

UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷 大鼠肠道菌群代谢产物的研究

林文振¹, 李坤平^{1*}, 曾玉冰², 周晓锐¹

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 海南康芝药业股份有限公司, 海口 570216)

[摘要] 目的: 分析异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷经体外培养大鼠肠道菌群代谢转化的产物。方法: 在离体培养的大鼠肠道菌群中, 加入异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷, 采用 HPLC 检测代谢进程, 采用超高效液相色谱串联电喷雾飞行时间质谱 (UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS) 对转化产物进行分析, 结合对照品、化合物精确分子量和 CID-MS-MS 裂解碎片信息进行化合物结构解析。结果: 从异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的大鼠肠道代谢产物中鉴定了槲皮素-3-O-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、山奈酚和异鼠李素, 另一化合物是否为 5, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮-3-O-葡萄糖苷还需进一步确证。结论: 肠道菌群代谢对异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的转化主要是苷水解、脱羟基和甲基化, 增加了化合物疏水性和化学多样性。

[关键词] 异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷; 肠道菌群; 生物转化; UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0140-04

Analysis of the Metabolites of Isorhamnetin-3-O-β-D-Rutinoside in Rat Intestinal Flora *in vitro* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS

LIN Wen-zhen¹, LI Kun-ping^{1*}, ZENG Yu-bing², ZHOU Xiao-rui¹

(1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China;

2. Hainan Honz Pharmaceutical Co., Ltd, Haikou 570216, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the metabolites of isorhamnetin-3-O-β-D-rutinoside bio-transformed by rat intestinal flora *in vitro*. **Method:** Isorhamnetin-3-O-β-D-rutinoside was incubated with rat anaerobic intestinal flora *in vitro* with HPLC monitoring the biotransformation course, and a LC-MS method based on the combined use of ultra-performance liquid chromatography, electro-spray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry has been applied to an investigation of the structural characterization of biotransformation products. The metabolites were identified by accurate molecular weight, CID-MS-MS fragmentation information, combined with reference substance and literature data review. **Result:** Five metabolites-quercetin, isorhamnetin, kaempferol, quercetin-3-O-glucoside and isorhamnetin-3-O-glucoside were identified though the above method, and another compound, maybe, 5, 7, 3', 4'-tetramethoxy flavonoid-3-O-glucoside, need more information to identify. **Conclusion:** During the biotransformation by rat intestinal flora *in vitro*, isorhamnetin-3-O-β-D-rutinoside usually lose its glycosyl ligands, -OH or be adding-CH₃, and which lead to their lipophilicity and chemical diversity increasing.

[Key words] isorhamnetin-3-O-β-D-rutinoside; intestinal flora; biotransformation; UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS

[收稿日期] 20120419(006)

[基金项目] 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(LYM10092); 广东省大学生创新实验项目(1057310010)

[通讯作者] * 李坤平, 博士, 副教授, 从事中药制药方面的教学与研究, Tel: 020-39352118, E-mail: lkpchina@sohu.com

布渣叶 *Microcos paniculata* L.,性凉,味微酸,归脾、胃经,收载于《中国药典》(2010年版),具消食化滞清热利湿之功效,用于饮食积滞,感冒发热,湿热黄疸等症^[1],异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷是所含主要黄酮苷类化合物之一^[2]。研究表明,黄酮苷类化合物口服给药生物利用度低,其肠道的首过代谢作用不容忽视;大量的肠道微生物能产生丰富的酶类,使尚未吸收的黄酮苷类化合物发生糖苷键断裂、去羟基化、甲基化等反应,甚至使黄酮开环裂解,形成多种代谢产物且疏水性增强,而再次被机体吸收^[3-5]。罗集鹏等^[6]、李坤平等^[2,7-8]对布渣叶黄酮的提取、分离纯化、含量测定等进行了研究,但有关其黄酮类成分的代谢研究尚未见报道。本实验利用体外培养大鼠肠道菌群,对布渣叶中主要的黄酮苷类成分——异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的代谢转化进行了研究,以期对布渣叶中其他黄酮苷类化合物的代谢研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备 Acquity UPLC 超高压液相色谱,二元高压泵、自动进样器、柱温箱和 UV 检测器(Waters 公司);Q-ToF micro 飞行时间质谱,电喷雾离子源(ESI)及 MassLynx 4.1 数据处理系统(Waters 公司);岛津高效液相色谱仪(LC-10ATVP 泵,SCL-10AVP 控制器,SPD-10AVP 检测器,CTO-10ASVP 柱温箱,SIL-20A 自动进样器,LC solution 色谱工作站)。RE-52AA 旋转蒸发器(河南巩义仪器有限公司),不锈钢灭菌器(SYQ-DSX-280B 型,上海申安医疗器械厂)、数显电热培养箱(HPX-9162 MRE 型,上海博迅实业有限公司)、离心机(TDL80-2B 型,上海安亭科学仪器厂)。

