

苳草花有效组分在人肠道菌群中体外代谢特征分析

陈浩^{1,3}, 王昌权^{1,3}, 夏涛³, 李月婷¹, 王永林¹, 黄勇¹, 李勇军², 郑林^{1*}

¹贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室;

²贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心; ³贵州医科大学药学院, 贵阳 550004

摘要:为考察苳草花有效组分在离体人肠道菌群中的代谢特征。通过在离体培养的人肠道菌液中,加入苳草花有效组分,并在厌氧环境下进行培养,孵育的代谢产物采用超高效液相串联电喷雾飞行时间质谱仪进行检测。运用 Metabolite Tools™ 分析平台对样品中的代谢产物进行预测分析,结合 Mass Defect Filter 技术并运用 Data Analysis 中的 Smart Formula 功能推测代谢产物化学式。结果表明从药物-肠菌孵育液中共检测出 14 个代谢产物,主要包括 *N-p*-香豆酰酪胺, *N-trans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺的氢化、氢化羟基化,甲基化羟基化代谢产物,山柰酚的双脱氧、C2-C3 双键还原、脱氧氢化代谢产物,槲皮素的羟基化、O-C2 键开环裂解脱氧化、C2-C3 双键还原 O-C2 键开环裂解代谢产物,儿茶素的氢化代谢产物和没食子酸的脱羧、甲基化代谢产物。上述结果表明苳草花有效组分在人离体肠道菌群中主要发生还原、氧化、水解 I 相反应和甲基化 II 相反应,为进一步研究其在体内的作用机制提供实验依据。

关键词:苳草花有效组分;代谢;肠道菌群;UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R285.1; R969.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.12.010

Analysis of *in Vitro* Metabolic Characteristics of Effective Components of *Polygonum orientale* Flower in Human Intestinal Flora

CHEN Hao^{1,3}, WANG Chang-quan^{1,3}, XIA Tao³,

LI Yue-ting¹, WANG Yong-lin¹, HUANG Yong¹, LI Yong-jun², ZHENG Lin^{1*}

¹Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/ State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University; ²Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University;

³School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract: In order to investigate the metabolic characteristics of the effective components of *Polygonum orientale* flower in human intestinal flora. The effective components of *Polygonum orientale* flower were added to *in vitro* culture of human intestinal bacteria and incubated in anaerobic environment. The metabolites were detected by UPLC-Q-TOF/MS. The metabolites in the samples were predicted and analyzed by using Metabolite Tools™ analysis platform and the chemical formula of metabolites was deduced by using the Smart Formula function in Data Analysis combined with Mass Defect Filter technology. A total of 14 metabolites were detected from the drug-enteroinoculum solution, including *N-p*-coumaroyl tyramide, hydrogenation of *N-trans-p*-hydroxyphenethyl ferulamide, hydrogenation hydroxylation, and methylation. Hydroxylated metabolites, dodeoxygenation of kaempferol, reduction of C2-C3 double bonds, deoxygenation metabolites, hydroxylation of quercetin, ring-opening cleavage and deoxidation of O-C2 bonds, and C2-C3 double bond reduction of O-C2 bonds Ring-opening pyrolysis metabolites, hydrogenated metabolites of catechins, and decarboxylated, methylated metabolites of gallic acid. The effective components of *Polygonum orientale* flower are mainly reduced, oxidized, hydrolyzed I phase reaction and methylated phase II reaction in isolated human intestinal flora, which will provide reference for further study of its mechanism *in vivo*.

Key words: *Polygonum orientale* flower effective components; metabolism; intestinal flora; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2018-06-22 接受日期: 2018-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(81360664, 81560630, 81660712); 贵州省科技计划(黔科合平台人才[2017]5601, [2016]5613·677); 贵阳市科研创新团队项目(筑科合同[2017]30-29号)

