

## 三七总皂苷传递体中5种皂苷类成分含量与包封率的测定研究

范煜航<sup>1</sup>, 徐畅<sup>1#</sup>, 费雅蓉, 程碧欣<sup>1</sup>, 丘鹰昆<sup>2</sup>, 郑杭生<sup>1\*</sup>

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102

**摘要:** 目的 建立三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)传递体(transfersomes, TFSs)(PNS-TFSs)中5种皂苷类成分含量与包封率的测定方法,并探讨药物包封特性。方法 采用超高效液相色谱(UPLC)法测定PNS-TFSs制剂中三七皂苷R<sub>1</sub>(NGR<sub>1</sub>)、人参皂苷Rg<sub>1</sub>(GRg<sub>1</sub>)、人参皂苷Re(GRe)、人参皂苷Rb<sub>1</sub>(GRb<sub>1</sub>)与人参皂苷Rd(GRd)的含量,色谱柱为Hypersil Gold柱(100 mm×2.0 mm, 1.9 μm),流动相为乙腈-水,梯度洗脱,检测波长为203 nm,柱温为28 ℃。以离心超滤法结合UPLC测定传递体包封率。结果 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>与GRd对应的各色谱峰专属性与分离度良好( $R \geq 1.5$ ),且分别在4.04~505.00、3.98~498.00、4.03~504.00、3.99~499.00、4.00~500.00 μg/mL呈良好的线性关系( $r \geq 0.9997$ ),精密度(RSD≤2.40%)、准确度(97.23%≤回收率≤104.50%)与供试品溶液稳定性(RSD≤0.90%)均符合要求;测得PNS传递体中NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>与GRd质量浓度依次为98.14、380.80、41.68、317.50、75.61 μg/mL,包封率依次为75.48%、69.68%、69.51%、92.35%、95.97%。结论 UPLC法与离心超滤法可用于PNS传递体中多成分含量与包封率的测定,方法快速、准确、可靠。

**关键词:** 三七总皂苷;传递体;超高效液相色谱;离心超滤法;包封率;包封特性;三七皂苷R<sub>1</sub>;人参皂苷Rg<sub>1</sub>;人参皂苷Re;人参皂苷Rb<sub>1</sub>;人参皂苷Rd

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)10-3006-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.010

## Determination of contents and encapsulation efficiencies of five saponins in *Panax notoginseng* saponins transfersomes

FAN Yu-hang<sup>1</sup>, XU Chang<sup>1</sup>, FEI Ya-rong<sup>1</sup>, CHENG Bi-xin<sup>1</sup>, QIU Ying-kun<sup>2</sup>, ZHENG Hang-sheng<sup>1</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China

**Abstract: Objective** To develop methods for the determination of contents and encapsulation efficiencies of five saponins in *Panax notoginseng* saponins (PNS) transfersomes (PNS-TFSs) and probe the drug encapsulation features. **Methods** UPLC was adopted to determine the contents of notoginsenoside R<sub>1</sub> (NGR<sub>1</sub>), ginsenoside Rg<sub>1</sub> (GRg<sub>1</sub>), ginsenoside Re (GRe), ginsenoside Rb<sub>1</sub> (GRb<sub>1</sub>) and ginsenoside Rd (GRd) in the preparation of PNS-TFSs. An Hypersil Gold column (100 mm × 2.0 mm, 1.9 μm) was used to separate the analytes with acetonitrile-water mixture as the mobile phase in gradient elution mode, and the detection wavelength was set at 203 nm, the column temperature was 28 ℃. Encapsulation efficiencies were determined by centrifugal ultrafiltration method combined with UPLC. **Results** The specificity and resolution ( $R \geq 1.5$ ) of the peaks corresponding to each analyte met requirements of methodology. The calibration curves were linear ( $r \geq 0.9997$ ) and in the ranges of 4.04—505.00, 3.98—498.00, 4.03—504.00, 3.99—499.00, 4.00—500.00 μg/mL for NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd respectively. RSD (≤ 2.4%) of repeated measurements with working solution of chemical reference substances (CRS) and recoveries (97.23%—104.50%) of the analytes from the blank transfersomes spiked with their CRS demonstrated respectively the precision and accuracy of the method. The test solutions were stable (RSD ≤ 0.90%) in 12 h. The contents of NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd in the transfersomes were 98.14, 380.80, 41.68, 317.50,

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174096); 校级科研基金(国家自然科学基金预研专项)资助项目(2019ZG37)

作者简介: 范煜航, 硕士研究生, 研究方向为经皮吸收脂质囊泡新剂型及其体内过程。Tel: 18768131106 E-mail: fanyuhang1016@163.com

\*通信作者: 郑杭生, 硕士生导师, 主要从事经皮吸收新剂型及其体内过程研究。Tel: (0571)61768157 E-mail: hs-zheng@163.com

#共同第一作者: 徐畅, 硕士研究生, 研究方向为经皮吸收脂质囊泡新剂型及其体内过程。Tel: 17826865411 E-mail: xu\_xile@163.com

75.61  $\mu\text{g/mL}$ , and their encapsulation efficiencies were 75.48%, 69.68%, 69.51%, 92.35%, 95.97%, respectively. **Conclusion** UPLC is fast, accurate, precise and applicable to the determination of the contents of NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd in the transfersomes and the centrifugal ultrafiltration method coupled with UPLC is applicable to the determination of their encapsulation efficiencies.

