

大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 R_{g_1} 的代谢转化研究

陈新梅*

(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 考察大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 R_{g_1} (GR_{g_1}) 的代谢转化作用。方法: 研究 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GR_{g_1} 溶液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 人工胃液 (pH 1.0) 和人工肠液 (pH 6.8) 中的稳定性; 考察大鼠 *ig* GR_{g_1} 后粪便和尿液中的 GR_{g_1} 代谢状况。结果: GR_{g_1} 在人工胃液中 2 h 内 100% 降解; 在人工肠液 pH 中 4 h 相对稳定 ($\text{RSD} < 1.5\%$); GR_{g_1} 被大鼠肠道内酶和菌群代谢。结论: 为提高生物利用度, GR_{g_1} 应选择非口服途径给药。

[关键词] 人参皂苷 R_{g_1} ; 代谢转化; 生物利用度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0210-03

Experimental Study on Metabolism and Bio-Transformation of Ginsenoside R_{g_1} by Intestinal Enzyme and Microflora in Rats

CHEN Xin-mei*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of metabolism and bio-transformation of GR_{g_1} by intestinal enzyme and microflora in rats. **Method:** The stability of GR_{g_1} in the artificial gastric juice and intestinal juice was

[收稿日期] 20101220(003)

[通讯作者] * 陈新梅, 博士, 讲师, E-mail: xinmeichen@126.com

[参考文献]

- [1] Fogh J, Fogh J M, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice[J]. J Natl Cancer Inst, 1977, 59(1): 221.
- [2] Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, et al. Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines[J]. Pharm Res, 2003, 20: 3.
- [3] Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption; advantages and limitations of the Caco-2 model[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1997, 14: 221.
- [4] Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. Gastroenterology, 1989, 96: 736.
- [5] Buur A, Trier L, Magnusson C, et al. Permeability of 5-fluorouracil and prodrugs in Caco-2 cell monolayers [J]. Int J Pharm, 1996, 129: 223.
- [6] Mouly S, Meune C, Bergmann J F. Uncertainty and inaccuracy of predicting CYP-mediated *in vivo* drug interactions in the ICU from *in vitro* models: focus on CYP3A4[J]. Intensive Care Med, 2009, 21: 173.
- [7] Hyatt J L, Tsurkan L, Wierdl M, et al. Intracellular inhibition of carboxylesterases by benzil: modulation of CPT-11 cytotoxicity[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5: 2281.
- [8] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 175 (3): 880.
- [9] Yee S Y. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man: fact or myth [J]. Pharm Res, 1997, 14: 763.

[责任编辑 何伟]

tested. The metabolism and bio-transformation of GR_{g1} administrated orally in rats were studied. **Result:** GR_{g1} was degraded totally within 2 hours in artificial gastric juice. Meanwhile, GR_{g1} was stable in artificial intestinal juice. GR_{g1} was metabolized by intestinal enzyme microflora in rats. **Conclusion:** GR_{g1} should be administrated from other routes instead of oral route in order to improve the bioavailability.

[**Key words**] ginsenoside R_{g1}; metabolism and bio-transformation; bioavailability

人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1}, GR_{g1}) 是人参三醇组皂苷的一个代表性单体,现代药理学研究表明:GR_{g1} 能够作用于机体多个系统,对心血管和血液系统、神经系统及免疫功能等具有广泛的药理作用,但 GR_{g1} 口服生物利用度很低,只有 1.9 ~ 20%^[1],本研究拟对 GR_{g1} 在人工肠液和人工胃液的稳定性以及大鼠肠道的酶和菌群对 GR_{g1} 的代谢转化作用进行研究,以期对 GR_{g1} 的给药途径的选择和处方设计提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent8453 紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司), Waters 高效液相色谱仪(Waters 486 型可变波长紫外检测器、510 型泵、N2000 色谱工作站)。

1.2 药品与试剂 GR_{g1} (吉林省宏久生物科技股份有限公司,批号 20040504,纯度 98.99%)。GR_{g1} 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110703-200322)。试剂均为分析纯。盐酸(浙江三鹰化学试剂有限公司,批号 20040607)。

