

肠道菌群对石榴皮鞣质的分解代谢作用研究

陈 鹏¹, 涂晶晶¹, 李巧玲¹, 周本宏^{1,2*}

1. 武汉大学人民医院 药学部, 湖北 武汉 430060

2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072

摘 要: 目的 考察肠道菌群对石榴皮鞣质的分解代谢作用, 阐明石榴皮鞣质在肠道的代谢途径。方法 将石榴皮鞣质与大鼠肠道菌群共同孵育 4、6、8、12、24、48 h 后, 检测不同时间点溶液中的代谢成分。结果 通过 LC-MS/MS 从石榴皮鞣质肠道菌群孵育液中共鉴别出了 10 个代谢产物, 分别为尿石素 B、没食子酸、焦性没食子酸、3-O-甲基没食子酸、尿石素 A、甲基化尿石素 A、尿石素 C、尿石素-M6、葡萄糖醛酸化尿石素 A、葡萄糖醛酸化尿石素 C。结论 石榴皮鞣质在肠道菌群中主要通过代谢酶的水解、还原等作用将其代谢成具有生理活性的小分子化合物, 这些化合物有可能是石榴皮鞣质在机体内发挥药理活性的物质基础。

关键词: 石榴皮鞣质; 肠道菌群; 代谢产物; LC-MS/MS; 没食子酸; 尿石素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)14-3396-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.019

Study of metabolism of tannins from *Granati Pericarpium* in intestinal flora

CHEN Peng¹, TU Jing-jing¹, LI Qiao-ling¹, ZHOU Ben-hong^{1,2}

1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: Objective To investigate the metabolism effect of tannins from *Granati Pericarpium* in intestinal flora for elucidating the metabolic pathway of tannins from *Granati Pericarpium* in the intestinal flora. **Methods** Pomegranate tannins were incubated with rats intestinal flora for 4, 6, 8, 12, 24, and 48 h. The content was then detected at different times. **Results** A total of 10 metabolites were detected in the rats intestinal flora by LC-MS, namely urolithin B, gallic acid, pyrogallol, 3-O-methylgallic acid, urolithin A, methyl-urolithin A, urolithin C, urolithin-M6, urolithin A-glucuronidation, urolithin C-glucuronidation. **Conclusion** Tannins from *Granati Pericarpium* in intestinal flora could generate physiological activity of small molecule compounds through hydrolysis of metabolic enzymes, and these compounds may be the material basis of tannins from *Granati Pericarpium* and play the role of pharmacological activities in the body.

Key words: tannins from *Granati Pericarpium*; intestinal flora; metabolites; LC-MS/MS; gallic acid; urolithins

肠道菌群是人体肠道内的正常微生物, 中药在进入机体之后, 与肠道微生物菌群发生接触而被代谢, 另外一些经肝脏代谢的产物还会通过胆汁的分泌而进入肠道参与肠道菌群代谢, 因此研究肠道菌群对药物代谢与药物药效发挥过程的影响具有重大意义^[1]。石榴皮为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 富含丰富的鞣质, 是其药效物质基础, 石榴皮中的总鞣质具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抑精、改善慢性肾功能等作用。本研究考察肠道菌

群对石榴皮总鞣质的分解代谢作用, 以阐明石榴皮鞣质在肠道内的代谢途径^[2]。

1 材料

1.1 药材与试剂

石榴皮购于武汉市中药材市场, 经武汉大学人民医院药品供应管理科张洪教授鉴定为 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 质量合格且符合《中国药典》2015 年版标准。没食子酸 (批号 20150912, 质量分数 > 99%, 成都曼斯特生物科技有限公司);

收稿日期: 2019-02-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31570349)

作者简介: 陈 鹏, 男, 博士研究生在读, 主要从事中药及天然药物活性成分的研究。

*通信作者 周本宏, 男, 博士研究生导师, 主要从事中药成分体内代谢的研究。Tel: 15335898431 E-mail: benhongzh@whu.edu.cn

HPD 树脂(天津宝恩化工科技有限公司); GAM 肉汤培养基(青岛海博生物有限公司); 磷钼钨酸(国药集团化学试剂有限公司); 其他实验试剂均达到实验分析化学用标准。

1.2 仪器

液相色谱三重四级杆-质谱(LC-MS/MS)联用仪(赛默飞世尔科技公司); 台式高速冷冻离心机(郑州南北仪器设备有限公司); RE-52C 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); ALPHAI-4/RZ-2 型冷冻干燥机(德国 Martin Christ 公司); 厌氧培养箱(广州三元科技有限公司); FZ10 粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司); UV-1800 紫外可见分光光度计(Shimadzu Corporation 公司)。

