·基础研究·

金莲花中 5 个黄酮类化合物的大鼠体内代谢研究△

刘斯琪，彭玉帅，郭丽娜，陶志，王莎，王如峰*
北京中医药大学 生命科学学院，北京　102488

［摘要］　**目的：**研究金莲花中 5 个黄酮类化合物的体内代谢产物。**方法：**将荭草素、荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷、牡荆素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、异槲皮素分别以静脉注射的方式给予大鼠，给药 10 min 后取血，利用高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)对血浆中的代谢产物进行分析。**结果：**大鼠体内共检测到 20 个代谢产物，其中 5 个来源于荭草素、2 个来源于荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷、3 个来源于牡荆素、5 个来源于 2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、5 个来源于异槲皮素。通过准分子离子峰及二级碎片推测 20 个代谢产物的结构及 5 个原型化合物的代谢规律。**结论：**5 个黄酮类成分均可以通过氧化、甲基化、硫酸酯结合、葡萄糖醛酸结合等Ⅰ相及Ⅱ相代谢过程代谢为相应的产物。

［关键词］　金莲花；黄酮类化合物；代谢产物；荭草素；荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷；牡荆素；2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素；异槲皮素

［中图分类号］　R284；R285　　［文献标识码］　A　　［文章编号］　1673-4890(2021)05-0792-08

doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20200708008

Metabolism of Five Flavonoids from Flowers of *Trollius chinensis* in Rats

LIU Si-qi，PENG Yu-shuai，GUO Li-na，TAO Zhi，WANG Sha，WANG Ru-feng*
School of Life Sciences，*Beijing University of Chinese Medicine*，*Beijing* 102488，*China*

［**Abstract**］　**Objective**：To study the metabolites of 5 flavonoids from the flowers of *Trollius chinensis in vivo*. **Methods**：Five typical flavonoid compounds from the flowers of *T. chinensis* including orientin，2″-*O*-*β*-*L*-galactopyranosylorientin，vitexin，2″-*O*-(2‴-methylbutanoyl) vitexin and isoquercetin were administrated intravenously and the rat plasma samples were obtained 10 min after administration. The high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was used to investigate the metabolites in rat plasma. **Results**：A total of 20 metabolites had been identified and 5 of them were from orientin，2 of them were from 2″-*O*-*β*-*L*-galactopyranosylorientin，3 of them were from vitexin，5 of them were from 2″-*O*-(2‴-methylbutanoyl) vitexin and 5 of them were from isoquercetin，respectively. The structures of 20 metabolites and the metabolic pathways of 5 flavonoids were speculated on the basis of pseudo-molecular ion peaks and secondary fragments. **Conclusion**：Five compounds could be metabolized into the corresponding metabolites through phase Ⅰ and Ⅱ reactions involving oxidation，methylation，sulfating，glucuronidation，and so on.

［**Keywords**］　*Trollius chinensis* Bunge；flavonoids；metabolites；orientin；2″-*O*-*β*-*L*-galactopyranosylorientin；vitexin；2″-*O*-(2‴-methylbutanoyl) vitexin；isoquercetin

金莲花为毛茛科多年生草本植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花，由于其具有抗病毒、抗菌、抗炎等药理活性被广泛用于治疗咽炎、扁桃体炎、急性中耳炎和急性淋巴管炎等疾病[1-3]。金莲花中的主要化学成分为黄酮类、酚酸类和生物碱类物质[2,4]。其中黄酮类物质中大部分为黄酮碳苷，即黄酮骨架的 C-8 通过 C-C 键与糖基相连，包括荭草素、牡荆素、异当药黄素、荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷、牡荆素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)荭草素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、荭草素-6‴-(3-羟基-3-甲基戊二酸)-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷(荭草素-6‴-HMG-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷)、牡荆素-6‴-HMG-2″-*O*-

△［基金项目］　国家自然科学基金面上项目(81274044)
*［通信作者］　王如峰，教授，研究方向：中药化学；Tel：(010)84738646，E-mail：wangrufeng@ tsinghua. org. cn

β-*L*-半乳糖苷、金莲花碳苷Ⅰ～Ⅲ等[5-8]。除此之外还有黄酮氧苷，如槲皮素和异槲皮素[9]。

中药药效是多成分多靶点的协同效应和多成分单靶点叠加效应的共同结果，并且中药的成分需要被吸收入血后才能够到达相应的靶器官发挥作用，因此真正起效的应该是血液中的原型成分和代谢产物[10]。目前研究认为，金莲花中的主要化学成分是黄酮类化合物[11]，但其在体内真正起效的成分依然不明确。鉴于此，本研究采用高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)对金莲花中 5 个典型的黄酮类化合物体内代谢产物及代谢途径进行研究，以期进一步明确金莲花中所含主要物质在体内的代谢过程，为合理用药提供参考。

1　材料

1.1　仪器与试药

1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)；LTQ ORBTTRAP XL 型质谱仪(美国 Thermo 公司)；甲酸、乙腈(色谱纯，美国 Fisher 公司)；1，2-丙二醇、水合氯醛(分析纯，中国医药集团有限公司)；荭草素、荭草素-2″-*O*-β-*L*-半乳糖苷、牡荆素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、异槲皮素均为本实验室从金莲花中提取分离，经 HPLC 峰面积归一化法测定其纯度均大于 98%。

