

## UHPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析金丝桃苷在大鼠肠道菌群中的代谢

梅朝叶<sup>1,2,4</sup>, 陈浩<sup>1,2</sup>, 覃小丽<sup>1,2</sup>, 黄勇<sup>1</sup>, 王爱民<sup>3</sup>, 郑林<sup>3</sup>, 席晓岚<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>贵州省药物制剂重点实验室; <sup>2</sup>贵州医科大学药学院; <sup>3</sup>民族药与中药开发应用教育部工程研究中心;<sup>4</sup>国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004

**摘要:** 分析金丝桃苷经体外培养大鼠肠道菌群代谢转化的产物。建立超高效液相色谱串联电喷雾飞行时间质谱(UHPLC-ESI-Q-TOF-MS)测定金丝桃苷及其代谢产物的分析方法, 流动相为 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B), 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 扫描方式为电喷雾负离子模式, 将金丝桃苷与大鼠肠道菌孵育液在 37 °C 离体厌氧环境中培养 24 h 使其发生代谢, 采用此方法对其代谢物进行检测分析, 结合 Metabolite Tools™、质量亏损过滤(MDF)等技术, 对代谢产物进行筛查分析以及推测代谢产物化学式。从药物菌群孵育液中鉴定出金丝桃苷在大鼠肠道细菌各种酶的作用下发生脱糖反应, 脱糖形成的苷元槲皮素进一步发生羟基化和还原反应, 得到槲皮素羟基化代谢产物和槲皮素 C<sub>2</sub>C<sub>3</sub> 双键加氢还原产物花旗松素。阐明了金丝桃苷在大鼠肠道菌群中的代谢特征。

**关键词:** 金丝桃苷; 肠道菌群; 超高效液相色谱串联电喷雾飞行时间质谱; 代谢

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.007

## Analysis of the Metabolites of Hyperoside in Rat Intestinal Flora *in vitro* by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS

MEI Chao-ye<sup>1,2,4</sup>, CHEN Hao<sup>1,2</sup>, QIN Xiao-li<sup>1,2</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup>, WANG Ai-min<sup>3</sup>, ZHENG Lin<sup>3</sup>, XI Xiao-lan<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics; <sup>2</sup>School of Pharmacy, Guizhou Medical University;<sup>3</sup>Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education;<sup>4</sup>National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guiyang, Guizhou 550004, China

**Abstract:** To identify the metabolites of hyperoside bio-transformed by rat intestinal flora *in vitro*. UHPLC-ESI-Q-TOF-MS method was established to detect the hyperoside and its metabolites with 0.1% formic acid solution (A)-0.1% formic acid acetonitrile (B) as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. Electrospray negative ion mode was applied to analyze the metabolites of quercitrin in rat intestinal flora. The hyperoside was added to the intestinal flora of rat respectively, the sample was incubated under anaerobic conditions of 37 degrees for 24 h. Metabolite Tools™, mass defect filter (MDF) and other technologies were to screen, analyze the metabolites and infer the chemical formula of the metabolites. The metabolic reaction of hyperoside was degalactoside, and the aglycone quercetin resulted from degalactoside would have further reactions such as hydroxylation and reduction to achieve hydroxylation metabolite, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> double bonds hydrogenation and reduction product taxifolin. The *in vitro* metabolic characteristics of hyperoside by rat intestinal flora have been clarified.

**Key words:** hyperoside; intestinal flora; UHPLC-ESI-Q-TOF-MS; metabolism

金丝桃苷(hyperoside)又名槲皮素-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷,属于黄酮醇苷类化合物,广泛存在于金丝桃科、蔷薇科、桔梗科等植物的果实及全草中,近年来对金丝桃苷的研究较为活跃。研究表明,金丝

桃苷具有抗氧化、镇痛、调血脂、保护心肌等作用<sup>[1]</sup>,且在体内外均具有良好的抗乙型肝炎病毒(HBV)作用和保肝降酶作用<sup>[2-5]</sup>。有较好的开发前景。黄酮苷类化合物口服给药生物利用度较低,因大量的肠道微生物能产生丰富的代谢酶,使尚未吸收的黄酮苷类化合物糖苷键断裂、去羟基化、甲基化等,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<sup>[3-5]</sup>。目前国内对金丝桃苷的

收稿日期: 2017-07-21 接受日期: 2017-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(81760675; 81360664); 贵州省科技计划项目(2017-5601; 2016-5613-5677); 贵阳市科技计划(2017-050)

