

· 中药工业 ·

三种达玛烷型皂苷的生物药剂学分类及吸收机制研究<sup>△</sup>苏元元<sup>1</sup>, 付宇<sup>2</sup>, 李楠楠<sup>2</sup>, 高尧春<sup>2</sup>, 刘海波<sup>2</sup>, 董政起<sup>1,2\*</sup>

(1. 延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002;

2. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]** 目的: 探究人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 的生物药剂学分类(BCS)及吸收机制。方法: 首先运用 StarDrop 软件预测三种皂苷的溶解特性及其吸收是否受 *P*-糖蛋白(*P*-gp)调控, 进一步通过实验测定三种皂苷的溶解度, 并以 Caco-2 细胞单层为模型进行双向转运实验, 通过研究时间、给药浓度、*P*-gp 抑制剂对模型药物转运的影响, 确定其 BCS 分类及初步吸收机制。结果: 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 为高溶解性药物, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 为低溶解性药物。StarDrop 模型预测溶解性与 *P*-gp 结果和实际结果存在一定差异。三种药物的表观渗透系数( $P_{app}$ )均小于  $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 为低渗透性药物, 在 Caco-2 细胞单层的转运呈时间和浓度依赖性,  $P_{app(BL-AP)/(AP-BL)}$  均小于 1.5。维拉帕米能降低人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 的转运速率, 对人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 无影响。结论: 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rg<sub>1</sub> 为 BCS III 类药物, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 为 BCS IV 类药物。三种药物均以被动转运为主, 且转运不受 *P*-gp 调控, 同时维拉帕米对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 的转运有抑制作用。

**[关键词]** 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 生物药剂学分类; Caco-2 细胞单层模型; 表观渗透系数; StarDrop

## Biopharmaceutics Classification and Absorption Mechanism of Three Kinds of Dammarane Saponins

SU Yuan-yuan<sup>1</sup>, FU Yu<sup>2</sup>, LI Nan-nan<sup>2</sup>, GAO Yao-chun<sup>2</sup>, LIU Hai-bo<sup>2</sup>, DONG Zheng-qi<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the BCS classification and absorption mechanism of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub>. **Methods:** The StarDrop software was used to predict the solubility of three saponins and whether their absorption was regulated by *P*-gp. The solubility of three saponins was further determined by experiments. The Caco-2 monolayer membrane was used as a model for the bidirectional transport experiments. By studying the effect of time, concentration and *P*-gp inhibitor on the transport of the model drugs, the BCS classification and preliminary absorption mechanism of the model drugs were determined. **Results:** Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> were highly soluble drugs, and notoginsenoside R<sub>1</sub> was a low solubility drug. The solubility and *P*-gp results predicted by the StarDrop model were somewhat different from the actual result. The apparent permeability coefficients( $P_{app}$ ) of the three drugs were less than  $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , indicating that they were low permeability drugs. The transport of compounds in Caco-2 was in a time and concentration dependent manner,  $P_{app(BL-AP)/(AP-BL)}$  were less than 1.5. Verapamil could reduce the transport rate of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub>, and has no effect on ginsenoside Rb<sub>1</sub>. **Conclusion:** Ginsenoside Rb<sub>1</sub> and ginsenoside Rg<sub>1</sub> are BCS III drugs, and notoginsenoside R<sub>1</sub> is a BCS IV drug. The three drugs are mainly passively transported, and the transport is not regulated by *P*-gp, and Verapamil inhibited the transport of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub>.

**[Keywords]** Ginsenoside Rb<sub>1</sub>; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; notoginsenoside R<sub>1</sub>; biopharmaceutics classification; Caco-2 cell monolayer model; apparent permeability coefficients; StarDrop

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180322005

<sup>△</sup> [基金项目] “重大新药创制”国家科技重大专项(2015ZX09501005); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-012)

\* [通信作者] 董政起, 副研究员, 研究方向: 中药新剂型新技术及新药研发; Tel: (010)57833253, E-mail: zqdong@implad.ac.cn

达玛烷型皂苷是人参、三七、绞股蓝等中药材的主要药效成分<sup>[1]</sup>。研究表明,达玛烷型皂苷具有抗肿瘤、改善心肌缺血、免疫调节、降血糖、抗休克、保肝、镇静安神等作用<sup>[2-3]</sup>,具有广阔的应用前景。但是,从天然药物中提取的达玛烷型皂苷大多口服生物利用度低,严重影响了其充分利用<sup>[4]</sup>。溶解性和渗透性是中药口服药物成药性的核心。因此,探究此类药物的生物药剂学分类(BCS)及转运机制,尽早地发现和解决溶解度与渗透性问题,提高其成药性显得尤为重要。