**Key words:** *Panax notoginseng* saponins; transfersomes; UPLC; centrifugal ultrafiltration; encapsulation efficiencies; encapsulation features; notoginsenoside R<sub>1</sub>; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Re; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; ginsenoside Rd

三七是五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎, 是中医传统用于体内外各种出血之证及跌打损伤、瘀滞肿痛的要药。其主要活性成分为三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS), PNS 中主要成分包括三七皂苷 R<sub>1</sub> (notoginsenoside R<sub>1</sub>, NGR<sub>1</sub>)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>)、人参皂苷 Re (ginsenoside Re, GRe)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (ginsenoside Rb<sub>1</sub>, GRb<sub>1</sub>) 与人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd, GRd) 等。PNS 具有多种药理作用, 包括保护心脑血管系统、保护神经系统、抗肿瘤、抗菌、抗炎等<sup>[1]</sup>, 并对骨折的愈合、骨关节损伤及肢体功能的恢复等也具有显著疗效<sup>[2]</sup>, 同时, 也被广泛用于治疗软组织损伤<sup>[3]</sup>。目前, PNS 临床给药方式主要为 *po* 和 *iv*, 然而, *po* 容易引起胃肠道药物分解, 且存在肝首关效应, 导致生物利用度低, 而注射给药存在患者顺应性差、安全性等问题。此外, 这 2 种给药途径均难以实现 PNS 在损伤局部组织分布, 从而影响其治疗局部损伤的作用。故在 PNS 的局部闭合性损伤治疗中经皮给药成为一种更具优势的给药途径, 因其可避免口服途径存在的肝首过效应和胃肠道分解, 用药安全性高, 给药次数少, 且可明显提高 PNS 在用药部位皮下局部组织的浓度, 从而提高对局部疾病的疗效<sup>[4]</sup>。然而, 因 PNS 中各成分相对分子质量较大, 难以透过角质层屏障, 故需要设计合理的透皮给药剂型以达到理想的经皮吸收效果。

传递体 (transfersomes, TFSs) 作为透皮给药的优良载体, 已受到广泛的关注, 它是由磷脂、胆固醇形成的双分子层与边缘活化剂 (edge activator, EA) 共同构成的可变形囊泡, 后者的加入使 TFSs 具有良好的弹性和变形性, 同时, 由于天然存在的皮肤水化梯度的驱动作用, 故 TFSs 能通过仅为其自身粒径十分之一大小 (被 TFSs 诱导扩张后) 的皮肤角质层中的水性通道, 到达皮肤深层部位<sup>[5]</sup>, 其中部分包载的药物释放后被吸收入血而发挥全身作用, 而另一部分药物则可实现皮下较深部位的靶向递送<sup>[6]</sup>。故在临床上局部疾病的治疗中, 相较于其他给药途径, TFSs 能够增加皮下局部组织中的药物

浓度, 并显著降低进入体循环的药量, 从而发挥增效减毒的作用<sup>[7]</sup>。TFSs 中常用的 EA 有胆酸钠、聚山梨酯等表面活性剂。有研究发现, 以柠檬烯与柠檬醛等单萜挥发油成分作为 EA 的 TFSs 具有相似的药物经皮渗透特性<sup>[8]</sup>, 本课题组前期研究结果也证实了以挥发油作为 EA 的 TFSs 可明显促进药物的透皮吸收与关节腔的局部药物递送<sup>[9-10]</sup>。

药物包封率对于囊泡型药物制剂的生物效应有重要影响, 《中国药典》2020 年版四部微囊、微球与脂质体制剂指导原则中也明确规定脂质体制剂中药物的包封率不得低于 80%<sup>[11]</sup>, 而 TFSs 是脂质体处方中加入 EA 后形成的脂质囊泡载体, 其包封率的高低会影响经皮给药后产生疗效的优劣, 故包封率亦为 TFSs 处方工艺筛选和质量评价的重要依据。为了提高 PNS 透皮与局部组织递送效率, 改善对局部闭合性损伤的疗效, 本课题组前期以单萜挥发油成分柠檬烯与柠檬醛作为 EA 将中药有效部位 PNS 制备成传递体 (PNS-TFSs) <sup>[12]</sup>。为了对该制剂进行更加全面、合理的质量评价, 本实验建立了一种同时测定 PNS-TFSs 中多种主要皂苷类成分含量的 UPLC 方法, 并将离心超滤法与之结合, 测定制剂中多种皂苷类成分的包封率, 进而探讨 TFSs 对 PNS 中皂苷类成分的包封特性。本研究可为 PNS-TFSs 制剂质量标准的建立与处方工艺的进一步优化奠定基础。

