

三七乳膏中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的裸鼠体外透皮特征研究

黎月桃, 朱黎霞, 曾庆, 黄国志*
(南方医科大学珠江医院, 广州 510280)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法同步考察三七乳膏中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的体外透皮能力。方法: 优选梯度洗脱及检测条件, 采用 Franz 透皮扩散仪进行三七乳膏的裸鼠体外透皮实验, 测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的累积透皮量。结果: 建立三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的高效液相同步检测方法, 体外透皮吸收符合零级速率特征。结论: 本研究为三七乳膏的质量控制及临床应用提供依据。

[关键词] 高效液相色谱; 三七乳膏; 透皮吸收

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0106-04

[doi] 10.11653/syfy2014060106

Study on Transdermal Permeability of Notoginsenoside R_1 , Ginsenoside R_{g_1} , R_{b_1} and R_d in Notoginseng Radix et Rhizoma Cream by HPLC Through Nude Mouse Skin *in vitro*

LI Yue-tao, ZHU Li-xia, ZENG Qing, HUANG Guo-zhi*
(Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

[收稿日期] 20131114(014)

[基金项目] 2011年广东省科技计划资助项目(2011B061300071)

[第一作者] 黎月桃, 硕士, 从事康复医学与理疗学研究, Tel: 15820245829, E-mail: 333963123@qq.com, 337963123@qq.com

[通讯作者] * 黄国志, 教授, 博士生导师, 从事康复医学与理疗学研究, Tel: 18666087186, E-mail: drhuang66@gmail.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 205.
- [2] 张百霞, 周凤琴, 郭庆梅. 金银花中黄酮类化合物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 349.
- [3] 丁既鹏, 李世林. 醇提法和超声波法提取金银花中黄酮类物质的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 64.
- [4] 蔡清宇, 郝特, 李曼玲, 等. 7份不同产地金银花质量初步调查[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 246.
- [5] 王海娣, 杜冠华, 刘艾林. 天然黄酮类化合物的神经氨酸酶抑制活性评价[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(15): 1435.
- [6] 韩宁宁, 叶文博. 木犀草素和木犀草苷对 K562 细胞增殖的影响[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2008, 37(6): 622.
- [7] 何玲, 孙桂波, 孙潇, 等. 木犀草苷对阿霉素诱导乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 28(9): 1229.
- [8] 靳维荣, 李广华, 孙强, 等. 自然诱变品种红金银花中木犀草苷含量初探[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5): 22.
- [9] 赵彦杰. 金银花叶提取物的抑菌效果研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 63.
- [10] 郭玉, 阳育聪, 刘运美, 等. 金银花及其叶中有效成分的比较研究[J]. 南华大学学报: 医学版, 2008, 36(2): 154.

[责任编辑 邹晓翠]

[Abstract] **Objective:** Applying HPLC method to study on the determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g₁}, Rb₁ and Rd in Notoginseng Radix et Rhizoma cream, and to investigate the ability of percutaneous penetration of Notoginseng Radix et Rhizoma cream. **Method:** Optimizing the gradient elution conditions and detecting condition. Improved Franz type diffusion cells were used *in vitro* permeation studies, and nude mouse skin were employed as transdermal barrier. The concentration of notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g₁}, Rb₁ and Rd in the receptor solution was determined by HPLC to investigate the cumulative permeation quantities at different time respectively. **Result:** A method for simultaneous determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g₁}, Rb₁ and Rd by HPLC was established. The percutaneous penetration of Notoginseng Radix et Rhizoma cream conformed to the zero kinetic equation. **Conclusion:** This method provides the basis for quality control and clinical application of Notoginseng Radix et Rhizoma cream.

[Key words] HPLC method; Notoginseng Radix et Rhizoma cream; percutaneous absorption