* 通信作者 Tel: 86-851-86908468; E-mail: mailofzl@126.com

荳蔻花为蓼科荳蔻 *Polygonum orientale* L. 的花序,又名水荳蔻花、狗尾巴花等,在贵州分布广泛。具有行气活血、消积、止痛的功效,用于胸痛、胸闷、气短、中风偏瘫、风湿疼痛等疾病的治疗^[1]。课题组前期研究对荳蔻各部位药理筛选实验中发现,荳蔻花比其“全草”有更为明显的抗心肌缺血作用,为荳蔻的主要药用有效部位,并从有效组分中分离并鉴定了13个代表成分(没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、槲皮素-3-O-(2"-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖醛酸苷、山柰酚-3-O-(2"-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖醛酸苷、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮苷、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷、*N-p*-香豆酰酪胺、*N-trans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺、槲皮素、山柰酚)^[2,3]。研究表明,其吸收进入体内后,绝对生物利用度较低^[4],但其抗心肌缺血疗效确切,原因可能为荳蔻花在体内发挥药效的形式除了原型成分外,其在体内的代谢产物也可能为活性成分,而肠道菌群的代谢作用不容忽视,但有关荳蔻花有效组分在肠道菌群中的代谢研究尚未见报道。人肠道菌群种类繁多,不同种类的菌群产生不同的代谢酶,从而能对有效组分中的不同成分进行特定转化,且肠道菌群影响着许多中药有效成分的代谢转化与机体的吸收利用。而中药的有效成分经肠道菌群特定的转化酶作用下,才能转化成具有药理或毒理的有效成分^[5-7]。本实验采用离体人肠道菌群,揭示离体人肠道菌群对荳蔻花有效成分的影响,以期探索荳蔻花有效组分在体内的作用机制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1290 Infinity 型超高压液相色谱(美国 Agilent 公司),micrOTOF-Q II 型电喷雾-四级杆-飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司),CDH6000B II 型电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司),SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司),YXQ-LS-18SI 型手提式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司),Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),MTN-2800 D 型氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司)。

1.2 实验材料

荳蔻花药材购自贵州贵阳鹿冲关贵州省药用植物园种植基地,经贵州医科大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为蓼科植物荳蔻 *Polygonum*

orientale L. 的花序;荳蔻花有效组分(自制),山柰酚、槲皮素、原儿茶酸、槲皮苷对照品(四川维克奇生物科技有限公司),没食子酸对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心),山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷对照品、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷对照品、儿茶素对照品实验室自制(采用¹NMR、¹³MR、MS、UV、IR 波普进行结构鉴定,用 UPLC-PDA 在多个检测波长下测定,其峰面积归一化均大于 98),厌氧产气袋,厌氧培养罐(日本三菱瓦斯化学株式会社),蛋白胨(上海博微生物科技有限公司),营养琼脂培养基、小牛浸膏(杭州微生物试剂有限公司),*L*-半胱氨酸(上海蓝季科技发展有限公司),*L*-抗坏血酸(北京索莱宝科技有限公司),乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),甲酸为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 荳蔻花有效组分的制备

称取荳蔻花药材 6 kg,加 10 倍量水煎煮 3 次,滤液合并浓缩,加入乙醇使含醇量达 65%,静置过夜,回收乙醇,残留物用 0.5 倍量水饱和正丁醇萃取 4 次,回收正丁醇,残留物用乙醇溶解,上聚酰胺柱,用 80% 乙醇洗脱,收集流出液和洗脱液,回收乙醇,残留物水浴挥干。

2.2 色谱条件

Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μ m),柱温 45 $^{\circ}$ C,进样体积为 1 μ L,流动相 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B)进行梯度洗脱(0 ~ 4.0 min, 5% ~ 45% A; 4.0 ~ 10.0 min, 45% ~ 95% A; 10.0 ~ 15.0 min, 95% ~ 100% A; 20.0 ~ 21.0 min, 95% ~ 0% A; 21.0 ~ 22.0 min, 0% ~ 5% A)。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源,扫描方式为负离子扫描(ESI⁻: *m/z* 50 ~ 1 000),毛细管电压 3.5 kV(ESI⁻),离子源温度 200 $^{\circ}$ C,雾化气 N₂,压力 1.2 bar, N₂ 温度 180 $^{\circ}$ C,干燥气温度 200 $^{\circ}$ C,气体体积流量 6 L/min,准确质量测定采用甲酸钠校正标准液,校正模式选用 Enhanced Quadratic. 数据分析采用 Data Analysis 软件, Metabolite Predict(micrOTOF 2.3)软件, Metabolite Detect(micrOTOF 2.3)软件、质量亏损过滤(MDF)。

2.4 实验方法

2.4.1 厌氧培养液的配制^[8]

37.5 mL A 液(0.78% K₂HPO₄), 37.5 mL B 液

(0.47% KH_2PO_4 , 1.18% NaCl , 1.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.12% CaCl_2 , 0.25% $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), C 液 50 mL 8% Na_2CO_3 。0.5 g *L*-半胱氨酸, 2 mL 25% *L*-抗坏血酸, 1 g 牛肉膏, 1 g 蛋白胍, 1 g 营养琼脂, 加蒸馏水至 1 L, 盐酸调 pH7.5 ~ 8.0。

