

• 药理与临床 •

基于体外人源胃肠道代谢评价乌梅粉和水煎剂对克罗恩大鼠的治疗作用

刘治华, 彭颖[#], 孙崇智, 李晓波*

上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要:目的 评价乌梅粉和水煎剂对消化性溃疡的疗效。方法 采用2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)诱导的克罗恩病大鼠模型,比较乌梅粉和水煎剂的抗炎活性;分别采用超高效液相色谱-电喷雾电离四级杆飞行时间质谱联用(ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF-MS^E)法、苯酚-硫酸法、气相色谱-质谱联用法比较乌梅粉和水煎剂的体外胃肠道代谢前及不同时间点孵育液中化学成分、总糖含量及短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)变化,以揭示其可能活性物质。结果 与对照组比较,克罗恩病大鼠体重显著降低($P < 0.01$),脾脏肿大($P < 0.01$),胸腺萎缩($P < 0.05$),结肠缩短且伴有结肠损伤和溃疡($P < 0.01$);与模型组比较,乌梅粉和水煎剂均有缓解结肠损伤的作用($P < 0.05$ 、 0.01)。乌梅粉对结肠髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性的抑制效果优于乌梅水煎剂($P < 0.05$),而乌梅水煎剂降低克罗恩病大鼠血清中炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和一氧化氮(nitric oxide, NO)水平优于乌梅粉($P < 0.01$)。肠道菌孵育液中,与乌梅水煎剂相比,乌梅粉中的化学成分及其代谢产物的含量更高且保留时间更久;与空白菌液相比,0~12 h乌梅粉总糖降解率降低,而乌梅水煎剂总糖降解率增加;同时,乌梅水煎剂增加肠道菌孵育液中SCFAs的含量,而乌梅粉相反。结论 乌梅粉可能对结肠MPO活性的抑制作用更好,而乌梅水煎剂可能更有利于降低机体循环炎症因子IL-6和NO水平,原因在于乌梅粉中有效成分的含量更高;但乌梅粉可能对肠道菌群结构产生一定损伤,导致胃肠道中有抗炎活性的SCFAs含量降低,进而可能导致吸收进入血液循环的SCFAs含量低于乌梅水煎剂。

关键词: 乌梅; 粉剂; 水煎剂; 克罗恩病; 胃肠道代谢; UPLC-QTOF-MS^E; 短链脂肪酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)19-6054-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.012

Evaluation of therapeutic effects of *Mume Fructus* powder and water decoction on Crohn's rats based on *in vitro* human gastrointestinal metabolism

LIU Zhi-hua, PENG Ying, SUN Chong-zhi, LI Xiao-bo

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of powder or water decoction of Wumei (*Mume Fructus*) on peptic ulcer. **Methods** A rat model of Crohn's disease (CD) induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was used to compare the anti-inflammatory activities of powder or water decoction of *Mume Fructus*. Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS^E) method was used to detect the chemical components, phenol-sulfuric acid method was used to detect the total sugar content, and gas chromatography-mass spectrometry method was used to determine the short-chain fatty acids (SCFAs) in the *in vitro* gastrointestinal incubation of *Mume Fructus* powder and water decoction before incubation and at different incubation times to reveal their possible active components. **Results** Compared with control group, CD rats had significantly lower body weight ($P < 0.01$), enlarged spleen ($P < 0.01$), atrophied thymus ($P < 0.05$), shortened colon and were associated with colon damage and ulcers ($P < 0.01$). Compared with model group, both powder and water decoction of *Mume Fructus*

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707300)

作者简介: 刘治华, 女, 博士研究生, 从事生药学研究。Tel: (021)34205222 E-mail: liuzhuhua-apple@sjtu.edu.cn

*通信作者: 李晓波, 女, 博士, 教授, 从事生药学研究。Tel: (021)34204806 E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

#共同第一作者: 彭颖, 女, 博士, 助理研究员, 从事生药学研究。Tel: (021)34205222 E-mail: ypeng@sjtu.edu.cn

had the effect of relieving colon damage ($P < 0.05, 0.01$). *Mume Fructus* powder had a better inhibitory effect on colon myeloperoxidase (MPO) activity of CD rats ($P < 0.05$), while *Mume Fructus* water decoction could reduce the serum levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO) in CD rats ($P < 0.01$). *Mume Fructus* powder could increase the content of chemical components and their metabolites and extend the retention time in the incubation solution of intestinal bacteria. *Mume Fructus* powder decreased the degradation rate of total sugar, while *Mume Fructus* water decoction increased the degradation rate of total sugar comparing with the control intestinal bacterial solution at 0—12 h. *Mume Fructus* water decoction could increase the content of SCFAs in the incubation solution of intestinal bacteria, while *Mume Fructus* powder was on the contrary. **Conclusion** *Mume Fructus* powder might have better anti-CD effect on colon MPO, while *Mume Fructus* water decoction might be more conducive to reduce the level of circulating inflammatory factors IL-6 and NO. The difference in efficacy might be caused by the higher content of active ingredients in *Mume Fructus* powder, however, *Mume Fructus* powder may cause certain damage to the intestinal flora structure, resulting in decreased levels of SCFAs with anti-inflammatory activity in gastrointestinal tract and blood circulation.

Key words: *Mume Fructus*; powder; water decoction; Crohn's disease; gastrointestinal metabolism; UPLC-QTOF-MS^E; short-chain fatty acids

“中药汤剂”最早在夏商时代《甲乙经》序中，有“汤液始于伊尹”的记载，是中医临床治疗疾病最古老、最常用的剂型之一。由于中药“煎煮”成汤剂费时费力，且不容易保存，现代应用中常将中药提取液浓缩制成颗粒剂^[1]；或药材净选除杂后干燥、粉碎成一定粒度的颗粒或粉末，供临床调配入药^[2]。2种方法都有配伍灵活、质量可控、免煎高效的特点。

乌梅是蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et. Zucc. 的近成熟果实经低温烘干，闷至色变黑制成，具有敛肺、涩肠、生津、安蛔的功效，可用于肺虚久咳、久泻久痢、虚热消渴、蛔厥呕吐腹痛^[3]。乌梅炮制历史悠久，有净乌梅、乌梅肉、醋乌梅、蜜制乌梅、乌梅炭等^[4]。现代只有乌梅（个子或打碎）、乌梅肉、乌梅炭（取肉或连核炒）应用于临床^[5]，亦可用乌梅水煎剂或乌梅粉口服治疗腹泻、克罗恩病（Crohn's disease, CD）等^[6-7]。已有研究表明，乌梅水煎剂可提高葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎小鼠病变组织的超氧化物歧化酶活性，降低丙二醛含量^[8]。本课题组前期研究也表明，乌梅水煎剂和醇提物均可改善 2,4,6-三硝基苯磺酸（2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS）诱导的 CD 大鼠症状^[9]。但乌梅粉对 CD 的药效以及乌梅水煎剂和乌梅粉干预 CD 的药效差异尚不明确。

中医临床上乌梅水煎剂或乌梅粉均为口服使用，因此它们所含化学成分不可避免地要经过胃肠道代谢。在胃肠道环境中，中药的多种成分发生生物转化而发挥生物活性。例如，乌梅中羟基肉桂酸类的咖啡酰奎尼酸可在小肠保持完整，但在肠道菌中酯酶的作用下发生降解，生成咖啡酸被吸

收利用^[10]。为了阐释乌梅粉和乌梅水煎剂应用的科学性以及二者的差异，本研究比较了乌梅粉和乌梅水煎剂在 TNBS 诱导 CD 大鼠体内的药效差异，并分析二者在人工胃肠液及人源肠道菌中的代谢情况，为乌梅的临床应用提供科学支撑。

1 材料

1.1 动物

CL 级雄性 SD 大鼠，体质量（160±10）g，6 周龄，购自上海斯莱克实验动物有限公司，动物合格证号 2015000551519。动物于室温饲养，模拟 12 h 光照 12 h 黑暗，自由进食饮水。动物实验方案经上海交通大学伦理委员会批准（批准号 A2017044）。

1.2 药材

梅果于 2017 年采自云南大理，经上海交通大学李晓波教授鉴定为梅 *P. mume* (Sieb.) Sieb. et. Zucc. 的果实。乌梅由梅果加工，按本课题组报道方法^[9]制备，即采用传统晒干闷黑的方式干燥而成。乌梅样品（样品号为 YanMei201707）储藏在上海交通大学药学院药品储藏柜。

1.3 药品与试剂

对照品 5-咖啡酰奎宁酸（批号 wkq16052705）、4-咖啡酰奎宁酸（批号 wkq16081903）、3-咖啡酰奎宁酸（批号 wkq16050805）、山柰酚（批号 wkq20042613）购自维克奇生物技术有限公司；对照品熊果酸（批号 DST180606-019）、4-香豆酸（批号 DST190406-057）、表儿茶素（批号 DST190308-035）、咖啡酸（批号 DSTDK001301）购自成都德斯特生物技术有限公司；对照品没食子酸（批号 MUST-13040103）、丁香酸（批号 MUST19041920）购自成都曼斯特生物科技有限公司；对照品白藜芦

