

人参皂甙 Rb₁ 的肠内菌代谢

陈 昕¹, 周秋丽¹, 王本祥^{*}

(长春中医学院新药研究中心; ¹ 白求恩医科大学生物工程研究所, 长春 130021)

摘要 目的:通过离体及整体实验观察了人和大鼠肠内菌对人参皂甙 Rb₁(G-Rb₁)的代谢。方法:采用薄层色谱(TLC)和电喷雾质谱(ESI-MS)检测 G-Rb₁ 及其代谢产物。结果:离体实验表明, G-Rb₁ 容易被大鼠和人消化道菌群代谢,随着代谢时间的延长,相继出现 Rd, Rg₃/F₂, Rh₂/C-K 和 Ppd 4 种代谢产物。给大鼠 ig G-Rb₁ 500 mg·kg⁻¹后收集 4 h 和 6 h 粪,提取 G-Rb₁ 的代谢产物,证明粪中存在 Rd 和 Rg₃/F₂ 两种代谢产物。结论:G-Rb₁ 可被人和大鼠肠内菌代谢,其代谢模式为 G-Rb₁→Rd→F₂→compound K(C-K)→20(S)protopanaxadiol(Ppd)。

关键词 人参皂甙 Rb₁; 肠内菌代谢; 电喷雾质谱; 薄层色谱

人参(*Radix Ginseng*)是五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根。从人参中分离出来的人参皂甙被认为是人参主要的有效成分之一。药理实验表明,人参皂甙在心血管、免疫调节、抗衰老^[1,2]等方面有广泛的生物活性。自古以来,人参的主要给药途径为口服,近些年来,肠内菌代谢研究证明,人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ 被人和大鼠口服后,在肠道中被代谢成多种代谢产物^[3]。但何种代谢产物被吸收入血和产生药理作用,至今尚无深入研究报告。本文通过离体和整体实验首先观察了人和大鼠肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢。

材 料 和 方 法

药品及试剂 人参皂甙 Rb₁, Rd, Rg₃, Rh₂, 20(S)原人参二醇 [20(S) protopanaxadiol, Ppd] 购于白求恩医科大学天然药化室;厌氧培养液^[4]组成及制备:取 37.5 ml 溶液 A(0.78% K₂HPO₄), 37.5 ml 溶液 B(0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄·H₂O), 1 ml 0.1% resazurine, 0.5 g L-cysteine·H₂O, 2 ml 25% L-ascorbic acid, 50 ml 8% Na₂CO₃, 1 g 牛肉膏, 1 g 蛋白胨和 1 g 营养琼脂,加蒸馏水至 1 L,最后调 pH 7.5~8.0;其它化学试剂均为分析纯。

动物 体重 135~155 g, ♂, Wistar 大鼠,由白

求恩医科大学实验动物部提供。

仪器 薄层色谱(TLC)预制板(青岛海洋化工厂); C₁₈ 色谱预处理柱(河北省津杨滤材厂); 825-A 型厌氧培养罐(沈阳市第五人民医院); 美国 Finnigan MAT 公司 LCQ 电喷雾质谱(Electron spurt ion mass spectroscopy, ESI-MS)仪;自制代谢用鼠笼。

离体厌氧培养人肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢^[5] 取青年健康志愿者的新鲜粪,按 1 g:4 ml 的比例将粪与生理盐水混合制成悬浊液,取新鲜配制的粪悬浊液 0.5 ml,加入厌氧培养液 4.5 ml,混匀,得到肠菌培养液 5 ml。取此新鲜配制的肠菌培养液 6 份,各加 G-Rb₁ 5 mg,分别置于 37℃ 厌氧培养罐(产气袋法:向培养罐中的产气袋内注入水后启动化学反应,产生 H₂ 气,在催化剂作用下氢与罐内氧气反应产生 H₂O,在密闭罐内局部造成缺氧环境,用于肠道厌氧菌培养)中培养 0, 4, 8, 16, 24, 48 h,用等体积水饱和正丁醇萃取培养混合物,萃取液减压蒸干后用 20% 乙腈水溶液溶解,注入 C₁₈ 预处理柱后,先用 20% 乙腈水溶液 20 ml 冲洗,然后用甲醇 15 ml 洗脱,洗脱液减压浓缩,用于 TLC 检测。

