

UPLC-Q/TOF-MS/MS 法分析鉴定夏佛塔昔在小鼠体内的代谢产物

魏雅芹¹, 王天云², 李雅婷¹, 陈雨浪^{1,2}, 廖文星¹, 杜岩¹, 汤道权^{1*}

(1. 徐州医科大学, 江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 江苏 徐州 221004; 2. 淮安市淮安医院, 江苏 淮安 223200)

摘要: 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole/ time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q/TOF-MS/MS) 技术, 对夏佛塔昔口服给药后在小鼠体内的原形成分及其代谢产物进行定性分析。动物福利和实验过程获得徐州医科大学伦理委员会的批准 (批准号: XZMULL201612024)。通过分析各成分的精确分子量、一级、二级质谱信息, 并与相应的对照品及文献比对, 从小鼠血浆、胆汁、尿液和粪便中共鉴定出 1 个原形成分和 29 个代谢产物。这些成分在小鼠体内代谢的主要途径有去羟基化、羟基化、脱糖化、糖化、氢化、甲基化、乙酰化、硫酸化、葡糖醛酸化等。研究结果可为进一步阐明夏佛塔昔的药效物质基础提供有价值的依据。

关键词: 夏佛塔昔; 小鼠; 原形成分; 代谢产物; 超高效液相色谱-飞行时间串联质谱联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2811-10

Metabolites of schaftoside in mouse plasma, bile, urine and feces after oral administration by UPLC-Q/TOF-MS/MS

WEI Ya-qin¹, WANG Tian-yun², LI Ya-ting¹, CHEN Yu-lang^{1,2}, LIAO Wen-xing¹,
DU Yan¹, TANG Dao-quan^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 2. Huai'an Hospital of Huai'an City, Huai'an 223200, China)

Abstract: Ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole/time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS/MS) has been used to detect the metabolites of schaftoside in plasma, bile, urine and feces of mice after oral administration. The study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee from Xuzhou Medical University (No. XZMULL201612024). Compounds were identified by analyzing their high-resolution mass spectrometry data, mass spectra, and comparison with reference substances and the literatures. The parent compound and 29 metabolites were detected in the plasma, bile, urine and feces samples of mice. The main metabolic pathways of schaftoside in mice include deglycosylation/glycosylation, hydroxylation/dehydroxylation, hydrogenation, methylation, acetylation, sulfation, and glucuronidation. This study provides references for the material basis of schaftoside *in vivo*.

Key words: schaftoside; mouse; parent compound; metabolite; UPLC-Q/TOF-MS/MS

夏佛塔昔 (芹菜素-6-葡萄糖-7-阿拉伯糖) 为一种黄酮碳苷类化合物, 主要存在于广金钱草中, 并被中国药典收录为广金钱草质量控制的指标性成分^[1]。研究

表明, 夏佛塔昔尚存在于甘草、甘蔗、溪黄草、艾叶、天南星等植物中。现代药理学研究证实, 夏佛塔昔具有抗炎^[2,3]、抗黑色素瘤^[4]、抑制胆囊、膀胱及肾脏结石形成^[5]、保护对乙酰氨基酚引起的肝脏损伤^[6]、抗癫痫^[7]、抑制肝脏脂质堆积^[8,9]等药理活性, 但其在体内的代谢产物目前尚不完全清晰。

收稿日期: 2022-04-14; 修回日期: 2022-06-27.

基金项目: 江苏省高校自然科学研究重大项目 (16KJA350001).

*通讯作者 Tel: 86-516-83263313, E-mail: tangdq@xzhmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0436

中药有效成分在体内的代谢产物对阐明其体内药效物质基础和作用机制发挥着重要作用,但中药有效成分在生物体内通常发生广泛代谢,且由于其代谢途径的多样性和复杂性,以及内源性物质的干扰,使得其代谢物鉴定仍然存在很大的技术挑战。液相色谱-高分辨串联质谱具有分离能力强、扫描质量范围宽、速度快、灵敏度高优点,可提供母离子及子离子的精确分子质量和元素组成结构信息,能较为可靠地快速鉴定复杂生物基质中的代谢产物,已广泛应用于中药及其有效成分体内代谢产物的鉴定^[10-14]。

本文采用液相色谱-飞行时间/四级杆串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole/time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q/TOF-MS/MS) 技术对小鼠灌胃给予夏佛塔昔后血浆、胆汁、尿液及粪便中主要代谢产物进行鉴定,共鉴定 30 种化学成分,包括 1 个原形成分及 29 个代谢物,为深入探讨夏佛塔昔药效物质基础及作用机制提供了实验基础。

材料与amp;方法

仪器 Agilent 1290-6550 四级杆-飞行时间质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); AB265-S 梅特勒电子分析天平 (瑞士梅特勒公司); Hettich MIKRO 200/200R 台式高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); LNG-T98 真空冷冻浓缩干燥仪 (太仓市科教器材厂); EYEL4 N-1100 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); XW-80A 微型涡旋仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); 超纯水机 (德国赛得利斯公司); SB-5200D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 手持组织匀浆器 (美国 Biospec 公司)。

试剂与试剂 甲醇 (色谱级,批号: 0000164930) 及乙腈 (色谱级,批号: 0000166712) 购自美国 J.T.Baker 公司; 甲酸 (LC-MS 级,色谱纯) 购自美国 MREDA 公司; 乙酸乙酯 (分析纯) 购自国药集团化学试剂有限公司; 娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司; 屈臣氏纯净水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司; 对照品芹菜素 ($\geq 98\%$, TB20180302)、木犀草素 ($\geq 98\%$, TB20180301) 购自西安天宝生物科技有限公司; 槲皮素 ($\geq 98\%$, RP180413) 购自四川维克奇生物科技有限公司; 夏佛托昔 ($\geq 98\%$, RP170621)、异鼠李素 ($\geq 98\%$, RP170815) 购自成都麦德生生物科技有限公司。

动物实验 C57BL/6J 小鼠 12 只,体重 25~30 g,雌雄各半,徐州医科大学实验动物中心提供 [生产许可证: SYXK (苏) 2015-0009,饲养许可证: SYXK (苏) 2015-0030]。随机分为给药组 (6 只) 和空白组 (6 只),于

温度 22~25 °C、湿度 50%~70%、12 h/12 h 日夜循环的环境下适应 5 天后。进食 12 h,给药组按 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量口服给予夏佛塔昔的 0.5% 羧甲基纤维素钠悬浮液^[15],空白组给予相应体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。给药周期内小鼠自由进食饮水。给药一周后,分别收集血液、尿液、胆汁、粪便。实验方案经徐州医科大学实验动物中心伦理委员会批准 (批准号: XZMULL201612024)。

样品收集 各组动物连续给药 4 天后,置代谢笼,继续给药 3 天,最后一天 (第 7 天) 给药后,收集 24 h 的粪便、尿液,置-80 °C 冰箱冻存,备用。将各组小鼠从代谢笼取出,置常规饲养笼中,继续给药 1 天 (第 8 天),末次给药后 1 h,眼眶采血,将收集的血液迅速置肝素化管中,4 °C 下 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。收集血浆并储存在-80 °C 冰箱。采血后的各组小鼠脱颈处死,迅速打开腹腔,取肝内侧的胆囊于-80 °C 冰箱保存。

