

· 基础研究 ·

银杏内酯 A 的 BCS 分类及吸收机制研究[△]李楠楠^{1,2}, 劳元圣², 高尧春², 李楠², 张梦雪², 黎迎², 刘海波², 董政起^{2*}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193

[摘要] 目的: 实验通过计算机模拟和体外快速实验研究银杏内酯 A 的生物药剂学分类(BCS)及其转运机制, 分析其口服生物利用度不高的因素。方法: 采用 MOE、Discovery Studio、StarDrop 软件对药物进行相关预测。采用 2 种不同的方法进行溶解度试验, 以美国食品药品监督管理局(FDA)指导原则中的 D_0 值和 2015 版《中华人民共和国药典》中的水中溶解度进行判断。渗透性采用体外细胞模型和人工渗透膜(PAMPA)模型, 根据其表观渗透系数(P_{app})和有效渗透率(Pe)的大小进行判断。结果: MOE 预测结果显示银杏内酯 A 为难溶性药物; Discovery Studio 预测结果表明银杏内酯 A 水溶性好, 肠道吸收性质非常差; StarDrop 预测银杏内酯 A 的溶解性为微溶, 药物吸收率 > 30%, 不受 P-糖蛋白(P-gp)调控。选取 pH 1.2、4.0、6.8 磷酸缓冲液及水中银杏内酯 A 的 D_0 值均大于 1, 可判断其为低渗透性药物。且其在水中的溶解度等于 $6 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 为极微溶性药物。在 Caco-2 单层细胞模型中 AP→BL 转运实验中银杏内酯 A 的 P_{app} 为 $8.04 \times 10^{-6} \sim 13.99 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 在 BL→AP 转运实验中银杏内酯 A 的 P_{app} 为 $11.79 \times 10^{-6} \sim 12.95 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 因此可判断银杏内酯 A 为低渗透性药物。在 PAMPA 模型中, 其 Pe 为 $0.089 \times 10^{-6} \sim 0.098 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 可以判断其为低渗透性药物。在高、中、低 3 个不同浓度的转运中, 银杏内酯 A 的外排系数(ER)为 1.11、0.62、0.89, 均小于等于 1.5。随着 P-gp 抑制剂维拉帕米的加入, 银杏内酯 A 的转运速率无显著变化, 且差异无统计学意义, 说明其的转运不受 P-gp 的调控, 以被动转运为主。结论: 银杏内酯 A 为 BCS IV 类药物, 溶解性和渗透性均较差, 导致其口服生物利用度较低。

[关键词] 银杏内酯 A; 溶解性; 渗透性; 生物药剂学分类系统

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)03-0372-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190422002

Study on BCS Classification and Absorption Mechanism of Ginkgolide A

LI Nan-nan^{1,2}, LAO Yuan-sheng², GAO Yao-chun², LI Nan², ZHANG Meng-xue²,LI Ying², LIU Hai-bo², DONG Zheng-qi^{2*}

1. Center for Life Science and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

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

[Abstract] **Objective:** To study the biopharmaceutical classification (BCS) and its transport mechanism of ginkgolide A by computer simulation and rapid *in vitro* experiments, and analyze the factors of low oral bioavailability. **Methods:** MOE, Discovery Studio, and StarDrop software were used to predict the drug. Solubility experiments were performed using two methods, judged by the D_0 value in the US FDA guidelines and the solubility in water in the 2015 Chinese Pharmacopoeia. The permeability was determined using an *in vitro* cell model and a manual osmosis membrane (PAMPA) model based on the apparent permeability coefficient (P_{app}) and effective permeability (Pe). **Results:** The results of MOE prediction showed that ginkgolides A were poorly soluble drugs; the results of Discovery Studio showed that ginkgolides A had good water solubility and poor intestinal absorption properties; StarDrop predicted that the solubility of ginkgolides A was slightly soluble and drug absorption rate was more than 30%, not regulated by P-glycoprotein (P-gp). The D_0 values of pH 1.2, 4.0, 6.8 phosphate buffer and ginkgolides A in water were all greater than 1, and it was judged to be a low permeability drug. And its solubility in

