

- (4): 589-603.
- [21] Raval A P, Sick J T, Gonzalez G J, *et al.* Chronic nicotine exposure inhibits estrogen-mediated synaptic functions in hippocampus of female rats [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 517 (1): 41-46.
- [22] Raval A P, Dave K R, Saul I, *et al.* Synergistic inhibitory effect of nicotine plus oral contraceptive on mitochondrial complex-IV is mediated by estrogen receptor- β in female rats [J]. *J Neurochem*, 2012, 121 (1): 157-167.
- [23] Rocha B A, Fleischer R, Schaeffer J M, *et al.* 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 179 (3): 637-643.
- [24] Sárvári M, Kalló I, Hrabovszky E, *et al.* Long-term estrogen receptor beta agonist treatment modifies the hippocampal transcriptome in middle-aged ovariectomized rats [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 149.
- [25] Wang P, Ren J, Tang J, *et al.* Estrogen-like activities of saikosaponin-d *in vitro*: a pilot study [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 626 (2-3): 159-165.
- [26] 高耀, 高丽, 高晓霞, 等. 基于网络药理学的逍遥散抗抑郁活性成分作用靶点研究 [J]. *药科学报*, 2015, 50 (12): 1589-1595.

人体肠道菌群对人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 代谢转化的影响

严桐, 易婷, 郑婷婷

(常州市第三人民医院, 江苏常州 213001)

摘要: 目的 考察人体肠道菌群对人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 代谢转化的影响。方法 分别采集肝癌患者与健康人体的新鲜粪便, 经处理后分别与人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 进行厌氧共孵育, UPLC-Q-TOF/MS 法鉴定其肠菌孵育后的代谢产物差异, UPLC-QQQ-MS 法检测原型及其代谢产物含量随孵育时间的变化。结果 肝癌患者与健康人体肠道菌群的人参皂苷 R_{g3} 孵育液中均鉴定出了人参皂苷 Rh₂ (脱糖基产物)、原人参二醇; 肝癌患者肠道菌群的白头翁皂苷 D 孵育液中鉴定出了白头翁皂苷 D 脱鼠李糖产物、白头翁皂苷 D 脱葡萄糖产物、白头翁皂苷 D 羟基化产物、常春藤皂苷元, 但健康人体肠道菌群的白头翁皂苷 D 孵育液中鉴定出了白头翁皂苷 D 脱鼠李糖产物、白头翁皂苷 D 脱葡萄糖产物、白头翁皂苷 D 脱鼠李糖和葡萄糖产物、白头翁皂苷 D 甲基化产物、常春藤皂苷元。人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 在肝癌患者肠道菌群中的代谢速率显著低于健康人体, 人参皂苷 Rh₂ 和常春藤皂苷元在肝癌患者肠道菌群中的生成速率显著低于健康人体。结论 在肝癌状态下, 人体肠道菌群变化对人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 代谢转化有显著影响。

关键词: 人体肠道菌群; 人参皂苷 R_{g3}; 白头翁皂苷 D; 肝癌; UPLC-Q-TOF/MS; UPLC-QQQ-MS

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)09-1902-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.002

Effects of human intestinal flora on the metabolic transformations of ginsenoside R_{g3} and pulsatilla saponin D

YAN Tong, YI Ting, ZHENG Ting-ting

(The Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of human intestinal flora on the metabolic transformations of ginsenoside R_{g3} and pulsatilla saponin D. **METHODS** The fresh feces collected from liver cancer patients and healthy human were incubated with intestinal bacteria and ginsenoside R_{g3} and pulsatilla saponin D, respectively, under anaerobic condition. The metabolites differences were identified by UPLC-Q-TOF-MS, and the quantitative changes of ginsenoside R_{g3}, pulsatilla saponin D and their metabolites with incubation time were detected by UPLC-QQQ-

收稿日期: 2017-12-02

作者简介: 严桐 (1970—), 男, 主任中医师, 从事肝病临床研究。Tel: 13815011235, E-mail: czszfgp@163.com

MS. RESULTS Ginsenoside Rh₂ (de-glycosylated product) and protopanaxadiol were observable in ginsenoside Rg₃ intestinal bacteria incubation solution of the liver cancer patients and healthy human. De-rhamnose product, de-glucose product and hydroxylated product of pulsatilla saponin D, and hederagenine were identified in the pulsatilla saponin D intestinal bacteria incubation solution of the liver cancer patients. But De-rhamnose product, de-glucose product, de-rhamnose and glucose product and methylation product of pulsatilla saponin D, and hederagenine were found in the pulsatilla saponin D intestinal bacteria incubation solution of the healthy human. However, the metabolic rate of ginsenoside Rg₃ and pulsatilla saponin D in the intestinal bacteria of the liver cancer patients were significantly lower than that of the healthy human. Meanwhile, the generation rate of ginsenoside Rh₂ and hederagenine in the intestinal bacteria of the liver cancer patients was significantly lower than that of the healthy human.

CONCLUSION The abnormal human intestinal flora due to liver cancer obviously affects the metabolic transformations of ginsenoside Rg₃ and pulsatilla saponin D.

