

UPLC-Q-TOF/MS 鉴定大鼠口服桑叶黄酮后的体内物质

伍明江^{1,2}, 吴晓磊^{1,3}, 张德芹^{1*}, 丁丽琴¹, 邱峰¹, 马浩玲¹, 陈新则¹

1. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津 300193

2. 遵义医药高等专科学校 药学系, 贵州 遵义 563006

3. 天津中新药业研究中心, 天津 300457

摘要: 目的 鉴定大鼠口服桑叶黄酮提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁样品中的化学物质。方法 Wistar 大鼠按 0.5 g/kg 一次性 ig 桑叶黄酮提取物后, 取不同时间点的血浆、尿液、粪便及胆汁, 采用超高效液相色谱与四级杆飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF/MS) 技术对各样品进行检测, 分析样品中存在的化学物质。结果 从大鼠血浆、尿液、粪便、胆汁中共鉴定出 13 个原型成分, 41 个代谢产物, 其代谢产物以葡萄糖醛酸结合、硫酸结合及甲基化产物为主。结论 该研究为桑叶的药动学及药效作用机制研究提供一定的参考。

关键词: 桑叶; 黄酮; 超高效液相色谱与四级杆飞行时间质谱联用仪; 药动学; 槲皮素; 葡萄糖醛酸结合

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)14-2832-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.005

Identification of *in vivo* substances of rats after oral administration of mulberry leaves flavonoids by UPLC-Q-TOF/MS

WU Ming-jiang^{1,2}, WU Xiao-lei^{1,3}, ZHANG De-qin¹, DING Li-qin¹, QIU Feng¹, MA Hao-ling¹, CHEN Xin-ze¹

1. Traditional Chinese Medicine Research Institute, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Department of Pharmacy, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, China

3. R&D Center, Zhong-xin Drug Company of Tianjin, Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To identify the chemical substances in plasma, urine, feces and bile samples of rats after oral administration of mulberry leaves flavonoids. **Methods** The plasma, urine, feces and bile samples of rats after a single oral administration of mulberry leaves flavonoids at a dose of 0.5 g/kg at different time points were detected by UPLC-Q-TOF/MS. **Results** Thirteen prototype compounds and 41 metabolites were found. The metabolites mainly included glucuronidation, sulfation and methylation. **Conclusion** This research established the basis to study the pharmacokinetics and the pharmacological action mechanism of the mulberry leaves.

Key words: leaves of *Morus alba*; flavonoids; UPLC-Q-TOF/MS; pharmacokinetics; quercetin; glucuronidation

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 始载于《神农本草经》。其味甘、苦, 性寒, 归肺、肝经, 具有疏散风热、清肺润燥, 清肝明目的功效。用于治疗风热感冒、肺热燥咳、头晕头痛、目赤昏花, 常用于以发热、咳嗽为主的风热感冒、风热犯肺的肺热咳嗽及风热引起的目赤涩痛。桑叶主要含黄酮、生物碱、苯丙素、萜类、多糖等化学成分^[1-2], 具有降血糖、调血脂、抗凝血、抗肿瘤、抗病毒等药理作用^[3-7]。古代桑叶常用于消渴病的防治^[8]。

桑叶黄酮是桑叶的主要化学成分^[9], 主要包括

黄酮类、黄酮醇类、黄烷类、查耳酮类 4 种类型, 经现代研究证明桑叶黄酮具有调节糖脂代谢紊乱^[10-11]、抗衰老^[12]等药理作用。产生药理作用的物质基础包括药物原型成分以及由原型成分经生物转化后形成的代谢产物, 因此, 进一步阐明桑叶黄酮在治疗糖脂代谢紊乱等疾病的物质基础, 对其吸收入体的化学成分研究很有必要。本实验选择 Wistar 大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后, 利用超高效液相色谱与四级杆飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF/MS) 技术对大鼠体内存在的原型成分和代谢产物进行鉴定, 共鉴

收稿日期: 2016-12-13

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (81430095); “重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09101212)

作者简介: 伍明江 (1981—), 男, 在读博士, 研究方向为药动学研究。Tel: 18286281981 E-mail: zyyzwmj@163.com

*通信作者 张德芹, 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药基本理论及临床应用研究。Tel: (022)59596152 E-mail: deqin123@163.com

