

三七总皂苷透皮凝胶膏剂的制备和含量测定

吴静澜¹, 郭璐玫¹, 龚艳¹, 张永萍^{1*}, 肖时珍²

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州师范大学中国南方喀斯特研究院, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:** 优选三七总皂苷透皮凝胶膏剂的制备工艺, 并建立其含量测定方法。**方法:** 以凝胶膏剂样品的初黏力、外观、涂布性等为综合评价指标, 通过正交试验优选凝胶膏剂的成型工艺; 采用 HPLC 测定三七总皂苷的含量。**结果:** 优化的基质处方为部分聚合的聚丙烯酸钠 4 g, 羧甲基纤维素钠 1 g, 高岭土 3.5 g, 甘羟铝 0.18 g, 甘油-丙二醇(2:1) 25 g, 聚乙烯吡咯烷酮 0.5 g, 聚维酮 0.5 g, 聚乙烯醇 0.25 g。HPLC 测得三七皂苷 R₁ 在 0.42~3.36 μg 线性关系良好($r=0.9996$); 人参皂苷 R_{g₁} 在 4.82~38.56 μg 线性关系良好($r=0.9994$); 人参皂苷 R_{b₁} 在 1.24~9.92 μg 线性关系良好($r=0.9997$)。**结论:** 优选的凝胶膏剂制备工艺稳定可行; 建立的 HPLC 操作简便、可靠, 适用于该制剂的含量测定和质量控制。

[关键词] 三七总皂苷, 凝胶膏剂, 正交试验, 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0020-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070020

Preparation and Content Determination of Total Saponins from *Panax notoginseng* Transdermal Gel Ointments

WU Jing-lan¹, GUO Lu-mei¹, GONG Yan¹, ZHANG Yong-ping^{1*}, XIAO Shi-zhen²

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Institute of South China Karst, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of total saponins from *Panax notoginseng* transdermal gel ointments and establish its content determination method. **Method:** With adhesive power, appearance, coating properties, et al as comprehensive indexes, molding technology of total saponins from *P. notoginseng* gel ointments was optimized by orthogonal test. The content of total saponins from *P. notoginseng* was determined by HPLC. **Result:** The best formulation was as following: NP-700 and CMC (4:1) 5 g, kaolin 3.5 g, aluminium glycinate 0.18 g, glycerin and propylene glycol (2:1) 25 g, PVP-K90 0.5 g, PVPP 0.5 g, PVA 0.25 g. The linear range of notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g₁} and ginsenoside R_{b₁} were 0.42-3.36 μg ($r=0.9996$), 4.82-38.56 μg ($r=0.9994$), 1.24-9.92 μg ($r=0.9997$). **Conclusion:** This optimized preparation technology of gel ointments was stable and practical. Established HPLC method was simple, reliable, and suitable for content determination and quality control of the preparation.

[Key words] total saponins from *Panax notoginseng*; gel ointments; orthogonal test; HPLC

现代药理学研究表明,三七主要有效成分三七总皂苷(PNS)不仅具有抗血栓、抗炎、镇痛等作用,还能提高机体自身对自由基的清除能力,通过促进

皮肤新陈代谢作用和血液循环发挥抗衰老、润滑肌肤作用,达到嫩肤增颜、延缓衰老的效果^[1]。国内外关于 PNS 的剂型研究大多为常规口服剂型和注

[收稿日期] 20121103(012)

[基金项目] 贵阳市科技计划项目(筑科合同 2011201 大-3 号);贵州省科技计划课题(黔科合 SY 字[2011]3087);贵州师范大学人文社会科学研究基地自主招生课题(KSTZB1101)

[第一作者] 吴静澜,副教授,硕士生导师,从事中药新剂型与新制剂开发研究, Tel:0851-5601305, E-mail:lanawu1073@sina.com

[通讯作者] *张永萍,教授,硕士生导师,从事中药新剂型与新制剂开发研究, Tel:0851-5652056, E-mail:gyzhyp@yahoo.com.cn

