

# 大鼠肠道菌群对葶草花有效组分代谢转化的影响

杨淑婷, 陈思颖, 孙慧园, 陈浩, 黄勇, 李月婷, 李勇军, 郑林, 王永林\*

(贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 药学院, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的:考察葶草花有效组分在大鼠肠道菌群中的代谢特征。方法:采用超高效液相色谱串联电喷雾四级杆飞行时间质谱联用技术(UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)检测葶草花有效组分在大鼠体外肠道菌群中的孵育样品,流动相 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液梯度洗脱,流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式扫描,使用 Metabolite Tools™ 和质量亏损过滤(MDF)等代谢产物分析技术,并结合化合物精确相对分子质量、碎片离子信息及文献数据,分析葶草花有效组分在大鼠体外肠道菌群中的代谢产物,推测其可能的生物转化途径。结果:葶草花有效组分经分离体大鼠肠道菌群孵育后共检出 18 个代谢产物色谱峰,其生物转化途径主要是以还原、氧化、水解为主的 I 相反应,甲基化为主的 II 相反应。结论:葶草花有效组分能够在大鼠肠道菌群作用下转化为多种代谢产物,提示葶草花用药时,应考虑代谢产物是否为其生物活性成分。

**[关键词]** 葶草花;有效组分;质量亏损过滤;肠道菌群;代谢途径;甲基化;体外孵育

**[中图分类号]** R22;R969.1;O657;R378.2;R28;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0142-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190447

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.1335.025.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-02 10:20

## Effect of Intestinal Flora in Rats on Metabolism and Transformation of Effective Components in *Polygonum orientale* Inflorescences

YANG Shu-ting, CHEN Si-ying, SUN Hui-yuan, CHEN Hao, HUANG Yong, LI Yue-ting,  
LI Yong-jun, ZHENG Lin, WANG Yong-lin\*

(Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the metabolic characteristics of effective components from *Polygonum orientale* inflorescences in intestinal flora of rats. **Method:** The incubating samples of effective components from *P. orientale* inflorescences in rat intestinal flora *in vitro* were detected by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS, the mobile phase was consisted of 0.1% formic acid solution-0.1% formic acid acetonitrile solution and eluted in gradient mode at a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The mass spectral analysis was detected with electrospray ionization under positive ion mode and negative ion mode. The metabolites and possible biotransformation pathways of effective components form *P. orientale* inflorescences in rat intestinal flora *in vitro* was analyzed by Metabolite Tools™, mass defect filtration (MDF) and other metabolite analysis techniques and combined with the accurate relative molecular weight

**[收稿日期]** 20180915(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360664,81560630,81660712);贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2017]5601,黔科合平台人才[2016]5613,黔科合平台人才[2016]5677);贵阳市科研创新团队项目(筑科合同[2017]30-29号)

**[第一作者]** 杨淑婷,在读硕士,从事中药活性成分研究,Tel:0851-86908468,E-mail:1747337668@qq.com

**[通信作者]** \*王永林,博士生导师,教授,从事中药药效物质基础及质量控制研究,Tel:0851-86908468,E-mail:gywyl@gmc.edu.cn

of the compounds, the fragment ion information and the literature data. **Result:** Eighteen metabolites were detected after incubation of effective components from *P. orientale* inflorescences in rat intestinal flora. The main biotransformation pathways were reduction, oxidation, hydrolysis in I phase reaction and methylation in II phase reaction. **Conclusion:** The effective components of *P. orientale* inflorescences can be transformed into a variety of metabolites under the action of intestinal flora in rats. It is suggested that whether the metabolites are bioactive components should be considered when *P. orientale* inflorescences is used as medicine.

**[Key words]** *Polygonum orientale* inflorescences; effective components; mass defect filtration; intestinal flora; metabolic pathways; methylation; *in vitro* incubation

荭草花又名水荭花、何草花、狗尾巴花,收载于 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》,具有行气活血、止痛、消积的功效,是贵州省民间及少数民族常用药物,常用于治疗心胃气痛、胸痛、头痛、腹中痞积等<sup>[1-2]</sup>。在化学成分研究方面,从荭草花活性部位中分离并鉴定了大量单体化合物,如 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺、没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、槲皮素-3-*O*-(2"-*O*- $\alpha$ -*L*-鼠李糖基)- $\beta$ -*D*-葡萄糖醛酸苷、山柰酚-3-*O*-(2"-*O*- $\alpha$ -*L*-鼠李糖基)- $\beta$ -*D*-葡萄糖醛酸苷、槲皮苷、山柰素-3-*O*- $\alpha$ -*L*-鼠李糖苷以及 *N-p*-香豆酰酪胺等<sup>[3-4]</sup>。在药理学研究方面,荭草花经水提醇沉后的正丁醇萃取部位在心血管方面具有较好的药理活性,如抗心肌缺血、减少心肌梗死面积以及体外抗肿瘤活性等<sup>[5-7]</sup>。但在荭草花的药动学研究中,只在血中检测到了少量的原型成分<sup>[8-9]</sup>。推测原因可能是荭草花在生物体内转化为代谢产物,进而导致原型成分含量较低,这提示代谢产物也可能是其活性成分。故开展荭草花的代谢研究,分析可能产生的代谢产物,对其药效物质基础的阐明和进一步开发利用具有重要意义。

