

胡芦巴多糖自组装递送对姜黄素体内代谢产物及代谢途径的影响

胡琼丹¹, 龙蕊^{1#}, 刘佳¹, 唐鑫星¹, 李玲¹, 马入瑜¹, 熊雯², 罗霄², 郑萍², 肖洪涛^{3*}, 李锐^{1,4*}

1. 成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137
2. 成都市药品检验研究院 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 四川 成都 610045
3. 四川省肿瘤医院药学部, 四川 成都 610072
4. 四川锦弘科优生物科技有限责任公司, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究胡芦巴多糖 (FS60) 与总姜黄素 (Curcuminoids) 自组装纳米聚集体对其主要活性成分姜黄素 (curcumin, Cur) 体内代谢的影响。方法 随机将 SD 雄性大鼠分为空白组、总姜黄素组、FS60-总姜黄素I组和 FS60-总姜黄素II组, 其中 FS60-总姜黄素II组 ig FS60 (3.44 g/kg), 其余组给予等体积纯水。干预 7 d 后, 各组以 100 mg/kg Cur 剂量 ig 相应药物, 空白组给予等体积纯水。收集血浆、肝脏、尿液和粪便样品并进行预处理, 采用超高效液相色谱串联四级杆-静电场轨道高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术, 分别在正、负离子模式下对各组 Cur 原型及其代谢产物进行鉴定和对比分析。结果 共检测出 29 种 Cur 代谢产物, 其中总姜黄素组 24 种, FS60-总姜黄素I组 27 种, FS60-总姜黄素II组 29 种。组间对比分析可知, 胡芦巴多糖 FS60 通过包裹总姜黄素形成自组装 FS60-总姜黄素聚集体增加了可检出的体内 Cur 代谢产物种类以及促进 Cur 代谢产物体循环。长时间摄入 FS60-总姜黄素聚集体可能由于 FS60 的持续干预可进一步提高 Cur 的吸收与代谢。结论 初步明确了胡芦巴多糖 FS60 对 Cur 体内代谢产物种类及其代谢转化的影响, 为进一步明确胡芦巴多糖递送姜黄素的药效学意义提供研究基础。

关键词: 胡芦巴多糖; 姜黄素; 自组装; 代谢; 姜黄素葡萄糖醛酸; 四氢姜黄素; 六氢姜黄素; 八氢姜黄素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2024)23 - 7950 - 19

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.004

Effects of self-assembly delivery system of fenugreek polysaccharide on curcumin metabolites and metabolic pathways *in vivo*

HU Qiongdan¹, LONG Rui¹, LIU Jia¹, TANG Xinxing¹, LI Ling¹, MA Ruyun¹, XIONG Wen², LUO Xiao², ZHENG Ping², XIAO Hongtao³, LI Rui^{1,4}

1. School of Pharmacy, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Chengdu Institute for Drug Control & NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine (Chinese Materia Medica), Chengdu 610045, China
3. Pharmacy Department of Sichuan Cancer Hospital, Chengdu 610072, China
4. Sichuan Jinhong Keyou Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the effects of self-assembled nanoaggregates formed by fenugreek polysaccharide (FS60) and curcuminoids on the metabolism of curcumin (Cur) *in vivo*. **Methods** SD male rats were randomly divided into blank group, Curcuminoids group, FS60-curcuminoids I group and FS60-curcuminoids II group. FS60-curcuminoids II group was given FS60

收稿日期: 2024-09-13

基金项目: 国家重点研发计划-中医药现代化专项 (2023YFC3504101); 国家自然科学基金面上项目 (82073994); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划 (QJJ2021002)

作者简介: 胡琼丹, 博士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 529975190@qq.com

#共同第一作者: 龙蕊, 本科生, 研究方向为中药的化学分析及体内代谢。E-mail: 1059815770@qq.com

*通信作者: 李锐, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药的化学分析与体内代谢研究。E-mail: lirui@cudtc.edu.cn

肖洪涛, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新药研发与药剂学研究。E-mail: xiaohongtao@scszlyy.org.cn

(3.44g/kg) via gavage. The other groups were given equal volume pure water. After 7 d of intervention, 100 mg/kg Cur were given to each treatment group by gavage, and the blank group was given equal volume pure water. Plasma, liver, urine and fecal samples were collected and pretreated. The Cur prototypes and their metabolites were analyzed and identified in positive and negative ion modes by ultra performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS). **Results** A total of 29 species of Cur metabolites were detected, including 24 species in Curcuminoids group, 27 species in FS60-curcuminoids I group and 29 species in FS60-curcuminoids II group. The comparison between groups showed that FS60 encapsulated Curcuminoids to form self-assembled FS60-curcuminoids aggregates, which increased the types of Cur metabolites that could be detected *in vivo* and promoted the systemic circulation of them. Long-term intake of FS60-curcuminoids aggregates may further improve the absorption and metabolism of Cur due to the continuous intervention of FS60. **Conclusion** The effects of fenugreek polysaccharide FS60 on the types of metabolites and their metabolic transformation in Cur were clarified, which provided the research basis for further clarifying the pharmacodynamic significance of delivery of Cur by fenugreek polysaccharide.

Key words: fenugreek polysaccharide; curcumin; self-assembly; metabolism; curcumin glucuronide; tetrahydrocurcumin; hexahydrocurcumin; octahydrocurcumin

多酚作为广泛存在于植物体内的次生代谢物，流行病学研究表明，其摄入与癌症、糖尿病和心血管疾病呈负相关^[1-3]。经典疏水性多酚姜黄素 (curcumin, Cur) 作为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 干燥根茎的主要药效成分，具备抗炎、降血糖、抗氧化和抗菌等多种活性^[4]。然而，其高疏水性和低生物利用度问题促使大量关于 Cur 递送系统的研究^[5-9]。

植物多糖是由多个单糖以 α -或 β -糖苷键连接而成的高分子聚合物^[10]。由于其具备在某些位点结合和捕获酚类化合物的能力，故植物体系中的多糖与多酚在果实成熟或胃肠道过程中存在相互作用^[11]。其中，水溶性多糖因具备良好的水溶性、黏度和可发酵性在健康益处与加工方面具备更多优势^[12-13]。因此，以植物体系中的天然相互作用为灵感，课题组前期筛选出一种作用力较稳定的 Cur 与多糖组合，即从姜黄中提取出得到的总姜黄素 (curcuminoids, 含 72.2%Cur) 与一种葫芦巴水溶性多糖 (FS60)。经鉴定可知 FS60 是一种重均分子量 (M_w) 为 7.079×10^3 且含 4.51% 蛋白质的葡聚糖。其通过包裹 Cur 形成圆球状的自组装 FS60-总姜黄素聚集体，能够提高 Cur 在水中的分散性，改善其高疏水性问题^[14]。

然而，摄入 FS60-总姜黄素聚集体是否对总姜黄素中的主要成分 Cur 体内代谢所产生的影响仍旧未知。多酚经人体口服摄入后，小部分被机体吸收的多酚进入体循环后通过磺酸化、葡萄糖醛酸化或甲基化等代谢后排出体外^[15]。而大多数多酚不被小肠吸收^[16]，到达结肠并被肠道微生物转化为代谢物，这些代谢物可能比它们的前体结构具有更大的生物活性^[17]。因此，多酚的生物活性和健康影响极大程度取决于到达目标组织的代谢物的性质和浓

度^[17-18]。而植物多糖可以通过与多酚之间的相互作用力从而影响机体对多酚的利用和代谢，并极大程度取决于两者的空间结构和作用力强弱^[19]。例如，阿魏酸与谷物全粉摄入时，其可能与阿拉伯木聚糖和木质素等多糖紧密结合导致生物利用度降低^[20]。另一项研究表明，增加碳水化合物的摄入可显著提高机体对黄酮的利用^[21]。然而，目前研究基本局限于体外模型，未考虑到代谢与基质效应的影响。此外，大分子多糖因不被机体吸收的特性而可被肠道微生物分解利用，从而可以实现间接性调节菌群的目的^[22-23]。那么当机体持续摄入 FS60 时，FS60-总姜黄素聚集体中的 Cur 胃肠道代谢又会因肠道菌群的变化产生怎样的变化值得深入挖掘。

FS60 作为一种新型天然递送材料，为了进一步明确其通过装载总姜黄素形成自组装聚集体而对 Cur 体内代谢产生的短期和长期影响，本研究基于超高效液相色谱串联四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术，以 FS60-总姜黄素聚集体中的主要多酚化合物 Cur 为研究对象，以健康和 ig 干预 FS60 1 周的雄性 SD 大鼠为模型，探讨给药 FS60-总姜黄素聚集体后血浆、肝脏、尿液以及粪便中 Cur 的差异代谢物，并推测其体内代谢途径。以期科学阐述 FS60-总姜黄素聚集体中 Cur 的药效物质基础，为挖掘植物多糖作为递送多酚载体的相关潜力提供参考。

1 材料

1.1 材料与试剂

葫芦巴膳食纤维 (质量分数 $\geq 90.0\%$ ，批号 LL221105-1) 购于中国陕西绿莱生物科技有限公司；总姜黄素 (质量分数 $\geq 95.0\%$ ，由 72.22% Cur、

17.72%去甲氧基姜黄素和 5.26%双去甲氧基姜黄素组成,批号 JHSH20220702)由中大生物工程有限公司提供;对照品 Cur (批号 M13GB148382)购于源叶生物科技有限公司;对照品八氢姜黄素(批号 LY-CH-20220117C)、六氢姜黄素(批号 LY-CH-202201178)、姜黄素葡萄糖醛酸(批号 LY-CH-20220217)和四氢姜黄素葡萄糖醛酸(批号 LY-CH-20220217)由广州珑莹生物科技有限公司提供;甲醇、甲酸、乙腈(均为色谱纯)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;其余试剂均为分析级。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠 72 只,体质量 200~220 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。饲养于成都中医药大学药学院动物房,实验动物许可证号为 SYXK(川)2020-124,在自然光照/黑暗条件下保持(25±2)℃适应性喂养 1 周后开始实验。实验规程及方案通过成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批件号 CDUTCM2023239)。

1.3 仪器与设备

UPLC-Q-Orbitrap HRMS 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);3H16RI 型智能高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);DHG-9030 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);HGC-12A 型氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);PX125DZH 型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司];SCI-VS 可调式混匀仪(美国 SCILOGEX 公司);YRE-201D 型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);SHZ-D III 循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);KQ-100KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Xcalibur、Mass Frontier 和 Compound Discoverer 3.1(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 FS60-总姜黄素聚集体制备工艺

参考课题组前期工艺基础^[12],将葫芦巴膳食纤维通过分级醇沉法提取得到 40%~60%醇沉段的水溶性葫芦巴多糖简称 FS60。精密称取 240.32 mg FS60 溶解于 20 mL 水中,并向其滴加无水乙醇使该溶液中乙醇体积分数 37%。用 HCl 和 NaOH 溶液将该溶液 pH 值调节至 4.57,磁搅 20 min。将 5.00 mg/mL 的总姜黄素乙醇溶液缓慢滴加到正在搅拌的 FS60 溶液中,使体系中的总姜黄素达到 9.67 mg。

并再次通过滴加无水乙醇使混合体系中的乙醇体积分数达到 40%。在室温下连续搅拌 4 h 后,于 40 ℃水浴上旋转蒸发除去体系中的乙醇,0.8 μm 微孔滤膜滤过,定容后即得 Cur 包封率 95%、粒径 231 nm、Zeta 电位为-26 mV 的 FS60-总姜黄素聚集体。

2.2 动物分组与给药

将 SD 大鼠随机分为空白组、总姜黄素组、FS60-总姜黄素 I 组和 FS60-总姜黄素 II 组共 4 组,每组各 18 只。其中,FS60-总姜黄素 II 组以 3.44 g/kg 剂量(FS60-总姜黄素纳米制剂中 100.00 mg/kg Cur 剂量所需 FS60 用量)ig FS60,每日 1 次且连续 ig 7 d,空白组、对照组和 FS60-总姜黄素 I 组 ig 等体积的水。

7 天后,FS60-总姜黄素 I 和 II 组均以 100.00 mg/kg Cur 剂量 ig 给药 FS60-总姜黄素纳米溶液,总姜黄素组以 100.00 mg/kg Cur 剂量 ig 给药游离总姜黄素溶液,空白组给予等体积水。连续给药 3 d。末次给药前各组大鼠均禁食 12 h,期间可自由饮水。

2.3 生物样品的采集

2.3.1 尿液与粪便的收集 于第 3 天 ig 给药结束后,分别从 4 组大鼠中各随机取 3 只置于代谢笼中,收集 0~24 h 的尿液样品于-80 ℃储存备用。收集 0~24 h 的粪便样品并将其置于室温下避光风干后置于-80 ℃储存备用。