实验参照FDA制定的BCS评价指南<sup>[5]</sup>及《中华人民共和国药典》2015版凡例中溶解度测定方法<sup>[6]</sup>,测定不同pH下药物的溶解度。通过建立Caco-2细胞单层模型<sup>[7]</sup>,运用较为简单、快速、低成本的体外渗透性试验,评价药物的渗透性并研究

其初步的吸收机制。为探究药物的吸收转运与极性的关系<sup>[8]</sup>,实验选择药用价值相对较高的人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>为模型药物。其中达玛烷为母核,人参皂苷Rg<sub>1</sub>含2个糖基、三七皂苷R<sub>1</sub>含3个糖基、人参皂苷Rb<sub>1</sub>含4个糖基,(结构见图1)。对其进行BCS分类研究,为中药新药和剂型的设计提供理论依据。

同时,由于中药单体普遍存在提取率低、成本较高的特点,本实验采用StarDrop软件预测模型药物在水中的溶解特性,并预测药物的吸收是否受P-糖蛋白(P-gp)外排作用影响,与药物实际溶解性及转运实验结果相比较,探究StarDrop模型预测结果的可行性,为其他中药单体性质判断提供一种简单、有效的方法。

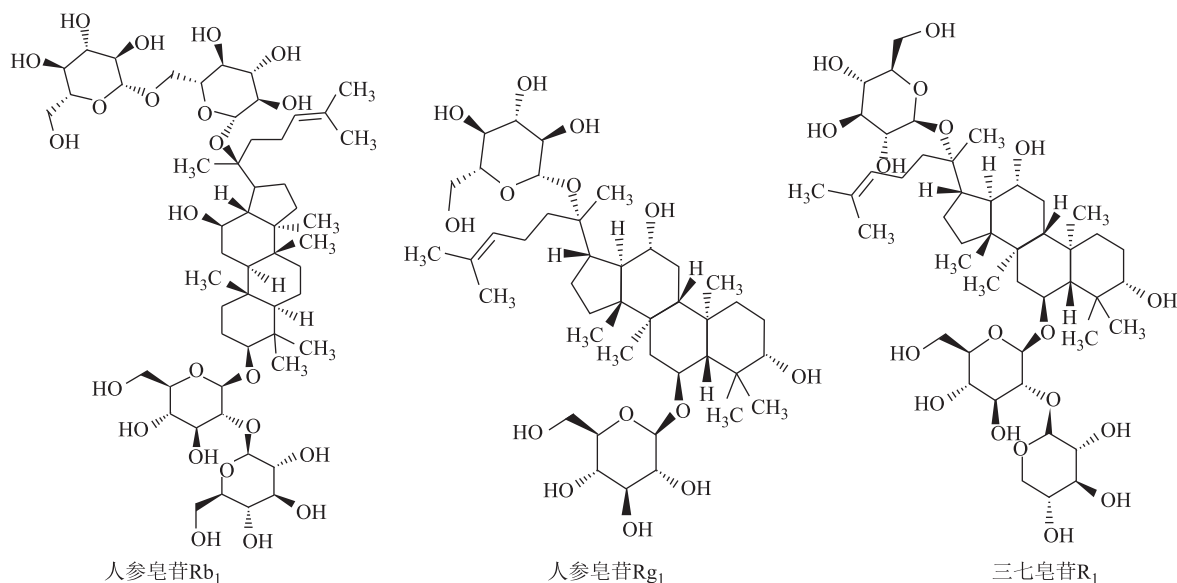


图1 三种达玛烷型皂苷的结构

## 1 材料

### 1.1 仪器

INC108型CO<sub>2</sub>培养箱(德国MEMMERT公司); SCB-1220型超净台(北京东联哈尔仪器有限公司); Millcell-ERS型电阻仪(美国Millipore公司); Spectra max 190型酶标仪(美国MD公司); Agilent-1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

### 1.2 细胞

Caco-2细胞(北京协和医学院基础医学研究所细胞中心)。

### 1.3 药品与试剂

人参皂苷Rb<sub>1</sub>(纯度98.58%,批号MUST-17060106)、人参皂苷Rg<sub>1</sub>(纯度99.70%,批号MUST-17021414)、三七皂苷R<sub>1</sub>(纯度98.67%,批号MUST-16112110),均购于成都曼斯特生物科技有限公司;胎牛血清、非必需氨基酸、双抗、0.25%胰酶(Gibco公司);MEM培养基(Hyclone Thermo公司);二甲基亚砜(Sigma公司);磷酸缓冲液(PBS)、HANK'S(Solarbio公司);MTT(Amresco公司);12孔Transwell TM培养板(1.12 cm<sup>2</sup>, 0.4 μm, Corning公司);96孔细胞培养板、T-25细胞培养瓶(Corning公司);甲醇、乙腈(MREDA公司)。