[△] **[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501005); 国家公益性行业科研专项(201507004); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-I-012, 2017-I2M-B&R-09)

^{*} **[通信作者]** 董政起, 副研究员, 研究方向: 基于 BCS 分类的中药有效成分成药性评价研究; E-mail: dzq626@163.com

water is equal to $6 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, which is a very slightly soluble drug. The apparent permeability coefficient P_{app} of ginkgolides A in the AP→BL transport experiment in the Caco-2 monolayer cell model was $8.04 \times 10^{-6} \sim 13.99 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, In the BL→AP transport experiment, the apparent permeability coefficient P_{app} of ginkgolides A was $11.79 \times 10^{-6} \sim 12.95 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, so it can be judged that ginkgolides A is a low-permeability drug. In the PAMPA model, the effective permeability P_e is 0.089×10^{-6} to $0.098 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, which can be judged as a low-permeability drug. In the three different concentrations of high, medium and low transport, the ER values of ginkgolides A were 1.11, 0.62, and 0.89, all of which were less than or equal to 1.5. With the addition of *P*-gp inhibitor verapamil, the transport rate of ginkgolide A did not change significantly, and there was no significant difference, indicating that its transport was not regulated by *P*-gp, and it was mainly passive transport. **Conclusion:** Ginkgolide A is a BCS class IV drug with poor solubility and permeability, resulting in low oral bioavailability.

[**Keywords**] ginkgolide A; solubility; permeability; biopharmaceutical classification

银杏内酯是银杏叶主要成分, 包括银杏内酯 A、B、C、J 和 M (GKA、GKB、GKC、GKJ、GKM) 等^[1], 银杏内酯具有抗炎、抗氧化、改善脑缺血以及神经保护作用^[2], 对中枢神经系统的作用^[1], 拮抗血小板活性因子 PAF 作用^[3]等。银杏内酯注射液主要成分有白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C^[4]。目前, 银杏内酯注射液使用较为广泛, 但有研究表明其存在严重胃绞痛或周身疼痛、过敏等不良反应^[5]。口服制剂能够在帮助提高患者适用性的同时降低不良反应, 因此本实验拟以银杏内酯 A 为模型药物, 建立以溶解性和渗透性为指标的系统、快速、准确评价药物口服生物利用度的方法, 同时分析目前市面上没有银杏内酯口服剂型的原因, 并为下一步开发提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC; 电热恒温水浴锅 (HHS 型, 上海博讯实业有限公司); 旋涡振荡器 (VORTEX-5 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); CO₂ 培养箱 (INC108 型, 德国 MEMME[®] T 公司); 倒置显微镜 (GX51 型, 奥林巴斯公司); 超净台 (SCB-1220 型, 北京东联哈尔仪器制造有限公司); 微量振荡器 (MM-1 型, 金坛市正基仪器有限公司); 全自动跨膜电阻测量仪 (德国 Nanoanalytics 公司); 高压灭菌罐 (DY2009X-032-00, 上海博讯实业有限公司); 酶标仪 (Spectra max 型, 美国 MD 公司); 药物渗透性检测仪 (PAMPA-Evolution)。

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 试药

银杏内酯 A (成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: MUST-18031502, 纯度: 99.70%); 荧光素钠 (Coolaber 公司, 批号: 518-47-8, 纯度: 98%); MEM/EBSS (Hyclone Thermo 公司, 批号: AC1214569); 非必需氨基酸 (Gibco 公司, 批号: 1896361); 胰酶 (Gibco 公司, 批号: 1933273); 双抗 (Gibco 公司, 批号: 1851595); 胎牛血清 (Gibco 公司, 批号: 1856032); 二甲基亚砷 (Sigma 公司, 批号: SHBG3288V); Hank's 溶液 (Solarbio 公司, 批号: 20180713); MTT (Amresco 公司, 批号: 298-93-1); 12 孔 Transwell TM 培养板 (1.12 cm^2 , $0.4 \mu\text{m}$, Corning 公司, 批号: 34717041); 96 孔细胞培养板 (Corning 公司, 批号: 15718601); T-25 细胞培养瓶 (Corning 公司, 批号: 35216601); 乙腈 (色谱纯, 德国默克公司, 批号: 75-05-8); 甲醇 (色谱纯, 德国默克公司, 批号: 67-56-1)。

