

· 药物代谢 ·

三七提取液中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和 人参皂苷 R_{b_1} 的透皮规律研究

何百寅¹, 谢友良^{1,2*}, 刘常青¹, 叶雪兰¹, 吴安国¹, 陈建南^{1,2}

(1. 广州中医药大学新药研究开发中心, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的:研究三七提取液中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 等成分对完整豚鼠腹皮的透过性。方法:采用 Franz 扩散池进行体外透皮实验,以完整豚鼠腹皮为渗透屏障,HPLC 法测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的透过量。结果:未加透皮促进剂时,三七提取液中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 等均不能透过完整豚鼠皮。在氮酮的促进下,三七提取液中的上述成分均可透过完整豚鼠腹皮,其透皮能力:人参皂苷 R_{g_1} > 三七皂苷 R_1 > 人参皂苷 R_{b_1} ;透皮促进剂氮酮加入量为 2% 时,上述成分的透皮作用较好。结论:三七提取液中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 在 2% 氮酮促进下渗透效果较佳。

[关键词] 三七提取液;三七皂苷 R_1 ;人参皂苷 R_{g_1} ;人参皂苷 R_{b_1} ;氮酮;透皮吸收

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)21-0130-05

Study on Percutaneous Absorption of *Panax notoginseng* R_1 , Ginsenoside R_{g_1} and Ginsenoside R_{b_1} through Guinea Pig's Complete Skin *in vitro*

HE Bai-yin¹, XIE You-liang^{1,2,*}, LIU Chang-qing¹, YE Xue-lan¹, WU An-guo¹, CHEN Jian-nan^{1,2}

(1. Dept. of New drug R&D in Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University
of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To studying transdermal absorption patterns of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} from extraction of *Panax notoginseng* *in vitro*. **Method:** Using Franz diffusion cell for *in vitro* transdermal experiments, complete guinea pigs' abdomen skin was used as transdermal barrier; HPLC was applied to determent the amount of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} which penetrated the test skin. **Result:** When no penetration enhancers like azone exsited, notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} couldnot pass through test skin at all. When 2% azone was add in the *Panax notoginseng* extraction, notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} could penetrate the test skin effectively. The sequence of its penetration capabilities was as follows: ginsenoside R_{g_1} > notoginsenoside R_1 > ginsenoside R_{b_1} . **Conclusion:** With the assisting of 2% Azone, notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} can effectively penetrate

[收稿日期] 20110419(008)

[基金项目] 东莞市科技计划重点项目(201010810203)

[第一作者] 何百寅,硕士研究生,从事中药新药开发和吡啉的合成与应用, Tel:020-39358183, E-mail:hbyhby2007.10@163.com

[通讯作者] * 谢友良,博士,助理研究员,从事中药新药开发研究, Tel:13824405992, Fax:020-39358390, Email:xieyl@gzhtcm.edu.cn

complete guinea pigs' skin.

[**Key words**] extraction of *Panax notoginseng* absorption; notoginsenoside R₁; ginsenoside R_{g₁}; ginsenoside R_{b₁}; azone; transdermal absorption

三七是五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根^[1],具有止血,活血化瘀等功效,常用于跌打损伤。现代研究表明三七中的皂苷类成分特别是人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 R_{b₁} 能增强血清 SOD 活性,减缓衰老的功效^[2],并具有显著抗纤维化作用,外用可保养皮肤^[3]。

目前已有很多关于同时测定三七中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 R_{b₁} 这几种有效成分含量的文献,但关于这 3 种成分同时经皮渗透吸收的研究却较少见。本研究采用 Franz 扩散池,以未去角质层的豚鼠腹皮为透皮屏障,同时研究三七总皂苷中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 R_{b₁} 的体外透皮吸收特性,以及不同浓度氮酮对上述 3 种皂苷透皮吸收促进规律,为人参-三七经络贴的研制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级雄性豚鼠 2 只,体质量 (200 ± 10) g,广州中医药大学实验动物中心提供(质量合格证编号 0064992)。

