

# 基于大鼠在体肠灌流模型研究 白及有效部位在肠道的可吸收及代谢成分

陈 浩<sup>1,3</sup>, 王昌权<sup>1,3</sup>, 夏 涛<sup>3</sup>, 李月婷<sup>1</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 黄 勇<sup>1</sup>, 李勇军<sup>2</sup>, 郑 林<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>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;<sup>3</sup>贵州医科大学药学院,贵阳 550004

**摘要:**为了考查白及有效部位在肠道的可吸收成分及其代谢特征。基于在体肠灌流模型,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOF/MS)对收集到的健康SD大鼠循环肠灌流液、血清、胆汁进行分析检测,并结合对照品、质谱碎片信息和Masslynx V4.1工作站中的Single Mass Analysis功能,初步推测吸收和代谢产物的结构式。在大鼠血清和胆汁中,初步鉴定出1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸、4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯、 $\alpha$ -异丁基苹果酸酯原型产物。在大鼠循环肠灌流液、血清和胆汁中,共鉴定出4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯的脱糖后硫酸化代谢产物和二氢菲5的葡萄糖醛酸化代谢产物,其代谢产物主要生水解和葡萄糖醛酸化反应。该方法初步探究了白及有效部位在大鼠循环肠灌流液中可吸收成分和代谢特征,为阐释白及药材的药效物质基础提供实验依据。

**关键词:**白及;有效部位;肠灌流液;UPLC-Q-TOF/MS;血清;胆汁

中图分类号:R969.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0772-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.006

## Study on the absorbable components and metabolism of *Bletilla striata* effective parts in the intestine based on rat intestinal perfusion model

CHEN Hao<sup>1,3</sup>, WANG Chang-quan<sup>1,3</sup>, XIA Tao<sup>3</sup>, LI Yue-ting<sup>1</sup>,  
WANG Yong-lin<sup>1</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup>, LI Yong-jun<sup>2</sup>, ZHENG Lin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/ State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University;

<sup>2</sup>Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University;

<sup>3</sup>School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

**Abstract:** In order to examine the absorbable components of the *Bletilla striata* effective parts in the intestine and their metabolic characteristics. Based on the intestine perfusion model, the collected intestinal perfusate, serum and bile of healthy SD rats were analyzed by UPLC-Q-TOF/MS. And combined with the reference substance, MS fragment information and the Single Mass Analysis function in the Masslynx V4.1 workstation, preliminarily speculated the structure of the absorption and metabolites. militarine, gymnoside I and  $\alpha$ -isobutylmalic acid were preliminarily identified in serum and bile of rats. A total of gymnoside I and dihydrophenanthrene 5 metabolites were identified in rat circulating intestinal perfusion fluid, serum and bile. The method preliminarily explored the absorbable components and metabolic characteristics of *Bletilla striata* effective parts in the circulating intestinal perfusate of rats, and provided experimental basis for explaining the pharmacodynamic basis of white and medicinal materials.

收稿日期:2018-08-29 接受日期:2019-03-13

基金项目:国家自然科学基金(81460630/U1812403);贵州省科技计划(黔科合平台人才[2017]5601; [2016]5613·677);贵州省教育厅项目(黔教合 KY 字[2018]050);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