样品处理

血浆 取血浆 200 μ L,加入乙酸乙酯 200 μ L,涡旋 5 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,重复该步骤 3 次。收集乙酸乙酯层,合并后真空冷冻至干,残余物加入 95% 乙腈 100 μ L,涡旋 5 min,超声 3 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为脂溶性样品待分析;取水下层,加入乙腈 400 μ L,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液于真空冷冻至干,残余物加入 95% 甲醇 100 μ L,涡旋 5 min,超声 3 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为水溶性样品待分析。

胆汁 取胆囊置离心管中,挤破,吸取胆汁,加入 6 倍量的乙酸乙酯,涡旋 5 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上层真空冷冻至干,残余物加入 6 倍胆汁体积的 95% 乙腈,涡旋 5 min,超声 3 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为脂溶性样品待分析;取乙酸乙酯提取后的下层,加入 6 倍胆汁体积的甲醇,涡旋 5 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为水溶性样品待分析。

尿液 取尿液 500 μ L,加入乙酸乙酯 500 μ L,涡旋 5 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,重复 3 次。收集乙酸乙酯层,真空冷冻至干,残余物加入 95% 乙腈 100 μ L,涡旋 5 min,超声 3 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为脂溶性样品待分析;另取尿液 500 μ L,加入乙腈 1 mL,涡旋 5 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液于真空冷冻至干,残余物加入 95% 甲醇 100 μ L,涡旋 5 min,超声 3 min,4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为水溶性样品待分析。

粪便 取 2.5 mg 粪便两份,分别溶于 800 μ L 生理

盐水, 搅匀。一份加入乙酸乙酯 800 μL , 涡旋 5 min, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 重复萃取 3 次, 乙酸乙酯层真空冷冻至干, 残余物加入 95% 乙腈 100 μL , 涡旋 5 min, 超声 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 作为脂溶性样品待分析; 另一份加入乙腈 2 mL, 涡旋 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液于真空冷冻至干, 残余物加入 95% 甲醇 100 μL , 涡旋 5 min, 超声 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 作为水溶性样品待分析。

色谱条件

参照本课题组以前的分析方法^[16], 血浆及胆汁样品采用 Xbridge C18 柱 (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm , Waters), 而尿液及粪便样品分别采用 Fortis C18 柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) 和 Zorbax SB-C18 柱 (100 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm) 进行分离; 柱温及自动进样器的温度分别为 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 流速、梯度及进样量分设如下:

血浆 水溶性提取物: 0 min, 15% B; 3 min, 20% B; 5 min, 30% B; 8 min, 65% B; 20~24 min, 100% B; 脂溶性提取物: 0 min, 30% B; 3 min, 60% B; 5 min, 75% B; 8 min, 80% B; 22 min, 90% B; 26 min, 95% B; 28~30 min, 100% B; 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 2 μL 。

胆汁 水溶性提取物: 0 min, 5% B; 3 min, 20% B; 17 min, 20% B; 20 min, 65% B; 23~26 min, 100% B; 脂溶性提取物: 0~3 min, 30% B; 8 min, 80% B; 14 min, 80% B; 16 min, 90% B; 18~22 min, 100% B; 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 2 μL 。

尿液 水溶性提取物: 0~10 min, 5% B; 15 min, 15% B; 30 min, 40% B; 32 min, 70% B; 40 min, 100% B; 脂溶性提取物: 0~6 min, 5% B; 10 min, 10% B; 14 min, 20% B; 18 min, 20% B; 19~24 min, 30% B; 28 min, 60% B; 30 min, 90% B; 45 min, 100% B; 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 1.5 μL 。

粪便 水溶性提取物: 0~6 min, 5% B; 28 min, 40% B; 40 min, 60% B; 52 min, 100% B; 脂溶性提取物: 0 min, 5% B; 2 min, 10% B; 16 min, 40% B; 22 min, 60% B; 32 min, 60% B; 40 min, 70% B; 48 min, 100% B; 流速 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 1.5 μL 。

质谱条件 电离模式: Dual AJS ESI (-); 参比离子: m/z 121.050 8 和 922.009 7; 毛细管电压: 3 500 V; 干燥气温度: 225 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流量: 12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 雾化器压力: 28 psig; 鞘气温度: 275 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流量: 12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 扫描范围: m/z 50~1 700。碎裂电压: 175 V; 碰撞能量: 15 eV。

数据处理 根据测得的精确相对分子质量, 在规

定误差范围内 (± 10.0 ppm) 计算可能的元素组成, 并结合对照品及各个成分的二级质谱碎片信息和文献报道的数据, 对各色谱峰进行定性分析。

结果

1 夏佛塔昔口服给予小鼠后的体内代谢分析

夏佛托昔经口服给予小鼠之后, 经初步结构推测, 在小鼠体内共可检测到 1 个原形成分和 29 个代谢产物。它们的总离子流色谱图和可能的化学结构分别见图 1 和表 1。根据代谢产物的结构, 推测出它们的可能代谢途径见图 2。

由表 1 和图 2 可知, 夏佛托昔经口服给予小鼠后, 小鼠粪便、尿液、胆汁和血液中均可检测到去糖化、羟基化、甲基化、双键加氢的代谢产物; 尿液、胆汁和血液中均可发现去羟基化的代谢产物; 粪便、尿液和血液中均可检测到葡萄糖化的代谢产物; 粪便、胆汁和血液均可发生去氧化还原代谢反应; 粪便和尿液均可检测到硫酸酯化的代谢产物; 而尿液中尚可检测到葡萄糖醛酸化及乙酰化的代谢产物。

由表 1 可知, 夏佛托昔经口服给予小鼠后, 在小鼠的粪便、尿液和血液中均可测到原形和其昔元芹菜素的羟基化产物—木犀草素; 另外, 在粪便、尿液、胆汁和血液中均可检测昔元芹菜素。推测可能是由于夏佛托昔是 C 糖苷, 不容易被糖苷酶水解, 从而以一部分原形吸收入血。

2 原形成分及代谢产物的结构鉴定及裂解规律分析

负离子模式下, 黄酮昔元主要发生以 C 环为中心的断裂、丢失重排反应, 其中最具有结构特征的是 $^{13}[\text{A}-\text{H}]^{-}$ 与 $^{13}[\text{B}-\text{H}]^{-}$ 系列离子。黄酮 (醇)、查尔酮及二氢黄酮类化合物 C 环 1/3、1/4、0/2、0/4 等位上 C-C 键均能断裂, 其中 1/3 与 0/4 断裂为逆狄尔斯-阿德尔 (Retro Diels Alder, RDA) 裂解^[17,18], 是该类化合物的优势裂解, 它们骨架的 C 环裂解示意图及形成的碎片离子见图 3。负离子下, 黄酮昔元还时常发生相继丢失 CO 、 CO_2 、 H_2O 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ 、 C_2O_3 等中性碎片的系列裂解^[16]。本研究即是参照这些信息进行黄酮类化合物裂解规律的推测。

