

## 基于UHPLC-Q-Exactive质谱法分析桔红素在大鼠体内的代谢过程

马贝贝<sup>1</sup>, 娄天宇<sup>1</sup>, 梁耀月<sup>1</sup>, 王婷婷<sup>1</sup>, 李瑞吉<sup>1</sup>, 刘金辉<sup>1</sup>, 王晨晓<sup>1</sup>, 于尚玥<sup>1</sup>, 郭玉东<sup>2</sup>, 王晶<sup>1\*</sup>, 王志斌<sup>3\*</sup>

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京市药品检验所, 北京 102200

3. 同仁堂科技发展股份有限公司, 北京 100071

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UHPLC-Q-Exactive MS)分析、筛选、鉴定桔红素在大鼠体内的代谢产物。**方法** 大鼠 ig 给予桔红素溶液后, 收集不同时间点的血浆及 24 h 内的尿液与粪便, 经固相萃取法处理后, 使用 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)流动相系统进行梯度洗脱, 在正离子扫描模式下分析给药组大鼠的生物样品。**结果** 通过检索化合物的多级质谱信息, 由精确相对分子质量推测分子式, 结合对照品的特征性裂解规律, 共鉴定出包括桔红素在内的 28 个代谢产物。**结论** 桔红素在大鼠体内主要发生去甲基化、羟基化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸化、去甲氧基化、甲氧基化、脱一氧化碳以及它们的复合反应等。较为详细地阐明了桔红素在大鼠体内的代谢情况, 剖析了其代谢过程, 可为其进一步的药效学、药动学及毒理学研究提供参考。

**关键词:** 桔红素; UHPLC-Q-Exactive MS; 固相萃取法; 代谢产物; 代谢过程

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4153-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.005

## Analysis of metabolic process of tangeretin in rats based on UHPLC-Q-Exactive mass spectrometry

MA Bei-bei<sup>1</sup>, LOU Tian-yu<sup>1</sup>, LIANG Yao-yue<sup>1</sup>, WANG Ting-ting<sup>1</sup>, LI Rui-ji<sup>1</sup>, LIU Jin-hui<sup>1</sup>, WANG Chen-xiao<sup>1</sup>, YU Shang-yue<sup>1</sup>, GUO Yu-dong<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, WANG Zhi-bin<sup>3</sup>

1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102200, China

3. Tongrentang Technology Development Company Limited by Shares, Beijing 100071, China

**Abstract: Objective** Ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q-Exactive MS) was used to analyze, screen and identify the metabolites of tangeretin in rats. **Methods** The plasma at different time points and urine and feces within 24 h were collected after the rats were given tangeretin solution by gavage. After solid phase extraction (SPE) treatment, the gradient elution was carried out on the Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid solution (A)-acetonitrile (B) mobile phase system. The biological samples of the rats in the drug group were analyzed in the positive ion scanning mode. **Results** By retrieving the multi-level mass spectrometry information of the compound, inferring the molecular formula from the accurate relative molecular mass, and combining with the characteristic cleavage law of the reference standard, a total of 28 metabolites including tangeretin were identified. **Conclusion** The results showed that tangeretin mainly underwent demethylation, hydroxylation, sulfonation, glucuronidation, demethoxylation, methoxylation, carbon monoxide removal, and their composite reactions in rats. Therefore, this study had elucidated the metabolism of tangeretin in rats in detail and analyzed its metabolic process, which could provide reference for further pharmacodynamics,

收稿日期: 2020-12-12

基金项目: 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室项目(JKLPS201816); 中医脑病学山西省重点实验室(山西中医药大学)项目(CME-OP-2017002); 国家药典委员会项目(2018Y007)

作者简介: 马贝贝, 硕士研究生, 研究方向为消化药理及神经药理。E-mail: bucm3679@163.com

\*通信作者: 王晶, 博士, 副教授, 研究方向为消化药理及呼吸药理。E-mail: crystal\_wj@163.com

王志斌, 博士, 研究员, 研究方向为中药质量控制标准及药理毒理研究。E-mail: wangzhibin4804@126.com

pharmacokinetics and toxicology research.

**Key words:** tangeretin; UHPLC-Q-Exactive MS; solid phase extraction (SPE); metabolites; metabolic process

桔红素(tangeretin), 又被称为橘红素、蜜桔素、桔皮素或5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮, 作为一种天然的多甲氧基黄酮类化合物(polymethoxylated flavones, PMFs), 主要存在于芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* Linn. 和川橘 *C. nobilis* Lour. 的果皮以及柑橘 *C. reticulata* Blanco. 的叶和茎中<sup>[1-3]</sup>。近年来国内外研究表明, 桔红素具有较强的药理活性, 如可减轻脂多糖诱导的急性肺损伤、抑制氧化应激和炎症、保护人脑微血管内皮细胞以及抑制链脉佐菌素诱导的细胞凋亡等<sup>[4-7]</sup>。此外, 桔红素还可抗肿瘤、抗癫痫以及阻断病毒融合、治疗拉沙病毒引起的病毒性出血热, 被广泛应用于食品保健和医学研究<sup>[8-10]</sup>。然而有关桔红素的体内代谢研究却鲜有报道, 急需一种快速有效的分析方法详细阐明桔红素的代谢产物和代谢途径<sup>[11-12]</sup>。

超高效液相色谱-高分辨质谱技术(UHPLC-HRMS) 将色谱分离与质谱结构解析相结合, 同时具备高选择性、高灵敏度及高精度的独特优势, 使迅速分离成分与结构信息获取一体化, 从而频繁应用于药物成分检测和快速筛查<sup>[13-16]</sup>。四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Q-Exactive Orbitrap MS) 将四极杆对母离子的高选择性与提供准确质量数的高分辨 Orbitrap 技术相统一, 检出限度小, 质量偏差范围窄, 可显著消除样品基质的干扰, 实现对复杂样品的定性和定量分析<sup>[17-20]</sup>。固相萃取法(solid-phase extraction, SPE) 是21世纪以来蓬勃兴起的样品前处理技术, 可使分离、纯化与浓缩同步完成, 常被用于多甲氧基类黄酮等柑橘中的有效成分在动物体内的代谢研究<sup>[21-23]</sup>。