**Key words:** *Bletilla striata*; effective part; intestinal perfusate; UPLC-Q-TOF/MS; serum; bile

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F. 的干燥块茎,别名苞舌兰、连及草、白根等,是《中国药典》收载的常用药材,其味苦、甘、涩、微寒,归肺、肝、胃经,具有收敛止血、消肿生肌的功能。常用于治疗皮肤皲裂、烫灼伤、痈疮及各种出血性疾病<sup>[1,2]</sup>。现代药理研究表明,白及作为一种传统的中药材,药用价值高,用药广泛,具有抗病原微生物、止血活血、抗肿瘤、促进创面愈合、抗胃溃疡、调节免疫等药理作用<sup>[3]</sup>。但白及研究主要涉及白及的种植加工、成分提取分离与性质研究、抗氧化活性、药理活性以及药理作用和临床应用等<sup>[4]</sup>。而其在体内发挥疗效的物质基础一直未能明确<sup>[5]</sup>,导致其产品工艺和质量控制水平低,使其在产品开发和临床应用受到一定的局限性。经高分辨质谱分析指认发现,其有效部位主要成分为1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(militarine)、4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(gymnoside I)、 $\alpha$ -异丁基苹果酸( $\alpha$ -isobutylmalic acid)、4-(葡萄糖糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(blestroside)、二氢菲5(dihydrophenanthrene 5)、二氢菲1(dihydrophenanthrene 1)、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-[4-O-肉桂酰基-6-O-乙酰基]葡萄糖苷(gymnoside IX)<sup>[6,7]</sup>。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,究其原因可能为其代谢物发挥了疗效<sup>[8,9]</sup>。因此,通过对白及在肠道的代谢研究,可以明确其进入体内的成分和存在形式,进而阐明白及的代谢途径和推测其机制,进一步的明确其药效物质基础,但有关白及在肠道的吸收和代谢的文献鲜有报道。肠道是药物的吸收的主要器官,同时还具有代谢药物的功能。其上皮细胞中不仅存在大量影响药物吸收的转运体,还含有多种与肝脏中相同的代谢酶<sup>[10]</sup>。而在体肠灌流模型不仅是研究药物吸收的简单可行的研究方法,更能够应用于药物肠道代谢特征的研究,相较于各种体外代谢研究方法,更接近于正常生理条件,其结果更加直观、可靠<sup>[11,12]</sup>。因此,该研究采用大鼠在体肠灌流模型研究白及有效部位在大鼠循环肠灌流液中可吸收成分及其代谢产物,对其在肠道中可能的吸收成分和代谢物进行初步研究,以期为阐释白及药材的药效物质基础提供理论依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

UPLC-Q-TOF/MS (Xevo G2-XS 美国沃特世公司,电喷雾四级杆串联飞行时间质谱仪、MassLynx V4.1 质谱工作站,UNIFI 数据库), KQ-300DE 数控超声波清洗器(四川沃特尔科技发展有限公司), NA-5L 氮空一体机(北京中兴汇利科技发展有限公司), EL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), GILSON 移液器(丹麦凯博), DK-98-IIA 恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司); HL-2S 蠕动泵(上海青浦沪西仪器厂)。

### 1.2 材料

氯化钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 160110);磷酸二氢钠(天津市复兴科技发展有限公司,批号 151110);无水氯化钙(西陇科学股份有限公司,批号 1705222);葡萄糖(天津科密欧化学试剂有限公司,批号 20150910);碳酸氢钠(西陇化工股份有限公司,批号 151106);氯化镁(汕头市西陇化工股份有限公司,批号 151209);氯化钾(汕头市西陇化工股份有限公司,批号 151103);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。葛根素对照品(批号:110752-201615,含量 95.4%)购自中国食品药品检定研究院,1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(militarine)对照品(批号:PS180413-03,含量  $\geq 98\%$ )购自成都普思生物科技股份有限公司;天麻素(Gastrodin)对照品(批号:110807-201608,含量 97.6%)购自中国食品药品检定研究院;4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(gymnoside I); $\alpha$ -异丁基苹果酸酯( $\alpha$ -isobutylmalic acid);4-(葡萄糖糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(blestroside);二氢菲5(dihydrophenanthrene 5);二氢菲1(dihydrophenanthrene 1);1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-[4-O-肉桂酰基-6-O-乙酰基]葡萄糖苷(gymnoside IX)对照品均为实验室自制(采用<sup>1</sup>NMR、<sup>13</sup>MR、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%)。

### 1.3 动物

健康 SD 大鼠,雌雄兼用,体重为  $250 \pm 20$  g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(渝)2015-0001。

**饲养条件:**大鼠引进到实验室后,按每个饲养笼分装8只,雌鼠与雄鼠分开饲养,动物房内光照充足,空调和通风设备系统良好,温度控制在18~25℃,相对湿度在50%~60%。实验室定期对动物房进行消毒和消毒,大鼠在动物房饲养1周,待适应动物房环境之后再用于动物实验。

## 2 方法

### 2.1 溶液配制

#### 2.1.1 标准溶液的配制

精密称取 Militarine、gymnoside I、 $\alpha$ -isobutylmalic acid、blestroside、dihydrophenanthrene 5、dihydrophenanthrene 1、gymnoside IX 对照品适量,加甲醇溶解,摇匀,获得各对照品的储备液。用甲醇将各对照品的储备液稀释成所需浓度,得混合标准溶液。UPLC-Q-TOF/MS 进样分析。

#### 2.1.2 Krebs-Ringer's (K-R) 营养液的配制<sup>[13]</sup>

精密称取  $\text{CaCl}_2$  0.37 g,葡萄糖 1.40 g,分别加少量蒸馏水使溶解,再称取  $\text{NaCl}$  7.80 g、 $\text{KCl}$  0.35 g、 $\text{NaHCO}_3$  1.37 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.32 g、 $\text{MgCl}_2$  0.02 g,加蒸馏水溶解后与溶解的  $\text{CaCl}_2$  及葡萄糖混匀,蒸馏水定容至 1 L。