M0 的准分子离子峰产生在 m/z 563.143 1 ($[\text{M}-\text{H}]^{-}$), 特征碎片离子分别为 m/z 401 ($[\text{M}-\text{H}-\text{葡萄糖基}]^{-}$)、269 ($[\text{M}-\text{H}-\text{葡萄糖基}-\text{阿拉伯糖基}]^{-}$)、151 ($^{13}[\text{A}-\text{H}]^{-}$)、117 ($^{13}[\text{B}-\text{H}]^{-}$), 经与对照品对照、文献^[16] 比对, 确定为夏佛塔昔。

M1 的准分子离子峰为 m/z 269.046 5 ($[\text{M}-\text{H}]^{-}$), 比 M0 低 294 Da (葡萄糖基+阿拉伯糖基), 结合其特征碎片 m/z 241 ($[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^{-}$)、151 ($^{13}[\text{A}-\text{H}]^{-}$)、117 ($^{13}[\text{B}-\text{H}]^{-}$)

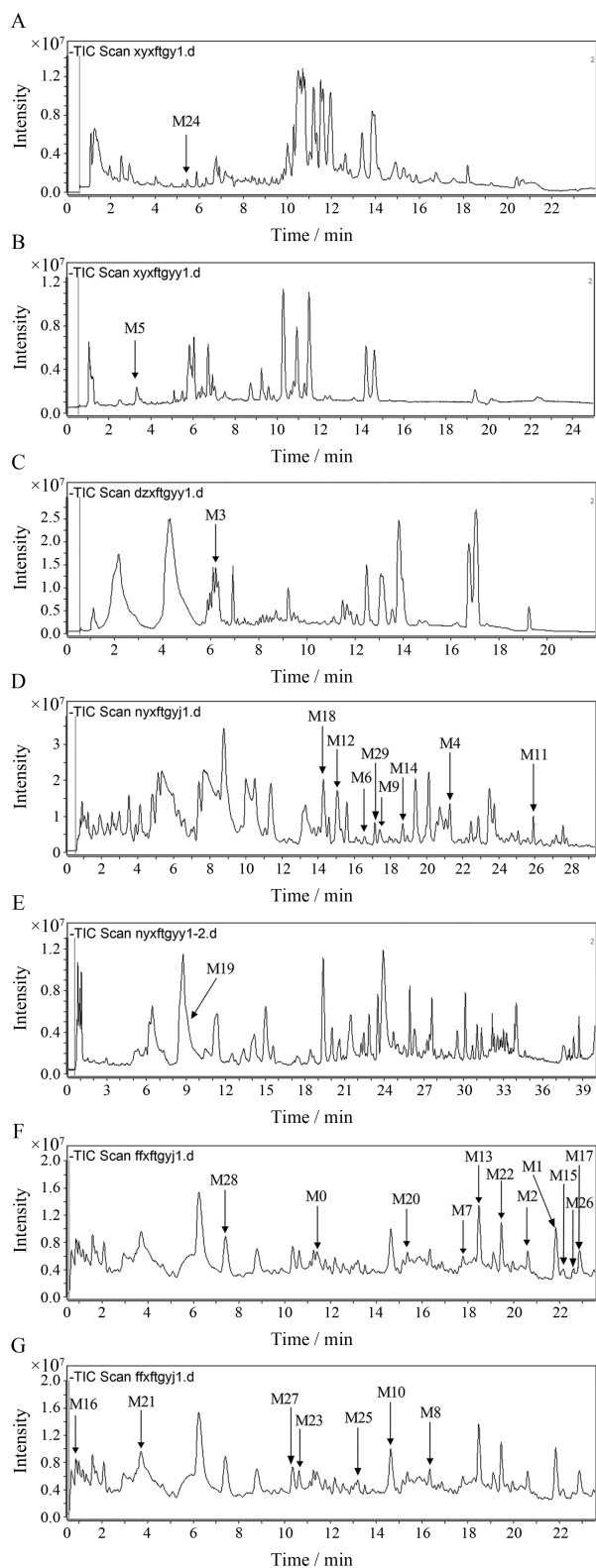


Figure 1 The total ion chromatograms (TIC) of mouse plasma treated with acetonitrile (A) and ethyl acetate (B), bile treated with methanol (C), urine treated with acetonitrile (D) and ethyl acetate (E), and feces treated with acetonitrile (F) and ethyl acetate (G) after oral administration of schaftoside. The names of M0–M29 were listed in Table 1

