

人参皂苷 Rg_1 及其代谢产物的药代动力学研究

冯 亮, 胡昌江*, 余凌英

(成都中医药大学药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 研究静注和灌胃给予一定量人参皂苷 Rg_1 后, 其原形和 3 种代谢产物的药代动力学。以 Wistar 大鼠为模型动物, 以 LC-MS/MS 法测定血浆中人参皂苷 Rg_1 及其代谢产物的浓度, 并计算药代动力学参数。灌胃给药后, 在血浆中检测到人参皂苷 Rg_1 、 Rh_1 、 F_1 和原人参三醇 4 种物质。其 T_{max} 分别为 0.92、3.64、5.17 和 7.30 h, MRT 分别为 2.68、5.06、6.65 和 5.33 h, AUC_{0-t} 为 2 363.5、4 185.5、3 774.3 和 396.2 $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ 。静注给药后, 在血浆中检测到人参皂苷 Rg_1 、 Rh_1 和 F_1 3 种物质。其 $T_{1/2\beta}$ 分别为 3.12、5.87 和 6.87 h, MRT 分别为 1.92、5.99 和 7.13 h, AUC_{0-t} 分别为 1 454.7、597.5 和 805.6 $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ 。结果表明灌胃给药后, 大鼠体内的人参皂苷 Rg_1 代谢产物的量超过原形药, 且代谢产物的吸收和消除速率相对缓慢。静注给药后, 大鼠体内的人参皂苷 Rg_1 以原形为主, 但仍有少量代谢产物存在, 且代谢产物的吸收和消除速率相对缓慢。

关键词: 人参皂苷 Rg_1 ; 代谢产物; LC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 05-0636-05

Pharmacokinetics of ginsenosides Rg_1 and its metabolites in rats

FENG Liang, HU Chang-jiang*, YU Ling-ying

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China)

Abstract: To study the pharmacokinetics of ginsenosides Rg_1 and its metabolites after iv and oral administration in Wistar rats, the LC-MS/MS method was selected to determine ginsenosides Rg_1 and its metabolites in plasma and their pharmacokinetic parameters were calculated. After oral administration of ginsenosides Rg_1 to rats, ginsenosides Rg_1 , Rh_1 , F_1 and protopanaxatriol (Ppt) could be detected in plasma. Their T_{max} were 0.92, 3.64, 5.17, and 7.30 h, respectively; MRT were 2.68, 5.06, 6.65, and 5.33 h, respectively; AUC_{0-t} were 2 363.5, 4 185.5, 3 774.3, and 396.2 $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$, respectively. After iv administration of ginsenosides Rg_1 to rats, ginsenosides Rg_1 , Rh_1 and F_1 could be detected in plasma. Their $T_{1/2\beta}$ s were 3.12, 5.87, and 6.87 h, respectively; MRTs were 1.92, 5.99, and 7.13 h, respectively; AUC_{0-t} s were 1 454.7, 597.5, and 805.6 $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$, respectively. So, it can be concluded that after oral administration, the amounts of metabolites were higher than the prototype *in vivo*, and the distribution and elimination of the metabolites were relatively slow. After iv administration, the amount of prototype were higher than that of the metabolites *in vivo*, and the distribution and elimination of the metabolites were relatively slow.

Key words: ginsenoside Rg_1 ; metabolite; LC-MS/MS; pharmacokinetics

三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen] 是我国的传统珍贵药材, 具有止血、散瘀、消肿、止痛等功效。研究表明, 三七中的达玛烷型四环三萜皂苷是

其主要有效成分之一, 所含的皂苷包括两类, 即原人参二醇型和原人参三醇型。人参皂苷 Rg_1 (ginsenoside Rg_1 , Rg_1) 属于原人参三醇型^[1], 是三七中主要的皂苷成分, 具有益智、抗衰老、提高神经系统功能^[2, 3]等作用。

对 Rg_1 的药代动力学研究始于 20 世纪 80 年代。研究发现, Rg_1 在体内呈二室模型, 其体内吸收迅速,

收稿日期: 2009-11-04.

