

· 药剂与炮制 ·

白头翁皂苷类成分的肠道菌群降解动力学

刘亚丽¹, 宋永贵², 关志宇², 张凌¹, 冯育林¹, 王萌¹, 李伟², 苏丹^{2*}

(1. 江西中医药大学科技学院, 南昌 330025;

2. 江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的:考察白头翁皂苷类成分在肠道菌群中的降解动力学特征,为阐明白头翁发挥药效的作用机制提供参考。方法:采用 HPLC-ELSD 测定白头翁皂苷 B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁ 含量,流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min, 75%~90% A), 漂移管温度 75 ℃, 气体流速 2.0 L·min⁻¹。通过肠道内容物体外孵育白头翁总皂苷计算降解参数。结果:白头翁皂苷类成分在大鼠肠道中孵育结果符合一级降解动力学特征, 48 h 内白头翁皂苷 B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁ 迅速降解, 降解速率常数分别为 0.079 4, 0.052 3, 0.053 9, 0.042 6, 0.046 8 h⁻¹, 半衰期依次为 8.73, 13.25, 12.86, 16.27, 14.81 h。结论:肠道菌群是白头翁皂苷原型化合物发生代谢的重要因素。

[关键词] 白头翁; 皂苷类成分; 肠道菌群; 降解动力学

[中图分类号] R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080001

Intestinal Flora Degradation Dynamics of Saponins from Pulsatillae Radix in Rats LIU Ya-li¹, SONG Yong-gui², GUAN Zhi-yu², ZHANG Ling¹, FENG Yu-lin¹, WANG Meng¹, LI Wei², SU Dan^{2*} (1. Science and Technology College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330025, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate pharmacodynamic mechanism of Pulsatillae Radix by investigating degradation dynamics of its saponins in intestinal flora. **Method:** HPLC-ELSD was adopted to determinate contents of pulchinoside B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁ with mobile phase of methanol (A) -water (B) for gradient elution (0-30 min, 75% -90% A), drift tube temperature at 75 ℃, gas flow rate of 2.0 L·min⁻¹. Degradation parameters were determinated through incubating total saponins from Pulsatillae Radix with rats' intestinal bacteria *in vitro*. **Result:** Saponins from Pulsatillae Radix were in accordance with first-order reaction, pulchinoside B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁ degraded rapidly in rats' intestinal flora within 48 hours with degradation rate constants were 0.079 4, 0.052 3, 0.053 9, 0.042 6, 0.046 8 h⁻¹, half-life periods were 8.73, 13.25, 12.86, 16.27, 14.81 h, respectively. **Conclusion:** Intestinal flora is the most important factor on metabolism of prototype compounds of saponins from Pulsatillae Radix.

[Key words] Pulsatillae Radix; saponins; intestinal flora; degradation dynamics

白头翁功效清热解毒、凉血止痢^[1],具有抗肿瘤、抗血吸虫、抗氧化、抗炎、杀虫、抑菌等药理作用^[2-5],主要成分为皂苷类。前期研究发现白头翁

总皂苷提取物具有抗肿瘤活性^[1],在此基础上对总皂苷进行分离、鉴定和构效关系研究,结果表明5种齐墩果烷母核的皂苷类成分(白头翁皂苷 B₃, B_D,

[收稿日期] 20140720(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460594);江西省自然科学基金项目(20122BAB215041);江西省教育厅科技计划项目(GJJ12529, GJJ13583);江西中医药大学博士启动基金项目(2010BS2037, 2014BS019)

[第一作者] 刘亚丽, 博士, 讲师, 从事中药药物代谢和新药开发研究, Tel: 18007092727, E-mail: 582685133@qq.com

[通讯作者] * 苏丹, 博士, 副教授, 从事药物分析方法与药代动力学研究, Tel: 13177859011, E-mail: Sud94@aliyun.com

