

· 基础研究 ·

红参皂苷在人尿液的排泄实验研究[△]

杨秀伟*, 周琪乐

北京大学药学院/天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

[摘要] 目的: 研究红参皂苷在人尿液的排泄。方法: 成年人(62 kg 体质量)口服红参提取物 2 g(相当于 4.30 g 红参), 然后分别在 0~3、3~6、6~12、12~24 h 收集尿液。通过超快速液相-串联质谱法(UFLC-MS/MS)技术与对照品比较分析鉴定和定量人参皂苷的排泄。结果: 在人 24 h 排泄的尿液中, 可检测到 3 个苷元, 即 20(S)-原人参三醇(PPT)、20(R)-PPT 和 20(S)-原人参二醇(PPD); 7 个人参皂苷(G), 即 20(S)-G-Rh₁、G-Rd、G-Rk₃、G-Rh₄、20(S)-G-Rg₃、20(R)-G-Rg₃ 和 G-C-K。结论: 红参中的一些原型人参皂苷及其代谢产物可通过人体尿液排出体外。

[关键词] 红参; 人参皂苷; 代谢产物

[中图分类号] R284

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-4890(2020)09-1458-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191128002

Study on Urine Excretion of Ginsenosides from Red Ginseng in man

YANG Xiu-Wei*, ZHOU Qi-Le

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

[Abstract] **Objective:** To study the urine excretion of ginsenosides from red ginseng in man. **Methods:** An adult with body weight of 62 kg was orally given 2 g (equivalent to 4.30 g of red ginseng) of red ginseng water extract. Then, the urine samples were collected at 0-3 h, 3-6 h, 6-12 h, 12-24 h post-dosing, respectively, which were analyzed and identified for excreted ginsenoside and their metabolites by ultra-fast liquid chromatography coupled with MS/MS method and comparison with standard substances. **Results:** In the excreted urine during 24 h post-dosing, 3 aglycones namely 20(S)-protopanaxatriol, 20(R)-protopanaxatriol and 20(S)-protopanaxadiol, and 7 ginsenosides namely 20(S)-ginsenoside-Rh₁, ginsenoside-Rd, ginsenoside-Rk₃, ginsenoside-Rh₄, 20(S)-ginsenoside-Rg₃, 20(R)-ginsenoside-Rg₃ and ginsenoside-compound-K were detected and identified. **Conclusion:** Some prototypical ginsenosides and their metabolites in red ginseng could be excreted by urine in man.

[Keywords] red ginseng; ginsenoside; metabolite

红参 Ginseng Radix et Rhizoma Rubra 是五加科多年生草本植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根和根茎经蒸制成的产品, 驰名中外。人参根和根茎含有独特的四环三萜达玛烷型三萜^[1-5], 经蒸制后许多成分发生了化学结构转化^[6-9], 药性亦发生了改变^[9]。本课题组前期研究报道了红参中人参皂苷的定量分析^[10], 本实验研究人口服红参后, 其中的人参皂苷在人尿液中的排泄。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 超高效液相色谱-质谱联用仪,

包括 Nexera X2 UFLC 液相系统: LC-30AD 二元泵、SIL-30AC 自动进样器、SPD-M30A 检测器、CTO-20AC 柱温箱; 8050 型三重四级杆定量质谱: 配备 ESI 离子源和 LabSolution 工作站; Mettler XS105DU 十万分之一电子天平(METTLER TOLEDO, Zurich, Switzerland); AR4120 型万分之一电子天平 [奥豪斯国际贸易(上海)有限公司]; KQ5200 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 200 W, 频率: 40 kHz)。

1.2 试药

红参(批号: 20131201JLRG)水提取物(批号: PG-Y-201606)由长春加一健康食品有限公司提供,

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(81973446)

* [通信作者] 杨秀伟, 教授, 博士生导师; Tel: (010)82801569, E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

主要制备方法^[6]: 干燥的红参粗粉(10 kg)用沸水提取3次, 每次80 L, 提取4 h; 合并提取液, 减压浓缩得干膏4.65 kg。

对照品人参皂苷(G): 20(*S*)-G-Rh₁(1)、G-Rd(2)、G-Rk₃(3)、G-Rh₄(4)、20(*S*)-G-Rg₃(5)、20(*R*)-G-Rg₃(6), 20(*S*)-原人参三醇(PPT)(7)、20(*R*)-PPT(8)、G-化合物(C)-K(9)和20(*S*)-原人参二醇(PPD)(10)系本课题组从红参^[6]或人参茎叶总皂苷酸水解产物^[11]中分离制备, 纯度经液相色谱-质谱(LC-MS)测定均大于98%。以上10个对照品的化学结构式见图1。