基金项目: 四川省教育厅基金课题 (07ZB019).

*通讯作者 Tel: 86-28-85500123, E-mail: hhccjj@163.com

消除速率较快^[4]。此外, Rg₁ 在肠道菌群的作用下可以被迅速代谢, 在人肠道内代谢途径为 Rg₁→Rh₁ (ginsenoside Rh₁, Rh₁)→原人参三醇 (20S-protopanaxatriol, Ppt), 而在大鼠肠道内代谢途径为 Rg₁→Rh₁/F₁ (ginsenoside F₁, F₁)→Ppt, 其中 Rh₁/F₁ 互为同分异构体^[5], 其分子结构式如图 1 所示。到目前为止, Rg₁ 的药代动力学研究多限于药材与各种制剂中的原形药物考察, 并未涉及到其代谢产物。因此, 本文以 Wistar 大鼠为模型动物, 分别采用静注和灌胃法给予一定量 Rg₁, 然后测定给药后不同时间点大鼠血浆中 Rg₁ 原形和各种代谢产物的含量, 以此考察不同给药途径下 Rg₁ 及其代谢产物的药代动力学。

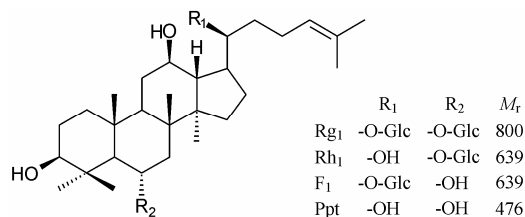


Figure 1 Molecular structure of ginsenoside Rg₁ (Rg₁) and its metabolites. Rh₁: Ginsenoside Rh₁; F₁: Ginsenoside F₁; Ppt: 20S-protopanaxatriol

材料与方法

仪器与试剂 美国 AB 公司 API 3000 型液相色谱-三级四极杆质谱联用仪, 配有电喷雾离子源 (ESI); Agilent 1100 液相色谱系统; TDL-5 台式高速离心机; GM-0.33A 隔膜真空泵; HSE-12A 固相萃取仪; Agela Cleanert ODS-C₁₈ SPE 柱 (100 mg, 1 mL); CM-12 水浴式氮吹仪。Rg₁ 提取物购自云南特安纳制备厂, 纯度≥95%, 生产批号 DFC2SQ29901; Rg₁、Rh₁、F₁ 和 Ppt 对照品购自中国药品生物制品检定所。

实验动物 Wistar 大鼠 (由成都中医药大学动物试验中心提供, 合格证号: 川动字 1136 号) 12 只, 雌雄各半, 体重 (250±25) g, 试验前饲养 7 d。

色谱与质谱条件 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱 (200 mm×2.1 mm ID, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (28:72); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃。电喷雾 ESI 源; 喷雾电压 4 kV; 雾化温度 380℃; 雾化气 10 L·min⁻¹; 加热辅助气 7 L·min⁻¹; 帘气 12 L·min⁻¹; 碰撞气 3 L·min⁻¹; 检测方式为正离子多离子反应监测 (MRM), 用于定量分析的离子分别为 *m/z* 801.0→441.0 (Rg₁)、*m/z* 639.0→441.0 (Rh₁)、*m/z* 639.0→405.0 (F₁)、*m/z* 477.0→228.0 (Ppt)。

给药方案与血样采集 Wistar 大鼠 12 只, 随机

分成 2 组, 每组 6 只, 试验前禁食不禁水 12 h。一组灌胃给予 Rg₁ 提取物溶液, 剂量 150 mg·kg⁻¹, 给药后 15 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、3.5 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 24 h 于尾静脉取血 0.4 mL; 另一组股静脉注射给予 Rg₁ 提取物溶液, 剂量 10 mg·kg⁻¹, 给药后 5 min、10 min、15 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 24 h 于尾静脉取血 0.4 mL。血样置肝素化离心管。离心 (4 000 r·min⁻¹, 5 min) 分离血浆, 置-20℃保存待测。