## 2 方法

### 2.1 StarDrop 软件预测溶解度

实验运用 StarDrop 软件中 ADME QSAR 模型, 将受试化合物结构的 InChI 数据录入, 得出化合物在水中的溶解度及是否受 *P*-gp 调控。

### 2.2 溶解性实验

2.2.1 溶解性测定 对于单体化合物, 美国 FDA 工业指导原则指出: 在 37 °C 下, pH 在 1~7.5 范围内, 剂量/溶解度比值(D: S ratio)小于 250 mL 的药物为高溶解性药物, 即  $D_0 \leq 1$ <sup>[5]</sup>。本实验根据人体药物吸收部位的 pH 值及《中华人民共和国药典》2015 年版中溶解性的测定方法选取 pH 1.2、pH 4.0、pH 6.8、水(pH5.8)四种环境为溶解介质, 测定药物在 37 °C 下的溶解性。精密称取化合物过量于离心管中, 每个药品各称量四份, 分别加入水(pH 5.8)、pH 6.8 缓冲液、pH 4.0 缓冲液、pH 1.2 缓冲液 2000  $\mu$ L, 置于 37 °C 摇床震荡 3 h, 30 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 25 min, 取上清液 5  $\mu$ L, 适当稀释后过 0.22  $\mu$ m 滤膜, 进 HPLC 测药物浓度, 重复三次, 按下式计算溶解度及  $D_0$  值。

$$D_0 = (M_0/V_0)/C_s \quad (1)$$

其中  $V_0$  为 250 mL,  $C_s$  为溶解度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $M_0$  为人的最大给药剂量 ( $\text{mg}$ )。

2.2.2 HPLC 检测 色谱条件为 Agilent 5 TC  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)和 SEP  $C_{18}$  保护柱(8.0 mm  $\times$  100 mm); 进样量 20  $\mu$ L, 流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温 30 °C。流动相: 人参皂苷  $R_{b1}$  为乙腈-水(35:65), 人参皂苷  $R_{g1}$ 、三七皂苷  $R_1$  均为乙腈-水(23:77)。检测波长: 均为 203 nm。标准曲线、日内精密度、日间精密度、回收率均符合定量检测求。

### 2.3 渗透性实验

2.3.1 Caco-2 细胞的培养 将 Caco-2 细胞复苏后培养于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 、90% 湿度的培养箱中。所用培养基为含胎牛血清 10%、青霉素-链霉素双抗 1%、谷氨酸和非必需氨基酸 1% 的 MEM 培养液。隔天换液, 培养 4~6 d 时细胞长至 80%~90%, 然后进行传代。所用细胞在 20~50 代之间<sup>[9]</sup>。

2.3.2 药物的细胞毒性实验 实验采用 MTT 法测定药物在 Caco-2 细胞中的毒性。将  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100  $\mu$ L, 培养板边缘填充无菌 PBS 各 100  $\mu$ L。置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 、

90% 湿度的培养箱中培养 24 h。吸弃培养液, 加不同浓度受试药物 100  $\mu$ L (不含胎牛血清培养基配制), 其中人参皂苷  $R_{b1}$ 、人参皂苷  $R_{g1}$ 、三七皂苷  $R_1$  的给药浓度均为 20、40、60、80、100、150、200、300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每个浓度平行 5 次, 调零组和阴性对照组均加相应体积培养液。培养 12 h 后, 每孔加 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu$ L (PBS 配制), 培养 4 h 后弃去培养液, 每孔加 150  $\mu$ L DMSO, 置摇床震荡 10 min, 完全溶解后用酶标仪测各孔在 570 nm 处的吸光值(A), 计算细胞抑制率。选取抑制率低于 10% 的高、中、低三个浓度进行转运实验。

$$\text{细胞抑制率}(\%) = [(A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}) - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}})] / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\% \quad (2)$$

2.3.3 跨膜转运模型的建立 将培养至 80%~90% 的 Caco-2 细胞按  $2 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种于 12 孔 Transwell 培养板中, 培养板顶侧(AP)加 0.5 mL 细胞悬液, 培养板底侧(BL)加 1.5 mL 培养液, 置于培养箱培养 19~21 d, 隔天换液。将电阻仪的干燥电极放入 PBS 溶液中平衡 2 h, 然后用 75% 酒精消毒 10 min, 测量细胞在第 19~21 d 的跨膜电阻(TEER)。测量时先测空白膜电阻(未接种细胞), 再测接种 Caco-2 细胞的 Transwell 培养板膜两侧电阻值, 相减即为实际膜电阻( $\Delta\Omega$ ), 当 TEER 值大于 500  $\Omega$  即可用于转运实验。

