

肠道菌群对菊花提取物的代谢作用

李丽萍, 蒋惠娣*

(浙江大学药学院 药物分析与代谢研究室, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 观察和比较人、大鼠、Beagle 犬及家兔肠道菌群对菊花提取物(*Chrysanthemum morifolium* extracts, CME)的代谢作用。方法 采用人、大鼠、Beagle 犬及家兔的新鲜粪便 37 °C 厌氧培养, 经醋酸乙酯提取后采用 RP-HPLC 及 LC-MS 方法对代谢成分进行分离和定性、定量分析。结果 CME 容易被肠道菌群代谢, 0.5 h 后样本中能检测出较高浓度代谢物; 经 LC-MS 检测, 主要的代谢物为木犀草素和芹菜素; 随着代谢时间的延长, 两者均出现降解代谢的现象, 24 h 后几乎检测不到这两种代谢物; 且人、大鼠和 Beagle 犬肠道菌群对 CME 的代谢较快, 而家兔肠道菌群对 CME 的代谢过程比较平缓。结论 在离体条件下, CME 可以被人、大鼠、Beagle 犬及家兔的肠道菌群代谢, 主要的代谢物为木犀草素和芹菜素。

关键词:菊花提取物; 木犀草素; 芹菜素; 肠道菌群代谢; 高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)07-1001-04

Metabolism of *Chrysanthemum morifolium* extracts in intestinal flora

LI Li-ping, JIANG Hui-di

(Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: Objective To study and compare the metabolism of *Chrysanthemum morifolium* extracts (CME) *in vitro* intestinal flora from human, rat, Beagle dog, and rabbit. **Methods** Intestinal flora of human, rat, Beagle dog, and rabbit and CME were anaerobically cultured at 37 °C *in vitro*. After being extracted by acetic ether, the main metabolites of CME were separated and quantified by HPLC. **Results** *In vitro*, CME was easily metabolized by the intestinal flora and the main metabolites in incubation medium were determined in high concentration after 0.5 h. By LC-MS, luteolin and apigenin were identified, respectively; both metabolites were degraded with prolongation of incubation time and the concentrations of luteolin and apigenin were low after 24 h; moreover, CME was quickly metabolized by human, rat, Beagle dog intestinal flora, and gently by rabbit intestinal flora. **Conclusion** *In vitro*, CME is easily metabolized by intestinal flora human, rat, Beagle dog, and rabbit and the main metabolites are luteolin and apigenin.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat. extracts (CME); luteolin; apigenin; intestinal flora metabolism; HPLC

菊花为菊科菊属植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 为亦食亦药的常用药物, 具有抗氧化、抗心肌缺血等功效^[1,2], 夏天以菊花代茶饮用可以达到解除暑热的目的^[3]。菊花中含有较多的黄酮类化合物^[4], 且主要以黄酮苷的形式存在, 其中以木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的量较高^[5]。文献报道, 动物口服黄酮苷类化合物, 在体内经过肠道微生物区系^[6]、上皮细胞以及相应的肝脏生物转化酶^[7]等酶系分别转化为相应的苷元。菊花提取物(C.

morifolium extract, CME)经动物口服后, 其中木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷可分别转化为木犀草素和芹菜素^[8]。本实验采用离体方法, 以 LC/MS 及 HPLC 法定性定量分析菊花提取物主要代谢产物, 研究其在人、大鼠、Beagle 犬及家兔肠道菌群的代谢情况, 据此来推断菊花提取物的肠道菌群代谢途径, 证明了木犀草素与芹菜素为口服菊花制剂的体内效应成分, 其抗氧化、扩血管等药理作用与菊花提取物的作用吻合, 对指导临床合理用药将具有重要的意义。

收稿日期: 2005-11-22

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y204379); 浙江省中药现代化专项资助(G20050066)

作者简介: 李丽萍, 硕士研究生。

* 通讯作者 蒋惠娣 Tel: (0571) 87217226 E-mail: hdjiang@zju.edu.cn

1 实验材料

木犀草素对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 111520-200201), 芹菜素对照品购自 Sigma 公司(质量分数 > 99%, 批号 064K0653); 菊花提取物(*C. morifolium* extract, CME)自杭白菊提取、纯化, 经酸水解后测定木犀草素和芹菜素质量分数分别为 7.60%、5.19%, 由本院药物研究所提供。