#### 2.1.3 白及有效部位供试液的制备

参照文献方法<sup>[14]</sup>,称取白及药材用适量,用4倍量95%乙醇溶液回流提取3次,2 h/次,滤过,合并滤液,浓缩至浸膏,浸膏用水溶解后上 D101 大孔吸附树脂柱色谱,水洗脱后,用80%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,残留物微波真空干燥,得白及有效部位,备用。称取白及提取物1 g,用15 mL 无水乙醇溶解,取1 mL逐滴加入到5 mL 10% 吐温80水溶液中,混匀后用 K-R 营养液稀释定容至100 mL,超声10 min,5 000 rpm 离心10 min,取上清液,得666  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的供试液。取1  $\mu\text{L}$  UPLC-Q-TOF/MS 进样分析。

### 2.2 色谱条件

保护柱为 Waters VanGuard BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 5 mm, 1.7 1.7  $\mu\text{m}$ ) ;色谱柱是 Waters BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )柱;流动相 0.01% 甲酸水溶液(A)-0.01% 甲酸乙腈(B)进行梯度洗脱(0~2 min, 5% B; 2~5 min, 5%~15% B; 5~8 min, 15%~15% B; 8~10 min, 15%~45% B; 10~14 min, 45%~95% B; 14~15 min, 95%~5% B)流速:0.5 mL/min;柱温:35℃;进样体积为1  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 质谱条件

电喷雾离子源;扫描方式为负离子扫描(ESI<sup>-</sup>,

*m/z* 50~1 200);毛细管电压 1.5 kV;离子源温度 100 ℃;锥孔电压 30 V;脱溶剂气温度 300 ℃;锥孔气流量 50 L/h;碰撞能量 20~30 V;脱溶剂气流量 10 L/min;数据采集模式:MS<sup>E</sup> Continuum;甲酸钠校正;校正模式:sensitivity;质谱数据采集及处理软件为:Masslynx V4.1 工作站。扫描方式为 MS Centroid 模式。

### 2.4 白及有效部位在大鼠循环肠灌流试验中灌流液、血清和胆汁的收集<sup>[15,16]</sup>

取健康 SD 大鼠,实验前禁食 12 h(不禁水),30% 乌拉坦(1.4 g/kg) 麻醉大鼠,仰卧固定。实验分为两组:空白组和给药组。将给药组大鼠,固定于 37 ℃ 恒温手术台,剃去大鼠腹部的毛,然后沿大鼠的腹部中线打开腹腔,开口大概 3~4 cm,结扎总胆管;然后从大鼠胃后顺延找到幽门底部的十二指肠,在十二指肠前端剪一个小口并插入硅胶管,扎紧;然后通过盲肠找到回肠底端,在回肠底端同样剪一个小口并插入硅胶管,扎紧。使其与恒流泵形成一个回路。在灌流前,先将恒流泵调至 1.0 mL/min 的流速并用 37 ℃ 的生理盐水冲洗肠道,冲至肠道无内容物为止,然后排空肠道内的水分。取 37 ℃ 白及有效部位溶液 60 mL,以 5.0 mL/min 的流速循环平衡 15 min 后,此时记为 0 时。调节流速,再以 2.5 mL/min 的速度继续循环,收集 3 h 时白及有效部位循环肠灌流液;与此同时,实施胆管插管手术,开腹,找到胆管,于胆管切口,选用内径小的硅橡胶(1.5 mm)插入胆管,收集 3 h 含药胆汁;实验结束后,立即实施腹主动脉取血,于 37 ℃ 水浴孵育后,收集含药血清。空白组大鼠按照给药组方法进行空白胆汁、空白循环肠灌流液、空白血清。以上样品均放置-20 ℃ 保存,备用。

### 2.5 样品处理方案

#### 2.5.1 血清样品处理方法

取大鼠血清 1 mL,置于 5 mL 进口塑料离心管中,补加 4 mL 甲醇,涡混震荡 2 min 后,超声 5 min,15 000 rpm 离心 10 min,取上清液于 37 ℃ 氮气吹干,加入 1 mL 甲醇于吹干的样品中,按上述处理方法加入 1 mL 甲醇二次沉淀蛋白,加入 200  $\mu\text{L}$  50% 甲醇水溶液溶解残留物,涡混震荡 2 min 后,超声 5 min,15 000 rpm 离心 10 min,取上清液 UPLC-Q-TOF/MS 进样分析。