$$\text{TEER} = \Delta\Omega \times A (\text{有效膜面积}) \quad (3)$$

2.3.4 药物双向转运实验 根据细胞毒性实验结果选择高、中、低三个浓度进行 AP $\rightarrow$ BL 与 BL $\rightarrow$ AP 侧双向转运实验, 探究药物转运与给药浓度及转运时间的关系, 实验药物均由 HANK'S 溶液配制。实验前吸弃两侧培养液, 取预热 37 °C 的 HANK'S 溶液, AP 侧 0.5 mL、BL 侧 1.5 mL, 各洗涤两次。然后, 置培养箱孵育 20 min, 测膜两侧跨膜电阻 TEER, 选择电阻值相近的膜孔进行转运实验。对于 AP $\rightarrow$ BL 侧的转运: AP 侧加 0.5 mL 药物, BL 侧加 1.5 mL 空白 HANK'S 溶液, BL 侧取样; 对于 BL $\rightarrow$ AP 侧的转运: BL 侧加 1.5 mL 药物, AP 侧加 0.5 mL 空白 HANK'S 溶液, AP 侧取样。每个药物浓度平行 3 个复孔, 分别于 15、30、60、90、120、150、180 min 取样 200  $\mu$ L, 并补加空白预热的 HANK'S 溶液 200  $\mu$ L。实验结束时再次测定 TEER 值。将样品过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜后, 取 20  $\mu$ L 进 HPLC 按 2.1.3 色谱条件进行含量测定。计算表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ )。

$$P_{app} = (dQ/dt) / (A \times C_0) \quad (4)$$

其中,  $P_{app}$  ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 为表观渗透系数,  $dQ/dt$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 为药物单位时间转运量,  $C_0$  ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为药物在供给室的初始浓度,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) 为转运膜面积。

2.3.5  $P$ -gp 功能对药物吸收的影响 实验选择  $P$ -gp 抑制剂维拉帕米为参比药物, 考察三种皂苷的跨膜转运是否受  $P$ -gp 外排作用影响。实验组为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  维拉帕米与皂苷合用给药, 对照组为不含维拉帕米的

受试药物, 实验方法同 2.2.4 中  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  侧的转运实验。检测皂苷在各个时间的透过量, 计算  $P_{app}$ 。

### 3 实验结果

#### 3.1 溶解性实验结果

根据溶解性结果可知(见表 1), 人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 、 $\text{Rg}_1$  在三种 pH 条件及水中的  $D_0$  均小于 1, 为高溶解性药物; 三七皂苷  $\text{R}_1$  的  $D_0 > 1$ , 为低溶解性药物。

表 1 3 种达玛烷型皂苷的溶解性判断 ( $n=3$ )

| 化合物                | $D_0$  |        |       |        | 溶解性    |        |   |        |
|--------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|---|--------|
|                    | pH 1.2 | pH 4.0 | 水     | pH 6.8 | pH 1.2 | pH 4.0 | 水 | pH 6.8 |
| 人参皂苷 $\text{Rb}_1$ | 0.049  | 0.053  | 0.067 | 0.045  | 高      | 高      | 高 | 高      |
| 人参皂苷 $\text{Rg}_1$ | 0.093  | 0.093  | 0.094 | 0.094  | 高      | 高      | 高 | 高      |
| 三七皂苷 $\text{R}_1$  | 4.680  | 3.750  | 3.880 | 3.840  | 低      | 低      | 低 | 低      |

#### 3.2 药物给药浓度筛选结果

实验结果见表 2, 细胞抑制率在 10% 以下的人参皂苷  $\text{Rb}_1$  浓度范围为  $20 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$  安全浓度范围为  $20 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、三七皂苷  $\text{R}_1$  的安全浓度范围为  $20 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 3 个达玛烷型皂苷的浓度筛选 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 化合物                | 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 抑制率 (%)          |
|--------------------|-------------------------------------|------------------|
| 人参皂苷 $\text{Rb}_1$ | 100                                 | $1.26 \pm 0.035$ |
|                    | 150                                 | $3.50 \pm 0.028$ |
|                    | 200                                 | $8.80 \pm 0.23$  |
| 人参皂苷 $\text{Rg}_1$ | 100                                 | $3.98 \pm 0.13$  |
|                    | 200                                 | $4.44 \pm 0.08$  |
|                    | 300                                 | $7.01 \pm 0.07$  |
| 三七皂苷 $\text{R}_1$  | 40                                  | $4.88 \pm 0.08$  |
|                    | 80                                  | $4.14 \pm 0.41$  |
|                    | 100                                 | $8.71 \pm 0.04$  |

#### 3.3 时间和给药浓度对药物转运的影响

图 2 和表 3 表明, 人参皂苷  $\text{Rb}_1$  在  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  与  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  侧的转运量随着时间的增长而增大, 且 3 h 内未达到饱和, 具有时间依赖性。随着药物浓度的增加, 转运量随之增加 ( $P < 0.05$ ), 具有浓度依赖性。 $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  侧转运速率为  $7.59 \times 10^{-6} \sim 12.50 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 在  $1 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  附近, 推测其为中等吸收。 $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  侧与  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  侧,  $P_{app}$  均小于  $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 说明人参皂苷  $\text{Rb}_1$  为低

