

矢车菊素-3-葡萄糖苷在小鼠体内的吸收与代谢

邹堂斌^{1,2}, 凌文华^{2*}

(1. 广东医学院公共卫生学院, 广东 东莞 523808; 2. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究花色苷矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)在小鼠体内的吸收与代谢情况。【方法】48 只小鼠随机分为 7 个实验组和 1 个对照组, 每组 6 只。实验组小鼠灌胃 C3G 后测定不同时间点血浆、肝脏、肾脏、膀胱、胃及小肠中 C3G、总花色苷和原儿茶酸(PCA)含量, 分析其代谢产物。【结果】实验组小鼠血浆、肝脏、肾脏和尿液中均有 C3G 存在, 在血浆中检测到了 C3G 的甲基化产物, 肝脏、肾脏和尿液中检测到了 C3G 的甲基化、葡萄糖醛酸化和硫酸化产物。另外, 在小鼠血浆、肝脏、肾脏、尿液和小肠中发现了 PCA, 在小肠中发现了矢车菊素, 在肝脏和肾脏中检测到了矢车菊素的甲基化、葡萄糖醛酸化和少量香草酸。【结论】花色苷除以原型吸收外, 部分在肠道可被代谢成酚酸, 酚酸种类可能与 B 环上取代基有关。

关键词: 花色苷; 矢车菊素-3-葡萄糖苷; 原儿茶酸; 吸收与代谢

中图分类号: R151.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)01-0036-05

Absorption and Metabolism of Cyanidin-3-glucoside in Mice

ZOU Tang-bin^{1,2}, LING Wen-hua^{2*}

(1. School of Public Health, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China; 2. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside (C3G) in mice. 【Methods】 Forty-eight mice were randomly divided into seven experimental groups and one control group, six mice in each group. Mice in experimental groups were gavaged with C3G. In different time, plasma and urine were collected; liver, kidney, stomach, and small intestine were excised. C3G, total anthocyanins (ACN), protocatechuic acid (PCA), and metabolites of C3G were determined in all samples. 【Results】 C3G existed in the plasma, liver, kidney, and urine in experimental group mice. Moreover, peonidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside were also detected in plasma. C3G methylation, C3G glucuronide, and C3G sulphate were detected in the liver, kidney, and urine. In addition, we found that PCA existed in the plasma, liver, kidney, urine, and small intestine after orally gavaged with C3G. Meanwhile, cyanidin was detected in the small intestine; cyanidin methylation, cyanidin glucuronide and a small amount of vanillic acid were detected in the liver and kidney. 【Conclusion】 A few anthocyanins could be absorbed by prototype, the others were metabolized to phenolic acids in the gut. The type of phenolic acids may be related to the substituent group of B cycle.

Key words: anthocyanins; cyanidin-3-glucoside; protocatechuic acid; absorption and metabolism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1):36-40]

花色苷(anthocyanins, ACN)是具有 2-苯基苯并吡喃(2-phenylbenzopyrylium)结构的一类糖苷衍生物,为植物界广泛分布的一种水溶性色素。流行病学研究提示,花色苷具有抗炎、抗氧化、预防心血管疾病和改善糖脂代谢等多种健康促进和疾病预防功效^[1-4]。许多富含花色苷的植物都是我们平时食用的果蔬,如桑葚、紫葡萄、石榴、紫甘蓝

等。Wu 等^[5]对 100 多种美国居民经常食用的水果和蔬菜进行了分析,估算出人均花色苷摄入量为 12.5 mg/d。在欧盟西部 10 国居民中,花色苷的摄入量介于 18.7 ~ 64.9 mg/d 之间^[6]。而在植物性膳食摄入比例较高的其他国家,如中国、日本等,人们通过膳食摄入的花色苷量会更高。但是,花色苷在体内是如何发挥作用的还不清楚,它的吸收与

收稿日期:2012-09-03

基金项目:国家自然科学基金(81172655);广西教育厅科研项目(200103YB143)