醇(批号 111535-201703)、香草酸(批号 110776-201805)购自中国食品药品检定研究院。以上对照品质分数均大于 98%。美沙拉嗪(0.4 g/片,批号 1611171)购自恒诚制药集团淮南有限公司;肠炎宁(0.4 g/片,批号 1707006)购自江西天施康弋阳制药有限公司;甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯购自德国 Merck 公司;其他试剂均为分析纯,购自上海国药化学试剂公司;TNBS(批号 SLBT1675)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;BCA 蛋白测定试剂盒(批号 16K03A46)购自博士德生物科技有限公司;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒(批号 201905)、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(批号 201909)购自南京建成生物工程研究所;白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 A301BHS-02)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 A306H11123)、IL-10 ELISA 试剂盒(批号 A310H10409)、IL-17 ELISA 试剂盒(批号 A317H10824)均购自上海酶联生物科技有限公司;猪胰蛋白酶(批号 Gibco27250-018)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;胃蛋白酶(批号 RM18Y403)、厌氧菌肉汤(anaerobic broth, GAM)、维生素 K1(批号 RW18Q404)、氯化血红素(批号 RS17B1108)购自上海瑞永生物技术有限公司。

1.4 仪器

Milli-Q 超纯水纯化系统(德国 Millipore 公司);SK5200H-T 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司);LE225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);5417R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Vortex-2 型涡旋混匀器(美国 Scientific Industries);800-DT 型厌氧孵育箱(美国 Plas-Labs Lansing 公司);DM2000 型 LED 显微镜(德国 Leica 公司);Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、Vion ims QTOF 质谱仪(美国 Waters 公司);7890A-5975C 型 GC-MS 仪(美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 乌梅粉及水煎剂的制备

2.1.1 乌梅粉的制备 乌梅润湿去核,再经 50 °C 烘制 24 h 得到乌梅肉。乌梅肉打成细粉(按照《中国药典》2020 年版,细粉全部通过 5 号筛,通过 6 号筛不少于 95%)备用。

2.1.2 乌梅水煎剂的制备 精密称取干燥的乌梅肉,加 10 倍量的蒸馏水,100 °C 回流提取 3 次,每次 2 h,抽滤后,合并滤液,减压浓缩至适当体积,

然后经冷冻干燥制成冻干粉,用前加入溶剂摇匀,提取率为 12.9%(以生药量计)。

2.2 CD 造模及给药

大鼠适应性饲养 7 d 后,随机分成对照组、模型组、美沙拉嗪(0.1 g/kg)组、肠炎宁(0.34 g/kg)组及乌梅粉低、高剂量(1.08、3.24 g/kg,分别相当于临床剂量的 1、3 倍)^[11]组和乌梅水煎剂低、高剂量(1.08、3.24 g/kg,分别相当于临床剂量的 1、3 倍)组,每组 8 只。在造模前未发现明显的饮食、饮水变化。除对照组外,大鼠禁食 12 h 后,ip 3%戊巴比妥钠麻醉,用内径 2 mm 左右的软聚氯乙烯管,将含 2% TNBS 的 40%乙醇溶液(现用现配),以 80 mg/kg 的剂量推至大鼠结肠腔内 8 cm 处。为防止药液流出,灌肠后,大鼠倒置 1 min^[12]。CD 造模后 6 h,各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续 10 d。

2.3 大鼠体质量及免疫器官指数测定

每 2 天记录各组大鼠造模前、后的体质量变化。大鼠末次给药后,禁食 12 h,腹主动脉取血(血清和全血各 1 管)。血清于 4 °C 静止 12 h 后,4 °C、3000 r/min 离心 15 min,在无菌操作台中取血浆至无菌 EP 管中,于-80 °C 保存。大鼠处死后,取胸腺、脾,称定质量,计算免疫器官指数。取大鼠结肠段,拍照待用;结肠纵向切段,于-80 °C 保存待用。

免疫器官指数=免疫器官质量/体质量

2.4 大鼠结肠损伤评分及病理观察

测定各组大鼠结肠长度,观察结肠整体形态,按照文献方法^[9]进行整体结肠损伤评分。取各组大鼠远端结肠 5 mm,于中性多聚甲醛中固定,石蜡包埋,制备 0.7 μ m 厚的切片,脱蜡、水化后,进行 HE 染色,于显微镜下观察并拍照,并按本课题组前期报道方法^[9]进行评分。

2.5 大鼠结肠组织 MPO 活性的测定

取各组大鼠结肠组织,用冷的生理盐水清洗后,加入 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)匀浆提取蛋白,采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,按照 MPO 试剂盒说明书测定结肠组织 MPO 活性。

2.6 大鼠血清中细胞因子水平的测定

取各组大鼠血清,按照试剂盒说明书测定 NO、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 IL-17 水平。

2.7 乌梅粉及水煎剂在体外人工胃液、肠液孵育和体外人源肠道菌孵育

2.7.1 人工胃液孵育 参照《中国药典》2020 年版

三部配制人工胃液^[13]。《中国药典》2020年版一部乌梅的日用量为6~12 g^[3]，取最大量12 g。人正常基础胃液量为10~100 mL，取最大值100 mL。取人工胃液10 mL，在37℃水浴锅中温浴30 min，然后加入相当于1.2 g生药的乌梅粉或水煎剂的冻干粉末，根据胃排空时间为2~4 h，分别于0、1、2、4 h取样1 mL。

2.7.2 人工肠液孵育 参照《中国药典》2020年版三部配制人工肠液^[13]。取10 mL人工肠液，在37℃水浴锅中温浴30 min，然后加入相当于1.2 g生药的乌梅粉或水煎剂的冻干粉末，根据肠排空时间为6 h，分别于0、2、4、6 h取样1 mL。

2.7.3 人源肠道菌孵育 参照本课题组前期方法配制人源肠道菌液^[14]，根据健康人24 h内的正常粪便量为100~300 g（平均200 g），拟定乌梅与人粪等效比例为12:200，即12 g生药:200 g粪便。200 g粪便对应的GAM肉汤培养基为5 L，即乌梅水煎液与肠道菌液比为12:5。取生药量120 mg的乌梅粉或水煎剂的冻干粉末，溶于50 mL肠道菌液中，37℃厌氧孵育，分别于0、3、6、12、24、36、48 h取样1 mL。同时设定空白菌液对照（肠道菌在培养基中孵育，不加待测物）和待测成分+GAM肉汤培养基（不加入肠道菌液）对照。每个时间点取样3份，分别用于酚酸等小分子、总糖以及粪便短链脂肪酸的测定。

2.8 化学成分分析

2.8.1 超高效液相色谱-电喷雾电离四级杆飞行时间质谱联用（ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF-MS^E）分析

(1) 样品制备: 采用蒸馏水混悬乌梅细粉，制备乌梅混悬液。取乌梅粉混悬液和水煎剂，以及各时间点乌梅粉和水煎剂的体外孵育液1 mL，立即用1倍量水饱和的正丁醇萃取3次，收集正丁醇萃取液，于40℃氮气下吹干，加入0.5 mL甲醇复溶，4800 r/min离心10 min，经0.22 μm微孔滤膜滤过，进行UPLC-QTOF-MS^E检测。

(2) 色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm, 1.7 μm），流动相为0.1%甲酸水溶液（A）-0.1%甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱：0~2 min, 99%A; 2~3 min, 99%~85%A; 3~9 min, 85%~70%A; 9~11 min, 70%~50%A; 11~15 min, 50%~0 A; 15~18 min, 100% B; 18~18.1 min,

0~99%A; 18.1~20 min, 99%A。进样量1 μL; 体积流量0.4 mL/min; 柱温35℃。

(3) 质谱条件: 电喷雾电离，离子源为负离子模式（ESI⁻）；毛细管电压为2.5 kV; 锥电压为40 kV; 离子源温度为100℃; 去溶剂化温度为450℃; 锥孔气体流量为50 L/h; 脱溶剂气体流量为900 L/h; 碰撞能量为20~45 eV; 扫描范围 *m/z* 50~1000。使用Unifi 1.8.1软件进行数据处理。

2.8.2 总糖含量测定 分别取乌梅粉混悬液和水煎剂，以及各时间点乌梅粉和水煎剂的人源肠道菌孵育液1 mL，根据苯酚-硫酸法^[15]测定总糖含量，间接考察孵育液中肠道菌代谢生长速率的变化。

2.8.3 短链脂肪酸（short chain fatty acids, SCFAs）含量测定 参照文献方法^[16]及本课题组前期建立的气相色谱-质谱联用（GC-MS）方法测定肠道菌孵育液中SCFAs含量。

(1) 样品制备: 取各时间点的乌梅肠道菌厌氧孵育液1 mL，5000 r/min离心20 min，取上清0.4 mL，加入0.1 mL 50%硫酸，再加入0.5 mL内标（二甲基戊酸，100 μg/mL），涡旋混匀，12 000 r/min离心10 min，4℃放置30 min，取上层乙醚溶液供GC-MS分析。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取醋酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸各0.25 g，于25 mL量瓶中，用50 μg/mL内标溶液定容，配成质量浓度为10 mg/mL的对照品母液。将对照品母液用内标溶液梯度稀释成含对照品各1000、400、200、100、50、10、5 μg/mL的系列溶液（含内标50 μg/mL），进样分析。

