

# 吴茱萸致肝毒性部位在大鼠体内的多样性分析

孙向明, 胡 扬, 温 静, 宋 辉, 李文兰, 丁振铎

(哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:**利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)技术对吴茱萸肝毒性部位给药后大鼠胆汁、尿液、粪便中的原型成分及其代谢产物进行分析,共检测到23个原型成分和10个代谢产物。采用正离子MS<sup>E</sup>扫描模式采集质量范围 $m/z$  50~1 200的数据,通过与UNIFI软件数据库比对,以及各成分的保留时间、精确的一级和二级质谱信息,结合化合物的裂解规律和已有文献报道,共鉴定出29个化学成分,包括23个原型成分和6个代谢产物。进一步由代谢产物逆向追踪原型成分,推测出可能的代谢途径。这些成分在体内的主要代谢途径有葡萄糖醛酸结合、硫酸酯化、甲酰基化、羟基化、去甲基化等。基本明确了吴茱萸肝毒性部位在大鼠胆汁、尿液和粪便中的主要存在形式及代谢途径,为揭示吴茱萸肝毒性物质基础提供了参考依据。

**关键词:**吴茱萸;肝毒性部位;原型成分;代谢产物;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2021)06-1113-14

doi:10.7538/zpxb.2020.0103

## Diversity Analysis of Euodiae Fructus Hepatotoxic Part in Rats

SUN Xiang-ming, HU Yang, WEN Jing, SONG Hui, LI Wen-lan, DING Zhen-duo

(School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**Abstract:** In our previous study, it has been confirmed that the 50% ethanol extract of Euodiae Fructus is a hepatotoxic active part, and its metabolism in rat serum has been revealed. However, the metabolic pathway of traditional Chinese medicine *in vivo* is multiple. A diverse analysis for the metabolism behavior of components will provide us a deep understanding for the qualitative metabolic law and action process *in vivo* between prototype components and metabolites. In this study, ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) was used to detect chemicals in rat bile, urine and feces after administration of Euodia rutaecarpa (35 g/(kg · d)) once a day for fourteen consecutive days. By comparing the BPI chromatograms of samples in positive and negative ion modes, it was found that the response signals in negative ion mode were all responsive in positive ion mode, and the response was better. So the positive ion data was selected for the subsequent analysis. The BPI chromatograms of blank bile and medicated bile, blank urine and medicated urine, blank feces and medicated feces were compared and analyzed. A total of 10 com-

ponents in bile, 20 components in urine and 26 components in feces were detected. Further comparison with the retention time and mass spectrum data of chemical components in the hepatotoxic part of *Euodiae Fructus* showed that there were 4 prototypes in bile, 15 prototypes in urine and 22 prototypes in feces. By positive ions MS<sup>E</sup> scanning mode, the data of compounds with mass range of 50-1 200 u were collected. Through comparing with the database with UNIFI software, the retention time of each component, accurate information, primary and secondary mass spectrometry combined with compound cracking rule and existing literature reports, 29 compounds were identified, including 23 prototype components and 6 metabolites. Further, the possible metabolic pathways were deduced by reversely tracing the prototype components of the metabolites. The main metabolic pathways of these components *in vivo* include glucuronide binding, sulfation, formylation, hydroxylation and demethylation and so on. The metabolism and excretion process *in vivo* were further revealed by comparing the distribution of prototype components and metabolites in different biological samples. The main existing forms and metabolic pathways of *Euodiae Fructus* in rat bile, urine and feces were clarified, which provided a valuable reference for revealing the hepatotoxic substances and metabolism law of *Euodiae Fructus*. At present, the metabolites identification of traditional Chinese medicine is limited to the metabolites with literature reports and prior knowledge. And the results are not very reliable only by analysis of chromatography and mass spectrometry. It is necessary to verify the meaningful metabolites by nuclear magnetic resonance and other methods in the future research to get the exact conclusion.

**Key words:** *Euodiae Fructus*; hepatotoxic part; prototype comments; metabolites; Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS)

吴茱萸是传统的温里中药,用于散寒止痛,助阳止泻,降逆止呕。据文献<sup>[1-2]</sup>报道,其主要的化学成分为生物碱、苦味素、挥发油和黄酮等。现代药理研究表明<sup>[3-7]</sup>,吴茱萸主要活性成分具有抗肿瘤、抗菌、抗炎镇痛、保护胃黏膜、血管舒张、强心等作用。随着对吴茱萸药理作用和临床研究的不断深入,其肝毒性的相关研究受到广泛关注<sup>[8-11]</sup>。对于传统口服给药方式的中药,发挥作用的直接物质都存在于体内,受到胃肠道微生物、酸碱性和代谢酶等的影响,常会使其化学成分发生转化,体内不仅有原型成分,也可能存在代谢产物,这些物质都有可能是其发挥药效或毒性的物质基础。

在本课题组前期研究中,已经证实吴茱萸的50%乙醇提取物是致肝毒性部位<sup>[12]</sup>,并揭示了其在大鼠血清中的代谢情况<sup>[13]</sup>。然而,中药的体内代谢往往是多途径的,对中药成分的体

内代谢行为进行多样性分析,有助于深入了解中药原型成分和代谢产物之间的质变代谢规律和体内作用过程。

本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)技术全面表征吴茱萸肝毒性部位经灌胃进入大鼠胆汁、尿液、粪便中的成分,通过分析大鼠体内运载的吴茱萸代谢产物信息,逆向追踪原型成分,推测各代谢产物可能的代谢途径。通过进一步比较原型成分及代谢产物在不同生物样品中的分布情况,以期全面分析吴茱萸在体内的代谢和排泄过程,为阐明肝毒性物质基础提供参考和佐证。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与装置