2 方法

2.1 样品的制备

精密称取银杏内酯 A 对照品 10.4 mg 置于 0.5 mL EP 管中, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 配成质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的银杏内酯 A 对照品溶液。

2.2 银杏内酯 A 定量检测

色谱条件: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$); 保护柱 (VanGuard[™] Pre-Column 3/Pk, $5 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ Column); 流动相为水-甲醇 (55:45); 检测波长为 220 nm; 流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 30 °C; 进样量为 2 μL ; 检测器为 H-class PDA。

线性关系考察:精密吸取银杏内酯 A 对照品溶液,用甲醇稀释成质量浓度分别为 200、100、50、20、10、5、2、1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,混匀后 0.22 μm 滤膜过滤,进样 20 μL ,按 2.2 中的色谱方法进行定量分析,以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得线性回归方程: $Y = 26\,436X + 49\,759$ ($r = 0.999\,7$) 线性范围为 1 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

精密度与回收率考察:选择 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 低、中、高 3 个质量浓度的银杏内酯 A 样品,测定 5 次,计算日内精密度 $\text{RSD } 1.08\% < 2\%$ 。每天使用新配制的 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 低、中、高 3 个质量浓度的银杏内酯 A 样品,连续 3 d,计算日间精密度 RSD 为 $1.03\% < 2\%$ 。说明该分析方法的精密度符合方法学要求。按精密度实验操作,计算求得实测质量浓度,与理论质量浓度比较得到方法的回收率为 98.6%, RSD 为 $1.12\% < 2\%$,说明该分析方法的回收率符合方法学要求。

2.3 软件预测

实验采用 MOE、Discovery Studio、StarDrop 3 种软件对银杏内酯 A 进行预测,分别得出溶解性($\lg^S$ 、 $\lg^P$ 、 $\lg^D$ 、ADMET_Solubility_Level)、渗透性(HIA category、ADMET_Absorption_Level)及 P-gp 底物判断等相关参数对银杏内酯 A 生物药剂学属性进行预测。

2.4 银杏内酯 A 溶解性实验

根据美国食品药品监督管理局(FDA)工业指导原则^[6]:称取银杏内酯 A 溶于水(pH 5.8)、pH 1.2、4.0、6.8 缓冲液中,使药物达到饱和状态,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡 3 h, 30 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 25 min (离心半径:5 cm),取上清液 10 μL ,适当稀释后,按 2.2 色谱条件检测药物浓度,重复 3 次,计算溶解度及 D_0 值。

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

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

本实验主要根据动物与人之间的等效剂量换算方法^[7]来计算银杏内酯 A 的 M_0 ,根据文献[8]中兔的最大给药剂量为 10.64 mg,因此可得人的最大给药剂量为 89.04 mg。

《中华人民共和国药典》(2015 版)的溶解性测定方法^[9]:精密称取药物 10 mg 置于具塞离心管中,加入 5 mL 蒸馏水,样品试管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,每 5 min

振荡 30 s,观察 30 min 内的溶解情况,充分混匀后取出部分溶,并用 HPLC 分析银杏内酯 A 的含量。

2.5 银杏内酯 A 的细胞毒性实验

每孔 1×10^5 个/mL 的 Caco-2 细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL 。其中 2 组为空白组和阴性对照组,培养箱中培养 24 h,弃去废液并向其中加入用不完全培养基配制的不同质量浓度的银杏内酯 A 溶液,每孔 100 μL ,培养 12 h。取出培养板,每孔加 20 μL 质量浓度为 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液(MTT 采用 PBS 配制),继续培养 4 h,弃废液,然后向其中加入 150 μL 的 DMSO 溶液,置于摇床低速振荡 10 min,将其放于酶标仪中检测各孔在 570 nm 处的吸光度值(A),计算细胞抑制率,本实验选取抑制率低于 10% 的高、中、低 3 个质量浓度进行转运实验。

细胞抑制率 =

$$\frac{[(A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}}) - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}})]}{(A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\% \quad (2)$$

