

肠内菌群对七叶皂苷体外代谢转化产物的研究

陈继永^{1,2}, 吴立军¹, 滕厚雷², 刘珂^{2*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016 2 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003)

摘要: 目的 通过离体实验观察人肠道内细菌对七叶皂苷的代谢。方法 离体培养人肠道内细菌, 与七叶皂苷厌氧温孵, 采用硅胶柱色谱和制备型高效液相色谱等方法对七叶皂苷的肠菌代谢产物进行分离和代谢转化产物的鉴定。结果 代谢产物经 IR、MS 和 NMR 鉴定为: 2 β -巴豆酰基原七叶皂苷元(I), 2 β -当归酰基原七叶皂苷元(II), 2 β -巴豆酰基-2 α -乙酰基原七叶皂苷元(III), 2 β -当归酰基-2 α -乙酰基原七叶皂苷元(IV)。其中 III 和 IV 为首次发现的新天然产物。结论 在离体条件下, 七叶皂苷可被人肠内菌代谢为 2 β -巴豆酰基原七叶皂苷元(I)、2 β -当归酰基原七叶皂苷元(II)、2 β -巴豆酰基-2 α -乙酰基原七叶皂苷元(III)、2 β -当归酰基-2 α -乙酰基原七叶皂苷元(IV)。

关键词: 七叶皂苷; 七叶树属; 肠内菌群

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-0970-04

Study on aescin metabolism in intestinal flora *in vitro*

CHEN Ji-yong^{1,2}, WU Li-jun¹, TENG Hou-lei², LIU Ke²

(1. College of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264003, China)

Abstract **Object** To study the aescin metabolism in human intestinal flora *in vitro*. **Methods** Human intestinal flora and aescin were incubated *in vitro*. TLC and HPLC were used to examine aescin and its metabolites; the metabolites were separated and purified by silica gels column chromatography and preparation high performance liquid chromatography. **Results** Their structures were identified by IR, MS and NMR as 2 β -tigloyl-protoaescigenin (I), 2 β -angeloyl-protoaescigenin (II), 2 β -tigloyl-2 α -acetyl-protoaescigenin (III), 2 β -angeloyl-2 α -acetylprotoaescigenin (IV). Among them II and IV were new natural products found from this plant. **Conclusion** Aescin can be *in vitro* metabolized by intestinal flora into 2 β -tigloyl-protoaescigenin (I), 2 β -angeloyl-protoaescigenin (II), 2 β -tigloyl-2 α -acetylprotoaescigenin (III), 2 β -angeloyl-2 α -acetylprotoaescigenin (IV).

Key words aescin; *Aesculus* L.; intestinal flora

七叶皂苷为七叶树属 *Aesculus* L. 多种植物中含有的总皂苷, 现收载于德国药品法典 (DAC) 1997 年版^[1]和中国国家药品标准^[2], 其主要成分为七叶皂苷 A、B、C、D (α -aescin and β -aescin), 化学结构见图 1。七叶皂苷的主要生物活性为抗炎、消肿、抗渗出。在欧洲, 其适应症主要为外周循环障碍所致的水肿, 主要以口服和外用剂型为主。七叶皂苷口服的原型生物利用度极低, 仅为 0.98%^[3,4]。七叶皂苷在体内的药物代谢研究较少, 其肠道菌代谢的研究目前尚未见报道。有关天然皂苷肠道代谢的研究以日本学者小桥恭一教授为先导者, 他先后证明人参皂苷、甘草皂苷等多种皂苷口服大多以经肠道菌代谢后所

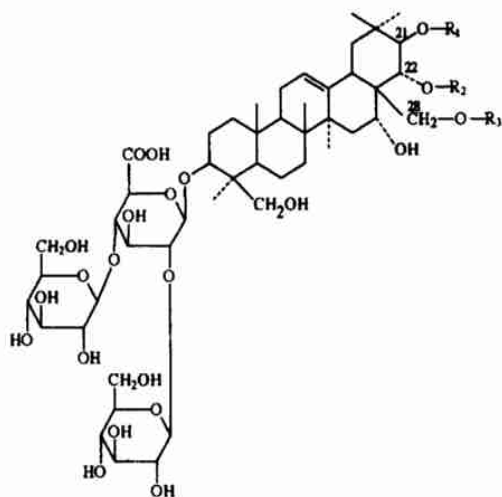
得的活性代谢产物入血发挥其疗效。并提出了天然前药的概念^[5]。本实验试图研究七叶皂苷的体内肠道菌代谢转化途径。