1.3 动物 健康成年 SD 大鼠,雌雄各半,体重(250 ± 50) g。实验动物由中国药科大学动物中心提供,动物证号 SCXK(苏)2002-0011。

2 方法

2.1 GR_{g1} 在人工胃液中的稳定性^[2]

2.1.1 人工胃液的配制 取稀盐酸 16.4 mL,加水约 800 mL,摇匀后,加水稀释成 1 000 mL 即得。人工胃液的 pH 值为 1.0。

2.1.2 GR_{g1} 在人工胃液中的稳定性 将 GR_{g1} 溶解在人工胃液中,配制成 100 mg·L⁻¹ 的样品溶液,密塞,37 °C 磁力搅拌,于不同的时间点吸取样品溶液,用 HPLC-UV 法^[3]测定人工胃液中剩余的 GR_{g1}。以时间为横坐标,以人工胃液中 GR_{g1} 的剩余量为纵坐标,绘图,考察 GR_{g1} 在人工胃液 pH 中的稳定性

2.2 GR_{g1} 在人工肠液中的稳定性^[2]

2.2.1 人工肠液的配制 取磷酸二氢钾 6.8 g,加水 500 mL 使溶解,用 0.4% NaOH 溶液调节 pH 值

至 6.8,摇匀,加水稀释成 1 000 mL 即得。

2.2.2 GR_{g1} 在人工肠液中的稳定性 将 GR_{g1} 溶解在人工肠液中,配制成 100 mg·L⁻¹ 的样品溶液,37 °C 磁力搅拌,于不同的时间点吸取样品溶液,用 HPLC-UV 法测定人工肠液中剩余的 GR_{g1},考察 GR_{g1} 在人工肠液 pH 下的稳定性,

2.3 大鼠肠道酶和菌群对 GR_{g1} 的代谢转化作用^[4]

取体重(250 ± 50) g 的 SD 大鼠 10 只,雌雄各半,随机分为空白组和 GR_{g1} 灌胃组,每组 5 只。在实验室内饲养 7 d,待其充分适应环境后,禁食 24 h,空白组大鼠按 10 mL·kg⁻¹ 剂量 ig 生理盐水,GR_{g1} ig 组大鼠按 30 mg·kg⁻¹ 剂量 ig GR_{g1} 的生理盐水溶液,体积相同。两组大鼠同时 ip 5% 糖盐水 5 mL。24 h 内,继续禁食,分别收集 0 ~ 12 h 和 12 ~ 24 h 时间段内的尿液和粪便,注意粪便不要污染尿液。将所收集的尿液用旋转蒸发器 60 °C 浓缩至 10 mL 后,用乙醚反复提取,得到乙醚层。回收乙醚后,残渣用 1 mL 甲醇溶解做 TLC 检查。粪便用甲醇浸泡 24 h,得甲醇提取液,过滤,浓缩至 1 mL,供 TLC 检查用。在同一硅胶 G 薄层色谱板上[6 cm × 12 cm, 0.2% CMC: 硅胶 G = 1:3 (v/w), 薄层厚度为 0.5 mm] 从左至右依次点空白尿浓缩液、含有 GR_{g1} 的浓缩尿液、GR_{g1} 对照品的甲醇溶液(10 g·L⁻¹)、含有 GR_{g1} 粪便的甲醇浓缩液,空白粪便甲醇浓缩液,点样量均为 50 μL。将硅胶 G 薄层色谱板置展开缸内饱和 10 min 后,用展开剂[氯仿:乙酸乙酯:甲醇:水 = 15:40:22:10 的下层液]展开。待晾干后,用 5% 硫酸-乙醇溶液显色,95 ~ 100 °C 烘 10 min,在日光下检视。

3 结果

3.1 GR_{g1} 在人工胃液中的稳定性 结果见图 1。在不到 20 min 时间内,GR_{g1} 在人工在胃液中的含量下降了 50%;在不到 2 h 时间内,人参皂苷 R_{g1} 在人工胃液 pH 下完全消失。

3.2 GR_{g1} 在人工肠液中的稳定性 结果见表 1。在考察的 0 ~ 4 h 内,GR_{g1} 的浓度无显著变化,样品溶液的含量为 98.89 mg·L⁻¹,表明 GR_{g1} 在人工肠

液 pH 下 4 h 内是相对稳定的。

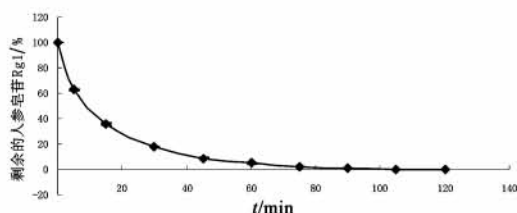


图 1 GRg1 在 37 °C 人工胃液中的稳定性

表 1 GRg1 在 37 °C 人工肠液中的稳定性 (n = 3)