2.3.2 血浆与肝脏的收集 于第 3 天 ig 给药结束后,将 4 组大鼠分别于给药后的 1、4、8、12、24 h 进行腹腔主动脉取血并剥离出肝脏组织,每个时间点每组各 3 只。将血液样品于 4 000 r/min 离心 15 min 获取血浆样品并于-80 ℃储存备用。肝脏组织于冷冻生理盐水中反复清洗 3 次以除去残留的血液后,置于-80 ℃储存备用。

2.4 生物样品的处理

2.4.1 血浆样品 分别取大鼠的各时间点血浆样品 100 μL,等量混合(共 15 个样品),涡旋 1 min,取混匀后的血浆样品 500 μL,加入 2 mL 乙腈进行蛋白沉淀。涡旋 1 min 后,于 4 ℃条件下以 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液转移至另一 EP 管中,37 ℃条件下 N₂ 吹干。残渣用 100 μL 甲醇复溶,4 ℃下以 13 000 r/min 离心 10 min,离心 2 次,取上清液,进样。

2.4.2 肝脏样品 称取同一组相同部位的肝脏组织 1 g,切片后分别加入 1 mL 生理盐水(1 mL/g)匀浆。分别取大鼠的各时间点匀浆样品 100 μL,等量

混合(共 15 个样品), 涡旋 1 min, 取混匀后匀浆 500 μL , 后续处理同血浆样品处理方法。

2.4.3 尿液样品 取 2 mL 尿液加入 1% 盐酸 20 μL 进行酸化后, 加入 8 mL 乙腈涡旋混匀 1 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, N_2 吹干, 100 μL 甲醇复溶, 4 $^\circ\text{C}$ 下以 13 000 r/min 离心 10 min, 离心 2 次, 取上清液, 进样。

2.4.4 粪便样品 将风干后的粪便置于研钵中研碎, 混合均匀。取约 0.5 g 混合均匀的粪便样品, 加入 80% 乙腈 5 mL, 超声提取 30 min, 4 $^\circ\text{C}$ 下以 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 室温下氮气吹干。残渣用 200 μL 甲醇复溶, 4 $^\circ\text{C}$ 下以 13 000 r/min 离心 10 min, 离心 2 次, 取上清液, 进样。

2.5 对照品的配制

用甲醇分别将 Cur、八氢姜黄素、六氢姜黄素、姜黄素葡萄糖醛酸以及四氢姜黄素葡萄糖醛酸溶解后配制成质量浓度为 1 mg/mL 的母液。分别取各对照品溶液适量混合均匀, 配制成质量浓度均为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.6 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析条件

2.6.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸超纯水溶液 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~1 min, 95% A; 1~2 min, 95%~73% A; 2~15 min, 73%~50% A; 15~22 min, 50%~20% A; 22~26 min, 20%~10% A; 26~32 min, 10%~5% A; 32~34 min, 5% A; 34~37 min, 5%~95% A; 37~40 min, 95% A; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 $^\circ\text{C}$; 进样量 3 μL 。

2.6.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正负离子模式检测; 喷雾电压 3.5 kV; 毛细管温度 350 $^\circ\text{C}$; 鞘气体积流量 40 kPa; 辅助气体积流量 15 kPa; 辅气加热器温度 300 $^\circ\text{C}$; 一级分辨率 35 000, 二级分辨率 17 500; 归一化碰撞能量 20%、40%、60%; 质量扫描范围 m/z 100~1 500。

2.7 数据处理与分析

数据处理与分析主要步骤如下: ①将混合对照品溶液和处理后的生物样品采用 Xcalibur 4.6 软件采集质谱数据; ②将保留时间、精确相对分子质量和多级碎片离子等质谱信息结合 Compound Discoverer 3.3 软件中 mZVault 和 mZCloud 等数据库进行定性匹配, 同时与对照品质谱信息或参考文献进行比对, 从而确定已知代谢产物; ③以 Cur 原型为母体化合物建立代谢产物预测模板, 根据对照品

质谱信息与参考文献对未知的代谢产物结构进行预测, 预测结果导入 Mass Frontier 7.0 质谱解析软件进行分析鉴定, 根据质谱碎片信息比对, 最终选取匹配度最高的结构作为未知代谢物的可能结构; ④基于质谱裂解信息与参考文献, 分析推断 Cur 原型及其代谢产物在大鼠体内的代谢途径。

3 结果

3.1 Cur 代谢产物的鉴定结果

基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对各组给药大鼠与空白大鼠的血浆、肝脏、粪便、尿液中的 Cur 代谢产物进行对比分析可知, 空白基质对 Cur 代谢产物种类分析未产生干扰。同时, 结合色谱精确相对分子质量、保留时间、多级碎片离子等信息的分析以及与对照品质谱信息 (表 1) 和相关文献数据的比对^[24-28], 共鉴定出 29 种 Cur 代谢产物, 详见表 2。其中, 按组别分类统计可知, 总姜黄素组鉴定出代谢产物 24 种, FS60-总姜黄素 I 制剂组鉴定出代谢产物 27 种, FS60-总姜黄素 II 制剂组鉴定出代谢产物 29 种; 按生物基质分类统计可知, 血浆中鉴定代谢产物 24 种, 肝脏中鉴定代谢产物 14 种, 粪便中鉴定代谢产物 21 种, 尿液中鉴定代谢产物 6 种。

3.1.1 对照品的质谱裂解途径分析 分别在正离子模式和负离子模式下对含 Cur、六氢姜黄素、八氢姜黄素、姜黄素葡萄糖醛酸和四氢姜黄素葡萄糖醛酸的混合对照品溶液进行质谱数据的采集并对其裂解碎片进行分析鉴定, 并推测 Cur 原型的裂解途径, 从而有助于找寻其代谢产物的碎片信息。其中, 六氢姜黄素和四氢姜黄素葡萄糖醛酸对照品仅在负离子模式下提取到质谱信息。各对照品具体质谱信息见表 1。

在正离子模式下, 提取到 Cur 对照品 M1 (+) ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$) 的离子流色谱图, 其产生 m/z 369.133 39 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 准分子离子峰, 一级质谱图见图 1-A, t_{R} 为 16.13 min, 误差 -0.35×10^{-6} , 故准确鉴定 M1 (+) 为 Cur 原型。二级质谱图见图 1-B, 特征碎片离子 m/z 285.111 42 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2]^+$ 、 m/z 253.085 34 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2]^+$ 、 m/z 177.054 29 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3]^+$ 、 m/z 161.059 49 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3]^+$ 、 m/z 145.028 14 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3-\text{CH}_2-\text{H}_2\text{O}]^+$, 该离子模式下 Cur 可能的裂解途径见图 2。

在负离子模式下, 提取到 Cur 对照品 M1 (-) ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$) 的离子流色谱图, 一级质谱图见图 3-A, 准分子离子峰为 m/z 367.118 56 $[\text{M}-\text{H}]^-$, t_{R} 为

表 1 对照品的一级和二级质谱数据
Table 1 MS¹ and MS² data of references

化合物	编号	分子式	t _R /min	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)	二级碎片	代谢物匹配 ^a
姜黄素	M1 (+)	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	16.17	[M+H] ⁺	369.133 26	369.133 39	-0.35	285.112 40, 177.054 81, 161.059 84, 145.028 58	MC1
	M1 (-)	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	16.18	[M-H] ⁻	367.118 71	367.118 56	0.41	217.050 19, 202.027 05, 173.060 20, 158.036 58	
八氢姜黄素	M2 (+)	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	6.79	[M+H] ⁺	377.195 86	377.195 71	0.40	341.175 11, 217.121 84, 163.075 23, 151.075 09	
	M2 (-)	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	6.57	[M-H] ⁻	375.181 31	375.180 88	1.15	360.157 87, 209.081 04, 193.086 93, 179.070 71	MC5
六氢姜黄素	M3 (-)	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	7.89	[M-H] ⁻	373.165 66	373.165 56	0.27	355.155 55, 219.101 65, 193.086 58, 179.070 77	MC4
	M4 (+)	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	8.82	[M+H] ⁺	545.165 35	545.164 31	1.91	369.132 35, 285.111 36, 245.080 69, 219.064 26	MC8
姜黄素葡萄糖醛酸	M4 (-)	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	8.84	[M-H] ⁻	543.150 79	543.150 94	-0.28	367.118 26, 217.050 23, 202.026 61, 158.036 39	
	M5 (-)	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₂	8.19	[M-H] ⁻	547.182 09	547.181 70	0.71	371.150 36, 235.097 26, 193.086 23, 149.059 56	MC11

a 代表表 2 代谢物编号。

a represents the number of metabolites in Table 2.

表 2 不同组别大鼠血浆、尿液、粪便和肝脏中 Cur 的代谢产物质谱信息及分布情况

Table 2 Metabolic profiling and distribution of curcumin in plasma, urine, feces and liver of rats in different groups

编号	分子式	t _R /min	离子模式	理论值 m/z	实际值 m/z	误差 (×10 ⁻⁶)	二级碎片	代谢途径	来源
MC1	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	16.16	[M+H] ⁺	369.133 26	369.133 36	-0.27	285.111 45, 253.085 10, 177.054 28, 161.059 43	原型	I (a, b, c)
									II (a, b, c)
									III (a, b, c)
MC2	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	7.56	[M-H] ⁻	369.134 36	369.134 38	-0.05	191.070 74, 175.039 29, 149.059 98, 134.036 38	二氢化	I (a, c)
									II (a, c)
									III (a, c)
MC3	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	7.89	[M+H] ⁺	373.164 57	373.163 51	2.84	355.152 80, 205.085 36, 193.085 62, 177.054 24	四氢化	I (a, c)
									II (a, c)
	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	14.75	[M-H] ⁻	371.150 01	371.149 90	0.30	347.047 45, 235.097 08, 207.101 82, 193.086 43	四氢化	I (b)
MC4	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	7.86	[M-H] ⁻	373.165 66	373.165 68	0.05	355.156 01, 219.102 20, 193.086 59, 179.070 65	六氢化	I (a, b, c)
									II (a, b, c)
									III (a, b, c)
MC5	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	6.60	[M-H] ⁻	375.181 31	375.181 27	0.11	360.158 72, 209.081 34, 193.086 59, 179.070 53	八氢化	I (a, b, c)
									II (a, b, c)
									III (a, b, c)
MC6	C ₂₁ H ₂₂ O ₉ S	4.62	[M-H] ⁻	449.091 18	449.090 73	1.00	369.134 03, 367.118 38, 191.070 50, 175.039 28	二氢化、硫 酸化	I (c)
									II (a, c)
MC7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	4.49	[M-H] ⁻	545.165 45	545.167 60	-3.94	369.134 06, 191.070 92, 175.039 29, 149.059 73	二氢化、葡 萄糖醛酸 化	I (a)
									II (a)
									III (a)

表 2 (续)

