

· 化学成分研究 ·

HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析大承气汤在人肠道菌群中的代谢产物

刘兴艳¹, 马舒伟², 黄玉凤¹, 李丽³(1. 宁波职业技术学院, 浙江 宁波 315800; 2. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: **目的** 鉴别大承气汤在人离体肠道菌群中的体外代谢产物。**方法** 应用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)鉴别大承气汤体外肠道菌群孵育样品中的代谢产物并推测其转化途径, 定量分析其主要成分在 48 h 内的动态变化情况。**结果** 从大承气汤中鉴别出 48 个固有的化学成分、21 个代谢产物。大承气汤在肠道菌中发生去糖基化、糖基化、甲基化、羟基化、开环反应和水合反应等多种反应, 其中去糖基化是苷类成分的主要转化方式。黄酮类化合物柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量下降 49.56%、29.25%和 90.95%; 蒽醌类化合物大黄素、大黄甲醚和芦荟大黄素含量下降 66.77%、8.23%和 9.74%; 新木脂素类成分和厚朴酚及厚朴酚含量下降了 60.01%和 73.80%; 各代谢产物含量明显增加。**结论** 肠道菌群对大承气汤具有广泛的代谢作用, 随着孵育时间延长, 大承气汤中苷类成分水解, 提高了大承气汤的生物利用度, 具有更强的泻下、抗炎、抗氧化作用的转化产物在肠道菌代谢过程中富集。

关键词: 人肠道菌群; 转化代谢; 大承气汤; 液相色谱-四极杆飞行时间质谱; 泻下; 抗炎; 抗氧化作用

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)07-1004-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.014

Identification of Metabolites of *Da Chengqi Tang* in Human Intestinal Microflora *in Vitro* by HPLC-Q-TOF-MS/MS

LIU Xingyan¹, MA Shuwei², HUANG Yufeng¹, LI Li³(1. Ningbo Polytechnic, Ningbo 315800 Zhejiang, China; 2. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100 Zhejiang, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** This study investigated the biotransformation and metabolic profile of *Da Chengqi Tang* (DCQT) by human intestinal microflora *in vitro*. **Methods** DCQT was anaerobically incubated with human intestinal microflora suspensions for 48 h at 37 °C. A liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry(HPLC-Q-TOF-MS/MS) method was developed and applied for rapid identification of the metabolites of DCQT. **Results** There were 48 compounds identified in DCQT, and 21 metabolites were identified. The possible metabolic pathways, including deglycosylation, glycosylation, methylation, hydration and C ring cleavage of the benzo- γ -pyrone system, were identified. The deglycosylation was the major metabolic pathway of glycosides in DCQT- BT. When DCQT was anaerobically incubated for 48 h by human intestinal microflora, the levels of flavanone glycosides(naringin, hesperidin and neohesperidin) were decreased continuously(49.56%, 29.25% and 90.95%); the levels of anthraquinones(emodin, physcion and aloe-emodin) were decreased continuously(66.77%, 8.23% and 9.74%); the levels of honokiol and magnolol were decreased continuously(60.01% and 73.80%). At the same time, the metabolites were increased continuously. **Conclusion** With incubating time prolonging, extensive metabolism of DCQT by human intestinal microflora *in vitro* was observed. Biotransformation of DCQT by human

收稿日期: 2021-02-01

作者简介: 刘兴艳, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药效物质基础研究。Email: liuxingyan2002@163.com。

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ21H280001); 浙江省教育厅一般课题(Y201941130); 宁波市自然科学基金项目(2019A610373)。

intestinal microflora is beneficial to elevate bioavailability of flavonoid glycosides and metabolites may play a key role in activities of DCQT.

Keywords: Human intestinal microflora; metabolism and bio-transformation; *Da Chengqi Tang* (DCQT); HPLC-Q-TOF-MS/MS