本实验采用离体实验的代谢研究方法, 用富含肠内菌的粪便悬浮液与药物在厌氧条件下温孵, 利用硅胶柱色谱和制备型高效液相色谱从温孵物中得到了 4 种代谢产物, 采用核磁共振谱等方法鉴定了它们的结构, 分别为 2 β -巴豆酰基原七叶皂苷元 (I)、2 β -当归酰基原七叶皂苷元 (II)、2 β -巴豆酰基-2 α -乙酰基原七叶皂苷元 (III)、2 β -当归酰基-2 α -乙酰基原七叶皂苷元 (IV), 并根据此推断了七叶皂苷的肠道菌代谢途径。

* 收稿日期: 2003-05-06

作者简介: 陈继永 (1973-), 男, 1997 年毕业于沈阳药科大学, 现在读沈阳药科大学药化专业在职硕士。

* 通讯作者 Tel (0535) 6713858 E-mail liuke@luye-pharm.com



		R ₁	R ₂	R ₃
七叶皂苷 A(β-aescin)		巴豆酰基	-COCH ₃	-H
七叶皂苷 B(β-aescin)		当归酰基	-COCH ₃	-H
七叶皂苷 C(α-aescin)		巴豆酰基	-H	-COCH ₃
七叶皂苷 D(α-aescin)		当归酰基	-H	-COCH ₃

图 1 七叶皂苷的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of aescin

1 仪器和材料

熔点用 X-4 熔点测定仪。红外光谱用 Perkin-Elmer FT-IR 光谱仪, KBr 压片。核磁共振波谱仪为 DELTA-600 型 (¹H-NMR, 600 MHz, ¹³C-NMR, 150 MHz TMS 为内标) Mariner TOF-MS 质谱仪。柱色谱用硅胶 (200~300 目) 及薄层色谱用硅胶均系青岛海洋化工厂产品。厌氧培养罐 (825-A 型, 沈阳市第五人民医院); 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 检测波长为 220, 205 nm 美国 Varian 制备型液相色谱仪, 制备型色谱柱: Hypersil C₁₈ (300 mm×20 mm, 10⁴ μm), 流动相为甲醇-水, 流速为 5.0 mL/min。七叶皂苷 (含七叶皂苷 A, B, C, D) 由山东绿叶制药股份有限公司提供, 经精制后纯度为 98%; 厌氧培养液的组成及制备^[6]: 37.5 mL A 液 (0.78% K₂HPO₄), 37.5 mL B (0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.23% MgSO₄·H₂O), C 液 50 mL 8% Na₂CO₃ L-半胱氨酸 0.5 g, 2 mL 25% 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, 盐酸调 pH 7.5~8.0 乙腈为色谱纯, 其他化学试剂均为分析纯。

2 离体厌氧培养人肠内菌对七叶皂苷的代谢

按文献方法^[7]取新鲜的健康志愿者的粪便, 按 0.5 g: 1.5 mL 加入厌氧培养液, 用玻璃棒打碎, 经纱布滤过得到含菌培养液。加入七叶皂苷钠使培养

液中皂苷的浓度为 1 mg/mL, 并作空白对照, 密闭恒温 37℃ 培养。分别于 0, 8, 12, 24, 48, 72 h 各取样 5 mL, 经水饱和正丁醇萃取 3 次, 合并萃取液蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL, 供 HPLC 检测用。

3 色谱条件

流动相为乙腈-水 (40:60); 20~50 min, 乙腈量 40~80; 51~55 min, 乙腈量 80~40; 56~60 min, 乙腈量 40; 柱温为 40℃, 流速为 1.0 mL/min。检测波长为 220, 205 nm。

4 代谢产物的分离和纯化

按上述方法配制厌氧培养液 2 L, 加入七叶皂苷厌氧培养, 培养结束后, 溶液经水饱和正丁醇萃取, 萃取液浓缩蒸干后, 得浸膏, 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 在氯仿-甲醇 (9:1) 洗脱部分得化合物 246 nm, 此流份中得到空白对照中未出现的几个峰, 且极性较小, TLC 鉴别硫酸-乙醇显红色, 初步确定为皂苷的代谢物, 经过进一步柱色谱分离和制备 HPLC 分离, 得到 4 个主要代谢产物 I~IV。

