

。 药理实验与临床观察。

淫羊藿苷的肠菌代谢研究I . 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化[△]

长春中医学院附属医院新药研究中心 (130021)
沈阳药科大学天然药物研究室

刘铁汉* 王毅 王本祥**
吴立军

摘要 目的: 在考察淫羊藿苷 (icariin) 于人工胃液中稳定性的基础上, 研究了肠道内细菌对淫羊藿苷的代谢作用。方法: 于人工胃液或肠内菌培养液中, 加入淫羊藿苷温孵培养一定时间后, 以薄板层析、高效液相色谱仪和电喷雾质谱仪, 对培养物成分做定性分析检查。结果: 淫羊藿苷在人工胃液中有较高的稳定性。离体培养人肠道内细菌可代谢淫羊藿苷, 且其主要代谢产物为淫羊藿苷的苷元 (icaritin) 及其苷元的异戊烯基位置异构体。在大鼠整体实验中, 从粪便和尿液中均检出一主要代谢产物, 并初步确定此代谢产物为宝藿苷I (baohuoside I)。结论: 在离体条件下, 淫羊藿苷可被人肠内菌代谢, 主要代谢产物为淫羊藿苷的苷元。大鼠灌服淫羊藿苷后, 吸收入血的主要代谢物为宝藿苷I。

关键词 淫羊藿苷 宝藿苷I 肠内菌代谢 电喷雾质谱

Studies on the Metabolism of Icarin by Intestinal Bacteria Part I : The Transformation of Icarin by Intestinal Flora

Research Center of New Drug of Affiliated Hospital, Changchun College of TCM (Changchun 130021) Liu Tiehan, Wang Yi and Wang Benxiang

Shenyang Pharmaceutical University Wu Lijun

Abstract The stability of icariin in artificial gastric juice and the transformation of icariin in intestine were studied. Icarin was incubated with artificial gastric juice or intestinal flora for a certain period of time, and its metabolite examined by TLC, HPLC and ESI/MS. Results showed that icariin was stable in artificial gastric juice, but was metabolized to icaritin by human intestinal bacteria *in vitro*. A main metabolite, baohuoside I . was found in urine and feces of rat after ig administration of 200 mg/kg icariin. These results showed that icariin can be metabolized *in vitro* by human intestinal bacteria to icaritin and as baohuoside after oral administration.

Key words icariin baohuoside I intestinal bacteria metabolism ESI/MS

淫羊藿苷 (icariin) 是小檗科淫羊藿属植物的主要有效成分之一。注射途径给药或离体实验表明, 淫羊藿苷在心血管^[1,2], 免疫调节^[3-7]等方面有着广泛的生物活性。然而, 传统中药淫羊藿和现今绝大多数以淫羊藿苷为指标成分的药物制剂均为口服制剂。因此, 考察淫羊藿苷在消化道内的稳定性是揭示此类制剂作用机制研究中一个不可缺少的重要环节。我们采用离体实验与小鼠整体实验相结合的方法, 重点考察了肠内细菌对淫羊藿苷的分解代谢作用, 初步了解了淫羊藿苷在胃肠道内分解代谢的一般规律。

1 实验材料

1.1 动物: Wistar 雄性大鼠 (180~200 g), 购自白

求恩医科大学实验动物室。

1.2 药品: 淫羊藿苷为自制, 经理化测定, 证明纯度大于 99%; 胃蛋白酶购自 Sigma 公司。

1.3 仪器: Varium Unity -400 型核磁共振波谱仪; Finigan mat 公司 LCQ 电喷雾质谱仪; Shimadzu-8A 型分析制备两用高效液相色谱仪 (UV 检测器); 厌氧培养罐购自沈阳第五人民医院; 自制代谢用鼠笼。

1.4 试剂及其它材料: 人工胃液按 1995 年版药典方法配制; 厌氧培养液^[8]: 37.5 mL 溶液 A (0.87% K₂HPO₄), 37.5 mL 溶液 B (0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄ · H₂O), 0.5 g L-cystine · H₂O, 2

* Address: Liu Tiehan, Research Center of New Drug, Affiliated Hospital, Changchun College of TCM, Changchun
刘铁汉 沈阳药科大学中药系 95 级硕士研究生, 现为中国科学院微生物研究所 98 级博士研究生

