

大鼠肠道菌群对三七总皂苷体外降解的研究

唐 岚¹, 傅璐璐¹, 沈丽婷¹, 孙伯璇¹, 朱转凤¹, 余小兰¹, 吕慧侠^{2*}, 单伟光^{1*}

1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

2. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009

摘要:目的 探究雌、雄大鼠肠道菌群对三七总皂苷中 3 种皂苷(三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁) 的体外降解作用。方法 将三七总皂苷分别与雌、雄大鼠肠道菌群孵育液在厌氧条件下共同培养 24 h, 测定不同时间点孵育液中 3 种皂苷的量。结果 雌、雄大鼠肠道菌群对人参皂苷 Rb₁ 均有降解作用, 雄鼠的降解较雌鼠稍快。雌、雄鼠肠道菌群对三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 均无明显降解作用。结论 在离体条件下, 三七总皂苷中人参皂苷 Rb₁ 会被肠道菌群降解, 而三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 则较为稳定。

关键词: 肠道菌群; 三七总皂苷; 降解; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0396-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.020

Degradation of total saponins of *Panax notoginseng* by intestinal flora of rats *in vitro*

TANG Lan¹, FU Lu-lu¹, SHEN Li-ting¹, SUN Bo-xuan¹, ZHU Zhuan-feng¹, YU Xiao-lan¹, LV Hui-xia², SHAN Wei-guang¹

1. School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To investigate the degradation of three kinds of saponins (notoginseng saponin R₁, ginsenoside Rg₁, and ginsenoside Rb₁) from total saponins of *Panax notoginseng* (tPNS) by intestinal flora in male and female rats *in vitro*. **Methods** tPNS were incubated for 24 h with male and female rats intestinal flora separately *in vitro* under anaerobic environment. The content of three kinds of saponins was measured at different treatment time. **Results** The results showed that the intestinal flora both in male and female rats all had the degradation action against ginsenosides Rb₁, in which the degradation of male rats was slightly faster than that of female rats. But the intestinal flora both in male and female rats had no obvious degradation to notoginseng saponin R₁ and ginsenoside Rg₁. **Conclusion** Under the condition of *in vitro*, tPNS can be degraded by rats intestinal flora, of which Rb₁ was degraded most, while notoginseng saponin R₁ and ginsenoside Rg₁ were more stable.

Key words: intestinal flora; total saponins of *Panax notoginseng*; degradation; notoginseng saponin R₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁

肠道菌群是人体肠道内的正常微生物, 口服药物进入体内后, 在进入血液循环之前, 在小肠内与肠道菌群接触并相互作用, 可能导致药物活性发生改变^[1], 增加了用药风险, 尤其对于成分较为复杂的中药, 会影响药物的吸收和疗效。开展肠道菌群对中药复杂成分代谢规律的研究有助于阐明各类成分在体内的代谢过程以及发挥药效的机制, 为中药复方作用物质基础的研究提供依据^[2]。

三七总皂苷(total saponins of *Panax notoginseng*,

tPNS) 是从三七根中提取的主要药用有效成分, 具有抗心肌缺血、抗心肌梗死、抗凝、调血脂、降血压、抗炎、抗氧化等药理作用^[3]。其中人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 是 tPNS 中含量最高的 2 个成分, 而三七皂苷 R₁ 则是 tPNS 的特征化合物^[4]。tPNS 极性较大, 脂溶性小, 口服生物利用度较低, 其中肠道微生物对皂苷的转化降解是重要原因之一^[5]。钱静等^[6]研究了人参皂苷 Rb₁ 单一成分在肠道菌群中的代谢, 发现其在大鼠肠道菌液作用下脱糖基生成人参皂苷

收稿日期: 2017-07-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673830)

作者简介: 唐 岚, 副教授, 研究方向为中药制剂。Tel: (0571)88871075 E-mail: tanglan@zjut.edu.cn

*通信作者 吕慧侠, 副教授, 研究方向为制剂新技术。E-mail: lvhuixia@163.com

单伟光, 教授, 研究方向为天然药物及其制剂。Tel: (0571)88871075 E-mail: tianranyaowu@zjut.edu.cn

Rd、F₂和C-K。本实验通过研究雌性和雄性大鼠肠道菌群对tPNS中3种代表性单体皂苷的体外降解作用,为阐明tPNS口服吸收过程提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); ZHWY-2102 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司); SW-CJ-IFB 净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

tPNS(批号110870-201603,质量分数≥98%),对照品三七皂苷R₁(批号110745-201619,质量分数≥99%)、人参皂苷Rg₁(批号110754-201626,质量分数≥99%)、人参皂苷Rb₁(批号110704-201625,质量分数≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;厌氧培养基(批号20150616,青岛高科园海博生物技术有限公司);甲醇为分析纯、乙腈为色谱纯。