肠道细菌可以产生氧化还原酶、水解酶、转移酶和裂解酶等多种代谢酶,广泛影响着许多中药有效成分的代谢转化与机体的吸收利用<sup>[10-11]</sup>。因此,本实验采用离体大鼠肠道菌群研究荭草花有效组分的代谢情况,将荭草花水提醇沉后经正丁醇萃取的有效组分与大鼠肠道菌群在体外共同孵育,考察体外孵育的大鼠肠道菌群对荭草花有效组分的体外代谢转化作用,并运用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 对生物样品进行检测分析,同时结合 Metabolite Tools™ 分析平台,分析荭草花有效组分在大鼠肠道菌群中的代谢产物,从而阐明荭草花有效组分可能的代谢途径,明确荭草花的体外代谢规律。

## 1 材料

1290 Infinity 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),microTOF-Q II 型电喷雾-四极杆-飞行时间质

谱仪(德国 Bruker 公司),Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司),MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司),DH6000B II 型电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司),YXQ-LS-18SI 型手提式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司),WP-UP-II-20 型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司),EL204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

蛋白胨(上海博微生物科技有限公司,批号 130941),营养琼脂培养基(杭州微生物试剂有限公司,批号 20150304-01),牛肉膏(北京奥博星生物技术有限公司,批号 20150428),*L*-半胱氨酸(上海蓝季科技发展有限公司,批号 150125),*L*-抗坏血酸(北京索莱宝科技有限公司,批号 402C036),水为纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。荭草花药材(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荭草 *Polygonum orientale* 的花序),荭草花有效组分(自制,批号 20150915),槲皮素、山柰酚、槲皮苷、原儿茶酸对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为 151222,150328,150702,150710,纯度均  $\geq 98\%$ ),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,批号 M32-110518,纯度  $\geq 98\%$ );山柰素-3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、山柰素-3-*O*- $\alpha$ -*L*-鼠李糖苷、儿茶素 3 种对照品均从荭草花中分离制备所得,采用 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS, UV, IR 波谱进行结构鉴定,上述对照品分别用 UPLC-光电二极管矩阵(PDA)在多个检测波长下测定,其峰面积归一化法计算纯度均  $> 98.0\%$ 。

健康 SD 大鼠,雌雄各半,体质量 240 ~ 260 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,合格证号 SCXK(湘)2014-0011。经贵州医科大学动物实验伦理

委员会批准(批准号1503016),动物饲养于动物房中,温度保持20~24℃,相对湿度保持50%~60%,饲养1周以适应环境。

## 2 方法与结果

**2.1 荳草花有效组分的制备** 取荳草花药材1 kg,加10倍量水煎煮3次,每次1 h,用纱布过滤,合并滤液,水浴浓缩至生药质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。加入乙醇使溶液含醇量达65%,混匀,静置12 h,抽滤,水浴浓缩至生药质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。加0.5倍量水饱和正丁醇萃取4次,合并正丁醇液,减压回收正丁醇,残留物加80%乙醇使溶解,上聚酰胺柱,用80%乙醇洗脱,收集洗脱液减压回收乙醇,水浴挥干,即得荳草花有效组分。

**2.2 色谱条件** Agilent RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~4 min,5%~45% B;4~10 min,45%~95% B;10~15 min,95%~100% B;15~20 min,100%~95% B;20~21 min,95%~0% B;21~22 min,0%~10% B),柱温45℃,流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量1 μL。

**2.3 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),扫描方式为正、负离子扫描(ESI<sup>+</sup>,ESI<sup>-</sup>, $m/z$  50~1 000),毛细管电压4 kV(ESI<sup>+</sup>)和3.5 kV(ESI<sup>-</sup>),锥孔电压80 V,离子源温度200℃,雾化气[氮气(N<sub>2</sub>)]压力0.12 MPa,去溶剂气(N<sub>2</sub>)流速6.0 L·min<sup>-1</sup>,雾化气(N<sub>2</sub>)体积流量50 L·h<sup>-1</sup>,干燥气温度200℃,脱溶剂气体积流量550 L·h<sup>-1</sup>,脱溶剂气温度300℃。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DataAnalysis软件,Metabolite Tools™(包括Metabolite Predict及Metabolite Detect)软件和质量亏损过滤(MDF)。

**2.4 厌氧培养液的配制**<sup>[12]</sup> 取溶液A(0.78%磷酸氢二钾)37.5 mL,溶液B(1.18%氯化钠,0.47%磷酸氢二钾,1.2%硫酸铵,0.25%水合氯化镁,0.12%氯化钙)37.5 mL和溶液C(8%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)50 mL。L-半胱氨酸·H<sub>2</sub>O 0.5 g,25%L-抗坏血酸2 mL,蛋白胨1 g,牛肉膏1 g,营养琼脂1 g,加水至1 L,用36.0%~38.0%盐酸调pH 7.5~8.0,即得。