1.2 仪器 TK-12B 型透皮扩散试验仪及配套 Franz 扩展池、搅拌子(上海谐凯科技贸易有限公司),CP225D 电子分析天平(Sartorius),KQ5200DA 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),300 目标标准检验筛(上虞市道墟通用纱筛厂),N1001 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),QL-901 型涡旋器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),高速中药粉碎机(瑞安市环球药械厂),贝利 WZJ6-TB I (BFM6)型超微粉碎机(济南贝利粉体工程有限公司),岛津 20-AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司,配有 DGU 20-As 型脱气机,LC-20AT 液相仪,SIL-20A 自动进样器,CTO-20A 柱温箱,SPD-20A 紫外-可见检测器)。

1.3 试药与试剂 人参皂苷 R_{g₁} 对照品批号 110703-200726;人参皂苷 R_{b₁} 对照品批号 110704-200420;三七皂苷 R₁ 对照品,批号 110745-200617 均购自中国药品生物制品检定所。三七药材(广州市药材公司“广药牌”三七饮片,批号 20091201),经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南研究员鉴定

为三七;氯化钠注射液(广东利泰药业有限公司,批号 10030901);硫化钠(分析纯,天津大茂化学试剂厂,批号 20080903);乙腈和甲醇(色谱纯,Merck);液相用水(怡宝牌纯净水,批号 20100505,临用前过 0.45 μm 微孔滤膜);乙醇(分析纯,天津大茂化学试剂厂,批号 20100429);氮酮(98%,天津大茂化学试剂厂,批号 200907)。

供试三七提取液:自制,经 HPLC 测定其三七皂苷 R₁,人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 R_{b₁} 含量分别为 12.66,5.28,51.84 g·L⁻¹。

2 方法

2.1 样品测定

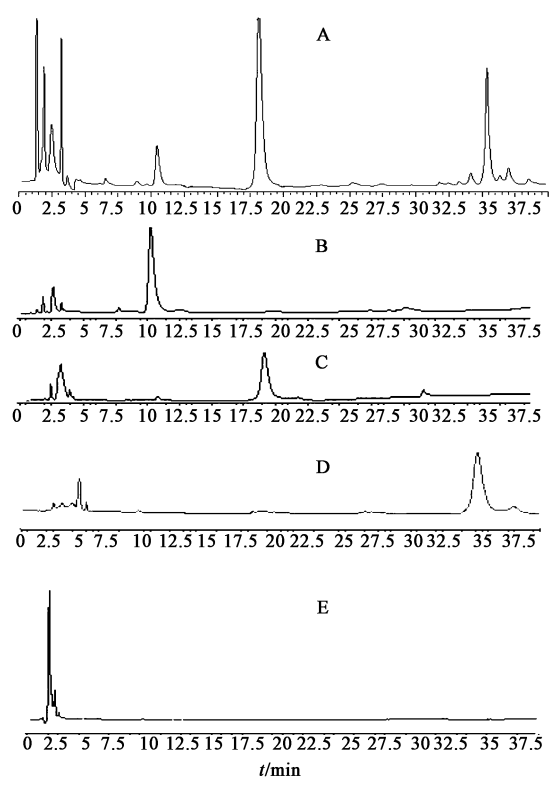
2.1.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:乙腈和水梯度洗脱(见表 1);流速:1 mL·min⁻¹,检测波长:203nm;柱温 40℃;HPLC 色谱图见图 1,阴性无干扰。

表 1 梯度洗脱条件		
t/min	乙腈/%	水/%
0 ~ 12	22	78
12 ~ 40	22→40	78→60

2.1.2 对照品溶液的制备和标准曲线及线性范围考察 精密称取人参皂苷 R_{g₁} 对照品 10.25 mg,加甲醇溶解定容至 5 mL 的量瓶中,制成质量浓度为 2.05 g·L⁻¹ 的储备液。再以适量甲醇稀释制成 0.010 3, 0.102 5, 0.307 5, 0.512 5, 0.717 5, 0.922 5,1.025 g·L⁻¹ 的对照品溶液。精密吸取人参皂苷 R_{g₁} 对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以峰面积 Y 对进样量 X(μg)线性回归,即得标准曲线。

