

基于肠道菌转化介导的桔梗总皂苷入血代谢产物鉴定研究

吴茜娃¹, 张欣雨¹, 钟渊涵¹, 张雪梅¹, 周瑜², 冯艳¹, 秦倩¹, 张寿文¹,
钟国跃¹, 曾金祥^{1*}

(1. 江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 九江学院生命科学学院, 江西 九江 332005)

摘要: 桔梗总皂苷入血产物的鉴定具有重要意义, 但仍存在很大挑战。本研究采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS), 应用 Compound Discoverer 3.2 与 Trace finder 2.1 软件, 首先从桔梗总皂苷中鉴定出 8 个类型共 44 个原形成分。在此基础上, 以所鉴定的原形成分及其肠道菌转化逐级脱糖产物为分子模板构建肠道菌介导鉴定新方法, 进一步从含药血浆中鉴定出来源于 44 个原形成分的 57 个入血产物。这些入血产物包括 12 个原形成分和 45 个代谢产物, 且血中原形成分同时是其他原形成分的脱糖基代谢产物。本研究表明肠道菌介导新方法可有效鉴定桔梗总皂苷入血产物, 揭示不同含量与口服生物利用度桔梗皂苷原形成分在血中的存在形式, 并可阐明中药原形成分及其代谢产物的一对多与多对一网络。所有动物实验方案均获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (编号: JZLLSC-202100322)。

关键词: 桔梗皂苷; 原形成分; 代谢产物; 肠道菌介导方法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-3141-12

Identify the metabolites of total saponins of Platycodonis Radix in blood based on intestinal bacteria-mediated method

WU Xi-wa¹, ZHANG Xin-yu¹, ZHONG Yuan-han¹, ZHANG Xue-mei¹, ZHOU Yu², FENG Yan¹,
QIN Qian¹, ZHANG Shou-wen¹, ZHONG Guo-yue¹, ZENG Jin-xiang^{1*}

(1. Research Center of Chinese Medicine Resources and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China)

Abstract: The identification of the components absorbed in serum of platycosides in total saponins fraction of Platycodonis Radix is great significance, but there are still great challenges. In this study, 8 types of 44 primordial components from Platycodon saponins were firstly identified using the ultra-performance liquid chromatography-linear ion trap electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) equipped with the software of Compound Discoverer 3.2 and Trace finder 2.1. Then, the platycosides and their deglycosylated metabolites were used as the template molecules to construct the intestinal microbiota mediated method to identify the primary components and the prototypes in serum. As results, 57 components originating from 44 prototypes of platycosides were identified from drug-containing plasma. Those compounds consist of 12 prototypes of platycosides and 45 metabolites, while the prototypes in serum are also deglycosylated metabolites of other platycosides. The results showed that the intestinal microbiota mediated method could be applied to identify the metabolites of platycosides in total saponins fraction of Platycodonis Radix; and reveal the potential existing forms of prototypes of platycosides in plasma; In addition, it could clearly illustrate the one to many and many to one

收稿日期: 2024-04-18; 修回日期: 2024-08-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160736); 江西中医药大学科技创新团队项目 (CXTD22002).

*通讯作者 E-mail: zjx@jxutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0377

network of the prototypes and metabolites of platycosides. All animal protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (No.JZLLSC-202100322).

Key words: platycoside; prototype; metabolite; intestinal microbiota mediated method

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根, 广泛分布于中国、朝鲜、日本、俄罗斯远东地区和西伯利亚东南部^[1], 具有多种药理作用和保健功效, 主要活性部位为桔梗总皂苷^[2,3]。大量研究表明, 桔梗皂苷 D^[4,5]、桔梗皂苷 A^[6]、桔梗皂苷 E^[7]、桔梗皂苷 D₃^[7]和去芹糖桔梗皂苷 D₃^[8]等主要皂苷成分具有较好的镇咳、祛痰、抗炎、抗肿瘤等药理活性^[8], 提示桔梗总皂苷具有很好的现代化新药研究与开发价值。

不过, 这些桔梗总皂苷所含成分口服生物利用度往往较低, 在体内难以直接与靶点结合, 故其代谢物才有可能是体内的显效形式^[9]。但迄今为止, 已鉴定的桔梗总皂苷血中产物仍主要为含量相对较高的原形皂苷成分, 而代谢产物仅 2 到 3 个^[10], 严重制约后续药效物质及作用机制的合理阐释。已有研究表明低口服生物利用度的中药成分进入肠道后, 不可避免与肠道菌作用, 进而被其代谢转化^[11]。课题组前期研究显示, 桔梗皂苷肠道菌转化代谢物的活性高于其原形成分^[12]; 且桔梗皂苷部分原形成分与其代谢产物之间还存在一对多、多对一的网络关系^[13]。但这些研究仍采用体外肠道菌转化方法鉴定代谢产物, 且代谢产物是否可入血液成为潜在显效形式仍不清楚。

基于低口服生物利用度的中药成分进入肠道后, 不可避免与肠道菌作用之特征, 本研究提出了一种肠道菌介导的血清药物化学方法, 用以鉴定桔梗皂苷入血产物: 首先采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术及 Xcalibur 2.1 和 TraceFinder 4.1 软件鉴定桔梗总皂苷原形成分; 然后以原形成分之肠道菌转化逐级脱糖产物为分子模板, 运用 Trace Finder 4.1 及 Compound Discoverer 3.2 软件对桔梗总皂苷入血产物进行靶向鉴定; 最后, 基于代谢产物相同母核反向追踪血中代谢产物的原形成分来源, 并构建原形成分与代谢产物之间的网络关系。本研究结果首次显示, 桔梗总皂苷所有不同口服生物利用度与含量原形皂苷成分均可以在血中产生代谢产物, 且原形成分-代谢产物之间存在一对多与多对一的网络关系。

仪器与材料

仪器 LTQ Orbitrap VELOS Pro 型线性离子阱-静电场轨道阱联用质谱仪, 配备 Ultimate 3000 超高效

液相色谱系统 (美国赛默飞公司); ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm; 美国安捷伦公司); 5430R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); R-210 型旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司); CP214 型电子分析天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); UV-1800 型紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); QL-901 型涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SCIENTZ-10N 冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Milli-Q 水净化系统 (美国 Millipore 公司)。

药物与试剂 桔梗产自内蒙古赤峰牛家营子镇, 经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心慕泽泾副研究员鉴定为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根。桔梗皂苷 D (platycodin D, PD) 纯度 98.66%, 批号 MUST-20051510, 购自成都曼斯特生物科技有限公司。乙腈 (质谱级, 德国 Merck 公司)、甲酸 (色谱级, 上海阿拉丁试剂有限公司); 水为 Milli-Q 超纯水, 其余试剂均为分析纯。

动物 实验动物购自江西中医药大学实验动物科技中心, 许可证号为 SCXK (Gan) 2018-0003。实验动物为雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量为 180~220 g。饲养温度为 21~25 °C, 相对湿度为 50%~60%, 明暗循环 12 h。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准号为 JZLLSC-202100322。