** 通讯联系人

△ 国家中医药管理局资助课题

mL 25% L-ascorbic acid, 50 mL 8% Na₂CO₃, 牛肉膏 1 g, 蛋白胨 1 g, 营养琼脂 1 g, 最后调 pH 7.5~8.0 粪便采于健康志愿者。

2 实验方法

2.1 淫羊藿苷在人工胃液中的稳定性考察: 精密称取淫羊藿苷 1.0 mg, 加微量甲醇, 加热溶解, 然后与 16 mL 温度为 37℃ 人工胃液混合。用移液管分装于 0, 1, 2, 3 号 4 支试管中 (预先置于 37℃ 恒温水浴中) 然后分别用 0.2 mol/L NaOH 在 0, 1, 2, 3 h 后调 pH 值至 7.0 终止反应。0.45 μm 的醋酸纤维膜过滤至 5 mL 容量瓶中, 定容摇匀后, 用 HPLC 分析 (经考察, 淫羊藿苷含量与峰面积在 0.004~0.2 mg/mL 浓度范围内有较好的线性关系, r=0.999 888), 每组进样 8 μL, 以 0 h 组检测到的淫羊藿苷量为 100%, 依据各峰面积与 0 h 组的峰面积之比求出经一段时间后未发生变化的淫羊藿苷占原加入药物的百分含量。

2.2 用 TLC 法检测离体培养人肠内细菌对淫羊藿苷的代谢作用: 取青年健康志愿者的新鲜粪便, 按 0.5 g: 15 mL 的比例加入厌氧培养液中, 用玻璃珠和玻璃棒打匀, 用纱布过滤即得肠菌培养液。取此新鲜配制的肠菌培养液 9 份, 每份 10 mL, 各加淫羊藿苷 2 mg, 分别于 37℃ 厌氧条件下培养 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 h, 用正丁醇萃取培养混合物, 萃取液浓缩后用于 TLC 分析。

2.3 淫羊藿苷体外代谢产物的制备分离和纯化: 淫羊藿苷 (1 000 mg) 与新配制的肠菌培养液 1 000 mL 混合, 于 37℃ 厌氧条件下培养 24 h 后, 用正丁醇等量萃取 4 次, 60℃ 减压回收, 所得残渣用乙酸乙酯提取。此提取液浓缩后, 过滤, 用于硅胶柱层析, 以氯仿为洗脱剂, 得一黄色结晶 (10.6 mg)。

2.4 淫羊藿苷大鼠整体肠内菌代谢的考察

2.4.1 分析样本的制备: 取大鼠 3 只, 饲养 7 d, 待其充分适应本室环境后, 收取空白尿液及空白粪便备用。禁食 12 h 后, 连续 ig 给药 2 d, 每天 2 次 (200 mg/kg), 禁食但自由饮用糖盐水 (含 5% 葡萄糖和 0.9% 氯化钠)。不断收集给药后尿液和粪便, 连续 3 d 尿液用乙酸乙酯萃取, 粪使用乙酸乙酯提取, 回收乙酸乙酯, 过滤, 即得澄明分析样本。

2.4.2 HPLC 法对样本进行分析: 采用 Shimadzu-8A 分析制备两用 HPLC, Spherisorb-C₁₈ 分析柱, 以 CH₃OH-H₂O=7:3 为流动相, UV 353 nm, 流速为 1 mL/min 对样本进行分析。

2.4.3 电喷雾质谱 (ESI-MS) 法对主要代谢产物的

分析: 采用 Shimadzu-8A 高效液相, Spherisorb-C₁₈ 半制备柱, 以 CH₃OH-H₂O=7:3 为流动相。从给药鼠尿液中富集粪便和尿液中均存在的主要代谢物, 用于 ESI-MS 分析。

3 结果

3.1 淫羊藿苷在人工胃液中具有相对稳定性: 淫羊藿苷分子中, 3 位与 7 位羟基上分别有鼠李糖基和葡萄糖基与黄酮母核相连, 有被胃酸迅速分解的可能。然而, 考察结果表明, 淫羊藿苷在 37℃ 人工胃液中作用 2 h 后, 仍有 92.7% 以原苷形式存在, 仅有少部分分解。所以, 大部分的淫羊藿苷能在正常的胃排空时间内通过胃进入小肠, 避免胃酸的破坏。见表 1。

表 1 淫羊藿苷在人工胃液中的稳定性 (37℃)