1.2 动物与试剂 SD 大鼠,SPF 级,体重 180~200 g,由广东省医学实验动物中心提供(合格证号 2011-0002)。异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷,自布渣叶药材中分离纯化,经 IR,MS,¹H-NMR,¹³C-NMR 确证结构,面积归一化法测定纯度 98.1%。D101 大孔树脂(天津海光化工有限公司),乙醇、甲醇、冰醋酸、半胱氨酸、维生素 C(市售分析纯),牛肉膏、蛋白胨、二甲亚砷(北京鼎国);甲醇、乙腈(色谱纯,Merck 公司)。

1.3 异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷溶液和大鼠肠道菌群培养基的配制 称取异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷 200.0 mg,溶于 4 mL 二甲亚砷中,即配制成质量浓度为 50 g·L⁻¹的异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的二甲亚砷溶液。培养基的制备参考文献[10],先配

制溶液 A(0.78% K₂HPO₄ 溶液)、溶液 B(0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.22% MgSO₄ 溶液)和 8% Na₂CO₃ 溶液;再取溶液 A 18.75 mL、溶液 B 18.75 mL 和 8% Na₂CO₃ 溶液 40 mL,加入 0.25 g 半胱氨酸、2.5 g 维生素 C、5 g 牛肉膏和 5 g 蛋白胨,用蒸馏水定容至 500 mL,即得。

1.4 异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的大鼠肠道菌群体外代谢实验 将培养基在 121 °C 下湿热灭菌 20 min,冷却,备用。取 9 只 SD 大鼠,乙醚麻醉后处死,取直肠段的新鲜粪便,以 1 g 粪便加入 15 mL 培养基的比例制成大鼠肠道菌群混悬液,每份 20 mL 分装到培养皿中,再分别加入异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的二甲亚砷溶液 40 μL,置于真空干燥器中,经 N₂ 置换后密封于 37 °C 培养箱中培养,间歇取样,样品迅速置于 -18 °C 冷冻,每个时间点平行取样 5 份,将异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的二甲亚砷溶液与不含粪便的培养基混合后同此法操作作为空白对照。

1.5 大鼠肠道菌群生物转化样品的预处理 将样品解冻,1 500 r·min⁻¹离心 10 min,移取上层清液 10 mL,60 °C 旋转蒸干,加入 2 mL 甲醇超声溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液 1 mL,加入乙腈 4 mL,混匀,10 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液 1 mL,N₂ 吹干后用 100 μL 甲醇溶解,待测。

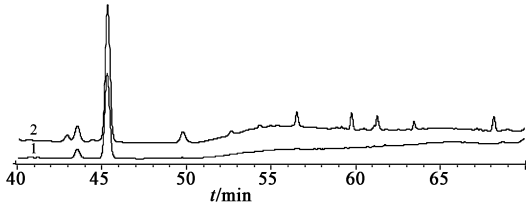
1.6 HPLC 分析色谱条件 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~12 min,82% B;12~45 min,82%~70% B;45~60 min,70%~55% B;60~70 min,55%~25% B,总流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 276 nm,进样量 20 μL,柱温 35 °C。