离体厌氧培养大鼠肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢 取健康大鼠新鲜粪,按上述方法制备离体厌氧培养大鼠肠内菌对 G-Rb₁ 代谢的分析样本,用于 TLC 检测。

大鼠整体肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢 取大鼠 9 只,均分 3 组,饲养 7 d,待其充分适应环境后,禁食 12 h,一组按 10 ml·kg⁻¹ ig 生理盐水做对照,另外两组经口给予 G-Rb₁ 500 mg·kg⁻¹。然后将大鼠置

收稿日期: 1998-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(39570861)

* 联系人 Tel: (0431)5650624, Fax: (0431)5650624,

E-mail: cctemwbx@public.cc.ji.cn

于代谢笼中,并继续禁食,自由饮用糖盐水(含5%葡萄糖和0.9%氯化钠)。一给药组于给药后收集4h粪,另一给药组和对照组于给药后收集6h粪。ESI-MS测定以对照组粪做空白对照分析。按Chart 1所示步骤处理收集的粪。

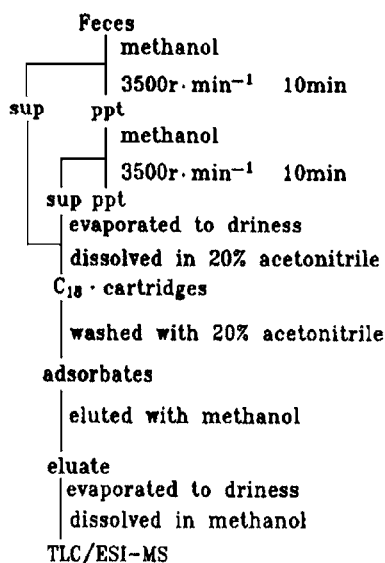


Chart 1 Assay procedure for ginsenoside Rb₁ in biological samples. sup: suspension; ppt: precipitate. ESI-MS: Electron spurt ion mass spectroscopy.

结 果

1 离体培养人肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢

在离体培养条件下,代谢产物经 TLC 鉴定,结

果见图 1A。G-Rb₁ 被人肠内菌代谢,随代谢时间的延长,相继出现 4 种代谢产物,其 R_f 值分别与标准品 R_d, R_{g₃}, R_{h₂}, P_{p_d} 的 R_f 值相同。

2 离体培养大鼠肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢

代谢产物经 TLC 检测,结果见图 1B。在离体条件下,G-Rb₁ 被大鼠肠内菌代谢,其代谢产物与离体培养人肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢产物相同。但是,大鼠肠内菌对 G-Rb₁ 代谢 48 h 的代谢物中已经检测不到 R_d 和 R_{g₃},只有 R_{h₂} 和 P_{p_d}。而在完全相同的条件下,人肠内菌对 G-Rb₁ 代谢 48 h 的代谢产物(图 1A)中 4 种代谢产物(R_d, R_{g₃}, R_{h₂} 和 P_{p_d})都能检测到,提示离体培养大鼠肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢作用较强。

3 大鼠整体肠内菌对 G-Rb₁ 的代谢作用

给大鼠 ig G-Rb₁ 后,用 TLC 方法在粪中未检测到 G-Rb₁ 及其代谢产物,但用 ESI-MS 法在 4 h 和 6 h 的代谢物中检测到了 R_{b₁} 及其代谢产物 R_d 和 R_{g₃}/F₂。结果见表 1 和图 2A~D。

Tab 1 Detection of Rb₁ and its metabolites in rat feces after oral administration of Rb₁ 500 mg·kg⁻¹ by ESI-MS^a

Time/h	Rb ₁	Rd	Rg ₃ /F ₂	Rh ₂ /C-K	Ppd
4	+	+	+ -	-	-
6	+	+	+	-	-

^a(+) and (-) indicate detectable and undetectable, respectively; (+ -) indicate trace.