以相同方法配制 0.002 1, 0.003 8, 0.011 3, 0.022 6,0.037 7,0.060 3 g·L⁻¹ 的三七皂苷 R₁ 对照品溶液,精密吸取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积并求出标准曲线

以相同方法配制浓度为 0.037, 0.075 1, 0.018 8,0.037 5,0.056 3,0.075 0 g·L⁻¹ 的人参皂苷 R_{b₁} 对照品溶液,精密吸取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积并求出标准曲线。



A. 三七提取液; B. 三七皂苷 R₁ 对照品;
C. 人参皂苷 R_{g1} 对照品; D. 人参皂苷 R_{b1} 对照品; E. 空白接收液

图 1 三七提取液的 HPLC

三七皂苷 R₁, 人参皂苷 R_{g1}, 人参皂苷 R_{b1} 的标准曲线和线性范围见表 2。

表 2 三七皂苷 R ₁ , 人参皂苷 R _{g1} 和人参皂苷 R _{b1} 线性范围考察			
对照品	回归方程	r	线性范围/μg
人参皂苷 R _{g1}	$Y = 17\,034X + 3\,151$	0.999 0	0.206 ~ 24.120
人参皂苷 R _{b1}	$Y = 199\,879X - 19\,765$	0.999 0	0.042 ~ 1.021
三七皂苷 R ₁	$Y = 240\,113X - 5\,874$	0.999 0	0.075 ~ 1.500

2.2 透皮实验

2.2.1 供试皮肤的制备 取豚鼠,用自制的脱毛膏脱去腹部毛,脱毛过程中应保证不刮伤皮肤。将豚鼠处死后剥下完整的腹部皮肤,除去皮下脂肪,平摊于洁净玻璃板上,置于冰箱中 -20 ℃ 保存备用。

2.2.2 释放液的制备 取三七药材,粉碎成超微粉(过 300 目),取超微粉 30 g,加 80% 乙醇浸泡 12 h,回流提取 2 次,(300 mL,240 mL) 每次 1 h,抽滤,合并 2 次滤液,减压浓缩定容至 25 mL,冷藏备用。

移取三七提取液 2 mL,分别加入氮酮 0.00, 0.04, 0.08, 0.16 mL,涡旋均匀,配成释放液。

2.2.3 离体透皮试验 离体透皮试验先做豚鼠皮

阴性干扰试验,再分别做豚鼠皮离体透皮试验。实验操作如下:

将转子置于接收池中,供试豚鼠皮固定于扩散装置的中间,使角质层面向释放池,用配套钢夹夹稳;在释放池中加入 2.5 mL 三七总皂苷提取液或 5 mL 注射用生理盐水(阴性干扰试验),池顶覆以保鲜膜。在接收池中加入 18 mL 注射用生理盐水作为接受液,使皮肤与接受液充分接触。池内水温 (37 ± 0.5) ℃,恒温磁力搅拌。加样后平衡 30 min 开始计时,于 1,2,4,6,8,10,12,24 h 分别取样 2 mL,同时补充等量的空白接受液(生理盐水)。所取样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品,取供试品注入 HPLC 仪中(进样量 20 μL),测定其三七皂苷 R₁, 人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的含量。

2.2.4 累积透过药量的测算方法 以 HPLC 法三七皂苷 R₁, 人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的含量,按公式: $Q = C_nV + \sum C_iV_i$ 分别计算每个化合物的累积透过量,计算累积透过率^[4]。

$$\text{累积透过率} = \frac{\text{累积透过量 } Q}{\text{释放液中化合物的总量}} \times 100\%$$

(注: C_n 和 C_i 分别为第 n 次和第 i 次取样时接受液中待测药物的浓度, $\sum C_iV_i$ 为取样时带走的药物的总合)

