

黄烷-3-醇类化合物及其代谢产物的 靶向定量方法研究

刘若男^{1,2}, 陈婉冰^{1,2}, 杨宏¹, 胡亦清³,
鲁群^{1,2}, 董军³, 刘睿^{1,2,4}

- (1. 华中农业大学食品科学与技术学院, 环境食品学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;
2. 武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070;
3. 武汉市农业科学院环境与安全研究所, 湖北 武汉 430070;
4. 农业农村部华中都市农业重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要:黄烷-3-醇类化合物作为重要的膳食多酚,其生物利用度不仅局限于母体化合物,更重要的是其经过体内肠道微生物代谢后的产物。为了明确体内代谢情况及代谢产物对生物利用度的贡献,本研究探讨了黄烷-3-醇类化合物及其代谢产物的靶向定量分析方法。根据各化合物子离子响应值的差异,确定其在混合标准溶液中适合的浓度,并建立了超高效液相色谱-三重四极杆-串联质谱(UHPLC-QQQ-MS)定量分析方法,在15 min分析时间内所有化合物的分离度良好,并有适宜的响应值。方法学验证结果表明,定量化合物具有良好的线性关系;并以尿液、粪便和血浆为研究材料考察方法的稳定性,日内和日间精密RSD值均在15%以下,基质效应介于±20%之间,回收率在70%~120%之间。该方法快速、灵敏、准确、稳定,可用于黄烷-3-醇类化合物在体内的靶向定量研究。

关键词:超高效液相色谱-三重四极杆-串联质谱(UHPLC-QQQ-MS);黄烷-3-醇类化合物;代谢产物

中图分类号:O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-2997(2022)01-0067-11

doi:10.7538/zpxb.2021.0021

Development of Target Quantitative Methods of Flavan-3-ols and their Metabolites

LIU Ruo-nan^{1,2}, CHEN Wan-bing^{1,2}, YANG Hong¹, HU Yi-qing³,
LU Qun^{1,2}, DONG Jun³, LIU Rui^{1,2,4}

- (1. *Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
2. *Wuhan Engineering Research Center of Bee Products on Quality and Safety Control, Wuhan 430070, China;* 3. *Wuhan Academy of Agricultural Sciences Institute of Environment and Safety, Wuhan 430070, China;* 4. *Key Laboratory of Urban Agriculture in Central China Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Wuhan 430070, China*)

Abstract: Flavan-3-ols are important dietary polyphenol, their bioavailability are not only limited to the parent compound, but also the metabolites after the intestinal micro-

bial metabolism *in vivo*. Aimed to identify the *in vivo* metabolism and the contribution of metabolites to bioavailability, the quantitative analysis methods of dietary flavan-3-ols and their metabolites were researched. According to the difference response values of the product ions of each compound, the appropriate concentration in the mixed standard was determined, and the quantitative analysis method of ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UHPLC-QQQ-MS) was established. All compounds had good resolution and appropriate response values within analysis time of 15 min. The method validation results showed that most of the quantitative compounds had good linearity. Urine, feces and plasma were used as samples to investigate the intra-day and inter-day precision of the method. The RSD value of the method was below 15%, the matrix effect was within $\pm 20\%$, and the recovery was mainly between 70% and 120%. The method is fast, sensitive, accurate and stable, which can be used as a method for targeted quantitative research of flavan-3-ol compounds *in vivo*.

Key words: ultra-high-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UHPLC-QQQ-MS); flavan-3-ols; metabolites

黄烷-3-醇类膳食多酚包括儿茶素、表儿茶素、原花青素及其衍生物,富含此类化合物的膳食具有较好的抗氧化、抗炎作用^[1-2],对心血管疾病、神经退行性疾病和癌症等慢性疾病具有预防或缓解作用^[3]。研究表明^[4],黄烷-3-醇类化合物经口摄入后,其在体内血液中的浓度仅能达到 $\text{nmol/L} \sim \mu\text{mol/L}$ 水平,不足摄入量的1%^[4],而大量母体化合物进入结肠并被肠道微生物群降解,主要产生小分子酚酸,然后再被吸收至循环系统到达各组织或器官^[5]。关于黄烷-3-醇类化合物在体内经肠道微生物代谢后对健康的影响机制仍未得到完整解析。目前,一些研究者将黄烷-3-醇类化合物对人类慢性疾病的影响和可能的干预机制归因于它们的肠道微生物代谢产物^[6]。羟基苯甲酸、苯丙酸、苯乙酸、马尿酸、阿魏酸及其葡醛酸苷和硫酸酯缀合物均被证明比母体化合物具有更强的生物活性^[7-8]。可见,黄烷-3-醇类化合物发挥有益作用的能力与其肠道微生物的代谢产物密切相关。尽管对黄烷-3-醇类化合物的肠道微生物代谢产物的定性鉴定取得了一定的进展^[9-10],但其精准定量仍需重点突破,该成果可以揭示黄烷-3-醇类化合物的生物利用度和体内外生物活性。

