

关黄柏水提物在大鼠血清、尿液和粪便中原型成分及其代谢产物的UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribid-MS鉴定

康立欣, 许振鹏, 刘艳, 杨靖, 杨炳友, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:应用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱质谱法(UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribid-MS)分析关黄柏水提物在正常大鼠血清、尿液及粪便中的原型成分及其代谢物,探讨关黄柏在大鼠体内的药效物质基础。方法:采用ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 2%~25%B; 15~25 min, 25%~50%B; 25~28 min, 50%~98%B),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量10 μL,柱温40℃。运用加热电喷雾离子源(HESI),扫描范围 m/z 100~1 000,正离子模式采集数据。通过比较给药后样品和空白样品的差异,对灌胃给予关黄柏水提物后大鼠血清、尿液和粪便中的原型成分及其代谢产物进行鉴定。结果:灌胃给予关黄柏水提物后,从大鼠血清、尿液及粪便中鉴定和表征了70个外源性成分,包括15个原型成分和55个代谢产物。其中15个原型成分包括12个生物碱和3个柠檬苦素,55个代谢产物包括52个生物碱和3个柠檬苦素。关黄柏水提物在大鼠体内的代谢途径主要包括脱饱和、甲基化、氧化、硫酸化及葡萄糖醛酸结合等反应。结论:生物碱在大鼠体内进行I相代谢和II相代谢,柠檬苦素类在大鼠体内主要进行I相代谢,可为进一步解析关黄柏体内过程,阐明其药效物质基础提供实验依据。

[关键词] 关黄柏; 生物碱; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱质谱法(UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribid-MS); 原型成分; 代谢产物; 柠檬苦素类; 大鼠

[中图分类号] R22;R969.1;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0139-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211050

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210301.1618.003.html>

[网络出版日期] 2021-3-2 11:42

Identification of Prototype Components and Their Metabolites in Rat Serum, Urine and Feces After Oral Administration of Phellodendri Amurensis Cortex Aqueous Extract by UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribid-MS

KANG Li-xin, XU Zhen-peng, LIU Yan, YANG Jing, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Basis and Applied Research of Northern Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** An ultra-performance liquid chromatography coupled with Orbitrap Fusion Lumos Tribid mass spectrometry (UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribid-MS) was applied to analyze the prototypes and their metabolites of Phellodendri Amurensis Cortex aqueous extract in the serum, urine and feces of normal rats, and to investigate the pharmacodynamic material basis of Phellodendri Amurensis Cortex in rats. **Method:** Chromatographic separation was performed on the ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with the mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-15 min, 2%-25%B; 15-25 min, 25%-50%B; 25-28 min, 50%-98%B), flow rate was 0.3 mL·min⁻¹,

[收稿日期] 20201211(014)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1707100)

[第一作者] 康立欣,在读硕士,从事中药及其复方药效物质基础研究,E-mail:kanglx2020@163.com

[通信作者] *匡海学,博士,教授,从事中药及其复方药效物质基础研究,Tel:0451-82197188,E-mail:hxkuang@hljucm.net

the injection volume was 10 μ L and the column temperature was 40 $^{\circ}$ C. Heated electrospray ionization (HESI) was used to collect data in the positive ion modes with the scanning range of m/z 100-1 000. By comparing chromatogram differences between the blank samples and the samples after administration, prototypes and their metabolites of biological samples after oral administration of *Phellodendri Amurensis* Cortex aqueous extract were identified. **Result:** After oral administration of *Phellodendri Amurensis* Cortex aqueous extract, a total of 70 compounds including 15 prototypes and 55 metabolites in rat serum, urine and feces were detected. Among them, 15 prototypes included 12 alkaloids and 3 limonoids, and 55 metabolites included 52 alkaloids and 3 limonoids. Desaturation, methylation, oxidation, sulfonation and glucuronide conjugation were observed as the primary metabolic pathways for the chemical constituents of *Phellodendri Amurensis* Cortex aqueous extract. **Conclusion:** Alkaloids in *Phellodendri Amurensis* Cortex aqueous extract undergo phase I and phase II metabolism in rats, and limonoids mainly undergo phase I metabolism in rats. This paper can provide experimental basis for further analyzing the process *in vivo* of *Phellodendri Amurensis* Cortex and elucidating its pharmacodynamic substance basis.

[Key words] *Phellodendri Amurensis* Cortex; alkaloids; ultra-performance liquid chromatography coupled with Orbitrap Fusion Lumos Tribrid mass spectrometry (UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribrid-MS); prototypes; metabolites; limonoids; rats

药物代谢研究是阐明药效物质基础的重要组成部分。生物样本中存在大量内源性物质,这会对测定含量较低的代谢产物造成很大干扰^[1]。超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱质谱法(UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribrid-MS)的AcquireX自动化数据采集模式不仅可以排除基质背景的干扰,还可以获得众多低含量组分的二级质谱信息,使得在生物样本中含量较低的化合物能得到解析,从而可以鉴定到更多的代谢产物^[2]。