三七乳膏是以三七总皂苷为主药制备而成的 O/W 型软膏剂。三七总皂苷是从五加科多年生草本植物三七的根中提取的有效活性物质,含有人参皂苷 Rb₁,Rb₂,Rc,Rd,Rf,Rg₁,Rg₂,Rh₁ 和三七皂苷 R₁,R₂,R₃,R₄,R₆ 等 20 余种皂苷成分,均属于达玛烷型(dammarane type)四环三萜皂苷^[1]。其中,人参皂苷 Rg₁,Rb₁ 是三七总皂苷中含量最高的两个成分,而三七皂苷 R₁ 则是三七总皂苷的特征化合物。三七总皂苷具有活血、补血、止血、降脂、改善心脑血管循环等作用,在耐缺氧、抗衰老、提高机体免疫力等方面作用显著,在物质代谢及抗炎、抗肿瘤等方面均有较好的活性^[2],近年来临床应用范围不断拓宽。本研究建立了高效液相色谱法测定三七乳膏中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁,Rb₁,Rd 的方法,并考察了三七乳膏的裸鼠体外透皮特征,为三七产品开发及乳膏应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Dionex 高效液相色谱仪(包括 P680 泵、ASI-100 自动进样器、TC100 柱温箱、UV1700 型检测器、变色龙色谱工作站),GR-202AND 型 1/10 万电子分析天平(日本岛津公司),TK-12A 型透皮扩散试验仪(扩散池面积为 2.92 cm²,接收液体积为 7 mL,上海凯谱科技贸易有限公司)。

1.2 试药 三七总皂苷(批号 ZL12310G,南京泽朗医药科技有限公司),三七皂苷 R₁ 对照品(批号 111219,四川省维克奇生物科技有限公司),人参皂苷 Rg₁ 对照品(批号 120625,四川省维克奇生物科技有限公司),人参皂苷 Rb₁ 对照品(批号 120529,四川省维克奇生物科技有限公司),人参皂苷 Rd(批号 110415,四川省维克奇生物科技有限公司),乙腈为色谱纯(美国 Merck 公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。自制 O/W 型三七乳膏(三七

皂苷 0.5 g,红花 0.5 g,硬脂酸 0.25 g,单甘脂 0.2 g,白凡士林 0.2 g,液体石蜡 0.5 g,司盘-80 0.05 g,聚山梨酯 80(吐温-80)0.2 g,甘油 0.5 g,尼泊金乙酯 0.01 g,蒸馏水 3.1 g。乳膏中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁,Rb₁,Rd 及 Re 的含量分别为 19,33.7,32.6,7.9 mg·g⁻¹)。

1.3 动物 裸鼠 22~25 g,广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(粤)2008-0020。

2 方法与结果

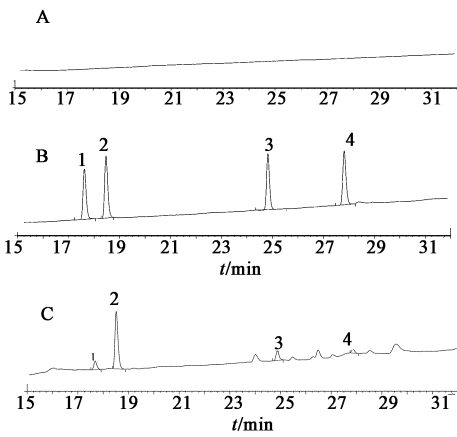
2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁,Rb₁,Rd 对照品适量,置于 10 mL 的量瓶中,加 25% 甲醇溶解并稀释至刻度,制成三七皂苷 R₁ 0.247 g·L⁻¹、人参皂苷 Rg₁ 0.251 g·L⁻¹、人参皂苷 Rb₁ 0.248 g·L⁻¹、人参皂苷 Rd 0.250 g·L⁻¹ 的混标溶液,于 4 °C 冰箱保存。

2.2 样品的处理方法 取不同时间点的透皮吸收样品,12 000 r·min⁻¹ 高速离心后,0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液进样检测。

2.3 专属性实验 Thermo C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 A 乙腈,B 纯水,梯度洗脱(0~4 min,12% A;4~30 min,12%~45% A;(30~31 min,45%~12% A;31~33 min,12% A),检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温为恒温,进样量 10 μL。三七皂苷 R₁ 保留时间(t_R)为 17.57 min,人参皂苷 Rg₁ 保留时间为 18.38 min,人参皂苷 Rb₁ 保留时间为 24.71 min,人参皂苷 Rd 保留时间为 27.64 min。

分别采集空白基质、含药基质透皮 14 h 后样品,在此色谱条件下,空白基质对三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 的含量测定无影响。见图 1。

2.4 标准曲线的绘制 分别精密量取混标溶液 0,



1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g_1} ; 3. 人参皂苷 R_{b_1} ; 4. 人参皂苷 R_d

A. 空白基质接收液; B. 对照品溶液; C. 14 h 自制样品接收液

图 1 三七乳膏 HPLC

1, 2, 3, 4, 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 25% 甲醇定容, 稀释至刻度, 摇匀, 得到系列标准溶液。分别进样 10 μ L, 以峰面积为纵坐标、质量浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 绘制工作曲线, 计算回归方程, 得到各对照品的回归方程及线性范围, 各对照品在相应线性范围内线性关系良好, 见表 1。