定出13个原型成分,41个代谢产物,代谢产物主要以葡萄糖醛酸结合、硫酸结合、甲基化代谢产物为主。该研究为桑叶的药动学及药效作用机制研究提供一定的参考。

1 材料

1.1 动物

Wistar大鼠,雄性,体质量200~220 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,许可证号SCXK-(军)2012-0004。

1.2 药物

桑叶购自河北华霖药业有限公司,经天津中新药业耿彤执业中药师鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。

对照品芦丁(批号20150615)、槲皮素(批号20150821)、山柰酚(批号20151110)、紫云英苷(批号20150924)均购自天津士兰科技有限公司;异槲皮苷(批号20130822)、桑色素(批号AW800M)、木犀草苷(批号111720-201418)均购自天津一方众康医药技术有限公司,以上对照品质量分数均≥98%。

1.3 试剂

乙腈、甲酸均为色谱纯,购自天津市康科德科技有限公司;甲醇、乙醇、石油醚、醋酸乙酯均为分析纯,购自天津市大茂化学试剂厂;肝素钠,购自北京索莱宝科技有限公司;乌拉坦,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器

OSB-2100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);LEGEND MACH 1.6R 离心机(美国 Thermo 公司);HS6150D 超声清洗器(天津恒奥科技发展有限公司);AcQuity UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Xevo G2-S Qtof 质谱仪(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 桑叶总黄酮的提取 参考文献方法^[13-14],取桑叶10 kg,用10倍量70%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩后用等体积的石油醚萃取3次,保留水层,再用等体积的醋酸乙酯萃取3次,合并醋酸乙酯萃取液,萃取液通过大孔树脂柱分离,用95%乙醇洗脱,洗脱液再通过聚酰胺柱纯化,95%乙醇洗脱,收集乙醇液,浓缩,干燥至恒定质量,其中以桑叶中芦丁的量计,总黄

酮提取物中芦丁质量分数为1.6%。

2.1.2 药物配制 参考文献方法^[15]和预试验结果,桑叶黄酮提取物按0.5 g/kg的用量ig给予大鼠,给药时将一定量黄酮提取物加在0.5% CMC-Na水溶液中,反复研磨至混悬液。

2.1.3 混合对照品的配制 分别取适量的芦丁、异槲皮苷、木犀草苷、紫云英苷、桑色素、槲皮素、山柰酚对照品,用甲醇配制成质量浓度均为0.1 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2 样品采集

2.2.1 大鼠血浆样品的采集 取Wistar雄性大鼠3只,适应性饲养5 d,于实验前禁食24 h,自由饮水。按0.5 g/kg一次性ig桑叶黄酮提取物,分别于给药前及给药后15、30、60、120、240、360、720 min于眼眶后静脉丛取血,每次取血约0.5 mL于1.5 mL肝素化的离心管中,在4 000 r/min条件下离心10 min,取分离出的血浆于离心管中,-20℃冰冻保存备用。

2.2.2 大鼠尿液、粪便样品的采集 取Wistar雄性大鼠3只,适应性饲养5 d,将大鼠置于代谢笼中禁食24 h,自由饮水,收集空白尿液和空白粪便。于第6天按0.5 g/kg一次性ig桑叶黄酮提取物后继续置于代谢笼中,收集0~12、12~24、24~48 h的尿液及0~48 h的粪便。实验期间以淀粉糊喂食大鼠,自由饮水。

2.2.3 大鼠胆汁样品的采集 取Wistar雄性大鼠3只,适应性饲养5 d,于实验前禁食24 h,自由饮水。于第6天按0.5 g/kg一次性ig桑叶黄酮提取物后,用20%乌拉坦按7 mL/kg ip麻醉后背式固定,在剑突下做横向切口2~3 cm找到十二指肠上段黏膜的胆管,分离,在胆管远端作一小切口向肝方向插入内径为0.8 mm的PE管,收集0~12、12~24 h的胆汁。另取Wistar雄性大鼠3只,按上述操作收集空白大鼠胆汁。

2.3 样品处理

2.3.1 大鼠血浆样品的处理 取血浆样品200 μL,加甲酸10 μL,涡旋1 min,加醋酸乙酯1.6 mL,涡旋3 min,4 000 r/min离心10 min,取上清液转移至离心管中,N₂吹干,进样前,用80%甲醇水溶液200 μL复溶,14 000 r/min离心10 min,取上清液进样分析。