及 107 ($^{0,4}[\text{A-H}]^-$), 并通过对照品及文献比对^[19], 确定为芹菜素。M2 的准分子离子峰为 m/z 271.061 5 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M1 (芹菜素) 高 2 Da, 结合其碎片离子 m/z 255 ($[\text{M-OH}]^-$), 163 ($^{0,4}[\text{B-H}]^-$), 151 ($^{1,3}[\text{A-H}]^-$) 及 119 ($^{1,3}[\text{B-H}]^-$), 结合文献^[20], 推测为二氢芹菜素。M4 的准分子离子峰为 m/z 253.051 8 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M2 低 16 Da, 结合其碎片离子 m/z 151 ($^{1,3}[\text{A-H}]^-$), 123 ($^{1,4}[\text{A-H}]^-$) 及 107 ($^{0,4}[\text{A-H}]^-$), 并经文献^[16] 比对, 推测其为 5,7-二羟基黄酮 (4-去羟基芹菜素)。M5 的准分子离子峰为 m/z 267.066 2 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M4 高 14 Da, 其碎片离子分别为 m/z 253 ($[\text{M-H-CH}_2]^-$), 165 ($^{1,3}[\text{A-H}]^-$) 及 151 ($^{1,3}[\text{A-H-CH}_2]^-$), 推测为 5-羟基-7-甲氧基黄酮 (白杨素)^[21]。M6 所产生的准分子离子峰在 m/z 431.098 1 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M1 高 162 Da, 结合其主要碎片离子 m/z 269 ($[\text{M-H-葡萄糖基}]^-$), 151 ($^{1,3}[\text{A-H-葡萄糖基}]^-$), 135 ($^{1,3}[\text{A-H-O-葡萄糖基}]^-$), 推测其为芹菜素-7-葡萄糖苷。M7 的准分子离子峰为 m/z 349.001 2 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M1 高 80 Da, 结合其主要产物离子 m/z 269 ($[\text{M-H-SO}_3]^-$), 225 ($[\text{M-H-SO}_3-\text{CO}_2]^-$), 151 ($^{1,3}[\text{A-H-SO}_3]^-$) 及 117 ($^{1,3}[\text{B-H}]^-$), 推测其为芹菜素-7-硫酸酯。M8 产生的准分子离子峰在 m/z 283.061 5 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M1 高 14 Da, 结合其碎片离子 m/z 269 ($[\text{M-H-CH}_2]^-$), 151 ($^{1,3}[\text{A-H}]^-$) 及 131 ($^{1,3}[\text{B-H}]^-$), 推测其为芹菜素-4'-甲基醚。M9 的准分子离子峰为 m/z 459.093 5 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M8 高 176 Da, 结合其产物离子 m/z 283 ($[\text{M-H-葡萄糖醛酸基}]^-$), 269 ($[\text{M-H-CH}_2\text{-葡萄糖醛酸基}]^-$), 151 ($^{1,3}[\text{A-H-葡萄糖醛酸基}]^-$) 及 131 ($^{1,3}[\text{B-H}]^-$), 推测其为芹菜素-4'-甲基醚-7-*O*-葡萄糖醛酸苷。M10 产生 m/z 269.082 0 ($[\text{M-H}]^-$) 的准分子离子峰, 比 M4 高 16 Da, 结合其产物离子 m/z 165 ($^{1,3}[\text{A-H}]^-$) 及 151 ($^{1,3}[\text{A-H-CH}_2]^-$), 推测其为 5-羟基-7-甲氧基黄酮。M11 产生 m/z 445.113 8 ($[\text{M-H}]^-$) 的准分子离子峰, 比 M8 高 162 Da, 其主要碎片离子为 m/z 283 ($[\text{M-H-葡萄糖基}]^-$), 269 ($[\text{M-H-CH}_2\text{-葡萄糖基}]^-$), 151 ($^{1,3}[\text{A-H-葡萄糖基}]^-$) 及 131 ($^{1,3}[\text{B-H}]^-$), 因此推测其为芹菜素-4'-甲基醚-7-*O*-葡萄糖苷。M12 的准分子离子峰为 m/z 447.127 9 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M11 高 2 Da; 结合产物离子 m/z 269 ($[\text{M-H-O-葡萄糖基}]^-$), 149 ($^{0,2}[\text{A-H-葡萄糖基}]^-$) 及 147 ($^{0,2}[\text{B-H-CH}_2]^-$), 推测其为二氢芹菜素-4'-甲基醚-7-*O*-葡萄糖苷。M13 的准分子离子峰为 m/z 313.106 8 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M2 高 42 Da, 结合其产物离子 m/z 271 ($[\text{M-H-3CH}_2]^-$), 269 ($[\text{M-H-CO}_2]^-$), 179 ($^{1,3}[\text{A-H}]^-$) 及 117 ($^{1,3}[\text{B-H-2H-CH}_2]^-$), 推测其为二氢芹菜素-4',5,7-三甲基醚。M14 的准分子离子峰为 m/z 395.076 6 ($[\text{M-H}]^-$), 比 M1 高 126 Da, 结合其主要产物离子 m/z 353 ($[\text{M-H-COCH}_2]^-$), 311 ($[\text{M-H-}$

Table 1 Possible metabolites in the plasma (P), bile (B), urine (U) and feces (F) of mice after oral administration. *Identification by the reference standard

No.	Formula	Measured [M-H] ⁻	Predicted [M-H] ⁻	Error (ppm)	Identification	Major fragment ion	Source
*M0	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.143 1	563.140 1	-5.33	Schaftoside	401, 269, 151, 117	F, U, P
*M1	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.046 5	269.045 0	-5.58	Apigenin	241, 151, 117, 107	F, U, P, B
M2	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.061 5	271.060 6	-3.32	Dihydroapigenin	255, 163, 151, 119	F, B
M3	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	257.082 7	257.081 4	-5.06	2',4',4-Trihydroxydihydrochalcone	163, 147, 135, 121	B
M4	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.051 8	253.050 1	-6.72	5,7-Dihydroxyflavone	151, 123, 107	U
M5	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.066 2	267.065 7	-1.87	Tectochrysin	253, 165, 151	P, B
M6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 1	431.097 8	-0.70	Apigenin-7-O-glucoside	269, 151, 135	U
M7	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	349.001 2	349.001 8	1.72	Apigenin-7-sulfate	269, 225, 151, 117	F
M8	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	283.061 5	283.060 6	-3.18	Apigenin-4'-methyl ether	269, 151, 131	F,U
M9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	459.093 5	459.092 7	-1.74	Apigenin-4'-methyl ether-7-O-glucuronide	283, 269, 151, 131	U
M10	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269.082 0	269.081 4	-2.23	5-Hydroxy-7-methoxyflavone	165, 151	F
M11	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.113 8	445.113 5	-0.67	Apigenin-4'-methyl ether-7-glucoside	283, 269, 151, 131	U
M12	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	447.127 9	447.129 1	2.68	Dihydroapigenin-4'-methyl ether-7-glucoside (isosakuranin)	269, 149, 147	U
M13	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	313.106 8	313.107 6	2.56	Dihydroapigenin-4',5,7-trimethyl ether	271, 269, 179, 117	F
M14	C ₂₁ H ₁₆ O ₈	395.076 6	395.076 7	0.25	Apigenin-4',5,7- triacetyl ether	353, 311, 269, 151	U
*M15	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 1	285.039 9	-0.70	Luteolin	177, 151, 133, 107	F, U, P
M16	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.106 9	449.108 4	3.34	Dihydroxyluteolin-7-O-glucoside	287, 179, 151, 135	F, U
M17	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.055 8	299.055 6	-0.67	Luteolin-3'-methyl ether	283, 151, 147, 133, 107	F, U
M18	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301.072 9	301.071 2	-5.65	Dihydroxyluteolin-3'-methyl ether	287, 271, 151, 149	F, U
M19	C ₁₆ H ₁₄ O ₉ S	381.026 9	381.028 0	2.89	Dihydroxyluteolin-3'-methyl ether 7-sulfate	301, 287, 151, 149	U
M20	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	327.079 8	327.086 9	-5.81	Luteolin-3',4',7-trimethyl ether	299, 283, 165	F
M21	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	329.102 6	329.102 5	-0.30	Dihydroxyluteolin-3',4',7-trimethyl ether	315, 287, 135, 125	F, U
M22	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	343.118 8	343.118 2	-1.75	Dihydroxyluteolin-3',4',5,7- tetramethyl ether	329, 287, 151, 135	F
*M23	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.035 6	301.034 8	-2.66	Quercetin	257, 193, 151, 149, 107	F, U
M24	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	303.051 3	303.050 5	-2.64	Dihydroquercetin	259, 167, 151, 107	P
*M25	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.051 0	315.050 5	-1.59	Quercetin-3'-methyl ether (isorhamnetin)	301, 177, 151, 125, 107	F
M26	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.066 7	329.066 1	-1.82	Quercetin-3',7-dimethyl ether	315, 301, 165, 163, 107	F, U
M27	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	357.097 6	357.097 4	-0.56	Quercetin-3,3',4',7-tetramethyl ether	343, 313, 151	F
M28	C ₁₆ H ₁₂ O ₁₁ S	411.000 9	411.002 2	3.16	Gossypetin-3'-methyl ether-4'-sulfate	331, 167, 131	F
M29	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₉	653.101 4	653.099 0	-3.67	Quercetin-3',7-O-diglucuronide	477, 301, 149	U

