

离体人肠道菌群对柚皮苷的代谢动力学分析

熊万娜¹, 黄敏琪¹, 梁健钦², 廖朝东¹, 刘笑¹, 刘喜华^{1*}, 黄慧学²

(1. 广西卫生职业技术学院, 南宁 530023;

2. 广西中医药大学 中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530001)

[摘要] 目的:研究人肠道菌群对柚皮苷的代谢程度与速度,为该成分的新药开发提供参考。方法:采集健康志愿者新鲜粪便制备肠道菌群混悬液,与柚皮苷在厌氧环境下孵育,运用 HPLC 监测柚皮苷浓度变化,HPLC-MS 鉴定代谢产物结构。柚皮苷 HPLC 色谱条件为检测波长 288 nm,流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱。结果:柚皮苷与人肠道菌群共同孵育 15 min 后,柚皮苷色谱峰后面可见 1 个代谢产物;孵育至 120 min 时,柚皮苷代谢率 100%。经 HPLC-MS 鉴定代谢产物为柚皮素。柚皮苷代谢过程符合非线性动力学过程。HPLC 监测发现柚皮素可被进一步代谢,导致柚皮素峰面积降低。结论:柚皮苷可被人肠道菌群代谢,代谢速度快,代谢产物主要为柚皮素,可能存在柚皮苷的二级代谢产物。

[关键词] 柚皮苷; 代谢产物; 人肠道菌群; 柚皮素

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0069-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120069

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1027.017.html>

[网络出版时间] 2015-04-28 10:27

In Vitro Metabolism of Naringin by Human Intestinal Microflora XIONG Wan-na¹, HUANG Min-qi¹, LIANG Jian-qin², LIAO Chao-dong¹, LIU Xiao¹, LIU Xi-hua^{1*}, HUANG Hui-xue² (1. Guangxi Medical College, Nanning 530023, China; 2. Key Laboratory of Common Technology of Traditional Chinese Medicine Preparation, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate metabolites and metabolic dynamics of naringin by human intestinal microflora. **Method:** Human intestinal microflora were obtain from human feces, and incubated with naringin under anaerobic environment. HPLC was applied to monitor the concentration of naringin with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution for gradient elution and detection wavelength at 250 nm. Metabolites were analysis by HPLC-MS. **Result:** Naringenin, one metabolite of naringin, was detected after incubation for 15 min, which was identified by HPLC-MS and its retention time was about 23 min in HPLC. Metabolism percentage of naringin was reached 100% after incubation for 120 min. Metabolic dynamics of naringin by human intestinal microflora was fitted with nonlinear kinetics. Naringenin could be converting to its metabolite through HPLC monitor. **Conclusion:** Naringin can be quickly metabolism by human intestinal microflora, its main metabolite is naringenin, secondary metabolites of naringin may be existed.

[Key words] naringin; metabolism; human intestinal microflora; naringenin

柚皮苷^[1]作为一种双氢黄酮类化合物,具有抗炎镇痛^[2-3]、抗氧化^[4]、降糖^[5]、心肌保护^[6]等作用。人体肠道菌群能产生糖苷水解酶,该酶能水解具有苷键的药物^[7],药物水解为苷元后以苷元形式吸收^[8]。柚皮苷含有糖苷键结构,推测柚皮苷经口服

后在胃肠道容易被糖苷酶水解,影响了其生物利用度。张蔚等^[9]以柚皮苷为模型药物,从志愿者新鲜粪便中分离得到了4种对柚皮苷有代谢活性的肠道细菌,证实不同细菌分别参与了3种柚皮苷代谢产物(乙酰化结合产物、苷元及氢化的苷元)的代谢过

[收稿日期] 20140829(022)

[基金项目] 广西省自然科学基金项目(2013XNSFAA4019124,2014 XNSFAA118198,2011GXNSFB018077);广西高校科技创新能力提升工程项目(70-ZJGX201401002)

[第一作者] 熊万娜,硕士,讲师,从事中药质量与成分分析研究,Tel:13036883598,E-mail:188848168@qq.com

[通讯作者] *刘喜华,硕士,讲师,从事中药教学、中药质量与成分分析研究,Tel:13647819061,E-mail:liuxihua104@163.com

程。本实验采用离体培养人体肠道菌群,在厌氧条件下与柚皮苷共同孵育,初步评价人肠道菌群对柚皮苷的代谢动力学特点。

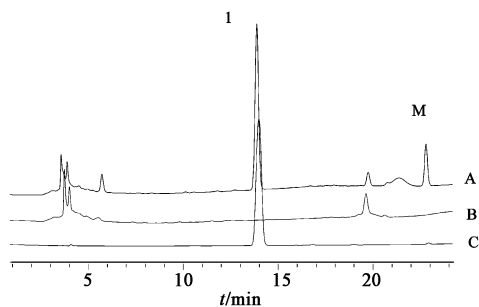
1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津),LCQ Deca XP 型液质联用仪(美国 Finnigan),EL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),LG16-W 型离心机(北京医用离心机厂)。柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110722-200610),胰蛋白胨、大豆蛋白胨(中国检验检疫科学研究院北京路桥技术有限责任公司,批号 100108,090707),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 柚皮苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,进样量 10 μL,检测波长 288 nm,流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 60% ~ 50% B; 8 ~ 16 min, 50% ~ 40% B; 16 ~ 25 min, 40% ~ 60% B)。理论塔板数按柚皮苷峰计算不低于 3 000,见图 1。