血浆样品处理 采用 HSE-12A 固相萃取仪为固相萃取辅助装置。将 SPE 柱先后用甲醇和水各 2 mL 活化。取血浆 0.1 mL 移入已活化的 SPE 柱, 减压使其恒速通过 SPE 柱。然后用水 2 mL 清洗小柱, 抽干, 最后用甲醇 1.5 mL 洗脱。收集洗脱液, 40℃水浴中 N₂ 流下吹干。残留物用流动相 0.1 mL 充分溶解后, 经自动进样器进样 20 μL, 进行 LC-MS/MS 分析。

方法学考察 分别取 Rg₁、Rh₁、F₁ 和 Ppt 对照品适量, 等比稀释成一系列不同浓度的对照品溶液。取不同浓度的对照品溶液 0.1 mL, 分别加入大鼠空白血浆 0.1 mL, 按“血浆样品处理方法”处理后进样分析, 以测得的峰面积 (*A*) 对血药浓度 (*C*) 作线性回归。

同法配制低、中、高 3 个浓度的 Rg₁、Rh₁、F₁ 和 Ppt 样品溶液, 按“血浆样品处理方法”操作, 随标准曲线同时测定, 计算方法回收率和日内、日间精密度, 以提取后的色谱峰面积与空白血浆提取后加入对照品溶液后进样获得的峰面积之比, 考察方法的提取回收率。

数据处理 药-时数据采用 3P87 药代动力学程序进行模型拟合, 以 AIC 值和 *F* 检验结果确定最佳房室模型, 并计算各药代动力学参数。其中 AUC_{0-*t*} 采用梯形法计算, MRT 采用统计矩法进行计算, 与房室模型无关。

结果

1 方法学评价

本方法中 Rg₁、Rh₁、F₁ 和 Ppt 的保留时间分别为 7.6、16.5、18.1 和 23.5 min, 血浆中内源性物质不干扰测定, 见图 2~图 4, 各色谱峰的理论塔板数在 1 100~1 600 之间, 对称因子在 1.02~1.15 之间。各组分的回归方程、线性范围、相关系数和检测限见表 1。各组分在低、中、高浓度下的回收率和日内、日间精密度的结果见表 2; 经考察, 血浆样品中各组分经

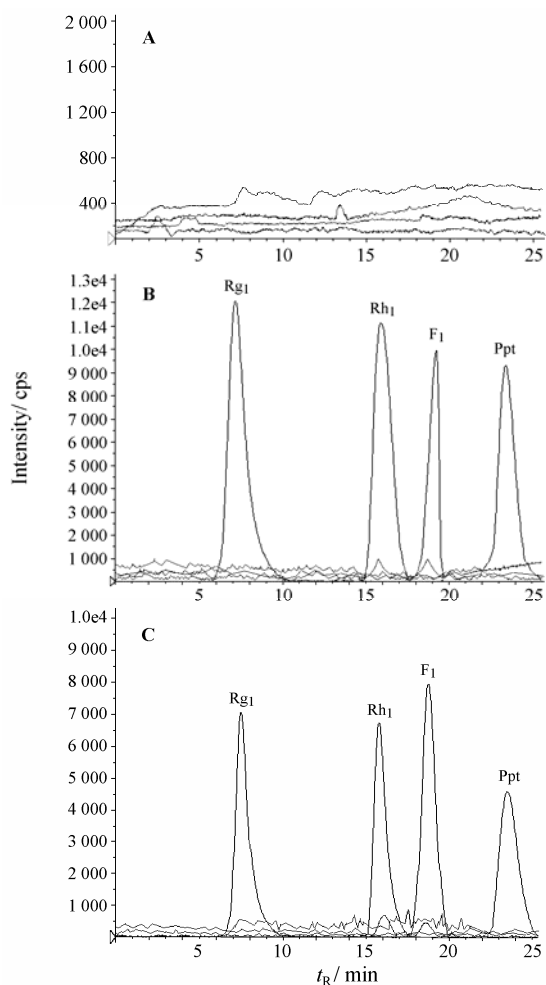


Figure 2 Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with Rg₁, Rh₁, F₁ and Ppt (B), and plasma sample (C) after oral administration of 150 mg·kg⁻¹ herbal extracts of Rg₁