2.4.2 供试品制备

取苳草花提取物 0.12 g, 加入 50% 甲醇水 6 mL, 充分溶解, 备用。

2.4.3 人离体培养肠道菌群对苳草花有效组分的代谢^[9]

取健康成人新鲜粪便, 按 1 g 粪便 4 mL 0.9% 生理盐水混合均匀超声 10 min, 6 000 rpm 离心 5 min, 取上清液即为人肠道菌培养液。将 0.5 mL 人肠道菌培养液加入 6 mL 厌氧培养液中(已灭菌), 混匀, 迅速置于厌氧培养罐中, 加入 1 个厌氧产气袋后盖上培养罐盖, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 使肠道菌培养液中的肠道菌充分成长。实验分为 3 组, 实验组、空白对照 A 组、空白对照 B 组。实验组: 将离体肠道菌液与苳草花提取物溶液 60 μL , 混合均匀, 立即置于厌氧培养罐中, 加入 1 个厌氧产气袋后迅速盖上培养罐盖, 置于 37 °C 恒温培养箱, 分别培养 4、12、36、72 h ($n = 3$) 后, 放入 -20 °C 保存, 备用。空白对照 A 组, 空白离体肠道菌液(不加苳草花提取物); 空白对照 B 组, 将厌氧培养液和苳草花提取物混合, 将上述样品按照实验组方法进行厌氧培养。所用器具均经高压蒸汽 121 °C 灭菌 20 min。

2.4.4 样品处理方案

将“2.4.3”项下的生物样品, 分别转入 50 mL 离心管中, 分别向其中加入 1 倍体积乙酸乙酯进行萃取, 涡悬震荡 3 min, 提取 3 次, 合并 3 次萃取液, 于 37 °C 下 N_2 吹干。残渣加 200 μL 50% 甲醇水进行溶解, 15 000 rpm 离心 5 min, 上清液 UPLC-Q-TOF/MS 进样分析。

3 实验结果

3.1 UPLC-Q-TOF/MS 分析结果

在“2.4.4”项下, 获得准分子离子峰高分辨质量数和准分子离子峰 MS^2 质谱碎片信息, 结合 Metabolite Predict (micrOTOF 2.3), Metabolite Detect (micrOTOF 2.3) 软件对苳草花有效组分的代谢产物进行预测分析, 得到苳草花有效组分在人肠道菌群中代谢产物图谱, 包括在含药培养基, 空白肠菌液, 含药肠菌液的图谱以及由质谱软件计算形成的差异图谱(见图 1)。