编号	分子式	t_R/min	离子模式	理论值 m/z	实际值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	代谢途径	来源
MC8	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	8.85	$[\text{M}+\text{H}]^+$	545.165 35	545.163 88	2.70	369.132 26, 285.111 39, 177.054 28, 161.059 37	葡萄糖醛酸化	I (a, d) II (a, d)
MC9	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{S}$	10.03	$[\text{M}-\text{H}]^-$	447.075 53	447.075 62	-0.20	367.118 32, 217.050 06, 202.026 54, 158.036 47	硫酸化	I (a, d) II (a, d) III (a)
MC10	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$	12.50	$[\text{M}+\text{H}]^+$	353.138 35	353.137 66	1.95	303.100 56, 253.085 31, 229.085 65, 197.059 25	二氢化、脱水	I (a, c) II (a, c) III (c)
MC11	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	8.15	$[\text{M}-\text{H}]^-$	547.182 10	547.183 23	-2.07	371.150 67, 235.097 23, 193.086 70, 177.055 05	四氢化、葡萄 糖醛酸化	II (a)
MC12	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{S}$	4.59	$[\text{M}-\text{H}]^-$	451.106 83	451.106 87	-0.09	371.149 17, 235.097 17, 207.102 51, 193.086 41	四氢化、硫酸 化	I (b, c) II (a, b, c) III (b, c)
MC13	$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$	4.65	$[\text{M}-\text{H}]^-$	549.196 65	549.198 30	-3.00	373.166 32, 355.154 82, 219.102 87, 193.086 65	六氢化、葡萄 糖醛酸化	I (b) II (b, d) III (b)
MC14	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{S}$	4.15	$[\text{M}-\text{H}]^-$	453.122 48	453.123 02	-1.19	373.166 38, 193.086 41, 179.070 72, 164.047 15	六氢化、硫酸 化	I (a, b, c) II (a, b, c) III (a, b, c)
MC15	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$	4.24	$[\text{M}-\text{H}]^-$	551.213 40	551.214 32	-1.51	375.181 49, 179.069 66, 135.044 13, 121.027 92	八氢化、葡萄 糖醛酸化	I (a) II (a) III (a)
MC16	$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{S}$	4.72	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.138 12	455.138 76	-1.41	375.181 58, 360.158 29, 179.070 76, 151.039 11	八氢化、硫酸 化	I (b, d) II (a, b, c, d) III (b)
MC17	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$	7.73	$[\text{M}+\text{H}]^+$	355.154 00	355.153 35	1.83	337.142 52, 219.101 30, 179.070 01, 163.075 01	四氢化、脱水	I (a, b, c) II (a, b, c) III (a, c)
MC18	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$	7.85	$[\text{M}+\text{H}]^+$	357.169 65	357.168 49	3.24	339.157 75, 207.100 89, 177.090 58, 145.064 48	六氢化、脱水	I (a, b, c) II (a, b, c) III (a, b, c)
MC19	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4$	4.27	$[\text{M}+\text{H}]^+$	341.174 74	341.173 80	2.76	277.120 73, 217.121 75, 203.106 96, 177.090 55	八氢化、脱水	I (b, c, d) II (a, b, c, d) III (b, c)
MC20	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{S}$	4.65	$[\text{M}+\text{H}]^+$	437.126 46	437.125 73	1.67	419.112 09, 357.128 21, 339.158 60, 207.101 14	六氢化、脱水、 硫酸化	I (b) II (a, b, c)
MC21	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$	15.18	$[\text{M}+\text{H}]^+$	341.138 35	341.137 63	2.11	205.084 38, 203.069 95, 185.059 16, 177.054 32	四氢化、脱水、 去甲基化	I (a, c) II (a, c) III (a, c)
MC22	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$	4.88	$[\text{M}+\text{H}]^+$	343.154 00	343.153 35	1.90	325.143 40, 309.112 12, 221.116 96, 207.100 52	六氢化、脱水、 去甲基化	I (a, b, c) II (a, b, c) III (a, c)
MC23	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	5.89	$[\text{M}+\text{H}]^+$	517.170 44	517.169 43	1.12	341.137 42, 284.225 71, 205.085 40, 163.075 01	四氢化、脱水、 去甲基化、葡 萄糖醛酸化	I (a) II (a) III (a)

表 2 (续)

编号	分子式	<i>t_R</i> /min	离子模式	理论值 <i>m/z</i>	实际值 <i>m/z</i>	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	代谢途径	来源
MC24	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	12.21	[M+H] ⁺	325.143 44	325.142 88	1.73	279.073 00, 219.101 49, 177.090 82, 149.059 56	六氢化、脱水、 去甲基化	I (a, c) II (a, c) III (a, c)
MC25	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	7.62	[M+H] ⁺	327.159 09	327.158 51	1.77	309.147 43, 189.090 81, 177.090 65, 163.075 09	八氢化、脱水、 去甲基化	I (a, b, c) II (a, b, c, d) III (b, c)
MC26	C ₂₁ H ₁₈ O ₅	17.37	[M+H] ⁺	351.122 70	351.121 61	3.11	333.110 84, 231.064 64, 201.054 24, 177.054 31	脱水	I (c) II (c) III (c)
MC27	C ₂₂ H ₂₀ O ₆	17.68	[M+H] ⁺	381.133 26	381.131 74	3.99	363.121 40, 335.126 25, 257.080 08, 231.064 64	甲基化、脱氢	I (c) II (c) III (c)
MC28	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	7.35	[M+H] ⁺	385.128 18	385.127 26	2.39	367.115 84, 339.122 62, 249.075 44, 219.064 45	羟基化	II (c)
MC29	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	8.48	[M+H] ⁺	383.112 53	383.111 54	2.58	368.088 26, 350.076 84, 337.070 01, 322.082 89	羟基化、脱氢	I (c) II (c) III (c)

I-FS60-总姜黄素 I制剂组; II-FS60-总姜黄素 II制剂组; III-总姜黄素组; a-血浆; b-肝脏; c-粪便; d-尿液。

I-FS60-curcuminoids I group; II-FS60-curcuminoids II group; III-Curcuminoids group; a-plasma; b-liver; c-feces; d-urine.

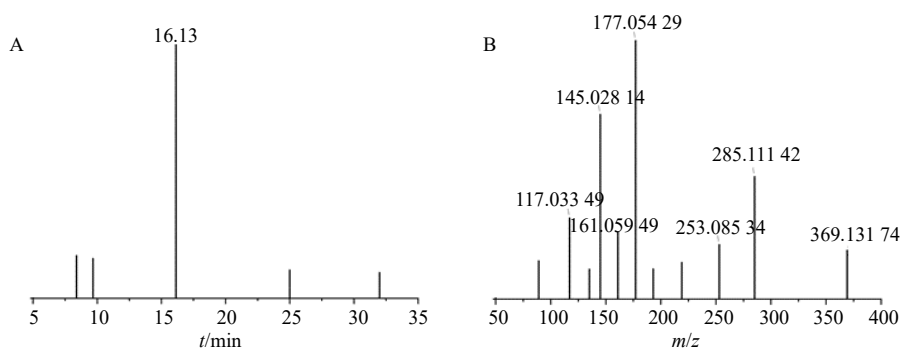


图 1 正离子模式下 Cur 原型的一级 (A) 和二级碎片离子 (B) 谱图

Fig. 1 First-order spectra (A) and second order fragment ion diagram(B) of Cur in positive ion mode

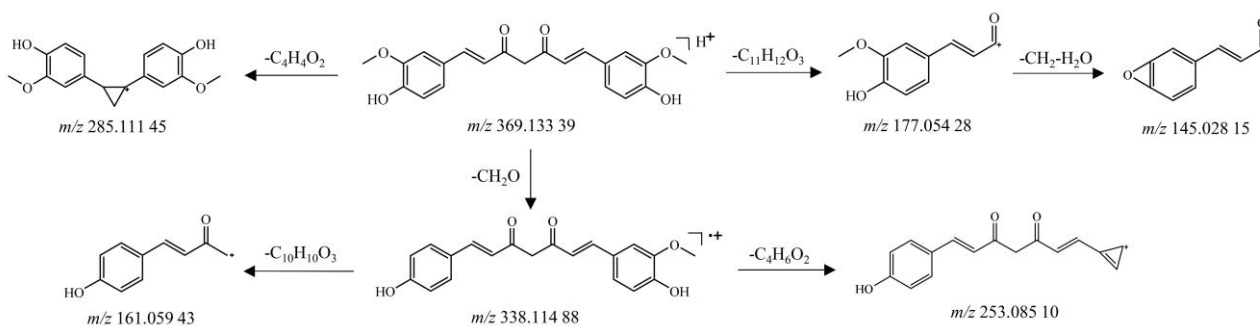


图 2 正离子模式下 Cur 可能的裂解途径

Fig. 2 Possible cleavage pathway of Cur in positive ion mode

16.18 min, 误差为 0.41×10^{-6} , 将 M19 (-) 准确鉴定为 Cur 原型。二级质谱图见图 3-B, 其二级碎片离子有 m/z 217.050 19 $[M-H-C_9H_{10}O_2]^-$, m/z 202.027 05 $[M-H-C_9H_{10}O_2-CH_3]^-$, m/z 173.060 20

$[M-H-C_{10}H_{10}O_4]^-$, m/z 158.036 58 $[M-H-C_{10}H_{10}O_4-CH_3]^-$, m/z 149.059 98 $[M-H-C_{12}H_{10}O_4]^-$, m/z 134.036 47 $[M-H-C_{12}H_{10}O_4-CH_3]^-$, 其可能的裂解途径见图 4 所示。

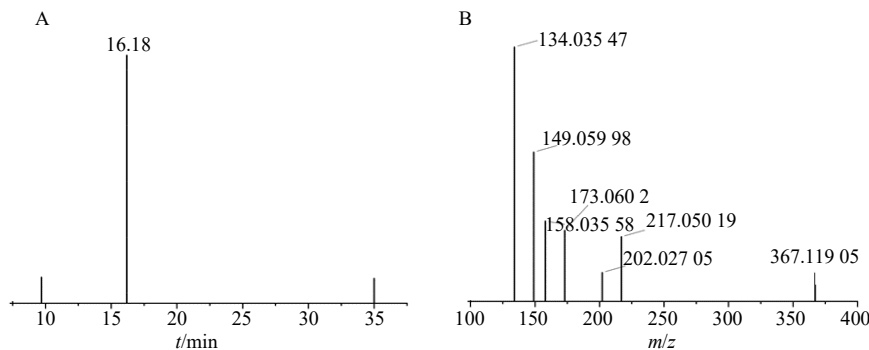


图 3 负离子模式下 Cur 的一级 (A) 和二级碎片离子 (B) 谱图

Fig. 3 First-order spectra (A) and second order fragment ion diagram(B) of Cur in negative ion mode

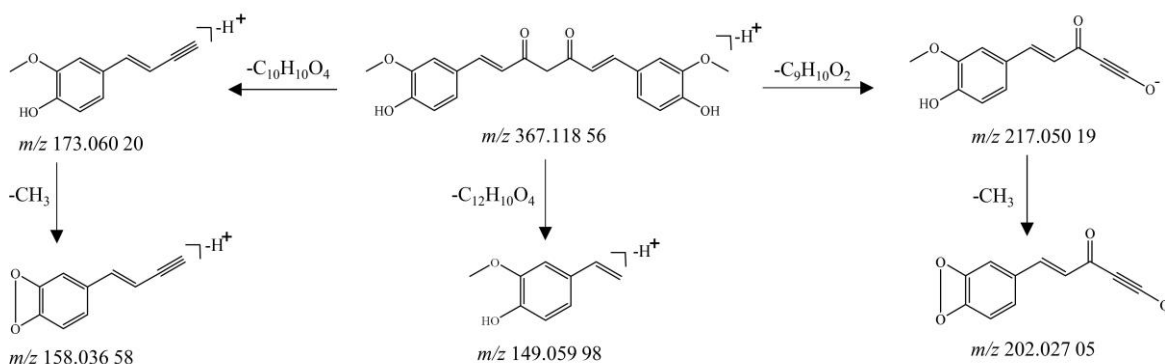


图 4 负离子模式下 Cur 可能的裂解途径

Fig. 4 Possible cleavage pathway of Cur in positive ion mode

八氢姜黄素对照品 M2 (+) ($C_{21}H_{28}O_6$) 在正离子模式下存在 m/z 377.195 86 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, t_R 为 6.79 min, 误差为 0.40×10^{-6} , 将 M2 (+) 鉴定为八氢姜黄素。在其 ESI-MS2 谱中, m/z 377.195 86 经碰撞诱导裂解后产生二级碎片离子 m/z 341.175 11 $[M+H-2H_2O]^+$, m/z 217.121 84 $[M+H-2H_2O-C_7H_8O_2]^+$, m/z 163.075 23 $[M+H-CH_3-C_{10}H_{15}O_4]^+$, m/z 151.075 09 $[M+H-CH_2-OH-C_{11}H_{15}O_3]^+$, m/z 137.059 60 $[M+H-CH_3-C_{12}H_{17}O_4]^+$, m/z 131.049 26 $[M+H-CH_2-OH-C_{11}H_{15}O_3-H_2O-2H]^+$, m/z 103.054 79 $[M+H-CH_2-OH-C_{12}H_{18}O_4-OH]^+$ 。在负离子模式下, 八氢姜黄素对照品 M2 (-) ($C_{21}H_{28}O_6$) 的离子流色谱图中产生 375.180 88 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, t_R 为 6.57 min, 误差为 1.55×10^{-6} , 鉴定为八氢姜黄素。产生二级碎片离子 m/z

360.157 87 $[M-H-CH_3]^-$, m/z 209.081 04 $[M-H-CH_2-C_9H_{12}O_2]^-$, m/z 193.086 93 $[M-H-2H-C_{10}H_{12}O_3]^-$, m/z 179.070 71 $[M-H-H_2O-C_{11}H_{14}O_2]^-$ 。

在负离子模式下, 提取到六氢姜黄素对照品 M3 (-) ($C_{21}H_{26}O_6$) 的离子流色谱图, 其产生 m/z 373.165 66 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, t_R 为 7.89 min, 误差为 0.27×10^{-6} , 准确鉴定 M3 为六氢姜黄素。具特征碎片离子 m/z 355.155 55 $[M-H-2H-O]^-$, m/z 219.101 65 $[M-H-H_2O-C_8H_8O_2]^-$, m/z 193.086 58 $[M-H-C_{10}H_{12}O_3]^-$, m/z 179.070 77 $[M-H-C_{11}H_{14}O_3]^-$, m/z 164.047 04 $[M-H-C_{11}H_{14}O_3-CH_2-H]^-$ 。