\* 通信作者 Tel: 86-851-6908468; E-mail: 970088464@qq.com

药理药效<sup>[6,7]</sup>、吸收<sup>[8,9]</sup>等方面的研究较多,但关于金丝桃苷在大鼠肠道菌群中的代谢研究尚不明确,因此本文采用UHPLC-ESI-Q-TOF-MS连用技术,并结合Metabolite Tools™(包括Metabolite Predict及Metabolite Detect)、Mass Defect Filter(MDF)及Data Analysis中的Smart Formula等代谢产物预测、筛查软件,探讨金丝桃苷在大鼠肠道菌群中的代谢作用,明确其在消化道中生物转化的一般规律,对金丝桃苷及其类型的黄酮醇苷代谢机制具有十分重要的意义。

## 1 材料

### 1.1 仪器

SW-CJ-2FD超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司),CDH6000B II电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司),YXQ-LS-18SI手提式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司),Allegra 64R低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司),EL204电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),MTN-2800D氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),厌氧培养罐(Pack-Rectangular Jars,日本三菱瓦斯化学株式会社),厌氧产气袋(AnaeroPack-Anaero, MGC, 日本三菱瓦斯化学株式会社);Agilent Technologies 1290 Infinity液相色谱-布鲁克道尔顿电喷雾-四极杆-飞行时间质谱联用仪(美国Agilent公司、德国Bruker公司)。

### 1.2 试剂与动物

蛋白胨(批号130941,上海博微生物科技有限公司),小牛浸膏和营养琼脂培养基(批号20140108-0、批号20140304-01,杭州微生物试剂有限公司),碳酸钠和磷酸氢二钾(批号20131206、批号20130722,上海化学试剂总厂),硫酸铵(批号20120305,重庆川江化学试剂厂),氯化钠和磷酸二氢钾(批号130927、批号120202,西陇化工股份有限公司),L-抗坏血酸(批号402C036,北京索莱宝科技有限公司),L-半胱氨酸(批号100125,上海蓝季科技发展有限公司),硫酸镁和无水氯化钙(批号20130522、批号2013101801成都市科龙化工试剂厂);金丝桃苷对照品(批号MB6720,大连美仑生物科技有限公司),槲皮素对照品(批号1166-101216,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心),花旗松素对照品(批号111816-201102,中国食品药品检定研究院);乙腈为色谱纯(德国Merck公司)、甲酸

为色谱纯(德国Merck公司),其他试剂均为分析纯。

健康成年SD大鼠,均为清洁级动物,体重(220 ± 20 g),雌雄兼用;购自重庆腾鑫生物技术有限公司,许可证号:SCXK(渝)2012-0008。

## 2 方法

### 2.1 溶液配制

#### 2.1.1 厌氧培养液的配制<sup>[10]</sup>

取0.78%的K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液37.5 mL,再加入由(0.47% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.18% NaCl、1.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.12% CaCl<sub>2</sub>、0.25% MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)混合配制而成的溶液37.5 mL、和8%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液50 mL;以及0.5 g L-半胱氨酸、25%的L-抗坏血酸2 mL,1 g牛肉膏,1 g蛋白胨,1 g营养琼脂,并加蒸馏水至1 L, pH调至:7.5~8.0,高压蒸汽121 °C灭菌20 min,备用。

#### 2.1.2 大鼠肠道菌液的配制<sup>[11]</sup>

将健康大鼠断颈处死后,迅速开腹取其大肠段粪便,将新鲜粪便与生理盐水按1:4 mL比例混合制成混悬液,5000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,上清液即为大鼠肠道菌液。

### 2.2 样品制备<sup>[11]</sup>

取新鲜配制的大鼠肠道菌液2 mL于培养皿中,加入厌氧培养液18 mL(已灭菌),混匀,即得1份肠菌培养液,共配制3份。将此肠菌培养液置于厌氧培养罐中,加入1个厌氧产气袋后迅速盖上培养罐盖,置于37 °C恒温培养箱中培养24 h,使肠菌培养液中的肠道菌充分成长。24 h后取出培养皿,将上述肠菌培养液平均分为6组,每组10 mL,向其中3组加入金丝桃苷,3组不加金丝桃苷作为空白肠菌培养液对照组,另取厌氧培养液30 mL分为3组加入金丝桃苷作为不加肠菌的对照组。将上述培养皿迅速放入厌氧培养罐中,放入1个厌氧产气袋,置于37 °C恒温培养箱中培养12 h。所用器具均经高压蒸汽121 °C灭菌20 min。

### 2.3 样品处理方法

将“2.2”条下培养得到的样品依次转入50 mL离心管中,再加入乙酸乙酯10 mL,涡混振荡5 min,萃取3次,合并3次萃取液,8000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液于37 °C下氮气吹干。残渣加200 μL 50%甲醇水进行溶解,15000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,上清液UHPLC-ESI-Q-TOF-MS进样分析。

