

## [制剂]

# 碳纳米管结合人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub> 纳米乳经皮给药系统的制备

曾臣红，王政，陈冲，魏莉\*

(上海中医药大学，上海 201203)

**摘要：**目的 制备碳纳米管结合人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub> 纳米乳经皮给药系统。方法 0.5% 碳纳米管加入已制备的纳米乳中，透射电镜观察其结合状态，考察该给药系统的皮肤刺激性和透皮机制。再建立小鼠皮肤 UVA 损伤模型，评价其抗氧化活性。结果 碳纳米管对纳米乳具有很强的吸附作用，并在表皮层形成药物储库，从而增加人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub> 的透皮渗透量。给药系统组小鼠皮肤组织中 SOD 活力显著高于模型组和纳米乳组 ( $P < 0.01$ )，MDA 含有量显著减少 ( $P < 0.01$ )。结论 碳纳米管结合人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub> 纳米乳经皮给药系统对皮肤刺激性小，并可使药物更好地透过皮肤以发挥抗氧化活性。

**关键词：**碳纳米管；人参皂苷 Rb<sub>1</sub>；人参皂苷 Rb<sub>2</sub>；纳米乳；经皮给药系统；抗氧化活性

**中图分类号：**R944      **文献标志码：**A      **文章编号：**1001-1528(2017)06-1161-04

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.010

## Preparation of transdermal drug delivery system of carbon nanotubes graft ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rb<sub>2</sub> nanoemulsion

ZENG Chen-hong, WANG Zheng, CHEN Chong, WEI Li\*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: AIM** To prepare the transdermal drug delivery system of carbon nanotubes graft ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rb<sub>2</sub> nanoemulsion. **METHODS** After 0.5% carbon nanotubes' dispersion into the prepared nanoemulsion, the combination state was observed under transmission electron microscope. The skin irritation and transdermal mechanism of this drug delivery system were investigated. Then the UVA-damaged mouse skin model was established to evaluate the antioxidant activity. **RESULTS** Carbon nanotubes had strong adsorption to nanoemulsion, together with the formation of drug storage cavern in epidermis, thus increased the transdermal osmotic quantities of ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rb<sub>2</sub>. The SOD activity in mouse skin tissue in the drug delivery system group was higher than that in the model group and the nanoemulsion group ( $P < 0.01$ ), and the MDA content was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** The transdermal drug delivery system of carbon nanotubes graft ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rb<sub>2</sub> nanoemulsion can make drugs play an antioxidant role because of its less irritation to skin and better skin permeability.

**KEY WORDS:** carbon nanotubes; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; ginsenoside Rb<sub>2</sub>; nanoemulsion; transdermal drug delivery system; antioxidant activity

自 1991 年日本科学家 Iijima 发现了碳纳米管 (CNTs) 以来，碳纳米管在性能和应用方面得到广泛研究，发现了其在信息、光电、能源等众多领域的潜在应用价值。在医药领域，随着药学、生物学、

材料学等其他学科的交叉发展，碳纳米管具有载药量大、生物相容性良好、稳定性高、跨膜特性优良、吸附性强大等特点，可通过形成稳定的共价键等方式来结合肽类、蛋白质、核酸和药物，并将其运送

收稿日期：2016-12-07

作者简介：曾臣红（1991—），女（侗族），硕士生，研究方向为中药新剂型及新技术。Tel: (021) 51322684, E-mail: zengchenhong@126.com

\*通信作者：魏莉（1970—），女，教授，硕士生导师，研究方向为中药新剂型及新技术。Tel: (021) 51322197, E-mail: 13818541918@163.com

至特定的组织或器官中<sup>[1-4]</sup>。目前，碳纳米管应用于经皮给药制剂技术方面的报道有限，但其可携带药物穿过角质层障碍，提高药物尤其是非水溶性药物的透皮渗透量，从而可使药物更好地发挥药效已经得到证实<sup>[5-7]</sup>。由于碳纳米管的导电特殊性，其衍生材料还可用于电敏感的透皮药物释放<sup>[8]</sup>；在缓控制剂方面，单壁碳纳米管载碘伏的绷带可以达到药物缓释的效果，并更好地促进伤口的愈合<sup>[9]</sup>。因此，碳纳米管的载药优势在经皮给药系统方面具有良好的应用价值，值得关注和深入研究。