VPI 盐溶液: 0.2 g CaCl_2 和 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 蒸馏水中, 待完全溶解后, 加入 1.0 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g KH_2PO_4 、10.0 g NaHCO_3 和 2.0 g NaCl , 搅拌溶解后加蒸馏水至 1 000 mL, 混匀。肠道菌厌氧培养液: 20 g 胰蛋白胨、10 g 酵母浸膏、0.5 g 半胱氨酸盐酸盐和 40 mL VPI 盐溶液, 加蒸馏水至 1 000 mL, 加热搅拌溶解, 用 NaOH 试液调 pH 7.3, 分装后 121 °C 高压灭菌 15 min, 冷却后置 4 °C 保存。胰蛋白胨(批号 0316S05)和酵母浸膏(批号 0104S04)购自 BIO BASIC INC.; 色谱甲醇购自美国 Merk 公司; 醋酸乙酯和异丙醇试剂为分析纯; 水为重蒸水; 粪便采于健康的动物体(大鼠: 雄性成年 Sprague-Dawley, 200~250 g; 家兔: 新西兰长耳白兔, 2.0~2.5 kg, 大鼠和家兔均由浙江大学实验动物中心提供, 清洁二级, 动物合格证号: 医动字第 2001001 号; Beagle 犬: 雄性, 13.0~15.0 kg, 由广东肇庆实验动物中心提供, 清洁二级, 动物合格证号: 粤检证字 2002A026 号)及健康志愿者(男性, 55~60 kg)。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(G1311A 四元泵; DAD 检测器; 柱温箱; Agilent 化学工作站; 自动

进样器); 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 的磷酸溶液(52 : 48); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 350 nm; 进样量: 50 μL 。

2 方法与结果

2.1 人及动物离体厌氧培养液的制备: 人、大鼠、Beagle 犬及家兔的新鲜粪便与生理盐水按比例 1 g : 4 mL 混合制成悬浊液, 2 000 r/min 离心 10 min 后得上清液, 即为肠道菌液。取 5 mL 肠道菌液, 加置 90 mL 厌氧培养液中, 混匀后置于 37 °C 厌氧培养箱(向培养箱中的密闭罐中通入氢气, 在催化剂作用下氢与罐内氧气反应去除罐内氧气, 再充以 90% N_2 和 10% CO_2 的混合气体以使密闭罐内造成缺氧环境, 用于肠道厌氧菌培养)中培养 24 h, 使培养液中的肠道菌充分生长。

2.2 肠道菌对菊花提取物(CME)的代谢: 向上述预孵育液中加入 5 mL CME 溶液(质量浓度 110.0 $\mu\text{g/mL}$)混匀, 再将混匀的溶液分装(0.5 mL/管), 置于 37 °C 厌氧培养箱中分别厌氧孵育 0、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h, 然后用 3.0 mL 醋酸乙酯旋涡提取 5 min, 混匀, 4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液 2.0 mL, 真空抽干, 残渣加 0.5 mL 流动相溶解, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 50 μL 进样。

2.3 HPLC 方法建立

2.3.1 方法的选择性: 通过调节流动相比比例, 结果在甲醇与 0.2% 磷酸溶液为 52 : 48 时, CME 代谢物木犀草素和芹菜素的分离度较好, 且孵育液中其他组分不影响实验分析(图 1)。

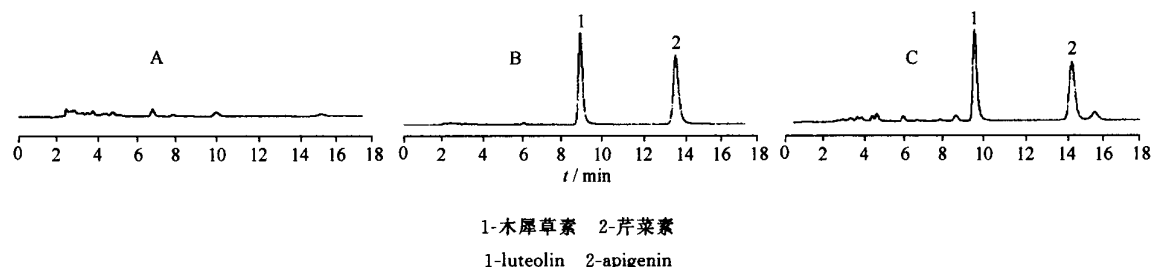


图 1 空白肠道菌孵育液(A)、加木犀草素和芹菜素对照品的质控肠道菌孵育液(B)和代谢 0.5 h 后的肠道菌(Beagle 犬)孵育液(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank incubation medium of intestinal flora (A), quality control sample of incubation medium spiked with luteolin and apigenin (B), and intestinal flora sample (Beagle dog) incubated after 0.5 h (C)

