

三七三醇皂苷两种制剂在比格犬体内的药物动力学研究

冷 静^{1,2} 林大生³ 杨华蓉^{3*} 刘 婧¹ 万 方³

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 重庆市中医院, 重庆 400021; 3. 成都华神集团股份有限公司制药厂, 四川 成都 610225)

摘要: 目的 研究三七三醇皂苷的三七通舒胶囊和三七通舒胶囊(肠溶微丸)在比格犬体内的药动学特征。方法 采用双周期交叉试验设计, 6只比格犬分别单剂量口服14粒三七通舒胶囊、10粒肠溶微丸, 测定血浆样品中三七皂苷 R_1 (R_1)、人参皂苷 R_{g_1} (R_{g_1})、人参皂苷 Re (Re) 的含量, 数据经 3P87 药动学软件处理。结果 三七通舒胶囊、肠溶微丸中的 R_1 、 R_{g_1} 、 Re 在比格犬体内的药动学过程符合二室模型, 三七通舒胶囊在比格犬体内的药动学特征以 R_1 、 R_{g_1} 、 Re 计, $AUC_{0 \rightarrow t}$ 分别为 10.230、10.898、6.816 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2\alpha}$ 分别为 1.759、1.383、1.019 h^{-1} , $t_{1/2\beta}$ 分别为 5.159、3.687、7.177 h ; 肠溶微丸的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 分别为 10.058、13.218、6.703 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2\alpha}$ 分别为 2.074、1.652、0.887 h , $t_{1/2\beta}$ 分别为 6.032、3.922、6.292 h 。结论 两制剂中 3 种成分的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 值无显著性差异, 表明两制剂指标成分的体内过程相似, 生物利用度接近。

关键词: 三七三醇皂苷; 三七通舒胶囊; 三七通舒胶囊(肠溶微丸); 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 Re ; 药物动力学; 比格犬

中图分类号: R969

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2011)02-0158-04

Study on pharmacokinetic behavior of two preparations about protopanaxotriol saponins in Beagle dog

LENG Jing^{1,2}, LIN Da-sheng³, YANG Hua-rong^{3*}, LIU Jing¹, WAN Fang³

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, 611137 P. R. China, China; 2. Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing, 400021 P. R. China; 3. Chengdu Huashen Pharmaceutical Factory of Co. Ltd, Chengdu, Sichuan, 610225 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the pharmacokinetic behavior of Sanqi Tongshu and Sanqi Tongshu capsule (enteric pellets) in beagle dogs. **METHODS** The cross-over design (two-periods) was employed. Six Beagle dogs were orally administrated a single dosage of 14 Sanqi Tongshu capsules and 10 Sanqi Tongshu capsule (enteric pellets), respectively. The concentration of Notoginsenoside - R_1 , ginsenoside - R_{g_1} and ginsenoside - Re in plasma of 6 dogs at different sampling time were determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated by 3P87 program and compared by statistic analysis. **RESULTS** The mean concentration - curve of Notoginsenoside - R_1 , ginsenoside - R_{g_1} and ginsenoside - Re in Sanqi Tongshu capsules and Sanqi Tongshu capsule (enteric pellets) were both fitted to two-compartment model with the main pharmacokinetic parameters as follows: $AUC_{0 \rightarrow t}$ were 10.230, 10.898, 6.816 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 10.058, 13.218, 6.703 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; $t_{1/2\alpha}$ were 1.759, 1.383, 1.019 h and 2.074, 1.652, 0.887 h , respectively; $t_{1/2\beta}$ were 5.159, 3.687, 7.177 h and 6.032, 3.922, 6.292 h , respectively. **CONCLUSION** The $AUC_{0 \rightarrow t}$ of R_1 , R_{g_1} and Re in two preparations were no significant difference. Two preparations has the similar bioavailability.

Key words: Protopanaxotriol saponins; Sanqi Tongshu capsule; Sanqi Tongshu capsule (enteric pellets); Notoginsenoside - R_1 ; Ginsenoside - R_{g_1} ; Ginsenoside - Re ; Pharmacokinetic; Beagle dog

CLC number: R969

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2011)02-0158-04

三七三醇皂苷 (PTS) 为三七根茎用乙醇提取、大孔吸附树脂分离纯化后所得的人参三醇型皂苷, 主要特征成分为人参皂苷 R_{g_1} (R_{g_1})、 Re (Re) 和三七皂苷 R_1 (R_1) 等。三七通舒胶囊为已上市品种, 是将 PTS 粉填充于肠溶性空心胶囊中而得; 三七通舒胶囊(肠溶微丸)是以 PTS 为原料制备的微丸, 在包

