

· 药物代谢 ·

## UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 在大鼠肠道菌群中的代谢产物

刘亚丽<sup>1</sup>, 宋永贵<sup>2</sup>, 魏韶锋<sup>1</sup>, 张凌<sup>2</sup>, 杨世林<sup>2</sup>, 王萌<sup>1</sup>, 苏丹<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学科技学院, 南昌 330025;

2. 江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

**[摘要]** 目的:研究大鼠肠道菌群对白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的代谢作用,为皂苷类物质在肠道菌群的代谢特征研究提供参考。方法:以连翘苷为内标物,建立 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 检测条件,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~8 min,10%~95% A; 8~10 min,95% A;10~10.10 min,95%~10% A),流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,扫描方式为电喷雾(ESI)负离子模式,离子喷雾电压-3 500 V,碰撞电压 130 V,干燥气流量 12 L·min<sup>-1</sup>,温度 350 ℃,鞘气流量 12 L·min<sup>-1</sup>,温度 350 ℃,碎裂电压分别为 20, 35,50 V。总离子流全扫描的范围 *m/z* 100~1 100。采用负离子和多反应离子监测模式分析白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 与大鼠肠道菌群共孵育后的代谢产物。结果:从药物-菌群孵育液中鉴定出白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的 3-位侧链脱糖代谢产物及苷元母核上羟化、羧化和脱羧、甲基化和去甲基化代谢产物共 8 种。结论:大鼠肠道菌群在实验条件下能有效代谢白头翁皂苷 B<sub>3</sub>,提示上述代谢产物是其生物活性成分。

**[关键词]** 白头翁皂苷 B<sub>3</sub>; 肠道菌群; 羟化; 连翘苷; 白头翁

**[中图分类号]** R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0072-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230072

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1415.042.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-22 14:15

## Metabolites Analysis of Pulchinenoside B<sub>3</sub> in Rat Intestinal Flora by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

LIU Ya-li<sup>1</sup>, SONG Yong-gui<sup>2</sup>, WEI Shao-feng<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>2</sup>, YANG Shi-lin<sup>2</sup>, WANG Meng<sup>1</sup>, SU Dan<sup>2\*</sup>

(1. Science and Technology College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330025, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate metabolism of rat intestinal flora on pulchinenoside B<sub>3</sub>, so as to provide scientific basis for metabolism characteristic analysis of saponins in intestinal flora. **Method:** With phillyrin as internal standard, UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS with negative ion and multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied to analyze metabolites of pulchinenoside B<sub>3</sub> in rat intestinal flora. **Result:** Pulchinenoside B<sub>3</sub> prototype and other eight metabolites were detected in rat intestinal flora. Various types of metabolitic reactions happen to pulchinenoside B<sub>3</sub> in intestinal flora, including 3-side chain sugar-remove, hydroxylation, methylation, and methoxylation on the mother nucleus of aglycone. **Conclusion:** Pulchinenoside B<sub>3</sub> can be effective metabolism by rat intestinal flora under these experimental conditions, which shows these eight metabolites are active ingredients of pulchinenoside B<sub>3</sub>.

**[Key words]** pulchinenoside B<sub>3</sub>; intestinal flora; hydroxylation; phillyrin; Pulsatillae Radix

**[收稿日期]** 20150528(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81460594);江西省自然科学基金项目(20151BAB215038);江西省教育厅科技计划项目(GJJ13583);江西中医药大学博士启动基金项目(2010BS2037,2014BS019)

**[第一作者]** 刘亚丽,博士,讲师,从事中药药物代谢和新药开发研究,Tel:18007092727,E-mail:582685133@qq.com

**[通讯作者]** \*苏丹,博士,副教授,硕士生导师,从事药用植物有效成分和新药开发研究,Tel:13177859011,E-mail:Sud94@aliyun.com

白头翁具有清热解毒、凉血止痢的功效<sup>[1]</sup>。研究表明白头翁具有抗肿瘤作用<sup>[2-3]</sup>。白头翁水提物可抑制大鼠 S180 细胞, HepA 肝癌细胞和 Lewis 肺癌细胞中肿瘤细胞的数量<sup>[4]</sup>, 而其醇提物可减少 7721, HeLa, MKN-45, BGC-823, SW-116, LoVo, CaEs-17 细胞<sup>[5]</sup>的增殖。课题组研究还发现白头翁皂苷活性成分在裸鼠肿瘤模型中具有抗肿瘤活性<sup>[4]</sup>。

