

三七总皂苷微乳在家兔眼部的药动学研究

邢 月， 卢 鹏， 闫宏丽， 梁春霞， 谢佳蓉， 刘志东\*  
(天津中医药大学，现代中药发现与制剂技术教育部工程中心，天津市现代中药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地，天津 301617)

**摘要：**目的 研究三七总皂苷微乳在家兔眼部的药动学。方法 微透析探针植入家兔眼前房室内，灌流平衡 1 h，耳缘静脉注射微乳和注射用血栓通（冻干）。然后，LC-MS/MS 法测定不同时间点（0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8 h）人参皂苷 R<sub>g1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量。结果 微乳组人参皂苷 R<sub>g1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 的 C<sub>max</sub>、AUC<sub>0-8 h</sub>、AUC<sub>0-∞</sub> 高于注射用血栓通（冻干）组（P<0.01），V<sub>z</sub>/F、CL/F 降低（P<0.05，P<0.01），这 2 种成分生物利用度分别为（290.62±63.64）%、（587.78±148.07）%。结论 三七总皂苷微乳可提高药物在家兔眼部的生物利用度，为其进一步研发奠定了基础。

**关键词：**三七总皂苷；微乳；药动学；LC-MS/MS  
中图分类号：R969.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2020)01-0007-05  
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.002

Pharmacokinetics of total *Panax notoginseng* saponins microemulsions in rabbit eyes

XING Yue, LU Peng, YAN Hong-li, LIANG Chun-xia, XIE Jia-rong, LIU Zhi-dong\*  
(Ministry of Education Engineering Center for Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Tianjin Municipal Key Laboratory for Modern Chinese Medicine-State Key Laboratory Breeding Base Co-founded by Province and MOST, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**ABSTRACT:** AIM To study the pharmacokinetics of total *Panax notoginseng* saponins microemulsions in rabbit eyes. **METHODS** After the implantation of microdialysis probe into the anterior chamber of rabbits and 1-hour perfusion balance, the ear edge was intravenously injected either with microemulsions or Xueshuantong Freeze-dried Powder. Subsequently, LC-MS/MS was adopted in the content determination of ginsenoside R<sub>g1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub> at different time points (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8 h). **RESULTS** The microemulsions group demonstrated higher C<sub>max</sub>, AUC<sub>0-8 h</sub> and AUC<sub>0-∞</sub> of ginsenoside R<sub>g1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub> than the Xueshuantong Freeze-dried Powder group (P<0.01), along with decreased V<sub>z</sub>/F and CL/F (P<0.05, P<0.01). The bioavailabilities of ginsenoside R<sub>g1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub> reached (290.62±63.64)% and (587.78±148.07)%, respectively. **CONCLUSION** Total *Panax notoginseng* saponins microemulsions can enhance drug bioavailability in rabbit eyes, which can lay a foundation for the further research and development.

**KEY WORDS:** total *Panax notoginseng* saponins; microemulsions; pharmacokinetics; LC-MS/MS

三七是我国传统名贵中药，具有散瘀止血、消肿定痛的作用<sup>[1]</sup>，其主要成分三七总皂苷在扩张血管、改善微循环障碍、抑制血小板凝集、缓解视网

膜缺血缺氧状态等方面疗效显著<sup>[2-4]</sup>。目前，以该成分为单一主药上市的制剂大多为注射给药制剂与口服制剂，可治疗视网膜中央静脉阻塞症、角膜

收稿日期：2019-08-15  
作者简介：邢 月（1995—），女，硕士生，从事中药制剂研究。Tel: 13116083807, E-mail: 18822181016@163.com  
\* 通信作者：刘志东（1978—），男，博士，研究员，博士生导师，从事中药新型给药系统研究。Tel: 13752581592, E-mail: liuzhidong@tjutcm.edu.cn

病、内眼病、眼前方出血、糖尿病性视网膜病变等眼部疾病<sup>[5-6]</sup>。

微乳作为一种新型药物制剂，是由水相、油相、表面活性剂、助表面活性剂，按一定比例自发形成的一种粒径 $\leq 200$  nm的分散体系<sup>[7-8]</sup>，具有黏度低、热力学稳定、制备简单、生物相容性好、注射时可减少患者疼痛感等优点<sup>[9-10]</sup>。