作者简介:邹堂斌,博士,讲师,研究方向:营养与食品卫生,E-mail: zoutb@163.com; * 通信作者:凌文华,E-mail: lingwh@mail.sysu.edu.cn

代谢成为近年来研究的热点。在自然界中,花色苷以矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyanidin-3-glucoside, C3G)的分布最为广泛^[7]。本次研究采用灌胃方式给予小鼠C3G,观察不同时间点C3G的吸收、分布和代谢情况。通过对C3G在小鼠体内吸收与代谢规律的研究,可进一步阐明花色苷的体内过程,将为花色苷的临床应用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

矢车菊素-3-葡萄糖苷(96.5%,实验室自制)、原儿茶酸($\geq 98\%$,Sigma公司)、SPF级BALB/c小鼠(9周龄,体质量20~25g,中山大学实验动物中心提供)、乙腈(HPLC级,Fisher公司)、甲酸(HPLC级,Fisher公司)、Oasis HLB过滤柱(1 mL,Waters公司)、Waters e2695高效液相色谱仪、Agilent 1200高效液相色谱仪、Agilent 6410三重四级杆质谱仪。

1.2 动物处理

给药前将小鼠禁食12h,可自由饮水。将48只小鼠随机分为7个实验组和1个对照组,每组6只(雌雄各半)。对照组小鼠灌胃PBS 0.5 mL/只,实验组小鼠以100 mg/kg剂量灌胃C3G溶液(每只约0.5 mL)。5、15、30、60、120、240和480 min后分别对7组小鼠进行处理;从眼眶静脉丛采血,置于肝素化离心管中,306 \times g离心10 min,分离血浆。小鼠脱颈椎处死后,取肝脏、肾脏、膀胱、胃及小肠,从膀胱中分离出尿液,胃和小肠用PBS冲洗;然后将所有样本放-80 $^{\circ}$ C保存待测。

1.3 样本前处理

称取一定质量组织,按1:2比例(即1 g:2 mL)加入生理盐水,高速匀浆获得均一匀浆液,1 224 \times g离心10 min,取上清液200 μ L;另取血浆100 μ L、尿液80 μ L;用10%甲酸定容至1.0 mL,用固相萃取柱按以下步骤处理:①HLB小柱先用1.0 mL丙酮:甲酸(体积比9:1,下同)和1.0 mL水:甲酸(9:1)清洗。②取1.0 mL样品上清装入过滤柱中,流速为1.0 mL/min。③过滤柱中加入1.0 mL丙酮:甲酸(9:1)洗脱,流速为1.0 mL/min。④洗脱液吹氮气使溶剂完全挥发。⑤剩余沉淀重新用100 μ L的水:甲酸(9:1)复溶。

1.4 C3G和总花色苷(Total ACN)含量测定

采用HPLC法测定,流动相A为乙腈,B为体积分数为10%的甲酸,检测波长 $\lambda = 520$ nm。选用elite[®] C18色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)分析,柱温30 $^{\circ}$ C,流速1.0 mL/min,进样体积20 μ L,每个样品分析30 min。流动相梯度洗脱条件为:0~15 min,5%~15% A;15~21 min,15%~28% A;21~22 min,28%~40% A;22~24 min,40%~60% A;24~27 min,60%~5% A;27~30 min,5% A。根据回归方程计算样品中C3G和Total ACN含量。

1.5 原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)含量测定

检测波长 $\lambda = 260$ nm,其他条件同1.4。

1.6 C3G在小鼠体内的代谢产物

采用HPLC-MS/MS法分析C3G在小鼠体内的代谢产物。Zorbax SB-C18柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m),流动相A为含5%甲酸的水,流动相B为乙腈,洗脱条件如下:0~1 min,2% B;1~3 min,2%~8% B;3~10 min,8%~10% B;10~15 min,10%~2% B。柱温30 $^{\circ}$ C,流速0.2 mL/min,进样体积5 μ L。质谱部分采用电喷雾离子源,以多重反应监测(MRM)扫描方式检测,雾化器压力50 psi,干燥气温度350 $^{\circ}$ C,流速8.0 L/min,毛细管电压5000 V,四级杆温度100 $^{\circ}$ C。