渗透性药物。高、中、低三浓度的  $P_{app}(\text{BL-AP})/(\text{AP-BL})$  分别为 0.94、0.86、1.23, 均小于 1.5, 说明人参皂苷  $\text{Rb}_1$  以被动转运为主<sup>[10]</sup>。

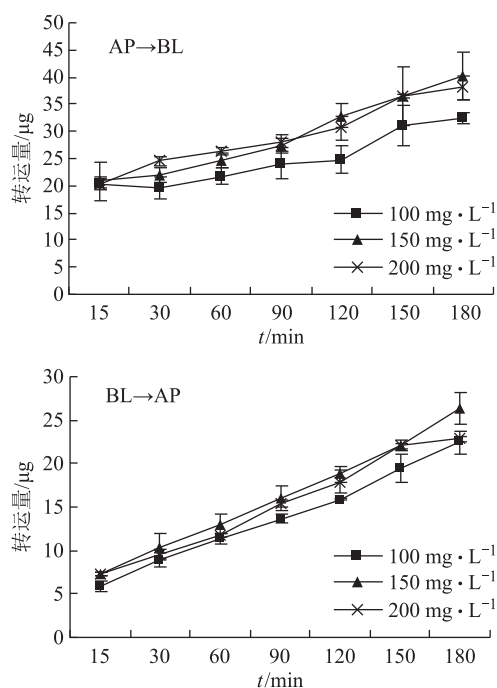


图 2 人参皂苷  $\text{Rb}_1$   $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$ 、 $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  方向的转运量随时间和浓度的变化

图 3 和表 3 表明, 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  在  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  侧与  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  侧的转运量随着时间的增长而增大, 且 3 h 内未达到饱和, 具有时间依赖性。随着药物浓度的增加, 同一时间下  $\text{AP} \rightarrow \text{BL}$  侧转运量随之增加 ( $P < 0.05$ ),  $\text{BL} \rightarrow \text{AP}$  侧无显著变化, 说明人参皂苷  $\text{Rg}_1$

在AP→BL侧以被动转运为主。AP→BL人参皂苷R<sub>g1</sub>转运速率为 $1.19 \times 10^{-6} \sim 4.17 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,推测其为中等吸收。双侧转运的 $P_{\text{app}}$ 均小于 $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,说明人参皂苷R<sub>g1</sub>为低渗透性药物。高、中、低三浓度的 $P_{\text{app(BL-AP)/(AP-BL)}}$ 分别为1.12、0.84、0.86,均小于1.5说明人参皂苷R<sub>g1</sub>以被动转运为主。

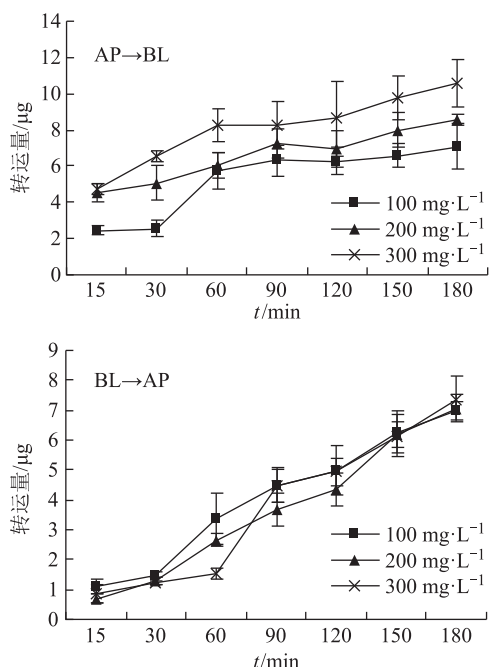


图3 人参皂苷R<sub>g1</sub> AP→BL、BL→AP方向转运量随时间和浓度的变化

图4和表3表明,三七皂苷R<sub>1</sub>在AP→BL与BL→AP侧的转运量随着时间的增长而增大,且3 h内未达到饱和,具有时间依赖性。随着药物浓度的增加,同一时间下AP→BL与BL→AP侧转运量随之增加( $P < 0.05$ )。AP→BL三七皂苷R<sub>1</sub>转运速率为 $6.98 \times 10^{-6} \sim 10.04 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 推测其为中等吸收。双侧转运的 $P_{\text{app}}$ 均小于 $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,说明三七皂苷R<sub>1</sub>为低渗透性药物。高、中、低三浓度的 $P_{\text{app(BL-AP)/(AP-BL)}}$ 分别为0.94、0.88、1.04,均小于1.5说明三七皂苷R<sub>1</sub>以被动转运为主。

