

UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS 鉴定桑色素在大鼠体内的代谢产物

邓志鹏¹, 柳佳², 熊山², 田海涛¹(1.山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2.山东第一医科大学山东省医学科学院药物研究所, 济南 250062)

摘要: 目的 利用 UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS 技术对桑色素在大鼠体内的主要代谢产物进行研究。方法 大鼠灌胃给予桑色素 20 mg·kg⁻¹ 后, 分别收集血浆、尿液和粪便样品, 采用 UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS 技术测定桑色素的体内代谢物。结果 根据一级质谱分子离子信息和二级质谱碎裂离子信息, 在大鼠血浆和尿液中均发现 2 个葡萄糖醛酸代谢产物, 在粪便中发现脱氢产物。结论 桑色素在大鼠体内的主要代谢途径为葡萄糖醛酸化反应。本研究初步阐明了桑色素在大鼠体内的代谢情况, 为进一步药理作用机制研究提供依据。

关键词: 桑色素; 代谢产物; UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)24-3262-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.24.011

引用本文: 邓志鹏, 柳佳, 熊山, 等. UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS 鉴定桑色素在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(24): 3262-3266.

Metabolite Identification of Morin in Rats by UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS

DENG Zhipeng¹, LIU Jia², XIONG Shan², TIAN Haitao¹(1.School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2.Institute of Materia Medica, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the metabolites of morin in rats *in vivo* by UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS. **METHODS** Rat plasma, urine and feces samples were collected after oral administration of 20 mg·kg⁻¹ morin, and the metabolites of morin *in vivo* were detected by UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS. **RESULTS** Two glucuronidation metabolites were observed in rat plasma and urines, and one dehydrogenation metabolite was in feces according to the MS and MS/MS information. **CONCLUSION** The main metabolic pathway of morin is glucuronidation in rats. This preliminary study clarified the metabolism of morin in rats, and provided the basis for further study of pharmacological mechanism.

KEYWORDS: morin; metabolite; UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS

桑色素, 分子式为 C₁₅H₁₀O₇, 化学名称为 3,5,7,2',4'-五羟基黄酮, 常温下为黄色或灰黄色针状结晶, 在空气中久置易被氧化为棕色而变质^[1-2]。桑色素是来源于桑科植物的一种常见化合物, 除桑科植物外, 含有桑色素的植物还有洋葱、番石榴叶和海藻等, 在濒危植物中华补血草中也有发现^[3-4]。现代药理研究表明^[5-10], 桑色素具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗高尿酸症、保肝等作用。武林^[10]证明桑色素对非酒精性脂肪性肝炎具有明显缓解作用, 其作用机制为桑色素上调过氧化物酶体增殖激活受体 α 的蛋白表达并抑制固醇调节原件结合蛋白 1c 的蛋白表达, 同时激活了乙酰辅酶 A 羧化酶、蛋白激酶 B 和单磷酸腺苷依赖的蛋白激酶的磷酸化表达, 从而起到显著的抗脂质积聚作用, 因此桑色素在将来有望成为治疗肝损伤及其他代谢

疾病的药物。

超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用技术(UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS)技术, 具有分离速度快、分辨率高、灵敏度高等一系列优点, 通过与对照品图谱相结合, 参考色谱峰相关数据库和相关文献, 已广泛应用于药物代谢产物研究及化学成分分析^[11-12], 本实验采用 UPLC-Q-Exactive Plus Orbitrap-MS 技术对桑色素在大鼠体内代谢产物进行分析鉴定。

在创新药物研究开发过程中, 药物代谢研究变得愈发重要, 而在进行药物代谢研究时, 必须保证所用分析方法的可靠性, 而对药物代谢物进行研究鉴定在这个过程的许多阶段中有着尤为重要的作用。目前, 有关桑色素药理活性的研究较多, 但是对于桑色素代谢产物的研究较少, 通过

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2019MH051)

