

三七总皂苷鼻腔给药的药代动力学与药效学

吴云娟, 朱晓艺, 沙先谊, 方晓玲*

(复旦大学 药学院 药剂教研室, 上海 200032)

摘要: 目的 研究三七总皂苷鼻腔用粉雾剂以混悬液形式给药后在大鼠体内的药代动力学过程及对心脑血管疾病的保护作用。方法 HPLC测定三七总皂苷混悬液大鼠鼻腔给药后血样中人参皂苷 R_{g1} 的浓度,考察药物在体内的动力学过程,并计算其绝对生物利用度;结扎 SD大鼠的左冠状动脉建立急性缺血性心肌梗死模型,夹闭沙鼠的双侧颈总动脉建立脑缺血再灌注模型,考察三七总皂苷混悬液对心脑血管疾病的保护作用。结果 三七总皂苷混悬液鼻腔给药后, R_{g1} 在大鼠体内的过程符合二室模型,其绝对生物利用度为 103.56%;对大鼠急性缺血性心肌梗死及沙鼠脑缺血再灌注所引起的脑水肿和脑卒中症状均具有明显的缓解作用,且呈剂量依赖性,剂量越高,保护作用越强。结论 药代动力学和药效学结果证明,三七总皂苷鼻腔给药制剂具有很好的开发前景。

关键词: 三七总皂苷; 鼻腔给药; 药代动力学; 急性缺血性心肌梗死; 脑缺血再灌注

中图分类号: R969.1; R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)04 - 0377 - 05

The pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasal preparation of *Panax notoginseng* Saponins

WU Yun-juan, ZHU Xiao-yi, SHA Xian-yi, FANG Xiao-ling*

(Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Aim To investigate the pharmacokinetic course of intranasal powders of *Panax notoginseng* Saponins (PNS) in a rat model and its protective effects against cardio-cerebrovascular diseases administered in the form of its suspension. **Methods** After administration, R_{g1} concentration in the serum was analyzed by HPLC and the absolute bioavailability was calculated. The protective effects against cardio-cerebrovascular diseases were studied on acute myocardial infarction model in rats built by occlusion of left coronary artery and cerebral ischemia-reperfusion model in gerbils built by occlusion of bilateral common carotid artery (CCA). **Results** The *in vivo* course of R_{g1} in rats conformed to two-compartment model after intranasal administration of PNS suspension and the absolute bioavailability was 103.56%. The suspension significantly reduced myocardial infarct size induced by occlusion of the left coronary artery, alleviated cerebral edema and the stroke symptoms induced by occlusion of bilateral common carotid artery (CCA). And the effects were dose-dependent, the higher dose, the better effects. **Conclusion** The results of pharmacokinetics and pharmacodynamics demonstrated that PNS intranasal preparation has a pretty prospect to develop.

Key words: *Panax notoginseng* Saponins; intranasal administration; pharmacokinetics; acute myocardial infarction; cerebral ischemia-reperfusion

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. Chen.] 是我国的一种名贵中药,对心脑血管、神经、免疫等多

个系统的疾病均具有明显的治疗效果。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* Saponins, PNS) 是三七的主要活性部位,现代药理学研究表明其对心脑血管疾病具有多种治疗作用,尤其对缺血性心肌梗死和脑梗死具有很好的治疗效果,其中人参皂苷 R_{b1} 和 R_{g1} 是 PNS 的主要活性成分。由于口服和静脉给药系统均

收稿日期: 2004-09-06.

基金项目: 复旦大学科技创新基金资助项目 (C9 - 104).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 54237432,

E-mail: xlfang@shmu.edu.cn

存在明显的不足,本实验室对 PNS鼻腔给药制剂进行了研究,发现其具有较高的生物利用度^[1]。本课题在已有研究基础上,进一步筛选处方,改进工艺条件,对其鼻腔用粉雾剂进行了系统的研究,以 SD大鼠为动物模型,考察三七总皂苷粉雾剂以混悬液形式鼻腔给药后的药代动力学过程及其生物利用度;并结扎 SD大鼠的左冠状动脉建立急性缺血性心肌梗死模型,夹闭沙鼠的双侧颈总动脉建立脑缺血再灌注模型,考察该混悬液对心脑血管疾病的保护作用。