### 3.4 维拉帕米对药物转运的影响

实验结果表明,与对照组相比,实验组的人参皂苷R<sub>b1</sub>的转运速率无显著变化( $P > 0.05$ ),说明人参皂苷R<sub>b1</sub>的转运不受P-gp的调控。加入P-gp抑制剂维拉帕米后,实验组的人参皂苷R<sub>g1</sub>与三七皂苷R<sub>1</sub>的转运速率均明显降低( $P < 0.05$ ),见图5。说明

维拉帕米对人参皂苷R<sub>g1</sub>与三七皂苷R<sub>1</sub>的转运具有抑制作用。

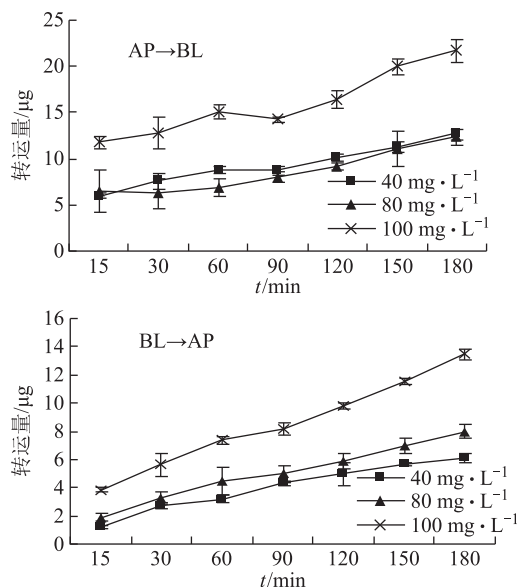
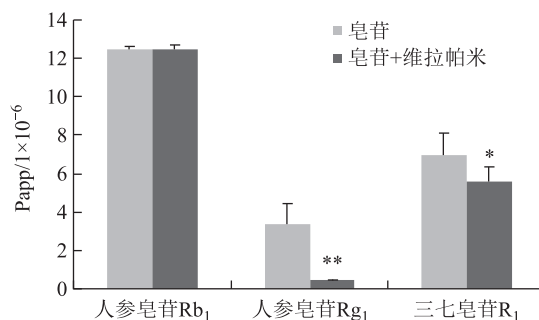


图4 三七皂苷R<sub>1</sub> AP→BL、BL→AP方向转运量随时间和浓度的变化

表3 3个达玛烷型皂苷的渗透性测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 化合物                  | 浓度/<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | $P_{\text{app AP} \rightarrow \text{BL}} /$<br>$\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ | $P_{\text{app BL} \rightarrow \text{AP}} /$<br>$\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ | $P_{\text{app BL} \rightarrow \text{AP}} /$<br>$P_{\text{app AP} \rightarrow \text{BL}}$ |
|----------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 人参皂苷 R <sub>b1</sub> | 100                                    | $11.61 \pm 0.00$                                                                               | $14.28 \pm 0.04$                                                                               | 1.23                                                                                     |
|                      | 150                                    | $12.50 \pm 0.11$                                                                               | $10.71 \pm 0.15$                                                                               | 0.86                                                                                     |
|                      | 200                                    | $7.59 \pm 0.01$                                                                                | $7.14 \pm 0.05$                                                                                | 0.94                                                                                     |
| 人参皂苷 R <sub>g1</sub> | 100                                    | $4.17 \pm 0.30$                                                                                | $3.57 \pm 0.21$                                                                                | 0.86                                                                                     |
|                      | 200                                    | $3.35 \pm 0.33$                                                                                | $2.83 \pm 0.52$                                                                                | 0.84                                                                                     |
|                      | 300                                    | $1.19 \pm 0.42$                                                                                | $1.34 \pm 0.00$                                                                                | 1.12                                                                                     |
| 三七皂苷 R <sub>1</sub>  | 40                                     | $10.04 \pm 0.00$                                                                               | $10.42 \pm 1.30$                                                                               | 1.04                                                                                     |
|                      | 80                                     | $6.98 \pm 0.03$                                                                                | $6.14 \pm 0.61$                                                                                | 0.88                                                                                     |
|                      | 100                                    | $8.57 \pm 0.80$                                                                                | $8.40 \pm 0.00$                                                                                | 0.94                                                                                     |



注: 人参皂苷R<sub>b1</sub>组 $P > 0.05$ ; 人参皂苷R<sub>g1</sub>组 $**P < 0.01$ ; 三七皂苷R<sub>1</sub>组 $*P < 0.05$ 。

图5 维拉帕米对三种皂苷转运的影响( $n=3$ )

