

离体大鼠肠道菌群对淫羊藿苷的代谢研究^{*}

□徐文 张亚萍 张卫东^{**} (中国人民解放军第二军医大学药学院 上海 200433)
张新民 沈自尹^{**} (复旦大学附属华山医院 上海 200040)

摘要:目的:考察大鼠肠道菌群对淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 的代谢情况,为研究淫羊藿苷的口服吸收机理打下基础。方法:将待测药物与新配制的大鼠肠内容物混悬液在 37 ℃ 孵化,采用高效液相色谱法同时测定孵化前后溶液中淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 的浓度。结果:淫羊藿苷被肠道菌群迅速代谢成淫羊藿次苷 II,而淫羊藿次苷 II 不被代谢。结论:研究淫羊藿次苷 II 的吸收和代谢机理对于研究淫羊藿苷的口服吸收机理非常有必要。

关键词:淫羊藿苷 淫羊藿次苷 II 大鼠肠道菌群 代谢

中药淫羊藿 (*Epimedium herba*) 为小檗科植物,具有补肾壮阳,强筋健骨,祛风除湿之功效^[1]。淫羊藿中的主要成分为淫羊藿总黄酮,其中淫羊藿苷 (icariin, 图 1A) 是淫羊藿主要的活性成分和指标性成分。但淫羊藿苷口服吸收很差,绝对生物利用度只有 12.02 %^[2]。国内几个课题组对该化合物口服吸收差的原因进行了初步研究,叶丽卡^[2]等人测定了其肝门静脉给药后绝对生物利用度为 45.17 %,提示肝首过效应是造成淫羊藿苷口服生物利用度低的一个原因。还有研究表明淫羊藿苷在肠道内发生代谢^[3,4]。邱峰^[3]等人研究了大鼠灌胃给予淫羊藿苷后小肠匀浆液中淫羊

藿苷的代谢产物,主要为淫羊藿次苷 II (icariside II, 图 1B) 和淫羊藿素 (icaritin, 图 1C)。但肠匀浆液中不仅包含淫羊藿苷被肠道菌群代谢得到的产物,还包括药物被肠细胞中的药物代谢酶代谢的产物。刘铁汉^[4]等人将淫羊藿苷、人粪便和厌氧菌培养基共同孵育后得到少量的代谢物,推测可能为淫羊藿苷的苷元。由于文献中采用了不同的研究方法,得出的结果也不相同,甚至互相矛盾。我们在预实验中发现将大鼠灌胃给予淫羊藿苷后在其血浆中测得浓度较高的淫羊藿次苷 II,因此在从淫羊藿中分离了大量淫羊藿次苷 II 后对淫羊藿苷的代谢进行了定量研究,并对其主要的代谢产物淫羊藿次苷 II 的代谢进行了考察。

收稿日期:2006-11-15

修回日期:2006-12-16

^{*} 国家科技部 973 项目 (2007CB507400): 衰老的机制与干预的基础研究, 负责人: 陈香美。

^{**} 联系人: 张卫东, 上海交通大学药学院教授, 研究方向: 天然产物的提取、分离、鉴定、质量控制和代谢研究。Tel: 021-25070386, E-mail: WDZhang@hotmail.com。沈自尹: 本刊编委会学术顾问, 中国科学院院士, 主要从事中西医结合思路和方法的开拓、肾本质的研究和传统老年医学研究。

一、实验材料

1. 受试药物

淫羊藿苷购于中国药品生物制品检定所;110737-200312;淫羊藿次苷 II 由本研究室从淫羊藿总黄酮中提取纯化得到,纯度大于 98%。

2. 实验动物

雄性 Wistar 大鼠,体重 200-230 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。

3. 仪器

SHA-C 恒温振荡器:江苏太仓市实验设备厂;LC-2010A HT 液相色谱仪,岛津公司。1100LC/MSD-Trap-XCT 液质联用仪:Agilent 公司。

4. 试剂

甲醇(色谱纯):购于 Merck 公司;水为超纯水;其余试剂为分析纯。

二、实验方法

1. 大鼠肠内容物混悬液的制备

大鼠处死后马上将肠取出,用适量生理盐水将内容物冲出,置于研钵中研磨,即得。大鼠肠内容物制备后立即使用。

2. HPLC 法同时测定样品中的淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II

色谱条件:色谱柱: Diamonsil(TM) C18 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 200 mm) 色谱柱;流动相:甲醇-水(65:

35);流速:1.0 mL/min;紫外检测波长:270 nm;色谱柱柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量 50 μ L。在此色谱条件下,淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 的保留时间分别为 6.21 和 38.5 min,大鼠肠内容物中的杂质不干扰二者的测定。

取大鼠肠内容物匀浆分别加入不同浓度的淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II,使淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 的浓度分别为 2、5、10、20 和 40 μ g/mL,加入 0.8 mL 甲醇,涡旋混合 30 s 后离心,取上清液 50 μ L 注入 HPLC 仪,记录峰面积,建立标准曲线。