射剂,对于以抗衰老为目的的皮肤外用制剂报道很少。课题组运用新兴的制剂技术,研制三七总皂苷透皮凝胶膏剂,用于面部抗衰老,增加药物在皮肤中滞留量,提高药物在皮肤局部的生物利用度。本实验以初黏力、外观、涂布性等为指标,通过正交试验优选凝胶膏剂的成型工艺,并建立其含量测定方法,为三七总皂苷透皮凝胶膏剂的质量标准研究提供实验依据。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津,SPD-20 A型紫外检测器),Diamondsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),AE/240型电子天平(上海梅特勒仪器公司),DJ-1A型大功率恒温磁力搅拌器(常州澳华仪器有限公司),YHG-500-BS-II型远红外快速干燥箱(上海贺德实验设备有限公司)。

羧甲基纤维素钠(CMC-Na 800-1200,上海山浦化工有限公司),高岭土(天津市大茂化学试剂厂),聚乙烯醇(PVA,天津市科密欧化学试剂开发中心),甘羟铝(陕西西岳制药有限公司),部分聚合的聚丙烯酸钠(NP-700)、聚维酮(PVPP XL-10)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP-K90)均购自美国ISP公司,甘油(重庆川江化学试剂厂),三七皂苷R₁、人参皂苷R_{g1}及人参皂苷R_{b1}对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为110745-200517,110703-200424,110704-200420),三七总皂苷(PNS,昆明双星科技有限公司,批号090910,纯度88%),乙腈、甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 基质制备^[2-4] 将CMC-Na和PVP-K90置于烧杯中,加适量水搅拌溶胀1 h使其成胶体,作为A相;将三七总皂苷,NP-700,高岭土、甘羟铝及PVPP混合,搅拌,加入保湿剂(甘油-丙二醇2:1),继续搅拌混合均匀,作为B相;将PVA置于烧杯中,加水于80℃磁力搅拌20 min使其溶解呈均匀的胶体溶液,作为C相;将C相倒入A相中混合搅拌均匀,加至B相中,继续搅拌,直至混合均匀,包好静置过夜。第2 d涂布于无纺布上,制成每张12 g,以7 cm为直径的圆形凝胶膏剂,50℃烘箱干燥,盖好,即得。

2.2 考察指标

2.2.1 初黏力^[5] 参照《中国药典》2010年版附录XII E贴膏剂黏附力测定法第一法——斜坡滚球测定,即将一不锈钢球从置于倾斜板上的供试品黏性面滚过,根据供试品黏性面能够粘住的最大球号钢

球,评价其初黏力大小。本实验以能黏住12号球为50分,其余的与之相比计算得分。刚球球号及规格见表1。

表1 刚球球号及规格

No.	直径/mm	质量/g	No.	直径/mm	质量/g
2	2.000	0.03	12	12.005	7.10
3	2.996	0.111	13	13.122	9.03
4	4.452	0.253	14	14.03	11.3
5	5.006	0.516	15	15.086	14.1
6	5.977	0.877	16	15.971	16.7
7	7.014	1.42	17	16.997	20
8	7.947	2.06	18	17.975	23.8
9	9.021	3.01	19	19.085	28.5
10	10.014	4.12	20	19.975	32.7
11	11.050	5.45			

2.2.2 外观 膏体光洁、细腻、色泽一致、表面平整、无颗粒状胶团、无气泡等。满分10分。

2.2.3 涂布性 易涂布,膏体均匀不断条者为佳。满分10分。

2.2.4 剥离性 取凝胶膏剂样品,180°剥离后,根据残留在保护膜上的基质的多少进行评分。满分10分。

2.2.5 皮肤追随性 将成型凝胶膏剂贴于手腕背部,用力甩10下,根据膏体黏附于皮肤上的情况评分。满分10分。

2.2.6 残留性 将成型凝胶膏剂贴于手臂一段时间,揭起,根据残留在手腕上的基质多少进行评分。满分10分。

2.3 制备工艺优选^[6] 以NP-700,CMC-Na,PVPP,PVP-K90及PVA为黏着剂,高岭土为填充剂,甘羟铝为交联剂,甘油、丙二醇为保湿剂。在预试验基础上,对其用量范围进行考察,选用NP-700:CMC-Na(4:1),高岭土,甘羟铝,甘油-丙二醇(2:1)作为考察因素,采用正交试验优选各基质配比的水平。因素水平见表2,试验安排及结果见表3,方差分析见表4。