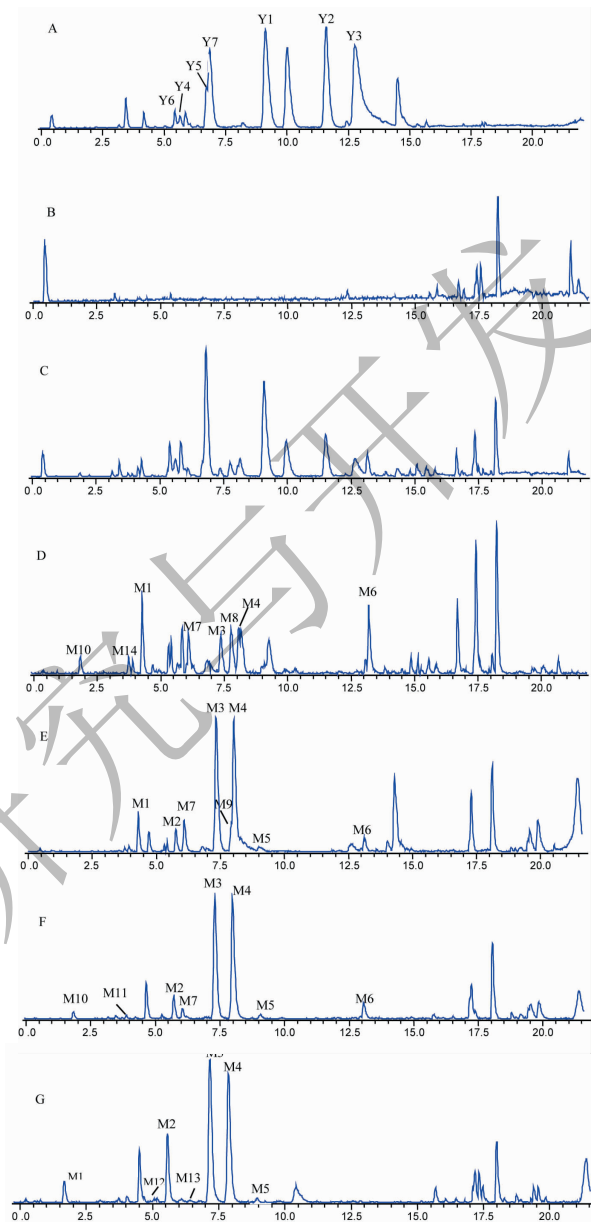


图 1 苳草花有效组分在人肠道菌群中的代谢产物 EST 总离子流图及 4、12、36、72 h 含药肠菌液与空白肠菌液、含药培养基差异

Fig. 1 Base peak chromatograms of *Polygonum orientale* L. flower extract metabolites in man intestinal flora sample in negative mode and different chromatograms are 4, 12, 36 h, and 72h respectively

注: A. 含药培养基; B. 空白肠菌液; C. 含药肠菌液; D、E、F、G 分别是 4、12、36、72 h 含药肠菌液。

Note: A. Drug-containing medium; B. Blank intestinal fluid; C. Medicinal enteric liquid; D、E、F、G are 4 h, 12 h, 36 h, 72 h drug-containing intestinal bacteria respectively.

3.2 苳草花有效组分在培养基中的原型产物鉴定分析

化合物 Y1 t_R 为 9.3 min 时, 负模式下出现准

分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 431.099 $C_{21}H_{19}O_{10}$ (err-1.4 ppm), 与山柰素-3-*O*- α -*L*-鼠李糖苷对照品一致, 故推测 t_R 为 9.3 min 的化合物 Y1 为山柰素-3-*O*- α -*L*-鼠李糖苷。

化合物 Y2 t_R 为 11.8 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 312.1228 $C_{18}H_{18}NO_4$ (err 4.1 ppm), 参照相关文献^[2]并结合质谱数据, 推测 t_R 为 11.8 min 时的化合物 Y2 为 *N-tans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺。

化合物 Y3 t_R 为 12.9 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 301.0367 $C_{15}H_9O_7$ (err-4.3 ppm), 与槲皮素标准品相同, 故推测 t_R 为 12.9 min 的化合物 Y3 为槲皮素。

化合物 Y4 t_R 为 5.7 min 时, MS 质谱出现准分子离子峰为 $[M-H]^{-} m/z$ 607.1325 $C_{27}H_{27}O_{16}$ (err-3.4 ppm)。据参考文献^[10], 故推测 t_R 为 5.7 min 的化合物 Y4 为山柰酚-3-*O*-(2''-*O*- α -*L*-鼠李糖基)- β -*D*-葡萄糖醛酸苷。

化合物 Y5 t_R 为 6.8 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 447.0927 $C_{21}H_{19}O_{11}$ (err 1.3 ppm), 与山柰素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷标准品相同, 故推测 t_R 为 5.6 min 的化合物 5 为山柰素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物 Y6 t_R 为 5.2 min 时, MS 质谱出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 623.127 $C_{27}H_{27}O_{17}$ (err-2.6 ppm)。进一步作 MS² 质谱分析, 从中可见 $[M-H]^{-} m/z$ 623.1266 $C_{27}H_{27}O_{17}$ (err-1.9 ppm), 碎片离子峰 $[M-H-C_6H_{10}O_4-C_6H_8O_6]^{-} m/z$ 301.0366 $C_{15}H_9O_7$ 。根据以上离子碎片信息和参照相关文献^[10], 推测 t_R 为 5.2 min 的化合物 Y6 为槲皮素-3-*O*-(2''-*O*- α -*L*-鼠李糖基)- β -*D*-葡萄糖醛酸苷。

化合物 Y7 t_R 为 6.9 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 447.0935 $C_{21}H_{19}O_{11}$ (err-0.4 ppm), 与标准品槲皮苷一致, 推测 t_R 为 6.9 min 的化合物 Y7 为槲皮苷。

3.3 有效组分在人肠道菌群中代谢产物鉴定分析

3.3.1 氢化代谢产物的鉴定

在 t_R 为 4.4 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 291.0875 $C_{15}H_{15}O_6$, 显示碎片离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 136.0385 $C_7H_7O_3$, 故推测 t_R 为 4.4 min 的化合物 M1 为儿茶素的氢化代谢产物。在 t_R 为 7.6 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$