#### 2.5.2 胆汁样品处理方法

取大鼠胆汁 1 mL,加入 1 mL 1% 甲酸水,然后加入 2 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液于 37 ℃

氮气吹干,加入200 μL 50% 甲醇水溶液溶解残留物,涡混震荡2 min后,超声5 min,15 000 rpm离心10 min,取上清液UPLC-Q-TOF/MS进样分析。

### 2.5.3 灌流液样品处理方法

取肠灌流循环液1 mL,加入1 mL 1% 甲酸水,然后加入2 mL乙酸乙酯萃取3次,合并萃取液于37 °C氮气吹干,加入200 μL 50% 甲醇水溶液溶解残留物,涡混震荡2 min后,超声5 min,15 000 rpm离心10 min,取上清液UPLC-Q-TOF/MS进样分析。

## 3 结果与分析

运用Masslynx V4.1软件得到K-R液+药液、空白血清、含药血清及两者差异图谱;空白胆汁、含药胆汁及两者差异图谱;空白灌流液、含药灌流液及两者差异图谱。图谱见图1~图3,主要代谢产物信息表见表1。各成分在ESI<sup>-</sup>模式下得到较好的响应信号。

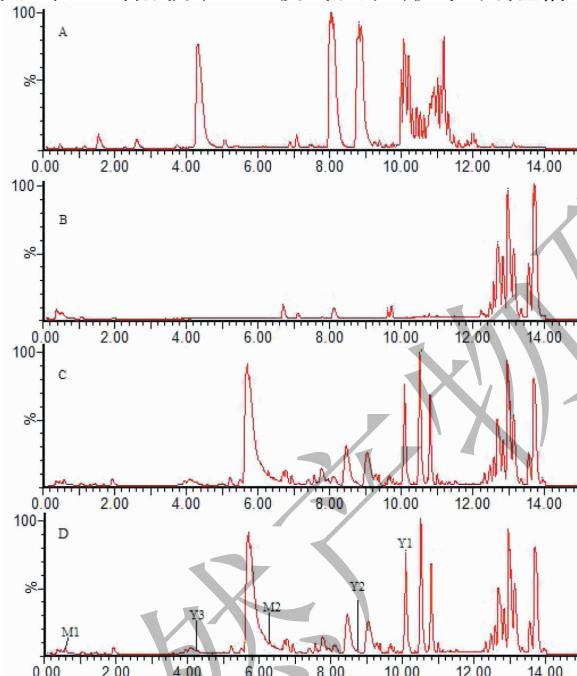


图1 白及有效部位在大鼠血清中的代谢产物ESI<sup>-</sup>基峰图

Fig. 1 Base peak chromatograms of active fraction from *Bletilla striata* metabolites in rats serum sample in negative mode

注:(A) K-R液+药液;(B) 空白血清;(C) 含药血清;(D) 含药血清与空白血清差异图谱;Y1:militarine;Y2:gymnoside I;Y3:α-isobutylmalic acid;M1:gastrodin脱糖后硫酸化的代谢产物;

M2:dihydrophenanthrene 5葡萄糖醛酸化的代谢产物。

Note:(A) K-R liquid + liquid medicine (B) blank serum;(C) serum with drug;(D) different chromatograms of A and B;Y1. militarine; Y2. gymnoside I; Y3. α-isobutylmalic acid; M1. Sulfated metabolites after gastrodin de-sugar; M2. Dihydrophenanthrene 5 glucuronidation metabolite.

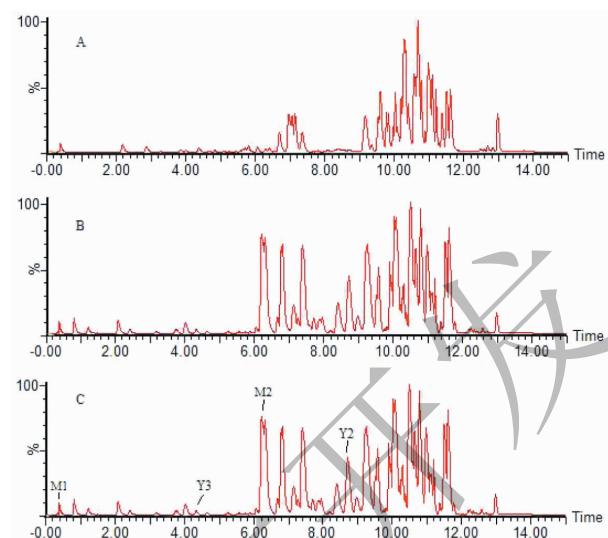


图2 白及有效部位在大鼠胆汁中的代谢产物ESI<sup>-</sup>基峰图

Fig. 2 Base peak chromatograms of active fraction from *Bletilla striata* metabolites in rats bile sample in negative mode

