

UPLC-Q-TOF/MS 分析头花蓼提取物在大鼠尿液中的代谢产物

迟明艳, 向文英, 杨武, 孙佳, 廖尚高, 李勇军, 黄勇*
(贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部
工程研究中心, 药学院, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:通过 UPLC-Q-TOF/MS 鉴别大鼠口服头花蓼提取物后尿液中的原型成分及代谢产物,以探索其体内代谢过程及直接作用物质。方法:流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,95%~55% A;10~14 min,55%~5% A;14~15 min,5%~0% A;15~16 min,0%~95% A),柱温 45℃,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 2 μL。以电喷雾质谱检测,扫描范围 m/z 50~1 000,在负离子模式下扫描,通过比较空白尿液、给药尿液和两者的差异图谱确认灌胃后大鼠尿液中原型成分及其代谢产物。利用 TOF/MS 得到的准确相对分子质量,对尿液中头花蓼原型成分及代谢物进行鉴别。结果:鉴别出尿液中 3 个原型成分及 15 个代谢产物,推测头花蓼直接作用物质可能为原儿茶酸、槲皮素和没食子酸,或其经肝脏代谢的产物。结论:该方法可靠、有效,可用于口服头花蓼提取物后尿液中化学成分鉴别,为该药材后续的药效物质基础研究提供参考。

[关键词] 头花蓼; 原儿茶酸; 槲皮素; 代谢产物; 代谢途径; 没食子酸

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;O657.7+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0077-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170077

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1132.006.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 11:32

Analysis on Metabolites of *Polygonum capitatum* Extract in Rat Urine by UPLC-Q-TOF/MS

CHI Ming-yan, XIANG Wen-ying, YANG Wu, SUN Jia, LIAO Shang-gao, LI Yong-jun, HUANG Yong*
(School of Pharmacy, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To identify prototype components and metabolites of *Polygonum capitatum* extract in rat urine after oral administration by UHPLC-Q-TOF/MS, and explore its direct acting substances and *in vivo* metabolic process. **Method:** The separation was performed on a RRHD Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase of 1% formic acid aqueous solution-0.1% formic acid acetonitrile solution for gradient elution, flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, column temperature was set at 45℃. Using electrospray ionization (ESI) in negative ion mode with scanning range from m/z 50 to 1 000. By comparing chromatograms difference between blank urine and urine of administration, prototype components and metabolites of *P. capitatum* extract were identified. **Result:** Three kinds of prototype constituents and 15 kinds of metabolites were identified in the urine. These direct acting substances were protocatechuic acid, quercetin and gallic acid, or their products of liver metabolism. **Conclusion:** This method is reliable and effective for identifying compounds in urine after oral administration of *P. capitatum* extract, and it can provide a reference for further study on pharmacodynamic material basis of this herb.

[Key words] *Polygonum capitatum*; protocatechuic acid; quercetin; metabolites; metabolic pathway; gallic acid

[收稿日期] 20160118(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260688,81160516);贵州省国际科技合作计划项目(2012-7040);贵州省高等学校创新能力提升计划项目(黔教合协同创新字[2013]04)

[第一作者] 迟明艳, 硕士, 讲师, 从事新药研究与开发, Tel:0851-88416167, E-mail:379876001@qq.com

[通讯作者] *黄勇, 博士, 教授, 从事中药活性成分及新药研发, Tel:0851-88416167, E-mail:jack_568@163.com

头花蓼又名四季红、红酸杆、省丁草等,是贵州省中药现代化重点培育发展的“十大苗药”和“十大中药产业链”品种之一,收载于 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[1]。具有清热解毒、利尿通淋之功效,临床上主要用于治疗肾盂肾炎、尿道感染、跌打损伤、膀胱炎等^[2-4]。目前,已从头花蓼药材中分离出了多种化学成分,其中主要报道了没食子酸、槲皮素、槲皮苷、龙胆酸、原儿茶酸、没食子酸甲酯、木犀草素、儿茶素,水飞蓟宾、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷、胡萝卜苷、没食子酸乙酯等^[5-9]。但未见有对其尿液中成分及代谢成分的鉴别报道。