2COCH₂)⁻、269 ([M-H-3COCH₂)⁻及 151 (¹³[A-H-2COCH₂)⁻), 推测其为芹菜素-4',5,7-三乙酰酯。

M3的准分子离子峰为 m/z 257.082 7 ([M-H]⁻), 推测为 2',4',4-三羟基查尔酮, 其羰基的 α 裂解产生碎片离子 m/z 135 及 m/z 121; 也可脱氢后异构化为其相应的黄烷 (4',7-二羟基黄烷), 进而发生 C 环裂解, 分别产生碎片离子 m/z 163 (⁰⁴[B-H]⁻) 及 m/z 147 (¹⁴[B-H]⁻)^[20]。

M15的准分子离子峰为 m/z 285.040 1 ([M-H]⁻), 其特征碎片离子分别为 m/z 177 (⁰⁴[B-H]⁻), 151 (¹³[A-H]⁻), 133 (¹³[B-H]⁻) 及 107 (⁰⁴[A-H]⁻), 结合对照品及文献^[22]对比, 确定其为木犀草素。M16产生准分子离子峰 m/z 449.106 9 ([M-H]⁻), 比 M15 高 164 Da, 比二氢木犀草素 (分子量为 287 Da) 高 162 Da, 结合其碎片离子 m/z 287 ([M-H-葡萄糖基]⁻), 179 (⁰⁴[B-H]⁻), 151 (¹³[A-H-葡萄糖基]⁻) 及 135 (¹³[B-H]⁻), 推测其为二氢木犀草素-7-O-葡萄糖苷。M17的准分子离子峰为 m/z 299.055 8 ([M-H]⁻), 比 M15 高 14 Da, 结合其碎片离子 m/z 283 ([M-H-CH₂)⁻), 151 (¹³[A-H]⁻), 147 (¹³[B-H]⁻),

133 (¹³[B-H-CH₂)⁻) 及 107 (⁰⁴[A-H]⁻), 推测其为木犀草素-3'-甲基醚。M18产生 m/z 为 301.072 9 ([M-H]⁻) 的准分子离子峰, 比 M17 高 2 Da, 比二氢木犀草素高 14 Da, 结合其碎片离子 m/z 287 ([M-H-CH₂)⁻), 271 ([M-OCH₃)⁻), 151 (¹³[A-H]⁻) 及 149 (¹³[B-H]⁻), 推测其为二氢木犀草素-3'-甲基醚。M19的准分子离子峰为 m/z 381.026 9 ([M-H]⁻), 比 M18 高 80 Da, 结合其碎片离子 m/z 301 ([M-H-SO₃)⁻), 287 ([M-H-SO₃-CH₂)⁻), 151 (¹³[A-H]⁻) 及 149 (¹³[B-H]⁻), 推测其为二氢木犀草素-3'-甲基醚-7-硫酸酯。M20的准分子离子峰为 m/z 327.088 8 ([M-H]⁻), 比 M17 高 28 Da, 结合其产物离子 m/z 299 ([M-H-2CH₂)⁻), 283 ([M-H-3CH₂)⁻) 及 165 (¹³[A-H]⁻), 推测其为木犀草素-3',4',7-三甲基醚。M21产生 m/z 为 329.102 6 的准分子离子峰, 比 M20 高 2 Da, 结合其产物离子 m/z 315 ([M-H-CH₂)⁻), 287 ([M-H-3CH₂)⁻), 135 (⁰⁴[A-H]⁻ 或 ¹³[A-CH₂-OCH₃)⁻) 及 125 (¹⁴[A-H-2CH₂)⁻), 推测其为二氢木犀草素-3',4',7-三甲基醚。M22的准分子离子峰为 m/z 343.118 8 ([M-H]⁻),

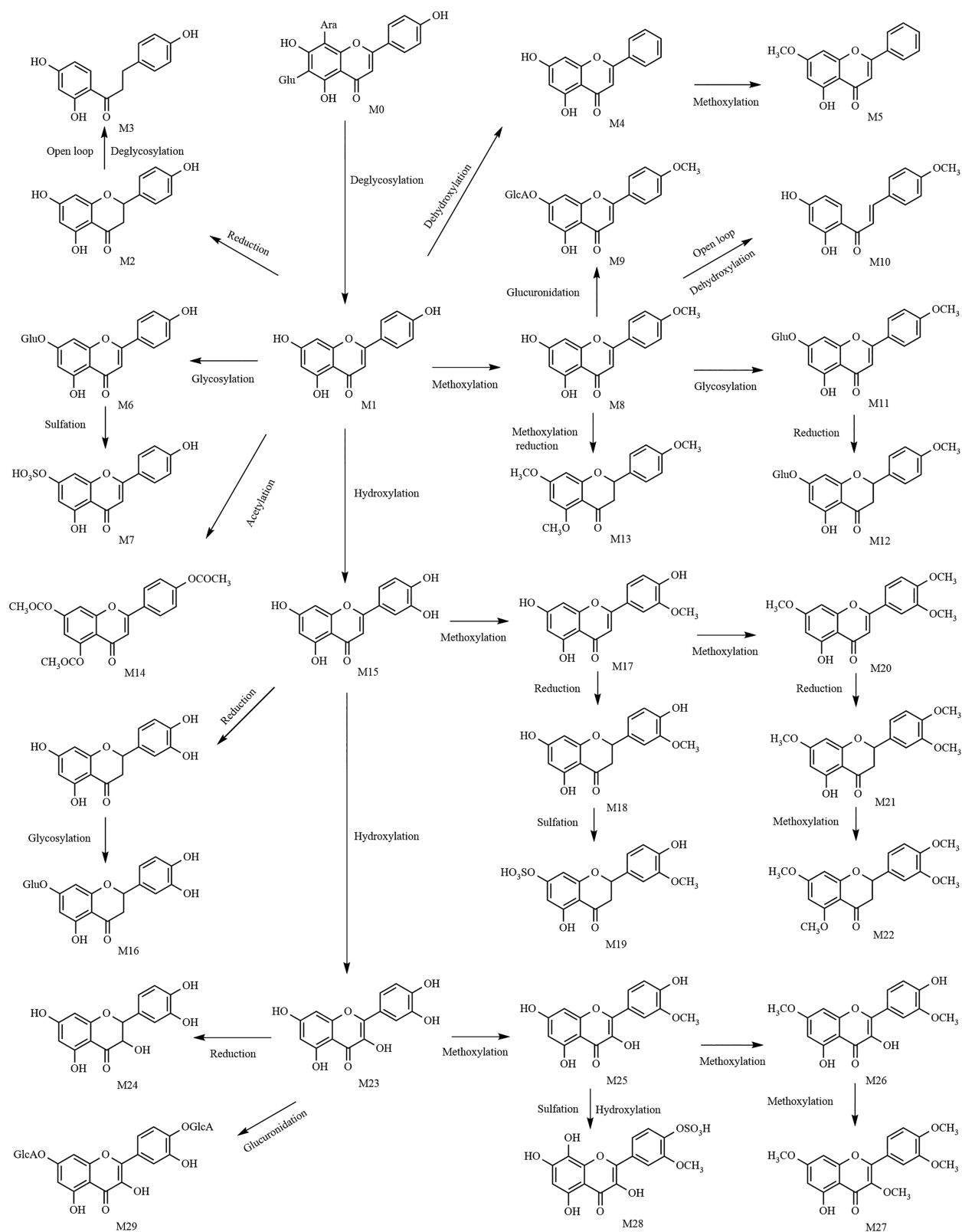


Figure 2 Possible metabolic pathways of schaftoside in mouse after oral administration. The names of M0-M29 were listed in Table 1