人参Rb组皂苷具有良好的抗氧化、清除自由基作用，但由于其几乎不能透过皮肤，从而相关应用受到一定限制<sup>[10-12]</sup>。本实验在通过体外筛选发现人参皂苷Rb<sub>1</sub>及Rb<sub>2</sub>的1:1混合溶液具有良好抗氧化活性的基础上，制备两者纳米乳，并将碳纳米管与纳米乳相结合以制备新型经皮给药系统，考察其皮肤刺激性和透皮机制，并通过小鼠皮肤紫外损伤模型来评价其抗氧化活性。

## 1 材料、试药和动物

1.1 仪器 BS214S电子天平（德国Satorius公司）；Agilent 1100 Series公司（美国Agilent Technologies公司）；85-1磁力搅拌器（上海飞云生物科技有限公司）；Mastersizer-2000粒径仪（英国马尔文公司）；离心机（德国Eppendorf公司）；UVA灯管（荷兰Philips公司）；荧光显微镜（德国Leica公司）。

1.2 试药 油酸乙酯、吐温-80、司盘-80、异丙醇（国药集团化学试剂有限公司）；人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>2</sub>（自制，制备方法为取三七花、茎叶、根各适量，乙醇回流提取，浓缩，D101大孔吸附树脂纯化，D941离子树脂脱色，冷冻干燥，即得，含有量≥90%）；普通多壁碳纳米管（10~30 nm，苏州恒球石墨烯科技有限公司）；超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、总蛋白测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.3 动物 雄性SD大鼠，普通级，体质量（200±20）g，许可证号SCXK 2012-0002；昆明种小鼠，清洁级，体质量（20±3）g，均购自上海市克莱实验动物有限责任公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>含有量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相乙腈-水（34:66）；体积流量1.0 mL/min；检测波长

203 nm；柱温30℃；进样量20 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制成每1 mL含0.908 mg人参皂苷Rb<sub>1</sub>、0.487 mg人参皂苷Rb<sub>2</sub>的溶液，保存备用。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液，按2、5、10、50倍稀释，配制成不同质量浓度的溶液。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，得标准曲线分别为人参皂苷Rb<sub>1</sub> Y=4 819.1X-36.064（r=0.999 0），在0.018~0.908 mg/mL范围内呈良好的线性关系；人参皂苷Rb<sub>2</sub> Y=3 320.8X+16.417（r=0.999 0），在0.010~0.487 mg/mL范围内呈良好的线性关系。

2.2 透皮给药系统制备 取人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>对照品各125 mg，加5 mL蒸馏水溶解，即得25 mg/mL溶液，保存备用。根据文献[13]，通过伪三元相图筛选了油相、表面活性剂、助表面活性剂的组成配比，正交设计优选载人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>纳米乳配方，最终确定水相4%，由两者质量浓度均为25 mg/mL的混合溶液组成，48%油酸乙酯为油相，16%吐温-80及司盘-80（1:6）为表面活性剂，32%异丙醇为助表面活性剂（比例1:2），所得纳米乳为W/O型，电镜下呈圆形。采用高速离心法，取纳米乳1 mL，10 000 r/min离心25 min后，取上层清液100 μL，加甲醇定容至1 mL，按“2.1”项下方法测定游离药物含有量。另取100 μL，甲醇定容至5 mL量瓶中，充分混匀破乳，0.45 μm微孔滤膜过滤，测定药物总含有量，按公式包封率=（1-C<sub>游</sub>/C<sub>总</sub>）×100%测得纳米乳包封率为（82.82±0.08）%，马尔文粒径仪测得其平均粒径为（40.12±8.03）nm，外观呈淡黄色透明液状，流动性良好，性质稳定。

将碳纳米管加入纳米乳中（0.5%），磁力搅拌器搅拌以使其均匀分散，取1滴置于覆有Formvar支持膜的铜网上，自然晾干，2%磷钨酸染色剂正染30 min，滤纸吸走多余的染液，于透射电子显微镜下观察两者结合状态，见图1。由图可知，与碳纳米管结合后，纳米乳被吸附于其周围。