1.3 实验动物

雌性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 8 只, 购于湖北省疾控中心动物所。实验动物许可证号 SCXK(鄂) 2008-0005; 动物质量合格证号 420004000031246。大鼠置于武汉大学第一临床学院动物实验中心 SPF 级大鼠饲养房中, 适应喂养 1 周后正式开始实验。

2 方法

2.1 药物的提取与测定

2.1.1 药材的提取 取一定量的干燥石榴皮, 经 FZ10 粉碎机进行充分粉碎后, 与 70% 丙酮有机溶剂按照 1:10 常温避光浸渍 6 h, 超声辅助提取 30 min, 上述操作重复进行 2 次, 合并收集滤液, 减压浓缩至小体积除去丙酮, 冷冻干燥得石榴皮鞣质粗提物。

2.1.2 粗提物的纯化及总鞣质的定量测定 参照本课题组前期确定的纯化分离方法^[1], 即采用 HPD-400 大孔树脂进行纯化, 配制 4.36 mg/mL 的石榴皮粗提物溶液进行装柱, 装柱量为 5 BV, 调整吸附体积流量为 2 BV/h, 使用 70% 乙醇进行洗脱。收集洗脱液, 用旋转蒸发仪进行浓缩, 冷冻干燥, 即可得石榴皮鞣质粉末, 将纯化得到的石榴皮干燥粉末密封置于干燥器中为后续实验备用。参照《中国药典》2015 年版制定的鞣质测定方法磷钼钨酸-干酪素比色法进行石榴皮鞣质总量的测定^[2]。最终测得终产品的总鞣质质量分数为 60.49%。

2.2 培养基的制备

取 10.0 g 蛋白胨、10.0 g 胰蛋白胨、3.0 g 大豆胨、5.0 g 酵母浸粉、13.5 g 消化血清、1.2 g 牛肝浸出粉、2.2 g 牛肉膏、3.0 g 葡萄糖、3.0 g 氯化钠、

2.5 g 磷酸二氢钾、5.0 g 可溶性淀粉、0.3 g 硫代乙酸钠、0.3 g L-半胱氨酸盐酸盐、16.0 g 琼脂粉(1.6%), 加 1 000 mL 蒸馏水。按照上述组成配制培养基, 调节 pH 值至 7.0 左右。

2.3 培养基的分装及灭菌

将“2.2”项下肉汤培养基按照一定比例进行加热配制, 配制结束后将其分装至 500、250、100 mL 的量瓶中, 加胶塞, 并用锡纸包裹对瓶口进行密封, 放入高压灭菌锅中进行灭菌, 灭菌条件为 15 MPa, 121 °C, 灭菌 20 min。待自然冷却后取出待用^[3]。

2.4 大鼠肠道菌群培养液的制备

取大鼠新鲜粪便 4.0 g, 按 1:4 (g/mL) 将新鲜粪便与生理盐水混合配制成粪悬浊液, 置于高速离心机中离心 20 min (3 500 r/min), 上清液即为大鼠肠道菌液。取 0.5 mL 的肠道菌液, 加至 4.5 mL 的厌氧培养液中(已灭菌), 混匀振荡, 于 37 °C 厌氧条件下培养 24 h, 即得大鼠肠道混合菌群储备液^[4]。

2.5 大鼠肠道菌群的活化

将大鼠肠道菌群储备液与已配制好的厌氧培养基按照 1:9 进行混合, 用玻璃棒充分搅拌, 精密加入 0.201 mg/mL 的石榴皮鞣质甲醇溶液 10 μL, 涡旋 30 s, 混匀后制备得大鼠肠道菌群培养液。将大鼠肠道菌群孵育液置于培养瓶中, 按时间点分为 6 组, 每组 6 mL, 于 37 °C、CO₂ 恒温培养箱厌氧环境中分别培养 4、6、8、12、24、48 h。同时移取大鼠肠道菌群储备液 6 mL 置于 9 mL 的培养瓶中作为对照。培育时间结束后, 取出培育液, 于冰水浴中停止反应。加入异丙醇 200 μL、醋酸乙酯 4.0 mL, 旋涡 3 min, 于 3 000 r/min 离心 10 min, 弃掉下层沉淀, 将上层清液转移至 5 mL EP 管中, 于 40 °C 条件下用 N₂ 吹干, 加入 100 μL 乙腈, 旋涡 60 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液过 0.45 μm 滤膜滤过, 进行 LC-MS/MS 分析^[5]。

2.6 LC-MS 分析条件

2.6.1 色谱条件 PHENOMEX QC MIX870 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 2.6 μm), 进样量 1 μL, 柱温 40 °C, 运行 40 min。色谱纯乙腈为流动相 A, 0.1% 甲酸-水为流动相 B, 体积流量为 2 mL/min。梯度洗脱条件为 0~5 min, 0~20% A; 5~12 min, 20%~50% A; 12~25 min, 50%~80% A; 25~30 min, 80%~85% A; 30~35 min, 85%~90% A; 35~40 min, 90%~100% A; 梯度洗脱完后继续运行 5 min。