在本课题组对头花蓼各部位药理筛选实验中,发现头花蓼经水煮、乙醇沉淀、正丁醇萃取后的部位为有效组分,主要为黄酮类及酚酸类化合物^[10]。本实验以头花蓼有效组分为研究对象,采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)对头花蓼在大鼠尿液中成分及相应的代谢产物进行鉴别,探索该药材可能的直接作用物质及其体内代谢过程,为头花蓼的药效物质研究奠定基础。

1 材料

1290 Infinity 型超高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司,包括 1290 Infinity 型二元泵), impact II 型电喷雾四极杆飞行时间质谱仪(ESI-Q-TOF-MS,美国布鲁克·道尔顿公司), Allegra 64R 型低温高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司), MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司), EL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

头花蓼药材(贵州威门药业股份有限公司贵州施秉头花蓼 GAP 种植基地,由贵州医科大学龙庆德副教授鉴定为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* 的干燥全草),没食子酸、原儿茶酸、槲皮苷对照品(贵州省药物制剂重点实验室天然活性产物研究室制备,经 UV, IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 确证结构,经 HPLC 在多个波长检测,峰面积归一化纯度均 > 98.0%),头花蓼提取物(自制,批号 20140307),乙腈、甲酸为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,体重(220 ± 20) g,由贵州医科大学动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2002-0001。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备^[10] 取头花蓼药材,加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,滤过后合并滤液,减压浓缩至相对密度 1.05 ~ 1.07 (50 °C),加乙醇至溶液含醇

量达 65%,搅拌均匀,静置 12 h 抽滤,滤液减压回收乙醇并浓缩至相对密度 1.04 ~ 1.06 (50 °C);加 1/2 倍量水饱和的正丁醇提取 3 次,合并正丁醇提取液,减压回收正丁醇,残留物微波真空干燥,得头花蓼提取物,计算收膏率 2.3%。提取物加水超声使溶解,配成 0.2 g·mL⁻¹ 的混悬液,备用。

2.2 色谱条件 RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 95% ~ 55% A; 10 ~ 14 min, 55% ~ 5% A; 14 ~ 15 min, 5% ~ 0% A; 15 ~ 16 min, 0% ~ 95% A),柱温 45 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 2 μL。

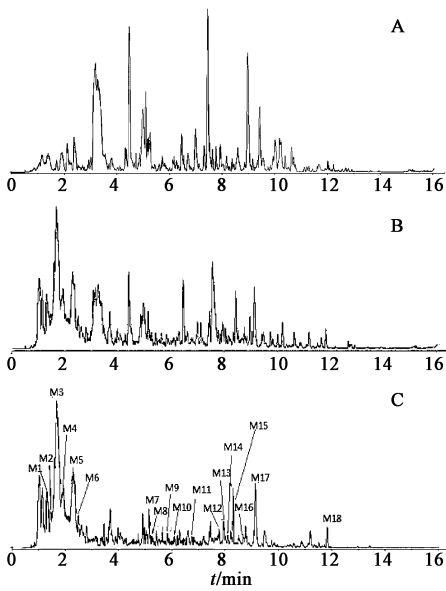
2.3 质谱条件 电喷雾离子源,扫描方式为负离子扫描(ESI⁻, m/z 50 ~ 1 000),毛细管电压 3 kV,锥孔电压 80 V,离子源温度 110 °C,雾化气(N₂)压力 120 kPa,流速 8.0 L·min⁻¹,温度 200 °C,脱溶剂气温度 300 °C,气体体积流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气体积流量 550 L·h⁻¹,准确质量测定采用甲酸钠校正标准液,校正模式选用 enhanced quadratic,数据分析为 Data Analysis 软件, Metabolite ToolsTM 软件及质量亏损过滤(MDF)。