**2.5 供试品溶液的制备** 称取荳草花有效组分0.12 g,加入50%甲醇6 mL,超声至全部溶解,备用。

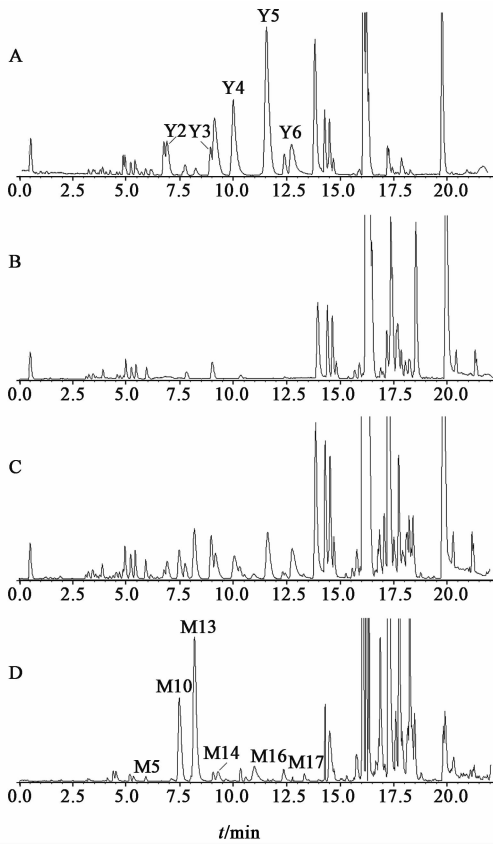
**2.6 大鼠离体培养肠道菌群对荳草花有效组分的代谢**<sup>[13-14]</sup> 选取健康SD大鼠10只,雌雄各半,断颈处死,收集大鼠肠道内新鲜粪便,混合粪便。粪便

与生理盐水按 $0.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合成悬浊液,于 $6\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,上清液即为大鼠肠道菌液。将大鼠肠道菌液0.5 mL加至6 mL的厌氧培养液中(已灭菌),于37℃厌氧条件下培养24 h,即得1份肠菌孵育液。实验分为3组,分别为药物组、不含肠菌组、空白组。药物组设置8个时间点(2,4,6,8,10,24,36,48 h),每个时间点3份肠菌孵育液,共24份,每份肠菌孵育液加入荳草花有效组分溶液60 μL,混合均匀;不含肠菌组与药物组设置相同的时间点,每个时间点3份样品,取厌氧培养液(不含肠菌)156 mL,平均分为24份,每份加入荳草花有效组分溶液60 μL,混合均匀;空白组与药物组设置相同的时间点,每个时间点3份样品,取24份肠菌孵育液,不加荳草花有效组分溶液;将上述72份样品于37℃厌氧条件下培养对应的时间。所得样品放入-20℃保存至分析。所用器具均经高压蒸汽121℃灭菌20 min。

**2.7 样品处理方案** 将2.6项下的肠菌样品分别转入50 mL离心管中,每管加入乙酸乙酯6.5 mL进行萃取,涡旋混合5 min,萃取3次,合并3次乙酸乙酯层萃取液,37℃下N<sub>2</sub>吹干。残渣用50%甲醇200 μL复溶,于 $15\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液进行UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS分析。

**2.8 代谢分析** 利用UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS对大鼠肠道菌群孵育样品进行检测,获得不含肠菌组孵育样品、空白组孵育样品、药物组孵育样品色谱图,运用Metabolite Detect软件将药物组和空白组孵育样品色谱图进行处理后得差异图谱,见图1,2。结果发现荳草花有效组分在ESI<sup>+</sup>和ESI<sup>-</sup>模式下均有响应,但在负离子模式下各成分的响应较好。结合已知对照品及文献[3,15-16]确定不含肠菌组孵育样品中的原型成分,运用Metabolite Predict和Metabolite Detect对样品中的代谢产物进行预测分析,利用MDF技术进一步有效提取代谢产物信息,排除基质背景干扰,并应用DataAnalysis软件中Smart Formula功能推测代谢产物的化学式<sup>[17]</sup>。

**2.8.1 荳草花有效组分在不含肠菌组孵育样品中的原型成分分析** 组分Y1:保留时间( $t_R$ )=5.7 min,负离子模式下出现准分子离子[M-H]<sup>-</sup> $m/z$  607.1325(C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>O<sub>16</sub>)。主要碎片离子为[M-H-C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>]<sup>-</sup> $m/z$  285.04(C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>)。由离子碎片信息可知,组分Y1通过丢失322 Da(C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>)形成碎片离子[M-H-C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>]<sup>-</sup> $m/z$  285。结合文献[15],推测组分Y1为山柰酚-3-O-(2''-O-α-L-鼠