ACQUITY UPLC I-Class 液相系统、Xevo G2-S QTOF 质谱系统、UNIFI 1.7 软件;美国

Waters 公司产品; Allegra 64R 低温高速离心机:美国贝克曼库尔有限公司产品。

## 1.2 试剂与材料

吴茱萸:购自哈尔滨三棵树药材市场,经哈尔滨商业大学张德连教授鉴定为吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.; ProElut PLS 固相萃取小柱(60 mg, 3 mL):北京迪科马科技有限公司产品;甲醇、乙腈和甲酸:色谱纯,美国赛默飞世尔科技有限公司产品。

雄性 Wistar 大鼠(合格证号 SCXK-(吉)):质量为(230±20) g,购自长春国家生物产业基地实验动物中心。单次实验所用的大鼠均为同一批次,自由进食饮水,实验前适应性饲养 1 周。

## 1.3 灌胃药液的制备与给药

取适量吴茱萸粗粉,用 50% 乙醇浸泡过夜,热回流法提取 2 次,分别为 8 倍量溶剂提取 120 min,7 倍量溶剂提取 90 min,将 2 次提取液减压浓缩至无醇味呈浸膏状,给药前以蒸馏水制成约 1.4 g 生药材/mL 的灌胃药液。

将大鼠分为给药组和空白组,每组 6 只。给药前称取大鼠体重,按照 35 g/(kg·d)(以生药计)的剂量灌胃给药,每天 1 次,空白组每天给予 25 mL/kg 蒸馏水,连续给药 14 天(本课题组的前期实验证实连续灌胃 14 天可致大鼠出现肝毒性<sup>[12]</sup>)。

## 1.4 生物样品的采集和预处理

**1.4.1 生物样品的采集** 于第 13 天给药后将大鼠放回代谢笼中,禁食不禁水,收集 0~24 h 内的尿液和粪便。末次给药后立即用 10% 水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉,打开腹腔,在十二指肠的肠系膜上找到具有韧性的白色胆管,用聚氯乙烯管向肝脏方向穿入,医用缝合线进行线结扎固定,收集 4 h 内流出的胆汁。整个实验过程中,用生理盐水纱布覆盖创面,并保持湿润。

**1.4.2 生物样品的预处理** 分别取 3 mL 含药和空白胆汁样品,加入 12 mL 甲醇,于离心管中充分涡旋混匀 1 min,再以 12 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液,氮气吹干。

将空白及含药尿液以 3 000 r/min 离心 15 min,分别取 3 mL 离心后上清液活化平衡后的固相萃取小柱。先用蒸馏水淋洗,洗去强极性的杂质,弃去淋洗液;再分别用 3 mL

50% 甲醇、乙腈洗脱,收集、合并洗脱液,氮气吹干。

分别称取 1 g 捣碎后的含药和空白粪便样品,加入 9 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,做匀浆处理。再用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次加入 10 mL,收集萃出液,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液减压浓缩后,氮气吹干。在进行 UPLC-Q-TOF MS 分析前,用 0.5 mL 50% 甲醇充分溶解上述生物样品的氮吹残留物,经 0.22 μm 微孔滤膜除去杂质。

## 1.5 实验条件

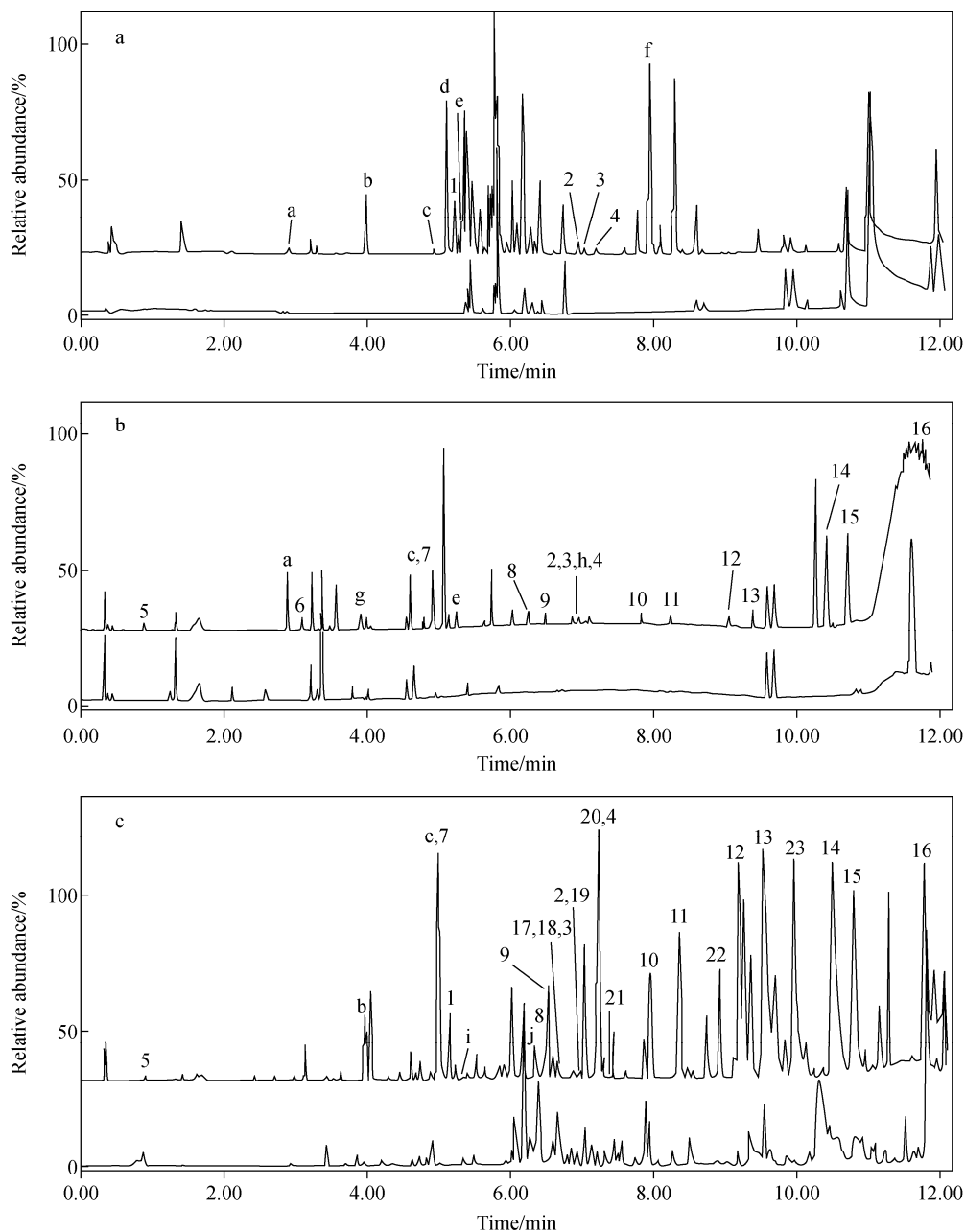
色谱和质谱分析条件与参考文献[13]一致。采用 HSS T3 色谱柱(1.8 μm×100 mm×2.1 mm);流动相:0.1% 甲酸-水(A),0.1% 甲酸-乙腈(B);梯度洗脱程序:0~0.3 min(1%B),0.3~2 min(1%~15%B),2~4 min(15%~25%B),4~6 min(25%~55%B),6~8 min(55%~70%B),8~12 min(70%~99%B);流速:0.5 mL/min。采用大气压电喷雾离子扫描;毛细管电压:2.5 kV;源温度:120 °C;雾化气温度:500 °C;雾化气流速:800 L/h;锥孔气流速:10 L/h;采集模式:MS<sup>E</sup>;采集质量范围: $m/z$  50~1 200;低碰撞能量:4.0 eV;高碰撞能量:20.0~45.0 eV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大鼠胆汁、尿液和粪便中吴茱萸原型成分分析