1.7 UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS 分析条件^[10] 色谱条件:Acquity UPLC™ BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm,1.7 μm)色谱柱;流动相为甲醇(A)水(含 0.1% 甲酸,B),流速 0.2 mL·min⁻¹,梯度洗脱(0~7.6 min,85%~60% B;7.6~10 min,60%~60% B;10~12 min,60%~30% B;12~15 min,30%~20% B),自动进样,进样量 1 μL,柱温 35 °C。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),毛细管电压 3.1 kV,锥孔电压 15 V,锥孔气流量 25 L·h⁻¹;离子源温度 100 °C,离子能 1.0 V,诱导解离能 5 V;脱溶剂气流量 500 L·h⁻¹,脱溶剂气温度 300 °C,碰撞气 Ar;负离子模式检测;扫描范围 *m/z* 50~1 000;MS/MS 源内碰撞诱导解离电压为 20~30 V。

2 结果与分析

2.1 异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的大鼠肠道菌群代谢产物的 HPLC 分析 对异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷经大鼠肠道菌群代谢的样品,按上述方法进行预处理后,经 HPLC 分析,结果见图 1。



1. 空白样品; 2. 体外培养 4 h 的样品

图 1 异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的大鼠肠道菌群代谢产物 HPLC

表 1 异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷大鼠肠道菌群代谢产物的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS 分析

No.	相对分子质量/Da				分子式	CID/MS/MS 碎片离子	鉴定化合物
	[M-H] ⁻ 测定值	[M-H] ⁻ 理论值	误差 mDa	δ			
1	463.085 6	463.087 7	-2.1	-4.5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	346,300,271,151,125	槲皮素-3-O-葡萄糖苷
2	477.106 2	477.103 3	2.9	6.0	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	387,357,315,300,151	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷
3	315.047 9	315.050 5	-2.6	-8.2	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	300,271,243,151	异鼠李素
4	301.031 5	301.034 8	-3.3	-10.9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	227,151	槲皮素
5	285.037 4	285.039 9	-2.5	-8.7	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	257,229,151	山奈酚
6	519.152 7	519.150 3	2.4	4.6	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₂	357,189,179,153	5,7,3',4'-四甲氧基黄酮-3-O-葡萄糖苷

从上述结果可知,菌群代谢对异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的代谢过程中,糖苷键的水解极易发生,这与肠道广泛存在的 α-鼠李糖苷酶、α 和 β-D-葡萄糖苷酶等有关^[4-5,13];另外,去羟基化和甲基化现象也普遍存在,这一方面增加了代谢产物的疏水性,而有利于通过被动扩散透过生物膜而吸收,另一方

面也增加了代谢产物的化学多样性,可能导致其整体生物活性的增强^[13],这与中药多靶点协同作用的观点是一致的;这些都说明,肠道微生物的代谢对于中药药效物质的吸收、代谢有着较大的影响,要科学理解中药药效作用机制及其药效物质基础,肠道生物转化研究也是一个值得深入的问题。图 2。

2.2 UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS 分析结果 将培养 4 h 的生物转化样品,按上述方法预处理后,经 UPLC-ESI-Q-TOF-MS-MS 分析,结合对照品、化合物精确相对分子质量和 CID-MS-MS 裂解碎片分析^[10],鉴定了槲皮素-3-O-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素和山奈酚,但另一化合物推断其结构为 5,7,3',4'-四甲氧基黄酮-3-O-葡萄糖苷,还须进一步确证。见表 1。