关黄柏具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之功效^[3]。现代研究表明,关黄柏中含有生物碱类、柠檬苦素类、酚酸类、奎宁酸类和黄酮类等化学成分^[4]。其中生物碱类和柠檬苦素类化合物是主要有效成分,具有抗炎^[5-6]、抗菌^[7]、抗肿瘤^[8]和抗溃疡^[9]等作用。为阐明关黄柏的药效物质基础,需要对其主要有效成分在体内的代谢过程进行研究。近年来,关黄柏的代谢产物研究主要集中于单体生物碱^[10-17]及含关黄柏复方^[18-20]的体内代谢过程方面。中药传统入药方式大多为水煎液,但目前仅见关黄柏甲醇提取物在大鼠血清中代谢过程的研究^[21],未见其水提物在体内代谢过程的研究。相比血清,尿液和粪便中含有更多的代谢产物^[22],对血清、尿液和粪便中代谢产物进行综合分析可以更好地了解关黄柏中活性成分在体内的代谢、排泄过程^[23]。因此,本实验通过UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribrid-MS的AcquireX模式对关黄柏在大鼠血清、尿液和粪便中的代谢产物进行了研究,结果共鉴定

了15个原型成分和55个代谢产物,相较之前的研究,本研究对关黄柏体内代谢产物进行了更为全面地分析,可为深入阐释关黄柏的药效物质基础提供实验依据。

1 材料

Vanquish型超高效液相色谱仪,Orbitrap Fusion Lumos Tribrid型质谱仪(包括Xcalibur 4.2数据采集软件和Compound Discoverer 3.1数据分析软件),SPD140DDA SpeedVac型离心浓缩仪(美国Thermo Fisher公司);AL204型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),CT15RE型台式低温高速离心机(日本Hitachi公司),Mikro220R型台式高速冷冻离心机(德国Hettich公司),OSB-2100型旋转蒸发仪(日本EYELA公司)。关黄柏饮片购自哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司(批号1805002S),经黑龙江中医药大学樊锐锋副教授鉴定为芸香科植物黄檗*Phellodendron amurense*的干燥树皮;水为屈臣氏蒸馏水,甲酸为质谱纯,甲醇、乙腈为色谱纯。

6~8周龄健康SPF级雄性SD大鼠18只,体质量180~220 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。本文所涉及的动物实验经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号2019121101。

2 方法

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C₁₈色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~15 min, 2%~25%B;

15~25 min, 25%~50%B; 25~28 min, 50%~98%B), 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2 质谱条件 采用加热电喷雾离子源(HESI), 正离子扫描采集模式, 喷雾电压 3.5 kV , 离子源加热温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$, 离子传输管温度 $325 \text{ }^\circ\text{C}$, 鞘气流速设定 50 arb , 辅助气流速 10 arb ; 高能诱导裂解(HCD)能量设定 20% , 35% 和 50% , 碰撞诱导裂解(CID)能量 30% , 分辨率 3 万 ; m/z 采集范围 $100\sim 1\ 000$ 。

2.3 样品采集与处理

2.3.1 灌胃药液 称取关黄柏饮片 100 g , 加水 1 L , 加热回流 1 h , 提取 2 次, 趁热过滤, 合并药液并于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩至生药质量浓度 $0.52 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.3.2 样品采集 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为空白组和关黄柏组, 空白组 4 只, 关黄柏组 14 只, 关黄柏组按 $8.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予 $0.52 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液, 空白组给予等量蒸馏水。将空白组、关黄柏组大鼠各 2 只放置于代谢笼中, 收集给药后 $0\sim 4$, $4\sim 8$, $8\sim 12$, $12\sim 24 \text{ h}$ 的尿液和粪便, 收集期间禁食不禁水。空白组大鼠 2 只腹主动脉取血作为 0 h 样品, 关黄柏组于给药后 $2, 4, 6, 8, 12, 24 \text{ h}$ 腹主动脉取血, 每个时间点 2 只大鼠, 全血放置 30 min 后于温度 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min ($5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 94 mm), 取上清, 分装后置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

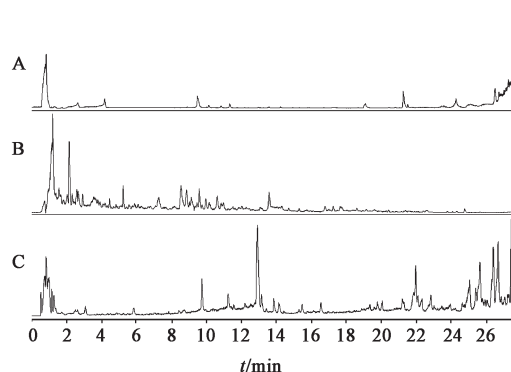
2.3.3 样品处理 将血清(各时间点 $40 \mu\text{L}$)与 3 倍量甲醇混合, 离心(温度 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速 $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心时间 15 min , 离心半径 86 mm , 下同), 取上清液用冷冻离心浓缩仪在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下旋干, 加甲醇 $100 \mu\text{L}$ 复溶, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 待用。将尿液(每个时间段 $50 \mu\text{L}$)与 3 倍量甲醇混合, 离心, 取上清液, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 待用。将粪便(各时间段 0.1 g)与 10 倍量甲醇混合, 超声 30 min (45 kHz , 200 W), 离心, 取上清液, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 待用。