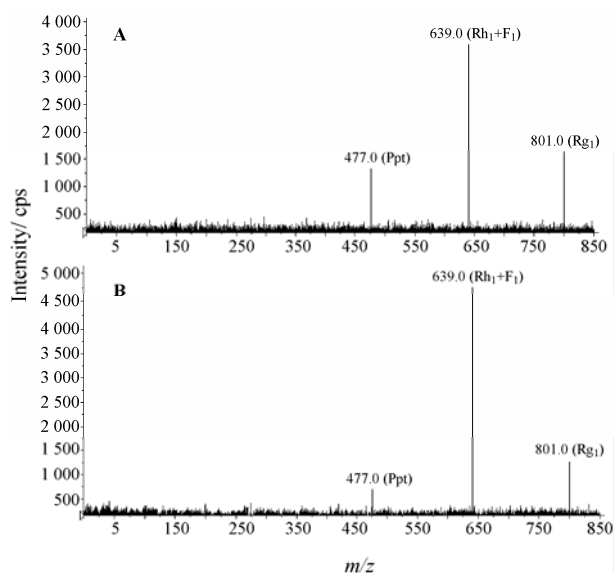


Figure 3 First mass-spectrogram of blank plasma spiked with Rg₁, Rh₁, F₁ and Ppt (A), and plasma sample (B) after oral administration of 150 mg·kg⁻¹ herbal extracts of Rg₁

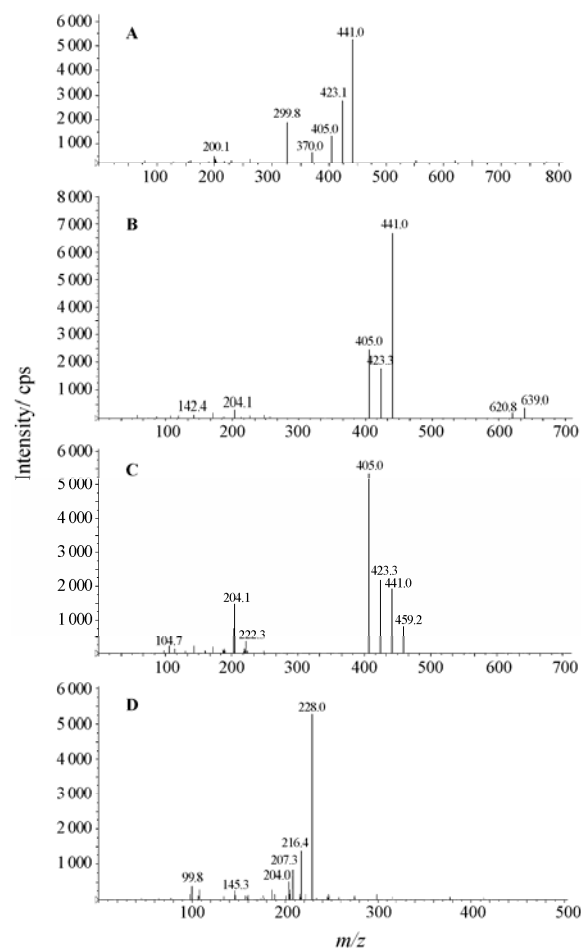


Figure 4 Second mass-spectrogram of Rg₁ (A), Rh₁ (B), F₁ (C) and Ppt (D)

Table 1 Calibration curves of ginsenoside Rg₁ and its metabolites in plasma ($n = 6$)

Ginsenoside	Calibration curve $A = aC + b$	Linear range /ng·mL ⁻¹	r	LOD /ng·mL ⁻¹
Rg ₁	$A = 5.15 \times 10^3 C + 2\,219$	2 400–4.69	0.998 7	2.34
Rh ₁	$A = 3.22 \times 10^3 C + 109$	1 400–2.73	0.997 9	1.37
F ₁	$A = 3.74 \times 10^3 C + 1\,158$	1 600–3.13	0.999 1	1.56
Ppt	$A = 1.73 \times 10^3 C + 2\,947$	1 100–2.15	0.998 1	1.07

