

大鼠肠内菌对毛冬青皂苷 ilex saponin A₁ 的代谢转化

赵钟祥, 李美芬, 林朝展, 熊天琴, 祝晨蓀*

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

摘要 采用 HPLC 法研究大鼠肠内菌对毛冬青皂苷 ilex saponin A₁ 的代谢作用。研究采用 Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm) 为色谱柱, 流动相为乙腈-0.02% 三氟乙酸梯度洗脱, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C。将 ilex saponin A₁ 加大鼠肠内菌培养液中, 温孵一定时间后, 分析体外代谢产物和代谢模式; 大鼠灌胃给予 ilex saponin A₁, 分析尿液和粪便中的代谢产物, 同时测定粪便样品中原型物和代谢产物的含量。结果表明, 离体培养大鼠肠内菌可代谢 ilex saponin A₁, 其主要代谢产物为其苷元 ilexgenin A, 培养 48 h 后, 约 93.12% 的 ilex saponin A₁ 被转化成 ilexgenin A; 大鼠在体实验中, 尿液未检测到原型物及代谢物, 在粪便中可检测到原型物和代谢物苷元 ilexgenin A; ilex saponin A₁ 经口给予后经原物和代谢产物 ilexgenin A 排除体外的量高达 89.85%。研究结果表明: ilex saponin A₁ 经口给予后大部分经肠内菌群代谢后被排出体外, 主要代谢产物为其苷元。

关键词 毛冬青; 肠内菌群; 代谢; 生物转化

中图分类号 R284; R969.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)04-0329-04

Metabolic transformation of ilex saponin A₁ by intestinal flora

ZHAO Zhong-xiang, LI Mei-fen, LIN Chao-zhan, XIONG Tian-qin, ZHU Chen-chen*

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract A high-performance liquid chromatography method was used to investigate the metabolic transformation characteristics of ilex saponin A₁ by rat intestinal flora *in vitro* and *in vivo*. The HPLC separation was performed on a reversed-phase Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm) at a temperature of 30 °C and the mobile phase system consists of acetonitrile and trifluoroacetic acid (0.02%) in water using a gradient elution with the flow rate of 1.0 mL/min. *In vitro* samples were prepared by incubating ilex saponin A₁ with intestinal flora of rats. *In vivo* samples including feces and urine samples were collected individually after oral administration of ilex saponin A₁ to healthy rats. Then the *in vivo* and *in vitro* metabolism of ilex saponin A₁ was investigated using the established HPLC method. The results showed that ilex saponin A₁ could be metabolized to its aglycone (ilexgenin A) by rat intestinal flora *in vitro*, and after incubating for 48 h, about 93.12% of ilex saponin A₁ was metabolized to ilexgenin A. *In vivo*, ilex saponin A₁ and its aglycone were found in feces, but not in urine. It was found that ilex saponin A₁ could be metabolized to its aglycone by intestinal flora *in vitro* and *in vivo*, and after oral administration about 89.85% of ilex saponin A₁ was excreted as its prototype and metabolites.

Key words *Ilex pubescens* Hook et Arn; intestinal flora; metabolism; biotransformation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30901954); the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 9451040701003203); the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20094425110008); and the Origination Fund of Guangzhou University of Chinese Medicine (No. 09CX015)

毛冬青为冬青属植物毛冬青 (*Ilex Pubescens* Hook et Arn) 的干燥根, 具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒等功效, 是我国南方常用的中药材, 在临床上广泛用于治疗冠心病、心绞痛和脉管炎、高血

* 收稿日期 2011-01-10 * 通讯作者 Tel: 020-39358047 E-mail: zhuchenchen@vip.sina.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 30901954); 广东省自然科学基金资助项目 (No. 9451040701003203); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20094425110008); 广州中医药大学创新基金资助项目 (No. 09CX015)