2.4 数据处理 使用 Compound Discoverer 3.1 软件对质谱检测的原始数据进行定性分析。本地中药成分高分辨质谱数据库 OTCML, 保留时间(t_R)阈值 0.02 min , 质量偏差 $< 5 \text{ ppm}$ ($1 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6}$, 下同), 信噪比阈值 3 , 正离子模式加和离子为 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

3 结果

3.1 血清、尿液、粪便中原型成分及代谢产物的鉴定 总离子流图见图 1, 通过文献查阅、数据库搜索, 从大鼠血清、尿液和粪便中共鉴定了 70 个化合物, 包括 15 个原型成分和 55 个代谢产物。鉴定出的原型及代谢产物包括 64 个生物碱类和 6 个柠檬

苦素类, 主要鉴定信息见表 1。



A. 2~24 h 血清; B. 0~24 h 尿液; C. 0~24 h 粪便

图 1 正离子模式下关黄柏组大鼠不同生物样品的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of samples of rats from Phellodendri Amurensis Cortex group under positive ion mode

3.2 生物碱及其代谢产物的鉴定 关黄柏的主要成分为生物碱。大鼠灌胃给予关黄柏水提物后, 在生物样品中检测到的生物碱类原型产物主要是小檗碱、去亚甲基小檗碱、小檗红碱等^[24]。生物碱类成分的裂解方式主要包括去甲基、脱羰基、去亚甲基等。以去亚甲基小檗碱为例, 解释生物碱类化合物的推断过程。去亚甲基小檗碱(F)在尿液和粪便中均被检测到。其准分子离子峰为 m/z $324.123\ 9$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$), 其代表性二级碎片离子及可能的裂解模式分别为 m/z $309.100\ 4$ $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $308.092\ 7$ $[\text{M}-\text{CH}_4]^+$, $294.076\ 9$ $[\text{M}-2\text{CH}_3]^+$, $280.097\ 6$ $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{CO}]^+$, $266.082\ 0$ $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{CO}-\text{CH}_2]^+$ 。代谢物 F1 准分子离子峰为 m/z $310.108\ 2$, 比 F 小 14 Da , 推测 F1 可能为 F 的去甲基化产物。代谢物 F2 准分子离子峰 m/z $322.108\ 0$, 比 F 小 2 Da , 同时可发生与 F 相同的裂解(丢失 1 个分子 CH_3 和 1 个分子 CO)产生 m/z $279.089\ 5$, 推测 F2 为 F 的脱饱和产物。代谢物 F3 和 F4 的准分子离子峰分别为 m/z $402.065\ 2$, $498.139\ 9$, 分别比 F2 大 80 Da , 176 Da , 推测二者分别为 F2 的硫酸化产物、葡萄糖醛酸结合产物。代谢物 F5 准分子离子峰 m/z $326.138\ 9$, 比 F 大 2 Da , 推测 F5 可能为 F 的还原产物。代谢物 F6 准分子离子峰 m/z $502.172\ 0$, 比 F5 大 176 Da , 同时具有与 F5 准分子离子峰相同的碎片 m/z $326.139\ 4$, 推测 F6 为 F5 的葡萄糖醛酸结合产物。代谢物 F7 的准分子离子峰为 m/z $338.139\ 5$, 比 F 大 14 Da , 二级质谱中可见离子 m/z $323.116\ 5$ $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $322.108\ 2$ $[\text{M}-\text{CH}_4]^+$, $308.092\ 9$ $[\text{M}-2\text{CH}_3]^+$, $294.113\ 3$ $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{CO}]^+$, $280.092\ 7$ $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{CO}-\text{CH}_2]^+$, 碎裂模式与 F 相同, 故而推测代谢物 F7 为 F 的甲基化产物。代谢物 F8

表 1 关黄柏水提物在大鼠血清、尿液和粪便中原型成分及其代谢产物的 UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribrid-MS 鉴定
Table 1 Identification of prototypes and their metabolites of Phellodendri Amurensis Cortex aqueous extract in rat serum, urine and feces by UPLC-Orbitrap Fusion Lumos Tribrid-MS