因此, 本研究采用 SPE 法提取生物样品, 纯化后通过 UHPLC-Q-Exactive MS 技术分析桔红素在大鼠体内的代谢产物, 以期剖析其在动物体内的代谢过程。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Thermo Fisher Ultimate 3000 超高效液相色谱仪和 Q-Exactive 质谱(美国 Thermo Fisher 公司), 配有电喷雾离子源(ESI); Xcalibur 2.1 工作站; R200D 分子天平(十万分之一, 德国 Sartorius 公司); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统(美国 Millipore

公司); KQ-250DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); OASIS HLB C<sub>18</sub> 固相萃取小柱(3 L/60 g, 美国 Waters 公司)。

### 1.2 试剂

桔红素对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数>98%, 批号 MUST-18012910); 乙腈和甲醇(质谱级, 美国 Thermo Fisher 公司); 甲酸(色谱级, 德国 Merck 公司)。

### 1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠(雄性, 200~220 g), 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2016-0011。本研究由北京市药品检验所实验动物伦理委员会审查通过, 实验动物使用许可证号 SYXK(京)2015-0033。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的配制

称取桔红素对照品 480 mg, 溶解于 16 mL 0.5% 的羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 溶液中。

### 2.2 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 25 °C; 流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~1 min, 5% B; 1~3 min, 5%~25% B; 3~8 min, 25%~60% B; 8~15 min, 60%~80% B; 15~20 min, 80%~100% B; 20~24 min, 100% B; 24~25 min, 100%~5% B; 25~30 min, 5% B; 体积流量为 0.30 mL/min; 进样量为 2 μL。

### 2.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描模式, 毛细管温度 350 °C, 鞘气(sheath gas) 体积流量 275 kPa, 辅助气(aux gas) 体积流量 138 kPa, 喷雾电压(source voltage) 4 kV。碰撞能量(collision energy) 40 eV。检测方式为 Full MS/dd-MS<sup>2</sup>, Full MS 分辨率 70 000, dd-MS<sup>2</sup> 分辨率 17 500, 质量扫描范围 *m/z* 100~1500。

### 2.4 动物实验

将 16 只 SD 大鼠随机分为空白组与给药组, 实验前于 SPF 级动物房适应性饲养 1 周(室温 22~26 °C, 湿度 40%~70%, 12 h 昼夜更替), 喂药前禁食 12 h, 全程不禁水。

给药组以 300 mg/kg 的剂量 ig 给予桔红素溶液, 空白组则 ig 等量的 0.5% 的羧甲基纤维素钠。

### 2.5 生物样品采集

待空白组与给药组大鼠给药完成后, 置于代谢笼中, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 h 眼内眦取血约 0.5 mL 置于肝素钠抗凝 EP 管中, 静置 15 min, 于 4 °C 下 3000 r/min 离心 15 min, 合并上述 5 个时间点的上清液, 将空白组与给药组血浆分装保存 (-80 °C)。分别收集其 24 h 内排出的尿液与粪便, 尿液于 4 °C 下 3000 r/min 离心 15 min, 收集上清液分装 (-80 °C)。粪便烘干后研磨粉碎, 分别称取 2 组粪便粉末各 0.5 g, 溶解于 70% 的乙醇中, 超声提取 30 min, 收集溶液层保存 (-80 °C)。

### 2.6 SPE 处理生物样品

将固相萃取小柱用 5 mL 甲醇与 5 mL 去离子水活化平衡, 分别取解冻后的生物样品 (血浆、尿液与粪便) 各 1 mL 加入柱中, 依次用 5 mL 去离子水和 3 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 室温下用氮

气吹干, 得到的残渣用 100 μL 初始比例流动相 (5% 乙腈溶液) 复溶, 涡旋震荡 3 min, 13 000 r/min 离心 15 min (4 °C), 收集上清液进行 UHPLC- HRMS 分析。

## 3 结果

### 3.1 桔红素对照品的质谱裂解行为分析

在正离子扫描模式下, 桔红素产生准分子离子峰  $m/z$  373.127 62, 分子式为  $C_{20}H_{21}O_7$  (误差为  $-1.50 \times 10^{-6}$ )。在其 ESI-MS<sup>2</sup> 质谱图中, 检测到的主要二级碎片离子有  $m/z$  358 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  343 [M-2CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  312 [M-2CH<sub>3</sub>-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  327 [M-CH<sub>3</sub>-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  297 [M-3CH<sub>3</sub>-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 以及  $m/z$  345 [M-CO]<sup>+</sup>。通过对比黄酮类化合物的质谱裂解规律<sup>[24-25]</sup>, 本研究以连续丢失 CH<sub>3</sub> 与 OCH<sub>3</sub>、中性丢失 CO 作为此类化合物的在 ESI 正离子模式下的特异性裂解规律, 以为下一步的代谢产物结构筛选与鉴定提供依据。桔红素在正离子模式下的多级质谱图见图 1, 其详细裂解途径见图 2。

