

# 毛橘红醇提物中柚皮苷、柚皮素在大鼠尿液和粪便中的代谢与排泄

孙国玲<sup>1</sup>, 钱大玮<sup>1\*</sup>, 段金廛<sup>1</sup>, 李向明<sup>2</sup>, 万建义<sup>2</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 广东化州市绿色生命有限公司, 广东 广州 510016)

**摘要:** 为分析毛橘红醇提物中柚皮苷、柚皮素在大鼠尿液和粪便中的代谢与排泄, 本文给健康 SD 大鼠连续灌胃毛橘红醇提物 3 天, 于第 3 天给药后, 收集 0~24 h 的粪便和 0~4、4~8 和 8~24 h 的尿液, 使用 UPLC-Q-TOF/MS 仪器与 Metabolynx<sup>TM</sup> 软件分析。结果显示, 在大鼠含药尿液中存在柚皮苷及其 6 个代谢产物、柚皮素及其 4 个代谢产物; 在含药粪便中存在柚皮苷及其 3 个代谢产物、柚皮素及其 2 个代谢产物。

**关键词:** 毛橘红; 柚皮苷; 柚皮素; 代谢产物; UPLC-MS

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 06-0761-06

## UPLC-Q-TOF/MS analysis of naringin and naringenin and its metabolites in rat urine and feces after intragastric administration of alcohol extract of *Exocarpium Citri Grandis*

SUN Guo-ling<sup>1</sup>, QIAN Da-wei<sup>1\*</sup>, DUAN Jin-ao<sup>1</sup>, LI Xiang-ming<sup>2</sup>, WAN Jian-yi<sup>2</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Huazhou Green Life Co., Ltd., Guangzhou 510016, China)

**Abstract:** To analyze naringin, naringenin and its metabolites in rat urine and feces after intragastric administration of alcohol extract of *Exocarpium Citri Grandis*, healthy SD rats were fed with alcohol extract of *Exocarpium Citri Grandis* for 3 days. On the last day, 0-24 h feces and 0-4 h, 4-8 h, 8-24 h urine were collected and analyzed by UPLC-Q-TOF/MS. The post-acquisition data were processed using Metabolynx<sup>TM</sup>. The result is that naringin and its 6 metabolites, naringenin and its 4 metabolites were detected in the urine of rat. Meanwhile, naringin and its 3 metabolites, naringenin and its 2 metabolites were detected in the feces of rat.

**Key words:** *Exocarpium Citri Grandis*; naringin; naringenin; metabolite; UPLC-MS

毛橘红为芸香科植物化州柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮, 具有散寒、燥湿、利气、消痰的功效<sup>[1]</sup>, 单独使用或配制成复方使用。黄酮是毛橘红的主要有效成分之一, 黄酮类成分中主要含有柚皮苷、野漆树苷、柚皮素等<sup>[2]</sup>。柚皮苷及其苷元柚皮素在降血脂、镇静、抗氧化、抗动脉粥样硬化等方面具有较强的生物活性<sup>[3]</sup>。本文采用 UPLC-Q-TOF/MS 联用技术, 以及质量丢失滤过 (MDF) 处理方法快速检测大鼠灌胃毛橘红醇提物后在尿液和粪便中柚皮苷及柚皮素的代谢物, 为毛橘红药效物质基础研究提供依

据。

### 材料与方法

**仪器与试剂** UPLC Acquity 系统 (Waters 公司); Synapt Q-TOF 质谱仪 (Waters 公司), 配有 Lock-spray 接口; 电喷雾离子源 (ESI); Masslynx 4.1 质谱工作站软件 (Waters 公司), Metabolynx 分析软件 (Waters 公司)。柚皮苷 (naringin) 和柚皮素 (naringenin) 购自中国药品生物制品检定所 (批号分别为: 722-200107、05-2010, 供含量测定)。毛橘红药材由广东化州市绿色生命有限公司提供, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为芸香科植物化州柚的干燥外层果皮, 毛橘红醇提物由本实验室制备。

收稿日期: 2009-12-05.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811916, E-mail: qiandw05@yahoo.com.cn