姜黄素葡萄糖醛酸对照品 M4 (+) ($C_{27}H_{28}O_{12}$) 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 545.164 31

$[M+H]^+$, t_R 为 8.82 min, 误差为 1.91×10^{-6} 。二级碎片离子 m/z 369.132 35 为其脱去葡萄糖醛酸而得到的姜黄素, 且其余碎片离子均与同离子模式下姜黄素原型的二级碎片离子一致, 因此将 M4 (+) 鉴定为姜黄素葡萄糖醛酸。

负离子模式下, 姜黄素葡萄糖醛酸对照品 M4 (-) ($C_{27}H_{28}O_{12}$) 存在 m/z 543.150 94 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, t_R 为 8.84 min, 误差为 -0.28×10^{-6} , 将 M4 (-) 鉴定为姜黄素葡萄糖醛酸。二级碎片离子 m/z 367.118 26 为其脱去 1 分子葡萄糖醛酸形成, 其余碎片离子也均与同离子模式下姜黄素原型得到的碎片离子一致, 进一步确定其为姜黄素葡萄糖醛酸。

在负离子模式下, 四氢姜黄素葡萄糖醛酸对照品 M5 ($C_{27}H_{32}O_{12}$) 存在 m/z 547.181 70 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, t_R 为 8.19 min, 误差为 0.71×10^{-6} 。二级碎片离子 m/z 371.150 36 为脱去 1 分子的葡萄糖醛酸所得, 比同离子模式下的姜黄素多 4 (4H), 推断其为四氢姜黄素。其他碎片离子为 m/z 235.097 26 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$ 、 m/z 193.086 23 $[M-H-C_9H_{10}O_2-CO]^-$ 、 m/z 149.059 56 $[M-H-C_{12}H_{14}O_4]^-$ 、 m/z 135.044 27 $[M-H-C_{13}H_{16}O_4]^-$ 。综上, 将 M5 准确鉴定为四氢姜黄素葡萄糖醛酸。

3.1.2 Cur 在大鼠体内代谢产物的鉴定 MC1 的准分子离子峰为 m/z 369.132 23 $[M+H]^+$, t_R 为 16.16 min, 误差为 -0.27×10^{-6} 。二级碎片离子为 m/z 285.111 45 $[M+H-C_4H_4O_2]^+$ 、 m/z 253.085 10 $[M+H-CH_2O-C_4H_6O_2]^+$ 、 m/z 177.054 28 $[M+H-C_{11}H_{12}O_3]^+$ 、 m/z 161.059 43 $[M+H-CH_2O-C_{10}H_{10}O_3]^+$ 、 m/z 145.028 15 $[M+H-C_{11}H_{12}O_3-CH_2-H_2O]^+$, 其色谱行为、一级和二级质谱信息与对照品 M1 (+) 一致, 故 MC1 确认为 Cur 原型。

MC2 的准分子离子峰为 m/z 369.134 38 $[M-H]^-$, t_R 为 7.56 min, 误差为 -0.05×10^{-6} , 有特征碎片离子 m/z 191.070 74 $[M-H-C_{10}H_{10}O_3]^-$ 、 m/z 175.039 29 $[M-H-CH_3-C_{10}H_{11}O_3]^-$ 、 m/z 149.059 98 $[M-H-C_{12}H_{12}O_4]^-$, 且其色谱行为、一级和二级质谱信息与文献数据^[24] 比对一致, 推断 MC2 为二氢姜黄素。

MC3 正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 373.163 51 $[M+H]^+$, t_R 为 7.89 min, 误差为 2.84×10^{-6} , 比 MC0 多 4 (4H), 具有特征碎片离子 m/z 355.152 80 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 205.085 36 $[M+H-C_9H_{10}O_2-H_2O]^+$ 、 m/z 193.085 62 $[M+H-C_{10}H_{12}O_3]^+$ 、 m/z 177.054 24 $[M+H-2H-$

$C_{11}H_{14}O_3]^+$ 、 m/z 163.074 95 $[M+H-C_{10}H_{12}O_3-CH-OH]^+$ 等。MC3 负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 371.149 90 $[M-H]^-$, t_R 为 14.75 min, 误差为 0.30×10^{-6} , 具有特征碎片离子 m/z 235.097 08 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$ 、 m/z 193.086 43 $[M-H-C_9H_{10}O_2-CO]^-$ 、 m/z 177.054 89 $[M-H-C_{11}H_{14}O_3]^-$, 碎片信息与文献数据一致^[24], 推断 MC3 为四氢姜黄素。

MC4 和 MC5 的准分子离子峰分别为 m/z 373.165 68 $[M-H]^-$ 和 m/z 375.181 27 $[M+H]^+$, 质谱信息分别能与对照品 M3 (-) 和 M2 (+) 相一致, 故断 MC4 和 MC5 分别为六氢姜黄素和八氢姜黄素。

MC6 的准分子离子峰为 m/z 449.090 73 $[M-H]^-$, t_R 为 4.62 min, 误差为 1.00×10^{-6} , 比 MC2 多 80 (SO_3), 特征碎片离子 m/z 369.134 03 $[M-H-SO_3]^-$ 与 MC2 的准分子离子峰一致, m/z 367.118 38 $[M-H-SO_3-2H]^-$ 与 MC1 的准分子离子峰一致, 且其余碎片离子均与 MC2 的碎片离子一致。因此, 推断 MC6 为二氢姜黄素的硫酸化代谢产物。

MC7 的准分子离子峰为 m/z 545.167 60 $[M-H]^-$, t_R 为 4.49 min, 误差为 -3.94×10^{-6} , 比 MC2 多 176 ($C_6H_8O_6$), 特征碎片离子 m/z 369.134 06 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$ 与 MC2 的准分子离子峰一致, 且其余碎片离子均与 MC2 的碎片离子一致。因此, 推断 MC7 为二氢姜黄素的葡萄糖醛酸化代谢产物。

MC8 的准分子离子峰为 m/z 545.163 88 $[M+H]^+$, t_R 为 8.85 min, 误差为 2.70×10^{-6} , 比 MC1 多 176 ($C_6H_8O_6$), 特征碎片离子 m/z 369.132 26 $[M+H-C_6H_8O_6]^+$ 与 MC1 的准分子离子峰一致, 且其余碎片离子也均与 MC1 的碎片离子一致。因此, 推断 MC8 为 Cur 的葡萄糖醛酸化代谢产物。

MC9 的准分子离子峰为 m/z 447.075 62 $[M-H]^-$, t_R 为 10.03 min, 误差为 -0.20×10^{-6} , 比 M1 (-) 多 80 (SO_3), 特征碎片离子 m/z 367.118 32 $[M-H-SO_3]^-$ 与 M1 (-) 的准分子离子峰一致, 且其他碎片离子均与 M1 (-) 的碎片离子一致。因此, 推断 MC9 为 Cur 的硫酸化代谢产物。

MC10 的准分子离子峰为 m/z 353.137 66 $[M+H]^+$, t_R 为 12.50 min, 误差为 1.95×10^{-6} , 比该离子模式下的 MC2 少 18 (H_2O), 推断其在 MC2 的基础上发生了脱水。结合其特征碎片离子结果 m/z 303.100 56 $[M+H-CH_2O-2H-H_2O]^+$ 、 m/z 253.085 31 $[M+H-2CH_3-2H-CO-CH_2O]^+$ 、 m/z 229.085 65 $[M+H-C_7H_8O_2]^+$ 、 m/z 201.090 65 $[M+H-OH-$

$C_8H_7O_2]^+$ 、 m/z 197.059 25 $[M+H-CH_2-CH_2O-C_6H_6O_2-2H]^+$ 、 m/z 177.054 35 $[M+H-C_{11}H_{12}O_2]^+$ ，因此推断 MC10 为 Cur 还原、脱水的代谢产物。

MC11 的准分子离子峰为 m/z 547.183 23 $[M-H]^-$ ， t_R 为 8.15 min，误差为 -2.07×10^{-6} ，比该离子模式的 MC3 多 179 ($C_6H_8O_6$)，特征碎片离子 m/z 371.150 67 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$ 与 MC3 负离子模式下的准分子离子峰一致，其余碎片离子也均与其碎片离子一致，且 MC11 的质谱信息与四氢姜黄素葡萄糖醛酸对照品比对一致。推断 MC11 为四氢姜黄素的葡萄糖醛酸化代谢产物，即四氢姜黄素葡萄糖醛酸。

MC12 的准分子离子峰为 m/z 451.106 87 $[M-H]^-$ ， t_R 为 4.59 min，误差为 -0.09×10^{-6} ，比负离子模式下的 MC3 多 80 (SO_3)，特征碎片离子 m/z 371.149 17 $[M-H-SO_3]^-$ 与 MC3 负离子模式下的准分子离子峰一致，且其余碎片离子也均与其碎片离子一致。因此，推断 MC12 为四氢姜黄素的硫酸化代谢产物。

MC13 的准分子离子峰为 m/z 549.198 30 $[M-H]^-$ ， t_R 为 4.65 min，误差为 -3.00×10^{-6} ，比 MC4 多 176 ($C_6H_8O_6$)，特征碎片离子 m/z 373.166 35 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$ 与 MC4 的准分子离子峰一致，其余碎片离子也均与 MC4 的碎片离子一致。因此，推断 MC13 为六氢姜黄素的葡萄糖醛酸化代谢产物。

MC14 的准分子离子峰为 m/z 453.123 02 $[M-H]^-$ ， t_R 为 4.15 min，误差为 -1.19×10^{-6} ，比 MC4 多 80 (SO_3)，特征碎片离子 m/z 373.166 38 $[M-H-SO_3]^-$ 与 MC4 的准分子离子峰一致，且其余碎片离子也均与 MC4 的碎片离子一致。因此，推断 MC14 为六氢姜黄素的硫酸化代谢产物。

MC15 的准分子离子峰为 m/z 551.214 32 $[M-H]^-$ ， t_R 为 4.24 min，误差为 -1.51 ，比 MC5 多 176 ($C_6H_8O_6$)，特征碎片离子 m/z 375.181 49 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$ 与 MC5 的准分子离子峰一致，且其余碎片离子也均与 MC5 的碎片离子一致。因此，推断 MC15 为八氢姜黄素的葡萄糖醛酸化代谢产物。

MC16 的准分子离子峰为 m/z 455.138 76， t_R 为 4.72 min，误差为 -1.41×10^{-6} ，比 MC5 多 80 (SO_3)，特征碎片离子 m/z 375.181 58 $[M-H-SO_3]^-$ 与 MC5 的准分子离子峰一致，且其余碎片离子也均与 MC5 的碎片离子一致。因此，推断 MC16 为八氢姜黄素的硫酸化代谢产物。

MC17 的准分子离子峰为 m/z 355.153 35 $[M+$

$H]^+$ ， t_R 为 7.73，误差为 1.83×10^{-6} ，比 MC1 少 14 ($+4H-H_2O$)。具有特征碎片离子 m/z 337.142 52 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 219.101 30 $[M+H-C_8H_8O_2]^+$ 、 m/z 179.070 01 $[M+H-C_{11}H_{12}O_2]^+$ 、 m/z 163.075 00 $[M+H-C_{11}H_{12}O_3]^+$ ，因此推断 MC17 为 Cur 的还原和脱水的产物。

MC18 的准分子离子峰为 m/z 357.168 49 $[M+H]^+$ ， t_R 为 7.85 min，误差为 3.24×10^{-6} ，比 MC17 多 2 ($2H$)。特征碎片离子 m/z 339.157 75 $[M+H-H_2O]^+$ 比 MC17 对应的碎片离子 m/z 337.142 52 $[M+H]^+$ 多 2，且碎片离子 m/z 137.059 42 与 MC17 对应的碎片离子一致。具有其他特征碎片离子 m/z 207.100 89 $[M+H-C_9H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 177.090 58 $[M+H-C_{10}H_{12}O_3]^+$ 、 m/z 145.064 48 $[M+H-C_{10}H_{12}O_3-CH_2O-2H]^+$ 。因此，推断 MC18 为 MC17 的还原产物。MC20 的准分子离子峰为 m/z 437.125 73 $[M+H]^+$ ， t_R 为 4.65 min，误差为 1.67，比 MC18 多 80 (SO_3)。特征碎片离子 m/z 357.128 21 $[M+H-SO_3]^+$ 与 MC18 的准分子离子峰一致，其他子离子也均一致。因此，推断 MC20 为 MC18 的硫酸化产物。

MC19 的准分子离子峰为 m/z 341.173 80 $[M+H]^+$ ， t_R 为 4.27 min，误差为 2.76×10^{-6} ，比 MC18 少 16 ($+2H-H_2O$)。具有特征碎片离子 m/z 277.120 73 $[M+H-2CH_2O-4H]^+$ 、 m/z 217.121 75 $[M+H-C_7H_8O_2]^+$ 、 m/z 203.106 96 $[M+H-C_8H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 177.090 55 $[M+H-C_{10}H_{12}O_2]^+$ 。因此，推断 MC19 为在 MC18 的基础上进行了氢化和脱水，即 MC19 为 Cur 的还原和脱水的代谢产物。