(3) GS-MS 条件: DB-5MS 色谱柱（30 m×0.25 mm, 0.25 μm）；柱温100℃保持5 min，以20℃/min升至190℃，以3℃/min升至260℃，以10℃/min升至300℃，保持10 min。进样温度280℃; 进样量1 μL; 分流比5:1; 载气为氦气（99.999%）; 体积流量1.0 mL/min; 接口温度280℃; 离子源温度230℃; 四级杆温度150℃; 电离方式为电子轰击离子源正离子模式（ESI⁺），70 eV; 检测器电压1471 V; 扫描方式为全扫描模式，扫描范围 *m/z* 33~600; 溶剂延迟5 min; 采用NIST2011谱库进行分析。

2.9 统计学分析

数据采用Graphpad prism 9软件的单因素方差分析进行统计分析。

3 结果

3.1 乌梅粉及水煎剂中的化学成分分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 方法对乌梅粉和水煎剂中的化学成分进行指认和鉴定, 共鉴定了 47 个化合物, 包括脂肪酸类 (fatty acids, FA) 成分 8 个、多

酚类 (polyphenols, Pp) 成分 25 个、糖苷类 (glycosides, Gly) 成分 12 个以及三萜类 (triterpenoids, Tp) 成分 2 个。乌梅粉和水煎剂中检测到的化学成分无明显差别, 具体信息见表 1 (均为共有成分)。代表性的 UPLC-Q-TOF-MS^E 质谱基峰图见图 1。

表 1 基于 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术的乌梅粉和水煎剂中主要化学成分的表征

Table 1 Characterization of chemical constituents of *Mume Fructus* powder and water decoction by UPLC-QTOF-MS^E

序号	<i>t_R</i> /min	分子离子 (<i>m/z</i>)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	MS/MS 碎片 (<i>m/z</i>)	化学成分	归属
C1	0.70	134.02	0.55	C ₄ H ₆ O ₅	133.015 9, 96.960 4	苹果酸	FA
C2	0.91	174.02	-0.08	C ₆ H ₆ O ₆	173.008 9, 111.008 7	乌头酸	FA
C3	0.94	192.03	1.48	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 6, 111.008 7, 87.008 7	柠檬酸	FA
C4	1.29	220.06	-0.77	C ₈ H ₁₂ O ₇	265.056 5, 219.050 8, 111.008 7	1,5-柠檬酸二甲酯	FA
C5 ^{std}	1.49	170.02	1.52	C ₇ H ₆ O ₅	169.014 1, 111.024 7, 191.056 0	没食子酸	Pp
C6	2.39	206.04	-5.31	C ₇ H ₁₀ O ₇	205.035 3, 111.008 7	2-柠檬酸甲酯	FA
C7	3.12	154.03	1.46	C ₇ H ₆ O ₄	153.019 2, 108.251 5	3,4-二羟基苯甲酸	Pp
C8	3.52	270.11	-0.22	C ₁₃ H ₁₈ O ₆	315.107 1, 269.102 6	苜基-β-D-葡萄糖苷	Gly
C9 ^{std}	3.56	354.10	2.76	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 0, 191.055 6, 135.044 7	3-咖啡酰奎宁酸	Pp
C10	3.63	182.06	0.78	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.050 8, 109.029 7, 163.040 4	二羟基苯丙酸	Pp
C11 ^{std}	3.72	354.10	3.69	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 1, 191.055 7, 135.045 4, 179.034 7	5-咖啡酰奎宁酸	Pp
C12	3.75	488.15	-0.33	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	487.145 2, 145.029 6	对香豆酰-3-O-蔗糖酯	Pp
C13	3.83	300.05	-0.58	C ₁₂ H ₁₂ O ₉	299.040 5, 173.009 1, 111.008 9	mumefural	FA
C14	3.87	354.10	-0.30	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 5, 179.034 8, 135.045 0, 173.045 4	4-咖啡酰奎宁酸	Pp
C15	3.94	300.05	-0.58	C ₁₂ H ₁₂ O ₉	299.040 5, 111.008 9, 87.008 1, 67.018 7	mumefural 异构体	FA
C16	3.95	368.11	1.28	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.103 4, 191.056 0, 173.009 2	3-咖啡酰奎宁酸甲酯或 3-阿魏酰奎宁酸	Pp
C17 ^{std}	3.99	180.04	2.11	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 8, 173.009 1, 135.045 1	咖啡酸	Pp
C18 ^{std}	4.00	290.08	2.87	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 8, 109.029 5, 245.081 9	表儿茶素	Pp
C19	4.04	457.16	-1.57	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	511.109 4, 502.156 6, 111.008 7	苦杏仁苷	Gly
C20	4.04	346.13	0.37	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	391.124 9	3,4,5-三甲氧基苜基-β-D-吡喃葡萄糖苷	Gly
C21	4.05	530.16	0.02	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₄	529.155 7, 145.029 5	mumeose A	Pp
C22 ^{std}	4.06	168.04	1.21	C ₈ H ₈ O ₄	167.034 5, 151.040 2, 108.021 5	香草酸	Pp
C23	4.08	402.15	2.77	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	447.150 5, 401.145 0, 269.102 8	苜基-β-D-葡萄糖苷	Gly
C24	4.09	368.11	-0.05	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.103 3, 161.024 2, 191.055 9	3-咖啡酰喹酸甲酯异构体	Pp
C25	4.14	270.11	-0.22	C ₁₃ H ₁₈ O ₆	315.108 7, 145.029 7	苜基-β-D-葡萄糖苷异构体	Gly
C26	4.16	402.15	2.77	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	447.151 0, 401.145 3	苜基-β-D-葡萄糖苷异构体	Gly
C27 ^{std}	4.18	198.05	0.05	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 5, 173.045 6	丁香酸	Pp
C28	4.46	296.13	-1.42	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	295.117 9, 133.029 4	香茅醇-β-D-葡萄糖苷	Gly
C29	4.47	295.11	-0.89	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	340.104 1, 295.117 9	野黑樱苷	Gly
C30	4.48	336.08	0.04	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.077 8, 161.024 0	5-O-咖啡酰莽草酸	Pp
C31 ^{std}	4.56	164.05	-1.18	C ₉ H ₈ O ₃	163.040 3, 119.050 3, 111.008 8	4-香豆酸	Pp
C32	4.60	336.09	2.25	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.077 3, 191.056 0, 161.024 4	4-O-咖啡酰莽草酸	Pp
C33	4.73	610.15	1.41	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 1, 300.027 6, 302.037 5	芦丁	Gly
C34	4.75	336.09	2.96	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	381.082 4, 335.078 0, 145.029 6, 191.056 3	3-咖啡酰莽草酸	Pp
C35	4.94	166.06	1.45	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.056 1, 147.045 2, 119.050 2	3-羟苜基丙酸	Pp
C36	4.94	464.10	-0.37	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	509.093 1, 463.088 2	槲皮素 3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	Gly
C37	5.30	420.18	0.10	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	419.171 3, 271.060 5	南烛木树脂酚	Pp
C38	5.36	336.08	-0.32	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	381.082 4, 269.081 5, 191.056 0, 173.045 4	3-咖啡酰莽草酸异构体	Pp
C39	5.57	248.09	0.40	C ₁₀ H ₁₆ O ₇	247.082 3, 111.008 8, 173.009 2	1,5-柠檬酸二乙酯	FA
C40 ^{std}	6.40	228.08	-0.51	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227.071 2, 143.050 4	白藜芦醇	Pp
C41	6.77	434.12	-1.92	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.114 4, 219.065 3, 152.011 4, 108.021 5	柚皮素 7-O-β-D-葡萄糖	Gly
C42	6.80	326.14	-0.72	C ₁₆ H ₂₂ O ₇	371.135 0, 191.055 4,	丁子香苷	Gly
C43 ^{std}	7.45	302.04	0.47	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.035 2, 111.008 5	槲皮素	Pp
C44	8.28	656.20	0.73	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₇	655.186 7, 145.029 8, 574.323 7	prunose II	Pp
C45 ^{std}	8.97	286.05	2.18	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 4, 116.928 7, 159.045 2	山柰酚	Pp
C46	13.23	472.35	-0.67	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.347 8, 539.331 6	科罗素酸	Tp
C47 ^{std}	14.58	456.36	-1.08	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.352 6, 523.340 1	熊果酸	Tp

std: 与对照品比对

std: compared with reference substances

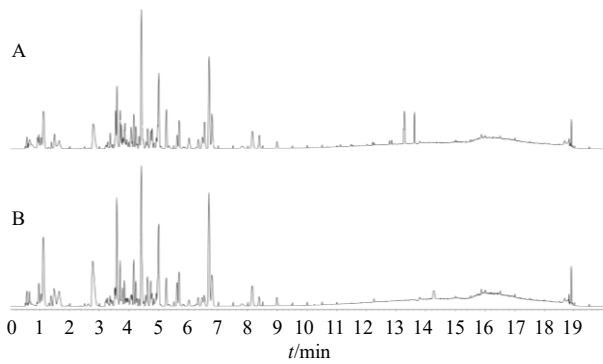


图1 乌梅粉 (A) 和水煎剂 (B) 中化学成分的基峰色谱图

Fig. 1 Representative base peak intensity chromatogram of chemical constituents in *Mume Fructus* powder (A) and water decoction (B)