摄入富含黄烷-3-醇类化合物的膳食后,体

内主要出现黄烷-3-醇母体化合物及其II-相衍生物、5-碳开环代谢产物(主要为苯基戊内酯类和苯基戊酸类及其II-相衍生物)、小分子酚酸以及II-相衍生物等3类代谢产物,其中,后2类代谢物含量在血浆、尿液和粪便中占主导。研究表明^[11],这些代谢产物主要以葡萄糖醛酸化和硫酸酯化II-相代谢产物的形式存在。II-相代谢产物同样也是其他多酚类化合物的特征代谢产物,但由于其标准品不易获得,常采用酶解打破葡萄糖醛酸键或硫酸酯键定性或定量多酚代谢产物前体。Kahle等^[12]对血清和尿液样本酶解后,实现了对5-咖啡基奎宁酸、4-对香豆基奎宁酸、咖啡酸、(-)表儿茶素、根皮素、槲皮素及马尿酸等代谢产物的定量分析。

目前,常使用三重四极杆(QQQ)、飞行时间(TOF)、四极飞行时间(Q-TOF)、线性离子阱(LTQ)、静电场轨道离子阱(Orbitrap)等方法对复杂生物样品进行精确靶向定量。其中,QQQ扫描速度快、干扰小,具有较宽的线性范围,广泛用于定量分析,但是需要依赖目标待测物的标准品建立分析方法^[13-14];TOF、LTQ和Orbitrap均为高分辨和高灵敏度的质谱仪,皆可提供精准质量数、多级碎片离子质量和准确的离子色谱,但扫描速度慢、线性范围窄,在定量方面的应用

较少,但随着质谱数据分析软件的开发以及新定量模式的需求,也逐渐应用于靶向定量分析^[15-18]。

本研究拟使用葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶打破Ⅱ-相代谢产物的酯键,并结合标准品开发定量方法,采用超高效液相色谱-三重四极杆-串联质谱(UHPLC-QQQ-MS)法靶向定量分析黄烷-3-醇类化合物及其主要代谢产物,同时测定其在血浆、粪便、尿液等不同生物基质中的含量,并从灵敏度、精确度、稳定性等方面进行方法学验证。希望为黄烷-3-醇类化合物的靶向定量研究提供方法,为选择与健康相关的有效生物标志物提供参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Acquity UPLC H-Class PLUS 超高效液相色谱系统:美国 Waters 公司产品,由 Acquity UPLC QSM 四元溶剂管理系统、Acquity UPLC FTN 样品管理系统、Acquity UPLCPDA 检测系统组成;Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪:美国 Waters 公司产品,配有电喷雾离子源及 Masslynx 数据处理软件;Gradient A10 Milli-Q 超纯水器:法国 Milli-pore 公司产品;Vortex-2500M 多管涡旋混合器:中国力辰科技公司产品;LHS-100CH 恒温培养箱:中国上海一恒公司产品;YTLG-12A 冷冻干燥机:中国上海叶拓公司产品。

1.2 主要材料与试剂

5-(3-羟基苯基)-戊内酯(纯度 98.78%)、4-羟基-5-(3-羟基苯基)-戊酸(纯度 98.13%):由药明康德新药开发有限公司合成;高香草酸标准品:中国苏州爱玛特生物科技有限公司产品;原花青素 A1(纯度 95.23%)、原花青素 A 型三聚体(纯度 97.34%):从花生红衣原花青素中分离得到;其余标准品均为上海源叶生物科技有限公司产品。硫酸酯酶(酶活力值为 10 kU)、葡萄糖醛酸酶(酶活力值为 100 kU):来源于罗曼蜗牛,美国 Sigma 公司产品;乙腈、甲醇:均为色谱级,美国 Fisher 公司产品;甲酸(色谱级):德国 Merck 公司产品;血浆、尿液、粪便:取自 C57BL/6 健康小鼠,购自华中农业大学实验动物中心。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Thermo Hypersil GOLD C18 柱(100 mm×2.1 mm×1.9 μm);流动相:A 相为 0.1% 甲酸,B 相为含 0.1% 甲酸的乙腈;柱温 40 ℃;洗脱梯度:0~2 min (95% A),2~10 min (95%~60% A),10~12.5 min (60%~5% A),12.5~15 min (5%~95% A)。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),毛细管电压 3 kV,脱溶温度 500 ℃,脱溶气(N₂)流速 750 L/h。使用 0.1、0.5、5、50 mg/L 标准品溶液从低浓度到高浓度进行质谱调谐分析,直至获得化合物响应值最高的子离子信息;然后选择该离子进行后续优化,通过手动调谐的方式优化各分析物的 MS/MS 参数(锥孔电压和碰撞能量),使子离子的响应值达到最高。采用多反应监测(MRM)模式,选择最敏感的跃迁(母离子和子离子)进行定量。使用 MassLynx 4.1 软件进行数据采集和处理。

1.4 标准溶液的配制

1.4.1 调谐标准品的配制 分别精密称取适量的各标准品,加入 70% 甲醇溶解,配制 2 000、200、50、0.5、0.1 mg/L 标准品溶液,用于调谐分析。

1.4.2 混合标准品的配制 根据调谐过程中化合物量子离子响应值的差异,将 33 种标准品分成 4 组,质谱响应较低时,需要该化合物在混合标准品溶液中以较高的浓度存在,以保证同一条件下每种化合物都能得到较均衡的响应值。4 组混合标准品溶液的最高浓度分别为 25、50、100、200 mg/L,取 4 组等体积标准品溶液,配制混合标准品溶液 S1,依次稀释得到 S2~S9,稀释梯度列于表 1。根据化合物对应的浓度范围和响应的峰面积,使每种化合物都得到 1 个 MRM 函数。