材料与amp;方法

药品、辅料和试剂 三七总皂苷(PNS)(复旦大学药学院生药教研室陈道峰教授提供,其凭证标本为DFC-SQ-9901);人参皂苷 Rb1 和 Rg1 化学对照品(中国药品生物制品检定所);微晶纤维素(microcrystalline cellulose, MCC, PH101)(日本旭化成公司惠赠);中等粘度羟丙基纤维素(moderate viscosity hydroxypropyl cellulose, H-HPC)(日本信越公司惠赠);血塞通注射液(批号 2000107,昆明兴中制药厂);乙腈和甲醇(HPLC级);其他试剂均为分析纯。

仪器 色谱柱(大连依利特科学仪器有限公司);LC-10AT高效液相色谱仪(日本岛津);SPD-10A紫外可见波长检测器(日本岛津);OASISR固相萃取小柱(美国);TKR-200c小动物呼吸机(江西省特力麻醉呼吸设备公司)。

实验动物 SD大鼠(复旦大学上海医学院实验动物中心),♀♂各半,(250±30)g;蒙古沙鼠(浙江省实验动物中心),♀♂各半,(50±20)g。

鼻腔用粉雾剂的制备 PNS与相应量MCC的混悬液经行星式研磨仪研磨,在-70℃低温冰箱中预冻2h,在 7×10^3 MPa真空条件下继续冷冻干燥24h,得冻干粉过筛后与H-HPC混合,即得粉雾剂。

体内样品分析方法 按文献^[1,2]方法,取血清0.2 mL加磷酸4 μL,旋涡离心后过柱,N₂吹干。进样前,残渣加三蒸水0.2 mL,旋涡离心,取上清液进样分析,以外标法峰面积定量。

色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈柱(5 μm, 4.6 mm × 200 mm),调节乙腈和20 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄溶液的比例,使Rg1的出峰时间适当,与血样杂质的分离度符合要求,其他色谱条件同文献^[2]报道。

大鼠体内药代动力学过程考察 健康SD大鼠9只,随机均分为3组,分别为①静脉注射组:血塞通注射液通过尾静脉给药,剂量为18 mg·kg⁻¹,给

药后分别于0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0和48.0 h从大鼠尾静脉取血0.5 mL置于1.5 mL Ependoff管中,室温静置3 h,5 000 r·min⁻¹离心10 min,分离出血清0.2 mL,于-20℃冷冻备用;②鼻腔用溶液剂组:PNS溶液滴入大鼠鼻腔内,剂量为18 mg·kg⁻¹,给药后分别于0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0和48.0 h从大鼠尾静脉取血0.5 mL置于1.5 mL Ependoff管中,如上分离出血清;③鼻腔用混悬液组:临用前将粉雾剂配制成混悬液滴入大鼠鼻腔内,剂量为18 mg·kg⁻¹,取血点与溶液剂相同,如上分离血清。

按血样预处理方法处理血样,HPLC测定血样中Rg1的含量。PNS鼻腔用混悬液中Rg1绝对生物利用度的计算公式为

$$F_{ab}(\%) = \frac{AUC_{(in)} / Dose_{(in)}}{AUC_{(iv)} / Dose_{(iv)}} \times 100\%$$

其中AUC为血药浓度-时间曲线下的面积。

对大鼠急性缺血性心肌梗死的保护作用^[3] SD大鼠,10%水合氯醛(3 mL·kg⁻¹, ip)麻醉,气管插管。经胸骨旁切口纵行开胸,立即正压人工呼吸(工作压力0.01 MPa,呼吸频率90次·min⁻¹,呼吸比值2.5/1),暴露心脏,于肺动脉圆锥与左心耳之间,离起源2-3 mm处用(圆3/8, 2.5×8, 5/0带线缝合针)锦纶线结扎左冠状动脉根部。SD大鼠42只,随机均分成7组:①对照组,大鼠左冠状动脉结扎,但不给药;②血塞通注射液组,大鼠尾静脉注射血塞通注射液,剂量为12 mg·kg⁻¹;③PNS口服溶液剂组,PNS溶液大鼠灌胃,剂量为12 mg·kg⁻¹;④、⑤、⑥和⑦PNS鼻腔用混悬液极低、低、中和高剂量组,PNS鼻腔用粉雾剂临用前配成混悬液,鼻腔给药,剂量分别为3, 6, 12和18 mg·kg⁻¹。用药组在给药1 h后结扎左冠状动脉,4 h后处死大鼠,取心脏,-20℃冷冻15 min,再将心脏横切成厚薄均匀的薄片,置于pH 7.8的1% TTC磷酸盐缓冲液中,于37℃染色15 min,分离梗死心肌和正常心肌(梗死心肌呈白色,非梗死心肌呈暗红色),分别称重,计算梗死心肌占全心湿重的百分比(%),即心肌梗死面积,以此为指标评价药物对急性缺血性心肌梗死的保护作用。