Table 2 Recovery and precision of ginsenoside Rg₁ and its metabolites in plasma ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Ginsenoside	Concentration /ng·mL ⁻¹	Recovery/%		Precision RSD/%	
		Absolute	Relative	Inter-day	Intra-day
Rg ₁	9.38	67.9 ± 7.3	97.7 ± 7.7	8.4	11.4
	150	76.5 ± 8.0	101.2 ± 6.5	5.2	9.9
	1 200	70.3 ± 5.5	95.2 ± 9.3	6.6	7.3
Rh ₁	5.47	65.1 ± 6.2	98.4 ± 10.8	6.2	8.5
	87.5	78.8 ± 6.8	94.6 ± 11.2	5.5	2.6
	700	69.3 ± 3.9	99.8 ± 6.6	2.3	3.7
F ₁	6.25	70.6 ± 4.7	98.5 ± 7.5	6.9	9.7
	100	77.4 ± 6.3	102.7 ± 5.9	4.4	5.4
	800	68.8 ± 5.2	100.6 ± 10.2	7.2	2.6
Ppt	4.30	77.9 ± 8.6	95.9 ± 8.7	8.8	9.3
	68.75	69.6 ± 7.6	99.4 ± 4.9	3.9	4.3
	550	73.3 ± 5.8	97.2 ± 9.5	1.7	4.4

过 3 个冷冻-解冻循环和 -20°C 条件下保存 30 d 及制备的样品室温放置至少 8 h 后仍保持稳定。

2 药代动力学

Wistar 大鼠灌胃给予 R_{g1} 溶液 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 测得的 R_{g1} 及其代谢产物的药-时曲线见图 5, 其在大鼠体内的动力学行为均符合二房室开放模型 (权重 $1/C^2$)。由图可见, 灌胃给药 15 min 即可在血中检测到 R_{g1} 的存在, 大约 1 h 血药浓度达到峰值, 然后迅速下降, 8 h 后即检测不到。 R_{g1} 的中间代谢产物 Rh_1 和 F_1 大约在给药后 1 h 可在血中测到, 并分别在给药后 3.64 h 和 5.17 h 达到浓度峰值。最终代谢产物 Ppt 大约在给药 3 h 后出现在血中, 并在给药后 7.30 h 达到浓度峰值。3 种代谢产物在给药后 24 h 仍可在血中检出。将测得的药-时数据采用 3P87 程序处理得到各主要药代动力学参数, 结果见表 3。

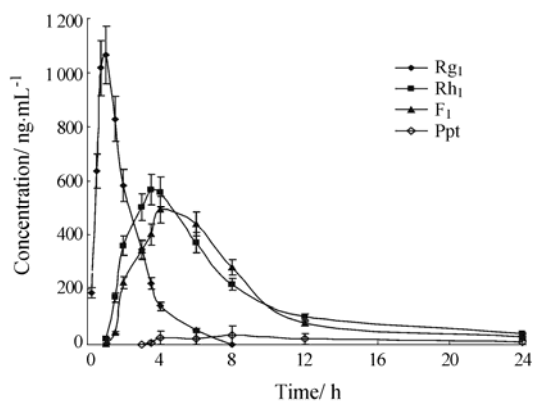


Figure 5 Mean plasma concentration-time curves of ginsenoside R_{g1} and its metabolites after oral administration of $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ herbal extracts of R_{g1} ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Wistar 大鼠静注给予 R_{g1} 溶液 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 测得的 R_{g1} 及其代谢产物的药-时曲线见图 6, 其在大鼠体内的动力学行为仍符合二房室开放模型 (权重