B₇, B₁₀, B₁₁)为该提取物的活性成分。前期还对白头翁总皂苷进行大鼠体内药代动力学研究,发现该部位吸收较差,大部分齐墩果烷型五环三萜皂苷类成分未以原型形式被机体吸收利用^[6]。中草药口服后某些成分经肠道菌群降解后生成苷元而发挥药理作用,这类药被认为是天然前体药物^[7],只有较小部分是以原型形式被吸收。体内环境中肠道菌群是完成中药有效成分代谢的重要因素之一^[8]。本实验通过体外大鼠肠道菌群研究白头翁总皂苷的降解变化规律,揭示其降解动力学特征,为阐明白头翁发挥药效的作用机制提供依据。

1 材料

1100系列高效液相色谱系统(G1311型四元泵, G1322型在线脱气机, G1316C型柱温箱, 1100型化学工作站, 美国安捷伦科技有限公司), 2000ES型蒸发光散射检测器(美国Alltech公司), HL-2型恒流泵(上海沪西分析仪器厂), AUW220D型1/10万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), SZ-93型自动双重水蒸馏器(上海雅荣生化仪器设备有限公司), Cleanert ODS C₁₈固相微萃取小柱(200 mg × 3 mL, 美国Agela公司), DT5-3型低速台式自动平衡离心机(北京时代北利离心有限公司)。

白头翁购自苏州一家中药店, 由苏州大学药学院李笑然教授鉴定为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* 的干燥根, 存放在苏州大学药学院中药标本馆。白头翁皂苷 B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁对照品(纯度 > 95%, 自制, 结构经 MS, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定^[9-10]), 白头翁总皂苷提取物(自制, 取干燥白头翁 0.25 kg, 加 70% 乙醇逆流提取 3 次, 提取液减压干燥, 经 D101 型大孔树脂柱洗脱, 收集 60% 乙醇洗脱部分, 冻干, 即得), 甲醇为色谱纯, 水为自制超纯水, 其他试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠, 体重(200 ± 25) g, 由江西中医药大学动物中心提供, 合格证号 SCXK(赣)2005-0001, 实验前 3 d 饲养于昼夜自然循环的控制环境中[(22 ± 2) °C, 相对湿度(50 ± 20)%]。

2 方法与结果

2.1 **Kreb-Ringer's 营养液的配方** 营养液每 1 L 中含有 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, NaHCO₃ 1.37 g, MgCl₂ 0.02 g, 葡萄糖 1.4 g。

2.2 **厌氧菌培养液的制备** 取溶液 A (0.78% K₂HPO₄) 和溶液 B [0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₂)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄ · H₂O] 各 37.5 mL, L-半胱氨酸 · H₂O 0.5 g, 25% 左旋

抗坏血酸 2 mL, 8% Na₂CO₃ 50 mL, 牛肉膏 1 g, 蛋白胨 1 g, 加水至 1 L, 用 NaOH 和 HCl 调节 pH 7.5 ~ 8.0, 即得。

2.3 **肠道孵育液的制备** 将大鼠新鲜粪便与生理盐水按 0.25 g · mL⁻¹ 混合制成悬浊液, 于 4 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 得肠道菌液。取肠道菌液 80 mL, 置于 720 mL 厌氧培养液中, 混匀, 得肠道孵育液。

2.4 **白头翁总皂苷肠道孵育** 取大鼠肠道孵育液 10 mL, 加入白头翁总皂苷 5.08 mg, 混匀, 将混匀的溶液按 1 mL/管分装, 分别于 37 °C 厌氧条件下培养 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24, 36, 48 h。

2.5 溶液的制备

2.5.1 **对照品溶液** 精密称取白头翁皂苷 B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁ 对照品适量, 加甲醇配成质量浓度分别为 1.00, 0.92, 1.00, 0.82, 1.04 g · L⁻¹ 的混合对照品贮备液, 置 4 °C 保存。精密量取白头翁皂苷储备液适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配成系列对照品溶液。