对沙鼠脑缺血再灌注的保护作用^[4] 蒙古沙鼠,5%水合氯醛(6 mL·kg⁻¹, ip)麻醉后,分离双侧颈总动脉,用无创伤动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成脑缺血。去除夹闭,即再灌注。沙鼠42只,随机均

分成 7 组: ①假手术组, 仅分离双侧颈总动脉, 不夹闭; ②脑缺血再灌注组, 即对照组, 双侧颈总动脉夹闭 1 h, 再灌注 4 h; ③血塞通注射液组, 沙鼠股静脉注射血塞通注射液, 剂量为 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; ④PNS 口服溶液剂组, PNS 溶液沙鼠灌胃, 剂量为 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; ⑤、⑥和 ⑦ PNS 鼻腔用混悬液低、中和高剂量组, PNS 粉雾剂临用前配成混悬液, 鼻腔给药, 剂量分别为 6、12 和 $18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。用药组给药后, 双侧颈总动脉夹闭 1 h, 再灌注 4 h。

检测指标: (1) 卒中指数的观察和计算: 参照 Ohno 法计算沙鼠脑缺血再灌注 4 h 内的卒中指数, 其中竖毛震颤、运动减少、听力减弱、眼睑下垂各判 1 分, 抬头症、眼球固定、后肢瘫痪、癫痫各判 3 分, 昏迷判 6 分, 记录 $1 \text{次} \cdot \text{h}^{-1}$, 并计算总和; (2) 脑组织含水量的测定: 采用干湿重法, 灌注 4 h 后, 沙鼠迅速断头取脑, 用滤纸尽可能吸干血液和体液, 称脑组织样品湿重 (W) 后, 置 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温干燥箱中干燥 6 h 至恒重, 并精称干脑重 (D), 脑组织含水量 (%) = $(W - D) / W \times 100\%$ 。

结果

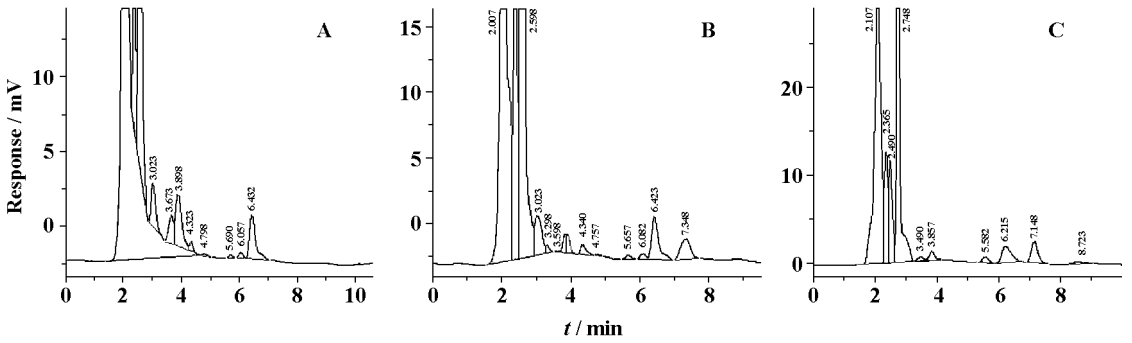
1 粉雾剂外观

冻干所得粉末疏松易过筛, 呈无定形, 与 H-HPC 混合后得颜色均一的淡黄色粉末。

2 药代动力学考察结果

2.1 体内样品分析方法的建立 当乙腈- $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 为 24:76 时, Rgl 的保留时间为 7.3 min。空白血样、 $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Rgl 血样标准液及 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PNS 血样溶液的色谱图见图 1。由图可见, 溶剂及血样中的杂质对测定没有干扰。在该色谱条件下, 标准曲线方程是 $A = 1166.8C - 2718.2$ ($r^2 = 0.9996$), 线性范围为 $1.5 - 150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限为 15 ng 。在标准曲线范围内提取回收率为 $57.97\% - 62.99\%$, 方法回收率为 $95.96\% - 103.50\%$ 。

2.2 大鼠体内药代动力学过程考察结果 以取血时间为横坐标, Rgl 血药浓度为纵坐标绘制药时曲线, 血塞通注射液组和 PNS 鼻腔用混悬液组结果分别见图 2 和图 3。



A: Blank serum sample; B: $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Rgl standard serum sample; C: $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PNS serum sample

Figure 1 HPLC chromatograms of Rgl blood sample when the ratio of acetonitrile to $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ solution was 24:76 ($t_R = 7.3 \text{ min}$)