2.3 透皮机制考察 按“2.2”项下方法，在水相中加入荧光染料罗丹明B，使其质量浓度为1 mg/mL，制备透皮给药系统。将SD大鼠腹部剃毛，剪取腹部皮肤，镊子刮去皮下多余脂肪组织后生理盐水润洗至无脂肪粒，角质层朝上固定，涂抹荧光罗丹明B标示的纳米乳，4 h后取下皮肤，滤

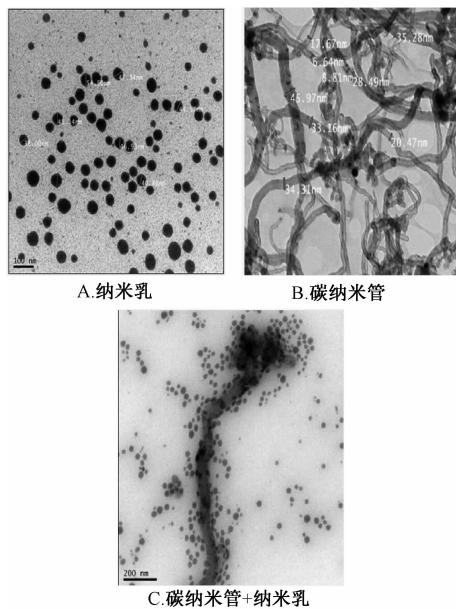
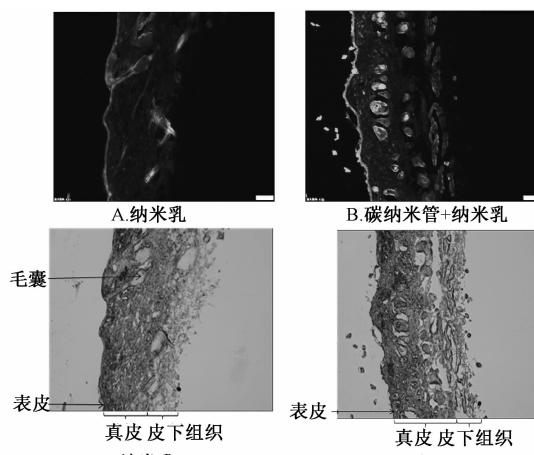


图1 样品透射电子显微镜图

Fig. 1 Transmission electron microscope images of samples

纸吸除多余液体，4% 多聚甲醛固定，生理盐水清洗至无药物残留，常规石蜡包埋，冷冻切片机纵切面切片，保持表皮、真皮层和皮肤附属器毛囊、汗腺等部位完整，荧光显微镜（ $40\times$ ）下以绿光激发（543 nm），罗丹明 B 标记的纳米乳呈红色荧光，观察拍照，见图 2。由图可知，大量纳米乳经过毛囊、汗腺等皮肤附属器管道进入皮肤，在皮肤表皮层下形成药物储库，荧光标记显示碳纳米管结合纳米乳的药物储库明显多于纳米乳，表明碳纳米管有增加透皮渗透、提高纳米乳皮肤滞留量的作用。