检测波长 305 nm。

2.6.2 质谱条件 采用负离子扫描模式进行多级质谱全扫描, 质量扫描范围 m/z 100~1 500, 离子源喷射电压 4 kV, 毛细管电压为 4 kV; 雾化器压力为 275.79 kPa; 干燥气体积流量为 10 L/min, 干燥气温度为 350 ℃。

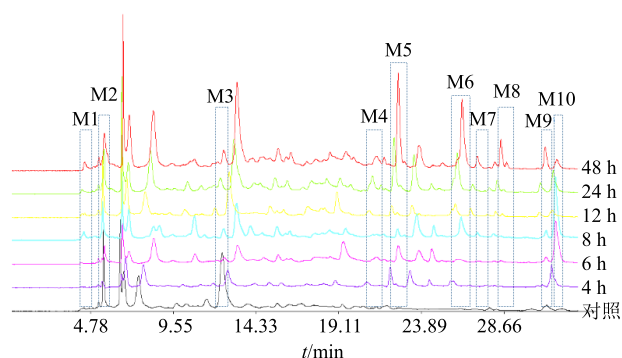
3 结果

3.1 肠道菌群培养

石榴皮鞣质肠道菌群经过 37 ℃、CO₂ 恒温培养箱厌氧环境中的培育后, 可以明显看到大鼠肠道菌群微生物的繁殖和生长, 导致孵育培养液变浑浊, 且多数沉淀聚集在培养瓶底端, 与厌氧微生物生长代谢规律接近。另外实验中还发现随着培育时间的不断增长, 培养品中的培养液浑浊程度越明显, 颜色越深, 代谢积累沉淀越多^[6-7]。

3.2 HPLC-MS 分析结果

3.2.1 石榴皮鞣质类成分不同转化时间点总离子流图 采用 LC-MS/MS 技术对 6 组石榴皮鞣质肠道菌群孵育样品和对照样品进行检测分析, 得石榴皮鞣质类成分不同转化时间点总离子流图 (图 1)。一般情况下, 与对照组比较, 新出现的峰或同一保留时间下峰强增加的峰可能为代谢产物。本课题组前期已经通过实验证实了石榴皮鞣质中主要单体成分为安石榴苷、鞣花酸、没食子酸、安石榴林等富含酚羟基的化合物, 根据这些单体化合物的母核结构信息及药物在代谢酶作用下的代谢转化规律, 预测石榴皮鞣质在肠道菌群作用下的代谢产物, 将这些目标代谢产物的一级质谱信息质荷比通过 LC-MS/MS 自带的提取离子流色谱功能进行定位, 如果一级质谱信息匹配成功, 将其离子碎片敲碎继续做二级质谱, 结合二级质谱信息与目标代谢物的裂解规律确



M1-尿石素 B M2-没食子酸 M3-焦性没食子酸 M4-3-O-甲基没食子酸 M5-尿石素 A M6-甲基化尿石素 A M7-尿石素 C M8-尿石素-M6 M9-葡萄糖醛酸化尿石素 A M10-葡萄糖醛酸化尿石素 C
M1-urolithin B M2-gallic acid M3-pyrogallac acid M4-3-O-methylgallicacid M5-urolithin A M6-methyl-urolithin A M7-urolithin C M8-urolithin M6 M9-urolithin A-glucuronidation M10-urolithin C-glucuronidation

图 1 石榴皮鞣质类成分不同转化时间点总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of tannin from *Granati Pericarpium* in intestinal flora at different times

定其最终产物^[8]。

3.2.2 代谢产物的初步鉴定 本实验一共初步鉴定出 10 种石榴皮鞣质大鼠肠道菌群代谢化合物, 化合物信息见表 1。

代谢产物 M1, 分子离子峰 m/z 211.100 [M-H]⁻ ($t_R=4.39$ min), 二级质谱碎片 m/z 167.100 [M-H-COO]⁻, 通过与文献报道^[9]的代谢产物尿石素 B 的二级质谱碎片信息进行匹配, 发现结果一致, 最终进一步证实石榴皮鞣质肠道菌群代谢产物 M1 为尿石素 B。代谢产物 M1 的二级质谱信息和结构式及可能的裂解方式见图 2。

代谢产物 M2 的分子离子峰 m/z 169.120 [M-

表 1 石榴皮鞣质肠道菌群代谢物初步鉴定信息

Table 1 Identification result of metabolites for tannin from *Granati Pericarpium* in intestinal flora