培养时间 (h)	0	1	2	3
剩余率 (%)	100	95.4	92.7	87.8

注: 人工胃液: 10 g 胃蛋白酶溶于 100 mL 稀盐酸中 (pH 1.2); HPLC 条件: Spherisorb C₁₈ 柱; 流动相 CH₃OH-H₂O-AcOH=60:40:0.5; 流速 1.0 mL/min; 紫外检测器; 波长 271 nm

3.2 离体培养人肠道内细菌对淫羊藿苷的代谢作用: 薄层检查结果表明淫羊藿苷很快被离体培养人肠道内细菌所代谢 (约始于 8 h), 12 h 后, 原形药物不能用薄层方法检出, 而代之以一极性小于淫羊藿苷的代谢物斑点。见图 1。

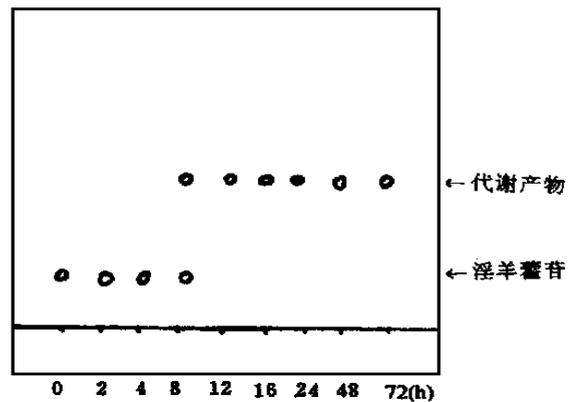


图 1 人肠道菌群对淫羊藿苷代谢薄层层析示意图

层析条件: 硅胶板, 硅胶厚度为 0.25 mm, 溶剂系统为石油醚 (30℃~60℃)-丙酮-甲酸=3.5:1.5:0.1; 层析后用 2% 三氯化铝乙醇溶液显色并在 254 nm 紫外下观察。

3.3 淫羊藿苷离体肠菌代谢产物的鉴定: 所得代谢产物: 黄色针状结晶 (甲醇); Molish 反应阴性, 盐酸-镁粉反应阳性, 推测此代谢产物可能为不含糖基的黄酮类化合物, ESI-MS 正谱给出 m/z 369 [M+H]⁺, 且其裂解特征与淫羊藿苷的碎片峰 m/z 369 次级断裂特征基本一致。预示此化合物为淫羊藿苷

元或苷元的同分异构体。¹H NMR谱中,当谱图未被放大时,各峰信号归属与淫羊藿苷元基本一致^[9]。然而,当谱图被放大后发现,相应于5位羟基氢,3位羟基氢,7位羟基氢,A环6位氢,B环2',6'位氢,异戊烯基烯氢质子信号均不是单一信号,结合质谱情况,推断此代谢产物为3,5,7-三羟基-4'-甲氧基-8-异戊烯基黄酮(I)与3,5,7-三羟基-4'-甲氧基-6-异戊烯基黄酮(II)的混合物。又因为¹H NMR谱中 δ 6.415峰明显强于 δ 6.423峰,因此在代谢物中以化合物(I)为主。各峰信号具体归属见表2

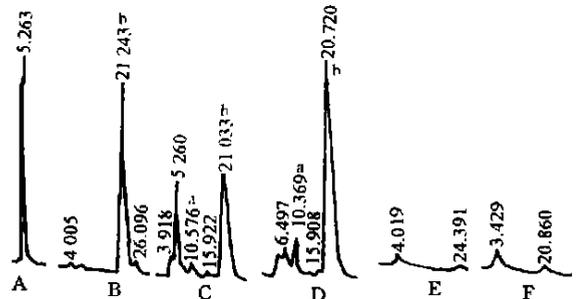
表2 淫羊藿苷体外肠菌代谢产物的¹H NMR图谱数据

位置	I	II
6	6.415(1H, s)	6.423(1H, s)
2', 6'	8.242(2H, d, $J=9, 2$)	8.239(2H, d, $J=9, 2$)
3, 5'	7.246(2H, d, $J=9, 2$)	7.246(2H, d, $J=9, 2$)
4'-OCH ₃	3.965(1H, s)	3.965(1H, s)
1''	3.523, 3.558(each 1H)	3.523, 3.558(each 1H)
2''	5.296(1H, m)	5.293(1H, m)
4''	1.868(3H, s)	1.868(3H, s)
5''	1.747(3H, s)	1.747(3H, s)
3-OH	9.589(1H, s)	9.589(1H, s)
5-OH	12.485(1H, s)	12.470(1H, s)
7-OH	10.852(1H, s)	10.857(1H, s)

