

· 药物代谢 ·

三七总皂苷肠溶微丸的体内外相关性

赖玲¹, 刘华钢^{1*}, 文丽², 秦艳娥¹, 陆仕华¹, 陈明², 刘冠萍²

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中医学院, 南宁 530001;
3. 广西梧州制药(集团)股份有限公司, 广西 梧州 543000)

[摘要] 目的:考察三七总皂苷(Panax Notoginseng Saponins, PNS)肠溶微丸在 Beagle 犬体内的释药行为及其体内外相关性。方法:采用双周期交叉试验设计,6 只健康 Beagle 犬口服自制 PNS 普通胶囊或自制 PNS 肠溶微丸(胶囊型)后,用 HPLC 测定血药浓度,计算 2 种制剂的药动学参数,进行生物利用度比较,并对体外累积释度和体内累积吸收率进行线性回归。结果:自制 PNS 肠溶微丸对 PNS 普通胶囊的相对生物利用度为三七皂苷 R_1 520.56%,人参皂苷 Rb_1 367.70%,人参皂苷 Rg_1 251.66%,上述 3 成分在体内的平均滞留时间均延长; R_1, Rb_1, Rg_1 的体内外相关系数分别为 0.784 9, 0.877 2, 0.691 2。结论:自制 PNS 肠溶微丸与 PNS 普通胶囊相比生物利用度更高,在 pH 6.8 的缓冲液中 R_1, Rb_1, Rg_1 的体内外相关性较差。

[关键词] 三七总皂苷;肠溶微丸;药动学;体内外相关性;生物利用度

[中图分类号] R283.6, R945 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)24-0097-04

Correlation Between *in vivo* Absorption and *in vitro* Release of Panax Notoginseng Saponins Enteric Pellets

LAI Ling¹, LIU Hua-gang^{1*}, WEN Li², QIN Yan-e¹, LU Shi-hua¹, CHEN Ming², LIU Guan-ping²

(1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
3. Guangxi Wuzhou Pharmaceutical Group Co. Ltd., Wuzhou 543000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate pharmacokinetics of panax notoginseng saponins (PNS) enteric pellets in Beagle dogs and study correlation between *in vivo* absorption and *in vitro* release of PNS enteric pellets. **Method:** Two-cycle crossover test design was used, six Beagle dogs orally self-made PNS ordinary capsules or self-made PNS enteric pellets (capsule mode), and determined plasma concentration by HPLC, calculated pharmacokinetic parameters. Then compared bioavailability, adopted linear regression of *in vitro* cumulative release percentage and *in vivo* cumulative absorption. **Result:** Bioavailability of Notoginsenoside R_1 , Ginsenoside Rb_1 and Ginsenoside Rg_1 in PNS enteric pellets were 520.56%, 367.70% and 251.66% respectively. Their mean residence time was longer than referenced preparation *in vivo*. Correlation coefficient of R_1, Rb_1 and Rg_1 were 0.784 9, 0.877 2 and 0.691 2 respectively. **Conclusion:** Bioavailability of PNS enteric pellets was higher than PNS capsule. There was a bad correlation of R_1, Rb_1 and Rg_1 between *in vivo* absorption and *in vitro* release in pH 6.8 buffer liquid.

[Key words] panax notoginseng saponins; enteric pellets; pharmacokinetics; correlation *in vivo* and *in vitro*; bioavailability

[收稿日期] 20110828(008)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2010GXNSFB013068);广西企业科技特派员专项(09321049)

[第一作者] 赖玲, 博士, 讲师, 从事药物新剂型研究, Tel:0771-5329140, E-mail: victory0773@yahoo.com.cn

[通讯作者] *刘华钢, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学、中药新制剂的开发研究, Tel:0771-5358272, E-mail: hgliu@263.net