峰号	t/min	母离子 [M-H] ⁻		碎片离子 MS ² (m/z)	成分	分子式
		实测值	理论值			
M1	4.39	211.100	211.200	167.100	尿石素 B	C ₁₃ H ₈ O ₃
M2	5.21	169.120	169.210	125.00	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅
M3	10.78	125.025	125.110	81.034	焦性没食子酸	C ₆ H ₆ O ₃
M4	20.01	183.030	184.146	168.011, 123.960	3-O-甲基没食子酸	C ₈ H ₈ O ₅
M5	22.34	227.104	227.200	199.039	尿石素 A	C ₁₃ H ₈ O ₄
M6	26.67	241.051	241.200	210.904, 196.986	甲基化尿石素 A	C ₁₄ H ₁₀ O ₄
M7	27.02	243.200	243.200	243.200, 215.199	尿石素 C	C ₁₃ H ₈ O ₅
M8	27.46	259.020	259.190	259.020	尿石素 M6	C ₁₃ H ₈ O ₆
M9	28.11	402.300	402.360	175.200, 227.100	葡萄糖醛酸化尿石素 A	C ₁₉ H ₁₆ O ₁₀
M10	31.68	418.300	418.358	175.200, 243.100	葡萄糖醛酸化尿石素 C	C ₁₉ H ₁₆ O ₁₁

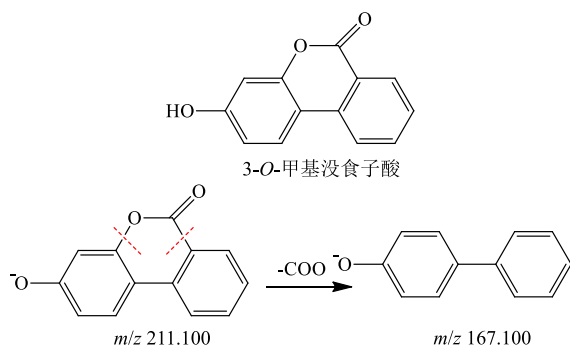
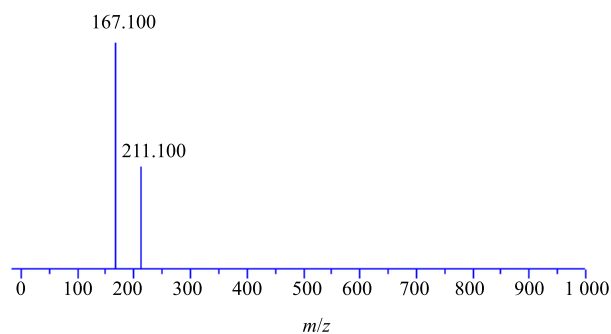


图 2 代谢产物 M1 的二级质谱信息、结构及可能的裂解机制

Fig. 2 Tandem mass spectrogram, structural formula and possible pyrolysis mechanism of metabolite M1

$\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=5.21$ min), 通过与预测的目标化合物没食子酸的一级相对分子质量 169.014 对比, 匹配误差较小, 因此初步判断 M2 为没食子酸^[10]。

代谢产物 M3, 分子离子峰 m/z 125.025 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=10.08$ min), 二级质谱碎片离子为 m/z 81.034 $[\text{M}-\text{CO}-\text{OH}]^-$, 通过与文献报道^[11]中的代谢成分焦性没食子酸的二级质谱碎片信息匹配, 结果一致, 证实代谢产物 M3 为焦性没食子酸。代谢产物 M3 的二级质谱信息和结构式及可能的裂解方式见图 3。

代谢产物 M4 的分子离子峰 m/z 183.030 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=20.01$ min), 而 MS^2 有 2 个碎片离子, 分别为 m/z 168.011 $[\text{M}-\text{CH}_3]^-$ 的离子碎片和 m/z 123.960 $[\text{M}-\text{COO}]^-$ 的碎片离子, 因此推测其为 3-O-甲基没食子酸^[12]。

代谢产物 M5, 分子离子峰 m/z 227.104 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=22.34$ min), 二级质谱碎片 m/z 199.039 $[\text{M}-\text{CO}-\text{H}]^-$, 通过与目前文献中所报道的代谢产物尿石素 A 的二级质谱碎片信息匹配, 结果一致, 证实石榴皮鞣质肠道菌群代谢产物 M5 为尿石素 A^[13]。代谢产物 M5 的二级质谱信息和结构式及可能的裂