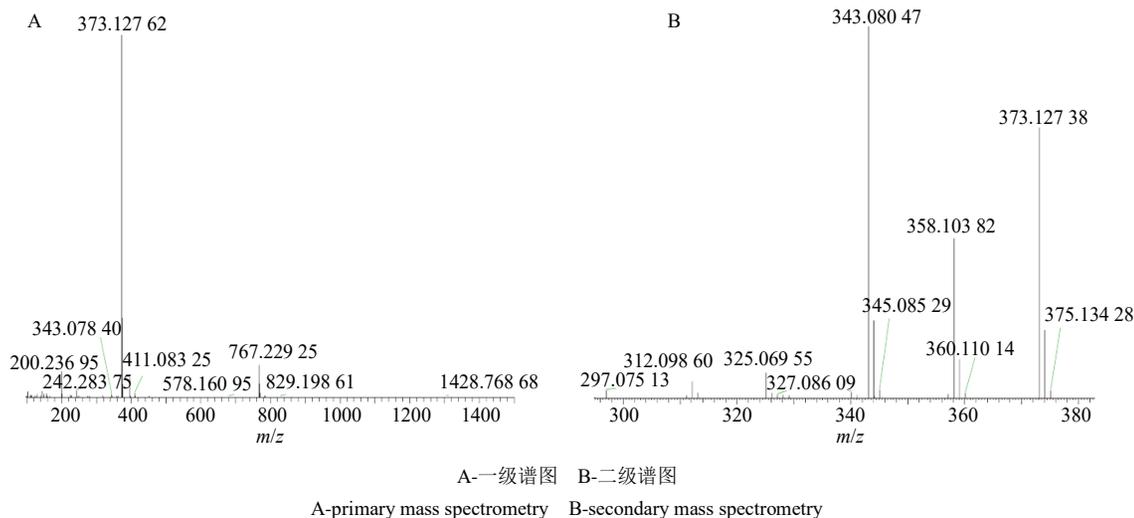


图 1 桔红素在正离子扫描模式下的多级质谱图

Fig. 1 Multi-level mass spectrum of tangeretin in positive ion scanning mode

### 3.2 大鼠体内桔红素的代谢产物分析与鉴定

基于 UHPLC-Q-Exactive 高分辨质谱技术分析大鼠给药后的尿液、血浆与粪便, 通过对比空白组与给药组的生物样品色谱图, 结合桔红素对照品的质谱碎裂规律、二级质谱裂解碎片、保留时间、精确相对分子质量以及脂水分配系数 (calculated log *P*, Clog *P*), 最终鉴定出包括原型在内的 28 个代谢产物, 其中尿液中有 18 个、血浆中有 22 个、粪便中有 26 个。鉴定结果见表 1。空白组与给药组的血浆、尿液与粪便的总离子流图见图 3。

在正离子扫描模式下, 代谢产物 M0 的色谱保留时间为 9.71 min, 精确相对分子质量为 373.127 66, 其质谱碎裂行为与桔红素对照品类似, 结合文献报道<sup>[26-27]</sup>, 可将其准确鉴定为桔红素。化合物 M13、M19、M23 以及 M24 在正离子模式下均产生  $m/z$  为 359.112 48 的准分子离子峰, 较之桔红素少 14 (丢失了 1 分子 CH<sub>2</sub>), 由精确相对分子质量推测出它们的分子式都为  $C_{19}H_{19}O_7$ , 在 ESI-MS<sup>2</sup> 裂解过程中, 它们都产生了  $m/z$  344 (脱去 1 分子 CH<sub>3</sub>)、 $m/z$  329 (脱去 2 分子 CH<sub>3</sub>) 以及  $m/z$  311 (脱去 1 分子 H<sub>2</sub>O)

