

# 三七叶总皂苷脂质体凝胶剂的制备及其离体透皮率考察

张慧慧, 刘超英\*

(湖北中医药大学药学院, 武汉 430061)

**[摘要]** 目的: 优选三七叶总皂苷脂质体凝胶剂的处方工艺并考察其离体累积透皮吸收率。方法: 采用薄膜分散法制备脂质体, 以包封率为指标, 通过正交试验考察选择磷脂与胆固醇的质量比、脂类与药物的质量比、药物质量浓度对三七叶总皂苷脂质体处方工艺的影响。运用高速离心法测定包封率, 以卡波姆 940 为基质制备凝胶剂, 通过单因素试验筛选卡波姆 940 用量。通过体外透皮试验考察三七叶总皂苷中人参皂苷  $Rb_3$  的体外透皮吸收情况, 利用 HPLC 测定透过及滞留在皮肤内的人参皂苷  $Rb_3$  含量, 色谱条件为 ZORBOX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A) - 0.2% 磷酸 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 19 min, 30% A; 19 ~ 21 min, 35% A; 21 ~ 26 min, 50% A), 检测波长 203 nm。结果: 优选的处方工艺为卵磷脂-胆固醇 (4:1), 人参皂苷  $Rb_3$  质量浓度 90 g·L<sup>-1</sup>, 脂药比 (6:1), 当卡波姆 940 质量分数为 0.5% 时, 药物的皮肤累积透过量最大。结论: 脂质体凝胶剂能提高药物中有效成分在皮肤的透过量, 为三七叶总皂苷新剂型和新给药途径的开发提供参考。

**[关键词]** 三七叶总皂苷; 薄膜分散法; 包封率; 脂质体; 凝胶剂; 透皮吸收; 含量测定

**[中图分类号]** R283.6; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0045-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013210045

## Preparation and *in vitro* Transdermal Absorption of Total Saponins from Leaves of Notoginseng Radix et Rhizoma Liposomal Gels

ZHANG Hui-hui, LIU Chao-ying\*

(College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize prescription of total saponins from leaves of Notoginseng Radix et

**[收稿日期]** 20130409(018)

**[第一作者]** 张慧慧, 硕士, 从事中药新制剂新剂型研究, Tel:027-68889065, E-mail:huihui5207374@163.com

**[通讯作者]** \*刘超英, 学士, 副研究员, 从事中药新制剂新剂型研究, Tel:027-68889065, E-mail:liuchaoying@21.cn.com

- [2] 周陆怡, 鲁澄宇. 有关丹参及其主要有效成分丹参素的研究概况[J]. 中外医疗, 2009, 28(25): 153.
- [3] 唐志勇, 苏青, 周娟娟, 等. 盐酸川芎嗪透皮贴剂药代动力学研究[J]. 西南国防医药, 2012, 22(4): 361.
- [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: 70, 373.
- [5] 尹华. 三黄散瘀巴布剂的基质配方优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 24.
- [6] 韩宝龙, 薛强强, 杜文婷, 等. 复方红花泡腾颗粒的体外透皮吸收性能考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 45.
- [7] 郑晓珂, 董三丽, 冯卫生. HPLC 法测定丹参中丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、二氢丹参酮 I、隐丹参酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(6): 12.
- [8] 邱家学. 充分利用 EXCEL 数据处理功能巧算 Weibull 分布位置参数[J]. 药学进展, 2004, 28(10): 464.
- [9] 梁英珍, 薛磊. 丹参中丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮在不同 pH 值条件下含量变化规律探讨[J]. 西北药学杂志, 2003, 18(3): 108.
- [10] 郭冬, 刘珍, 张恩户. 丹参酮 II<sub>A</sub>、丹参素、川芎嗪和阿魏酸抑制血小板聚集的相互作用类型及配比关系研究[J]. 陕西中医, 2007, 28(6): 743.
- [11] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 100, 313.