KEY WORDS: human intestinal flora; ginsenoside Rg₃; pulsatilla saponin D; liver cancer; UPLC-Q-TOF/MS; UPLC-QQQ-MS

人体肠道内存在着数以万计的肠道菌群,可产生大量水解酶、糖苷酶、氧化还原酶等多种代谢酶,调控着宿主体内的代谢,从而影响药物的生物活性。正常、肝癌状态下肠道菌群的种类和数量存在差异^[1-3],可能会影响药物的代谢路径和代谢速率,从而改变药物疗效,尤其是糖苷类成分需要经过肠道菌群代谢脱糖基后才能发挥更好的药理活性^[4]。查阅文献发现,人参皂苷 Rg₃、白头翁皂苷 D 均具有较好的抗肝癌作用^[5-8],两者均属于苷类成分,本身不易被吸收,口服生物利用度普遍较低,主要是在胃肠道内被水解为次级苷或苷元而吸收入血^[9-12],从而发挥更强的药理活性,其中前者抗肿瘤作用与其在体内能生成人参皂苷 Rh₂ 有密切相关性^[13]。

本实验以人参皂苷 Rg₃、白头翁皂苷 D 为抗肝癌类皂苷成分的代表,将其分别与健康人体、肝癌患者的新鲜粪便共孵育,采用 LC-MS 法比较两者在肠道菌群中孵育后代谢产物和代谢速率的差异,为其在病理状态下的体内代谢过程研究提供数据支持,也为相关抗肝癌类制剂的开发提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 6538 Q-TOF 质谱仪、Agilent 1290 infinity 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); AB6500 三重四级杆(美国 AB SCIEX 公司);厌氧培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);电子分析天平(十万分之一,梅特勒-托利多仪器上海有限公司);氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);高压蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司);涡

旋混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

1.2 试剂 人参皂苷 Rg₃ 对照品(含有量 99.5%,批号 110804-201504)、人参皂苷 Rh₂ 对照品(批号 111748-200501)、常春藤皂苷元对照品(含有量 98.3%,批号 111733-201205)、氯雷他定(批号 100615-201103)(中国食品药品检定研究院);白头翁皂苷 D 对照品(含有量 ≥96%,上海源叶生物科技有限公司,批号 B21904);胰蛋白胍(美国阿拉丁工业公司,批号 H1414086)。KH₂PO₄、NaCl、CaCl₂、Na₂CO₃ 均购于南京化学试剂有限公司;K₂HPO₄·3H₂O、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、L-半胱氨酸、L-抗坏血酸、牛肉浸膏均购于国药集团化学试剂有限公司。甲酸、乙腈为色谱纯;其余试剂为分析纯;水为纯化水。

2 方法

2.1 药物贮备液制备 精密称取对照品人参皂苷 Rg₃ 7.92 mg、人参皂苷 Rh₂ 6.25 mg、白头翁皂苷 D 9.13 mg、常春藤皂苷元 4.73 mg,置于 5 mL 量瓶中,含 50% DMSO 的乙腈稀释定容至刻度,即得(浓度均为 2 mmol/L),置于 4 °C 冰箱中备用。

2.2 内标溶液制备 精密称取氯雷他定 3.78 mg,置于 5 mL 量瓶中,含 50% DMSO 的乙腈稀释定容至刻度,配制成 2 mmol/L 贮备液,精密吸取 0.5 mL,乙腈定容至 10 mL 量瓶中,涡旋,混匀,即得(浓度为 100 μmol/L)。

2.3 厌氧培养基制备 培养基组成 A 为 7.5 mL (0.78% K₂HPO₄); B 为 37.5 mL (0.47% KH₂PO₄、1.18% NaCl、1.2% (NH₄)₂SO₄、0.12% CaCl₂、0.25% MgSO₄·H₂O); C 为 50 mL (8% Na₂CO₃); 0.5 g L-半胱氨酸,2 mL (25% L-抗坏血酸),1 g

牛肉浸膏, 1 g 蛋白胨。以上加超纯水适量, 1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.5~7.7, 定容至 1 000 mL, 所得培养基分配于管, 115 °C 下以 0.07 MPa 高压灭菌 30 min, 4 °C 下贮存或立即使用。

2.4 粪便采集与处理

2.4.1 采集 筛选 2017 年 2 月—2017 年 4 月在常州市第三人民医院收治的、经组织病理学切片检查确诊为肝癌的患者, 共 6 例 (男女各 3 例, 年龄 46~70 岁); 另筛选年龄、性别、生活地域等因素与肝癌患者基本匹配的 6 例健康人体 (男女各 3 例, 年龄 45~73 岁), 经常规体检证明体质量正常, 无慢性肠道疾病史, 研究期间无严重疾病。入组者粪便采集均依照自愿原则, 肝癌患者治疗前收集新鲜粪便 1 次, 同时健康人体也收集 1 次, 将所得标本尽快置于 -80 °C 冰箱中。

