

# UHPLC-QTOF-MS 法分析鉴定吴茱萸水提物在大鼠血浆、尿液和粪便中的原形成分及其代谢产物

程宇欣<sup>1,2</sup>, 陈两绵<sup>2</sup>, 王智民<sup>2</sup>, 张启伟<sup>2</sup>, 闫利华<sup>2\*</sup>, 赵正保<sup>1\*</sup>

(1. 山西医科大学, 山西 太原 030001; 2. 中国中医科学院中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室/国家中医药管理局中药过程控制技术重点研究室, 北京 100700)

**摘要:** 采用 UHPLC-QTOF-MS 技术, 对吴茱萸水提物的主要成分及给药后大鼠体内的原形成分及其代谢产物进行定性分析。通过分析各成分的保留时间、精确分子质量、一级、二级质谱信息并与相应的对照品比对, 从吴茱萸水提物中鉴定了 27 个成分, 其中 25 个成分经对照品确证; 从灌胃给予吴茱萸水提物的大鼠血浆、尿液和粪便中鉴定、推测出 16 个原形成分和 35 个代谢产物, 16 个原形成分均经对照品确证。吴茱萸水提物的主要成分有酚酸、黄酮苷、柠檬苦素和生物碱。生物碱、黄酮和酚酸存在于血浆、尿液和粪便中, 柠檬苦素主要存在于尿液和粪便中。这些成分在大鼠体内代谢的主要途径有羟基化、氢化、甲基化、硫酸化、葡糖醛酸化等。该研究基本明确了吴茱萸水提物中各类成分在大鼠体内的主要存在形式, 为吴茱萸体内药效物质的阐明提供了参考。

**关键词:** 吴茱萸; 水提物; 原形成分; 代谢产物; 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1157-08

## Analysis of major bioactive components and their metabolites in rats' plasma, urine and feces after oral administration of the aqueous extract of *Euodiae Fructus* by UHPLC-QTOF-MS

CHENG Yu-xin<sup>1,2</sup>, CHEN Liang-mian<sup>2</sup>, WANG Zhi-min<sup>2</sup>, ZHANG Qi-wei<sup>2</sup>,  
YAN Li-hua<sup>2\*</sup>, ZHAO Zheng-bao<sup>1\*</sup>

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences; National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines; Key Laboratory of SATCM for Process Analysis Technology of Chinese Herbal Medicines, Beijing 100700, China)

**Abstract:** An ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS) method has been established to analyze the bioactive components of the aqueous extract of *Euodiae Fructus* and detect the metabolites in rats after oral administration of the aqueous extract. Compounds were detected by analyzing their retention times, high resolution mass data, mass spectra and comparing with the reference substances. As a result, 27 compounds were characterized from the aqueous extract of *Euodiae Fructus*, and 25 compounds were identified on the basis of the reference substances. 16 parent compounds and 35 metabolites were detected in rats' plasma, urine and feces samples, and all of the parent compounds were determined unambiguously through comparison with the reference substances. Four classes of compounds were identified from the aqueous extract of *Euodiae Fructus*, including phenolic acids, limonins, flavonoid glycosides

收稿日期: 2017-01-09; 修回日期: 2017-03-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31200244); 中医药行业科研专项资助项目 (201507002-3).

\*通讯作者 E-mail: yanlihua2829@163.com; zhengbao\_z@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0038

and alkaloids. Phenolic acids, flavonoid glycosides and alkaloids were detected in rats' plasma, urine and feces, while limonins were detected in the urine and feces. The main metabolism pathways of these compounds in rats might include hydroxyl, hydrogenation, methylation, sulfating, glucuronidation, and so on. The results of this study provide references in the material basis of *Euodia Fructus in vivo*.

**Key words:** *Euodia Fructus*; aqueous extract; parent compound; metabolite; UHPLC-QTOF-MS

吴茱萸为传统中药, 来源于芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实<sup>[1]</sup>。其性味辛、苦, 性热, 具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泄等功效<sup>[2]</sup>。含吴茱萸的中医方剂及成方制剂很多, 如吴茱萸汤、温经汤、萆铃胃痛颗粒、泻痢消胶囊、胃立康片、肠康片、调经活血片、左金丸、戊己丸等<sup>[1]</sup>。可见, 汤剂(水提物)为吴茱萸中医临床中最常用的剂型。大量文献也证实吴茱萸水提物具有镇痛、抗炎、抗溃疡、止呕、止泻等药理作用<sup>[3,4]</sup>。虽然国内外学者对吴茱萸的化学成分及其生物活性进行了广泛深入的研究, 从中分离得到生物碱(吲哚类和喹诺酮类)<sup>[5,6]</sup>、柠檬苦素<sup>[7]</sup>、黄酮<sup>[8]</sup>、酚酸<sup>[9]</sup>等多种类型的化合物, 但吴茱萸体内发挥药效的化学成分及其体内过程仍不清楚。

研究中药在体内的代谢产物对阐明中药体内药效物质基础和作用机制发挥着重要作用。2015版《中国药典》以吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素作为吴茱萸药材及饮片质量控制的指标成分。目前, 对吴茱萸代谢产物的研究大多局限于吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素等单体成分, 包括经肝微粒体体外代谢<sup>[10,11]</sup>和实验动物灌胃或静脉注射后<sup>[12-15]</sup>体内代谢产物的分析。关于提取物给药后体内的代谢研究较少, 仅有少量关于醇提物<sup>[16-18]</sup>的报道, 且表征的成分仅局限于生物碱。本课题组研究表明吴茱萸水提物中存在大量的酚酸类和黄酮苷类成分<sup>[19]</sup>, 提示酚酸和黄酮类成分也对吴茱萸药效作用有贡献, 但是至今尚无关于吴茱萸中该两类成分体内代谢的报道。