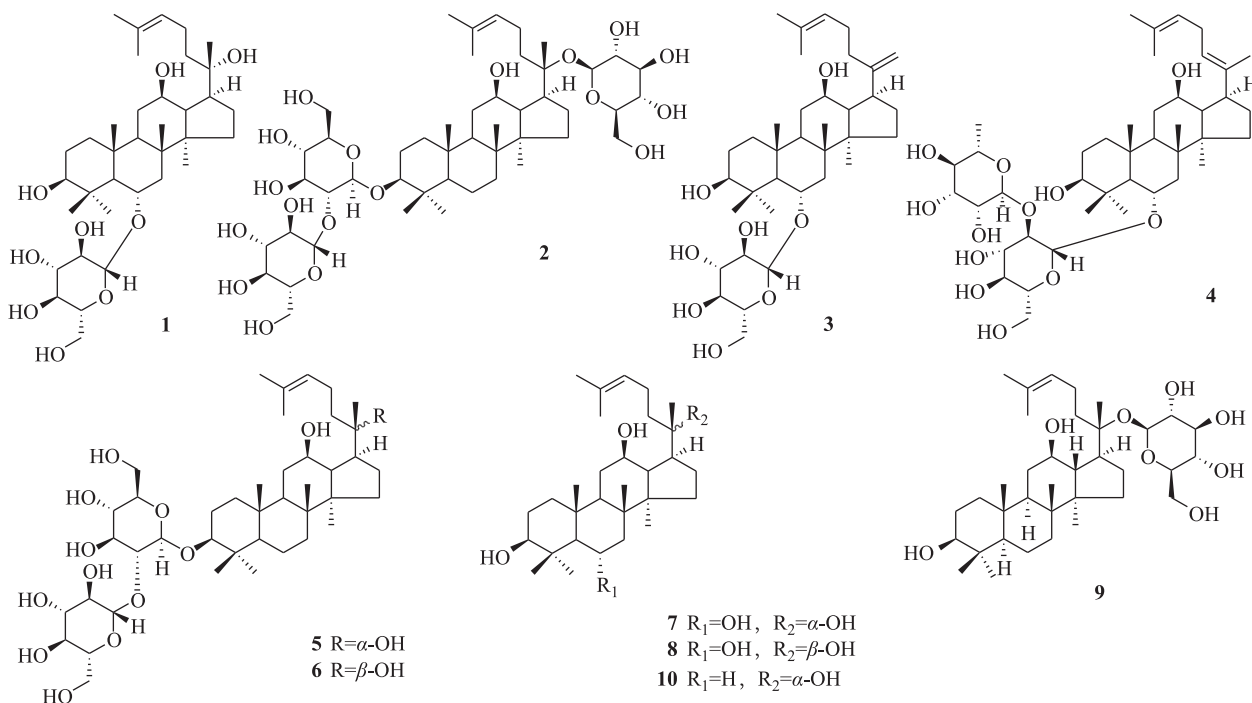


图1 10个对照品(以及口服红参水提取物后在尿液中监测到的这些化合物)的结构

LC-MS 级别乙腈和甲醇(Fisher Scientific Inc.); 色谱纯级别乙腈和甲醇(天津西华特种试剂厂); 超纯水(18 MΩ/cm)为本实验室用 Milli-Q Advantage A10 (Millipore, Billerica, USA)制水机自制; HPLC 级别乙酸铵(Sigma-Aldrich 公司)。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件

液质分析 C₁₈ 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH Shield RP₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 预柱 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH Shield RP₁₈ VanGuard[™] Pre-Column (5 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为 0.1 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液(A)和乙腈(B), 采用梯度洗脱方式, 梯度洗脱(0~4 min, 72%~67% A; 4~6 min, 67%~61% A; 6~6.1 min, 61%~58% A; 6.1~13 min, 58%~53% A); 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 柱温为 35℃; 进样体积为 2 μL。

质谱优化参数: 雾化气流速为 3 L·min⁻¹; 干燥气流速为 10 L·min⁻¹; 加热气流速为 10 L·min⁻¹;

