

基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术鉴定薄荷在大鼠体内的入血成分及代谢产物

张 昱, 马惠玲, 麦 曦*, 王浣璐

南昌大学药学院, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 研究薄荷 *Mentha haplocalyx* 在大鼠体内的入血成分及代谢产物。方法 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)联用技术鉴定薄荷入血成分及代谢产物。采用 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 5 μL。结果 建立了大鼠给药后血浆样品的分析测定方法, 并且与空白生物样品、薄荷提取物和对照品的保留时间及质谱离子碎片信息对比, 共鉴定了 28 个入血原型成分、39 个代谢产物, 其中 1 个为未曾报道过的木犀草素的新代谢产物。结论 薄荷在大鼠体内的代谢途径包括氧化、还原、甲基化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸化等, 其中以 II 相反应为主。所建立的方法简单可靠, 为揭示薄荷的药效物质基础提供理论依据。

关键词: 薄荷; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 原型成分; 代谢产物; 代谢途径; 木犀草素

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章** 0253-2670(2017)19-3927-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.005

Identification of components and metabolites of *Mentha haplocalyx* in rats plasma by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHANG Yu, MA Hui-ling, MAI Xi, WANG Huan-lu

School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: **Objective** To investigate the prototype components and metabolites of *Mentha haplocalyx* in rats plasma. **Methods** UHPLC-Q-TOF-MS/MS method was developed and applied to identify the components and metabolites of rat plasma. The analysis was carried out on an Eclipse Plus C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 3.5 μm, Agilent) with the mobile phase of 0.1% acetic acid solution (A)-acetonitrile (B) at a flowing rate of 0.3 mL/min, and the injection volume was 5 μL. **Results** The developed method was applicable to the analysis and identification of metabolites of *M. haplocalyx* after oral administration. A total of 67 compounds, including 28 prototype components and 39 metabolites (one of which was a new metabolite of luteolin unreported), were identified by comparison of their retention time, ion fragmentation information with that of the blank biological samples, herb extract, and reference compounds. **Conclusion** The metabolic pathway of *M. haplocalyx* in rats were consisted of oxidation, reduction, methylation, sulfation, and glucuronidation, and the main metabolic pathway was phase II metabolic pathway among of them. This experimental method is simple and reliable, which could provide theoretical basis for elucidating the bioactive components of *M. haplocalyx*.

Key words: *Mentha haplocalyx* Briq.; UHPLC-Q-TOF-MS/MS; prototype components; metabolites; metabolic pathway; luteolin

薄荷为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分, 为常用的辛凉解表药^[1], 具有抗炎、抗菌、解热、镇痛等作用^[2-3], 常用于治疗心悸、失眠、水肿、感冒发热、目赤肿痛、疮疡肿毒等病症^[4]。现代药理学研究表明, 薄荷还具有抗

癌、抗肿瘤、抗氧化等药理作用^[5-6], 但其药效物质基础不明确, 并且目前尚未有关于薄荷入血成分及代谢产物的研究。因此, 本实验采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)联用技术鉴定大鼠血浆中薄荷的入血成分及代谢产物, 共

收稿日期: 2016-12-09

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20122BAB205038); 南昌大学研究生创新专项基金项目(cx2016295)

作者简介: 张 昱(1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究。Tel: 15879092136 E-mail: 1277922273@qq.com

*通信作者 麦 曦(1963—), 女, 理学博士, 博士生导师, 教授, 从事药物分析研究。Tel: 13970866198 E-mail: maixi123@aliyun.com

鉴定了28个入血原型成分、39个代谢产物,其中1个为未曾报道过的木犀草素的新代谢产物;并推测其入血成分的代谢途径,为进一步研究薄荷的药效物质基础及作用机制提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Nexera X2 LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); Triple-TOFTM 5600⁺高分辨质谱仪(美国AB SCIEX公司,配备ESI离子源,Analyst TF 1.6数据处理软件,Peak View数据处理软件); TG16A-WS台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Vortex Mixer XW-80A涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器有限公司); MTN-2800W氮气吹干仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 材料

薄荷药材购自北京同仁堂药店(南昌),并由南昌大学药学院凌云副教授鉴定为薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥叶;水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,甲酸等其余试剂均为分析纯。

SD大鼠,雄性,体质量(200±10)g,由南昌大学动物实验中心提供,动物许可证号SYXK(赣)2010-0002。将大鼠置于饲养盒中适应性喂养7d,保持室内12h光照、12h黑暗,给予标准饲料及饮用水,控制室内温度18~26℃,相对湿度40%~60%。

2 方法

2.1 薄荷混悬液的制备

称取薄荷粉末适量,加甲醇超声提取2次,蒸干后得到薄荷提取物,然后加入0.1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液溶解至浓度为20mg/mL,备用。