皂苷类是常见的一类生物活性物质, 近年来受到国内外学者的关注<sup>[6-7]</sup>。课题组前期对白头翁总皂苷进行分离、鉴定和构效关系的研究, 结果表明齐墩果烷母核的白头翁皂苷为其主要活性成分。化合物常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-[α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)]-α-L-吡喃阿拉伯糖(课题组命名为白头翁皂苷 B<sub>3</sub>) 在白头翁皂苷提取物中含量最高, 为五环三萜类皂苷, 根据所含糖链数量, 归属于单糖链皂苷<sup>[8]</sup>。根据苷元类型, 常春藤皂苷元类皂苷的结构特征见图 1。构效关系表明其抗肿瘤活性与 C-28 位羧酸和 C-3 位侧链有关<sup>[9]</sup>。

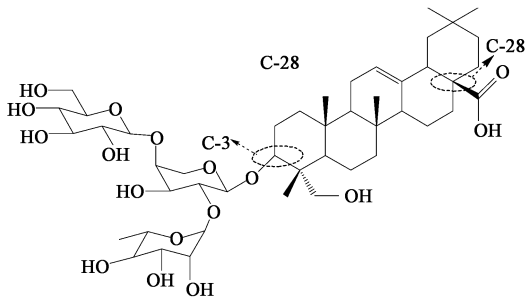


图 1 白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的化学结构

Fig.1 Chemical structures of pulchinenoside B<sub>3</sub>

由于皂苷类物质在体内代谢转化器和酶系的多样性作用下, 其代谢产物在体内的浓度较低, 肠内滞留时间长, 易受到肠道菌群的作用<sup>[10]</sup>。文献研究表明皂苷类成分主要在肠道菌群中被代谢<sup>[11-12]</sup>, 故该类物质多采用体外肠道孵育为典型代谢研究方式。本实验采用离体培养大鼠肠内菌, 与白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 厌氧温孵, 运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析其代谢特征, 并对代谢产物进行结构推断, 为白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的化学结构改造以寻找其他活性药物提供参考。

## 1 材料

1290 型超高压液相色谱(配置 G4410A 型四元液相泵, G1315B 型二极管阵列检测器, G2200A 型自动进样器, G2300B 型自动恒温柱温箱)和 6540 型四级杆-飞行时间串联质谱仪(Q-TOF)均购自美国安捷伦科技公司, DT5-3 型低速台式自动平衡离心机(北京时代北利离心有限公司), AUV2200 型

电子分析天平(日本岛津)。

白头翁(购自苏州一家中药店, 由苏州大学药学院李笑然教授鉴定为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* 的干燥根), 白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 对照品(自制, 批号 2013110205, 纯度 >98%), 连翘苷(内标物, 中国食品药品检定研究院, 批号 ZB2013060523, 纯度 >98%), 水为去离子水, 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠, 体重(200 ± 25) g, 由江西中医药大学动物中心提供, 合格证号 SCXK(赣)2005-0001, 实验前 3 d 饲养于昼夜自然循环的控制环境中, 温度(22 ± 2) °C, 相对湿度(50 ± 20)%。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 厌氧菌培养液 取溶液 A(0.78% 磷酸氢二钾)和溶液 B(0.47% 磷酸氢二钾, 1.18% 氯化钠, 1.2% 硫酸铵, 0.12% 氯化钙, 0.25% 水合氯化镁)各 37.5 mL, L-半胱氨酸·H<sub>2</sub>O 0.5 g, 25% L-抗坏血酸 2 mL, 8% 碳酸钠 50 mL, 牛肉膏 1 g, 蛋白胨 1 g, 加水至 1 L, 调 pH 7.5 ~ 8.0, 即得。

2.1.2 肠道孵育液 大鼠的新鲜粪便与生理盐水按 0.25 g·mL<sup>-1</sup> 混合成悬浊液, 于 4 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 上清液为肠道菌液。取肠道菌液 80 mL, 加至 720 mL 厌氧培养液中, 混匀, 得肠道孵育液。