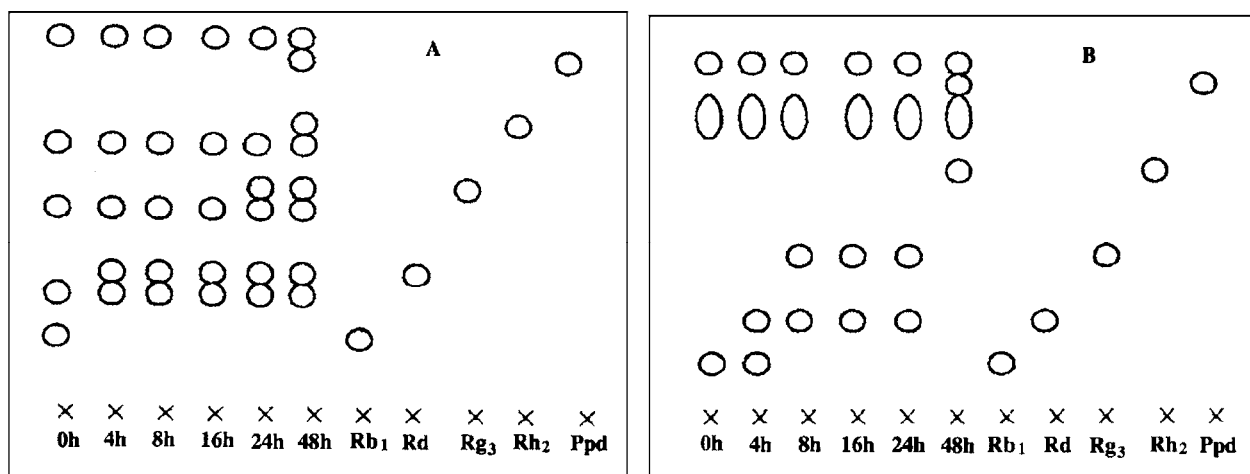


Fig 1 TLC of G-Rb₁ metabolites induced by human(A) and rats(B) intestinal bacteria *in vitro*. Condition of TLC: Application of samples: 5 μl metabolites or 2 μl standard samples; TLC plate: silica gel G 60, 0.25 mm thick; Developing solvents: CHCl₃-MeOH-H₂O(65:35:10, lower phase); Detection of spot: 10% H₂SO₄-EtOH.