1.5 样品处理方法

1.5.1 尿液样品 使用代谢笼收集小鼠 24 h 内的尿液样本,并定容至 8 mL,所有尿液样本过 0.22 μm 滤膜,冻存于-80 ℃。分析前取出,对尿液样本解冻、涡旋,然后取 0.5 mL 尿液样本,加入 0.25 mL 混合酶(含 1 000 U 葡萄糖醛酸酶和 100 U 硫酸酯酶),在 37 ℃ 水解 3 h,再加入 20 μL 6 mol/L 盐酸中止反应,以 12 000

表 1 各组混合标准品的浓度和稀释梯度

Table 1 Concentration and dilution gradient of each group of mixed standards

混合标准品编号 Number of mixed standard	稀释梯度 Dilution gradient	浓度 Concentration/(mg/L)			
		A 组 A Group	B 组 B Group	C 组 C Group	D 组 D Group
S1	1 : 1	25	50	100	200
S2	1 : 2	12.5	25	50	100
S3	1 : 5	5	10	20	40
S4	1 : 10	2.5	5	10	20
S5	1 : 20	1.25	2.5	5	10
S6	1 : 50	0.5	1	2	4
S7	1 : 100	0.25	0.5	1	2
S8	1 : 500	0.005	0.1	0.2	0.4
S9	1 : 1000	0.0025	0.05	0.1	0.2

r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 用于代谢产物含量的测定^[19-20]。

1.5.2 粪便样品 称取 100 mg 粪便, 加入 200 mg 玻璃微珠和 1 mL 50% 甲醇进行涡旋, 混合均匀后, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 分析测定前过 0.22 μm 滤膜。

1.5.3 血浆样品 采血于肝素钠抗凝管, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 密封, 冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。样品前处理时, 将其取出放于冰上 30~60 min, 待样品完全溶解后, 取 100 μL 血浆, 加入 100 μL 混合酶, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水解 3 h, 水解结束后, 加入 500 μL 含 2% 甲酸的乙腈溶液, 超声 10 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 用于沉淀蛋白; 取上清液, 真空冷冻干燥后保存。测定时取出样品, 加入 100 μL 含 0.1% 甲酸的甲醇溶液复溶, 涡旋, 然后以 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 用于 UPLC-MS/MS 检测^[21-22]。

2 结果与讨论

2.1 处理条件的优化

根据文献^[19-22]报道, 优化了 3 种不同生物基质的处理方法, 以加标回收率作为优化指标, 优化方案示于图 1, 优化效果示于图 2。使用方案一处理尿液样本时, 黄烷-3-醇类化合物均出现了未检出的结果, 包括儿茶素、表儿茶素、原花青素 B1、原花青素 A1、三聚体, 这可

能是因为 pH 值较高, 黄烷-3-醇类化合物在偏酸性的条件下更稳定, 经过调整 pH 值后, 这一现象得到改善, 且回收率范围更合理。在粪便样本处理过程中也同样存在 pH 值较高的现象, 将 0.1% 乙酸调整为 2% 甲酸后, 可以提高大多数化合物的回收率。拟定的血浆样本处理方案的回收率能够达到方法学验证标准, 未进行优化。

粪便处理方案

- 方案一: 100 mg 粪便+研磨玻璃珠+1 mL 甲醇(含 0.1% 冰醋酸)→振荡提取→离心, 过膜, 检测
方案二: 收集的所有粪便混合均匀+研磨玻璃珠+5 倍体积的 50% 甲醇(2% 甲酸)→振荡提取→离心, 过膜, 检测