三七为五加科多年生草本植物三七 *Panax notoginseng* (Buck.) F. H. Chen 的根,主产于云南、广西等地。三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)是三七的主要活性成分,现代药理学研究发现其作用于心脑血管疾病的多个环节^[1]。其中,三七皂苷 R_1 (以下简称 R_1)、人参皂苷 Rb_1 (以下简称 Rb_1) 和人参皂苷 Rg_1 (以下简称 Rg_1) 是 PNS 的主要活性成分。目前,PNS 在临床上的给药途径主要为注射和口服,以 PNS 作为单一主药的上市制剂的商品名为血塞通或血栓通。其中注射剂虽起效快,但有报道部分患者出现过过敏反应^[2],且用药的顺应性差,而口服制剂由于 PNS 受胃肠道酶、细菌及 pH 等多种因素影响,生物利用度较低^[3]。研究表明,PNS 口服吸收最佳部位为十二指肠^[4],为提高口服 PNS 的生物利用度,笔者将 PNS 制备成肠溶微丸(胶囊型),并以 R_1 、 Rb_1 、 Rg_1 为测定指标对其进行体内和体外试验。

1 材料

PNS(梧州制药集团股份有限公司,其中 R_1 、 Rg_1 、 Rb_1 含量分别为 9.64%、51.10%、36.38%), R_1 对照品(批号 110745-200415)、 Rg_1 对照品(批号 110704-200318)、 Rb_1 对照品(批号 110703-200424)均购自中国药品生物制品检定所,Acryl-EZE·水性丙烯酸树脂肠溶包衣剂(上海卡乐康包衣技术有限公司),1#空心胶囊(苏州胶囊有限公司),空白丸芯(杭州高成生物营养技术有限公司)。

无水乙醇(成都科龙化工试剂厂),甲醇、乙腈为色谱纯,三蒸水自制)。

LC-10AT 型高效液相色谱仪(SPD-10A 紫外检测器,日本岛津),BS224S 型电子天平(Sartorius),SK-1 型旋涡混合器(苏州威尔实验用品有限公司),TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),BGB5-10C 型高效包衣机(瑞安市东方制药有限公司)。

雄性 Beagle 犬,(10±2) kg,广州医药工业研究院提供,实验动物生产许可证号 SCXK(粤)2008-0007,维持犬配合饲料(东莞市银华生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 PNS 肠溶微丸(胶囊型)的制备 取 PNS 90 g,HPMC 4.5 g, L-HPC 4.5 g,过 100 目筛混匀,依次溶于 60% 乙醇,用磁力搅拌器搅拌至澄清溶液,置于

恒流泵中,并开启浆叶不断搅拌。将 MCC 空白丸芯置包衣机中滚动预热,喷浆液上药,至长大成丸。完成上药后再滚转 30 min,以雅克宜肠溶包衣液进行包衣,至微丸增重 15%,停止喷液,继续滚转 15 min,取出,40 °C 干燥 6 h,筛选 18~24 目的微丸。将所得微丸直接装普通胶囊,即得。

2.2 参比试剂 取 PNS 直接装普通胶囊,即得。

2.3 体外释药试验

2.3.1 色谱条件 Welchrom- C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-水,线性梯度洗脱:0~17 min(25:75)~18 min(45:55)~25 min(25:75),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 203 nm,柱温 30 °C。

2.3.2 方法学考察 称取相当于处方中一粒胶囊(含 PNS 85 mg)剂量的空白辅料 6 份,再分别精密加入 R_1 、 Rb_1 、 Rg_1 混合对照品液适量,pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至 25 mL,超声,混匀,得到一系列标准工作液,将标准工作液用孔径 0.8 μm 的微孔滤膜过滤,取 20 μL 进样。在上述色谱条件下分离测定,以质量浓度 C 为纵坐标,峰面积 A 为横坐标进行回归,得到标准曲线方程、相关系数(r)及线性范围,结果见表 1。日内和日间精密度的 RSD < 2%,表明所用分析方法符合要求,可用于 PNS 的体外释药试验研究。

