

## UPLC-Q-trap-MS 鉴定白头翁皂苷 D 在大鼠离体肠道菌群中的代谢产物

欧阳辉<sup>1,2,3</sup>, 郭宜城<sup>2,3</sup>, 何明珍<sup>2,3</sup>, 梁起栋<sup>2,3</sup>, 饶小勇<sup>2,3</sup>, 冯育林<sup>2,3\*</sup>, 简晖<sup>2,3</sup>, 杨世林<sup>1,2,3</sup>

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

**摘要:** 目的 鉴定白头翁皂苷 D 在大鼠离体肠道菌群体外代谢产物。方法 运用超高效液相色谱-三重四级杆线性离子阱复合质谱 (UPLC-Q-trap-MS) 分析白头翁皂苷 D 体外肠道菌群孵育样品, 采用 Analyst 1.5 软件进行数据处理, 根据保留时间和各色谱峰质谱裂解规律, 比较确定白头翁皂苷 D 在体外肠道菌群中代谢产物, 同时根据质谱二级裂解规律对代谢产物结构进行推测。结果 在大鼠离体肠道菌群孵育样品中鉴定了白头翁皂苷 D (M0) 原型及常春藤皂苷元 3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷 (M1)、常春藤皂苷元 3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷 (M2)、常春藤皂苷元 (M3)、白头翁皂苷 D 羟基化 (M4)、白头翁皂苷 D 甲基化产物 (M5、M6)、白头翁皂苷 D 脱氢产物 (M7) 等 7 个代谢产物。结论 白头翁皂苷 D 能够在离体肠道菌群中发生广泛的代谢。

**关键词:** 超高效液相色谱-三重四级杆线性离子阱复合质谱; 白头翁皂苷 D; 肠道菌群; 代谢产物

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0523-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.013

## Identification of metabolites of *Pulsatilla* saponin D in intestinal microflora of rats *in vitro* by UPLC-Q-trap-MS

OUYANG Hui<sup>1,2,3</sup>, GUO Yi-cheng<sup>2,3</sup>, HE Ming-zhen<sup>2,3</sup>, LIANG Qi-dong<sup>2,3</sup>, RAO Xiao-yong<sup>2,3</sup>, FENG Yu-lin<sup>2,3</sup>, JIAN Hui<sup>2,3</sup>, YANG Shi-lin<sup>1,2,3</sup>

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

**Abstract: Objective** To identify the metabolites of *Pulsatilla* saponin D (PSD) in the intestinal microflora of rats *in vitro*. **Methods** The sample of PSD incubated in intestinal microflora of rats *in vitro* was analyzed by a ultraperformance liquid chromatography/hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry (UPLC-Q-trap-MS). The data were processed with Analyst 1.5 software, and the metabolites of PSD were confirmed by comparing the retention time and MS/MS spectra. The possible structures of metabolites were proposed by analyzing the proposed fragmentation pathway. **Results** PSD (M0, parent) and seven metabolites were identified, including hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinosyl (M1), hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-arabinosyl (M2), hederagenin (M3), hydroxylation of PSD (M4), methylation of PSD (M5 and M6), and dehydrogenation of PSD (M7). **Conclusion** PSD has a wide range of metabolic in the intestinal microflora of rats *in vitro*.

**Key words:** UPLC hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry; *Pulsatilla* saponin D; intestinal microflora; metabolites

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 的干燥根, 为常用中药; 具有清热解 毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效; 临床上用于治疗 细菌性痢疾、阿米巴痢疾、妇科阴道炎等<sup>[1]</sup>。近年

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX111102); 江西省优势科技创新团队计划项目 (2010DQB01700); 江西省自然科学基金项目 (20114BAB215045); 江西省教育厅产学研合作项目 (GJJ11006)

作者简介: 欧阳辉 (1981—), 博士研究生, 讲师, 研究方向为中药活性成分。Tel: (0791)87119632 E-mail: huiouyang@163.com