注:(A) 空白胆汁;(B) 含药胆汁;(C) 含药胆汁与空白胆汁差异图谱;Y2. gymnoside I;Y3. α-isobutylmalic acid ; M1. gastrodin 脱糖后硫酸化的代谢产物;M2. dihydrophenanthrene 5 葡萄糖醛酸化的代谢产物。

Note: (A) blank bile; (B) bile with drug; (C) different chromatograms of A and B; Y2. gymnoside I;

Y3. α-isobutylmalic acid ; M1. Sulfated metabolites after gastrodin de-sugar; M2. Dihydrophenanthrene 5 glucuronidation metabolite.

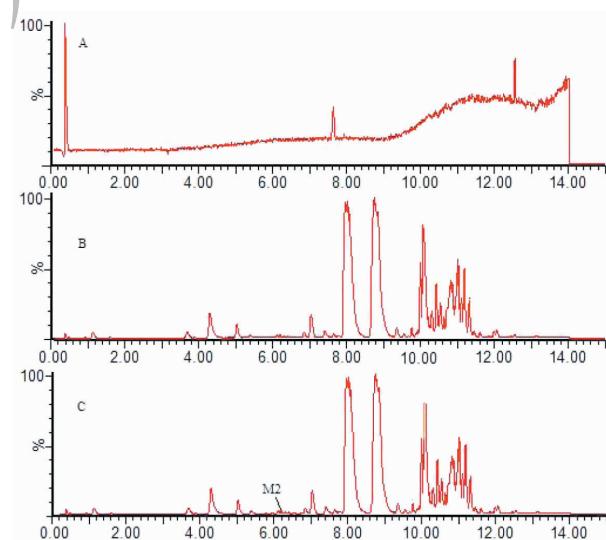


图3 白及有效部位在大鼠在体循环肠灌流中的代谢产物ESI<sup>-</sup>基峰图

Fig. 3 Base peak chromatograms of active fraction from *Bletilla striata* metabolites in rats intestinal perfusion sample in negative mode

注:(A) 空白循环肠灌流液;(B) 含药循环肠灌流液;(C) 含药循环肠灌流液与空白循环肠灌流液差异图谱;M2. dihydrophenanthrene 5 葡萄糖醛酸化的代谢产物。

Note:(A) blank intestinal perfusion; (B) intestinal perfusion with drug; (C) different chromatograms of a and b; M2. ophenanthrene 5 glucuronidation metabolite.

表1 白及有效部位在大鼠循环肠灌流液、血清、胆汁中的代谢产物分析

Table 1 Analysis of metabolites of *Bletilla striata* effective parts in rat intestinal perfusate, serum and bile

编号 No.	保留时间 Retention time ( min )	模式 Mode	质荷比 <i>m/z</i>	分子式 Formula	误差 Error	碎片离子 Fragment ion	原型与代谢产物 Prototype and metabolite name	来源 Source
Y1	10.06	[ M-H ] <sup>-</sup>	725.264 8	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> O <sub>17</sub>	-1.2	457.174 0	Militarine	S
Y2	8.71	[ M-H ] <sup>-</sup>	457.171 0	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> O <sub>11</sub>	0.0	285.102 5	Gymnoside I	S,B
Y3	4.26	[ M-H ] <sup>-</sup>	189.076 5	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	1.1	129.055 6	α-Isobutylmalic acid	S,B
M1	0.62	[ M-H ] <sup>-</sup>	203.002 3	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub> S	4.4	123.042 0	Desugarization and sulfate conjugation	S,B
M2	6.29	[ M-H ] <sup>-</sup>	417.117 4	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	-2.9	241.083 4	Glucuronide conjugation	S,B,I

注:S:血清,B:胆汁,I:肠灌流液。

Note:S:serum,B:bile,I:intestinal perfusate.