[责任编辑 全燕]

Rhizoma liposomal gels and investigate its *in vitro* transdermal absorption properties. **Method:** Total saponins from leaves of Notoginseng Radix et Rhizoma liposomes were prepared by thin-film dispersion Method, with encapsulation efficiency as index, orthogonal test was adopted to optimize liposomes formulation by taking ratio of phospholipids-cholesterol, lipids-drug ratio and drug concentration as factors. High-speed centrifugation method was used to determine encapsulation efficiency, carbomer 940 was added as a substrate for preparation of gels, its dosage was investigated by single factor test. *In vitro* transdermal test was adopted to investigate *in vitro* transdermal absorption of ginsenoside Rb<sub>3</sub> from total saponins in leaves of Notoginseng Radix et Rhizoma, the content of ginsenoside Rb<sub>3</sub> was determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: ZORBOX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile (A) -0.2% phosphoric acid (B) gradient elution (0-19 min, 30% A; 19-21 min, 35% A; 21-26 min, 50% A), detection wavelength 203 nm. **Result:** Optimized formulation technology was: lecithin-cholesterol (4:1), the concentration of ginsenoside Rb<sub>3</sub> 90 g · L<sup>-1</sup>, lipid-drugs (6:1), the highest cumulative permeation rate of drug through skin when the content of carbomer 940 was 0.5%. **Conclusion:** Liposomal gels could increase permeation amount of active ingredients in skin, this study laid experimental foundation for development of new dosage forms and new administration routes.

[**Key words**] total saponins from leaves of Notoginseng Radix et Rhizoma; thin-film dispersion method; entrapment efficiency; liposomes; gels; transdermal absorption; determination

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Buck.) F. H. Chen 的干燥根和根茎,特产于云南、广西,现代药理研究发现其茎叶亦可供药用,且毒副作用小。三七地上部分主要有效成分为三七叶总皂苷,具有镇痛、镇静、改善睡眠等作用,用于改善头痛、头晕、心悸、乏力等<sup>[1]</sup>。《中国药典》2010 年版一部收录了七叶神安片和七叶神安滴丸,二者的组成成分均为三七叶总皂苷,具有益气安神、活血止痛、止血的功效,临床用于神经衰弱、偏头痛、失眠等症的治疗。但口服制剂因受到胃肠道酶、细菌及 pH 等多种因素影响,可能会导致生物利用度很低。三七叶中总皂苷质量分数 4% ~ 6%,主要包括人参皂苷 Rb<sub>3</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rc、三七皂苷 Fc 等,其中人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 质量分数 > 10%,各主要成分的相对分子质量均较大 (≥ 600)<sup>[2]</sup>。三七叶总皂苷为水溶性成分,与皮肤相容性较低,如果将其直接制成普通的凝胶制剂可能会使透皮率较低,影响药物疗效的发挥。

脂质体的成分与构成人体的细胞膜相似,能提高药物穿透人体皮肤的作用,增加药物在人体血液中的局部浓度;同时脂质体作为药物载体,具有在生物体内可降解、无毒性、无免疫原性、能减少药物剂量等优点。本实验拟将三七叶总皂苷制成脂质体凝胶剂<sup>[3]</sup>,但外用制剂要求具有一定的黏度和易于涂布性,而单纯的脂质体不具备这种性质,因此需加入适当凝胶剂或增稠剂等。通过正交试验优选三七叶总皂苷脂质体凝胶剂的处方,并考察其离体透皮率,

为三七资源的充分利用提供实验依据。

## 1 材料

DLSB-1000/80 型低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司), ZORBOX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), YB-P6 型智能透皮仪(天津药典标准仪器厂), AL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

大豆卵磷脂(上海太伟药业有限公司), 胆固醇(南京奥多福尼生物科技有限公司), 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111686-201002), 三七叶总皂苷(安康东科麦迪森天然药业有限公司), 卡波姆 940(美国 BFGoodrich 公司), 乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 由湖北省实验动物研究中心提供, 许可证号 SCXK(鄂) 2008-0005。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[4]</sup> ZORBOX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A) -0.2% 磷酸(B) 梯度洗脱 (0 ~ 19 min, 30% A; 19 ~ 21 min, 35% A; 21 ~ 26 min, 50% A), 检测波长 203 nm。理论塔板数按人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 计应不低于 6 000。