284.1291 $C_{17}H_{18}NO_3$, 进一步作 MS² 质谱分析, 出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 284.1281 $C_{17}H_{18}NO_3$, 碎片离子峰 $[M-H-C_7H_6O]^{-} m/z$ 178.0874 $C_{10}H_{12}NO_2$ 。由离子碎片信息可见, 准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 284 丢失 106 Da 形成离子碎片峰 $[M-H-C_7H_6O]^{-} m/z$ 178, 为化合物 *N-p*-香豆酰酪胺丢失 122 Da (- C_7H_6O)、氢化碎片离子。参照相关文献^[3]并结合质谱数据推测 t_R 为 7.6 min 的化合物 M3 为 *N-p*-香豆酰酪胺的氢化代谢产物。在 t_R 为 8.3 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 314.1404 $C_{18}H_{20}NO_4$, 进一步作 MS² 质谱分析, 出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 314.1392 $C_{18}H_{20}NO_4$, 碎片离子峰 $[M-H-C_7H_6O]^{-} m/z$ 180.0663 $C_9H_{10}NO_3$ 。由离子碎片信息可见, 准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 314 丢失 134 Da 形成离子碎片峰 $[M-H-C_9H_{10}O]^{-} m/z$ 180, 为 *N-tans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺丢失 134 Da (- $C_9H_8O-CH_2$)、氢化碎片离子。故推测 t_R 为 8.3 min 的化合物 M4 为化合物 M7 (*N-tans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺) 的氢化代谢产物。

3.3.2 氢化、羟基化代谢产物鉴定

在 t_R 为 6.0 min 时, 负模式下出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 300.1238 $C_{17}H_{18}NO_4$, 进一步作 MS² 质谱分析, 出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 300.1253 $C_{17}H_{18}NO_4$, 碎片离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 178.0866 $C_{10}H_{12}NO_2$ 。由离子碎片信息可见, 准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 300 丢失 122 Da (- $C_7H_6O_2$) 形成离子碎片峰 $[M-H-C_7H_6O_2]^{-} m/z$ 178, 与化合物 M3 离子碎片峰一致。准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 300 较化合物 M3 增加 16 Da (+OH), 故推测 t_R 为 6.0 min 的化合物 M2 为 *N-p*-香豆酰酪胺的氢化、羟基化代谢产物。在 t_R 为 6.3 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 330.1337 $C_{18}H_{20}NO_5$, 较化合物 M4 增加 16 Da (+OH), 且其亲水性增加, 保留时间变短, 推测 t_R 为 6.3 min 的化合物 M13 为 *N-tans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺的氢化、羟基化代谢产物。在 t_R 为 3.9 min 时, 负模式下, 分别出现准分子离子峰 $[M-H]^{-} m/z$ 303.0502 $C_{15}H_{11}O_7$ (err 2.6 ppm), 较山柰酚增加 18 Da (+OH+2H), 且其亲水性增加, 保留时间变短, 故推测 t_R 为 3.9 min 的化合物 M14 为山柰酚羟基化、氢化代谢产物。

3.3.3 甲基化代谢产物鉴定

在 t_R 为 3.6 min 时, 负模式下, 出现准分子离子

峰 $[M-H]^-$ m/z 183.0298 $C_8H_7O_5$, 较没食子酸增加 14 Da (+CH₂), 且亲脂性较为增大, 故推测 t_R 为 3.6 min 的化合物 M11 为没食子酸甲基化代谢产物。

3.3.4 甲基化、羟基化代谢产物鉴定

在 t_R 为 9.3 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 344.1508 $C_{19}H_{22}NO_5$, 较化合物 M4 增加 30 Da (+CH₂+OH)。故推测 t_R 为 9.3 min 的化合物 M5 为 *N-trans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺的甲基化、羟基化代谢产物。

3.3.5 C2-C2 双键还原、O-C2 键开环裂解代谢产物鉴定

在 t_R 为 6.2 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 305.0668 $C_{15}H_{13}O_7$, 较槲皮素增加 4 Da (+4H), 故推测 t_R 为 6.2 min 的化合物 M7 为槲皮素 C2-C2 双键还原、O-C2 键开环裂解代谢产物。