表 1 各对照品的回归方程及线性范围 ($n=4$)

成分	回归方程	线性范围 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
三七皂苷 R_1	$Y=0.1079X-2.636(0.9999)$	24.7 ~ 123.5
人参皂苷 R_{g_1}	$Y=0.1129X-2.774(0.9997)$	25.1 ~ 125.5
人参皂苷 R_{b_1}	$Y=0.1082X-2.657(0.9997)$	24.8 ~ 124.0
人参皂苷 R_d	$Y=0.1120X-2.792(0.9999)$	25.0 ~ 125.0

2.5 精密度试验 对照品溶液连续进样 6 次, 每次进样 10 μ L, 测定峰面积, 计算 RSD。结果三七皂苷 R_1 RSD 1.71%, 人参皂苷 R_{g_1} RSD 1.65%, 人参皂苷 R_{b_1} RSD 1.87%, 人参皂苷 R_d RSD 0.82%, 表明测定方法的精密度较高。

2.6 稳定性试验 取样品按对照品溶液制备方法制成供试品溶液, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 h 进样 1 次, 每次进样 10 μ L, 测定峰面积, 计算 RSD。结果三七皂苷 R_1 RSD 1.53%, 人参皂苷 R_{g_1} RSD 1.24%, 人参皂苷 R_{b_1} RSD 2.18%, 人参皂苷 R_d RSD 0.92%, 表明样品中成分在 14 h 内均较稳定。

2.7 加样方法回收率 精密称取已知含量的样品, 分别精密加入一定量的三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d 对照品, 按样品溶液制备项下操作, 重复操作 5 份。按色谱条件测定含量, 计算回收率。三七

皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d 平均回收率分别为 96.67%, 99.30%, 96.87%, 98.23%, RSD 分别为 2.62%, 1.83%, 1.93%, 2.13%。

2.8 体外透皮实验 采用改良的 Franz 扩散池, 接收介质为 30% 乙醇生理盐水液。裸鼠脱颈处死, 采集腹部皮肤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中迅速剥离皮下脂肪组织, 固定于 Franz 扩散池上预平衡 1 h 后备用, 角质层向上, 皮下组织与接收液密切接触无气泡, 维持接收液温度为 $(32 \pm 0.5) ^{\circ}\text{C}$ 、磁振子转速 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别称取 3 g 三七乳膏 4 份, 置于扩散池中, 涂匀, 分别于给药后 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 h 各取接受液 1 mL 按样品处理方法处理后立即进样测定。取样后即向接收池内补充 1 mL 32 $^{\circ}\text{C}$ 的 30% 乙醇生理盐水。按下式计算累积渗透量 ($Q_n, \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$):

$$Q_n = \frac{C_n \times t + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times t_i}{A}$$

在公式中, C_n : 第 n 个取样点测得的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); A 为渗透面积; C_i : 第 i 个 ($i \leq n-1$) 取样点测得的药物质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。以累积渗透量的平均值对时间 t 分别按零级、一级及 Higuchi 方程进行拟合, 所得方程的斜率即为透皮速率常数 (J), 结果表明三七成分群以零级速率透皮转运, 则 $Q-t$ 直线斜率即为透皮吸收速率 J_s ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$), 结果见表 2 及图 2。

表 2 三七乳膏中 R_1, R_{g_1}, R_{b_1} 及 R_d 的透皮吸收结果

成分	回归方程	r	J_s ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
三七皂苷 R_1	$Q_n = 4.83t + 40.23$	0.9999	4.83 ± 0.20
人参皂苷 R_{g_1}	$Q_n = 8.15t + 51.56$	0.9974	8.15 ± 0.97
人参皂苷 R_{b_1}	$Q_n = 5.02t + 39.42$	0.9995	5.02 ± 0.19
人参皂苷 R_d	$Q_n = 4.68t + 41.35$	0.9999	4.68 ± 0.15

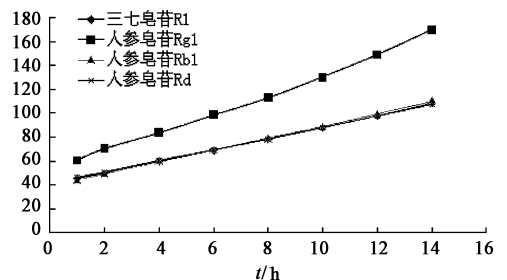


图 2 三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g_1}, R_{b_1} 及 R_d 的渗透动力学曲线