**2.2 包封率的测定**<sup>[5]</sup> 取脂质体溶液适量置于离心管中, 于室温条件下离心 40 min (13 000 r · min<sup>-1</sup>), 吸取上清液适量, 加乙醇定容至 1 mL, 按

**2.1** 项下色谱条件测定人参皂苷  $Rb_3$  含量,计算包封率。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$$

其中  $W_{\text{总}}$  为脂质体溶液中人参皂苷  $Rb_3$  总量,  $W_{\text{游离}}$  为上清液中人参皂苷  $Rb_3$  含量。

**2.3** 脂质体处方优化<sup>[6]</sup> 在预试验基础上,选择磷脂与胆固醇的质量比、脂类与药物的质量比、药物质量浓度为考察因素,每个因素选取3个水平,因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。结果由直观分析可知,各因素对脂质体包封率的影响顺序为  $A > B > C$ ,方差分析表明3个因素  $A$  对包封率的影响均不显著,确定脂质体最佳处方为  $A_3B_3C_3$ ,即磷脂-胆固醇(4:1),脂类-药物(6:1),药物质量浓度  $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表1 三七叶总皂苷脂质体处方工艺正交试验因素水平

水平	A 磷脂-胆固醇	B 脂药比	C 药物质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1:1	4:1	70
2	2:1	5:1	80
3	4:1	6:1	90

**2.4** 验证试验 按优选的处方工艺制备3批脂质体。精密称取处方量大豆卵磷脂、胆固醇,置于250 mL圆底瓶中,加入适量三氯甲烷超声10 min使溶解,置25 °C条件下减压蒸发除去三氯甲烷,使其在瓶壁上成均匀薄膜,继续旋转蒸发除尽有机溶剂,真空干燥过夜,加入含处方量三七叶总皂苷的pH 6.8磷酸盐缓冲液(PBS)适量,常温下水浴旋转洗膜150 min,即得脂质体溶液,按2.2项下方法测定包封率,结果平均包封率61.28%,RSD 1.34%。

表2 三七叶总皂苷脂质体处方工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	包封率/%
1	1	1	1	1	0.083
2	1	2	2	2	0.195
3	1	3	3	3	0.379
4	2	1	3	2	0.481
5	2	2	1	3	0.384
6	2	3	2	1	0.443
7	3	1	2	3	0.327
8	3	2	3	1	0.483
9	3	3	1	2	0.583
$K_1$	0.219	0.279	0.350	0.336	
$K_2$	0.436	0.354	0.322	0.420	
$K_3$	0.464	0.468	0.448	0.363	
R	0.245	0.171	0.126	0.084	

表3 处方工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.108	2	9.818	>0.05
B	0.046	2	4.182	>0.05
C	0.026	2	2.364	>0.05
D(误差)	0.011	2	1.000	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

**2.5** 脂质体凝胶剂的制备 称取一定量卡波姆940置于烧杯中,加入适量水放置过夜,使之充分溶解溶胀,用三乙醇胺适量调节pH 6~7,得空白凝胶基质。将处方量脂质体加至空白凝胶基质中,并加入少许甘油研和均匀,即得脂质体凝胶,三七叶总皂苷质量分数2%。

**2.6** 离体透皮率考察<sup>[7]</sup>

**2.6.1** 离体鼠皮的制备 将小鼠处死后置于适量的8%硫酸钠酒精溶液中,待毛发变成浅黄色时,捞出,用生理盐水清洗数次,从腹部剪开剥离皮肤后,小心剔除皮下组织和脂肪,漂洗干净后储存于4 °C冰箱中备用。

**2.6.2** 离体透皮试验 将离体鼠皮固定,真皮层面向接受池,有效面积  $7.1 \text{ cm}^2$ ,接收室体积28 mL,在接受池内注满生理盐水,将三七叶总皂苷脂质体凝胶剂适量加入供给池中,使之紧贴于鼠皮角质层面,水浴恒温至37 °C<sup>[8]</sup>,磁力搅拌子以  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  搅拌,分别于1,2,4,6,8,12 h从接收池中取出全部接收液,同时补充同体积预温37 °C的生理盐水。将取出的接收液置于水浴上蒸干,加乙醇定容至2 mL,计算皮肤累积透过量。将12 h后的皮肤用脱脂棉擦洗干净,用生理盐水反复冲洗后剪碎置于适量乙醇溶液中超声40 min,将滤液蒸干并定容至5 mL,按2.1项下色谱条件进样测定人参皂苷  $Rb_3$  含量。