3.2 乌梅粉及水煎剂对 TNBS 诱导 CD 大鼠体重、免疫器官指数、整体结肠损伤评分及结肠病理变化的影响

如表 2 所示, 给药第 9 天, 与对照组比较, 模

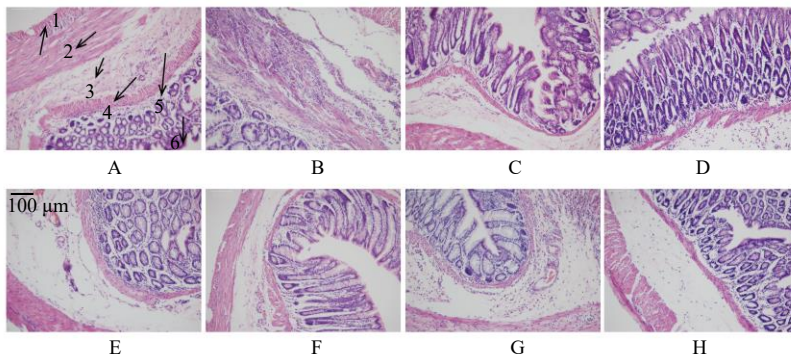
表 2 乌梅粉和水煎剂对 TNBS 诱导 CD 大鼠体重、免疫器官指数和整体结肠损伤评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of *Mume Fructus* powder and water decoction on body weight, immune organ index and overall colon injury score of TNBS-induced CD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/%	胸腺指数	脾脏指数	结肠损伤评分
对照	—	149.41 ± 1.03	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.13 ± 0.12
模型	—	124.09 ± 2.18 ^{##}	0.20 ± 0.01 [#]	0.45 ± 0.05 ^{##}	3.88 ± 0.39 ^{##}
美沙拉嗪	0.10	137.87 ± 2.08 ^{**}	0.23 ± 0.01	0.35 ± 0.02	1.50 ± 0.26 ^{**}
肠炎宁	0.34	127.18 ± 5.22	0.23 ± 0.01	0.31 ± 0.02 ^{**}	2.13 ± 0.66 ^{**}
乌梅粉	1.08	136.25 ± 1.08 ^{**}	0.25 ± 0.01 [*]	0.36 ± 0.02	1.75 ± 0.31 ^{**}
	3.24	129.02 ± 2.54	0.25 ± 0.01	0.34 ± 0.01 [*]	1.87 ± 0.22 ^{**}
乌梅水煎剂	1.08	133.65 ± 2.75 [*]	0.27 ± 0.02 ^{**}	0.31 ± 0.02 ^{**}	2.37 ± 0.32 [*]
	3.24	135.21 ± 3.27 [*]	0.25 ± 0.02	0.32 ± 0.02 ^{**}	1.62 ± 0.33 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group



1-上皮 2-固有层 3-黏膜肌层 4-黏膜下层 5-肌层 6-质膜 A-对照组 B-模型组 C-美沙拉嗪组 D-肠炎宁组 E-乌梅粉低剂量组 F-乌梅粉高剂量组 G-乌梅水煎剂低剂量组 H-乌梅水煎剂高剂量组, 图 3 同 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

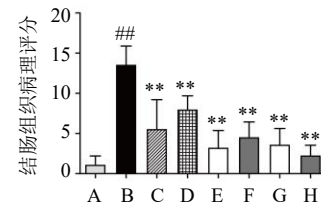
1-epithelium 2-lamina propria 3-muscularis mucosa 4-submucosa 5-muscularis 6-plasma membrane A-control group B-model group C-mesalazine group D-Changyanning group E-*Mume Fructus* powder low-dose group F-*Mume Fructus* powder high-dose group G-*Mume Fructus* water decoction low-dose group H-*Mume Fructus* water decoction high-dose group, same as fig. 3 ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 2 乌梅粉和水煎剂对 CD 大鼠结肠组织病理变化的影响 (×200)

Fig. 2 Effect of *Mume Fructus* powder and water decoction on histopathological changes in colon of CD rats (×200)

型组大鼠体质量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组、乌梅粉低剂量组和乌梅水煎剂低、高剂量组大鼠体质量均明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, 模型组大鼠胸腺指数显著降低 ($P < 0.05$), 脾脏指数显著升高 ($P < 0.01$), 表明胸腺萎缩同时伴有脾脏肿大; 与模型组比较, 乌梅粉低剂量组和乌梅水煎剂低剂量组大鼠胸腺指数明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肠炎宁组、乌梅粉高剂量组和乌梅水煎剂低、高剂量组脾脏指数明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, 模型组大鼠结肠整体损伤评分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠结肠整体损伤评分明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

进一步采用 HE 染色方法观察结肠组织形态及炎症情况, 如图 2 所示, 对照组大鼠结肠组织形态正常, 柱状细胞清晰, 杯状细胞排列有序, 固有层、黏膜肌层和黏膜下层连接紧密, 黏膜肌层较薄, 肌层和质膜层皆完整; 而模型组大鼠结肠组织上皮细胞结构改变, 固有层与黏膜肌层裂隙增大, TNBS 甚



至透过黏膜肌层,使肌层和质膜层结构改变;此外,模型组大鼠炎症细胞的数量和分布范围也较对照组明显增多。乌梅粉和水煎剂组大鼠结肠上皮细胞完整,结肠损伤程度较模型组明显改善 ($P < 0.01$)。

3.3 乌梅粉及水煎剂对 CD 大鼠结肠组织中 MPO 活性及血清中 NO、IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 IL-10 水平的影响

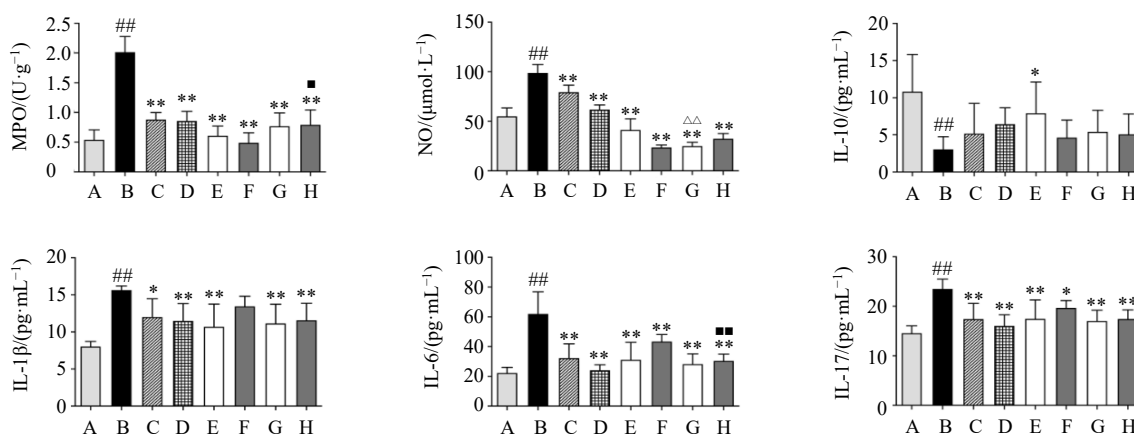
如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中 MPO 活性及血清中 NO、IL-1 β 、IL-6、IL-17 水平均显著升高 ($P < 0.01$),血清中 IL-10 水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠结肠组织中 MPO 活性及血清中 NO、IL-6、IL-17 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),乌梅粉低剂量组血清中 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$),除乌梅粉高剂量组外,其余各给药组血清中 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。其中乌梅粉高剂量组对结肠组织 MPO 活性的抑制作用较乌梅水煎剂高剂量组更为显著 ($P < 0.05$),乌梅水煎剂高剂量组对血清中 IL-6 水平的抑制作用较乌梅粉高剂量组更为显著 ($P < 0.01$),乌梅水煎剂低剂量组对血清中 NO 水平的抑制作用较乌梅粉低剂量组更为显著 ($P < 0.01$)。为探究造成上述差异的主要原因,进一步比较乌梅粉和水煎剂中的化学成分在体外模拟人胃肠道中的代谢情况。

3.4 乌梅粉及水煎剂的化学成分在体外模拟人胃肠道中的代谢变化

采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 方法对乌梅粉和水煎

剂在人工胃液/肠液中孵育前后的化学成分进行比较,发现随孵育时间变化,主要化学成分相对质量分数无显著性变化,表明乌梅中的主要化学成分在人工胃液和肠液中是稳定的,但在肠道菌孵育的条件下乌梅中化学成分会发生生物转化。乌梅粉和水煎剂在正常人工胃液、肠液及人源肠道菌群中孵育的化学成分及其代谢物质量分数变化见表 3,相对于乌梅粉,乌梅水煎剂中的原型成分消耗较快,相应地代谢产物生成速率也较快。相同孵育时间下,除了 0h 的香草酸 (C22)、3-羟苯基丙酸 (C35) 和南烛木树脂酚 (C37) 之外,其余化合物在不同孵育时间,其相对质量分数变化均为乌梅粉高于水煎剂,表明在不同时间点,乌梅粉的原型成分和代谢产物的质量分数高于乌梅水煎剂,可能是乌梅水煎剂在煎煮过程中部分成分损失导致的;同时乌梅粉中化学成分可在不同孵育时间逐渐释放。这与乌梅粉抑制结肠组织 MPO 活性较好的结果吻合。