2.4 尿液的收集^[11-14] 选取生长状况相似的健康 SD 大鼠 6 只,雌雄各半,正常饲养 1 周,饲养于代谢笼中,给药前禁食 12 h,自由饮水,收集空白尿样,混合。按剂量 87 g·kg⁻¹ (生药量,剂量选择依据源自预试验)给予头花蓼提取物,连续灌胃给药 3 d,每天 2 次,连续收集 2 ~ 72 h 的尿液。置于 -20 °C 保存,备用。

2.5 尿液样品的处理^[15] 取大鼠尿液 0.5 mL,补加甲醇 4 mL,涡混震荡 2 min,超声 5 min,于 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液于氮气吹干,温度 37 °C,吹干的样品中加入甲醇 1 mL,按上述处理方法二次沉淀蛋白,加入 50% 甲醇 300 μL 溶解残留物, UPLC-Q-TOF/MS 进样分析。

2.6 头花蓼提取物尿液中成分及代谢产物的鉴别
运用 Metabolite ToolsTM 将 UPLC-Q-TOF/MS 采集的图谱进行处理,得到生物样品和空白样品的差异图谱,见图 1。结合已知对照品确定尿液中原型成分。利用 Metabolite Predict 对头花蓼有效组分中多个原型单体成分进行代谢产物预测,将生成的代谢产物 MassList 导入至 Metabolite Detect 中,差异图谱与 MassList 匹配,得到其可能的代谢产物,推测头花蓼有效组分中各成分在体内可能的代谢途径。

2.7 尿液中原型成分及相关代谢产物鉴定 尿液



a. 空白尿液; b. 给药尿液; c. 空白尿液与含药尿液差异图谱
图 1 头花蓼提取物在大鼠尿液中的代谢产物总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of metabolites of *Polygonum capitatum* extract in rat urine

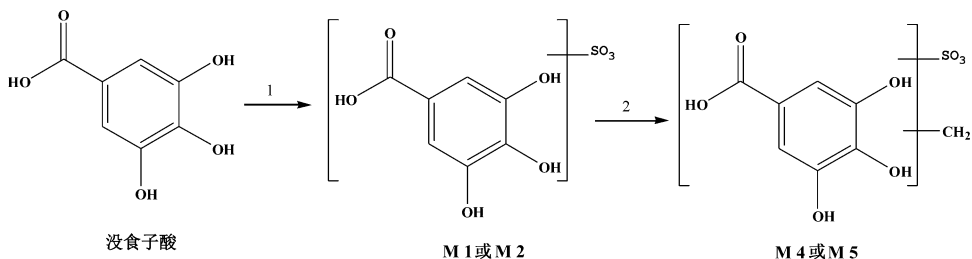
中共鉴别出 3 个头花蓼原型成分, 见表 1。根据头花蓼尿液中成分的结构特征及药物在体内主要发生的代谢反应, 发现头花蓼在大鼠尿液中的 15 个主要代谢产物, 见表 2。

表 1 头花蓼提取物入尿成分

No.	t_R /min	m/z ($[M-H]^-$)	化合物
M6	2.5	153.019 2	原儿茶酸
M10	6.1	447.093 7	槲皮苷
M13	8.0	301.035 1	槲皮素

2.8 尿液中头花蓼提取物可能的代谢途径^[16-19]

根据尿液中 15 个代谢产物及头花蓼提取物中化学结构, 推测尿液样品中以酚酸类成分的硫酸化反应、甲基化反应为主, 还存在以槲皮素为主发生葡萄糖醛酸化反应, 见表 2 和图 2~4。尿液中主要成分为原儿茶酸、槲皮素及其代谢产物和没食子酸代谢物, 说明头花蓼直接作用物质可能为原儿茶酸、槲皮素