**2.7** 脂质体凝胶剂的处方确定<sup>[9]</sup> 将卡波姆940的质量分数分别设为0.5%,1.0%,2.0%,按2.5项下方法制备脂质体凝胶,取适量按2.6.2项下方法进行体外透皮试验,结果见表4,显示以0.5%卡波姆940为凝胶基质形成的脂质体在各时间段的离体皮肤累积透过量均最大。

### 3 讨论

脂质体的常用制备方法有注入法、逆向蒸发法、薄膜分散法等。注入法存在注入速度不易控制、有机溶剂难以除净、温度偏高等导致包封率降低的问题;同时由于皂苷类成分水溶液本身具有表面活性剂的性质,可降低水溶液表面张力,因此将皂苷类药

表 4 卡波姆 940 对三七叶总皂苷脂质体凝胶  
皮肤累积透过量的影响

卡波姆 940 质量分数/%	人参皂苷 Rb <sub>3</sub> 累积透过量/%					
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
0.5	3.04	4.68	6.95	8.55	9.93	12.33
1.0	2.05	3.46	5.38	7.05	8.68	10.95
2.0	0.64	1.27	2.23	2.91	3.51	4.71

物制成脂质体比一般的水溶性药物更易泄漏。逆相蒸发法制备脂质体步骤较多,且每一步都可能会造成药物泄漏,致使测得药物包封率很低。薄膜分散法操作简便、制备的脂质体结构典型,且药物水溶液中溶解度越高、浓度越高,则包封率越高。故最后选用经典的薄膜分散法制备脂质体。

卡波姆为白色疏松的粉末,具有较强的吸湿性,为水溶性聚合物凝胶基质,与皮肤接触时,皮肤表层能迅速被润湿,有利于药物的吸收。选取以不同质量分数的卡波姆 940 作为凝胶基质时,形成的基质黏稠度不同。2% 卡波姆 940 形成的药物凝胶在 12 h 内的皮肤透过量均小于相同条件下 0.5% 卡波姆 940 的药物凝胶,原因可能是 2% 卡波姆 940 的基质黏稠度大,不利于药物扩散,从而造成透过皮肤的药物量减少。

[参考文献]

[1] 雷伟亚,史栓桃,余思畅,等.三七叶总皂苷的毒性研究药物研究[J].云南医药,1984,5(4):241.

[2] 熊维政,杨义厚,梁秉文.药物贴膏剂的生产与开发[M].北京:北京工业出版社,2010:61.

[3] 曹红.凝胶剂在中药制剂中的研究进展[J].中华实用医学,2005,7(4):5.

[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,2010:423.

[5] 徐白,沈蕴琪,方晓玲,等.三七总皂苷复方脂质体凝胶剂的制备及皮肤给药研究[J].中国临床药理学杂志,2007,16(3):145.

[6] 陈玉玺,王冰,浦益琼,等.20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸缓释微球的制备[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):4.

[7] 中华人民共和国卫生部.中药新药临床研究指导原则.第1辑[S].北京:中华人民共和国卫生部,1993:263.

[8] 梁秉文.中药经皮给药制剂技术[M].北京:化学工业出版社,2006:38.

[9] 刘超英,张慧慧.HPLC法测定复方苯妥英钠凝胶剂中苯妥英钠的含量[J].中国药师,2012,15(3):345.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的"中国科技论文统计源期刊"收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊,大 16 开国际开本,136 页,国内外公开发售,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部,邮编:100700,电话:010-64014411-3278, E-mail:Lxx@mail.cintem.ac.cn。