2.3.2 大鼠尿液、胆汁样品的处理 将收集到的尿液(或胆汁)离心,取上清液1 mL,加甲酸50 μL,

涡旋 1 min, 加醋酸乙酯 8 mL, 涡旋 3 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液转移至离心管中, N₂ 吹干, 进样前, 用 80% 甲醇水溶液 200 μ L 复溶, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.3.3 大鼠粪便样品的处理 取粪便 1.0 g, 加醋酸乙酯 8 mL, 超声提取 50 min, 离心, 取上清液 1 mL 转移至离心管中, N₂ 吹干, 进样前, 用 80% 甲醇水溶液 200 μ L 复溶, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.4 样品检测条件

2.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~25% A; 10~15 min, 25%~60% A; 15~18 min, 60%~80% A; 18~19 min, 80%~5% A; 19~22 min, 5%~5% A。体积流量 0.4 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 样品温度 4 $^{\circ}$ C, 进样量 2 μ L。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 负离子监测模式, 毛细管电压: 2.0 kV, 锥孔电压: 40 V, 萃取锥孔电压: 3.0 V, 离子源温度: 100 $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度: 400 $^{\circ}$ C, 锥孔气体流量: 50 L/h, 脱溶剂气体流量: 600 L/h, 全信息串联质谱 (MS^E)

表 1 UPLC-Q-TOF/MS 及对照品比对鉴定大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁样品中存在的原型成分

Table 1 Identification of prototype compounds in plasma, urine, feces and bile of rats after oral administration of mulberry leaves flavonoids by UPLC-Q-TOF/MS and reference substance comparison

编号	<i>t_R</i> /min	化合物	取样部位			
			血浆	尿液	粪便	胆汁
C1	5.16	芦丁	+	+	+	+
C2	5.33	异槲皮苷	+	+	+	+
C3	5.55	木犀草苷	+	+	+	+
C4	6.29	紫云英苷	+	+	+	+
C5	7.57	桑色素	+	+	+	+
C6	8.63	槲皮素	+	+	+	+
C7	10.55	山柰酚	+	+	+	+

“+”表示有,“-”表示无,下同

“+” means existent,“-” means non-existent, same as below

3.1.2 其他原型成分的鉴定 大鼠给药后的血浆、尿液、粪便、胆汁生物样品分别与空白生物样品总离子流色谱及全信息串联质谱数据比较,并进行二级质谱相关数据分析,发现大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后在血浆、尿液、粪便、胆汁样品中均存在 5,2',4'-三羟基黄酮-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (C8)、7-甲氧基-8-羟乙基-2',4'-二羟基黄酮 (C9)、(2S)-2',4'-二羟基-7-甲氧基-8-丁酸基黄烷 (C10)、morachaleone C (C12),

无碰撞能为 0 eV, 高碰撞能为 15~60 eV, 二级质谱 (MS²) 碰撞能为 22 eV; 扫描范围 *m/z* 50~1 200。

2.5 数据处理

采用 Waters MassLynxV 4.1 工作站对质谱数据进行采集和分析。

3 结果

3.1 原型成分的鉴定

3.1.1 已有对照品原型成分的鉴定 将大鼠给药后的血浆、尿液、粪便、胆汁生物样品与混合对照品的总离子流色谱 (图 1) 及全信息串联质谱数据进行比较,发现大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁样品中均存在芦丁 (C1)、异槲皮苷 (C2)、木犀草苷 (C3)、紫云英苷 (C4)、桑色素 (C5)、槲皮素 (C6)、山柰酚 (C7) 原型成分, 结果见表 1。

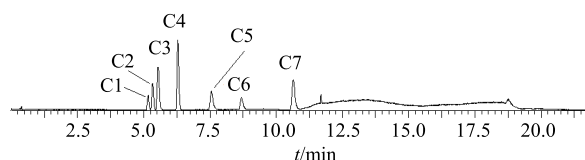


图 1 桑叶黄酮混合对照品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substances of mulberry leaves flavonoids

在血浆、尿液、粪便样品中存在槲皮素-3-*O*-(6"-*O*-乙酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (C11), 在粪便样品中存在 morachaleone A (C13) 原型成分, 结果见表 2。

3.2 代谢产物的鉴定

3.2.1 代谢途径推测 桑叶黄酮提取物在生物体内的生物转化因各化学成分结构的不同, 代谢途径也不尽相同。一般来说黄酮类成分生物转化主要有 2 种方式: 一是黄酮苷水解后形成苷元再发生结合反