1. 硫酸化; 2. 甲基化

图 3 头花蓼提取物没食子酸在尿液中的主要代谢产物及可能的代谢途径

Fig. 3 Major metabolites and possible metabolic pathways of gallic acid in urine

表 2 头花蓼提取物在尿液中的主要代谢产物

Table 2 Major metabolites of *Polygonum capitatum* extract in rat urine

No.	t_R /min	m/z ($[M-H]^-$)	化学式	代谢产物
M1	1.3	248.970 2	$C_7H_5O_8S$	没食子酸硫酸化
M2	1.5	248.969 4	$C_7H_5O_8S$	没食子酸硫酸化
M3	1.7	232.975 6	$C_7H_5O_7S$	原儿茶酸硫酸化
M4	1.9	262.985 8	$C_8H_7O_8S$	没食子酸甲基硫酸化
M5	2.2	262.986 0	$C_8H_7O_8S$	没食子酸甲基硫酸化
M7	5.1	461.184 6	$C_{15}H_9O_{13}S_2$	槲皮素双硫酸化
M8	5.4	477.067 5	$C_{21}H_{17}O_{13}$	槲皮素葡萄糖醛酸化
M9	5.8	491.189 8	$C_{22}H_{19}O_{13}$	槲皮素甲基葡萄糖醛酸化
M11	6.7	505.098 0	$C_{23}H_{21}O_{13}$	槲皮素二甲基葡萄糖醛酸化
M12	7.8	519.078 6	$C_{24}H_{23}O_{13}$	槲皮素三甲基葡萄糖醛酸化
M14	8.1	519.077 9	$C_{24}H_{23}O_{13}$	槲皮素三甲基葡萄糖醛酸化
M15	8.2	505.096 6	$C_{23}H_{21}O_{13}$	槲皮素二甲基葡萄糖醛酸化
M16	8.7	519.077 1	$C_{24}H_{23}O_{13}$	槲皮素三甲基葡萄糖醛酸化
M17	9.1	329.066 4	$C_{17}H_{13}O_7$	槲皮素二甲基化
M18	11.8	343.082 2	$C_{18}H_{15}O_7$	槲皮素三甲基化

和没食子酸, 或其经肝脏代谢的产物。

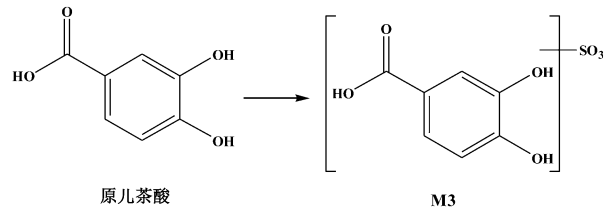
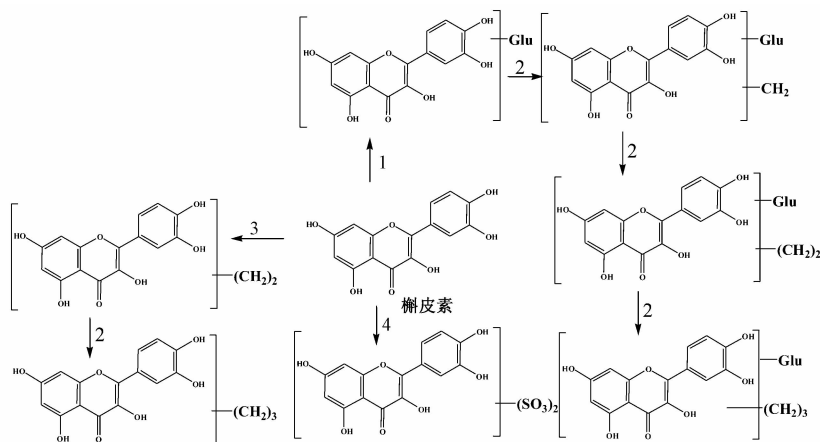


图 2 头花蓼提取物中原儿茶酸在尿液中的主要代谢产物及可能的代谢途径(硫酸化)

Fig. 2 Major metabolites and possible metabolic pathways of protocatechuic acid in urine (sulfation)

3 讨论

本研究连续收集大鼠给药后 2~72 h 的尿液, 分析头花蓼提取物在大鼠体内的生物转化规律, 此法能全面反映头花蓼在大鼠体内的整个代谢过程^[11-14]。实验中分别采用正模式、负模式对样品进行检测, 结果发现生物样品在负模式下各色谱峰响应较好, 这可能与所检测到的色谱峰中含有多个羟基, 且大量代谢物色谱峰中连有葡萄糖醛酸基团、硫



