

· 研究报告 ·

高效液相色谱法测定体外大鼠肠道菌液中大豆苷及其代谢物

张 圳¹, 冯家懿¹, 果 卉¹, 姚 媛^{1,2}, 闻 俊¹, 周婷婷¹ [1. 第二军医大学药学院, 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室, 上海 200433; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012]

[摘要] **目的** 建立 HPLC 法测定体外大鼠肠道菌液中的大豆苷及其代谢物, 研究大鼠肠道菌群对大豆苷的代谢情况。**方法** 采用大鼠离体粪便温孵法, 将大豆苷与大鼠肠道菌群培养液进行厌氧温孵。温孵样品采用甲醇沉淀蛋白处理后进行 HPLC 法分析, 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱; 流动相为 0.2% 乙酸水溶液与甲醇, 梯度洗脱; 检测波长为 260 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μl。**结果** 大豆苷及其代谢物大豆苷元分别在 98.0~490、57.6~288 μg/ml 浓度范围内线性良好, 高、中、低 3 个浓度的相对回收率在 96.6%~114.0% 之间, 相对标准偏差小于 9.9%, 表明本法的准确度和精密性符合要求。大豆苷在肠道菌液中代谢生成大豆苷元, 其消除半衰期为 37.6 min。**结论** 所建立的 HPLC 法适合同时测定体外大鼠肠道菌液中的大豆苷及其代谢物, 大豆苷在体外代谢的主要途径为糖苷键断裂转化成对应苷元。

[关键词] 肠道菌群; 体外代谢; 大豆苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0347-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.013

Simultaneously determination of daidzin and its metabolite in rat intestinal bacteria test solution *in vitro* by HPLC

ZHANG Zhen¹, FENG Jiayi¹, GUO Hui¹, YAO Yuan^{1,2}, WEN Jun¹, ZHOU Tingting¹ [1. School of Pharmacy & Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical (Chinese Materia Medica) Metabolite Research, Second Military Medical University Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China]

[Abstract] **Objective** To establish an HPLC method for simultaneously determination of daidzin and its metabolite in rat intestinal bacteria test solution *in vitro*, and study the metabolism of daidzin by rat intestinal bacteria. **Methods** The incubation of daidzin was carried out at 37 °C with rat intestinal bacteria test solution. The samples were precipitated by methanol followed by a separation with HPLC method. The conditions were as follows: the chromatographic column was Ultimate C₁₈; the mobile phase was 0.2% acetic acid and methanol (gradient elution); the detection wavelength was 260nm, and the column temperature was 25 °C. **Results** Daidzin and daidzein showed good linearity with the range of 98.0~490μg/ml and 57.6~288μg/ml, respectively. The accuracy of daidzin and daidzein was ranged from 96.6%~114.0% and the precision of the two analytes was within 9.9%. Daidzin was transformed to daidzein in the rat intestinal bacteria test solution, and its elimination half-life was 37.6 min. **Conclusion** The established HPLC method was suitable for the determination of daidzin and its metabolite. Daidzin could be metabolized by rat intestinal bacteria *in vitro*, and the main metabolic pathway was transforming daidzin into corresponding aglycone through breaking the glucoside bond

[Key words] intestinal bacteria; metabolism *in vitro*; daidzin; HPLC

中药糖苷类成分是中药中一类重要的活性物质, 如环烯醚萜苷具有镇静、止痛、抗氧化、抗肿瘤等

多种生理活性^[1]; 异黄酮苷具有类雌激素、抗肿瘤、调节血脂、预防和治疗动脉粥样硬化等作用^[2]。糖苷类成分在生物体内代谢转化途径主要是由肠道菌群介导的脱糖基代谢, 生成苷元^[3]。苷元极性减小, 脂溶性增加, 能迅速通过小肠吸收, 进入血液循环, 发挥其作用^[4]。

中药淡豆豉中的主要成分为异黄酮, 其中的大豆苷结构与人体内源性雌激素类似^[5], 与雌激素受体结合会对雌激素介导的心血管、代谢、生殖、骨骼和中枢神经系统产生不同的影响, 从而起到保护心

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81573584, 81773862); 第二军医大学本科生创新孵化基地项目(FM2016071)

[作者简介] 张 圳, 第二军医大学中药学本科 2014 级学员, Email: 18301923751@163.com

[通讯作者] 周婷婷, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药效物质基础与体内代谢, Tel: (021)81871262; Email: tingting_zoo@163.com