化学位移单位 ppm,偶合常数单位为 Hz,工作频率 400 MHz,溶剂为 DM SO-d₆, TMS为内标

3.4 一主要淫羊藿苷大鼠整体肠菌代谢产物的推定:从高效液相色谱图(图2)中可见,不论在给药大鼠的粪便中,还是在给药大鼠的尿液中,至少可检出保留时间分别为10.3 min(I)和21 min(II)的代谢物峰出现。并且,保留时间为21 min的代谢物峰(II)由二个保留时间相差很小的峰重叠在一起组成。用 Shimadzu HPLC, Spherisorb 半制备柱,不断富集代谢峰 I 和 II 所对映的代谢物,用于 ESI-MS 分析,代谢峰 II 所对映的代谢物在 ESI-MS 正谱全

谱中显较强峰 m/z 536[M+ Na]⁺ 和 m/z 514 [M+ H]⁺。采用分步解离技术对此二离子进行分析。 m/z 536峰脱掉146碎片(鼠李糖基碎片)后,得稳定子峰 m/z 390 m/z 514峰脱掉146碎片(鼠李糖基碎片)后得 m/z 369子离子,且此子离子的进一步裂解碎片与淫羊藿苷子离子 m/z 369的质谱图一致。结合高效液相色谱情况,初步证明代谢峰 II 中有宝藿苷 I (3,5,7-三羟基-4'-甲氧基-8-异戊烯基黄酮-3-O-鼠李糖苷)的存在。代谢峰(I)所对映的代谢物有待进一步研究。



A淫羊藿苷标准品; B宝藿苷I 标准品; C给药组粪便; D给药组尿样; E粪便对照; F尿样对照
a未知代谢产物; b宝藿苷I

图2 大鼠粪便与尿中代谢产物的 HPLC 图谱

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药物的一大特征^[10]。在本实验中,我们不但检测到了肠道内细菌对淫羊藿苷分子中糖基的水解作用,而且也检测到了淫羊藿苷元位置异构体的生成。由此我们推测肠内细菌代谢淫羊藿苷的可能途径如图3

综上所述,淫羊藿苷易被肠道内菌丛所代谢。

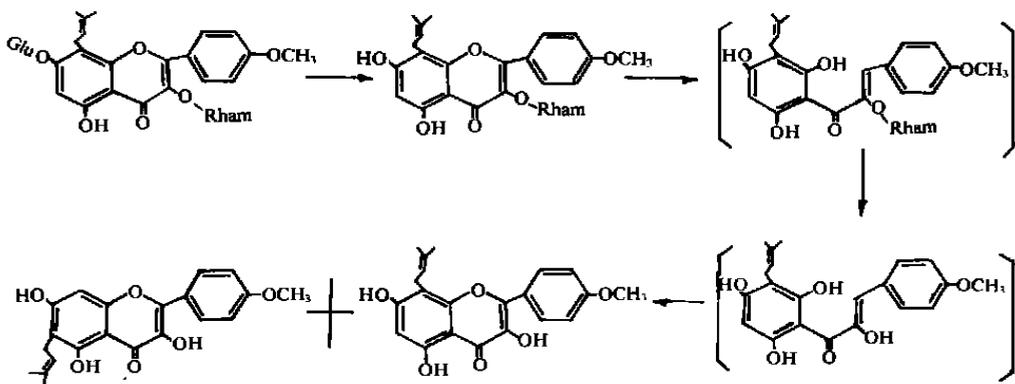


图3 肠内细菌代谢淫羊藿苷的推想图

因此,有必要进一步对口服淫羊藿苷后原苷及其肠菌代谢产物在血液中能否出现,及原苷与肠菌代谢

产物在生物活性方面有何异同进行考察,以期阐明传统中药制剂中淫羊藿苷发挥药效的机制,并促进

新的药物制剂的开发

参考文献

1 王天然,邢善田,周金黄. 中国免疫学杂志, 1986, 2 74
 2 王天然,邢善田,周金黄. 药学通报, 1987, 22 533
 3 刘崇铭,于庆海,张利民. 沈阳药学院学报, 1981, 14 28
 4 刘崇铭,于庆海,张利民. 中草药, 1982, 13 (9): 31
 5 李青南,吴铁,谢华,等. 中草药, 1993, 24 637