压等疾病^[1-2]。毛冬青中主要含有三萜及其苷类,此外还含有酚性成分、木脂素类及环烯醚萜类成分,其中三萜皂苷类成分为其主要成分和特征成分^[3-5]。现代药理学研究表明,毛冬青提取物及单体具有确切的抗血栓及抗血小板聚集活性^[6]。有关皂苷成分的代谢转化研究也已证实人参皂苷^[7-8]、黄山药总皂苷^[9]等多种皂苷口服后通过肠内菌群代谢发挥药效。三萜类皂苷作为毛冬青的主要特征成分,在体内代谢转化的特点和规律目前尚未见报道。本课题组对毛冬青中的主要三萜皂苷类成分 ilexaponin A₁ 肠道菌群代谢特点进行了研究。采用离体和在体实验相结合的方法,考察肠内菌群对 ilexaponin A₁ 的代谢转化作用,探讨 ilexaponin A₁ 在胃肠道内代谢的一般规律,以期为毛冬青三萜皂苷类成分的体内代谢转化研究提供研究资料。

1 材料

1.1 药品与试剂

Ilexaponin A₁ 为广州中医药大学中药学院药物分析实验室于毛冬青药材中分离纯化所得,经面积归一化法检测,其纯度高于98%;卡马西平对照品(中国药品生物制品检定所,批号:01429503);厌氧培养液^[10]:A液37.5 mL(0.78% K₂HPO₄),37.5 mL B液(0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄·H₂O),50 mL C液(8% Na₂CO₃),0.5 g L-半胱氨酸,2 mL 25%的L-抗坏血酸,牛肉膏1 g,蛋白胨1 g,营养琼脂1 g,加蒸馏水,用盐酸调节溶液的pH为7.5-8.0;厌氧培养袋及厌氧产气剂(上海华蓝化学科技有限公司);乙腈(色谱纯,德国Merck公司);其余化学试剂为分析纯。

1.2 仪器

RE-2000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);LRH-150-S 恒温恒湿培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司);LC2000 液相色谱仪(包括LC2130 高压液相色谱输液泵、LC2200 自动进样器、LC2030 紫外检测器及 T2000P 色谱工作站,上海天美科学仪器有限公司)。

1.3 动物

SD 雄性大鼠,体重200~220 g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号为SCXK(粤)

2008-0020。

2 方法

2.1 离体培养大鼠肠内菌对 ilexaponin A₁ 的代谢作用

取新鲜大鼠粪便,将粪便与生理盐水按质量体积比1:4制成混悬液,离心后取上层,按1:9比例加入厌氧培养液,混匀后得肠菌培养液。取此新鲜配制的肠菌培养液置于培养皿中,各加入 ilexaponin A₁ 1 mg,混匀后于37℃厌氧条件下温孵0,4,8,12,24,48 h后取出培养皿,分别用等体积的水饱和正丁醇萃取3次,合并萃取液,加入卡马西平内标液,蒸干,残渣用甲醇定容至1 mL。

2.2 大鼠整体肠内菌对 ilexaponin A₁ 的代谢作用

取大鼠6只至代谢笼中,饲养5 d,待其充分适应本实验室环境后,收集2 d空白粪便和空白尿液备用。给药前禁食12 h,自由饮水,连续灌胃给药,给药剂量为175 mg/kg,每天2次,给药7 d,总共给予 ilexaponin A₁ 2.760 3 g。每天收集给药后尿液和粪便。尿液经过滤后用水饱和正丁醇萃取3次,合并萃取液,蒸干,残渣用甲醇溶解得样品(ilexaponin A₁ urine, IPU),同法处理得空白样品(ilexaponin A₁ blank urine, IPBU)。粪使用甲醇回流提取2次,每次0.5 h,合并提取液,蒸干后残渣用水混悬,用饱和正丁醇萃取3次,合并萃取液,残渣用甲醇溶解得代谢产物提取物(ilexaponin A₁ feces, IPF),同法处理得空白样品(ilexaponin A₁ blank feces, IPBF)。