\*通信作者 冯育林 Tel: (0791)87119632 E-mail: fengyulin2003@126.com

来白头翁皂苷的抗肿瘤活性也引起了广泛的关注<sup>[2]</sup>, 本课题组前期研究发现白头翁皂苷 D 为白头翁皂苷抗肿瘤的主要活性成分之一<sup>[3]</sup>, 其化学名为常春藤皂苷元 3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2) [ $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷, 结构式见图 1。由于皂苷类成分普遍生物利用度较低, 易于发生肠道菌群代谢<sup>[4]</sup>, 因此研究白头翁皂苷 D 在体外肠道菌群中的代谢产物对于了解白头翁皂苷 D 的活性机制具有很重要的意义, 本实验利用超高效液相色谱-三重四级杆线性离子阱复合质谱(UPLC-Q-trap-MS)对白头翁皂苷 D 在大鼠离体肠道菌群中的代谢产物进行研究, 为进一步了解白头翁皂苷 D 的体内代谢过程提供参考。

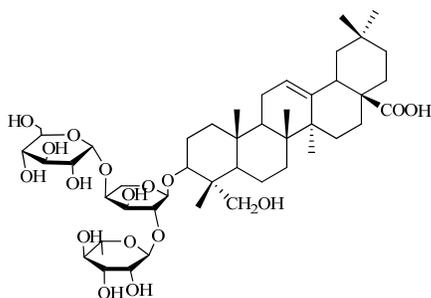


图 1 白头翁皂苷 D 结构式

Fig. 1 Structure of PSD

## 1 材料

### 1.1 仪器

Q-trap 4500 型三重四级杆线性离子阱质谱联用仪(美国 AB SCIEX 公司); 超高效液相 EksperultraLC 100—XL, 含在线真空脱气机, 高压四元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱(美国 AB SCIEX 公司); Analyst1.5 数据处理系统(美国 AB SCIEX 公司); Thome legend micro 17R 型离心机(德国赛默飞世尔公司); MTV—100 型多管漩涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司); MTN—28000 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); Sartorius BT25S 型十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司); KQ—500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 自动细菌鉴别仪(美国 BD 公司); 湿热灭菌器(上海艾测电子科技有限公司); 厌氧培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

厌氧液体培养基(北京陆桥技术有限责任公司), 白头翁皂苷 D(自制, 质量分数>98%), 乙腈、甲醇为色谱纯(Fisher 公司), 水为 Milli—Q

系统纯化水, 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SD 雄性大鼠, 体质量(250 $\pm$ 10) g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 动物许可证号 SCXK(京)2012-0001, 适应性喂养 1 周后开始实验。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters-SunFire C<sub>18</sub> 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m), 流动相为含 0.1% 甲酸超纯水(A)—乙腈(B), 梯度洗脱: 0~3 min, 10% B, 3~15 min, 40% B; 15~25 min, 90% B; 25~30 min, 10% B。体积流量为 0.25 mL/min, 柱温箱控温为 40  $^{\circ}$ C, 进样体积为 5  $\mu$ L。

### 2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源, 喷雾电压(IS)为-4 500 V, 雾化气温度(TEM)为 600  $^{\circ}$ C, 气帘气(CUR)为 206.85 kPa, 雾化气(GS1)和辅助气(GS2)为 50 344.75 kPa; 检测方式为负离子检测(Negative); 扫描方式为增强母离子触发的增强子离子扫描(EMS-IDA-EPI)以及中性丢失扫描(162、146)触发的 EPI 扫描(NL-IDA-EPI)两种扫描模式; 去簇电压(DP)为-150 V, 碰撞能量(CE): -69 eV, 碰撞能量叠加(CES):  $\pm$ 15 eV, 扫描范围  $m/z$  400~1 200。

### 2.3 体外肠道菌群代谢样品的采集与处理

**2.3.1 肠道菌群液采集** 取新鲜 SD 雄性大鼠粪便, 按 1 g 粪便加 4 mL 水的比例加入捣碎搅匀, 制成匀浆, 离心, 取上清液即为肠道菌群液, 用前保存在-80  $^{\circ}$ C 冰箱。

**2.3.2 厌氧液体培养基** 取 46 g 厌氧培养基, 加入 1 000 mL 蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 封口, 120  $^{\circ}$ C 湿热灭菌 15 min, 分装备用。