3 结果与数据分析

3.1 透皮试验 试验数据表明不含氮酮的三七提取液,接受液中几乎检测不到三七皂苷 R₁, 人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1}。含 2%, 4%, 8% 氮酮的三七提取液经过 24 h 连续透皮释放,三七皂苷 R₁, 人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 均能透过完整豚鼠皮肤。结果见表 3,图 2。

3.2 三七提取液中三七皂苷 R₁ 的透皮规律 含 2%, 4%, 8% 氮酮的释放液中的三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 在 1 ~ 12 h 的累积透皮吸收量与透皮时间呈线性关系,符合零级动力学规律。结果见表 4。

4 讨论

4.1 3 种皂苷透皮能力的差异 由试验数据可知在氮酮的促进下,三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 都透过了完整豚鼠腹皮。

在三七提取液配成的释放液中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的构成比为: 8.45%, 56.94%, 34.61%。而这 3 种皂苷在 2%, 4%, 8% 氮酮组 24 h 总皂苷累积透皮吸收量中的构成比与提

表 3 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 Rb₁ 的 24 h 累积透皮吸收

组别		累积透过量/mg								24 h 累积 透过率/%
		1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	
三七皂苷 R ₁	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	0.077 9	0.155 0	0.274 4	0.395 7	0.528 3	0.616 4	0.783 0	1.041 9	4.115 4
	3	0.014 9	0.046 9	0.120 6	0.197 2	0.323 9	0.374 2	0.473 1	0.503 9	1.990 4
	4	0.043 3	0.102 3	0.173 1	0.373 4	0.491 4	0.595 0	0.631 4	1.144 0	4.518 4
人参皂苷 R _{g₁}	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	0.657 7	1.489 8	2.940 7	4.702 2	6.988 7	8.103 7	10.059 4	18.767 6	11.003 6
	3	0.287 8	0.761 3	1.350 3	2.387 0	3.203 9	3.768 4	4.394 6	6.363 2	3.730 8
	4	0.500 3	1.459 2	2.979 5	5.139 2	7.220 9	9.170 9	10.328 3	17.593 1	10.315 0
人参皂苷 Rb ₁	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	0.111 6	0.255 5	0.357 9	0.498 9	0.724 3	0.866 9	1.022 6	1.342 3	1.294 7
	3	0.072 0	0.101 4	0.106 1	0.157 2	0.187 0	0.251 4	0.382 4	0.410 6	0.396 0
	4	0.030 6	0.216 5	0.368 8	0.514 1	0.689 3	0.632 1	0.634 5	1.008	0.971 9