表 1 PNS 肠溶微丸(胶囊)体外释药试验的标准曲线

成分	方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
R_1	$C = 0.00024A + 0.2464$	0.9999	0.53 ~ 26.21
Rb_1	$C = 0.00024A + 0.2718$	0.9999	2.03 ~ 101.35
Rg_1	$C = 0.00024A - 1.2992$	0.9998	3.01 ~ 150.57

2.3.3 释放度测定 采用《中国药典》2010 年版二部附录 XD 释放度测定法第二法转篮法,溶出介质为 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 900 mL,温度(37±0.5) °C,转速(75±1) r·min⁻¹。取自制胶囊及普通胶囊分别置于溶出杯中,定时取滤液 2 mL,并补入同体积空白缓冲液。HPLC 法测定各成分的峰面积,计算释放度。结果见图 1。

2.4 体内药动学

2.4.1 色谱条件 Welchrom- C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-水,线性梯度洗脱:0 min(21:79)~15 min(40:60)~18 min(45:55)~20 min(21:79)~25 min(21:79),流速 1.0

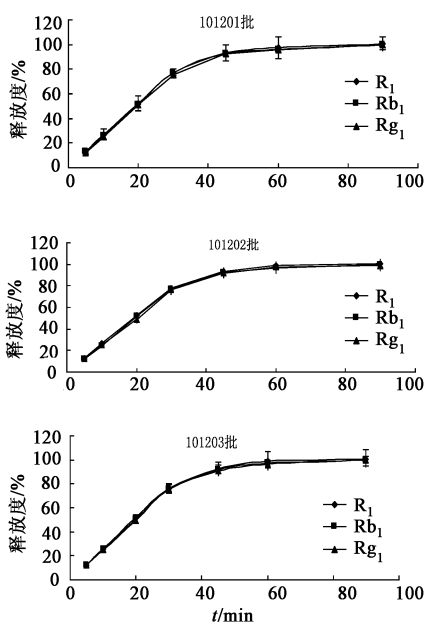


图1 PNS 肠溶微丸(胶囊)在缓冲液中的释放量

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $20 \mu\text{L}$, 检测波长 203 nm , 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.4.2 血浆样品处理与测定 取 Beagle 犬血浆样品 1.0 mL , 精确加入内标(internal standard, IS)溶液 $20 \mu\text{L}$ 和甲醇-乙腈(1:1)的混合液 3.0 mL , 漩涡混合 3 min , 离心($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 10 \text{ min}$)。分取上层混合液, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴吹干, 残渣用 0.20 mL 甲醇溶解, 漩涡混合 1 min , 离心($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 10 \text{ min}$)。取上清液 $20 \mu\text{L}$ 在 2.3.1 项色谱条件下进样分析, 记录色谱图、IS 峰面积(A_i)、 R_1 峰面积(A_{s_1})、 R_{b_1} 峰面积(A_{s_2})和 R_{g_1} 峰面积(A_{s_3}), 将 R_1 , R_{b_1} , R_{g_1} 峰面积与 IS 峰面积的比值($Y = A_s/A_i$)代入标准曲线计算血浆中 R_1 , R_{b_1} , R_{g_1} 的质量浓度。

2.4.3 方法学考察 分别精密称取 R_1 2.4 mg , R_{b_1} 2.8 mg , R_{g_1} 2.7 mg , 加甲醇溶解, 定容至 10 mL , 质量浓度分别为 $240, 280, 270 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 PNS 对照品贮备液。精密称取 PNS 0.25 g , 置 10 mL 量瓶中, 加入蒸馏水溶解、定容, 即得供试液。精密称取淫羊藿 1.8 mg , 加甲醇溶解, 定容至 100 mL 作为内标溶液。在 ep 管中分别加入不同体积的 PNS 对照品溶液, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴吹干甲醇后, 分别加入空白血浆 1.0 mL , 得到一系列含药血浆, 按 2.4.2 项下方法从“精确加入内标溶液 $20 \mu\text{L}$ ”开始处理。取上清液 $20 \mu\text{L}$ 进样, 以 Y 作为横坐标, 血浆中 R_1 , R_{b_1} , R_{g_1} 的质量浓度 C 为纵坐标进行线性回归, 得到 R_1 , R_{b_1} , R_{g_1} 的标准曲线方程、 r 及线性范围, 结果见表 2。此法