桔梗总皂苷样品的制备 桔梗药材烘干粉碎后过二号筛, 称取 100 g 置于圆底烧瓶, 并加入 70% 乙醇 800 mL 静置过夜, 回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并滤液置于旋转蒸发仪浓缩。残渣加适量蒸馏水加热溶解, 用等量水饱和的正丁醇萃取 3 次, 合并上层萃取液后分别用等量的氨试液和正丁醇饱和的水溶液洗涤, 之后取上清液。将所得上清液回收溶剂后真空冷冻干燥, 所得固体粉末即桔梗总皂苷 (得率为 1.3%), 密封置于 -20 °C 保存。UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 分析时取上述桔梗总皂苷 50 mg 以甲醇溶解, 定容至 25 mL。取适量标准品 PD 以甲醇溶解。样品及标准品均用注射器经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

含药血浆样本的采集 取 6 只 SD 大鼠为给药组, 每只大鼠用桔梗总皂苷灌胃, 给药剂量 1 g kg⁻¹; 单次灌胃后禁食不禁水, 给药 60 min 后对大鼠眼眶取血 0.5 mL, 各鼠血浆样品等体积混匀后, 置于含肝素钠

EP管中, 4 °C以4 000 r·min⁻¹离心5 min取上清液, 即得含药血浆样本, 样本置于-80 °C保存备用。

空白血浆样本的采集 取6只SD大鼠为空白组, 每只大鼠给予相同剂量的生理盐水, 灌胃60 min眼眶取血0.5 mL, 各鼠血浆样品等体积混匀后, 置于含肝素钠EP管中, 4 °C以4 000 r·min⁻¹离心5 min取上清液, 即得空白血浆样本, 样本置于-80 °C保存备用。

血浆样本的处理与分析 取血浆样本于4 °C解冻, 各取100 μL分别置于离心管中, 加3倍量正丁醇沉淀蛋白, 涡旋混合1 min, 将混合物于4 °C以13 000 r·min⁻¹离心10 min后取上清液。然后用N₂气流干燥上清液, 将获得的残渣于200 μL甲醇中复溶, 将溶液涡旋混合1 min, 并于4 °C下以13 000 r·min⁻¹离心10 min取上清液, 以获得用于UHPLC-LTQ-Orbitrap MS分析的最终样品。

色谱条件 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm; 美国安捷伦公司); 流动相为0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)。梯度洗脱条件: 0~30 min, 15%~24% B; 30~45 min, 24% B; 45~62 min, 24%~71% B; 62~67 min, 71%~95% B; 67~67.1 min, 95%~15% B; 67.1~70 min, 15% B; 流速0.3 mL·min⁻¹, 进样量1 μL; 柱温40 °C。

质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 毛细管温度320 °C, 鞘气流速35 arb; 辅助气流速10 arb, 以负离子

模式采集, 喷雾电压-3.5 kV, 毛细管电压为-5 V, 管透镜电压为-110 V, 样品一级质谱采用全扫描模式, 扫描范围 m/z 400~2 000 Da, 检测分辨率30 000, 二级质谱数据采用数据依赖性扫描模式, 选取上一级丰度最高的6个峰进行碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)碎片扫描。

数据分析 采用Xcalibur 2.1软件和TraceFinder 4.1软件对目标物进行筛查, 初步筛选出相关化合物, 结合文献进行药材成分鉴定。采用Compound Discoverer 3.2软件, 以桔梗总皂苷原形成分及其逐级脱糖产物为分子模板对入血成分进行靶向鉴定, 同分异构体成分的保留时间根据ClogP值来确定。由于血浆中噪音较高, 把入血成分鉴定的质量误差容限设置为20 ppm, 信号强度设置为至少超过空白血浆10倍。

结果

1 桔梗总皂苷化学成分鉴定

采用UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术, 对桔梗总皂苷进行定性分析, 样品在负离子模式下的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)见图1, 应用Xcalibur 2.1软件对各成分的保留时间、准分子离子峰和二级碎片进行提取分析, 并结合标准品及相关文献推测其结构, 结果共鉴定出44个桔梗皂苷主要原形成分, 详情见表1^[2,3,6,7,14-25]。

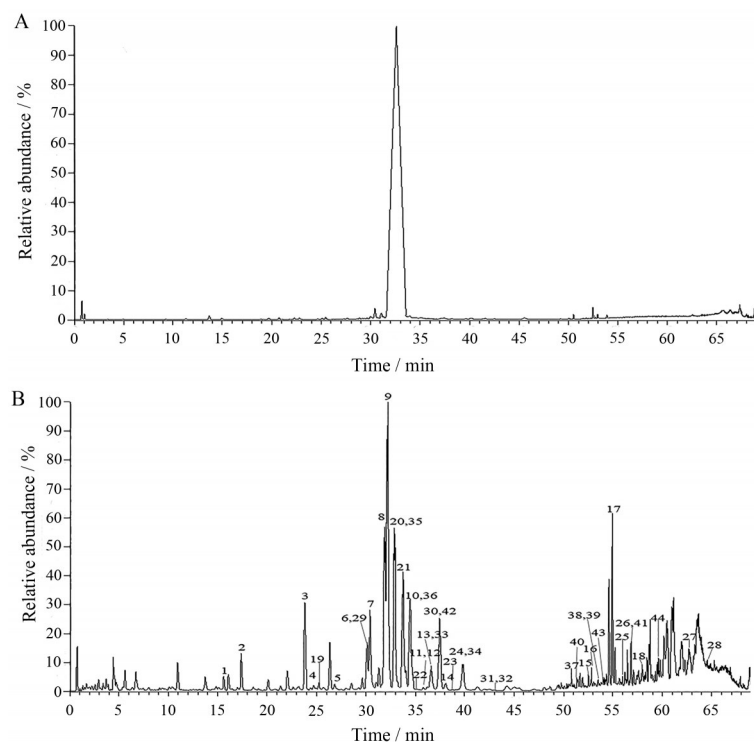


Figure 1 TIC in negative ion mode. A: TIC of PD; B: TIC of total platycosides fraction in Platycodonis Radix; TIC: Total ion chromatogram; PD: Platycodon D

Table 1 Identification of components in platycosides fraction (PF). Ion mode: M-H