$1/C^2$)。由图可见, 静注给药 5 min 后血中 R_{g1} 的浓度最高, 然后迅速下降, 4 h 后即检测不到。代谢产物 Rh_1 和 F_1 分别在给药后 1 h 和 2 h 出现在血液中, 并分别在 4.46 h 和 5.73 h 达到浓度峰值。与灌胃给药不同, 静注 R_{g1} 后不能在血中检测到 Ppt 的存在。将测得的药-时数据采用 3P87 程序处理得到各主要药代动力学参数, 结果见表 4。

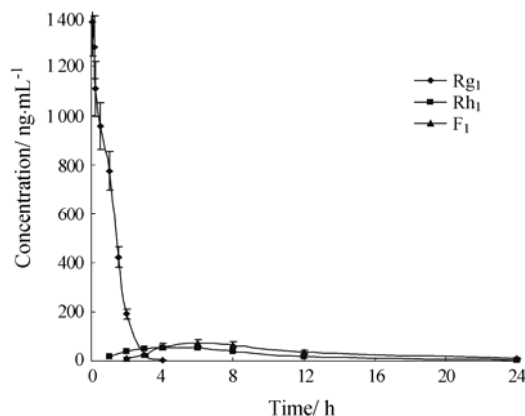


Figure 6 Mean plasma concentration-time curves of ginsenoside R_{g1} and its metabolites after iv administration of $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ herbal extracts of R_{g1} ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of ginsenoside R_{g1} and its metabolites after iv administration of $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ herbal extracts of R_{g1} ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	R_{g1}	Rh_1	F_1
α / h^{-1}	2.2 ± 0.8	2.9 ± 1.1	4.1 ± 1.3
β / h^{-1}	0.28 ± 0.11	0.16 ± 0.04	0.13 ± 0.05
$T_{1/2\alpha} / \text{h}$	0.37 ± 0.13	0.30 ± 0.14	0.23 ± 0.10
$T_{1/2\beta} / \text{h}$	3.12 ± 1.64	5.87 ± 2.66	6.87 ± 2.95
$V_c / \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.021 ± 0.009	0.028 ± 0.011	0.035 ± 0.014
$CL_s / \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.037 ± 0.017	0.009 ± 0.005	0.016 ± 0.006
$AUC_{0-t} / \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	$1\ 454.7 \pm 446.2$	597.5 ± 274.3	805.6 ± 233.7
MRT / h	1.92 ± 0.23	5.99 ± 3.03	7.13 ± 2.25

Table 3 Pharmacokinetic parameters of ginsenoside R_{g1} and its metabolites after oral administration of $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ herbal extracts of R_{g1} ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	R_{g1}	Rh_1	F_1	Ppt
α / h^{-1}	7.4 ± 2.9	3.6 ± 0.8	4.0 ± 1.0	4.4 ± 1.4
β / h^{-1}	0.46 ± 0.16	0.12 ± 0.05	0.17 ± 0.05	0.22 ± 0.06
$C_{\max} / \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	1134 ± 563	585 ± 117	522 ± 198	38 ± 23
$T_{\max} / \text{h}$	0.92 ± 0.12	3.64 ± 1.43	5.17 ± 0.93	7.30 ± 2.0
$T_{1/2\alpha} / \text{h}$	0.14 ± 0.05	0.29 ± 0.09	0.22 ± 0.08	0.20 ± 0.04
$T_{1/2\beta} / \text{h}$	2.25 ± 0.68	6.73 ± 2.28	5.44 ± 1.44	5.06 ± 0.9
$V_c / \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.008 ± 0.002	0.015 ± 0.04	0.020 ± 0.007	0.027 ± 0.011
$CL_s / \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.031 ± 0.014	0.017 ± 0.08	0.022 ± 0.005	0.011 ± 0.006
$AUC_{0-t} / \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	$2\ 363.5 \pm 856.6$	$4\ 185.5 \pm 1\ 394.7$	$3\ 774.3 \pm 889.6$	396.2 ± 203.4
MRT / h	2.68 ± 0.36	5.06 ± 1.33	6.65 ± 2.17	5.33 ± 3.20