2.4.2 处理 取 1 个干净塑料袋, 充满氮气, 装入 10 g 粪便, 并加入 40 mL 生理盐水, 涡旋混合制成悬浊液, 2 000 r/min 离心 10 min 后得上清液, 作为肠菌液。取 20 mL 置于培养瓶中, 加入 30 mL 厌氧培养液, 作为肠菌培养液, 整个过程于 N₂ 流下操作。

2.5 药物与肠道菌液的厌氧共培养

2.5.1 代谢产物差异考察 取健康人体、肝癌患者的肠菌培养液各 0.99 mL, 置于锥形瓶中, 加入人参皂苷 Rg₃ 或白头翁皂苷 D 贮备液 (2 mmol/L) 0.01 mL, 混匀溶解, 于 37 °C 厌氧条件下孵育培养 12 h, 取出反应管, 吸取 0.5 mL 孵育液, 加入 0.5 mL 乙腈, 等量乙酸乙酯萃取 3 次, 合并上清液, 40 °C 水浴中氮气吹干, 200 μL 甲醇复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。同时, 进行不含药物、肠菌液的空白实验。每组平行 3 次。

2.5.2 代谢速率差异考察 取健康人体、肝癌患者的肠菌培养液各 9.9 mL, 置于锥形瓶中, 加入人参皂苷 Rg₃ 或白头翁皂苷 D 储备液 (2 mmol/L) 0.1 mL, 混匀溶解后分装成 9 管 (0.5 mL/管), 于 37 °C 厌氧条件下孵育培养 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h, 取出反应管, 加入 0.5 mL 乙腈和 0.1 mL 内标溶液, 等量乙酸乙酯萃取 3 次, 合并上清液, 40 °C 水浴中氮气吹干, 1 mL 50% 乙腈复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。同时, 进行不含药物、肠菌液的空白实验。每组平行 3 次。

2.6 分析条件

2.6.1 UPLC-Q-TOF-MS/MS

2.6.1.1 色谱 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (人参皂苷 Rg₃, 0~5 min, 30%~38% B; 5~15 min, 38%~100% B。白头翁皂苷 D, 0~15 min, 30%~90% B); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL。

2.6.1.2 质谱 离子源 ESI; 干燥气温度 350 °C; 雾化压力为 40 psi (1 psi = 6.895 kPa); 干燥气体积流量 8.0 L/min; 八级杆电压 750 V; 锥孔电压 65 V; 负离子模式毛细管电压 3 500 V; 裂解电压 130 V; 离子扫描范围 *m/z* 100~2 000; 图谱采集频率 1.0 spectra/s。

2.6.2 UPLC-QQQ-MS

2.6.2.1 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 35%~100% B; 10~11 min, 100% B); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 1 μL。

2.6.2.2 质谱条件 离子源 ESI; 气帘气 40 psi (1 psi = 6.895 kPa); 碰撞气 8 psi; 离子源温度 500 °C; 雾化气 40、60 psi; 离子喷雾电压 5 500 V; 扫描方式多反应监测 (MRM), 正离子模式。用于定量分析的检测离子对见表 1。

表 1 用于定量分析的检测离子对

Tab. 1 Detection ion pairs for quantitative analysis

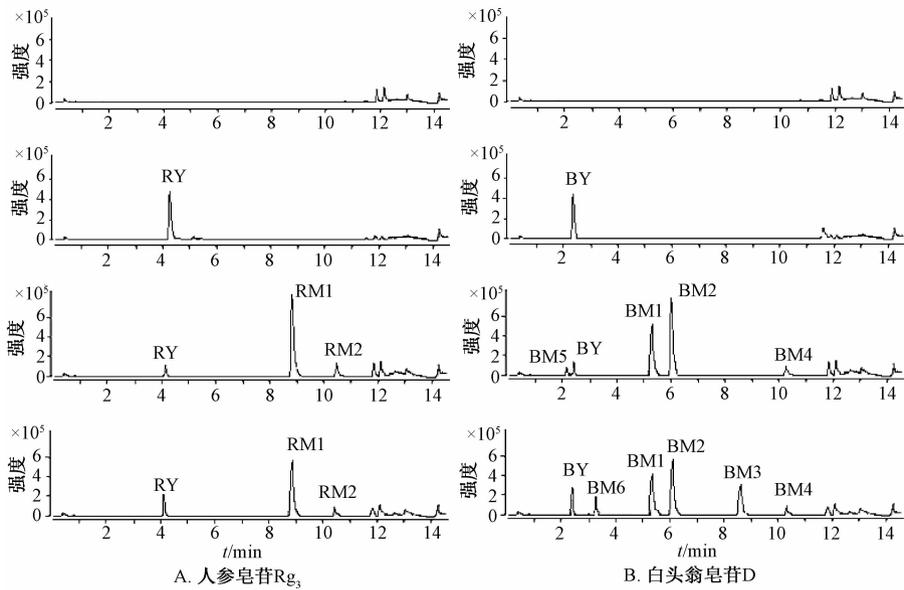
成分	扫描范围 <i>m/z</i>	去簇电压/V	碰撞电压/eV
人参皂苷 Rg ₃	807.5→623.4	150	45
人参皂苷 Rh ₂	645.5→623.5	150	50
白头翁皂苷 D	913.4→605.3	150	75
常春藤皂苷元	473.5→425.5	150	70
氯雷他定	383.1→337.2	80	30