尿液处理方案

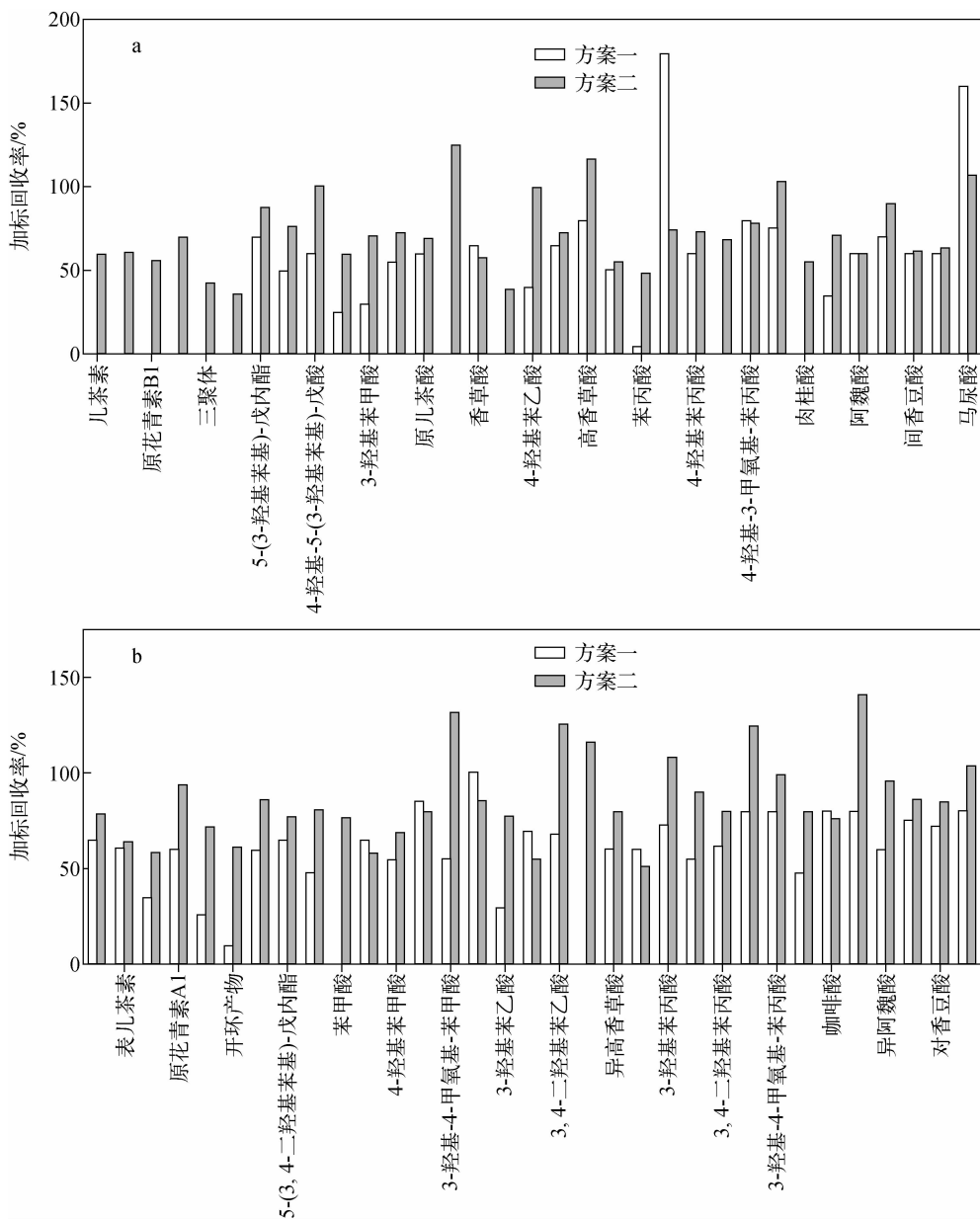
- 方案一: 0.5 mL 尿液+0.25 mL 混合酶, 孵育 3 h→加 20 μL 1 mol/L 盐酸, 0.25 mL 甲醇→离心, 取上清过膜、检测
方案二: 0.5 mL 尿液+0.25 mL 混合酶, 孵育 3 h→加 20 μL 6 mol/L 盐酸, 0.75 mL 甲醇→离心, 取上清过膜、检测

血浆处理方案

- 方案: 100 μL 血浆+100 μL 混合酶, 孵育 3 h→孵育结束后, 沉淀蛋白, 加入 500 μL 乙腈(含 2% 甲酸)→取上清, 冻干→复溶于 50% 甲醇(含 1% 甲酸)离心、取上清过膜、检测

图 1 优化不同基质的处理方案

Fig. 1 Processing schemes of optimized different matrices



注: a. 尿液样本; b. 粪便样本

图2 不同处理方案的回收率

Fig. 2 Recovery of different processing schemes

2.2 质谱参数的优化

黄烷-3-醇类化合物的代谢产物主要为小分子酚酸类。本实验在电喷雾负离子模式下对质谱条件进行优化,每种化合物的母离子 $Q1 [M-H]^-$ 出现后,对 $Q1$ 进行碰撞解离,通过子离子扫描,得到目标化合物的特征碎片离子。在此基础上,对去簇电压和碰撞能量等参数进行优化,使分子离子对的信号达到最强。根据化合物的特征离子对、目标离子的出峰时间,

以及对应的去簇电压和碰撞能量等,建立MRM定量方法的基本信息。33种化合物优化后的质谱参数列于表2。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性分析 以标准品浓度(x)为横坐标,峰面积比值(y)为纵坐标,最小二乘法进行回归计算,即得标准曲线的线性方程和线性相关系数,结果列于表3。可见,33种化合物在线性范围内具有较好的线性关系。