2.1.3 白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 肠道孵育液 取肠道孵育液 50 mL, 加入白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 约 5.0 mg, 混匀溶解, 溶液分装(1 mL/管), 于 37 °C 厌氧条件下培养 24 h, 即得。

2.1.4 对照品溶液 取白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得 0.250 g·L<sup>-1</sup> 对照品溶液, 置 4 °C 保存。

2.1.5 样品溶液 取上述厌氧培养一定时间后白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 肠道孵育液, 加甲醇 1 mL 终止反应, 漩涡振荡 2 min, N<sub>2</sub> 吹干, 加水 1 mL 复溶, 固相萃取分离, 加水 5 mL 淋洗, 加甲醇 5 mL 洗脱, 收集洗脱液, N<sub>2</sub> 吹干, 加甲醇 0.2 mL 复溶, 漩涡振荡 2 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。同法做空白样品。

### 2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 10% ~ 95% A; 8 ~ 10 min, 95% A; 10 ~ 10.10 min, 95% ~ 10% A), 柱温 30 °C, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 2.0 μL。

2.2.2 质谱条件 扫描方式为电喷雾(ESI)负离

子模式,离子喷雾电压 -3 500 V,碰撞电压 130 V,干燥气流量 12 L·min<sup>-1</sup>,温度 350 ℃,鞘气流量 12 L·min<sup>-1</sup>,温度 350 ℃,碎裂电压分别为 20,35,50 V。总离子流全扫描的范围  $m/z$  100 ~ 1 100。运用 Mass Hunter Analyst 1.2 采集数据和 Agilent Metabolite ID 软件进行数据处理。

**2.3 代谢产物分析** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测大鼠肠道孵育液中白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的代谢产物。与空白孵育液组和空白药物组对照,通过提取离子

流,根据负离子模式准分子离子峰 [M - H]<sup>-</sup>,推测出可能的相对分子质量,结果在大鼠肠内菌培养液中找到 8 种白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的代谢产物。

**2.4 化合物鉴定** 在白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的肠道孵育液中,检测到原型成分白头翁皂苷 B<sub>3</sub> ( $m/z$  911.501 0),代谢产物 M1 ( $m/z$  749.448 2),M2 ( $m/z$  765.443 1),M3 ( $m/z$  603.390 2),M4 ( $m/z$  471.348 0),M5 ( $m/z$  957.497 7),M6 ( $m/z$  971.526 1),M7 ( $m/z$  927.497 9),M8 ( $m/z$  941.513 6)。见表 1 和图 2,3。

表 1 白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 及其代谢产物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

Table 1 Fragment ions of pulchinoside B<sub>3</sub> and its metabolites by UPLC-Q-TOF-MS/MS

代谢产物	$m/z$	分子式	代谢方式	碎片离子 ( $m/z$ )
M0	911.501 0	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	-	947.684 8,911.509 1,879.644 5,825.476 3,765.332 0,112.703 4
M1	749.448 2	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub>	去葡萄糖	基于母核结构
M2	765.443 1	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>13</sub>	去鼠李糖	基于母核结构
M3	603.390 2	C <sub>35</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub>	去葡萄糖 + 去鼠李糖	基于母核结构
M4	471.348 0	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	去葡萄糖 + 去鼠李糖 + 去阿拉伯糖	基于母核结构
M5	957.497 7	C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>19</sub>	双羟基化 + 甲基化/羟基化 + 甲氧基化/羟基化 + 羟甲基化	基于代谢一般规律
M6	971.526 1	C <sub>49</sub> H <sub>80</sub> O <sub>19</sub>	双羟基化 + 双甲基化/双甲氧基化/双羟甲基化	971.526 1,911.527 4,749.352 5,603.328 7,471.521 4,191.329 6,112.045 4
M7	927.497 9	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	羟基化	947.897 8,927.497 9,911.212 1,112.945 4
M8	941.513 6	C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>	羟基化 + 甲基化	941.513 6,911.252 1,896.520 8,112.054 1

**2.4.1 M0** 准分子离子峰 [M - H]<sup>-</sup> 为  $m/z$  911.501 0,对其进行 LC-MS/MS 分析,得主要碎片离子,其中  $m/z$  765.332 0 与白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的准分子离子峰相比减少了 146 Da,为失去 1 个鼠李糖的结果,产物 M0 的色谱行为和质谱数据与白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 对照品的完全一致,可推测为未代谢完全的原型药物,见图 2(a)。