比 M21 高 14 Da, 结合其产物离子 m/z 329 ($[M-H-2CH_2]^-$), 287 ($[M-H-4CH_2]^-$), 151 ($^{1,3}[A-H-2CH_2]^-$) 及 135 ($^{1,3}[A-H]^-$), 推测其为二氢木犀草素-3',4',4,7-四甲基醚。

M23 的准分子离子峰为 m/z 301.035 6 ($[M-H]^-$), 结合特征碎片离子 m/z 257 ($[M-H-CO_2]^-$), 193 ($^{0,4}[B-H]^-$), 151 ($^{1,3}[A-H]^-$), 149 ($^{1,3}[B-H]^-$) 及 107 ($^{0,4}[A-H]^-$), 并经对照品对照和文献^[23]比对, 鉴定其为槲皮素。M24

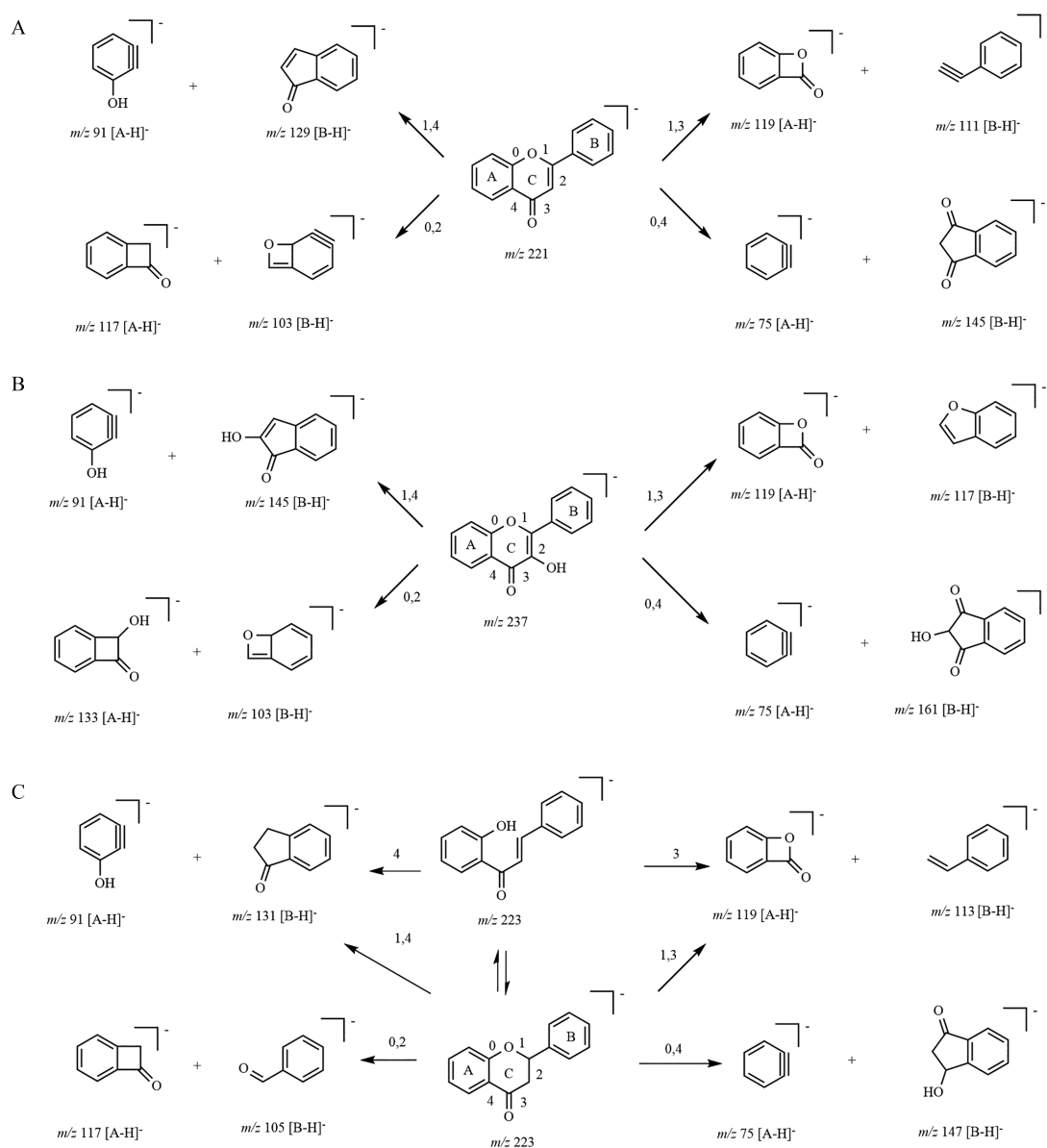


Figure 3 Possible C-cycle fragmentation of the pseudomolecular anion flavone (A), flavonol (B) and chalcone (C)

产生准分子离子峰 m/z 303.051 3 ([M-H]⁻), 比 M23 高 2 Da, 结合碎片离子 m/z 259 ([M-H-CO₂]⁻), 167 (^{0,2}[A-H]⁻), 151 (^{1,3}[A-H]⁻ 或 ^{1,3}[B-H]⁻) 及 107 (^{0,4}[A-H]⁻), 推测其为二氢槲皮素。M25 的准分子离子峰为 m/z 315.051 0 ([M-H]⁻), 比 M23 高 14 Da, 结合其特征碎片离子 m/z 301 ([M-H-CH₂]⁻), 177 (^{1,4}[B-H-CH₂]⁻), 151 (^{1,3}[A-H]⁻), 125 (^{1,4}[B-H-CH₂]⁻) 及 107 (^{0,4}[A-H]⁻), 并经对照品对照及文献^[24] 比对, 鉴定其为异鼠李素 (槲皮素-3'-甲基醚)。M26 产生 m/z 为 329.066 7 ([M-H]⁻) 的准分子离子峰, 比 M25 高 14 Da, 结合其碎片离子 m/z 315 ([M-H-CH₂]⁻), 301 ([M-H-2CH₂]⁻), 165 (^{1,3}[A-H]⁻), 163 (^{1,3}[B-H-CH₂]⁻) 及 107 (^{0,4}[A-H-CH₂]⁻), 推测其为槲皮素-3',7-二甲基醚。M27 的准分子离子峰为 m/z