2.3 HPLC 条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm);流动相:乙腈-0.02%三氟乙酸梯度洗脱,0~10 min,乙腈量36%~43%,10~13 min,乙腈量43%~80%,13~15 min,乙腈量80%~85%,15~20 min,乙腈量85%;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:210 nm;柱温:30℃。

2.4 在体肠内菌的样品预处理

将所收集的IPU、IPBU、IPF、IPBF分别用甲醇溶解,取1 mL过C₁₈小柱,用水5 mL洗脱,弃去洗脱液,继续用甲醇15 mL洗脱,收集甲醇洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解,并转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.22 μL微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

3 结果

3.1 离体培养肠内菌对 ilexsaponin A₁ 的代谢

采用 HPLC 和 TLC 法分别对不同培养时间的培养液进行分析,检测到原型物 ilexsaponin A₁ 和一个代谢物,该代谢物经与对照品对比分析,发现其保留时间及色谱行为与相同色谱条

件下其苷元 ilexgenin A 的相同,判断代谢产物为 ilexsaponin A₁ 的苷元 ilexgenin A,温孵培养前后的 HPLC 图谱见图 1。随着代谢时间的延长,原型物的量逐渐减少,代谢物的量逐渐增多,培养 48 h 后,约 93.12% 的 ilexsaponin A₁ 被转化为 ilexgenin A。图 2 为原型物和代谢物随时间的浓度变化曲线。

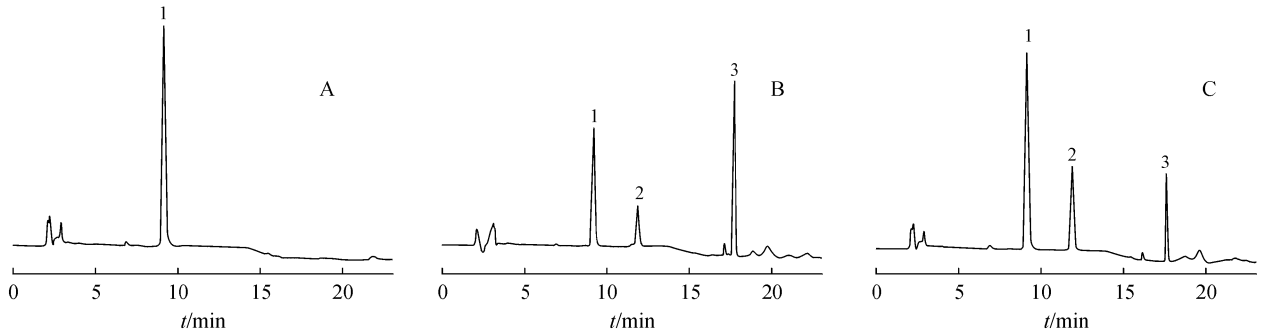
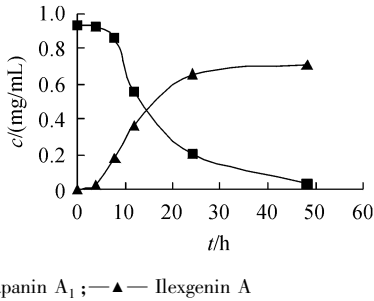


Figure 1 HPLC chromatograms of ilexsaponin A₁ and its metabolites *in vitro*
A: Blank feces with added carbamazepin; B: Blank feces with added carbamazepin, ilexsaponin A₁, and ilexgenin A; C: Sample after incubated of ilexsaponin A₁. Peak assignment: 1-Carbamazepin; 2-Ilexsaponin A₁; 3-Ilexgenin A



—■— Ilexsaponin A₁; —▲— Ilexgenin A
Figure 2 Microbial transformation of ilexsaponin A₁