**2.4.2 M1-M4** M1, M2, M3, M4 为白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 原型脱糖代谢的产物,在 Q-TOF-MS<sup>n</sup> 的色谱和质谱图中能找到相应的数据支持,见图 2(b-e)。

**2.4.3 M5** M5 与 M0 相比,增加了 46 Da,综合考虑原型药物结构特点和相似药物体内代谢的规律,推测为白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的常春藤皂苷母核结构上发生 2 次羟基化和 1 次甲基化,或者 1 次羟基化和 1 次甲氧基化,或者 1 次羟基化和 1 次羟甲基化的结果,见图 2(f)。

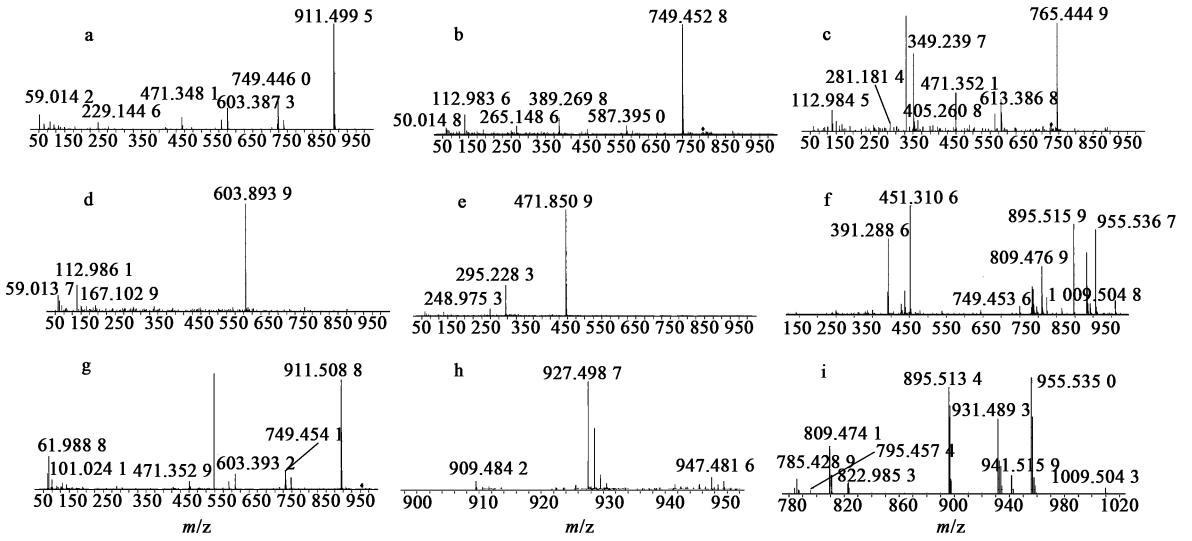
**2.4.4 M6** M6 与 M0 相比,增加 60 Da,推测可能为有 3 种代谢方式为 2 次羟化和 2 次甲基化,或 2 次甲氧基化,或者 2 次羟甲基化,见图 2(g)。

**2.4.5 M7** M7 与 M0 相比,增加 16 Da,恰好与 1 个 O 原子的相对分子质量一致,综合考虑原型药物结构特点和相似药物体内代谢的规律,推测为白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 被羟化的产物,见图 2(h)。虽文献报道 C-7 位是较易引入羟基的位点<sup>[13]</sup>,但本次实验数据并不足以说明该羟基化发生在 C-7,故引入羟基位置不确定。

**2.4.6 M8** M8 与 M0 相比,增加 30 Da,根据皂苷代谢规律,为 1 次羟基化和 1 次甲基化的产物,见图 2(i)。

### 3 讨论

中药皂苷类化合物在体内代谢转化器和酶系的多样性作用下<sup>[14]</sup>,其代谢产物在体内的浓度较低,在肠内滞留时间较长,易受到肠道菌群的作用,影响其代谢转化与机体的吸收利用<sup>[15-16]</sup>。大量研究表明皂苷类成分主要在肠道菌群中被代谢<sup>[17-18]</sup>。皂苷类物质多采用体外肠道孵育为典型代谢研究方式,该方法能在短时间内得到大量代谢产物,迅速解决一些复杂药物代谢研究中的问题,还可以比较方



a. M0; b. M1; c. M2; d. M3; e. M4; f. M5; g. M6; h. M7; i. M8

图 2 白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 及其代谢产物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和裂解机制

