

HPLC 法测定大鼠皮肤中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rb₁

常 翠¹, 陈思思², 王 娟³, 魏 燕³, 陈淑敏³, 杨宏图¹, 郑杭生^{3*}

[1. 深圳市人民医院 (暨南大学第二临床医学院) 药学部, 广东 深圳 518020; 2. 湖州市第三人民医院药剂科, 浙江 湖州 313000; 3. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053]

摘要: **目的** 建立 HPLC 法测定大鼠皮肤中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁ 含量。 **方法** 分析采用 CNW C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以水-乙腈为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm。 **结果** 三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rb₁ 分别在 0.218 ~ 14.6 μg ($r=0.999\ 0$) 和 0.929 ~ 61.9 μg ($r=0.999\ 2$) 范围内呈良好的线性关系, 提取回收率 89.8% ~ 103.0%。大鼠全皮及角质层下皮肤给药 12 h 后, 三七皂苷 R₁ 在三七总皂苷脂质体混悬液中的滞留量高于在传递体混悬液中, 而人参皂苷 Rb₁ 恰好相反。 **结论** 该方法简便准确, 重复性好, 专属性强, 可用于大鼠皮肤中三七总皂苷主要成分的测定。

关键词: 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rb₁; 大鼠; 皮肤; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)09-1885-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.026

Determination of notoginsenoside R₁ and ginsenoside Rb₁ in rat skin by HPLC

CHANG Cui¹, CHEN Si-si², WANG Juan³, WEI Yan³, CHEN Shu-min³, YANG Hong-tu¹, ZHENG Hang-sheng^{3*}

[1. Department of Pharmacy, Shenzhen People's Hospital (The Second Medical College of Jinan University), Shenzhen 518020, China; 2. Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Huzhou City, Huzhou 313000, China; 3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China]

KEY WORDS: notoginsenoside R₁; ginsenoside Rb₁; rats; skin; HPLC

三七总皂苷是五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的主根或根茎经加工制成的总皂苷^[1], 主要包括人参皂苷 Rg₁、Rb₁ (Rb₁)、Re、Rd、Rb₂、Rb₃、Rc, 以及少量三七皂苷 R₁ (R₁)、R₂、R₃、R₆^[2], 具有活血化瘀、消肿止痛、补虚强壮等功效, 现代药理研究表明, 其对心血管疾病防治具有良好的效果, 主要是由于它可舒张血管以增加血流量、抑制血小板聚集, 并在动脉粥样硬化过程中抑制炎症反应的发生^[3], 还可减少血清中乳酸脱氢酶和肌酸激酶的含有量, 使超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶水平恢复正常, 从而对心血管系统起到保护作用^[4]。同时, 它在促进损伤修复方面起到重要作

用, 可促进骨髓基质细胞的增殖和成骨分化, 从而帮助受伤的骨头修复, 临床上主要应用于软组织损伤、骨折愈合、骨关节病及脊髓损伤治疗等^[5]。另外, 它还具有丰富的抗癌活性, 能促进癌细胞凋亡, 阻滞细胞周期^[4]。

目前, 三七总皂苷市售与在研剂型主要有片剂、胶囊、颗粒、注射液、脂质体、微乳等, 但是普通口服制剂往往由于胃肠道酶、菌群、pH 等因素影响, 生物利用度较低, 而且药物对消化道黏膜具有刺激性; 注射剂存在患者顺应性差、安全性低的问题, 并且主要适用于全身给药, 对身体局部损伤的治疗效果不理想^[6-7], 故有必要进行新剂型与新给药途径的研究以弥补上述缺点。经皮给药具有

收稿日期: 2016-11-29
基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20123322120002); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2015111458); GK2016 年新苗人才计划项目 (2016R410023)
作者简介: 常 翠, 女, 硕士, 主任药师, 从事医院药学、临床药理研究。Tel: (0755) 22943176, E-mail: changcui@tom.com。
* 通信作者: 郑杭生 (1973—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药新剂型及其体内过程。Tel: 18268066638, E-mail: HS-Zheng@163.com

可避免肝脏与胃肠道首过效应、血药浓度恒定、给药次数少、可及时中断给药等优点,而皮肤外用制剂应用后,皮肤中药物滞留量的监测对阐明制剂的生物效应特点(起效时间、药效强弱、作用持续时间、毒副作用大小等)以及药物经皮渗透途径与机制有着重要意义^[8-9],故本实验首次建立 HPLC 法测定大鼠皮肤中三七总皂苷主要成分三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rb_1 的含有量。

