

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 Rg₁、三七皂苷 R₁ 含有量。结果 微乳组人参皂苷 Rg₁、三七皂苷 R₁ 的 C_{max} 、 AUC_{0-8h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 高于注射用血栓通（冻干）组（ $P<0.01$ ）， V_z/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 Rg₁ and notoginsenoside R₁ 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_{max} , AUC_{0-8h} and $AUC_{0-\infty}$ of ginsenoside Rg₁ and notoginsenoside R₁ than the Xueshuantong Freeze-dried Powder group ($P<0.01$), along with decreased V_z/F and CL/F ($P<0.05$, $P<0.01$). The bioavailabilities of ginsenoside Rg₁ and notoginsenoside R₁ 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^[1]，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^[2-4]。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^[5-6]。

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≤200 nm 的分散体系^[7-8]，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^[9-10]。

课题组前期制备了三七总皂苷微乳，并进行了药动学研究^[11]。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 Rg₁ 质量分数 44.470%，三七皂苷 R₁ 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 Rg₁（批号 110703-201832，质量分数 92.4%）、三七皂苷 R₁（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 Rg₁ 质量分数 48.117%，三七皂苷 R₁ 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^[11]，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 Rg₁、三七皂苷 R₁ 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。

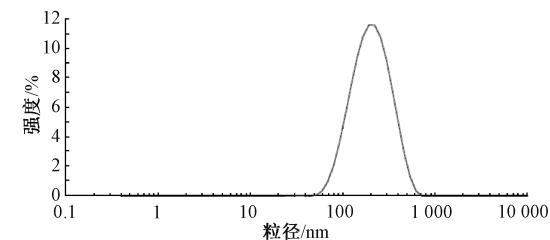


图 1 微乳粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of microemulsions

2.2 含有量测定

2.2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；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 μL。

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 Rg₁ m/z 823.48~643.3，三七皂苷 R₁ m/z 955.52~775.3；碰撞电压，人参皂苷 Rg₁ 280 V，三七皂苷 R₁ 300 V；碰撞能量，人参皂苷 Rg₁ 42 eV，三七皂苷 R₁ 50 eV；电喷雾电压 4 kV；雾化气体 N₂；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 Rg₁、三七皂苷 R₁ 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 Rg₁、三七皂苷 R₁ 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

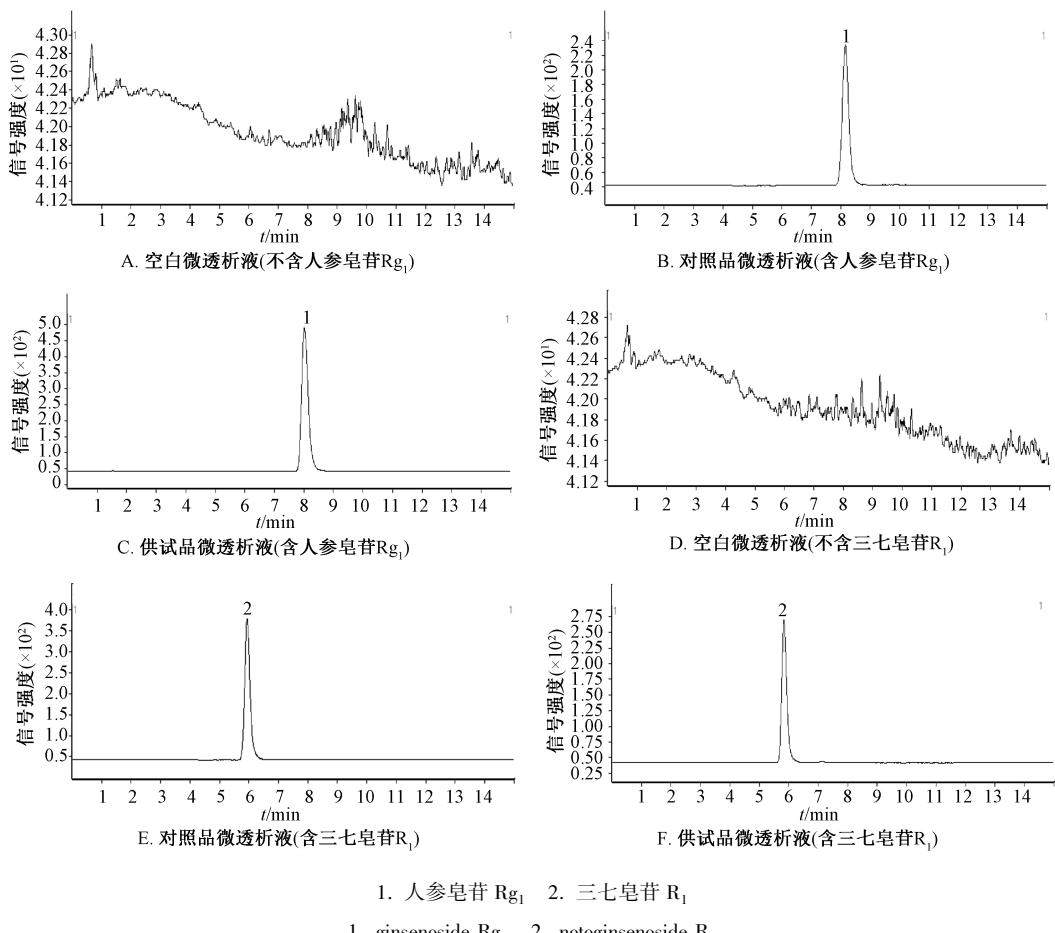
1. 人參皂苷 Rg_1 2. 三七皂苷 R_1 1. ginsenoside Rg_1 2. notoginsenoside R_1