1. 柚皮苷; M. 代谢产物; A. 供试品; B. 空白样品; C. 对照品

图 1 含柚皮苷人肠道菌群培养液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of human intestinal bacteria culture medium containing naringin

2.1.2 线性关系考察 精密称取柚皮苷对照品 7.0 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容,得储备液。精密吸取该储备液适量,加煮沸灭活的人肠道菌群液适量,制成系列对照品溶液,离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min,下同),以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 15\ 678X + 18\ 970$ ($r = 0.9995$),线性范围 3.5 ~ 140.0 mg·L⁻¹。

2.1.3 精密度和回收率考察 精密吸取适量储备液,加煮沸灭活的人肠道菌群液适量,制成质量浓度分别为 3.5, 35.0, 105.0 mg·L⁻¹ 的柚皮苷对照品溶液($n = 5$),离心,按 2.1.1 项下条件测定,计算日内精密度 RSD 分别为 4.6%, 3.6%, 4.2%, 日

间精密度 RSD 分别为 5.9%, 5.7%, 5.5%。将测定结果与对照品液标示质量浓度计算平均提取回收率分别为 99.14%, 95.51%, 102.29%, RSD 依次为 4.6%, 3.6%, 4.2%。

2.2 代谢产物的 HPLC-ESI-MS

2.2.1 分析条件 色谱条件为 Synergi Fusion-RP 80A 色谱柱(2.0 mm × 250 mm, 4 μm),甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 55% ~ 45% A),流速 0.2 mL·min⁻¹。质谱条件为 ESI 源,负离子模式,毛细管温度 350 °C,喷雾电压 4.5 kV,壳气流速 22.5 L·min⁻¹,辅助气流速 7.5 L·min⁻¹,一级质谱扫描范围 m/z 100 ~ 1 000。

2.2.2 代谢产物 M 的结构鉴定 由图 2 可知, M 准分子峰 $[M - H]^-$ m/z 271, 二级全扫描质谱主要碎片离子有 m/z 177, 151, 119 离子峰。结果提示代谢产物 M 的相对分子质量 272, 推测其应为柚皮苷糖苷键断裂后得到的苷元。以上数据与文献[10]报道的数据一致,确定代谢产物 M 为柚皮素。

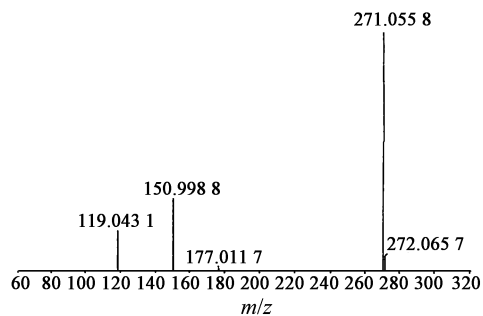


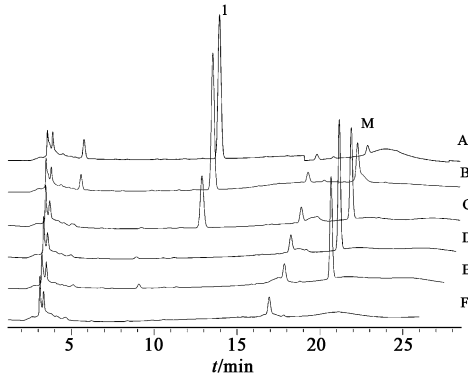
图 2 代谢产物 M 的 MS

Fig. 2 Mass chromatogram of metabolite M

2.3 离体人肠道菌群对柚皮苷的代谢 称取胰蛋白胨 1.50 g,大豆蛋白胨 0.50 g,氯化钠 0.50 g,加水使溶解并定容至 100 mL,调节 pH 7.2 ± 0.2,经 121 °C 高压蒸气灭菌 20 min,冷却,得 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TSB)培养基。精密称取柚皮苷 46.0 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,加水稀释至刻度,得 0.92 g·L⁻¹ 柚皮苷溶液。取健康志愿者(饮食健康、无消化道疾病,试验前 3 个月内未服用抗生素)的新鲜粪便适量与生理盐水按 1:4 的比例混合,制成混悬液,加入玻璃珠振荡 5 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液,得人肠道菌群液^[11]。取人肠道菌群液 4 mL,置 20 mL 离心管中,加入 TBS 培养基 4 mL 和柚皮苷溶液 2 mL,混匀,在液面上部加入液体石蜡适量(密封,保持厌氧环境),置 37 °C 水浴培养,分别于 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 min 取样 200 μL,加