3 结果

3.1 代谢产物差异分析

3.1.1 人参皂苷 Rg₃ 与空白、阴性孵育样品比较, 人参皂苷 Rg₃ 在健康人体和肝癌患者的 12 h 肠菌孵育样品中均可检测到原型药 (*m/z* 829.496 3, [M + COOH]⁻) 和 2 个代谢产物 [图 1, *m/z* 分别为 667.440 5 (RM₁)、505.387 8 (RM₂)]。根据精确分子量和质谱裂解规律 (表 2) 可知, 代谢产物 RM₁ 的分子量比人参皂苷 Rg₃ 减少 1 个葡萄糖 (162 Da), 可推测为人参皂苷 Rh₂; RM₂ 的分子量比人参皂苷 Rg₃ 减少 2 个葡萄糖 (486 Da), 可推测为原人参二醇。

3.1.2 白头翁皂苷 D 与空白、阴性孵育样品比较, 白头翁皂苷 D 在肝癌患者的 12 h 肠菌孵育样



注：由上至下，依次为空白对照、阴性对照、健康人体肠菌孵育 12 h 样品、肝癌患者肠菌孵育 12 h 样品

图 1 各成分代谢产物总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms for metabolites of various constituents

表 2 各成分代谢产物

Tab. 2 Metabolites of various constituents

成分	编号	t/min	m/z	分子式	主要碎片离子	结构推测	肝癌患者	健康人体
人参皂苷 Rg ₃	RY	4.06	829.496 3 [M + COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.492 4 [M-H] ⁻ , 621.438 2 [M-H-Glc] ⁻ , 459.385 0 [M-H-Glc-Glc] ⁻	人参皂苷 Rg ₃	+	+
	RM1	8.92	667.440 5 [M + COOH] ⁻	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	621.439 6 [M-H] ⁻ , 459.384 5 [M-H-Glc] ⁻	人参皂苷 Rh ₂	+	+
	RM2	10.52	505.387 8 [M + COOH] ⁻	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	459.361 1 [M-H] ⁻	原人参二醇	+	+
白头翁皂苷 D	BY	2.43	911.501 4 [M-H] ⁻	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	749.448 1 [M-H-Glc] ⁻ , 603.390 5 [M-H-Glc-Rha] ⁻ , 471.347 8 [M-H-Glc-Rha-ara] ⁻ , 423.298 1 [M-H-Glc-Rha-ara-CH ₄ O ₂] ⁻	白头翁皂苷 D	+	+
	BM1	5.37	765.443 3 [M-H] ⁻	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	603.390 5 [M-H-Glc] ⁻ , 471.347 8 [M-H-Glc-ara] ⁻ , 423.298 3 [M-H-Glc-ara-CH ₄ O ₂] ⁻	白头翁皂苷 D 脱鼠李糖产物	+	+
	BM2	6.05	749.448 5 [M-H] ⁻	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	603.390 5 [M-H-Rha] ⁻ , 471.347 8 [M-H-Rha-ara] ⁻ , 423.298 6 [M-H-Rha-ara-CH ₄ O ₂] ⁻	白头翁皂苷 D 脱葡萄糖产物	+	+
	BM3	8.68	603.390 8 [M-H] ⁻	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	471.347 8 [M-H-ara] ⁻ , 423.298 5 [M-H-ara-CH ₄ O ₂] ⁻	白头翁皂苷 D 脱鼠李糖和葡萄糖产物	-	+
	BM4	10.22	471.348 2 [M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	423.298 5 [M-H-CH ₄ O ₂] ⁻	常春藤皂苷元	+	+
	BM5	2.21	927.495 5 [M-H] ⁻	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	765.432 2 [M-H-Glc] ⁻ , 619.410 8 [M-H-Glc-Rha] ⁻ , 497.221 3 [M-H-Glc-Rha-ara] ⁻	白头翁皂苷 D 羟基化产物	+	-
BM6	3.26	925.516 2 [M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	763.486 4 [M-H-Glc] ⁻ , 617.420 8 [M-H-Glc-Rha] ⁻ , 485.430 5 [M-H-Glc-Rha-ara] ⁻	白头翁皂苷 D 甲基化产物	-	+	

品中可检测到原型药 (m/z 911.501 4, [M-H]⁻) (BM₁)、749.448 5 (BM₂)、471.348 2 (BM₄)、和 4 个代谢产物 [图 1, m/z 分别为 765.443 3 927.495 5 (BM₅)]；在健康人体的 24 h 肠菌孵育