作者简介: 邓志鹏, 男, 博士, 副教授 E-mail: depon2005@126.com

鉴定桑色素在大鼠体内的代谢产物,可以充分了解桑色素在大鼠体内的代谢情况,对于研究桑色素药理活性及其在人体内的作用机制具有重要的参考价值。本实验对桑色素大鼠体内代谢产物进行研究,并根据质谱裂解规律和借助代谢软件,考察代谢产物情况和推测可能的代谢途径,明确桑色素药效物质基础,从而为桑色素进一步开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SD 大鼠,♂,体质量为(200±20)g,由济南朋悦动物繁育公司提供,动物生产许可证号为 SCXK(鲁)20140007。实验期间大鼠在恒定环境下饲养,相对湿度为(55±15)%,饲养温度为(23±3)℃,日温差≤4℃,昼夜明暗交替时间 10 h/14 h,并且可自由饮食饮水。

1.2 仪器与试剂

超高压液相串接 Q-Exactive Plus Orbitrap 高分辨质谱、Sorvall Biofuge Stratos 高速冷冻离心机[半径为 8.51 cm]、手动移液器均来自美国 ThermoFisher Scientific 公司;EL204 电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];IKA Vortex 3 旋涡混匀器[艾卡(广州)仪器设备有限公司];数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);氮吹仪(青岛聚创环保集团有限公司)。

桑色素标准品(宝鸡辰光生物科技有限公司,批号:HM052276198;纯度:98.87%);甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);乙腈(色谱纯,中国赛默飞世尔科技有限公司);乙酸铵(分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(美国 Sigma-Aldrich 公司);实验用水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。

1.3 色谱与质谱条件

色谱条件:Agilent Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);柱温:35℃;流动相:5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,洗脱程序为:0~2 min, 10%B; 2~20 min, 10%→95%B; 20~27 min, 95%B; 27~27.1 min, 95%→10%B; 27.1~30 min, 10%B。流速:0.6 mL·min⁻¹;自动进样器温度:15℃;进样量:5 μL。

具体质谱参数如下所示:HESI 离子源,负离子模式下检测,喷雾电压为+3 500V/-3 300V;离子传输管温度为 320℃;鞘气压力为 45 arb;辅助

气为 10 arb;扫描模式为全扫描模式。

1.4 给药溶液的配制

精密称取桑色素 10.29 mg,加入 0.5%羧甲基纤维素钠溶液 5 mL,搅拌使之均匀分散。给药溶液现用现配,并按照 20 mg·kg⁻¹ 剂量进行大鼠灌胃给药。

1.5 动物给药及样品采集

4 只 Wistar 大鼠分为 2 组,分别为给药组和空白组,每组 2 只大鼠。经适应性饲养 7 d 后开始实验,给药前禁食 14 h,自由饮水。给药组大鼠按 20 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃给予桑色素溶液,空白组大鼠给予等体积 0.5%羧甲基纤维素钠溶液,分别在给药后 2, 4, 8 h 眼眶静脉丛取血,以 10 000 r·min⁻¹ 转速离心 3 min,取上层血浆置于-80℃冰箱中保存待分析测定。同时分别收集给药后 0~6 h, 6~12 h 和 12~24 h 的尿液和粪便,记录尿样体积、粪便质量,置-80℃冰箱中冷冻保存。

1.6 样品预处理

1.6.1 血浆样品的预处理 分别吸取大鼠给药后 3 个时间点的血浆样品,按 1:1:2 体积比例进行混匀,加 3 倍甲醇涡旋震荡 5 min,以 13 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,取 5 μL 上清液进样分析。

1.6.2 尿液样品的预处理 将各时间段尿液样品合并后 13 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后,取 5 μL 上清液进样分析。

1.6.3 粪便样品的预处理 将干燥的粪样研碎混匀,加入甲醇超声提取后,取全部上清液经 40℃ 氮气流浓缩至干,加流动相复溶,以 13 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,取 5 μL 上清液进样分析。

1.7 质谱分析

对处理后的血浆、尿液、粪便样品进行质谱扫描,利用 ThermoFisher Scientific 超高压液相串接 Q-Exactive plus Orbitrap 高分辨质谱自带的 Compound Discoverer 3.0.0.294 软件,根据血浆、尿液、粪便样品的一级、二级质谱图,并与相应的空白样品对比寻找潜在的代谢产物。

2 结果

2.1 桑色素的质谱裂解规律分析

在负离子模式下,桑色素生成准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 301.036 1,其二级质谱图和质谱裂解途径见图 1~2。在二级质谱图中,桑色素碎片离子有 *m/z* 273.041 2[M-H-CO]⁻、*m/z* 257.046 2[M-H-CO-O]⁻、*m/z* 229.051 1[M-H-2CO-O]⁻等,除此之