No.	Identification	Name	t_R /min	Formula	m/z	Error (ppm)	Fragment ion	Ref.
1	Deapio-platycoside E	AP1	15.62	$C_{64}H_{104}O_{34}$	1 415.630 9	-1.13	1 005.486 3; 843.424 2	[14]
2	Platycoside E	AP2	17.40	$C_{69}H_{112}O_{38}$	1 547.673 8	-0.65	1 005.449 5; 519.320 6	[3]
3	Platycodin D3	AP3	23.85	$C_{63}H_{102}O_{33}$	1 385.619 3	-1.95	843.407 1; 1 253.549 5	[2]
4	3''-O-Acetyl platycodin D3	AP4	24.87	$C_{65}H_{104}O_{34}$	1 427.629 3	-2.24	1 385.582 4; 843.413 1	[15]
5	Platycoside G2	AP5	27.28	$C_{59}H_{96}O_{30}$	1 283.589 6	-0.55	843.362 9; 519.270 3	[16]
6	Deapio-platycodin D2	AP6	30.14	$C_{58}H_{94}O_{29}$	1 253.577 3	-1.92	843.408 5; 681.381 6	[6]
7	Deapio-platycodin D	AP7	30.41	$C_{52}H_{84}O_{24}$	1 091.525 1	-1.65	681.360 3; 519.342 9	[17]
8	Platycodin D2	AP8	31.90	$C_{63}H_{102}O_{33}$	1 385.621 5	-0.37	843.407 1; 1 253.549 5	[18]
9	Platycodin D	AP9	32.23	$C_{57}H_{92}O_{28}$	1 223.565 8	-2.70	681.343 5; 1 091.511 0	[2]
10	Platycoside F	AP10	34.44	$C_{47}H_{76}O_{20}$	959.484 5	-0.10	681.374 2; 797.431 4	[2]
11	Platycodins K	AP11	35.42	$C_{59}H_{92}O_{30}$	1 279.558 2	-0.63	827.463 3; 1 147.544 7	[2]
12	Platycoside B	AP12	35.83	$C_{54}H_{86}O_{25}$	1 133.535 3	-1.85	681.393 5; 1 091.543 8	[18]
13	3-O-β-D-Gentiobiosyl platycodigenin methylester	AP13	36.75	$C_{43}H_{70}O_{17}$	857.456 0	3.62	797.613 4; 858.662 5	[19]
14	2''-O-Acetyl-platycodin D2	AP14	38.08	$C_{65}H_{104}O_{34}$	1 427.630 4	-1.47	1 385.623 3; 843.482 7	[16]
15	Platycoside L	AP15	52.52	$C_{42}H_{68}O_{17}$	843.435 4	-2.25	519.291 1; 681.346 9	[7]
16	Platycoside K	AP16	52.83	$C_{42}H_{68}O_{17}$	843.436 8	-0.59	519.291 3; 681.346 9	[7]
17	3-O-β-D-Glucopyranosyl platycodigenin	AP17	54.96	$C_{36}H_{58}O_{12}$	681.383 8	-1.03	519.295 4	[3]
18	Platycodigenin	AP18	57.93	$C_{30}H_{48}O_7$	519.332 1	0.96	501.136 8	[3]
19	Platycoside D	BP1	25.25	$C_{69}H_{112}O_{37}$	1 531.678 2	-1.11	827.428 4; 665.452 7	[20]
20	Polygalacin D2	BP2	32.88	$C_{63}H_{102}O_{32}$	1 369.626 2	-0.66	827.411 1; 665.394 5	[16]
21	Polygalacin D	BP3	33.74	$C_{57}H_{92}O_{27}$	1 207.573 6	-0.50	1 075.503 1; 665.361 5	[19]
22	3''-O-Acetyl polygalacin D	BP4	35.14	$C_{59}H_{94}O_{28}$	1 249.590 2	4.32	1 207.558 4; 665.376 7	[18]
23	Platycoside J	BP5	38.80	$C_{52}H_{84}O_{23}$	1 075.530 8	-1.12	665.363 0; 503.333 4	[18]
24	2''-O-Acetyl polygalacin D2	BP6	40.03	$C_{65}H_{104}O_{33}$	1 411.634 8	-1.98	1 369.654 7; 827.436 5	[21]
25	3-O-β-D-Laminaribiosyl polygalacic acid	BP7	55.97	$C_{42}H_{68}O_{16}$	827.442 0	-0.48	503.317 4; 665.378 4	[22]
26	3-O-β-D-Glucopyranosyl polygalacic acid	BP8	56.85	$C_{36}H_{58}O_{11}$	665.388 2	-1.95	647.233 6; 503.334 3	[14]
27	Methyl-3-O-β-D-glucopyranosyl polygalaeate	BP9	62.71	$C_{37}H_{60}O_{11}$	679.400 0	-7.66	633.371 3; 661.229 7	[19]
28	Polygalacic acid	BP10	64.50	$C_{30}H_{48}O_6$	503.337 2	-0.99	485.111 5; 503.195 3	[22]
29	Platyconic acid A	CP1	30.01	$C_{57}H_{90}O_{29}$	1 237.546 3	-1.70	827.433 9	[7]
30	Platyconic acid E	CP2	37.52	$C_{58}H_{92}O_{30}$	1 267.556 9	-1.66	1 117.583 2	[23]
31	2''-O-Acetyl platyconic acid A	CP3	43.07	$C_{59}H_{92}O_{30}$	1 279.555 1	-3.05	1 147.577 4; 827.463 3	[2]
32	Platyconic acid C	CP4	43.11	$C_{52}H_{82}O_{25}$	1 105.504 9	-1.09	943.521 9; 695.415 4	[23]
33	Platycoside O	DP1	36.61	$C_{53}H_{84}O_{25}$	1 119.520 6	-1.07	635.333 6; 1 119.178 6	[15]
34	Platyconic acid A methylester	DP2	39.80	$C_{58}H_{84}O_{29}$	1 251.560 4	-2.96	635.330 8; 1 089.517 9	[7]
35	Deapio-platyconic acid A lactone	EP1	33.29	$C_{52}H_{80}O_{24}$	1 087.494 9	-0.64	1 069.565 3	[7]
36	Platyconic acid A lactone	EP2	34.72	$C_{57}H_{88}O_{28}$	1 219.533 9	-3.20	677.324 7; 1 087.651 6	[7]
37	Platycoside M-2	EP3	50.80	$C_{47}H_{72}O_{20}$	955.459 3	6.28	937.188 6; 793.335 6	[24]
38	Platycoside M-1	EP4	53.36	$C_{36}H_{54}O_{12}$	677.353 0	-0.30	659.374 8	[18]
39	Platycogenic acid A lactone	EP5	53.73	$C_{30}H_{44}O_7$	515.301 3	1.94	495.030 2	[7]
40	3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-2β,12α,16α,23α-tetrahydroxyoleanane-28(13)-lactone	FP1	51.19	$C_{43}H_{70}O_{16}$	841.459 0	1.19	679.347 6; 517.300 9	[25]
41	3-O-β-D-Glucopyranosyl-2β,12α,16α,23,24-pentahydroxyoleanane-28(13)-lactone	FP2	56.90	$C_{37}H_{60}O_{12}$	695.397 3	-4.03	533.301 0; 676.848 4	[25]
42	16-oxo-Platycodin D	GP1	37.46	$C_{57}H_{90}O_{28}$	1 221.551 1	-1.97	1 089.470 0; 679.342 2	[7]
43	Platycogenin A	HP1	53.90	$C_{42}H_{68}O_{16}$	827.441 7	-0.85	503.317 4; 665.378 4	[17]
44	Platycogenic acid C	HP2	59.78	$C_{30}H_{48}O_6$	503.335 6	-2.19	485.179 4	[7]

进一步分析桔梗皂苷成分结构类型可知,桔梗总皂苷部位中含有全部8类,总计44个桔梗皂苷成分,其中A类型18个,B类型10个,C类型4个,D类型2个,E类型5个,F类型2个,G类型1个,H类型2个。这些成分中,大部分成分在C-3位及C-28位均含有双糖链。大量研究显示,肠道菌群可产生大量肠道酶,可使桔梗皂苷成分发生脱糖、脱水、羟基化、甲基化、氧化等代谢反应^[9,10]。这些双糖链易于被肠道菌转化之特征,无疑