3.2 在体肠内菌对 ilexsaponin A₁ 的代谢结果

3.2.1 HPLC 检测结果 经 HPLC 检测,在尿液中未检测到原型物 ilexsaponin A₁ 和代谢物,在粪便中可同时检测到原型物及代谢物。见图 3。

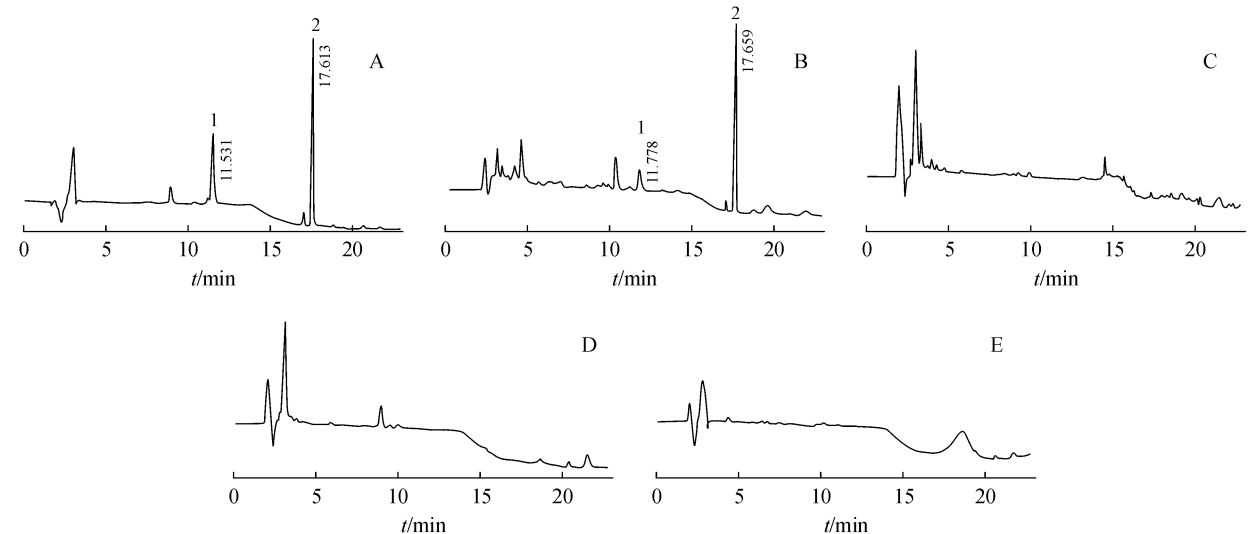


Figure 3 HPLC chromatograms of ilexsaponin A₁ and its metabolites *in vivo*
A: Ilexsaponin A₁ and ilexgenin A; B: Feces sample after administration of ilexsaponin A₁; C: Blank feces; D: Urine sample after administration of ilexsaponin A₁; E: Blank urine
Peak assignment: 1-Ilexsaponin A₁; 2-Ilexgenin A

3.2.2 粪便中代谢物的含量测定 将 IPF 用甲醇定容至 250 mL,按“2.4”项下操作,平行测定 3 次,记录峰面积,外标法计算 ilexosaponin A₁ 和 ilexgenin A 的平均含量分别为 1.72 和 6.20 mg/mL,二者在粪便中的量分别为 430 和 1 550 mg。经计算可知,大鼠经口给予 ilexosaponin A₁ 后,排除体外的量高达 89.85%,其中 15.58% 以原型物 ilexosaponin A₁,74.27% 以代谢产物 ilexgenin A 排除体外。

4 讨论

糖类化合物是肠道内细菌重要的碳源,因此,肠道内细菌的苷键水解酶系对具有苷键的药物进行水解是肠道内细菌代谢的一大特征^[11]。在代谢产物提取方法考察的过程中,考虑到 ilexosaponin A₁ 可能被代谢为极性较小的苷元,先用乙酸乙酯对其萃取 3 次,再用水饱和正丁醇萃取 3 次,通过 TLC 检测,发现在乙酸乙酯萃取部位和正丁醇萃取部位均有原型物和代谢物,改用只用正丁醇对其萃取 3 次,且在水相并未检测到二者的存在,说明水饱和正丁醇萃取比较完全,因此,最终选择正丁醇为萃取溶剂。