**2.3.3 肠道菌群的培养** 肠道菌液 40 mL 加入厌氧液体培养基 200 mL, 于恒温 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h, 使菌充分生长分装, 作为孵育液待用。

**2.3.4 白头翁皂苷 D 肠道菌群孵育** 6 mL 孵育液中加入 1 mg/mL 白头翁皂苷 D 水溶液 2 mL, 至恒温厌氧培养箱, 在厌氧的条件下孵育 24 h。

**2.3.5 样品处理** 白头翁皂苷 D 肠道菌群孵育液及空白孵育液, 15 000 r/min 离心 5 min, 取 500  $\mu$ L 上清液, N<sub>2</sub> 吹干, 500  $\mu$ L 初始比例流动相复溶, 取 5  $\mu$ L 进行质谱分析。

### 2.4 体外肠道菌群代谢产物分析

取白头翁皂苷 D 在体外肠道菌群孵育液空白样及孵育样品, 在相同的色谱条件下进样分析, 采用 Analyst 1.5 软件进行数据处理, 根据保留时间和各色谱峰质谱数据, 比较并鉴定白头翁皂苷 D 在体外肠道菌群中的代谢产物。

## 3 结果

### 3.1 白头翁皂苷 D 的裂解规律

白头翁皂苷 D 的苷元相对比较稳定, 其准分子离子峰  $m/z$  911.5  $[M-H]^-$  相对较强, 白头翁皂苷 D 有  $m/z$  749.5、603.4、471.4 等 3 个主要的碎片离子峰, 遵循  $[M-H-162]^-$ 、 $[M-H-162-146]^-$ 、 $[M-H-162-146-132]^-$  的裂解方式, 依次为白头翁皂苷 D 脱去葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖的  $[M-H]^-$  峰。

### 3.2 体外肠道菌群代谢产物的结构解析

由于肠道菌群代谢样品中内源性干扰影响较大, 根据白头翁皂苷 D 结构及其可能代谢物的特点, 用 EMS (增强母离子扫描) 触发的 EPI (增强子离子扫描) 和中性丢失扫描 (162、146) 触发的 EPI 2 种扫描模式, 进行扫描检测。结合白头翁皂苷 D 和代谢产物形成的分子离子峰及各碎片离子, 在肠道菌群代谢样品中鉴定原型及 7 个代谢产物, 分别为白头翁皂苷 D (M0)、常春藤皂苷元 3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷 (M1)、常春藤皂苷元 3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷 (M2)、常春藤皂苷元 (M3)、白头翁皂苷 D 羟基化产物 (M4)、白头翁皂苷 D 甲基化产物 (M5、M6)、白头翁皂苷 D 脱氢产物 (M7), 结果见表 1。白头翁皂苷 D 的孵育液样品总离子流图见图 2。

表 1 白头翁皂苷 D 在大鼠体外肠道菌群中代谢产物的 MS/MS 分析结果

Table 1 MS/MS analysis on metabolites of PSD in intestinal microflora of rats *in vitro*

编号	$t/min$	$[M-H]^-$	主要碎片离子	裂解特征	结构推测
M0	11.07	911.5	749.6, 603.4, 471.4	749.6, 603.4, 471.4	白头翁皂苷 D
M1	13.84	749.4	603.1, 471.3, 423.3	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 少 162 (glc), 其余碎片相同	常春藤皂苷元 3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷
M2	11.74	765.4	603.4, 471.4, 423.4	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 少 146 (rha), 其余碎片相同	常春藤皂苷元 3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷
M3	17.84	471.4	471.4, 423.4	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 少 440 (glc+rha+ara), 其余碎片相同	常春藤皂苷元
M4	10.65	927.5	765.5, 619.4, 497.2	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 多 16 (O)	白头翁皂苷 D 羟基化产物 (glc+rha+ara), 其余碎片均多 16
M5	11.22	925.5	763.4, 617.4, 485.4	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 多 14 ( $CH_2$ ), 其余碎片均多 14	白头翁皂苷 D 甲基化产物
M6	10.64	925.4	763.5, 617.4, 485.4	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 多 14 ( $CH_2$ ), 其余碎片均多 14	白头翁皂苷 D 甲基化产物
M7	10.96	909.5	747.4, 601.4, 469.3	$[M-H]^-$ 峰比白头翁皂苷 D 少 2 (2H), 其余碎片均少 2	白头翁皂苷 D 脱氢产物