肠道菌群是人体最重要的微生物体系,能影响消化吸收,对抗感染和自身免疫性疾病,并调节身体对治疗药物的反应。肠道菌群作为人体吸收、代谢的有机整体,发挥着至关重要的作用。天然产物或者中药的活性物质通过肠道菌的生物转化,可代谢为适合人体吸收或者活性更强的代谢产物,从而发挥预防和治疗局部或者全身疾病的作用。人肠道细菌代谢黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、去甲汉黄芩苷和木蝴蝶素-7-葡萄糖醛酸苷,生成转化产物黄芩苷元、去甲汉黄芩素和木蝴蝶素 A,其转化产物的抗补体和抗菌活性高于黄芩^[1]。肠道菌可以将连翘脂苷 A 转化为 3,4-二羟基苯基丙酸和羟基酪醇,转化产物比连翘脂苷 A 有更强的抗补体、抗菌和抗内毒素活性^[2]。芍药苷的转化产物比原型芍药苷的抗癫痫活性提高了 1.4 倍^[3]。大承气汤出自《伤寒论》,由枳实、大黄、厚朴和芒硝 4 味中药组成。该方主治实热内积、气滞不行、腹部胀满疼痛,现代临床用于治疗便秘、肠梗阻、急性胰腺炎、肝损伤等疾病。大承气汤的主要成分包括鞣质类、黄酮类、萜醌类和新木脂素等,目前人们对直接来源于大承气汤中的化学成分已经有较深入的研究^[4-7],但是对其在人肠道菌中转化代谢特征尚不明确。为此,本研究拟用液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)对大承气汤在人肠道菌群中的代谢产物进行定性、定量分析,考察其转化途径,分析其主要成分动态变化特征,明确大承气汤固有化学成分与代谢产物的关系,揭示大承气汤化学成分在肠道中的生物转化的一般规律。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 大黄、厚朴、枳实、芒硝饮片购自宁波中医院,经浙江中医药大学吴刚副研究员鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定。大黄为蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)或药用大黄(*Rheum officinale* Baill.)的干燥根,厚朴为木兰科植物厚朴(*Magnolia officinalis* subsp. *Magnolia*

officinalis Rehd. et Wils)凹叶厚朴(*biloba* Rehd. et Wils.)的干燥干皮,枳实为芸香科植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种或甜橙(*Citrus sinensis* L. Osbeck)的干燥幼果,芒硝为硫酸盐类矿物芒硝族芒硝。样本保存在宁波职业技术学院药品生物技术实验室,编号:DH-1901061、ZS-1901062、HP-1901063 和 MX-1901064。

甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);超纯水(美国 Millipore 纯水机制备);GAM 肉汤培养基(青岛海博生物技术有限公司,批号:20190503)。对照品柚皮苷(批号: B21594)、柚皮素(批号: B21596)、橙皮苷(批号: B20182)、新橙皮苷(批号: B21390)、大黄素(批号: B20240)、芦荟大黄素(批号: B20772)、木樨草素(批号: B20245)、厚朴酚(批号: B20511)、和厚朴酚(批号: B20498)、大黄甲醚(批号: B20242),上海源叶生物技术有限公司;桔皮素(批号: 47000620)、大黄酚(批号: 47013298)、大黄酸(批号: 47000353)、川陈皮素(批号: 47000233)、儿茶素(批号: 47031758)、番泻苷 A(批号: 47000480)、新橘皮苷(批号: 47000244)、异槲皮苷(批号: 47001148)、柠檬苦素(批号: 47001066)、金丝桃苷(批号: 47000785)、野漆树苷(批号: 47000854)、圣草酚(批号: 47001004)和香叶木苷(批号: 47000412),上海爱必信生物技术有限公司;异厚朴酚(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号: Y-094)。上述对照品经高效液相色谱(HPLC)面积归一化法测定,纯度均大于 98%。

1.2 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱系统(包括在线脱气机、四元泵、盘式自动进样器、柱温箱、DAD 检测器)、6530 Q-TOF 质谱仪、MassHunter 质谱工作站软件(美国 Agilent 公司);YQX-II 厌氧培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);Mettler AE240 万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.3 大承气汤及体外肠道菌群代谢产物分析

1.3.1 大承气汤样品的制备 称取大黄 120 g(后下),枳实 120 g,厚朴 240 g,加入 8 倍量水浸泡

30 min, 煮 1 h, 过滤; 滤渣加 6 倍量水, 煮 1 h, 合并 2 次滤液, 加入芒硝 60 g。减压浓缩至 0.5 g·mL⁻¹, 置于 4 °C 密闭保存。

1.3.2 人体肠道菌群的制备 将新鲜健康人粪便转移至厌氧培养箱中, 在厌氧无菌操作条件下, 加入 10 倍量稀释液(蛋白胨 1.0 g, 琼脂粉 0.4 g, 氯化钠 8.5 g, 加入 1000 mL 蒸馏水), 涡旋 10 min, 双层纱布过滤。取滤液, 在 37 °C 厌氧条件下加入 GAM 肉汤培养基孵育 24 h, 即为离体肠道菌孵育液。