样品中可检测到原型药 (m/z 911.501 4, $[M + COOH]^-$) 和 5 个代谢产物 [m/z 分别为 765.443 3 (BM_1)、749.448 5 (BM_2)、603.390 8 (BM_3)、471.348 2 (BM_4)、925.516 2 (BM_6)]。根据精确分子量和质谱裂解规律 (表 2) 可知, 代谢产物 BM_1 的分子量比白头翁皂苷 D 减少 1 个鼠李糖 (146 Da), 可推测为白头翁皂苷 D 脱鼠李糖产物, 即常春藤皂苷元 3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷; BM_2 的分子量比白头翁皂苷 D 减少 1 个葡萄糖 (162 Da), 可推测为白头翁皂苷 D 脱葡萄糖产物, 即常春藤皂苷元 3-*O*-L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷; BM_3 的分子量比白头翁皂苷 D 减少 1 个葡萄糖和 1 个鼠李糖 (308 Da), 可推测为白头翁皂苷 D 脱鼠李糖和葡萄糖产物, 即常春藤皂苷元- α -L-吡喃阿拉伯糖苷; BM_4 的分子量比白头翁皂苷 D 减少 1 个葡萄糖、1 个鼠李糖和 1 个阿拉伯糖 (440 Da), 可推测为常春藤皂苷元, 即常春藤皂苷元; BM_5 的分子量比白头翁皂苷 D 增加 16 Da (O), 可推测为白头翁皂苷 D 羟基化产物; BM_6 的分子量比白头翁皂苷

D 增加 14 Da (CH_2), 可推测为白头翁皂苷 D 甲基化产物。

3.2 代谢速率差异分析

3.2.1 含有量测定 目前, 市场上仅能购买到人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷 Rh_2 、白头翁皂苷 D、常春藤皂苷元对照品, 故本实验将比较原药及其代谢物人参皂苷 Rh_2 、常春藤皂苷元的含有量随孵育时间的变化。

3.2.1.1 线性关系考察 精密吸取人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷 Rh_2 、白头翁皂苷 D、常春藤皂苷元对照品贮备液适量, 预先灭活的肠菌孵育液 (肠菌液与乙腈按 1:1 比例混合) 等倍稀释成 20、10、5、2.5、1.25、0.62、0.31、0.16、0.08、0.04 $\mu\text{mol/L}$ 系列标准工作液, 分别精密吸取 1 mL, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 内标溶液 0.1 mL, 涡旋混匀, 按“2.5.2”项下方法处理, 取上清液进样测定。以待测物浓度为横坐标 (X), 待测物与内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行回归, 以 $S/N = 10$ 为定量限, $S/N = 3$ 为检测限, 结果见表 3, 可知各成分均在 0.04 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系。

表 3 各成分线性关系

Tab. 3 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
人参皂苷 Rg_3	$Y=0.007\ 8X+0.000\ 9$	0.998 5	0.04 ~ 20	0.02	0.005
人参皂苷 Rh_2	$Y=0.010\ 4X+0.005\ 6$	0.999 2	0.04 ~ 20	0.04	0.01
白头翁皂苷 D	$Y=0.005\ 2X+0.002\ 7$	0.997 7	0.04 ~ 20	0.02	0.01
常春藤皂苷元	$Y=0.004\ 7X+0.010\ 3$	0.996 3	0.04 ~ 20	0.04	0.01

3.2.1.2 精密度、准确度试验 预先灭活的肠菌孵育液配制成 0.08、1.25、10 $\mu\text{mol/L}$ 质控样品, 分别精密吸取 1 mL, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 内标溶液 0.1 mL, 涡旋混匀, 按“2.5.2”项下方法处理, 取上清液进样测定。结果, 人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷 Rh_2 、白头翁皂苷 D、常春藤皂苷元批内、批间精密度 RSD 均小于 15%, 表明该方法精密度良好; 平均相对偏差 (Re) 均在 $\pm 15\%$ 范围内, 表明该方法准确度良好, 符合生物样品分析要求。

3.2.1.3 提取回收率及基质效应 预先灭活的肠菌孵育液配制成 0.08、1.25、10 $\mu\text{mol/L}$ 质控样品, 分别精密吸取 1 mL, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 内标溶液 0.1 mL, 涡旋混匀, 按“2.5.2”项下方法处理, 取上清液进样测定, 得到峰面积 A; 选择 6 份不同来源的大鼠肠菌孵育液, 预先灭活后各取 1 mL, 按“2.5.2”项下方法处理, 加入 50% 乙腈及对照品, 配制成与质控样品浓度相同的样品, 进样测定, 得到峰面积 B; 50% 乙腈配制成与质控样

品浓度相同的样品, 进样测定, 得到峰面积 C, 提取回收率为 A/B , 待测物、内标的基质因子为 B/C , 待测物、内标的基质因子之比为内标归一化的基质效应因子, 结果见表 4, 均符合生物样品分析要求。同时, 人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷 Rh_2 、白头翁皂苷 D、常春藤皂苷元的内标归一化基质效应分别为 86.33% ~ 92.04%、95.15% ~ 103.06%、92.14% ~ 98.37%、85.92% ~ 94.34%, RSD 分别为 3.02% ~ 4.14%、2.85% ~ 5.04%、3.27% ~ 6.01%、4.62% ~ 9.17%, 变异系数均小于 15%, 均符合生物样品分析要求。