1.2　实验动物

清洁级 SD 大鼠，体质量(200 ± 20) g，由北京斯贝福实验动物科技有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2011-0004。实验前禁食不禁水 24 h。

2　方法

2.1　色谱条件

Welch Ultimate C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm，5 μm)，有预柱；流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)，梯度洗脱条件分别为荭草素：0～9 min，5%～25% A；9～12 min，25% A；12～17 min，25%～45% A；17～24 min，45%～60% A；24～29 min，60%～80% A；29～31 min，80%～5% A；31～35 min，5% A。荭草素-2″-*O*-β-*L*-半乳糖苷：0～12 min，5%～25% A；12～15 min，25%～27% A；15～27 min，27%～45% A；27～30 min，45%～70% A；30～32 min，70%～5% A；32～35 min，5% A。牡荆素：0～6 min，5%～15% A；6～16 min，15%～35% A；16～20 min，35%～50% A；20～25 min，50%～80% A；25～27 min，80%～5% A；27～30 min，5% A。2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素：0～7 min，5%～25% A；7～18 min，25%～55% A；18～25 min，55%～80% A；25～27 min，80%～5% A；27～30 min，5% A。异槲皮素：0～20 min，5%～70% A；20～22 min，70%～5% A；22～25 min，5% A；流速为 1.0 mL·min^{-1}；进样量为 10 μL。

2.2　质谱条件

Accela 600 型泵；电喷雾离子源(ESI)；负离子扫描模式；扫描范围为 *m/z* 100～1000；毛细管温度为 350 ℃；毛细管电压为 −35 V；气化温度为 300 ℃；鞘流气体积流量为 17 L·min^{-1}。

2.3　药品制备

精密称定荭草素-2″-*O*-β-*L*-半乳糖苷，超声溶解于水中。精密称定荭草素、牡荆素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、异槲皮素，用 30% 1，2-丙二醇水溶液超声溶解。荭草素、荭草素-2″-*O*-β-*L*-半乳糖苷、牡荆素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、异槲皮素终质量浓度分别为 1.60、3.00、1.00、3.00、1.25 mg·mL^{-1}。

2.4　给药及采血

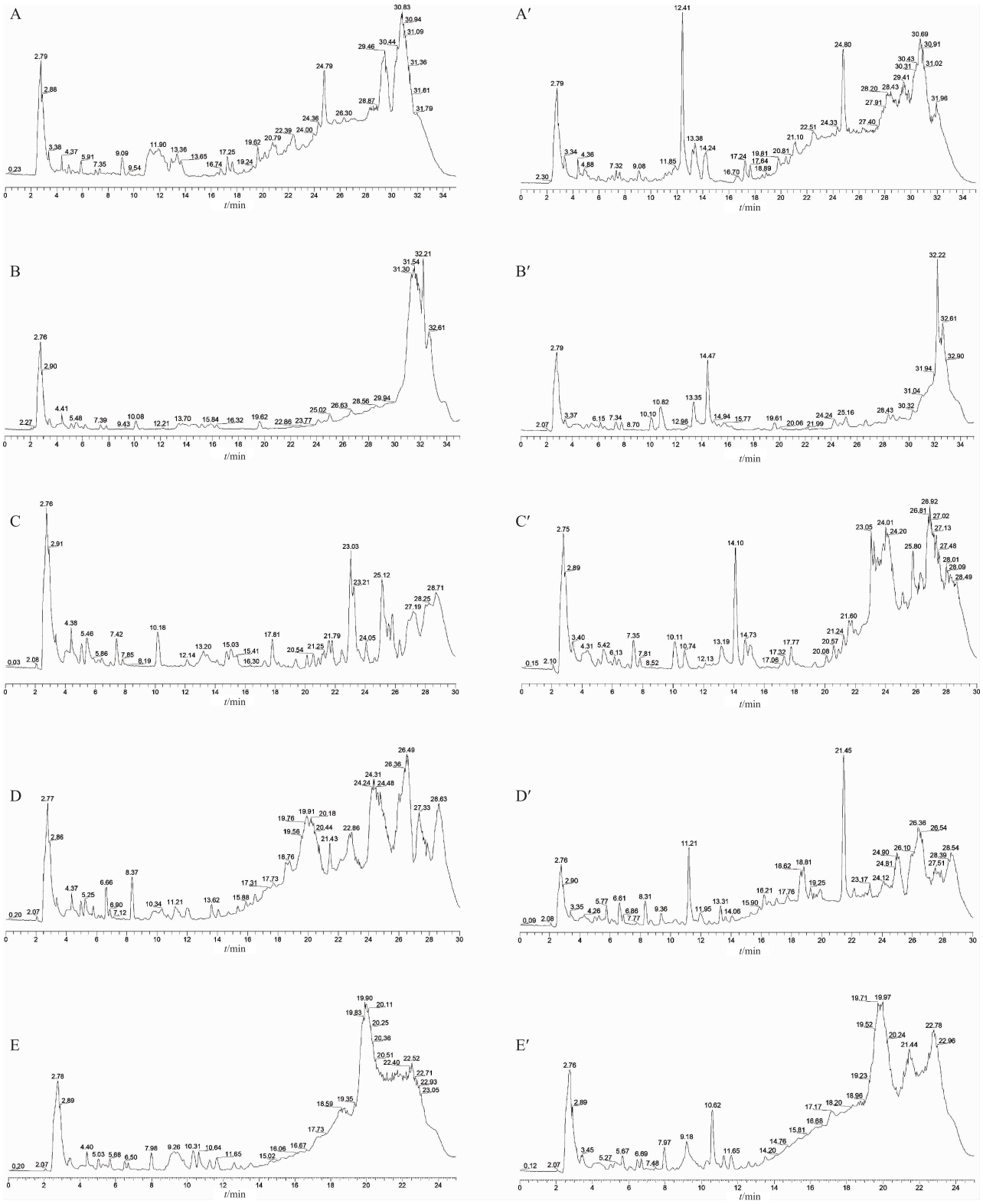
大鼠随机分为 5 组，每组 10 只，其中 5 只为给药组，5 只为空白组。荭草素、荭草素-2″-*O*-β-*L*-半乳糖苷、牡荆素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素、异槲皮素分别按照 10.00、15.00、6.25、15.00、7.50 mg·kg^{-1}尾静脉注射给药，各对照组给予相同体积的蒸馏水，给药后 10 min 眼眶静脉丛取血。