1.3.3 大承气汤在肠道菌群中的孵育 30 mL 孵育液中加入 1.0 mg·mL⁻¹ 大承气汤 1 mL, 在 37 °C 厌氧条件下孵育 48 h。

1.3.4 样品处理 取 40 mL 乙酸乙酯对样品溶液进行萃取, 萃取 3 次, 合并萃取液, 旋转蒸发仪浓缩, 用甲醇溶解并定容至 2 mL。将样品以 12 000×g 离心 10 min, 取上清液, 经微孔滤膜(0.22 μm)滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

1.3.5 对照品溶液的配制 精密称取柚皮苷、柚苷素、橙皮苷、新橙皮苷、桔皮素、新橘皮苷、金丝桃苷、野漆树苷、圣草酚、香叶木苷、柠檬苦素、川陈皮素、木樨草素、儿茶素、异槲皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、番泻苷 A、大黄甲醚、大黄酚对照品适量, 加甲醇制备成混合对照品溶液。

1.3.6 HPLC-Q-TOF-MS/MS 测定 色谱条件: 色谱柱为 Heder ODS-2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇(含 0.1% 乙酸, A)-水(含 0.1% 乙酸, B), 梯度洗脱(0~12 min, 10%~42%A; 12~32 min, 42%~52%A; 32~50 min, 52%~60%A; 65~70 min, 90%~90%A; 70~75 min, 90%~10%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C; 检测波长: 260 nm。

质谱检测条件: ESI 离子源; 干燥气(N₂)流速: 10 L·min⁻¹; 干燥气温度: 320 °C; 雾化气压: 35 MPa; 毛细管电压: 3 500 V; 裂解电压: 120 V。数据采集范围(*m/z*): 100~3 000。数据采集和处理分别采用 MassHunter Acquisition Software 和 MassHunter Workstation software (V B.04.00) 软件(美国 Agilent 公司)。

1.4 含量测定

1.4.1 混合对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、圣草酚、柚皮素、根皮素、橙皮素、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸、

大黄素、和厚朴酚、厚朴酚对照品适量, 加入甲醇溶解, 制备成浓度分别为 527、245、322、235、23、117、133、610、232、217、57、109、74 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

1.4.2 色谱条件 同“1.3.6”项下。

2 结果

2.1 大承气汤肠道菌群转化前后化学成分辨识

2.1.1 化学成分辨识 负离子模式下的总离子流图见图 1-A。大承气汤主要成分质谱裂解规律已有报道^[8-10], 结合对照品的质谱信息, 在当前条件下, 共鉴定出大承气汤中 48 个化合物。结果见表 1。

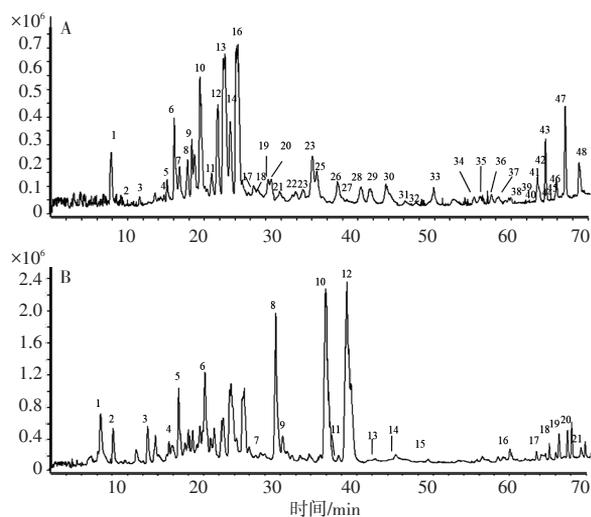


图 1 大承气汤(A)和转化后的大承气汤(B)负离子模式下的总离子流图

Figure 1 Total ion chromatograms(TIC) of DCQT(A), DCQT-BT(B) by LC-Q-TOF/MS in negative ion mode

表 1 大承气汤 48 种化学成分的 MS/MS 数据

Table 1 MS/MS data of 48 original components identified in DCQT

序号	<i>t_R</i> /min	实测值	理论值	分子式	化合物
F1	7.275	169.0143	170.0216	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸
F2	10.317	452.1322	452.1319	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	catechin-O-glc
F3	12.031	290.0793	290.0790	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素
F4	15.383	260.1048	260.1049	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	橙皮内酯
F5	15.707	624.2055	624.2054	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	magnolioside A
F6	17.528	478.1480	478.1475	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	莲花掌苷
F7	17.744	478.1494	478.1475	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	异莲花掌苷
F8	17.857	596.1761	596.1741	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	eriodictyol-7-O-rutinoside
F9	18.575	596.1735	596.1741	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	圣草苷
F10	20.416	862.1953	862.1956	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	番泻苷 A
F11	21.099	580.1793	580.1792	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	芸香柚皮苷
F12	22.508	624.2063	624.2054	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	阿克替苷
F13	22.850	580.1723	580.1796	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	柚皮苷
F14	23.162	610.1902	610.1894	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	新橙皮苷