课题组前期制备了三七总皂苷微乳，并进行了药动学研究<sup>[11]</sup>。本实验在此基础上通过家兔耳缘静脉注射给药，研究其药动学，对相关制剂开发与改进具有一定参考意义。

## 1 材料

1.1 仪器 高压均质机（ATS工业系统有限公司）；FA25高剪切分散乳化机（德国Fluko公司）；Nano ZS激光粒径测定仪（英国Malvern公司）；KQ-400DE高功率数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q超纯水系统（美国Millipore公司）；液质联用仪（美国Agilent公司，配置Agilent 1290高效液相色谱仪、Agilent 6460三重四级杆质谱仪、MassHunter工作站）；FA124电子天平（万分之一，上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；AX205电子天平（瑞士Mettler-Toledo公司）；SZCL-4B智能磁力加热搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；CMA402微透析泵、CMA30线型微透析探针（瑞士CMA公司）。

1.2 试剂与药物 三七总皂苷原料药（云南玉溪万方天然药物有限公司，批号021108，人参皂苷 $R_{g_1}$ 质量分数44.470%，三七皂苷 $R_1$ 质量分数14.056%）；大豆磷脂（上海艾韦特医药科技有限公司，批号SY-SI-170103）；油酸聚乙二醇甘油酯（Labrafil M 1944CS，法国佳法赛公司）。人参皂苷 $R_{g_1}$ （批号110703-201832，质量分数92.4%）、三七皂苷 $R_1$ （批号110745-201820，质量分数93.1%）对照品（中国食品药品检定研究院）。注射用血栓通（冻干）（广西梧州制药集团有限公司，批号17010216，人参皂苷 $R_{g_1}$ 质量分数48.117%，三七皂苷 $R_1$ 质量分数10.370%）。去离子水（由Milli-Q纯水机制备）；其他试剂均为色谱纯。

1.3 动物 新西兰白兔，雌雄各半，体质量2.0~2.5 kg，由天津中医药大学实验动物中心提供，动物生产许可证号SCXK（津）2014-0001，动物伦理号TCM-LAEC2018031。

## 2 方法与结果

2.1 三七总皂苷微乳制备及初步评价 微乳制备

采用课题组前期报道的方法<sup>[11]</sup>，处方为58% Labrafil M 1944CS、25%磷脂/乙醇（ $K_m=1$ ）、17%三七总皂苷溶液（400 mg/mL）。按处方量称定油相、乳化剂、三七总皂苷溶液于烧杯中，50℃水浴搅拌均匀，分散3 min后80 MPa下均质5次，即得。激光粒度测定仪测定其粒径，结果见图1，可知微乳（人参皂苷 $R_{g_1}$ 、三七皂苷 $R_1$ 质量分数分别为1.983%、0.606%）平均粒径为（170.23±0.91）nm，PDI为0.29±0.01。

