

· 药物代谢 ·

UPLC-Q-TOF/MS 鉴定芦丁在大鼠体内的代谢产物

伍明江^{1,2}, 吴晓磊^{1,3}, 张德芹^{1*}, 丁丽琴¹, 邱峰¹, 张洪敏¹

(1. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津 300193; 2. 遵义医药高等专科学校 药理学系, 贵州 遵义 563002; 3. 天津中新药业研究中心, 天津 300457)

[摘要] 目的:研究大鼠口服芦丁后血浆、尿液、粪便和胆汁中的代谢产物。方法:按 50 mg·kg⁻¹ 剂量对 Wistar 大鼠一次性灌胃芦丁,取不同时间点的血浆、尿液、粪便和胆汁,采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)对各生物样品进行检测,分析样品中芦丁的代谢产物。流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,5%~15% A;10~15 min,15%~60% A;15~18 min,60%~90% A;18~19 min,90%~5% A;19~22 min,5% A),流速 0.4 mL·min⁻¹,样品温度 4℃;电喷雾离子源(ESI),负离子监测模式。结果:从大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁中共鉴定出 22 个代谢产物,其中血浆中 7 个,尿液中 19 个,粪便中 12 个,胆汁中 15 个,代谢产物主要包括 I 相的水解代谢产物和 II 相的葡萄糖醛酸结合、硫酸结合及甲基化代谢产物。结论:芦丁在大鼠体内存在多种代谢途径,代谢产物主要包括去糖基化产物和苷元槲皮素进一步生物转化的代谢产物,为芦丁的体内代谢提供了重要信息。

[关键词] 芦丁; 槲皮素; 葡萄糖醛酸; 甲基化; 尿液; 粪便; 胆汁

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;O657.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0091-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170091

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170609.1515.012.html>

[网络出版时间] 2017-06-09 15:15

Identification of Metabolites of Rutin in Rats by UPLC-Q-TOF/MS

WU Ming-jiang^{1,2}, WU Xiao-lei^{1,3}, ZHANG De-qin^{1*}, DING Li-qin¹,
QIU Feng¹, ZHANG Hong-min¹

(1. *Research Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China*; 2. *Department of Pharmacy, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563002, China*; 3. *Tianjin Zhongxin Pharmaceuticals Research & Development Center, Tianjin 300457, China*)

[Abstract] **Objective:** To study on the metabolites in plasma, urine, feces and bile samples of rats after oral administration of rutin. **Method:** After disposable intragastric administration of rutin at a dose of 50 mg·kg⁻¹, samples of plasma, urine, feces and bile were collected at different time points, and then all the samples were analyzed by UPLC-Q-TOF/MS. **Result:** A total of 22 metabolites of rutin were identified, including 7 metabolites in plasma, 19 metabolites in urine, 12 metabolites in feces and 15 metabolites in bile. Phase I metabolites of rutin were hydrolytic metabolites and phase II metabolites mainly included glucuronidation, sulfation and methylation metabolites. **Conclusion:** Rutin exists a variety of metabolic pathways in rats. The metabolites mainly include deglycosylated products and metabolites of quercetin. This study provides important information on the metabolism of rutin, which will be helpful for the further development and utilization of rutin.

[Key words] rutin; quercetin; glucuronic acid; methylation; urine; feces; bile

[收稿日期] 20170328(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81430095);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101212)

[第一作者] 伍明江, 硕士, 副教授, 从事药物代谢动力学研究, Tel:18286281981, E-mail:zyzwmj@163.com

[通讯作者] *张德芹, 博士, 教授, 从事中药基本理论及临床应用研究, Tel:022-59596152, E-mail:deqin123@163.com

芦丁及其苷元槲皮素为常见的黄酮类成分,存在于多种药材中,如槐米、桑叶、山楂叶等。现代研究证明芦丁具有抗氧化^[1]、抗病毒^[2]、降血糖^[3]、抗疲劳^[4]、舒张血管^[5]等作用。近年来,研究人员对芦丁调节糖脂代谢紊乱的药效作用及其机制探讨方面进行了大量研究^[6-7]。治疗疾病的物质基础是体内存在的化学成分,药物进入体内后会发生复杂的生物转化过程,从而使药物在体内呈现出相关联的多成分共存状态,因此,阐明治疗疾病的物质基础,体内代谢产物的研究很有必要。