(续表 1)

序号	<i>t_R</i> /min	实测值	理论值	分子式	化合物
F 15	23.788	310.106 1	310.106 5	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	cinnamoyl glucose
F 16	24.425	610.190 2	610.189 1	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷
F 17	26.207	578.164 3	578.164 3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	野漆树苷
F 18	26.282	578.164 5	578.164 8	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	异野漆树苷
F 19	27.629	448.101 5	448.101 8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷
F 20	28.043	608.173 1	608.173 4	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	香叶木苷
F 21	29.744	462.114 6	462.114 9	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	kaempferol- <i>O</i> -glc
F 22	31.009	278.116 1	278.116 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	水合橙皮内酯
F 23	32.113	202.026 1	202.026 4	C ₁₁ H ₆ O ₄	花椒毒酚
F 24	34.436	593.188 7	594.196 0	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	新枳属苷
F 25	35.010	470.193 3	470.193 1	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	柠檬苦素
F 26	36.204	272.068 2	272.068 6	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素
F 27	39.169	302.078 3	302.079 2	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	橙皮素
F 28	41.092	432.106 3	432.106 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	aloe-emodin- <i>O</i> -glc
F 29	42.200	416.109 4	416.110 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	chrysofanol-8- <i>O</i> -D-glc
F 30	43.386	416.111 1	416.109 5	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	chrysofanol-8- <i>O</i> -D-glc
F 31	46.348	432.106 3	432.105 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	emidin-8- <i>O</i> -D-glc
F 32	47.506	432.106 8	432.104 8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	emidin-8- <i>O</i> -D-glc
F 33	50.075	332.162 0	332.162 3	C ₁₉ H ₁₄ O ₅	marmin
F 34	55.068	358.106 2	358.106 3	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	hydroxy-tetramethoxyflavon
F 35	57.267	284.067 6	284.068 3	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	大黄甲醚
F 36	58.386	270.053 5	270.052 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	芦荟大黄素
F 37	58.631	254.058 5	254.058 3	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	大黄酚
F 38	60.694	606.136 4	606.136 4	C ₃₁ H ₂₆ O ₁₃	11- <i>O</i> -actyl-aloe-emodin- <i>O</i> -glc- <i>xyl</i>
F 39	61.188	402.130 8	402.130 2	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	川陈皮素
F 40	63.107	314.079 2	314.078 7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	hortensin
F 41	63.941	284.032 4	284.031 3	C ₁₅ H ₈ O ₆	大黄酸
F 42	64.374	432.106 8	372.120 3	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	橘红素
F 43	64.806	266.130 4	266.131 3	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	和厚朴酚
F 44	65.116	298.156 3	298.155 5	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	橙皮油素
F 45	65.242	418.126 3	418.127 2	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	4- <i>O</i> -methylhonokiol
F 46	66.757	282.125 4	282.125 2	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	obovatal
F 47	67.068	266.131 0	266.129 7	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	厚朴酚
F 48	68.853	270.053 4	270.052 9	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	大黄素

2.1.2 肠道菌群转化后的大承气汤化学成分辨识 见图 1-B, 根据对照品的质谱信息结合文献报道鉴定出 21 个代谢产物。结果见表 2。

2.2 肠道菌群中转化途径推测 大承气汤中所含主要的化学成分类型包括蒽醌类、黄酮类和新木脂素类。根据图 1 和表 1、2 所示的大承气汤及其代谢产物的信息, 按照化合物类型对大承气汤的肠道菌群转化途径进行推测。

2.2.1 蒽醌类成分转化途径的推测 检测出 3 个蒽醌类代谢产物: M15 为大黄酸蒽酮、M16 为大黄酚和 M17 为大黄酸。根据原型蒽醌苷和代谢产物的结构, 对大承气汤中蒽醌类成分转化途径进行推测, 结果见图 2。其存在 2 种主要转化途径: 其一, 番泻 A 水解成为大黄酸蒽酮; 其二, 蒽醌苷首先水解脱糖成相应的蒽醌苷元, 最后生成大黄酸蒽酮。在转化