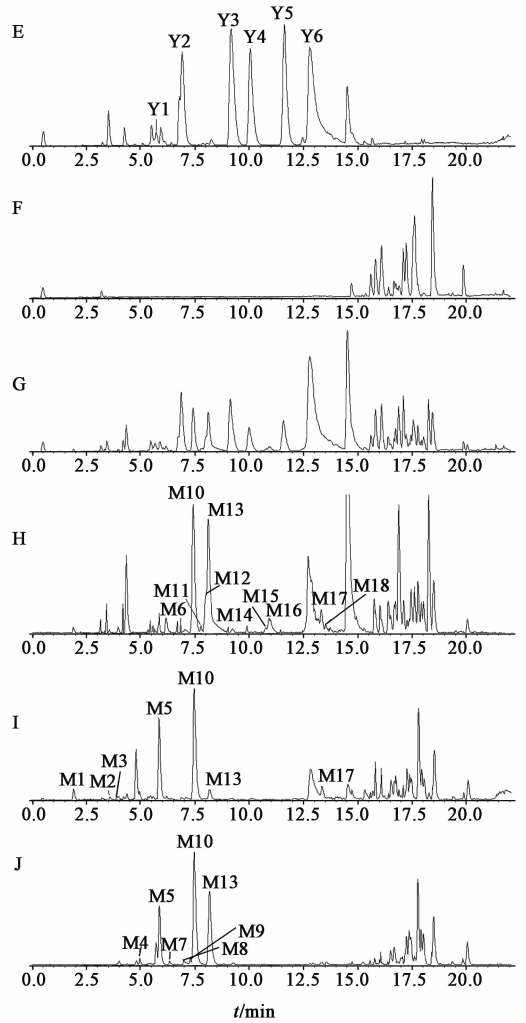


A. 不含肠菌组孵育样品; B. 空白组孵育样品; C. 药物组孵育样品;  
D. 2 h 药物组孵育样品与不含肠菌组孵育样品、空白组孵育样品的差异图谱

图 1 荜草花有效组分在大鼠肠道菌群中代谢产物的 ESI<sup>+</sup> 总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatograms of metabolites of effective components from *Polygonum orientale* inflorescences in rat intestinal flora under positive mode

李糖基)- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷。组分 Y2:  $t_R = 6.9$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+$   $m/z$  449. 103 9 ( $C_{21}H_{21}O_{11}$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^-$   $m/z$  447. 093 5 ( $C_{21}H_{19}O_{11}$ ), 与槲皮苷对照品一致, 推测组分 Y2 为槲皮苷。组分 Y3:  $t_R = 9.1$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+$   $m/z$  433. 115 1 ( $C_{21}H_{21}O_{10}$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^-$   $m/z$  431. 099 6 ( $C_{21}H_{19}O_{10}$ ), 与山柰素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷对照品一致, 故推测组分 Y3 为山柰素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷。组分 Y4:  $t_R = 10.2$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+$   $m/z$  284. 127 9 ( $C_{17}H_{18}NO_3$ ), 碎片离子  $[M + H]^+$   $m/z$  147. 044 1 ( $C_9H_7O_2$ ); 由碎片离子信息可知, 组分 Y4 通过丢失 137 Da ( $C_8H_{11}NO$ ) 形成碎片离子  $[M + H - C_8H_{11}NO]^+$   $m/z$  147。负离子模式下出现



E. 不含肠菌组孵育样品; F. 空白组孵育样品; G. 药物组孵育样品;  
H, I, J. 2, 24, 36 h 药物组孵育样品与不含肠菌组孵育样品、空白组孵育样品的差异图谱

图 2 荜草花有效组分在大鼠肠道菌群中代谢产物的 ESI<sup>-</sup> 总离子流

Fig. 2 Total ion current chromatograms of metabolites of effective components from *Polygonum orientale* inflorescences in rat intestinal flora under negative mode

准分子离子  $[M - H]^-$   $m/z$  282. 114 2 ( $C_{17}H_{16}NO_3$ )。参照文献[3]并结合质谱数据, 推测组分 Y4 为 *N-p*-香豆酰酪胺。组分 Y5:  $t_R = 11.8$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+$   $m/z$  314. 138 6 ( $C_{18}H_{20}NO_4$ ), 碎片离子  $[M + H - C_8H_{11}NO]^+$   $m/z$  177. 054 7 ( $C_{10}H_9O_3$ ); 可见准分子离子  $[M + H]^+$   $m/z$  314 丢失 137 Da ( $C_8H_{11}NO$ ) 形成碎片离子  $[M + H - C_8H_{11}NO]^+$   $m/z$  177。负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^-$   $m/z$  312. 124 9 ( $C_{18}H_{18}NO_4$ )。参照文献[3]并结合质谱数据, 推测组分 Y5 为 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺。组分 Y6:  $t_R = 12.9$  min, 正离子

模式下出现准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  303.049 3 ( $C_{15}H_{11}O_7$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  301.036 7 ( $C_{15}H_9O_7$ ), 与槲皮素对照品相同, 故推测组分 Y6 为槲皮素。