3.3.6 C2-C2 双键还原代谢产物鉴定

在 t_R 为 7.8 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 287.056 $C_{15}H_{11}O_6$, 较山柰酚增加 2 Da (+2H), 故推测 t_R 为 7.8 min 的化合物 M8 为山柰酚 C2-C2 双键还原代谢产物。

3.3.7 羟基化代谢产物鉴定

在 t_R 为 8.0 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 317.0297 $C_{15}H_9O_8$, 较槲皮素增加 16

Da (+OH), 亲水性增加, 故推测 t_R 为 8.0 min 的化合物 M9 为槲皮素羟基化代谢产物。

3.3.8 脱羧基代谢产物鉴定

在 t_R 为 1.9 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 125.025 $C_6H_5O_3$, 较没食子酸减少 44 Da (-COOH), 且亲水性较为增大, 故推测 t_R 为 1.9 min 的化合物 M10 为没食子酸脱羧基代谢产物。

3.3.9 氢化、二羟基化代谢产物鉴定

在 t_R 为 5.0 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 316.1188 $C_{17}H_{18}NO_5$ (err-0.2 ppm), 较化合物 M3 增加 32 Da (+2OH), 亲水性较为增加, 保留时间变短, 故推测 t_R 为 5.0 min 的化合物 M12 为 *N-p*-香豆酰酰胺的氢化、二羟基化代谢产物。

3.3.10 羰基化代谢产物鉴定

在 t_R 在 13.3 min 时, 负模式下, 出现准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 329.0311 $C_{16}H_9O_8$, 较槲皮素增加 28 Da (+CO), 亲水性较为增大, 故推测 t_R 为 13.3 min 的化合物 M6 为槲皮素羰基化代谢产物。

3.4 荜草花有效组分在人肠道菌群孵育液中的代谢物生物转化途径

根据以上代谢产物的鉴定结果, 荜草花有效组分在人肠道菌群孵育液中的代谢物生物转化途径 (见表 1, 图 2)。

表 1 荜草花有效组分在人肠道菌群孵育液中的代谢物分析

Table 1 Analysis of metabolites of effective components of *Polygonum orientale* L. flower in human intestinal flora

编号 NO.	保留时间 Retention time (min)	模式 Mode	质荷比 M/Z	分子式 Formula	误差 Error	代谢途径 Metabolic pathway
M1	4.4	$[M-H]^-$	291.0875	$C_{15}H_{15}O_6$	-0.2	氢化
M2	6	$[M-H]^-$	300.1238	$C_{17}H_{18}NO_4$	1.2	氢化、羟基化
M3	7.6	$[M-H]^-$	284.1291	$C_{17}H_{18}NO_3$	0.4	氢化
M4	8.3	$[M-H]^-$	314.1404	$C_{18}H_{20}NO_4$	-2.1	氢化
M5	9.3	$[M-H]^-$	344.1508	$C_{19}H_{22}NO_5$	-1.4	甲基化、羟基化
M6	13.3	$[M-H]^-$	329.0311	$C_{16}H_9O_8$	-2.3	羰基化
M7	6.2	$[M-H]^-$	305.0668	$C_{15}H_{13}O_7$	-0.2	C2-C2 双键还原、O-C2 键开环裂解
M8	7.8	$[M-H]^-$	287.0560	$C_{15}H_{11}O_6$	0.5	C2-C2 双键还原
M9	8	$[M-H]^-$	317.0297	$C_{15}H_9O_8$	1.8	羟基化
M10	1.9	$[M-H]^-$	125.0250	$C_6H_5O_3$	-4.8	脱羧基
M11	3.6	$[M-H]^-$	183.0298	$C_8H_7O_5$	0.3	甲基化
M12	5	$[M-H]^-$	316.1188	$C_{17}H_{18}NO_5$	0.9	氢化、二羟基化
M13	6.5	$[M-H]^-$	330.1337	$C_{18}H_{20}NO_5$	3.1	氢化、羟基化
M14	3.9	$[M-H]^-$	303.0502	$C_{15}H_{11}O_7$	2.6	氢化、羟基化