注：A、B 为荧光显微镜图，C、D 为纵切面图

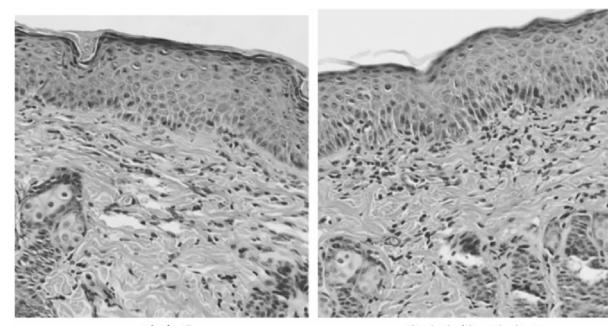
图2 碳纳米管对纳米乳透皮的影响

Fig. 2 Effect of carbon nanotubes on the transdermal permeation of nanoemulsion

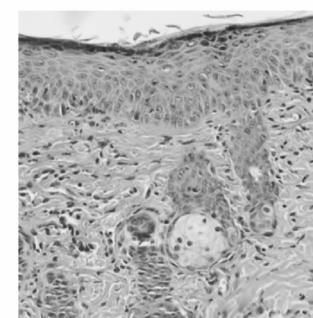
**2.4 皮肤刺激性试验** 实验前 24 h 将清洁级昆明种小鼠背部剃毛（不得损伤皮肤），分为纳米乳组、碳纳米管 + 纳米乳组、蒸馏水组，每组 3 只，每日分别给予相应药物各 0.5 mL，连续 7 d，末次给药后 24、48、72 h 观察水肿、红斑等刺激性情况，根据皮肤刺激反应评分标准评分<sup>[14]</sup>，结果见表 1，可知各组对小鼠皮肤均无刺激性。于评分后处死小鼠，取左侧 1 cm × 1 cm 皮肤组织，置于 10% 中性甲醛中固定，常规石蜡包埋，切片后作 HE 染色，光学显微镜下观察皮肤炎症发生情况，结果见图 3，可知碳纳米管结合纳米乳后，小鼠皮肤组织结构清晰，未见表皮角化、基底层增厚、炎性细胞浸润等刺激性情况。

表 1 皮肤刺激性试验结果 ( $n=3$ )  
Tab. 1 Results of skin irritation tests ( $n=3$ )

组别	刺激强度					
	1 h 红斑	24 h 水肿	48 h 红斑	72 h 水肿	红斑	水肿
纳米乳组	0	0	0	0	0	0
碳纳米管 + 纳米乳组	0	0	0	0	0	0
蒸馏水组	0	0	0	0	0	0



A. 纳米乳 B. 碳纳米管+纳米乳



C. 蒸馏水

图3 小鼠皮肤组织HE染色图 ( $\times 200$ )Fig. 3 HE staining images of mouse skin tissue ( $\times 200$ )

**2.5 抗氧化活性评价** 清洁级昆明种小鼠分为模型组、纳米乳组、碳纳米管 + 纳米乳组和对照组，每组 10 只，背部剃毛，除对照组外其他组均置于 UVA 灯下，按照文献 [15] 同法制备紫外氧化损伤模型，同时纳米乳组和碳纳米管 + 纳米乳组每日

分别给予相应药物各 0.5 mL, 对照组给予同体积蒸馏水, 连续 30 d, 干预完毕 24 h 后处死小鼠, 取背部皮肤组织, 加入生理盐水匀浆, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清测定皮肤组织 SOD 及 MDA 含有量, 结果见表 2。由表可知, 与模型组比较, 纳米乳组和碳纳米管 + 纳米乳组 SOD 含有量明显升高, MDA 含有量明显降低 ( $P < 0.01$ ), 表明纳米乳具有良好的抗氧化能力; 与纳米乳组比较, 碳纳米管 + 纳米乳组 SOD 含有量的升高与 MDA 含有量的降低更为明显 ( $P < 0.01$ ), 表明与碳纳米管结合后, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub> 能更好地体现出其抗氧化活性。

表 2 SOD、MDA 含有量测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )Tab. 2 Results of content determination of SOD and MDA ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )
纳米乳组	23.05 ± 0.93 ***#	257.16 ± 32.97 **##
碳纳米管 + 纳米乳组	27.90 ± 2.03 **	164.17 ± 15.15 **
模型组	10.53 ± 1.75 ##	375.26 ± 72.97 ##
对照组	21.30 ± 3.83 ***#	177.91 ± 13.02 **

注: 与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与碳纳米管 + 纳米乳组比较, \*\*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

碳纳米管是由碳原子层卷曲而成的中空管体, 其强吸附性及空腔结构可携带大量药物, 而且纳米级体积可使其具有穿透细胞的能力, 成为药物的最佳载体之一<sup>[16-17]</sup>, 其细胞穿透机制可能为直接穿过细胞膜和能量介导的内吞作用、以嵌入或扩散方式穿过细胞膜的脂质双分子层进入细胞等<sup>[18]</sup>。