(6), 20(*S*)-原人参三醇(PPT)(7)、20(*R*)-PPT(8)、G-化合物(C)-K(9)和20(*S*)-原人参二醇(PPD)(10)系本课题组从红参^[6]或人参茎叶总皂苷酸水解产物^[11]中分离制备, 纯度经液相色谱-质谱(LC-MS)测定均大于98%。以上10个对照品的化学结构式见图1。

接口加热器温度为 300℃; 脱溶剂管温度为 250℃; 接口电压: -3.0 kV; 检测器电压为 1.80 kV。电离源为电喷雾离子源, 负离子扫描模式, 扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。

选择监测的10个化合物及内标地高辛(digoxin)的MRM离子对、滞留时间(dwel time)、Q1和Q3能量、碰撞能量(CE)见表1。

表1 测定的10个三萜成分及内标(地高辛)的质谱MRM参数

分析物	<i>t_R</i> /min	MRM 转换 (<i>m/z</i>) 前体离子→产物离子	滞留时间/ms	Q1 能量/V	碰撞能量/V	Q3 能量/V
20(<i>S</i>)-G-Rh ₁	4.984	637.4→475.3	68	19	24	33
G-Rd	6.210	945.6→783.4	68	5	38	39
G-Rk ₃	8.081	679.4→619.4	247	25	19	31
G-Rh ₄	8.391	679.4→619.4	247	25	19	31
20(<i>S</i>)-G-Rg ₃	9.672	783.4→621.3	247	24	32	30
20(<i>R</i>)-G-Rg ₃	9.970	783.4→621.3	247	24	32	30
20(<i>S</i>)-PPT	11.126	475.4→391.3	247	10	30	43
20(<i>R</i>)-PPT	11.416	475.4→391.3	247	10	30	43
G-C-K	13.297	621.5→161.2	163	32	21	30
20(<i>S</i>)-PPD	17.550	459.4→375.4	497	5	30	41
digoxin	3.080	779.4→649.3	68	5	33	31

2.2 储备液及工作溶液的配制

精密称取上述10个对照品各适量,分别精密加入LC-MS级甲醇配制成 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液;精密称取内标化合物地高辛适量,加入LC-MS级甲醇配制成 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。制备标准溶液时,以甲醇将储备液稀释成一系列工作溶液,密封,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

2.3 混合对照品溶液的配制

分别移取适量储备液混合并稀释制成混合对照品母液。连续稀释混合对照品母液得到一系列混合对照品线性工作液。

2.4 方法学验证

分别对分析方法的专属性、系统适用性、线性、检测下限和定量下限、重复性、提取回收率和稳定性进行方法学考察,结果表明,该方法能够用于上述10个分析物的含量测定(数据略)。各待测化合物的

的内标校正曲线的线性范围和回归方程见表2。

2.5 口服红参提取物

成年人(62 kg 体质量,男,55 周岁)口服红参提取物2 g(相当于4.30 g 红参),然后分别在0~3、3~6、6~12、12~24 h 收集尿液,尿液经过滤后,加入甲醇-乙腈(3:1)沉淀离心后,收集上清液待进一步处理分析。

3 结果与分析

3.1 色谱行为

在选定的色谱条件下,10 个人参皂苷类化合物和内标地高辛的保留时间见表1;MRM 图谱显示无内源性物质对其干扰,口服红参水提取物后各时间段人尿液样品对应的10 个化合物的MRM 图谱见图2。

3.2 人尿液中10 个人参皂苷类成分含量

人口服红参水提取物后各时间段尿液中能检测到的10 个化合物的绝对含量见表3。

表2 各待测分析物的内标校正曲线的线性范围和回归方程

分析物	校正曲线	r	线性范围	检测下限	定量下限
20(S)-G-Rh ₁	$Y=0.085\ 4X+0.066\ 5$	0.999\ 1	5~2000	0.21	0.63
G-Rd	$Y=0.056\ 8X+0.201\ 7$	0.998\ 1	5~2000	0.32	0.96
G-Rk ₃	$Y=0.042\ 6X+0.123\ 9$	0.997\ 6	1.25~500	0.41	1.23
G-Rh ₄	$Y=0.072\ 4X+0.205\ 6$	0.998\ 2	5~2000	1.12	3.35
20(S)-G-Rg ₃	$Y=0.058\ 3X+0.081\ 4$	0.999\ 5	2.5~1000	0.28	0.85
20(R)-G-Rg ₃	$Y=0.121\ 5X+0.040\ 9$	0.999\ 4	2.5~1000	0.25	0.76
20(S)-PPT	$Y=0.067\ 3X-0.094\ 8$	0.999\ 2	1.25~500	0.38	1.15
20(R)-PPT	$Y=0.112\ 0X-0.082\ 1$	0.999\ 4	1.25~500	0.40	1.21
G-C-K	$Y=0.085\ 6X+0.210\ 3$	0.999\ 7	2.5~1000	0.57	1.70
20(S)-PPD	$Y=0.082\ 1X+0.136\ 0$	0.998\ 5	2.5~1000	0.51	1.54