**2.8.2 代谢产物的鉴定与分析** 组分 M1:  $t_R = 1.9$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  125.025 0 ( $C_6H_5O_3$ ), 较没食子酸减少 44 Da (COO), 结合文献[16], 推测组分 M1 为没食子酸脱羧基代谢产物。组分 M2:  $t_R = 3.6$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  183.029 8 ( $C_8H_7O_5$ ), 较没食子酸增加 14 Da ( $CH_2$ ), 结合文献[16], 推测组分 M2 为没食子酸甲基化代谢产物。组分 M3:  $t_R = 3.9$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  151.039 8 ( $C_8H_7O_3$ ), 较槲皮素减少 150 Da ( $C_7H_2O_3 - O$ ), 故推测组分 M3 为槲皮素 O - C2 键开环裂解、脱氧化代谢产物。组分 M4:  $t_R = 5.0$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  316.118 8 ( $C_{17}H_{18}NO_5$ ), 较组分 M10 增加 32 Da ( $-2H + 2OH$ ), 故推测组分 M4 为 *N-p*-香豆酰酪胺的氢化、二羟基化代谢产物。组分 M5:  $t_R = 5.8$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  302.139 0 ( $C_{17}H_{20}NO_4$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  300.123 8 ( $C_{17}H_{18}NO_4$ ), 碎片离子  $[M - H]^- m/z$  178.086 6 ( $C_{10}H_{12}NO_2$ )。由碎片离子信息可知, 准分子离子  $[M - H]^- m/z$  300 丢失 122 Da ( $C_7H_6O_2$ ) 形成碎片离子  $[M - H - C_7H_6O_2]^- m/z$  178, 与组分 M10 碎片离子一致。准分子离子  $[M - H]^- m/z$  300 较组分 M10 增加 16 Da ( $-H + OH$ ), 推测组分 M5 为 *N-p*-香豆酰酪胺的氢化、羟基化代谢产物。

组分 M6:  $t_R = 6.2$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  305.066 8 ( $C_{15}H_{13}O_7$ ), 较槲皮素增加 4 Da (4H), 故推测组分 M6 为槲皮素 C2 - C3 双键还原和 O - C2 键开环裂解代谢产物。组分 M7:  $t_R = 6.3$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  330.133 7 ( $C_{18}H_{20}NO_5$ ), 较组分 M13 增加 16 Da ( $-H + OH$ ), 推测组分 M7 为 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺的氢化、羟基化代谢产物。组分 M8 和 M9:  $t_R$  分别为 7.0, 7.3 min, 负离子模式下分别出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  358.129 3 ( $C_{19}H_{20}NO_6$ ) 和  $[M - H]^- m/z$  358.128 6 ( $C_{19}H_{20}NO_6$ ), 较 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺增加 46 Da ( $-2H + 2OH + CH_2$ ), 故推测组分 M8 和 M9 为 *N*-

反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺的甲基化、二羟基化代谢产物。组分 M10:  $t_R = 7.6$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  286.143 7 ( $C_{17}H_{20}NO_3$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  284.129 1 ( $C_{17}H_{18}NO_3$ ), 较组分 *N-p*-香豆酰酪胺增加 2 Da (2H), 故推测组分 M10 为 *N-p*-香豆酰酪胺的氢化代谢产物。组分 M11:  $t_R = 7.8$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  287.056 0 ( $C_{15}H_{11}O_6$ ), 较山柰酚增加 2 Da (2H), 故推测组分 M11 为山柰酚 C2-C3 双键还原代谢产物。

组分 M12:  $t_R = 8.0$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  317.029 7 ( $C_{15}H_9O_8$ ), 较槲皮素增加 16 Da ( $-H + OH$ ), 故推测组分 M12 为槲皮素羟基化代谢产物。组分 M13:  $t_R = 8.3$  min, 正离子模式下有准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  316.152 2 ( $C_{18}H_{22}NO_4$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  314.140 4 ( $C_{18}H_{20}NO_4$ ), 碎片离子  $[M - H - C_9H_{10}O]^- m/z$  180.066 3 ( $C_9H_{10}NO_3$ )。由碎片离子信息可知, 准分子离子  $[M - H]^- m/z$  314 丢失 134 Da ( $C_9H_{10}O$ ) 形成碎片离子  $[M - H - C_9H_{10}O]^- m/z$  180, 是 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺丢失 134 Da ( $C_8H_8O - CH_2$ ) 后氢化碎片离子。故推测组分 M13 为 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺的氢化代谢产物。组分 M14:  $t_R = 9.3$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  346.165 1 ( $C_{19}H_{24}NO_5$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  344.150 8 ( $C_{19}H_{22}NO_5$ ), 较组分 M7 增加 14 Da ( $CH_2$ ), 故推测组分 M14 为 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺的氢化、甲基化、羟基化代谢产物。组分 M15:  $t_R = 10.7$  min, 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  255.066 4 ( $C_{15}H_{11}O_4$ ), 较组分 M16 增加 2 Da (2H), 故推测组分 M15 为山柰酚双脱氧后 C2-C3 键还原代谢产物。组分 M16:  $t_R = 11.0$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  255.065 0 ( $C_{15}H_{11}O_4$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  253.049 4 ( $C_{15}H_9O_4$ ), 较山柰酚减少 32 Da (2O), 故推测组分 M16 为山柰酚双脱氧代谢产物。组分 M17:  $t_R = 13.3$  min, 正离子模式下出现准分子离子  $[M + H]^+ m/z$  331.045 0 ( $C_{16}H_{11}O_8$ ); 负离子模式下出现准分子离子  $[M - H]^- m/z$  329.031 1 ( $C_{16}H_9O_8$ ), 较槲皮素增加 28 Da (CO), 故推测组分 M17 为槲皮素羰基化代谢产物。组分 M18:  $t_R = 13.5$  min, 负离子模式下出现

准分子离子  $[M - H]^-$   $m/z$  271.060 3 ( $C_{15}H_{11}O_5$ ), 较山柰酚减少 14 Da ( $-O + 2H$ ), 故推测组分 M18 为山柰酚脱氧、氢化代谢产物。