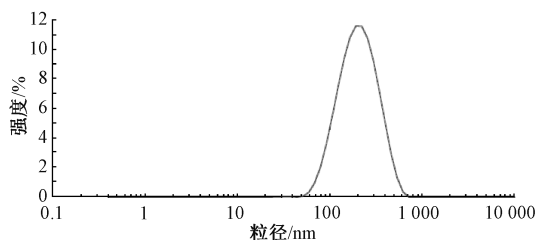


图1 微乳粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of microemulsions

### 2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH  $C_{18}$  色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.7  $\mu$ m）；流动相水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~7 min，18% B；7~13 min，18%~40% B；13~14 min，40%~18% B；14~15 min，18% B）；体积流量0.3 mL/min；柱温40℃；进样量10  $\mu$ L。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子（ESI）源，正离子模式，多反应离子监测（MRM）；人参皂苷 $R_{g_1}$   $m/z$  823.48~643.3，三七皂苷 $R_1$   $m/z$  955.52~775.3；碰撞电压，人参皂苷 $R_{g_1}$  280 V，三七皂苷 $R_1$  300 V；碰撞能量，人参皂苷 $R_{g_1}$  42 eV，三七皂苷 $R_1$  50 eV；电喷雾电压4 kV；雾化气体 $N_2$ ；喷雾气40 psi（1 psi=6.895 kPa）；干燥气温度350℃。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取空白、对照品、供试品微透析液，在“2.2”项条件下进样测定，结果见图2，可知对照品、供试品微透析液中人参皂苷 $R_{g_1}$ 、三七皂苷 $R_1$ 保留时间一致，空白微透析液无干扰，表明该方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 精密称取人参皂苷 $R_{g_1}$ 、三七皂苷 $R_1$ 对照品适量于10 mL量瓶中，甲醇稀释成每1 mL分别含两者1.022、0.98 mg的溶液，精密量取适量，0.9% NaCl溶液稀释成系列质量浓度，在“2.2”项条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回