3.2.1.4 稳定性试验 预先灭活的肠菌孵育液配制成 0.08、1.25、10 $\mu\text{mol/L}$ 质控样品, 平行取 6 份, 分别在室温下放置 6 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 自动进样器内放置 24 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 d、反复冻融 3 次, 分别精密吸取 1 mL, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 内标溶液 0.1 mL, 涡旋混匀, 按“2.5.2”项下方法处理, 取上清液进样测定。结果, 人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷

表4 各成分提取回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

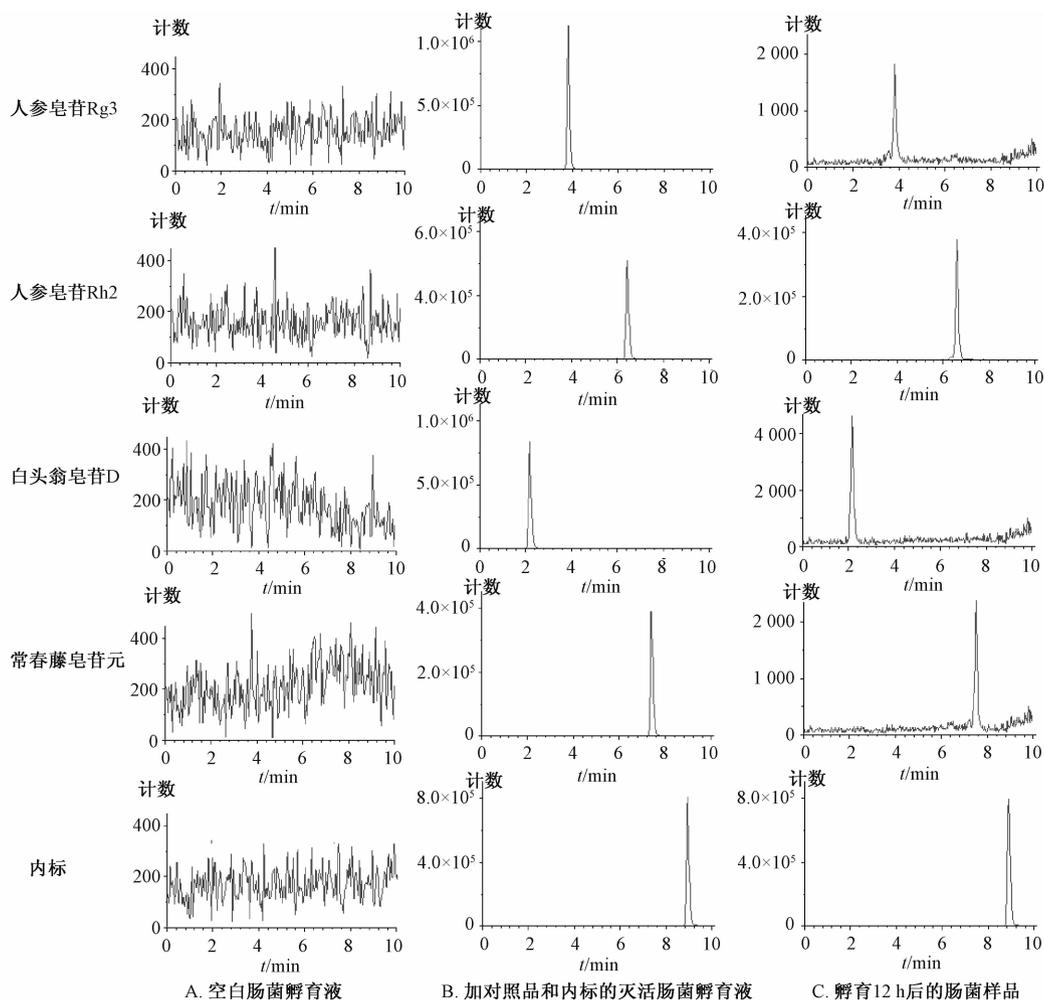
Tab. 4 Results of extraction recovery tests for various constituents ($\bar{x} \pm s$)

成分	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
人参皂苷 R _{g₃}	0.08	89.21 ± 5.17	5.79
	1.25	95.37 ± 2.43	2.54
	10	93.60 ± 2.95	3.15
人参皂苷 Rh ₂	0.08	90.42 ± 3.95	4.37
	1.25	92.28 ± 6.30	6.82
	10	99.83 ± 4.65	4.66
白头翁皂苷 D	0.08	89.60 ± 3.64	4.06
	1.25	88.26 ± 4.49	5.09
	10	97.52 ± 9.09	9.32
常春藤皂苷元	0.08	91.98 ± 9.52	10.35
	1.25	91.27 ± 6.01	6.58
	10	87.33 ± 5.48	6.28

Rh₂、白头翁皂苷 D、常春藤皂苷元在室温下放置 6 h 后含有量 RSD 分别为 5.26% ~ 9.32%、4.85% ~

8.77%、4.37% ~ 10.55%、6.28% ~ 12.59%，4 °C 自动进样器内放置 24 h 后分别为 3.08% ~ 6.29%、2.15% ~ 9.19%、7.12% ~ 11.33%、5.65% ~ 13.25%，-80 °C 下放置 30 d 后分别为 6.44% ~ 10.73%、5.47% ~ 10.04%、3.47% ~ 12.85%、7.18% ~ 13.29%，反复冻融 3 次后分别为 5.67% ~ 11.05%、3.20% ~ 9.22%、7.36% ~ 13.27%、8.54% ~ 11.37%，即均小于 15%，表明各成分在上述 4 种条件下均具有良好的稳定性。