采用 UPLC-Q-TOF MS 技术对灌胃吴茱萸肝毒性部位后的大鼠体内样品进行正、负离子模式扫描,比较样品的基峰离子(BPI)色谱图,结果表明,在正离子模式下信号响应更强,因此选取正离子模式进行分析。

空白胆汁与含药胆汁、空白尿液与含药尿液、空白粪便与含药粪便的 BPI 色谱图示于图 1,共检测到 10 个排入胆汁的成分,20 个进入尿液的成分,26 个进入粪便的成分。进一步与吴茱萸肝毒性部位各化学成分的保留时间和质谱数据<sup>[13]</sup>比对,发现胆汁中 4 个成分为原型成分(1~4 号峰),尿液中 15 个成分为原型成分(2~16 号峰),粪便中 22 个成分为原型成分(1~5、7~23 号峰),结果列于表 1。有关原型成分的解析过程已在文献[13]中做了详细阐述,本文不再赘述。



注:a~j峰为代谢产物峰,1~23为原型成分峰

图1 含药胆汁与空白胆汁(a),含药尿液与空白尿液(b),含药粪便与空白粪便(c)的基峰离子色谱图

Fig. 1 Base-peak ion chromatograms of medicated bile and blank bile (a), medicated urine and blank urine (b), medicated feces and blank feces (c)

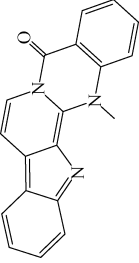
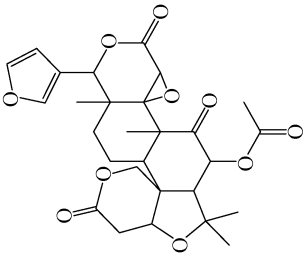
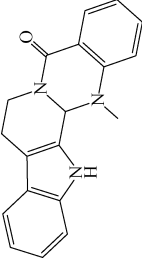
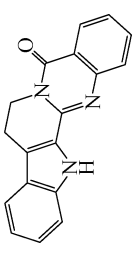
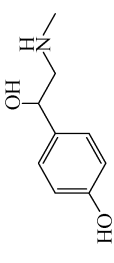
## 2.2 大鼠胆汁、尿液和粪便中吴茱萸的代谢产物分析

由图1和表2可见,在胆汁中检测到6个代谢产物(a~f号峰),在尿液中检测到5个代谢产物(a,c,e,g,h号峰),在粪便中检测到4个代谢产物(b,c,i,j号峰)。其中,代谢产物b、c、e、h、j也是吴茱萸肝毒性部位在血中的代谢

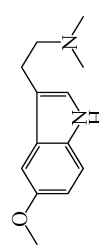
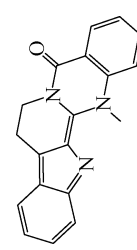
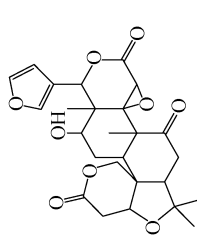
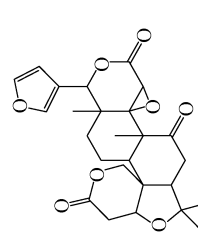
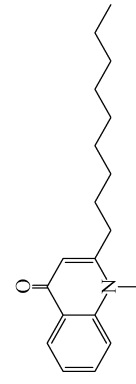
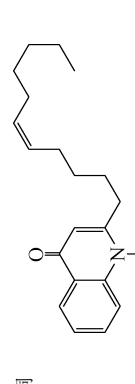
产物,分别对应喹诺酮类生物碱代谢物I、羟基去氢吴茱萸碱、去甲基去氢吴茱萸碱、羟基吴茱萸碱和14-甲酰基二氢吴茱萸次碱<sup>[13]</sup>。由于代谢物b的结构未知,但其二级碎片离子 $m/z$  173.0839、186.0916是喹诺酮类生物碱的特征碎片离子<sup>[14]</sup>,提示其为喹诺酮类生物碱,但因缺乏相关文献报道,故在本文中将其暂定为