## 4 讨论

本课题组前期的研究表明, 白头翁皂苷 D 的口服生物利用度在 5% 以下, 但是药效实验表明白头翁皂苷 D 的抗肿瘤活性很明显<sup>[3]</sup>, 因此, 白头翁皂苷的代谢产物很有可能是其起效物质, 由于口服药物必须要经过胃肠道, 研究证实, 肠道细菌的苷键水解酶系对皂苷的苷键进行水解是造成皂苷生物利用度低的原因之一<sup>[5]</sup>, 本实验已经基本证实了白头翁皂苷 D 在体外肠道菌群中发生脱糖代谢

及羟基化、甲基化、脱氢等代谢反应, 但是到底这些代谢产物是否为白头翁皂苷 D 产生活性的物质基础, 正在进行更深入的体内代谢研究。

代谢产物鉴定对检测仪器灵敏度要求很高, 有文献报道采用 HPLC-DAD 以及 HPLC-DAD-MS<sup>[6-7]</sup> 等方法测定代谢产物, 由于扫描方式比较单一, 极大地限制了代谢产物鉴定的效率。三重四级杆线性离子阱质谱联用仪具有扫描方式多样化、灵敏度高的特点, 一次扫描完成代谢产物的发现及识别。如

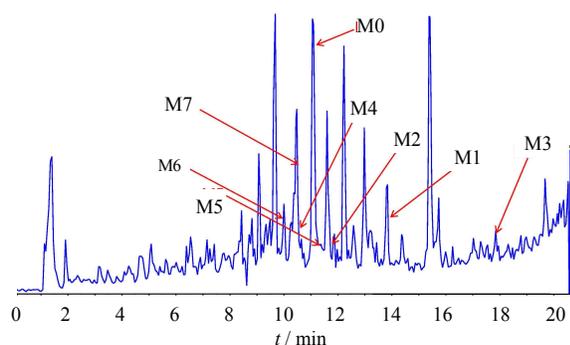


图2 白头翁皂苷D肠道菌群孵育液总离子流图

Fig. 2 TIC Spectra of PSD incubated by intestinal microflora

本研究中用到的增强母离子触发的增强子离子扫描(EMS-IDA-EPI)以及中性丢失扫描(162、146)触发的(NL-IDA-EPI)2种扫描模式,前者能够对代谢产物进行全景扫描,后者能够根据白头翁皂苷D所连接所连接的2个糖(葡萄糖162、鼠李糖146)产生的特异性的中性丢失发现代谢产物,并由此触发EPI(增强子离子扫描),产生二级质谱(MS/MS),一次性完成代谢产物的发现和结构鉴定,这对今后代谢产物的发现和识别具有很重要的指导意义。

#### 参考文献

- [1] 李勇, 林翠英. 白头翁属植物化学成分及活性研究概述 [J]. 天津中医药, 2005, 22(6): 526-528.
- [2] Cai Y, Tang Y M, Liang B W. Experimental studies on antitumor effects of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel *in vitro* [J]. *Herb Drugs*, 1999(30): 441-443.
- [3] Xu Q M, Shu Z, He W J, *et al.* Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7240 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19: 293-300.
- [4] 夏小燕, 居文政, 谈恒山. 肠道菌群对中药皂苷类成分的代谢研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(2): 96-98.
- [5] 冯培生, 沈建忠, 吴海霞, 等. 体外大鼠肠道菌群代谢脱氧雪腐镰刀菌烯醇的研究 [J]. 分析化学, 2012, 40(1): 119-123.
- [6] 夏宏军, 朱珊, 梁键谋, 等. 大鼠灌胃灯盏花素后血浆、胆汁、尿液以及粪便中代谢产物的鉴定 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1362-1366.
- [7] 陈丽红, 范慧佳, 唐于平, 等. 葛根苓连配方颗粒在大肠湿热证模型大鼠尿液中的代谢产物研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1570-1573.