本实验采用 UHPLC-QTOF-MS 法, 首先对吴茱萸水提物中的主要化学成分进行鉴定, 在此基础上对吴茱萸水提物经大鼠灌胃后的体内成分进行全面分析。从吴茱萸水提物中共鉴定了 27 个化合物, 其中 25 个成分经对照品指认; 在灌胃给予吴茱萸水提物的大鼠血浆、尿液和粪便中共鉴定、推测出 16 个原形成分和 35 个代谢产物。研究结果为阐明吴茱萸体内药效物质基础、完善吴茱萸及其制剂的质量标准、提高其临床疗效提供了科学依据。

## 材料与方法

**仪器** 美国 Waters Acquity UPLC/Xevo G2-S QTOF 系统, 包括 Xevo G2-S QTOF 质谱和 Acquity 超高效液相系统; BSA124S-CW 型万分之一电子分析天平(北京塞多利斯科学仪器有限公司); 高速离心机(Sigma Laborzentrifugen GmbH); 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); 手动移液器(德国艾本德股份公司)。

**药品与试剂** 吴茱萸药材于 2015 年 8 月采自江西樟树吴城乡, 经中国中医科学院中药研究所闫利华副研究员鉴定为芸香科植物石虎 [*Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang] 的干燥近成熟果实。样品标本(凭证号 WZY-JXZS-2015)保存于中国中医科学院中药研究所。对照品异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-半乳糖苷 (2)、异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷 (3)、去氢吴茱萸碱 (4)、<sup>14</sup>N-甲酰二氢吴茱萸次碱 (5)、7 $\beta$ -羟基吴茱萸次碱 (6)、吴茱萸碱 (8)、吴茱萸次碱 (9)、1-甲基-2-正壬基-4(1*H*)-喹诺酮 (10)、1-甲基-2-[(*Z*)-6-十一烯基]-4(1*H*)-喹诺酮 (11)、1-甲基-2-正十一烷基-4(1*H*)-喹诺酮 (12)、吴茱萸卡品碱 (13)、1-甲基-2-[(6*Z*, 9*Z*)-6,9-十五二烯]-4(1*H*)-喹诺酮 (14)、二氢吴茱萸卡品碱 (15)、1-甲基-2-[(*Z*)-10-十五烯基]-4(1*H*)-喹诺酮 (16)、松柏苷 (21)、异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-木糖-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (23)、柠檬黄素-3-*O*- $\beta$ -D-芸香糖苷 (24) 和异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (25) 均为实验室自制, 纯度均大于 95%。金丝桃苷 (1) (批号 111521-201004)、柠檬苦素 (7) (批号 110800-200404)、绿原酸 (18) (批号 110753-200413)、咖啡酸 (19) (批号 110885-200102) 购自中国食品药品检定研究院。新绿原酸 (17) (批号 X-014-140801) 和隐绿原酸 (20) (批号 Y-067-14080) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 芦丁 (22) (批号 Y22S653719) 购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均大于 98%。化学纯羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、肝素钠、水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司; 色谱纯乙腈、质谱纯甲酸(Fisher公司); 娃哈哈纯净水(娃哈哈宏振有限公司)。

**实验动物** SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 180~200 g, 由中国食品药品检定研究院提供, 合格证号: SCXK

(京) 2014-0013。大鼠适应性喂养 5 天后开始实验, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

**吴茱萸水提取物及供试品溶液的制备** 吴茱萸药材 50 g, 粉碎, 依次用 15 倍量、10 倍量和 10 倍量的去离子水回流提取 3 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液, 45 °C 减压浓缩至约 200 mL, 再冷冻干燥, 得水提物粉末 22.04 g (提取率 44.08%)。

取上述水提物粉末 0.25 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶, 50% 甲醇溶解定容, 即得供试品溶液。进样前 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 进样体积 1 μL。

**对照品溶液制备** 分别精密称取对照品适量, 加甲醇溶解定容, 制成适宜浓度的混合对照品溶液。进样前 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 进样体积 1 μL。

**色谱条件** 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C18 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.1% 甲酸/水 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 6% A; 3~4 min, 6%~10% A; 4~7 min, 10%~12% A; 7~8 min, 12%~14% A; 8~13 min, 14%~15% A; 13~15 min, 15%~20% A; 15~18 min, 20%~30% A; 18~21 min, 30%~49% A; 21~25 min, 49%~51% A; 25~27 min, 51%~73% A; 27~30 min, 73%~80% A; 30~31 min, 80%~100% A; 31~32 min, 100% A。流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C。

**质谱条件** 电喷雾离子源 (ESI); 正负离子扫描模式测定; 离子源温度 120 °C; 毛细管电压 1.8 kV; 锥孔电压 40 V, 去溶剂温度 500 °C; 去溶剂氮气流量 700 L·h<sup>-1</sup>; 锥孔气流量 50 L·h<sup>-1</sup>; 质量扫描范围 *m/z* 100~1 200。

**实验动物分组** 6 只 SD 雄性大鼠, 体重 (200~210) g, 随机分为 2 组, 每组 3 只。给药组给予吴茱萸水提物粉末 2.2 g·kg<sup>-1</sup> (相当于生药量 5 g·kg<sup>-1</sup>, 溶于提前制备好的 CMC-Na 溶液中, 每只灌胃量 3 mL) 灌胃 3 天, 每天 1 次。空白组灌胃给予等量的 CMC-Na 溶液。

**尿液和粪便样品的采集** 大鼠给药后置于代谢笼中, 自由饮水, 6 h 后给予食物, 分别收集 0~24 h 时间段的尿液和粪便。尿液收集后随即加入 1 倍量甲醇, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后取上清液, -20 °C 暂时保存。粪样低于 50 °C 烘干。

**血浆样品的采集** 末次给药后 0.5、1、1.5、2.5 和 4 h 分别由眼眶静脉丛取血, 每次约 1 mL, 将血样收集于肝素化的 EP 管中, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上层血浆转移至另一 EP 管中, 置于 -20 °C 暂时保存。

## 生物样品处理

**尿液处理** 将大鼠各时间段的尿液合并, 共计约 48 mL (含等体积甲醇), 40 °C 减压浓缩, 称重 3.96 g, 加入甲醇 20 mL 超声提取 30 min, 提取液 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后取上清液, 40 °C 减压浓缩, 加甲醇 6 mL 复溶, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取 1 μL 进行 UHPLC-MS 分析。