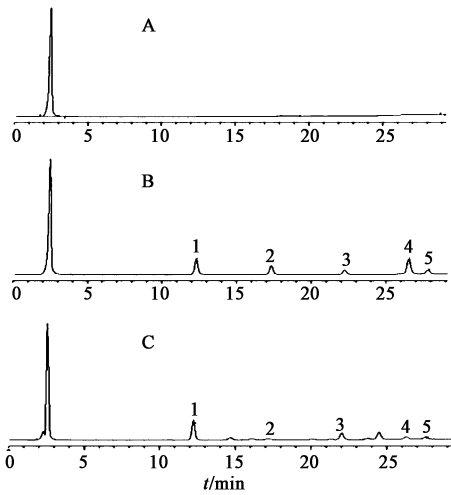
2.5.2 **供试品溶液** 取厌氧培养一定时间后白头翁肠道孵育液, 加入甲醇 1 mL 终止反应, 漩涡振荡 2 min, 氮气吹干, 加水 1 mL 复溶, 利用固相微萃取小柱分离, 加水 5 mL 淋洗, 加甲醇 5 mL 洗脱, 收集甲醇洗脱液, 氮气吹干, 加甲醇 0.2 mL 复溶, 漩涡振荡 2 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。同时用空白肠道孵育液做空白试验。

2.6 方法学验证

2.6.1 **色谱条件** 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 30 min, 75% ~ 90% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 蒸发光散射检测器漂移管温度 75 °C, 气体流速 2.0 L · min⁻¹, 进样量 20 μL。结果发现 5 个白头翁皂苷类成分的检测具有较高选择性, 色谱峰良好, 内源性物质无干扰, 见图 1。

2.6.2 **标准曲线绘制** 取空白肠道孵育液, 加入系列对照品溶液 0.2 mL 和甲醇 0.8 mL, 其他操作同 2.5.2 项, 按 2.6.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得白头翁皂苷 B₃, B_D, B₇, B₁₀, B₁₁ 的回归方程分别为 $Y = 0.79X + 0.48$ ($R^2 = 0.9969$), $Y = 0.69X + 1.01$ ($R^2 = 0.9956$), $Y = 0.73X + 1.12$ ($R^2 = 0.9932$), $Y = 0.43X + 0.78$ ($R^2 = 0.9983$), $Y = 0.20X + 0.83$ ($R^2 = 0.9989$), 线性范围分别为 8.0 ~ 200.0, 7.36 ~ 184.00, 8.0 ~ 200.0, 6.56 ~ 164.00, 8.32 ~ 208.00 mg · L⁻¹。

2.6.3 **精密度试验** 取空白肠道孵育液, 分别加入



A. 空白样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 白头翁皂苷 B_3 ; 2. 白头翁皂苷 B_D ; 3. 白头翁皂苷 B_7 ; 4. 白头翁皂苷 B_{10} ; 5. 白头翁皂苷 B_{11}

图 1 白头翁皂苷类成分 HPLC-ELSD

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatogram of five pulchinenosides

高、中、低质量浓度的白头翁皂苷 B_3 ($0.04, 0.2, 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), B_D ($36.8, 184, 920 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), B_7 ($0.04, 0.2, 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), B_{10} ($32.8, 164, 820 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), B_{11} ($41.6, 208, 1040 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合对照品溶液 0.2 mL 和甲醇 0.8 mL , 其他操作同 2.5.2 项, 每个质量浓度制备 6 份, 按 2.6.1 项下色谱条件测定, 每个质量浓度连续进样 6 次, 测定日内精密度。连续测定

3 d, 计算日间精密度。结果日内和日间精密度 RSD 分别为 $2.7\% \sim 13.0\%$ 和 $2.6\% \sim 11.7\%$, 表明仪器精密度良好。