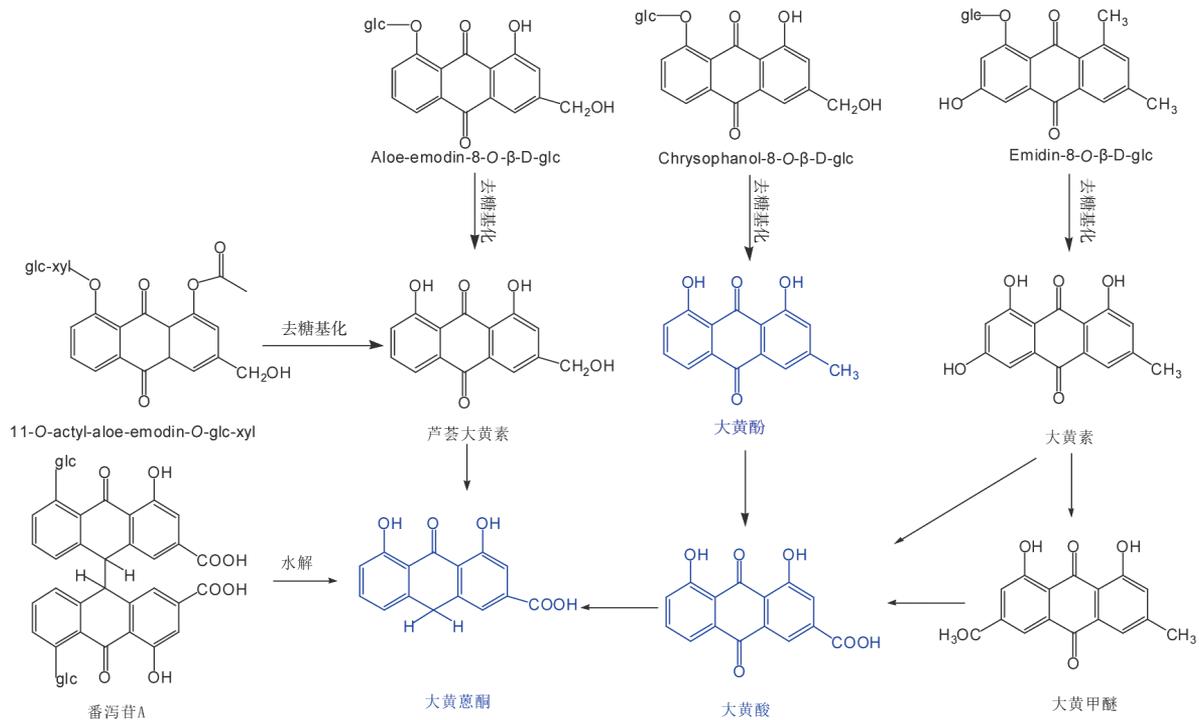
表 2 大承气汤经肠道菌群孵育后 21 种代谢产物的 MS/MS 数据

Table 2 MS/MS data of 21 metabolites identified in DCQT-BT

序号	<i>t_R</i> /min	实测值	理论值	分子式	化合物
M1	6.199	126.031 8	126.031 7	C ₆ H ₆ O ₃	间苯三酚/1,2,4-Trihydroxybenzene
M2	10.446	154.063 0	154.063 0	C ₈ H ₁₀ O ₃	3,4-Dihydroxyphenylethanol
M3	15.216	624.209 9	624.208 3	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅	甲基橙皮素
M4	16.328	464.075 3	464.074 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷
M5	17.021	464.073 3	464.074 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮苷
M6	21.777	166.062 8	166.063 0	C ₈ H ₁₀ O ₃	丹皮酚
M7	27.290	288.064 7	288.063 4	C ₈ H ₁₂ O ₆	圣草酚
M8	30.827	308.021 3	308.020 7	C ₉ H ₁₀ O ₇	水合儿茶素
M9	36.439	418.128 2	418.126 4	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	3',4',5',6,7,8-Hexamethoxy-5-hydroxyflavone
M10	37.000	272.068 1	272.068 2	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素
M11	39.294	274.085 1	274.084 1	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	根皮素
M12	39.695	302.079 4	302.079 0	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	橙皮素
M13	42.089	286.230 1	286.229 8	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	木犀草素
M14	45.280	346.067 2	346.068 9	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	丁香亭
M15	47.985	270.053 2	270.052 8	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	大黄酸蒽酮
M16	59.442	254.058 8	254.057 9	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	大黄酚
M17	63.947	284.032 8	284.032 1	C ₁₅ H ₈ O ₆	大黄酸
M18	65.608	300.064 9	300.063 4	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	香叶木素
M19	66.131	300.064 9	300.063 4	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	高车前素
M20	67.598	266.130 7	266.130 7	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	isomagnolol
M21	68.675	286.085 8	286.084 1	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	异樱花素