在健康人肠道菌孵育液中共指认 17 个相对含量先增加再降低的化合物,该 17 个化合物是乌梅本身存在的化学成分,在肠道菌孵育后也可由乌梅中其他化学成分代谢生成,表明胃肠道代谢可以改变乌梅中化学成分的组成比例(表 3)。根据乌梅粉和水煎剂中化学成分的含量变化和已报道的化合物裂解规律,乌梅中脂肪酸类的 2-柠檬酸甲酯 (C6)、1,5-柠檬酸二甲酯 (C4) 和 1,5-柠檬酸二乙酯 (C39) 可水解或脱甲基生成柠檬酸 (C3),然后可继续脱水生成乌头酸 (C2) [17],或脱羟基、脱乙酰基生成苹果



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与乌梅粉低剂量组比较: $\triangle P < 0.05$; 与乌梅粉高剂量组比较: $\blacksquare P < 0.05$ $\blacksquare P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\triangle P < 0.05$ vs *Mume Fructus* powder low-dose group; $\blacksquare P < 0.05$ $\blacksquare P < 0.01$ vs *Mume Fructus* powder high-dose group

图3 乌梅粉及水煎剂对 CD 大鼠结肠组织中 MPO 活性及血清中 NO、IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 3 Effect of *Mume Fructus* powder and water decoction on MPO activity in colon tissue and NO, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-10 levels in serum of CD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 3 乌梅粉和水煎剂在体外人工胃肠液和人源肠道菌孵育后原型成分和代谢产物的相对含量 (n = 3)

Table 3 Relative contents of prototype components and metabolites of *Mume Fructus* powder and water decoction after incubation with artificial gastrointestinal fluid and human intestinal bacteria *in vitro* (n = 3)

编号	化学成分	类别	来源	t _R /min	相对质量分数/%								
					胃液	肠液	0 h 肠道菌	3 h 肠道菌	6 h 肠道菌	12 h 肠道菌	24 h 肠道菌	36 h 肠道菌	48 h 肠道菌
C1	苹果酸	原型、代谢产物	乌梅粉	0.70	0.17	0.22	0.18	0.07	0.09	0.33	0.21	0.40	0.24
			乌梅水煎剂	0.70	0.21	0.28	0.13	0.15	0.27	0.35	0.27	0.25	0.39
C2	乌头酸	原型、代谢产物	乌梅粉	0.70	2.98	2.32	0.39	0.32	0.39	0.54	0.46	0.77	—
			乌梅水煎剂	0.70	0.83	0.54	0.08	0.10	0.12	0.09	0.07	—	0.38
C3	柠檬酸	原型	乌梅粉	0.93	6.28	6.07	5.35	2.87	2.24	0.40	—	—	—
			乌梅水煎剂	0.93	7.04	5.79	2.11	—	—	—	—	—	—
C4	1,5-柠檬酸二甲酯	原型	乌梅粉	1.29	1.22	1.02	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	1.29	0.51	0.47	—	—	—	—	—	—	—
C5	没食子酸	原型、代谢产物	乌梅粉	1.49	0.02	0.02	0.03	—	—	—	—	0.14	—
			乌梅水煎剂	1.49	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	0.15
C6	2-柠檬酸甲酯	原型	乌梅粉	2.39	1.63	1.45	0.05	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	2.39	0.79	0.30	—	—	—	—	—	—	—
C7	3,4-二羟基苯甲酸	原型、代谢产物	乌梅粉	3.12	0.42	0.47	0.15	0.13	0.14	0.15	0.15	0.19	0.10
			乌梅水煎剂	3.12	0.14	0.14	0.08	0.09	0.10	0.11	0.10	0.10	0.20
C8	苯基-β-D-葡萄糖苷	原型	乌梅粉	3.52	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	3.52	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	—
C9	3-咖啡酰奎宁酸	原型	乌梅粉	3.56	18.84	19.02	13.06	9.61	4.33	4.17	3.60	3.97	—
			乌梅水煎剂	3.56	17.00	17.81	8.04	1.33	0.98	0.50	0.16	—	2.61
C10	二羟基苯丙酸	原型、代谢产物	乌梅粉	3.63	0.01	0.01	0.14	0	0	2.16	4.32	4.18	2.15
			乌梅水煎剂	3.63	0	0	0.17	0.32	0.54	1.55	2.10	2.11	3.74
C11	5-咖啡酰奎宁酸	原型	乌梅粉	3.82	1.92	1.87	1.51	1.42	1.36	1.30	1.13	0.95	—
			乌梅水煎剂	3.82	4.91	5.08	0.29	0.21	0.15	—	—	—	0.63
C12	对香豆酰-3-O-蔗糖酯	原型、代谢产物	乌梅粉	3.75	5.64	6.54	9.08	9.88	11.22	12.33	13.91	12.60	0
			乌梅水煎剂	3.75	5.74	6.52	5.27	0	0	0	0	0	12.19
C13	mumefural	原型	乌梅粉	3.83	0.02	0.01	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	3.83	0	0.01	—	—	—	—	—	—	—
C14	4-咖啡酰奎宁酸	原型	乌梅粉	3.87	8.36	8.89	9.07	5.69	1.06	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	3.87	7.56	7.87	2.64	0.17	—	—	—	—	—
C15	mumefural 异构体	原型	乌梅粉	3.94	0.20	0.20	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	3.94	0.06	0.10	—	—	—	—	—	—	—
C16	3-咖啡酰奎宁酸甲酯 或 3-阿魏酰奎宁酸	原型	乌梅粉	3.95	1.01	1.21	0.63	0.28	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	3.95	1.23	1.55	0.25	—	—	—	—	—	—
C17	咖啡酸	原型、代谢产物	乌梅粉	3.99	0.44	0.48	0.33	0.14	0.07	—	—	0.10	—
			乌梅水煎剂	3.99	0.29	0.31	0.09	—	—	—	—	—	0.13
C18	表儿茶素	原型	乌梅粉	4.00	0.01	0.02	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.00	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	—
C19	苦杏仁苷	原型	乌梅粉	4.04	0.31	0.30	0.14	0.10	0.08	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.04	0.31	0.25	0.09	—	—	—	—	—	—
C20	3,4,5-三甲氧基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷	原型	乌梅粉	4.04	0.63	0.78	0.56	0.18	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.04	0.69	0.86	0.41	—	—	—	—	—	—
C21	mumeose A	原型、代谢产物	乌梅粉	4.05	1.54	1.68	1.19	1.12	1.44	1.51	1.56	1.71	0.65
			乌梅水煎剂	4.05	3.58	3.98	2.43	1.56	0.72	0.76	0.69	0.66	1.77
C22	香草酸	原型、代谢产物	乌梅粉	4.06	—	—	0.03	0.09	0.11	0.12	0.11	0.10	0.09
			乌梅水煎剂	4.06	—	—	0.05	0.11	0.10	0.11	0.09	0.09	0.12
C23	苯甲醇樱草糖苷	原型	乌梅粉	4.08	7.95	7.81	10.03	9.69	8.14	5.27	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.08	8.23	7.87	6.34	—	—	—	—	—	—
C24	3-咖啡酰奎宁酸甲酯 异构体	原型	乌梅粉	4.09	1.11	0.90	0.36	0.33	0.25	0.09	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.09	0.57	0.30	—	—	—	—	—	—	—
C25	苯基-β-D-葡萄糖苷异 构体	原型	乌梅粉	4.14	0.14	0.15	0.23	0.20	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.14	0.16	0.24	0.22	—	—	—	—	—	—
C26	苯甲醇樱草糖苷异 构体	原型	乌梅粉	4.16	3.00	2.99	2.46	1.78	1.38	1.02	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.16	3.04	3.11	0.83	—	—	—	—	—	—