表 2 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁样品中存在的原型成分

Table 2 Identification of prototype compounds in plasma, urine, feces and bile of rats after oral administration of mulberry leaves flavonoids by UPLC-Q-TOF/MS

编号	t_R/min	[M-H] ⁻		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	MS/MS 碎片	化合物	取样部位			
		实测值	计算值					血浆	尿液	粪便	胆汁
C8	6.64	447.092 1	447.092 7	-1.3	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	285.040 0 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 151.002 8	5,2',4'-三羟基黄酮-7-O- [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₈ H ₅ O ₂] ⁻ β -D-吡喃葡萄糖苷	+	+	+	+
C9	7.05	327.087 0	327.086 9	0.3	C ₁₈ H ₁₅ O ₆	295.059 4 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 282.052 6	7-甲氧基-8-羟乙基-2', [M-H-OCH ₂ CH ₃] ⁻ 4'-二羟基黄酮	+	+	+	+
C10	8.16	355.117 6	355.118 2	-1.7	C ₂₀ H ₁₉ O ₆	340.093 9 [M-H-CH ₃] ⁻ , 267.065 3	(2S)-2',4'-二羟基-7-甲氧 [M-H-CH ₃ C ₂ H ₅ COOH] ⁻ 基-8-丁酰基黄烷	+	+	+	+
C11	9.39	505.098 4	505.098 2	0.4	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃	463.086 7 [M-H-Acetyl] ⁻ , 301.036 3 [M-H-Acetyl-Glu] ⁻	槲皮素-3-O-(6"-O-乙酰 基)- β -D-吡喃葡萄糖苷	+	+	+	-
C12	11.24	353.102 6	353.102 5	0.3	C ₂₀ H ₁₇ O ₆	283.060 7 [M-H-C ₄ H ₇ O] ⁻ , 268.037 1 [M-H-C ₄ H ₇ O-CH ₃] ⁻	moraehaleone C	+	+	+	+
C13	12.07	339.122 7	339.123 2	-1.5	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	323.092 0 [M-H-CH ₃] ⁻ , 203.070 4 [M-H-C ₈ H ₇ O ₂] ⁻	moraehaleone A	-	-	+	-

应；二是游离的黄酮苷元直接发生结合反应。此外，有些黄酮类化合物还会发生还原反应。根据桑叶中黄酮成分的结构特点，推测桑叶黄酮在大鼠体内主要可能发生的代谢途径见表 3。

3.2.2 代谢产物 桑叶黄酮大多数成分具有相似的母核，为了鉴定代谢产物，在二级质谱中需要充分结合化合物裂解特征进行分析。下面以槲皮素为

例来说明其裂解规律。在碰撞能量为 22 eV 下，槲皮素的 MS/MS 中明显出现了 2 组相关峰信息，即 m/z 107.013 0（元素组成 C₆H₃O₂，误差 -2.8×10^{-6} ）和 m/z 193.013 5（元素组成 C₉H₅O₅，误差 -1.0×10^{-6} ）， m/z 151.003 1（元素组成 C₇H₃O₄，误差 0.0）和 m/z 149.023 7（元素组成 C₈H₅O₃，误差 -1.3×10^{-6} ），可以推测其裂解规律主要有 2 种途径，见图 2。

大鼠给药后的血浆、尿液、粪便、胆汁生物样品分别与空白生物样品总离子流色谱及全信息串联质谱数据比较，并进行二级质谱相关数据分析，发现大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后体内可鉴定出代谢产物 41 个，其中血浆中 15 个、尿液中 38 个、粪便中 21 个、胆汁中 25 个，以槲皮素和山柰酚的代谢产物为主（槲皮素和山柰酚代谢产物总离子流色谱图见图 3），代谢产物主要以葡萄糖醛酸结合、硫酸结合及甲基化产物形式存在，结果见表 4。

4 讨论

黄酮结构上存在多位置羟基，在发生结合反应时会出现同分异构体的代谢产物，要明确各代谢产物的结构，仅仅从色谱-质谱联用技术来分析会存在一定的难度。因此，更大程度上只能依靠桑叶黄酮各化合物结构来推测所存在的代谢产物。以槲皮素为例，槲皮素代谢产物中出现槲皮素葡萄糖醛酸、槲皮素硫酸酯、甲基槲皮素、甲基槲皮素葡萄糖醛酸等同分异构体，如在总离子流色谱图中保留时间

表 3 桑叶黄酮在大鼠体内可能发生的代谢途径

Table 3 Possible metabolic pathway *in vivo* of rats after oral administration of mulberry leaves flavonoids