### 3.5 StarDrop 模型预测结果与实际结果比较

采用 StarDrop 模型预测的三七皂苷  $R_1$  溶解性与实际结果一致, 另两种药物溶解性预测结果与实际相差较大。三种皂苷预测的结果均为  $P$ -gp 底物, 与实验结果不符。实验结果见表 4。

表 4 3 种达玛烷型皂苷在水中真实溶解性与模型预测溶解性结果

| 化合物           | 实验结果                                                  |           |         | 预测结果                                                  |           |         |
|---------------|-------------------------------------------------------|-----------|---------|-------------------------------------------------------|-----------|---------|
|               | $S_{\text{实际}}$<br>( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 溶解性<br>实际 | $P$ -gp | $S_{\text{预测}}$<br>( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 溶解性<br>预测 | $P$ -gp |
| 人参皂苷 $R_{b1}$ | 139.55                                                | 易溶解       | 否       | 7.36                                                  | 微溶        | 是       |
| 人参皂苷 $R_{g1}$ | 76.63                                                 | 溶解        | 否       | 4.81                                                  | 微溶        | 是       |
| 三七皂苷 $R_1$    | 2.28                                                  | 溶解        | 否       | 6.15                                                  | 微溶        | 是       |

## 4 讨论

溶解性是中药成药性的一个重要因素, 是早期药物成药性评价的必要条件。美国 FDA 指导原则规定的高溶解性药物主要针对已知剂量的化学药物<sup>[5]</sup>。中药成分复杂, 中药单体成分并没有明确的给药剂量, 因此本实验参照徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中人和动物间等效剂量换算方法, 将模型药物口服药物代谢动力学实验中大鼠的最高给药剂量<sup>[11-13]</sup>换算为人的剂量, 作为人最高给药剂量  $M_0$ 。得出人参皂苷  $R_{b1}$ 、人参皂苷  $R_{g1}$ 、三七皂苷  $R_1$  给药剂量  $M_0$  分别为 1.11、1.67、2.22 g。以此计算  $D_0$  值, 判断 37 °C 条件下, 模型药物在水 (pH 5.8)、pH 6.8 缓冲液、pH 4.0 缓冲液、pH 1.2 缓冲液环境中的溶解性。由  $D_0$  值可知, 人参皂苷  $R_{b1}$ 、人参皂苷  $R_{g1}$  均为高溶解性药物, 三七皂苷  $R_1$  为低溶解性药物。

美国 FDA 指导原则对 BCS 分类中渗透性评价标准为: 高渗透性药物是指在没有证据表明药物在胃肠道不稳定情况下, 在肠道吸收达到 90% 以上的药物, 否则即为低渗透性药物<sup>[5]</sup>。Donna A. Volpe 等<sup>[14]</sup>验证了 BCS 评价标准, 通过 Caco-2 细胞单层模型研究 23 个模型药物的  $P_{\text{app}}$  值, 然后与这 23 个模型药物通过人体小肠吸收  $f_a$  值比较, 建立了以 Caco-2 细胞模型培养 21 天时的药物转运渗透性高低评价标准, 临界  $P_{\text{app}}$  值为  $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。本实验中, 三个皂苷的双向转运  $P_{\text{app}}$  值均小于  $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 说明人参皂苷  $R_{b1}$  和  $R_{g1}$  及三七皂苷  $R_1$  为低渗透性药物。人参皂苷  $R_{b1}$  和

$R_{g1}$  为 BCS III 类药物, 三七皂苷  $R_1$  为 BCS IV 类药物。

由于  $P_{\text{appBL} \rightarrow \text{AP}}/P_{\text{appAP} \rightarrow \text{BL}}$  均小于 1.5, 推测三种化合物均以被动转运为主。由  $P_{\text{app}}$  大小判断三个化合物经小肠吸收速率大小为: 人参皂苷  $R_{b1}$  > 三七皂苷  $R_1$  > 人参皂苷  $R_{g1}$ , 吸收速率随极性增加逐渐增加, 说明肠道对被动转运药物的吸收与极性密切相关。影响药物被动扩散的原因有药物溶解性、分子量大小及脂溶性等。当药物极性增加时水溶性升高, 脂溶性相对减少, 而生物膜为脂质双分子层, 因此, 药物的极性并非越大越好<sup>[15]</sup>。实验结果证明, 受试药物并未达到最佳渗透的极性峰值, 可为进一步的达玛烷型皂苷的结构修饰提供理论依据。