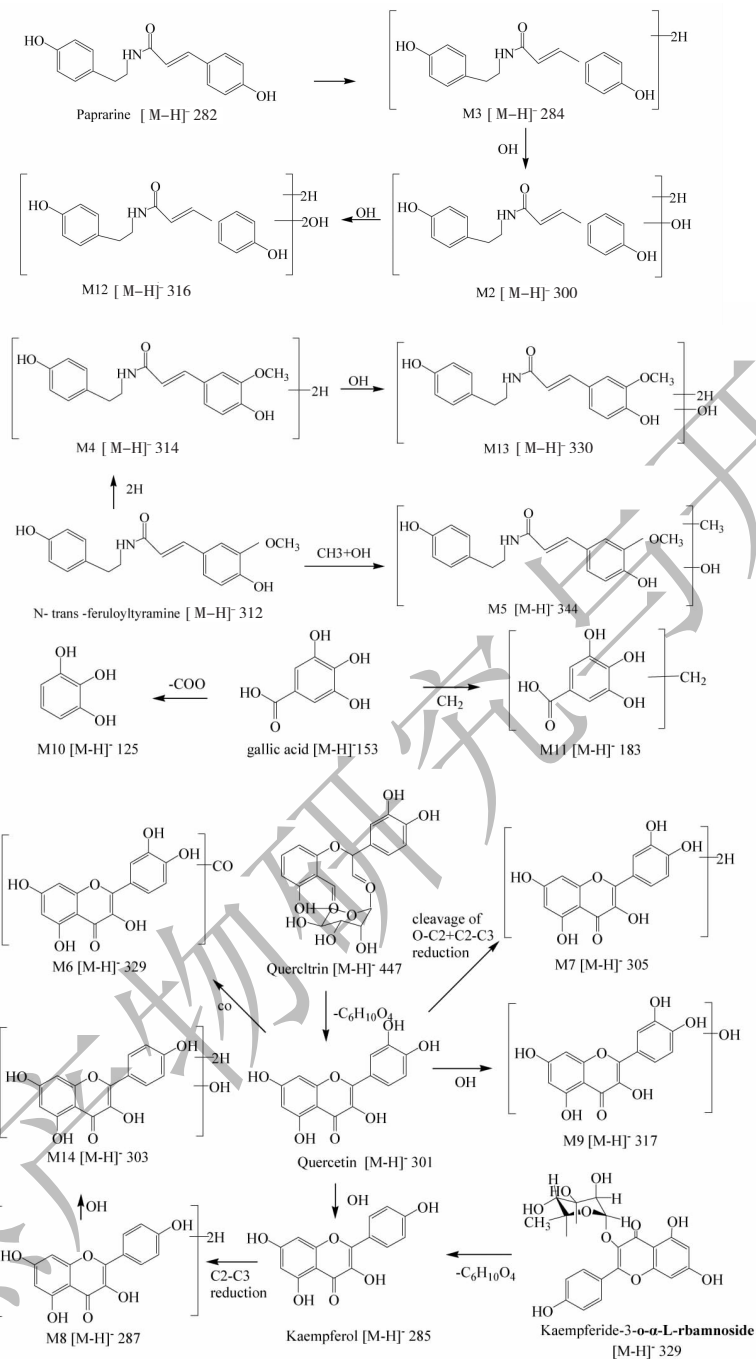


图2 荜草花有效组分在人肠道菌群中可能的代谢途径

Fig. 2 Possible metabolic pathway of *Polygonum orientale* L. Flower extract in human intestinal flora

4 讨论

传统中药主要是经口服给药,而肠道是口服药物在体内代谢的重要场所,虽然某些中药在血浆中的原形成分和生物利用度不高,但却有很好的疗效,这与肠道内寄居的大量细菌对药物的生物转化作用密不可分。目前,国内对中药单一有效组分在肠道

菌群中的代谢研究较多,而患者服用的药物往往是多成分的,发挥药效作用的也不仅仅是单一成分代谢物药理活性简单的叠加^[5,11]。因此,研究多成分中药在肠道菌群中的代谢产物,阐明肠道菌群与中药有效成分的作用机理,将有助于开发新型中药制剂和提高中药制剂的有效利用^[12]。

针对中药在肠道菌群的代谢研究,合适的检测

分析方法将有效的阐明有效成分在体内的代谢转化过程, 本实验采用的 UPLC-Q-TOF/MS 分析方法, 与传统分析方法相比具有高效、高灵敏度、检测模式多样、专属性强、分析速度快、并提供丰富的数据信息和数据处理等优点^[13]。