$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

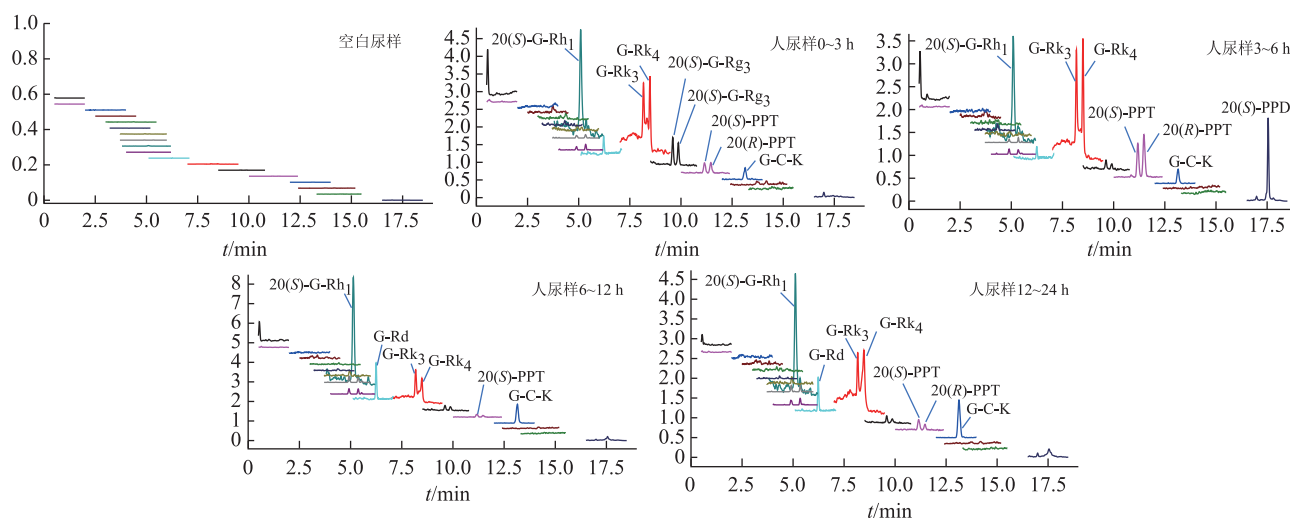


图2 人口服红参提取物后各时间段尿液的MRM 图谱

表 3 人口服红参水提取物后各时间段尿液中 10 个化合物的绝对含量($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分析物	0 ~ 3 h	3 ~ 6 h	6 ~ 12 h	12 ~ 24 h
20(S)-G-Rh ₁	34.17 ± 0.68	29.98 ± 0.59	114.80 ± 2.27	57.20 ± 1.13
G-Rd	—	—	40.94 ± 0.81	17.06 ± 0.34
20(S)-G-Rg ₃	14.31 ± 0.28	—	—	—
20(R)-G-Rg ₃	12.18 ± 0.24	—	—	—
G-Rk ₃	16.52 ± 0.33	27.85 ± 0.55	28.84 ± 0.57	22.55 ± 0.45
G-Rh ₄	32.36 ± 0.64	51.39 ± 1.02	52.04 ± 1.03	38.72 ± 0.77
20(S)-PPT	5.50 ± 0.11	15.73 ± 0.31	10.19 ± 0.24	—
20(R)-PPT	5.87 ± 0.12	20.76 ± 0.41	—	—
20(S)-PPD	—	66.47 ± 1.32	—	—
G-C-K	8.52 ± 0.17	8.43 ± 0.18	51.24 ± 1.02	50.55 ± 1.16