**2.8.3 代谢产物及其生物转化途径分析** 根据以上代谢产物鉴定结果, 归纳荳草花有效组分在大鼠肠道菌群中的代谢产物及其生物转化途径, 见表 1 与图 3。

表 1 荳草花有效组分在大鼠肠道菌群孵育液中的代谢产物鉴定

Table 1 Identification of metabolites of effective components from *Polygonum orientale* inflorescences in rat intestinal flora incubation fluid

| 代谢产物 | $t_R$<br>/min | 模式          | $m/z$     | 分子式                | 误差<br>/ppm | 代谢方式                               |
|------|---------------|-------------|-----------|--------------------|------------|------------------------------------|
| M1   | 1.9           | $[M - H]^-$ | 125.025 0 | $C_6H_5O_3$        | -4.8       | 没食子酸脱羧基                            |
| M2   | 3.6           | $[M - H]^-$ | 183.029 8 | $C_8H_7O_5$        | 0.3        | 没食子酸甲基化                            |
| M3   | 3.9           | $[M - H]^-$ | 151.039 8 | $C_8H_7O_3$        | 1.7        | 槲皮素 O—C2 键开环裂解、脱氧化                 |
| M4   | 5.0           | $[M - H]^-$ | 316.118 8 | $C_{17}H_{18}NO_5$ | -0.2       | <i>N-p</i> -香豆酰酰胺的氢化、二羟基化          |
| M5   | 5.8           | $[M + H]^+$ | 302.139 0 | $C_{17}H_{20}NO_4$ | -1.1       | <i>N-p</i> -香豆酰酰胺的氢化、羟基化           |
|      |               | $[M - H]^-$ | 300.123 8 | $C_{17}H_{18}NO_4$ | 1.2        |                                    |
| M6   | 6.2           | $[M - H]^-$ | 305.066 8 | $C_{15}H_{13}O_7$  | -0.2       | 槲皮素 C2—C3 双键还原和 O—C2 键开环裂解         |
| M7   | 6.3           | $[M - H]^-$ | 330.133 7 | $C_{18}H_{20}NO_5$ | 3.1        | <i>N</i> -反式-对羟基苯乙基阿魏酰酰胺的氢化、羟基化    |
| M8   | 7.0           | $[M - H]^-$ | 358.129 3 | $C_{19}H_{20}NO_6$ | 0.8        | <i>N</i> -反式-对羟基苯乙基阿魏酰酰胺的甲基化、二羟基化  |
| M9   | 7.3           | $[M - H]^-$ | 358.128 6 | $C_{19}H_{20}NO_6$ | 3.0        | <i>N</i> -反式-对羟基苯乙基阿魏酰酰胺的甲基化、二羟基化  |
| M10  | 7.6           | $[M + H]^+$ | 286.143 7 | $C_{17}H_{20}NO_3$ | 0.3        | <i>N-p</i> -香豆酰酰胺的氢化               |
|      |               | $[M - H]^-$ | 284.129 1 | $C_{17}H_{18}NO_3$ | 0.4        |                                    |
| M11  | 7.8           | $[M - H]^-$ | 287.056 0 | $C_{15}H_{11}O_6$  | 0.5        | 山柰酚 C2—C3 双键还原                     |
| M12  | 8.0           | $[M - H]^-$ | 317.029 7 | $C_{15}H_9O_8$     | 1.8        | 槲皮素羟基化                             |
| M13  | 8.3           | $[M + H]^+$ | 316.155 2 | $C_{18}H_{22}NO_4$ | -2.7       | <i>N</i> -反式-对羟基苯乙基阿魏酰酰胺氢化         |
|      |               | $[M - H]^-$ | 314.140 4 | $C_{18}H_{20}NO_4$ | -2.1       |                                    |
| M14  | 9.3           | $[M + H]^+$ | 346.165 1 | $C_{19}H_{24}NO_5$ | -0.7       | <i>N</i> -反式-对羟基苯乙基阿魏酰酰胺氢化、甲基化、羟基化 |
|      |               | $[M - H]^-$ | 344.150 8 | $C_{19}H_{22}NO_5$ | -1.4       |                                    |
| M15  | 10.7          | $[M - H]^-$ | 255.066 4 | $C_{15}H_{11}O_4$  | -0.4       | 山柰酚双脱氧后 C2—C3 键还原                  |
| M16  | 11.0          | $[M + H]^+$ | 255.065 0 | $C_{15}H_{11}O_4$  | 0.6        | 山柰酚双脱氧                             |
|      |               | $[M - H]^-$ | 253.049 4 | $C_{15}H_9O_4$     | 5          |                                    |
| M17  | 13.3          | $[M + H]^+$ | 331.045 0 | $C_{16}H_{11}O_8$  | -0.5       | 槲皮素羰基化                             |
|      |               | $[M - H]^-$ | 329.031 1 | $C_{16}H_9O_8$     | -2.3       |                                    |
| M18  | 13.5          | $[M - H]^-$ | 271.060 3 | $C_{15}H_{11}O_5$  | 3.2        | 山柰酚脱氧、氢化                           |