清洁级SD大鼠,雌雄各5只,体质量(250±20)g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,许可证号SCXK(浙)2017-0002。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁对照品,用蒸馏水溶解定容,配制成含三七皂苷R₁ 22.2 μg/mL、人参皂苷Rg₁ 81.76 μg/mL、人参皂苷Rb₁ 93.70 μg/mL的混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称定tPNS,蒸馏水溶解,配制成质量浓度为2.53 g/L的供试品溶液。

2.3 厌氧培养基的配制^[7]

称取一定量的厌氧培养基于250 mL烧杯中,以9.9:1 000的质量体积比加入纯化水,80℃水浴下搅拌使之完全溶解,稍冷却后移取至试管中,每管18 mL,置于灭菌锅,0.1 MPa、121℃灭菌20 min。取出后趁热加入1 mL液体石蜡,冷却待用。

2.4 大鼠肠道菌群孵育液的制备^[1,8-9]

分别取雌性和雄性大鼠新鲜粪便各1.5 g,以1:4的质量体积比加入生理盐水,涡旋制成混悬液,5 000 r/min离心10 min,取上清液再次离心,上清液即为肠道菌液。每次取2 mL肠道菌液加入到18 mL的厌氧培养基中,充分混匀,置于恒温振荡器中(150 r/min, 37℃)培养24 h,分别得到雌性和雄性大鼠肠道菌群孵育液。

2.5 大鼠肠道菌群对tPNS的降解研究

精密量取“2.2”项tPNS供试品溶液5 mL至

离心管中,加入25 mL雄鼠肠道菌群孵育液,混匀,装入厌氧袋中密封,放入恒温振荡器。于0、4、8、12、24 h分别取样,每个时间点平行3份,每次取样1 mL至离心管中,加入0.8 mL甲醇,涡旋后,10 000 r/min离心10 min,取上清液于2 mL量瓶,用无水甲醇洗涤离心管,将洗涤液转移至量瓶,用甲醇定容至刻度,得到雄鼠肠道菌群降解样品。制备雌鼠肠道菌群样品时,预试验结果表明雌鼠肠道菌群降解能力较弱,因此将供试品溶液的量减至4 mL,其他处理方法同雄鼠。

2.6 色谱条件^[10]

Agilent Extend-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水,柱温25℃,体积流量1 mL/min,进样量50 μL,检测波长203 nm。梯度洗脱,洗脱程序为0~20 min, 20%乙腈; 20~45 min, 20%~46%乙腈; 45~55 min, 46%~55%乙腈; 55~60 min, 55%乙腈。