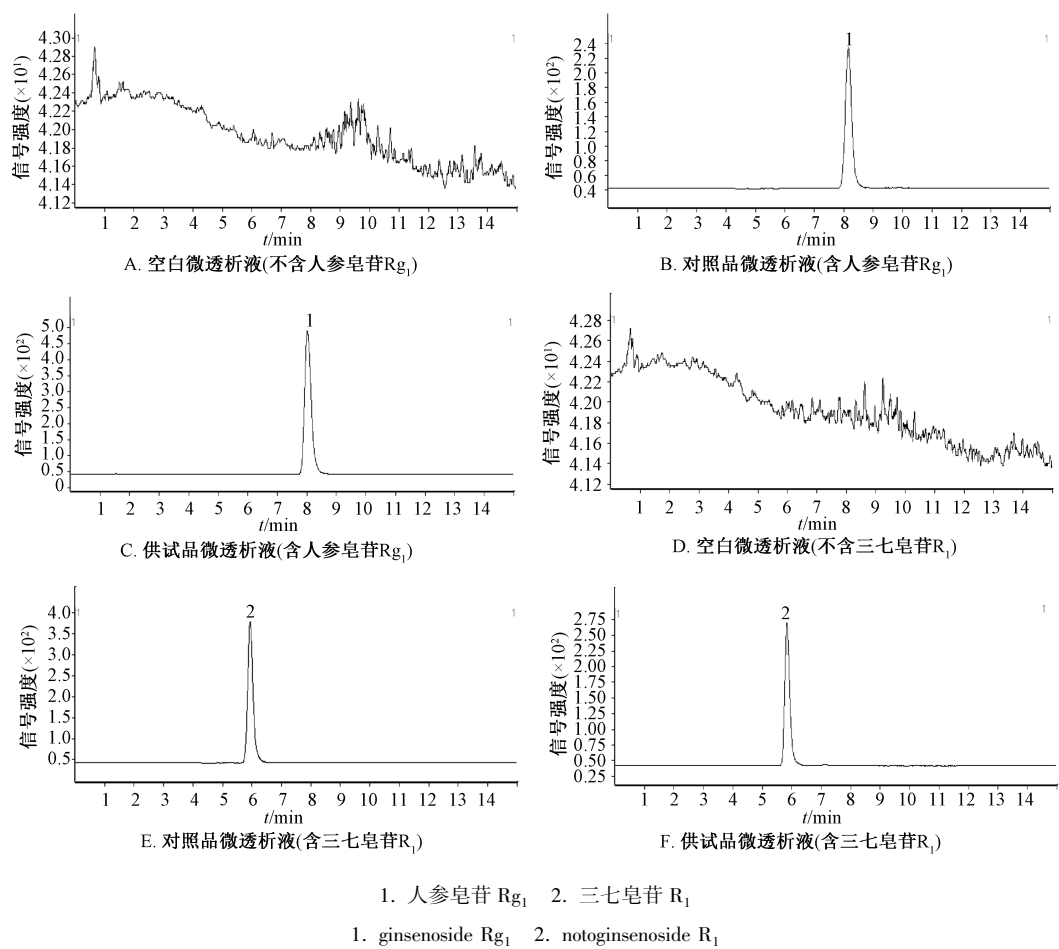


图 2 方法专属性色谱图  
Fig. 2 Chromatograms of method specificity

归, 得方程分别为  $Y = 33.562X - 5.304$  ( $R^2 = 0.999\ 4$ )、 $Y = 46.037X - 7.760$  ( $R^2 = 0.999\ 6$ ), 分别在  $0.511 \sim 511$ 、 $0.490\ 5 \sim 490.5$  ng/mL 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取低、中、高质量浓度对照品溶液, 平行 6 份, 于日内、日间在“2.2”项条件下进样测定, 结果见表 1, 可知该方法精密度良好。

表 1 各成分精密度试验结果 ( $n=6$ )					
成分	质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )		RSD/%		方法回收率/%
	加入量	测得量	日内	日间	
人参皂苷 $R_{g1}$	2.044	2.03	3.56	2.67	99.10
	204.4	204.50	1.27	1.29	100.05
	408.8	402.07	1.47	1.13	98.35
三七皂苷 $R_1$	1.962	1.97	2.19	1.30	100.38
	196.2	197.70	1.37	1.76	100.77
	392.4	396.32	0.73	1.30	101.10

2.3.4 稳定性试验 取低、中、高质量浓度对照品溶液, 平行 6 份, 在“2.2”项条件下进样测定, 考察人参皂苷  $R_{g1}$ 、三七皂苷  $R_1$  分别在室温下放置 15 h、4℃下放置 12 h 的稳定性。结果见表 2, 可知溶液在相应条件下稳定性良好。

2.4 探针体内回收率测定 实验前, 向家兔右眼

周围皮下注射盐酸利多卡因 (0.75 mL/kg) 充分麻醉<sup>[12]</sup>, 在兔眼对外部刺激无反应时撑开眼睑, 沿角膜结膜缘前将 10 mL 针头倾斜刺入眼前房室内, 沿针头一端将微透析探针的透析窗嵌入眼内, 抽出针头, 调整透析窗, 使其完全置于房水中, 针两端分别在鼻翼侧和外眼角固定<sup>[13]</sup>。然后, 将微

表 2 各成分稳定性试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of stability tests for various constituents (n=6)

成分	原有量/(ng·mL <sup>-1</sup> )	室温下 15 h		4 ℃ 下 12 h	
		测得量/(ng·mL <sup>-1</sup> )	相对误差/%	测得量/(ng·mL <sup>-1</sup> )	相对误差/%
人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	2.044	2.02	-1.05	2.02	-1.11
	204.4	201.71	-1.31	202.33	-1.01
	408.8	404.91	-0.95	404.77	-0.99
三七皂苷 R <sub>1</sub>	1.962	1.95	-0.67	1.96	0.02
	196.2	196.57	0.19	195.48	-0.37
	392.4	393.54	0.39	393.40	0.36

透析探针植入家兔眼内，使用微透析泵，以 5、25、100、500、1 000 ng/mL NaCl 溶液为灌注液，体积流量 1.5 μL/min，每种质量浓度平衡 30 min，每 30 min 收集 1 份样品，平行 3 次，测定探针体内回收率，回收率=  $[(C_d-C_p)/C_p] \times 100\%$ ，其中  $C_d$  为透析液中含药量， $C_p$  为灌注液中含药量<sup>[14]</sup>。结果，人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 探针体内回收率分别为 (28.07 ± 1.42)%、(22.74 ± 0.71)%。

2.5 药动学研究 12 只家兔随机分成 2 组，每组 6 只，分别给予微乳和注射用血栓通（冻干）溶液（精密称取血栓通冻干粉 355.4 mg 于 50 mL 量瓶中，0.9% NaCl 溶液稀释至刻度，配制成 7.108 mg/mL 溶液）。按“2.4.1”项下方法操作，以 1.5 μL/min 体积流量向探针内灌注生理盐水，平衡 1 h 后耳缘静脉注射 6.74 mg/kg 微乳和注射用血栓通（冻干）溶液（以人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 计，0.34 mL 前者相当于 1.97 mL 后者），开始收集透析液，0~6 h 每 30 min 收集 1 份，6~8 h 每 1 h 收集 1 份。然后，通过 LC-MS/MS 法测定微渗析液中人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量，WinNonlin6.0 版药动学软件、SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理与分析，组间比较采用 *t* 检验。