时间/h	GRg ₁ 浓度/%	SD/%
0	98.87	1.21
0.5	98.96	1.34
1	98.92	1.25
2	98.89	1.28
3	98.85	1.23
4	98.88	1.27

3.3 大鼠肠道酶和菌群对 GRg₁ 的代谢转化作用在日光下检视,结果见图 2。

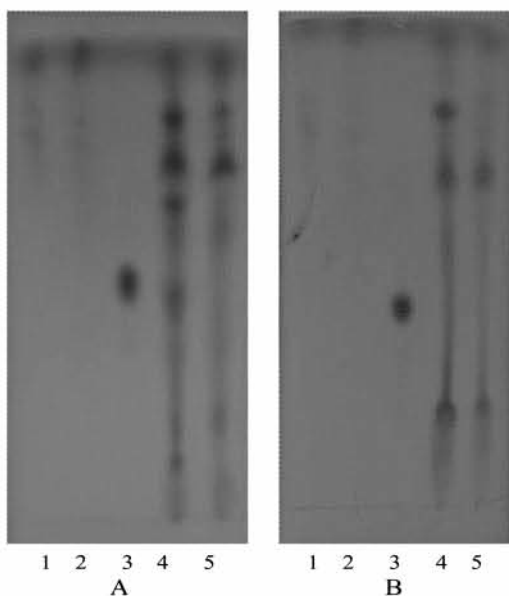


图 2 大鼠口服 GRg₁ 后尿液和粪便中的 GRg₁ 的 TLC

注:A.0~12 h;B.12~24 h;1. 空白尿;2. 含 GRg₁ 的尿;

3. GRg₁ 的标准品;4. 含 GRg₁ 的粪便;5. 空白粪便

TLC 的检测结果表明:在 ig GRg₁ 的 0~12 h 的粪便样品中,有一个极性小于 (R_f 值大) GRg₁ (GRg₁ 的 R_f 值为 0.46) 的斑点,与空白粪便及 GRg₁ 对照

品的 TLC 对比,可以初步判定是 GRg₁ 的代谢产物,在查阅文献的基础上,可能是一对同分异构体人参皂苷 Rh₁ 及人参皂苷 F₁ (R_f = 0.64);12~24 h 粪便样品出现一极性更小 (R_f 值大) 的代谢产物,可能是苷元 20 (S) (protopanaxatriol, Ppt, R_f = 0.81);同时 12~24 h 粪便样品中的人参皂苷 Rh₁ 及人参皂苷 F₁ 的斑点消失。具体的代谢产物还需要用对照品进一步验证。与粪便相比,尿液中的 GRg₁ 及其代谢产物含量很少,用 TLC 无法检测出。GRg₁ 在尿液中的排泄量远远小于在粪便中的排泄量,这与文献^[4] 报道的:“24 h 累积排泄量,在尿中为 0.4% ± 0.04%,在粪中为 41.2% ± 2.6%” 的趋势是一致的。

4 讨论

GRg₁ 在人工胃液 pH 环境下不稳定,2 h 内完全降解;在人工肠液 pH 环境下,在考察的 4 h 内相对稳定;GRg₁ 在大鼠肠内菌所分泌的水解皂苷糖基的酶类如 β-葡萄糖苷酶^[4] 作用下,0~12 h 内的代谢产物为一对同分异构体人参皂苷 Rh₁ 及人参皂苷 F₁;12~24 h 内的代谢产物为苷元 Ppt;代谢产物的极性小于人参皂苷 Rg₁。本实验结果表明,GRg₁ 口服生物利用度低的原因可能是被胃液降解和肠道酶和菌群对 GRg₁ 的代谢转化作用,因此,为提高 GRg₁ 的生物利用度,可选择非胃肠道给药途径,如鼻腔给药^[3],以避免胃肠道恶劣的环境。

[参考文献]

- [1] Xu Q F, Fang X L, Chen D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ from Panax notoginseng in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 84 (2):187.
- [2] 宋磊,张春娜,郭圣荣,等. 人参皂苷 Rb₁ 在胃液和肠液 pH 下的稳定性考察[J]. 中国临床药理学杂志,2004,13 (4):211.
- [3] 陈新梅. 人参皂苷 Rg₁ 鼻腔给药的可行性研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(2):229.
- [4] 王毅,刘铁汉,王巍,等. 人参皂苷 Rg₁ 的肠内菌代谢及其代谢产物吸收入血的研究[J]. 药理学杂志,2000,35 (4):284.

[责任编辑 聂淑琴]