甲醇 300 μL 终止反应, 涡旋混合 5 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 采用外标法计算柚皮苷质量浓度分别为 194.69, 131.26, 100.01, 51.04, 32.52, 14.65, 6.60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

柚皮苷与离体人肠道菌群共同孵育 15 min 后, 柚皮苷质量浓度开始下降, 同时在 23 min 位置上出现了新色谱峰(代谢产物 M); 120 min 样品中 M 质量浓度达最大值, 随后质量浓度降低, 提示 M 在该体系中可能被代谢成其他物质, 见图 3。



A. 15 min 样品; B. 30 min 样品; C. 90 min 样品; D. 120 min 样品; E. 150 min 样品; F. TBS 基质; 1. 柚皮苷; M. 代谢产物

图 3 不同培养时间含柚皮苷人肠道菌群培养液的 HPLC
Fig. 3 HPLC chromatograms of human intestinal bacteria culture medium containing naringin at various time

以柚皮苷质量浓度 (C)-时间 (t) 分别按零级方程、一级方程及非线性动力学方程进行拟合, 利用相关系数 (r) 判断拟合程度, 得回归方程分别为 $C = -2.086t + 168.675$ ($r = 0.9630$), $\log C = -0.017t + 2.403$ ($r = 0.9865$), $-dC/dt = 5.717C/(100.439 + C)$ ($r = 0.9906$)。结果显示 Michaelis-Menten 方程的 r 最大, 表明柚皮苷在体外人肠道菌群代谢过程更符合非线性动力学过程, 最大反应速度 $5.717 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 米氏常数 $100.439 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

柚皮苷在肠道的代谢过程具有 3 个特点: 代谢速度快, 代谢过程更符合非线性动力学过程; 能产生多种代谢产物, 柚皮素(苷元)只是检测鉴定到的其中 1 种代谢产物; 代谢产物柚皮素能进一步被肠道菌群代谢。张蔚等^[9]分离并鉴定了肠道细菌, 尤其是能产生糖苷水解酶的一类细菌。柚皮素(苷元)与柚皮苷比较, 具有脂溶性大、相对分子质量小的特点, 按现代生物药剂学的理论, 柚皮素经胃肠道的吸收速度较柚皮苷快。说明经胃肠道给予柚皮苷后, 以代谢产物的形式吸收是其中一种吸收机制。

通过比对 HPLC 图谱, 发现谢产物 M(柚皮素)在 120~150 min 强度明显减弱, 但色谱图中未见其他明显新增的色谱峰。推测原因可能为柚皮素的代谢产物浓度很低; 柚皮素的代谢产物无紫外吸收, 考虑紫外检测器的局限性, 建议应用 ELSD, DAD 或 HPLC-MS 考察柚皮素代谢产物变化情况。曾考察健康志愿者多剂量服用甲硝唑, 于末次给药后, 取新鲜粪便, 按本文方法与柚皮苷厌氧培养 2 h 后, 柚皮苷仅减少 22%, 可见抗生素会显著影响肠道厌氧菌活性, 从而降低对柚皮苷的水解程度。提示抗生素与苷类药物的联合使用可能会影响苷类药物的生物利用度, 在药物研发或临床用药中需予以重视。

[参考文献]

- [1] 刘学仁. 柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的提取与分析研究[D]. 黄石: 湖北师范学院, 2011.
- [2] 谢仁峰, 文双娥, 李洋, 等. 柚皮苷抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2011, 8(4): 5-8, 12.
- [3] Kanno S, Shouji A, Tomizawa A, et al. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages [J]. Life Sci, 2006, 78(7): 673-681.
- [4] Jeon S M, Bok S H, Jang M K, et al. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits [J]. Clin Chim Acta, 2002, 317(1/2): 181-190.
- [5] 周燕文, 时雪峰. 柚皮苷对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的降糖与抗氧化作用[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 293-295.
- [6] 吴铿, 游琼, 黄瑞娜, 等. 柚皮苷对实验性 2 型糖尿病心肌病大鼠模型糖脂代谢的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1863-1866.
- [7] Chen X, Zhong D, Jiang H, et al. Characterization of some glucuronide conjugates by electrospray ion trap mass spectrometry [J]. 药学学报, 1998, 33(11): 849-854.
- [8] Day A J, Kroon P A, Díaz J C, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase [J]. FEBS Lett, 2000, 468(2/3): 166-170.
- [9] 张蔚, 江曙, 钱大玮, 等. 肠道细菌对柚皮苷的代谢研究[J]. 药学学报, 2013, 48(12): 1817-1822.
- [10] 孙国玲, 钱大玮, 段金殿, 等. 大鼠灌胃毛橘红醇提物血浆中柚皮苷、柚皮素及其代谢产物液质分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1580-1585.
- [11] 高志敏. 白花蛇舌草总黄酮苷和苷元的制备及肠道菌群代谢研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2010.

[责任编辑 刘德文]