6 曹颖璞,郑钦岳,张国庆,等. 第二军医大学学报, 1998, 19 199
 7 赵勇,张玲,崔正言. 中国药理学通报, 1996, 12 52
 8 Massao Hattori, Shu Y Z, Mined Shimizu, et al. Chem Pharm Bull, 1985, 33 3838
 9 李枫,刘永隆. 药理学学报, 1988, 23 739
 10 康白主编. 微生物学. 大连: 大连出版社, 1988 95

(1999-12-14收稿)

水杉总黄酮对肾性高血压大鼠左室肥厚的作用[△]

武汉大学医学系药理学教研室 (430071)

刘惟莞* 曾加雄 石明健 杨晓茹 糜留西** 郑庆安** 卢云英 王红英

摘要 目的: 研究水杉总黄酮对肾性高血压大鼠左室肥厚的预防作用。方法: 二肾一夹法建立大鼠肾性高血压心肌肥厚模型, 术后第 4 周, 不同剂量的水杉总黄酮 ig 给药, 持续 5 周。结果: 水杉总黄酮 (400, 40 mg/kg, d) 能显著降低 HW/BW, LVW/BW, 心肌纤维直径, 左室肌 Ca²⁺ 含量, 对大鼠收缩压无显著性影响。结论: 水杉总黄酮对肾性高血压大鼠左室肥厚有预防作用, 机制可能与钙拮抗作用有关。

关键词 水杉总黄酮 高血压 左室肥厚

Effects of Total Flavone of *Metasequoia glyptostroboides* on Left Ventricular Hypertrophy in Renovascular Hypertensive Rats

Department of Medicine, Wuhan University (Wuhan 430071) Liu Weiwan, Zeng Jiaxiong, Shi Mingjian, Yang Xiaoru, Lu Yunying and Wang Hongying

Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences Mi Liuxi and Zheng Qing'an

Abstract The effects of total flavone of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (TFM) on left ventricular hypertrophy in rat were investigated. Left ventricular hypertrophy of rat was induced by renovascular hypertension, and then treated by ig TFM for five weeks. Results showed that TFM (400, 40 mg/kg/d) markedly reduced HW/BW, LVW/BW, left ventricular Ca²⁺ content and myofibril diameter, but without effect on systolic blood pressure (SBP). In conclusion, TFM can prevent left ventricular hypertrophy in renovascular hypertensive rats. The mechanism of action may be related to its calcium antagonistic properties.

Key words total flavone of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng hypertension left ventricular hypertrophy

左室肥厚 (LVH) 是心血管系统疾病的一项独立危险因素^[1]。心脏机械负荷过重和许多非血流动力学因素的刺激均可诱发 LVH。现已发现 α-甲基多巴、血管紧张素转化酶抑制剂、钙离子拮抗剂等均有不同程度的防止左室肥厚作用。水杉总黄酮 (total flavones of *Metasequoia glyptostroboides* TFM) 是从古老的杉属植物水杉中提取的活性成分, 对其初步药理学研究表明, TFM 具有抗心肌缺血和抗心律

失常作用。我们通过建立肾性高血压大鼠左室肥厚模型, 研究 TFM 对其作用。

1 材料与方法

1.1 动物: Sprague-Dawley 雄性大鼠, 体重 150~200 g, 湖北医科大学实验动物中心提供

1.2 仪器与试剂: HX-II 型小动物血压测量器 (尾套检压计), 湖南医科大学监制; 日立 180-80 型原子吸收分光光度计, 日本产; 测微尺, 上海第三光学仪

* Address: Liu Weiwan, Medical Department of Wuhan University, Wuhan

刘惟莞 女, 现任武汉大学医学系药理学教研室教授, 主要从事心血管药理的研究。目前承担国家自然科学基金《古老树种心脑血管疾病活性成分研究》、《重要资源植物杉科植物特征成分和活性研究》及中科院资源与环境“九五”重大项目《治疗数种重要疾病新天然药物研究与开发》和省、市科委等课题 5 项。

** 中科院武汉植物研究所

△ 国家自然科学基金资助项目, 项目号 39770088