使低口服生物利用度的桔梗皂苷原形成分难以被直接吸收入血而被检出。

2 桔梗总皂苷入血产物鉴定

有研究显示,桔梗皂苷成分的双糖链可经肠道菌转化发生脱糖反应^[9,10]。这提示,以桔梗皂苷成分逐级脱糖产物为分子模板,可基于I相与II相代谢产物规律靶向鉴定其血中代谢产物。基于此,采用UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术,进一步获取了SD大鼠灌胃桔梗总

皂苷前、后血浆中成分的特IC图,结果见图2。应用Xcalibur 2.1、TraceFinder 4.1及Compound Discoverer 3.2软件,结合桔梗总皂苷TIC色谱图成分保留时间和相关文献,对桔梗总皂苷入血产物进行了鉴定。结果共鉴定出57个桔梗总皂苷入血产物,各成分的保留时间、准分子离子峰和二级碎片及鉴定结果见图2、表2。表内产物名称中,A~H表示化合物结构类别,P表示原形成分,M表示代谢产物,各产物依次编号。

由表2可知,57个入血成分中,仅包含12个原形成分,但包含45个肠道菌转化代谢产物,且其代谢途径主要为甲基化、羟化反应、脱羟反应I相代谢反应。这说明,以肠道菌转化产物逐级脱糖产物为分子模板,显著提高了桔梗总皂苷血中代谢产物的鉴定能力。

3 桔梗皂苷代谢产物之原形成分的逆向追踪

阐明代谢产物的原形成分来源,可有效说明桔梗皂苷原形成分在血中的潜在形式,并说明其与口服生物利用度与含量的潜在关系,进而为揭示原形成分的起效机制提供重要依据。已有研究显示,桔梗皂苷成分的双糖链可经肠道菌转化发生脱糖反应,而基于代谢产物的相同母核可反向追溯其潜在原形^[9,15]。本研究基于相同母核反向追溯了代谢产物的原形成分,结果见图3~6,图中蓝色标记为成分结构分类特征基团,A~H代表不同的化合物类型,P表示原形桔梗皂

苷,M表示代谢产物,红色标记为原形桔梗皂苷,绿色标记为代谢产物,双色标记表示其同时为原形与代谢产物,黑色标记表示它们为过渡态分子模板探针。

3.1 A型桔梗皂苷及其代谢产物的原形成分反向追踪

结果 A型桔梗皂苷成分在C-4位连接2个羟甲基。如图3所示,5个A型代谢产物可反向追踪至全部18个A型原形成分。从代谢路径看,其主要由18个原形成分在肠道菌作用下发生多步脱糖、甲基化、乙酰化、羟甲基化及脱氢等转化反应所致,并形成AP2、AP5、AP11及AP14等主要转化路径。且由转化路径可知,AP7~10及AP17、AP18等6个血中成分既是原形成分,也是代谢产物。另外,进入血中的原形成分AP7~10虽然口服生物利用度很低,但因含量相对较高而可直接入血;另2个原形成分AP17、AP18虽然含量相对较低,但口服生物利用度高,也可在血中被检测到;其他低含量低口服生物利用度的原形成分则难以在血中被检测到。此外,由图3还可发现,无论成分口服生物利用度及含量高低如何,均可在血中检测到其代谢产物。这说明,A型原形成分在血中的存在形式与肠道菌转化、口服生物利用度及其含量均具有密切相关性,肠道菌介导方法可揭示不同口服生物利用度及含量全部A型原形成分在血中的存在形式及其来源,进而为A型成分活性与作用机制的合理阐释提供充分依据。

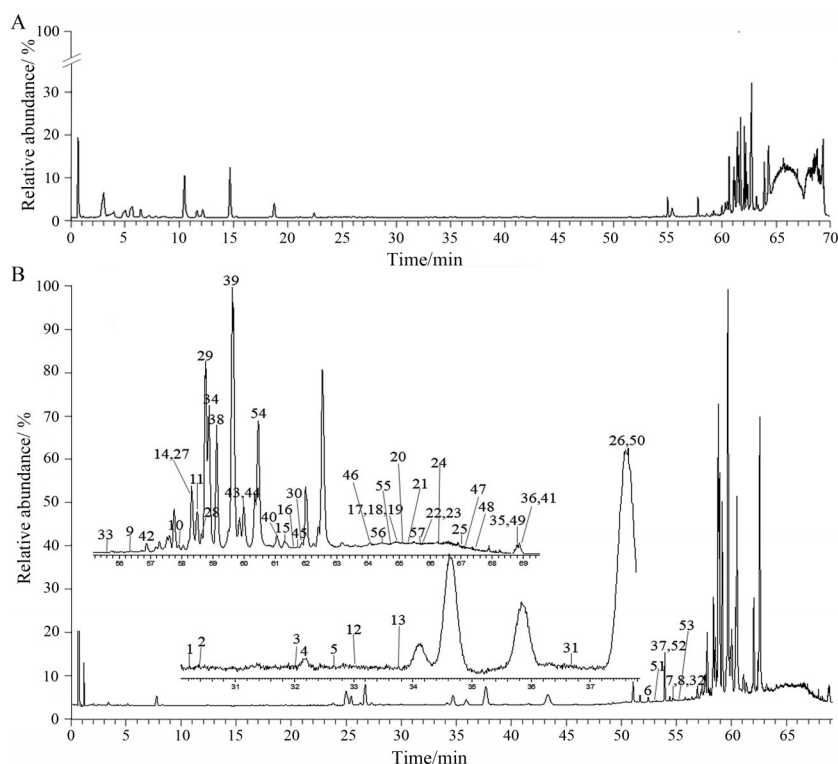


Figure 2 TIC of chemical constituents in the plasma after intragastric administration of PF in rats in negative ion mode. A: TIC of blank blood sample; B: TIC of drug-containing blood sample