图2 方法专属性色谱图

Fig. 2 Chromatograms of method specificity

归, 得方程分别为 $Y = 33.562X - 5.304$ ($R^2 = 0.9994$)、 $Y = 46.037X - 7.760$ ($R^2 = 0.9996$), 分别在 $0.511 \sim 511$ 、 $0.4905 \sim 490.5$ 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 ($n=6$)Tab. 1 Results of precision tests for various constituents ($n=6$)

成分	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		RSD/%		方法回收率/%
	加入量	测得量	日内	日间	
人參皂苷 Rg_1	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, 考察人參皂苷 Rg_1 、三七皂苷 R_1 分别在室温下放置15 h、4 °C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^[12], 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^[13]。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 ⁻¹)	室温下 15 h		4 ℃下 12 h	
		测得量/(ng·mL ⁻¹)	相对误差/%	测得量/(ng·mL ⁻¹)	相对误差/%
人参皂苷 Rg ₁	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 ₁	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 μ L/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= $\left[(C_d - C_p) / C_p \right] \times 100\%$, 其中 C_d 为透析液中含药量, C_p 为灌注液中含药量^[14]。结果, 人参皂苷 Rg₁、三七皂苷 R₁ 探针体内回收率分别为 (28.07 \pm 1.42)%、(22.74 \pm 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 μ L/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 Rg₁ 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 法测定微透析液中人参皂苷 Rg₁、三七皂苷 R₁ 含有量, 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 Rg₁、三七皂苷 R₁ C_{max} 、 AUC_{0-8h} 、 V_z/F 、 CL/F 高于注射用血栓通(冻干)组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

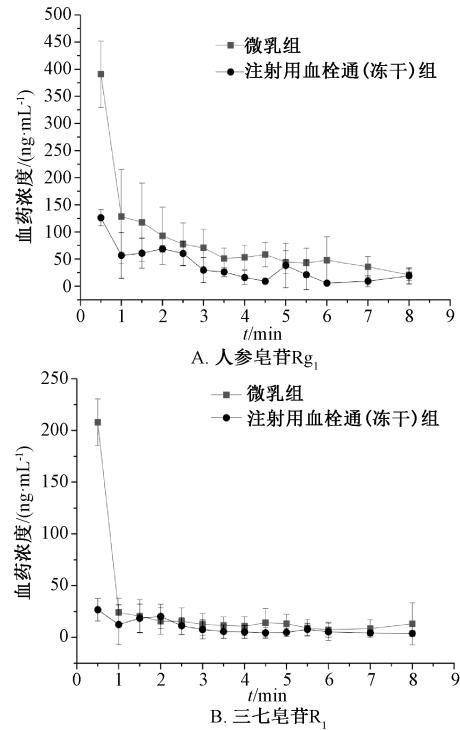


图3 样品血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Plasma concentration-time curves for samples

表3 样品主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, n=6)Tab. 3 Main pharmacokinetic parameters for samples ($\bar{x} \pm s$, n=6)

参数	单位	微乳组		注射用血栓通(冻干)组	
		人参皂苷 Rg ₁	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 Rg ₁	三七皂苷 R ₁
C_{max}	ng·mL ⁻¹	390.90 \pm 61.15 **	207.93 \pm 22.58 **	126.30 \pm 14.97	27.29 \pm 12.32
T_{max}	h	0.50 \pm 0	0.50 \pm 0	0.50 \pm 0	0.58 \pm 0.20
AUC_{0-8h}	ng·mL ⁻¹ ·h	1 150.79 \pm 319.24 **	821.30 \pm 373.47 **	392.73 \pm 21.87	100.35 \pm 47.59
$AUC_{0-\infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	1 247.37 \pm 280.87 **	914.95 \pm 347.29 **	444.59 \pm 22.30	120.59 \pm 57.13
L_z	h ⁻¹	0.28 \pm 0.17	0.31 \pm 0.18	0.40 \pm 0.11	0.28 \pm 0.15
$T_{1/2}$	h	2.90 \pm 1.00	3.06 \pm 1.74	1.86 \pm 0.62	3.09 \pm 1.49
V_z/F	mL·kg ⁻¹	53 370.80 \pm 26 712.20 *	18 538.41 \pm 15 071.60 **	108 563.54 \pm 47 658.71	142 623.12 \pm 67 106.61
CL/F	mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	12 216.84 \pm 6 026.92 **	3 570.53 \pm 1 608.81 **	40 476.44 \pm 15 945.50	33 044.93 \pm 4 848.04
MRT	h	1.34 \pm 0.99	0.51 \pm 0.56 *	1.98 \pm 1.28	1.88 \pm 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Rg₁、三七皂苷R₁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±63.64)%、(587.78±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。其原因之一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^[15];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^[16]。

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Rg₁、三七皂苷R₁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] 娄贊.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.微透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.