目前,关于芦丁代谢产物的研究报道较少,且主要集中于芦丁在体外肠道菌作用下所产生的代谢产物,其代谢产物主要有槲皮素^[8],降解产物为苯酚衍生物,如 3,4-二羟基甲苯^[9]等。YANG 等^[10]研究了芦丁在肠道菌中的代谢产物,发现芦丁除了含有甲基化物外,还可以被代谢成去糖基化物槲皮素-3-氧葡萄糖苷以及在 β -D-葡萄糖苷酶作用下进一步代谢成无色花青素。众所周知,药物在体内和体外由于环境的不同,生物转化存在一定的差异,使得产生的代谢产物有所不同;目前,关于芦丁体内代谢产物的研究尚未见报道,为了更清楚地了解芦丁体内代谢产物及存在形式,本实验运用 UPLC-Q-TOF/MS 对大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁中芦丁的代谢产物进行鉴定,分析吸收相和排泄相代谢产物,为芦丁的体内存在形式及体内代谢过程进行解释,也为阐明芦丁药效作用机制和药物代谢动力学研究提供实验依据。

1 材料

Legend Mach 1. 6R 型离心机(美国 Thermo 公司), ACQUITY 型超高效液相色谱仪(UPLC)和 Xevo G2-S 型四级杆飞行时间质谱仪(Q-TOF)(美国 Waters 公司)。

芦丁、异槲皮苷对照品(天津一方众康医药技术有限公司,批号分别为 20130822, 100080-201419, 纯度均 $\geq 98\%$), 槲皮素(天津化标生物技术有限公司,批号 20150821, 纯度 $\geq 98\%$), 肝素钠(北京索莱宝科技有限公司), 乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司), 乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重 200 ~ 220 g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK-(军)2012-0004。饲养温度保持 24 ~ 26 °C, 相对湿度 50% ~ 60%, 适应性饲养 5 d, 于实验前禁食 24 h, 自由饮水。本实验经天津国际生物医药联合研究院实验动物伦理委员会批准, 批

准号 TJAB-TJU20160035。

2 方法与结果

2.1 药物准备 结合预试验和文献[6, 11], 按剂量 50 mg·kg⁻¹ 给大鼠一次性灌胃芦丁对照品, 给药时将一定量的芦丁加在 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液中, 反复研磨成混悬液。另取芦丁、异槲皮苷和槲皮素对照品适量, 用 50% 甲醇分别配制成质量浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 样品采集

2.2.1 血浆样品 取 Wistar 雄性大鼠 3 只, 分别在给药前及给药后 15, 30, 60, 120, 240, 360, 720 min 于眼眶后静脉丛取血, 置于肝素化的离心管中, 离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min, 下同), 取分离出的血浆于离心管中, -20 °C 冰冻保存备用。

2.2.2 尿液和粪便样品 取 Wistar 雄性大鼠 3 只, 置于代谢笼中, 收集空白尿液和空白粪便。给药后继续置于代谢笼中, 收集 0 ~ 12, 12 ~ 24, 24 ~ 48 h 的尿液及 0 ~ 48 h 的粪便。实验期间用淀粉糊喂食大鼠, 自由饮水。

2.2.3 胆汁样品 取 Wistar 雄性大鼠 3 只, 给药后用 20% 乌拉坦按 7 mL·kg⁻¹ 腹腔麻醉后背式固定, 在剑突下作纵行切口 2 ~ 3 cm, 找到十二指肠上段黏膜的胆管, 分离, 在胆管远端作一小切口向肝方向插入内径 0.8 mm 的聚乙烯塑料(PE)管, 结扎固定, 收集 0 ~ 12, 12 ~ 24 h 的胆汁。另取 Wistar 雄性大鼠 3 只, 按上述操作收集空白胆汁。

2.3 样品处理

2.3.1 血浆样品 取血浆样品 1 mL, 加甲酸 50 μ L, 涡旋 1 min, 加乙酸乙酯 8 mL, 涡旋 3 min, 离心, 取上清液转移至离心管中, N₂ 吹干, 加 50% 甲醇 200 μ L 复溶, 于 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样。

2.3.2 尿液和胆汁样品 将收集到的尿液或胆汁, 离心, 取上清液 1 mL, 加甲酸 50 μ L, 涡旋 1 min, 加乙酸乙酯 8 mL, 涡旋 3 min, 离心, 取上清液转移至离心管中, N₂ 吹干, 进样前加 50% 甲醇 1 mL 复溶, 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样。

2.3.3 粪便样品 取粪便 1.0 g, 加乙酸乙酯 8 mL 超声提取 50 min, 离心, 取上清液 1 mL 转移至离心管中, N₂ 吹干, 进样前用 50% 甲醇 200 μ L 复溶, 于 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样。