为大黄酸蒽酮的过程中, 会产生一系列的中间代谢产物如大黄素甲醚、大黄酸和大黄素。

2.2.2 黄酮类成分转化途径的推测 在当前质谱条件下, 共检测出 17 个黄酮类成分的代谢产物。通过与对照品以及已报道数据^[8-10]比对, M1~M14、M18、M19 和 M21 被鉴定为间苯三酚、3,4-dihydroxyphenylethanol、甲基橙皮素、金丝桃苷、异槲皮苷、丹皮酚、圣草酚、水合儿茶素、3',4',5',6,7,8-Hexamethoxy-5-hydroxyflavone、柚皮素、根皮素、橙皮素、木犀草素、丁香亭、香叶木素、高车前素和异樱花素。根据大承气汤原型黄酮类和代谢产物的结构, 对黄烷酮、黄酮、黄酮醇、多甲基黄酮和苯乙醇苷类的转化途径进行了推测, 结果见图 3。(1)黄烷酮、黄酮苷的主要转化途径是水解 C-7 位上的单糖或二糖生成相应的黄烷酮和黄酮。(2)kaempferol-*O*-glc 脱糖生成丁香亭, C-3 糖基化生成金丝桃苷和异槲皮苷。(3)川陈皮素、hortensin 和橘红素的最终代谢产物是 3',4',5',6,7,8-Hexamethoxy-5-hydroxyflavone。(4)苯乙醇苷类和黄烷醇分解为丹皮酚、间苯三酚、1,2,4-Trihydroxybenzene 和 3,4-dihydroxyphenylethanol。(5)代谢产物根皮素来自于柚皮素 C 环裂解。



注：“→”表示主要路径；蓝色表示代谢产物

图2 大承气汤蒽醌类成分肠道菌代谢途径

Figure 2 Proposed anthraquinones metabolic pathways of DCQT by intestinal bacteria

2.2.3 新木脂素类成分转化途径的推测 通过对照品比对, M20 被鉴定为异厚朴酚。根据原型成分和代谢产物的结构推测 4-O-methylhonokiol、厚朴酚、和厚朴酚的最终代谢产物是异厚朴酚。图 4。

2.3 定量分析 分别取“1.4.1”项下混合对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL, 置 1 mL 容量瓶中, 加甲醇配成系列含量的混合标准品溶液, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程和相关系数, 并以信噪比为 3(S/N=3) 和 10(S/N=10) 计算定量限度。结果见表 3。

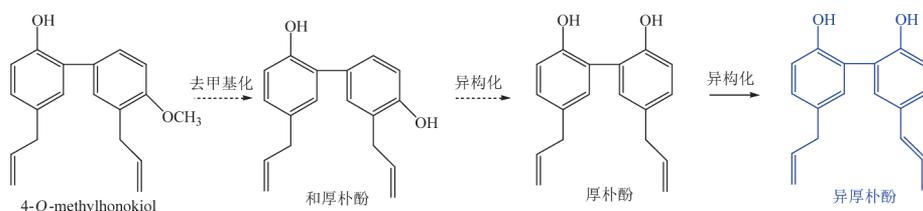
大承气汤各类化合物在代谢转化中的含量变化见图 5。(1) 黄酮类化合物柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量下降 49.56%、29.25% 和 90.95%。随着孵育时间延长, 代谢产物圣草酚、柚皮素、根皮素和橙皮素的含量增加。(2) 蒽醌类化合物大黄素、大黄甲醚和芦荟大黄素含量下降 66.77%、8.23% 和 9.74%。随着孵育时间延长, 代谢产物大黄酚和大黄酸含量增加。(3) 新木脂素类成分和厚朴酚和厚朴酚含量下降了 60.01% 和 73.80%。

3 讨论

本研究采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对大承气汤中复杂化学成分进行快速定性分析, 借助数据库