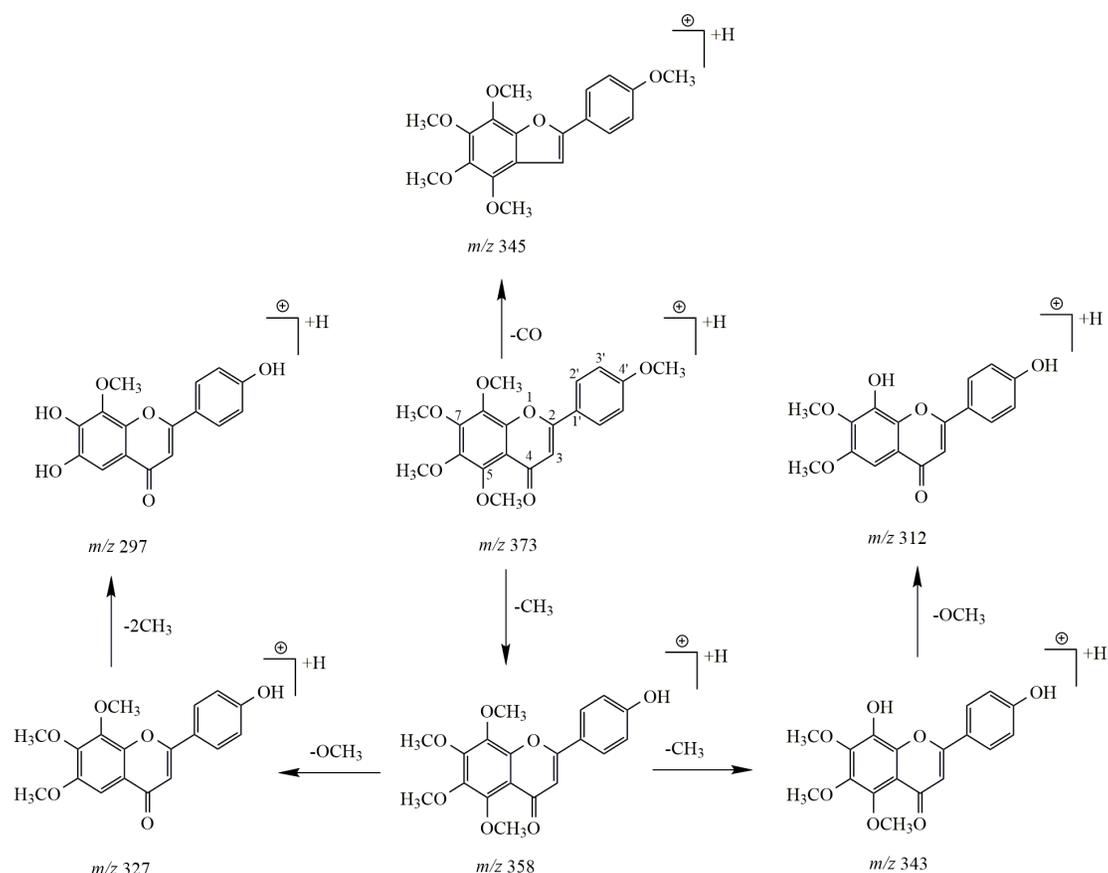


图2 桔红素对照品在正离子模式下的裂解途径

Figure 2 Cleavage pathway of tangeretin in positive ion mode

的碎片离子, 据此推断它们都是桔红素的去甲基化产物。根据反相色谱的洗脱行为,  $\text{Clog } P$  值越大的化合物越难被洗脱。因此代谢产物 M13、M19、M23 和 M24 分别为 5,6,7,8-四甲氧基-4'-羟基黄酮 ( $\text{Clog } P$ , 1.80), 5,6,7,4'-四甲氧基-8-羟基黄酮 ( $\text{Clog } P$ , 2.13), 5,6,8,4'-四甲氧基-7-羟基黄酮或 5,7,8,4'-四甲氧基-6-羟基黄酮 ( $\text{Clog } P$ , 2.23), 6,7,8,4'-四甲氧基-5-羟基黄酮 ( $\text{Clog } P$ , 3.03)。

代谢产物 M11、M18 和 M27 均产生  $m/z$  375.107 43 的准分子离子峰  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 推测分子式为  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_8$ , 其相对分子质量比 M13、M19、M23 以及 M24 多 16, 推测为它们的羟基化产物。在它们的二级质谱图中都存在  $m/z$  345 (丢失 2 分子  $\text{CH}_3$ )、 $m/z$  327 (失去 1 分子  $\text{H}_2\text{O}$ ) 和  $m/z$  299 (中性丢失 1 分子  $\text{CO}$ ) 等离子碎片, 因此 M11、M18 和 M27 为桔红素发生去甲基化反应后的羟基化产物。

化合物 M8 在正离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  535.144 63, 推测分子式为  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{O}_{13}$ , 其相对分子质量比 M13 多 176, 推测为 M13、M19、M23 以及 M24 的葡萄糖醛酸结合产物。在其 ESI-MS<sup>2</sup>

裂解过程中检测到  $m/z$  359 (丢失 1 分子葡萄糖醛酸) 以及  $m/z$  344、329、311 等碎片离子, 进一步证明其与 M13 的碎裂行为相似, 因此可将 M8 鉴定为桔红素去甲基化和葡萄糖醛酸化复合反应产物。同理, M6 的相对分子质量 551.139 54 比 M11、M18 及 M27 多 176, 二级质谱图中  $m/z$  375 是由  $m/z$  551 中性丢失 1 分子葡萄糖醛酸产生的, 又根据  $m/z$  360、345、327 等特征碎片将 M6 鉴定为桔红素去甲基化、羟基化和葡萄糖醛酸化复合反应产物。

代谢产物 M16 的准分子离子峰为  $m/z$  439.069 33  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 推测分子式为  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_{10}\text{S}$  (误差为  $-1.47 \times 10^{-6}$ ), 比去甲基化桔红素的理论相对分子质量多 80, 推测为桔红素去甲基化和硫酸酯化反应产物。而之后连续丢失  $\text{CH}_3$  以及中性丢失 1 分子水 (分别产生  $m/z$  344, 329, 311) 进一步证实了上述推断。与之相似, 化合物 M12 ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_{11}\text{S}$ ) 被鉴定为桔红素去甲基化、羟基化和硫酸酯化产物。

化合物 M1、M3、M9、M15、M17 和 M25 均产生准分子离子峰  $m/z$  345.096 98  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_7$ , 分子质量比桔红素少 28, 推测

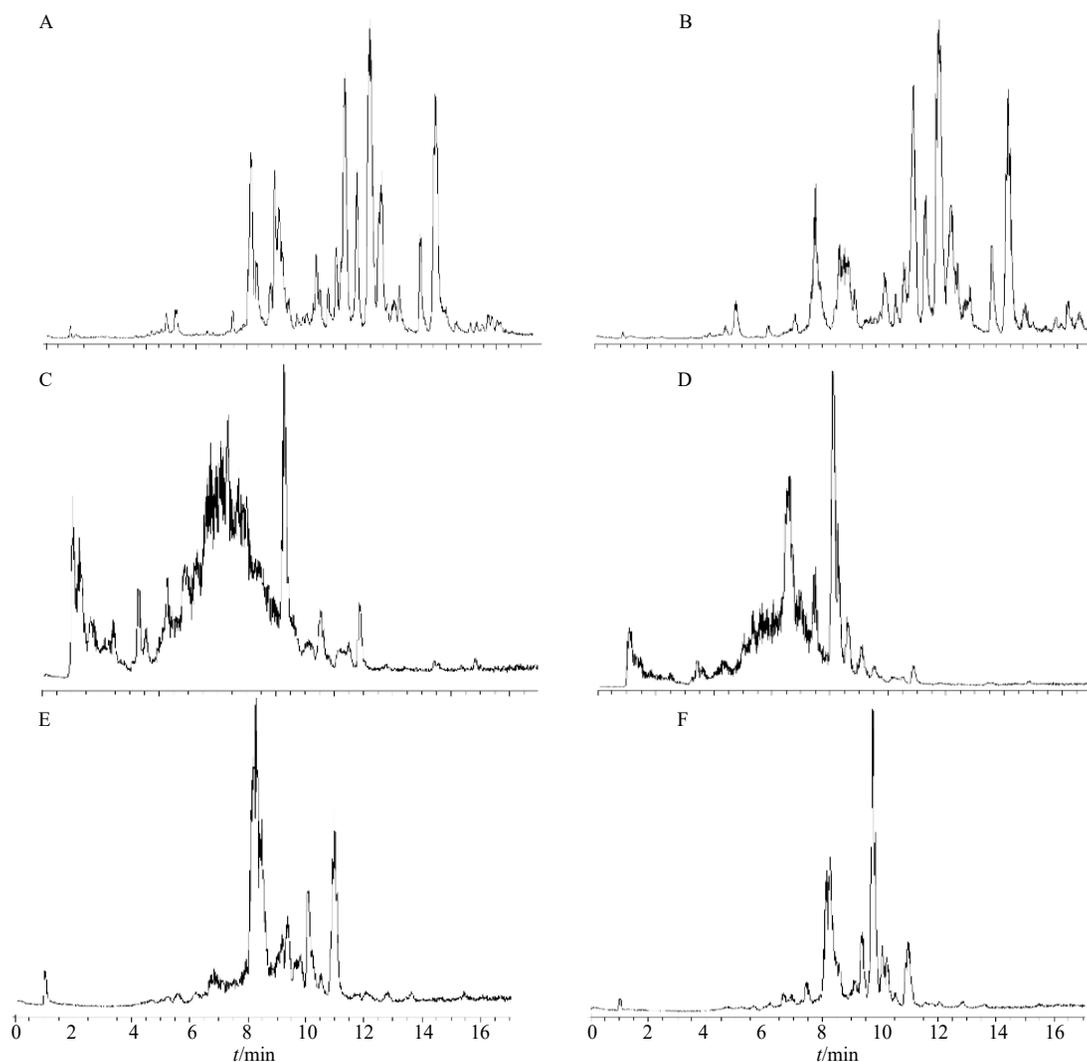
表 1 大鼠尿液、血浆和粪便中的代谢产物  
Table 1 Summary of tangeretin metabolites in rat urine, plasma and feces