上肠溶衣后再填充于普通空心胶囊中而得, 两者均为肠溶制剂, 主要用于治疗心脑血管栓塞性病症。尽管研究 R_{g_1} 、 Re 、 R_{b_1} 的体内药物动力学较多^[1-4], 但多数是测定其单一成分来表征体内药动学过程。现以比格犬为试验对象、黄芪甲苷为内标物、 R_{g_1} 、 Re 、 R_1 为检测指标来表征 PTS 中有效成分

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(编号: 2006BAI1B04); 2007 年度成都市科技计划项目(编号: 07GGYB074SF); 2008 年度成都市双流县科技成果孵化资金

作者简介: 冷静(1979—), 女, 四川中江, 主管中药师, 主要从事中药新药及医院制剂的研发工作。Email: ljlengjing@sina.com

* 通信作者(Correspondent author), Email: yhr_rose@hotmail.com

的总体动力学特征,并在此基础上对三七通舒胶囊及肠溶微丸体内动力学过程进行了比较,初步研究了两种制剂在体内外的过程差异性和生物等效性。

1 实验部分

1.1 仪器、试药与动物

1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent); GM-0.33 II 隔膜真空泵(天津津腾有限公司)。三七通舒胶囊(成都华神集团有限责任公司制药厂,每粒 0.2 g,含 100 mg PTS,其中 8.75% R_1 、48.48% R_{G1} 、4.82% Re,批号:080902);三七通舒胶囊(肠溶微丸)(自制,每粒 0.35 g,含 130 mg PTS,其中 9.37% R_1 、52.10% R_{G1} 、5.29% Re);三七皂苷 R_1 (R_1 ,批号:110745-200415)、人参皂苷 R_{G1} (R_{G1} ,批号:110703-200425)、人参皂苷 Re (Re,批号:110754-200421) 对照品、黄芪甲苷内标(批号:110781-2006113)(中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯;水为超纯水;其余试剂为分析纯。6 只健康 δ Beagle 犬[四川省医科院试验动物研究所,试验动物质量合格证号为 SCXK(川)2006-024],体重 12 ± 0.5 kg。

1.2 方法与结果

1.2.1 溶液的制备 取适量 R_1 对照品,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,即得 $1.595 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ R_1 对照品溶液。取适量 R_{G1} 对照品,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,即得 $1.603 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ R_{G1} 对照品溶液。取适量 Re 对照品,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并定

容,即得 $0.6676 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Re 对照品溶液。各取 1 mL 3 种对照品贮备液,置 5 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,即得 R_1 、 R_{G1} 、Re 分别为 0.3190 、 0.3206 、 $0.1335 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。取适量黄芪甲苷内标,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得 $0.537 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标溶液。上述溶液置冰箱中冷藏(溶液稳定期为 1 个月),临用前稀释。

1.2.2 血样的处理 精密量取 1.0 mL 血浆样品,依次加入 0.1 mL 内标溶液、0.5 mL 甲醇、1.0 mL 乙腈,漩涡振荡 3 min,以 $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,分取上清液,于 40°C 水浴中氮气挥干,残渣用 $350 \mu\text{L}$ 甲醇溶解,漩涡振荡 30 s,以 $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,吸取上清液置自动进样瓶导管中,进样 $20 \mu\text{L}$ 分析。

1.2.3 色谱条件 采用 Symetry Shield C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm $5 \mu\text{m}$)和 C_{18} 预柱;流动相为乙腈-水,梯度洗脱程序为:0 $\rightarrow$ 25 min,乙腈 21% $\rightarrow$ 23%、水 79% $\rightarrow$ 77%,25 $\rightarrow$ 30 min,乙腈 23% $\rightarrow$ 40%、水 77% $\rightarrow$ 60%,30 $\rightarrow$ 45 min,乙腈 40% $\rightarrow$ 45%、水 60% $\rightarrow$ 55%;流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 35°C ;检测波长 203 nm;进样量 $20 \mu\text{L}$,运行时间 45 min。在此条件下,检测到空白血浆、 R_1 + 空白血浆、 R_{G1} + 空白血浆、Re + 空白血浆、内标 + 空白血浆和血浆样品的 HPLC 色谱图(图 1)。血浆中 R_1 、 R_{G1} 、Re 和内标的峰形良好,分离完全,无内源性杂质峰干扰,以 R_1 、 R_{G1} 、Re 指标成分的色谱峰计算,理论板数不低于 3×10^3 ,对称因子为 0.85 ~ 0.88。3 种成分色谱峰之间的分离度 $R > 1.50$ 。