编号	可能的代谢途径	分子式	获得/失去的 相对分子质量
1	氢化	H ₂	2
2	甲基化	CH ₂	14
3	去甲基化	CH ₂	-14
4	双甲基化	C ₂ H ₄	28
5	硫酸结合	SO ₃	80
6	葡萄糖醛酸结合	C ₆ H ₈ O ₆	176
7	双葡萄糖醛酸结合	C ₁₂ H ₁₆ O ₁₂	352
8	甲基-葡萄糖醛酸化	C ₇ H ₁₀ O ₆	190
9	葡萄糖醛酸-硫酸化	C ₆ H ₈ O ₉ S	256
10	甲基-硫酸化	CH ₂ SO ₃	94
11	乙酰化	C ₂ H ₂ O	42

“—”表示失去

“—”means loss

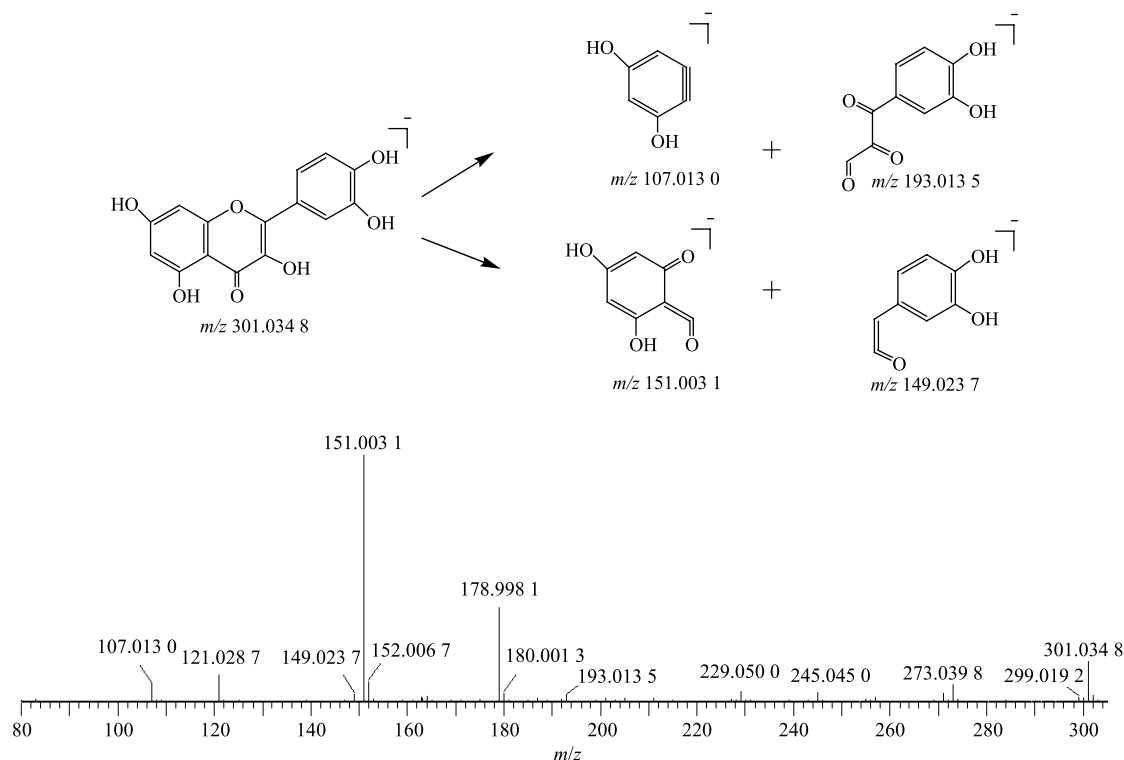


图 2 槲皮素二级质谱信息和主要离子碎片裂解规律

Fig. 2 MS/MS spectrum and main fragmentation mechanism of quercetin

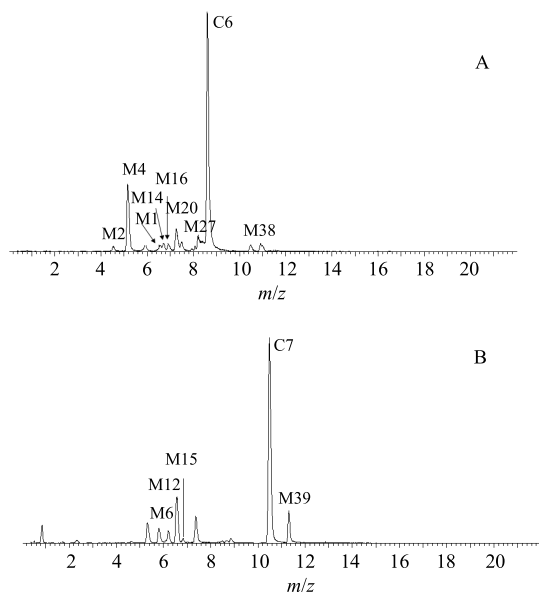


图 3 槲皮素及其代谢产物 (A) 和山奈酚及其代谢产物 (B) 的总离子流色谱图

Fig. 3 TIC of quercetin and its metabolites (A) and kaempferol and its metabolites (B)

10.92 和 11.08 min 处分别出现明显的离子峰, 质谱分析 $[M-H]^-$ 均为 315, 元素组成为 $C_{16}H_{11}O_7$ (误差 0.3×10^{-6}), 初步推测其应为文献报道的异鼠李

素和柞柳黄素^[16]。

桑叶黄酮成分中存在同分异构体槲皮素和桑色素(分子式 $C_{15}H_{10}O_7$), 木犀草苷、紫云英苷和 5,2',4'-三羟基黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(分子式 $C_{21}H_{20}O_{11}$), 在进行代谢产物鉴定时归属较难。本实验研究过程中同时对桑叶主要成分槲皮素进行了体内代谢产物的研究, 分析和鉴定了槲皮素体内代谢产物, 在相同检测条件下, 给予桑叶总黄酮提取物后, 作为同分异构体的桑色素其体内代谢产物能得到了一定的归属, 而木犀草苷、紫云英苷和 5,2',4'-三羟基黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷代谢产物还有待进一步研究。

本实验比较了血浆甲醇沉淀蛋白、尿液胆汁过 ODS 萃取小柱(甲醇冲柱)、粪便甲醇超声的处理方法, 发现样品采用醋酸乙酯(加少许甲酸)液液萃取处理后其代谢产物较全, 离子响应较强, 总离子色谱图较好, 几乎无基质效应, 故本实验分析的样本均采用醋酸乙酯液液萃取进行处理。

实验对大鼠各时间点样品进行了对比分析, 结果发现代谢产物没有差异, 仅存在检测响应度的不同, 这可能与各代谢产物在体内发生的代谢速度不同有关。对各大鼠样品进行了独立检测和分析, 比

表4 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁样品中存在的代谢产物

Table 4 Identification of metabolites in plasma, urine, feces and bile of rats after oral administration of mulberry leaves flavonoids by UPLC-Q-TOF/MS