1.7 统计分析

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计分析,所有结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

于不同时间点采集实验组和对照组小鼠血液和组织样本,通过HPLC法测定血浆和组织中花色苷浓度。血浆、肝脏、肾脏、尿液及胃、小肠中C3G、总花色苷和PCA浓度随时间变化的规律见图1。

2.1 血浆中C3G、总花色苷和PCA浓度

如图1A所示,灌胃C3G后,实验组小鼠血浆中C3G浓度在15 min达到峰值[(2.84 \pm 0.18) nmol/mL],随后开始下降,4 h时浓度为(0.20 \pm 0.05) nmol/mL,8 h时几乎检测不到。另外,总花色苷浓度峰值也在15 min时出现[(3.76 \pm 0.42) nmol/mL],其余各时间点总花色苷浓度均高于C3G,8 h时也检测不到。有趣的是,灌胃后30 min在小鼠血浆中检测到PCA;PCA在2 h时浓度达到

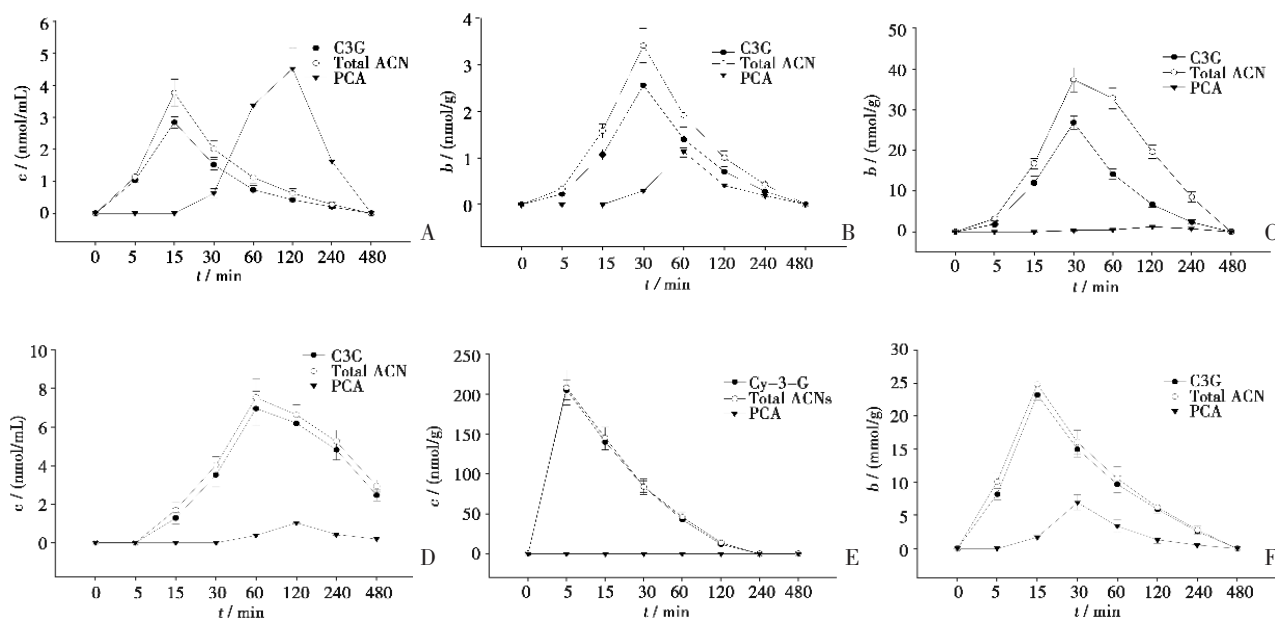


图 1 灌胃后血浆、尿液和器官中 C3G、总花色苷和 PCA 浓度

Fig.1 Concentration of C3G, total ACN, and PCA in plasma, urine, and organs after gavaged with C3G

A: in plasma; B: in liver; C: in kidney; D: in urine; E: stomach; F: in small intestine.