表2 三七总皂苷透皮凝胶膏剂的制备工艺正交试验因素水平

水平	ANP-700: CMC-Na/g	B 高岭土 /g	C 甘羟铝 /g	D 甘油-丙二醇 /g
1	2.5	1.5	0.06	25
2	5.0	2.5	0.12	30
3	7.5	3.5	0.18	35

表 3 三七总皂苷透皮凝胶膏剂的制备工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总分
1	1	1	1	1	97.05
2	1	2	2	2	94.73
3	1	3	3	3	98.45
4	2	1	2	1	97.40
5	2	2	3	2	96.55
6	2	3	1	1	97.20
7	3	1	3	2	73.23
8	3	2	1	3	56.22
9	3	3	2	1	74.02
K_1	96.743	89.227	83.480	89.207	
K_2	97.050	82.500	88.717	88.387	
K_3	67.823	89.890	89.410	84.023	
R	29.227	7.390	5.920	5.184	

表 4 三七总皂苷透皮凝胶膏剂的制备工艺正交试验方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	1 690.658	2	36.297	<0.05
B	100.300	2	2.153	>0.05
C	62.845	2	1.349	>0.05
D(误差)	46.578	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对成型工艺的影响顺序为 $A > B > C > D$; 以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明 A 因素对凝胶膏剂的成型影响显著,其他各因素均无显著影响。确定最佳配比为 $A_2B_3C_3D_1$, 即 NP-700: CMC-Na (4:1) 5 g (NP-700 4 g, CMC-Na 1 g), 高岭土 3.5 g, 甘羟铝 0.18 g, 甘油-丙二醇 (2:1) 25 g。

2.4 验证试验 按优选的最佳处方制备 3 批样品, 结果平均得分 97.93, RSD 0.06%, 表明优选的基质配方稳定可行。

2.5 三七总皂苷的含量测定

2.5.1 色谱条件^[7-8] Diamonsil C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 24% A; 5 ~ 25 min, 24% ~ 40% A; 25 ~ 40 min, 40% ~ 55% A; 40 ~ 45 min, 55% A)。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取三七皂苷 R_1 对照品 2.1 mg, 人参皂苷 R_{g_1} 对照品 24.1 mg 和人参皂苷 R_{b_1} 对照品 6.2 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL, 即得混合对照品溶液。

2.5.3 样品的制备 将 CMC-Na 1 g 和 PVP-K90

0.5 g 置于烧杯中, 加水 60 mL, 搅拌溶胀 1 h 使其成胶体, 作为 A 相; 将三七总皂苷 1.23 g, NP-700 4 g, 高岭土 3.5 g, 甘羟铝 0.18 g, PVPP 0.5 g 混合, 搅拌, 加入保湿剂 25 mL, 继续搅拌混合均匀, 作为 B 相; 将 PVA 0.25 g 置于烧杯中, 加 60 mL 水于 80 $^{\circ}$ C 磁力搅拌 20 min 使其溶解呈均匀的胶体溶液, 作为 C 相; 将 C 相倒入 A 相中混合搅拌均匀, 加至 B 相中, 继续搅拌, 直至混合均匀, 包好静置过夜。第 2 天涂布于无纺布上, 制成每张 12 g, 以 7 cm 为直径的圆形凝胶膏剂, 50 $^{\circ}$ C 烘箱干燥, 盖好, 即得。

2.5.4 供试品溶液的制备^[9] 取制得的凝胶膏剂 1/2 片 (约 2.28 g), 精密称定, 加甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 45 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补充减失的质量, 滤过, 滤液挥去部分甲醇, 最后用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 即得。

2.5.5 标准曲线的绘制 精密取上述三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_{b_1} 混合对照品溶液 2, 6, 10, 12, 14, 16 μ L, 进样测定, 以峰面积积分为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程依次为 $Y = 2.228 \times 10^5 X - 5.945 \times 10^3$ ($r = 0.9996$), $Y = 1.362 \times 10^5 X + 1.312 \times 10^5$ ($r = 0.9994$), $Y = 2.190 \times 10^5 X + 3.699 \times 10^4$ ($r = 0.9997$); 线性范围分别为 0.42 ~ 3.36, 4.82 ~ 38.56, 1.24 ~ 9.92 μ g。

2.5.6 精密度试验 取对照品溶液进样 10 μ L, 连续进样 5 次, 以 3 种成份峰面积积分值分别计算三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 的 RSD 分别为 2.09%, 1.51%, 1.33%。