2.3.2 木犀草素和芹菜素在肠道菌孵育液中线性关系的考察: 在含有 0.5 mL 预先灭菌过的肠道菌(人、大鼠、Beagle 犬及家兔)孵育液中, 精密加入 20 μL 木犀草素和芹菜素的对照溶液(木犀草素

0.083 5~10.23 $\mu\text{g/mL}$, 芹菜素 0.076 9~9.231 $\mu\text{g/mL}$), 混匀后精密加入 3.0 mL 醋酸乙酯, 按 2.2 项下方法操作。HPLC 分析结果表明, 木犀草素和芹菜素在人、大鼠、Beagle 犬和家兔肠道菌孵育液中分别在

0.083 5~10.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.076 9~9.231 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好,线性回归方程见表 1。

表 1 木犀草素和芹菜素的线性回归方程
Table 1 Linear regression equations of luteolin and apigenin

试验对象	木犀草素			芹菜素		
	回归方程	<i>r</i>		回归方程	<i>r</i>	
人	$Y=163.66 X+7.840$	0.999 1		$Y=177.11 X-7.642$	0.999 0	
大鼠	$Y=165.67 X+23.41$	0.998 1		$Y=182.03 X+0.299 8$	0.999 4	
Beagle 犬	$Y=146.52 X-31.66$	0.998 1		$Y=149.87 X-10.24$	0.999 4	
家兔	$Y=151.64 X-12.49$	0.999 6		$Y=144.24 X-9.152$	0.999 6	

2.3.3 方法精密度和回收率试验:在含有 0.5 mL 预先灭菌过的肠道菌(人、大鼠、Beagle 犬及家兔)孵育液中,精密加入 20 μL 高、中、低质量浓度的木犀草素和芹菜素的对照溶液(木犀草素 0.083 5、5.000 0、10.23 $\mu\text{g/mL}$;芹菜素 0.076 9、4.615、9.231 $\mu\text{g/mL}$),每个质量浓度平行 5 份。混匀后,精密加入 3.0 mL 醋酸乙酯,按 2.2 项下方法操作。HPLC 分析结果表明,日内 RSD 木犀草素均小于 5.1%,芹菜素均小于 3.6%;木犀草素和芹菜素绝对回收率分别高于 91.1%和 91.8%。

2.3.4 木犀草素和芹菜素在肠道菌孵育液中稳定性试验:在含有 0.50 mL 预先灭菌过的肠道菌(人、大鼠、Beagle 犬及家兔)孵育液中,精密加入 20 μL 高、低质量浓度的木犀草素和芹菜素的对照溶液(木犀草素 0.083 5 和 10.23 $\mu\text{g/mL}$;芹菜素 0.076 9 和

9.23 $\mu\text{g/mL}$),每个质量浓度平行 3 份。混匀后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养箱中分别厌氧孵育 0、4、8、18、24 h,然后用 3.0 mL 醋酸乙酯旋涡提取 5 min,按 2.2 项下方法操作。用 HPLC 分析,以 0 h 组检测到的木犀草素和芹菜素峰面积为 100%,依据各孵育一定时间后峰面积与 0 h 组的峰面积之比来考察两者在孵育液中的稳定性。结果表明,低质量浓度的木犀草素和芹菜素在孵育液中厌氧孵育 24 h 后其峰面积比值均大于 >95.7%,表明两者在 24 h 内稳定;而高质量浓度木犀草素和芹菜素在 18 h 内稳定,24 h 后两者的峰面积比值仅为 67.6%和 77.2%。