357.097 6 ([M-H]⁻), 比 M26 高 28 Da, 结合碎片离子 m/z 343 ([M-H-CH₂]⁻), 313 ([M-H-CH₂-OCH₂]⁻) 及 151 (^{1,3}[A-H-2CH₂]⁻), 推测其为槲皮素-3,3',4',7-四甲基醚。M28 产生准分子离子峰 m/z 411.000 9 ([M-H]⁻), 比 M23 高 96 Da、M25 高 80 Da, 结合其碎片离子 m/z 331 ([M-H-SO₃]⁻), 167 (^{1,3}[A-H]⁻) 及 131 (^{1,4}[A-H]⁻), 推测其为棉黄素-3-甲基醚-4'-硫酸酯。M29 的准分子离子峰为 m/z 653.101 4 ([M-H]⁻), 比 M23 高 352 Da, 结合其产物离子 m/z 477 ([M-H-葡萄糖醛酸基]⁻), 301 ([M-H-2 葡萄糖醛酸基]⁻) 及 149 (^{1,3}[B-H-葡萄糖醛酸基]⁻), 再通过文献^[25] 比对, 推测其为槲皮素-3',7-O-二葡萄糖醛酸苷。

讨论

近年来,作为广金钱草的主要活性成分,夏佛塔昔的药理学活性已引起广泛关注,但有关其体内代谢的研究尚为有限。Liu等^[15]对其在正常大鼠及结石大鼠体内的代谢产物进行了比较研究,为广金钱草及其活性成分夏佛塔昔的利尿排石作用提供了坚实的实验依据,但其在其他生物体内的代谢行为尚未见报道,这在一定程度上限制了人们对夏佛塔昔体内代谢的全面认识。据此,本研究利用UPLC-Q/TOF-MS/MS技术,对小鼠口服给予夏佛塔昔后的血浆、尿液、胆汁及粪便中代谢产物进行了全面的研究。本研究根据参考文献中给药方法及夏佛塔昔的代谢参数,将给药剂量设定为 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[15],采血时间设定为给药后 1 h ^[26,27],并根据仪器的灵敏度和预实验的结果,采取多剂量给药的方式,以增加代谢产物在小鼠生物基质中的累积,从而尽可能地获取夏佛塔昔代谢产物的全貌。本研究所检测到的体内代谢产物,除芹菜素、二氢芹菜素及木犀草素3个代谢产物外^[15],其他均未见报道。与已有结果相比,本研究所检测到的代谢产物大多数为黄酮苷元的I相和II相代谢产物,推测可能与给药方式不同有关。本研究所检测到的代谢产物芹菜素、木犀草素、槲皮素及异鼠李素,其药理活性均已被广泛证实,这一方面提示黄酮类化合物在体内可能存在相互转化,另一方面提示上述代谢产物可能为夏佛塔昔的体内活性成分。

黄酮类化合物在体内可发生多种代谢反应,主要包括去羟基化、去甲基化、羟基化、甲基化、葡萄糖化、葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、乙酰化等,根据这些代谢反应在质谱中形成的特征性中性损失,可鉴定代谢反应类型。与母体化合物或其他代谢物相比,代谢物形成的具有 $\pm 16\text{ Da}$ (O)、 $\pm 14\text{ Da}$ (CH_2)、 $\pm 2.0\text{ Da}$ (H_2)、 $\pm 18\text{ Da}$ (H_2O)、 $+80\text{ Da}$ (SO_3)、 $\pm 162\text{ Da}$ ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$)和 $+176\text{ Da}$ ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)等特征丢失,可能分别意味着羟基化/脱羟基化、甲基化/去甲基化、脱氢/氢化、脱水/水合、硫酸化、脱葡萄糖/葡萄糖化和葡萄糖醛酸化等代谢反应的发生^[28]。

甲基化反应形成的代谢产物极性较弱,是阻碍药物清除的代谢反应。体内儿茶酚O-甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)存在倾向于B环的C3'或C4'位羟基的甲基取代^[23],且以2:1的比例形成C3'和C4'位的甲基化反应^[29]。据此,本研究将M8、M17、M25分别推测为芹菜素-4'-甲基醚、木犀草素-3'-甲基醚、槲皮素-3'-甲基醚(异鼠李素)。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGTs)与黄酮(醇)类化合物不同位置羟基的表现亲和力和顺序为 $\text{C-3}' \geq \text{C-4}' > \text{C-7} > \text{C-3}$,其中C-3位葡萄糖醛酸化发生率很低,若5-OH是唯一游离的羟基,也有

可能结合葡萄糖醛酸基团^[30]。由于C3'和C4'位同时又是甲基化优势位点,当甲基化发生在C3'时,葡萄糖醛酸则位于C4'或者C7位;当甲基化发生在C4'时,葡萄糖醛酸则位于C3'或者C7位,因此,本研究将M9及M29分别推测为芹菜素-4'-甲基醚-7-O-葡萄糖醛酸苷及槲皮素-3',7-O-二葡萄糖醛酸苷。黄酮(醇)类化合物的硫酸化呈现出更强的位置选择性,以C-3'、C-7位为主,当C-3'位有甲基取代时,C-4'位也可能发生硫酸结合反应^[23,29,31,32],据此,本研究结合碎片离子信息将M7、M19、M28分别推测为芹菜素-7-硫酸酯、二氢木犀草素-3'-甲基醚-7-硫酸酯、棉黄素-3-甲基醚-4'-硫酸酯。另外,羟基化、乙酰化、葡萄糖化的优势位点尚未见相关报道,本研究参照甲基化、葡萄糖醛化及硫酸化的优势结合位点进行了相关推测。

一般来说,黄酮类化合物更适应于负离子模式检测。另外,实验中发现正离子模式下发现的代谢产物远少于负离子模式检测,且正离子模式下检测到的代谢产物几乎均可以在负离子模式下检测到,综合以上因素,本研究最终选择了负离子模式检测。

黄酮及其苷类化合物通常吸收入血困难,肝脏和肠道中均高度表达的各种药物代谢酶,如细胞色素P450、UGTs、磺基转移酶和COMTs等,可促进黄酮体内吸收与代谢;可通过外排转运蛋白又可将黄酮的代谢物泵入肠腔或胆汁,参与肠肝、肠道和局部再循环的三重回收。UGTs、外排转运蛋白和肠道微生物菌群/肠细胞衍生的 β -葡萄糖醛酸酶的联合作用,使得这些再循环成为可能,增加了黄酮类化合物在肠道中的停留时间^[33],从而使代谢产物在血液、胆汁、尿液及粪便等不同基质中被检测到并得到合理的解释。本研究也发现,尿液和粪便中的代谢产物较多,说明尿液和粪便是黄酮类化合物的活性代谢物的主要排泄场所,而血液和胆汁内被检测的较少,进一步提示黄酮类化合物及其代谢产物主要经尿液和粪便排泄。另外,小鼠血液量和胆汁量少,在生物基质的干扰下,能被分离分析的化合物也较少,这在一定程度上影响了本研究的代谢物的发现。

黄酮化合物通常含有多羟基,羟基位点是其在体内发生代谢转变的关键点。黄酮醇在4种基质中均能发生羟基化或者去羟基化,但黄酮类含有两个羟基或一个羟基、一个甲基时,较难发生去羟基化,一般是先去甲基化。甲基化在黄酮醇、黄酮、二氢黄酮和查尔酮的4种基质中均可发生,甲基化是延缓药物清除和提高药物脂溶性的反应。在4种基质中,黄酮母环均能发生羟基化、去羟基化,C环是双键时易被加成。但粪便内共有代谢产物包括葡萄糖化及甲基化产物;尿