2.4 样品检测

2.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μ m), 流动相乙腈(A)-

0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% ~ 15% A; 10 ~ 15 min, 15% ~ 60% A; 15 ~ 18 min, 60% ~ 90% A; 18 ~ 19 min, 90% ~ 5% A; 19 ~ 22 min, 5% A), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 样品温度保持 4 °C, 进样量 2 μL。

2.4.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子监测模式。毛细管电压 2.0 kV, 锥孔电压 40 V, 萃取锥孔电压 3.0 V, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂温度 400 °C, 锥孔气流量 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气流量 600 L·h⁻¹, 全信息串联质谱 (MS^E) 无碰撞能 0 eV, 高碰撞能 15 ~ 60 eV, 二级质谱 (MS/MS) 的碰撞能 22 eV。扫描范围 m/z 50 ~ 1 200。

2.5 数据处理 采用 Waters MassLynx 4.1 工作站对检测数据采集和分析。

2.6 芦丁质谱裂解规律分析 在大鼠血浆、尿液、粪便及胆汁样品中均能提取出保留时间 (t_R) 为 7.86 min 的色谱峰, 与芦丁对照品比较, 其色谱和质谱数据一致, 见图 1。在碰撞能量为 22 eV 时, 芦丁的二级质谱碎片中出现明显的离子峰有 m/z 463.087 8 (分子式 C₂₁H₁₉O₁₂, 0.2 ppm), 301.034 4 (分子式 C₁₅H₉O₇, -1.2 ppm), 178.997 8 (分子式 C₈H₃O₅, -0.6 ppm) 和 151.004 0 (分子式 C₇H₃O₄, 1.6 ppm), 分别是芦丁脱去鼠李糖基、芸香糖基以及苷元在 C 环发生断裂所形成的碎片离子, 其主要裂解途径见图 2。

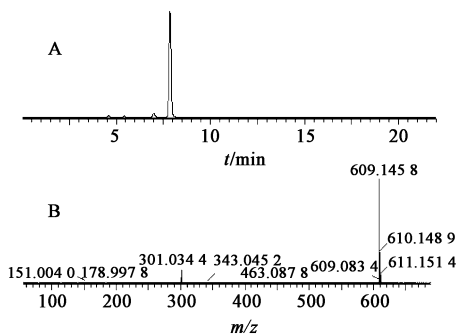


图 1 芦丁的 UPLC (A) 及二级质谱 (B)
Fig. 1 UPLC chromatogram (A) and MS/MS spectrum (B) of rutin

2.7 芦丁代谢产物分析 大鼠给药后的血浆、尿液、粪便及胆汁样品分别与空白样品的色谱和质谱数据比较并分析, 共鉴定出大鼠体内代谢产物有 22 个, 其中代谢产物甲基芦丁、槲皮素葡萄糖醛酸、槲皮素硫酸酯、槲皮素二葡萄糖醛酸、甲基槲皮素葡萄糖醛酸在提取的色谱中出现明显的双峰或多峰, 推测其为同分异构体代谢产物。芦丁体内代谢产物色谱图见图 3, 二级质谱图见图 4。