3 讨论

迄今已从三七的不同部位分离得到 60 余种单体皂苷成分^[3]。2010 年版《中国药典》^[4]一部收载的三七总皂苷的 HPLC 含量测定方法能同时测定 5 种皂苷的含量,但分析时间长,本实验在此基础上调整乙腈和水的比例,大大缩短了分析时间,且其中 4 种主要成分三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_d 与其他成分的分离度均符合要求,理论塔板数高。

透皮吸收实验的关键在于选择与人体皮肤渗透性相似的动物皮肤。因人体皮肤来源有限,故常需用动物皮肤来代替。常用的动物有猪、家兔、豚鼠、大鼠、小鼠、裸鼠等。猪皮肤厚度与人皮肤接近,作为人皮肤穿透研究动物模型的价值已被认可,但不容易获得。家兔皮肤厚度较人皮肤薄,皮肤渗透量明显高于人皮肤,很难作为透皮吸收预测模型^[5]。豚鼠及大鼠皮肤组织结构与人皮肤基本一致,但渗透性大于人皮肤^[5]。小鼠皮肤结构与人皮肤结构一致,且毛孔密度较接近其去毛离体皮肤常用于药物的透皮吸收实验。由于小鼠的角质层较薄、渗透性大、去毛麻烦且影响实验结果。国外用得较多的是裸鼠,Brnaugh 等认为无毛小鼠的毛囊数目和直径与人类最接近,其角质层厚度则相应减半,裸鼠的渗透性比有毛小鼠低,更接近于人皮肤的渗透性^[6],且价廉易获得,皮肤容易处理,故本研究采用裸鼠皮肤作为经皮渗透实验的皮肤。

透皮吸收研究中的接收液应满足两个条件:一是能模拟皮下生理环境;二是要使难溶性药物具有一定的溶解度,以使在透皮吸收研究中不会因为溶解度的制约而影响透皮吸收研究结果。目前常用的接收液有蒸馏水、生理盐水、30% 乙醇生理盐水、pH 6.8 磷酸盐缓冲液。选定 30% 乙醇生理盐水为本研究的接收液,因为它不仅能反映皮下环境的生理特点^[7],同时可使角质层膨胀疏松,增加皮肤的通透性,从而减少时滞,缩短实验时间^[8]。

在进行 HPLC 检测之前必须对接收液进行过滤,防止带入较多杂质影响检测结果、污染色谱柱。

笔者在实验过程中采用检测灵敏度较高的 HPLC 测定透皮接收液中的三七乳膏中各组分的含量,结果准确可靠,满足透皮吸收制剂研究的要求,为三七乳膏的质量控制及临床应用提供依据。

本文研究结果表明,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d 可以透过完整的裸鼠腹皮,4 种成分的累积渗透量均随时间的延长而增加,以 Q_n 对 t 进行线性回归,测定样品的 r 均 > 0.99 ,具有零级动力学透皮吸收速率的特征。但 4 种成分透皮吸收率不高,可能与其相对分子质量较大(均超过 900)、极性太强有关,根据现代药剂学研究,此类结构的分子难以透皮吸收^[9]。因此若要进一步提高透皮吸收率,则需要采用加入透皮促进剂或制成脂质体、微乳,或运用离子导入、电致孔或超声波导入^[10]等手段以促进其透皮吸收。

[参考文献]

- [1] 郭元日. 三七有效成分的药理学研究进展[J]. 中国药业, 2012, 21(4): 86.
- [3] 鲍建才, 刘刚, 丛登立, 等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 246.
- [4] 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: 11.
- [5] 罗世英, 陈华萍. 透皮吸收常用的几种实验动物[J]. 中国药业, 2004, 13(4): 74.
- [6] Simon G A, Maibach Hi. Relevance of hairless mouse as an experimental mode of percutaneous in man[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 1998, 11(2): 80.
- [7] 孙亦群, 周莉玲, 陈孝银. 九分喷雾剂透皮吸收接收液的筛选[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(1): 45.
- [8] 王英姿, 孙秀梅, 惠建国. 高乌甲素透皮吸收接收液的选择研究[J]. 山东中医药大学学报. 2004, 28(6): 461.
- [9] 崔福德. 药剂学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 429.
- [10] 林静. 经皮给药制剂中物理促渗透方法的研究进展[J]. 黄石理工学院学报, 2009, 25(5): 40.

[责任编辑 邹晓翠]