**动物** SD 大鼠, 雄性, 7~8 周龄, 清洁级, 体重量 (240 ± 10) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 合格证号 SCXK(沪) 2007-0005。

**UPLC 检测条件** 色谱柱: Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 1.7 μm (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 柱; 流动相: 乙腈 (A) - 0.5% 醋酸水 (B) 梯度洗脱 (0 min, 3% A, 3~8 min, 13% A, 12 min, 20% A, 17 min, 35% A, 22 min, 60% A, 30~32 min, 95% A, 34~36 min, 3% A); 柱温 35 °C; 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 5 μL。

**MS 检测条件** ESI 源, 扫描方式: ESI± 模式, 毛细管电压: 3 kV, 锥孔电压: 40 V, 离子源温度: 120 °C, 脱溶剂气温度: 350 °C, 锥孔气流量: 50 L·h<sup>-1</sup>, 脱溶剂气流量: 600 L·h<sup>-1</sup>, 碰撞能量 (6~40 V), 离子能量: 1 V; 准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽 (leucine-enkephalin, ESI<sup>+</sup>: *m/z* 556.277 1, ESI<sup>-</sup>: *m/z* 555.261 5) 溶液为锁定质量溶液。扫描范围: *m/z* 100~1 000, 数据采集方式和模式: centroid 与 MS<sup>E</sup>, 数据分析: 质量丢失滤过 (MDF)。

**毛橘红醇提物的制备** 取毛橘红药材 300 g, 加 70% 乙醇 8 倍量, 浸泡 1 h, 回流提取 3 次, 第 1 次 1.5 h, 后两次分别 1 h, 合并 3 次滤液, 减压浓缩至 100 mL, 其中每毫升含柚皮苷 269.3 mg、柚皮素 0.688 mg。此液每毫升相当于生药 3 g。

**对照品溶液的制备** 取柚皮苷、柚皮素对照品用甲醇分别制成质量浓度为 21.4 和 28.1 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**空白样品及含药样品的制备** 取 SD 大鼠 6 只, 随机分为空白组和给药组, 给药前禁食 12 h (自由饮水), 按照 16 mL·kg<sup>-1</sup> 体重, 分别灌予蒸馏水和毛橘

红醇提物。每日 1 次, 连续给药 3 天, 末次给药后, 收集 0~4、4~8 和 8~24 h 的尿液和 0~24 h 的粪便。将同一时间段的给药大鼠和空白大鼠尿液分别合并, 各取尿液 1 mL, 加乙腈 420 μL, 离心 10 min (10 000 r·min<sup>-1</sup>), 取上清液即得。将给药大鼠和空白大鼠的粪便分别合并, 碾碎混匀, 各取 1 g 加 70% 乙腈 3 mL, 超声 10 min, 然后离心 10 min (10 000 r·min<sup>-1</sup>), 取上清液 0.5 mL, 加蒸馏水 670 μL, 再离心 10 min (10 000 r·min<sup>-1</sup>), 取上清液, 分别作为空白样品及给药后样品。

**数据处理** 将柚皮苷与柚皮素 I 相可能的代谢途径如: 还原、羟化后还原、氧化、羟化甲基化等; II 相可能的代谢途径如: 甲基化、乙酰化、磺酸化、羟化再磺酸化、葡萄糖醛酸化、羟化再葡萄糖醛酸化、磺酸化葡萄糖醛酸化、双葡萄糖醛酸化、脱糖等输入 Metabolynx 软件 Metabolite List 窗口中, 质谱数据检测误差范围 < 10 mDa, 软件自动根据采集的数据及设置的处理方法进行分析。