外, 桑色素还易发生 RDA 裂解, 即 C 环 1 位和 3 位断裂, 产生碎片离子 m/z 151.003 2, 裂解示意图见图 3。

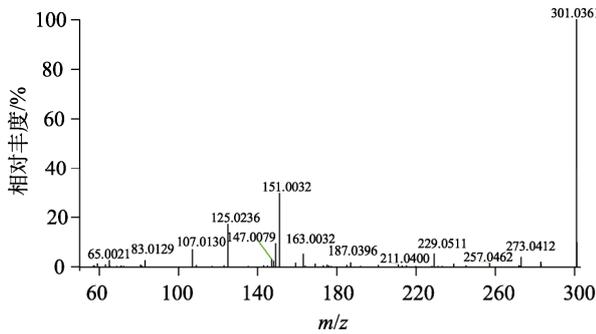


图 1 ESI-模式下桑色素二级质谱图
Fig. 1 MS/MS spectra of morin in ESI⁻ mode

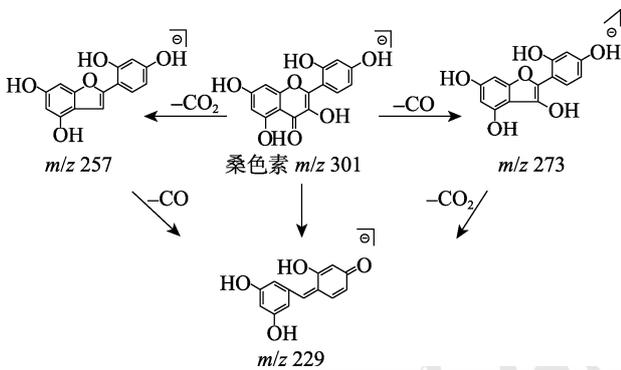


图 2 ESI-模式下桑色素的质谱裂解途径
Fig. 2 Mass spectrometric fragmentation pathway of morin in ESI⁻ mode

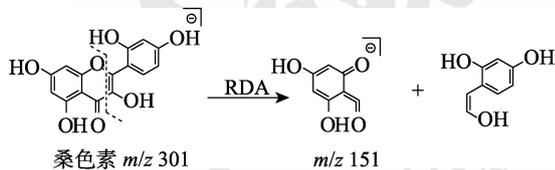


图 3 ESI-模式下桑色素 RDA 质谱裂解
Fig. 3 RDA fragmentation of morin in ESI⁻ mode

2.2 代谢产物鉴定

与大鼠空白血浆样品相比, 给药后大鼠血浆中除了桑色素(**M0**)以外, 检测到与桑色素相关的 2 个代谢产物, 其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 477.067 5(**M1**, **M2**)、其保留时间分别为 8.4 min(**M0**)、7.0 min(**M1**)和 8.0 min(**M2**); 给药后大鼠尿液中未检测到原形 **M0**, 发现 2 个代谢产物, 其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 477.067 5(**M1**, **M2**)、其保留时间分别为 7.0 min 和 8.0 min, 与血浆代谢物一致; 大鼠粪便中发现原形 **M0** 和 1 个代谢产物 **M3**, 其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 299.019 7, 保留时间为 9.7 min。结果见图 4~5 和表 1。