表 1 大鼠胆汁、尿液和粪便中吴茱萸肝毒性部位的原型成分

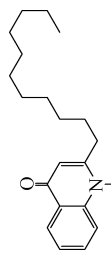

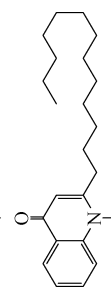
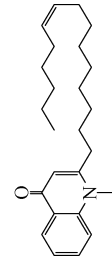
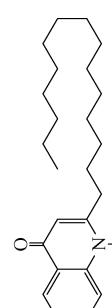
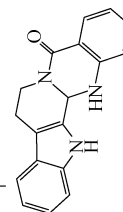
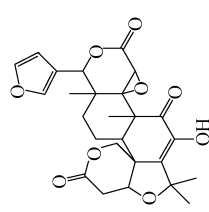
Table 1 Prototype comments of Euodiae Fructus hepatotoxic part in rat bile, urine and feces

峰号 No.	保留时间 $t_R$ /min	准分子离子峰 Quasi-molecular ion peak ( $m/z$ )	二级碎片 Secondary fragment ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	化合物名称 Compound	结构式 Structural formula	来源 Source
1	5.222	300.1132	285.0895 257.0944	$C_{19}H_{13}N_3O$	0.13	吴茱萸宁碱		B,F
2	6.940	529.2067	161.0595 425.1956	$C_{28}H_{32}O_{10}$	-0.30	6 $\beta$ -乙酰氧-5-表柠檬苦素		B,U,F
3	6.998	304.1442	134.1658 161.0639	$C_{19}H_{17}N_3O$	-0.63	吴茱萸碱		B,U,F
4	7.189	288.1131	169.0762 273.0897	$C_{18}H_{13}N_3O$	-0.26	吴茱萸次碱		B,U,F
5	0.934	150.0918	136.0812	$C_9H_{13}NO_2$	—	辛弗林		U,F

续表 1

峰号 No.	保留时间 $t_R$ /min	准分子离子峰 Quasi-molecular ion peak ( $m/z$ )	二级碎片 Secondary fragment ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	化合物名称 Compound	结构式 Structural formula	来源 Source
6	3.104	219.1490	159.0659 174.0909	$C_{13}H_{18}N_2O$	-1.05	<i>N,N</i> -二甲基-5-甲氧基色胺		U
7	4.988	302.1293	258.1001 286.0978	$C_{19}H_{15}N_3O$	1.61	去氢吴茱萸碱		U,F
8	6.395	487.1959	144.0777 441.1911	$C_{28}H_{30}O_8$	-0.82	12 $\alpha$ -羟基柠檬苦素		U,F
9	6.554	471.2012	161.0594 425.1953	$C_{28}H_{30}O_8$	-0.27	柠檬苦素		U,F
10	7.901	286.2166	173.0834 230.1241	$C_{19}H_{27}NO$	0.32	1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹诺酮		U,F
11	8.301	312.2325	173.0844 186.0929	$C_{21}H_{29}NO$	0.92	1-甲基-2-[( <i>Z</i> )-5-十一烯]-4(1H)-喹诺酮		U,F

续表 1

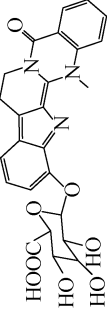
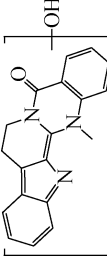
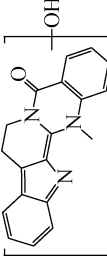
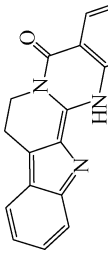
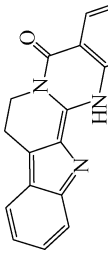
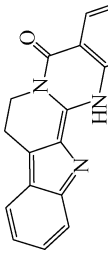
峰号 No.	保留时间 $t_R$ /min	准分子离子峰 Quasi-molecular ion peak ( $m/z$ )	二级碎片 Secondary fragment ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	化合物名称 Compound	结构式 Structural formula	来源 Source
12	9.128	314.2485	173.0842 186.0918	$C_{21}H_{31}NO$	2.08	1-甲基-2-十一烷基-4(1H)-喹诺酮		U,F
13	9.479	340.2644	173.0845 186.0916 312.1211	$C_{23}H_{33}NO$	2.59	吴茱萸新碱		U,F
14	10.421	342.2798	159.0829 173.0837	$C_{23}H_{33}NO$	1.90	二氢吴茱萸新碱		U,F
15	10.711	368.2950	144.1729 186.0910	$C_{25}H_{37}NO$	0.62	1-甲基-2-[(Z)-9-十五烯]-4(1H)-喹诺酮		U,F
16	11.681	370.3108	173.0819 186.0797	$C_{25}H_{39}NO$	0.89	1-甲基-2-十五烷基-4(1H)-喹诺酮		U,F
17	6.604	290.1280	120.0448 273.0901 288.1133	$C_{18}H_{15}N_3O$	-2.80	二氢吴茱萸次碱		F
18	6.697	485.1803	161.0604 439.1730 381.1682	$C_{26}H_{28}O_8$	-0.55	吴茱萸内酯醇		F