**粪便处理** 将干燥的粪样研碎混匀, 取 8 g 加入甲醇 40 mL 超声提取 3 次, 每次 30 min, 合并提取液, 40 °C 减压浓缩至干, 加甲醇 5 mL 复溶, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取 1 μL 进行 UHPLC-MS 分析。

**血浆处理** 将大鼠各时间点的血浆混合, 约 7 mL, 加入 5 倍量甲醇, 涡旋混匀, 超声 30 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后取上清液, 40 °C 减压浓缩至干, 加甲醇 1.5 mL 复溶, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取 3 μL 进行 UHPLC-MS 分析。

**数据处理** 应用 MassLynx V4.1 软件, 根据测得的精确相对分子质量, 在规定误差范围内 (±3.0 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 吴茱萸水提取物中主要成分的定性及定量分析

应用 UHPLC-QTOF-MS 技术在上述色谱和质谱条件下对供试品溶液和对照品溶液进行分析, 根据各主要色谱峰的一级、二级质谱信息及保留时间, 结合 25 个对照品的质谱、色谱行为, 表征了吴茱萸水提取物中的 27 个化合物, 结果见表 1, 包括生物碱 12 个、黄酮 7 个、酚酸 5 个、柠檬苦素 3 个。

吴茱萸水提取物的 UHPLC 色谱图 (254 nm) 见图 1。峰 7 ( $\lambda_{\max}$  为 190 nm)、峰 10、11 ( $\lambda_{\max}$  为 320 nm) 在 254 nm 下检测不到, 峰 14、16、21、22、23 则由于含量太低检测不出, 采用外标法<sup>[20]</sup>分别在 254、320 和 215 nm 下对吴茱萸水提取物中的 20 个成分进行定量,

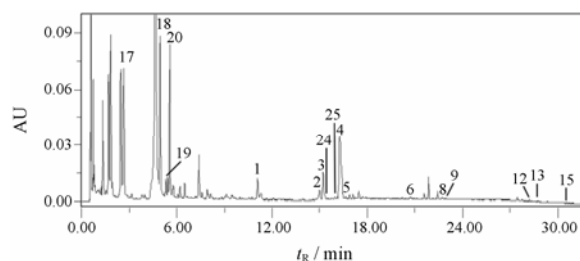


Figure 1 UV chromatogram (254 nm) of the aqueous extract of Euodiae Fructus. The peak numbers listed in Table 1

**Table 1** MS and MS<sup>2</sup> data of the identified compounds *in vitro* and metabolites *in vivo*. W: Aqueous extract; P: Plasma; U: Urine; F: Feces; GlcUA: Glucuronidation