## 1 仪器与试剂

H-class 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Hypersil Gold C<sub>18</sub> 液相色谱柱 (100 mm×2.0 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ ), 美国 Thermo 公司; R-502 系列旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; DK-S24 型电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; SHB-111S 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; XL2000 型超声破碎仪, 美国 Misonix 公司; Nano-ZS90 动态激光散射粒度仪, 英国 Malvern 公司; JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 Jeol 公司; 聚碳酸酯径迹蚀刻膜, 0.10、0.05  $\mu\text{m}$ , 英国 Whatman 公司; Olympus BX51 型光学显微镜, 日本奥林巴斯公司; Homoe X-25 型高压膜挤出仪, 上

海赫默仕机电科技有限公司; BS124S 型电子天平, 德国萨多利斯公司; FE20 型台式 pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 5804R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Pall Nanosep 离心浓缩管, 截留相对分子质量 10 000, 美国 Pall 公司。

PNS, 注射级, 批号 HB20081103, 云南植物药业有限公司; 对照品 GR<sub>g1</sub> (质量分数 95.6%, 批号 110703-201426)、GR<sub>b1</sub> (质量分数 96.1%, 批号 110704-201424)、GR<sub>d</sub> (质量分数 96.3%, 批号 111818-201302)、GR<sub>e</sub> (质量分数 95.7%, 批号 110754-201322)、NGR<sub>1</sub> (质量分数 93.8%, 批号 110745-201015) 均由中国食品药品检定研究院提供; 大豆卵磷脂 (sbPC), 注射级, 批号 131002, 上海太伟药业有限公司; 柠檬烯 (批号 140825, 质量分数 ≥98.3%) 与柠檬醛 (批号 141006, 质量分数 ≥97.5%) 均购自吉安市聚鹏天然香料油有限公司; 胆固醇 (CH), 注射级, 批号 B40333, 上海艾韦特医药科技有限公司; 维生素 E (VE), 批号 MKCD4493, Sigma 公司; 磷酸二氢钾, 分析纯, 批号 20110801, 温州市化学用料厂; 磷酸氢二钠, 分析纯, 批号 130801, 湖州湖试化学试剂有限公司; 甲醇、二氯甲烷, 分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 美国 Honeywell 公司; UPLC 用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 PNS-TFSs 的制备及物理性质表征

**2.1.1 PNS-TFSs 的制备** 本课题组前期研究确定了采用薄膜分散法制备 PNS-TFSs, 并以 TFSs 的弹性为指标, 通过均匀设计试验得到优化处方与可行工艺<sup>[12]</sup>。本实验参照相关处方工艺进行 TFSs 的制备。

分别配制 0.067 mol/L 磷酸二氢钾溶液和 0.067 mol/L 磷酸氢二钠溶液, 两者按 124:1 的体积比混合, 混合液稀释 10 倍, 即得需要浓度的 pH 值为 5.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS 5.0), 作为薄膜分散法中脂质薄膜的水化液。

处方: PNS 100 mg、CH 30 mg、sbPC 120 mg、VE 2 mg、柠檬烯-柠檬醛 (质量比 4:1) 混合挥发油 80 mg、PBS 5.0 10 mL。

工艺: 按处方量称取处方中除水化液之外的各组分, 溶解于甲醇-二氯甲烷 (3:4) 混合有机溶剂中, 转移至茄形瓶中, 减压旋转蒸发除去溶剂, 得到干膜, 继续旋转蒸发 2 h 以除尽有机溶剂, 加入水化液进行水化, 静置 12 h 后进行超声破碎处理,

最后依次挤压通过 0.10 μm 与 0.05 μm 孔径的聚碳酸酯径迹蚀刻膜, 即得 PNS-TFSs。按相同处方工艺重复制备 3 批。

以同样方法制备不含药物 PNS 的 TFSs, 即得空白 TFSs。

**2.1.2 粒径与 ζ 电位的测定** 取适量 PNS-TFSs 样品, 以蒸馏水稀释 10 倍后, 在室温下用激光散射粒度仪分别进行粒径与 ζ 电位测定。所有样品的各项测定均重复 3 次, 结果 PNS-TFSs 的平均粒径为 (66.92 ± 4.34) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.074 ± 0.016, 平均 ζ 电位为 (-25.1 ± 1.5) mV (n=3), 代表性粒径与 ζ 电位分布图见图 1。

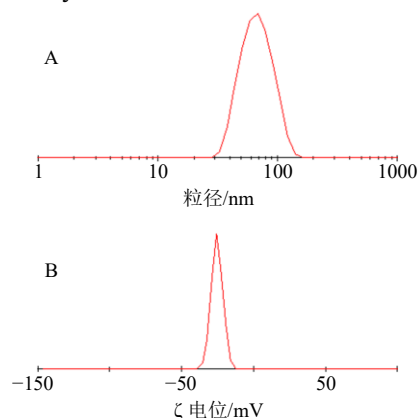


图 1 PNS-TFSs 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B) 分布  
Fig. 1 Size (A) and ζ potential (B) distribution of PNS-TFSs