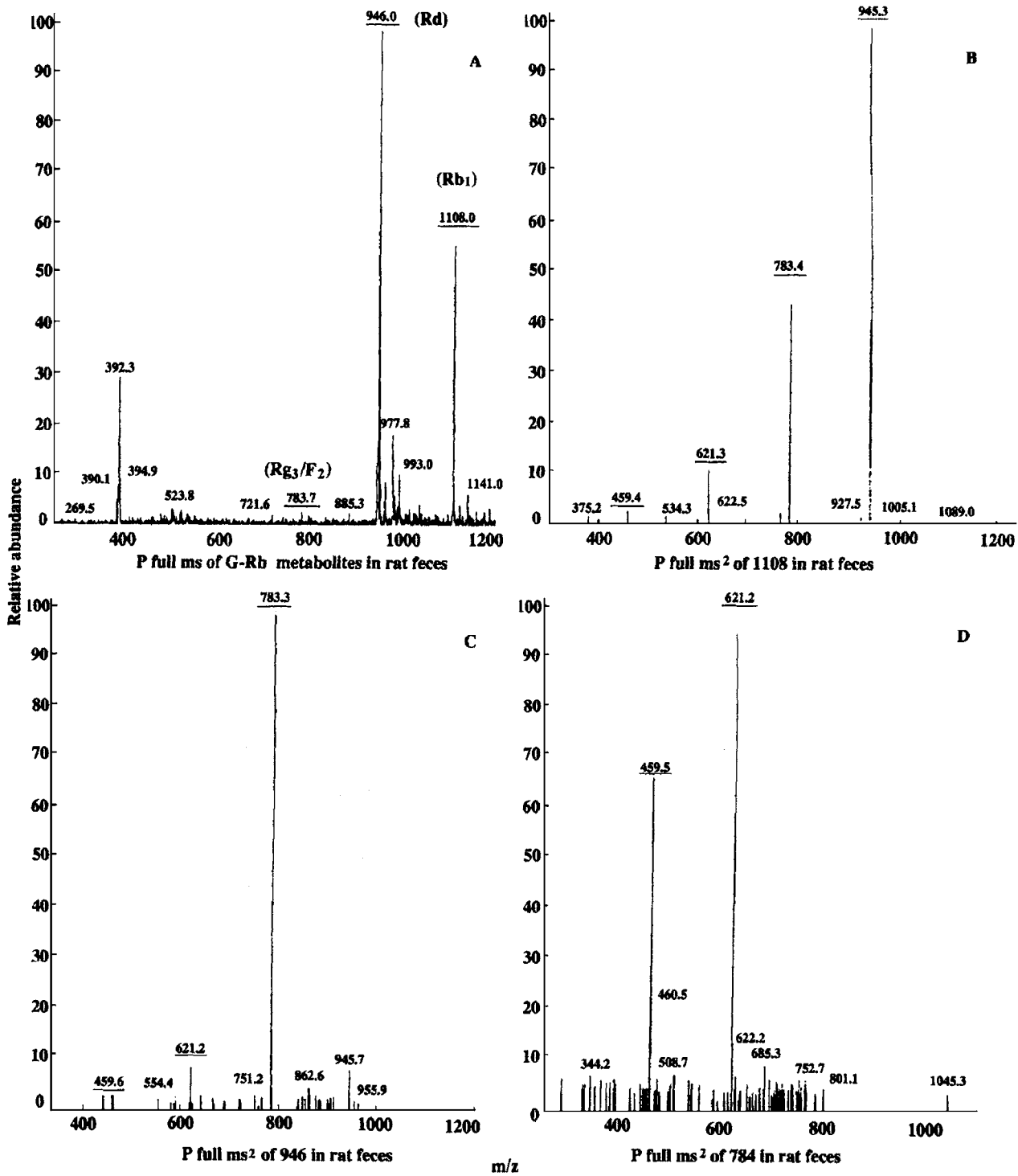


Fig 2 ESI-MS of rat feces 4 hours after G-Rb₁ (500 mg·kg⁻¹) administration (po).

讨 论

糖类化合物是肠道内细菌重要的碳源。因此，肠道内细菌的甙键水解酶系对具有甙键的药物进行水解是肠道内细菌代谢药物的一大特征^[6]。在本实验中，我们证实了肠道内细菌对 G-Rb₁ 分子中糖基的水解作用，并在肠内菌代谢的研究中引进了更

为灵敏(最低检测限为 10~12 ng·ml⁻¹)的检测手段-电喷雾质谱(ESI-MS)。对已知结构化合物的肠内菌代谢产物及其吸收入血微量成分的检测和确定，ESI-MS 都不失为一有用工具。

Odani^[3]等曾认为大鼠肠内菌代谢 G-Rb₁ 的终产物为 C-K，但我们用 TLC 和 ESI-MS(图谱未附)两种检测方法均证实，人和大鼠的肠内菌对 G-Rb₁

的最终代谢产物均为 20(S)Ppd。给大鼠整体 ig G-Rb₁ 4 h 后,用 ESI-MS 全质谱从大鼠粪便中检测出与 G-Rb₁, Rd 和 Rg₃/F₂ 3 种化合物分子量相近似的吸收峰,其分子量分别为 1108, 946 和 784 amu(图 2A)。继之对代谢物中分子量 1108, 946 和 784 的化合物进行 ESI-MS 第 2 次电子轰击(2 级质谱,见图 2B~D),根据其分子裂变规律(即电子轰击碎片的分子量衰减符合逐个脱糖的规律)与标准品 G-Rb₁, Rd 和 Rg₃ 的裂变规律完全吻合,从而确证上述 3 种化合物分别为 G-Rb₁, Rd 和 Rg₃/F₂。即在大鼠灌服 G-Rb₁ 4 h 后,粪中有 Rd 和 Rg₃/F₂ 两种代谢产物存在。由于整体给药收集粪时,时间长粪易被尿液污染,所以本文仅检测了 4 h 和 6 h 粪的代谢产物。