No.	<i>t<sub>R</sub></i> /min	Formula	Measured <i>m/z</i>	Predicted <i>m/z</i>	Error/ppm	Ion mode	Source	Metabolite name	MS <sup>2</sup> fragment ( <i>m/z</i> )
1	10.59	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.088 8	463.087 7	2.4	[M-H] <sup>-</sup>	W, F	Hyperin	301.033 4, 271.027 6, 255.032 9, 243.032 7
2	14.18	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	477.104 6	477.103 3	2.7	[M-H] <sup>-</sup>	W, U	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -galactoside	315.048 8, 271.027 6, 243.033 1
3	14.50	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	623.160 1	623.161 2	-1.8	[M-H] <sup>-</sup>	W, U	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside	315.050 5, 285.040 3
4	16.22	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O	302.130 2	302.129 3	3.0	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	Dehydroevodiamine	286.097 7, 258.101 8, 272.082 5
5	16.77	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	318.123 5	318.124 3	-2.5	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	<sup>14</sup> N-Formyldihydrorutaecarpine	171.116 0, 144.085 6
6	21.08	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	304.108 0	304.108 6	-2.0	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	7β-Hydroxyrutaecarpine	286.097 6, 257.095 4, 167.060 0
7	21.44	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	471.202 0	471.201 9	2.1	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	Limonin	425.196 2
8	22.41	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	304.144 7	304.145 0	-1.0	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	Evodiamine	171.092 8, 144.081 8, 134.061 3, 161.072 1
9	22.66	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O	288.113 5	288.113 7	-0.7	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	Rutaecarpine	273.091 1, 244.088 2, 169.076 8
10	25.50	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO	286.216 9	286.217 1	-0.7	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	1-Methyl-2-nonyl-4(1 <i>H</i> )-quinolone	173.083 5, 186.091 3, 159.066 7, 144.080 7
11	26.97	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> NO	312.232 1	312.232 7	-1.9	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	1-Methyl-2-[( <i>Z</i> )-6-undecyl]-4(1 <i>H</i> )-quinolone	173.083 5, 186.091 6, 159.067 5, 144.080 7
12	28.32	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> NO	314.247 8	314.248 4	-1.9	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	1-Methyl-2-undecyl-4(1 <i>H</i> )-quinolone	173.084 2, 186.091 8, 159.067 3, 144.081 0
13	28.74	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> NO	340.264 0	340.264 0	0.0	[M+H] <sup>+</sup>	W, P, F	Evocarpine	173.088 0, 186.096 3, 159.071 8
14	29.29	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> NO	366.279 4	366.279 7	-0.8	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	1-Methyl-2-[(6 <i>Z</i> , 9 <i>Z</i> )-6, 9-pentadecenyl]-4(1 <i>H</i> )-quinolone	173.098 1, 186.106 3
15	30.08	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> NO	342.279 0	342.279 7	-2.0	[M+H] <sup>+</sup>	W, P, F	Dihydroevocarpine	173.084 2, 186.091 7, 159.067 1, 144.080 8
16	30.39	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> NO	368.294 4	368.295 3	-2.4	[M+H] <sup>+</sup>	W, F	1-Methyl-2-[( <i>Z</i> )-10-pentadecenyl]-4(1 <i>H</i> )-quinolone	173.098 1, 186.106 6
17	2.54	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.087 4	353.087 3	0.2	[M-H] <sup>-</sup>	W	Neochlorogenic acid	191.055 5, 179.034 2, 135.044 4
18	4.98	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.087 5	353.087 3	0.6	[M-H] <sup>-</sup>	W	Chlorogenic acid	191.056 0, 179.034 5, 135.044 6
19	5.20	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179.034 5	179.034 4	0.6	[M-H] <sup>-</sup>	W	Caffeic acid	135.043 9, 177.018 0, 179.033 5
20	5.49	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.087 2	353.087 3	-0.3	[M-H] <sup>-</sup>	W	Cryptochlorogenic acid	179.034 5, 191.055 5, 135.044 5
21	6.07	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	341.333 3	341.333 1	0.6	[M-H] <sup>-</sup>	W	Coniferin	179.084 7
22	10.29	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	609.145 6	609.145 6	0.0	[M-H] <sup>-</sup>	W	Rutin	301.033 8
23	10.81	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	609.145 5	609.145 6	0.2	[M-H] <sup>-</sup>	W	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xylopyranosyl-(1→2)-β- <i>D</i> -glucopyranoside	315.033 3
24	14.69	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>17</sub>	653.171 3	653.171 8	-0.3	[M-H] <sup>-</sup>	W	Limocitrin 3- <i>O</i> -rutinoside	345.060 2, 330.037 0, 329.029 6
25	14.96	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	477.103 2	477.103 3	-0.2	[M-H] <sup>-</sup>	W	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	315.047 8, 271.028 0, 243.033 3
26	20.91	C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub>	487.197 1	487.196 8	0.6	[M+H] <sup>+</sup>	W	Rutaevine	441.192 4
27	21.81	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>9</sub>	485.180 4	485.181 2	-1.7	[M+H] <sup>+</sup>	W	Evodol	439.175 7
M1	5.33	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> S	273.006 8	273.006 9	-0.4	[M-H] <sup>-</sup>	P	Methylation and sulfation of <b>19</b>	245.027 3, 193.052 4, 135.102 9
M2	5.81	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	512.167 4	512.166 9	1.0	[M+H] <sup>+</sup>	P, U	Dihydroxylation and GlcUA of <b>8</b>	336.134 2, 304.105 3, 171.076 1, 134.095 1
M3	6.84	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	207.065 1	207.065 7	-2.9	[M-H] <sup>-</sup>	F	Dimethylation of <b>19</b>	193.056 2, 179.040 3
M4	6.90	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	510.151 9	510.151 3	1.2	[M+H] <sup>+</sup>	P	Dihydroxylation and GlcUA of <b>4</b>	334.115 3, 316.108 4, 302.147 6
M5	7.24	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	512.165 9	512.166 9	-2.0	[M+H] <sup>+</sup>	U	Dihydroxylation and GlcUA of <b>8</b>	336.134 6, 304.106 0, 161.070 2, 144.044 2
M6	7.77	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	367.103 1	367.102 9	0.5	[M-H] <sup>-</sup>	U	Methylation of <b>18</b>	193.058 6, 191.056 0
M7	9.01	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	336.134 1	336.134 8	-2.1	[M+H] <sup>+</sup>	U	Hydrogenation and dihydroxylation of <b>4</b>	318.123 7, 302.091 7
M8	9.08	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> O <sub>8</sub>	343.139 4	343.139 3	0.3	[M-H] <sup>-</sup>	U	Hydrogenation of <b>21</b>	181.047 8
M9	9.34	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	336.134 2	336.134 8	-1.8	[M+H] <sup>+</sup>	U	Dihydroxylation of <b>8</b>	320.102 1, 171.115 2, 161.058 8
M10	10.56	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	334.118 3	334.119 2	-2.7	[M+H] <sup>+</sup>	P, U, F	Dihydroxylation of <b>4</b>	318.123 8, 302.092 3, 272.082 5
M11	10.99	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	334.118 8	334.119 2	-1.2	[M+H] <sup>+</sup>	F	Dihydroxylation of <b>4</b>	318.087 5, 302.092 3
M12	11.26	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	494.156 0	494.156 3	-0.6	[M+H] <sup>+</sup>	U	GlcUA of <b>5</b>	302.091 8, 286.105 9
M13	14.04	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	322.119 0	322.119 2	-0.6	[M+H] <sup>+</sup>	P	Hydrogenation and dihydroxylation of <b>9</b>	288.205 4