续表 3

编号	化学成分	类别	来源	t _R /min	相对质量分数/%								
					胃液	肠液	0 h 肠道菌	3 h 肠道菌	6 h 肠道菌	12 h 肠道菌	24 h 肠道菌	36 h 肠道菌	48 h 肠道菌
C27	丁香酸	原型、代谢产物	乌梅粉	4.18	0.04	0.04	0.05	0.05	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.18	0.07	0.02	0.05	—	—	—	—	—	—
C28	香茅醇-β-D-葡萄糖苷	原型、代谢产物	乌梅粉	4.46	0.37	0.44	0.23	0.18	0.20	0.23	0.23	0.26	0.10
			乌梅水煎剂	4.46	0.22	0.32	0.10	0.09	0.09	0.12	0.11	0.11	0.26
C29	野黑樱苷	原型	乌梅粉	4.47	1.03	1.18	1.01	0.42	0.18	0.07	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.47	1.11	1.48	0.60	—	—	—	—	—	—
C30	5-O-咖啡酰莽草酸	原型	乌梅粉	4.48	4.54	4.62	3.35	1.80	0.22	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.48	3.45	2.92	0.73	—	—	—	—	—	—
C31	4-香豆酸	原型	乌梅粉	4.56	0.27	0.30	0.08	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.56	0.13	0.17	—	—	—	—	—	—	—
C32	4-O-咖啡酰莽草酸	原型	乌梅粉	4.60	2.56	2.52	1.56	0.96	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.60	1.10	1.09	—	—	—	—	—	—	—
C33	芦丁	原型	乌梅粉	4.73	2.81	2.94	1.31	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.73	2.36	3.07	—	—	—	—	—	—	—
C34	3-咖啡酰莽草酸	原型	乌梅粉	4.75	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.75	0.01	0.02	—	—	—	—	—	—	—
C35	3-羟苯基丙酸	原型、代谢产物	乌梅粉	4.94	0.10	0.01	0.61	2.21	3.79	7.76	10.77	11.41	11.47
			乌梅水煎剂	4.94	0.05	0.00	1.15	4.21	5.77	9.33	10.61	10.80	10.83
C36	槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	原型、代谢产物	乌梅粉	4.94	0.40	0.44	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	4.94	0.26	0.34	—	—	—	—	—	—	—
C37	南烛木树脂酚	原型、代谢产物	乌梅粉	5.30	0.03	0.04	0.04	0.07	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	5.30	0.03	0.08	0.07	—	—	0.10	0.11	0.10	0.11
C38	3-咖啡酰莽草酸异构体	原型	乌梅粉	5.36	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	5.36	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C39	1,5-柠檬酸二乙酯	原型	乌梅粉	5.57	17.86	10.08	0.04	0	0	0	0	0	0
			乌梅水煎剂	5.57	16.25	1.57	0	0	0	0	0	0	0
C40	白藜芦醇	原型	乌梅粉	6.40	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	6.40	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	—
C41	柚皮素-7-O-β-D-葡萄糖	原型	乌梅粉	6.77	0.22	0.23	0.05	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	6.77	0.05	0.06	—	—	—	—	—	—	—
C42	丁子香苷	原型	乌梅粉	6.80	0.32	0.35	0.04	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	6.80	0.16	0.19	—	—	—	—	—	—	—
C43	槲皮素	原型、代谢产物	乌梅粉	7.45	0.32	0.38	0.31	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	7.45	0.03	0.03	—	—	—	—	—	—	—
C44	prunose II	原型	乌梅粉	8.28	0.17	0.19	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	8.28	0.08	0.10	—	—	—	—	—	—	—
C45	山柰酚	原型	乌梅粉	8.97	0.01	0.01	—	—	—	—	—	—	—
			乌梅水煎剂	8.97	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C46	科罗素酸	原型、代谢产物	乌梅粉	13.23	0.47	0.40	0.64	0.33	2.00	2.36	0.53	0.25	0.27
			乌梅水煎剂	13.23	0.06	0.06	0.18	0.19	0.26	0.17	0.15	0.13	2.70
C47	熊果酸	原型、代谢产物	乌梅粉	14.58	0.19	0.15	0.79	1.16	2.89	2.81	2.31	0.66	0.53
			乌梅水煎剂	14.58	0.15	0.13	0.27	0.36	0.51	0.35	0.30	0.26	2.77

酸 (C1, 图 4), 因而 C4、C6、C39 和 C3 随孵育时间延长含量逐渐降低; C3 先在 3 h 升高后逐渐降低, 而 C2 和 C1 的相对含量则都在 12 h 升高后逐渐降低。羟基肉桂酸类化合物 C9、C11、C14、C16、C17、C24、C30、C31、C32、C34、C38、C44 中的 3-咖啡酰奎宁酸甲酯及其异构体、3-阿魏酰奎宁酸 (C16、C24) 发生去甲基化为咖啡酰奎宁酸 C9、C11、C14, 进而裂解生成咖啡酸 (C17)。C17 经过一系列的羟基化、氧化、甲基化和还原生成中间体二氢丁香素,

进而发生二聚化生成木脂素类的南烛木树脂酚 (C37)。C17 还会发生重排、脱乙烯基生成 3,4-二羟基苯甲酸 (C7), 氧化生成没食子酸 (C5), 然后继续甲基化为丁香酸 (C27)。C7 也可以甲基化生成香草酸 (C22)。同时, C17 还会脱羟基生成 4-香豆酸 (C31), 或者发生脱羟基和还原反应生成成为 3-羟苯基丙酸 (C35)^[18] (图 5)。糖苷类的代谢途径如图 6 所示, 丁子香苷 (C42) 可发生去甲基化、脱氧生成香茅醇-β-D-葡萄糖苷 (C28), 然后 C28 仍继续代谢,

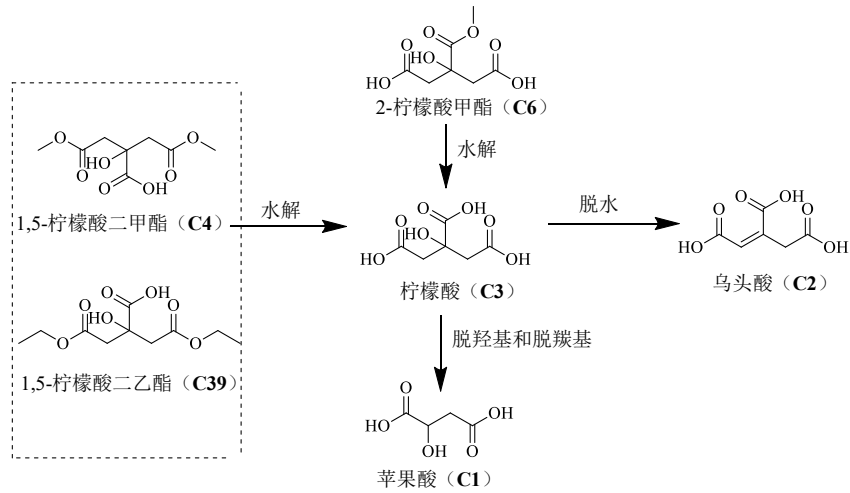


图4 乌梅粉和水煎剂中的脂肪酸类在体外人源肠道菌孵育的代谢途径

Fig. 4 Proposed metabolic pathways of fatty acids in powder suspension and water decoction of *Mume Fructus* in human gut bacteria *in vitro*

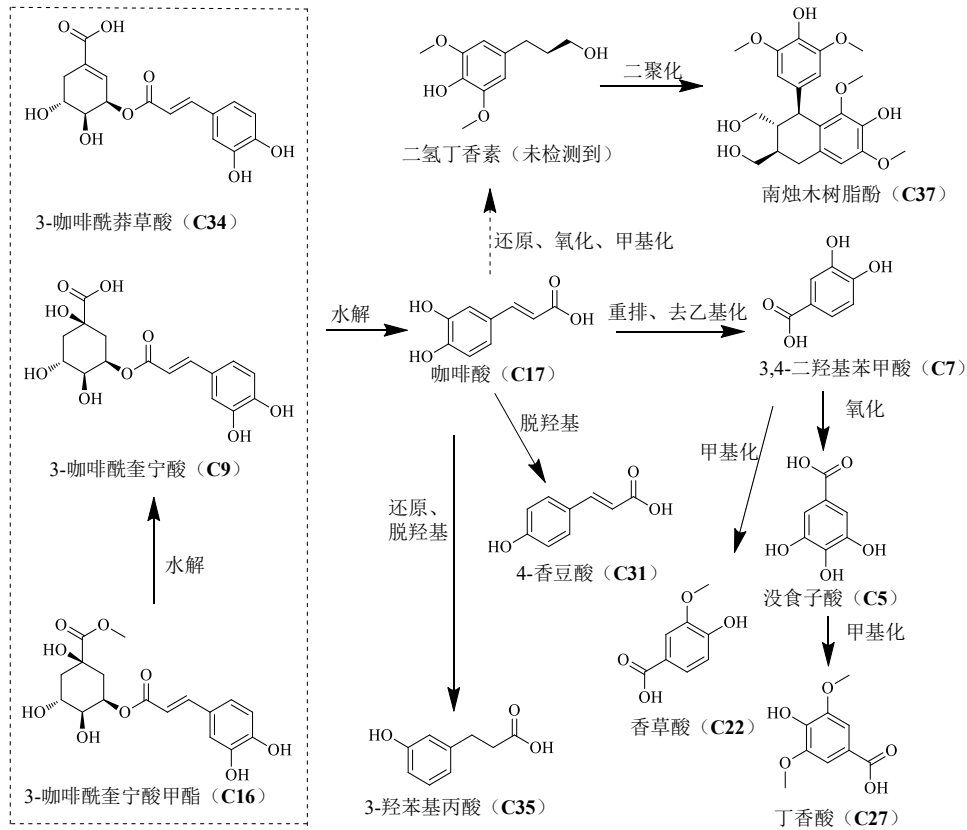


图5 乌梅粉和水煎剂中的多酚类在体外人源肠道菌孵育的代谢途径

Fig. 5 Proposed metabolic pathways of polyphenols in powder and water decoction of *Mume Fructus* in human gut bacteria *in vitro*

因而 C28 相对含量随孵育时间延长呈现先增加再降低的变化趋势。另据文献报道，孵育液中的糖苷类，例如化合物 C33、C36、C41 和 C23 等还会发生脱糖基化^[19]，生成 C43、C45 等黄酮苷元以及 C8 单糖苷，然后 C8、C43 和 C45 可继续代谢^[20-21]，因