测定的方法回收率在 $90\% \sim 105\%$, 提取回收率均 $>50\%$, 日间和日内精密度均 $<10\%$, 完全符合生物样品分析的要求。

表2 PNS 肠溶微丸(胶囊)体内试验的标准曲线

成分	方程	r	线性范围 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
R_1	$C = 22.474Y - 5.4926$	0.9987	0.30 ~ 240.00
R_{b_1}	$C = 32.252Y - 28.854$	0.9989	0.35 ~ 280.00
R_{g_1}	$C = 25.454Y - 69.838$	0.9977	0.34 ~ 270.00

2.4.4 三七总皂苷两种剂型血药浓度比较 6 只 Beagle 犬随机分为 A, B 2 组(每组 3 只), 采用双周期交叉试验设计, 自身对照法进行试验, 洗净期 7 d 。给药前禁食 12 h , 给药前 15 min 于股静脉抽取空白血样 5 mL ; 给药后 5 h 进统一餐(犬配合饲料-维持料), 统一饮水。

第一周期 A 组口服给予自制普通胶囊 15 粒, B 组口服给予 PNS 肠溶微丸(胶囊型)11 粒, 于给药后不同时间点取血。A 组 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0 \text{ h}$ 取犬下肢股静脉血样 3 mL , 共 10 个取样点; B 组给药后与 A 组相同时间点取犬下肢股静脉血样 3 mL , 共 10 个取样点。血样统一保存于肝素化塑料离心管中, 离心($1 \text{ 万} \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 10 \text{ min}$), 血浆保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境中待测。

第二周期 A 组给予 PNS 肠溶微丸(胶囊型)11 粒, B 组给予自制普通胶囊 15 粒, 取血点同第一周期。

两组血样按 2.4.2 项下方法处理, 测定含量, 绘制药时曲线, 见图 2。

2.5 数据处理

2.5.1 生物利用度 将测得的 R_1 , R_{b_1} , R_{g_1} 的血药浓度数据用 3P97 实用药物动力学计算机程序处理, 以自制 PNS 普通胶囊为参比制剂, 进行剂量校正后计算相对生物利用度分别为 520.56% , 367.70% , 251.66% 。其他主要药动学参数见表 3。

2.5.2 体内外相关性 体内药物吸收率的计算采用 Wagner-Nelson 法。以体外累积释放率(f_r)为自变量, 体内吸收分数(f_a)为因变量, 进行最小二乘法线性回归, 求得相关方程和相关系数, 判断体外释放与体内吸收的相关性。将 f_r 与 f_a 进行回归处理, 结果见表 4。其中体外释放的最佳模型为 Weibull 模型。

表 3 受试、参比制剂口服试验的主要药动学参数

成分	剂型	隔室数	权重	K_a / h^{-1}	$AUC_{0 \rightarrow t}$	CL	V	MRT	$Lag\ time$
					$/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	$/L \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$	$/L \cdot kg^{-1}$	$/h^{-1}$	$/h$
R_1	A	2	1/C	2.123	4.523	0.380	5.514	2.165	0.42
	B	1	1/C ²	2.347	8.891	0.917	3.978	3.562	0.81
Rb_1	A	1	1/C ²	13.538	70.340	1.209	1.995	2.060	0.49
	B	1	1/C ²	2.462	97.667	0.468	0.946	2.451	0.46
Rg_1	A	1	1/C ²	0.821	16.475	7.220	18.487	3.142	0.003
	B	1	1/C ²	0.748	15.664	3.145	8.332	3.395	0.42