### 3.1 原型与代谢产物鉴定

#### 3.1.1 原型产物鉴定

Y1:在 10.06 min 处存在 *m/z* 725.264 8 [ M-H ]<sup>-</sup> 峰的化合物,显示 *m/z* 457.174 0 的主要碎片离子峰,由 Single Mass Analysis 预测的化学式分为 C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>O<sub>17</sub>,与 militarine 对照品相同,由此确定 T<sub>R</sub> 10.06 min 的 Y1 为 militarine。

Y2:在 8.71 min 处存在 *m/z* 457.171 0 [ M-H ]<sup>-</sup> 峰的化合物,显示 *m/z* 285.102 5 的主要碎片离子峰,由 Single Mass Analysis 预测的化学式分为 C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>11</sub>,与 gymnoside I 对照品相同,由此确定 T<sub>R</sub> 8.71 min 的 Y2 为 gymnoside I。

Y3:在 4.26 min 处存在 *m/z* 189.075 6 [ M-H ]<sup>-</sup> 峰的化合物,显示 *m/z* 129.055 6 的主要碎片离子峰,由 Single Mass Analysis 预测的化学式分为 C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>,与 α-isobutylmalic acid 对照品相同,由此确定 T<sub>R</sub> 4.26 min 的 Y3 为 α-isobutylmalic acid。

#### 3.1.2 代谢产物鉴定

M1:在 0.62 min 处存在 *m/z* 203.002 3 [ M-H ]<sup>-</sup> 峰的化合物,显示 *m/z* 123.042 0 的主要碎片离子峰,由 Single Mass Analysis 预测的化学式分为 C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S,推测 M1 为 gastrodin 脱糖后硫酸化的代谢产物。由于具体信息不够全面,因此不能确定发生代谢和转化的位点。

M2:在 6.23 min 处存在 *m/z* 417.117 4 [ M-H ]<sup>-</sup> 峰的化合物,质量数比 dihydrophenanthrene 5 多 176,显示 *m/z* 241.083 4 的主要碎片离子峰,由 Single Mass Analysis 预测的化学式分为 C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>9</sub>,推测 M2 为 dihydrophenanthrene 5 葡萄糖醛酸化的代谢产物。由于具体信息不够全面,因此不能确定发生代谢和转化的位点。

#### 3.1.3 白及有效部位在大鼠循环肠灌流液、血清、胆汁中的代谢物生物转化途径

根据以上代谢产物的鉴定结果,白及有效部位

在大鼠循环肠灌流液、血清、胆汁中的代谢产物的生物转化途径见图 4。

### 4 讨论

小肠不仅是药物吸收的主要部位,同时小肠黏膜的上皮细胞也是药物肝外代谢的主要部位之一,而小肠自身所表达的药物代谢酶会影响到药物的首关代谢和生物利用度,对口服药物的毒性及疗效有着潜在的影响<sup>[17]</sup>。研究药物吸收和代谢特性的模型有体内、在体和体外 3 种,但体内和体外的操作方法均较为繁琐,实验要求高,难以达到良好的效果<sup>[18]</sup>。故本实验采用在体循环肠灌流模型,研究白及有效部位在肠中可能吸收的成分及代谢产物。从图谱中可以发现存在其他未检识出的丰度较高的化学成分,但目前对白及醇提后的非多糖成分能够确认的成分较少。只能根据已鉴别确认的化学成分来对其实验谱图中的峰图进行鉴别。而对其它丰度较高的化学成分与目前已鉴别确认的化学成分进行对比分析后,还是无法对其进行鉴别和归属,但是其未检识出的丰度较高的化学成分有可能源自原型药材、内源性物质、代谢物,具体是何种成分还有待继续深入研究。

在肠道环境中代谢产物不仅仅是小肠黏膜的上皮细胞对药物进行代谢,同时排入肠道的胆汁也会对药物进行代谢。结果显示,在胆汁中检测到了代谢产物 M1,而在肠灌流液中未检测到 M1,故推测代谢产物是由胆汁的影响或其经过肝脏代谢排入胆汁中,进而对血清进行检测发现 M1 存在于血清中,这表明 M1 能够吸收入血。通过单独对肠灌流液和胆汁的检测,推测产生代谢产物的来源,而对血清进行检测,则为了推测在肠道中可吸收的成分,同时为研究白及有效成分在各个肠段中的吸收及代谢情况奠定实验基础。目前有关白及有效部位的相关代谢文献尚未见报道,因此本实验基于大鼠在体肠灌流模