Continued

No.	$t_R$ / min	Formula	Measured $m/z$	Predicted $m/z$	Error/ ppm	Ion mode	Source	Metabolite name	MS <sup>2</sup> fragment ( $m/z$ )
M14	14.16	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	316.108 2	316.108 6	-1.3	[M+H] <sup>+</sup>	F	Dehydrogenation of <b>5</b>	273.088 9, 244.087 0
M15	14.21	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	318.124 1	318.124 3	-0.6	[M+H] <sup>+</sup>	F	Hydroxylation of <b>4</b>	302.092 1, 286.096 6, 272.082 3
M16	15.20	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	398.065 4	398.095 4	-3.0	[M-H] <sup>-</sup>	F	Hydroxylation and sulfation of <b>4</b>	318.123 5, 302.092 4
M17	15.40	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	320.138 9	320.139 9	-2.8	[M+H] <sup>+</sup>	F	Hydrogenation and hydroxylation of <b>4</b>	302.092 1, 286.097 2, 272.081 4
M18	16.70	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	318.123 5	318.124 3	-2.5	[M+H] <sup>+</sup>	F	Hydroxylation of <b>4</b>	302.128 8, 286.096 8, 272.081 9
M19	17.22	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O	288.159 7	288.160 0	-1.0	[M+H] <sup>+</sup>	P, U, F	Demethylation, depentamethylation and dihydroxylation of <b>13</b>	270.149 1, 186.091 4, 173.083 7
M20	17.46	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	480.139 9	480.140 7	-1.7	[M+H] <sup>+</sup>	U	Hydroxylation and GlcUA of <b>9</b>	304.107 7, 288.160 1
M21	17.61	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	496.171 4	496.172 0	-1.2	[M+H] <sup>+</sup>	P, U	Hydroxylation and GlcUA of <b>8</b>	320.139 0, 304.101 0, 161.061 5, 134.059 6
M22	18.10	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	480.139 9	480.140 7	-1.7	[M+H] <sup>+</sup>	U	Hydroxylation and GlcUA of <b>9</b>	304.108 1, 244.129 9
M23	18.15	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>9</sub>	485.181 9	485.181 2	1.4	[M-H] <sup>-</sup>	F	Hydroxylation of <b>7</b>	469.279 9, 229.143 9
M24	18.22	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	320.103 1	320.103 5	-1.2	[M+H] <sup>+</sup>	F	Demethylation and dihydroxylation of <b>4</b>	302.092 7, 286.096 4
M25	18.62	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> O <sub>9</sub>	489.213 3	489.215 2	1.6	[M-H] <sup>-</sup>	U	Dihydrogenation and hydroxylation of <b>7</b>	453.126 1
M26	18.97	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O	302.175 1	302.175 6	-1.7	[M+H] <sup>+</sup>	F	Dehydrogenation, demethylation and dihydroxylation of <b>10</b>	284.164 2, 186.091 3, 173.082 0
M27	19.11	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	480.140 5	480.140 7	-0.4	[M+H] <sup>+</sup>	U	Hydroxylation and GlcUA of <b>9</b>	304.108 4, 244.130 9
M28	19.36	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>9</sub>	485.180 9	485.181 2	-0.6	[M-H] <sup>-</sup>	F	Hydroxylation of <b>7</b>	469.282 2, 229.143 9
M29	19.69	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	320.102 9	320.103 5	-1.9	[M+H] <sup>+</sup>	F	Demethylation and dihydroxylation of <b>4</b>	302.093 6, 286.096 0
M30	19.97	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	320.139 3	320.139 9	-1.9	[M+H] <sup>+</sup>	U, F	Hydroxylation of <b>8</b>	304.107 8, 171.116 0, 161.071 0
M31	20.16	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O	346.237 7	346.238 2	-1.4	[M+H] <sup>+</sup>	F	Dihydroxylation of <b>12</b>	328.226 9, 186.091 3, 173.084 0
M32	20.35	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	304.108 0	304.108 6	-2.0	[M+H] <sup>+</sup>	U, F	Hydroxylation of <b>9</b>	288.077 2
M33	23.09	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O	372.253 1	372.253 9	-2.1	[M+H] <sup>+</sup>	F	Dihydroxylation of <b>13</b>	354.242 3, 340.253 8, 186.091 2, 173.083 6
M34	23.33	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> NO	396.253 9	396.253 9	0.0	[M+H] <sup>+</sup>	P	Dehydrogenation and dihydroxylation of <b>14</b>	378.243 9, 186.091 7, 173.083 5
M35	27.85	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>2</sub>	356.258 6	356.259 0	-1.1	[M+H] <sup>+</sup>	F	Hydroxylation of <b>13</b>	340.263 6, 186.091 3, 173.131 2

含量分别是 0.550 (1)、0.550 (2)、1.198 (3)、2.620 (4)、0.147 (5)、0.052 (6)、13.007 (7)、0.212 (8)、0.064 (9)、0.054 (10)、0.040 (11)、0.058 (12)、0.101 (13)、0.062 (15)、7.356 (17)、6.103 (18)、5.637 (19)、8.347 (20)、0.055 (24) 和 0.055 mg·g<sup>-1</sup> (25)。

## 2 给药血浆、尿液、粪便的 UHPLC-QTOF-MS 分析

采用 MassLynx V4.1 分别对空白血浆、尿液、粪便和给药血浆、尿液、粪便样品的 UHPLC-QTOF-MS 数据进行分析, 通过与已知对照品比对保留时间、准确分子质量、碎片离子来确定原形成分。利用高分辨质谱数据及其误差值、保留时间、原形成分的裂解规律及文献数据进行代谢产物推测。最终从大鼠血浆、尿液和粪便样品中分析鉴定出 16 个原形成分和 35 个可能的代谢产物 (表 1)。

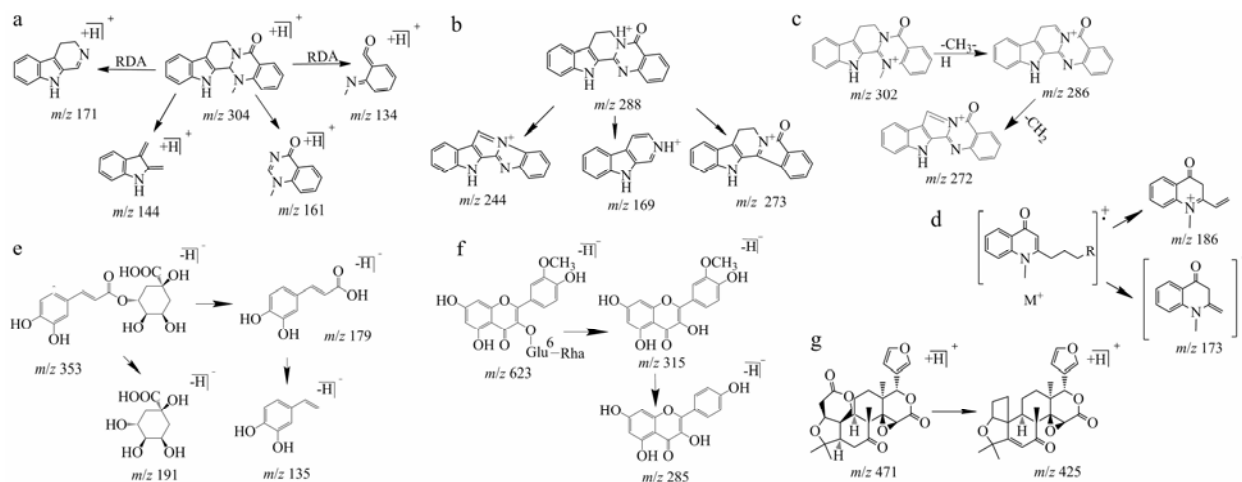
### 2.1 原形成分的鉴定

从给药血浆、尿液和粪便样本中检测到 16 个原形成分 (表 1 中 1~16), 包括 12 个生物碱 (4~6, 8~16), 3 个黄酮苷 (1~3) 和 1 个柠檬苦素 (7)。其中,