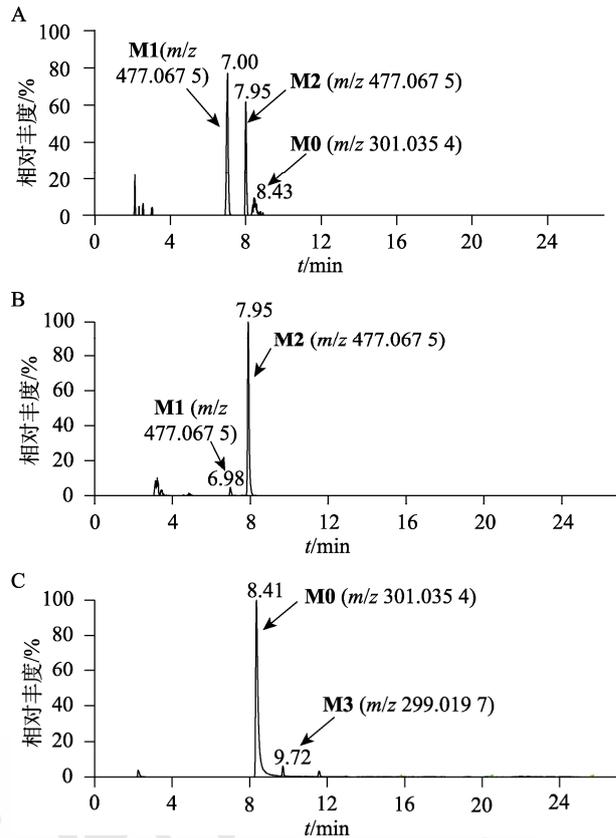


图 4 大鼠样品提取离子流色谱图
A-血浆; B-尿液; C-粪便。
Fig. 4 Extraction ion chromatograms of rat samples
A-plasma; B-urine; C-feces.

M0 鉴定: 给药后大鼠血浆样品中检测到准分子离子为 m/z 301.036 1 色谱峰, 保留时间为 8.4 min, 其二级质谱产生 m/z 151.003 2, m/z 125.023 6, m/z 107.013 0, m/z 229.051 1, m/z 273.041 2, m/z 257.046 2 碎片离子, 均与桑色素标准品有相同的碎片离子, 所以判断 **M0** 为桑色素原形。其中 m/z 151.003 2 是桑色素发生 RDA 裂解产生的碎片离子, m/z 273.041 2 是桑色素脱去一分子 CO 产生的碎片离子, m/z 257.046 2 是桑色素脱去一分子 CO_2 所产生, m/z 229.051 1 是桑色素脱去一分子 CO 和一分子 CO_2 所产生的。

代谢物 **M1** 鉴定: 给药后大鼠血浆、尿液样品中均检测到准分子离子 m/z 477.068 0, 保留时间为 7.0 min, 由精确分子质量推测其分子式为 $C_{21}H_{18}O_{13}$, **M1** 精确分子量比 **M0** 多 176 Da 推测 **M1** 是 **M0** 的葡萄糖醛酸结合物, 其二级质谱产生 m/z 339.495 5、 m/z 301.035 9、 m/z 151.002 5 的碎片离子, m/z 301.035 9 为桑色素特征离子, m/z 151.002 5 为 m/z 477.068 0 脱去葡萄糖醛酸再发生 RDA 裂解产生的碎片离子。

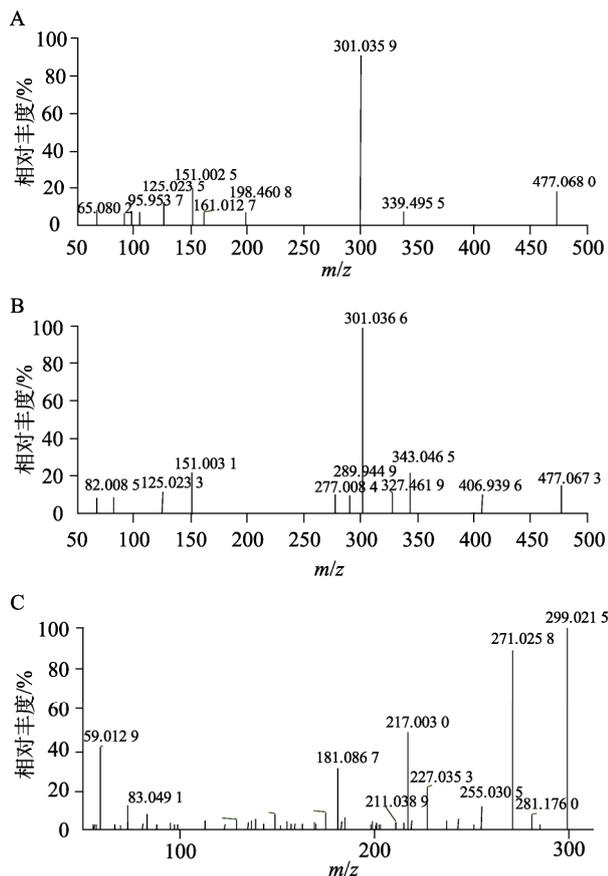


图5 代谢产物的二级质谱图

A-M1; B-M2; C-M3。

Fig. 5 MS/MS spectra of metabolites

A-M1; B-M2; C-M3.