注:1~4 组分别为不含氮酮组和含 2%、4%、8% 氮酮组。

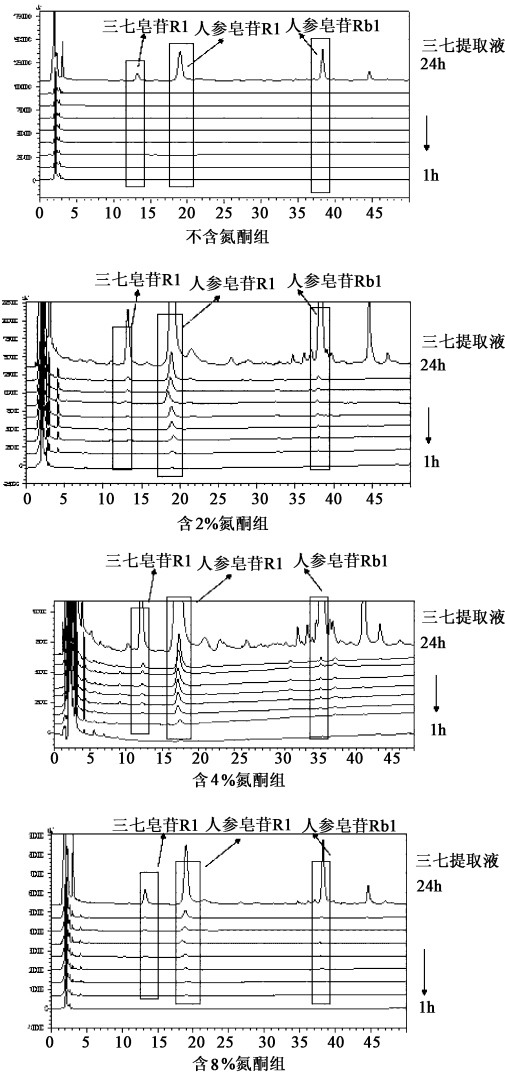


图 2 各组接受液的 HPLC 图

表 4 不同浓度氮酮的释放液中的 3 种皂苷在 1~12 h 的透皮规律

皂苷	组别	回归方程	r
三七皂苷 R ₁	1	$Y = 0.062\ 0X + 0.023\ 2$	0.998 5
	2	$Y = 0.042\ 2X - 0.037\ 8$	0.996 5
	3	$Y = 0.057\ 9X - 0.011\ 1$	0.987 5
人参皂苷 R _{g₁}	1	$Y = 0.858\ 9X - 0.284\ 5$	0.998 1
	2	$Y = 0.380\ 3X - 0.028\ 5$	0.996 6
	3	$Y = 0.927\ 5X - 0.440\ 3$	0.997 7
人参皂苷 Rb ₁	1	$Y = 0.081\ 4X + 0.048\ 3$	0.996 5
	2	$Y = 0.024\ 9X + 0.026\ 4$	0.947 6
	3	$Y = 0.054\ 7X + 0.104\ 8$	0.909 2

注:1~3 组分别为含 2%、4%、8% 氮酮释放液组(表 5 同)。

取液的有显著差别,结果见表 5。在各组 24 h 总皂苷累积透皮吸收量中人参皂苷 R_{g₁} 所占比例最大,明显超过了它在释放液中所占的份额。这可能是由于 3 种皂苷的透皮能力不一致而引起的,可以推断人参皂苷 R_{g₁} 透皮能力最强,三七皂苷 R₁ 次之,人参皂苷 Rb₁ 最弱。因此,对于中药透皮吸收的研究,仅仅抓住其中一个主要成分并不能全面了解其透皮吸收性质,在研究中应该注意中药多成分的特点,全面考察各成分的透皮吸收性能,通过其构成比的变化和特征图谱的比较来更有效的了解中药的透皮吸收过程。

4.2 不同浓度氮酮对 3 种皂苷透皮吸收的促进作用 氮酮是目前经皮给药系统中常用的透皮促进剂,其毒性极小,对多数药物的透皮吸收均有明显促进。由文献可知氮酮对药物的透皮促进作用与其用

表 5 各组溶液中 3 种皂苷构成比

成分	3 种皂苷构成比/%			
	提取液	1	2	3
三七皂苷 R ₁	8.45	4.93	6.92	5.79
人参皂苷 Rg ₁	56.94	88.73	87.43	89.10
人参皂苷 Rb ₁	34.61	6.35	5.64	5.10

量并不成正比关系^[5-6],对于不同的药物、辅料,在不同的使用环境下,氮酮的最佳用量都有所不同。一般而言,氮酮用量在 0.1%~5% 效果较好^[7],有研究报道以小鼠皮为渗透屏障时氮酮用量在 2%~3% 对人参皂苷 Rg₁ 促透效果最好^[5];而如果以大鼠皮为渗透屏障时氮酮用量在 4%~5% 对三七总皂苷促透效果最佳^[8]。氮酮不但可以促进药物透皮吸收,目前还有试验研究发现氮酮还可以抑制药物的透皮吸收。这一作用与药物的结构和氮酮的用量均有一定联系,该现象可能是由于氮酮与药物相互作用造成^[6,9]。为了考察高中低浓度氮酮对三七提取液中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的促透规律,确定试验中氮酮的含量分别为 0%、2%、4% 和 8%。