表 2 33 种代谢产物的质谱参数
Table 2 Mass spectrometric parameters of 33 metabolites

编号 No.	化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	母离子 Parent ion Q1[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	子离子 Daughter ion Q3 (<i>m/z</i>)	去簇电压 Cone voltage/V	碰撞能量 Collision energy/V
1	儿茶素	4.35	289	245	30	16
2	表儿茶素	5.57	289	245	30	16
3	原花青素 B1	3.54	577	289	20	18
4	原花青素 A1	6.43	575	285	20	22
5	A 型三聚体	6.34	836	575	30	22
6	儿茶素 C-环开环产物	5.75	291	247	40	16
7	5-(3,4-二羟基苯基)-戊内酯	7.49	207	163	40	16
8	5-(3-羟基苯基)-戊内酯	7.56	191	147	20	18
9	4-羟基-5-(3-羟基苯基)-戊酸	6.09	209	101	20	14
10	苯甲酸	7.54	121	77	20	12
11	3-羟基苯甲酸	5.32	137	93	20	12
12	4-羟基苯甲酸	3.78	137	93	20	12
13	原儿茶酸	2.24	153	109	30	14
14	3-羟基-4-甲氧基-苯甲酸	5.40	167	108	30	20
15	香草酸	5.05	167	152	30	12
16	3-羟基苯乙酸	5.47	151	107	40	8
17	4-羟基苯乙酸	4.75	151	107	24	14
18	3,4-二羟基苯乙酸	3.10	167	123	24	10
19	高香草酸	6.18	181	122	20	15
20	异高香草酸	5.59	181	137	30	10
21	苯丙酸	9.08	149	105	30	10
22	3-羟基苯丙酸	6.72	165	121	32	12
23	4-羟基苯丙酸	6.12	165	121	33	12
24	3,4-二羟基苯丙酸	4.85	181	137	32	12
25	4-羟基-3-甲氧基-苯丙酸	6.62	195	136	30	10
26	3-羟基-4-甲氧基-苯丙酸	7.04	195	151	30	16
27	肉桂酸	9.37	147	103	20	12
28	咖啡酸	5.05	179	135	35	16
29	阿魏酸	6.77	193	134	30	16
30	异阿魏酸	7.11	193	178	30	12
31	间香豆酸	7.05	163	119	30	18
32	对香豆酸	6.30	163	119	30	14
33	马尿酸	4.89	178	134	30	10

表3 33种代谢产物的回归方程、线性关系、检出限和定量限
Table 3 Regression equation, linearity, LOD and LOQ of 33 metabolites

编号 No.	化合物 Compound	分组 Group	回归方程 Regression equation	线性相关系数 Correlation coefficient (r^2)	线性范围 Linear range/ (mg/L)	检出限 LOD/ (mg/L)	定量限 LOQ/ (mg/L)
1	儿茶素	A	$y=106692.0x-681.4$	0.998	0.025~12.5	0.0078	0.0156
2	表儿茶素	A	$y=134830.0x+3010.1$	0.993	0.025~12.5	0.0063	0.0125
3	原花青素 B1	B	$y=104651.0x-2478.5$	0.999	0.05~25	0.0063	0.0063
4	原花青素 A1	B	$y=121716.0x+6262.2$	0.983	0.05~25	0.0063	0.0063
5	A型三聚体	B	$y=355180.0x+21177.3$	0.984	0.05~25	0.0063	0.0063
6	儿茶素 C-环开环产物	B	$y=16959.8x-553.2$	1.000	0.125~25	0.0625	0.1250
7	5-(3-羟基苯基)-戊内酯	A	$y=512405.0x+8569.8$	0.995	0.025~25	0.0125	0.0250
8	5-(3,4-二羟基苯基)-戊内酯	A	$y=41394.4x-404.9$	0.999	0.031~12.5	0.0078	0.0313
9	4-羟基-5-(3-羟基苯基)-戊酸	A	$y=22295.0x-373.1$	0.998	0.025~12.5	0.0250	0.0250
10	苯甲酸	D	$y=3164.5x-771.1$	0.987	1.25~100	0.6250	1.2500
11	3-羟基苯甲酸	B	$y=50478.8x+748.1$	0.996	0.125~10	0.0313	0.1250
12	4-羟基苯甲酸	A	$y=82183.0x-1333.7$	0.999	0.0625~12.5	0.0078	0.0625
13	原儿茶酸	A	$y=120709.0x+1207.8$	0.991	0.025~5	0.0063	0.0156
14	3-羟基-4-甲氧基-苯甲酸	C	$y=247.2x+1048.4$	0.994	2.5~50	0.2000	1.0000
15	香草酸	B	$y=10268.5x+619.4$	0.979	0.1~10	0.0500	0.1000
16	3-羟基苯乙酸	D	$y=2390.8x-1921.4$	0.991	2.5~100	0.6250	2.5000
17	4-羟基苯乙酸	C	$y=2749.1x+229.0$	0.991	1~100	0.2000	1.0000
18	3,4-二羟基苯乙酸	C	$y=480.5x-30.7$	0.988	10~50	2.5000	10.0000
19	高香草酸	D	$y=251.1x-409.7$	0.994	5~100	1.2500	5.0000
20	异高香草酸	C	$y=36477.1x+3080.9$	0.981	2~12.5	0.2500	2.0000
21	苯丙酸	C	$y=1876.8x-536.5$	0.996	2~100	1.0000	2.0000
22	3-羟基苯丙酸	B	$y=143935.0x+4127.9$	0.990	0.1~12.5	0.0312	0.0625
23	4-羟基苯丙酸	D	$y=3122.2x+961.8$	0.976	2.5~100	0.6250	2.5000
24	3,4-二羟基苯丙酸	B	$y=124365.0x+4034.7$	0.991	0.1~12.5	0.0313	0.0625
25	4-羟基-3-甲氧基-苯丙酸	A	$y=117801.0x+2297.3$	0.991	0.025~5	0.0125	0.0250
26	3-羟基-4-甲氧基-苯丙酸	C	$y=16008.4x+291.7$	0.993	0.5~50	0.2500	1.0000
27	肉桂酸	C	$y=5252.8x-108.8$	0.991	2.5~50	0.2000	1.0000
28	咖啡酸	A	$y=591337.0x+17393.0$	0.990	0.025~5	0.0031	0.0156
29	阿魏酸	B	$y=81051.0x+2457.2$	0.996	0.05~25	0.0250	0.0500
30	异阿魏酸	C	$y=13562.7x-163.1$	0.999	0.1~12.5	0.0500	0.1000
31	间香豆酸	A	$y=172015.0x-277.2$	0.999	0.031~12.5	0.0078	0.0313
32	对香豆酸	A	$y=199754.0x+267.4$	0.998	0.025~5	0.0063	0.0156
33	马尿酸	A	$y=102364.0x+1552.3$	0.995	0.063~12.5	0.0078	0.0625