讨论

灌胃给药后, R_{g1} 、 R_{h1} 、 F_1 和 P_{pt} 的分布相半衰期和消除相半衰期表明原形药物在体内的分布和消除速率均较快, 但代谢产物的消除速率相对较慢, 其平均滞留时间 MRT 也比原形高。Odani 等^[6]发现 R_{g1} 的口服生物利用度仅为 1.9%~20%。而霍玉书等^[7]灌胃给予小鼠 3H - R_{g1} 后, 发现其生物利用度可达 49%, 并推断是代谢产物被吸收入血的缘故。本实验证实了这一推断, 若仅考虑原形药物, 则 R_{g1} 的口服生物利用度仅为 10.82%。但是其水解掉一分子葡萄糖的代谢产物 R_{h1} 和 F_1 在血液中浓度较高, 两者的 AUC_{0-t} 均超过原形。 P_{pt} 在血液中的浓度比较低, 其 AUC_{0-t} 也较小, 但是其代谢缓慢, 24 h 后仍能在血中检出, 因此不能忽视。

静注给药后, R_{g1} 、 R_{h1} 和 F_1 的平均滞留时间 MRT 分别为 1.92、5.99 和 7.13 h, 说明 R_{g1} 在体内消除较快, 而代谢产物的体内消除相对缓慢; 药-时曲线下面积表明相对于灌胃给药而言, 静注给药后有更多的 R_{g1} 以原形存在于体内, 代谢产物的比例相对较低。研究^[8]发现, 大鼠静脉注射 R_{g1} 15 mg·kg⁻¹ 后, 4 h 胆汁中累积排泄量为剂量的 57.2%, 12 h 内尿累积排泄量为剂量的 23.5%, R_{g1} 经尿、胆汁共排出 80% 以上, 说明其体内代谢并不明显。因此, 静注 R_{g1} 后血液中代谢产物的来源应该是部分 R_{g1} 通过胆汁排入肠道, 在肠道内发生水解后, 水解产物再吸收入血。排泄、水解和再吸收过程需要时间, 因此, 在给药一段时间后才能再出现在血中。 P_{pt} 不能被检出, 原因可能有: ① 给药剂量小导致 P_{pt} 的血药浓度过低; ② P_{pt} 在肠道中出现时间过晚, 错过了最佳吸收部位以至于不能吸收^[9]。

总之, 无论是口服还是静注给予 R_{g1} , 其代谢产物在体内均普遍存在, 且浓度水平高, 消除缓慢。因此, 有必要进一步对代谢产物的药理学、药效学性质

进行考察, 并对原形与代谢产物在生物活性方面的异同进行深入研究, 以期阐明传统三七制剂中发挥作用的真正有效成分。

References

- [1] Dou D, Chen Y, Ren J. Ocotillone-type ginsenoside from leaves of *Panax ginseng* [J]. J Chin Pharm Sci, 2002, 11: 119–121.
- [2] Rudake M, Ba F. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenosides Rb1 and Rg1 [J]. Planta Med, 2001, 67: 533–537.
- [3] Chen XC, Zhou YC, Chen Y. Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26: 56–62.
- [4] Xu QF, Fang XL. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenosides Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 23: 187–192.
- [5] Hideo H, Jong HS, Satoshi M, et al. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria [J]. Planta Med, 1996, 62: 453–457.
- [6] Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins II. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rg1 in the rat [J]. Chem Bull (Tokyo), 1983, 31: 292–298.
- [7] Huo YS, Zhang SC, Zhou D, et al. The pharmacokinetics and distribution of 3H labeled ginsenoside Rg1 [J]. Acta Pharmacol Sin, 1986, 7: 519–521.
- [8] Han M, Fang XL. Comparison between the characteristics of absorption and pharmacokinetic behavior of ginsenoside Rg1 and ginsenoside Rb1 of *Panax notoginseng* saponins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 849–853.
- [9] Wang Y, Liu TH. Studies on the metabolism of ginsenosides Rg1 by intestinal bacterial and its absorbed metabolites in rat and human serum [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 35: 284–288.