续表 1

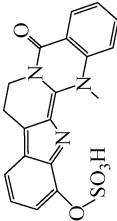
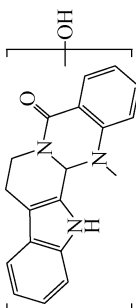
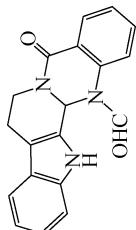
峰号 No.	保留时间 $t_R$ /min	准分子离子峰 Quasi-molecular ion peak ( $m/z$ )	二级碎片 Secondary fragment ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	化合物名称 Compound	结构式 Structural formula	来源 Source
19	6.943	294.1598	134.0609 161.0599	$C_{18}H_{19}N_3O$	-0.93	去甲基吴茱萸酰胺		F
20	7.129	320.1402	144.0812 177.0663	$C_{19}H_{17}N_3O_2$	0.94	吴茱萸酰胺 II		F
21	7.365	306.1600	134.0605 144.0818	$C_{19}H_{19}N_3O$	-0.21	吴茱萸酰胺 I		F
22	8.866	338.2482	173.0840 186.0921	$C_{23}H_{31}NO$	1.13	1-甲基-2-[(4Z,7Z)-4,7-十三烷二烯基]-4(1H)-喹诺酮		F
23	9.884	366.2794	173.0865 186.0975	$C_{25}H_{35}NO$	0.70	1-甲基-2-[(6Z,9Z)-6,9-十五烷二烯基]-4(1H)-喹诺酮		F

注: B 表示胆汁; U 表示尿液; F 表示粪便

表 2 大鼠胆汁、尿液和粪便中吴茱萸肝毒性部位的代谢产物  
Table 2 Metabolites of *Euodiae Fructus* hepatotoxic part in rat bile, urine and feces

峰号 No.	保留时间 $t_R$ /min	准分子离子峰 Quasi-molecular ion peak ( $m/z$ )	二级碎片 Secondary fragment ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	化合物名称 Compound	结构式 Structural formula	来源 Source
a	2.934	494.1563	302.1001 318.1242	$C_{25}H_{23}N_3O_8$	0.01	去氢吴茱萸碱葡萄糖醛酸结合物		B,U
b	3.995	260.1289	173.0839 186.0916	未知	—	喹诺酮类生物碱代谢物 I		B,F
c	4.946	318.1232	286.0988 302.1291	$C_{19}H_{15}N_3O_2$	-3.46	羟基去氢吴茱萸碱		B,U,F
d	5.113	274.1442	173.0840 186.0916	未知	—	喹诺酮类生物碱代谢物 II		B
e	5.315	288.1133	260.3132	$C_{18}H_{13}N_3O$	-1.39	去甲基去氢吴茱萸碱		B,U
f	7.906	520.3398	104.1074 184.0738	未知	—	未知		B

续表 2

峰号 No.	保留时间 $t_R$ /min	准分子离子峰 Quasi-molecular ion peak ( $m/z$ )	二级碎片 Secondary fragment ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	化合物名称 Compound	结构式 Structural formula	来源 Source
g	3.963	398.0820	302.1291 318.1244	$C_{19}H_{15}N_3O_5S$	2.26	去氢吴茱萸碱硫酸盐结合物		U
h	7.113	320.1382	134.1570 187.2159	$C_{19}H_{17}N_3O_2$	-5.31	羟基吴茱萸碱		U
i	5.497	302.1759	173.0838 186.0919 256.1701 284.1649	未知	—	喹诺酮类生物碱代谢物 III		F
j	6.346	318.1230	144.1371 171.0490 290.3381	$C_{19}H_{15}N_3O_2$	-4.09	14-甲酰基二氢吴茱萸次碱		F

注: B 表示胆汁; U 表示尿液; F 表示粪便

喹诺酮类生物碱代谢物 I。利用 UNIFI 1.7 软件数据库比对与人工解析相结合,进行质谱数据分析,参考化合物的裂解规律、各级质谱信息和已有文献报道对其他代谢物进行结构解析<sup>[15-20]</sup>:代谢物 a 的  $[M+H]^+$  峰为  $m/z$  494.156 3,推断其分子式为  $C_{25}H_{23}N_3O_8$ ,误差为  $0.01 \times 10^{-6}$ 。碎片离子  $m/z$  318.124 2 与母离子相差 176.032 1 u,为母离子失去 1 分子葡萄糖醛酸 (GlcA) 产生的  $[M+H-G_6H_8O_6]^+$ ,同时出现丢失葡萄糖醛酸苷 (OGlcA) 产生的  $m/z$  302.100 1 碎片离子,因此推测代谢物 a 为去氢吴茱萸碱葡萄糖醛酸结合物。代谢物 d 的  $[M+H]^+$  峰为  $m/z$  274.144 2,代谢物 i 的  $[M+H]^+$  峰为  $m/z$  302.175 9,二者的碎片离子中都包含  $m/z$  173、186 等喹诺酮类生物碱的特征碎片离子,由于结构未知,缺乏相关文献报道,分别暂定为喹诺酮类生物碱代谢物 II 和喹诺酮类生物碱代谢物 III。代谢物 f 的  $[M+H]^+$  峰为  $m/z$  520.339 8,有碎片离子  $m/z$  184.073 8、104.107 4,其结构未知。代谢物 g 的  $[M+H]^+$  峰为  $m/z$  398.320 4,推断其分子式为  $C_{19}H_{15}N_3O_5S$ ,误差为  $2.26 \times 10^{-6}$ ,碎片离子  $m/z$  318.124 4 与母离子相差 80.195 7 u,为母离子丢失 1 分子磺酸基 ( $SO_3$ ) 产生的  $[M+H-SO_3]^+$ ,碎片离子  $m/z$  302.129 1 与母离子相差 96.191 3 u,为母离子失去 1 分子硫酸基 ( $SO_4$ ) 形成的  $[M+$