化合物	<i>t<sub>R</sub></i> /min	分子式	相对分子质量 ( <i>m/z</i> )		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	LC-MS <sup>2</sup>	鉴定结果	Clog <i>P</i> 值	尿	血	粪
			理论值	实测值							
M0	9.71	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub>	373.128 23	373.127 66	-1.39	343, 373, 358, 297, 357, 327	桔红素	-	+	+	+
M1	5.58	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	345.096 98	345.095 43	-4.20	345, 315, 330, 312, 284	双去甲基化反应	-	+	+	+
M2	5.62	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	347.076 28	347.075 78	-1.05	347, 317, 332, 299, 329	三去甲基化反应、羟 基化反应	-	-	-	+
M3	5.83	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	345.096 98	345.096 25	-1.82	345, 315, 330, 312, 297	双去甲基化反应	-	+	+	+
M4	6.04	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>	331.081 38	331.080 69	-1.63	331, 316, 301, 298	三去甲基化反应	-	-	+	+
M5	6.19	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	361.091 88	361.091 19	-1.67	361, 331, 346, 328, 300	双去甲基化反应、羟 基化反应	-	-	-	+
M6	6.39	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	551.139 54	551.138 37	-2.11	375, 360, 345, 327	去甲基化反应、羟基 化反应、葡萄糖醛 化结合反应	-	-	+	-
M7	6.41	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	361.091 88	361.091 16	-1.76	361, 331, 346, 313, 328	双去甲基化反应、羟 基化反应	-	-	-	+
M8	6.48	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	535.144 63	535.143 62	-1.86	359, 344, 329, 311	去甲基化反应、葡萄 糖醛化结合反应	-	+	-	-
M9	6.69	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	345.096 98	345.096 13	-2.17	345, 315, 330, 284, 312	双去甲基化反应	-	+	+	+
M10	6.82	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub>	315.122 68	315.122 07	-2.00	133, 123, 107, 279, 297	去甲氧基化反应、脱 一氧化碳	-	-	+	+
M11	6.86	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	375.107 43	375.106 96	-1.29	345, 375, 360, 327, 299	去甲基化反应、羟基 化反应	-	+	+	+
M12	6.90	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> S	455.064 23	455.063 66	-1.32	375, 345, 360, 327, 89	去甲基化反应、羟基 化反应、硫酸酯化结 合反应	-	+	+	+
M13	6.94	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	359.112 48	359.111 94	-1.64	329, 359, 344, 311, 298, 326	去甲基化反应	1.80	+	+	+
M14	6.98	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	347.076 28	347.075 47	-1.94	347, 332, 317, 314, 329	三去甲基化反应、羟 基化反应	-	-	-	+
M15	7.01	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	345.096 98	345.096 56	-0.93	359, 329, 344, 311, 89	双去甲基化反应	-	+	+	+
M16	7.05	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> S	439.069 33	439.068 70	-1.47	359, 329, 344, 311, 89	去甲基化反应、硫酸 酯化结合反应	-	+	+	+
M17	7.43	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	345.096 98	345.096 50	-1.10	315, 345, 330, 312	双去甲基化反应	-	+	+	+
M18	7.49	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	375.107 43	375.107 09	-0.94	345, 375, 360, 327, 299	去甲基化反应、羟基 化反应	-	+	+	+
M19	8.10	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	359.112 48	359.111 82	-1.98	329, 359, 344, 311, 298	去甲基化反应	2.13	+	+	+
M20	8.22	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	389.123 08	389.122 10	-2.56	359, 389, 374, 341, 328, 313	羟基化反应	-	-	+	+
M21	8.27	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	389.123 08	389.122 31	-2.02	359, 389, 374, 341, 328, 313	羟基化反应	-	-	+	+
M22	8.35	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	361.091 73	361.091 19	-1.67	329, 359, 344, 331, 361	双去甲基化反应、羟 基化反应	-	-	+	+
M23	8.58	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	359.112 48	359.111 94	-1.64	329, 359, 344, 311, 326	去甲基化反应	2.23	+	+	+
M24	9.05	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	359.112 48	359.112 00	-1.47	329, 359, 344, 311, 298	去甲基化反应	3.03	+	+	+
M25	9.11	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	345.096 98	345.096 53	-1.01	345, 315, 330, 297, 312	双去甲基化反应	-	+	+	+
M26	9.14	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>8</sub>	403.138 68	403.137 79	-2.37	373, 388, 355, 327	甲氧基化反应	-	+	-	+
M27	9.28	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	375.107 43	375.107 18	-0.70	375, 345, 360, 327	去甲基化反应、羟基 化反应	-	+	+	+