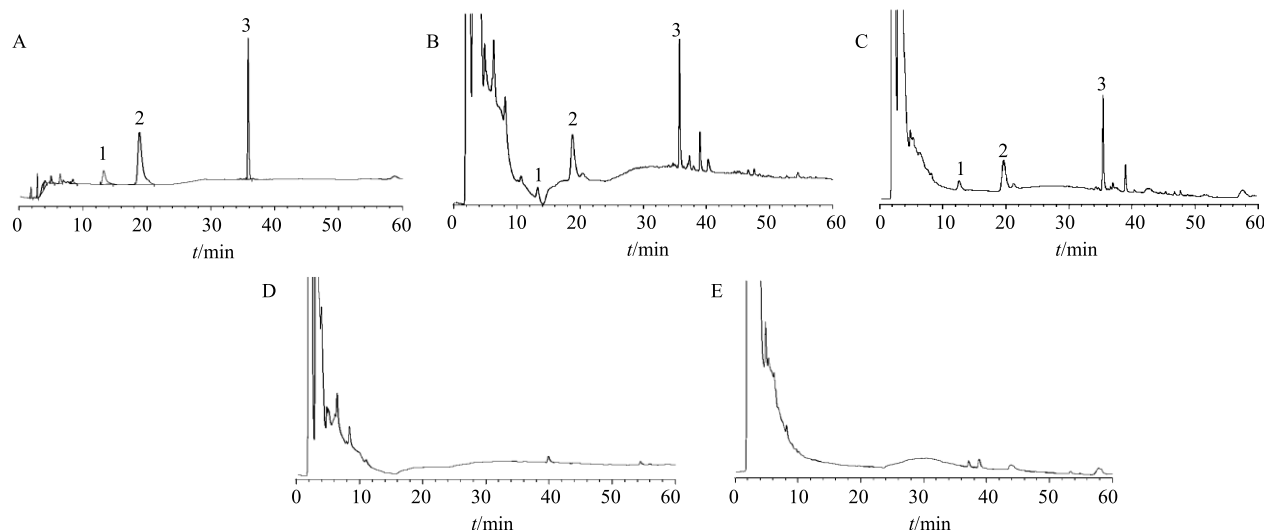
2.7 方法学验证

2.7.1 标准曲线及线性范围 精密吸取一定量混合对照品储备液于10 mL量瓶中,用甲醇依次稀释到三七皂苷R₁质量浓度分别为22.20、17.75、13.30、8.85、4.40 mg/L,人参皂苷Rg₁质量浓度分别为81.76、65.42、49.08、32.74、16.40 mg/L,人参皂苷Rb₁质量浓度分别为93.70、74.95、56.20、37.45、18.70 mg/L,以色谱峰面积为纵坐标(Y),以对照品质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得到三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁线性方程分别为 $Y=8\,897X+6.878$, $r=0.998$; $Y=12\,483X+25.25$, $r=0.997$; $Y=9\,289X-26.32$, $r=0.997$ 。线性范围分别为4.40~22.20、16.40~81.76、18.70~93.70 μg/mL。结果表明各化合物在相应质量浓度范围内线性关系良好。

2.7.2 专属性试验 空白雄、雌鼠肠道菌液按“2.5”项下方法处理,进行液相分析,结果见图1。由图1可见,肠道菌液不干扰3种皂苷的测定。

2.7.3 精密度和重复性试验 取一定量“2.1”项下对照品溶液,于同日内连续进样6次,记录峰面积,计算RSD。三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁的RSD分别为1.97%、0.45%、0.18%,结果表明仪器精密密度良好。

取1 mL雄鼠菌液于离心管中,平均分成3组,每组平行6份。分别精密加入tPNS供试品溶液适量,配制成高、中、低质量浓度的供试品溶液。混



A-混合对照品 B-tPNS 雌鼠肠道菌群代谢 0 h 样品 C-tPNS 雄鼠肠道菌群代谢 0 h 样品 D-雌鼠空白肠道菌群液 E-雄鼠空白肠道菌群液 1-三七皂苷 R_1 2-人参皂苷 R_{g1} 3-人参皂苷 R_{b1}

A-reference substance solution B-metabolite sample solution of tPNS in female rat intestinal flora at 0 h C-metabolite sample solution of tPNS in male rat intestinal flora at 0 h D-blank intestinal flora of female rat E-blank intestinal flora of male rat 1-notoginseng saponin R_1 2-ginsenoside R_{g1} 3-ginsenoside R_{b1}

图 1 专属性试验 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of specificity tests

匀后按“2.5”项中的方法处理样品，测定 0 h 样品中各皂苷的量。结果高、中、低 3 种质量浓度的 tPNS 中三七皂苷 R_1 的 RSD 为 5.27%、2.42%、4.44%，人参皂苷 R_{g1} 的 RSD 为 3.84%、0.98%、1.38%，人参皂苷 R_{b1} 的 RSD 为 1.63%、1.24%、4.12%。结果表明样品重复性良好。