### 3 讨论

传统中药在我国预防和治疗疾病中已经有几千年历史, 其绝大多数给药途径以口服为主, 药物中的有效成分经口服进入肠道后不可避免地会与肠道菌群接触, 发生新陈代谢转换<sup>[18-19]</sup>。目前已经发现多种中药有效成分被肠道菌群代谢后会发生转化, 产生了具有较强药理活性的代谢产物<sup>[20]</sup>。有文献报道, 荳草花中含有酚酸、黄酮、生物碱等多种有效成分, 具有显著的抗心肌缺血作用<sup>[21]</sup>。本课题组前期对大鼠口服荳草花后入血成分进行研究, 结果在荳草花提取物中共标定了 17 个化学成分, 但在大鼠含药

血清中只鉴定出了 6 个原型成分, 其余原型成分在血清样品中均未发现, 这可能是这些成分在体内不能被直接吸收入血, 主要以代谢产物的形式在体内产生药效, 并且在含药血清中还发现了 9 个代谢峰, 这些可能是荳草花中的原型成分代谢转化而成<sup>[22]</sup>。在对荳草花中酚酸类、黄酮类代表性特征成分原儿茶酸和山柰素-鼠李糖苷的绝对生物利用度研究中发现, 这 2 个成分的生物利用度低, 分别为 2.5% 和 0.3%, 说明二者在体内有其他吸收代谢途径<sup>[23]</sup>。因此, 本文选择大鼠肠道菌群为体外代谢模型, 研究荳草花有效组分在体外肠道菌群中的代谢规律。

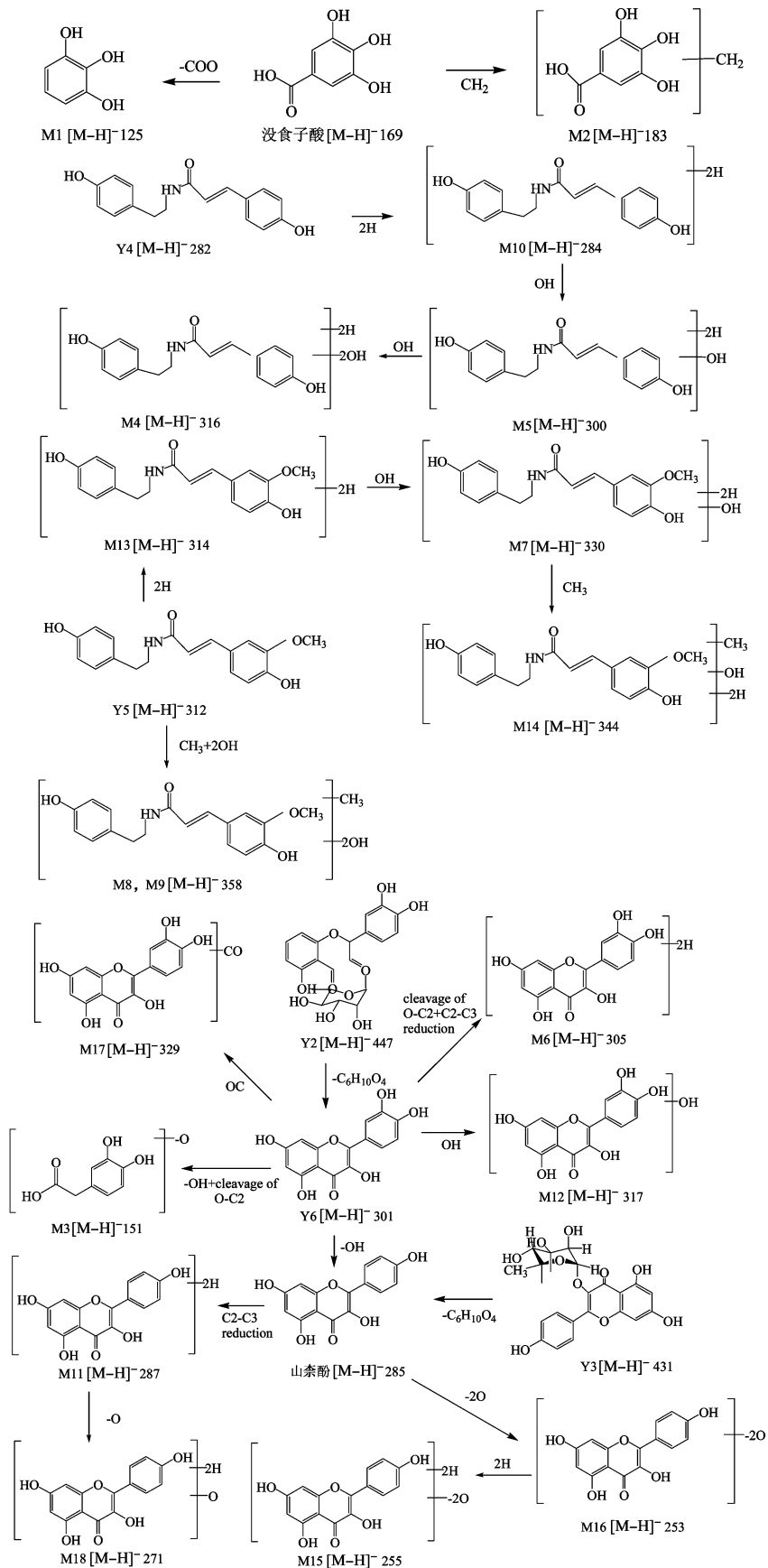


图 3 葎草花有效组分在大鼠肠道菌群中可能的生物转化途径

Fig. 3 Potential metabolic pathways of effective components from *Polygonum orientale* inflorescences in rat intestinal flora