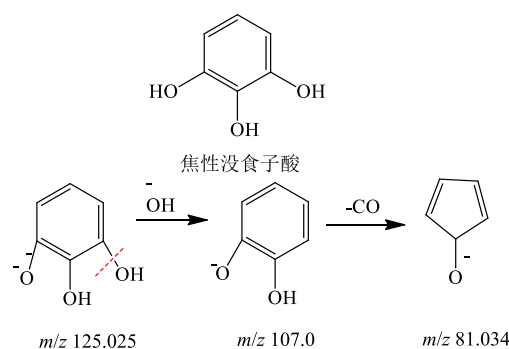
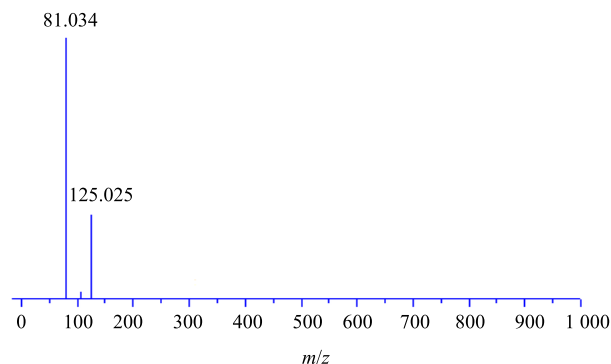


图 3 代谢产物 M3 的二级质谱信息、结构及可能的裂解机制

Fig. 3 Tandem mass spectrogram, structural formula and possible pyrolysis mechanism of metabolite M3

解方式见图 4。

代谢产物 M6, 分子离子峰 m/z 241.050 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=26.67$ min), 二级质谱碎片 m/z 210.904 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^-$ 和 m/z 196.986 $[\text{M}-\text{COO}]^-$, 通过对文献报道^[14]中的代谢产物甲基化尿石素 A 二级质谱碎片信息匹配, 结果一致, 证实石榴皮鞣质肠道菌群代谢产物 M6 为甲基化尿石素 A。代谢产物 M6 的二级质谱信息和结构式及可能的裂解方式见图 5。

代谢产物 M7, 分子离子峰 m/z 243.200 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=27.02$ min), 二级质谱碎片离子 m/z 215.199 $[\text{M}-\text{CO}]^-$, 通过与目前文献报道^[15-17]的代谢产物尿石素 C 的二级质谱碎片信息匹配, 结果一致, 最终进一步证实石榴皮鞣质肠道菌群代谢产物 M7 为尿石素 C。代谢产物 M7 的二级质谱信息和结构式及可能的裂解方式见图 6。

代谢产物 M8 的分子离子峰 m/z 259.020 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($t_{\text{R}}=27.46$ min), 通过与预测的目标代谢化合物一级相对分子质量 260.200 对比, 误差小于 0.5%, 推断代谢产物 M8 为尿石素 M6^[18]。代谢产物 M9、M10 二级质谱均有 176 碎片丢失, 证明为结合葡萄

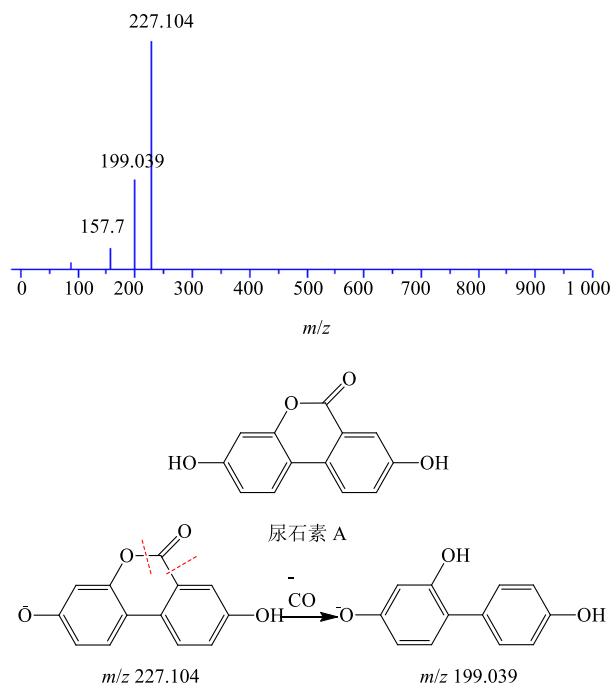


图 4 代谢产物 M5 的二级质谱信息、结构及可能的裂解机制
Fig. 4 Tandem mass spectrogram, structural formula and possible pyrolysis mechanism of metabolite M5