编号	t_R /min	化合物	分子式	$[M+H]^+$ /[M] ⁺ 理论值	$[M+H]^+$ /[M] ⁺ 实测值	δ /ppm	MS/MS 碎片离子	来源
A	4.72	去甲乌药碱	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	272.129 1	272.128 8	-0.9	255.103 7, 122.978 7, 107.050 3	血清
B	5.96	黄柏碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	342.170 0	342.170 9	2.6	327.148 5, 192.102 1	尿液、粪 便、血清
C	7.06	木兰花碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	342.170 0	342.171 0	3.0	327.147 4, 311.128 7, 297.112 9, 282.089 4, 265.086 5, 237.091 5	尿液、血清
C1	4.26	木兰花碱的去甲基化产物	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	328.154 4	328.155 2	2.5	313.131 8, 297.113 7, 265.086 7, 237.091 6	尿液、粪 便、血清
C2	7.00	C1 的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₅ H ₃₀ NO ₁₀	504.186 5	504.187 3	1.5	328.155 1, 313.077 3, 297.082 1	尿液
C3	0.84	木兰花碱的甲基化产物	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄	356.185 7	356.186 6	2.6	341.162 9, 325.144 6, 311.128 5, 296.105 3, 279.102 2, 251.107 1	粪便、血清
C4	5.37	木兰花碱的氧化产物	C ₂₀ H ₂₄ NO ₅	358.164 9	358.165 7	2.3	343.142 5, 313.107 8, 298.084 3, 281.081 5, 253.086 6	粪便、血清
C5	3.10	C4 的去甲基化产物	C ₁₉ H ₂₂ NO ₅	344.149 3	344.150 4	3.3	329.126 1, 299.092 7, 267.065 4, 239.070 2	粪便
C6	6.88	C4 的脱饱和产物	C ₂₀ H ₂₂ NO ₅	356.149 3	356.150 1	2.3	341.091 4, 311.128 6, 296.092 5, 279.102 5, 251.105 1	粪便
C7	3.89	C4 的氧化产物	C ₂₀ H ₂₄ NO ₆	374.159 8	374.160 9	3.0	359.137 3, 329.103 0, 297.076 1	粪便
D	7.58	N-甲基四氢罂粟碱	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄	358.201 3	358.202 4	3.1	343.179 3, 327.184 2, 313.144 6, 189.091 5, 137.060 1	粪便
D1	8.15	N-甲基四氢罂粟碱的脱饱和产物	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.185 7	356.187 1	4.0	341.163 3, 325.145 0, 311.129 0	粪便
E	7.75	右旋四氢巴马汀	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.187 0	356.188 4	4.0	192.103 0, 177.805 3	血清
E1	9.99	右旋四氢巴马汀的脱饱和产物	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	354.171 3	354.170 8	-1.4	339.138 2, 190.080 4, 175.062 5	粪便
E2	11.42	右旋四氢巴马汀的甲基化产物	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	370.202 7	370.202 0	-1.8	355.178 6, 206.118 1, 191.094 6	粪便
E3	7.92	右旋四氢巴马汀的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₇ H ₃₃ NO ₁₀	532.219 1	532.218 9	-0.3	356.186 8, 341.163 9, 192.102 5, 177.079 0	尿液
F	9.81	去亚甲基小檗碱	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄	324.123 0	324.123 9	2.7	309.100 4, 308.092 7, 294.076 9, 280.097 6, 266.082 0	尿液、粪 便
F1	8.37	去亚甲基小檗碱的去甲基化产物	C ₁₈ H ₁₆ NO ₄	310.107 4	310.108 2	2.6	295.084 6, 294.076 6, 280.061 1, 267.090 4	粪便
F2	11.24	去亚甲基小檗碱的脱饱和产物	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄	322.107 4	322.108 0	1.9	307.084 6, 292.061 0, 279.089 5	尿液、粪 便
F3	15.16	F2 的硫酸化产物	C ₁₉ H ₁₆ NO ₇ S	402.064 2	402.065 2	2.5	322.108 0, 307.084 6, 292.097 1, 279.089 5	尿液
F4	9.24	F2 的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₅ H ₂₄ NO ₁₀	498.139 5	498.139 9	0.8	322.108 1, 307.084 8	尿液
F5	6.51	去亚甲基小檗碱的还原产物	C ₁₉ H ₂₀ NO ₄	326.138 7	326.138 9	0.7	311.115 8, 310.106 8, 296.091 8	粪便
F6	8.92	F5 的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₅ H ₂₈ NO ₁₀	502.170 8	502.172 0	2.4	326.139 4, 311.115 8, 310.108 2	尿液
F7	8.96	去亚甲基小檗碱的甲基化产物	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	338.138 7	338.139 5	2.4	323.116 5, 322.108 2, 308.092 9, 294.113 3, 280.092 7	粪便
F8	9.89	F7 的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₆ H ₂₈ NO ₁₀	514.170 8	514.173 0	4.3	338.140 1, 323.116 6, 322.108 8, 308.093 0, 294.113 6	尿液
F9	7.27	去亚甲基小檗碱的氧化产物	C ₁₉ H ₁₈ NO ₅	340.118 0	340.119 2	3.6	325.095 5, 324.087 7, 310.072 0, 296.092 7, 282.077 1	粪便
F10	7.08	F9 的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₅ H ₂₆ NO ₁₁	516.150 1	516.151 1	1.9	340.118 7, 325.095 2, 324.087 2, 310.071 3, 296.092 4	尿液