自动及手动匹配, 在负离子模式下共鉴定出大承气汤 48 个原型化合物; 经肠道菌群代谢转化之后, 鉴定出 21 个代谢产物。本研究结果反映了转化过程中大承气汤整体变化特征, 表征经肠道菌群转化的大承气汤化学物质轮廓。在比较大承气汤及其经肠道菌群转化化合物中, 我们发现大量的苷类成分水解, 提高了大承气汤的生物利用度。同时, 发现了可能引起活性变化的化学结构变化: 多种蒽醌类化合物转化为大黄蒽酮, 而大黄蒽酮是大黄在体内产生强泻下作用的化合物^[14]; 含量最高的代谢产物橙皮素、柚皮素比相应的原型化合物橙皮苷和柚皮苷具有更强的抗炎和抗氧化活性^[12], 表明肠道菌群转化产生新的代谢产物可能增强了大承气汤在体内的泻下、抗炎、抗氧化作用。另外, 一些代谢产物如香叶木素、丹皮酚和根皮素具有抗菌、抗癌、抗抑郁、抗神经退行性疾病、免疫调节等功效^[15-20]。部分新生代谢产物具有不同于原型化合物活性的新活性, 它们是否为大承气汤产生活性的物质基础, 需要进行更深入的体内代谢研究。

本研究针对不同时间的肠道菌群转化的大承气汤样品进行了主成分含量动态评价。发现随着孵育时间延长, 大承气汤经肠道菌群转化后苷类成分明显降低, 代谢产物黄酮和蒽醌含量显著增加。大承气



注：“→”表示主要路径；“----->”表示旁路径；蓝色表示代谢产物

图4 大承气汤新木脂素类成分肠道菌代谢途径

Figure 4 Proposed neolignans metabolic pathways of DCQT by intestinal bacteria. Structures in blue indicate metabolites in DCQT-BT

表3 大承气汤及其代谢产物的回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients, linear ranges, limits of detection (LODs) and limit of quantification(LOQs) of DCQT by intestinal bacteria

化合物	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
柚皮苷	$Y=458.39X-7.42$	0.999 6	0.374~82.28	0.006	0.030
橙皮苷	$Y=245.86X-2.71$	0.999 8	2.057~70.04	0.010	0.065
新橙皮苷	$Y=387.64X+50.11$	0.999 9	1.674 5~66.98	0.006	0.011
圣草酚	$Y=367.32X+131.96$	0.999 1	1.7~68.0	0.009	0.051
柚皮素	$Y=773.87X-7.65$	0.999 9	5.134~205.36	0.019	0.022
根皮素	$Y=3 681.67X-50.18$	0.999 9	0.37~14.96	0.007	0.018
橙皮素	$Y=672.72X-13.07$	0.999 9	4.998~199.9	0.019	0.023
大黄素甲醚	$Y=254.72X-180.39$	0.999 5	4.238~145.1	0.006	0.019
芦荟大黄素	$Y=32 565X-32.08$	0.999 9	0.242 25~9.69	0.012	0.031
大黄酚	$Y=2 839.91X-510.97$	0.999 8	0.221~8.84	0.018	0.027
大黄酸	$Y=2 080.33X-45.16$	0.999 4	0.217 6~8.70	0.013	0.029
和厚朴酚	$Y=2 796.78X-23.90$	0.999 3	0.18~7.21	0.005	0.016
厚朴酚	$Y=460.98X+1.26$	0.999 1	0.081 6~3.26	0.003	0.019
大黄素	$Y=2 194.85X-194.42$	0.999 8	0.048~11.94	0.005	0.021