液内主要包括极性较大的II相代谢产物,如葡萄糖醛酸化和硫酸酯化的代谢产物等;胆汁内不仅包括I相代谢产物,也包括II相代谢的葡萄糖化、甲基化代谢产物^[23,30,32]。

作者贡献: 汤道权、魏雅芹和王天云构思并设计了实验;魏雅芹、王天云和李雅婷进行论文的整体实验和数据分析;魏雅芹、王天云和杜岩参与体内动物实验;李雅婷、陈雨浪和廖文星参与数据分析工作;魏雅芹、杜岩和汤道权撰写并修改了论文。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2020: 46.
- [2] De Melo GO, Muzitano MF, Legora-Machado A, et al. C-Glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation [J]. *Planta Med*, 2005, 71: 362-363.
- [3] Zhou K, Wu J, Chen J, et al. Schaftoside ameliorates oxygen glucose deprivation-induced inflammation associated with the TLR4/Myd88/Drp1-related mitochondrial fission in BV2 microglia cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139: 15-22.
- [4] Kim PS, Shin JH, Jo DS, et al. Anti-melanogenic activity of schaftoside in Rhizoma *Arisaematis* by increasing autophagy in B16F1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503: 309-315.
- [5] Liu M, Liu C, Chen H, et al. Prevention of cholesterol gallstone disease by schaftoside in lithogenic diet-induced C57BL/6 mouse model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 815: 1-9.
- [6] Liu M, Zhang G, Song M, et al. Activation of farnesoid X receptor by schaftoside ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress and inflammation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33: 87-116.
- [7] Dang J, Paudel YN, Yang X, et al. Schaftoside suppresses pentylene-tetrazol-induced seizures in zebrafish *via* suppressing apoptosis, modulating inflammation, and oxidative stress [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12: 2542-2552.
- [8] Liu M, Zhang G, Wu S, et al. Schaftoside alleviates HFD-induced hepatic lipid accumulation in mice *via* upregulating farnesoid X receptor [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 255: 112776.
- [9] Liu MJ, Zhang GH, Huang XT, et al. Protection effect of schaftoside on mice with non-alcoholic fatty liver induced by high fat diet [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2017, 32: 5078-5081.
- [10] Zeng YY, Chen YT, He YY, et al. Identification of components *in vitro* and plasma of Jinhua Qinggan granules and preliminary pharmacokinetics analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 446-452.
- [11] Lou GG, Xia J, Yang J, et al. Differences in the chemical composition of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium crepidatum* Lindl based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 3331-3344.
- [12] Yin QC, Chen CC, Tian JS, et al. Analysis of serum pharmacology from Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba herb using UPLC-QE-Orbitrap-MS technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2296-2302.
- [13] Qiao S, Xu HS, Shi XW, et al. Identification of major bioactive components and their metabolites in rat plasma after oral administration of Zhikebao tablet by UHPLC-QTOF-MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1536-1544.
- [14] Wang MQ, Yu H, Liu X, et al. Profiling and characterization of the ingredients absorbed into blood and their metabolites of the *Eucommiae Cortex* extracts in rats with renal fibrosis induced by adenine based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS [J/OL]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1136-1146.
- [15] Liu R, Meng C, Zhang Z, et al. Comparative metabolism of schaftoside in healthy and calcium oxalate kidney stone rats by UHPLC-Q-TOF-MS/MS method [J]. *Anal Biochem*, 2020, 597: 113673.
- [16] Zhang L, Wang CX, Wu J, et al. Metabolic profiling of mice plasma, bile, urine and feces after oral administration of two licorice flavonones [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112892.
- [17] Shi PF. Studies on Mass Spectrometric Fragmentation Patterns of Four Categories of Compounds in TCMs and Pharmacokinetics of QI-SHEN-YI-QI (中药四类成分质谱裂解规律及芪参益气方药代动力学研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [18] Zhang YF. A Methodological Study on the Identification of Chemical Compounds in Herbs by LC/MS Technologies (基于液质联用技术的中药化学成分鉴定方法学研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [19] Guaouguaou FE, Ahl Bebaha MA, Yadlapalli S, et al. Structural characterization of bioactive compounds in *Cotula cinerea* extracts by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and high-resolution time-of-flight mass spectrometry detectors [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2020, 34: e8695.
- [20] Wu J, Zhong QQ, Wang TY, et al. MS-based metabolite analysis of two licorice chalcones in mice plasma, bile, feces, and urine after oral administration [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35: e4998.
- [21] Chen F, Li HL, Tan YF, et al. Identification of known chemicals and their metabolites from *Alpinia oxyphylla* fruit extract in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with selected reaction monitoring [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 97: 166-177.
- [22] Śliwka-Kaszyńska M, Anusiewicz I, Skurski P. The mechanism of a Retro-Diels-Alder fragmentation of luteolin: theoretical studies supported by electrospray ionization tandem mass spec-

- trometry results [J]. *Molecules*, 2022, 27: 1032.
- [23] van der Woude H, Boersma MG, Vervoort J, et al. Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II *in vitro* model systems [J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17: 1520-1530.
- [24] Ren X, Bao Y, Zhu Y, et al. Isorhamnetin, hspidulin, and cirsimaritin identified in *Tamarix ramosissima* barks from Southern Xinjiang and their antioxidant and antimicrobial activities [J]. *Molecules*, 2019, 24: 390.
- [25] Du LY, Tao JH, Jiang S, et al. Metabolic profiles of the Flos *Abelmoschus manihot* extract by intestinal bacteria from the normal and CKD model rats based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31: e3795.
- [26] Sun D, Dong L, Guo P, et al. Simultaneous determination of four flavonoids and one phenolic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of the Herba *Desmodii Styracifolii* extract [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 932: 66-73.
- [27] Xiong F, Wang H, Jiang Z, et al. Integrated pharmacokinetics and biodistribution of multiple flavonoid C-glycosides components in rat after oral administration of *Abrus mollis* extract and correlations with bio-effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 163: 290-296.
- [28] Dong SQ, Fan HR, Li QS, et al. *In vivo* metabolic pathway of liquiritin in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2014, 45: 2499-2505.
- [29] Morand C, Manach C, Crespy V, et al. Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model [J]. *Biofactors*, 2000, 12: 169-174.
- [30] Day AJ, Bao Y, Morgan MR, et al. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29: 1234-1243.
- [31] Geng P. Study of Mass Spectrometry Assay for the Analysis of Chemical Structures and Metabolomics Profiling of Bioactive Extract of Flavonols (黄酮醇类活性提取物整体代谢轮廓及结构分析的质谱方法研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2007.
- [32] Yang L. Studies on the Metabolites of Four Kinds Flavonoids in Blood (四种黄酮类成分的血中代谢产物研究) [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2007.
- [33] Xiao J, Mao F, Yang F, et al. Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55: 1637-1645.