Table 2 Identification of metabolites of PF in rat plasma

No.	Identification	Name	Formula	t_R /min	m/z	Error (ppm)	Peak intensity	Fragment ion
1	Deapio-platycodin D2	AP6-M1	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₉	30.20	1 253.586 2	5.19	857	843.473 5; 1 091.610 4
2	Deapio-platycodin D	AP7-M2	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₄	30.40	1 091.526 0	-0.82	2 608	681.323 9; 1 091.467 5
3	Platycodin D2	AP8-M3	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₃	31.96	1 385.619 1	-2.09	2 519	843.450 8; 1 223.914 9
4	Platycodin D	AP9-M4	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	32.16	1 223.565 9	-2.62	13 791	681.411 1; 1 091.693 1
5	Hydroxylated platycoside metabolite	AM5	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₉	32.62	1 239.581 9	14.37	402	-
6	PD-api-xyl-rha dehydrogenated metabolite	AM6	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₆	52.44	811.425 3	17.51	16 640	-
7	PD-glc-api-xyl hydroxylated metabolite	AM7	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₆	54.83	813.418 8	-9.12	29 671	-
8	3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -Glucopyranosyl platycodigenin	AP17-M8	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂	54.98	681.382 8	-2.50	921	-
9	PD-api-xyl-rha methylated metabolite	AM9	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₆	56.26	827.436 5	-7.13	26 141	-
10	Platycodigenin	AP18-M10	C ₃₀ H ₄₈ O ₇	57.88	519.333 5	3.66	6 506	-
11	Platycodigenin dehydrogenated metabolite	AM11	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	58.45	517.316 0	0	18 016	496.991 3; 449.078 3
12	Polygalacin D2	BP2-M1	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₂	32.96	1 369.626 2	-0.66	2 235	827.350 7; 503.441 0
13	Polygalacin D	BP3-M2	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₇	33.75	1 207.578 6	3.65	1 851	665.373 2; 1 207.292 0
14	Polygalacin D-glc-api-xyl dehydroxylated metabolite	BM3	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	58.02	765.453 1	14.51	32 883	-
15	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha	BM4	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₀	61.31	635.375 9	-4.88	39 541	403.283 1; 571.327 5
16	Polygalacin D-api-xyl-rha dehydroxylated metabolite	BM5	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	61.48	781.422 7	-18.18	45 908	-
17	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha-ara dehydrogenated metabolite	BM6	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	64.93	501.321 0	-0.20	11 100	-
18	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha methylated metabolite	BM7	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	64.96	649.388 8	-8.94	27 070	-
19	Polygalacin D-api-xyl-rha acetylated metabolite	BM8	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₆	64.98	839.444 5	2.50	14 119	-
20	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha glucuronicated metabolite	BM9	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₆	65.13	811.410 8	-0.37	13 749	-
21	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha-ara decarboxylated metabolite	BM10	C ₂₉ H ₄₈ O ₄	65.22	459.347 3	1.53	28 030	-
22	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha-ara acetylated metabolite	BM11	C ₃₂ H ₅₀ O ₇	65.67	545.346 4	-1.65	237 331	527.273 4; 501.260 1
23	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha-ara methylated metabolite	BM12	C ₃₁ H ₅₀ O ₆	65.73	517.350 5	-3.68	55 733	-
24	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha-ara hydroxylated metabolite	BM13	C ₃₀ H ₄₈ O ₇	66.22	519.331 8	0.39	12 470	-
25	Polygalacin D-glc-api-xyl-rha dehydrogenated metabolite	BM14	C ₃₅ H ₅₄ O ₁₀	66.94	633.360 9	-3.79	23 734	-
26	Platyconic acid E	CP2-M1	C ₅₈ H ₉₂ O ₃₀	37.53	1 267.555 8	-2.53	1 897	859.463 3; 841.466 0
27	Platyconic acid A-api-xyl-rha-ara	CM2	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₃	58.17	695.350 8	-18.56	136 178	635.296 5; 480.274 2
28	Platyconic acid A-glc-api-xyl-rha	CM3	C ₃₅ H ₅₄ O ₁₂	58.63	665.351 5	-2.56	39 887	-
29	Platyconic acid A-api-xyl-rha-ara hydroxylation metabolite	CM4	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₄	58.82	711.352 6	-8.44	122 922	-
30	Platyconic acid A-glc-api-xyl-rha dehydroxylated metabolite	CM5	C ₃₅ H ₅₄ O ₁₁	61.80	649.351 6	-10.17	10 843	-
31	Platycoside O	DP1-M1	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₅	36.62	1 119.521 0	-0.71	2 468	1 085.304 8; 1 119.383 9
32	Platycoside O-glc-xyl	DM2	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₆	54.87	825.427 7	-0.12	27 787	-
33	Platycoside O-glc-xyl dehydroxylated metabolite	DM3	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₅	55.59	809.435 4	3.09	27 042	-
34	Platycoside O-xyl-rha-ara methylated	DM4	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₃	58.88	723.390 9	-7.19	27 696	-
35	Platycoside O-xyl-rha acetylated metabolite	DM5	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₈	68.85	883.439 6	7.13	5 578	865.475 2; 465.221 0
36	Platycoside O-xyl-rha-ara dehydroxylated metabolite	DM6	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₂	68.91	693.397 5	17.17	29 302	-
37	Platycogenic acid A lactone	EP5-M1	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	53.84	515.304 3	7.77	190 527	279.236 5; 495.045 8
38	Platycoside M1-glc dehydroxylated metabolite	EM2	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	59.12	499.303 3	-4.21	21 565	-
39	Platycoside M1-glc hydroxylated metabolite	EM3	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	59.69	531.303 8	16.20	116 812	-

Continued

No.	Identification	Name	Formula	t_R /min	m/z	Error (ppm)	Peak intensity	Fragment ion
40	Platycoside M1-glc methylated metabolite	EM4	$C_{31}H_{46}O_7$	60.91	529.312 2	-7.18	27 747	-
41	Platycoside M1-glc dehydroxylated metabolite and D-methylated	EM5	$C_{30}H_{44}O_6$	68.94	499.308 8	7.30	73 393	-
42	3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-2 β ,12 α ,16 α ,23 α -tetrahydroxyoleanane-28(13)-lactone (F1) dehydroxylated metabolite	FM1	$C_{43}H_{70}O_{15}$	56.92	825.459 4	-8.12	31 450	-
43	3-O- β -D-Glucopyranosyl-2 β ,12 α ,16 α ,23,24-pentahydroxyoleanane-28(13)-lactone(F2)-glcdehydrogenated metabolite	FM2	$C_{31}H_{48}O_7$	60.09	531.328 8	-5.27	61 396	-
44	F1 methylated metabolite	FM3	$C_{44}H_{72}O_{16}$	60.77	855.476 1	2.81	36 600	-
45	F1-glc methylated metabolite	FM4	$C_{38}H_{62}O_{11}$	61.70	693.415 0	-8.37	49 989	633.346 9; 508.321 8
46	F2-glc methylated metabolite	FM5	$C_{32}H_{52}O_7$	64.15	547.363 0	0.18	49 200	-
47	F1-2glc dehydroxylated metabolite	FM6	$C_{31}H_{50}O_5$	67.04	501.358 2	1.40	17 722	-
48	F1-2glc acetylated metabolite	FM7	$C_{33}H_{52}O_7$	67.43	559.363 5	1.07	48 216	559.280 2; 541.382 6
49	F1-2glc methylated metabolite	FM8	$C_{32}H_{52}O_6$	68.81	531.363 3	-8.85	13 228	-
50	16-oxo-Platycodin D	GP1-M1	$C_{57}H_{90}O_{28}$	37.46	1 221.551 3	-1.80	4 237	469.098 4; 635.470 4
51	16-oxo-Platycodin D-glc-api-xyl methylated metabolite	GM2	$C_{42}H_{66}O_{15}$	53.07	809.434 6	3.46	9 101	-
52	16-oxo-Platycodin D-api-xyl-rha methylated metabolite	GM3	$C_{42}H_{66}O_{16}$	53.83	825.418 3	-10.18	10 027	-
53	16-oxo-Platycodin D-glc-api-xyl methylated and deglycosylated metabolite	GM4	$C_{42}H_{66}O_{15}$	55.04	809.426 0	-7.17	16 453	-
54	16-oxo-Platycodin D-glc-api-xyl-rha-ara decarboxylated metabolite	GM5	$C_{29}H_{46}O_5$	60.21	473.326 4	0.42	55 603	-
55	16-oxo-Platycodin D-glc-api-xyl-rha-ara acetylated metabolite	GM6	$C_{32}H_{48}O_8$	64.70	559.325 7	-1.43	48 881	-
56	Platycogenin A-2glc dehydroxylated metabolite	HM1	$C_{30}H_{48}O_5$	64.54	487.342 1	0.62	11 627	-
57	Platycogenin A-2glc decarboxylated metabolite	HM2	$C_{29}H_{48}O_4$	65.70	459.347 0	0.22	14 265	-