**2.1.3 显微形态的观察** 对 PNS-TFSs 样品进行适当倍数稀释, 吸取少量置于铜网正面, 用滤纸吸去多余样品液, 用 2% 磷钨酸溶液进行负染 2 min, 取出铜网, 用滤纸吸取过多染液, 将铜网正面朝上置于玻璃皿中, 自然晾干, 置于 TEM 下观察并拍照。结果见图 2, 样品中的囊泡呈圆形或类圆形, 大小及分布较均匀, 粒子之间未见黏连与聚集现象。

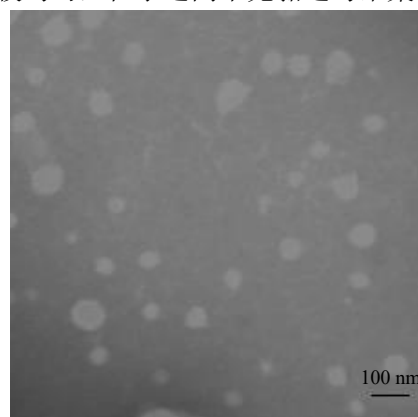


图 2 PNS-TFSs 的 TEM 图  
Fig. 2 TEM image of PNS-TFSs

## 2.2 PNS-TFSs 制剂中 5 种皂苷类成分含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Hypersil Gold C<sub>18</sub> 柱 (100 mm×2.0 mm, 1.9 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~2 min, 19%乙腈; 2~12 min, 19%~22%乙腈; 12~12.1 min, 22%~40%乙腈; 12.1~17.4 min, 40%~45%乙腈; 17.4~17.5 min, 45%~19%乙腈; 体积流量为 0.22 mL/min; 进样量为 2.5 μL; 柱温为 28 °C; 检测波长为 203 nm。

**2.2.2 混合对照品储备液的制备** 分别精密称取 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得含 5 种成分的混合对照品储备液, 各成分质量浓度依次为 0.505、0.498、0.504、0.499、0.500 mg/mL。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取 PNS-TFSs 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 用超声波清洗器浴式超声 (功率 200 W、频率 40 kHz) 处理 2 min, 以甲醇定容, 摇匀, 用 0.22 μm 的有机相过滤膜滤过, 即得供试品溶液。

**2.2.4 色谱峰的专属性** 分别取空白 TFSs 与 PNS-TFSs 样品, 按照“2.2.3”项下方法进行处理, 得空白 TFSs 与 PNS-TFSs 的供试品溶液; 精密称取 PNS 9.50 mg, 按“2.2.2”项下从“置于 10 mL 量瓶中”开始进行配液, 得 PNS 供试品溶液; 另取“2.2.2”项下制备的混合对照品储备液适量, 稀释适当倍数, 得混合对照品供试品溶液。按照“2.2.1”项下色谱条件分别分析以上 4 份供试品溶液。色谱图见图 3, 由图 3 可以看出, NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 各成分的色谱峰峰形良好, 分离度 ( $R \geq 1.5$ ) 良好, 空白传递体中的组分对各成分的色谱峰均无干扰。

**2.2.5 线性关系考察** 吸取“2.2.2”项下混合对照品储备液, 用甲醇逐级稀释成不同质量浓度的对照品溶液系列, 按照“2.2.1”项下色谱条件分别分析, 记录峰面积, 以峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标、各对照品质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标作图, 并进行线性回归, 得回归方程依次为 NGR<sub>1</sub>  $A=2.78 C-1.49$  ( $r=0.999 9$ ,  $n=8$ )、GRg<sub>1</sub>  $A=3.21 C-1.92$  ( $r=0.999 8$ ,  $n=8$ )、GRe  $A=3.30 C-2.56$  ( $r=0.999 8$ ,  $n=8$ )、GRb<sub>1</sub>  $A=2.73 C-1.33$  ( $r=0.999 7$ ,  $n=8$ ) 与 GRd  $A=3.47 C-3.04$  ( $r=0.999 7$ ,  $n=8$ ), 结果表明, NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>、GRd 分别在 4.04~505.00、3.98~498.00、4.03~504.00、3.99~499.00、4.00~500.00 μg/mL 呈良好的线性关系。