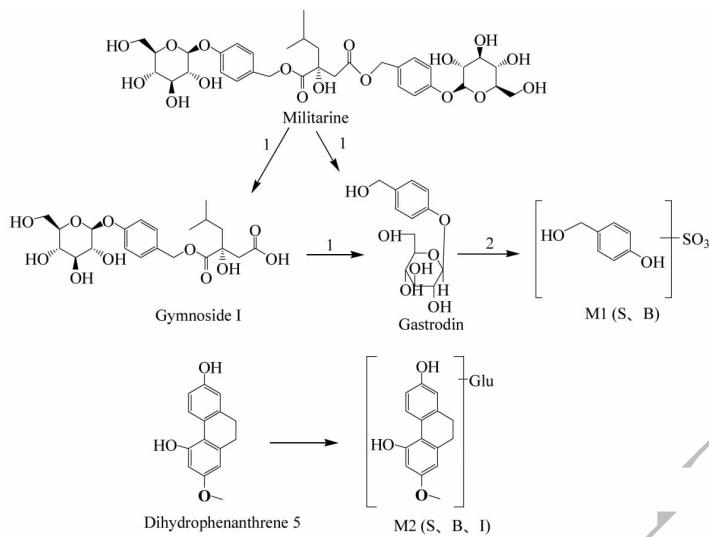


图4 白及有效部位在大鼠在体循环肠灌流实验中可能的代谢途径

Fig. 4 Possible metabolic pathway of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F. extract in human intestinal flora

注:1. 酯键水解;2. 酯键水解部位脱糖后硫酸化 3. 葡萄糖醛酸化;S. 血清 B. 胆汁 I. 肠灌流液。

Note: 1. Ester bond hydrolysis; 2. Esterification of the ester bond hydrolysis site after de-sugaring

3. Glucuronidation; S: Serum B: Bile I: intestinal perfusion.

型收集大鼠循环肠灌流液、血清、胆汁全面的分析白及有效部位在肠道中的变化,实验结果显示,在血清、胆汁中共检测出3个原型产物,在肠灌流液、血清、胆汁2个代谢产物,其代谢物主要发生水解和葡萄糖醛酸化反应。该实验结果,将为阐释白及药材的药效物质基础和进一步的研究提供实验依据。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 103.
- 2 Editorial Board of China National Materia Medica Administration. Chinese herbal medicine(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 8674.
- 3 Zhang LF, Hu JH, Zhang YQ, Research progress on pharmacological action of *Bletilla rhizoma*[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2014, 16(1): 83-86.
- 4 Liang YX, He XM, Zhu FC, et al. The Main bioactive substance and pharmacology of *Bletilla striata*[J]. Hunan Agri Sci(湖南农业科学), 2018, 3: 107-109.
- 5 Lei Z, Chang MQ, Chen L, et al. Progress in clinical application of *Bletilla striata*[J]. China Pharm(中国药师), 2013, 16: 1240-1242.
- 6 Wang AM, YanY, LanB, et al. Simultaneous determination of nine chemical markers of *Bletillae Rhizoma* by ultra performance liquid chromatography[J]. China J Chin Mater Med(中
- 国中药杂志), 2014, 39: 2051-2055.
- 7 Mei CY, Xiang WY, Yang W, et al. Simultaneous determination of six components in *Bletilla striata* by UPLC-MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1233-1237.
- 8 Gong ZP, Li M, Hou JY, et al. Study on the metabolites of active parts of inula cappa in the intestinal circulating perfusion fluid of rat[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2017, 45: 122-124.
- 9 Men W, Chen Y, Li YJ, 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.
- 10 Zheng QT, Zhuang XM, Li H. Intestinal first-pass effect: research advances[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2010, 37: 269-272.
- 11 Zhai L, Shi J, Xu W, et al. Ex vivo and in situ evaluation of 'dispelling-wind' chinese medicine herb-drugs on intestinal absorption of chlorogenic acid. [J]. Phytother Res, 2015, 29: 1974-1981.
- 12 Bi HE. The pharmacokinetic study of tanshinone II A in rats and the involved mechanisms[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University(中山大学), 2007.
- 13 Chen PC, Hou JY, et al. Intestinal absorption of four main components of cortex eucommiae extract in rats[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2015, 46: 730-735.
- 14 Zhao FF, Yang X, et al. Hemostatic effect and mechanism of a non-polysaccharide fraction of *Bletilla striata* [J]. Chin

- Pharmacol Bull(中国药理学通报),2016,32:1121-1126.
- 15 Joshi G, Kumar A, Sawant K. Bioavailability enhancement, Caco-2 cells uptake and intestinal transport of orally administered lopinavir loaded PLGA nanoparticles[J]. Drug Deliv, 2016,23(9):1.
- 16 Bowles SL, Ntamo Y, Malherbe CJ, et al. Intestinal transport and absorption of bioactive phenolic compounds from a chemically characterized aqueous extract of Athrixia phyllioides[J]. J Ethnopharmacol, 2017,200:45-50.