MC21 的准分子离子峰为 m/z 341.137 63 $[M+H]^+$ ， t_R 为 15.18 min，误差为 2.11×10^{-6} ，比 MC17 少 14 (CH_2)。具有特征碎片离子 m/z 205.084 38 $[M+H-C_8H_8O_2]^+$ 、 m/z 203.069 95 $[M+H-C_8H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 185.059 16 $[M+H-C_8H_8O_2-OH-3H]^+$ 、 m/z 177.054 32 $[M+H-C_{10}H_{12}O_2]^+$ 。因此推断 MC21 为 MC27 的去甲基化产物，即为 Cur 的还原、脱水和去甲基化的代谢产物。

MC22 的准分子离子峰为 m/z 343.153 55 $[M+H]^+$ ， t_R 为 4.88 min，误差为 1.90，比 MC21 多 2 ($2H$)。具有特征碎片离子 m/z 325.143 40 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 309.112 12 $[M+H-CH_2O-4H]^+$ 、 m/z 221.116 96 $[M+H-C_7H_6O_2]^+$ 、 m/z 207.100 52 $[M+H-C_8H_8O_2]^+$ 、 m/z 189.090 24 $[M+H-CH_3-OH-C_7H_7O_2]^+$ 。推断 MC22 为 MC21 的氢化代谢产物。

MC23 的准分子离子峰为 m/z 517.169 43 $[M+H]^+$, t_R 为 5.89 min, 误差为 1.12×10^{-6} , 比 MC21 多 176 ($C_6H_8O_6$), 特征碎片离子 m/z 341.137 42 $[M+H]^+$ 与 MC21 的准分子离子峰一致, 子离子 m/z 205.085 40、 m/z 137.059 42 等也与 MC21 的子离子碎片一致。因此, 推断 MC23 为 MC21 的葡萄糖醛酸化代谢产物。

MC24 的准分子离子峰为 m/z 325.142 88 $[M+H]^+$, t_R 为 12.21 min, 误差为 1.73×10^{-6} , 比 MC21 少 16 ($+2H-H_2O$)。推测分子式为 $C_{20}H_{20}O_4$, 特征碎片离子 m/z 177.090 82 $[M+H-C_9H_8O_2]^+$ 和 m/z 149.059 56 $[M+H-C_{11}H_{12}O_2]^+$ 为分子中碳碳键断裂形成, 因此, 推断 MC24 在 MC21 的基础上进行了氢化和脱水, 为 Cur 六氢化、脱水和去甲基化代谢产物。

MC25 的准分子离子峰为 m/z 327.158 51 $[M+H]^+$, t_R 为 7.62 min, 误差为 1.77×10^{-6} , 比 MC24 多 2 ($2H$)。具有特征碎片离子 m/z 309.147 43 $[M+H-OH]^+$ 、 m/z 189.090 81 $[M+H-C_8H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 177.090 65 $[M+H-C_9H_{10}O_2]^+$ 等。因此, 推断 MC25 为 MC24 的氢化产物。

MC26 的准分子离子峰为 m/z 351.121 61 $[M+H]^+$, t_R 为 17.37 min, 误差为 3.11×10^{-6} , 比 MC1 少 18 (H_2O)。具有特征碎片离子 m/z 333.110 84 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 231.064 64 $[M+H-C_8H_8O]^+$ 、 m/z 201.054 24 $[M+H-C_9H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 177.054 31 $[M+H-C_{11}H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 147.043 78 $[M+H-CH_3-OH-C_{11}H_9O_2]^+$ 。因此, 推断 MC26 为 Cur 脱水的代谢产物。

MC27 的准分子离子峰为 m/z 381.131 74 $[M+H]^+$, t_R 为 17.68 min, 误差为 3.99×10^{-6} , 比 MC1 多 12 ($+CH_2-2H$)。具有特征碎片离子 m/z 363.121 40 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 335.126 25 $[M+H-H_2O-CH_2O+2H]^+$ 、 m/z 257.080 08 $[M+H-C_7H_8O_2]^+$ 、 m/z 231.064 64 $[M+H-C_9H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 177.054 20 $[M+H-C_{12}H_{12}O_3]^+$ 。因此, 推断 MC27 为 Cur 的甲基化、还原的代谢产物。

MC28 的准分子离子峰为 m/z 385.127 26 $[M+H]^+$, t_R 为 7.35 min, 误差为 2.39×10^{-6} , 比 MC1 多 16 (O)。具有特征碎片离子 m/z 367.115 84 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 339.122 62 $[M+H-H_2O-CH_2O+2H]^+$ 、 m/z 249.075 44 $[M+H-C_7H_7O_2-CH]^+$ 、 m/z 219.064 45 $[M+H-O-C_9H_{10}O_2]^+$ 、 m/z 193.049 24 $[M+H-H_2O-C_{11}H_8O_2-2H]^+$ 、 m/z 177.054 32 $[M+H-C_{11}H_{12}O_4]^+$ 。推断 MC28 为 Cur 的羟基化产物。

MC29 的准分子离子峰为 m/z 383.111 54 $[M+H]^+$, t_R 为 8.48 min, 误差为 2.58×10^{-6} , 比 MC28 少 2 ($2H$)。具有特征碎片离子 m/z 368.088 62 $[M+H-CH_3]^+$ 、 m/z 350.076 84 $[M+H-CH_3-OH]^+$ 、 m/z 337.070 01 $[M+H-CH_2O-CH_2-2H]^+$ 、 m/z 322.082 89 $[M+H-OCH_3]^+$ 、 m/z 201.053 74 $[M+H-OCH_3-C_7H_6O_2-CO]^+$ 、 m/z 177.054 47 $[M+H-C_{11}H_8O_4-2H]^+$ 。因此, 推断 MC29 在 MC28 的基础上发生了脱氢反应, 即 MC29 为 Cur 的羟基化、脱氢的代谢产物。

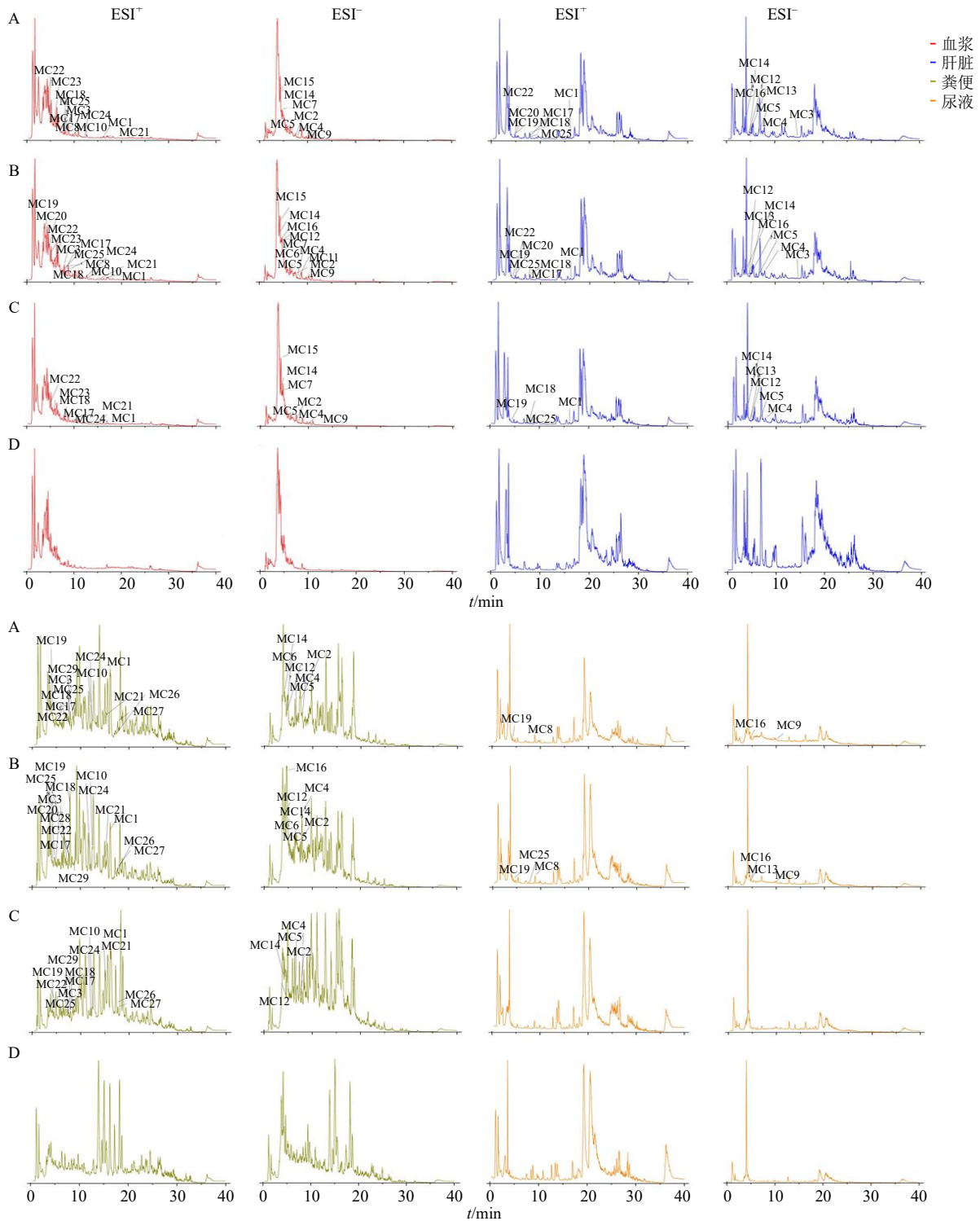
3.1.3 基质代谢与代谢途径分析 基于各组代谢产物总提取离子流图 (图 5) 分析得到各组血浆、肝脏、粪便和尿液 4 个基质的代谢产物信息 (表 2) 并进行归纳整理, 推测到 Cur 分别在总姜黄素组、FS60-总姜黄素 I 制剂组和 FS60-总姜黄素 II 制剂组大鼠体内的代谢途径, 见图 6~8。

3.2 各组 Cur 代谢产物的差异性分析

本研究以各组不同基质中 Cur 代谢产物的种类鉴别结果为基础 (表 2), 将各组分别在粪便、血浆、肝脏和尿液中的代谢产物种类通过 Venn 图形式进行展示, 见图 9。

3.2.1 粪便中代谢产物分析 当机体经口服摄入后, Cur 优先在肠道中表现出分布和积累^[29-30]。然而, Cur 作为一种亲脂性多酚, 系统生物利用度差, 易被人体肠道菌群进行生物转化而获得各种代谢产物^[29], 故代谢产物的生物活性可能解释姜黄素的低生物利用度差与报道的治疗效果之间的矛盾。

总姜黄素组、FS60-总姜黄素 I 组和 FS60-总姜黄素 II 组粪便中的 Cur 代谢产物种类异同性如图 9-A 所示。结果显示, 除未被分解利用的 Cur 原型, 总姜黄素组粪便中共发现了 17 种 Cur 代谢产物, 其中主要为 Cur 原型经脱水、加/减氢、羟基化或去甲基化后的代谢产物, 仅发现了 3 种 II 相代谢产物即 MC27、MC12 和 MC14。由此可见, 当机体摄入总姜黄素时, 肠道微生物对 Cur 的转化主要属于 I 相代谢。同时, 这亦可能归功于肠道菌群可以解结 II 期代谢物, 并将其转化成相应的 I 相代谢物和一些裂变产物的结果^[31]。与本研究结果相似的是, Lou 等^[32]基于超高效液相色谱/四极杆飞行时间质谱分析发现人体肠道菌群系统中的 Cur 主要代谢物是被还原的 Cur。据已报道的单株肠道菌群的生物转化结果, 目前可以推测弗格森杆菌菌群的生物转化结果, 目前可以推测弗格森杆菌 (ATCC 35469)、2 种



A-FS60-总姜黄素 I组; B-FS60-总姜黄素 II组; C-总姜黄素组; D-空白组。
A-FS60-curcuminoids I group; B-FS60-curcuminoids II group; C-Curcuminoids group; D-blank group.