+表示检测到；-表示未检测到  
+ means detected; - means not detected

为桔红素双去甲基化产物。在二级裂解过程中检测  
到 *m/z* 345、315、330 等特征碎片，证明它们的裂

解规律与桔红素类成分一致<sup>[28-29]</sup>，故将它们鉴定为  
桔红素双去甲基化反应产物（失去了 2 分子 CH<sub>2</sub>）。



A-空白血浆 B-给药血浆 C-空白尿液 D-给药尿液 E-空白粪便 F-给药粪便  
A-blank plasma B-drug plasma C-blank urine D-drug urine E-blank feces F-drug feces

图3 大鼠生物样品的总离子流图谱

Fig. 3 Total ion chromatograms of biological samples from rats

而代谢物 M5、M7 及 M22 均产生  $m/z$  361.091 88 的准分子离子峰,由 Xcalibur 推测分子式为  $C_{18}H_{17}O_8$ , 相对分子质量较 M1 多 16, 推测为 M1 类同分异构体的羟基化产物。在 ESI-MS<sup>2</sup> 质谱碎裂中,  $m/z$  361、346、331、328 及 300 等特征离子表明其裂解行为与 M1 等化合物类似, 因此将 M5、M7 及 M22 鉴定为桔红素双去甲基化和羟基化产物。

在正离子扫描模式下, 代谢产物 M4 产生  $m/z$  331.081 38, 分子式为  $C_{17}H_{15}O_7$  的准分子离子峰(误差为  $-1.63 \times 10^{-6}$ )。其实验相对分子质量较之桔红素少 42, 推测是由桔红素发生三去甲基化反应生成的。M4 主要的二级碎片离子  $m/z$  316 和  $m/z$  301 分别是由  $m/z$  331 连续丢失  $CH_3$  基团所产生, 而  $m/z$

298 进一步反映其裂解行为与化合物 M1、M13 等相似, 故将 M4 鉴定为桔红素三去甲基化产物。与 M5、M11 的鉴定方式相同, 可将分子式为  $C_{17}H_{15}O_8$  的 M2 和 M14 鉴定为桔红素三去甲基化与羟基化复合反应产物。

化合物 M20 和 M21 的准分子离子峰均为  $m/z$  389.123 08  $[M+H]^+$ , 推测分子式为  $C_{20}H_{21}O_8$ , 比正离子模式下检测到的桔红素 ( $C_{20}H_{21}O_7$ ) 多了 1 个氧原子, 推测为桔红素发生了羟基化反应。在其二级质谱图中筛选得到的  $m/z$  374、359、341 和 313 等离子碎片进一步证实了上述推断。代谢产物 M26 产生了  $m/z$  403.138 68 和分子式为  $C_{21}H_{23}O_8$  的准分子离子峰(误差为  $-2.37 \times 10^{-6}$ )。其相对分子质量比

桔红素多 30, 推测桔红素结构中多了 1 个甲氧基 (-OCH<sub>3</sub>)。在 ESI-MS<sup>2</sup> 质谱图中, *m/z* 403 经碰撞诱导碎裂产生 *m/z* 388、373 (连续丢失 CH<sub>3</sub>)、*m/z* 355 (脱去 1 分子 H<sub>2</sub>O)、*m/z* 327 (中性丢失 CO), 故将 M26 鉴定为桔红素甲氧基化产物。其二级谱图见图 4。

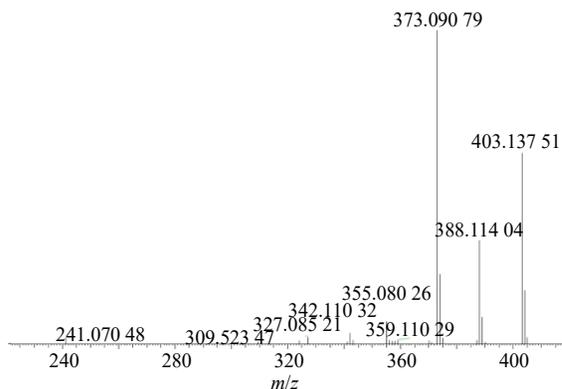


图 4 代谢物 M26 的二级质谱图

Fig. 4 Secondary mass spectrum of metabolite M26

代谢物 M10 在 6.82 min 被洗脱并产生 *m/z* 315.122 68 的准分子离子峰 [M+H]<sup>+</sup>, 预测分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub> (误差为 -2.00 × 10<sup>-6</sup>)。其相对分子质量比桔红素少 58, 而二级谱图中的特征碎片 *m/z* 133 表明中性丢失了 1 分子 CO, *m/z* 297、279 等产物

离子证明其碎裂行为与桔红素类化合物相同, 故推测桔红素还脱去了 1 分子甲氧基 (-OCH<sub>3</sub>)。因此将 M10 鉴定为桔红素去甲氧基化和脱一氧化碳复合反应产物。其二级谱图见图 5。