代谢物 **M2** 鉴定: 给药后大鼠血浆、尿液样品中均检测到准分子离子 m/z 477.0673, 保留时间为 8.0 min, 由精确分子质量推测其分子式为 $C_{21}H_{18}O_{13}$, **M2** 精确分子量比 **M0** 多 176 Da, 推测 **M2** 是 **M0** 的葡萄糖醛酸结合物, 其二级质谱产生 m/z 343.0465、 m/z 301.0366、 m/z 151.0031 的碎片离子, m/z 301.0366 为桑色素特征离子, m/z 151.0031 为 m/z 477.0680 脱去葡萄糖醛酸再

发生 RDA 裂解产生的碎片离子。

M1 和 **M2** 都是 **M0** 的葡萄糖醛酸结合物, 且互为同分异构体。

代谢物 **M3** 鉴定: 给药后大鼠粪便样品中检测到准分子离子 m/z 299.0215, 保留时间为 9.7 min, 由精确分子质量推测其分子式为 $C_{15}H_8O_7$, **M3** 精确分子量比 **M0** 少 2 Da, 推测 **M3** 为 **M0** 脱氢代谢物, 其二级质谱产生 m/z 281.1760、 m/z 255.0305、 m/z 271.0258、 m/z 181.0897 碎片离子, 其中 m/z 281.1760 为 m/z 299.0215 脱去一分子 H_2O 生成, m/z 255.0305 为 m/z 299.0215 脱去一分子 CO_2 生成。

3 讨论

据相关文献报道^[13], 大鼠低剂量灌胃给药桑色素 ($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的血清中桑色素结合代谢产物量远高于原形药物, 当桑色素给药剂量加倍, 血清中原形药物要比结合代谢产物高得多, 本实验所用桑色素剂量为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 通过图 4A 质谱相应信号可推测血浆中葡萄糖醛酸结合物量要显著高于原形药物。

在本实验中, 桑色素经灌胃给药后血浆中检测出原形药物和葡萄糖醛酸代谢物, 尿液中仅检测到葡萄糖醛酸代谢物, 粪便中检测出原形药物和脱氢产物。据研究报道^[14-16], 桑色素的绝对口服生物利用度仅有 0.45%, 提示化合物从小肠吸收进入血量较少, 进入体内的桑色素绝大部分经肝脏发生代谢转化成葡萄糖醛酸结合物, 血液中剩余少量的原形仍被检出。

桑色素在血浆及尿液中检测出 **M1** 和 **M2** 2 种互为同分异构体的葡萄糖醛酸结合物, 桑色素与槲皮素互为同分异构体, 化学结构上的区别在于 B 环上的二羟基取代位置不同^[17]。槲皮素进入体内

表 1 桑色素在大鼠体内的代谢产物

Tab. 1 Metabolites of morin in rats

化合物	离子模式	保留时间/min	分子式	理论相对分子量(m/z)	实验相对分子量(m/z)	误差/ $\times 10^{-6}$	二级碎片信息	鉴定结果	基质来源
M0	ESI ⁻	8.4	$C_{15}H_{10}O_7$	301.0354	301.0361	2.3	MS2[301]: 151.00(100), 125.02(75), 107.01(30), 229.05(15), 273.04(10), 257.05(8)	原形	血浆, 粪便
M1	ESI ⁻	7.0	$C_{21}H_{18}O_{13}$	477.0675	477.0680	1.1	MS2[477]: 301.04(100), 151.00(23), 125.02(18), 339.50(10)	葡萄糖醛酸化反应	血浆, 尿液
M2	ESI ⁻	8.0	$C_{21}H_{18}O_{13}$	477.0675	477.0673	-0.4	MS2[477]: 301.04(100), 343.05(28), 151.00(28), 125.02(18), 327.46(15)	葡萄糖醛酸化反应	血浆, 尿液
M3	ESI ⁻	9.7	$C_{15}H_8O_7$	299.0197	299.0215	0.6	MS2[299]: 271.03(91), 181.09(32), 255.03(15), 281.18(8)	去氢反应	粪便