2.6.4 提取回收率试验 取空白肠道孵育液, 加高、中、低质量浓度混合对照品溶液 0.2 mL 和甲醇 0.8 mL , 其他操作同 2.5.2 项, 按 2.6.1 项下色谱条件测定。另取厌氧培养一定时间后空白肠道孵育液, 按 2.5.2 项下方法处理至“收集甲醇洗脱液, 氮气吹干”, 分别用高、中、低质量浓度混合对照品溶液 0.2 mL 复溶, 漩涡振荡 2 min , 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按 2.6.1 项下色谱条件测定。计算白头翁皂苷 $B_3, B_D, B_7, B_{10}, B_{11}$ 的平均提取回收率 $87.11\% \sim 99.71\%$, RSD 均 $\leq 14.0\%$, 表明该方法回收率良好。

2.6.5 稳定性试验 按 2.6.1 项下色谱条件测定供试品溶液室温放置 24 h 的稳定性, 结果相对误差 $-5.6\% \sim 13.6\%$, RSD $\leq 9.2\%$, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 大鼠肠道菌群降解动力学分析 以白头翁总皂苷各有效成分的质量浓度响应值和相对剩余质量分数 ($\ln C_t/C_0$) 为考察指标, 在现有检测条件下, 结果显示在 48 h 的观测期内各有效成分在大鼠肠道菌群中降解显著, 见表 1。

表 1 白头翁皂苷类成分在肠道孵育液中的降解率

Table 1 Degradation rates of five pulchinenosides in intestinal incubation liquid

t/h	白头翁皂苷 B_3		白头翁皂苷 B_D		白头翁皂苷 B_7		白头翁皂苷 B_{10}		白头翁皂苷 B_{11}	
	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\ln C_t/C_0$	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\ln C_t/C_0$	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\ln C_t/C_0$	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\ln C_t/C_0$	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\ln C_t/C_0$
0	550.14	0.00	202.40	0.00	278.96	0.00	241.90	0.00	189.78	0.00
1	467.87	-0.16	166.07	-0.20	360.93	0.26	227.37	-0.06	169.23	-0.11
2	408.06	-0.30	142.27	-0.35	331.99	0.17	188.10	-0.25	140.18	-0.30
4	320.14	-0.54	137.89	-0.38	283.43	0.02	189.00	-0.25	123.10	-0.43
6	250.49	-0.79	126.99	-0.47	247.67	-0.12	168.84	-0.36	112.90	-0.52
8	219.52	-0.92	117.47	-0.54	202.98	-0.32	155.49	-0.44	107.57	-0.57
10	181.53	-1.11	88.14	-0.83	155.41	-0.59	130.68	-0.62	95.99	-0.68
20	93.27	-1.78	62.36	-1.18	65.02	-1.46	101.06	-0.87	78.87	-0.88
24	82.49	-1.90	50.38	-1.39	62.01	-1.50	88.08	-1.01	67.96	-1.03
32	49.58	-2.41	37.90	-1.68	41.77	-1.90	62.66	-1.35	44.07	-1.46
48	14.29	-3.65	21.25	-2.25	28.45	-2.28	33.85	-1.97	20.99	-2.20

根据白头翁皂苷类成分在大鼠肠道孵育液中经不同时间孵育后的拟合曲线方程符合一级降解动力

学特征, 经公式 $\ln C_A = \ln C_0 - K_A t$ (C_A 为不同时间点质量浓度, C_0 为初始质量浓度, K_A 为降解数率常

数) 计算 K_A 和半衰期($t_{0.5}$), 见表 2。结果表明白头翁皂苷 $B_3, B_D, B_7, B_{10}, B_{11}$ 在大鼠肠道孵育液中迅速降解, 半衰期 8.7 ~ 16.3 h, 肠道菌群是白头翁皂苷类成分原型化合物发生代谢的重要因素。

表 2 白头翁皂苷类成分的降解参数

Table 2 Degradation parameters of five pulchinenosides

化合物	K_A/h^{-1}	$t_{0.5}/h$	相关系数
白头翁皂苷 B_3	0.079 4	8.73	0.964 9
白头翁皂苷 B_D	0.052 3	13.25	0.928 9
白头翁皂苷 B_7	0.053 9	12.86	0.928 4
白头翁皂苷 B_{10}	0.042 6	16.27	0.972 9
白头翁皂苷 B_{11}	0.046 8	14.81	0.934 8