1. 葡萄糖醛酸化; 2. 甲基化; 3. 二甲甲基化; 4. 二硫酸化

图 4 头花蓼提取物中槲皮素在尿液中的主要代谢产物及可能的代谢途径

Fig. 4 Major metabolites and possible metabolic pathways of quercetin in urine

酸基团等有关。

本研究建立了 UPLC-Q-TOF/MS 分析头花蓼提取物在大鼠尿液中代谢产物的检测方法, 鉴别出尿液中 3 个原型成分及 15 个代谢产物, 推测尿液样品中以酚酸类成分的硫酸化反应、槲皮素甲基葡萄糖醛酸化反应为主, 与文献报道的原儿茶酸、没食子酸和槲皮素的代谢产物一致^[16-19]。头花蓼主要成分的体内代谢过程可进一步通过水解尿液中的 II 相代谢产物及相关药效学实验得以证实。本文通过检测头花蓼提取物中化学成分在尿液中的情况, 为后续的药理学及药效物质基础研究提供参考。

【参考文献】

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 147.

[2] 谢宇, 张丽艳, 梁斌, 等. HPLC 法测定头花蓼及制剂热淋清颗粒中槲皮素的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 984-986.

[3] 杨蓓蓓, 冯茹, 王维聪, 等. HPLC/DAD/MS 法同时测定苗药头花蓼中 3 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1793-1796.

[4] 李艳芳, 夏泉, 许风清, 等. HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12): 15-17.

[5] 卿娟, 张丽艳, 潘文婷, 等. 头花蓼药材薄层色谱指纹图谱研究[J]. 微量元素与健康研究, 2014, 31(2): 62-63.

[6] 王洪平, 曹芳, 杨秀伟. 头花蓼地上部分的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(1): 24-30.

[7] 刘跃, 胡杰, 谢玉敏, 等. UPLC-MRM-MS 法测定头花蓼药材中 7 个指标成分[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 73-76, 88.

[8] 张丽娟, 王永林, 王珍, 等. 头花蓼活性组分化学成分研究[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1425-1428.

[9] 曹芳, 谭辉, 邓先扩. 头花蓼化学成分及其黄酮类化合物含量的研究进展[J]. 黔南民族医学学报, 2012, 25(2): 121-125.

[10] Liao S G, Zhang L J, Sun F, et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Polygonum capitatum* [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 1006-1009.

[11] 袁海建, 陈宜刚, 安益强. 丹酚酸 B 大鼠体内代谢产物及途径分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 93-96.

[12] 董世奇, 樊慧蓉, 李全胜, 等. 甘草苷在大鼠体内的代谢途径研究[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2499-2505.

[13] Theodoridis G, Gika H G, Wilson I D. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics [J]. Trac-trend Anal Chem, 2008, 27(3): 251-260.

[14] 陈莘莘, 赵宁, 徐秀玲, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法分析新乌头碱在大鼠尿液中的代谢产物[J]. 药理学学报, 2010, 45(8): 1043-1047.

[15] 黄勇, 何峰, 郑林, 等. UPLC-ESI-MS/MS 法研究注射用复方荜茇在大鼠体内的排泄[J]. 中成药, 2012, 34(5): 879-883.

[16] 姜璇, 金艺, 袁波, 等. 复方丹参滴丸的体内代谢产物分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(2): 126-131, 142.

[17] Renouf M, Guy P A, Marmet C, et al. Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption; Small intestine and colon are key sites for coffee metabolism [J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54(6): 760-766.

[18] 王立萍, 王新春. 黄酮类化合物的代谢研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 226-229.

[19] 丁雯, 钱大玮, 段金殿, 等. 当归赤芍药对中阿魏酸和没食子酸在大鼠血浆和尿液中的代谢物研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 366-372.

【责任编辑 刘德文】