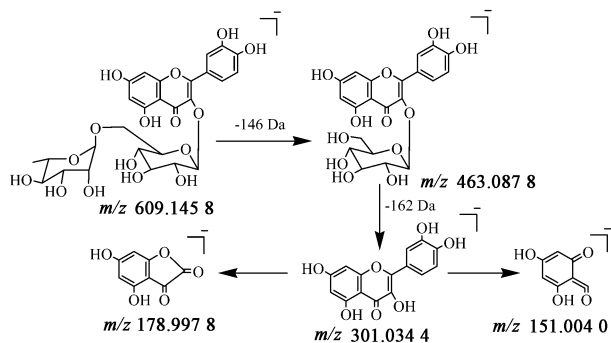


图 2 芦丁质谱的主要裂解规律
Fig. 2 Main fragmentation law of mass spectrometry of rutin

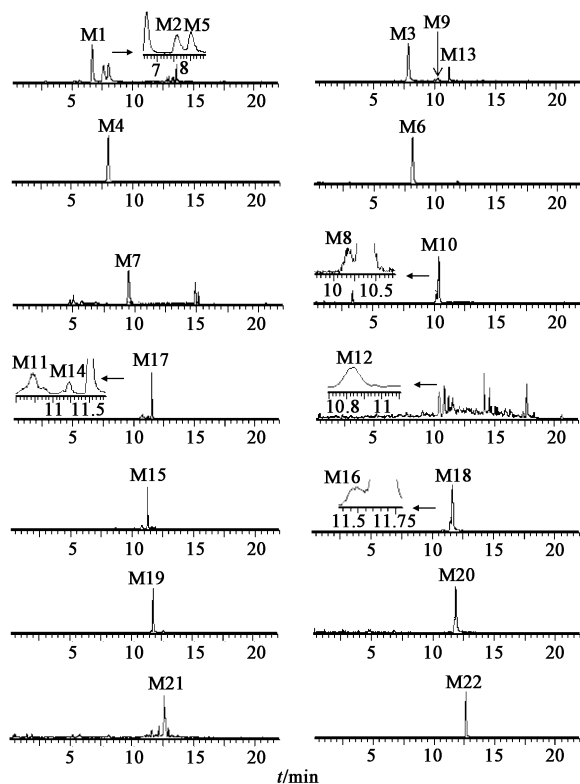


图 3 芦丁体内代谢产物 ESI 负离子检测模式提取的离子色谱
Fig. 3 Extracted ion chromatograms of *in vivo* metabolites of rutin in ESI negative ion mode

在 t_R 为 6.68, 7.60, 8.03 min 处各出现 1 个色谱峰, 其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 653, MS/MS 显示 m/z 477 ($[M - H]^- - \text{gluA}$, gluA 为葡萄糖醛酸) 和 m/z 301 ($[M - H]^- - 2 \text{ gluA}$) 的碎片离子, 推断其为槲皮素二葡萄糖醛酸 (M1, M2, M5); 在 t_R 为 7.84, 10.24, 11.18 min 处各出现 1 个色谱峰, 其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 477, MS/MS 显示 m/z 301 ($[M - H]^- - \text{gluA}$) 和 m/z 151 芦丁苷元 (槲皮素) 特征碎片离子, 推断其为槲皮素葡萄糖醛酸 (M3, M9, M13); 在 t_R 为 8.02 min 处出现 1 个色谱峰, 其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 463, MS/MS 显示 m/z