2.5　样品处理

取血后静置 30 min，5000 r·min^{-1}离心 10 min(离心半径为 11.5 cm)。各组取空白血清和含药血清各 500 μL，分别加入 3 倍体积的乙腈涡旋混匀，沉淀蛋白，12 000 r·min^{-1}离心 15 min(离心半径为 6.6 cm)。吸取上清液 1700 μL，于 40 ℃氮气吹干，再用甲醇 170 μL 复溶。超声溶解 2 min，12 000 r·min^{-1}离心 15 min(离心半径为 6.6 cm)。吸取上清液过 0.45 μm 滤膜，备用。

3　结果

各组样品的 HPLC-MS/MS 总离子流图见图 1，原型成分及代谢产物结构式见图 2～3，原型成分及代谢产物的碎片信息见表 1～2。



注：A. 荭草素组空白血清；A′. 荭草素组含药血清；B. 荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷组空白血清；B′. 荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷组含药血清；C. 牡荆素组空白血清；C′. 牡荆素组含药血清；D. 2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素组空白血清；D′. 2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素组含药血清；E. 异槲皮素组空白血清；E′. 异槲皮素组含药血清。

图 1　各组大鼠空白血清和含药血清的总离子流图

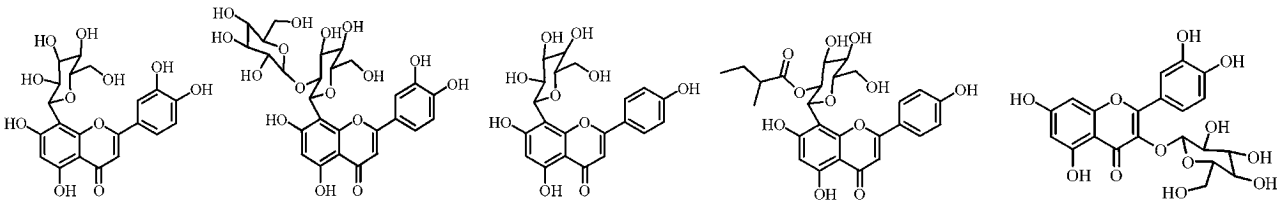


图 2　金莲花中 5 个原型成分结构式

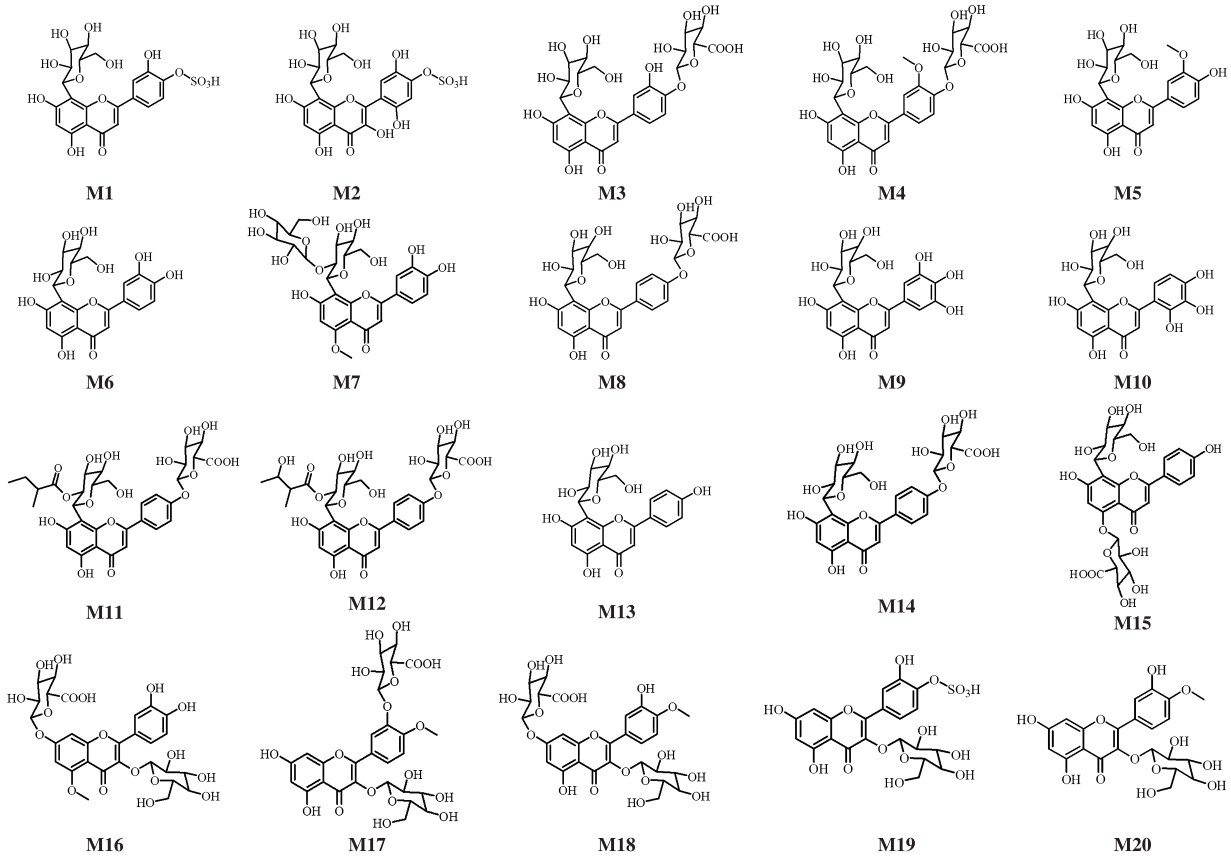


图 3　金莲花中 5 个原型成分在大鼠体内的代谢产物结构式

表 1　金莲花中 5 个原型成分质谱信息

原型成分	分子式	$[M-H]^-$ (m/z) 理论值	测定值	二级离子碎片(m/z)
荭草素	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.10	447.09	357.08$[M-C_3H_6O_3-H]^-$($[M-H-90]^-$),327.16$[M-C_4H_8O_4-H]^-$($[M-H-120]^-$)