**2.2.6 精密度试验** 在 1 d 内, 分别取高、中、低 3

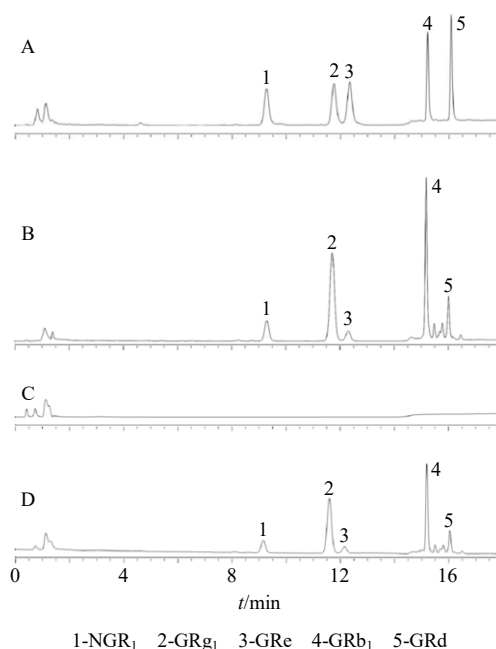


图 3 混合对照品溶液 (A)、PNS-TFSs (B)、空白-TFSs (C)、PNS (D) 的 UPLC 图

Fig. 3 UPLC of mixed CRS solution of NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd (A), PNS-TFSs (B), blank-TFSs (C), PNS (D)

种质量浓度 (200、20、10 μg/mL, 按 GRd 计) 的混合对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 分别连续进样 6 次, 记录峰面积, 分别计算各成分在不同质量浓度下的 RSD, 以示日内精密度; 在连续 5 d 内, 高、中、低 3 种质量浓度的混合对照品溶液分别各进 1 次, 记录峰面积, 分别计算各成分在各质量浓度下的 RSD, 以示日间精密度。结果见表 1, NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 的 RSD 均小于 3.0%, 精密度符合要求。

**2.2.7 回收率试验** 精密量取空白 TFSs 样品 9 份, 每份 1 mL, 分别精密加入高、中、低 (分别为 1 mL 样品中各成分含量的 80%、100%、120%<sup>[11]</sup>) 3 种不

表 1 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 精密度试验结果  
Table 1 Results of precision test with NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd

成分	高质量浓度		中质量浓度		低质量浓度	
	RSD/%		RSD/%		RSD/%	
	日内	日间	日内	日间	日内	日间
NGR <sub>1</sub>	0.3	0.3	0.7	1.2	0.4	1.6
GRg <sub>1</sub>	0.4	0.3	0.7	1.6	0.5	1.4
GRe	0.4	0.3	0.3	0.7	0.4	1.3
GRb <sub>1</sub>	0.3	0.8	0.5	1.1	1.5	2.4
GRd	0.2	0.3	0.4	1.1	0.3	1.3

同质量的各测定成分对照品, 各个质量分别平行 3 份, 均按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 按“2.2.5”项下标准曲线进行定量, 测得量相对于加入量的百分比为回收率, 结果见表 2, 可见, 该方法准确度良好。

**2.2.8 稳定性试验** 取 PNS-TFSs 样品 1 份, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 置于室温下, 分别在 0、1、2、3、4、8、12 h, 按“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 记录各成分峰面积, 分别计算表 2 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 回收率试验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 2 Results of recovery test with NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

加样水平	回收率/%				
	NGR <sub>1</sub>	GRg <sub>1</sub>	GRe	GRb <sub>1</sub>	GRd
低	102.1±1.4	102.2±1.9	102.5±1.6	103.5±1.0	99.5±1.2
中	101.4±1.7	101.8±2.1	99.8±1.0	102.0±0.9	101.0±1.1
高	99.1±1.4	99.1±1.4	98.4±1.3	98.0±1.6	98.1±1.4

**表 3 PNS-TFSs 中 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 含量的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

**Table 3 Content determination of NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd in PNS-TFSs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

样品	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )				
	NGR <sub>1</sub>	GRg <sub>1</sub>	GRe	GRb <sub>1</sub>	GRd
1	0.098±0.001	0.381±0.002	0.042±0.001	0.318±0.002	0.076±0.001
2	0.097±0.002	0.378±0.001	0.043±0.006	0.320±0.007	0.078±0.003
3	0.099±0.013	0.379±0.005	0.041±0.004	0.319±0.019	0.075±0.006

于光学显微镜下观察, 确认其中不含药物结晶后精密量取 100 μL, 置于离心超滤管内, 进行冷冻离心 (离心力 10 000×g, 温度 4 ℃), 收集全部外水相, 转移至 1 mL 量瓶中, 以甲醇定容, 摇匀, 按“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 测得 PNS 中各种成分的峰面积分别代入“2.2.5”项下的各种成分回归方程以计算外水相中药物含量; 另外, 取等量样品, 按“2.2.9”项下测定样品中各成分的含量, 并按下式计算包封率。

$$\text{包封率} = (W_s - W_{EA}) / W_s$$

$W_s$  为取样量样品中各成分的质量  $W_{EA}$  为取样量样品外水相中各成分的质量

**2.3.2 超滤滤出液中的脂质体监测** 采用 2 种方法监测滤出液中脂质体是否存在。①紫外分光光度法测定 450 nm 处样品浊度; ②光学显微镜观察。其中, 测定 450 nm 处样品浊度时, 合并多份滤出液以满足测定体积要求。结果表明, 滤出液中无脂质体

存在。NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 在不同时间点的 RSD, 结果依次为 0.6%、0.9%、0.4%、0.7%、0.6%, 结果表明供试品溶液中各待测成分在 12 h 内稳定。