血管以及治疗骨质疏松的作用。大豆苷可以在肠道菌群的 β -D-葡萄糖苷酶作用下水解,生成大豆苷元^[6]。本文建立高效液相色谱(HPLC)法,定量测定体外肠道菌温孵液中的大豆苷及其代谢产物大豆苷元,考察了肠道菌群对大豆苷的体外代谢动力学过程,为进一步的研究二者基于肠道菌群代谢的相互研究,提供必要的实验依据。

1 材料

1.1 药品及试剂

大豆苷、大豆苷元(纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司);甲醇、醋酸(HPLC级,美国Tedia公司);磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钠、硫酸铵、氯化钙、硫酸镁、碳酸钠、盐酸、磷酸(均为分析纯,国药集团);L-半胱氨酸、L-抗坏血酸、牛肉膏、蛋白胨、营养琼脂(上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器

SHIMADZU 高效液相色谱仪:由 LC-10AT 泵、SPD-10A 检测器、SIL-20A 自动进样器、CBM-20A 系统控制器、LabSolutions 色谱工作站(日本岛津公司)组成;XS205 精密天平(梅特勒-托利多国际有限公司);高速离心机;高压灭菌锅。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的配制

精密称取大豆苷和大豆苷元适量,用二甲亚砜分别配制成浓度为 10 mg/ml 和 5 mg/ml 的储备液。精密量取一定体积大豆苷和大豆苷元,用甲醇稀释配制成对照品系列工作溶液,其中大豆苷的浓度范围为 2~10 mg/ml,大豆苷元为 1~5 mg/ml。

2.1.2 肠道菌群培养液制备^[8]

量取 37.5 ml A 液(0.78% K_2HPO_4),37.5 ml B 液(0.47% KH_2PO_4 ,1.18% $NaCl$,1.2% $(NH_4)_2SO_4$,0.12% $CaCl_2$,0.25% $MgSO_4 \cdot H_2O$),50ml C 液(8% Na_2CO_3),混合后加入 0.5 g L-半胱氨酸、2 ml 25% L-抗坏血酸、1 g 牛肉膏、1 g 蛋白胨、1 g 营养琼脂,加蒸馏水至 1 L,盐酸调 pH 7.5-8.0,经 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min,冷却后得厌氧培养液^[5]。大鼠置于代谢笼内,自由饮水饮食,每 8 h 采集一次粪便,而后置于 -80 °C 冰箱内储存。取 10 g 大鼠粪便,按 1 g : 20 ml 的比例加入 200 ml 厌氧培养液,玻棒搅匀浆,纱布过滤,得到肠道菌群培养液。

2.2 大豆苷的体外温孵试验

取大豆苷储备液 0.4 ml 加入 10 ml 肠道菌液

中,配制大豆苷浓度约为 400 μ g/ml 的离体大鼠肠道菌液体外孵育液。通入 CO_2 后密闭,将配制好的孵育液置于恒温振荡器上,于 37 °C 温孵,于 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 min 取样 0.5 ml。取出后立即进行样品前处理。

2.3 样品前处理

向取出的体外孵育液样品中精密加甲醇 1 ml,涡旋 1 min,充分混匀,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 ml 于离心管中,再于 12 000 r/min 进行二次离心 10 min,取上清液进样进行 HPLC 法分析。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱(200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为 0.2% 乙酸水溶液(A)与甲醇(B),梯度洗脱程序为 B 相比例:0~5 min,40%~60%,5~12 min,60%~40%;检测波长为 260 nm;柱温为 25 °C;进样量为 10 μ l。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性试验

在上述色谱条件下,记录对照品、空白肠道菌群培养液及含药孵育液的色谱图(图 1),结果表明:大豆苷与大豆苷元可彼此分离,保留时间分别为 5.2 min 和 10.5 min,且肠道菌群培养液中其他组分不干扰苷和苷元的测定。

2.5.2 线性关系和范围

取适量“2.1”项的肠道菌群培养液,高压灭菌失活,分别精密加入大豆苷与大豆苷元的对照品溶液,配制样品工作曲线。按“2.3”项下处理样品后进样,以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程,

$$Y = 12\,455 X + 498\,023, r = 0.999\,8;$$

$$Y = 17\,020 X + 74\,139, r = 0.999\,3$$

结果表明大豆苷、大豆苷元分别在 98.0~490、57.6~288 μ g/ml 范围内线性良好。

2.5.3 精密度与准确度试验

取适量“2.1”项的肠道菌群培养液,高压灭菌失活,分别精密加入高、中、低质量浓度及定量下限 4 个浓度的大豆苷与大豆苷元的混合对照品溶液,每个质量浓度平行 5 份,配制质控样品溶液,按“2.3”项下处理样品后进样。结果见表 1。