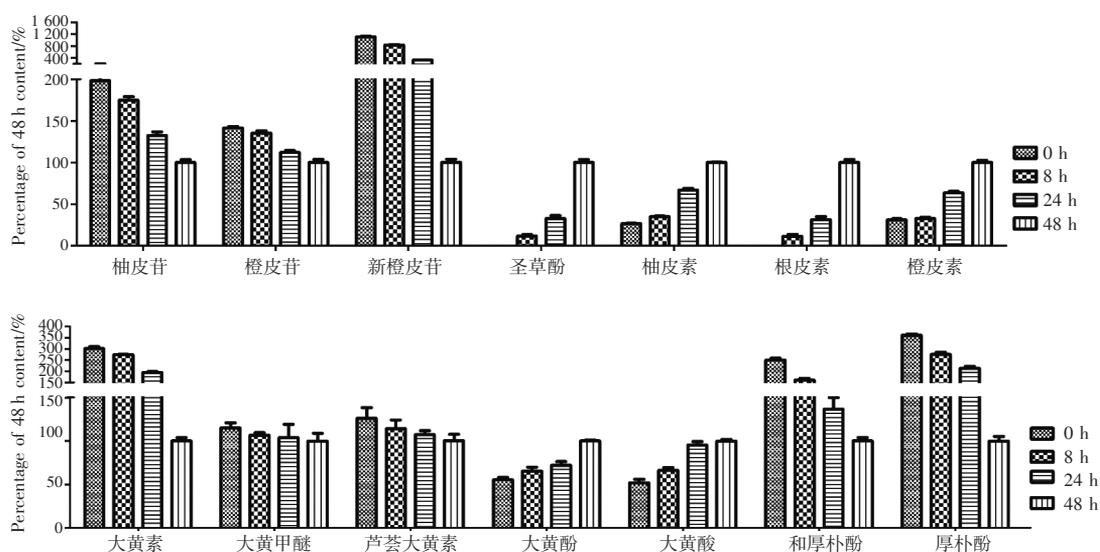


图5 大承气汤各类化合物在转化中的含量变化

Figure 5 Content changes of the main constituents in DCQT

汤在肠道菌群中转化造成代谢产物积累, 新生成的代谢产物有更强生物活性。但是, 这些代谢产物与大承气汤药理活性的相关性需要进一步的实验证明。

参考文献:

- [1] XING S, WANG M, PENG Y, et al. Simulated gastrointestinal tract metabolism and pharmacological activities of water extract of *Scutellaria baicalensis* roots[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 183-189.
- [2] XING S, PENG Y, WANG M, et al. In vitro human fecal microbial metabolism of Forsythoside A and biological activities of its metabolites[J]. *Fitoterapia*, 2014, 99: 159-165.
- [3] 屠鹏飞, 史社坡, 姜勇. 药物基础研究思路与方法[J]. *中草药*, 2012, 43(2): 209-225.
- [4] 宁秋菊, 詹树煜, 冯学轩. HPLC法同时测定大承气汤中10个有效成分的含量[J]. *中国处方药*, 2020, 18(10): 35-38.
- [5] YANG B, XU F Y, SUN H J, et al. Da-cheng-qi decoction, a traditional Chinese herbal formula, for intestinal obstruction: systematic review and meta-analysis[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(4): 101-119.
- [6] 谢臻, 王术玲, 高峰, 等. 大承气汤配伍变化的药效物质基础研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(1): 57-60.
- [7] 陆杰, 王婷婷, 梁琨, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS法分析大承气汤化学成分[J]. *中成药*, 2020, 42(12): 3275-3280.
- [8] ZHU T, LIU X, WANG X, et al. Profiling and analysis of multiple compounds in rhubarb decoction after processing by wine steaming using UHPLC-Q-TOF-MS coupled with multiple statistical strategies[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(15): 3081-3090.
- [9] XU F, LIU Y, ZHANG Z, et al. Rapid simultaneous quantification of five active constituents in rat plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after oral administration of Da-Cheng-Qi decoction[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(3): 586-595.
- [10] WAN J B, BAI X, CAI X J, et al. Chemical differentiation of Da-Cheng-Qi-Tang, a Chinese medicine formula, prepared by traditional and modern decoction methods using UPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 83: 34-42.
- [11] BAI Y, ZHENG Y, PANG W, et al. Identification and comparison of constituents of *aurantii fructus* and *aurantii fructus immaturus* by UFLC-DAD-Triple TOF-MS/MS[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 803.
- [12] YAN S, HAO M, YANG H, et al. Metabolomics study on the therapeutic effect of the Chinese herb pair *Fructus aurantii immaturus* and *Rhizoma atractylodis macrocephalae* in constipated rats based on UPLC-Q/TOF-MS analysis[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(5): 2837-2852.
- [13] LIU X Y, FAN M L, WANG H Y, et al. Metabolic profile and underlying improved bio-activity of *Fructus aurantii immaturus* by human intestinal microflora[J]. *Food Funct*, 2017, 8(6): 2193-2201.
- [14] KON R, IKARASHI N, NAGOYA C, et al. Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 190-200.
- [15] 王春景, 盛月, 周强, 等. 香叶木素通过线粒体凋亡途径对人乳腺癌MCF-7细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(2): 149-155.
- [16] SALEHI B, VENDITTI A, SHARIFIRAD M, et al. The therapeutic potential of apigenin[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1305.
- [17] CHANPUT W, KRUEYOS N, RITTHIRUANGDEJ P. Antioxidative assays as markers for anti-inflammatory activity of flavonoids[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 170-175.
- [18] GE A, MA Y, LIU Y N, et al. Diosmetin prevents TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition via ROS/MAPK signaling pathways[J]. *Life Sci*, 2016, 153: 1-8.
- [19] ZHANG L, LI D C, LIU L F. Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 413-421.
- [20] WU M, LI P, AN Y, et al. Phloretin ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by regulating the gut microbiota[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: e104489.

(编辑: 梁进权)