## 结果

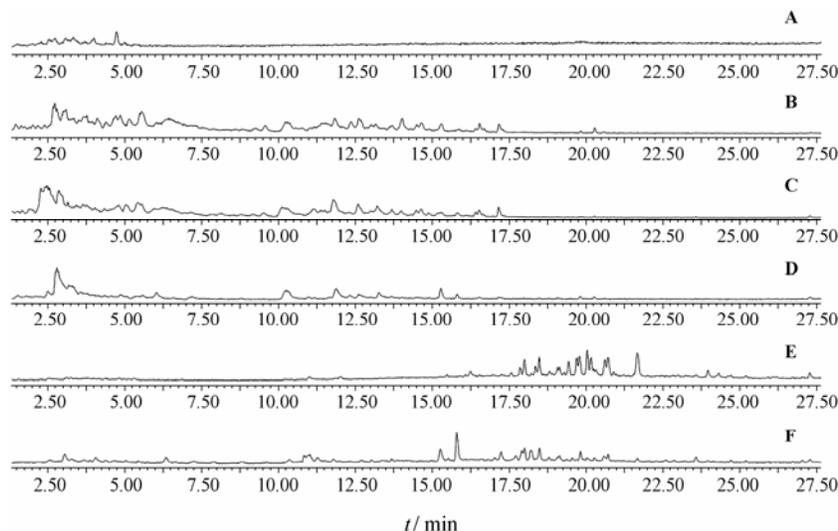
### 1 含药样品 UPLC-Q-TOF/MS 分析

空白尿液、粪便和给药尿液、粪便样品负离子条件下的总离子流图如图 1, 在正离子条件下, 给药尿液、粪便未得到较好的响应信号。

### 2 大鼠尿液、粪便中柚皮苷、柚皮素及其代谢物的鉴定

#### 2.1 数据处理

采用 Metabolynx 软件将 UPLC-Q-TOF/MS 采集的 MS 数据进行处理, 该软件以质量丢失滤过 (MDF)



**Figure 1** Total ion chromatograms in the positive mode of the samples. A: Blank urine sample; B: 0-4 h drug-containing urine sample; C: 4-8 h drug-containing urine sample; D: 8-24 h drug-containing urine sample; E: Blank fecal sample; F: 0-24 h drug-containing fecal sample

处理为基础,用于复杂生物基质中快速检测药物代谢物<sup>[4]</sup>。经 Metabolyx 软件处理后,检测到的大鼠尿液及粪便中柚皮苷、柚皮素及其代谢产物见表 1。

## 2.2 化合物的鉴定

### 2.2.1 原形化合物的鉴定

各时间段尿液及粪便样品中存在  $m/z$  579 的化合物 M1 ( $t_R = 11.0$  min), 此成分在一级质谱中有  $m/z$  579、459、271、150 峰, 其中  $m/z$  579 [M-H]<sup>-</sup> 为分子离子峰, 与柚皮苷对照品相同, 由此确定其为柚皮苷。

各时间段尿液及粪便样品中存在  $m/z$  271 的化合物 M2 ( $t_R = 15.3$  min), 此成分一级质谱中有  $m/z$  271、177、150、119 峰, 其中  $m/z$  271 [M-H]<sup>-</sup> 为分子离子峰, 与柚皮素对照品相同, 由此确定其为柚皮素。

黄酮苷转运进入肠壁上皮细胞后, 可以被存在于其中的广谱  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (broad-specific  $\beta$ -glucoside enzyme, BS $\beta$ G) 水解为苷元, 然后以苷元或苷元进一步形成的结合产物的形式进入循环系统。所以大鼠尿液中的柚皮素一部分为毛橘红醇提取物中柚皮素原形吸收, 一部分为柚皮苷的代谢物。

### 2.2.2 葡萄糖醛酸结合产物的鉴定

各时间段尿液样品中都存在两个  $m/z$  755 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M3 和 M4 ( $t_R$  分别为 3.6 和 8.1 min), 两成分一级质谱中主要碎片离子峰有  $m/z$  755 [M-H]<sup>-</sup>、579 [M-Glc]<sup>-</sup>、459、271 [M-Glc-Rutinosyl]<sup>-</sup>,  $m/z$  755 [M-H]<sup>-</sup> 为分子离子峰, 推测这两个化合物为柚皮苷的葡萄糖醛酸代谢物。柚皮苷 5 位、4' 位都可以结合葡萄糖醛酸, 由于两者的质谱信号基本相同, 都存在  $m/z$  579 [M-Glc]<sup>-</sup> 碎片, 未发现  $m/z$  635、326、295 碎片, 表明在发生 RDA 裂