编号	t_R/min	[M-H] ⁻		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	MS/MS 碎片	代谢产物	取样部位			
		实测值	计算值					血浆	尿液	粪便	胆汁
M1	4.01	637.102 7	637.104 1	-2.2	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₈	637.102 7, 461.071 1, 285.039 4	山柰酚二葡萄糖醛酸	-	+	-	+
M2	4.44	653.098 9	653.099 0	-0.2	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₉	653.098 9, 477.066 4, 301.034 2	槲皮素二葡萄糖醛酸	-	+	-	+
M3	5.01	639.119 9	639.119 7	0.3	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₈	639.119 9, 477.066 8, 463.089 3	异槲皮苷葡萄糖醛酸	-	+	-	-
M4	5.20	477.067 0	477.066 9	0.2	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477.067 0, 315.050 1, 301.034 9	槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M5	5.30	557.022 6	557.023 7	-2.0	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₆ S	557.022 6, 477.067 0, 301.034 2	槲皮素葡萄糖醛酸硫酸酯	-	+	-	-
M6	5.80	461.071 7	461.072 0	-0.7	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461.071 7, 285.040 1, 151.002 8	山柰酚葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M7	5.86	491.082 0	491.082 6	-1.2	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.082 0, 315.049 9, 301.034 3	甲基桑色素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M8	5.91	477.066 0	477.066 9	-1.9	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477.066 0, 301.035 0, 151.003 4	桑色素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M9	5.97	531.148 7	531.150 3	-3.0	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₂	531.148 7, 355.118 6, 267.067 7	(2S)-2',4'-二羟基-7-甲氧基-8- 丁酰基黄烷葡萄糖醛酸	-	+	+	+
M10	6.13	557.023 6	557.023 7	1.2	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₆ S	557.023 6, 477.067 0, 301.034 2	槲皮素葡萄糖醛酸硫酸酯	-	+	-	-
M11	6.47	341.102 6	341.102 5	0.3	C ₁₉ H ₁₇ O ₆	341.102 6, 281.081 4, 137.024 8	去甲基 (2S)-2',4'-二羟基-7- 甲氧基-8-丁酰基黄烷	-	+	+	-
M12	6.58	461.071 7	461.072 0	-0.7	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461.071 7, 285.039 6, 151.003 3	山柰酚葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M13	6.63	491.082 2	491.082 6	0.2	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.082 2, 315.049 9, 300.026 3	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M14	6.72	491.081 8	491.082 6	-1.2	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.081 8, 315.049 9, 300.026 3	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M15	6.78	364.996 4	364.996 7	-0.8	C ₁₅ H ₉ O ₉ S	364.996 4, 285.039 6, 151.004 3	山柰酚硫酸酯	-	+	+	-
M16	6.93	491.082 7	491.082 6	-0.8	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.082 7, 315.049 9, 300.026 3	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M17	6.97	380.991 8	380.991 6	0.6	C ₁₅ H ₉ O ₁₀ S	380.991 8, 317.029 8, 301.035 0	槲皮素硫酸酯	-	+	+	-
M18	7.05	477.102 2	477.103 3	-2.3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	477.102 2, 315.050 8, 301.034 9	甲基异槲皮苷	+	+	+	+
M19	7.06	299.055 9	299.055 6	1.0	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.055 9, 267.029 9, 151.002 8	7-甲氧基-8,2',4'-三羟基黄酮	-	+	+	+