**2.2.9 重复性试验** 取“2.1.1”项下 PNS-TFSs 混悬液, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 按照“2.2.5”项下回归方程进行定量测定。测得 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub> 与 GRd 各成分质量浓度的 RSD 分别为 0.6%、0.5%、1.0%、0.5%、1.6%, 结果表明该方法重复性良好。

**2.2.10 PNS-TFSs 中三七皂苷成分的含量测定** 取“2.1.1”项下 PNS-TFSs 混悬液, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 按照“2.2.5”项下回归方程进行定量, 平行 3 份。计算得各成分的质量浓度, 结果见表 3。

### 2.3 包封率的测定

**2.3.1 离心超滤法测定 PNS-TFSs 的包封率** 取“2.1.1”项下 PNS-TFSs 混悬液样品, 摇匀, 取少量

存在。

**2.3.3 超滤膜对溶液中游离药物的吸附** 取混合对照品储备液, 用 PBS 5.0 逐级稀释成高、中、低 3 个不同质量浓度 (500、100、20 μg/mL, 按 GRd 计) 各 3 份, 每份 500 μL, 按“2.3.1”项中条件进行超滤, 收集全部超滤液, 转移至 1 mL 量瓶中, 以甲醇定容, 摇匀, 按“2.2.1”项下色谱条件分别测定超滤前溶液中 PNS 各成分对应的峰面积 ( $A_{\text{before}}$ ) 与滤出液中 PNS 各成分对应的峰面积 ( $A_{\text{after}}$ ), 计算超滤膜吸附率, 结果见表 4。可以看出, 超滤膜对药物吸附较小, 超滤对药物溶液质量浓度的影响可以忽略。

$$\text{超滤膜吸附率} = (A_{\text{before}} - A_{\text{after}}) / A_{\text{before}}$$

**2.3.4 稀释对 PNS-TFSs 包封率测定结果的影响** 取“2.1.1”项下 PNS-TFSs 混悬液样品适量, 分别用 PBS 5.0 稀释 1 倍和 2 倍, 得 PNS-TFSs<sub>1/2</sub>、PNS-TFSs<sub>1/3</sub>。按“2.3.1”分别测定传递体 PNS-TFSs、PNS-

表4 超滤膜对高、中、低质量浓度溶液中 PNS 各种成分的吸附结果 (n = 3)

Table 4 Results of adsorption of PNS components at high, medium and low concentration in solutions by ultrafiltration membrane (n = 3)

质量浓度 水平	超滤膜吸附率/%				
	NGR <sub>1</sub>	GRg <sub>1</sub>	GRe	GRb <sub>1</sub>	GRd
低	4.36	4.61	2.25	3.85	4.72
中	4.49	4.53	3.96	2.55	3.48
高	2.74	3.11	3.09	2.54	2.82

TFSs<sub>1/2</sub>、PNS-TFSs<sub>1/3</sub>的包封率,每份平行测定3次,结果见表5。可以看出,稀释1倍后传递体中各成分的包封率均不同程度降低,稀释2倍使传递体中NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe的包封率均降低20%以上,而GRb<sub>1</sub>和GRd即使稀释2倍,包封率也在80%以上,下降较少。

**2.3.5** 空白TFSs与PNS PBS溶液混合法制得TFSs的包封率 按如下处方(记作TFSs<sub>blank</sub>): CH 30 mg、sbPC 120 mg、VE 2 mg、柠檬烯-柠檬醛(4:1)混合挥发油 80 mg、PBS 5.0 10 mL,以“2.1.1”项工艺条件薄膜分散法制备空白TFSs混悬液,将5 mL TFSs<sub>blank</sub>与20 mg/mL的PNS PBS溶液5 mL混匀,得TFSs<sub>blank</sub>+PNS。按“2.3.1”测定TFSs<sub>blank</sub>+PNS的包封率,平行测定3次,结果见表5。可以看出,TFSs<sub>blank</sub>+PNS的PNS各成分包封率均较高,只比PNS-TFSs低了不足15%。

**2.3.6** PNS-TFSs包封率测定的方法重复性考察 按“2.3.1”项方法操作,将1份PNS-TFSs样品平行测定6次,结果表明,NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>、GRd各成分包封率的RSD分别为2.0%、0.6%、2.6%、0.1%、1.1%,说明该方法重复性良好。

表5 稀释对包封率测定结果的影响及空白传递体与PNS PBS溶液混合制得脂质体的包封率

Table 5 Effect of dilution on determination of encapsulation efficiencies and determined encapsulation efficiencies of transfersomes prepared by mixing blank transfersome suspension with PNS PBS solution

样品	包封率/%				
	NGR <sub>1</sub>	GRg <sub>1</sub>	GRe	GRb <sub>1</sub>	GRd
PNS-TFSs	76.4	69.2	70.2	93.1	95.3
PNS-TFSs <sub>1/2</sub>	69.6	62.1	63.5	89.3	90.4
PNS-TFSs <sub>1/3</sub>	47.6	46.9	47.0	83.2	84.6
TFSs <sub>blank</sub> +PNS	64.5	58.5	59.1	84.5	85.2