血药浓度-时间曲线见图 3，主要药动学参数见表 3。由此可知，微乳组人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>  $C_{max}$ 、 $AUC_{0\sim 8\text{ h}}$ 、 $V_z/F$ 、 $CL/F$  高于注射用血栓通（冻干）组 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

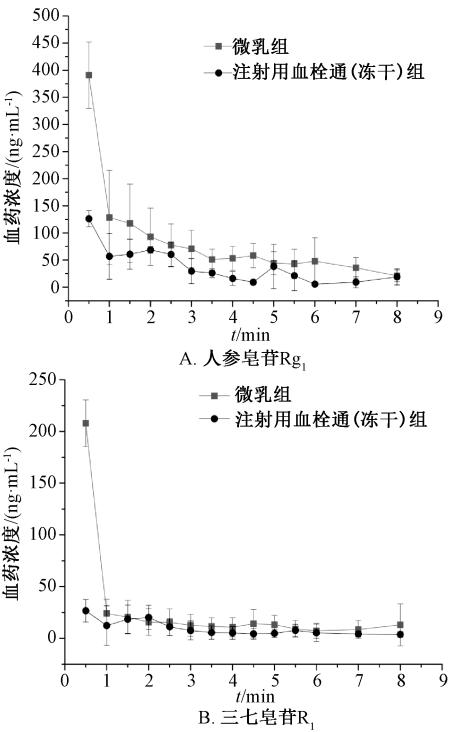


图 3 样品血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Plasma concentration-time curves for samples

表 3 样品主要药动学参数 (x̄±s, n=6)

Tab. 3 Main pharmacokinetic parameters for samples (x̄±s, n=6)

参数	单位	微乳组		注射用血栓通(冻干)组	
		人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	三七皂苷 R <sub>1</sub>	人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	三七皂苷 R <sub>1</sub>
$C_{max}$	ng·mL <sup>-1</sup>	390.90±61.15**	207.93±22.58**	126.30±14.97	27.29±12.32
$T_{max}$	h	0.50±0	0.50±0	0.50±0	0.58±0.20
$AUC_{0\sim 8\text{ h}}$	ng·mL <sup>-1</sup> ·h	1 150.79±319.24**	821.30±373.47**	392.73±21.87	100.35±47.59
$AUC_{0\sim \infty}$	ng·mL <sup>-1</sup> ·h	1 247.37±280.87**	914.95±347.29**	444.59±22.30	120.59±57.13
$L_z$	h <sup>-1</sup>	0.28±0.17	0.31±0.18	0.40±0.11	0.28±0.15
$T_{1/2}$	h	2.90±1.00	3.06±1.74	1.86±0.62	3.09±1.49
$V_z/F$	mL·kg <sup>-1</sup>	53 370.80±26 712.20*	18 538.41±15 071.60**	108 563.54±47 658.71	142 623.12±67 106.61
$CL/F$	mL·kg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	12 216.84±6 026.92**	3 570.53±1 608.81**	40 476.44±15 945.50	33 044.93±4 848.04
MRT	h	1.34±0.99	0.51±0.56*	1.98±1.28	1.88±1.27

注:与注射用血栓通(冻干)组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

### 3 讨论与结论

三七总皂苷为水溶性成分，分子结构大，不易透过血眼屏障，故可利用其微乳给药系统提高其渗透性，改善其在眼部的生物利用度。本实验基于微透析技术，通过兔耳缘静脉注射三七总皂苷微乳及注射用血栓通（冻干）进行眼部药动学研究，发现相较于注射用血栓通（冻干）组，三七总皂苷微乳组人参皂苷  $R_{g_1}$ 、三七皂苷  $R_1$  的  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-8h}$  显著升高， $V_z/F$ 、 $CL/F$  显著降低，生物利用度分别为  $(290.62 \pm 63.64)\%$ 、 $(587.78 \pm 148.07)\%$ ，表明三七总皂苷微乳在家兔眼内消除速度慢，可显著增加药物在眼部的浓度，从而更好地透过血眼屏障，提高生物利用度。其原因一方面是由于三七总皂苷微乳中的油相可增强其亲脂性，进而提高药物血眼屏障渗透性<sup>[15]</sup>；另一方面，微乳粒径较小，可增大药物与眼部的接触面积，更易透过血眼屏障，从而促进药物吸收<sup>[16]</sup>。