5 代谢产物的鉴定

化合物 I: 为白色粉末。¹³C-NMR 数据见表 1 ESI-MS, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 光谱数据与文献报道^[8]的一致, 鉴定为 2β-巴豆酰基原七叶皂苷元。

化合物 II: 白色粉末。¹³C-NMR 数据见表 1 ESI-MS, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 光谱数据与文献报道^[8,9]的一致, 化合物 II 鉴定为 2β-当归酰基原七叶皂苷元。

化合物 III: 白色粉末。ESI-MS *m/z* 630 [M]⁺, 530 [M⁺ - tiglic acid], 653 [M⁺ + Na], 470 [M⁺ - tiglic acid - CH₃CO - H₂O] ¹H-NMR (600 MHz, pyridine-d₅) δ 0.92, 1.00, 1.10, 1.31, 1.54, 1.81 (各 3H, s, 6×CH₃); 1.58 (3H, d, Tig-4-Me), 1.91 (3H, d, Tig-5-Me), 1.84 (3H, s, OAc-Me), 3.11 (1H, t, H-3), 3.67 (1H, d, Ha-24), 6.48 (1H, d, J=10.0 Hz, H-21), 7.01 (1H, dq, Tig-3)。比较 III 与 I 的 ¹³C-NMR 数据, 除多一个乙酰基信号外, 22 位碳的化学位移向高场移动了 2, 推断 III 为 I 的 22 位乙酰化物。¹³C-NMR 数据见表 1 综上所述数据, 化合物 III 鉴定为 2β-巴豆酰基-22α-乙酰基原七叶皂苷元。

化合物 IV: 白色粉末。ESI-MS *m/z* 630 [M]⁺, 530 [M⁺ - angelic acid], 653 [M⁺ + Na], 470 [M⁺ - angelic acid - CH₃CO - H₂O] ¹H-NMR (600 MHz, pyridine-d₅) δ 0.92, 1.00, 1.13, 1.31, 1.56, 1.82 (各 3H, s, 6×CH₃); 2.05 (3H, d, Ang-4-Me), 1.96

(3H, s, Ang-5-Me), 1. 82(3H, s, OAc-Me), 2. 87(1H, dd, C₁₈-H), 3. 09(1H, t, C₃-H), 5. 88(1H, dq, Ang-3), 6. 48(1H, d, J= 10. 0 Hz, H-21) 比较Ⅳ与Ⅱ的¹³C-NMR数据,除多一个乙酰基信号外,22位碳的化学位移向高场移动了2,推断Ⅳ为Ⅱ的22位乙酰化物¹³C-NMR数据见表1 综上数据,化合物Ⅳ鉴定为2β-当归酰基-22α-乙酰基原七叶皂苷元

表 1 代谢产物Ⅰ~Ⅳ的¹³C-NMR光谱数据(氘代吡啶)

Table 1 ¹³ C-NMR spectral data of compounds I - IV (pyridine-d ₅)				
碳位	I	II	III	IV
1	38. 9	38. 9	38. 9	38. 9
2	28. 5	28. 5	28. 5	28. 4
3	80. 1	80. 1	80. 1	80. 1
4	43. 2	43. 2	43. 2	43. 2
5	56. 4	56. 4	56. 4	56. 3
6	19. 1	19. 1	19. 1	19. 1
7	33. 5	33. 5	33. 5	33. 5
8	40. 1	40. 1	40. 1	40. 1
9	47. 2	47. 2	47. 3	47. 3
10	37. 0	37. 0	37. 0	37. 0
11	24. 1	24. 1	24. 2	24. 2
12	123. 1	123. 1	123. 1	123. 1
13	143. 5	143. 5	142. 8	142. 7
14	41. 9	41. 9	41. 8	41. 8
15	34. 4	34. 4	34. 6	34. 6
16	68. 0	67. 9	67. 6	67. 7
17	48. 2	48. 2	47. 2	47. 2
18	40. 5	40. 5	40. 6	40. 6
19	47. 9	47. 9	47. 1	47. 1
20	36. 4	36. 2	36. 3	36. 1
21	82. 0	81. 6	81. 5	81. 2
22	72. 9	73. 0	71. 1	71. 0
23	23. 6	23. 6	23. 6	23. 5
24	64. 6	64. 6	64. 6	64. 5
25	16. 9	16. 8	17. 0	17. 0
26	16. 2	16. 2	16. 2	16. 2
27	27. 4	27. 4	27. 4	27. 4
28	66. 0	66. 0	66. 4	66. 4
29	29. 9	29. 9	29. 8	29. 8
30	20. 3	20. 4	20. 2	20. 2
T或 A-1	168. 6	168. 6	168. 4	168. 5
T或 A-2	129. 9	129. 6	129. 8	129. 5
T或 A-3	136. 1	136. 0	136. 2	136. 2
T或 A-4	14. 1	15. 9	14. 1	15. 8
T或 A-5	12. 4	21. 1	12. 4	20. 7
乙酰基-1			170. 7	170. 7
乙酰基-2			20. 8	21. 0