而在孵育液中含量逐渐降低。此外，推测 C42 和 C20 还能分别通过脱甲基、还原、脱丙烯基生成 C8。孵育液中还检测到三萜酸类衍生物科罗素酸 (C46) 和熊果酸 (C47) 含量增加，可能是来源于其他三萜酸衍生物的降解。此外，孵育液中乙酰蔗糖酯类对香

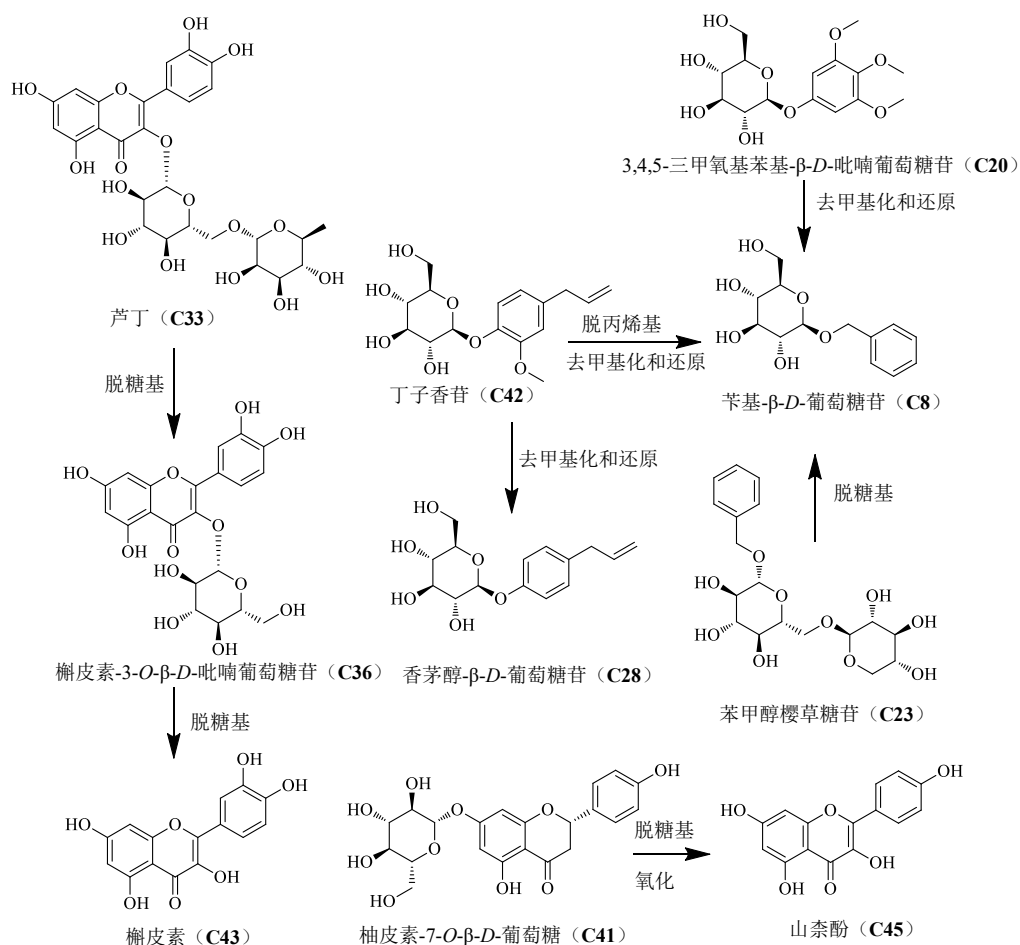


图6 乌梅粉和水煎剂中的糖苷类在体外人源肠道菌孵育的代谢途径

Fig. 6 Proposed metabolic pathways of glycosides in powder and water decoction of *Mume Fructus* in human gut bacteria *in vitro*

豆酰-3-O-蔗糖酯 (C12) 和 mumeose A (C21) 的含量也增加, 可能来源于其他乙酰蔗糖酯类的脱乙酰基反应。综上, 乌梅粉及水煎剂中的化学成分在人源肠道菌孵育液中会发生水解、脱甲基、脱羟基、还原、缩合、氧化、甲基化等代谢类型。

3.5 乌梅粉及水煎剂的人源肠道菌孵育液中总糖及 SCFAs 含量变化

SCFAs 不仅是多酚、黄酮等的代谢产物, 也是可溶性纤维的代谢产物。乌梅粉和水煎剂在人源肠道菌孵育液中可溶性的总糖以及 SCFAs 的变化见图 7, 空白菌液组的总糖降解率在 6 h 达峰, 而乌梅水煎剂的总糖降解率约 12 h 达峰, 乌梅粉的总糖降解率约 24 h 达峰。乌梅水煎剂的总糖降解率高于空白菌液组 ($P < 0.01$), 但是乌梅粉的总糖降解率先低于空白菌液组 ($P < 0.01$), 而后高于空白菌液组 ($P < 0.01$), 最终与乌梅水煎剂的总糖降解率持平。乌梅粉在孵育开始总糖降解率低于空白菌液组, 可

能是乌梅粉一开始对肠道菌产生部分抑制所致, 而最终孵育结束乌梅粉和水煎剂的总糖降解率高于空白菌液组, 推测可能是乌梅中的化学成分与肠道菌群相互作用有关。

孵育 48 h 后, 与空白菌液组比较, 乌梅粉和水煎剂可增加孵育液中醋酸水平 ($P < 0.01$); 乌梅水煎剂可增加丙酸水平, 而乌梅粉则相反 ($P < 0.01$)。乌梅水煎剂中丁酸、戊酸、异戊酸和己酸水平在孵育达平衡之后与空白菌液组接近, 无显著性差异, 而乌梅粉中丁酸、戊酸、异戊酸和己酸水平在孵育 6 h 后均低于空白菌液组 ($P < 0.01$)。孵育 48 h 后, 与空白菌液组比较, 乌梅水煎剂增加孵育液总 SCFAs 含量 ($P < 0.05$), 而乌梅粉则减少了总 SCFAs 含量 ($P < 0.01$), 原因可能与乌梅粉中不断溶出的化合物对肠道菌的抑制有关。SCFAs 可吸收入血, 发挥抗炎作用^[22], 这可能是乌梅水煎剂抑制血清中 IL-6 和 NO 水平优于乌梅粉的原因之一。

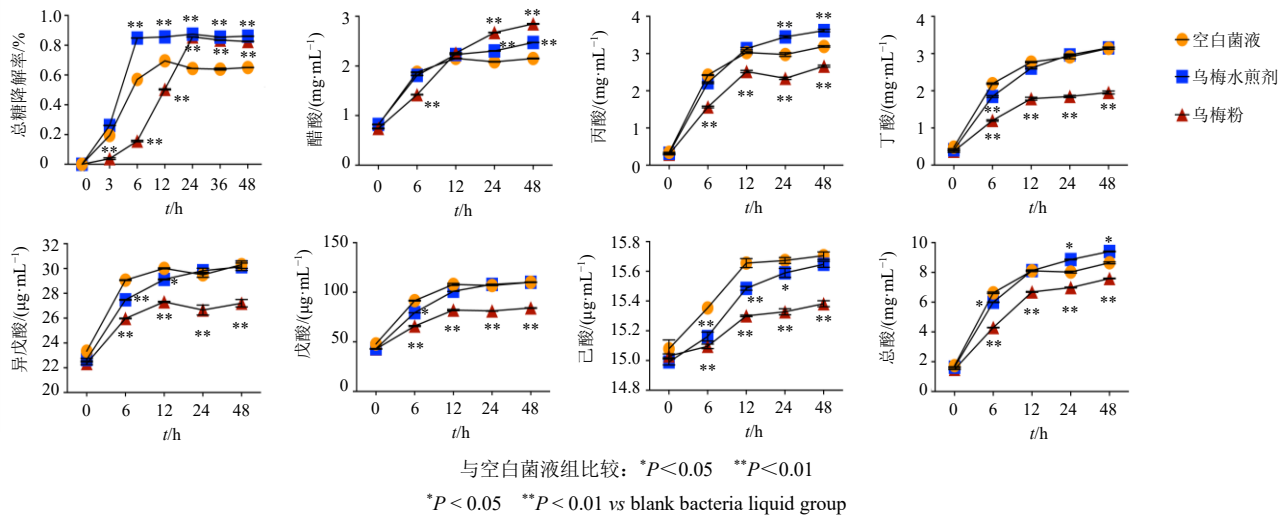


图7 乌梅粉和水煎剂在肠道菌孵育液中总糖降解率以及 SCFAs 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Changes of total sugar degradation and SCFAs in intestinal bacteria incubation solution of *Mume Fructus* powder and water decoction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