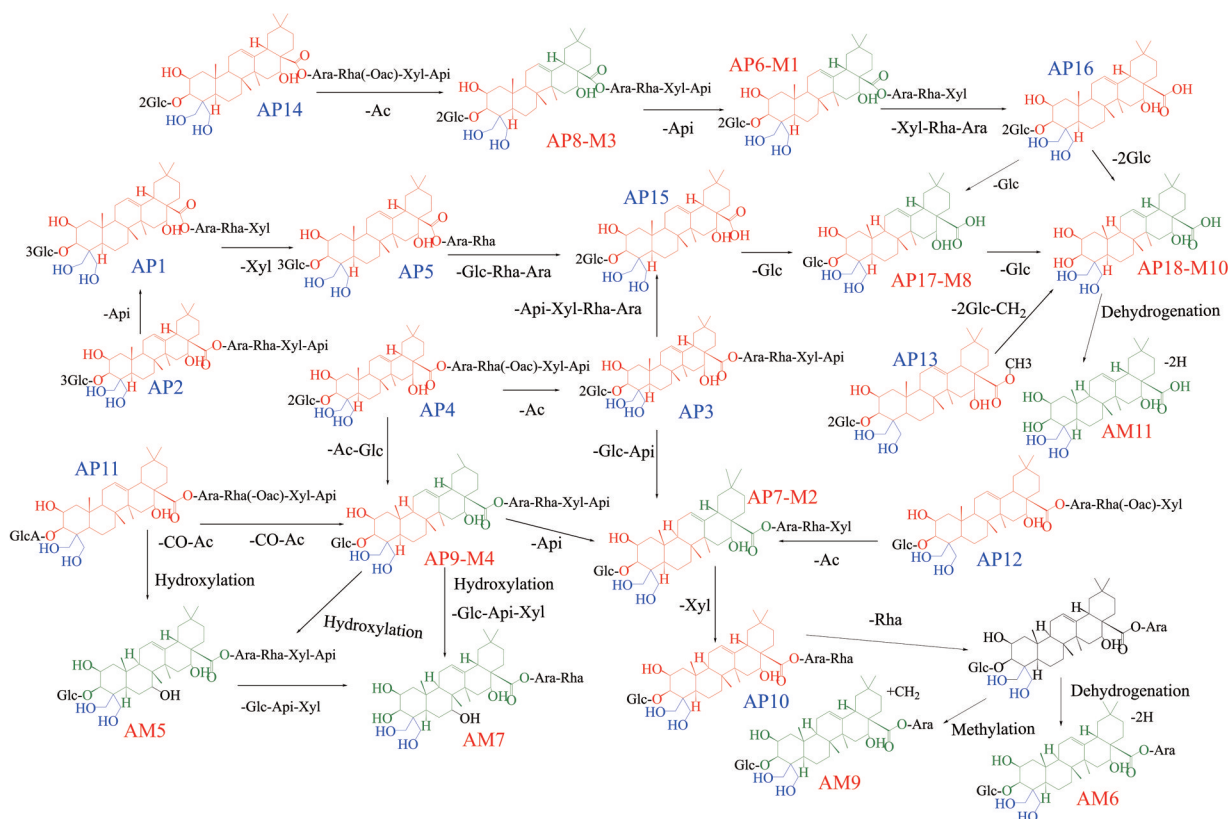


Figure 3 Reverse tracking results of the prototype components of platycosides and their metabolites of type A

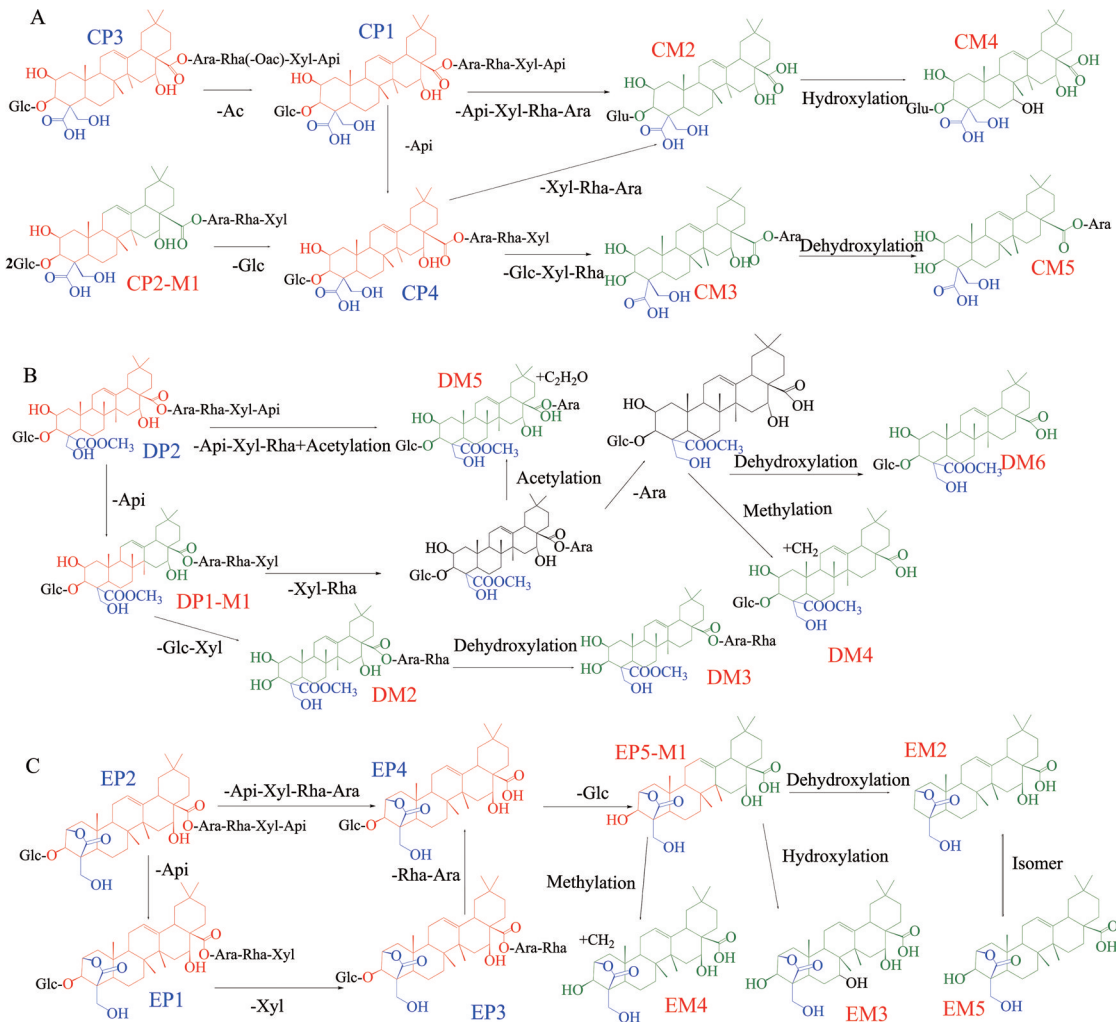


Figure 5 Reverse tracking results of the prototype components of platycosides and their metabolites of type C-E. A: Type C; B: Type D; C: Type E