2.4 菊花提取物的体外肠道菌代谢:HPLC 结果表明 CME 很快被离体培养的人、大鼠、Beagle 犬及家兔肠道菌所代谢,经 LC-MS(EIS 离子化,阴离子模式)检测,主要的代谢物为木犀草素和芹菜素,分子离子峰分别为 285.2 和 269.2(图 2);经光谱分析(DAD 检测),两代谢物的紫外光谱与木犀草素、芹菜素对照品的紫外光谱吻合。检测到两者的质量浓度均在线性范围之内,且 0.5 h 后样本中能检测出较高质量浓度的木犀草素和芹菜素(6.388、8.022、7.387、6.280 $\mu\text{g/mL}$ 和 4.789、5.238、6.133、5.504 $\mu\text{g/mL}$)。而且随着代谢时间的延长,生成的木犀草素和芹菜素又会被肠道菌降解代谢,24 h 后几乎检测不到这两种代谢物(图 3)。

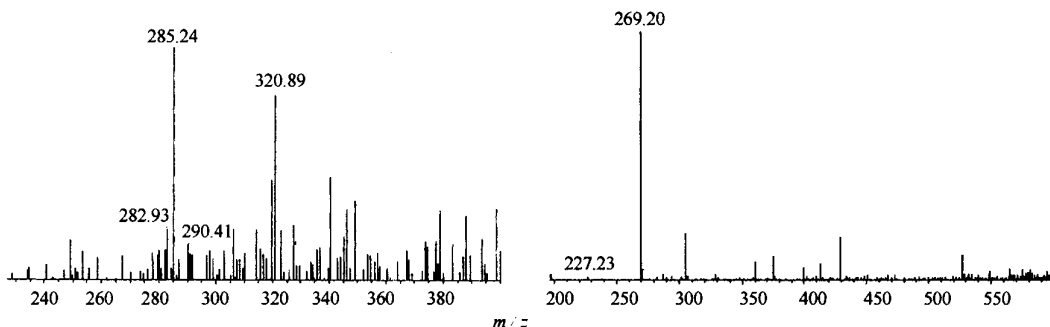


图 2 木犀草素(m/z 285.24)和芹菜素(m/z 269.20)的 LC-MS 图谱

Fig. 2 LC-MS Chromatograms of luteolin (m/z 285.24) and apigenin (m/z 269.20)

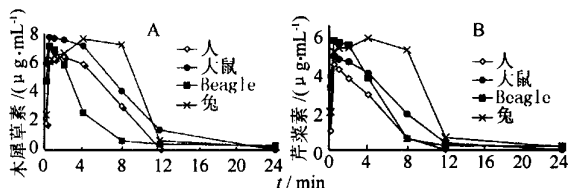


图 3 木犀草素(A)和芹菜素(B)在培养液中的质量浓度-时间曲线

Fig. 3 Concentration-time profile of luteolin (A) and apigenin (B) in incubation medium

4 讨论

糖类化合物是肠道菌群重要的碳源。因此,肠道细菌的苷键水解酶系对具有苷键的药物进行水解是肠道菌群代谢药物的一大特征^[9]。本实验室的研究已经证明,在犬及大鼠肝微粒体中,菊花提取物中的主要黄酮苷不会转化成相应的苷元,同时也已经证明,在人、犬以及大鼠口服菊花提取物后,其血浆中均检测不到黄酮苷的存在,而能检测到其相应的苷元(木犀草素、芹菜素),说明动物口服菊花提取物后

主要黄酮苷在肠道菌水解酶或小肠上皮细胞水解酶作用下转变为相应的苷元,菊花提取物在小肠上皮细胞中的转化正在研究中。

本实验中,人、大鼠、Beagle 犬及家兔肠道菌对 CME 的代谢产物经 HPLC 检测分析,可以看到随着孵育时间的延长,至 24 h 后孵育液中均检测不到木犀草素和芹菜素。虽然高质量浓度的木犀草素和芹菜素与灭活的肠道菌孵育 24 h 后有一定程度的降解,但降解率仍小于 32.4%。说明 CME 中所含的木犀草素和芹菜素的糖苷在被肠道菌代谢为木犀草素和芹菜素苷元的同时,两苷元也受肠道菌群的降解代谢,转化为其他代谢产物。从厌氧培养液中代谢物木犀草素和芹菜素的浓度-时间曲线可以看出人、大鼠和 Beagle 犬肠道菌对 CME 的代谢过程较为相似,而家兔肠道菌对 CME 中主要黄酮苷的代谢与其差别较大,在 1.0~8 h 的代谢与降解过程基本趋于平衡。从已经完成的动物中菊花效应成分药动学结果看,木犀草素和芹菜素在人、大鼠和 Beagle 犬血浆中出现最高血药浓度($C_{\max}$)的时间,即 $t_{\max}$ 为 1.0 h 左右,而在家兔血浆中为 4.0 h,此现象与肠道菌代谢结果基本一致^[10,11]。