3. 淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II 在大鼠肠内容物混悬液中的孵化

将淫羊藿苷或淫羊藿次苷 II 加入到大鼠肠内容物混悬液中,使淫羊藿苷或淫羊藿次苷 II 的浓度约为 30 μ g/mL,在无氧条件下于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡水浴中孵化,分别于 0、0.5、1、2 和 4 h 取样 0.2 mL,加入 0.8 mL 甲醇,涡旋混合 30 s 后离心,取上清液注入 HPLC 仪,记录峰面积,代入标准曲线计算淫羊藿苷或淫羊藿次苷 II 的浓度。

三、实验结果

1. 淫羊藿苷在大鼠肠内容物中的代谢

淫羊藿苷与大鼠肠内容物共同孵化后迅速被降解,同时生成近似相同质量分数的代谢产物(详见图 2),代谢产物在 HPLC 上的保留时间与相同色谱条件下淫羊藿次苷 II 的相同,经检测质谱图相同,初步断定代谢产物为淫羊藿次苷 II,孵育前后的 HPLC 图谱见图 3。

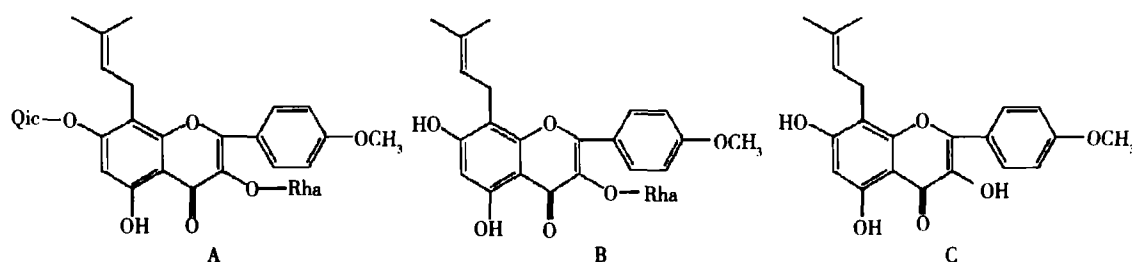


图 1 淫羊藿苷(A)、淫羊藿次苷 II(B)和淫羊藿素的化学结构(C)

2. 淫羊藿次苷 II 在大鼠肠内容物中的代谢

淫羊藿次苷 II 与大鼠肠内容物共同孵化 4 h 峰面积没有明显变化,表明淫羊藿次苷 II 不被大鼠肠内细菌代谢。

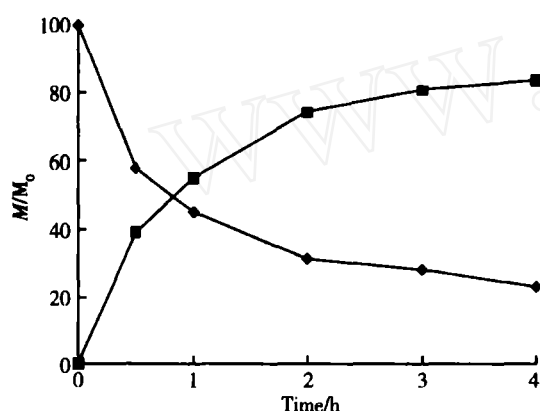


图2 淫羊藿次苷 II 与大鼠肠内容物孵化过程中淫羊藿次苷/淫羊藿次苷 II 的摩尔质量占孵化前淫羊藿次苷摩尔质量百分数-时间曲线。◆:淫羊藿次苷;■:淫羊藿次苷 II

四、讨论

1. 文献[4]报道淫羊藿苷在胃液中比较稳定,与我们预实验的结果一致,因此本文只考察了淫羊藿苷被肠道菌群的代谢。

2. 有文献[4]报道淫羊藿苷被肠内菌群代谢成淫

羊藿素,一个淫羊藿苷分子中含有两分子的糖,一个葡萄糖,一个鼠李糖,脱去一个葡萄糖分子得到淫羊藿次苷 II,继续脱去鼠李糖分子得到淫羊藿素,因此本实验还考察了淫羊藿次苷 II 被肠道菌群的代谢。该文献通过 TLC 法也确定淫羊藿苷几乎完全代谢成另一产物,分离代谢物进行鉴定代谢产物为淫羊藿素,但得到的淫羊藿素只占孵化前淫羊藿苷的 1.06 % (w/w)。

本实验的结果表明淫羊藿次苷 II 不被大鼠肠道内菌群代谢,几乎不生成淫羊藿素,因此我们推测文献中分离的代谢产物不是淫羊藿苷的主要代谢产物。

3. 本文的研究结果表明淫羊藿苷迅速被大鼠肠道内菌群代谢成淫羊藿次苷 II,为了研究淫羊藿苷的口服吸收机理,对淫羊藿次苷 II 的代谢和吸收研究非常必要。

参考文献

- 1 冉先德. 中华药海. 哈尔滨:哈尔滨出版社出版,1998;1714-1718
- 2 叶丽卡,陈济民,刘四海,李国秀. 淫羊藿苷在大鼠体内的药代动力学. 中国药理学杂志,1999,34(1):33-36
- 3 邱峰,陈英杰,鹿野美弘,姚新生. 淫羊藿苷在大鼠体内的代谢. 药理学杂志,1999,34(3):222-226
- 4 刘铁汉,王毅,王本祥,吴立军. 淫羊藿苷的肠菌代谢 I:肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化. 2000,31(11):834-867