由试验数据可知以完整豚鼠腹皮为渗透屏障时氮酮对三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的透皮吸收有促进作用,但其促进效果与用量不成正比,氮酮浓度为 2% 时作用最明显,8% 稍次,4% 效果最差。

目前对于氮酮促进药物透皮吸收的作用机制研究还不够透彻,一般认为氮酮促透机制和其与角质层中脂质的相互作用有关,也有研究表明氮酮可以通过与表皮细胞作用或增加皮肤角质层含水量来促进药物透皮吸收^[10-11]。出现这种结果的原因可能是由于当氮酮用量小,浓度低时氮酮主要与供试皮肤作用,所以 2% 氮酮可以显著增加 3 种皂苷的透过性。而随着氮酮用量增大,浓度增高,其与皂苷的作用逐渐加强,并超过了其对供试皮肤的作用,从而使得 4% 氮酮的促透作用大大下降。随着氮酮浓度进一步升高,氮酮对供试皮肤的作用明显加强并超过它与皂苷的作用,故 8% 氮酮的促透作用明显增强,与 2% 时相差不大。

4.3 不同皮肤对药物透皮试验结果的影响 豚鼠皮厚度较大,药物较易滞留在皮肤中^[12],由试验数

据可知没有氮酮的情况下,三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 均难以透过完整豚鼠皮。而根据以往试验结果可知^[13],以大鼠腹皮为渗透屏障时即使不加氮酮等透皮促进剂,人参皂苷 Rg₁ 都可以有效透过。大鼠和豚鼠同属哺乳纲啮齿目,在亲缘关系上比较接近,但其完整腹皮对人参皂苷 Rg₁ 等几种皂苷的透皮吸收性质亦完全不同,那么依此类推,大鼠皮或豚鼠皮与人类皮肤对同一药物的吸收代谢性质很可能也存在着较大的差异。所以选用什么皮肤才能更好的模拟人体皮肤是药物透皮研究的一个较大的问题,需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010;11.
[2] 姚恒,李世荣,刘剑毅.三七总苷对人增生性瘢痕成纤维细胞 TGF-β₁ 和细胞周期的作用[J].中国实用美容整形外科杂志,2005,16(4):243.
[3] 谢甦,李丽红,李丽.三七总皂苷抗衰老的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2008,3(2):86.
[4] 白志华,方晓玲.三七总皂苷中人参皂苷 Rg₁ 体外透皮吸收的实验研究[J].中成药,2006,28(5):639.
[5] 周敏,顾宜,张三奇,等.氮酮对人参皂苷 Rg 和米诺地尔透皮吸收的影响[J].第四军医大学学报,2004,25(10):958.
[6] 范卓文,关楠楠,张滨菊.氮酮对白癜风脂质体软膏中补骨脂素透皮作用的影响[J].中医药信息,2009,26(6):110.
[7] 郑俊民.经皮给药新剂型[M].北京:人民卫生出版社,2006;273.
[8] 蔡庆顺,欧阳胜,钟小群,等.三七粉末透皮吸收研究[J].江西中医学院学报,2002,14(4):9.
[9] 朴美兰,张善玉,崔京浩,等.渗透促进剂对紫草素透过大鼠腹部皮肤的作用[J].中国野生植物资源,2003,22(2):39.
[10] 侯雪梅,李国栋,李卫华.化学促渗剂及其机理的探讨[J].上海医药,2008,29(5):231.
[11] 李磊,赵秀丽,陈大为,等.化学促渗剂在经皮给药系统中的应用进展[J].中南药学,2007,5(6):532.
[12] 袁晓琼,栢学军,何海霞,等.复方盐酸萘替芬乳膏对离体豚鼠皮肤的透皮吸收研究[J].中国药房,2008,1:28.
[13] 何百寅,刘常青,谢友良,等.人参皂苷 Rg₁ 透皮规律研究[J].广东药学院学报,2010,26(6):564.

[责任编辑 聂淑琴]