解之前已经裂解掉葡萄糖醛酸, 因此二者分别为 naringin-5-*O*-glucuronide 和 naringin-4'-*O*-glucuronide, 仅 MS 信号无法将其区分。

在粪便样品中,  $t_R$  为 3.6 min 处存在  $m/z$  755 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M3, 此成分为柚皮苷的葡萄糖醛酸代谢物。而另一个柚皮苷的葡萄糖醛酸代谢物 M4 却未发现。

在大鼠各时间段尿液样品中存在  $m/z$  623 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M5 ( $t_R = 4.4$  min), 此化合物在一级质谱中有  $m/z$  447 [M-Glc]<sup>-</sup>、271 [M-Glc-Glc]<sup>-</sup> 的主要碎片离子峰, 为柚皮素双葡萄糖醛酸代谢物, 由于柚皮素的 7-OH、4'-OH、5-OH 都可以结合葡萄糖醛酸, 若为 7-OH 和 4'-OH 结合葡萄糖醛酸或 5-OH 和 4'-OH 结合葡萄糖醛酸, 则应出现  $m/z$  326、295 的碎片离子, 若为 7-OH 和 5-OH 结合葡萄糖醛酸, 则应出现  $m/z$  502 的碎片离子, 但是在一级质谱中未出现  $m/z$  326、295、502 碎片离子, 表明在发生 RDA 裂解之前已经裂解掉葡萄糖醛酸。

各时间段尿液及粪便样品中存在  $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M6 ( $t_R = 10.3$  min), 此化合物在一级质谱中有  $m/z$  271 [M-Glc]<sup>-</sup>、 $m/z$  150 的主要碎片离子峰, 为柚皮素单葡萄糖醛酸代谢物。柚皮素可以代谢为 7-OH、4'-OH、5-OH 葡萄糖醛酸结合物, 存在  $m/z$  326 的碎片离子峰, 是由 RDA 裂解产生, 由此推测应是柚皮素 5-OH 或 7-OH 结合葡萄糖醛酸的产物。

### 2.2.3 羟化硫酸化产物的鉴定

大鼠 4~8 h 含药尿液样品中存在  $m/z$  675 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M7 ( $t_R = 2.0$  min), 此化合物一级质谱中主要碎片离子峰有  $m/z$  579

Table 1 Reviewed metabolite summary for naringin and naringenin by Metabolyx software

No.	Mass	Metabolite	Formula	Mass difference	$\Delta M_f$	$t_R$ /min	Source
M1	580.179 2	A: parent	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	-0.001 4	-1.4	11.0	Urine-1, 2, 3, Feces
M2	272.068 5	B: parent	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-0.005 2	5.1	15.3	Urine-1, 2, 3, Feces
M3	756.211 3	A+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	176.023 4	-4.5	3.6	Urine-1, 2, 3, Feces
M4	756.211 3	A+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	176.036 2	4.1	8.1	Urine-1, 2, 3
M5	624.132 6	B+2C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	352.055 5	-8.6	4.4	Urine-1, 2, 3
M6	448.100 6	B+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	176.031 6	-0.5	10.3	Urine-1, 2, 3, Feces
M7	676.130 9	A+O+SO <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>18</sub> S	95.946 5	-5.2	2.0	Urine-2
M8	660.136 0	A+SO <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub> S	79.957 3	0.5	6.4	Urine-3, Feces
M9	352.025 3	B+SO <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> S	79.953 4	-3.5	13.5	Urine-2, 3
M10	596.174 1	A+O	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	16.004 5	9.6	7.9	Urine-3
M11	772.206 2	A+O+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	192.036 9	9.9	4.4	Urine-3
M12	528.057 4	B+SO <sub>3</sub> +C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> S	255.980 2	-8.8	5.5	Urine-1, 2, 3
M13	622.189 8	A+CH <sub>3</sub> CO	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	42.001 8	-8.8	13.7	Feces
M14	274.084 1	B+2H	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	2.012 0	-3.6	15.8	Feces