2.3.2 灵敏度 利用一系列已知低浓度混标与空白样品的测量信号进行比较,确定各化合物的检出限(LOD)为3倍信噪比对应的浓度,定量限(LOQ)为8倍信噪比对应的浓度,结果列于表3。可见,检出限的最小值为0.0063 mg/L,对应的化合物有表儿茶素、原花青素 B1、原花青素 A1、原花青素三聚体、对香豆酸,这些化合物几乎没有噪音干扰;检出限的最大值为2.5 mg/L,对应的化合物仅有3,4-二羟基苯乙酸,该化合物的特征子离子响应相对较差;33种化合物的定量限在0.0156~10 mg/L之间,最大值对应的化合物仍是3,4-二羟基苯乙酸。

2.3.3 回收率 样品在处理过程中会存在一定的损失,因此,定量分析中回收率的评估尤为重要。回收率评估流程如下:将标准品加入原始空白生物基质样本中,按照1.5节方法处理样品,同时在经过前处理的各基质样品中加入标准品,分析空白样本中各化合物的含量(以峰面积表示),按照以下公式评估回收率。

回收率=(样本提取前的峰面积-空白样

品的峰面积)/(样本提取后的峰面积-空白样品的峰面积)×100%。33种化合物在血浆、尿液、粪便中的回收率列于表4。结果表明,不同基质的回收率大多在70%~120%之间,其中,粪便样品的加标回收率最好,血浆样品次之。Quifer等^[24]研究表明,酶解处理和孵育过程对样品中游离态的多酚和酚酸在回收率方面有负面影响,酶水解可能是导致这一现象的原因。

2.3.4 基质效应 将尿液、血浆或粪便等生物样本提取后,加入标准品溶液分析并制作校准曲线,并用甲醇制备标准品溶液获得标准曲线斜率,通过比较以上结果来评价基质效应。结果以100%为基准进行比较,基质效应为正,即为增强效应,基质效应为负,则为减弱效应^[23]。33种化合物在血浆、尿液、粪便中的基质效应列于表4。可见,化合物在粪便和尿液样品中的基质效应表现为轻微的离子抑制作用,而在血浆样品中则表现为离子增强作用。虽然有些化合物的基质效应较高,但大多数化合物的基质效应介于±20%之间可被接受。

表4 33种化合物在粪便、尿液、血浆中的回收率及基质效应

Table 4 Recovery and matrix effect of 33 compounds in feces, urine and plasma

编号 No.	化合物 Compound	粪便 Feces		尿液 Urine		血浆 Plasma	
		回收率 Recovery/ %	基质效应 Matrix effect/%	回收率 Recovery/ %	基质效应 Matrix effect/%	回收率 Recovery/ %	基质效应 Matrix effect/%
1	儿茶素	78.6	-6.2	60.1	-16.0	77.8	15.9
2	表儿茶素	64.1	-4.0	61.2	-12.3	90.8	10.6
3	原花青素 B1	58.7	-10.2	56.2	22.8	83.4	20.1
4	原花青素 A1	94.2	-3.8	69.9	-2.4	102.1	19.3
5	A型三聚体	71.8	1.8	42.5	-8.3	75.8	11.6
6	儿茶素 C-环开环产物	61.1	-21.9	35.9	37.7	56.2	1.7
7	5-(3-羟基苯基)-戊内酯	77.5	2.1	76.2	-11.8	72.2	18.1
8	5-(3,4-二羟基苯基)-戊内酯	86.2	1.1	87.7	13.2	81.5	19.7
9	4-羟基-5-(3-羟基苯基)-戊酸	80.9	-10.1	100.2	-15.8	84.9	16.3
10	苯甲酸	76.5	-16.1	60.1	-7.2	107.3	3.3
11	3-羟基苯甲酸	58.6	2.6	71.1	-3.8	114.3	22.4
12	4-羟基苯甲酸	69.1	14.1	72.6	-8.1	113.5	14.1
13	原儿茶酸	79.8	11.5	69.5	-31.5	74.2	17.3
14	3-羟基-4-甲氧基-苯甲酸	131.7	15.2	124.9	20.4	68.4	6.4
15	香草酸	85.8	19.8	58.0	-18.3	72.5	22.7