血浆中检测到 2 个喹诺酮类生物碱; 尿液中检测到 2 个黄酮苷; 粪便中检测到 12 个生物碱, 1 个黄酮苷和 1 个柠檬苦素。16 个原形成分都经过对照品确证。

**2.1.1 生物碱类成分质谱裂解规律分析** 生物样本中共检测到 12 个生物碱原形, 分为吲哚和喹诺酮两类, 在质谱中均表现为[M+H]<sup>+</sup>。吴茱萸碱发生 RDA 裂解产生特征碎片离子  $m/z$  171 和  $m/z$  134, 另外, 会出现特征碎片离子  $m/z$  144 和  $m/z$  161。吴茱萸次碱的主要碎片离子为  $m/z$  169、 $m/z$  273 和  $m/z$  244<sup>[21, 22]</sup>。去氢吴茱萸碱脱去一个 CH<sub>3</sub> 和一个 H 后, 形成稳定的共轭体系, 产生特征碎片离子  $m/z$  286<sup>[22]</sup>。喹诺酮类生物碱的母核结构相同, 差异仅在侧链的碳数及双键位置,  $m/z$  186 和  $m/z$  173 是其特征碎片离子<sup>[7]</sup>。代表性生物碱裂解规律如图 2 a~d 所示。

**2.1.2 酚酸类成分质谱裂解规律分析** 以绿原酸 (18) 为例, 负离子模式一级质谱中显示准分子离子峰  $m/z$  353 ([M-H]<sup>-</sup>), 在二级质谱 (MS<sup>2</sup>) 中显示主要的碎片离子有经酯键水解后的奎宁酸负离子  $m/z$  191 和咖啡



**Figure 2** Possible fragmentation pathway of evodiamine (a), rutacarpine (b), dehydroevodiamine (c), quinolone alkaloids (d), chlorogenic acid (e), isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (f) and limonin (g)

酸 (19) 负离子  $m/z$  179, 咖啡酸继续失  $\text{CO}_2$  后形成碎片离子  $m/z$  135<sup>[23]</sup>。裂解规律如图 2e 所示。

**2.1.3 黄酮苷类成分质谱裂解规律分析** 生物样本中共检测到 3 个黄酮苷原形, 此类化合物在负离子模式下响应较好, 有相同的裂解规律。以异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷 (3) 为例, 在质谱中表现为糖苷键断裂, 形成  $m/z$  315 ( $[\text{M}-\text{H}-\text{Rha}-\text{Glu}]^-$ ) 的异鼠李素苷元碎片离子。在异鼠李素苷元中, 其甲氧基容易发生断裂, 形成失去 30 Da 的碎片离子  $m/z$  285。裂解规律如图 2f 所示。

**2.1.4 柠檬苦素类成分质谱裂解规律分析** 生物样本中检测到 1 个柠檬苦素原形, 以柠檬苦素 (7) 为例, 其正离子模式一级质谱中显示  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  471, 在  $\text{MS}^2$  中显示  $m/z$  425 ( $[\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{O}_6]^+$ ) 的基峰特征碎片离子, 裂解规律如图 2g 所示。在负离子模式一级质谱中显示  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的准分子离子峰  $m/z$  469, 在  $\text{MS}^2$  中显示特征碎片  $m/z$  229<sup>[7, 21, 22, 24]</sup>。

**2.2 代谢产物的分析**

从给药血浆、尿液和粪便中共检测到 35 个代谢产物 (表 1 中 M1~M35), 包括 28 个生物碱, 4 个酚酸和 3 个柠檬苦素。其中, 血浆中检测到 7 个生物碱, 和 1 个酚酸; 尿液中检测到 13 个生物碱、2 个酚酸和 1 个柠檬苦素; 粪便中检测到 16 个生物碱、1 个酚酸和 2 个柠檬苦素。

**2.2.1 生物碱类代谢产物分析** M18 的准分子离子峰为  $m/z$  318.123 5 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$ ), 比去氢吴茱萸碱  $[\text{M}+\text{H}]^+$  多 16 Da, 其特征碎片离子为  $m/z$  286.096 8、258.101 1、272.081 9, 与去氢吴茱萸碱的碎片离子一致, 因此推测 M18 为去氢吴茱萸碱羟基化产物。M9 的准分子离子峰为  $m/z$  336.134 2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$ ),

比吴茱萸碱  $[\text{M}+\text{H}]^+$  多 32 Da, 其失去 1 个羟基形成碎片离子  $m/z$  320.102 1, 此外, 特征碎片离子  $m/z$  171.115 2 和 161.058 8 与吴茱萸碱一致, 因此推测 M9 为吴茱萸碱双羟基化产物。同理, M15 为羟基去氢吴茱萸碱, 和 M18 互为同分异构体; M10 和 M11 为双羟基去氢吴茱萸碱, 二者互为同分异构体; M29 为双羟基吴茱萸次碱; M30 为羟基吴茱萸碱; M32 为羟基吴茱萸次碱。

M17 的准分子离子峰为  $m/z$  320.138 9 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ ), 比去氢吴茱萸碱多 2 个 H 原子和 1 个 O 原子, 特征离子碎片为  $m/z$  302.092 1、286.097 2 和 272.081 4, 与去氢吴茱萸碱一致, 因此推测 M17 为去氢吴茱萸碱氢化并羟基化产物。M7 和 M13 的准分子离子峰分别为  $m/z$  336.134 1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$ ) 和  $m/z$  322.119 0 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$ ), 分别比去氢吴茱萸碱和吴茱萸次碱多 2 个 H 和 2 个 O, 其余二级碎片和对应生物碱一致, 因此 M7 和 M13 分别为去氢吴茱萸碱和吴茱萸次碱的氢化并双羟基化产物。M14 的准分子离子峰为  $m/z$  316.108 2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$ ), 比  $^{14}\text{N}$ -甲酰二氢吴茱萸次碱少 2 个 H, 其余二级碎片和  $^{14}\text{N}$ -甲酰二氢吴茱萸次碱一致, 因此推测 M14 为去氢  $^{14}\text{N}$ -甲酰二氢吴茱萸次碱。M16 的准分子离子峰为  $m/z$  398.065 4 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ ), 比去氢吴茱萸碱多 1 个 O 和 1 个  $\text{SO}_3$  基团, 因此 M16 为羟基并硫酸化去氢吴茱萸碱。M24 的准分子离子峰为  $m/z$  320.103 1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$ ), 比去氢吴茱萸碱多 2 个 O 并少 1 个  $\text{CH}_2$  基团, 因此 M24 为双羟基去甲去氢吴茱萸碱。