续表 1

编号	t_R /min	化合物	分子式	$[M+H]^+$ /[M] ⁺ 理论值	$[M+H]^+$ /[M] ⁺ 实测值	δ /ppm	MS/MS 碎片离子	来源
F11	14.41	去亚甲基小檗碱的乙酰化产物	C ₂₁ H ₂₀ NO ₅	366.133 6	366.134 5	2.5	351.110 8, 350.103 1, 336.087 4, 322.107 9, 308.092 0	粪便
F12	13.36	去亚甲基小檗碱的硫酸化产物	C ₁₉ H ₁₈ NO ₇ S	404.079 9	404.080 8	2.3	324.123 5, 309.100 0, 308.092 2, 294.076 4, 280.097 2, 266.081 6	粪便
G	11.32	小檗红碱	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	322.107 4	322.108 1	2.2	307.084 8, 279.089 7, 249.079 2	尿液、粪便、血清
G1	9.38	小檗红碱的去甲基化产物	C ₁₈ H ₁₃ NO ₄	308.091 8	308.092 7	3.0	280.069 0, 250.086 7	粪便
G2	12.85	G1的脱饱和产物	C ₁₈ H ₁₁ NO ₄	306.076 1	306.077 3	4.0	278.082 3, 248.071 6	粪便
G3	10.31	G1的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₄ H ₂₁ NO ₁₀	484.123 9	484.124 9	2.2	308.092 6, 280.097 7, 250.087 5	尿液
G4	13.00	小檗红碱的甲基化产物	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄	336.123 1	336.124 2	3.3	321.100 7, 320.092 9, 306.077 1, 292.097 8, 278.082 1	粪便
H	11.53	药根碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	338.138 7	338.139 7	3.0	323.116 1, 322.108 4, 308.092 7, 294.113 3, 280.097 7	尿液、粪便
H1	9.67	药根碱的去甲基化产物	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄	324.123 1	324.123 7	1.9	309.100 1, 308.092 5, 294.076 8, 280.097 4, 266.081 8	尿液、粪便
H2	6.71	H1的还原产物	C ₁₉ H ₂₀ NO ₄	326.138 7	326.140 0	4.0	311.115 6, 310.107 2, 296.091 6, 282.103 4, 268.085 7	粪便
H3	6.12	H1的氧化产物	C ₁₉ H ₁₈ NO ₅	340.118 0	340.119 2	3.6	325.095 5, 324.087 7, 310.072 0, 296.092 7, 282.077 1	粪便
H4	11.05	H1的乙酰化产物	C ₂₁ H ₂₀ NO ₅	366.133 7	366.134 3	1.7	351.110 8, 350.103 0, 336.087 2, 322.107 9, 308.092 4	粪便
H5	9.42	H1的葡萄糖醛酸结合产物	C ₂₅ H ₂₆ NO ₁₀	500.155 2	500.156 7	3.0	324.123 7, 309.100 4, 308.092 8, 294.077 3, 280.096 9	尿液
H6	13.00	药根碱的脱饱和产物	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	336.123 1	336.124 3	3.6	321.100 7, 320.092 9, 306.077 1, 292.097 8, 278.082 1	粪便
H7	13.05	药根碱的甲基化产物	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.155 1	352.155 2	0.2	337.131 5, 336.123 9, 322.108 1, 308.128 8, 294.113 1	粪便
H8	10.09	H7的还原产物	C ₂₁ H ₂₄ NO ₄	354.170 8	354.169 4	-3.9	339.138 2, 338.130 6, 324.087 3, 310.134 3, 296.074 5	粪便
H9	27.10	H7的氧化产物	C ₂₁ H ₂₂ NO ₅	368.150 1	368.150 1	0.1	353.126 5, 352.118 7, 338.103 0, 324.123 6, 310.108 0	粪便
H10	14.57	H7的乙酰化产物	C ₂₃ H ₂₄ NO ₅	394.165 7	394.167 0	3.3	379.143 5, 378.135 7, 364.119 8, 350.140 3, 336.124 7	粪便
H11	9.47	药根碱的氧化产物	C ₂₀ H ₂₀ NO ₅	354.133 6	354.134 6	2.9	339.111 2, 338.103 5, 324.087 7, 310.108 4, 296.092 7	粪便
H12	11.36	药根碱的乙酰化产物	C ₂₂ H ₂₂ NO ₅	380.149 3	380.149 9	1.6	365.126 3, 364.118 6, 350.102 8, 336.123 4, 322.107 1	粪便
I	12.99	黄连碱	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	320.092 3	320.092 3	0.0	292.097 9, 290.082 3, 262.087 3	粪便
J	13.00	小檗碱	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	336.123 0	336.124 2	3.5	321.100 7, 320.092 9, 306.077 1, 292.097 8, 278.082 1	粪便、血清
J1	12.13	小檗碱的去甲基化产物	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄	322.107 4	322.108 0	1.9	307.084 6, 292.061 0, 279.089 5	尿液、粪便、血清
J2	13.79	小檗碱的甲基化产物	C ₂₁ H ₂₀ NO ₄	350.138 7	350.139 7	2.9	335.116 2, 334.108 4, 320.097 6, 306.113 4, 292.097 6	粪便
J3	14.84	小檗碱的氧化产物	C ₂₀ H ₁₈ NO ₅	352.118 0	352.118 7	2.0	337.131 7, 336.123 9, 322.108 1, 308.128 8, 294.113 1	粪便
J4	8.65	J3的还原产物	C ₂₀ H ₂₀ NO ₅	354.133 7	354.134 4	2.0	339.111 0, 338.103 3, 324.087 5, 310.108 3, 296.092 6	粪便