影响。

3.4 F~H 类型桔梗皂苷及其代谢产物的原形成分反向追踪结果 F~H 型桔梗皂苷原形成分总数相对较少, 但口服生物利用度大多较高, 故也放在一起讨论。

F 型桔梗皂苷成分 C-13 羧基与 C-17 位羟基缩合成酯。如图 6A 所示, 8 个 F 型代谢产物可反向追踪至全部 2 个 F 型原形成分。从代谢路径看, 其主要由 2 个原形成分在肠道菌作用下发生脱糖、脱氢、脱羟、甲基化及乙酰化等转化反应所致。另一方面, 这 2 个原形成分尽管口服生物利用度相对较高, 但结合丰度分析显示其含量相对较低, 故仍难在血中被检测到。

G 型桔梗皂苷成分 C-4 位连接双羟甲基且 C-16 位连接酮基。如图 6B 所示, G 型皂苷原形成分 GP1 除本身可直接入血外, 还可产生其他 5 个代谢产物。其主要由 GP1 经脱糖、乙酰化、甲基化及脱羧等肠道菌转化反应产生所致。另外, 从分子结构及丰度分析, GP1 具

有相对较低的口服生物利用度与较高的含量, 故其仍可直接入血而被检测到。

H 型桔梗皂苷成分 C-4 位连接两个甲基, 且 C-21 位连接羟基或葡萄糖分子。由图 6C 可知, 2 个 H 型代谢产物可反向追踪至全部 2 个 H 型原形成分。从代谢路径看, 2 个代谢产物由原形成分 HP1 经过脱糖转化为另一原形成分 HP2, 之后再发生脱羟、脱羧等肠道菌作用所致。另外, 从分子结构及丰度分析, 虽然这两个 H 型原形成分具有较高的口服生物利用度, 但因含量相对较低, 在血中同样难以检测到其原形成分。

因此, F~H 型皂苷成分的反向追踪结果再次说明, 肠道菌介导方法完全可阐明此 3 类全部原形成分在血中存在的形式及其来源, 且肠道菌介导、口服生物利用度及含量对这 3 类原形成分在血中的存在形式具有重要影响。

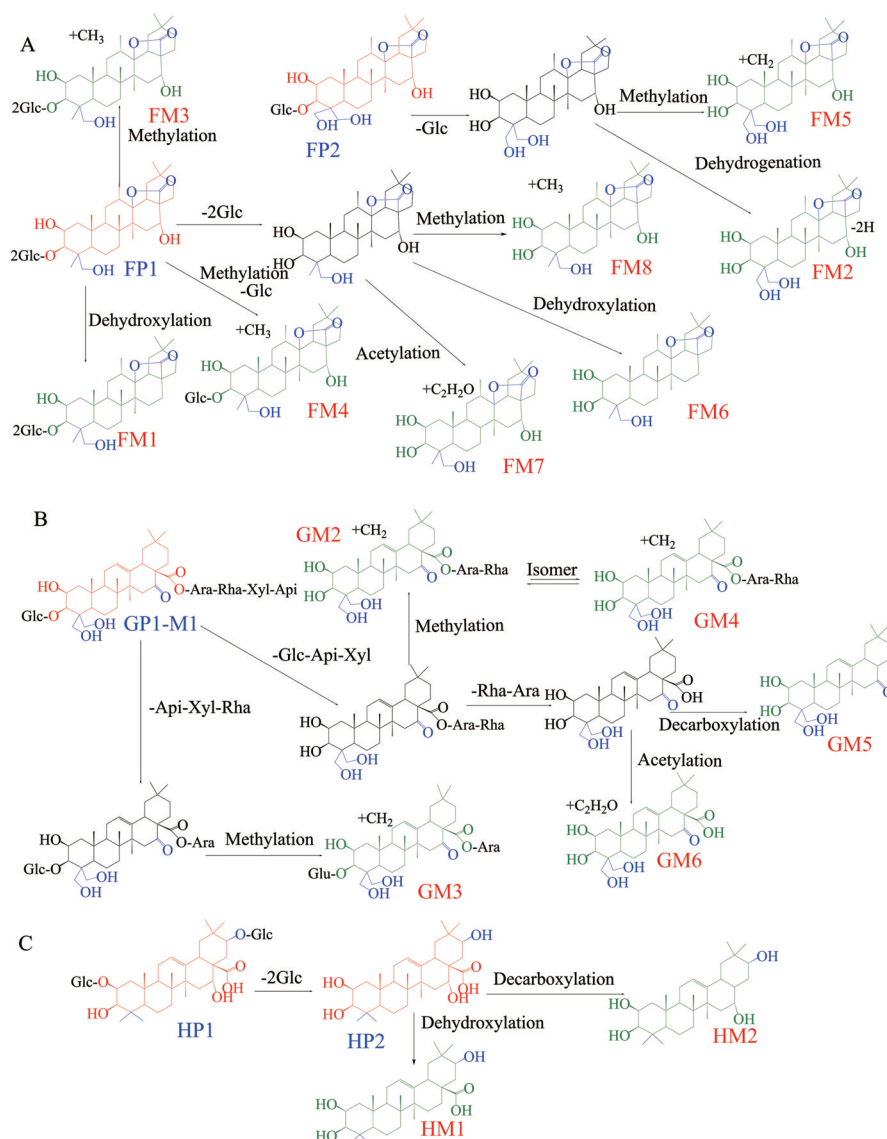


Figure 6 Reverse tracking results of the prototype components of platycosides and their metabolites of type F-H. A: Type F; B: Type G; C: Type H

讨论

桔梗皂苷成分口服生物利用度低,难以被直接吸收入血,且进入血中的原形成分往往难以与体内靶标结合,提示血中代谢产物才可能是其显效形式^[9,15]。但迄今为止,桔梗总皂苷血中成分的鉴定仍主要集中在主要原形成分,代谢产物的鉴定仅为2到3个^[3,10],极大制约其药效物质及作用机制阐释。本文基于UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术,首先采用Xcalibur 2.1软件和TraceFinder 4.1软件对原形成分进行鉴定。然后基于肠道菌介导方法,采用Compound Discoverer 3.2软件设定以桔梗总皂苷原形成分及其逐级脱糖产物为分子模板基于I相及II相代谢反应对入血产物进行靶向鉴定。结果除鉴定出12种原形成分外,还鉴定出了45种代谢产物。这说明肠道菌介导方法极大地提高了桔梗

皂苷血中产物的鉴定效率,为桔梗药效物质阐释提供了重要物质基础。

另一方面,原形成分与代谢产物之间一对多、多对一的网络关系是中药最具特色的作用机制。本研究先对桔梗总皂苷原形成分进行鉴定,再以其肠道菌转化逐级脱糖基产物为分子模板,鉴定血中代谢产物;并进一步基于相同母核反向追踪了其潜在原形,进而成功构建了8类44个桔梗皂苷原形成分与45个代谢产物之间的一对多、多对一网络关系。大量研究已经表明,桔梗皂苷成分的双糖链可在肠道菌转化作用下逐步水解形成脱糖基产物;且可进一步发生羟基化、加氧、脱氢、甲基化等肠道菌转化反应。因此,桔梗皂苷成分长双糖链经脱糖再进一步转化形成其他原形成分再生成I相及II相代谢产物具有严密的逻辑性,基于此逻辑构