T= 巴豆酰基, A= 当归酰基
T= tigloyl, A= angeloyl

6 讨论

肠道内细菌对具有苷键的药物进行水解是因为糖类化合物是肠道内细菌重要的碳源^[10]。在离体实验中,人肠内菌对 aescin的代谢产物经 HPLC检测分析,可以看到随着培养时间的延长,原型药物在逐

渐减少,代谢产物的量逐渐增多,但是代谢时间比较长,可能是体外培养与体内是有差别的。由于七叶皂苷的极性较大,而代谢产物的极性很小,本实验采用 HPLC梯度洗脱的方式,结合 TLC的检测结果,更准确方便的观察原型药物和代谢产物的变化。也有必要进一步对口服 aescin后原型及代谢产物入血的情况进行研究,并对其生物活性方面进行考察,从而对新药的开发奠定化学和药理学基础。

基于上述的研究结果推测七叶皂苷在人体的代谢途径见图 2

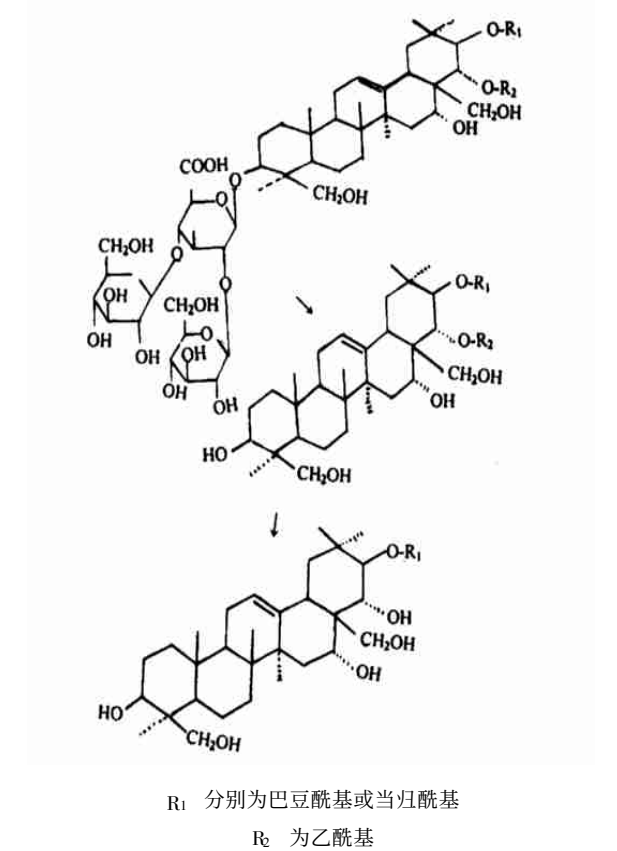


图 2 七叶皂苷肠道菌代谢的可能途径

Fig. 2 Possible way of aescin metabolism in intestinal flora

References

[1] Deutsche Arzneimittel Codex (DAC) [S]. A-030, 1997.
[2] National Drug Standard, State Drug Administration of P R China (中华人民共和国药品监督管理局国家药品标准) [S]. WSI-XG-003-99.
[3] Hager Handbuch der Pharmazeutischen Praxis [M]. Band 4, Berlin-Heidelberg-New York Springer Verlag, 1994.
[4] Dittgen M, Zimmermann H, Wober W, et al. Studies on the bioavailability of beta-aescin following oral administration of various dosage forms [J]. Pharmazie, 1996, 51(8): 608-610.
[5] Akao T. Metabolic activation of crude drug components by intestinal bacterial enzymes [J]. J Med Pharm Soc, 1992, (9): 1-13.
[6] Hattoni M, Shu Y Z, Shimizu M, et al. Metabolism of