荭草素 2″-O-β-L-半乳糖苷	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.15	609.15	519.22$[M-C_3H_6O_3-H]^-$($[M-H-90]^-$),489.18$[M-C_4H_8O_4-H]^-$($[M-H-120]^-$),429.17$[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$($[M-H-180]^-$),369.16$[M-C_8H_{16}O_8-H]^-$($[M-H-240]^-$),309.17$[M-C_{10}H_{20}O_{10}-H]^-$($[M-H-300]^-$),357.11$[M-C_9H_{16}O_8-H]^-$($[M-H-252]^-$),327.11$[M-C_{10}H_{18}O_9-H]^-$($[M-H-282]^-$),297.19$[M-C_{11}H_{20}O_{10}-H]^-$($[M-H-312]^-$)
牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.11	431.10	341.06$[M-C_3H_6O_3-H]^-$($[M-H-90]^-$),311.01$[M-C_4H_8O_4-H]^-$($[M-H-120]^-$),282.97$[M-C_4H_8O_4-CO-H]^-$($[M-H-148]^-$)
2″-O-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素	$C_{26}H_{28}O_{11}$	515.16	515.15	431.19$[M-C_5H_8O-H]^-$($[M-H-84]^-$),323.11$[M-C_8H_{14}O_4-H_2O-H]^-$($[M-H-192]^-$),293.06$[M-C_9H_{16}O_5-H_2O-H]^-$($[M-H-222]^-$)
异槲皮素	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.10	463.09	445.18$[M-H_2O-H]^-$($[M-H-18]^-$),343.04$[M-C_4H_8O_4-H]^-$($[M-H-120]^-$),300.99$[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$($[M-H-162]^-$),150.97$[M-C_{14}H_{16}O_8-H]^-$($[M-H-312]^-$)