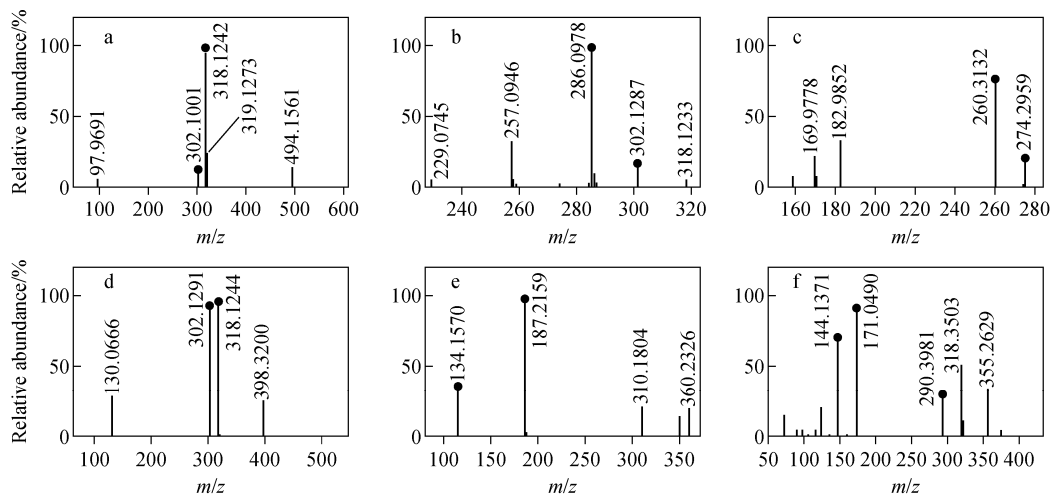
$H-SO_4]^+$ ,推测 g 为去氢吴茱萸碱硫酸结合物。各代谢产物的二级质谱图示于图 2。

### 2.3 代谢产物的代谢途径分析

本研究在大鼠的胆汁、尿液和粪便样品中共检测出 10 个代谢产物,其中 4 个代谢物结构未得到鉴定,6 个代谢产物推测由 4 个原型成分通过葡萄糖醛酸结合、硫酸酯化、甲酰基化等 II 相代谢以及羟基化、去甲基化等 I 相代谢途径转化产生,具体的代谢途径示于图 3<sup>[15-16,18]</sup>。推测代谢物 a(去氢吴茱萸碱葡萄糖醛酸结合物)、代谢物 c(羟基去氢吴茱萸碱)、代谢物 e(去甲基去氢吴茱萸碱)、代谢物 g(去氢吴茱萸碱硫酸结合物)分别是由原型成分去氢吴茱萸碱与体内葡萄糖醛酸结合、发生羟基化、脱甲基反应、与体内硫酸基发生结合反应产生的代谢产物;代谢物 h(羟基吴茱萸碱)可能为羟基吴茱萸碱在体内发生羟基化的代谢产物;代谢物 j(14-甲酰基二氢吴茱萸次碱)可能为二氢吴茱萸次碱在体内发生甲酰化后的代谢产物。

### 2.4 血清、胆汁、尿液、粪便中吴茱萸肝毒性部位的代谢比较

结合吴茱萸肝毒性部位入血成分分析结果<sup>[13]</sup>,比较吴茱萸肝毒性部位的原型成分和代谢产物在不同生物样品中的分布情况和代谢途径,有助于了解药物的体内作用过程和代谢规律。



注:a. 去氢吴茱萸碱葡萄糖醛酸结合物;b. 羟基去氢吴茱萸碱;c. 去甲基去氢吴茱萸碱;  
d. 去氢吴茱萸碱硫酸结合物;e. 羟基吴茱萸碱;f. 14-甲酰基二氢吴茱萸次碱

图 2 代谢产物的二级质谱图

Fig. 2 Secondary mass spectra of metabolites

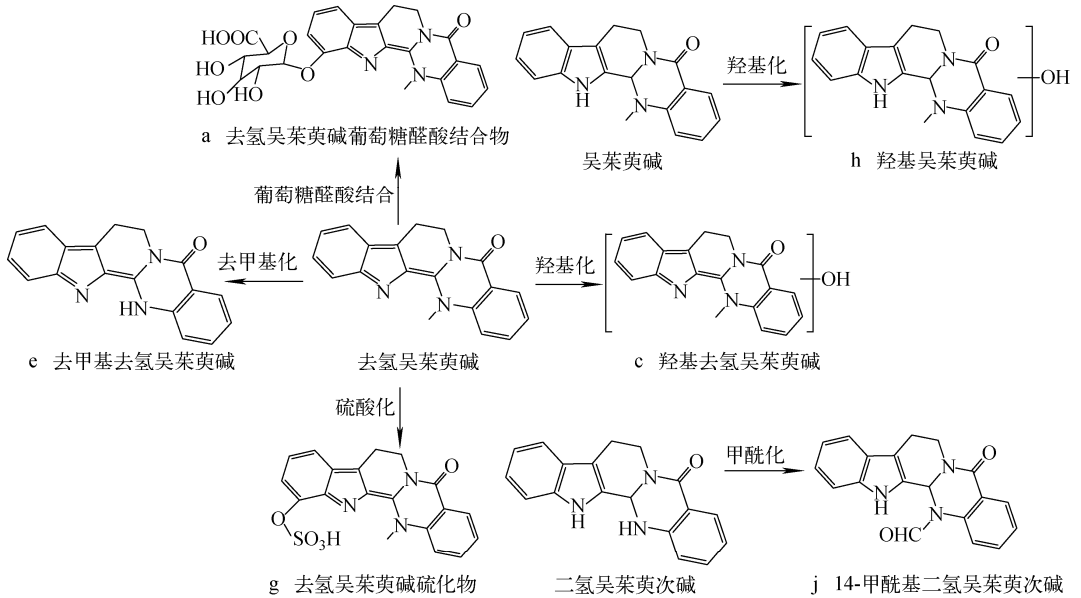


图3 吴茱萸肝毒性部位在大鼠胆汁、尿液和粪便中的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways of *Euodiae Fructus* hepatotoxic part in rat bile, urine and feces