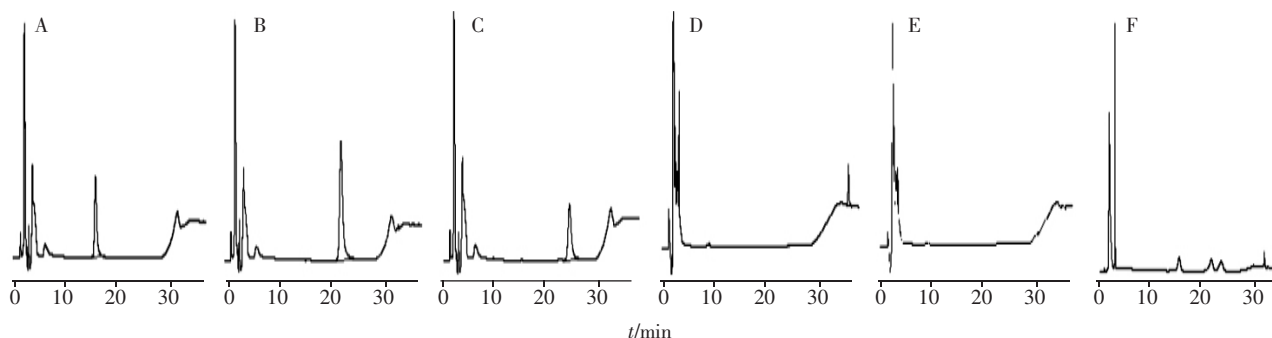


图 1 R_1 + 空白血浆(A)、 R_{G1} + 空白血浆(B)、Re + 空白血浆(C)、内标 + 空白血浆(D)、空白血浆(E)和样品(F)溶液的色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank plasma with R_1 control solution(A), blank plasma with R_{G1} control solution(B), blank plasma with Re control solution(C), blank plasma with IS solution(D), blank plasma solution(E) and sample solution(F)

1.2.4 标准曲线的制备与定量限 分别精密量取 1 mL R_1 、 R_{G1} 、Re 对照品溶液,置同一 5 mL 量瓶中,用蒸馏水定容。再分别用蒸馏水稀释成系列浓度的对照品工作液,各取 0.5 mL 加入 1.0 mL 犬空白血浆中,得到一系列含药血浆。按照“1.2.2”项下方法处理。取 $20 \mu\text{L}$ 上清液进样,测定血浆样品中

R_1 、 R_{G1} 、Re、内标的峰面积,计算药物峰面积与内标峰面积的比值。以该比值为横坐标,血浆中 R_1 、 R_{G1} 、Re 的浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为纵坐标进行线性回归,分别得到标准曲线方程为: $Y_{R_1} = 0.0303X$ ($r = 0.9989$)、 $Y_{R_{G1}} = 0.0312X$ ($r = 0.9984$)、 $Y_{Re} = 0.0356X$ ($r = 0.9983$)。 R_1 、 R_{G1} 、Re 的线性范围分别

为 0.29 ~ 290.00、0.29 ~ 291.40、0.27 ~ 267.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；将标准曲线最低浓度的供试品再依次做倍数稀释，同法处理后检测，确定 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 检测限均为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；定量限浓度是标准曲线上的最低浓度点，分别为 0.29、0.29、0.27 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.5 血浆样品的稳定性 配制含 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 的血浆样品数份，分别考察在处理 20 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 24 h、3 个周期反复冻融以及 -70°C 下冰冻 30 d 的稳定性。结果表明： R_{g1} 、 R_e 、 R_1 血浆样品的处理，于 20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 时 3 个成分的 RSD 分别为 2.58%、1.48%、0.66%；冰冻 30 d 内及反复冻融 3 周期的样品稳定，其 RSD 分别为 5.34%、4.67%、6.53% 和 4.65%、3.52%、3.09%。

1.2.6 方法的回收率及精密度 按“1.2.4”项下方法配制高、中、低浓度的血浆样品，每浓度 5 份。分别于 1 d 内和 5 d 内对样品照“1.2.4”项方法处理并测定，计算日内、日间精密度及相对回收率。回收率以测得值与加入值之比计算。回收率和精密度试验结果见表 1。结果表明：建立的血浆样品中 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 的 HPLC 方法能满足试验要求，可用于三七通舒胶囊及肠溶微丸的体内药动学研究。