(上接第 759 页)

- 2 Zhai XC, Wu J. Research progress in protective mechanism of panax notoginsenosidum on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2016,51(1):6-9.
- 3 Xu Y. Oxidative stress injury and cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J of Storke(中国卒中杂志), 2008,3: 195-197.
- 4 Gong J, Sun F, Li Y, et al. Momordica charantia polysaccharides could protect against cerebral ischemia /reperfusion injury through inhibiting oxidative stress mediated c-jun n-terminal ki-nase 3 signaling pathway [J]. Neuro Pharmacol, 2015,91:123-134.
- 5 Sun GB, Qin M, Luo Y, et al. Protect effects and the underlying mechanisms of myricitrin against vascular endothelial cells apoptosis induced by oxidative stress[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2013,48:615-620.
- 6 Xiao T, Li CY, Tian W. Research advances in mechanism of luteolin in ischemia-reperfusion injury[J]. Med Innovation of Chin(中国医学创新), 2017,14:146-148.
- 7 Lyu C, Wang HF, Yan XY. Advances in research on anti-oxidation of luteolin [J]. Heilongjiang of Chin Med(黑龙江医药), 2015,28:1019-1022.
- 8 Gao JB, Hu B, Sun CH, et al. Preparation, solubility determination and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of water-soluble luteolin [J]. Chin Pharmacist(中国药师), 2014,17:904-907.
- 9 Wei PP, Zhang ZH, Jin X, et al. Preparation of luteolin-loaded mixed micelles and their anti-tumor activity [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015,50:1330-1334.
- 10 Li JF, Gao MY, Wang HM, et al. Optimization and in vitro characterization of resveratrol-loaded poloxamer 403/407 mixed micelles[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2015,50: 1045-1051.
- 11 Cai Z, Pan WH. Honokiol/Pluronic F-127 micelles: preparation and its *in vitro* anti-tumor study[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014,31:186-189.
- 12 Xu HB, Li L, Liu GQ. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by guggulsterone[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2008,12:1190-1197.

- 17 Du Q, Di LQ, Shan JJ, et al. Research progress of drug intestinal metabolism and traditional Chinese medicine intestinal metabolism [J]. Her Med(医药导报), 2009, 28: 1595-1597.
- 18 Hu XX, Jing GL, Chen JB, et al. Study on the characteristics of ginsenoside Rg1 in PNS absorbed in the rat intestine[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2014, 34:998-1001.
- 13 Fang J, Ye ZX, Wang YQ, et al. Effects of continuous compression on the proliferation of PC12 cells and the expression of cytoskeletal protein[J]. Med J Chin PAPF(武警医学), 2010,21:383-387.
- 14 Fan RJ, Luo YF, Sun YF. The model of focal cerebral ischemia-reperfusion in rats was established by a new type [J]. Chin J of Ethnomed and Ethnopharm(中国民族民间医药), 2014,23(2):26-27.
- 15 Cheng FF, Song WT, Guo SY. Comparison of three kinds of neurological function rating systems on focal cerebral ischemia models of rodent animals[J]. Chin J of Rehab Med(中国康复医学杂志), 2011,26:337-341.
- 16 Long YQ, Wang L, Shang JC, et al. Pharmacokinetics of luteolin and its SBE- $\beta$ -CD inclusion complex in rats[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018,38:282-287.
- 17 Lei XX, Zhang Q, Li GH, et al. Study on protection of aloemodin for cytoskeleton in PC12 cells[J]. Chin J Misdiagn(中国误诊学杂志), 2011,11:5555-5558.
- 18 Li HX, Yang H, Zhang HB, et al. Curcumin induces apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells via MAPK signaling pathway[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014,26:329-334.
- 19 Li J, Liu Y, Liu HX, et al. Effects of zhali nusi fang on permeability changes of blood brain barrier after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Chin J of Exp Trad Med Form, 2014,20:114-117.
- 20 Xing HY, Wang K, Zhao K, et al. Optimization of preparation and formulation of luteolin liposomes [J]. Acta Acad Med Militaris Tertiae(第三军医大学学报), 2008,9:810-813.
- 21 Gao Q. Changes of the cytoskeleton and cell apoptosis[J]. J Med Postgraduates(医学研究生学报), 2008,8:877-880.
- 22 Liu HL, Hu L, Wang JK, et al. Protective effects of quercetin on PC12 cells with  $H_2O_2$ -induced oxidative damage [J]. Chin Pharm Bulletin(中国药理学通报), 2014, 30: 373-377.
- 23 Wang GG, Lu XH, Ding M, et al. Protective effects of luteolin preconditioning on rat liver under ischemia/ reperfusion[J]. Acta Physiologica Sinica(生理学报), 2011, 63:177-183.