2.5.7 稳定性试验 制备供试品溶液 1 份, 分别于配制后 0, 4, 8, 12, 24 h 时进样测定, 结果三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 峰面积积分值的 RSD 分别为 2.14%, 2.47%, 1.74%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.8 重复性试验 取同一批样品 5 份, 按 2.5.4 项下方法制备供试品溶液, 测得三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 的 RSD 分别为 1.99%, 2.55%, 2.92%。

2.5.9 加样回收率试验 制备已知 PNS 含量和加入一定量的三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_{b_1} 对照品的凝胶膏剂样品, 精密称量 6 份, 按 2.5.4 项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μ L, 测定峰面积, 计算回收率, 结果见表 5。

2.5.10 样品测定 分别取 3 批三七总皂苷凝胶膏剂各 3 份, 精密称定膏体质量, 按 2.5.4 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μ L 进样测定, 计算样品

中三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 的平均量分别为 1.68, 14.60, 3.30 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 依次为 1.87%, 1.64%, 0.98%。

表 5 三七总皂苷凝胶膏剂主要成分加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
三七皂苷 R_1	1.18	1.2	2.41	102.89	100.12	1.76
	1.22	1.23	2.46	100.74		
	1.22	1.23	2.43	98.63		
	1.26	1.28	2.51	97.93		
	1.14	1.14	2.28	99.86		
	1.15	1.16	2.32	100.65		
人参皂苷 R_{g_1}	9.72	9.72	19.46	100.19	98.52	0.97
	9.99	10	19.90	99.07		
	10.07	10.08	19.96	98.07		
	10.37	10.36	20.50	97.77		
	9.38	9.39	18.61	98.30		
	9.49	9.48	18.75	97.72		
人参皂苷 R_{b_1}	2.53	2.52	5.04	99.76	99.59	1.13
	2.6	2.61	5.16	98.05		
	2.62	2.62	5.20	98.47		
	2.7	2.71	5.41	100.01		
	2.44	2.43	4.90	101.06		
	2.47	2.48	4.95	100.18		

3 讨论

选取黏着剂 NP-700 和 CMC-Na 时, 采用单因素试验进行考察, 结果表明两者均对凝胶膏剂的成型影响较大。预试验发现两者间可能存在某种比例关系, 后调整比例进行考察, 分别用 2:1, 4:1, 6:1, 8:1 作为水平进行试验, 结果表明 NP-700: CMC-Na 4:1 时更有利于成型。试验用乙醇作为提取溶剂时,

PNS 中三七皂苷 R_1 不能完全提取出来, 后改用甲醇作为提取溶剂, 效果较乙醇好; 对提取时间进行考察时, 显示超声处理 45 min 时三七总皂苷基本被提取完全。

本实验采用 HPLC 对三七总皂苷凝胶膏剂的有效成分三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 含量进行测定, 并进行方法学研究, 研究表明本法简单、重复性较好, 但由于含量测定时采用梯度洗脱, 导致基线漂移, 经过调整流动相比比例与洗脱时间, 得到了较满意的洗脱程序。

[参考文献]

- [1] 王丽红, 吴铁, 吴志华, 等. 人参皂苷抗皮肤衰老作用实验研究[J]. 广东药学院学报, 2003, 19(1): 25.
- [2] 谷野. 普慧伤湿止痛巴布剂的制备工艺研究[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(12): 1241.
- [3] 朱敏, 张先发, 彭小珍. 跌打榜巴布剂的工艺研究[J]. 中国医药指南, 2008, 6(4): 99.
- [4] 王晓颖, 叶梦屏. 天麻钩藤凝胶贴基质配方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 23.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 附录 74.
- [6] 于晓佳, 贾伟. 正交试验法优选金铃子巴布剂基质的研究[J]. 首都医药, 2005, 15(16): 39.
- [7] 耿仕霞. HPLC 法测定复方三七注射液中三七总皂苷的含量[J]. 齐鲁药事, 2006, 2(4): 216.
- [8] 吴静澜, 陈红汝, 陈白霜, 等. 三七总皂苷白蛋白微球的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 17.
- [9] 吴圣琴, 李东芬, 尹蓉莉, 等. 复方祛疤凝胶中三七提取工艺的研究[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(3): 78.

[责任编辑 仝燕]