**2.3.7** PNS-TFSs包封率的测定 按“2.3.1”项方法操作,将1份PNS-TFSs样品平行测定3次,结果见表6。

表6 PNS-TFSs中NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>与GRd包封率的测定结果

Table 6 Determination results of encapsulation efficiencies of NGR<sub>1</sub>, GRg<sub>1</sub>, GRe, GRb<sub>1</sub> and GRd in PNS-TFSs

样品	包封率/%				
	NGR <sub>1</sub>	GRg <sub>1</sub>	GRe	GRb <sub>1</sub>	GRd
1	75.5±1.5	69.7±0.4	69.5±1.8	92.4±0.1	96.0±1.1
2	74.6±1.3	69.4±0.7	69.9±1.1	93.1±1.2	96.7±1.4
3	75.9±0.9	70.1±0.3	68.3±0.7	91.9±0.8	95.4±1.2

### 3 讨论

中药具有多成分、多靶点的特点,意味着通过单一成分控制很难全面评价其质量,需要对其进行多成分同时测定,然而,定量指标成分的增多,也相应地增加了检测的周期和成本<sup>[3]</sup>。《中国药典》2020年版一部中以NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>和GRd为PNS含量测定的指标成分,采用HPLC法测定,需要60 min完成<sup>[4]</sup>,本课题组前期尝试了药典的条件,发现GRg<sub>1</sub>与GRe这2种成分无法达到完全分离<sup>[5]</sup>。因此,本实验建立了一种可一次进样同时测定PNS-TFSs中5种主要皂苷类成分的UPLC方法,该方法不仅可以实现这5种皂苷成分的良好色谱分离,且相较于HPLC法,UPLC法测定具有分析速度快、分离效率高、准确度与灵敏度高、溶剂使用少、废液产生少等优点<sup>[6]</sup>,可以节约经济成本与时间成本,同时更加环保。此外,测定结果与原料药PNS的中各成分的含量比例基本一致,从一个方面佐证了结果合理、可信。

离心超滤法测定传递体包封率是将一定量传递体放入配有超滤膜的超滤管中,在适宜的转速下离心一段时间,游离药物在离心力的作用下可通过超滤膜,而传递体则被超滤膜截留,从而实现二者的分离。而后收集滤液用于测定游离药物的量,取等量未滤过的传递体测定药物总量,计算包封率<sup>[7-18]</sup>。该方法快速,易于操作,且不需要复杂的设备,与其他技术(如超速离心)相比,它只需要少量的样品。然而,离心超滤法有一个明显的缺点就是药物可能会被吸附在超滤膜上而引起损失,从而影响测定结果。因此,本实验考察了超滤膜对高、中、低3个质量浓度溶液中游离PNS各成分的吸附,发现



超滤膜对 PNS 各成分吸附均较小。

其次,超滤膜的选择对于离心超滤法测定包封率也尤为重要,因过大或过小的滤孔均无法实现传递体与游离药物良好分离。本实验以离心超滤法结合 UPLC 法测定制剂的包封率,因 PNS-TFSs 平均粒径约为 67 nm,大多数皂苷成分的相对分子质量约为 1000,对应分子尺寸为 2~3 nm,故采用截留相对分子质量 10 000 (对应膜孔径约为 10 nm) 的超滤膜进行冷冻离心,使 PNS-TFSs 中囊泡与游离药物实现分离。

为了验证超滤膜对于囊泡的分离效果,本实验考察了 2 种监测滤出液中脂质体的方法,发现紫外分光光度法灵敏度较高,可用于检测;光学显微镜只能观察到大的脂质囊泡,难以观察到一些小单室脂质体,灵敏度欠佳,但该方法简便、快速,可用于囊泡初步监测。此外,定磷法是通过检测滤出液中的磷的含量来监测滤出液中是否存在囊泡的方法,该法准确、灵敏<sup>[19]</sup>,但是本研究中 TFSs 制备时使用了 PBS 作为水化液,会对本法测定产生影响,故未采用。

离心超滤法是一种在平衡状态下测定传递体包封率的方法,为了探究药物与囊泡相互作用和药物泄漏行为以及非平衡状态对于 PNS-TFSs 包封率测定结果是否存在影响,将 PNS-TFSs 进行稀释,发现在稀释 1 倍和 2 倍后 PNS-TFSs 中各成分的包封率均有所降低,但 GRb<sub>1</sub> 与 GRd 的降低程度远小于其他成分。除此以外,还发现空白传递体直接与 PNS 溶液混合载药也具有较高的包封率,这可能与 PNS 中各成分良好的亲脂性有关,这使得它们能较好地分配于双分子层上。