本实验采用的 LC-MS/MS 法准确度高，专属性好。另外，三七总皂苷微乳组人参皂苷  $R_{g_1}$ 、三七皂苷  $R_1$  在家兔眼部中的药物浓度到达  $C_{max}$  后迅速下降，其原因有待进一步研究。本实验通过兔耳缘静脉注射三七总皂苷微乳，利用其高渗透、小粒径特性提高了三七总皂苷在眼部的生物利用度，为其治疗眼部疾病及相关制剂开发奠定了基础。

#### 参考文献：

[ 1 ] 居乃香, 孙 静. 三七药理作用的研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(11): 90-91.

[ 2 ] Shi S M, Liu Y Z, Tai W, *et al.* Smashing tissue extraction and HPLC determination of active saponins from different parts of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 340-344.

[ 3 ] 姚 青, 周 月, 芦晓红, 等. 三七总皂苷对糖尿病大鼠视网膜病变内皮素-1 表达的影响[J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39(5): 388-391.

[ 4 ] 李芮琳, 孙作艳, 王金鑫, 等. 注射用血栓通对 2 型糖尿病 GK 大鼠视网膜病理结构的影响[J]. 天津中医药, 2018, 35(2): 124-126.

[ 5 ] 娄 赞. 眼底病采用复方血栓通胶囊治疗的临床效果分析[J]. 现代诊断与治疗, 2018, 29(12): 1897-1899.

[ 6 ] 刘海峰, 赵永厚. 血栓通胶囊联合疏肝通滞方加减治疗眼底出血的效果观察[C] //中国医药教育协会神经外科专业委员会第二届学术年会论文集. 厦门: 中国医药教育协会神经外科专业委员会, 2018: 292-294.

[ 7 ] 周丽娟, 刘清飞, 陈 曦, 等. 药用微乳应用概况与发展趋势[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(22):1839-1843; 1853.

[ 8 ] Alkrad J A, AlKhatib H S, Musa R J. Formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of ferrous sulfate loaded microemulsions [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2019, 53: 101149.

[ 9 ] 章 一. 微乳在现代药剂学中的研究进展[J]. 科技展望, 2016, 26(35): 264.

[10] 王 聪. 叶黄素静脉注射亚微乳的实验研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2011.

[11] Liu Z D, Zhang Q, Ding L L, *et al.* Preparation procedure and pharmacokinetic study of water-in-oil nanoemulsion of *Panax notoginseng* saponins for improving the oral bioavailability [J]. *Curr Drug Deliv*, 2016, 13(4): 600-610.

[12] Wang S Y, Li D, Pi J X, *et al.* Pharmacokinetic and ocular microdialysis study of oral *ginkgo biloba* extract in rabbits by UPLC-MS/MS determination[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2017, 69(11): 1540-1551.

[13] 姚 晨, 周绣棣, 曲 涛, 等. 微渗析技术研究葛根素滴眼液麻醉家兔眼内药动学[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(16): 2236-2239.

[14] 宋继科, 毕宏生, 郭俊国, 等. 冰片对盐酸青藤碱滴眼液角膜透过性的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1321-1323.

[15] Li X R, Yuan Q, Huang Y Q, *et al.* Development of silymarin self-microemulsifying drug delivery system with enhanced oral bioavailability[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2010, 11(2): 672-678.

[16] 王 敏, 林 茂, 高仕琴, 等. 白藜芦醇口服自微乳在大鼠体内药代动力学的研究[J]. 广东医科大学学报, 2017, 35(4): 362-366.