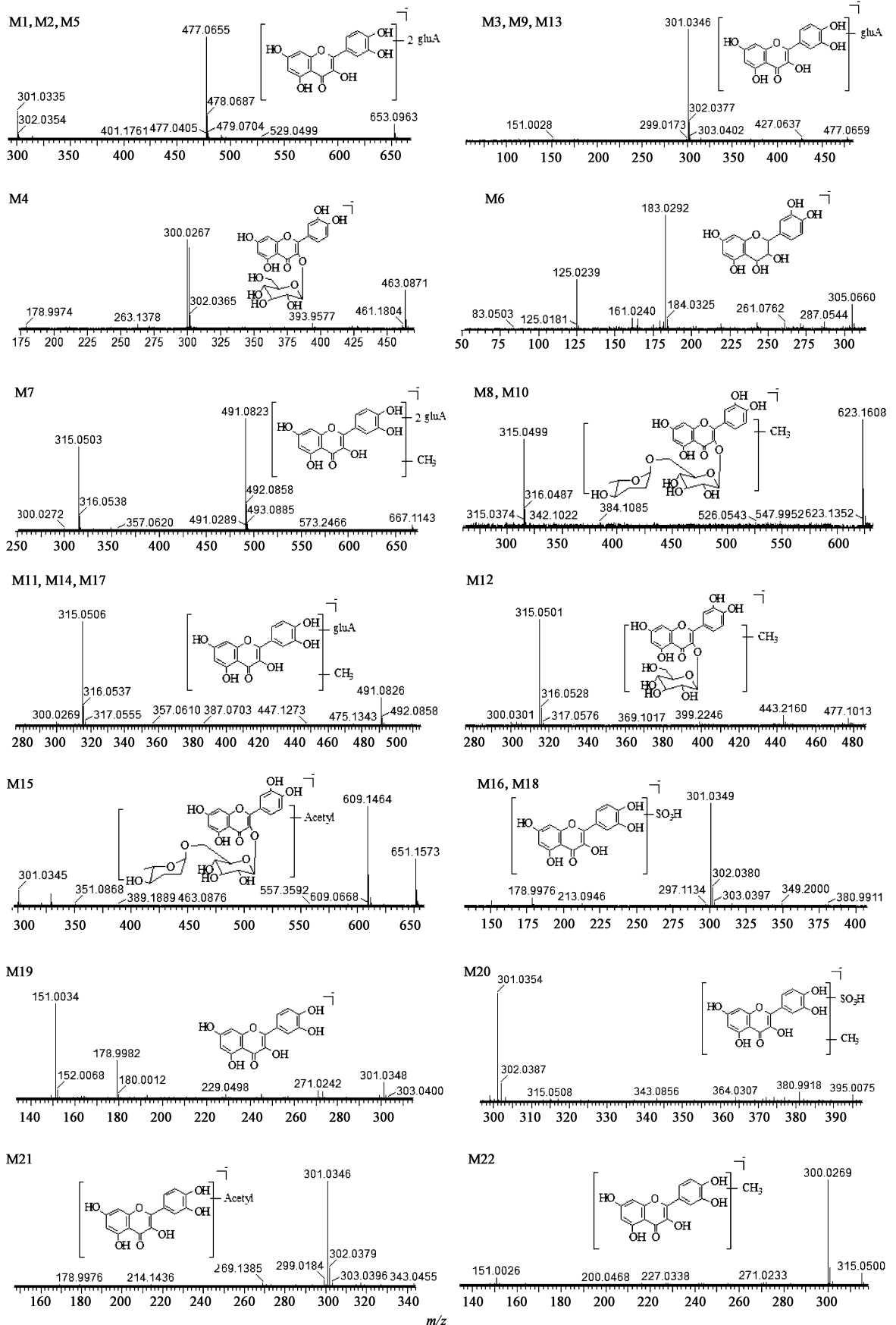


图 4 芦丁体内代谢产物二级质谱

Fig. 4 MS/MS spectra of *in vivo* metabolites of rutin

300(失去葡萄糖基)和 m/z 178 芦丁苷元特征碎片离子,且与异槲皮苷对照品比较,色谱和质谱数据一致,因此其为异槲皮苷(M4);在 t_R 为 8.13 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 305, MS/MS 显示 m/z 287 ($[M - H]^- - H_2O$) 和 m/z 183 (C 环发生断裂,失去 $C_7H_6O_2$ 离子碎片),推断其为文献报道的无色花青素^[10](M6);在 t_R 为 9.50 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 667, MS/MS 显示 m/z 491 ($[M - H]^- - gluA$), m/z 315 ($[M - H]^- - 2 gluA$) 和 m/z 300 ($[M - H]^- - 2 gluA - CH_3$) 的碎片离子,推断其为甲基槲皮素二葡萄糖醛酸(M7);在 t_R 为 10.19, 10.40 min 处各出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 623, MS/MS 显示 m/z 315 (失去芸香糖基)的碎片离子,推断其为甲基芦丁(M8, M10);在 t_R 为 10.73, 11.24, 11.51 min 处各出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 491, MS/MS 显示 m/z 315 ($[M - H]^- - gluA$) 和 m/z 300 ($[M - H]^- - gluA - CH_3$) 的碎片离子,推断其为甲基槲皮素葡萄糖醛酸(M11, M14, M17);在 t_R 为 10.83 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 477, MS/MS 显示 m/z 315 (失去葡萄糖基)和 m/z 300 (失去葡萄糖基和甲基)的碎片离子,推断其为甲基异槲皮苷(M12);在 t_R 为

11.27 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 651, MS/MS 显示 m/z 609 (失去 Acetyl, Acetyl 为乙酰基)和 m/z 301 (失去 Acetyl 和芸香糖基)的碎片离子,推断其为乙酰芦丁(M15);在 t_R 为 11.49, 11.64 min 处各出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 380, MS/MS 显示 m/z 301 ($[M - H]^- - SO_3$) 和 m/z 178 特征碎片离子,推断其为槲皮素硫酸酯(M16, M18);在 t_R 为 11.81 min 处出现色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 301, MS/MS 显示 m/z 178 和 m/z 151 特征碎片离子,与槲皮素对照品比较,色谱和质谱数据一致,因此其为槲皮素(M19);在 t_R 为 11.86 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 395, MS/MS 显示 m/z 380 ($[M - H]^- - CH_3$), m/z 315 ($[M - H]^- - SO_3$) 和 m/z 301 ($[M - H]^- - CH_3 - SO_3$) 的碎片离子,推断其为甲基槲皮素硫酸酯(M20);在 t_R 为 12.60 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 343, MS/MS 显示 m/z 301 (失去 Acetyl) 和 m/z 178 特征碎片离子,推断其为乙酰槲皮素(M21);在 t_R 为 12.62 min 处出现 1 个色谱峰,其质谱数据显示 $[M - H]^-$ 为 315, MS/MS 显示 m/z 300 ($[M - H]^- - CH_3$) 和 m/z 151 特征碎片离子,推断其为甲基槲皮素(M22)。见表 1。