2.6 银杏内酯 A 渗透性实验

2.6.1 Caco-2 细胞模型的建立及转运实验 首先用含 1% 非必需氨基酸、1% 双抗、10% 胎牛血清的 MEM 培养基复苏 Caco-2 细胞,然后将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、90% 湿度的培养箱中培养,隔天换液,培养 3 ~ 5 d,长至 80% ~ 90% 程度,进行传代。在细胞传 3 ~ 4 代将其冻存保存在液氮中,便于下次使用。

取 40 ~ 60 代长至 80% ~ 90% 的 Caco-2 细胞每孔 2×10^5 个/mL 的细胞悬液接种在 12 孔 Transwell 细胞培养板上,顶端(AP)侧加 0.5 mL 的细胞液,底端(BL)侧加 1.5 mL 的细胞液,隔天换液,培养至 19 ~ 21 d,并且隔天使用全自动跨膜电阻测量仪测试细胞 TEER 值。

21 d 时,开始进行转运实验,首先吸出两侧培养液,加入 Hank's 溶液清洗 1 遍,然后再加 Hank's 溶液在培养箱中孵育 20 min,取出检测其 TEER 值 $> 500 \Omega$ 进行实验,在 AP 侧加入不同浓度的药物溶液,BL 侧加入空白 Hank's 溶液,在 15、30、60、90、120、150、180 min 的不同时间段在 BL 侧取 200 μL 的样品,同时在相同的位置补充 200 μL 空白 Hank's 溶液,实验结束后再次测试细胞 TEER 值。将样品前处理后按照 2.2 的色谱条件在超高效液相色谱(UPLC)中进行含量测定,计算其表观渗透系数(P_{app})。

$$P_{app} = (dQ/dt)/(A \times C_0) \quad (3)$$

其中, 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质量浓度, A (1.12 cm^2) 为转运膜面积。

2.6.2 吸收机制研究 在建立好的 Caco-2 细胞模型中取高、中、低 3 个质量浓度的银杏内酯 A 溶液和含有维拉帕米的银杏内酯 A 溶液进行双向转运实验, 在 AP 侧加入 0.5 mL 的药物溶液, 同时在 BL 侧加入 1.5 mL 的空白 Hank's 溶液作为接收液, 在 15、30、60、90、120、150、180 min 的不同时间段在 BL 侧取 200 μL 的样品, 同时在相同的位置补充 200 μL 空白 Hank's 溶液。另外, 在 BL 侧加入 1.5 mL 的药物溶液, 同时在 AP 侧加入 0.5 mL 的空白 Hank's 溶液作为接收液, 在 15、30、60、90、120、150、180 min 的不同时间段在 BL 侧取 200 μL 的样品, 同时在相同的位置补充 200 μL 空白 Hank's 溶液。将所取样品与 UPLC 进行含量测定, 分析药物在 AP $\rightarrow$ BL 与 BL $\rightarrow$ AP 的不同转运中药物转运与药物浓度及时间的关系以及药物是否是 P-gp 底物。

2.6.3 PAMPA 模型的建立及转运实验 模型建立: 取配制好的磷脂溶液加在平行人工膜渗透性 (PAMPA) 模型的疏水网膜表面上, 供室马上加入 200 μL 含药物的 Hank's 溶液, 受室加入 200 μL Hank's 溶液, 整个加药过程在 10 min 内完成。间隔 30 min 在供室取 100 μL 溶液, 按 2.2 的色谱条件进行含量测定, 计算其有效渗透率 (Pe)。

$$Pe = -\ln[1 - (C_A(t)/C_{\text{equilibrium}})]/A \times (1/V_D + 1/V_A) \times t \quad (4)$$

$$C_{\text{equilibrium}} = [C_D(t) \times V_D + C_A(t) \times V_A]/(V_D + V_A) \quad (5)$$

其中, A 表示人工磷脂膜面积 (0.32 cm^2), V_D 表示供体侧的体积 (mL), V_A 表示受体侧的体积 (mL), t 表示渗透时间 (min), $C_A(t)$ 表示在 t 时间内受体液的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), $C_D(t)$ 表示 t 时间内供体液的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