图 5 大鼠生物样品中代谢产物总提取离子流图

Fig. 5 Total ion chromatograms of metabolites in rat biological samples

大肠杆菌 (ATCC 8739 和 DH10B)^[33]以及巨芽孢杆菌 (DCMB-002)^[34]是在粪便中氧化还原 Cur 的主

力军。对于总姜黄素组粪便中出现的 3 种 II 相代谢产物, 其硫酸化产物 MC12 和 MC14 同样在肝脏中

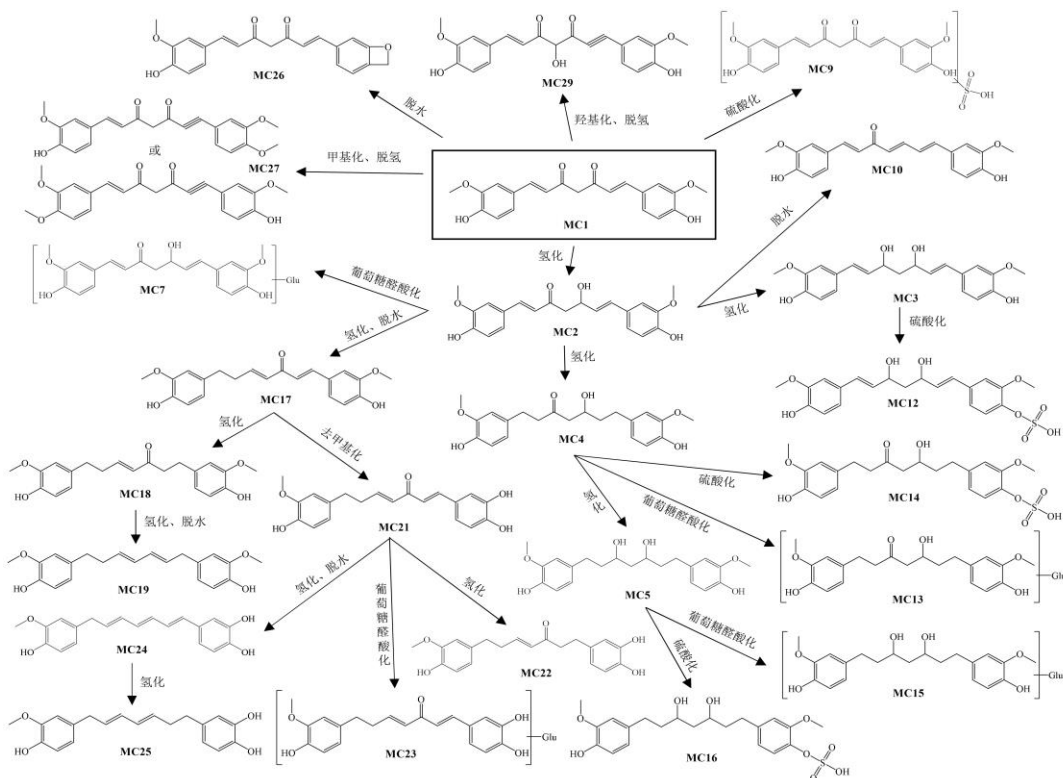


图6 Cur在总姜黄素组大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 6 Possible metabolic pathway of Cur in rats of Curcuminoids group

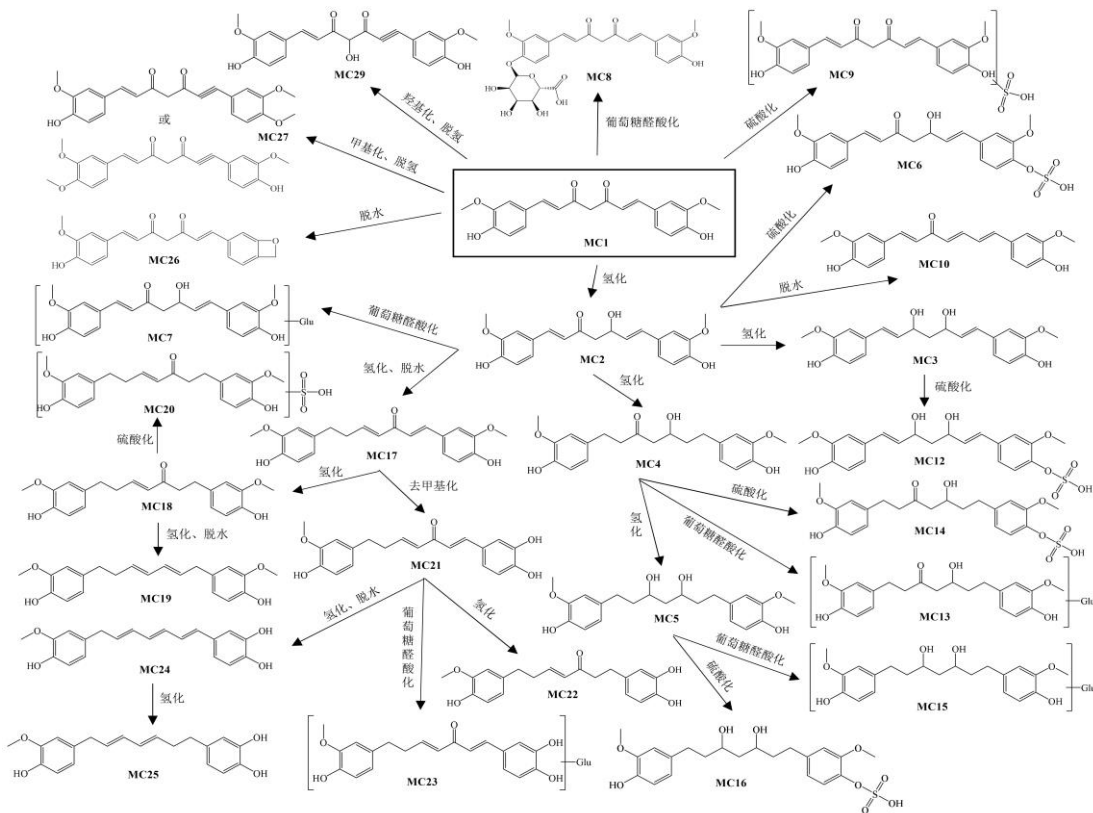


图7 Cur在FS60-总姜黄素I组大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 7 Possible metabolic pathway of Cur in rats of FS60-curcuminoids I group

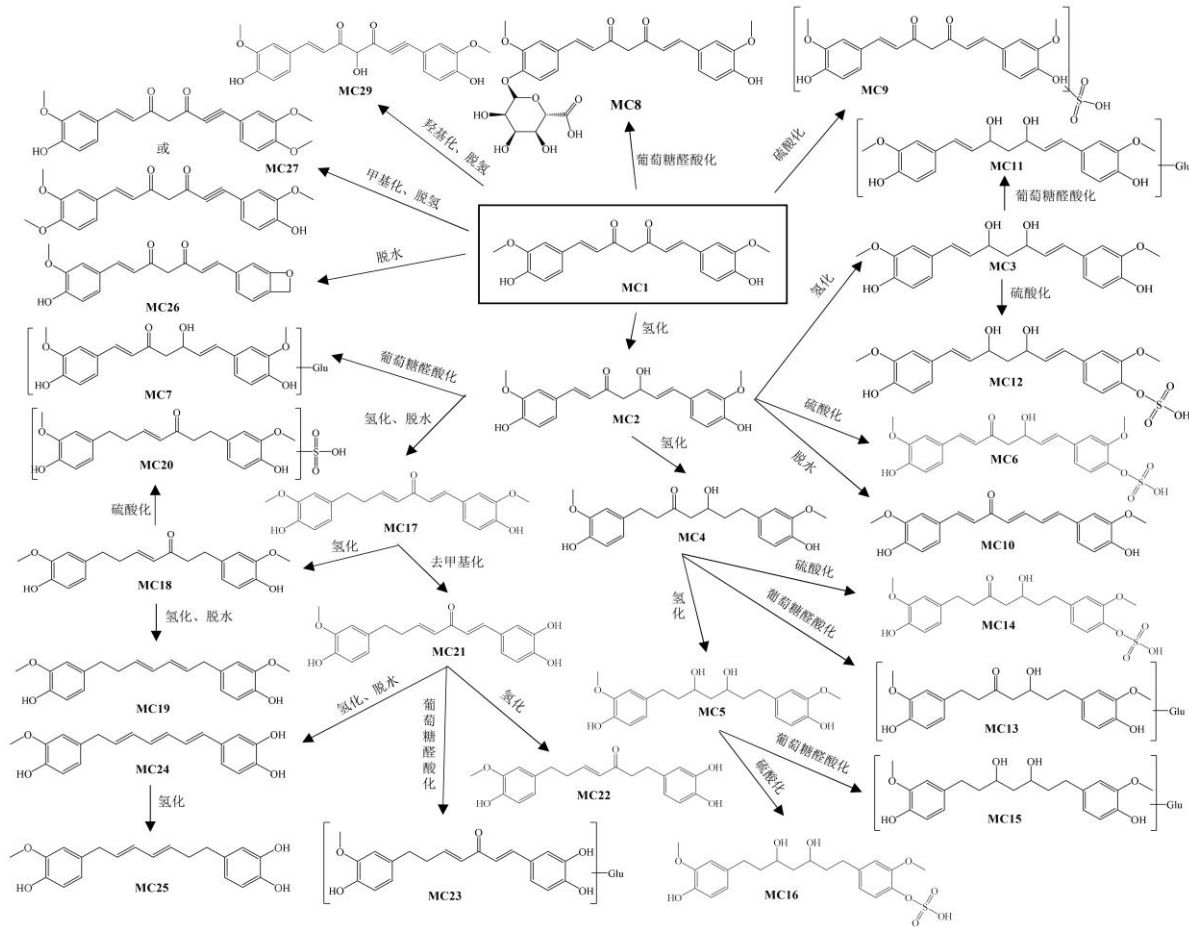


图 8 Cur 在 FS60-总姜黄素II组大鼠体内可能的代谢途径

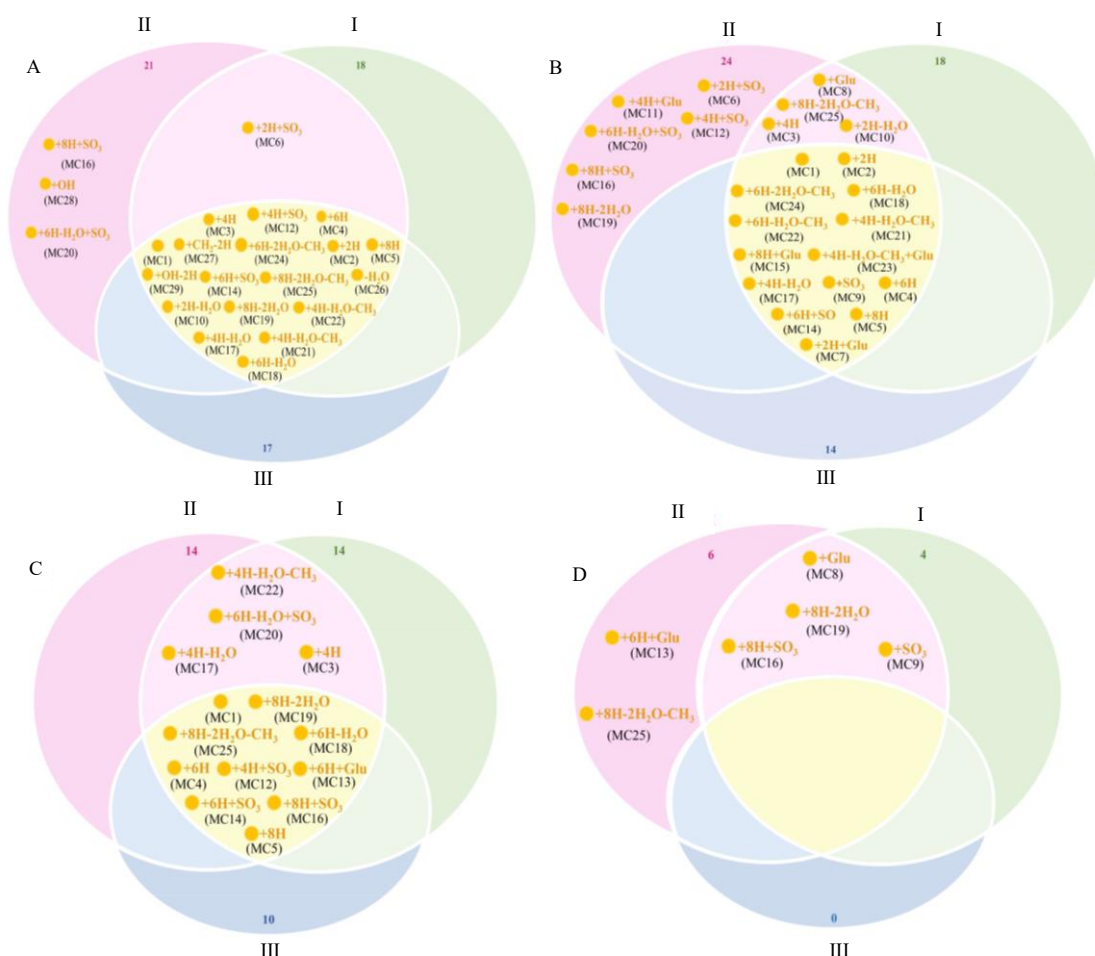
Fig. 8 Possible metabolic pathway of Cur in rats of FS60-curcuminoids II group