表 1 精密度实验的结果 ($n=5$)

Table 1 Precision of inter-day and intra-day of concentration determination ($n=5$)

Components	Added/ μg	Inter-day		Intra-day	
		Detected/ μg	$RSD/\%$	Detected/ μg	$RSD/\%$
R_1	174.00	165.47	3.62	164.46	2.11
	34.80	31.02	3.85	30.20	2.08
	1.74	1.59	5.58	1.50	5.44
R_{g1}	174.84	162.86	2.35	160.87	3.37
	34.96	31.33	1.29	32.56	2.64
	1.74	1.56	4.47	1.57	4.63
R_e	160.20	150.52	6.64	152.76	1.15
	32.04	29.14	8.72	28.73	3.96
	1.60	1.44	9.35	1.41	7.14

表 2 方法回收率的实验结果 ($n=5$)

Table 2 Method recovery of concentration determination ($n=5$)

Components	Added/ μg	Detected/ μg	Mean recovery/ $\%$	$RSD/\%$
R_1	174.00	165.47	95.10	1.79
	34.80	31.02	89.14	2.42
	1.74	1.59	91.28	1.75
R_{g1}	174.84	162.86	93.15	1.48
	34.96	31.33	89.63	2.35
	1.74	1.56	89.39	2.39
R_e	160.20	150.52	93.96	3.07
	32.04	29.14	90.95	2.63
	1.60	1.44	90.04	2.84

1.2.7 药物动力学试验 将 6 只健康 δ Beagle 犬随机均分为 A、B 两组，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 5 mL 空白血样；给药后 5 h 进食统一餐（市售犬饲料），统一饮水。第一周期：A 组口服给予 14 粒三七通舒胶囊，B 组口服给予 10 粒肠溶微丸，两组于给药后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、10、12、16、20、24 h 时取 3 mL 犬下肢的股静脉血样；第 2 周期：A 组给予 10 粒肠溶微丸，B 组给予 14 粒三七通舒胶囊，取血点同第 1 周期。血液样品统一保存于肝素化塑料离心管中，以 $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min，分离血浆，将血浆保存于 -70°C 环境中。

1.2.8 药-时曲线 将三七通舒胶囊及肠溶微丸单剂量口服给予 6 只比格犬后，以 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 表征的药-时曲线图见图 2。

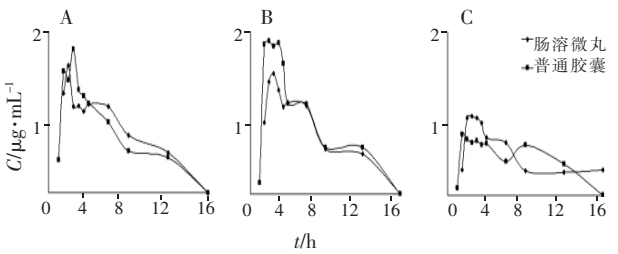


图 2 比格犬灌胃给予单剂量三七通舒胶囊及肠溶微丸后 R_1 (A)、 R_{g1} (B) 和 R_e (C) 的药-时曲线图 ($n=6$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of R_1 (A), R_{g1} (B) and R_e (C) in 6 Beagle dogs after a single oral dose of Sanqi Tongshu capsule and enteric pellets ($n=6$)

1.2.9 药动学参数 将三七通舒胶囊 (1.4 g PTS) 及肠溶微丸 (1.3 g PTS) 单剂量口服给予 6 只比格犬后，以 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 表征两种制剂的三七三醇皂苷类成分的数据，经 3p87 药动学软件分析后，3 种成分在比格犬体内的药动学过程符合二室模型，权重系数为 $1/C^2$ 。拟合度参数见表 3。两种药物口服给药后，主要成分的药动学参数计算结果见表 4。MRT 以统计矩法求得， AUC_{0-1} 以梯形法求得，与室模型无关。结果表明：PTS 两种制剂的体内过程均符合二室模型动力学过程，可观察到一个分布相 (α -phase) 和一个消除相 (β -phase)。两制剂均为

表 3 6 只比格犬灌胃给予单剂量三七通舒胶囊及肠溶微丸的房室模型

Table 3 The compartment model after po a single dose of Sanqi Tongshu capsule and enteric pellets in 6 Beagle dogs