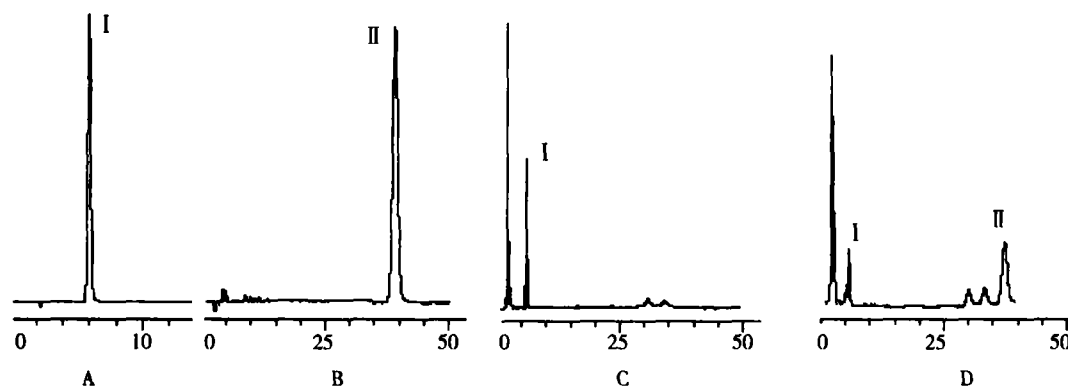


图3 淫羊藿苷与大鼠肠内容物孵化前后的 HPLC 色谱图。A:淫羊藿苷;B:淫羊藿次苷 II;C:淫羊藿苷孵化前色谱图;D:淫羊藿苷孵化后色谱图;I:淫羊藿苷;II:淫羊藿次苷 II。

(Continued on Page 106)

Metabonomics of CCL4 - Induced Rat Liver Injury and Interfering Effects of the Yin Chen Hao Tang Extract

Wang Xijun, Sun Wenjun, Sun Hui, Lu Haitao, Zhou Dixin, Wu Zeming, Wang Ping, Liu Lian, Wu Xiuhong
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

This paper discusses the metabonomics of rat liver injury induced by CCL4, and the interfering effects of the Yin Chen Hao Tang Extract. In the study, five special biomarkers of rat liver injury were discovered, using the MS analytical theory and PCA (principal components analysis) software. Both the mechanism of liver injury, and the therapeutic mechanism of the Yin Chen Hao Tang Extract have been sorted out, under the guidance of the systems biology. The investigation has led authors to believe that metabonomics makes a fine approach for explaining the therapeutic effects of traditional Chinese medicine on treating liver injury.

Keywords: UPLC - Q - TOF/MS, metabonomics, biomarker, the Yin Chen Hao Tang, liver injury

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:张志华, 责任译审:邹春申)

(Continued from Page 100)

Metabolism of Icariin and Icariside II by Rat Intestinal Bacteria In Vitro

Xu Wen¹, Zhang Yaping¹, Zhang Weidong^{1,2*}, Zhang Xinmin³, Shen Ziyi³
(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433;
2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201203;
3. Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040)

The purpose of this study is to understand the metabolism of icariin and its main metabolite icariside II by rat intestinal bacteria in vitro, creating a basis for further study of oral icariin absorption. In the study, Icariin and icariside II were incubated together with rat intestinal bacteria at a temperature of 37 °C. An HPLC method was used for simultaneous determination of Icariin and icariside II. It is found that Icariin is rapidly metabolized to icariside II, though icariside II is not touched. The finding suggest that it is important to understand the metabolism and absorption mechanism of icariside II, in an attempt to better understand the oral absorption mechanism of icariside II.

Keywords: Icariin, Icariin; icariside II; rat intestinal bacteria; metabolism

(责任编辑:王瑀, 责任编审:张志华, 责任译审:邹春申)

《中国新药杂志》征订启事

中国科技核心期刊、中国药学期刊、中国期刊方阵“双效”期刊！

主办单位:中国医药科技出版社/中国医药集团总公司/中国药学会。

1992年元月正式公开发行,半月刊。所刊文章被《美国化学文摘(CA)》、《万方数据-数字化期刊群》、中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库等国内外权威检索期刊或数据库收录。辟有综述与专论、实验研究、临床研究、新药述评、信息快递、药品管理等栏目。读者群多为从事医药研发、生产、经营、管理的单位,从事医药情报资料工

作的高中级医药卫生工作者及医药卫生院校的师生。欢迎投稿! 积极订阅! 刊登广告!

大16开本,每期定价10元,全年240元。

邮发代号:82-488 国外代号:M4240

国内统一刊号:CN11-2850/R

国际标准刊号:ISSN 1003-3734

邮编:100088

地址:北京市海淀区知春路20号中国医药大厦703室

《中国新药杂志》编辑部

电话:010-82358308 62359357/82089057(兼传真)

E-mail: cndj@newdrug.cn xyzz711@sohu.com