A: Naringin; B: Naringenin; Urine-1: 0-4 h drug-containing urine sample; Urine-2: 4-8 h drug-containing urine sample; Urine-3: 8-24 h drug-containing urine sample; Feces: 0-24 h drug-containing fecal sample

[M-O-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、271 [M-O-SO<sub>3</sub>-Rutinose]<sup>-</sup>，为柚皮苷羟化硫酸结合物。柚皮苷发生氧化反应后被代谢成 3', 4'-二羟基黄酮<sup>[5]</sup>。硫酸结合物可能结合在 A 环或 B 环的-OH 上，碎片离子峰 *m/z* 230 是柚皮苷先脱去芸香糖再发生 RDA 裂解产生的，所以推测柚皮苷 A 环上的 5-OH 结合了-SO<sub>3</sub>。

**2.2.4 硫酸结合产物的鉴定** 大鼠 8~24 h 含药尿液和粪便样品中存在 *m/z* 659 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M8 (*t<sub>R</sub>* = 6.4 min)，此化合物有 *m/z* 579 [M-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、459、351 [M-Rutinose]<sup>-</sup>、271 [M-SO<sub>3</sub>-Rutinose]<sup>-</sup> 的主要碎片离子峰，为柚皮苷的代谢产物柚皮苷硫酸化物。柚皮苷 5-OH 与 4'-OH 易结合硫酸，在质谱图中存在 *m/z* 199 碎片峰，此碎片峰来源于 M8 的 RDA 裂解，由此分析应是柚皮苷 4'-OH 结合硫酸产生的碎片离子，故推测 M8 为 naringin-4'-O-sulfate。

大鼠 4~8 h 和 8~24 h 含药尿液样品中存在 *m/z* 351 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M9 (*t<sub>R</sub>* = 13.5 min)，此化合物的主要碎片离子峰有 *m/z* 271 [M-SO<sub>3</sub>-Rutinose]<sup>-</sup>、177、151，为柚皮素硫酸化物。柚皮素 7-OH、5-OH 与 4'-OH 易结合硫酸，存在 *m/z* 199 碎片峰，此碎片峰来源于 M9 的 RDA 裂解，由此分析应是柚皮素 4'-OH 结合硫酸产生的碎片离子，故推测 M9 为 naringenin-4'-O-sulfate。

**2.2.5 羟化产物的鉴定** 大鼠 8~24 h 含药尿液样品中存在 *m/z* 595 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M10 (*t<sub>R</sub>* = 7.9 min)，此化合物的主要碎片离子峰有 *m/z* 579 [M-O]<sup>-</sup>、459、271 [M-O-Rutinose]<sup>-</sup>，为柚皮苷羟化产物。根据 M7 中的推论，柚皮苷 3' 位会被氧化，最终被氧化为 3', 4'-二羟基黄酮。

**2.2.6 羟化葡萄糖醛酸结合产物的鉴定** 大鼠 8~24 h 含药尿液样品中存在 *m/z* 771 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M11 (*t<sub>R</sub>* = 4.4 min)，此化合物的主要碎片离子峰有 *m/z* 595 [M-Glc]<sup>-</sup>、271 [M-O-Glc-Rutinose]<sup>-</sup>，为柚皮苷羟化葡萄糖醛酸化结合物，是体内酶的催化作用下同时发生羟化反应和葡萄糖醛酸结合反应而生成的代谢物。柚皮苷发生氧化反应后被氧化成 3', 4'-二羟基黄酮。葡萄糖醛酸结合物可能结合在 A 环或 B 环的-OH 上，碎片离子峰 *m/z* 311 是柚皮苷发生了 RDA 裂解产生的，所以推测柚皮苷 B 环上结合了葡萄糖醛酸，但是，具体是 3' 还是 4' 位结合未能通过 MS 来确定。

**2.2.7 硫酸化葡萄糖醛酸结合产物的鉴定** 各时间段尿液样品中存在 *m/z* 527 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M12 (*t<sub>R</sub>* = 5.5 min)，此化合物的主要碎片离子峰有 *m/z* 447 [M-

SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、351 [M-Glc]<sup>-</sup>、271 [M-Glc-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>，为柚皮素代谢产物柚皮素葡萄糖醛酸硫酸化结合物。此结合产物是在动物体内由葡萄糖醛酸化酶和硫酸转移酶共同催化下产生的。文献<sup>[6]</sup>报道，给人服用葡萄柚汁后，在人尿液中发现了柚皮素的代谢物柚皮素葡萄糖醛酸硫酸化结合产物。柚皮素的 7-OH、4'-OH、5-OH 都可结合葡萄糖醛酸或硫酸分子。若是 A 环上的 7-OH、5-OH 结合葡萄糖醛酸和硫酸，则质谱中应出现 *m/z* 406 的碎片峰，若是 A 环结合葡萄糖醛酸，B 环上的 4'-OH 结合硫酸应出现 *m/z* 326、199 的碎片峰，若是 A 环结合硫酸，B 环上的 4'-OH 结合葡萄糖醛酸应出现 *m/z* 230、295 的碎片峰，而在质谱中未出现 *m/z* 406、326、199、230、295 碎片峰，表明在发生 RDA 裂解之前已经裂解掉葡萄糖醛酸和硫酸。

**2.2.8 乙酰化结合产物的鉴定** 大鼠含药粪便样品中存在 *m/z* 621 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M13 (*t<sub>R</sub>* = 13.7 min)，此化合物的主要碎片离子峰有 *m/z* 579 [M-Ac]<sup>-</sup>、459、271 [M-Ac-Rutinose]<sup>-</sup>，为柚皮苷乙酰化结合物。柚皮苷 5-OH 与 4'-OH 容易结合乙酰基，碎片峰 *m/z* 501 来源于 M13 的 RDA 裂解，由此分析应是柚皮苷 5-OH 结合乙酰基产生的碎片离子，故推测 M13 为 naringin-5-O-acetylate。