在本实验中, 荜草花有效组分经离体人肠道菌群的代谢后, 共检测到 14 个代谢产物, 主要包括 *N-p*-香豆酰酪胺、*N-tans*-对羟基苯乙基阿魏酰胺的氢化、氢化羟基化、甲基化羟基化代谢产物, 山柰酚的双脱氧、C2-C3 双键还原、脱氧氢化代谢产物, 槲皮素的羟基化、O-C2 键开环裂解脱氧化、C2-C3 双键还原 O-C2 键开环裂解代谢产物, 儿茶素的氢化代谢产物和没食子酸的脱羧、甲基化代谢产物。在肠菌液孵育 4 h 后荜草花有效组分发生了脱羟基、氢化羟基化、氢化、C2-C2 双键还原、O-C2 键开环裂解、甲基化代谢反应, 而对比 12、36、72 h 除了其共有的代谢反应外, 发现 36 h 发生了脱羧基代谢反应, 72 h 发生了氢化二羟基化反应。从图 1 中可以看出, 大多数代谢产物随着时间的推移, 检测到该代谢产物的量越来越少, 推测其代谢产物, 又进行了二次代谢。而其少部分的代谢产物如 M3、M4 其发生氢化代谢反应后, 随着时间的推移, 其代谢产物的量没有明显的变化, 这可能由于 M3、M4 发生氢化代谢反应后其代谢产物的稳定性得到了改善, 使其在肠菌液能够稳定存在。综合肠道菌群的实验结果, 表明荜草花有效组分在体内吸收的过程中, 可能会被肠道里的菌群代谢成小分子物质或水溶性增强的物质, 从而影响荜草花有效组分的生物利用度, 而其有效成分的各个成分具体是被肠道中的何种细菌作用, 还需进一步研究。

荜草花因具有抗心肌缺血的作用而被关注, 其有效组分中主要有槲皮素、山柰酚、没食子酸等活性物质。研究表明, 槲皮素、山柰酚、没食子酸具有保护心肌的作用^[14-16]。但荜草花有效组分经口服吸收后, 绝对生物利用度较低, 抗心肌缺血作用却显著, 很可能是其有效组分经代谢转化后的代谢产物产生作用, 但具体的作用物质和机制还有待研究。实验结果初步判断了其有效成分在人离体肠道菌群的代谢情况, 但对全面反映荜草花有效组分在体内代谢过程具有一定的局限性, 还需从血液、胆汁、尿液、粪便等角度全面反映其有效组分在体内的代谢过程。本实验结果表明, 荜草花有效组分经离体人肠道菌群的作用后, 发生了羟基化、双羟基化、脱氧、氢化还原等 I 相代谢反应和甲基化 II 相代谢反应,

这为进一步研究其在体内具体作用的物质和机制提供实验基础。

参考文献

- 1 Chinese herbal medicine editorial committee(中华本草编委会). Chinese herbal medicine(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999: 1325.
- 2 Li YJ(李勇军), He X(何旭), Liu ZB(刘志宝), et al. Chemical constituents of flowers of *Polygonum orientale*[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21: 14-15.
- 3 Li YJ(李勇军), He X(何旭), Liu ZB(刘志宝), et al. Chemical constituents of flowers of *Polygonum orientale*[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2009, 34: 2613-2615.
- 4 Xie YM(谢玉敏), Yang W(杨武), Lu Y(陆苑), et al. Intestine absorption kinetics for five constituents in *Polygonum orientale* flower extract in rats[J]. *Chin Patent Med*(中成药), 2016, 38: 770-776.
- 5 Men W(门薇), Chen Y(陈颖), Li YJ(李玉洁), et al. Research progress of biotransformation on effective ingredients of chinese medicine via intestinal bacteria[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 229-234.
- 6 Lin WZ(林文振), Li QP(李坤平), Zeng YB(曾玉冰), et al. Analysis of the metabolites of isorhamnetin-3-*o*- β -D-rutinoside in rat intestinal flora *in vitro* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 140-143.
- 7 Lian GQ(连国琦), Zhou XL(周笑犁), Kong XF(孔祥峰), et al. Effects of dietary supplementing chitoooligosaccharide on biochemical parameters and intestinal flora in Huanjiang mini-piglets[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 1605-1609.
- 8 Akao T, Shu YZ, Matsuda Y, et al. Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria. IV. Formation and structures of adducts of a metabolic intermediate with sulfhydryl compounds by *Lactobacillus brevis*[J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36: 3043.
- 9 Cui Q, Pan Y, Xu X, et al. The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme *in vitro* employed UPLC-Q-TOF-MS[J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 67-74.
- 10 Li YJ(李勇军), Li CB(李翠兵), He X(何旭), et al. Chemical constituents in herb of *Polygonum orientale* II[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药), 2011, 36: 458-461.