吴茱萸的主要成分类型为生物碱类,极性较小,易以原型物形式被直接吸收。在大鼠体内共检测到23个吴茱萸肝毒性部位的原型成分,且多数成分的排泄途径呈多样性。就原型药物而言,肾排泄是主要消除途径,有些药物具有肝肠循环的特点,其代谢物经胆汁进入小肠,释放出原型药物,最终通过粪便排出。在血清中发现的15个原型成分会同时在尿液、胆汁或粪便中被检测到,推测这些原型成分经胃肠道被吸收入血后,通过肝门静脉进入肝脏,一部分进入体循环,最终随尿液排出体外,成为血清和尿液样品的共有成分,一部分被排泄到胆汁,经胆管到达小肠,直接由粪便排出,因此血清、胆汁、粪便中均能检出;一些成分未被完全吸收,则随肠道粪便排出,可在血清和粪便中同时检测到。另外,有7个原型成分未在血清中检测到,其中一个原因可能是由于药物含量甚微,现有的条件无法检测到,而尿液和粪便是累计收集24 h的样品,药物浓度一般高于血中,故在尿液和粪便中可以被检测到;另一个原因可能是该原型成分未被吸收入血,直接经肠道随粪便排出体外。

在大鼠的4种生物样品中共检测到12个代谢产物,其中4个成分结构未知。吴茱萸的代谢途径多样,在血清、尿液、粪便和胆汁中均能发现代谢产物,且I相代谢和II相代谢均会

发生。去氢吴茱萸碱在大鼠体内发生了葡萄糖醛酸结合、硫酸酯化、羟基化和去甲基化等多种代谢反应,产生的代谢产物主要出现在胆汁和尿液样品中,可能以肝代谢为主,代谢产物极性增加,水溶性增强,主要排泄途径为肾和胆排泄。一般情况下,胆汁排泄是药物代谢物尤其是水溶性大的代谢物的主要排泄途径,分子质量<300的化合物从尿液排泄,分子质量300~500的化合物从胆汁和尿液排泄,分子质量大于500的化合物主要从胆汁排泄。此外,某些药物的胆汁排泄具有肝肠循环现象,胆汁分泌后又从小肠重新吸收,或者代谢物被分泌入胆汁,然后又在小肠转化为药物被重新吸收。在本研究中,以去氢吴茱萸碱葡萄糖醛酸结合物为例,分子质量为493,由表2可知,其主要排泄途径是尿液和胆汁,而且很可能自胆汁流入肠腔,在肠道菌群或酶的作用下转化为去氢吴茱萸碱原型,部分被小肠重新吸收入血进入体循环,呈现肝肠循环现象,部分随粪便排出。在粪便样品中也检测到了去氢吴茱萸碱原型,并且在另一项研究中,通过绘制去氢吴茱萸碱的“血药浓度-时间”拟合曲线,发现去氢吴茱萸碱出现了明显的双峰,进一步印证了上述推测。在血清和粪便样品中,同时检测到14-甲酰基二氢吴茱萸次碱,推测为原型成分二氢吴茱萸次

碱水解和甲酰基化产生的代谢产物,该原型成分在血清和粪便中均被检测到,推测一部分原型成分被直接吸收入血,另一部分原型成分在肠道内发生代谢,代谢产物入血,并通过胆汁排泄,进入肠道后随粪便排出。吴茱萸次碱发生羟基化反应,产生代谢产物羟基吴茱萸次碱,仅在血清中被检测到,推测入血后在体内被进一步代谢,以其他代谢产物形式排泄。吴茱萸碱在体内发生羟基化反应,在血清和尿液中可检测到其代谢产物羟基吴茱萸碱,推测尿液是其唯一的排泄途径。

对于口服药物毒性物质基础的研究,进入血液中的原型成分和代谢产物是研究重点,在血清、胆汁、尿液、粪便中共存的成分更有研究意义<sup>[21-23]</sup>。目前,对中药体内代谢产物的鉴定,往往局限于有文献报道和先验知识的代谢产物,且仅通过色谱和质谱手段进行分析,结果的可靠性有待验证,还需要在未来的研究中以核磁共振等方法对有意义的代谢物进行验证,得到确切结论。

### 3 结论

本文应用 UPLC-Q-TOF MS/MS 技术对灌胃吴茱萸肝毒性部位后进入大鼠胆汁、尿液、粪便中的吴茱萸原型成分及代谢产物进行全面的定性分析及代谢途径解析。在胆汁中检测到 4 个原型成分和 6 个代谢产物;在尿液中检测到 15 个原型成分和 5 个代谢产物;在粪便中检测到 22 个原型成分和 4 个代谢产物。在对代谢产物进行结构表征的基础上,进一步推测了吴茱萸在大鼠体内的代谢途径,包括葡萄糖醛酸结合、硫酸酯化、甲酰基化、羟基化、去甲基化、水解等,并通过比较原型成分和代谢产物在不同生物样本中的分布情况,进一步探索其体内的作用过程,为吴茱萸的肝毒性物质基础及代谢规律研究提供了参考依据。

### 参考文献:

[1] 刘丽,张笑敏,许浚,张纪红,张铁军,陈常青,刘昌孝. 吴茱萸化学成分和药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药,2020,51(10):2 689-2 702.  
LIU Li, ZHANG Xiaomin, XU Jun, ZHANG

Jihong, ZHANG Tiejun, CHEN Changqing, LIU Changxiao. Chemical components and pharmacological action for *Euodiae Fructus* and predictive analysis on its Q-marker[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(10): 2 689-2 702(in Chinese).