$P$ -gp 是肠道细胞中存在的一种主要的外排蛋白, 能将 AP 侧转运到 BL 侧的药物外排到 AP 侧<sup>[16]</sup>。受  $P$ -gp 调控的药物在加入  $P$ -gp 抑制剂后,  $P_{\text{app}}$  会有所增加。为考察受试化合物的转运是否受  $P$ -gp 外排作用影响, 实验选择维拉帕米为  $P$ -gp 抑制剂。结果表明, 随着  $P$ -gp 抑制剂的加入, 人参皂苷  $R_{g1}$  与三七皂苷  $R_1$  的  $P_{\text{app}}$  反而显著下降, 说明人参皂苷  $R_{g1}$  与三七皂苷  $R_1$  的转运不受  $P$ -gp 的调控, 同时维拉帕米抑制了人参皂苷  $R_{g1}$  与三七皂苷  $R_1$  的转运, 其转运机理还需进一步研究。人参皂苷  $R_{b1}$  转运速率无明显变化, 说明人参皂苷  $R_{b1}$  的转运不受  $P$ -gp 的调控。

StarDrop 是一款用于在药物发现中起辅助决策、帮助项目组快速确定高质量化合物的软件, 用于评估复杂的数据, 预测关键的理化性质。这些数据通常由于实验或预测产生的误差而具有一定的不确定性。本实验预测的三七皂苷  $R_1$  的溶解性结果与实际结果存在一致性, 人参皂苷  $R_{b1}$  与  $R_{g1}$  的溶解性预测结果与实验结果相差较大。并且三个药物均不是  $P$ -gp 底物, 与模拟结果相反, 原因可能是天然产物结构复杂、分子量较大、化合物结构中不同属性相互冲突造成数据的不确定性。软件固有的 ADME QSAR 模型可能更适合化药中的小分子物质。为探究快捷、可靠的预测方法, 需进一步研究更多天然产物的溶解性和渗透性, 以此丰富自己的数据源, 通过 Auto-Modeller 模块构建适合预测大分子化合物的 QSAR 模型。

## 参考文献

- [1] Kong L T, Wang Q, Xiao B X, et al. Different pharmacokinetics of the two structurally similar dammarane sapogenins,

- protopanaxatriol and protopanaxadiol, in rats [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86(1): 48-53.
- [2] 孙德亚. 达玛烷型人参皂苷元结构修饰及其抗肿瘤活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [3] 李娟, 王如锋, 杨莉, 等. 三七皂苷类成分及对心血管作用的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(17): 3480-3487.
- [4] 刘海宇, 张庆贺, 刘金平, 等. 达玛烷型三萜皂苷结构修饰研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22): 269-273.
- [5] Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. "Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System" [S]. FDA, 2000.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: X.
- [7] 曾宝, 王春玲, 吴安国, 等. Caco-2 细胞模型的建立及其在中药吸收研究中的应用探讨[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(6): 570-573.
- [8] 杨秀伟. 人参化学成分的藥物代谢动力学研究[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(1): 16-35.
- [9] 杨秀伟, 杨晓达, 王莹, 等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立[J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(6): 634-641.
- [10] Yee S Y. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-Factor or myth[J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.
- [11] 杨秋娅, 康雷, 顾圣莹, 等. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 在大鼠体内的药动学研究[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(3): 221-226.
- [12] 韦凤华, 宋林, 何毅, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 在大鼠体内的代谢与排泄研究[J]. *华西药学杂志*, 2010, 25(3): 302-305.
- [13] 李丽明, 刘若轩, 郭洁文, 等. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 在急性心肌梗死大鼠体内的药动学研究[J]. *中药材*, 2015, 38(9): 1908-1911.
- [14] Volpe D A, Faustino P J, Ciavarella A B, et al. Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay[J]. *Clin Res Regul Aff*, 2007, 24(1): 39-47.
- [15] Wils P, Warnery A, Phung-Ba V, et al. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 269(2): 654-658.
- [16] Patel J, Buddha B, Dey S, et al. *In vitro* interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: changes in P-gp and CYP3 A4 activity[J]. *Am J Ther*, 2004, 11(4): 262-277.

(收稿日期 2018-03-22)

(上接第 1149 页)

- [10] 武小赞, 李铁钢, 阳勇, 等. HPLC 法测定黄连中主要生物碱的方法学研究. *上海中医药杂志*, 2010, 44(6): 112-115.
- [11] 廉莲, 万国盛, 贾伟利, 等. HPLC 同时测定黄柏中 6 种化学成分含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(2): 94-97.
- [12] 肖平, 李三新. 反相高效液相色谱法测定五味黄连丸中盐酸小檗碱的含量[J]. *中南药学*, 2009, 7(11): 879-880.
- [13] 熊玲, 覃瑶, 罗维早, 等. 正交试验设计筛选黄连总生物碱的提取纯化工艺研究[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(5): 706-710.
- [14] 肖培根, 肖伟, 许利嘉, 等. 黄连及含小檗碱类生物碱的中草药[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(11): 1381-1385.
- [15] 赵文龙, 周昌妮, 王佳乐, 等. 星点设计-效应面法优选黄连的提取工艺[J]. *中国现代中药*, 2014, 16(4): 312-315.

(收稿日期 2018-03-29)