M33 的准分子离子峰为  $m/z$  372.253 1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{NO}_3$ ), 比吴茱萸卡品碱多 2 个 O, 因此 M33 为

双羟基吴茱萸卡品碱。同理, M31、M34和M35分别为双羟基 1-甲基-2-正十一烷基-4(1*H*)-喹诺酮、双羟基去氢 1-甲基-2-[(6*Z*,9*Z*)-6,9-十五二烯基]-4(1*H*)-喹诺酮和羟基吴茱萸卡品碱。M26的准分子离子峰为  $m/z$  302.175 1 ( $[M+H]^+$ ,  $C_{18}H_{24}NO_3$ ), 比1-甲基-2-正壬基-4(1*H*)-喹诺酮多2个O、2个H和1个CH<sub>2</sub>基团, 且二级碎片和1-甲基-2-正壬基-4(1*H*)-喹诺酮一致, 因此M26为双羟基氢化甲基化 1-甲基-2-正壬基-4(1*H*)-喹诺酮。M19的准分子离子峰为  $m/z$  288.159 7 ( $[M+H]^+$ ,  $C_{17}H_{22}NO_3$ ), 比吴茱萸卡品碱少1个CH<sub>2</sub>和1个C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>基团并多2个O, 推测吴茱萸卡品碱失去N上的甲基, 同时侧链的烯键断裂, 失去C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>的烷基碎片, 进而双羟基化所得, 因此M19为去甲基去正戊烷基吴茱萸卡品碱的双羟基化产物。

M2和M5的准分子离子峰分别为  $m/z$  512.167 4 ( $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{26}N_3O_9$ ) 和  $m/z$  512.165 9 ( $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{26}N_3O_9$ ), 在质谱中表现为连接的葡萄糖醛酸的信号不稳定, 易断裂, 丢失176 Da, 从而得到双羟基吴茱萸碱的特征碎片  $m/z$  336.134 2, 因此推测M2和M5为双羟基吴茱萸碱的葡萄糖醛酸化产物, 二者为同分异构体。同理, M12为<sup>14</sup>N-甲酰二氢吴茱萸次碱的葡萄糖醛酸化产物; M20、M22和M27均为羟基吴茱萸次碱的葡萄糖醛酸化产物, 三者互为同分异构体; M4和M21分别为双羟基去氢吴茱萸碱和羟基吴茱萸碱的葡萄糖醛酸化产物。

**2.2.2 酚酸类代谢产物分析** M6的准分子离子峰为  $m/z$  367.103 1 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{17}H_{19}O_9$ ), 比绿原酸多一个CH<sub>2</sub>基团, 因此M6为甲基绿原酸<sup>[24]</sup>。M1的准分子离子峰为  $m/z$  273.006 8 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{10}H_9O_7S$ ), 比咖啡酸多1个CH<sub>2</sub>和1个SO<sub>3</sub>基团, 其余二级碎片与咖啡酸一致, 因此M1为甲基硫酸化咖啡酸; M3的准分子离子峰为  $m/z$  207.065 1 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{11}H_{11}O_4$ ), 比咖啡酸多2个CH<sub>2</sub>基团, 其余二级碎片与咖啡酸一致, 因此M3为双甲基咖啡酸。M8的准分子离子峰为  $m/z$  343.139 4 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{16}H_{23}O_8$ ), 比松柏苷多2个H, 因此M8为氢化松柏苷。

**2.2.3 柠檬苦素类代谢产物分析** M23和M28的准分子离子峰分别为  $m/z$  485.181 9 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{26}H_{29}O_9$ ) 和  $m/z$  485.180 9 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{26}H_{29}O_9$ ), 比柠檬苦素多1个O, 其余二级碎片与柠檬苦素一致, 因此M23和M28为羟基柠檬苦素, 二者互为同分异构体; M25的准分子离子峰为  $m/z$  489.213 3 ( $[M-H]^-$ ,  $C_{26}H_{33}O_9$ ), 比柠檬苦素多4个H和1个O, 推测柠檬苦素中的2个羰基被还原, 同时发生羟基化, 其余二级碎片与柠

檬苦素一致, 因此M25为双氢化羟基柠檬苦素。

## 讨论

本研究在血浆中共检测到吴茱萸卡品碱和二氢吴茱萸卡品碱2个生物碱类原形成分。文献<sup>[18]</sup>报道大鼠口服吴茱萸醇提物后, 血浆中除以上2个成分外, 还检测到吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和<sup>14</sup>N-甲酰二氢吴茱萸次碱4个生物碱原形, 分析是由于醇提物中生物碱类成分的含量远高于水提物。同时, 本实验在血浆中还检测到7个生物碱羟基化或葡萄糖醛酸化的代谢产物。在尿液中生物碱类成分代谢产物共检测到13个, 均发生I相羟基化或II相葡萄糖醛酸化, 转化为极性较大的代谢产物而排泄, 与文献<sup>[25]</sup>报道的单体代谢结果一致。但是, 文献<sup>[25]</sup>中羟基去氢吴茱萸碱与硫酸结合的II相代谢产物在本实验中未检测到。在粪便中检测到12个生物碱类原形成分, 代谢类型除了文献报道的I相羟基化和II相葡萄糖醛酸化<sup>[15]</sup>外, 还有氢化和甲基化的I相代谢。