2.5.4 绝对回收率试验

取适量“2.1”项的肠道菌群培养液,高压灭菌失活,分别精密加入高、低 2 个浓度的大豆苷与大豆苷元的混合对照品溶液,每个浓度平行 5 份,配制质控

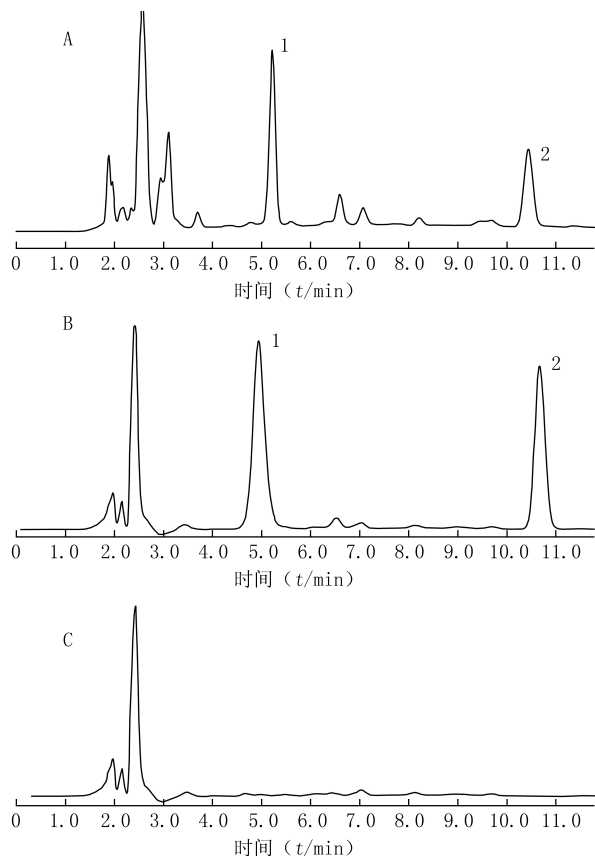


图1 大豆苷体系的HPLC专属性图谱

A.大豆苷体外温孵样品; B.对照品+空白肠菌液; C.空白肠菌液; 1.大豆苷; 2.大豆苷元

表1 大豆苷与大豆苷元的精密度与准确度

成分	配制浓度 ($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	测定浓度 ($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	精密度 (%)	准确度 (%)
大豆苷				
最低定量限	98.0	103±6.88	6.0	106.0
质控样品	196	211±6.48	2.7	107.6
	294	316±35.0	9.9	107.7
	392	446±36.2	7.1	114.0
大豆苷元				
最低定量限	57.6	59.6±4.82	7.3	103.4
质控样品	115	123±1.94	1.3	107.0
	172	167±8.58	4.7	96.6
	230	241±15.5	5.6	104.6

样品溶液,按“2.3”项下处理样品后进样。另用甲醇配制相当浓度的大豆苷与大豆苷元混合对照品溶液,按照色谱条件进样分析,以质控样品中对照品的峰面积与相应浓度下甲醇溶液中相同对照品峰面积比求算绝对回收率,大豆苷和大豆苷元的绝对回收率在91%~111.0%之间。

2.5.5 稳定性试验

取适量“2.1”项的肠道菌群培养液,高压灭菌失

活,分别精密加入高、低质量浓度2个浓度的大豆苷与大豆苷元的混合对照品溶液,每个质量浓度平行3份,置于37℃恒温培养箱中分别培养0、1、2、4、8h取样,按“2.3”项下处理样品后进样。结果表明,大豆苷与大豆苷元在灭菌失活的肠道菌群培养液中培养8h后未发生变化,说明在失活的培养体系中大豆苷与大豆苷元稳定,大豆苷的代谢是由肠道菌的作用产生。

3 讨论

3.1 分析方法的建立

由于大豆苷和大豆苷元的极性相差较大,苷元极性较小,在反相色谱上保留较强,为了能够在合适的分析周期内完成苷和苷元的分析检测,需要对流动相中有机溶剂的种类和比例进行调节。当采用甲醇-0.2%乙酸水溶液进行等度洗脱时,大豆苷与大豆苷元的保留时间相差很大,从而使得分析周期延长,因此,调整为梯度洗脱,在12min之内完成样品测定。在样品前处理过程中,采用甲醇稀释沉淀肠道菌液的办法,可以保证水溶性较大的苷和极性小的苷元均被提取出来。