## 2.4 检测条件

### 2.4.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相:0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B), 梯度洗脱:0 ~ 10 min, 5% → 45% B; 10 ~ 14 min, 45% → 95% B; 14 ~ 15 min, 95% → 100% B; 15 ~ 16 min, 100% → 5% B。流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 45 °C, 进样体积为 2 μL。

### 2.4.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为负离子扫描(ESI<sup>-</sup>, *m/z* 50 ~ 1000), 毛细管电压 3 KV, 锥孔电压:80 V, 离子源温度:110 °C, 雾化气(氮气)压力:1.2 bar, 流速:8.0 L · min<sup>-1</sup>, 温度 200 °C, 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:Data Analysis 软件、Metabolite Tools<sup>TM</sup>等。

## 3 结果

### 3.1 代谢产物分析

应用 Metabolite Predict 软件(代谢产物预测)对金丝桃苷进行代谢产物进行分析, 得到金丝桃苷大鼠肠道菌群孵育样品、大鼠空白肠道菌群孵育样品、金丝桃苷厌氧培养液孵育样品、差异图谱等图谱, 如图 1 所示。各成分在 ESI<sup>-</sup>模式下得到较好的响应信号。由图 1 中的 C 图可得知, 金丝桃苷在空白厌氧培养液中不干扰代谢产物的测定。

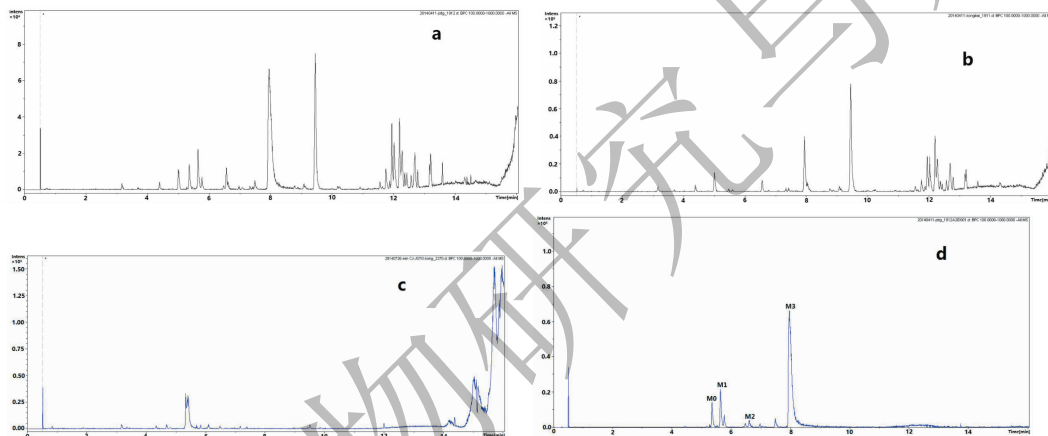


图 1 负模式下金丝桃苷在大鼠肠道菌孵育液中的总离子流图:(a) 金丝桃苷大鼠肠道菌孵育样品;(b) 大鼠空白肠道菌孵育样品;(c) 金丝桃苷厌氧培养液孵育样品;(d) 差异图谱

Fig. 1 base peak chromatograms of incubation medium of intestinal flora of rat from quercetin-3-*O*-galactoside in negative mode: (a) rat intestinal flora sample; (b) blank incubation medium of intestinal flora of rat; (c) blank incubation medium; (d) different chromatograms of a and b

### 3.2 金丝桃苷在大鼠肠道菌群中的代谢物鉴定分析

由 Metabolite Detect 软件对样品及空白图谱处理后得到的差异图谱中可知, 在大鼠肠道菌孵育样品中找到 4 种化合物, 即 M0 (*m/z* 447. 0943), M1 (*m/z* 317. 0305), M2 (*m/z* 303. 0543), M3 (*m/z* 305. 0686)。

#### 3.2.1 原型成分 M0 的鉴定

由 Metabolite Detect 对样品及空白图谱处理后得到的差异图谱中可知, 在 5.4 min 处存在 *m/z* 463. 0887 [M-H]<sup>-</sup> 峰的化合物, 显示 301. 0381 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup> 的主要碎片离子峰, 与金丝桃苷对照品相同, 由此确定 T<sub>R</sub>5.4 min 的代谢产物 M0 为金丝桃