建原形成分与代谢产物之间的网络关系是合理的。显然, 这些网络为揭示低口服生物利用度桔梗皂苷原形成分通过其代谢产物产生的潜在药效叠加作用提供了重要依据。同时, 这也提示经过酸、碱、酶及肠道菌群等水解桔梗总皂苷成分后, 再使用微乳与自微乳、脂质体以及纳米粒等新型药物传递系统无疑可大大提高其成分的口服生物利用, 进而为基于桔梗总皂苷的新型高口服生物利用度新药的开发提供了新的思路。

此外, 这些血中产物同时也显示: 不仅低口服生物利用度原形成分可产生入血代谢产物, 高口服生物利用度原形成分如H类皂苷成分HP1、HP2以及A类成分AP18也可以产生入血代谢产物; 同时, 血中原形成分主要为高含量的低口服生物利用度成分, 且其同时还是其他桔梗皂苷原形成分的脱糖基代谢产物; 低含量的桔梗皂苷原形成分则不论口服生物利用度如何, 均可被肠道菌转化产生入血代谢产物。这说明, 桔梗皂苷原形成分在血中的存在形式不仅与桔梗总皂苷原形成分的口服生物利用度相关, 还与其含量密切相关。这一发现为认识中药药效物质提供了全新视角。

总之, 本文基于肠道菌介导的血清药物化学方法, 鉴定了桔梗总皂苷在血中的代谢产物, 揭示了桔梗皂苷原形成分血中存在形式与原形成分口服生物利用度及含量的潜在关系, 说明了原形成分与其代谢产物一对多、多对一的网络关系。其结果提示不同口服生物利用度及含量桔梗皂苷原形成分均有可能通过其血中代谢产物发挥潜在药效, 可为准确阐释桔梗总皂苷药效物质提供重要参考依据。

作者贡献: 吴茜娃和曾金祥构思并设计了实验, 吴茜娃、张欣雨、钟渊涵、张雪梅、冯艳进行论文整体实验和数据分析, 周瑜、秦倩、张寿文、钟国跃协助实验开展与数据分析, 吴茜娃、张欣雨与曾金祥撰写并修改了论文。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang S, Chai X, Hou G, et al. *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.: a review of phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154422.
- [2] Huang W, Zhou H, Yuan M, et al. Comprehensive characterization of the chemical constituents in *Platycodon grandiflorum* by an integrated liquid chromatography-mass spectrometry strategy [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1654: 462477.
- [3] Yau LF, Huang H, Tong TT, et al. Characterization of deglycosylated metabolites of platycosides reveals their biotransformation after oral administration [J]. *Food Chem*, 2022, 393: 133383.
- [4] Lee SK, ParK KK, Kim HJ, et al. Platycodin D blocks breast cancer-induced bone destruction by inhibiting osteoclastogenesis and the growth of breast cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36: 1809-1820.
- [5] Wang C, Schuller Levis GB, Lee EB, et al. Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 1039-1049.
- [6] Choi JH, Jin SW, Kim HG, et al. Saponins, especially platyconic acid A, from *Platycodon grandiflorum* reduce airway inflammation in ovalbumin-induced mice and PMA-exposed A549 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 1468-1476.
- [7] Lee DY, Choi BR, Lee JW, et al. Simultaneous determination of various platycosides in four *Platycodon grandiflorum* cultivars by UPLC-QTOF/MS [J]. *Appl Biol Chem*, 2019, 62: 47.
- [8] Ryu J, Lee HJ, Park SH, et al. Effects of the root of *Platycodon grandiflorum* on airway mucin hypersecretion *in vivo* and platycodin D (3) and deapi-platycodin on production and secretion of airway mucin *in vitro* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 529-533.
- [9] Zhang C, Wang X, Zhong Y, et al. Active microbial metabolites study on antitussive and expectorant effects and metabolic mechanisms of platycosides fraction of *Platycodonis Radix* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1195: 123171.
- [10] Zhang X, Jiang Z, Zhang L, et al. Identification of prototype compounds and their metabolites in rats serum from Xuefu Zhuyu Decoction by UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 15: 139-150.
- [11] Gong X, Li X, Bo A, et al. The interactions between gut microbiota and bioactive ingredients of traditional Chinese medicines: a review [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104824.
- [12] Ju JH, Lee TE, Lee J, et al. Improved bioactivity of 3-O- β -D-glucopyranosyl platycosides in biotransformed *Platycodon grandiflorum* root extract by pectinase from *Aspergillus aculeatus* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31: 847-854.
- [13] Zhong YH, Liang J, Qin Q, et al. The activities and mechanisms of intestinal microbiota metabolites of TCM herbal ingredients could be illustrated by a strategy integrating spectrum effects, network pharmacology, metabolomics and molecular docking analysis: platycodin D as an example [J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154831.
- [14] Ha YW, Na YC, Ha IJ, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry-based structural analysis of new platycoside metabolites transformed by human intestinal bacteria [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51: 202-209.
- [15] Fu WW, Fu JN, Zhang WM, et al. Platycoside O, a new triterpenoid saponin from the roots of *Platycodon grandiflorum* [J]. *Molecules*, 2011, 16: 4371-4378.
- [16] Na YC, Ha YW, Kim YS, et al. Structural analysis of platycosides in *Platycodi Radix* by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1189: 467-475.

- [17] Ma XQ, Li SM, Chan CL, et al. Influence of sulfur fumigation on glycoside profile in *Platycodonis Radix* (Jiegeng) [J]. *Chin Med*, 2016, 11: 32.
- [18] Deng Y, Ye X, Chen Y, et al. Chemical characteristics of *Platycodon grandiflorum* and its mechanism in lung cancer treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 609825.
- [19] Hiroshi I, Kazou T. Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 1. Structure of prosapogenin [J]. *J Chem Soc*, 1981, 12: 295
- [20] Nikaïdo T, Koike K, Mitsunaga K, et al. Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum* [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 1999, 47: 903-904.
- [21] Yu J, Chang X, Peng H, et al. A strategy based on isocratic and linear gradient high speed counter current chromatography for the comprehensive separation of platycosides from *Platycodonis Radix* [J]. *Anal Methods*, 2021, 13: 477-483.
- [22] Fu W, Hou W, Dou D, et al. Saponins of polygalacic acid type from *Platycodon grandiflorum* [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 2006, 41: 358-360.
- [23] Motonori F, Daigo I, Yasuaki H, et al. Eight new oleanane-type triterpenoid saponins from platycodon root [J]. *Heterocycles*, 2010, 81: 2793-2806.
- [24] Fu WW, Shimizu N, Takeda T, et al. New A-ring lactone triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2006, 54: 1285-1287.
- [25] Zhang L, Liu ZH, Tian JK. Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* [J]. *Molecules*, 2007, 12: 832-841.