峰值 $[(4.52 \pm 0.65)\text{nmol/mL}]$,是 C3G 峰值的 1.57 倍;随后开始下降,在 8 h 时已被代谢出血液。对照组小鼠血浆中 8 h 内未发现花色苷及其代谢物。

2.2 肝脏中 C3G、总花色苷和 PCA 浓度

如图 1B 所示,灌胃 C3G 后,实验组小鼠肝脏中 C3G 浓度在 30 min 达到峰值 $[(2.56 \pm 0.30)\text{nmol/g}]$,随后开始下降,8 h 时几乎检测不到。另外,总花色苷浓度也在 30 min 时达到峰值,各时间点的浓度均高于 C3G。PCA 在 30 min 开始出现,1 h 达到峰值,8 h 时已检测不到。对照组小鼠肝脏中 8 h 内未发现花色苷及其代谢物。

2.3 肾脏中 C3G、总花色苷和 PCA 浓度

如图 1C 所示,灌胃 C3G 后,实验组小鼠肾脏中 C3G 浓度在 30 min 达到峰值 $[(2.68 \pm 0.16)\text{nmol/g}]$,随后开始下降,4 h 时浓度为 $(0.24 \pm 0.06)\text{nmol/g}$,8 h 时几乎检测不到。另外,总花色苷含量在各时间点均高于 C3G,峰值也在 30 min 时出现 $[(3.74 \pm 0.30)\text{nmol/g}]$ 。从 30 min ~ 4 h 在肾脏中检测到少量 PCA。对照组小鼠肾脏中 8 h 内未发现花色苷及其代谢物。

2.4 尿液中 C3G、总花色苷和 PCA 浓度

如图 1D 所示,灌胃 C3G 后,实验组小鼠尿液中 C3G 浓度在 1 h 时达到峰值 $[(6.95 \pm 0.89)\text{nmol/mL}]$,随后开始下降,8 h 时浓度为 $(2.45 \pm$

$0.28)\text{nmol/mL}$ 。另外,总花色苷浓度在各时间点均比 C3G 高,在 1 h 时达到峰值 $[(7.53 \pm 0.97)\text{nmol/mL}]$,8 h 时浓度为 $(2.93 \pm 0.32)\text{nmol/mL}$;在第 1、2、4 小时检测到少量 PCA。对照组小鼠尿液中 8 h 内未发现花色苷及其代谢物。

2.5 胃中 C3G、总花色苷和 PCA 浓度

如图 1E 所示,实验组小鼠灌胃 C3G 后,5 min 时胃组织 C3G 浓度为 $(205 \pm 12)\text{nmol/g}$,随后逐渐下降,4 h 时已检测不到。整个过程总花色苷和 C3G 浓度基本一致,未检测到 PCA。对照组小鼠胃中 8 h 内未发现花色苷及其代谢物。

2.6 小肠中 C3G、总花色苷和 PCA 浓度

如图 1F 所示,实验组小鼠灌胃 C3G 后,5 min 时在小肠中检测到了花色苷,峰浓度在 15 min 时出现,C3G 峰值为 $(23.2 \pm 2.0)\text{nmol/g}$,总花色苷峰值为 $(24.8 \pm 2.4)\text{nmol/g}$ 。随后逐渐下降,8 h 时几乎检测不到。15 min 时在小肠中检测到了 PCA,30 min 时达到峰值 $[(7.0 \pm 1.1)\text{nmol/g}]$,8 h 时已被清除完全。对照组小鼠小肠中 8 h 内未发现花色苷及其代谢物。