为了探明传递体中 5 种皂苷的包封特性,运用软件 (ACD/Labs 10.0) 进行了最优构象预测和基团间距离的计算,这样可以综合分析分子间亲水基团之间的相互作用、疏水部分的相互作用与分子大小适应性等影响因素。sbPC 双分子层的厚度约 5.0 nm,5 种皂苷分子均含有 1 个亲脂部分和 2 个亲水部分,其中 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub> 与 GRe 的分子优势构象均呈 U 形,2 个亲水端距离 2.0 nm,亲脂链长 1.5 nm,故嵌入 sbPC 形成的双分子层时因分子大小适应性差使系统能量很高,而 GRb<sub>1</sub> 与 GRd 的分子优势构象为线型,2 个亲水端距离 3.0 nm,亲脂链长 2.0 nm,嵌入磷脂双分子层时,亲脂部分大小合适,在双分子层内部的糖基可相互作用,体系能量降低<sup>[20]</sup>。

由上述结果可知,对于相对分子质量接近的不同皂苷分子,其优势构象影响分子中亲水基团之间的距离,进而影响分子与磷脂双分子层的相互作用及药物包封率,GRb<sub>1</sub> 与 GRd 分子嵌入 sbPC 双分子层产生的体系能量更低,表明两者与 sbPC 双分子层结合更稳定,这就解释了与 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe 相比 GRb<sub>1</sub> 和 GRd 为何具有更高的包封率 ( $P < 0.01$ ),以及稀释后包封率变化较小的原因。

此外,还发现一个大致的趋势,即 UPLC 色谱分析保留时间越长的 PNS 成分,其对应 PNS-TFSs 中包封率越高,也说明 PNS 成分亲脂性与包封率存在一定相关性,即其亲脂性越高,所对应的包封率越高,进一步地,可以推测 PNS 成分主要包封于 PNS-TFSs 的脂质双分子层中。

本研究建立了一种同时测定 PNS-TFSs 中 NGR<sub>1</sub>、GRg<sub>1</sub>、GRe、GRb<sub>1</sub>、GRd 含量的 UPLC 法,此法精密、准确、快速,进而以离心超滤法结合 UPLC 测定 PNS-TFSs 多成分的包封率,方法简便、准确、重复性良好,并根据实验结果探讨了 PNS 各主要成分在 TFSs 中的包封特性。本研究可以为单萜挥发油边缘活化的 PNS-TFSs 的质量评价与处方优化提供参考,为其透皮研究的开展奠定实验基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 黄依丹,成嘉欣,石颖,等.近五年三七化学成分、色谱分析、三七提取物和药理活性的研究进展[J].中国中药杂志,2022,47(10):2584-2596.
- [2] Ji Z, Cheng Y Z, Yuan P W, et al. *Panax notoginseng* stimulates alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(9): 950-957.
- [3] 贺延新.三七散治疗急性软组织损伤的疗效观察[J].中医正骨,2007,19(4):14.
- [4] 赖玲,刘华钢,陈明,等.三七总皂苷非注射途径给药剂型研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(3):235-238.
- [5] 梁秉文,刘淑芝,梁文权.中药经皮给药制剂技术[M].3版.北京:化学工业出版社,2017:182-184.
- [6] Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 675-711.
- [7] Peralta M F, Guzmán M L, Pérez A P, et al. Liposomes can both enhance or reduce drugs penetration through the skin [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13253.
- [8] El Maghraby G M, Williams A C, Barry B W. Interactions

- of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2004, 276(1/2): 143-161.
- [9] Wang J, Wei Y, Fei Y R, *et al*. Preparation of mixed monoterpenes edge activated PEGylated transfersomes to improve the *in vivo* transdermal delivery efficiency of sinomenine hydrochloride [J]. *Int J Pharm*, 2017, 533(1): 266-274.
- [10] Zheng H S, Xu C, Fei Y R, *et al*. Monoterpenes- containing PEGylated transfersomes for enhancing joint cavity drug delivery evidenced by CLSM and double-sited microdialysis [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 113: 110929.
- [11] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 474-476, 482-483.
- [12] 陈思思, 郑杭生, 王娟, 等. 三七总皂苷传递体的制备及其治疗大鼠急性软组织损伤作用研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2070-2075.
- [13] 魏会宇. 一测多评法同时测定注射用血栓通(冻干)中 5 个主要皂苷含量 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(6): 975-981.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 411-412.
- [15] 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.
- [16] 王亚茹, 商云霞, 尉小慧, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定三七总皂苷中 5 种皂苷类成分在大鼠血浆中的含量 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(14): 1878-1882.
- [17] 郑杭生, 佐拉·沙肯迪克, 王湘林, 等. 离心沉淀-离心超滤法测定盐酸青藤碱脂质体的包封率 [J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1523-1527.
- [18] 张艺, 杭太俊, 宋敏. 载药脂质体包封率测定方法的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(2): 245-252.
- [19] Stewart J C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate [J]. *Anal Biochem*, 1980, 104(1): 10-14.
- [20] 方蓉, 郑杭生, 陈思思. 离体皮肤渗透法测定三七总皂苷传递体经皮吸收特性 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 513-519.

[责任编辑 郑礼胜]