续表 1

编号	t_R /min	化合物	分子式	$[M+H]^+$ /[M] ⁺ 理论值	$[M+H]^+$ /[M] ⁺ 实测值	δ /ppm	MS/MS 碎片离子	来源
J5	11.05	J3的甲基化产物	C ₂₁ H ₂₀ NO ₅	366.133 7	366.134 3	1.7	351.110 8, 350.103 0, 336.087 2, 322.107 9, 308.092 4	粪便
J6	14.34	小檗碱的乙酰化产物	C ₂₂ H ₂₀ NO ₅	378.133 6	378.134 5	2.4	363.111 0, 362.103 1, 348.087 3, 320.092 3	粪便
K	13.24	巴马汀	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.154 3	352.155 2	2.4	337.131 6, 336.123 9, 322.108 1, 320.129 0, 308.128 8, 294.113 1	粪便、血清
K1	11.28	巴马汀的去甲基化产物	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	338.138 7	338.139 5	2.4	323.116 5, 322.099 0, 308.082 9, 294.103 7, 280.087 9	粪便
K2	14.20	巴马汀的脱饱和产物	C ₂₁ H ₂₀ NO ₄	350.138 7	350.139 7	2.9	335.116 2, 334.108 4, 320.097 6, 306.113 4, 292.097 6	粪便
K3	13.82	巴马汀的甲基化产物	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄	366.170 0	366.170 8	2.2	351.147 2, 350.139 4, 336.123 7, 322.128 7, 308.128 7	粪便
K4	12.75	巴马汀的氧化产物	C ₂₁ H ₂₂ NO ₅	368.149 3	368.150 0	2.0	353.126 6, 352.118 7, 338.103 1, 324.123 7, 310.108 1	粪便
K5	14.57	巴马汀的乙酰化产物	C ₂₃ H ₂₄ NO ₅	394.164 9	394.165 8	2.3	379.143 6, 378.135 7, 364.119 8, 350.140 3, 336.124 7	粪便
L	13.93	脱氢紫堇碱	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄	366.170 0	366.170 7	1.9	351.147 3, 350.139 6, 336.123 8, 322.144 5, 308.128 8	粪便
L1	9.68	脱氢紫堇碱的去甲基化产物	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.154 4	352.155 0	1.8	337.131 7, 336.123 9, 322.108 1, 308.128 8, 294.113 1	粪便、血清
L2	16.34	脱氢紫堇碱的脱饱和产物	C ₂₂ H ₂₂ NO ₄	364.154 4	364.156 4	5.5	349.134 8, 348.124 9, 334.109 2, 320.093 4	粪便
M	21.39	黄柏酮酸	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	473.217 0	473.218 2	2.5	455.207 2, 437.196 8, 427.212 5, 411.217 6, 409.202 0, 393.207 1	尿液、粪便、血清
M1	17.72	柏酮酸的去甲基化产物	C ₂₅ H ₃₀ O ₈	459.201 4	459.202 6	2.7	441.191 7, 423.181 1, 413.273 4, 395.186 2, 379.190 9	粪便
M2	22.24	黄柏酮酸的脱饱和产物	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.201 4	471.202 7	2.8	453.191 9, 435.181 5, 425.197 3, 409.202 1, 407.186 4, 391.191 8	尿液、粪便
N	22.30	黄柏内酯	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.201 4	471.202 2	1.8	453.192 4, 427.212 6, 425.197 0, 409.202 1, 367.191 3	粪便
N1	17.70	黄柏内酯的氧化产物	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	487.196 3	487.197 7	2.9	469.186 9, 443.207 6, 441.192 1, 425.197 0	粪便
O	25.46	黄柏酮	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	455.206 4	455.207 9	3.2	437.197 6, 411.218 2, 409.202 6, 303.139 3	尿液、粪便、血清

准分子离子峰比F7大176 Da,推测F8为F7的葡萄糖醛酸结合产物。代谢物F9准分子离子峰 m/z 340.119 2,比F大16 Da,生成碎片 m/z 325.095 5 $[M-CH_3]^+$, 324.087 7 $[M-CH_4]^+$, 310.072 0 $[M-2CH_3]^+$, 296.092 7 $[M-CH_4-CO]^+$, 282.077 1 $[M-CH_4-CO-CH_2]^+$,推测代谢物F9为F氧化产物。代谢物F10准分子离子峰 m/z 516.151 1比F9大176 Da,推测F10为F9的葡萄糖醛酸结合产物。代谢物F11准分子离子峰 m/z 366.134 5比F多42 Da,推测其为F的乙酰化产物。代谢物F12的准分子离子峰 m/z 404.080 8比F多80 Da,碎片离子 m/z 324.123 5 $[M-SO_3]^+$ 与F准分子离子峰相同,同时具有相同的碎片离子 m/z 309.100 0 $[M-SO_3-CH_3]^+$, 308.092 2 $[M-SO_3-CH_4]^+$, 294.076 4 $[M-SO_3-2CH_3]^+$, 280.097 2

$[M-SO_3-CH_4-CO]^+$, 266.081 6 $[M-SO_3-CH_4-CO-CH_2]^+$,推测代谢物F12为F的硫酸化产物。去亚甲基小檗碱可能的代谢途径见图2。