注:A.自制普通胶囊,B.自制肠溶微丸,权重 C 指实测血药浓度。

表 4 PNS 肠溶微丸(胶囊型)的体内相关性

成分	指标/%	t/h					回归方程	r
		1	1.5	2	2.5	3		
R_1	fr	30.91	87.71	98.73	99.91	100.00	$f_a = 0.552 2f_r - 15.55$	0.784 9
	fa	4.97	14.01	33.42	44.74	55.52		
Rb_1	fr	77.86	97.38	99.79	99.99	100.00	$f_a = 2.559 2f_r - 186.73$	0.877 2
	fa	15.06	41.26	65.03	77.96	82.71		
Rg_1	fr	80.98	97.83	99.83	99.99	100.00	$f_a = 2.430 9f_r - 183.07$	0.691 2
	fa	17.21	25.57	47.60	73.47	84.29		

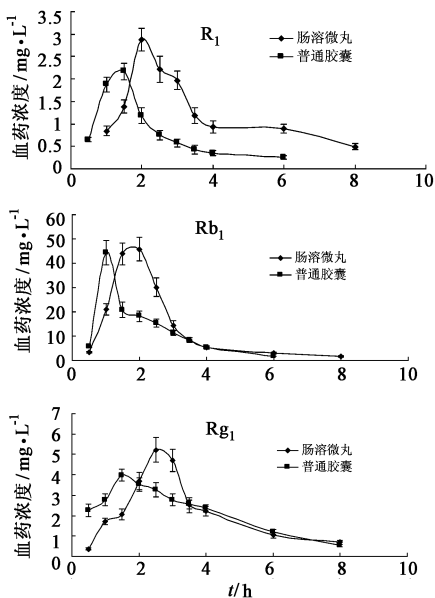


图 2 受试、参比制剂口服给药试验的平均血药浓度-时间曲线 ($n=6$)

3 讨论

Beagle 犬口服给药的结果除普通胶囊 R_1 符合二室模型外,其他各成分和自制肠溶胶囊均以一室模型拟合较好。与普通胶囊相比,自制肠溶微丸各成分在体内的平均滞留时间均有不同程度的延长,血药浓度-时间曲线也体现出达峰时间的后移,说明自制肠溶微丸不同程度地避免了胃酸对 PNS 的破坏,延长了药物在体内的滞留时间,使得 PNS 在肠

道更好地吸收。

自制肠溶微丸相对生物利用度的结果表明,与普通胶囊相比,生物利用度提高 2.52 ~ 5.21 倍。进一步证明通过制备 PNS 肠溶制剂改善 PNS 口服生物利用度差的问题思路是正确的。

在 pH 6.8 的缓冲液中 R_1, Rb_1, Rg_1 的体内相关性较差。其原因可能是 PNS 的吸收过程不仅仅是被动扩散,还包括主动转运过程,短时间大量药物的释放导致转运载体的饱和,使得药物的跨膜转运成为药物吸收的限速过程所致。而药物的体内-体外相关性良好,有一个很重要的前提条件是药物的溶出过程为药物吸收的限速过程^[5]。

[参考文献]

- [1] 马珂,汤金土.三七皂苷的实验研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2002,12(3):197.
- [2] 王陈翔,周子晔,叶其葵.57例血栓通注射液所致不良反应分析[J].药学实践杂志,2009,27(4):313.
- [3] 沈央,方晓玲.三七总皂苷脂质体的制备及其生理适应性的初步考察[J].中成药,2004,26(5):352.
- [4] 许清芳.三七总皂苷高生物利用度制剂的研究[D].上海:复旦大学,2003.
- [5] 冷静.三七通舒肠溶微丸(胶囊型)的研究[D].四川:成都中医药大学,2009.

[责任编辑 仝燕]