考虑到苷类化合物可被酸水解的特点,前期研究曾对大鼠经口给予 ilexosaponin A₁ 后的胃内容物进行了检测分析,结果仅检测到原型物,而未检测出苷元,表明 ilexosaponin A₁ 在胃液(酸性)条件下未被降解。本研究通过离体和在体实验证实,大鼠经口给予 ilexosaponin A₁ 后,主要在肠道中经肠道菌群代谢为苷元 ilexgenin A,但在离体实验中,代谢时间较长,可能是因为体外代谢与体内代谢有差别。

本研究曾尝试采用 HPLC 法对大鼠经口给予 ilexosaponin A₁ 后的入血代谢产物进行检测,结果未能在血浆样品中未检测到原型物及代谢物。药代动力学研究表明大鼠经口给予 ilexgenin A (100 mg/kg) 后,其血药浓度小于 350 ng/mL^[12],提示毛冬青中三萜类成分经口给予后的血药浓度相对较低。由于 HPLC 法对三萜类化合物的检测灵敏度有限,因此未能检出 ilexosaponin A₁ 经口给予后的入血成分,推测 ilexosaponin A₁ 经口给予后,可能只

有少量或微量被吸收入血,被吸收的总量低于 10.15%,大部分经肠道后被代谢,排出体外。文献报道毛冬青具有很多药理活性,究竟是单一成分被吸收入血发挥疗效还是成分群之间的相互作用发挥疗效还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 熊友香(Xiong YX),李 昶(Li C),罗宪堂(Luo XT). 毛冬青的化学成分、药理作用研究进展[J]. 中药材(*J Chin Med Mater*),2002,25(5):371-374.
- [2] 乔爱虹(Qiao WH). 毛冬青的药理作用及临床应用研究概况[J]. 中国现代药物应用(*Chin J Mod Drug Appl*),2008,2(5):104-106.
- [3] 杨 鑫(Yang X),丁 怡(Ding Y),张东明(Zhang DM). 毛冬青中环烯醚萜苷类化合物的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志(*Chin J Med Chem*),2007,17(3):173-177.
- [4] 杨 鑫(Yang X). 华山松松塔和毛冬青化学成分及生物活性的研究[D]. 扬州:江南大学,2005.
- [5] 尹文清(Yin WQ),周中流(Zhou ZL),傅春燕(Fu CY),等. 毛冬青根中酚性成分的研究[J]. 中成药(*Chin Tradit Patent Med*),2008,30(9):1400-1402.
- [6] 杨 涛(Yang T),蔺桂芬(Lin GF),王科大(Wang KD),等. 毛冬青甲素体外给药对花生四烯酸诱导的免血小板聚集和丙二醛生成的影响[J]. 首都医学院学报(*J Cap Univ Med Sci*),1992,13(3):171-176.
- [7] 王 毅(Wang Y),刘铁汉(Liu TH),王 巍(Wang W),等. 人参皂苷 Rg₁ 的肠内菌代谢及其代谢产物吸收入血的研究[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*),2000,35(4):284-288.
- [8] Ushio S, Chung KS, Byung HH, et al. Radioimmunoassay for the determination of ginseng saponin, ginsenoside Rg₁ [J]. *Chem Pharm Bull*,1982,30(5):1907-1910.
- [9] 马海英(Ma HY),周秋丽(Zhou QL),王本祥(Wang BX). 黄山药总皂苷肠内菌代谢及代谢产物吸收的研究[J]. 中国药房(*China Pharm*),2002,13(4):204-205.
- [10] Hattori M, Shu YZ, Shimizu M, et al. Metabolism of paeoniflorin and related compound by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*,1985,33(9):838-842.
- [11] Kyoichi K, Teruaki A. Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides [J]. *Biosci Microflora*,1997,16(1):1-3.
- [12] Liu WY, Li P, Feng F, et al. Quantitative determination of ilexgenin A in rat plasma by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and its pharmacokinetics [J]. *J Chin Pharm Sci*,2010,19(1):38-42.