乙酰化反应是在酰基转移酶的催化下进行的，以乙酰辅酶 A 作为辅酶，对羟基进行乙酰化反应。

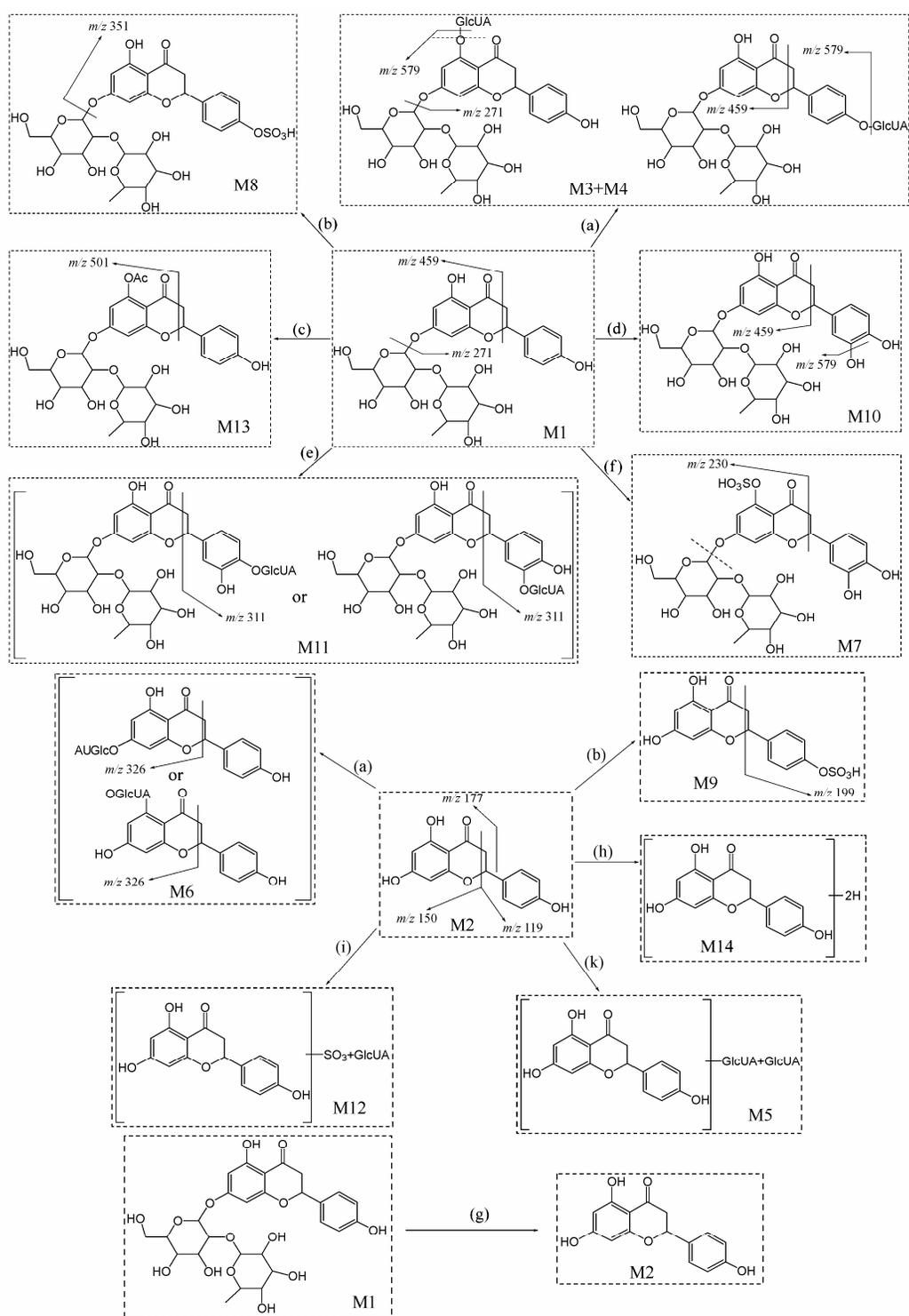
**2.2.9 被还原产物的鉴定** 大鼠含药粪便中存在 *m/z* 273 [M-H]<sup>-</sup> 的化合物 M14 (*t<sub>R</sub>* = 15.8 min)，此化合物的主要碎片离子峰有 *m/z* 273、271、151、119，为柚皮素还原化代谢物。

## 2.3 柚皮苷、柚皮素代谢物结构与主要的代谢途径

根据以上代谢物鉴定的结果，推测柚皮苷、柚皮素代谢物结构与主要的代谢途径如图 2。

## 讨论

本文使用了 UPLC-Q-TOF/MS 联用技术，能同时得到准分子离子和不同撞击能量下子离子图谱的 MS<sup>E</sup> 数据采集方式，并运用以质量丢失滤过 (MDF) 为基础的代谢物寻找软件 Metabolynx<sup>TM</sup> 来处理数据。MDF 是一个数据处理方法，它能将 LC-MS 采集到的高分辨率数据和预先设定的可能代谢物的质量亏损数据通过软件处理来推测目标代谢物<sup>[7]</sup>。Metabolynx<sup>TM</sup> 软件是通过含药样品与空白样品比对进行分析，去除所有干扰离子而简化质谱图的解析，从而能从复杂生物基质中快速检测药物代谢物，使



**Figure 2** Chemical structures of naringin, naringenin metabolites identified in the drug-containing urine and fecal samples and their proposed major metabolic pathways. GlcUA = glucuronyl unit; Ac = acetyl group. a: Glucuronidation; b: Sulfation; c: Acetylation; d: Hydroxylation; e: Hydroxylation + glucuronidation; f: Hydroxylation + sulfation; g: Loss of rutinose; h: Reduction; i: Sulfation + glucuronidation; k: 2×glucuronidation