苷。

#### 3.2.2 苷元还原产物 M1 的鉴定

由 Metabolite Detect 对样品及空白图谱处理后得到的差异图谱中可知, 在 5.6 min 处存在 *m/z* 303. 0543 [M-H]<sup>-</sup> 峰的化合物, 显示 285 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> 的主要碎片离子峰, 与花旗松素对照品相同, 确定 T<sub>R</sub>5.6 min 的 M1 为槲皮素 C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 双键加氢还原产物, 即花旗松素。

#### 3.2.3 苷元羟基化产物 M2 的鉴定

由 Metabolite Detect 对样品及空白图谱处理后得到的差异图谱中可知, 在 6.6 min 处存在 *m/z* 317. 0321 [M-H]<sup>-</sup> 峰的化合物, 由 Smart Formula 预测其化学式为 C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>8</sub>, 推测 T<sub>R</sub>6.6 min 的代谢产物

M2 为槲皮素的羟基化代谢产物。

### 3.2.4 脱糖产物(苷元)M3 的鉴定

由 Metabolite Detect 对样品及空白图谱处理后得到的差异图谱中可知,在 8.0 min 处存在  $m/z$  301.0381 [M-H]<sup>-</sup> 峰的化合物,与槲皮素对照品相

同,由此确定  $T_R$  8.0 min 的代谢产物 M3 为金丝桃苷脱糖后得苷元,即槲皮素。

### 3.3 金丝桃苷代谢物信息汇总表

经 Metabolite Detect 处理后,检测到的大鼠肠道菌液样品中金丝桃苷的代谢产物见表 1。

表 1 金丝桃苷在大鼠肠道菌群孵育液中的代谢物

Table 1 Summary of metabolites identification of hyperoside in rat incubation medium of intestinal flora with mass defect filtering

No. 代谢物	Metabolic pathway 代谢途径	$m/z$ Found 相对分子质量	Mode 模式	PPM 误差	RT/min 滞留时间	Formula 分子式
M0	parent	463.0887	[M-H] <sup>-</sup>	1.4	5.4	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>
M1	degalactoside + reduction	303.0543	[M-H] <sup>-</sup>	2.6	5.6	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>
M2	degalactoside + hydroxylation	317.0305	[M-H] <sup>-</sup>	1.9	4.5	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>
M3	degalactoside	301.0381	[M-H] <sup>-</sup>	-5.0	8.0	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>

### 3.4 金丝桃苷代谢物及可能的代谢途径

根据上述分析,推测金丝桃苷代谢产物及其可能的代谢途径如图 2。

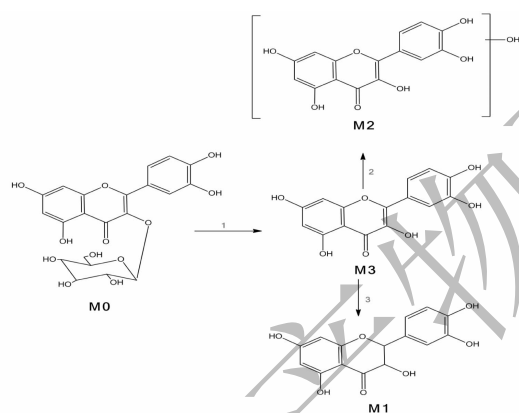


图 2 金丝桃苷在大鼠肠道菌群中的主要代谢物及其可能的生物转化途径 1:脱糖;2:羟基化;3:C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 双键还原

Fig. 2 The major metabolites of quercetin-3-O-galactoside and possible biotransformation pathways. 1:degalactoside 2;hydroxylation;3:reduction

## 4 讨论

中药绝大多数通过口服吸收而发挥作用,中药成分在进入胃肠道之后不可避免地与胃液及肠道菌群发生关联,某些成分经相应细菌的作用发生代谢后被吸收,较小部分的成分则以原型物直接被吸收。肠内菌群种类多,含酶丰富。中药成分的肠道代谢主要是利用肠内菌群中特定的酶将成分进行代谢或

生物转化<sup>[12]</sup>。大部分黄酮类化合物经口服给药后,因首过效应导致其生物利用度较低,肠道菌群中占 99% 以上的厌氧菌对它的转化起到决定性作用<sup>[13]</sup>,在其生长代谢过程中会产生许多酶,黄酮类化合物在酶的作用下降解,并发生水解,去羟基、还原等反应,肠道细菌对黄酮类化合物的代谢作用可以改善水溶性和生物利用度<sup>[14]</sup>,从而提高黄酮类化合物的生物利用度。