3.3 柠檬苦素类及其代谢产物的鉴定 大鼠灌胃给予关黄柏水提物后在生物样品中检测到了黄柏内酯、黄柏酮、黄柏酮酸3种柠檬苦素类成分及其代谢物^[17]。柠檬苦素类成分在大鼠体内主要进行I相代谢反应。黄柏内酯(N)存在于粪便中,其 $t_R=22.30$ min,准分子离子峰 m/z 471.202 2裂解后产生了系列碎片离子 m/z 453.192 4 $[M+H-H_2O]^+$, 427.212 6 $[M+H-CO_2]^+$, 425.197 0 $[M+H-CH_2O_2]^+$, 409.202 1 $[M+H-CH_2O_2-O]^+$, 367.191 3 $[M+H-C_3H_4O_4]^+$ 。代谢物N1准分子离子峰 m/z 487.197 7比N大16 Da,故推测其为N的氧化产物,在N1的

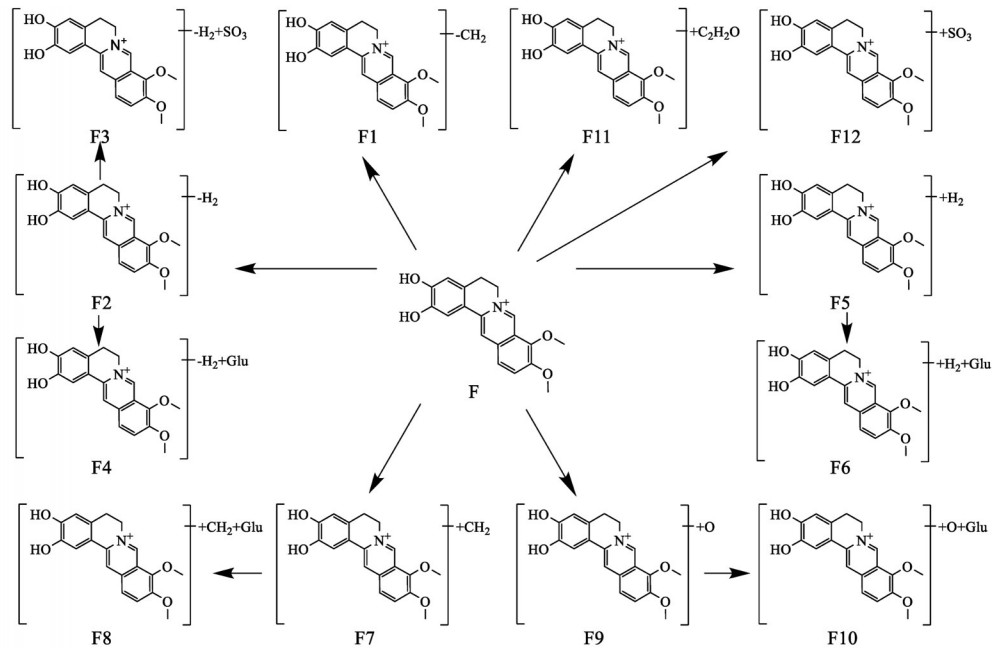


图2 去亚甲基小檗碱在大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 2 Possible metabolic pathways of demethyleneberberine in rats

二级质谱中,与N具有相同的碎裂模式,产生碎片 m/z 469.186 9 $[M+H-H_2O]^+$, 443.207 6 $[M+H-CO_2]^+$, 441.192 1 $[M+H-CH_2O_2]^+$, 425.197 0 $[M+H-CH_2O_2-O]^+$ 。黄柏酮酸(M)存在于血清、尿液和粪便中, $t_R=21.39$ min, 准分子离子峰 m/z 473.218 2 裂解产生碎片离子 m/z 455.207 2 $[M+H-H_2O]^+$, 437.196 8 $[M+H-2H_2O]^+$, 427.212 5 $[M+H-CH_2O_2]^+$, 411.217 6 $[M+H-CH_2O_3]^+$, 409.202 0 $[M+H-H_2O-CH_2O_2]^+$, 393.207 1 $[M+H-H_2O-CH_2O_3]^+$ 。代谢物 M1 的准分子离子峰 m/z 459.202 6 比 M 小 14 Da, 碎片离子有 m/z 441.191 7 $[M+H-H_2O]^+$, 423.181 1 $[M+H-2H_2O]^+$, 413.273 4 $[M+H-CH_2O_2]^+$, 395.186 2 $[M+H-H_2O-CH_2O_2]^+$, 379.190 9 $[M+H-H_2O-CH_2O_3]^+$, 推测其为 M 的去甲基化产物。代谢物 M2 准分子离子峰 m/z 471.202 7 比 M 小 2 Da, 推测 M2 为 M 的脱饱和产物。

4 讨论

本文采用对关黄柏水提物在大鼠血清、尿液和粪便中的原型成分及其代谢产物进行鉴定。通过比较给药后样品和空白样品的差异,在正离子模式下共鉴定了 70 个外源性成分,包括 15 个原型成分和 55 个代谢产物,15 种原型成分在大鼠体内主要发生脱饱和、甲基化、氧化、硫酸化及葡萄糖醛酸结合等反应,可为阐明关黄柏物质基础提供实验依据。