M20	7.23	491.082 8	491.082 6	0.8	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.082 8, 315.049 9, 300.026 3	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M21	7.28	477.067 0	477.066 9	0.2	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477.067 0, 315.050 1, 301.034 9	槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M22	7.36	491.082 2	491.082 6	1.3	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.082 2, 315.049 9, 300.026 3	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M23	7.75	475.087 9	475.087 7	0.4	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₂	475.087 9, 315.050 0, 285.039 4	甲基山柰酚葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M24	7.91	491.082 4	491.082 6	-0.4	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	491.082 4, 315.049 9, 300.026 3	甲基槲皮素葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M25	8.08	380.990 9	380.991 6	-1.8	C ₁₅ H ₉ O ₁₀ S	380.990 9, 301.034 2, 151.002 5	桑色素硫酸酯	-	+	+	-
M26	8.15	364.996 8	364.996 7	0.3	C ₁₅ H ₉ O ₉ S	364.996 8, 285.039 6, 151.004 3	山柰酚硫酸酯	-	+	+	-
M27	8.24	380.991 7	380.991 6	0.3	C ₁₅ H ₉ O ₁₀ S	380.991 7, 317.029 8, 301.035 0	槲皮素硫酸酯	-	+	+	-
M28	8.70	475.088 1	475.087 7	0.8	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₂	475.088 1, 315.050 0, 285.039 4	甲基山柰酚葡萄糖醛酸	+	+	-	+
M29	8.78	395.007 4	395.007 3	0.3	C ₁₆ H ₁₁ O ₁₀ S	395.007 4, 380.991 7, 301.035 4	甲基槲皮素硫酸酯	-	+	+	-
M30	8.98	315.050 3	315.050 5	-0.6	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.050 3, 300.026 8, 151.002 5	甲基桑色素	-	+	+	+
M31	9.10	343.044 9	343.045 3	-1.5	C ₁₇ H ₁₁ O ₈	343.044 9, 301.035 0, 151.003 4	乙酰槲皮素	-	-	+	-
M32	9.12	315.050 8	315.050 5	1.0	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.050 8, 300.027 0, 151.002 7	甲基桑色素	-	+	+	+
M33	9.94	341.102 4	341.102 5	-0.3	C ₁₉ H ₁₇ O ₆	341.102 4, 323.091 9, 278.057 4	7-甲氧基-8-羟基乙基-2',4'- 二羟基黄酮甲基化	-	-	+	-
M34	10.11	313.070 5	313.071 2	-2.2	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	313.070 5, 298.046 8, 285.039 0	二甲基山柰酚	-	+	+	+
M35	10.70	327.050 2	327.050 5	-0.9	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	327.050 2, 285.039 2, 151.002 3	乙酰山柰酚	-	-	+	-
M36	10.91	355.118 3	355.118 2	0.3	C ₂₀ H ₁₉ O ₆	355.118 3, 283.059 7, 268.037 8	氢化 morachalcone C	-	+	+	+
M37	10.92	315.050 1	315.050 5	1.3	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.050 1, 300.026 9, 151.002 6	甲基槲皮素	-	+	+	-
M38	11.08	315.050 5	315.050 5	0	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.050 5, 300.026 9, 151.002 6	甲基槲皮素	-	+	+	-
M39	11.31	299.055 5	299.055 6	-0.3	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.055 5, 284.032 0, 151.003 0	甲基山柰酚	-	+	+	+
M40	11.42	329.066 9	329.066 1	2.4	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.066 9, 314.042 8, 301.035 9	二甲基槲皮素	-	+	-	-
M41	11.51	299.055 7	299.055 6	0.3	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.055 7, 284.032 0, 151.003 0	甲基山柰酚	-	+	+	+