表 1 芦丁在大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁中的代谢产物

Table 1 Metabolites in plasma, urine, feces and bile of rats after oral administration of rutin

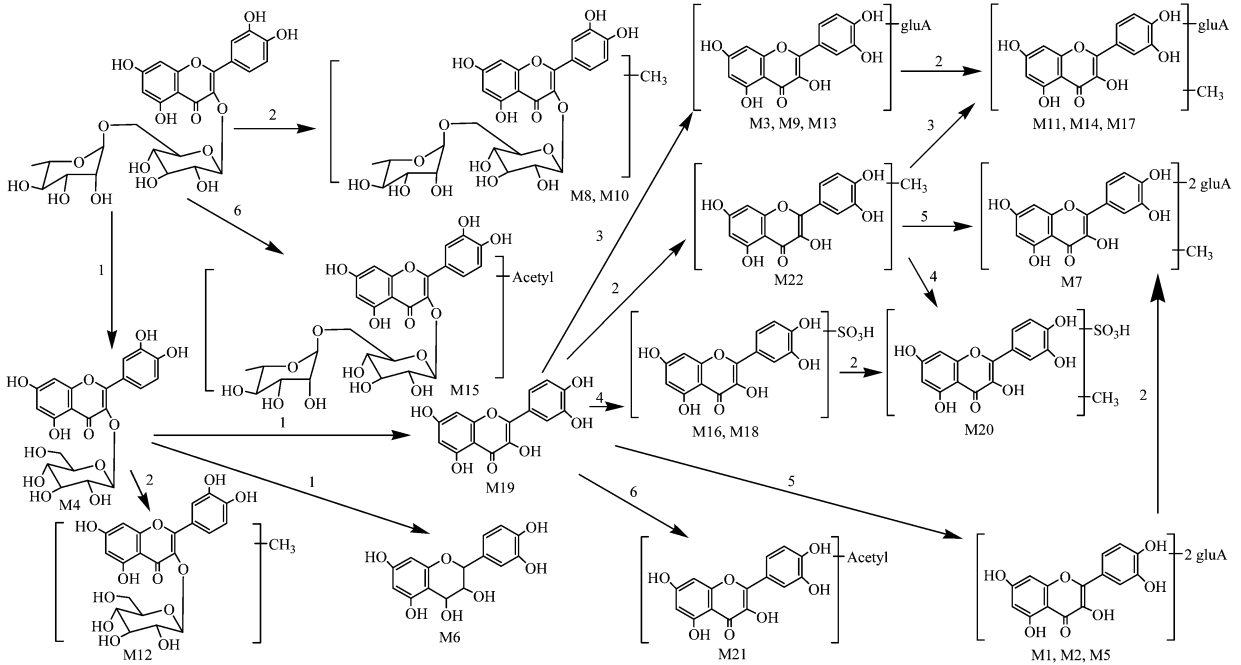
No.	t_R/min	$[M - H]^-$		误差 /ppm	分子式	MS/MS 碎片信息	代谢产物描述	部位			
		测定值	计算值					血浆	尿液	粪便	胆汁
M1	6.68	653.097 8	653.099 0	-1.8	$C_{27}H_{25}O_{19}$	653.097 8, 477.066 1, 301.044 1	槲皮素二葡萄糖醛酸	-	+	-	+
M2	7.60	653.099 4	653.099 0	0.6	$C_{27}H_{25}O_{19}$	653.099 4, 477.066 9, 301.034 8	槲皮素二葡萄糖醛酸	-	+	-	+
M3	7.84	477.066 8	477.066 9	-0.2	$C_{21}H_{17}O_{13}$	477.066 8, 301.035 2, 151.002 8	槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M4	8.02	463.087 9	463.087 7	0.4	$C_{21}H_{19}O_{12}$	463.087 9, 300.026 2, 178.997 4	异槲皮苷	-	+	+	+
M5	8.03	653.099 7	653.099 0	1.1	$C_{27}H_{25}O_{19}$	653.099 7, 477.067 1, 301.034 0	槲皮素二葡萄糖醛酸	-	+	-	+
M6	8.13	305.065 4	305.066 1	-2.3	$C_{15}H_{13}O_7$	305.065 4, 287.054 4, 183.029 2	无色花青素	-	-	+	-
M7	9.50	667.113 6	667.114 7	-1.6	$C_{28}H_{27}O_{19}$	667.113 6, 491.085 4, 315.050 2	甲基槲皮素二葡萄糖醛酸	-	+	-	+
M8	10.19	623.161 3	623.161 2	0.2	$C_{28}H_{31}O_{16}$	623.161 3, 315.050 2	甲基芦丁	-	+	+	+
M9	10.24	477.066 7	477.066 9	-0.4	$C_{21}H_{17}O_{13}$	477.066 7, 301.034 5, 151.003 1	槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M10	10.40	623.161 8	623.161 2	1.0	$C_{28}H_{31}O_{16}$	623.161 8, 315.049 9	甲基芦丁	-	+	+	+