表 2　金莲花中 5 个原型成分在大鼠体内的代谢产物质谱信息

代谢产物	分子式	$[M-H]^-$ (m/z)		二级离子碎片(m/z)
		理论值	测定值	
M1	$C_{21}H_{20}O_{14}S$	527.06	527.05	447.12 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$), 357.14 $[M-SO_3-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-170]^-$), 327.09 $[M-SO_3-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-200]^-$), 437.08 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$), 407.09 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$)
M2	$C_{21}H_{20}O_{16}S$	559.05	559.02	541.21 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 479.15 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$), 389.19 $[M-SO_3-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-170]^-$), 359.15 $[M-SO_3-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-200]^-$)
M3	$C_{27}H_{28}O_{17}$	623.13	623.13	533.13 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$), 503.08 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 447.17 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 356.97 $[M-C_9H_{14}O_9-H]^-$ ($[M-H-266]^-$), 327.02 $[M-C_{10}H_{16}O_{10}-H]^-$ ($[M-H-296]^-$)
M4	$C_{28}H_{30}O_{17}$	637.15	637.14	461.20 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 619.31 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 559.10 $[M-H_2O-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-78]^-$), 547.17 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$), 517.17 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 371.08 $[M-C_9H_{14}O_9-H]^-$ ($[M-H-266]^-$), 341.16 $[M-C_{10}H_{16}O_{10}-H]^-$ ($[M-H-296]^-$)
M5	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.12	461.11	371.10 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$), 341.10 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 285.24 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$)
M6	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.10	447.10	357.19 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$), 327.07 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$)
M7	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.17	623.17	463.23 $[M-C_9H_4O_3-H]^-$ ($[M-H-160]^-$), 443.07 $[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$ ($[M-H-180]^-$), 428.17 $[M-C_6H_{12}O_6-CH_3-H]^-$ ($[M-H-195]^-$), 503.08 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 371.17 $[M-C_9H_{16}O_8-H]^-$ ($[M-H-252]^-$), 341.03 $[M-C_{10}H_{18}O_9-H]^-$ ($[M-H-282]^-$)
M8	$C_{27}H_{28}O_{16}$	607.14	607.13	588.80 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 487.20 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 431.12 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 413.03 $[M-C_6H_8O_6-H_2O-H]^-$ ($[M-H-194]^-$), 311.11 $[M-C_{10}H_{16}O_{10}-H]^-$ ($[M-H-296]^-$)
M9	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.10	463.09	287.06 $[M-C_9H_4O_4-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 174.96 $[M-C_{12}H_{16}O_8-H]^-$ ($[M-H-288]^-$), 269.20 $[M-C_9H_6O_5-H]^-$ ($[M-H-194]^-$), 444.96 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$)
M10	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.10	463.09	287.06 $[M-C_9H_4O_4-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 174.96 $[M-C_{12}H_{16}O_8-H]^-$ ($[M-H-288]^-$), 269.20 $[M-C_9H_6O_5-H]^-$ ($[M-H-194]^-$), 444.96 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$)
M11	$C_{32}H_{36}O_{17}$	691.20	691.19	589.28 $[M-C_5H_8O-H_2O-H]^-$ ($[M-H-102]^-$), 515.29 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 413.15 $[M-C_{11}H_{16}O_7-H_2O-H]^-$ ($[M-H-278]^-$)
M12	$C_{32}H_{36}O_{18}$	707.19	707.18	689.21 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 531.12 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$)
M13	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.11	431.10	341.03 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$), 311.08 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 282.95 $[M-C_5H_8O_5-H]^-$ ($[M-H-148]^-$)
M14	$C_{27}H_{28}O_{16}$	607.14	607.13	589.16 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 486.96 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 431.04 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 413.21 $[M-C_6H_8O_6-H_2O-H]^-$ ($[M-H-194]^-$), 311.00 $[M-C_{10}H_{16}O_{10}-H]^-$ ($[M-H-296]^-$)
M15	$C_{27}H_{28}O_{16}$	607.14	607.13	589.26 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 487.26 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 431.17 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 413.37 $[M-C_6H_8O_6-H_2O-H]^-$ ($[M-H-194]^-$), 311.07 $[M-C_{10}H_{16}O_{10}-H]^-$ ($[M-H-296]^-$)
M16	$C_{28}H_{30}O_{18}$	653.14	653.14	477.17 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 315.15 $[M-C_{12}H_{18}O_{11}-H]^-$ ($[M-H-338]^-$), 300.21 $[M-C_{13}H_{21}O_{11}-H]^-$ ($[M-H-353]^-$)
M17	$C_{28}H_{30}O_{18}$	653.14	653.14	477.19 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 315.17 $[M-C_{12}H_{18}O_{11}-H]^-$ ($[M-H-338]^-$), 300.07 $[M-C_{13}H_{21}O_{11}-H]^-$ ($[M-H-353]^-$)
M18	$C_{28}H_{30}O_{18}$	653.14	653.14	477.12 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$), 315.04 $[M-C_{12}H_{18}O_{11}-H]^-$ ($[M-H-338]^-$), 300.16 $[M-C_{13}H_{21}O_{11}-H]^-$ ($[M-H-353]^-$), 342.14 $[M-C_{14}H_{15}O_8-H]^-$ ($[M-H-311]^-$)
M19	$C_{21}H_{20}O_{15}S$	543.05	543.05	524.86 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$), 380.94 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$), 301.08 $[M-C_6H_{10}O_5-SO_3-H]^-$ ($[M-H-242]^-$)
M20	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.11	477.11	462.15 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$), 449.23 $[M-CO-H]^-$ ($[M-H-28]^-$), 357.17 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$), 314.03 $[M-C_6H_{11}O_5-H]^-$ ($[M-H-163]^-$), 299.02 $[M-C_7H_{14}O_5-H]^-$ ($[M-H-178]^-$)

3.1　荭草素代谢产物

荭草素（*m/z* 447.09）共产生 5 种代谢产物。代谢产物 M**1**（*m/z* 527.05）存在二级碎片 *m/z* 447.12、437.08、407.09，提示其可能为硫酸酯结合产物。代谢产物 M**2**（*m/z* 559.02）存在二级碎片 *m/z* 479.15，表明其可能为硫酸酯结合产物，并且根据其相对分子质量、分子式及其他二级碎片可推断 M**2** 在 M**1** 的基础上又发生了 2 个位置的羟基化反应。代谢产物 M**3**（*m/z* 623.13）存在二级碎片 *m/z* 447.17、533.13、503.08，表明其为葡萄糖醛酸结合产物。代谢产物 M**4**（*m/z* 637.14）存在二级碎片 *m/z* 461.20、547.17、517.17，表明其为甲基化和葡萄糖醛酸结合产物，结合位置为黄酮母核。代谢产物 M**5**（*m/z* 461.11）存在二级碎片 *m/z* 371.10、341.10，说明其为甲基化产物。