- [2] YAN Q, SHAN Y U, YIN M, XU S, MA C, TONG H Y, FENG X, WANG Q Z. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Evodia rutaecarpa* var. *officinalis* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2020, 88: 103 961.
- [3] 曾以旺. 基于网络药理学的吴茱萸抗肿瘤作用机制研究[J]. 中国现代医生,2020,58(15):131-135,193.  
ZENG Yiwang. Study of anti-tumor mechanism of action of *Evodia rutaecarpa* based on network pharmacology[J]. *China Modern Doctor*, 2020, 58(15): 131-135, 193(in Chinese).
- [4] LIU Y N, PAN S L, LIAO C H, HUANG D Y, GUH J H, PENG C Y, CHANG Y L, TENG C M. Evodiamine represses hypoxia-induced inflammatory proteins expression and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  accumulation in RAW264.7[J]. *Shock*, 2009, 32(3): 263-269.
- [5] LIANG X, LI B, WU F, LI T, WANG Y, MA Q, LIANG S. Bitterness and antibacterial activities of constituents from *Evodia rutaecarpa*[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 180.
- [6] WANG L, HU C P, DENG P Y, SHEN S S, ZHU H Q, DING J S, TAN G S, LI Y J. The protective effects of *Rutaecarpine* on gastric mucosa injury in rats[J]. *Planta Medica*, 2005, 71(5): 416-419.
- [7] TIAN K M, LI J J, XU S W. *Rutaecarpine*: a promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia rutaecarpa* (Wu Zhu Yu)[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 541-550.
- [8] 廖文强,李波,李莉,赵军宁. 吴茱萸致小鼠肝毒性分子机制研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4 865-4 868.  
LIAO Wenqiang, LI Bo, LI Li, ZHAO Junning. Study on molecular mechanism of *Euodiae fructus* on liver toxicity in mice[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(24): 4 865-4 868(in Chinese).
- [9] 任晓静,李明,张逊,冯昊,袁金斌. 吴茱萸不同提取部位致大鼠肝毒性研究[J]. 吉林中医药,

- 2020,40(4):510-513.
- REN Xiaojing, LI Ming, ZHANG Xun, FENG Hao, YUAN Jinbin. Study on the rat hepatotoxicity of extracts from different parts of *Evodia rutaecarpa*[J]. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2020, 40(4): 510-513(in Chinese).
- [10] 王亮,孙凯滨,吴晓文,孙蓉. 吴茱萸水煎液肝毒质量标志物确认研究[J]. 中草药,2019,50(19): 4 547-4 555.
- WANG Liang, SUN Kaibin, WU Xiaowen, SUN Rong. Confirmation study of hepatotoxic quality marker in Euodiae Fructus decoction[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(19): 4 547-4 555(in Chinese).
- [11] 孙向明,宋辉,丁晶鑫,徐昶儒,李文兰. 吴茱萸醇提取物多次给药致大鼠肝毒性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2017,33(3):257-259,271.
- SUN Xiangming, SONG Hui, DING jingxin, XU Changru, LI Wenlan. Study on hepatotoxicity of rats caused by multiple dose ethanol extract from *Evodia rutaecarpa*[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2017, 33(3): 257-259, 271(in Chinese).
- [12] LI W L, SUN X M, LIU B M, ZHANG L H, FAN Z Q, JI Y B. Screening and identification of hepatotoxic component in *Evodia rutaecarpa* based on spectrum-effect relationship and UPLC-Q-TOFMS[J]. Biomedical Chromatography, 2016, 30(12): 1 975-1 983.
- [13] 李文兰,孙向明,陈晨,刘悦,宋辉,丁晶鑫,徐蓓蕾,阎新佳. 基于 UPLC-TOF MS 的吴茱萸致肝毒性部位及入血成分分析[J]. 质谱学报,2017, 38(3):282-293.
- LI Wenlan, SUN Xiangming, CHEN Chen, LIU Yue, SONG Hui, DING Jingxin, XU Beilei, YAN Xinjia. Analysis of *Euodia rutaecarpa* hepatotoxic part and absorbed components in rat serum based on UPLC-Q-TOF MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(3): 282-293(in Chinese).
- [14] 邱时祎. 吴茱萸中生物碱的分离纯化和质谱表征[D]. 上海:华东理工大学,2013.
- [15] 李丽. 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和左旋四氢巴马亭在微生物和大鼠体内的代谢研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2005.
- [16] SUN H Z, FANG Z Z, CAO Y F, SUN X. Investigation of the in vitro metabolism of evodia mine characterization of metabolites and involved cytochrome p450 isoforms[J]. Phytother Res, 2013, 27(5): 705-712.
- [17] UENG Y F, DON M J, JAN W C, WANG S Y, HO L K, CHEN C F. Oxidative metabolism of the alkaloid rutaecarpine by human cytochrome P450[J]. Drug Metabolism and Disposition the Biological Fate of Chemicals, 2006, 34(5): 812-827.
- [18] LIN L C, LI S H, WU Y T, KUO K L, TSAI T H. Pharmacokinetics and urine metabolite identification of dehydroevodiamine in the rat[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(7): 1 595-1 604.
- [19] DUNN W B, BROADHURST D, BEGLEY P, ZELENKA E, SUE F M, ANDERSON N, BROWN M, KNOWLES J D, HALSALL A, HASELDEN J N. Procedures for large-scale metabolite profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2011, 6(7): 1 060-1 083.
- [20] GIKA H G, THEODORIDIS G A, WILSON I D. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1 189(1-2): 314-322.
- [21] 陆林玲,束艳,钱大玮,宿树兰,段金殿,钱叶飞,薛彩福. 大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中主要代谢产物的鉴定[J]. 药理学学报,2011,46(11):1 374-1 379.
- LU Linling, SHU Yan, QIAN Dawei, SU Shulan, DUAN Jin'ao, QIAN Yefei, XUE Caifu. Identification of the metabolites of Sinisan extract in rat plasma, urine, feces and bile after intragastric administration[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2011, 46(11): 1 374-1 379(in Chinese).
- [22] 许璐,刘婉婉,谭潇,王石,穆丽华,董亮喆,王东晓,刘屏. 抑郁模型大鼠灌胃定志小丸提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中主要代谢产物的鉴定[J]. 中国中药杂志,2015,40(11):2 214-2 220.
- XU Lu, LIU Wanwan, TAN Xiao, WANG Shi, MU Lihua, DONG Xianzhe, WANG Dongxiao, LIU Ping. Identification of the metabolites of Dingzhi Xiaowan extract in depressive rat plasma, urine, feces and bile after intragastric administration[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(11): 2 214-2 220(in Chinese).