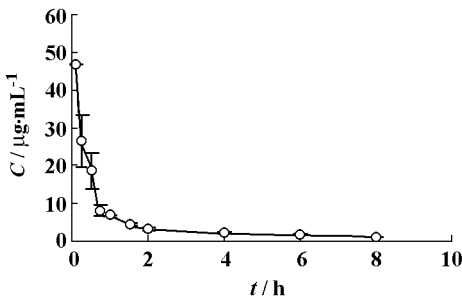


Figure 2 The curve of Rgl blood concentration vs time after intravenous administration of ginsenoside injection ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

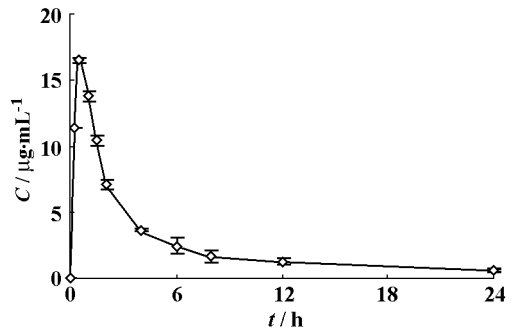


Figure 3 The curve of Rgl blood concentration vs time after intranasal administration of *Panax notoginseng* Saponins (PNS) suspension ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

其中, PNS鼻腔用溶液剂组除 C_{max} 外, 其他取样点的浓度均在检测限以下, 且 T_{max} 明显滞后。

应用 3P87 实用药代动力学计算机程序, 分别对上述血药浓度测定数据进行模型拟合。根据残差平方和 (SUM)、Akaike's 法、拟合度法 (r^2) 等房室模型判断标准进行选择。结果判定, 大鼠单次静脉注射血塞通注射液及单次鼻腔给予混悬液 Rgl 的体内过程符合双室模型, 在此基础上计算药代动力学参数结果见表 1。

Table 1 Pharmacokinetics parameters of ginsenoside injection and intranasal suspension

Parameter	$\bar{x} \pm s$	
	Intravenous	Intranasal
$A/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	54 ± 10	22 ± 5
$B/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5.1 ± 0.3	3.7 ± 1.8
α/h^{-1}	3.22 ± 0.13	0.84 ± 0.16
β/h^{-1}	0.200 ± 0.020	0.09 ± 0.04
K_a/h^{-1}	-	5.5 ± 2.0
Lag time/h	-	0.10 ± 0.05
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.220 ± 0.010	0.84 ± 0.15
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	3.46 ± 0.27	9 ± 4
$T_{1/2K_a}/\text{h}$	-	0.14 ± 0.05
$V_c/\text{mL} \cdot \text{mg} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	0.31 ± 0.05	0.82 ± 0.07
T_{max}/h	-	0.50 ± 0.00
$C_{max}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	-	16.5 ± 0.4
$CL_s/\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}$	0.43 ± 0.03	0.29 ± 0.03
K_{21}/h^{-1}	0.47 ± 0.06	0.22 ± 0.12
K_{10}/h^{-1}	1.40 ± 0.14	0.36 ± 0.04
K_{12}/h^{-1}	1.55 ± 0.04	0.36 ± 0.08
MRT/h	1.75 ± 0.09	3.27 ± 0.07
$AUC/\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	42.3 ± 2.8	43.8 ± 2.0

经计算, 鼻腔用粉雾剂中 Rgl 的绝对生物利用度为 103.56%。

3 药效学考察结果

3.1 对大鼠急性缺血性心肌梗死的保护作用 各实验组大鼠的心肌梗死面积见表 2。

实验证明, PNS鼻腔用混悬液对大鼠急性缺血性心肌梗死具有明显的保护作用, 且呈显著的剂量依赖性, 剂量越高, 保护作用越强; 混悬液中、高剂量组的治疗效果与血塞通注射液组无显著性差异, 低剂量组疗效比注射液组差, 但优于极低剂量组和口服溶液剂组, 后两组几乎没有疗效。

3.2 对沙鼠脑缺血再灌注的保护作用 各实验组的脑水肿程度和卒中指数见表 3。

实验证明, PNS鼻腔用混悬液高剂量组能显著减轻沙鼠脑缺血再灌注所引起的脑水肿程度, 但效果不及血塞通注射液组, 其他各组对脑水肿均无明

显作用; 而混悬液低、中、高三个剂量组均能显著缓解沙鼠脑缺血再灌注过程中出现的卒中症状, 且与血塞通注射液组没有显著性差异, 而口服组几乎没有治疗作用。

Table 2 Effects of *Panax notoginseng* Saponins (PNS) preparations on myocardial infarct size in a rat model of acute myocardial infarction ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Group	Drug dosage / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Myocardial infarct weight to total heart weight/%
Control	-	15.3 ± 1.7
Ginsenoside injection	12	4.6 ± 1.9*
PNS oral solution	12	14.8 ± 1.6
PNS intranasal suspension	3	14.5 ± 0.8 ^c
	6	10.3 ± 1.0* ^s
	12	4.9 ± 1.6* ^{△s}
	18	3.5 ± 1.2* ^{△s}