3.2　荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷代谢产物

荭草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷（*m/z* 609.15）共产生 2 种代谢产物。根据代谢产物 M**6**（*m/z* 447.10）的二级碎片 *m/z* 357.19 和 327.07 可推断 M**6** 为 *O*-苷键断裂后产生的荭草素。代谢产物 M**7**（*m/z* 623.17）存在二级碎片 *m/z* 443.07 和 428.17，表明其可能为甲基化产物，*m/z* 371.17 和 341.03 提示甲基结合在黄酮母核上，并且 *m/z* 463.23 提示发生了逆狄尔斯-阿德尔反应（RDA）。据此进一步推断甲基是结合于 A 环，又因 5-OH 的结合能力强于 7-OH，推断结合位置为 5-OH。

3.3　牡荆素代谢产物

牡荆素（*m/z* 431.10）共产生 3 种代谢产物。代谢产物 M**8**（*m/z* 607.13）存在二级碎片 *m/z* 431.12，说明发生了葡萄糖醛酸结合反应；同时碎片 *m/z* 558.80、487.20、413.03、311.11 进一步证明了此推断。代谢产物 M**9**（*m/z* 463.09）和 M**10**（*m/z* 463.09）为同分异构体，根据二级碎片及相对分子质量推测两者均为羟基化产物。两者存在互补二级碎片 *m/z* 287、175，该碎片来源于 RDA 裂解，据此推断羟基化发生于黄酮母核的 B 环。

3.4　2″-*O*-（2‴-甲基丁酰基）牡荆素代谢产物

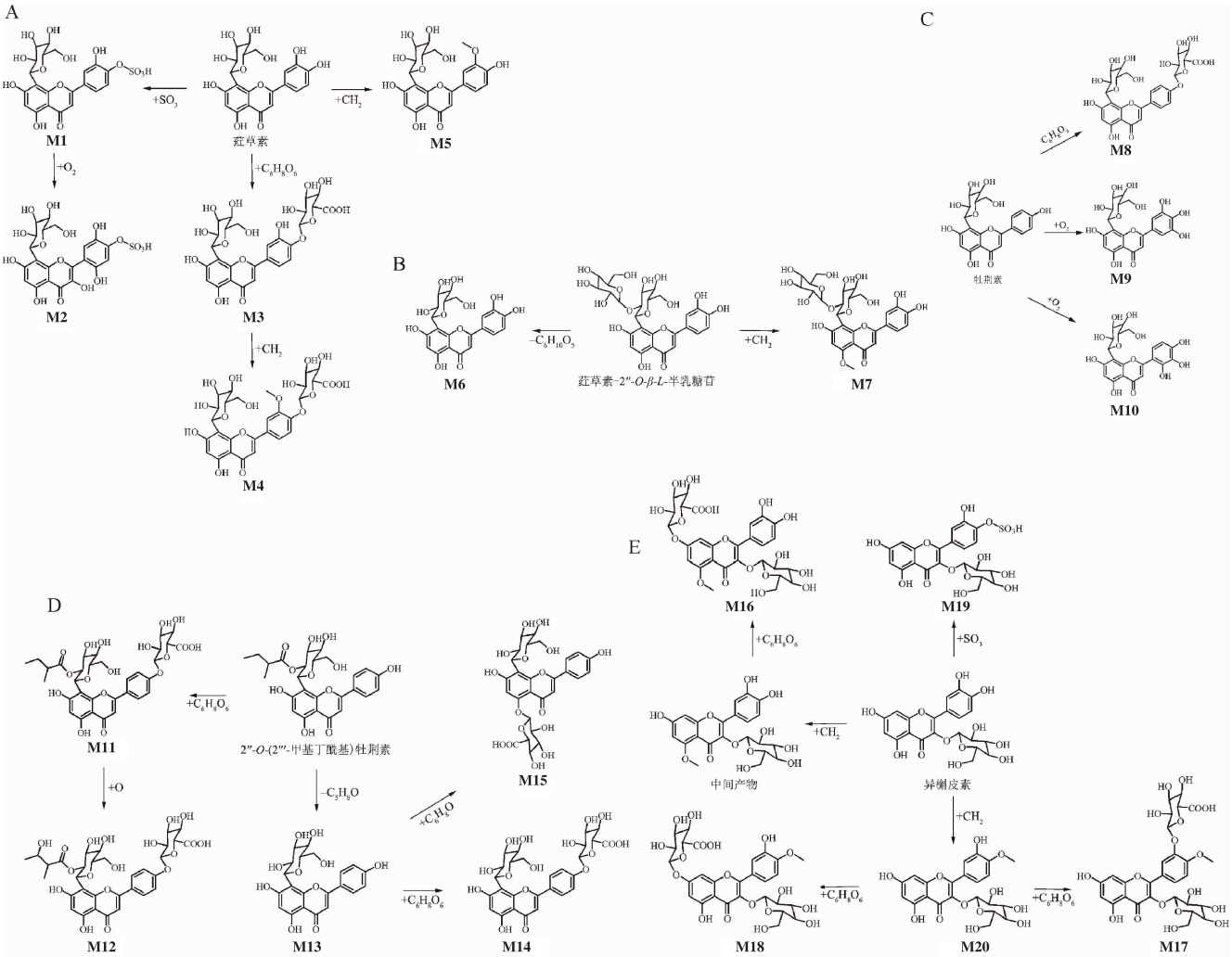
2″-*O*-（2‴-甲基丁酰基）牡荆素（*m/z* 515.15）共产生 5 种代谢产物。代谢产物 M**11**（*m/z* 691.19）存在二级碎片 *m/z* 515.29，提示其为葡萄糖醛酸结合产物。代谢产物 M**12**（*m/z* 707.18）存在二级碎片 *m/z* 689.21、531.12，表明其为羟基化和葡萄糖醛酸结合产物。代谢产物 M**13**（*m/z* 431.10）和牡荆素具有相同的相对分子质量和二级碎片，表明其为牡荆素。代谢产物 M**14**（*m/z* 607.13）和 M**15**（*m/z* 607.13）为同分异构体，两者与 M**8** 有相同的相对分子质量和许多相同的二级碎片，表明 M**14** 和 M**15** 在牡荆素基础上发生了葡萄糖醛酸结合反应，即 2″-*O*-（2‴-甲基丁酰基）牡荆素去甲基丁酰基后，再发生葡萄糖醛酸结合反应。