3 讨论

花色苷和槲皮素都属于黄酮类化合物,具有

类似的化学结构。于是人们推测花色苷与槲皮素一样都以苷元的形式被吸收^[8]。后来的研究发现花色苷多以原型形式通过胃肠道被吸收, 进入循环系统转移、转化, 然后通过尿液和粪便排出^[9-10]。Youdim 等^[11]使大鼠经口摄入主要成分为 C3G 的蓝莓提取物, 然后在其血浆中检测到了 C3G。Matsumoto 等^[12]所开展的研究也证实, 大鼠和人经口摄入黑加仑或接骨木果汁, 都在其血浆中测得完整结构的花色苷。但无论动物还是人, 摄入的花色苷只有很少部分被排出体外, 这可能是因为在吸收过程中与某些物质或基团结合, 分子结构发生变化, 所以未能检测到。

胃和小肠是花色苷吸收的主要场所。花色苷在胃部的吸收主要依赖于胃的酸性环境, 在胃酸作用下, 食物中的花色苷得到充分溶解释放, 所以吸收速度也比较快^[13-14]。研究表明, 给予大鼠花色苷 30 min ~ 2 h 后, 在大鼠胃部静脉和主动脉的血浆中, 以及肝脏和肾脏中均可检测到花色苷的原型及其代谢产物, 表明花色苷在胃部被快速而有效的吸收, 并经胆汁和尿液排泄。此外, 花色苷在胃部的吸收试验表明, 大多数花色苷可与胆红素转位酶(bilitranslocase)结合从而促使其迅速穿过胃壁黏膜^[14-15]。花色苷在小肠的吸收具有选择性, Matuschek 等^[16]通过体外培养小鼠胃肠组织观察了 C3G 的吸收, 发现 C3G 主要集中在空肠段吸收, 在十二指肠可被少量吸收, 而在回肠和结肠没有吸收。Andlauer 等^[17]将 C3G 灌注到大鼠小肠黏膜, 发现 C3G 被快速吸收进入肠微血管和小肠组织, 而单独的苷元未检测到。

本次研究发现, 给小鼠灌胃 C3G 后, C3G 会以原型形式迅速出现在血浆、肝脏、肾脏、尿液、胃和小肠中。另外, 总花色苷在血浆、肝脏、肾脏、尿液和小肠中的浓度均高于 C3G。说明酸性环境下 C3G 是稳定的, 进入血液或分布到组织器官后, 部分 C3G 会发生结构变化, 形成其他种类的花色苷。

花色苷的代谢贯穿整个消化道。已有研究表明, 花色苷在口腔就会发生初步代谢, 如唾液可以增强一些具有邻苯二酚结构的黄酮类的氧化亚氮的生物利用率; 由此推断, 唾液可能具有增强含矢车菊素苷元花色苷的生物利用率的作用^[18]。人体胃肠道的不同部位 pH 值和菌群结构有差异, 花色苷的结构也会因此而被修饰。胃中 pH 值很低, 花色苷可以 2-苯基苯并吡喃结构的稳定形式存在,

这在花色苷的体外消化实验中已经得到证实^[19]。与胃部不同, 肠道的 pH 值接近中性, 花色苷稳定性降低, 会向无色的查耳酮方向转换。而且, 肠道的大量菌群会对花色苷的结构进行修饰, Keppler 等^[20]用猪盲肠建立的体外模型证实花色苷在肠道菌群的作用下, 会迅速去糖基化和脱甲基化, 其苷元会通过 C-环裂解, 降解成相应的酚酸和醛。另外也有研究报道, 人粪便中的菌群可使矢车菊素花色苷和酰基化花色苷发生降解^[21-22]。一项人体试食试验结果表明, 大部分花色苷(约占摄入总量的 73%) 会在肠道细菌或肝肾酶系的催化作用下脱去糖苷生成 PCA^[23]。Tsuda 等^[24]的研究发现给大鼠灌胃 C3G 后, 在血浆中可检测到 PCA, 其浓度是 C3G 的 8 倍, 可能是 C3G 的代谢产物。但根据 Hassimoto 等^[25]的研究, 给大鼠灌服含有 C3G 和矢车菊素-3-芸香糖苷(cyanidin-3-rutinoside, C3R)的花色苷混合物后, 在大鼠血浆中并没有检测到 PCA。因此, 本次试验对 C3G 在小鼠体内是否会代谢生成 PCA 进行了研究。