3 实验结果

3.1 软件预测的结果

在软件 MOE 预测结果中, $\lg P$ 为 0.259 7, $h_{\lg S}$ 为 -2.865, $\lg S$ 为 -3.26, 根据 FDA 中的高溶解度大于或等于 85% 的药物, 在软件中高溶解度药物的

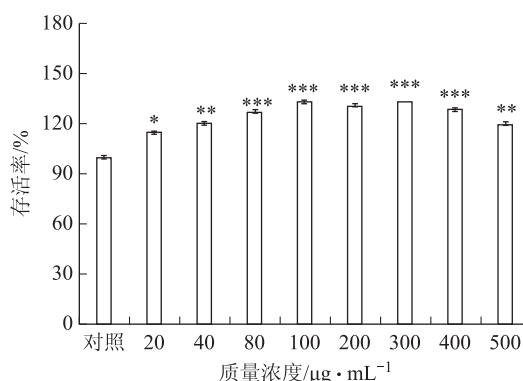
$\lg S$ 的范围在 -1 ~ 5, 可以表明银杏内酯 A 为难溶性药物; 在软件 Discovery Studio 预测结果中, 在软件中可以根据 ADMET_Solubility_Level 对药物的水溶性高低进行判断, 预测结果显示 ADMET_Solubility_Level 为 3, ADMET_Absorption_Level 为 3, $\lg D$ 为 -0.921, ADMET_Solubility_Level > 0 的范围内表明药物的水溶性过高表明银杏内酯 A 水溶性好, ADMET_Absorption_Level 为 3 时表明化合物在肠道内的吸收情况差; 在 StarDrop 软件预测结果中, $\lg S$ 为 2.013, HIA category 为 “+”, P-gp category 为 “no”, 其中 HIA 表示肠道吸收, 为 “+” 时, 代表药物吸收 > 30%, 因此预测银杏内酯 A 的结果为溶解性为微溶, 药物吸收 > 30%, 不受 P-gp 调控。其中软件 MOE 预测的溶解度结果与实验结果较为一致。

3.2 溶解性结果

根据美国 FDA 的检测方法, 银杏内酯 A 在 pH 1.2、4.0、6.8 及水中的 D_0 值分别为 25.38、26.66、66.46、59.46, 可以得出其 D_0 值均大于 1, 因此可以判断其为低溶解性药物。根据《中华人民共和国药典》(2015 版) 的溶解性测定方法^[9]: 银杏内酯 A 在水中溶解度为 $0.006 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 小于极微溶的标准 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 因此银杏内酯 A 为极微溶。

3.3 银杏内酯 A 的细胞毒性

采用 MTT 法检测不同浓度的银杏内酯 A 对 Caco-2 细胞存活率的影响, 见图 1。



注: 与阴性对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 MTT法检测不同浓度银杏内酯A的Caco-2细胞存活率

因此实验取细胞存活率 > 90% 的高、中、低 3 个质量浓度为 300、400、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行实验。

3.4 药物渗透性的实验结果

3.4.1 渗透性判断 实验主要以 P_{app} 为 $14.96 \times$

$10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为临界值^[10]对银杏内酯A的渗透性高低进行判断, AP→BL转运实验中银杏内酯A的 P_{app} 为 $8.04 \times 10^{-6} \sim 13.99 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 小于该值, 因此判断银杏内酯A属于低渗透性药物。

3.4.2 吸收机制 根据图2~4, 可得出银杏内酯A在AP→BL与BL→AP侧的转运量伴随着时间逐步增加且在3 h内没有饱和, 说明对时间具有一定的依赖性, 在30 min中后不同浓度组的趋势不同, 其中高浓度组较中浓度组在同一时间段内它的转运量在AP→BL与BL→AP侧明显增加, 推测银杏内酯A以被动转运为主。由于BL→AP侧高、中、低浓度组在不同的时间点它们的转运量差异不大, 通过对高、低2个浓度组在AP→BL侧的比较, 可以得出它们的双向转运 P_{app} : 低浓度>高浓度, 随着给药浓度的增加, 转运速率反而减小, 因此推测转运过程中可能存在主动转运的参与, 从而导致 P_{app} 计算公式中的分子部分增加幅度减小, 而高浓度时分母 C_0 较大, 从而导致转运速率在低浓度时较高。高、中、低3个浓度的外排系数(ER)分别为1.11、1.27、0.85, 均小于1.5, 说明银杏内酯A以被动转运为主。且双侧转运的 P_{app} 均小于 $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明银杏内酯A为低渗透性药物。