3.5　异槲皮素代谢产物

异槲皮素（*m/z* 463.09）共产生 5 种代谢产物。代谢产物 M**16**（*m/z* 653.14）、M**17**（*m/z* 653.14）和 M**18**（*m/z* 653.14）互为同分异构体，均存在二级碎片 *m/z* 477，表明三者为葡萄糖醛酸结合产物。*m/z* 477 为异槲皮素加 1 个甲基，表明其为甲基化产物。M**18** 存在二级碎片 *m/z* 342.14，表明 M**18** 的黄酮母核发生了 RDA 裂解，而 M**16** 和 M**17** 并没有出现该碎片，提示 M**18** 是葡萄糖醛酸结合反应和甲基反应发生在异槲皮素 A 环的产物，M**16** 和 M**17** 是2 种反应发生在异槲皮素 B 环的产物。代谢产物 M**19**（*m/z* 543.05）存在二级碎片 *m/z* 380.94、301.08，提示黄酮母核的 1 个游离羟基上发生了硫酸酯结合反应。代谢产物 M**20**（*m/z* 477.11）存在二级碎片 462.15，表明其可能为异槲皮素的甲基化结合产物。M**20** 的相对分子质量和二级碎片与文献报道的异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷一致[12-13]，故可以确定 M**20** 为异槲皮素的 3′-OH 发生了甲基化反应的产物。5 种黄酮类化合物的代谢途径见图 4。

4　讨论

许多代谢产物由于其稳定的化学性质及良好的生物活性而比原型成分具有更好的药效，这些代谢产物就是潜在的活性物质，有重要的研究意义。本研究采用 HPLC-MS/MS 测定了金莲花 5 个主要黄酮类成分的体内代谢产物，发现未发生 *C*-苷键断裂的现象，表明黄酮 *C*-苷键结构较稳定[14]。5 个化合物发生了氧化、甲基化、硫酸酯结合、葡萄糖醛酸结合等Ⅰ相和Ⅱ相代谢反应，其中荭草素发生了甲基化、硫酸酯结合和葡萄糖醛酸结合反应等Ⅱ相代谢反应，且硫酸化和甲基化基本不同时发生，而牡荆素则只发生了葡萄糖醛酸结合反应。由于牡荆素与荭草素相比在 3′位少 1 个羟基，据此可推测，在黄酮母核 B 环的 3′和 4′位存在羟基时易在 3′位发生甲基和硫酸酯基结合反应，在 4′位发生葡萄糖醛酸结合反应，该反应能够增加原化合物的极性，从而利于排泄。



注：A. 蒜草素；B. 蒜草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖；C. 牡荆素；D. 2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素；E. 异槲皮素。

图 4　5 个黄酮类化合物的代谢途径

本实验研究了蒜草素、蒜草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷、牡荆素、2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素 4 种黄酮碳苷及异槲皮素 1 种黄酮氧苷的代谢产物，发现除了 *C*-苷键难于水解外，异槲皮素连于 C 环上的 *O*-苷键也不易水解，这与本课题组前期研究结果一致[15]。但蒜草素-2″-*O*-*β*-*L*-半乳糖苷连于糖基上的 *O*-苷键则发生了水解。通过静脉注射给药后，药物可以通过血液循环进入肝脏代谢，因而可以确定连于黄酮母核上的黄酮 *O*-苷键不能在肝脏进行水解代谢。结合本实验室前期对金莲花代谢产物的研究及相关文献，发现黄酮类物质的代谢具有明显规律。首先，黄酮氧苷的主要水解代谢发生在胃肠道中，会被水解为相应的苷和苷元，而黄酮碳苷则主要通过肠道微生物产生的水解酶进行水解代谢[16]；其次，在进入血液循环后黄酮类物质会在肝脏多种酶的作用下发生羟基化等Ⅰ相代谢反应和葡萄糖醛酸结合、甲基化、硫酸酯化等Ⅱ相代谢反应，其中葡萄糖醛酸结合反应较易发生于 7-OH 位及 4′-OH 位。除此之外，还会由于肝肠循环而发生黄酮母核的 A 型和 B 型裂解反应；最后，黄酮类物质可以在肝脏中发生乙酰化反应[15]，同时带有酰基的黄酮类物质也可以在肝脏中发生水解反应脱酰基，如 2″-*O*-(2‴-甲基丁酰基)牡荆素。本研究结果为金莲花黄酮类化合物的体内代谢研究及金莲花的进一步开发利用提供了参考。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：中国医药科技出版社，2015：1080.