2.7.4 稳定性试验 取 tPNS 供试品溶液 5 mL，按“2.5”项下方法制备 0 h 的样品，于 0、4、8、24、48 h 测定各成分峰面积。三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 的 RSD 分别为 3.27%、3.09%、0.69%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7.5 加样回收率 取 tPNS 供试品溶液于离心管中，平均分成 3 组，每组平行 3 份。分别精密加入对照品混合液适量，配制成高、中、低质量浓度的供试品溶液。每份加入培育了 24 h 的雌鼠肠道菌群液 1 mL。按“2.5”项下的方法处理样品，测定 0 h 样品中各皂苷的量。结果高、中、低 3 种质量浓度的 tPNS 中三七皂苷 R_1 回收率分别为 $(100.68 \pm 1.05)\%$ 、 $(101.05 \pm 1.27)\%$ 、 $(100.29 \pm 1.43)\%$ ，人参皂苷 R_{g1} 的回收率分别为 $(101.16 \pm 0.90)\%$ 、 $(100.72 \pm 0.91)\%$ 、 $(100.28 \pm 1.15)\%$ ，人参皂苷 R_{b1} 的回收率分别为 $(100.72 \pm 1.13)\%$ 、 $(100.35 \pm 0.82)\%$ 、 $(100.30 \pm 1.17)\%$ 。结果表明建立的 tPNS 的测定方法回收率良好。

2.8 肠道菌群体外对 tPNS 降解的影响

本实验同时研究了雌性和雄性大鼠离体肠道菌群对 tPNS 中 3 种具有代表性的皂苷的降解情况。取各时间点雌、雄鼠肠道菌群代谢样品，按“2.6”项下方法测定 3 种皂苷的量，结果见图 2。在 24 h 内雄鼠肠道菌群对三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的降解不明显，但对人参皂苷 R_{b1} 降解明显，在 8 h 时已经降解超过 50%，在 24 h 内几乎完全降解。雌鼠肠道菌群在 24 h 内对三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的降解不明显，而对人参皂苷 R_{b1} 降解比较明显，在 8 h 时也代谢超过了 50%。与雄鼠比较，雌鼠在 24 h 后人参皂苷 R_{b1} 未代谢完全，质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

目前对皂苷类化合物在肠道菌群中的代谢研究较多，而且已证实人肠道中的细菌 *Bacteroides* JY-6, *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp. 和 *Fusobacterium* sp. 等能够代谢人参皂苷 R_{b1} 、 R_{b2} 和 R_{c1} ^[11]。本实验研究了雌、雄大鼠肠道菌群对 tPNS 的体外降解作用，选取了 tPNS 中量最高的人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} ，以及特征化合物三七皂苷 R_1 ，通过 HPLC 对这 3 种成分进行测定。结果显示在 24 h 内，大鼠肠道菌群对 tPNS 中的人参皂苷 R_{b1} 降解明显，且雄鼠肠道菌群比雌鼠代谢能力强，原因可能是不同性别的大鼠粪便中各种菌的比例不同，导致降解作

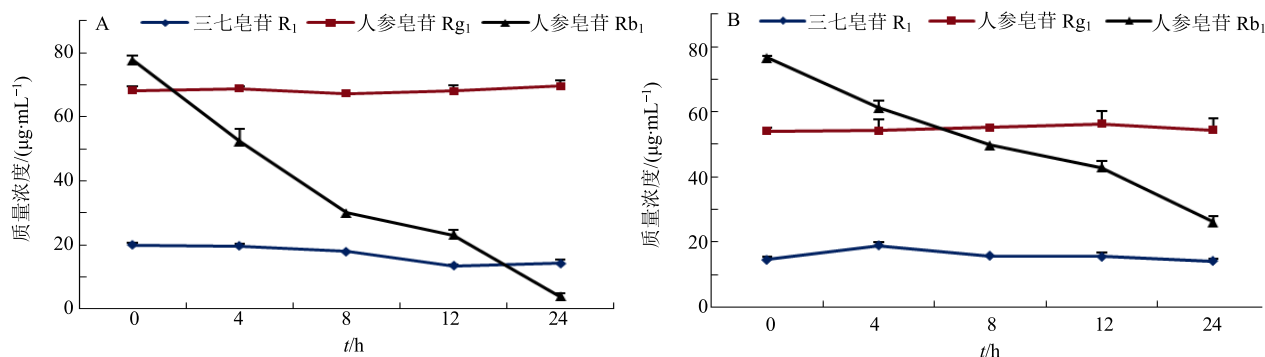


图 2 tPNS 在雄鼠 (A)、雌鼠 (B) 离体肠道菌群中的降解曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Metabolism of tPNS in male (A) and female (B) rats intestinal flora *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