Fig. 2 UPLC-MS/MS spectra and pyrolytic mechanism of pulchinoside B<sub>3</sub> and its metabolites under negative model with ESI source

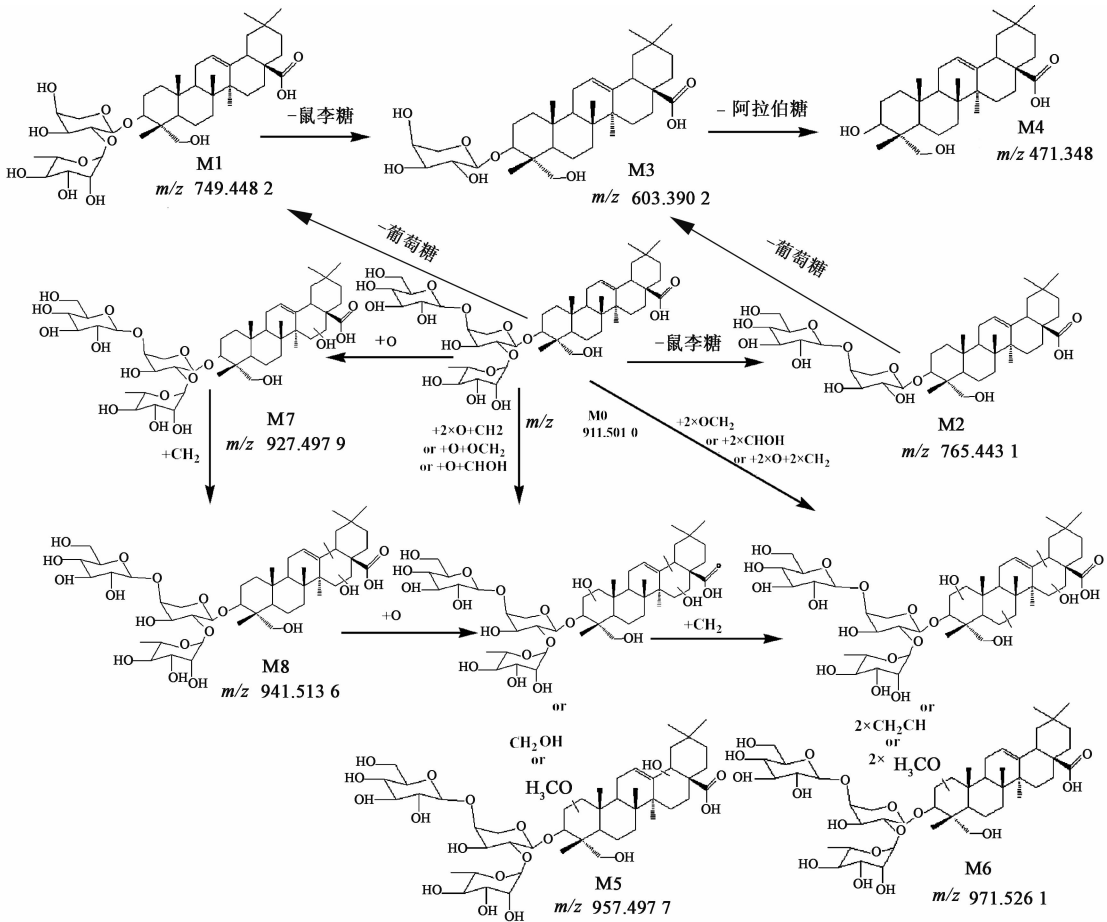


图 3 白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 的代谢途径

Fig. 3 Potential metabolic pathway of pulchinoside B<sub>3</sub>

便地控制某些代谢条件,代谢体系比较纯洁,易于对代谢物进行分离、提取,尽快确定药物代谢途径和代谢结构变化情况,尤其在代谢物结构鉴定方面具有较大的优势<sup>[19]</sup>。研究中药肠道代谢可以促进对中药复杂体系在体内代谢途径的理解,为中药现代制剂的开发奠定基础,为阐明中药复方的配伍规律,认识中药及其复方制剂的药效物质基础提供参考。