研究结果表明, 给小鼠灌胃 C3G 后, 血浆中出现了大量 PCA, 其浓度是 C3G 的 1.57 倍; 在尿液和其他组织中发现了少量 PCA。因此, C3G 进入消化道后, 可能在肠道菌群的作用下生成 PCA。另外, 我们对 C3G 在小鼠体内的代谢产物进行了鉴定, 发现血浆中主要含 C3G 的甲基化产物, 肝脏和肾脏中主要含有 C3G 的甲基化和葡萄糖醛酸化产物。有趣的是, 我们还在血浆中发现了少量香草酸, 可能是由 PCA 甲基化产生的。因此, 花色苷在体内的生物活性可能是由花色苷母体及其肠道代谢产物共同发挥的。

参考文献:

- [1] Wang H, Nair MG, Strasburg GM, et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(2): 294-296.
- [2] Qin Y, Xia M, Ma J, et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects [J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(3): 485-492.
- [3] 方仕, 罗小琴, 吴晓滨, 等. 矢车菊素-3-葡萄糖苷通过降低 STAT3 活化抑制 TNF- α 诱导的小鼠血管平滑肌细胞增殖 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*,

- 2012, 33(6): 716–722.
- Fang S, Luo X, Wu X, et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits TNF- α -induced mouse vascular smooth muscle cells proliferation through suppression of STAT3 activation[J]. *J SUN Yat-sen Univ: Med Sci*, 2012, 33(6): 716–722.
- [4] Guo H, Xia M, Zou T, et al. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1 [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(4): 349–360.
- [5] Wu X, Beecher GR, Holden JM, et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(11): 4069–4075.
- [6] Zamora-Ros R, Knaze V, Lujan-Barroso L, et al. Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study [J]. *Br J Nutr*, 2011, 12(1): 1–10.
- [7] He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2010, 1(7): 163–187.
- [8] Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, et al. Cyanidins: metabolism and biological properties [J]. *J Nutr Biochem*, 2004, 15(1): 2–11.
- [9] Prior RL, Wu X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(10): 1014–1028.
- [10] Kay CD. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans [J]. *Nutr Res Rev*, 2006, 19(1): 137–146.
- [11] Youdim KA, Shukitt-Hale B, MacKinnon S, et al. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1523(1): 117–122.
- [12] Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, et al. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(3): 1546–1551.
- [13] Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(3): 631–636.
- [14] Talavera S, Felgines C, Texier O, et al. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats [J]. *J Nutr*, 2003, 133(12): 4178–4182.
- [15] El Mohsen MA, Marks J, Kuhnle G, et al. Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats [J]. *Br J Nutr*, 2006, 95(1): 51–58.
- [16] Matuschek MC, Hendriks WH, McGhie TK, et al. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(1): 31–36.
- [17] Andlauer W, Stumpf C, Frank K, et al. Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol [J]. *Eur J Nutr*, 2003, 42(4): 217–223.
- [18] Peri L, Pietraforte D, Scorza G, et al. Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: a new biological function for polyphenols with a catechol group [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(5): 668–681.
- [19] McDougall GJ, Dobson P, Smith P, et al. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(15): 5896–5904.
- [20] Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(17): 5195–5205.
- [21] Aura AM, Martin-Lopez P, O’Leary KA, et al. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora [J]. *Eur J Nutr*, 2005, 44(3): 133–142.
- [22] Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, et al. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro [J]. *Eur J Nutr*, 2006, 45(1): 7–18.
- [23] Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides [J]. *J Nutr*, 2007, 137(9): 2043–2048.
- [24] Tsuda T, Horio F, Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats [J]. *FEBS Lett*, 1999, 449(2–3): 179–182.
- [25] Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats [J]. *Nutr Res*, 2008, 28(3): 198–207.

(编辑 刘清海)