较了不同大鼠的代谢产物,结果显示个体之间代谢产物相同,无代谢产物差异。

UPLC-Q-TOF/MS 是高分离度、高灵敏度的液相色谱与能同时提供准确相对分子质量及元素组成的高分辨质谱相结合的化学分析系统,该系统能为化学成分分析提供可靠数据,近年来广泛用于分析未知分子结构组成和鉴定体内代谢产物。上述结果显示,大鼠 ig 桑叶黄酮提取物后体内可鉴定出 13 个原型成分,41 个代谢产物,其代谢产物主要以葡萄糖醛酸结合、硫酸结合以及甲基化为主。本实验结果为阐述桑叶的药动力学和药效作用机制研究提供依据,为药动力学研究提供参考,同时为桑叶的进一步开发利用奠定基础。

参考文献

- [1] 张丽丽,白永亮,宿树兰,等. 不同品种不同生长期桑叶中生物碱类与黄酮类化学成分的积累动态分析评价[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4822-4828.
- [2] 陈晓燕. 桃仁、桑叶化学成分及生物活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [3] 任岩海,刘洪凤,韩智学. 桑叶多糖对 2 型糖尿病大鼠血糖血脂的影响 [J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 20-21.
- [4] 文静,张德芹,夏佳楠,等. 桑叶提取物对 MSG 肥胖大鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. 天津中医药, 2015, 32(4): 234-238.
- [5] 张入飞,蔡为荣. 谢亮亮,等. 桑叶多糖的分离纯化及其抗凝血活性的研究 [J]. 安徽工程大学学报, 2015, 2(2): 27-31.
- [6] Deepa M, Sureshkumar T, Satheeshkumar P K, *et al.* Antioxidant rich *Morus alba* leaf extract induces apoptosis in human colon and breast cancer cells by the downregulation of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase [J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(2): 305-310.
- [7] 马方,王辉,李药兰,等. 20 个品种桑叶不同提取部位体外抗呼吸道合胞病毒活性初探 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 451-455.
- [8] 霍蕊莉. 真实世界消渴病痹症症候特点与治疗方案研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [9] 吕丹,王海波,邸学,等. 桑叶药材中总黄酮含量的测定 [J]. 中国药房, 2016, 2(6): 844-845.
- [10] 张淞铭,黄平,杜静静. 桑叶总黄酮对糖尿病高脂血症大鼠血糖、血脂和胸主动脉 p22phox mRNA 表达的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(3): 191-194.
- [11] Hunyadi A, Martins A, Hsieh T J, *et al.* Chlorogenic acid and rutin play a major role in the *in vivo* anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): 1-6.
- [12] 王灿,左艇,王琳琳,等. 桑叶黄酮抗皮肤衰老实验研究 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(3): 30-31.
- [13] 李君,季涛,宿树兰,等. 桑叶中黄酮类和酚酸类成分的提取工艺优化 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(12): 1308-1312.
- [14] 孙玲红,项菲菲,王在贵,等. 桑叶黄酮的提取与初步纯化 [J]. 中国饲料, 2014, 28(19): 22-23.
- [15] He J, Feng Y, Ouyang H Z, *et al.* A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 84(10): 789-795.
- [16] 安代志,吴胜明,韦京豫,等. 大鼠灌胃槲皮素后门静脉槲皮素及其代谢产物的液质分析 [J]. 卫生研究, 2009, 38(4): 417-419.