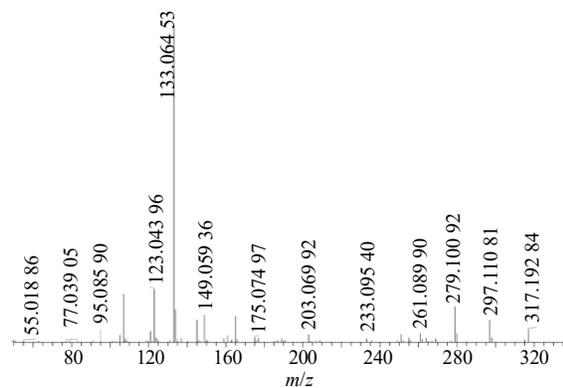


图 5 代谢物 M10 的二级质谱图

Fig. 5 Secondary mass spectrum of metabolite M10

### 3.3 桔红素在大鼠体内的代谢途径分析

通过对比空白组大鼠的血浆、尿液与粪便质谱图, 最终从给药组大鼠的生物样品中鉴定出 28 个代谢产物, 其详细代谢途径见图 6。综合分析这些代谢物的转化途径, 桔红素在大鼠体内主要发生去甲基

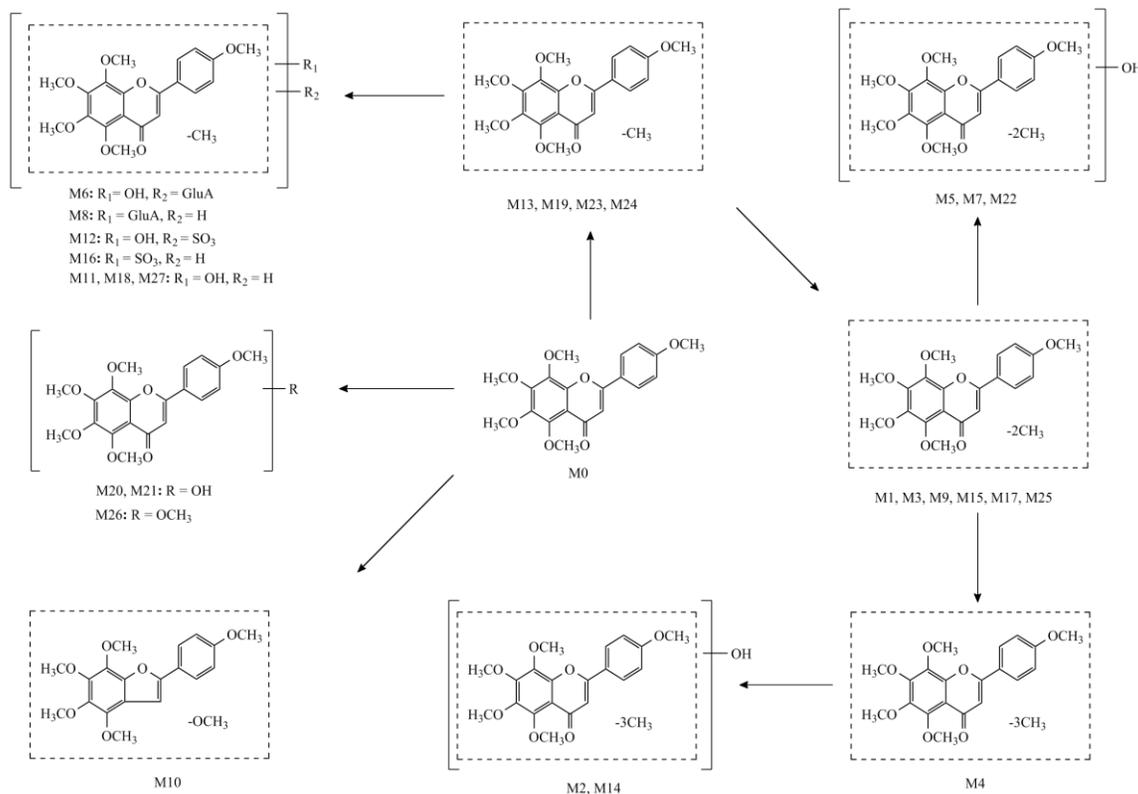


图 6 桔红素在大鼠体内的代谢途径

Fig. 6 Metabolic pathway of tangeretin in rats

化、羟基化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸化、去甲氧基化、甲氧基化、脱一氧化碳以及它们的复合反应等。

#### 4 结论

本研究采用固相萃取法处理大鼠的生物样品(尿液、血浆与粪便),可高效提取其中的代谢产物,使有机溶剂的使用量大大减少、重复性得到进一步优化,且操作简便,避免了多种杂质的干扰。生物样品经纯化后,使用UHPLC-Q-Exactive高分辨质谱联用技术对大鼠体内桔红素的代谢产物进行了全面筛选与快速鉴定,基于桔红素等多甲氧基类黄酮对照品的特征性碎裂行为、通过化合物的精确相对分子质量获取分子式,使误差缩小,鉴定结果更为精确。

结果表明,共从给药组大鼠的生物样品中鉴定出28个代谢产物。其中鉴定得到的M1、M3、M4及M13等代谢物最为常见,而其后发生羟基化反应生成的M2、M5与M11,发生硫酸酯化和葡萄糖醛酸化反应生成的M6、M8和M12进一步剖析了桔红素深层次的代谢轮廓。而M10(脱甲氧基与一氧化碳)与M26(甲氧基化)则对现有极少数有关桔红素的代谢研究作了重要补充。本研究较为详细地剖析了桔红素这一类多甲氧基黄酮的代谢机制和中间过程,可为桔红素下一步的药理活性、药动学、毒理学研究及食品保健药物的开发提供参考,同时可为其他中药天然有效成分的代谢研究提供借鉴。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 陈圣敏,董杨.多甲氧基黄酮抗肿瘤作用研究进展[J].中国药理学通报,2017,33(11):1493-1495.

[2] 源瀚祺.茶枝柑皮提取物中川陈皮素和桔皮素的药理学及肠吸收研究[D].广州:广东药学院,2014.