本实验采用体外大鼠肠道菌群孵育法,能在较短的时间内得到大量的代谢产物,比较方便解决复杂药物代谢研究的问题,代谢环境易于控制,代谢体系比较纯净,在代谢物结构鉴定方面具有较大的优势<sup>[15]</sup>,本实验通过 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS 与 Metabolite Predict 及 Metabolite Detect 结合使用,从复杂生物基质中快速有效地寻找药物可能的代谢产物,能够更好的提高效率,获得更加丰富的信息,能作为中药代谢研究的实用模式,也被认为是代谢研究的“第一线”方法<sup>[16-18]</sup>。本研究中金丝桃苷在大鼠肠道菌群中主要以脱糖基反应为主,苷元槲皮素进一步发生还原、羟基化反应,促进吸收,提高药效。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基础提供参考<sup>[19]</sup>。

### 参考文献

- Lin P(林萍), Yi HW(易宏伟), Zhang F(张斐), et al. Pharmacological research progress of the hyperin. *Modern Chinese Medicine*(中国现代中药), 2012, 14(10): 23-26.

- 2 Lu XJ (鲁小杰), Huang ZM (黄正明), Yang XB (杨新波), *et al.* Liver protective effects of hyperin on duck hepatitis B virus infection. *Pharm Clin Chin Materia Medica*(中药药理与临床), 2007, 23(2): 10-12.
- 3 Gen M(耿淼), Wang JH(王建华), Chen HY(陈红艳), *et al.* Effects of hyperin on the cccDNA of duck hepatitis B virus and its immunological regulation. *Acta Pharm Sinica*(药学报), 2009, 44: 1440-1444.
- 4 Wu LL, Yang XB, Huang ZM, *et al.* In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L.) medic. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28: 404-409.
- 5 Ai G, Liu QC, Hua W, *et al.* Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from *Abelmoschus manihot* (L.) Medic; *In vivo* and in vitro studies. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146: 794-802.
- 6 Tang M (唐敏), Liu Y (刘耀), Xia PY (夏培元), *et al.* Protective effect of hyperfine on acute liver injury in rats induced by CC<sub>14</sub>. *China Pharmacy*(中国药房), 2011, 22: 582-583.
- 7 Wang QH(王启海), Chen ZW(陈志武) *et al.* The study of abdominal aorta relaxant effect and its mechanism for hyperin on isolated rat. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41: 766-770.
- 8 Yang W(杨武), Hou J(侯佳), Lu Y(陆苑), *et al.* Intestinal absorption kinetics of *Polygonum capitatum* extract in rats. *China J Chin Mate Med*(中国中药杂志), 2015, 40: 4281-4287.
- 9 Xue CF(薛彩福), Guo JM(郭建明), Qian DW(钱大玮), *et al.* Absorption of flavonoids from *Abelmoschus manihot* extract by in situ intestinal perfusion. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2011, 46(4): 454-459.
- 10 Lin WZ(林文振), Li KP(李坤平), Zeng YP(曾玉平), *et al.* Analysis of the Metabolites of Isorhamnetin-3-O-p-D-Rutinoside in Rat Intestinal Flora in vitro by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. *Chin J Experimental Tradit Med Formulae*(中国实验方剂学志), 2012, 18: 140-143.
- 11 Song R(宋瑞), Tian Y(田媛), Zhang ZJ(张尊建), *et al.* Comparison of transformation of four processed rhubarb aqueous extracts in intestinal bacteria *in vitro*. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37: 1755-1760.
- 12 Liu B(刘斌). Chinese Native Medicine Ingredient Metabolic Research and Analysis. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011. 3.
- 13 Hang HQ(杭汉强), Chen XH(陈香花), *et al.* The biotransformation of intestinal microflora and flavonoids. *Chinese J Current Practical Med*, (中国现代实用医学杂志), 2006, 5(3): 30.
- 14 Pan YP(潘亚平), Zhang ZH(张振海), Ding DM(丁冬梅), *et al.* Advance in studies on biotransformation of flavonoids by intestinal bacteria. *China J Chin Mate Med*(中国中药杂志), 2013, 38: 3239-3245.
- 15 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 Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(1): 202.
- 16 Russell J, Desmond O, Jose M. *et al.* Accelerated throughput metabolic route screening in early drug discovery using high-resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated data analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19: 2659-2670.
- 17 Philip R, Sean Yu, Kevin P. *et al.* Fractional mass filtering as a means to assess circulating metabolites in early human clinical studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22: 3510-3516.
- 18 Lekha Sleno. The use of mass defect in modern mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2012, 47: 226-236.
- 19 Yang XW(杨秀伟). Key foundational science problem in experimental medicine study of Chinese materia medica: ascertainment of active and toxic constituents from Chinese materia medica. *J Chin Integrative Med*(中西医结合学报), 2005, 3(2): 154.