3.2.1.5 专属性考察 取空白肠菌孵育液、加对照品和内标的灭活肠菌孵育液、人参皂苷 R_{g₃} 孵育 12 h 后的肠菌样品适量，按“2.5.2”项下方法处理，取上清液进样测定，结果见图 2。由图可知，在“2.6.2”项色谱条件下，各成分与内标附近均无干扰峰，与孵育液中的杂质峰均有较好的分离，保留时间分别为 3.92、6.56、2.21、7.44、9.01 min。



注：由左至右，依次为空白肠菌孵育液、加对照品和内标的灭活肠菌孵育液、孵育 12 h 后的肠菌样品

图2 各成分 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of various constituents

3.2.2 代谢速率差异分析

3.2.2.1 人参皂苷 R_{g₃} 图3A显示, 人参皂苷 R_{g₃} 在健康人体肠道菌中的代谢速率高于在肝癌患者中, 与肠道菌共孵育24 h后已基本被代谢完全, 而肝癌状态下仍可检测到原药; 健康状态下孵育6 h后代谢了74%, 而肝癌状态下仅代谢了51%。图3B显示, 人参皂苷 R_{h₂} 在健康人体肠道菌中的生成速率高于肝癌患者中, 孵育6 h后含有量为5.63 μmol/L, 即有56.3%被肠道菌代谢转化成人参皂苷 R_{h₂}, 而肝癌状态下仅为41.5%。另外, 在孵育24 h后, 人参皂苷 R_{g₃} 被肠道菌代谢转化成人参皂苷 R_{h₂} 的比例约为90%, 而其他代谢物仅约为10%, 表明人参皂苷 R_{h₂} 是人参皂苷 R_{g₃} 的主要代谢产物; 在孵育48 h后, 其生成速率可能低于其降解速率, 故在孵育液中的含有量呈下降趋势。

3.2.2.2 白头翁皂苷 D 图3C显示, 白头翁皂苷 D 在健康人体肠道菌中的代谢速率高于在肝癌患者中, 与肠道菌共孵育24 h后已基本被代谢完全, 而肝癌状态下仍有7%未被代谢; 健康状态下孵育6 h后代谢了54%, 而肝癌状态下仅代谢了48%。图3D显示, 常春藤皂苷元在健康人体的肠道菌中的生成速率要高于在肝癌患者中, 孵育6 h后含有量为0.37 μmol/L, 而肝癌状态下仅为0.17 μmol/L。另外, 在孵育24 h后, 白头翁皂苷 D 被肠道菌代谢转化成常春藤皂苷元的比例仅约为7%, 可知白头翁皂苷 D 在肠道菌中的主要代谢产物为次级苷。

4 讨论

在正常情况下, 肠道菌群和宿主处于相对平衡状态, 一旦平衡被破坏, 肠道菌群就会失调, 宿主体内的物质代谢也会发生改变。据报道, 肠道菌群失调已成为肿瘤、糖尿病、肥胖症等疾病的重要临床特征^[6], 由于病理状态的多样性, 导致肠道菌群结构和数量也有显著差异, 故研究药物在病理状态下的代谢情况能更好地反映药物在体内发挥作用的机制, 从而指导临床合理用药, 为相关制剂研发提供新思路。

文献[14]报道, 人参皂苷 R_{g₃}、白头翁皂苷 D 在体内均能被代谢生成次级苷或苷元, 从而发挥抗肝癌作用, 故本实验以人参皂苷 R_{g₃}、白头翁皂苷 D 为对象, 采用 UPLC-Q-TOF/MS、UPLC-QQQ-MS 法比较两者在健康人体和肝癌患者肠道菌群中孵育后代代谢产物和代谢速率的差异。结果发现, 人参皂苷 R_{g₃} 与2种人群肠道菌群共孵育后, 均检测