3.2 体外肠道菌群对大豆苷的代谢

以大豆苷、大豆苷元在最高浓度检测到的质量浓度为100%,以各孵育时间点检测到的大豆苷、大豆苷元质量浓度与100%处的质量浓度比考察各组分在孵育液中的变化趋势,结果见图2。大豆苷的体外肠道菌群代谢较为迅速,在体外孵育80min时间内,原型药物减少了78%,其体外消除半衰期为37.6min;其代谢产物大豆苷元在体内10min即可被检测到,并且随着大豆苷的不断减少而增加。文献^[7]报道大豆苷主要是以苷元的形式在胃和肠道内被吸收,体外代谢研究的结果也表明大豆苷代谢较为迅速,代谢产生的大豆苷元应该是其主要的吸收形式。大豆苷转化成大豆苷元后会进一步在肠道菌群作用下生成去氧甲基安哥拉紫檀素和雌马酚^[8],

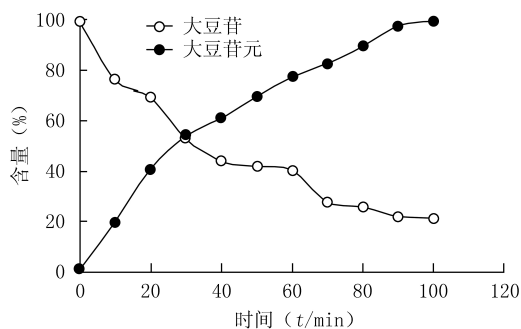


图2 大豆苷温孵体系各成分含量变化

而后者具有更强的雌激素样的生理活性作用。但是在本研究中雌马酚作为进一步代谢的产物,浓度更低;另外肠道菌群中代谢酶的活性随着时间的推移而降低,因而造成在肠道菌群温孵液中的雌马酚生成更少,采用常规液相色谱无法准确检测到雌马酚。

【参考文献】

- [1] 刘志平,崔建国. 近三年环烯醚萜类新化合物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(1):167-170.
- [2] 王守英,李志春,卜勇军. 大豆异黄酮的生物学作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2005, 22(4):397-400.
- [3] SILBERBERG M, MORAND C, MATHEVON T, *et al.* The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites[J]. *Eur J Nutr*, 2006, 45(2):88-96.

- [4] 张李赢,杨轶舜,张 彤,等. 肠道菌群对中药苷类成分的代谢研究进展[J]. 中药材, 2011, 34(7): 1155-1158.
- [5] VITALE DC, PIAZZA C, MELILLI B, *et al.* Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability [J]. *Eur J Drug Metab Ph*, 2013, 38(1):15-25.
- [6] SETCHELL KD, BROWN NM, ZIMMER-NECHEMIAS L, *et al.* Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(2):447-453.
- [7] PISKULA MK, YAMAKOSHI J, IWAI Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach[J]. *Febs Lett*, 1999, 447(2-3): 287-291.
- [8] CHANDRASEKHARAN S, AGLIN A. Pharmacokinetics of dietary isoflavones [J]. *J Steroids Hormon Sci* 2013, 12(1):4.
- [收稿日期] 2017-10-02 [修回日期] 2018-03-26
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 312 页)

- [39] WU M, ZHANG D, ZENG Y, *et al.* Nanocluster of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (dopamine) for magnetic field-targeting, highly sensitive MRI and photothermal cancer therapy [J]. *Nanotechnology*, 2015, 26(11):115102.
- [40] WANG C, HO PC, LIM LY. Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells [J]. *Int J Pharm*, 2010, 400(1-2):201-210.
- [41] CHEN H, LIU R, NAN W, *et al.* Abstract 5659: Surface modification of epirubicin-loaded PLGA nanoparticle with biotinylated chitosan enhances anti-cancer efficacy in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8):5659-5659.
- [42] RAO L, XU JH, CAI B, *et al.* Synthetic nanoparticles camouflaged with biomimetic erythrocyte membranes for reduced reticuloendothelial system uptake [J]. *Nanotechnology*, 2016, 27(8):085106.
- [43] PARODI A, QUATTROCCHI N, VAN DE VEN AL, *et*

al. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions [J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8(1):61-68.

- [44] GAO C, LIN Z, JURADO-S NCHEZ B, *et al.* Stem cell membrane-coated nanogels for highly efficient in vivo tumor targeted drug delivery [J]. *Small*, 2016, 12(30):4056-4062.
- [45] FANG RH, HU CM, LUK BT, *et al.* Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(4):2181-2188.
- [46] LO GIUDICE MC, MEDER F, POLO E, *et al.* Constructing bifunctional nanoparticles for dual targeting: improved grafting and surface recognition assessment of multiple ligand nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(38):16969-16975.
- [47] DOOLITTLE E, PEIRIS PM, DORON G, *et al.* Spatiotemporal targeting of a dual-ligand nanoparticle to cancer metastasis [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(8):8012-8021.
- [收稿日期] 2017-10-14 [修回日期] 2018-01-10
[本文编辑] 李睿旻