已有研究表明, 中药治疗消化性溃疡的疗效与剂型有关, 健胃愈疡颗粒剂较健胃愈疡片溶解快, 且直接作用于胃及十二指肠溃疡面, 从而更好发挥药效^[23]。临床上也有乌梅粉和水煎剂治疗肠炎的相关报道^[6-7]。但是, 乌梅粉和水煎剂对肠炎的治疗效果是否一致尚不清楚。本课题组前期研究表明, 乌梅水煎剂和醇提物均可缓解 TNBS 诱导的 CD 大鼠症状, 且乌梅水煎剂在降低血清炎症因子方面的效果优于醇提物^[9]。此外, 研究发现果梅提取液在增加幼鸡仔胸腺指数、减少大肠杆菌菌落以及增加乳杆菌的效果优于其冻干粉, 提示果梅提取液在促进健康幼鸡仔生长方面优于冻干粉^[24]。基于此, 推测乌梅不同剂型也可能对机体调节存在一定差异。因此, 本研究采用 TNBS 诱导 CD 大鼠模型比较乌梅粉和水煎剂干预 CD 的作用差异, 并基于体外人源胃肠道代谢探讨其差异的物质基础, 为乌梅不同剂型的临床应用和开发提供数据支持。

本研究结果表明, 乌梅粉和水煎剂中检测的化学成分在组成上无明显差别, 均含有柠檬酸、黄酮、多酚类等成分。其中, 乌梅中的柠檬酸^[25]以及多酚类^[26]通常被认为是其抗炎活性物质。这可能是乌梅粉和水煎剂均能明显缓解 CD 大鼠的体质量减轻、免疫器官指数失衡和结肠溃疡程度, 显著降低 CD 大鼠血清中 NO、IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 炎症因子的水平, 以及结肠组织中 MPO 活性, 发挥干预 CD 作用的原因。乌梅粉抑制结肠组织 MPO 活性优于乌

梅水煎剂, 但抑制血清中炎症因子水平低于乌梅水煎剂, 推测可能与乌梅不同剂型在胃肠道的代谢和吸收差异有关。在胃肠道环境中, 由于胃液中存在胃蛋白酶, 肠液中存在胰酶, 特别是肠道菌可以产生不同功能的代谢酶 (包括各种碳水化合物酶、蛋白酶、偶氮还原酶、7- α 羟基酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -葡萄糖苷酶、硝基还原酶等), 可参与不同药物的代谢过程^[27]。乌梅粉具有缓释的特点, 其中的化学成分逐渐释放, 且相同孵育条件下, 化学成分的相对含量高于乌梅水煎剂; 相较于乌梅粉, 发现体外孵育过程中乌梅水煎剂中的代谢产物 SCFAs 生成量较多, SCFAs 可吸收入血发挥抗炎作用^[22]。可能是乌梅粉降低结肠组织的 MPO 活性效果优于乌梅水煎剂, 而抑制血清中的炎症因子 IL-6 和 NO 水平低于乌梅水煎剂的原因之一。

此外, 在比较乌梅粉和水煎剂的肠道菌孵育液中总糖降解率以及代谢产物 SCFAs 的生成率变化时发现, 乌梅水煎剂在孵育的前 24 h 内, 总糖降解率高于乌梅粉, 且在孵育期间的 SCFAs 的生成率也高于乌梅粉, 这也反映了乌梅粉较水煎剂相比“缓释”的特点。总糖降解率可侧面反映菌群结构的变化^[28], 乌梅粉和水煎剂的总糖降解率变化不同, 表明其不同剂型可能对肠道菌群的调节作用不同。研究表明, 梅果中膳食纤维可增加盲肠中产 SCFAs 菌拟杆菌 *Bacteroides* 和 *Clostridium cluster IV* 的占比^[29], 而拟杆菌和 *Clostridium cluster IV* 在炎症性肠病患者中含量降低^[30]。适当浓度的绿原酸、咖啡

酸和芦丁等多酚类成分也可增加产 SCFAs 肠道菌如 *Bifidobacteria*, 进而增加 SCFAs 含量; 但是当多酚浓度较高时, 会对 *Bifidobacteria* 产生抑制, 减少 SCFAs 的生成^[31]。与肠道菌空白菌液组比较, 乌梅水煎剂可以增加肠道菌孵育液中 SCFAs 含量, 而乌梅粉减少了 SCFAs 的含量。推测乌梅水煎剂总糖降解率及 SCFAs 生成率较高, 可能与其促进 SCFAs 生成菌有关, 或其在煎煮过程中增加了可溶性膳食纤维的比例, 进而增加产 SCFAs 菌的比例, 增加 SCFAs 的生成。而乌梅粉中具有抗菌活性的有机酸^[25] (如柠檬酸、苹果酸、2-甲基柠檬酸等) 以及多酚类^[31] (如咖啡酰奎宁酸、对香豆酸、芦丁等) 的含量较高, 使菌群受到抑制, 可能是其 SCFAs 的生成率降低的原因之一。乌梅粉和水煎剂对肠道菌群的影响有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王中华. “免煎中药粉”的开发应用前景 [J]. 天津药学, 2002, 14(4): 2.
- [2] 骆苏芳, 翁甲丰. 浅谈超微细中药粉体 [J]. 中药材, 1999, 22(4): 3.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 81.
- [4] 唐一上, 蒋蔚屏. 关于乌梅炮制历史的沿革研究 [J]. 中成药研究, 1988(3): 16-17.
- [5] 龚旭. 乌梅的用法与用量刍议 [J]. 中医杂志, 1989(12): 54-55.
- [6] 张学峰. 乌梅汤对溃疡性结肠炎患者 Hgb、ESR、CRP 及免疫功能的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(8): 66-67.
- [7] 艾良英. 乌梅、苏打治疗婴幼儿腹泻 60 例分析 [J]. 江西医药, 2011, 46(8): 735-736.
- [8] 何爱明, 王乙林, 林世明. 乌梅水煎剂对实验性溃疡性结肠炎小鼠的作用 [J]. 药学实践杂志, 2012, 30(5): 357-360.
- [9] Liu Z H, Peng Y, Ma P, et al. An integrated strategy for anti-inflammatory quality markers screening of traditional Chinese herbal medicine *Mume Fructus* based on phytochemical analysis and anti-colitis activity [J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 154002.
- [10] Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(11): 5496-5500.
- [11] Nair A, Morsy M A, Jacob S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development [J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(8): 373-382.
- [12] Witaicenis A, Luchini A C, Hiruma-Lima C A, et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylscutellin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine [J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 195(1): 76-85.
- [13] 中国药典 [S]. 三部. 2020: 483.
- [14] Zhou G S, Peng Y, Zhao L J, et al. Biotransformation of total saponins in *Siraitia Fructus* by human intestinal microbiota of normal and type 2 diabetic patients: Comprehensive metabolite identification and metabolic profile elucidation using LC-Q-TOF/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(8): 1518-1524.
- [15] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. *Anal Biochem*, 2005, 339(1): 69-72.
- [16] Titgemeyer E C, Bourquin L D, Fahey G C, et al. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria *in vitro* [J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(6): 1418-1424.
- [17] Kobayashi K, Maruebi J, Kirimura K. Bioproduction of *trans*-aconitic acid from citric acid by whole-cell reaction of *Escherichia coli* heterologously expressing the aconitate isomerase gene from *Pseudomonas* sp WU-0701 [J]. *ChemistrySelect*, 2016, 1(7): 1467-1471.
- [18] Tomas-Barberan F, García-Villalba R, Quartieri A, et al. *In vitro* transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(5): 1122-1131.
- [19] Mori T, Kumano T, He H, et al. C-Glycoside metabolism in the gut and in nature: Identification, characterization, structural analyses and distribution of C-C bond-cleaving enzymes [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1-12.
- [20] Mizuma T, Nakamura M, Ina H, et al. Intestinal SGLT1-mediated absorption and metabolism of benzyl β -glucoside contained in *Prunus mume*: Carrier-mediated transport increases intestinal availability [J]. *BBA-Gen Subjects*, 2005, 1722(2): 218-223.
- [21] Vissienon C, Nieber K, Kelber O, et al. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin-are they prodrugs? [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(7): 733-740.
- [22] 胡民万, 扈金萍. 短链脂肪酸与代谢性疾病相关性的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志 2020, 47(11): 881-886.
- [23] 李家邦, 曹光复. 中药治疗消化性溃疡的疗效与剂型相关 [J]. 华人消化杂志, 1998, 6(4): 3.
- [24] Jang I, Kang S, Ko Y. Influence of Plum (*Prunus Mume*

- Siebold and Zucc.) products on growth performance, intestinal function and immunity in broiler chicks [J]. *J Poult Sci*, 2013, 50(1): 28-36.
- [25] Williams N C, O'Neill L A J. A role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 141.
- [26] Lee S Y, Lee S J, Hur S J. Effects of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. extract and its biopolymer encapsulation on a mouse model of colitis [J]. *J Sci Food Agr*, 2017, 97(2): 686-692.
- [27] Xie Y, Hu F D, Xiang D W, et al. The metabolic effect of gut microbiota on drugs [J]. *Drug Metab Rev*, 2020, 52(1): 139-156.
- [28] Flint H J, Scott K P, Duncan S H, et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut [J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 289-306.
- [29] Tamura M, Ohnishi Y, Kotani T, et al. Effects of new dietary fiber from Japanese Apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) on gut function and intestinal microflora in adult mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(4): 2088-2099.
- [30] Zhang S L, Wang S N, Miao C Y. Influence of microbiota on intestinal immune system in ulcerative colitis and its intervention [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1674.
- [31] Parkar S G, Trower T M, Stevenson D E. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota [J]. *Anaerobe*, 2013, 23: 12-19.

[责任编辑 李亚楠]