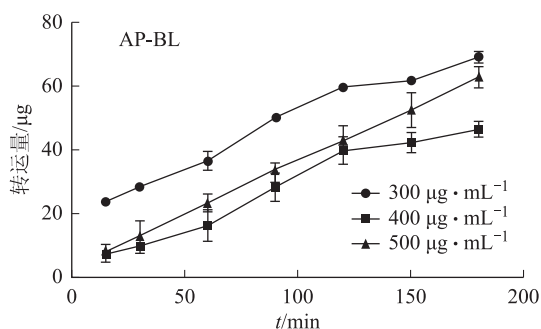


图2 银杏内酯A的AP→BL方向的转运量随时间和浓度的变化

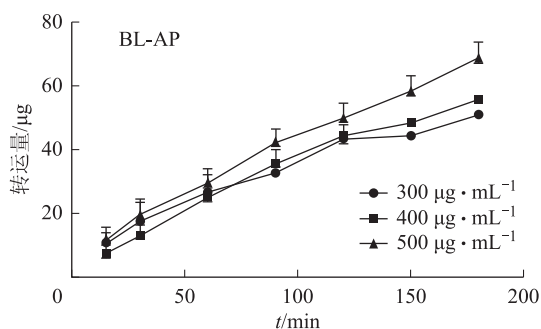
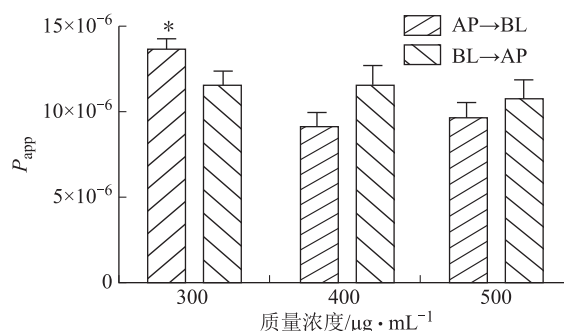


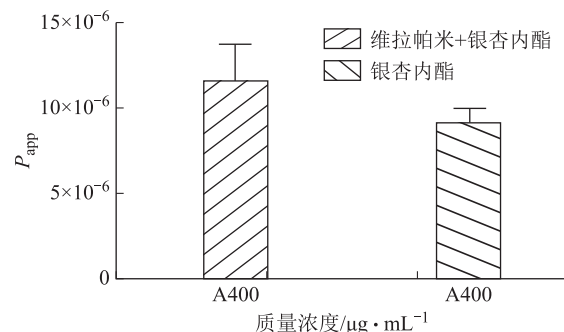
图3 银杏内酯A的BL→AP方向的转运量随时间和浓度的变化



注: $n=3$, $*P<0.05$ 。

图4 银杏内酯A的 P_{app} 在不同浓度不同方向的变化

P-gp是可以将药物从AP侧转运到BL侧的一种外排蛋白, 主要存在于肠道细胞中^[10]。根据图5可以得出, 银杏内酯A与含有同等浓度的维拉帕米相比较, 它们的 P_{app} 差异不大, 且 $P>0.05$, 差异无统计学意义, 说明添加P-gp抑制剂维拉帕米后, 对实验组的银杏内酯A的转运速率无影响, 说明银杏内酯A的转运不受P-gp的调控, 银杏内酯A不是P-gp的底物。



注: $n=3$, $P>0.05$ 。

图5 维拉帕米对银杏内酯A转运的影响

3.4.3 PAMPA膜的渗透性实验结果

荧光素钠试漏: 样品取样结束后, 吸出供体液, 向其中加入 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的荧光素钠溶液, 在酶标仪中进行检测。根据图6样品与空白Hank's溶液的A值无明显差异, 说明无药物渗透, 膜完整性良好。