在经皮给药系统中, 常存在药物的皮肤滞留量和透用量较小, 从而影响药物疗效的情况, 故选择增加药物透用量的合适载体已成为广大研究者关注的问题。在药物经皮吸收方面, 皮肤附属器是药物吸收初期的主要途径, 也是大分子和离子型药物的主要吸收途径。本实验中纳米乳的平均粒径在 30 ~ 50 nm 之间, 故在 4 h 内通过荧光检测发现, 该给药系统主要是通过皮肤附属器转运。皮肤刺激性试验结果显示, 该经皮给药系统皮肤刺激性小, 这一方面可能是由于在纳米乳的组成中, 大部分为皮肤刺激性均较小的吐温、司盘及油酸乙酯; 另一方面, 本实验旨在考察 7 d 内皮肤刺激性情况, 而对长期应用情况还有待于更深入的研究。

另外, 本实验通过建立小鼠皮肤 UVA 紫外损伤模型发现, 与纳米乳相比, 碳纳米管结合纳米乳可显著增强皮肤组织 SOD 活力 ( $P < 0.01$ ), 并明

显降低 MDA 含有量 ( $P < 0.01$ ), 从而发挥出更好的抗氧化活性, 这也表明了碳纳米管作为一种良好的药物载体, 在经皮给药系统方面具有广阔的应用前景, 值得进一步探索。

### 参考文献:

- [1] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon[J]. *Nature*, 1991, 354(6348): 56-58.
- [2] 但志刚, 蔡建明, 倪瑾. 碳纳米管在纳米医药中的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(3): 167-169.
- [3] 李杉杉, 何华, 焦庆才, 等. 碳纳米管在药物和基因转运领域的应用[J]. 化学进展, 2008, 20(11): 1798-1803.
- [4] 张金超, 杨康宁, 张海松, 等. 碳纳米材料在生物医学领域的应用现状及展望[J]. 化学进展, 2013, 25(2): 397-408.
- [5] Schwengber A, Prado H J, Zilli D A, et al. Carbon nanotubes buckypapers for potential transdermal drug delivery[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 57: 7-13.
- [6] Ismail Tuncer D, Burgess D J, Fotios P. Carbon nanotubes for transdermal drug delivery[J]. *J Microencapsul*, 2010, 27(8): 669-681.
- [7] Ilbasimis-Tamer S, Degim I T. A feasible way to use carbon nanotubes to deliver drug molecules: transdermal application [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(8): 991-999.
- [8] Im J S, Bai BCh, Lee Y S. The effect of carbon nanotubes on drug delivery in an electro-sensitive transdermal drug delivery system[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(6): 1414-1419.
- [9] Simmons T J, Lee S H, Park T J, et al. Antiseptic single wall carbon nanotube bandages [J]. *Carbon*, 2009, 47(6): 1561-1564.
- [10] 雷秀娟, 冯凯, 孙立伟, 等. 人参皂苷抗衰老机制的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(1): 44-47.
- [11] 沈干, 金钰, 陈德监, 等. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与红景天苷对抗皮肤光老化作用的研究[J]. 东南大学学报: 医学版, 2010, 29(3): 336-339.
- [12] 张红芹, 王建新, 郝海军, 等. 三七总皂苷巴布剂中透皮促进剂的优选[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1180-1183.
- [13] 张南生, 胡卢丰, 郭虹, 等. 伪三元相图研究人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 自微乳释药系统的处方组成[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 954-957.
- [14] 王庆利, 张凤琴, 赵德恒. FDA 发布经皮仿制药对皮肤刺激性和过敏性临床试验的设计及评分系统[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20(6): 459-461.
- [15] 李宗伟, 欧阳五庆, 张黎, 等. 玉米幼芽提取物对小鼠皮肤 UVA 照射损伤的保护作用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(2): 19-22.
- [16] 张晓科. 碳纳米管作为生物支架和胞内给药载体材料的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [17] 秦建辉. 叶酸受体介导碳纳米管靶向输运系统的制备及性质研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2010.
- [18] 刘珍宝. 功能化多壁碳纳米管与 LO2 细胞的相互作用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.