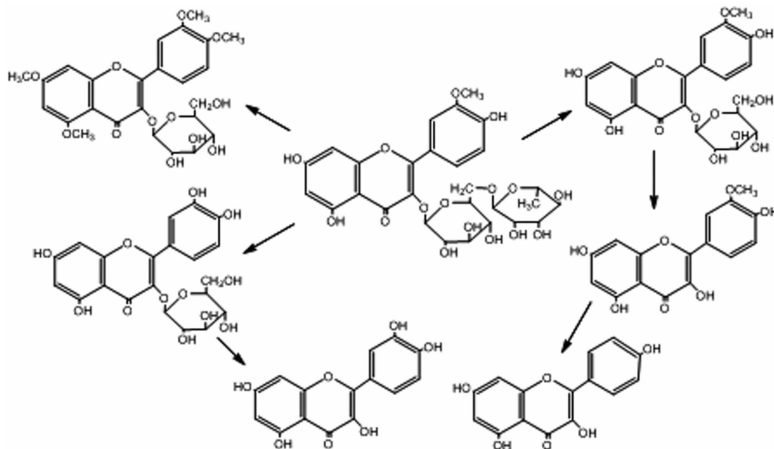


图 2 体外培养大鼠肠道菌群对异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的生物转化途径

3 讨论

大量肠道微生物的存在,广泛影响着许多中药有效成分的代谢转化与机体的吸收利用,黄酮类、皂苷类、生物碱类、蒽醌类、单萜类化合物的肠道代谢研究均有报道^[3,11-12]。大量研究表明,研究中药肠道代谢可以促进人们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,科学地认识中药及其复方制剂药效物质基础提供参考^[15]。

在中药肠道代谢研究过程中,由于分析条件的局限,可能有更多痕量的肠道代谢产物未被发现,随着 LC-MS 技术的飞速发展,使用“软电离”模式的多级质谱技术(LC-ESI-APCI-TOF-MS-MS)在中药药效物质分析中的应用日益广泛^[13-14]。随着现代分析科学、血清中药化学和肠道中药化学等方面研究的深入,作为一类重要的生理活性成分,黄酮类化合物的吸收和代谢的研究必将愈加深,对于其药效物质基础和作用机制的认识也必将更加科学^[5,9]。

异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷作为布渣叶中的一个重要的黄酮类成分,其肠道代谢转化主要是苷水解、脱羟基和甲基化,该研究结果有助于我们对布渣叶中其他黄酮苷类化合物代谢的理解,进而分析布渣叶总黄酮的肠道代谢,为其肠道吸收研究提供依据,为进一步的制剂开发提供参考。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010.
 [2] 李坤平,潘天玲,高崇凯,等. HPLC 法测定布渣叶中牡荆苷和异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(9):950.
 [3] 肖娟,王莹,王新宏,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.

[4] Blaut M, Schoefer L, Braune A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms[J]. Int J vitam Nutr Res, 2003,73(2):79.
 [5] 裴利宽,郭宝林. 黄酮类化合物吸收和代谢研究进展[J]. 中国药理学杂志,2006,41(8):568.
 [6] 罗集鹏,杨世林, Margaret F R, 等. 布渣叶黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 中草药,1993,24(9):455.
 [7] 李坤平,潘天玲,高崇凯,等. 大孔吸附树脂富集纯化布渣叶总黄酮的研究[J]. 中药材,2009,32(4):130.
 [8] 李坤平,曾玉冰,高崇凯,等. 从布渣叶中制备异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的研究[J]. 广东药学院学报,2011,27(1):13.
 [9] 杨秀美,郝美荣,服部征雄. 中药成分代谢分析[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003.
 [10] 李坤平,高崇凯,李卫民. 牡荆苷和异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的电喷雾飞行时间质谱研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(2):180.
 [11] Possemiers S, Bolca S, Verstraete W, et al. The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals[J]. Fitoterapia, 2011,82(1):53.
 [12] 陈新梅. 大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 Rg₁ 的代谢转化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):210.
 [13] 郭娜,范斌,彭娟,等. 基于超高效液相-飞行时间质谱技术的中药女贞子代谢组学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):131.
 [14] 倪书茂,钱大玮,尚尔鑫,等. 大川芎方化学成分的超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):39.
 [15] 杨秀伟. 中药实验医学研究中的关键基础科学问题——从肠内细菌生物转化确定中药有效和有毒化学成分[J]. 中西医结合学报,2005,3(2):154.

[责任编辑 邹晓翠]