1 仪器与材料

1.1 仪器 LC-2130 高效液相色谱仪、LC-2030 紫外检测器(上海天美科学仪器有限公司);BS124S 电子天平(德国 Sartorius 公司);低速离心机(上海安亭科学仪器公司)。

1.2 试药与材料 三七总皂苷(注射级,云南植物药业有限公司,批号 HB20081103);人参皂苷 Rb_1 (含有量 92.6%,批号 110704-200921)、三七皂苷 R_1 (含有量 95.7%,批号 110745-201015)对照品(中国食品药品检定研究院);高纯胆固醇(注射级,上海艾伟特医药科技有限公司,批号 B01221);维生素 E(浙江新和成股份有限公司,批号 V20121103);大豆卵磷脂(注射级,含有量 $\geq 70\%$,上海太伟药业有限公司,批号 091208);柠檬烯(含有量 $\geq 98.3\%$,批号 140825)、柠檬醛(含有量 $\geq 97.5\%$,批号 141006)(吉安市聚鹏天然香料油有限公司)。乙腈为色谱纯(美国 Honeywell 公司);甲醇、丙酮为分析纯(天津永大化学试剂有限公司);水为双蒸水;PNS 传递体与脂质体(自制);其他试剂均为分析纯。透明胶带(Polar bear,上海拥立胶粘有限公司)。

1.3 动物 清洁级 SD 大鼠,体质量(180 ± 20)g,雄性,由浙江中医药大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制 精密称取对照品三七皂苷 R_1 1.82 mg、人参皂苷 Rb_1 7.74 mg,置于 25 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,摇匀,即得(三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rb_1 质量浓度分别为 0.072 8、0.310 mg/mL),4℃下保存。

2.2 色谱条件 CNW C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~12 min, 81% A、19% B;13~60 min, 81%~64% A、19%~36% B;61~62 min, 64%~0A、36%~100% B);体积流量 1.0 mL/min;柱温

30℃;检测波长 203 nm;进样量 20 μ L。

2.3 离体鼠皮制备 取正常进食可自由饮水的大鼠,过量乙醚麻醉致死,固定于鼠板上,用剃毛器与弯头剪去除胸骨至腹部的毛发,剪下腹部皮肤,小心去除皮下组织,确保皮肤角质层的完整性,生理盐水漂洗干净,展平并吸去多余水分,锡箔纸包裹,置于-70℃冰箱中保存,备用。

2.4 空白皮肤样品处理 取空白皮肤样品,室温下自然解冻,剪取 1 cm² 置于研磨器中,加入 200 μ L 生理盐水,充分研磨,得皮肤匀浆,加入 3 mL 提取溶剂(丙酮:甲醇=3:1)涡旋 2 min,2 000 r/min 离心 15 min 后,将上清液转移至具塞塑料离心管中,重复 2 次,合并提取液,60℃下氮气流吹干,200 μ L 甲醇涡旋 1 min 溶解残留物,离心后吸取 20 μ L 上清液,进样分析。

2.5 含药皮肤样品处理与分析 将待测皮肤样品分为 2 等分(经过有效渗透部分圆的圆心直线切割),取其中 1 份用胶带黏贴角质层侧皮肤,重复 20 次,即得去角质层鼠皮,测定角质层下皮肤的药物滞留量;另 1 份不作处理,用于测定全皮的药物滞留量,两者相减,即得角质层中的药物滞留量。取两者适量,剪取合适大小,如不足 1 cm² 则以空白皮肤补足,按“2.4”项下方法进行提取与分析。

2.6 含有量测定

2.6.1 标准曲线绘制 取空白皮肤 1 cm²,置于研磨器中,加入“2.1”项下对照品溶液 3、5、10、25、50、75、100、200 μ L(其中三七皂苷 R_1 含有量分别为 0.218、0.364、0.728、1.82、3.64、5.46、7.28、14.6 μ g,人参皂苷 Rb_1 含有量分别为 0.929、1.55、3.10、7.74、15.5、23.2、31.0、61.9 μ g),按“2.4”项下方法操作。以峰面积(Y)对含有量(X)进行线性回归,得三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rb_1 回归方程分别为 $Y = 20\,961X - 7\,671.8$ ($r = 0.999\,0$)、 $Y = 28\,338X - 43\,159$ ($r = 0.999\,2$),分别在 0.218~14.6 μ g 与 0.929~61.9 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.6.2 专属性考察 取给药 12 h 后的皮肤、空白皮肤加对照品溶液、空白皮肤,按“2.4”项下方法处理后进行分析,结果见图 1。由图可知,皮肤中的内源性成分对成分含有量测定无干扰,该方法专属性良好。