亦被检测出，由于肝脏是 Cur 代谢的主要场所^[35]，故推测他们在粪便中的存在可能是肠肝循环的结果。由表 2 可知，甲基化产物 MC27 仅出现在粪便中，可能是肠道菌群对其进行甲基化代谢从而降低了化合物极性，导致 MC27 不被机体吸收而通过粪便排出体外。

与总姜黄素组相比，FS60-总姜黄素I和 II 组粪便中出现了新的 II 相代谢产物 MC6。除此外，该化合物仅出现在 FS60-总姜黄素 II 组血浆中。由此可以推测，FS60 对肠道菌群的干预可以促进 Cur 的二氢硫酸化产物 MC6 产生及入血。

与 FS60-总姜黄素I组相比，FS60-总姜黄素II组粪便中出现了新的硫酸化产物 (MC20 和 MC16) 以及羟基化产物 (MC28)。其中，MC28 仅在 FS60-总姜黄素 II 组的粪便中出现，MC29 作为 MC28 脱二氢的产物，仅在 3 组大鼠粪便中检出。由此推测 FS60 长期摄入调控大鼠肠道菌群结构组成从而改变 Cur 在肠道的 I 相代谢过程，使得新的代谢产物 MC28

出现。对于硫酸化产物 MC20，除粪便外，其同时出现在 FS60-总姜黄素II组肝脏和血液中，而其仅在 FS60-总姜黄素I组肝脏中出现，在总姜黄素组所有基质中未出现。由此可知，MC20 是 Cur 通过 FS60-总姜黄素聚集体给药、吸收入血并到达肝脏后进一步代谢的产物，故 FS60 长期摄入可能会促进机体对 Cur 的肠道吸收和肝脏代谢，产生足量的代谢产物 MC20 并通过肠肝循环分布于体循环中，从而在粪便中被检出。而 MC16 同时出现在 FS60-总姜黄素II组粪便、肝脏、血液和尿液中，该产物于总姜黄素组中仅在肝脏中出现，于 FS60-总姜黄素I组中在肝脏和尿液中出现。MC16 的前体化合物 MC5 在 3 组大鼠血液、肝脏、和粪便中同时检出。由此推测可知，MC16 是肝脏对 MC5 进行II相代谢的产物，由于 Cur 通过聚集体形式给药增加了代谢产物 MC5 的入血和入肝量，从而导致 MC16 大量生成并同时通过肠肝循环和尿液排泄，故在粪便和尿液中亦检测出该成分。



I-FS60-总姜黄素I组; II-FS60-总姜黄素II组; III-总姜黄素组。

I-FS60-curcuminoids I group; II-FS60-curcuminoids II group; III-Curcuminoids group.

图 9 各组大鼠在粪便 (A)、血浆 (B)、肝脏 (C) 和尿液 (D) 中的 Cur 代谢产物 Venn 图
Fig. 9 Venn diagram of Cur metabolites in feces (A), plasma (B), liver (C) and urine (D) matrices

综上所述，总姜黄素通过聚集体的形式给药可以促进粪便中 Cur 的二氢硫酸化产物 MC6 的产生。而 FS60 干预肠道菌群 1 周可以调控菌群代谢 Cur 的过程，产生新的 Cur 羟基化产物 MC28，促进了肝脏中硫酸化代谢物 MC16 和 MC20 的产生，从而导致经肠肝循环后粪便中硫酸化产物 MC16 和 MC20 的出现。

3.2.2 血液中代谢产物分析 经胃肠道吸收的 Cur 及其代谢产物通过肠上皮屏障入血，进入体循环，是有效成分发挥生物活性效应的前提条件。结果显示（图 9-B），总姜黄素组血液中除了 Cur 原型外，出现了 8 种 I 相代谢产物，5 种 II 相代谢产物。其中，8 种 I 相代谢产物均同时在粪便中出现，MC18、MC4 和 MC5 亦同时在肝脏被检出。由此可推测，同时分布在粪便、血液和肝脏中的 MC18、MC4 和 MC5 可能是 Cur 进入体循环后被肝脏代谢并经历

肠肝循环后的结果，亦有可能是肠道菌群代谢后增加了化合物的极性从而该产物生物利用度增加的结果。同时分布在粪便和血液中的 MC2、MC24、MC21、MC22 和 MC17 可能是 Cur 原型成分经肠道菌群转化成极性增加的代谢产物被肠道吸收入血后的结果。对于总姜黄素组血液中出现 5 种硫酸化或葡萄糖醛酸化 II 相代谢产物，它们的前体化合物均在粪便中被检出。研究表明，在肠细胞质中，Cur 的 II 相代谢非常活跃，特别是在酚位点与葡萄糖醛酸和硫酸盐结合^[35]。故 Cur 经菌群代谢的产物 MC5、MC21 和 MC2 经肠上皮吸收后，在肠细胞中的葡萄糖醛酸酶作用下部分发生结合反应分别生成 MC15、MC23 和 MC7 后入血。Cur 和 MC4 在肠细胞中的硫酸转移酶作用下部分发生结合反应分别生成 MC9 和 MC14 后入血。

与总姜黄素组相比，FS60-总姜黄素 I 和 II 组血

液中新出现了 3 个 I 相代谢产物 (MC25、MC3、MC10) 和 1 个 II 相代谢产物 (MC8)。其中, MC3 和 MC10 在总姜黄素组仅出现在粪便中, 而其均出现在 FS60-总姜黄素 I 和 II 组血液和粪便中。由此可推测 FS60-总姜黄素聚集体加速了肠道菌群对 Cur 代谢从而使四氢姜黄素和 MC10 产量增加从而被肠壁吸收后入血量增加。对于 MC25, 其在总姜黄素组仅出现在肝脏和粪便中, 而在 FS60-总姜黄素 I 和 II 组出现在血液、肝脏和粪便中。其前体化合物 MC21 均出现在 3 组大鼠的粪便和血液中, 故推测 MC25 应该是在肝脏产生的代谢产物, FS60-总姜黄素聚集体的摄入促进了肠菌对 MC21 的产生和入血量, 从而大量到达肝脏被进一步 I 相代谢成 MC25, 其通过肠肝循环被广泛分布在 FS60-总姜黄素聚集体给药后大鼠的体循环中。对于葡萄糖醛酸代谢产物 MC8, 经对照品比对可知为姜黄素葡萄糖醛酸, 仅出现在 FS60-总姜黄素 I 和 II 组的血液和肝脏中, 且由葡萄糖醛酸与 Cur 直接结合而来。故与总姜黄素组中 Cur 被肠壁硫酸化相比, FS60-总姜黄素聚集体给药促进了肠细胞对 Cur 的葡萄糖醛酸化, 产生大量姜黄素葡萄糖醛酸从而到达肝脏。

与 FS60-总姜黄素 I 组相比, FS60-总姜黄素 II 组血液出现了新的 I 相代谢产物 (MC19)、硫酸化产物 (MC6、MC12、MC20 和 MC16) 以及葡萄糖醛酸产物 (MC11)。对于新代谢产物 MC19, 其在 FS60-总姜黄素 I 组中出现在了肝脏、粪便和尿液中, 推测通过 FS60-总姜黄素聚集体给药后 MC19 能够在肝脏中大量产生并增加了从肾脏通过尿液排泄的量, 由此出现了粪便和尿液双排泄的现象。而 MC19 在 FS60-总姜黄素 II 组中同时出现在了血液、肝脏、粪便以及尿液中, 由此可推测 FS60 对肠道菌群的调节作用会促进肠道对 MC19 的重吸收而重新进入体循环。对于新出现的 II 相代谢产物, MC16 在 FS60-总姜黄素 I 组中出现在了肝脏和尿液, 说明 FS60-总姜黄素聚集体给药促进了机体对 Cur 的吸收代谢, 使得它产量增加从而在经肾排泄过程中被检出。而 MC16 在 FS60-总姜黄素 II 组中出现在了血液、肝脏、粪便以及尿液, 由此可推测 FS60 对肠道菌群的调节作用会影响 MC16 的代谢途径, 促使它们在胆汁中排出从而增加它们的肠肝循环。对于糖醛酸产物 MC11, 经对照品比对可知为四氢姜黄素葡萄糖醛酸, 其仅出现在 FS60-总姜黄素 II 组血液中, 其前体化合物 MC3 在总姜黄素组中仅粪

便中出现, 由此可推测 FS60 对肠道的长期干预可能会促进肠细胞对化合物的葡萄糖醛酸化, 产生更多的新葡萄糖醛酸产物从而入血。MC6 仅出现在 FS60-总姜黄素 I 组的粪便中, 而其在 FS60-总姜黄素 II 组血液和粪便中的同时检出说明 FS60 对肠道的长期干预可以促进对代谢产物的吸收入血。MC12 除在肝脏和粪便中出现外, 还在 FS60-总姜黄素 II 组中的血液中被检出, 由此可以推测 FS60 对肠道的长期干预促进了肠壁对 MC12 的重新吸收从而进入体循环。MC20 仅在 FS60-总姜黄素 I 组的肝脏中出现, 其却在 FS60-总姜黄素 II 组血液、肝脏和粪便中都被检出, 由此可知 FS60 对肠道的长期干预可以促进肝脏代谢产物 MC20 的肠肝循环, 从而延长其在机体的作用时间。

综上所述, FS60-总姜黄素聚集体给药的形式加速了肠道菌群对 Cur 的代谢从而使四氢姜黄素和 MC10 大量产生从而被肠壁吸收后入血量增加, 增加肠细胞中姜黄素葡萄糖醛酸的产生和入血, 促进了肝脏代谢产物 MC25 的肠肝循环从而入血。FS60 干预肠道一周增加肠道对粪便代谢产物 MC6 的吸收, 促使 MC12、MC20、MC16 和 MC19 在胆汁中的排出从而增加它们的肠肝循环以及促进四氢姜黄素葡萄糖醛酸入血。

3.2.3 肝脏中代谢产物分析 除肠道外, 肝脏是姜黄素被机体吸收后发生代谢的主要场所^[5,36]。结果显示 (图 9-C), 总姜黄素组肝脏中除检测出 Cur 原型外, 还出现了 5 种 I 相代谢产物和 4 种 II 相代谢产物。对于肝脏中的 I 相代谢产物 (MC18、MC19、MC4、MC5 和 MC25), MC19 是 MC18 在到达肝脏后被氢化和脱水后的产物, MC5 是 MC4 在肝脏中进一步氢化后的产物。MC25 的前体化合物 MC24 出现在血液和粪便中, MC25 则在肝脏和粪便中检出, 因此可以推测 MC25 是 MC24 在到达肝脏后被氢化的产物, 而后被分泌进入胆汁中排入肠道, 通过粪便排出体外。对于肝脏中的 II 相代谢产物 (MC12、MC13、MC14 和 MC16), 有趣的是, MC13 和 MC14 是肝脏中 I 相代谢产物 MC4 分别被葡萄糖醛酸化和硫酸化的产物, MC16 是肝脏中 I 相代谢产物 MC5 硫酸化的产物。MC12 的前体化合物 MC3 在大鼠的粪便中出现, 而 MC12 出现在总姜黄素给药后大鼠的肝脏和粪便中, 可推测 MC3 在肝脏进一步被硫酸化形成 MC12, 并分泌到肠道通过粪便排出体外。由此可见, 代谢产物通过血液进入肝脏

后再次发生了与葡萄糖醛酸酶和硫酸转移酶结合为主的II相代谢。

与总姜黄素组相比, FS60-总姜黄素I和II组肝脏中新出现了3个I相代谢产物(MC3、MC17、MC22)和1个II相代谢产物(MC20)。其中, MC20和MC22分别是MC18在肝脏分别被氢化和去甲基化以及硫酸化的产物。MC17的前体化合物MC2同时存在于3组大鼠的粪便和血液中, MC17存在于总姜黄素组的粪便和血液中, 而其在FS60-总姜黄素I和II组血液、肝脏和粪便中被同时检出, 由此可推测FS60-总姜黄素聚集体给药可以使二氢姜黄素到达肝脏后被进一步氢化、脱水后形成MC17, 并通过肠肝循环同时分布在血液、肝脏和粪便中。MC3在总姜黄素组粪便中检出, 而FS60-总姜黄素I和II组中的血液、肝脏和粪便中均被检出, 可推测FS60-总姜黄素聚集体给药促进了肠道对四氢姜黄素的吸收, 从而到达肝脏。