酚酸类成分以绿原酸和咖啡酸为主, 在血浆中只检测到咖啡酸的代谢产物, 推测绿原酸是通过水解为咖啡酸后, 再以代谢产物的形式吸收入血。与文献报道绿原酸口服不易吸收, 但是可以在肠道菌群的作用下水解为咖啡酸后被吸收的结果一致<sup>[26]</sup>。酚酸类成分在大鼠体内代谢形式主要是甲基化和硫酸化。

在尿液中检测到异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -*D*-芸香糖苷和异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -*D*-半乳糖苷2个黄酮苷的原形, 在粪便中检测到金丝桃苷的原形。在水提物中存在的另外3个黄酮苷类成分[异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -*D*-木糖-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、柠檬黄素-3-*O*- $\beta$ -*D*-芸香糖苷和异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷]在水提物中含量较低, 未在血浆、尿液和粪便样品中检测到其相关代谢产物。

柠檬苦素经尿液或粪便以原形及代谢产物的形式排出体外, 主要发生I相代谢, 包括羟基化及氢化。

此外, 在复杂的机体环境下, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和去氢吴茱萸碱之间由于结构相似, 可能存在相互转化。因此, M7和M17、M24和M29也可能分别是吴茱萸碱和吴茱萸次碱的代谢产物。同时, 由于现有技术的局限性, 使得诸如M2和M5、M15和M18等同分异构体的结构无法被确证。但是本研究对吴茱萸水提物中各类成分的体内代谢有了初步的认识, 为进一步阐明吴茱萸体内药效物质奠定了基础。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the

- People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 171.
- [2] Editorial Committee of flora of China. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Vol 43. Beijing: Science Press, 1997: 65.
- [3] Wen LM, Ma CY, Lin YD, et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects in plants of *Euodia* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2012, 30: 1976–1977.
- [4] Cai QY, Li WR, Wei JJ, et al. Antinociceptive activity of aqueous and alcohol extract of *Evodia rutaecarpa* [J]. Indian J Pharm Sci, 2014, 76: 235–239.
- [5] Tang YQ, Feng XZ, Huang L. Studies on the chemical constituents of *Evodia rutaecarpa* [Juss] Benth [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1996, 31: 151–155.
- [6] Xia X, Luo JG, Liu RH, et al. New alkaloids from the leaves of *Evodia rutaecarpa* [J]. Nat Prod Res, 2016, 30: 2154–2159.
- [7] Sugimoto T, Miyase T, Kuroyanagi M, et al. Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* Benth [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36: 4453–4461.
- [8] Hu CQ, Yang XB, Yang XW, et al. Flavonoid glycosides from dried and nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 2571–2575.
- [9] He Y, Li J, Wu HH, et al. A new caffeoylgluconic acid derivative from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. Nat Prod Res, 2015, 29: 1243–1248.
- [10] Ueng YF, Yu HJ, Lee CH, et al. Identification of the microsomal oxidation metabolites of rutaecarpine, a main active alkaloid of the medicinal herb *Evodia rutaecarpa* [J]. J Chromatogr A, 2005, 1076: 103–109.
- [11] Lee SK, Lee J, Lee ES, et al. Characterization of *in vitro* metabolites of rutaecarpine in rat liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18: 1073–1080.
- [12] Komatsu K, Wakame K, Kano Y. Pharmacological properties of galenical preparation. X VI. Pharmacokinetics of evodiamine and the metabolite in rats [J]. Biol Pharm Bull, 1993, 16: 935–938.
- [13] Shyr MH, Lin LC, Lin TY, et al. Determination and pharmacokinetics of evodiamine in the plasma and feces of conscious rats [J]. Anal Chim Acta, 2006, 558: 16–21.
- [14] Jan WC, Lin LC, Don MJ, et al. Elimination of rutaecarpine and its metabolites in rat feces and urine measured by liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20: 1163–1171.
- [15] Lee SK, Lee DW, Jeon TW, et al. Characterization of the Phase II metabolites of rutaecarpine in rat by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Xenobiotica, 2005, 35: 1135–1145.
- [16] Kano Y, Kanemaki S, Yasuda M, et al. Pharmacological properties of galenical preparation (XIII). Metabolites in rat urine of orally administered *Evodia* fruits extract [J]. Shoyakugaku Zasshi, 1989, 43: 226–229.
- [17] Kano Y, Chen XF, Kanemaki S, et al. Pharmacological properties of galenical preparation. XV. Pharmacokinetics study of evocarpine and its metabolite in rats [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1991, 39: 3064–3066.
- [18] Yang S, Tian M, Yuan L, et al. Analysis of *E. rutaecarpa* alkaloids constituents *in vitro* and *in vivo* by UPLC-Q-TOF-MS combined with diagnostic fragment [J]. J Anal Methods Chem, 2016: 1–10.
- [19] Liu SS, Zhou XQ, Liang CX, et al. Chemical constituents from aqueous extract of *Euodiae Fructus* [J]. Chin J Exp Tradi Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 58–64.
- [20] Yan LH. Relation between the law of accumulation, conversion of effective constituents and quality of *Euodiae Fructus* [EB/OL]. <http://npsd.nsf.gov.cn/projectDetail/showPDF.action?code=31200244&pid=2015>.
- [21] Ling Y, Hu P, Zhang L, et al. Identification and structural characterization of acylgluconic acids, flavonol glycosides, limonoids and alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa* by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2016. pii: bmw 109.
- [22] Liao QF, Xie ZY, Zhang L, et al. Mass spectrometric analysis of quinazoline alkaloid and limonin from *Fructus Evodiae* [J]. Chin Med Mat (中药材), 2008, 31: 673–676.
- [23] Xie C, Zhong DF, Chen XY, et al. Metabolites of injected chlorogenic acid in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 88–95.
- [24] Liu SJ, Zhou L, Zhang J, et al. Determination of limonin in dog plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27: 515–519.
- [25] Yan R, Mu Q, Wang Y, et al. Characterization and determination of the alkaloid metabolites of *Evodiae fructus* in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection [J]. Molecules, 2011, 16: 5822–5832.
- [26] Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 5496–5500.