Components	Drugs	One compartment model			Two compartment model		
		1	1/C	1/C ²	1	1/C	1/C ²
R_1	A	66.55	37.12	20.08	25.15	10.03	2.25
	B	78.66	40.21	18.15	27.17	2.69	-11.47
R_{g1}	A	51.19	40.06	22.69	17.13	6.52	-8.75
	B	63.24	30.38	5.59	41.47	10.88	-9.96
R_e	A	37.18	32.24	18.13	23.65	15.22	-9.95
	B	46.27	10.19	-9.97	18.83	6.65	-22.69

A means Sanqi Tongshu capsule; B means enteric pellets

肠溶制剂,在胃中不释放药物,进入小肠后迅速释放,其指标成分的药动学参数均较为接近。分别对两种制剂中指标成分相对应的药动学参数进行 t 检验,结果均无显著性差异($P > 0.05$)。两种制剂中 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 的 AUC_{0-1} 值无显著性差异,说明两种制剂中指标成分的体内过程相似,生物利用度基本接近。

表 4 6 只比格犬灌胃给予单剂量三七通舒胶囊及肠溶微丸的主要药动学参数($n=6$)
Table 4 Main pharmacokinetic parameters after po a single dose of Sanqi Tongshu capsule and enteric pellets in 6 Beagle dogs($n=6$)

Components		K_a/h^{-1}	$t_{1/2\alpha}/h$	$t_{1/2\beta}/h$	$AUC_{0-1}/\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	$Cl/mL \cdot h^{-1}$	MRT/h	Lag time/h
R_1	A	1.967	1.759	5.159	10.230	3.182	6.814	0.5
	B	1.485	2.074	6.032	10.058	2.263	5.695	0.4
R_{g1}	A	1.095	1.383	3.687	13.218	5.155	4.292	0.5
	B	1.464	1.652	3.922	10.898	4.732	5.144	0.3
R_e	A	0.622	1.019	7.177	6.816	4.667	7.145	0.5
	B	0.517	0.887	6.292	6.703	6.033	6.088	0.4

A means Sanqi Tongshu capsule; B means enteric pellets

2 讨论

在进行血浆样品的预处理方法时,曾对甲醇、乙醇、乙腈蛋白沉淀法和 SPE 固相萃取预处理等方法的提取效果进行比较,乙腈、乙醇沉淀蛋白时,产生块状沉淀,可能有部分有效成分被包裹在块状沉淀中,故样品的回收率稍低;采用 SPE 柱时因柱子的吸附能力有限,样品的回收率较低,且 SPE 柱价格高。最后确定采用甲醇与乙腈以一定比例处理样品。在对沉淀溶剂量与血浆量的配比进行的研究中,以血浆与甲醇、乙腈的比例为 1:1:2 的沉淀效果较好。在进行蛋白沉淀时,先缓慢加入甲醇,再加入乙腈,可使蛋白沉淀完全。该方法处理简单,稳定,样品回收率较高,且经济可行,能满足血药浓度的测定需要。试验建立了血浆样品中 PTS 主要成分 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 的 HPLC 测定方法,该方法较好地满足了 PTS 制剂在 Beagle 犬体内的药动学研究,以 PTS 的 3 个主要特征成分同时表征其体内药动学过程,更能反映其体内的整体药动学过程。比格犬体内药动学试验结果,可为三七通舒胶囊及肠溶微丸

的临床应用提供参考与借鉴。
PTS 制剂通过口服给药后在体内的代谢消除虽然缓慢,但由于检测设备所限,未能进一步的提高有效成分的检测限度。曾针对血浆样品进行指纹图谱研究,并与制剂的体外指纹图谱进行对比,发现产生了一些新的物质,对新的代谢产物及其代谢途径和机理等的探索有待深入研究。

参考文献:

[1] 冯亮,蒋学华,周静.三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的大鼠在体肠吸收动力学研究[J].中国药学杂志,2006,41(14):1097-1102.
[2] 刘奕明,杨柳,曾星,等.参麦注射液中人参皂苷 R_{g1} 和 R_e 药代动力学研究[J].药学学报,2005,40(4):365-368.
[3] 韩旻,傅韶,方晓玲.三七皂苷中人参皂苷 R_{g1} 与 R_{b1} 口服吸收及其体内药代动力学的研究和比较[J].药学学报,2007,42(8):849-853.
[4] 韩旻,韩丽妹,王青松.三七皂苷的口服吸收机制[J].药学学报,2006,41(6):498-505.
[5] 李晓宇,郝海平,王广基,等.三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J].中国天然药物,2008,6(5):377-381.

收稿日期:2010-05-20

《华西药 学杂志》继续入选 2008 年版北京大学
《中文核心期刊要目总览》之药 学类核心期刊