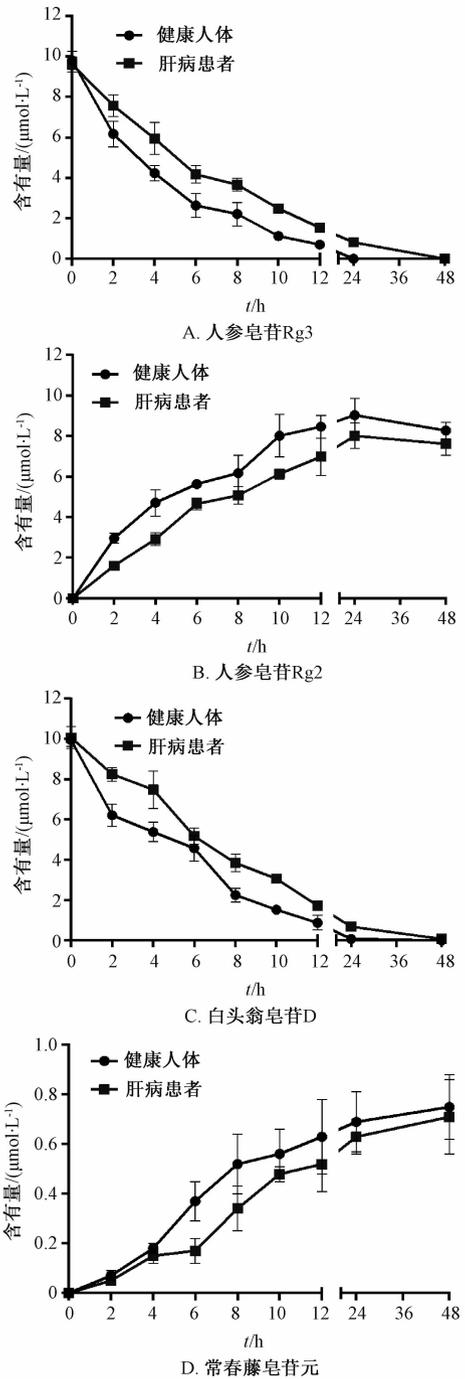


图3 各成分含有量变化曲线

Fig. 3 Curves for content changes of various constituents

到2个代谢产物, 分别为人参皂苷 R_{h₂} (脱糖基产物) 和原人参二醇, 表明对其代谢处置相同, 主要代谢途径均为去糖基; 白头翁皂苷 D 与肝癌患者肠道菌群共孵育后检测到4个代谢产物, 分别为白头翁皂苷 D 脱鼠李糖产物、白头翁皂苷 D 脱葡萄糖产物、常春藤皂苷元、白头翁皂苷 D 羟基化产物, 而与健康人体肠道菌群共孵育后共检测到5个代谢产物, 分别为白头翁皂苷 D 脱鼠李糖产物、

白头翁皂苷 D 脱葡萄糖产物、白头翁皂苷 D 脱鼠李糖和葡萄糖产物、常春藤皂苷元、白头翁皂苷 D 甲基化产物,表明对其代谢处置不同,推测肝癌患者的肠道菌群种类与数量可能发生了变化,但主要代谢途径仍均为去糖基。

通过比较代谢和生成速率可知,人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 在肝癌患者肠道菌群中的代谢速率显著低于在健康人体中,人参皂苷 Rh₂ 和常春藤皂苷元在肝癌患者肠道菌群中生成速率亦然,表明肝癌患者肠道菌群的变化对这 2 种成分的代谢速率有显著影响。

综上所述,本实验通过比较人参皂苷 R_{g3}、白头翁皂苷 D 在健康人体和肝癌患者肠道菌群中的代谢物谱和代谢速率差异,可为不同病理状态下糖苷类成分的代谢研究提供参考,也为同一药物发挥药效的差异性提供新的阐明方法。今后,将对肝癌状态下人体肠道菌群种类和数量的变化作进一步研究。

参考文献:

[1] Ladda B, Theparee T, Chimchang J, *et al.* *In vitro* modulation of tumor necrosis factor α production in THP-1 cells by lactic acid bacteria isolated from healthy human infants [J]. *Anaerobe*, 2015, 33: 109-116.

[2] 梁素妨,许琳,张东生,等. 肠道菌群失调与原发性肝癌的关系研究 [J]. 中国肝脏病杂志 (电子版), 2015, 7 (4): 50-53.

[3] Dapito D H, Mencin A, Gwak G Y, *et al.* Promotion of hepato-

cellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 504-516.

[4] Ruan J Q, Li S, Li Y P, *et al.* The presystemic interplay between gut microbiota and orally administered calycosin-7-O- β -D-glucoside [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43 (10): 1601-1611.

[5] 华琼, 华海清. 人参皂苷 R_{g3} 抗肝癌作用机制的研究进展 [J]. 中医学报, 2012, 27(3): 266-269.

[6] Sun M, Ye Y, Xiao L, *et al.* Anticancer effects of ginsenoside R_{g3} (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (3): 507-518.

[7] 徐坤, 舒展, 王永林, 等. 白头翁皂苷 D 抗肝癌作用的药理学研究 [J]. 中成药, 2014, 36(2): 240-244.

[8] 岳文华, 徐坤, 冯育林, 等. 白头翁皂苷 D 体外抗肝癌作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3295-3301.

[9] 郭跃龙, 钱静, 狄留庆, 等. 人参皂苷 R_{g3} 及人参皂苷 Rh₂ 在肠道菌群失调大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4198-4203.

[10] 康安, 钱静, 单进军, 等. 人参总皂苷主要成分大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3045-3050.

[11] 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.

[12] 季秀美. 白头翁总皂苷碱水解产物的抗肿瘤作用及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.

[13] Aziz F, Wang X Q, Liu J W, *et al.* Ginsenoside R_{g3} induces FUT4-mediated apoptosis in *H. pylori* CagA-treated gastric cancer cells by regulating SP1 and HSF1 expressions [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 31: 158-166.

[14] 祖先鹏, 林璋, 谢海胜, 等. 中药有效成分与肠道菌群相互作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (10): 1766-1772.