3 讨论

皂苷类化合物在体内代谢转化器和酶系的多样性作用下, 其代谢产物在肠内滞留时间较长, 易受到肠道菌群的作用^[11], 文献研究表明皂苷类成分主要在肠道菌群中被代谢^[12-15]。本文采用离体法分析白头翁总皂苷在大鼠肠道菌群中的代谢情况, 结果表明白头翁皂苷类成分在肠道菌群的作用下被显著代谢, 消除行为符合一级降解动力学特征, 能被肠道菌群迅速降解。与前期研究阐述的白头翁具有显著药理活性但生物利用度不高, 绝大多数活性物质齐墩果烷型皂苷类成分未以原型发挥药效的结论相吻合^[6]。这有助于寻找白头翁产生抗肿瘤药理活性的天然前体药物或活性代谢产物。

由于厌氧菌培养液中内源性物质能与药物及代谢物相结合, 同时微量药物分布在大量生物介质中, 会干扰 HPLC 分析。为了解决这一问题, 预试验采用 3 种方法处理样品, 包括正丁醇为萃取液的液液萃取法、乙腈为沉淀剂的沉淀蛋白法及 C_{18} 填料的固相微萃取法, 结果显示采用固相微萃取法进行样品前处理, 提取效率最高, 白头翁中 5 种皂苷类成分的提取回收率均 > 80%, 样品中内源性物质去除较完全, 获得了满意的分离效果。

[参考文献]

[1] Xu Q M, Shu Z, Yang S L, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo* [J].

Phytomedicine, 2012, 19(3/4): 293-300.

[2] Zheng Y T, Zhou F, Wu X L, et al. 23-Hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128(3): 615-622.

[3] Shu Z, Chen Z, Ding X J, et al. Three new triterpenoids from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel and their cytotoxic activities [J]. Heterocycles, 2011, 83(10): 2365-2371.

[4] Yao D C, Vlessidis A G, Gou Y L, et al. Chemiluminescence detection of superoxide anion release and superoxide dismutase activity; modulation effect of *Pulsatilla chinensis* [J]. Anal Bioanal Chem, 2004, 397(1): 171-177.

[5] 时维静, 路振香, 李立顺. 白头翁不同提取物及复方体外抑菌作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 166-168.

[6] Liu Y L, Song Y G, Xu Q M, et al. Validated rapid resolution LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of five pulchinenosides from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel in rat plasma: Application to pharmacokinetics and bioavailability studies [J]. J Chromatogr B, 2013, 942(1): 141-150.

[7] 梁文权, 李高, 刘建平. 生物药剂学与药物动力学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 45.

[8] Paradkar A. Biopharmaceutics & Pharmacokinetics [M]. Pune: Pragati Books Pvt. Ltd., 2008: 37.

[9] Shi B J, Li Q, Zhang X Q, et al. Triterpene glycosides from the aerial parts of *Pulsatilla chinensis* [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 42(8): 862-866.

[10] Glebko L I, Krasovskaj N P, Strigina L I, et al. Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis* [J]. Russ Chem B+, 2002, 51(17): 1945-1950.

[11] 程晓华, 熊玉卿. 三环萜皂苷的药代动力学研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 24(5): 443-446.

[12] 张怡红. 离体培养的肠道菌群对黄山药总皂苷的代谢研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2008.

[13] 赵雷, 陈昕, 陈晓. 肠内菌群对人参皂苷 Rb_1 的代谢特点 [J]. 长春中医学院学报, 2004, 20(1): 45-47.

[14] 陈昕, 周秋丽, 王本祥. 人参皂苷 Rb_1 的肠内菌代谢 [J]. 药学学报, 1999, 34(6): 410-414.

[15] 张钰哲. 离体大鼠肠内菌群对知母甾体皂苷代谢研究 [J]. 大理学院学报, 2012, 11(3): 5-8.

[责任编辑 刘德文]