与FS60-总姜黄素I组相比, FS60-总姜黄素II组肝脏中的Cur代谢物种类无差异。综上所述, FS60-总姜黄素聚集体给药的形式促进四氢姜黄素入肝, 促使肝脏对二氢姜黄素和MC18进行进一步I和II代谢, 从而生成新代谢产物MC17、MC20和MC22。FS60干预肠道1周对FS60-总姜黄素聚集体给药形式的肝脏代谢产物种类未产生影响。

3.2.4 尿液中代谢产物分析 肾脏在清除活性成分方面发挥重要作用。代谢产物通常经肾小球滤过滤出, 在近端小管分泌, 再由小管重吸收^[36]。结果显示(图9-D), 总姜黄素组尿液中未检出Cur原型及其相关代谢产物。推测可能与大鼠的尿液体积过大而代谢物体内含量较小, 导致样品中代谢物浓度经生物样品前处理过程后仍低于仪器检测限有关。此亦可间接反映出机体对Cur吸收较少, 被代谢生成的成分种类较少且浓度较低的现象, 证明了Cur的低生物利用度特性。

与总姜黄素组相比, FS60-总姜黄素I和II组尿液中检测出了1种I相代谢产物(MC19)和3种II相代谢产物(MC8、MC16和MC9)。由此可见, 随尿液排出体外的代谢产物大多属于II相代谢。其中, MC8和MC9亦出现在FS60-总姜黄素I和II组血液中。然而, MC8和MC9却未在FS60-总姜黄素I和II组肝脏中找到, 推测可能有以下2种原因: 一是可能大鼠肝脏体积较大, 所进行提取检测的部分肝脏虽经过样品处理和富集, 但其含量仍未达仪器检

测限所致。二是MC8和MC9经肾小管重吸收后再次入血后, 可能被血浆中的葡萄糖醛酸酶和硫酸脂酶作用产生苷元MC1^[37], 从而以MC1形式到达肝脏。这似乎也侧面说明了FS60-总姜黄素I和II组肝脏中均检出Cur原型(即MC1)的原因。MC16和MC19作为在3组大鼠肝脏中均被检出的代谢产物, 其通过尿液排出体外。它们未在总姜黄素组尿液中检出的原因极有可能与样品中浓度有关, 亦间接反映出以FS60-总姜黄素聚集体形式给药会增加体内Cur及其代谢产物的浓度。

与FS60-总姜黄素I组相比, FS60-总姜黄素II组尿液中还检测出了1种I相代谢产物(MC25)和1种II相代谢产物(MC13)。其中, MC13仅在总姜黄素组和FS60-总姜黄素I组的肝脏中检出, 而在FS60-总姜黄素II组的肝脏和尿液中被同时检出。由此推测, FS60干预肠道一周可以提高代谢产物的体内浓度从而高于仪器检测限, 导致MC13在排泄过程亦被检出。MC25在FS60-总姜黄素I组血液、粪便和肝脏中检出, 而在FS60-总姜黄素II组血液、尿液、粪便和肝脏中均被检出, 推测FS60干预肠道1周可能促进了MC25的产生从而导致其在通过尿液排除体外的过程中检出。

综上所述, 由于尿液体积过大, 且代谢物含量过低, 导致尿液中仅检测出了少量代谢产物。但该现象可以间接反映出以FS60-总姜黄素聚集体的形式给药可以增加体内代谢产物姜黄素葡萄糖醛酸、MC9、MC16和MC19的浓度, FS60干预肠道一周可进一步提高FS60-总姜黄素聚集体形式给药后MC13和MC25的浓度。

4 讨论

多酚易被肠道和肝脏代谢, 本研究基于健康SD大鼠粪便、血浆、肝脏和尿液基质对以总姜黄素形式给药后其主要成分Cur相关体内代谢产物进行了定性鉴定。基于上述结果可知, 以总姜黄素形式给药可在粪便和血液中检测到Cur原型, 而未在肝脏和尿液中检出, 验证了Cur在机体容易被快速代谢的特点。其中, 肠道菌群对Cur主要进行I相代谢, 肠细胞和肝脏对Cur主要进行II相代谢。由于Cur是吸收差、代谢快的经典多酚类型, 肠道中大部分未被吸收的Cur通过菌群代谢以及肠上皮细胞外排作用, 致使粪便中检出的代谢产物种类最多, 总计17种。小部分Cur被肠壁吸收代谢后入血, 基本以代谢产物形式存在于肝脏中。其中, MC4、MC5、

MC14 和 MC18 是 Cur 被吸收后体循环中主要的成分, 其中 MC4 和 MC5 经对照品比对可知分别为六氢姜黄素和八氢姜黄素, 它们均为游离 Cur 入血产生生物活性的物质基础。

以植物体系中多酚和多糖之间存在的天然相互作用力为灵感, 课题组前期筛选出一种葫芦巴多糖 FS60 可以包裹总姜黄素形成纳米级球状聚集体^[14], 改善 Cur 高疏水性难题。故本实验进一步探究以 FS60-总姜黄素聚集体形式给药对体内 Cur 代谢的影响, 并探讨了 FS60 材料的菌群调节作用对 FS60-总姜黄素聚集体形式给药后体内 Cur 代谢产生的间接影响。上述结果表明, 以聚集体给药可以加速肠道菌群代谢 Cur 生成姜黄素葡萄糖醛酸、四氢姜黄素、MC6 和 MC10 并被肠壁大量吸收入血, 促使肝脏对二氢姜黄素和 MC18 进行进一步代谢生成 MC17、MC20 和 MC22。另外, 增加体循环中姜黄素葡萄糖醛酸、MC9、MC16 和 MC19 浓度, 促进四氢姜黄素和 MC25 的肠肝循环。总的来说, FS60-总姜黄素聚集体可以增加体内 Cur 代谢产物种类并促进某些代谢产物的体循环从而延长它们在机体中的停留时间。FS60 干预肠道 1 周后再以聚集体形式给药可调控肠菌代谢 Cur 产生新代谢产物 MC28, 促进肠壁对 MC6 的吸收以及对四氢姜黄素的葡萄糖醛酸化与吸收, 促进肝脏中新代谢产物 MC16 和 MC20 的产生, 提高体循环中 MC13 和 MC25 浓度, 促进 MC12、MC20、MC16 和 MC19 的肠肝循环。因此, 葫芦巴多糖 FS60 对肠道的长期干预可以进一步促进肠上皮的糖醛酸代谢, 提高肠道菌群和肝脏对 FS60-总姜黄素聚集体中 Cur 的代谢, 以及增加体循环中代谢产物种类和停留时间。其相关作用机制可能与调节肠道菌群和对肠细胞某些调控作用有关, 待后续深入探索。

综上所述, 本研究以多酚体内代谢的角度阐述了葫芦巴多糖 FS60 对 Cur 的体内递送意义。葫芦巴多糖 FS60 通过包裹总姜黄素形成自组装 FS60-总姜黄素聚集体增加了体内 Cur 代谢产物种类以及延长 Cur 代谢产物在机体中的停留时间, 长时间摄入 FS60-总姜黄素聚集体可能由于 FS60 持续干预而效果更为明显。葫芦巴作为药食同源之品, 其多糖具有安全性高、生物活性丰富等特征, 后续将继续开展葫芦巴多糖 FS60 对 Cur 体内药动学以及相关疾病模型研究, 进一步明确葫芦巴多糖递送姜黄素的药效学意义, 为天然多糖载体的多酚递送系统

研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, *et al.* Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 686.
- [2] Dini I, Grumetto L. Recent advances in natural polyphenol research [J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8777.
- [3] Abbas M, Saeed F, Anjum F, *et al.* Natural polyphenols: An overview [J]. *Int J Food Prop*, 2016, 20(8): 1689-1699.
- [4] Prasad S, Tyagi A K, Aggarwal B B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice [J]. *Cancer Res Treat*, 2014, 46(1): 2-18.
- [5] Sanidad K Z, Sukamtoh E, Xiao H, *et al.* Curcumin: Recent advances in the development of strategies to improve oral bioavailability [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2019, 10: 597-617.
- [6] 张心洁, 廖洋洋, 廖婉, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒和微胶囊的制备、表征及体内药动学的比较研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1386-1396.
- [7] 李岭慧, 廖婉, 张倩, 等. 基于 Box-Behnken 设计-效应面法优化姜黄素-乳铁蛋白纳米粒制备工艺和体外评价研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(19): 5980-5990.
- [8] 李锐, 张倩, 孙良堃, 等. 青稞可溶性膳食纤维与姜黄素复配后增溶及促吸收作用研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 349-356.
- [9] 刘芳, 张倩, 李锐, 等. 表面活性剂对姜黄素类成分水溶性与抗肝纤维化作用的影响 [J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1809-1815.
- [10] 吴建军, 邹剑, 马致洁, 等. 从 2005—2023 年国家自然科学基金资助项目浅谈中药多糖的研究现状 [J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1053-1062.
- [11] Quirós-Sauceda A E, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi S G, *et al.* Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: Interaction and possible effect after ingestion [J]. *Food Funct*, 2014, 5(6): 1063-1072.
- [12] Mudgil D, Barak S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 1-6.
- [13] Guan Z W, Yu E Z, Feng Q. Soluble dietary fiber, one of the most important nutrients for the gut microbiota [J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6802.
- [14] Hu Q D, Ma R Y, Tang X X, *et al.* Self-assembled nanoparticles of curcuminoids and soluble dietary fibers: Characterization and mechanism [J]. *LWT*, 2023, 173: 114375.
- [15] Teng H, Chen L. Polyphenols and bioavailability: An update

- [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(13): 2040-2051.
- [16] Selma M V, Espín J C, Tomás-Barberán F A. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(15): 6485-6501.
- [17] Ozdal T, Sela D A, Xiao J B, *et al.* The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility [J]. *Nutrients*, 2016, 8(2): 78.
- [18] Rothwell J A, Urpi-Sarda M, Boto-Ordoñez M, *et al.* Phenol-Explorer 2.0: A major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals [J]. *Database*, 2012, 2012: bas031.
- [19] Jakobek L, Matić P. Non-covalent dietary fiber - polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 83: 235-247.
- [20] Adam A, Crespy V, Levrat-Verny M A, *et al.* The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats [J]. *J Nutr*, 2002, 132(7): 1962-1968.
- [21] Schramm D D, Karim M, Schrader H R, *et al.* Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols [J]. *Life Sci*, 2003, 73(7): 857-869.
- [22] Ye S X, Shah B R, Li J, *et al.* A critical review on interplay between dietary fibers and gut microbiota [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2022, 124: 237-249.
- [23] 刘欢欢, 石松利, 周红兵, 等. 肠道菌群及联用组学技术在中药领域上的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2023, 18(7): 1044-1051.
- [24] 王媛, 刘美娟, 王宏进, 等. 基于 UPLC-Q-Extractive Orbitrap MS 鉴定姜黄提取物在大鼠体内的代谢产物 [J]. *质谱学报*, 2022, 43(2): 155-167.
- [25] 朱宁, 凌海燕, 华桦, 等. HPLC-Q-TOF/MS 分析四氢姜黄素在大鼠肠道菌群中的代谢 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(2): 44-48.
- [26] 苏少锋, 黄国林, 严枫, 等. 姜黄素和吉马酮的体外肝微粒体代谢产物分析 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(6): 1013-1017.
- [27] 刘安昌, 娄红祥, 赵丽霞. 姜黄素在大鼠体内的代谢研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2008, 42(8): 74-77.
- [28] Tan S, Calani L, Bresciani L, *et al.* The degradation of curcuminoids in a human faecal fermentation model [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2015, 66(7): 790-796.
- [29] Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats [J]. *Toxicology*, 1980, 16(3): 259-265.
- [30] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, *et al.* Bioavailability of curcumin: Problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [31] Pluta R, Januszewski S, Ułamek-Kozioł M. Mutual two-way interactions of curcumin and gut microbiota [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1055.
- [32] Lou Y, Zheng J Q, Hu H H, *et al.* Application of ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify curcumin metabolites produced by human intestinal bacteria [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 985: 38-47.
- [33] Tan S, Rupasinghe T W, Tull D L, *et al.* Degradation of curcuminoids by *in vitro* pure culture fermentation [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(45): 11005-11015.
- [34] An C Y, Sun Z Z, Shen L, *et al.* Biotransformation of food spice curcumin by gut bacterium *Bacillus megaterium* DCMB-002 and its pharmacological implications [J]. *Food Nutr Res*, 2017, 61(1): 1412814.
- [35] Dei Cas M, Ghidoni R. Dietary curcumin: Correlation between bioavailability and health potential [J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2147.
- [36] Almazroo O A, Miah M K, Venkataramanan R. Drug metabolism in the liver [J]. *Clin Liver Dis*, 2017, 21(1): 1-20.
- [37] Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, *et al.* Polyphenols and human health: The role of bioavailability [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 273.

[责任编辑 王文倩]