2.6.3 精密度与准确度试验 取空白皮肤 1 cm²,加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液(三

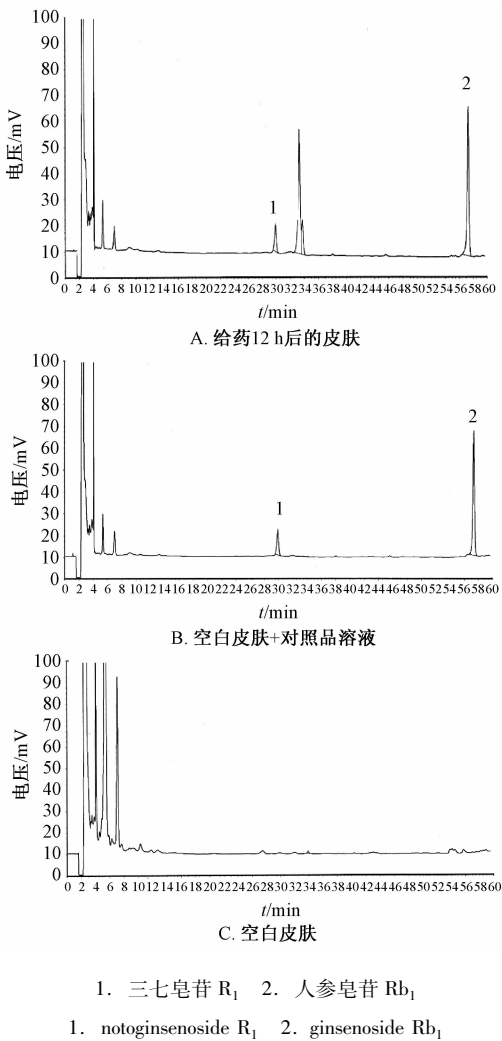


图1 样品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of samples

七皂苷 R₁ 含有量分别为 0.364、3.64、14.6 μg，人参皂苷 Rb₁ 含有量 1.55、15.5、61.9 μg，下同)，制成质控样品，按“2.4”项下方法操作，1 d内连续测定 5 次，即为日内精密度；连续 5 d 内各测 1 次，即为日间精密度，再测定准确度，结果见表 1，表明该方法精密度与准确度良好。

表1 样品精密度与准确度试验结果 (n=5)

Tab. 1 Results of precision and accuracy tests for samples (n=5)

成分	加入量/ μg	测得量/ μg	相对回收 率/%	RSD/%	
				日内精密度	日间精密度
三七皂苷 R ₁	0.364	0.359	98.6	10.4	12.0
	3.64	3.62	99.5	7.3	8.5
	14.6	14.7	100.8	6.5	7.2
人参皂苷 Rb ₁	1.55	1.52	98.3	7.0	8.7
	15.5	15.7	101.1	4.4	6.9
	61.9	61.9	100.0	1.5	3.2

2.6.4 提取回收率试验 向 1 cm² 空白大鼠皮肤

中加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液，制成质控样品，按“2.4”项下方法操作，平行 3 次。另取空白皮肤 1 cm²，按“2.4”项下方法操作，在有机层中加入相应对照品溶液，60 ℃ 水浴下氮气吹干，200 μL 甲醇涡旋 1 min 溶解残留物，离心，吸取 20 μL 上清液分析，平行 3 次。结果，提取回收率在 89.8% ~ 103.0% 之间，符合生物样本含有量测定要求。

2.6.5 稳定性试验 向 1 cm² 空白大鼠皮肤中加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液，制成质控样品，按“2.4”项下方法操作，室温下放置 24 h 后，离心，吸取 20 μL 上清液分析，考察样品在室温下的稳定性，平行 3 次。同法配制质控样品，-70 ℃ 冷冻 (72 h) 3 次后，在室温下解冻，考察样品在冷冻和解冻过程中的稳定性，平行 3 次。结果见表 2，可知样品稳定性良好。

表2 样品稳定性试验结果 (% , n=3)

Tab. 2 Results of stability tests for samples (% , n=3)

成分	24 h 内稳定性			冷冻-解冻稳定性		
	低	中	高	低	中	高
三七皂苷 R ₁	97.1	99.8	99.6	99.5	99.6	100.1
人参皂苷 Rb ₁	99.0	100.0	99.7	98.2	100.0	99.9