的主要代谢产物是槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷酸(m/z 477.1)、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷(m/z 463.2)、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷酸(m/z 491.2)^[18-20]。桑色素大鼠体内主要代谢产物是葡萄糖醛酸结合物 **M1** 和 **M2**, 其结构中含 5 个羟基, 推测葡萄糖醛酸化位点发生在 3, 5, 7, 2', 4'位置。

本研究通过分析大鼠给药桑色素后血浆、尿液和粪便样品共检测到 3 种相关代谢产物, 主要以葡萄糖醛酸化代谢为主, 此研究为桑色素体内物质基础的明确、代谢途径和代谢机制研究提供重要的参考。

REFERENCES

- [1] ZHI T D, HUANG Q H. The research development on the bioactivities of morin[J]. Chin Med Mod Distance Educ China(中国中医药现代远程教育), 2009, 7(3): 112-115.
- [2] WANG X L. Recent progress of the application of morin in analytical chemistry[J]. Metall Anal(冶金分析), 1992, 12(3): 36-40.
- [3] WANG Y J, ZHANG G W. Inhibition effect of morin on xanthine oxidase activity[J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(13): 143-146.
- [4] YU F. Simultaneous determination of isoquercetin, morin, quercetin, luteolin and apigenin in *Limonium sinense*(Girard) kuntze by RP-HPLC[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(4): 632-635.
- [5] KUCUKLER S, CAGLAYAN C, DARENDELIOU011FLU E, et al. Morin attenuates acrylamide-induced testicular toxicity in rats by regulating the NF- κ B, Bax/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways[J]. Life Sci, 2020(261): 118301.
- [6] ARAB H H, SAAD M A, EL-SAHAR A E, et al. Mechanistic perspective of morin protection against ketoprofen-induced gastric mucosal injury: Targeting HMGB1/RAGE/NF- κ B, DJ-1/Nrf2/HO-1 and PI3K/mTOR pathways[J]. Arch Biochem Biophys, 2020(693): 108552.
- [7] ZHOU Y. Mechanism of anti-inflammatory effects of morin hydrate in atherosclerosis[D]. Jinan: Shandong University, 2016.
- [8] YE J. The effect of morin on growth inhibition and its related mechanism in breast cancer[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [9] CHI S M, YANG S L, JIN W, et al. Inclusion and antioxidant properties of taxifolin, quercetin and morin hydrate with diaminopropane bridged bis(β -cyclodextrin)S[J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2020, 48(2): 215-223.
- [10] WU L. Molecular mechanism of morin on alleviating non-alcoholic fatty liver disease in mice[D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [11] LUO Y T, ZENG Y J, PENG J Y, et al. Chemical composition analysis of Tibetan medicine Ji-ni-de-xie based on UPLC-Q-Executive Orbitrap MS technology[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(17): 1727-1735.
- [12] CHANG G H, BO Y Y, CUI J, et al. Main chemical constituents in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* by UPLC-Q-Executive Orbitrap-MS[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(6): 1449-1459.
- [13] HOU Y C, CHAO P D L, HO H J, et al. Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2003, 55(2): 199-203.
- [14] LI J B, YANG Y, NING E J, et al. Mechanisms of poor oral bioavailability of flavonoid morin in rats: From physicochemical to biopharmaceutical evaluations[J]. Eur J Pharm Sci, 2019(128): 290-298.
- [15] FANG S H, HOU Y C, CHANG W C, et al. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock[J]. Life Sci, 2003, 74(6): 743-756.
- [16] HSIU S L, TSAO C W, TSAI Y C, et al. Determinations of morin, quercetin and their conjugate metabolites in serum[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(8): 967-969.
- [17] YIN Z H, SUN C H, FANG H Z. Analysis and comparison on fragmentation behavior of quercetin and morin by ESI-MS[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2017, 36(2): 205-211.
- [18] 王增仙. 高效液相色谱-质谱法测定血浆中槲皮素及其主要代谢产物[J]. 中成药, 2012, 34(4): 750-753.
- [19] FU N G, CHEN F, WEI N, et al. LC-MS determination of brief quercetin metabolites in rat plasma[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(5): 764-768.
- [20] WEN Q, CHEN F. Advances in the study of pharmacological activities for phase II metabolites of quercetin[J]. Hainan Med J(海南医学), 2016, 27(2): 275-278.

收稿日期: 2022-03-24

(本文责编: 沈倩)