M11	10.73	491.083 1	491.082 6	1.0	$C_{22}H_{19}O_{13}$	491.083 1, 315.050 6, 300.026 7	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M12	10.83	477.101 5	477.103 3	-3.8	$C_{15}H_{13}O_7$	477.101 5, 315.050 1, 300.028 9	甲基异槲皮苷	-	+	+	+
M13	11.18	477.065 7	477.066 9	-2.5	$C_{21}H_{17}O_{13}$	477.065 7, 301.033 9, 151.002 1	槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M14	11.24	491.082 8	491.082 6	0.4	$C_{22}H_{19}O_{13}$	491.082 8, 315.050 3, 300.025 9	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M15	11.27	651.157 2	651.156 1	1.7	$C_{29}H_{31}O_{17}$	651.157 2, 609.146 4, 301.034 5	乙酰芦丁	-	-	+	-
M16	11.49	380.990 7	380.991 6	-2.4	$C_{15}H_9O_{10}S$	380.990 7, 301.034 9, 178.997 6	槲皮素硫酸酯	-	+	+	-
M17	11.51	491.082 2	491.082 6	-0.8	$C_{22}H_{19}O_{13}$	491.082 2, 315.049 9, 300.026 9	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M18	11.64	380.990 6	380.991 6	-2.6	$C_{15}H_9O_{10}S$	380.990 6, 301.035 0, 178.998 2	槲皮素硫酸酯	-	+	+	-
M19	11.81	301.034 3	301.034 8	-1.7	$C_{15}H_9O_7$	301.034 3, 178.998 2, 151.003 4	槲皮素	+	+	+	+
M20	11.86	395.006 6	395.007 3	-1.8	$C_{16}H_{11}O_{10}S$	395.006 6, 380.991 3, 315.050 8	甲基槲皮素硫酸酯	-	+	+	-
M21	12.60	343.045 0	343.045 3	-1.2	$C_{17}H_{11}O_8$	343.045 0, 301.035 0, 178.997 6	乙酰槲皮素	-	-	+	-
M22	12.62	315.050 2	315.050 5	-1.0	$C_{16}H_{11}O_7$	315.050 2, 300.026 9, 151.002 6	甲基槲皮素	-	+	+	-