本研究建立了 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 对大鼠肠道菌群孵育样品进行检测。该方法具有高重复性、高通量、高离子传输效率等优势,22 min 即可完成对复杂生物样品的检测,得到代谢产物色谱峰的 MS 和 MS<sup>2</sup> 质谱数据,并结合 Metabolite Predict, MetaboliteDetect, MDF 及 Smart Formula 等数据处理技术,分析生物样品中的代谢产物,揭示荳蔻花有效组分在离体大鼠肠道菌群中的代谢途径。荳蔻花有效组分在大鼠肠道菌群体外代谢实验中共检测到 18 个代谢产物,生物转化途径主要以还原(氢化等),氧化(羟基化等),水解(O-C2 键开环裂解等)为主的 I 相反应,甲基化为为主的 II 相反应。在大鼠肠道菌群孵育样品中,检测到大量的代谢产物而原型成分较少,表明荳蔻花有效组分中的原型成分在肠道菌群的作用下快速转化为相对分子质量更小的代谢产物。提示荳蔻花用药时,应考虑其代谢产物是否为主要活性成分及代谢产物的毒副作用。本研究初步明确了荳蔻花有效组分在离体大鼠肠道菌群中的代谢产物及生物转化规律,可为荳蔻花后续的药效物质基础研究提供前期基础。但本文不能全面反映荳蔻花有效组分的代谢特征,还需结合荳蔻花有效组分在生物体内(血液、胆汁、尿液、粪便)的代谢情况,全面分析荳蔻花在体内的代谢过程。

[参考文献]

[1] 向文英,梅朝叶,孙慧园,等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 分析荳蔻花提取物在 H9c2 心肌细胞中效应物质[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(12):90-95.

[2] 董莉,陈鹏程,唐丽,等. 离体外翻肠囊法研究荳蔻花提取物中 9 个成分的肠吸收特征[J]. 中国医药工业杂志,2014,45(9):858-862.

[3] 李勇军,何迅,刘志宝,等. 荳蔻花水溶性化学成分的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):14-15.

[4] 李勇军,何迅,刘志宝,等. 荳蔻花化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(20):2613-2615.

[5] 张宇瑶,张慧,佟苗苗,等. 响应面法优化荳蔻花提取工艺研究[J]. 中药材,2014,37(2):324-327.

[6] 黄勇,郑林,王爱民,等. 荳蔻不同药用部位抗心肌缺血作用及化学成分比较研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2520-2522.

[7] 佟苗苗,张宇瑶,初正云,等. 荳蔻花提取物体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国民族民间医药,2012,22(24):7-8.

[8] 郑林,杨武,向文英,等. UPLC-MS/MS 同时测定静脉注射荳蔻花提取物大鼠血浆中 3 种成分及其药代动

力学研究[J]. 中药材,2016,39(7):1574-1577.

[9] 黄勇,胡杰,陆苑,等. UPLC-MS 法测定大鼠血浆中荳蔻花的 3 个指标成分及其药动学研究[J]. 中国药理学通报,2015,31(9):1314-1318.

[10] 马祥雪,王凤云,符俊杰,等. 基于肠道菌群的中医健脾方剂作用机制的研究现状与思考[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):210-215.

[11] 林文振,李坤平,曾玉冰,等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷大鼠肠道菌群代谢产物的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):140-143.

[12] 覃小丽,孙慧园,杨武,等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析槲皮苷在大鼠肠道菌群中的代谢[J]. 中国中药杂志,2017,42(2):357-362.

[13] 刘亚丽,宋永贵,魏韶锋,等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 在大鼠肠道菌群中的代谢产物[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(23):72-76.

[14] 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.

[15] 李勇军,李翠兵,何迅,等. 荳蔻化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志,2011,36(4):458-461.

[16] 罗媛,杨武,孙慧园,等. 没食子酸和原儿茶酸在大鼠肠道菌群中的代谢研究[J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(1):43-47.

[17] 唐丽. 贵州苗药头花蓼有效组分的体内外代谢研究 [D]. 贵阳:贵阳医学院,2015.

[18] 肖娟,王莹,王新宏,等. 中药化学成分肠道菌群代谢的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):247-251.

[19] 门薇,陈颖,李玉洁,等. 肠道菌群对中药有效成分的生物转化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):229-234.

[20] 邓颖,郭志刚,曾兆麟,等. 藏红花的药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2002,34(8):8-11.

[21] 刘亭,吴琼,刘香香,等. 荳蔻花提取物对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. 中药材,2018,41(1):184-188.

[22] 郑林,陈慧,王爱民,等. 超高效液相色谱测定大鼠口服荳蔻花后入血成分[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(2):91-93.

[23] 谢玉敏,梅朝叶,陈浩,等. 水荳蔻提取物的药动学特性及绝对生物利用度研究[J]. 中国抗生素杂志,2017,42(7):611-615.

[责任编辑 刘德文]