在本实验发现的 15 种原型成分中,其中 7 种在关黄柏甲醇提取物的大鼠体内代谢研究中被报

道^[21],其余 8 种原型成分(去甲乌药碱,*N*-甲基四氢罂粟碱,去亚甲基小檗碱,小檗红碱,药根碱,黄连碱,脱氢紫堇碱,黄柏酮酸)在灌胃给予关黄柏提取物后的大鼠生物样本中被首次发现,这可能缘于药材提取方式、样本种类和检测条件的差异。相比前期研究发现的去甲基化、甲基化和葡萄糖醛酸化代谢途径,在本实验中发现了关黄柏中生物碱的脱饱和、乙酰化、硫酸化代谢产物和柠檬苦素的去甲基化、脱饱和及氧化代谢产物,为全面阐释关黄柏药效物质基础奠定了基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 阿合尔扎马尼·麦麦提,米热阿依·亚力昆,太力艾提·吐尔洪,等. 干寒环境对大鼠尿液与血浆代谢成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(11): 115-120.
- [2] ZHU C Y, CAI T T, JIN Y, et al. Artificial intelligence and network pharmacology based investigation of pharmacological mechanism and substance basis of Xiaokewan in treating diabetes [J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 104935.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [4] SUN Y, LENON G B, YANG A W H. Phellodendri Cortex: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 7621929.

- [5] FUJII A, OKUYAMA T, WAKAME K, et al. Identification of anti-inflammatory constituents in Phellodendri Cortex and Coptidis Rhizoma by monitoring the suppression of nitric oxide production [J]. *J Nat Med*, 2017, 71(4): 745-756.
- [6] CUÉLLAR M J, GINER R M, RECIO M C, et al. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(3): 221-229.
- [7] WANG W, ZU Y G, FU Y J, et al. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Phellodendron amurense* Rupr. from China [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(1): 195-203.
- [8] LI X N, ZHANG A H, WANG M J, et al. Screening the active compounds of Phellodendri Amurensis Cortex for treating prostate cancer by high-throughput chinmedomics [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46234.
- [9] WANG L, WANG X, ZHU X M, et al. Gastroprotective effect of alkaloids from Cortex Phellodendri on gastric ulcers in rats through neurohumoral regulation [J]. *Planta Med*, 2017, 83(3/4): 277-284.
- [10] XUE B J, ZHAO Y Y, MIAO Q, et al. *In vitro* and *in vivo* identification of metabolites of magnoflorine by LC LTQ-Orbitrap MS and its potential pharmacokinetic interaction in Coptidis Rhizoma decoction in rat [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(8): 1235-1248.
- [11] ZHANG Y, WU W H, HAN F M, et al. LC/MS/MS for identification of *in vivo* and *in vitro* metabolites of jatrorrhizine [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(12): 1360-1367.
- [12] 韩凤梅, 朱明明, 陈怀侠, 等. 液相色谱-串联电喷雾离子阱质谱法鉴定大鼠尿液中药根碱代谢物 [J]. *药科学报*, 2006, 41(9): 846-851.
- [13] WANG K, CHAI L W, DING L Q, et al. Identification of metabolites of palmatine in rats after oral administration using ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2017, 31(6): 523-537.
- [14] WANG K, FENG X C, CHAI L W, et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 139-157.
- [15] 李梦, 徐佳, 赵梅, 等. UPLC-Q-TOFMS/MS 联用技术分析大鼠肠道微生物体外对小檗碱的代谢产物 [J]. *信阳师范学院学报: 自然科学版*, 2014, 27(4): 510-514.
- [16] XU P, XU C, LI X X, et al. Rapid Identification of berberine metabolites in rat plasma by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1994.
- [17] WANG P, SUN J B, GAO E Z, et al. Simultaneous determination of limonin, dictamnine, obacunone and fraxinellone in rat plasma by a validated UHPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Cortex Dictamni extract [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 928: 44-51.
- [18] WANG H Y, SUN H, ZHANG A H, et al. Rapid identification and comparative analysis of the chemical constituents and metabolites of Phellodendri Amurensis Cortex and Zhibai Dihuang pill by ultra-performance liquid chromatography with quadrupole TOF-MS [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(24): 3874-3882.
- [19] LI X N, ZHANG A H, SUN H, et al. Rapid discovery of absorbed constituents and metabolites in rat plasma after the oral administration of Zi Shen Wan using high-throughput UHPLC-MS with a multivariate analysis approach [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(24): 4700-4711.
- [20] LIU X W, ZHANG F, GAO S H, et al. Metabolite profiling of Zi-Shen pill in rat biological specimens by UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(2): 145-160.
- [21] WANG H Y, YAN G L, ZHANG A H, et al. Rapid discovery and global characterization of chemical constituents and rats metabolites of Phellodendri Amurensis Cortex by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry coupled with pattern recognition approach [J]. *Analyst*, 2013, 38(11): 3303-3312.
- [22] WAN M Q, LIU X Y, GAO H, et al. Systematic analysis of the metabolites of Angelicae Pubescentis Radix by UPLC-Q-TOF-MS combined with metabonomics approaches after oral administration to rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 188: 113445.
- [23] 许荣蓉, 刘浩龙, 陈筱清, 等. HPLC-FT-MS 鉴定芫花总生物碱在大鼠粪便及尿液中的代谢产物 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(9): 1798-1805.
- [24] SUN H, WANG H Y, ZHANG A H, et al. Chemical discrimination of Cortex Phellodendri Amurensis and Cortex Phellodendri chinensis by multivariate analysis approach [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(45): 41-49.

[责任编辑 刘德文]