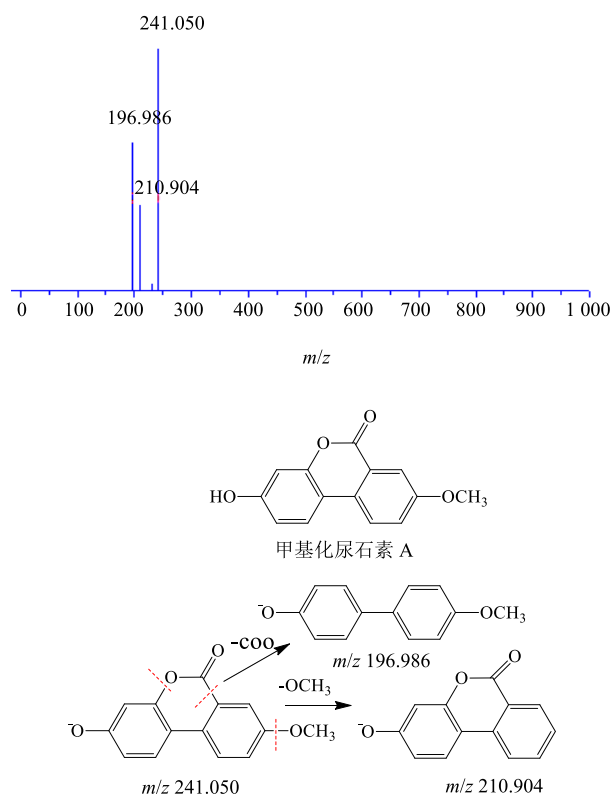


图 5 代谢产物 M6 的二级质谱信息、结构及可能的裂解机制
Fig. 5 Tandem mass spectrogram, structural formula and possible pyrolysis mechanism of metabolite M6

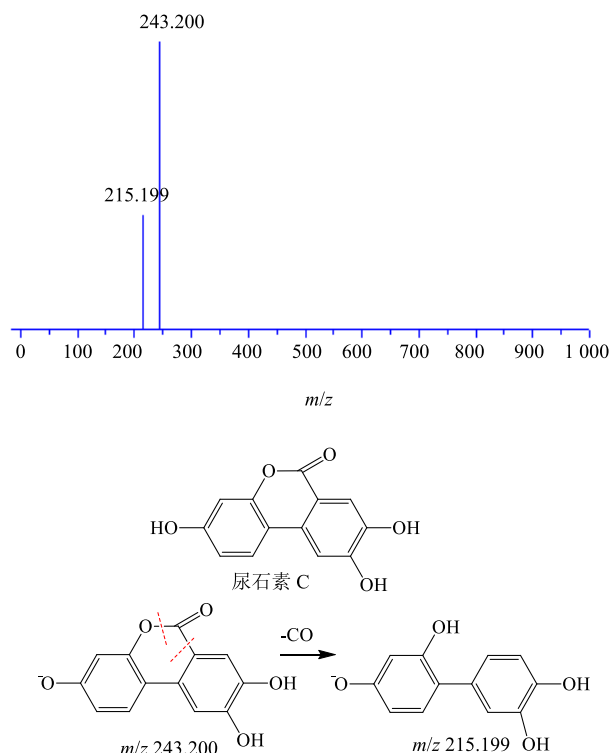


图 6 代谢产物 M7 的二级质谱信息、结构及可能的裂解机制
Fig. 6 Tandem mass spectrogram, structural formula, and possible pyrolysis mechanism of metabolite M7

糖醛酸化的 II 相代谢产物。

代谢产物 M9 的分子离子峰 m/z 403.3 [M-H]⁻ (t_R = 28.11 min), 二级质谱丢失 176 得到碎片 m/z 227.100, 结合先前已知的代谢产物的结构分析, 最终鉴定 M9 为葡萄糖醛酸化尿石素 A^[19]。

代谢产物 M10 的分子离子峰 m/z 418.300 [M-H]⁻ (t_R = 31.685 min), 二级质谱丢失 176 得到碎片 m/z 243.030, 结合文献报道^[20]和代谢物匹配分析, 推测 M10 为葡萄糖醛酸化尿石素 C。

4 讨论

机体肠道中生存着大量的活体微生物, 其中 90% 以上为厌氧型细菌。由于肠道菌群中存在着多种不同种类的细菌, 所包含的药物代谢酶也各有不同, 决定了药物肠道菌群发生代谢转化具有多样性等特点^[21]。肠道菌群代谢主要涉及的生化反应类型为水解和还原反应, 目前研究已经证实许多中药有效成分在机体肠道菌群代谢转化后能形成一些高生物活性的代谢产物^[22]。因此, 研究中药肠道菌群体外代谢对于药物活性成分的转化与作用机制的探讨具有重要意义。

本实验重点研究了石榴皮鞣质在大鼠肠道菌群

中的代谢产物, 研究结果显示, 将肠道菌群与石榴皮鞣质孵育, 经 HPLC-MS 技术检测, 共鉴定出 10 个代谢产物, 分别为尿石素 B、没食子酸、焦性没食子酸、3-*O*-甲基没食子酸、M5 尿石素 A (Urolithin A)、甲基化尿石素 A、尿石素 C、尿石素-M6、葡萄糖醛酸化尿石素 A、葡萄糖醛酸化尿石素 C。石榴皮鞣质类成分经大鼠肠道菌群代谢后, 没食子酸