续表 4

编号 No.	化合物 Compound	粪便 Feces		尿液 Urine		血浆 Plasma	
		回收率 Recovery/ %	基质效应 Matrix effect/%	回收率 Recovery/ %	基质效应 Matrix effect/%	回收率 Recovery/ %	基质效应 Matrix effect/%
16	3-羟基苯乙酸	77.4	-1.5	38.9	-31.3	51.6	22.7
17	4-羟基苯乙酸	55.1	-9.4	99.6	-17.7	97.5	17.7
18	3,4-二羟基苯乙酸	125.7	14.7	72.6	16.8	69.4	1.0
19	高香草酸	116.1	12.7	76.5	1.2	68.4	21.4
20	异高香草酸	80.0	6.7	55.5	11.2	85.6	16.6
21	苯丙酸	51.6	-2.2	47.8	-18.7	143.1	12.1
22	3-羟基苯丙酸	108.5	-3.2	74.2	4.8	68.7	23.6
23	4-羟基苯丙酸	89.8	7.6	73.4	15.7	73.3	23.3
24	3,4-二羟基苯丙酸	80.0	-9.5	68.5	21.8	73.6	14.8
25	4-羟基-3-甲氧基-苯丙酸	124.5	2.4	77.9	15.7	88.2	24.5
26	3-羟基-4-甲氧基-苯丙酸	99.6	10.8	102.8	-18.7	93.9	17.6
27	肉桂酸	80.1	1.9	55.3	-10.1	86.6	17.5
28	咖啡酸	76.4	3.1	71.1	-11.4	78.4	25.6
29	阿魏酸	141.0	-0.1	60.4	-5.2	73.4	16.3
30	异阿魏酸	96.3	5.1	89.9	28.5	59.3	19.7
31	间香豆酸	86.3	-7.4	61.8	23.5	168.3	20.0
32	对香豆酸	85.3	14.0	63.4	-19.5	83.6	22.6
33	马尿酸	103.8	-4.6	107.5	-27.0	58.2	11.7

2.3.5 日内和日间精密度 对混合标准品、血浆、尿液和粪便 4 种样本进行日内和日间精密度评估,混标选择 S6(A 组 0.5 mg/L、B 组 1 mg/L、C 组 2 mg/L、D 组 4 mg/L) 进行评估;血浆、尿液、粪便按 1.5 节条件进行前处理后,用生物样本提取液配制与混合标准品 S6 等浓度的混合标准品进行评估。33 种化合物的日内和日间精密度示于图 3。可见,标准品以及不同基质的日内、日间精密度均小于 15%,表明方法的精密度和稳定性良好。

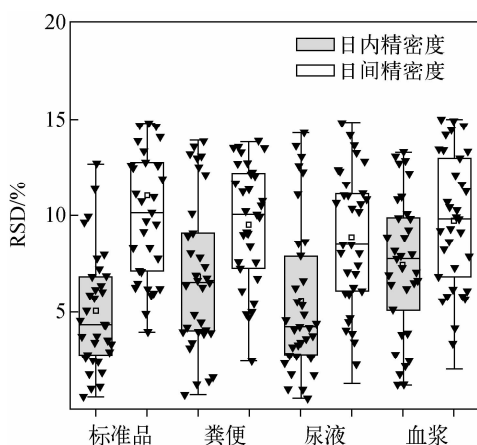


图 3 日内和日间精密度

Fig. 3 Inter-day and intra-day precisions

3 结论

本研究使用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱测定血浆、尿液和粪便中黄烷-3-醇类化合物的主要肠道微生物代谢产物,依据化合物离子响应值差异,确定了 33 种化合物在混合标准品中的浓度,使所有化合物在同一条件

下得到适宜的响应;同时,在 15 min 分析时间内,使混合标准品中 33 种化合物达到较好的分离。经方法学验证,33 种化合物具有较好的线

性关系,以尿液、粪便和血浆为研究材料,日内、日间精密度 RSD 值均在 15% 以下,基质效应介于±20%之间,回收率在 70%~120%之间。该方法灵敏、准确、稳定、抗基质干扰能力较强,可以为黄烷-3-醇类化合物靶向定量的深入研究提供参考。

参考文献:

- [1] KIM M Y, KIM H J, LEE Y Y, KIM M H, LEE J Y, KANG M S, KOO B C, LEE B W. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin extracts of various cultivars in oxidative-damaged HepG2 cells and LPS-induced raw 264.7 macrophages[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 9(4): 973-984.
- [2] NAWROT-HADZIK I, MATKOWSKI A, KUBASIEWICZ-ROSS P, HADZIK J. Proanthocyanidins and flavan-3-ols in the prevention and treatment of periodontitis-immunomodulatory effects, animal and clinical studies [J]. Nutrients, 2021, 13(1): 239-271.
- [3] SARRIA B, GOMEZ-JUARISTI M, MARTINEZ LOPEZ S, GARCIA CORDERO J, BRAVO L, MATEOS BRIZ M R. Cocoa colonic phenolic metabolites are related to HDL-cholesterol raising effects and methylxanthine metabolites and insoluble dietary fibre to anti-inflammatory and hypoglycemic effects in humans[J]. Peer J, 2020, 8: e9953.
- [4] 韩富亮,张予林,靳国杰,梁艳英,荆淑莹,姜小月. 葡萄酒花色苷的吸收机制[J]. 中国食品学报, 2016, 16(11): 182-188.
HAN Fuliang, ZHANG Yulin, JIN Guojie, LIANG Yanying, JING Shuying, JIANG Xiaoyue. The absorption mechanism of anthocyanins in wine [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(11): 182-188 (in Chinese).
- [5] MONAGAS M, URPI-SARDA M, SANCHEZ-PATAN F, LLORACH R, GARRIDO I, GOMEZ-CORDOVES C, ANDRES-LACUEVA C, BARTOLOME B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites[J]. Food Funct, 2010(1): 233-253.
- [6] KAY C D, PEREIRA-CARO G, LUDWIG I A, CLIFFORD M N, CROZIER A. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence[J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2017, 8: 155-180.
- [7] AMIN H P, CZANK C, RAHEEM S, ZHANG Q, BOTTING N P, CASSIDY A, KAY C D. Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59: 1095-1106.
- [8] WARNER E F, ZHANG Q, RAHEEM K S, O'HAGAN D, O'CONNELL M A, KAY C D. Common phenolic metabolites of flavonoids, but not their unmetabolized precursors, reduce the secretion of vascular cellular adhesion molecules by human endothelial cells[J]. J Nutr, 2016, 146(3): 465-473.
- [9] BORGES G, OTTAVIANI J I, Van der HOOFT J J J, SCHROETER H, CROZIER A. Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: a review of recent findings[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2018, 61: 18-30.
- [10] OU K, GU L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins[J]. J Funct Foods, 2014, 7: 43-53.
- [11] SERRA A, MACIA A, ROMERO M P, REGUANT J, ORTEGA N, MOTILVA M J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids[J]. Food Chemistry, 2012, 130(2): 383-393.
- [12] KAHLE K, KEMPF M, SCHREIER P, SCHEPPACH W, SCHRENK D, KAUTENBURGER T, HECKER D, HUEMMER W, ACKERMANN M, RICHLING E. Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols[J]. Eur J Nutr, 2011, 50: 507-522.
- [13] ZHOU J, YIN Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Analyst, 2016, 141(23): 6362-6373.
- [14] 李中权,张芳,苏越,郭寅龙. 质谱直接定量分析技术的应用进展[J]. 质谱学报, 2018, 39(2): 129-140.

- LI Zhongquan, ZHANG Fang, SU Yue, GUO Yinlong. Advances in direct quantification analysis by mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(2): 129-140(in Chinese).
- [15] CHEN S, KONG H, LU X, LI Y, YIN P, ZENG Z, XU G. Pseudotargeted metabolomics method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2013, 85(17): 8 326-8 333.
- [16] CHEN W, GONG L, GUO Z, WANG W, ZHANG H, LIU X, YU S, XIONG L, LUO J. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics[J]. Mol Plant, 2013 (6): 1 769-1 780.
- [17] 沈枫林,熊悦婷,刘晓慧,杨芑原. 基于质谱的蛋白质绝对定量研究策略和建议[J]. 质谱学报, 2021,42(2):101-117.
- SHEN Fenglin, XIONG Yueting, LIU Xiaohui, YANG Pengyuan. Strategies and recommendations for the absolute quantification of target proteins based on LC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(2): 101-117(in Chinese).
- [18] 蒲倩伦,廖晗,陈艳华,高杨,丁贤,贺玖明,张瑞萍,再帕尔·阿不力孜. 血浆代谢组同时定性定量分析方法研究[J]. 质谱学报, 2020, 41(4): 297-306.
- PU Qianlun, LIAO Han, CHEN Yanhua, GAO Yang, DING Xian, HE Jiuming, ZHANG Ruiping, ZEPER Ablize. Development of simultaneous qualification and quantification of plasma metabolome based on sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ions (SWATH) [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2020, 41(4): 297-306(in Chinese).
- [19] BASILIERE S, KERRIGAN S. Identification of metabolites and potential biomarkers of kratom in urine[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1 140: 121 971.
- [20] CASTELLO F, COSTABILE G, BRESCIANI L, TASSOTTI M, NAVIGLIO D, LUONGO D, CICIOLA P, VITALE M, VETRANI C, GALAVERNA G, BRIGHENTI F, GIACCO R, DEL RIO D, MENA P. Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans[J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 646: 1-9.
- [21] LUDWIG I A, MENA P, CALANI L, BORGES G, PEREIRA-CARO G, BRESCIANI L, DEL R D, LEAN M E J, CROZIER A. New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 89: 758-769.
- [22] van DUYNHOVEN J, van der HOOFT J J, van DORSTEN F A, PETERS S, FOLTZ M, GOMEZ-ROLDAN V, VERVOORT J, de VOS R C, JACOBS D M. Rapid and sustained systemic circulation of conjugated gut microbial catabolites after single-dose black tea extract consumption[J]. J Proteome Res, 2014, 13(5): 2 668-2 678.
- [23] PEREIRA-CARO G, ORDÓÑEZ J L, LUDWIG I, GAILLET S, MENA P, DEL RIO D, ROUANET J M, BINDON K A, MORENO-ROJAS J M, CROZIER A. Development and validation of an UHPLC-HRMS protocol for the analysis of flavan-3-ol metabolites and catabolites in urine, plasma and feces of rats fed a red wine proanthocyanidin extract[J]. Food Chem, 2018, 252: 49-60.
- [24] QUIFER-RADA P, MARTINEZ-HUELAMO M, LAMUELA-RAVENTOS R M. Is enzymatic hydrolysis a reliable analytical strategy to quantify glucuronidated and sulfated polyphenol metabolites in human fluids[J]. Food Funct, 2017, 8(7): 2 419-2 424.

(收稿日期:2021-02-25;修回日期:2021-05-06)