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P > 0.05$ vs ginsenoside injection group; ^s $P < 0.05$, the comparison in the different dose groups of PNS intranasal suspension

Table 3 Effects of PNS preparations on brain edema and stroke index during cerebral ischemia-reperfusion in gerbils ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cerebral hydration/%	Stroke index
Sham	-	73.0 ± 0.7 ^c	
Control	-	78.2 ± 0.6	23.2 ± 1.8
Ginsenoside injection	12	74.5 ± 0.6 ^c	12.0 ± 1.4 ^c
PNS oral solution	12	78.4 ± 1.1	20 ± 4
PNS intranasal suspension	6	77.6 ± 0.8	14.5 ± 2.1 [△]
	12	76.7 ± 1.6	13.2 ± 2.5 [△]
	18	76.2 ± 1.0 ^c	12.5 ± 2.6 [△]

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P > 0.05$ vs ginsenoside injection group

讨论

PNS在溶液状态不稳定, 因此本课题研究了固体制剂——PNS粉雾剂。由于大鼠及沙鼠为小动物, 较难以干粉形式给药, 所以在药代动力学及药效学考察时, 为了便于给药, 临用前将其配成混悬液。为了进一步了解粉雾剂通过鼻腔给药后的药代动力学过程, 作者将以干粉形式给药, 考察其在家兔体内的药代动力学过程。

大鼠体内药代动力学考察结果表明, PNS以混悬液形式鼻腔给药后, Rgl 的生物利用度等同于血塞通注射液静脉给药。但是, PNS溶液剂鼻腔给药后几乎没有吸收, 有可能 PNS溶液滴入鼻腔后, 由

于黏性低,很快通过鼻腔纤毛的清除作用推进到鼻咽处,进而进入胃肠道,吸收滞后,吸收量少。而PNS混悬液中添加了生物粘附性材料 H-HPC, H-HPC可与鼻腔表面黏液层中的糖蛋白通过物理或化学作用相互缠绕粘连,减少纤毛的清除,使药物在鼻腔黏膜表面的停留时间延长,吸收增加。另外,PNS混悬液中还添加了水不溶性材料 MCC,文献^[5]报道其具有促进黏膜透过作用,对PNS的吸收也可以产生一定的促进作用。

药效学实验结果显示,混悬液鼻腔给药能显著降低大鼠急性缺血性心肌梗死面积,对沙鼠脑缺血再灌注所引起的脑水肿和卒中症状均具有明显的缓解作用,而且这种保护作用具有剂量依赖性,剂量越高,保护作用越强。混悬液对心肌梗死和卒中症状的保护作用等效于相同剂量的血塞通注射液静脉给药,而相同剂量的溶液剂口服给药几乎没有疗效。但是,混悬液对脑水肿的治疗效果不及对卒中症状的保护作用,确切原因有待于进一步探讨。

以上研究结果预示,本课题所研制的鼻腔给药制剂有可能为临床提供一种使用方便、安全、疗效高、患者顺应性好的新剂型。本课题通过对中药鼻

腔制剂的研究,也为中药现代化的发展提供了一些有益的参考。

References

- [1] Xu QF, Fang XL, Chen DF, *et al.* Studies on formulations of Panax notoginsenosides for intranasal administration [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, **38**(11): 859 - 862.
- [2] Xu QF, Fang XL, Chen DF. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, **84**(2 - 3): 187 - 192.
- [3] Ding QL, Kuang LX, Sun YC, *et al.* The therapeutic effect of isosorbide-5-mononitrate on myocardial infarction in coronary artery ligated rats [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, **29**(6): 456 - 458.
- [4] Guo ZY, Wu YP, Li SH, *et al.* Effect of ginsenoside injection on the cerebral ischemia and reperfusion in gerbils [J]. *Acad J Kunming Med Coll* (昆明医学院学报), 1999, **20**(2): 1 - 2.
- [5] Suzuki Y, Makino Y. Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer [J]. *J Control Release*, 1999, **62**(1 - 2): 101 - 107.