G-Rb₁ 及其代谢产物经 TLC 分离,以标准品 Rg₃ 和 Rh₂ 进行定性检测时发现,以 CHCl₃-

MeOH-H₂O = 65:35:10 作为展开剂,可见到与 Rg₃ 及 Rh₂ 具有相同 Rf 值的斑点。但改变展开条件,即以 CHCl₃-EtOAc-CH₃OH-H₂O = 15:40:22:10(10℃)作为展开剂时,发现上述两个斑点的 Rf 值不再与 Rg₃ 和 Rh₂ 相同。根据上述实验结果,这两个斑点可能不是 Rg₃ 和 Rh₂。之后,用 ESI-MS 进一步检测两个斑点的分子量确实与 Rg₃, Rh₂ 相同。日本学者^[7]曾报告,Rg₃ 和 Rh₂ 是化学降解 G-Rb₁ 的产物,大鼠肠内菌代谢只能得到 Rg₃ 和 Rh₂ 的同分异构体 F₂ 和 C-K(图 3)。最近的研究资料表明,用酶免疫测定法(EIA)在 ig G-Rb₁ 后 7 h,在大鼠的血清中检测到代谢物 C-K^[8]。根据以上研究资料和文献资料我们推断,这两个斑点是 F₂ 和 C-K。结合厌氧培养条件下,G-Rb₁ 在大鼠和人肠内菌作用下代谢产物的动力学变化结果,肠内菌代谢 G-Rb₁ 的可能途径如下:

