0.998$), $Y = 3.5769X - 1.2233$ ($r = 0.999$),计算各样品对 DPPH 溶液(2 mL)的 IC_{50} 依次为 12.56,12.62,14.32 μg 。结果表明随着提取物中黄芩苷含

量的增高,抗氧化能力明显增强,但样品 3 和样品 4 的提取物抗氧化能力相当。

3 讨论

在药材提取、分离、纯化的过程中,被认为是“杂质”的有效成分的伴生物质被逐一除去,这不仅破坏了中医药提倡的整体性思维,也使得药效成分在制剂中出现溶出困难、生物利用度低等现象,这也可能是现代中药制剂疗效不及传统汤剂的一个原因。中药提取物伴生物质可通过自身或与有效成分发生化学或物理作用而产生某些功能,如增强活性作用、助溶剂作用、类似赋形剂作用等,这些功能会对制剂中有效成分的崩解、溶出与吸收产生一定的影响,使得经不同前处理工艺所制备制剂的生物利用度受到影响^[6-7]。

不同黄芩提取物中存在不同的伴生物质,本文研究表明伴生物质的差异对黄芩提取物中黄芩苷的溶出有一定影响,这符合 Müller 教授提出的“伴生物质可影响活性物质从药物处方或植物药提取物中溶出”的观点^[8]。文献报道黄芩苷在水中表观溶解度(55.16 ± 0.53) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,属于几乎不溶的范围^[9];而将黄芩饮片用传统煎汤方法制备时,药液中黄芩苷质量分数可达到 4.71%,溶出率 54.70%^[10]。课题组前期研究发现,黄芩水煎煮粗提取物中黄芩苷的转移率较高,提示黄芩苷在黄芩水煎液中可能与其他物质成分相互作用(可能成盐),进而促进黄芩苷在水中溶解与溶出^[2]。因此,在进行制剂工艺前处理研究时,不能单纯追求有效成分的纯度,应结合剂型载药量的要求,尽可能采用粗提取物进行投料,充分考虑主观行为判定的“有效成分”的有效性和生物利用度。另外,药物中伴生物质组成种类与数量的不同会导致提取物体系物理、化学、生物学性质的差异,进而影响到基本活性物质的吸收,这也为在中药原料中寻找新辅料提供判据。

DPPH 由于结构中苯环的共轭、位阻和硝基吸电子作用,是一种很稳定的以氮为中心的自由基,其孤电子在 515 nm 附近具有强吸收(其甲醇水溶液显深紫色)^[11],当有供氢能力的抗氧化剂存在时,孤电子被配对,吸收消失或减弱,且 A 变小的程度与自由基清除程度呈线性关系,根据该特性可进行定量分析。抗氧化试验结果提示,黄芩提取物中以黄芩苷为代表的黄酮类成分应该是提取物抗氧化能力

的主要成分,样品 3 和样品 4 具有接近的抗氧化能力,推断样品 3 中除了黄芩苷外,尚含其他抗氧化能力相当的成分。抗氧化能力作为黄芩修复缺血性脑损伤的一个重要指标,说明样品 3 和样品 4 可能具有较好的药效表现,但最终提取物质量浓度的确定还需药效学试验加以佐证,故在非口服制剂(注射给药、鼻腔给药等)制备与抗氧化相关疾病治疗中,可采用高纯度提取物投料,并选择适宜的表面活性剂以增加其溶出与吸收。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:282,614,846.
- [2] 史亚军,杨明. 不同黄芩提取物制备工艺研究[J]. 陕西中医学院学报,2013,36(6):110.
- [3] 谭晓梅,吴艳萍,吴朝晖. 葛根芩连微丸中黄芩苷和小檗碱的含量及溶出度测定[J]. 中药材,2006,29(2):195.
- [4] Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, et al. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.; Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts [J]. Food Chem, 2008, 107(1):1120.
- [5] Tepe B, Daferera D, Tepe A S, et al. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub. -Mor. from Turkey [J]. Food Chem, 2007, 103(4):1358.
- [6] 罗杰英,王玉蓉,张自然. 现代物理药剂学理论与实践[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2005:505.
- [7] Fu W Y. Absorption of quercetin-arginine complex and bioavailability study [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2002, 33(8):6951.
- [8] 胡晋红(译). 现代给药系统的理论和实践[M]. 北京:人民军医出版社,2004:77.
- [9] 欧水平,王森,张海燕,等. 黄芩苷溶解性能的测定与表征[J]. 现代生物医学进展,2009,9(20):3955.
- [10] 阿龙,王芳,谈静,等. 黄芩不同用法的合理性比较研究[J]. 成都中医药大学学报,2010,33(2):91.
- [11] Paixão N, Perestrelo R, Marques J C, et al. Relationship between antioxidant capacity and total Phenolic content of red, rosé and white wines [J]. Food Chem, 2007, 105(1):204.

[责任编辑 刘德文]