注: —表示未检测到。

4 讨论

在人口服红参水提取物后 24 h 排泄的尿液中能检测到 10 个人参三萜类化合物, 其化学结构见图 1。化合物 2、5、6、9 和 10 为二醇型达玛烷三萜, 化合物 1、3、4、7 和 8 为三醇型达玛烷三萜。表 3 中的 10 个分析物中, 除 G-C-K 在红参水提取物中不存在外, 其他 9 个人参三萜类化合物在红参水提取物^[6,10]中均存在, 尽管如此, 本研究结果也不能排除它们是某个或某些人参皂苷在人体内的代谢产物, 如: 已有研究显示, 志愿受试者口服 G-Re (200 mg), 在尿液中可检测到原形化合物 G-Re 及其代谢产物 G-Rg₁、G-F₁、G-Rh₁ 和 PPT^[12], 说明 G-Re 在体内可代谢为 G-Rh₁, 后者经尿液排泄。证明 G-C-K 肯定是作为人参皂苷的体内代谢产物, 在体内代谢产生, 经尿液排泄。在体内代谢转化为 G-C-K 的红参中的皂苷, 可能包括二醇型达玛烷三萜 G-Ra₁、G-Ra₂、G-Rb₁、G-Rb₂、G-Rb₃、G-Rc、

G-Rd、西洋参皂苷-R₁ (quinquenoside-R₁, Q-R₁)^[6,10]以及相关的中间代谢产物, 见图 3。因此, G-C-K 可能以较高的血药浓度出现在体循环中。生物活性研究表明, G-C-K 能改善脑缺血再灌注损伤, 具有抗炎活性, 能够通过抑制肿瘤细胞的增殖、侵入和转移, 促进肿瘤细胞凋亡及提高化疗药物对其敏感性, 减轻其对正常细胞的毒副作用等途径而表现出良好的抗肿瘤作用^[13]。这些结果一方面提示, 红参中多样性化学结构的一些皂苷, 在体内可代谢为同一代谢产物 G-C-K, 使其血药浓度提高, 更好地发挥作用; 另一方面提示能代谢为 G-C-K 的原形红参皂苷, 可能是红参的质量标志物。G-C-K 继续水解掉 C-20 的葡萄糖基, 可代谢为 20(S)-PPD^[14], 20(S)-PPD 也是生物活性物质^[13]。

在红参三醇型达玛烷三萜皂苷中, 如 G-Re、G-Rf、G-Rg₁、G-Rg₂、G-Rh₁、三七皂苷(notoginsenoside)-R₁和 R₂^[6,10]等逐级水解掉糖基, 代谢为 PPT^[14]; C-20 差向异构化, PPT 存在 20(S)-PPT 和 20(R)-PPT 平衡

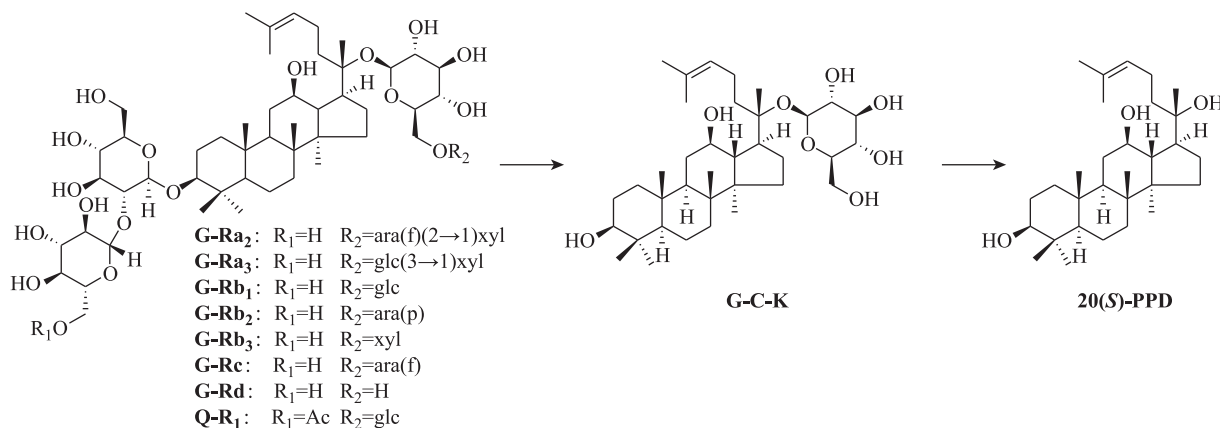


图 3 红参中可能转化为 G-C-K 的皂苷

形式,它们也是生物活性物质^[13,15]。如果 G-Re 代谢脱去 C-20 位的葡萄糖基和 C-6 位糖链末端的鼠李糖基转化为 G-Rh₁^[14],甚至代谢到 PPT,则对细胞沉默调节蛋白 1(silent information regulator two homolog 1, SIRT 1)激活作用增强^[15],有利于红参发挥延缓人衰老的作用。