2.7 滞留量测定 取健康雄性 SD 大鼠，乙醚麻醉后固定，剔除腹部毛发，然后将一定量三七总皂苷传递体或脂质体混悬液（相当于 6 mg 三七总皂苷）均匀涂抹于 2 cm² 皮肤区域内，12 h 后过量乙醚麻醉致死大鼠，按“2.3”项下方法取下给药部位皮肤，生理盐水冲洗皮肤以除去表面吸附的药物，吸水纸吸干皮肤表面后，展平于玻璃板上，按“2.4”、“2.5”项下方法进行处理与分析，结果见表 3。由表可知，不同制剂应用 12 h 后，全皮及角质层下皮肤中三七皂苷 R₁ 滞留量均为脂质体混悬液 > 传递体混悬液，而人参皂苷 Rb₁ 恰好相反。

表3 各成分滞留量测定结果 (n=5)

Tab. 3 Results of retention amount determination of various constituents (n=5)

剂型	成分	全皮/ (μg·cm ⁻²)	角质层下皮肤/ (μg·cm ⁻²)
传递体	三七皂苷 R ₁	4.27	4.12
	人参皂苷 Rb ₁	12.45	11.73
脂质体	三七皂苷 R ₁	7.68	5.36
	人参皂苷 Rb ₁	11.56	7.65

3 讨论与结论

本实验在皮肤样品的前处理过程中采用了物理方法（研磨匀浆），这与具有强烈腐蚀性 > 氧化性

的化学方法（高氯酸）相比，有利于药物的稳定^[10]。再对提取溶剂进行筛选，发现以丙酮-甲醇（3：1）为提取溶剂时，提取回收率最高，而且提取次数以 2 次为宜。

实验结果显示，三七总皂苷传递体中相对较少的三七皂苷 R₁ 滞留于皮肤，而其脂质体中该成分滞留较多（特别是角质层中），基本符合两者的皮肤转运机制。传递体是通过诱导皮肤屏障层中水性通道的扩张，加上自身的形变能力，同时借助皮肤水化梯度形成的渗透力，使得囊泡顺利穿透皮肤屏障；脂质体仅是通过直接与皮肤接触而产生相互作用（膜间转运）来促进药物渗透，并且在角质层中形成药物储库，故对促进药物渗透的作用有限。与此相反，脂质体中人参皂苷 Rb₁ 的皮肤滞留量低于传递体，可能是由于其与磷脂双分子层的结合力较强^[11]（这是一种很特殊的情况），阻碍了与囊泡的解离过程，从而导致膜间转运量的减少，而传递体由于是整体穿透，所以不存在上述问题。

综上所述，本实验成功建立了 HPLC 法测定大鼠皮肤中三七总皂苷主要成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁ 的含有量，并对其传递体与脂质体的透皮机制进行了初步探讨，可为相关制剂皮肤渗透、滞留及其机制的研究奠定基础。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部

[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：393-394.

[2] 韩淑娴，游 云. 三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应[J]. 中国中药杂志，2016，41(5)：818-822.

[3] Liu N, Shan D, Li Y, *et al.* Panax notoginseng saponins attenuate phenotype switching of vascular smooth muscle cells induced by notch3 silencing[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015：1-6.

[4] Yu L, Xie J, Xin N, *et al.* Panax notoginseng saponins promote wound repair of anterior cruciate ligament through phosphorylation of PI3K, AKT and ERK[J]. *Int J Exp Pathol*, 2014, 8(1)：441-449.

[5] 付开礼. 三七总皂苷在骨科的药理与临床研究进展[J]. 云南中医中药杂志，2006，27(2)：49-51.

[6] 邹 亮，冷 静，刘 洋，等. 三七总皂苷新型制剂研究进展[J]. 四川中医，2010，28(3)：23-25.

[7] 常 翠，陈思思，杨宏图，等. 三七总皂苷传递体的处方优化研究[J]. 中药材，2015，38(12)：2602-2605.

[8] 熊 欣，项佳音，尹晓琴，等. 灯盏花素脂质载体凝胶的小鼠在体透皮及皮肤局部药代动力学考察[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(5)：49-52.

[9] 高培平，苑振亭，李志强. 三维荧光光谱测定蛇床子素在离体皮肤中不同深度的分布[J]. 中国药学杂志，2009，44(18)：1420-1423.

[10] 朱谷晶，郑杭生，王肖龙，等. 大鼠皮肤中青藤碱的 HPLC 测定[J]. 中成药，2012，34(11)：2147-2151.

[11] 方 蓉，郑杭生，李范珠，等. HPLC 法测定三七总皂苷传递体中 2 个成分的含量和包封率[J]. 药物分析杂志，2014，34(2)：264-268.