用有强弱。预试验结果和文献研究^[12]均显示,雌鼠肠道菌群的降解能力较弱,故在加样的时候,将雌鼠肠道菌群中的加药量减至 4 mL。陈新梅^[13]考察了人参皂苷 R_{g1} 在人工胃液和人工肠液中的稳定性,结果表明 R_{g1} 在人工胃液中 2 h 内 100% 降解,在人工肠液中 4 h 内相对稳定,几乎没有降解。陈广通等^[14]研究了三七皂苷 R₁ 在大鼠体内的代谢,发现大鼠 ig 三七皂苷 R₁ 后,大量的原型药物通过粪便排泄出体外,12 h 内能检测到的代谢产物很少。表明三七皂苷 R₁ 在肠内菌中的降解是一个缓慢的过程。人参皂苷 R_{b1} 在体外肠道菌群中的代谢研究表明^[6]在厌氧条件下,人参皂苷 R_{b1} 被肠道菌群不断代谢,2、8、12 h 后相继出现不同的产物峰,24 h 后原型药物不能被检测到。这可以解释本实验中大鼠肠道菌群对人参皂苷 R_{b1} 的降解曲线在不同时间点斜率不同的情况,说明菌群对人参皂苷 R_{b1} 的降解是一个逐级过程。

tPNS 中的 3 种皂苷极性有差异,本实验在进行菌液样品中成分的提取时,筛选过很多方法,单一的有机溶剂很难将 3 种皂苷同时萃取完全,最后采用了加入甲醇离心后定容的方法,加样回收率结果理想,甲醇既能及时终止降解反应,又能充分溶解 3 种皂苷。

通过考察肠道菌群对 tPNS 中各皂苷的降解情况,可以有针对性地改善 tPNS 的口服生物利用度。比如在进行 tPNS 制剂研究及利用一些能提高生物利用度的制剂手段,如磷脂复合物、脂质体时,应特别重视人参皂苷 R_{b1} 的吸收情况。为了避免肠道菌群对人参皂苷 R_{b1} 的代谢,亦可采用非胃肠道给药途径或结肠释药体系。此外,人参皂苷 R_{b1} 菌群的代谢产物是否有可能也是药效物质值得进一步研究。

参考文献

[1] 杨宝,范真,周联,等.大鼠肠道菌群对紫丁香

苷体外代谢转化研究[J].中草药,2015,46(9):1333-1337.

[2] 高霞,耿婷,马阳,等.离体大鼠肠道菌对 6 种皂苷类成分代谢研究[J].中国中药杂志,2016,41(12):2329-2338.

[3] 贺旭,刘英飞,王伟,等.三七总皂苷对全脑缺血大鼠海马脑水肿及 GFAP 表达的影响[J].中草药,2017,48(22):4695-4700.

[4] 傅秋生,许小红. HPLC 法测定三七总皂苷中 3 种皂苷的含量[J].解放军药学学报,2009,25(1):84-86.

[5] 门薇,陈颖,李玉洁,等.肠道菌群对中药有效成分的生物转化研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(2):229-234.

[6] 钱静,康安,狄留庆,等.人参皂苷 R_{b1} 在体外肠道菌群模型中的代谢研究[J].南京中医药大学学报,2015,31(6):567-570.

[7] 曹伟宇,王鹏远,冯斌,等.离体培养人肠道菌群对九节龙皂苷 I 生物转化的研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(8):1357-1361.

[8] 曹迪,范真,朱锦萍,等.大鼠肠道菌群对长梗冬青苷体外代谢的影响[J].中国药师,2016,19(4):621-623.

[9] Ludwig A I, Pena M P, Cid C, *et al.* Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota[J]. *Bio Fact*, 2013, 39(6): 623-632.

[10] 中国药典[S].一部.2015.

[11] Bae E A, Han M J, Kim E J. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh₂ by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants[J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(1): 61-67.

[12] 钟皎,柳晓泉,王永升,等. RP-HPLC 法研究不同性别的大鼠尿液中盐酸雷诺嗪及其代谢物的差异[J].中国药科大学学报,2006,37(3):238-241.

[13] 陈新梅.大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 R_{g1} 的代谢转化研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):210-212.

[14] 陈广通,杨敏.三七皂苷 R₁ 在大鼠体内的代谢产物分析[J].时珍国医国药,2010,21(2):485-487.