高分辨 LC-MS 成为快速筛选和确认代谢物的有用平台<sup>[8-10]</sup>。

在大鼠含药尿液中发现柚皮苷与柚皮素原形及柚皮苷 1 个 I 相代谢产物 (M10) 和 5 个 II 相代谢产

物 (M3、M4、M7、M8 和 M11), 柚皮素 4 个 II 相代谢产物 (M5、M6、M9 和 M12)。柚皮苷在大鼠尿液中 0~4 h 主要以原形和葡糖醛酸结合物的形式被排泄, 4~8 h 尿液中出现了羟化硫酸化代谢物, 8 h 后,

又产生了新的代谢物形式(羟化、羟化葡萄糖醛酸化和硫酸化代谢物)。柚皮素在尿液中 0~4 h 主要以原形和单葡萄糖醛酸、双葡萄糖醛酸、硫酸化葡萄糖醛酸结合物的形式被排泄, 4~8 h 以硫酸化代谢物的形式被排泄, 8 h 后无新的代谢形式出现。

在大鼠含药粪便中发现柚皮苷与柚皮素原形及柚皮苷 3 个 II 相代谢产物 (M3、M8 和 M13), 柚皮素 1 个 I 相代谢产物 (M14) 和 1 个 II 相代谢产物 (M6)。柚皮苷在大鼠粪便中 0~24 h 以原形以及硫酸化、乙酰化、葡萄糖醛酸结合代谢产物的形式被排泄, 柚皮素以原形以及还原化、葡萄糖醛酸结合代谢产物的形式被排泄。

其中, 柚皮苷、柚皮素代谢物柚皮素双葡萄糖醛酸苷 (M5)、柚皮素葡萄糖醛酸 (M6)、柚皮素硫酸酯 (M9)、柚皮素葡萄糖醛酸基和硫酸酯基共价结合物 (M12) 已见报道<sup>[6, 11]</sup>。柚皮苷 5-*O*-葡萄糖醛酸苷和柚皮苷 4'-*O*-葡萄糖醛酸苷 (M3 和 M4)、羟基化柚皮苷硫酸酯 (M7)、柚皮苷 4'-*O*-硫酸酯 (M8)、羟基化柚皮苷甲醚 (M10)、羟基化柚皮苷葡萄糖醛酸苷 (M11)、柚皮苷乙酰化物 (M13)、柚皮素还原化代谢物 (M14) 未见报道。毛橘红中其他成分的代谢与排泄有待进一步研究。

## References

- [1] State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 51-52.
- [2] Yuan XJ, Lin L, Chen ZX. Phenolic constituents in *Epicarpium Citri Grandis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35: 498-500.
- [3] Yang HL, Tian H, Li PB. Biological activity of naringin and naringenin [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30: 752-754.
- [4] Zhang XZ, Li Y. Advances in studies on the detection of drug reactive metabolites by LC-MS [J]. *J Int Pharm Res* (国际药学研究杂志), 2009, 36: 393-396.
- [5] Pei LK, Guo BL. Advances in studies on absorption and metabolism of flavonoids [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 41: 568-572.
- [6] Zhang JM, Brodbelt JS. Screening flavonoid metabolites of naringin and narirutin in urine after human consumption of grapefruit juice by LC-MS and LC-MS/MS [J]. *Analyst*, 2004, 129: 1227-1233.
- [7] Zhang H, Zhang D, Ray K. A software filter to remove interference ions from drug metabolites in accurate mass liquid chromatography/mass spectrometric analyses [J]. *J Mass Spectrom*, 2003, 38: 1110-1112.
- [8] Bateman KP, Castro-Perez J, Wrona M, et al. MSE with mass defect filtering for *in vitro* and *in vivo* metabolite identification [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 1485-1496.
- [9] Zhu M, Ma L, Zhang D, et al. Detection and characterization of metabolites in biological matrices using mass defect filtering of liquid chromatography/high resolution mass spectrometry data [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1722-1733.
- [10] Tiller PR, Yu S, Castro-Perez J, et al. High-throughput, accurate mass liquid chromatography/tandem mass spectrometry on a quadrupole time-of-flight system as a 'first-line' approach for metabolite identification studies [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 1053-1061.
- [11] Silberberg M, Gil-Izquierdo A, Combaret L, et al. Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2006, 60: 529-535.