在口服 CME 的家兔血浆检测不到芹菜素存在,而在人、犬以及大鼠血浆可检测到木犀草素及芹菜素^[10,11]。另外,在人和大鼠血浆,芹菜素质量浓度远高于木犀草素中,而在犬血浆,木犀草素质量浓度高于芹菜素的质量浓度。然而本研究显示,同一时间,木犀草素及芹菜素的质量浓度差别不大,因此本研究提示:木犀草素及芹菜素在不同种属动物中的吸收可能存在较大的差别。

随着黄酮类化合物开发和应用的不断扩大,有关其生物利用度、药动学以及代谢诸方面的研究越来越受人们重视。曾有文献报道,芹菜素在体外孵育的肝脏微粒体中能被转化为木犀草素^[12,13],本实验也曾经研究过芹菜素在肠道菌中的转化,遗憾的是并未测定出木犀草素。综上所述,CME 易被肠道菌代谢,因此对口服后吸收入血或肝脏微粒体的代谢

产物进一步研究,将有助于初步了解服用 CME 后,其在体内的代谢转化部位和发挥药效的有效成分,以及深入理解其作用机制。

致谢:本研究中肠道菌厌氧培养得到本校医学院微生物研究室严杰教授的指导和帮助。

References:

- [1] Wang T, Jiang H D, Ji Y P, et al. Anti-oxidation effect of water extract of *Flos Chrysanthemi* on heart and brain *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2001, 24 (2): 122-124.
- [2] Jiang H D, Xia Q, Xu W H, et al. *Chrysanthemum morifolium* attenuated the reduction of contraction of isolated rat heart and cardiomyocytes induced by ischemia/reperfusion [J]. *Pharmazie*, 2004, 59 (7): 565-567.
- [3] Yang J, Jiang H D, Ge Z, et al. Variation of the contents of chlorogenic acid and other components in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. collected at different time [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38 (11): 833-836.
- [4] Hu C, Ding X L. Study of protection of *Chrysanthemum* extract on the human erythrocyte membrane [J]. *Food Sci*, 1996, 17 (2): 7-12.
- [5] Liu J Q, Wu D L, Wang L, et al. Quantitative determination of contents of flavone glycosides in *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (4): 308-310.
- [6] Walle T, Otake Y, Walle U K, et al. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption [J]. *J Nutr*, 2000, 130: 2658-2661.
- [7] Doostdar H, Burke M D, Mayer R T. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1 [J]. *Toxicology*, 2000, 144: 31-38.
- [8] Dai M, Liu Q Y, Li D P, et al. Research of material bases on antifebrile and hypotensive effects of *Flos Chrysanthemi* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2001, 24 (7): 505-506.
- [9] Kobashi K, Zhong D F, Jiang H, et al. Characterization of some glucuronide 12 conjugates by electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (中国药理学报), 1998, 33 (11): 849-854.
- [10] Li L P, Jiang H D, Wu H H, et al. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37: 615-620.
- [11] Li L P, Jiang H D, Wu H H, et al. Studies on effective component pharmacokinetics of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. extracts and its acid hydrolysate in rabbits [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2005, 40 (24): 1884-1887.
- [12] Liu C S, Song Y S, Zhang K, et al. Gas chromatographic/mass spectrometric profiling of luteolin and its metabolites in rat urine and bile [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1995, 13: 1409-1414.
- [13] Nielsen S E, Breinholt V, Justesen U, et al. *In vitro* bio-transformation of flavonoids by rat liver microsomes [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28: 389-401.

《中草药》杂志被评为“第四届中国百种杰出学术期刊”

2005 年 12 月,中国科学技术信息研究所公布了“第四届中国百种杰出学术期刊”名单,《中草药》杂志获此殊荣——“第四届中国百种杰出学术期刊”。这个名单是按照期刊评价指标体系对重要指标(影响因子、总被引频次、他引总引比、基金论文比和即年指标)进行打分的结果,并在近几年来召开了 20 余场专家研讨会,对评价指标不断进行推敲和改进而评出的。

摘引自中国科学技术信息研究所《2004 年度中国科技论文统计与分析年度研究报告》