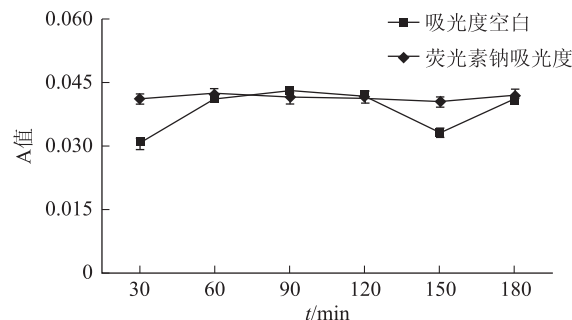


图6 荧光素钠A值与空白Hank's溶液的A值比较

根据图7~8可得出银杏内酯A的转运量是随着时间的增加而增加,并且在3h之内未出现饱和状态,说明具有一定的时间依赖性。比较高、中、低3组浓度的 Pe 差异均无统计学意义,可以判断其为被动转运。同时吸收良好的药物的 $Pe > 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$;吸收为1%~100%的药物的 Pe 为 $0.1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$;而吸收差的药物(即吸收<1%)的 $Pe < 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,银杏内酯A的 Pe 均小于 $1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,说明银杏内酯A为低渗透性药物。

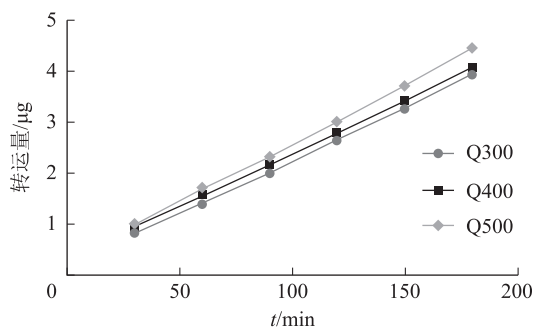
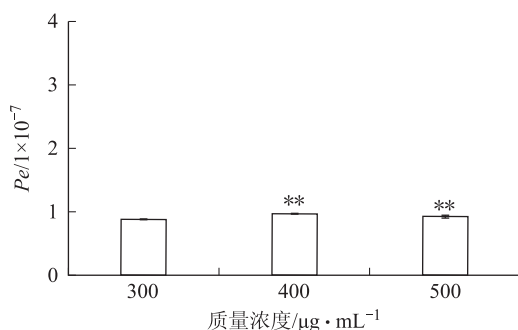


图7 银杏内酯A转运量随时间和浓度的变化



注: $n=3$, ** $P<0.01$ 。

图8 银杏内酯A的 Pe 在不同浓度的变化

4 结论

D_0 值和水中溶解度结果证明银杏内酯A为难溶性药物,Caco-2细胞及PAMPA膜转运实验结果表明银杏内酯A为低渗透性药物。根据Amidon等^[11]于1995年提出的生物药剂学分类系统理论,综合判定,银杏内酯A为BCSⅣ类药物,溶解性和渗透性差是导致其口服生物利用度低的重要因素。此外,银杏内酯A的转运不受P-gp的调控,吸收机制以被动转运为主。MOE软件在预测银杏内酯A溶解性时,结果更为准确;StarDrop软件在预测银杏内酯A与P-gp相关性上也得出较为准确的结论。

5 讨论

实验从药物的溶解度和渗透性两方面展开。溶

解度方面,根据美国FDA指导原则,计算其 D_0 值,均大于1表明银杏内酯A为低溶解性药物;根据《中华人民共和国药典》的溶解度划分,银杏内酯A为难溶性药物。软件MOE、Discovery Studio、StarDrop在预测银杏内酯A的溶解性时,结果分别为难溶、易溶、微溶,相差较大,与实验结果不相符,一方面可能因为有的软件更适合预测大分子化合物,另一方面可能是软件预测主要考虑其化学结构并没有实际考虑到化学结构中的羟基在不同pH条件下发生反应,改变原有结构。软件预测可以高效简便的判断出药物的性质,但是可能与实际有所出入,软件预测仅可以作为判断的一个指标,不能作为判断的主要依据。