注：“+”表示有，“-”表示无。

3 讨论

本研究利用 UPLC-Q-TOF/MS 对大鼠口服芦丁后体内存在的代谢产物进行鉴定,利用色谱和质谱数据推测代谢产物。通过分析,从大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁样品中共鉴定出 22 个代谢产物,其中血浆中 7 个,尿液中 19 个,粪便中 12 个,胆汁中 15 个。从芦丁及其代谢产物数据表征,芦丁能以原型形式存在于大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁中,在尿液、

粪便和胆汁中主要以其代谢产物存在,推测芦丁在排泄时是以代谢产物的形式进行,且代谢产物通过尿液排泄相对较多,而通过胆汁和粪便排泄相对较少,尿液排泄可能是芦丁主要的排泄途径。芦丁在大鼠体内存在多途径代谢,其主要代谢途径见图 5,代谢产物主要包括芦丁的 I 相代谢产物和 II 相代谢产物,代谢产物以其苷元槲皮素及槲皮素的葡萄糖醛酸结合、硫酸结合、甲基结合代谢产物为主。



1. 水解;2. 甲基化;3. 葡萄糖醛酸结合;4. 硫酸结合;5. 二葡萄糖醛酸结合;6. 乙酰化;gluA. 葡萄糖醛酸;Acetyl. 乙酰基

图 5 芦丁在大鼠体内的代谢途径

Fig. 5 *In vivo* metabolic pathways of rutin in rats

芦丁口服后与肠壁组分结合,影响了其在肠道中的吸收,大部分被肠道菌所降解^[12]。通过本实验结果推测,芦丁口服后主要被肠道中 α -L-鼠李糖苷酶水解成异槲皮苷,在 β -D-葡萄糖苷酶的作用下进一步水解成芦丁苷元槲皮素,然后槲皮素在体内再发生代谢,而少部分芦丁直接被肠道吸收进入体内,一部分以原型成分存在,另一部分以其甲基化和乙酰化代谢产物存在。需要特别指出的是,芦丁在肠道菌中 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶的作用下,能够被转化为无色花青素,但此代谢产物仅能在粪便中被检测出来。无色花青素作为芦丁的 I 相代谢产物,与文献报道一致^[10]。但在本研究中,空白样品和含药样品均在 t_R 为 8.81 min 处发现明显的色谱峰,其二级质谱数据显示一致,推测体内代谢产物不存在文献 [10] 报道的 5,7,3',4'-四羟基黄酮

($C_{15}H_{12}O_6$),这可能是由于芦丁体内代谢产物和体外肠道菌产生的代谢产物存在一定的差异。此外,由于芦丁属于结合型黄酮苷,具有多羟基结构,代谢产物存在同分异构体,如代谢产物甲基芦丁在提取的总离子色谱图中出现了双峰,通过二级质谱分析其为同分异构体,但甲基与羟基的连接位置需要结合如核磁共振(NMR)等多种分析手段才能判断,仅依靠质谱数据难以确定甲基与羟基具体连接位置。

一直以来,科研人员对芦丁的研究主要集中在芦丁的药物效应及细胞水平的机制探讨,而对芦丁代谢产物的研究仅体现在体外肠道菌作用的代谢产物。本实验对大鼠灌胃芦丁后的血浆、尿液、粪便和胆汁样品进行分析,能客观地反映出芦丁在体内的存在形式和药物代谢过程。芦丁在体内呈现出多种药理活性,这可能与芦丁存在的代谢产物有关,因此,分析芦丁代谢产物的活性评价及作用机制将是

下一步研究的重点。本文为阐明芦丁治疗疾病的物质基础提供了一定参考,为芦丁的药效作用机制和药物代谢动力学研究提供了依据。

[参考文献]

[1] Abarikwu S O, Olufemi P D, Lawrence C J, et al. Rutin, an antioxidant flavonoid, induces glutathione and glutathione peroxidase activities to protect against ethanol effects in cadmium-induced oxidative stress in the testis of adult rats [J]. *Andrologia*, 2016, doi: 10.1111/and.12696.

[2] Chéron N, YU C, Kolawole A O, et al. Repurposing of rutin for the inhibition of norovirus replication [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(9):2353-2358.

[3] TIAN R, YANG W, XUE Q, et al. Rutin ameliorates diabetic neuropathy by lowering plasma glucose and decreasing oxidative stress via Nrf2 signaling pathway in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 771:84-92.

[4] 吴涛,杨建雄,李宝茹,等. 芦丁抗疲劳作用的实验研究 [J]. *临床医学*, 2013, 33(3):90-92.

[5] LI Q, NIU S, WANG R, et al. Mechanisms that underlie the induction of vasodilation in pulmonary artery by rutin [J]. *Int Angiol*, 2012, 31(6):557-564.

[6] 苗建红,白静,李响,等. 芦丁对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及肾功能的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(6):48-51.

[7] 李光民,储金秀,韩淑英. 荞麦花叶中芦丁调节糖脂代谢的作用及机制 [J]. *华西药理学杂志*, 2010, 25(4):426-428.

[8] 周鹏飞,王建壮,庞小雄,等. 离体培养人肠道菌群对芦丁代谢的研究 [J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(6):582-586.

[9] SU K Y, YU C Y, CHEN Y P, et al. 3, 4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF- κ B signaling [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, doi: 10.1186/1472-6882-14-21.

[10] YANG J, QIAN D W, JIANG S, et al. Identification of rutin deglycosylated metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi:10.1016/j.jchromb.2012.04.024.

[11] Al-Roujeaie A S, Abuohashish H M, Ahmed M M, et al. Effect of rutin on diabetic-induced erectile dysfunction: Possible involvement of testicular biomarkers in male rats [J]. *Andrologia*, 2016, doi:10.1111/and.12737.

[12] Carbonaro M, Grant G. Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine [J]. *Ann Nutr Metab*, 2005, 49(3):178-182.

[责任编辑 刘德文]