- paeoniflorin and related compound by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, (33): 3838-3842
- [7] Wang Y, Liu T H, Wang W, *et al*. Research on the transformation of ginsenoside R_{g1} by intestinal flora [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(3): 188-190.
- [8] Zhao J, Yang X W. Studies on the chemical constituents of Japanese Buckeye seed (*Aesculus turbinata*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 327-331.
- [9] Yang L, Zhao X A. Studies on triterpenoid saponins from seeds of *Aesculus wilsonii* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(10): 617-618.
- [10] Kyoichi K, Teruaki A. Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides [J]. *Bioscience Microflora*, 1997, 16(1): 1-3.

碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究

李 平,王艳辉,马润宇*

(北京化工大学 可控化学反应科学与技术基础教育部重点实验室,北京 100029)

摘要:目的 研究碱提山茱萸多糖的单糖组成及抗氧化活性。方法 经热水抽提后的山茱萸残渣用碱提取,盐酸中和、浓缩、透析、乙醇沉淀、DEAE纤维素柱色谱分离,再通过 Sephadex G-200柱色谱进一步纯化,得到白色粉末状多糖 PFCCI。结果 该多糖经过完全酸水解、薄层色谱、红外光谱分析,证明 PFCCI 由木糖和葡萄糖以 18.8 : 81.2 摩尔比组成,平均相对分子质量为 7.57×10^4 。以羟基自由基 ($^{\circ}\text{OH}$)清除剂苯甲酸和甘露醇为对照,用 Fenton 反应检测 PFCCI 对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除作用,三者对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除率达 50% 所需浓度为 18, 330, 80 $\mu\text{g/mL}$ 。PFCCI 可以有效抑制猪油和芝麻油的氧化,对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率达 50% 所需浓度为 35.0 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 该多糖为首次提取制得,具有良好的抗油脂氧化及清除自由基能力。

关键词: 山茱萸;多糖;理化性质;抗氧化

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-0973-04

Study on physiochemical characteristic and antioxidation activity of polysaccharide extracted with sodium hydroxide from fruit of *Cornus officinalis*

LI Ping, WANG Yan-hui, MA Run-yu

(Key Laboratory of Science and Technology of Controllable Chemical Reactions, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract **Object** To study the chemical composition and antioxidation activity of polysaccharide from the fruit of *Cornus officinalis* Zieb. et Zucc. **Methods** The polysaccharide PFCCI was isolated from *C. officinalis* through NaOH extraction, neutral reaction, ethanol precipitation and DEAE-cellulose column chromatography. It was further purified by Sephadex G-200 column chromatography. **Results** The molecular weight of PFCCI was 7.57×10^4 . Monosaccharide composition analysis by TLC and HPLC showed that it was composed of xylose and glucose in a molar ratio of 18.8 : 81.2. PFCCI had strong activities of oxidation resistance to axunge and gingili. It also had an action to scavenging hydroxyl free radical ($^{\circ}\text{OH}$) generated by Fenton reaction and superoxide anion free radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generated by pyrogallol autoxidation system. The scavenging activity to $^{\circ}\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ was represented by the content scavenging 50% of all radicals or anion (E_{50}), which were 80 $\mu\text{g/mL}$ and 35.0 $\mu\text{g/mL}$ respectively. **Conclusion** This polysaccharide is isolated from *C. officinalis* for the first time, which could resist oxidation of axunge and gingili and scavenge free radical effectively.

Key words *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; polysaccharide; physiochemical characteristic; antioxidation

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,性平、味酸,

* 收稿日期: 2003-01-07

作者简介: 李 平 (1973-),女,山东济南人,博士研究生,研究方向为生化分离与制药工程

Tel (010) 64433790 E-mail lpxa@163.com

* 通讯作者 Tel (010) 64433790 Fax: (010) 64423610 E-mail r.ma@mail.buct.edu.cn