在渗透性方面,本实验主要采用Caco-2单层细胞模型和PAMPA模型。在Caco-2单层细胞模型中,AP→BL转运实验中银杏内酯A的 P_{app} 为 $8.04 \times 10^{-6} \sim 13.99 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,在BL→AP转运实验中银杏内酯A的 P_{app} 为 $11.79 \times 10^{-6} \sim 12.95 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,Volpe等^[12]通过对Caco-2细胞单层模型的实验,以23个模型药物为标准,研究其 P_{app} 与其通过人体小肠吸收fa值比较,验证了BCS评价标准,因此建立以Caco-2细胞模型培养21d时的药物转运渗透性高低评价标准,临界 P_{app} 为 $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。同时相关文献也有以 $P_{app} < 1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为吸收性差, P_{app} 在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为吸收中等, $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为吸收性好。本实验主要以 P_{app} 为 $14.96 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为临界值,银杏内酯A属于低渗透性药物,但是以另一个标准银杏内酯A属于高渗透性药物。在PAMPA模型中,其 P_{app} 为 $2.45 \times 10^{-6} \sim 3.42 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,因此银杏内酯A属于低渗透性药物。综合结果判断银杏内酯A为低渗透性药物。通过细胞模型可以判断其为被动转运,因此Caco-2单层细胞模型应用更为广泛,各种规定更加完善,PAMPA模型操作更为简单快捷,且耗时短,但由于所用的磷脂膜没有蛋白的存在,更适合用于被动转运为主的药物。

实验以银杏内酯中的主要成分之一的银杏内酯A为模型药物进行研究,结果表明其渗透性较差,在其他剂型上应用具有一定的局限性。银杏内酯A结构中存在羟基可能是影响其渗透性的原因,有研究表明对羟基进行甲基化修饰可以提高具有羟基取代化合物的渗透性^[13];透膜过程中氢键能力越强,

滞留时间就越长也是渗透性低的原因之一^[14], 可以减轻氢键能力增加其渗透性。难溶性药物制备成固体分散体、纳米制剂等, 均是提高其溶解度的有效方法^[15]。

实验通过软件预测、美国FDA指导原则、《中华人民共和国药典》的溶解度方法、Caco-2单层细胞模型和PAMPA模型系统的对银杏内酯A的渗透性研究进行其BCS分类找出其生物利用度低的主要原因, 为快速评价药物基于生物药剂学属性的成药性, 进而针对性地提高生物利用度的研究提供支撑。

参考文献

- [1] 王旋, 张慧灵, 顾振纶, 等. 银杏内酯药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1741-1744.
- [2] 司海红, 耿婷, 孙晓萍, 等. 银杏内酯类化合物在大鼠体内的绝对生物利用度研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2882-2886.
- [3] 刘秀萍, 邓方. 银杏内酯和白果内酯对大鼠脑缺血再灌注损伤后VEGF的表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(2): 108-111.
- [4] 耿婷, 申文雯, 王佳佳, 等. 银杏叶中内酯类成分的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1384-1391.
- [5] 刘海燕, 柯巍, 刘敏, 等. 银杏内酯注射液致严重胃绞痛并周身疼痛1例[J]. 药学与临床研究, 2017, 25(1): 79.
- [6] 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.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] 杨赴云, 王景田, 金有豫. 银杏内酯A, B在家兔体内的药代动力学研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 541.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 38.
- [10] 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 CYP3A4 activity[J]. *Am J Ther*, 2004, 11(4): 262-277.
- [11] AMIDON G L, LENNERN S H, SHAH V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability[J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413.
- [12] 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.
- [13] 徐适, 陈雕, 兰轲, 等. 黄酮苷元的三维构动关系研究 I: Caco-2细胞渗透性的预测[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1452-1455.
- [14] 卜晓斐, 郝本前, 徐为人, 等. B环不同羟基取代影响黄酮苷元透膜能力的分子动力学模拟研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1553-1559.
- [15] 王嘉新, 栾瀚森, 王浩. 计算药剂学在提高难溶性药物溶解度中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(8): 1066-1072.

(收稿日期: 2019-04-22 编辑: 谢睿)