本研究结果证明,红参含有的某些人参皂苷类成分可在体内代谢转化为生物活性更强的物质,它们是前药(pro-drug)。

参考文献

- [1] 杨秀伟. 人参中三萜类化学成分的研究[J]. 中国现代中药,2016,18(1):7-15,55.
- [2] 王洪平,杨鑫宝,杨秀伟,等. 吉林人参根和根茎的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(17):2807-2817.
- [3] WANG H P, ZHANG Y B, YANG X W, et al. Rapid characterization of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS and simultaneous determination of 19 ginsenosides by HPLC-ESI-MS[J]. J Ginseng Res,2016,40:382-394.
- [4] WANG H P, ZHANG Y B, YANG X W, et al. High-performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry to evaluate ginseng roots and rhizomes from different regions[J]. Molecules,2016,21(5):603/1-603/14.
- [5] 杨秀伟,王洪平,徐崑,等. 不同产地人参根和根茎中人参皂苷的含量分析[J]. 药物分析杂志,2017,37(1):30-36.
- [6] 周琪乐,徐崑,杨秀伟. 中国红参化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(2):233-249.
- [7] 杨鑫宝,杨秀伟,刘建勋. 人参中皂苷类化学成分的研究[J]. 中国现代中药,2013,15(5):349-358.
- [8] 杨秀伟,张雷. 人参水煎煮的科学性探索——水煎煮引发人参皂苷化学结构的转化[J]. 中国现代中药,2019,21(8):1009-1015.
- [9] 杨秀伟. 红参化学、药理和临床研究进展[J]. 中成药研究,1984,7(5):30-33.
- [10] ZHOU Q L, ZHU D N, YANG X W, et al. Development and validation of a UFLC-MS/MS method for simultaneous quantification of sixty-six saponins and their six aglycones: Application to comparative analysis of red ginseng and white ginseng[J]. J Pharm Biomed Anal,2018,159:153-165.
- [11] 马丽媛,杨秀伟. 人参茎叶总皂苷酸水解产物化学成分研究[J]. 中草药,2015,46(17):2522-2533.
- [12] LIU L, HUANG J Q, HU X, et al. Simultaneous determination of ginsenoside (G-Re, G-Rg₁, G-Rg₂, G-F₁, G-Rh₁) and protopanaxatriol in human plasma and urine by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetics study of G-Re in volunteers[J]. J Chromatogr B,2011,879(22):2011-2017.
- [13] 杨秀伟,富力. 人参中三萜类化学成分的生物活性及药理学作用[J]. 中国现代中药,2016,18(1):36-55.
- [14] 杨秀伟. 人参化学成分的代谢动力学研究[J]. 中国现代中药,2016,18(1):16-35.
- [15] MA L Y, ZHOU Q L, YANG X W. New SIRT1 activator from alkaline hydrolysate of total saponins in the stems-leaves of *Panax ginseng* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015,25(22):5321-5325.

(收稿日期:2019-11-28 编辑:王笑辉)

(上接第1427页)

- [24] 李锦利,崔淑兰,付华. 中医药与保健食品的同源性探究[J]. 食品安全导报,2014(26):51-53.
- [25] 李佳军,韩金良,田玉顺. 白藜芦醇及其衍生物药理作用的研究现状[J]. 药学研究,2017(3):161-163.
- [26] 肖瑞希,陈华国,周欣. 植物多糖降血糖作用及机制研究进展[J]. 食品科学,2019,40(11):254-260.
- [27] 陈直. 寿亲养老新书[M]. 福州:福建科学技术出版社,2013:133.
- [28] 贾璠,郭霞,何晨,等. 传统发酵豆制品营养成分研究进展[J]. 中国酿造,2019,38(4):1-6.
- [29] 孙思邈. 备急千金要方[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:448.
- [30] 范宁. 古代食疗专著中含药情况的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2016.
- [31] 严姝霞,陈仁寿,徐桂华,等. 药食两用性药(食)物性效与病症宜忌探析[J]. 护理研究,2016,30(10):3790-3792.
- [32] 肖德强,徐斌,鲁力,等. 食物营养成分与中医药膳性、味、归经的关联性初探[J]. 应用预防医学,2017,23(1):27-30.
- [33] 吴钢. 类经证治本草[M]. 北京:中国中医药出版社,2016:8.
- [34] 张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 太原:山西科学技术出版社,2009:73.

(收稿日期:2020-02-29 编辑:周鹭)