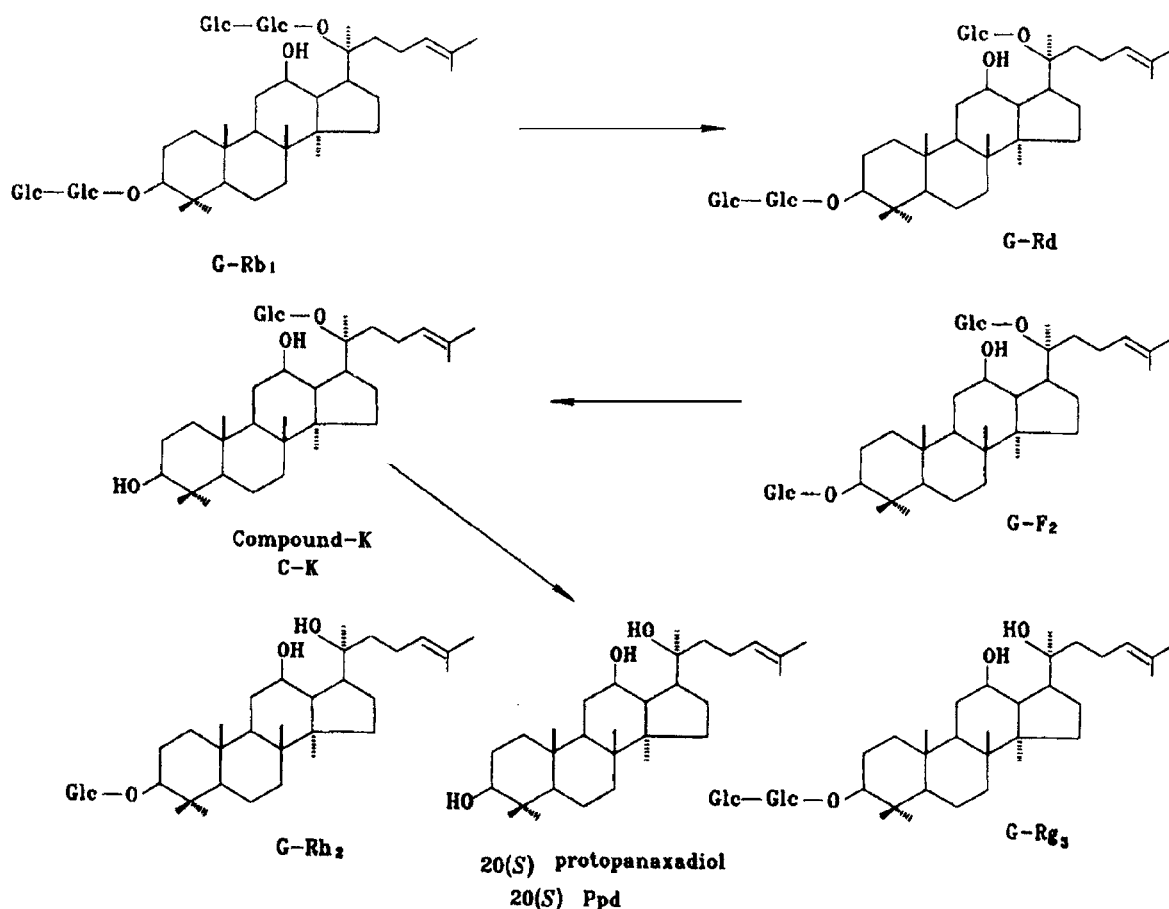


Fig 3 Possible metabolic path way of G-Rb₁ by human and rat intestinal bacteria.

综上所述,G-Rb₁ 易被肠道内细菌所代谢。因此,有必要进一步对口服 G-Rb₁ 后原甙及肠内菌代

谢产物吸收入血情况,以及原甙与代谢产物在生物活性方面有何异同进行考察,以期阐明人参制剂口

服后发挥药效的真正有效成分及其作用机制。

参 考 文 献

- 1 王本祥主编. 现代中药药理学. 天津:天津科学技术出版社, 1997. 1147
- 2 张均田. 人参研究的回顾和展望. 药理学报, 1995, **30**: 321
- 3 Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins IV. Decomposition of ginsenoside Rg₁ and Rb₁ in the digestive tract of rat. *Chem Pharm Bull*, 1983, **31**:3691
- 4 Hattori M, Shu YZ, Shimizu M, *et al.* Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal

- bacteria. *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**:3838
- 5 小橋恭一, 金岡又雄, 赤尾光昭. 药用人参の眞の活性物質は? 见:熊谷 朗編. 药用人参'95, 东京:共立出版社株式会社, 1994. 213
 - 6 康白主编. 微生物生态学. 大连:大连出版社, 1988. 95
 - 7 Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, *et al.* Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₁ and -Rb₂ in the digestive tract of rats. *Chem Pharm Bull*, 1991, **39**:2357
 - 8 赤尾光昭, 金岡又雄, 小橋恭一. 药用人参成分ジンセノサイド Rb₁は肠内細菌代謝物 compound K として吸収される. *Methods in Kampo Pharmacology*(第2回白桦湖シンポジウム). 东京:株式会社ういフサイユンス・メデイカ, 1997. 111

THE METABOLISM OF GINSENOSE Rb₁ BY INTESTINAL BACTERIA

Chen Xin(Chen X)¹, Zhou Qiuli(Zhou QL)¹ and Wang Benxiang(Wang BX)

(Research Centre of New Drug, Changchun College of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021;

¹Institute of Biological Engineering, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT AIM: To study the metabolism of ginsenosid Rb₁ (G-Rb₁) by rat and human intestinal bacteria *in vitro* and *in vivo*. **METHODS:** Using thin-layer chromatography(TLC) and electron spurt ion mass (ESI-MS) for measurements of G-Rb₁ and its metabolites. **RESULTS:** G-Rb₁ was decomposed easily *in vitro* by rat and human intestinal bacteria, and consequently four metabolites (Rd, Rg₃/F₂, Rh₂/C-K and Ppd) were observed on TLC with prolongation of incubation time. Using electron spurt ion mass spectroscopy(ESI-MS), G-Rb₁ and its metabolites in rat feces were also assayed 4 h and 6 h after oral administration. Both metabolites Rd and Rg₃/F₂ were detected. **CONCLUSION:** The above mentioned results showed that the mode of metabolism of G-Rb₁ was Rb₁→Rd→F₂→C-K and the final metabolite was 20(S) Ppd in the feces of rats and human.

KEY WORDS ginsenoside Rb₁; intestinal bacteria metabolism; electron spurt ion mass spectroscopy(ESI-MS); thin-layer chromatography(TLC)