前期对白头翁皂苷类成分的肠道菌群降解进行了研究,发现肠道菌群是白头翁皂苷原型化合物发生代谢的重要因素<sup>[20]</sup>。实验采用体外温孵法研究白头翁皂苷在模拟体内环境中的代谢情况,表明白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 在酶系的作用下主要发生 3-位侧链脱糖代谢,苷元母核上羟化、甲基化、羟甲基化和甲氧基化等代谢反应。其中,3-位侧链脱糖基化是白头翁皂苷 B<sub>3</sub> 在体内的显著代谢途径之一,这与课题组前期对齐墩果烷类皂苷的构效关系研究结果相吻合,即 C-3 位侧链是抗肿瘤活性的必需基团之一,脱糖基化代谢路径正是发生在这个位点,以上结果提示这类代谢产物可能是白头翁皂苷的生物活性成分,是其生物利用度低的前提下抗肿瘤疗效确切的潜在原因。这与文献报道的其他三萜皂苷类成分经由肠道菌群、生物酶系转化为苷元而产生生物活性<sup>[21]</sup>相一致。本实验可为科学地认识白头翁的药效物质基础、临床应用及作用机制提供参考,但还需进一步开展相关研究加以证实。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:96.

[2] Zheng Y T, Zhou F, Wu X L, et al. 23-Hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3):615-622.

[3] Shu Z, Chen Z, Ding X J, et al. Three new triterpenoids from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel and their cytotoxic activities [J]. *Heterocycles*, 2011, 83(10):2365-2371.

[4] Xu Q M, Shu Z, He W J, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3/4):293-300.

[5] Sun J, Liu B R, Hu W J, et al. *In vitro* anticancer activity of aqueous extracts and ethanol extracts of fifteen traditional Chinese medicines on human digestive tumor

cell lines[J]. *Phytother Res*, 2007, 21(11):1102-1104.

[6] Yan F L, Wang A X, Jia Z J. Pentacyclic triterpenoids from *Aster ageratoides* var. *pilosus* [J]. *Pharmaize*, 2004, 59(11):882-884.

[7] 孙婧. 几种齐墩果烷型三萜皂苷的合成及其生物活性研究[D]. 西安:西北大学,2010.

[8] Güçlü-stünda Ö, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2007, 47(3):231-258.

[9] Bang S C, Lee J H, Song G Y, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship[J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(11):1451-1454.

[10] 程晓华,熊玉卿. 五环三萜皂苷的药代动力学研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2008, 24(5):443-445.

[11] 张怡红. 离体培养的肠道菌群对黄山药总皂苷的代谢研究[D]. 广州:广东药学院,2008.

[12] 张钰哲. 离体大鼠肠内菌群对知母甾体皂苷代谢研究[J]. *大理学院学报*, 2012, 11(3):5-8.

[13] 岳文鹏. 肠道菌群转化对白头翁主要成分及药效的影响[D]. 贵阳:贵阳中医学院,2013.

[14] 程晓华,熊玉卿. 五环三萜皂苷的药代动力学研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2008, 24(5):443-446.

[15] 肖娟,王莹,王宏新,等. 中药化学成分肠道菌群代谢的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(5):247-251.

[16] 陈新梅. 大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的代谢转化研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11):210-212.

[17] 赵雷,陈昕,陈晓. 肠内菌群对人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的代谢特点[J]. *长春中医学院学报*, 2004, 20(1):45-46.

[18] 陈昕,周秋丽,王本祥. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的肠内菌代谢[J]. *药学学报*, 1999, 34(6):410-414.

[19] Ha Y W, Na Y C, Ha I J, 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(1):202-209.

[20] 刘亚丽,宋永贵,关志宇,等. 白头翁皂苷类成分的肠道菌群降解动力学[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(8):1-4.

[21] Han M, Sha X, Wu Y, et al. Oral absorption of ginsenoside Rb1 using *in vitro* and *in vivo* models[J]. *Planta Med*, 2006, 72(5):398-404.

[责任编辑 刘德文]