[2]　YUAN M, WANG R F, WU X W, et al. Investigation on Flos Trollii: Constituents and bioactivities[J]. Chin J Nat

Med,2013,11(5):449-455.

[3] AN F, WANG S H, TIAN Q Q, et al. Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells[J]. Oncol Lett,2015,10(4):2627-2633.

[4] GUO L N, QIAO S S, HU J H, et al. Investigation of the effective components of the flowers of *Trollius chinensis* from the perspectives of intestinal bacterial transformation and intestinal absorption[J]. Pharm Biol,2017,55(1):1747-1758.

[5] CAI S Q, WANG R F, YANG X W, et al. Antiviral flavonoid-type *C*-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis*[J]. Chem Biodivers,2006,3(3):343-348.

[6] LI Z L,LI D Y,HUA H M,et al. Three new acylated flavone *C*-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis*[J]. J Asian Nat Prod Res,2009,11(5):426-432.

[7] WEI J X,LI D Y,LI Z L. Acylated flavone 8-*C*-glucosides from the flowers of *Trollius chinensis*[J]. Phytochem Lett, 2018,25(6):156-162.

[8] LIU J Y,LI S Y,FENG J Y,et al. Flavone *C*-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* and their anti-complementary activity[J]. J Asian Nat Prod Res,2013,15(4):325-331.

[9] FANG M Y, LIU S Y, WANG Q Q,et al. Qualitative and quantitative analysis of 24 components in Jinlianhua decoction by UPLC-MS/MS[J]. Chromatographia, 2019, 82(12):1801-1825.

[10] 蔡少青,王璇,尚明英,等. 中药"显效理论"或有助于阐释并弘扬中药特色优势[J]. 中国中药杂志,2015, 40(17):3435-3443.

[11] LIU L,GUO L, ZHAO C, et al. Characterization of the intestinal absorption of seven flavonoids from the flowers of *Trollius chinensis* using the Caco-2 cell monolayer model[J]. PLoS ONE,2015,10(3):e0119263.

[12] 符乃光,陈峰,魏娜,等. LC-MS 法鉴定槲皮素在大鼠体内的主要代谢产物[J]. 药物分析杂志,2009,29(5): 764-768.

[13] 邢萌萌,朱科学,聂少平,等. UPLC-Q-TOF-MS 检测槲皮素代谢产物在大鼠血清及组织中的分布[J]. 食品科学,2013,34(24):158-162.

[14] 周乐,赵晓莉,狄留庆,等. 黄酮类化合物口服吸收与代谢特征及其规律分析[J]. 中草药,2013,44(16): 2313-2320.

[15] 刘双月,安燕南,刘斯琪,等. 金莲花中 8 种黄酮类成分的肝微粒体生物转化研究[J]. 中国现代中药,2019, 21(11):1489-1496.

[16] 孙欣光,张洁,庞旭,等. 天然黄酮苷的代谢途径研究进展[J]. 中草药,2020,51(11):3078-3089.

(收稿日期: 2020-07-08　　编辑: 田苗)

(上接第 780 页)

[2] GOROVOY P G, KETRITS L M, GRIEF V G. A study of East Asian *Bupleurum "falcatum"*[J]. Feddes Repert, 1980, 91(1/2):57-62.

[3] KIM Y H, KIM E S, KO B S, et al. Internal transcribed spacer-based identification of *Bupleurum* species used as sources of medicinal herbs[J]. J Med Plants Res, 2012, 6 (5):841-848.

[4] PAN S L. *Bupleurum* species: scientific evaluation and clinical applications[M]. Boca Raton: CRC Press, 2006: 135-147.

[5] YUAN B C, YANG R, MA Y S, et al. A systematic review of the active saikosaponins and extracts isolated from Radix Bupleuri and their applications[J]. Pharm Biol, 2017, 55(1):620-635.

[6] 潘胜利,柏巧明,顺庆生,等. 中国药用柴胡原色图志[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2002:15-18.

[7] 李晓伟,王玉庆,杜国军,等. 药用柴胡资源调查及市场现状分析[C]//中国自然资源学会天然药物资源专业委员会. 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会论文集. 兰州:中国自然资源学会天然药物资源专业委员会,2012:185-191.

[8] 秦雪梅,王玉庆,岳建英. 栽培柴胡资源状况分析[J]. 中药研究与信息,2005,7(8):30-32.

[9] 都明理,徐娇,朱楚然,等. 3 种柴胡染色体数目测定及基因组大小估测[J]. 江苏农业科学,2019,47(11): 191-193.

[10] 郑亭亭. 柴胡选育品系和主要栽培种质的品质及遗传整齐度评价[D]. 北京:北京协和医学院,2010.

[11] 闵云山,宋平顺. 高效液相色谱法测定甘肃野生与家种柴胡中柴胡皂苷 ad 的含量[J]. 中国当代医药,2010, 17(24):145-146.

[12] 丁永辉,宋平顺,朱俊儒,等. 甘肃柴胡属植物资源及中药柴胡的商品调查[J]. 中草药,2002,33(11): 1036-1038.

(收稿日期: 2020-09-05　　编辑: 戴玮)