类鞣质通过水解作用主要产生焦性没食子酸、3-*O*-甲基没食子酸; 鞣花鞣质类鞣质在培养液中经水解首先形成鞣花酸, 然后再经肠道菌群代谢酶的转化作用形成一系列分子量小、极性低的尿石素类化合物, 再与葡萄糖醛酸等大分子物质进行 II 相结合反应, 生成葡萄糖醛酸化尿石素系列物, 其可能的代谢途径见图 7。推测石榴皮鞣质在肠道菌群中主要

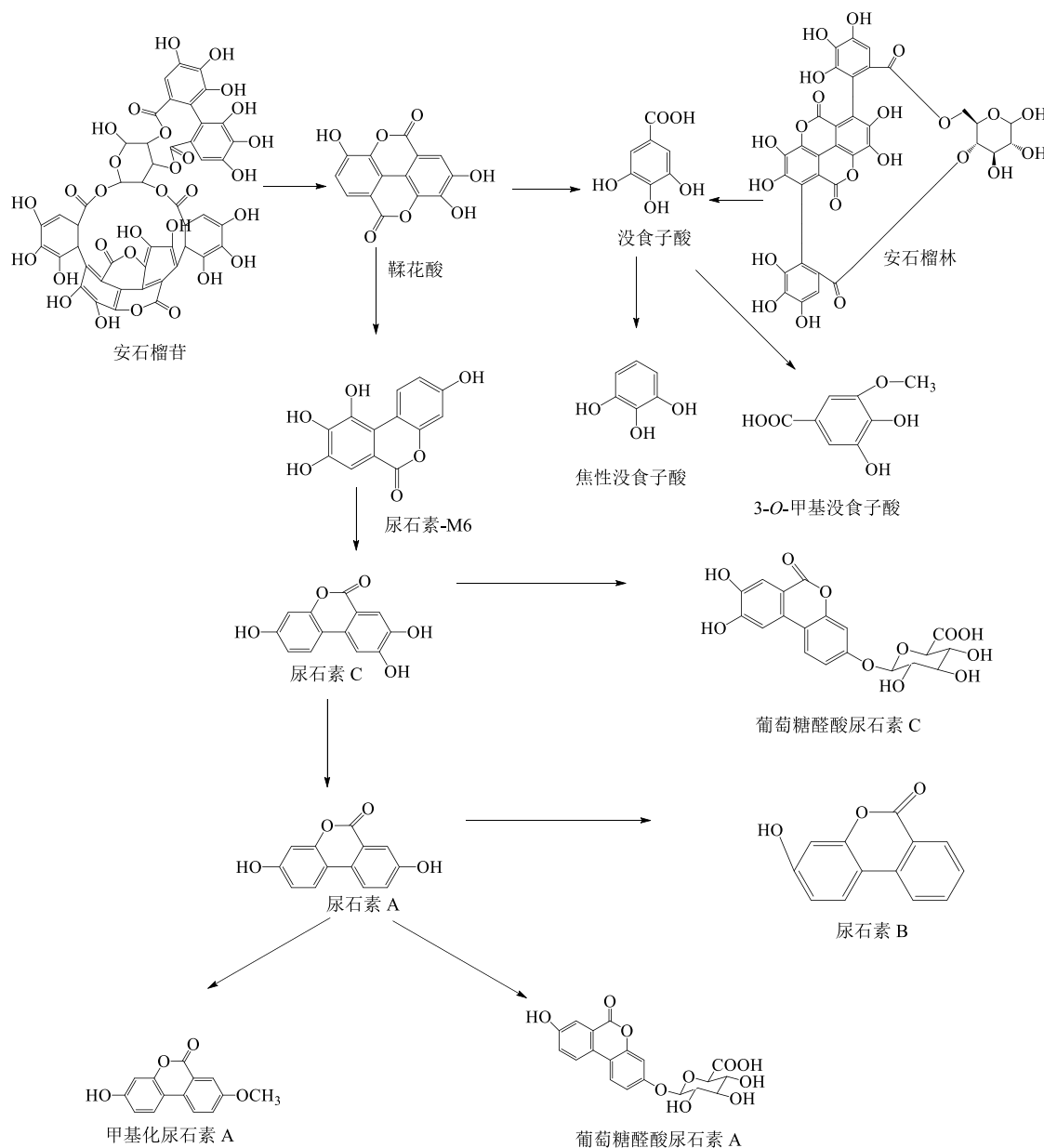


图 7 石榴皮鞣质在肠道菌群中的代谢途径

Fig. 7 Metabolic pathway of tannin from *Granati Pericarpium* in intestinal flora