[3] 杨桢楠.枳实中多甲氧基黄酮类化学成分的研究[D].长春:吉林大学,2007.

[4] Mla B, Yan Z A, Di Q A, et al. Tangeretin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through Notch signaling pathway via suppressing Th17 cell response in mice [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, doi: 10.1016/j.micpath.2019.103826.

[5] Li X, Xie P, Hou Y, et al. Tangeretin inhibits oxidative stress and inflammation via upregulating Nrf-2 signaling pathway in collagen-induced arthritic rats [J]. *Pharmacology*, 2019, 104(3/4): 187-195.

[6] Wu C, Zhao J, Chen Y, et al. Tangeretin protects human brain microvascular endothelial cells against oxygen - glucose deprivation - induced injury [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 4883-4891.

[7] Liu Y, Han J, Zhou Z, et al. Tangeretin inhibits streptozotocin-induced cell apoptosis via regulating NF- $\kappa$ B pathway in INS-1 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3286-3293.

[8] 熊娅,方仪德,韩亚鹏,等.橘红素药理作用研究进展[J].中成药,2018,40(09):2030-2033.

[9] 郭晓倩.桔皮素对氯化锂-匹鲁卡品致病大鼠神经保护作用及机制研究[D].济南:山东大学,2018.

[10] Tang K, He S, Zhang X, et al. Tangeretin, an extract from Citrus peels, blocks cellular entry of arenaviruses that cause viral hemorrhagic fever [J]. *Antiviral Res*, 2018, 160: 87-93.

[11] 张怡,成雨竹,区展纶,等.橘红素自微乳给药系统的制备及体内吸收研究[J].中国医院药学杂志,2019,39(08):833-837.

[12] 梁咏倩.陈皮-广藿香药对非挥发性成分的体外指纹谱和体内代谢谱的研究[D].广州:广东药科大学,2016.

[13] 喻鹤,徐贞贞,毕秀芳,等.液相色谱-高分辨质谱技术在食品脂质组学分析中的应用[J].农产品质量与安全,2019(6):40-46.

[14] Ottavio F D, Gauglitz J M, Ernst M, et al. A UHPLC-HRMS based metabolomics and chemoinformatics approach to chemically distinguish 'super foods' from a variety of plant-based foods [J]. *Food Chem*, 2020, 313: 126071.

[15] Ywa B, Pdbh B, Pei C A. Analysis of phenolic compositions in cranberry dietary supplements using UHPLC-HRMS [J]. *J Food Comp Anal*, 2020, doi: 10.1016/j.jfca.2019.103362.

[16] 于泓,胡青,孙健,等.基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术的黄芪注射液化学成分分析[J].世界中医药,2019,14(4):809-817.

[17] 吴丹,刘斌,邹瑜. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨率质谱法同时测定参芪健胃颗粒中8个成分的含量[J].中国药房,2020,31(5):600-606.

[18] 周丹丹,邹秦文,林瑞超.基于超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱质谱的胃复春片化学成分研究[J].世界中医药,2020,15(13):1841-1848.

[19] Cai W, Li K, Xiong P, et al. A systematic strategy for rapid identification of chlorogenic acids derivatives in *Duhaldea nervosa* using UHPLC-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry [J]. *Arabian J Chem*, 2020, 13(2): 3751-3761.

[20] Zhao Y, Yuan Y C, Bai X L, et al. Multi-mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC-Q-Exactive HRMS after magnetic solid-phase extraction based on PEGylated multi-walled carbon nanotubes [J]. *Food Chem*, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125429.

- [21] Niu M, Li Z, He W, *et al.* Attapulgite modified magnetic metal-organic frameworks for magnetic solid phase extraction and determinations of benzoylurea insecticides in tea infusions [J]. *Food Chem*, 2020, 317: 126425.
- [22] Kanaze F I, Kokkalou E, Georgarakis M, *et al.* Validated high-performance liquid chromatographic method utilizing solid-phase extraction for the simultaneous determination of naringenin and hesperetin in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 801(2): 363-367.
- [23] Regueiro J, Vallverdu-Queralt A, Negreira N, *et al.* Identification and quantification of grapefruit juice furanocoumarin metabolites in urine: An approach based on ultraperformance liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry and solid-phase extraction coupled to ultraperformance liquid chromatography coupled to triple quadrupole-tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(9): 2134-2140.
- [24] Zhao W, Shang Z, Li Q, *et al.* Rapid screening and identification of daidzein metabolites in rats based on uhplc-ltq-orbitrap mass spectrometry coupled with data-mining technologies [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23010151.
- [25] Liang Y Y, Zhao W J, Wang C X, *et al.* A Comprehensive screening and identification of genistin metabolites in rats based on multiple metabolite templates combined with UHPLC-HRMS analysis [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23081862.
- [26] Zhao Y, Kao C P, Liao C R, *et al.* Chemical compositions, chromatographic fingerprints and antioxidant activities of *Citri Exocarpium Rubrum* (Juhong) [J]. *Chin Med*, 2017, 12(1): 6.
- [27] Lei J, Xue Y, Liu Y M, *et al.* Characterization of major metabolites of polymethoxylated flavonoids in *Pericarpium Citri Reticulatae* using liver microsomes immobilized on magnetic nanoparticles coupled with UPLC/MS-MS [J]. *Chem Central J*, 2017, doi: 10.1186/s13065-017-0237-9.
- [28] Ke Z, Yang Y, Tan S, *et al.* Characterization of polymethoxylated flavonoids in the peels of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Food Anal Methods*, 2017, 10(5): 1328-1338.
- [29] Guccione C, Bergonzi M C, Piazzini V, *et al.* A simple and rapid HPLC-PDA MS method for the profiling of citrus peels and traditional Italian liquors [J]. *Planta Med*, 2016, 82(11/12): 1039-1045.

[责任编辑 王文倩]