通过代谢酶的水解、还原等作用将其代谢成具有生理活性的小分子化合物, 这些化合物有可能是石榴皮鞣质在机体内发挥药理活性的物质基础^[23]。但目

前关于代谢产物的药理活性研究报道较少, 后面会继续开展有关这些代谢产物的药理活性与转化调控的系列研究。

参考文献

- [1] 周本宏, 涂杰, 金龙, 等. 石榴皮鞣质在大鼠体内的代谢产物分析 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(10): 821-824.
- [2] 周本宏, 金龙, 张琛霞, 等. 大孔吸附树脂富集纯化石榴皮总鞣质的工艺条件优选 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(23): 1859-1863.
- [3] 欧阳辉, 郭宜城, 何明珍, 等. UPLC-Q-trap-MS 鉴定白头翁皂苷D在大鼠离体肠道菌群中的代谢产物 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 523-526.
- [4] 曹伟宇. 基于人肠道菌群代谢系统从九节龙皂苷-I 代谢物中筛选抗肿瘤活性物质的研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- [5] 王少光, 张晓峰, 韩萍, 等. 低聚异麦芽糖对小鼠肠道菌群及其代谢产物的影响 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2012, 33(5): 79-82.
- [6] Ming Y, Shi D Z, Wang T Y, *et al.* Transformation of trolloside and isoquercetin by human intestinal flora *in vitro* [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(3): 220-226.
- [7] Wang X, Wang J, Rao B, *et al.* Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals [J]. *Exper Ther Med*, 2017, 13(6): 2848-2854.
- [8] Tian C W, Cheng Y T, Zhang T J, *et al.* Anti-mutagenicity of swertiamarin and its metabolite in incubated system of human intestinal flora [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 92-95.
- [9] Ke Y, Li D, Zhao M, *et al.* Gut flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide accelerates endothelial cell senescence and vascular aging through oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 116(3): 88-100.
- [10] Du L Y, Zhao M, Tao J H, *et al.* The metabolic profiling of isorhamnetin-3-O-neohesperidoside produced by human intestinal flora employing UPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 55(3): 243-250.
- [11] Tao J H, Duan J A, Qian Y Y, *et al.* Investigation of the interactions between *Chrysanthemum morifolium* flowers extract and intestinal bacteria from human and rat [J]. *Biomed Chromatogr BMC*, 2016, 30(11): 1807-1819.
- [12] 李长明, 李玲孺, 陈禹, 等. 应用代谢组学技术进行中医生体质研究探讨 [J]. 中医药学报, 2016, 44(2): 1-3.
- [13] 刘丹, 齐双辉, 马海英. UPLC 在中药组分分析及代谢组学中的应用进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(7): 973-975.
- [14] Chen Y, Li C, Liu L, *et al.* Serum metabonomics of NAFLD plus T2DM based on liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(13/14): 962-966.
- [15] Wang Y, Man H, Gao J, *et al.* Plasma metabonomics study on toxicity biomarker in rats treated with *Euphorbia fischeriana* based on LC-MS [J]. *Biomed Chromatogr BMC*, 2016, 30(9): 1386-1396.
- [16] Li Z Z, Wang Y, Li D M, *et al.* Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening ethopabate residue in chicken muscle and liver [J]. *Rsc Adv*, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.100.
- [17] Moura T C F, Amoras E D S G, Araújo M S, *et al.* HBV viral load and liver enzyme levels may be associated with the wild MBL2 AA genotype [J]. *Med Inflamm*, 2017, 17(3): 1-11.
- [18] Yu J H, Kim J S, Lee M R, *et al.* Risks of borderline liver enzyme abnormalities to the incidence of impaired fasting glucose and diabetes mellitus: A 7 year follow up study of workers [J]. *Annal Occupat Envir Med*, 2016, 28(1): 1-9.
- [19] Miladi H, Didehdar M, Hajihosseini R, *et al.* Evaluating correlation between serum liver enzymes and toxocariasis: A case control study [J]. *Asian Pac J Trop Dis*, 2016, 6(6): 460-462.
- [20] 柯仲成, 杨楠, 侯雪峰, 等. 大鼠肠道菌群对芍药苷体外代谢转化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3839-3845.
- [21] Serrano-Villar S, Rojo D, Martínez-Martínez M, *et al.* Gut bacteria metabolism impacts immune recovery in HIV-infected individuals [J]. *Ebiomedicine*, 2016, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.033
- [22] Cui Q, Pan Y, Xu X, *et al.* The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme *in vitro* employed UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109(23): 67-74.
- [23] Vaziri N D, Zhao Y Y, Pahl M V. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: The nature, mechanisms, consequences and potential treatment [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2016, 31(5): 737-746.