2.2 动物给药与血浆样品采集

3只雄性SD大鼠,给药前禁食12h,自由饮水。以43.75g/kg薄荷提取物ig给予大鼠,给药前采集空白血浆,为尽可能多地采集药物在不同时间点的代谢物,参照文献方法^[7],采取了8个时间点的血样,合并血样,即分别于给药后0.25、0.5、1、2、3、4、6、8h进行眼内眦静脉取血,每次取血0.5mL(采用左、右眼交叉取血的方法),将血样收集至肝素化的EP管中,室温下4000r/min离心10min,取上层血清,储存在-20℃冰箱中备用。

2.3 血浆样品处理

将3只SD大鼠各个时间点的血浆混合后,取500μL血浆样品,加入1mL乙腈,涡旋提取1min,

以15000r/min离心5min,取上清液至另一干净的EP管中,残渣加入1mL乙腈复溶,重复上述操作1次,合并上清液,45℃氮气流吹干。固体残渣用100μL甲醇复溶,涡旋1min,15000r/min离心5min后,取上清液于0.22μm微孔滤膜滤过,取5μL进行LC-MS/MS分析,样品处理方法是在前期实验方法的基础上优化得到的^[8]。

2.4 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈色谱柱(100mm×4.6mm, 3.5μm, Agilent); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序: 0~8min, 5%~10%B; 8~15min, 10%~30%B; 15~29min, 30%~33%B; 29~35min, 33%~34%B; 35~50min, 34%~56%B; 50~60min, 56%~95%B; 60~65min, 95%~5%B; 体积流量0.3mL/min; 柱温25℃; 检测波长254nm; 进样量5μL; 分析时间65min。

质谱条件: 离子源为电喷雾离子化源(ESI),正、负离子模式; 质量扫描范围 m/z 50~1250, 喷雾电压±4500V, 雾化气温度500℃, 去簇电压(DP)±100V。采用TOF-MS-IDA-MS/MS方法采集数据。

3 结果与分析

运用UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术,分析大鼠ig薄荷后的血浆样品和空白血浆对照样品,获得入血原型成分及代谢物。对于有对照品的化合物,通过与对照品比对保留时间、特征碎片离子来确定其结构及分子式,对于没有对照品的化合物,根据文献及碎片离子信息来确定其结构及分子式。最终在大鼠血浆样品中分析鉴定出28个入血原型成分和39个代谢产物,见表1和2;其提取离子流色谱图分别见图1和2。

3.1 入血原型成分的鉴定

图1的离子峰5、7、11、13、16、18、21和26与相应对照品的保留时间、碎片离子信息比较,分别鉴定为咖啡酸、橙皮苷、苯甲酸、木犀草素、芦荟大黄素、大黄素、大黄酸和大黄酚;峰11的保留时间($t_R=21.36$ min)与苯甲酸对照品的保留时间($t_R=21.31$ min)相近,且典型碎片离子 $[M-H]^-$ m/z 121.0293, 77.0414与苯甲酸对照品的碎片离子 $[M-H]^-$ m/z 121.0291, 77.0415一致,因此,峰11被鉴定为苯甲酸,结果见图3。峰13的保留时间($t_R=24.69$ min)与木犀草素对照品的保留时间

表 1 薄荷入血原型成分的鉴定

Table 1 Identification of prototype components *in vivo*

峰号	t_R/min	$[M-H]^-/[M+H]^+$ (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	分子式	鉴定化合物
1	2.94	719.160 7	0.8	(+) 719.161 3	$C_{36}H_{30}O_{16}$	丹酚酸 B
2	3.50	719.158 3	-3.3	(+) 719.158 3	$C_{36}H_{30}O_{16}$	紫草酸 B
3	9.52	197.045 2	-2.0	(-) 197.045 2	$C_9H_{10}O_5$	丹参素
4	14.86	163.040 1	-2.6	(-) 163.039 6, 119.050 4, 93.036 2	$C_9H_8O_3$	反式桂皮酸
5	16.00	179.035 0	-0.6	(-) 179.034 9	$C_9H_8O_4$	咖啡酸
6	16.64	153.019 3	-1.0	(-) 153.019 2, 135.008 7, 109.030 5, 91.020 5, 65.043 4	$C_7H_6O_4$	龙胆酸
7	19.05	611.197 1	-3.3	(+) 611.1950	$C_{28}H_{34}O_{15}$	橙皮苷
8	20.12	149.097 2	-2.4	(-) 149.096 8	$C_{10}H_{14}O$	香芹酚
9	20.45	303.086 5	0.7	(+) 303.086 3, 177.053 9, 153.018 3	$C_{16}H_{14}O_6$	橙皮素
10	21.13	137.132 5	-3.0	(+) 137.132 5, 95.086 5, 81.070 5, 67.054 5	$C_{10}H_{16}$	α -蒎烯
11	21.36	121.029 6	0.9	(-) 121.0296, 92.0277, 77.0414	$C_7H_6O_2$	苯甲酸
12	23.70	135.116 3	-3.9	(+) 135.116 8, 91.054 5, 77.037 9	$C_{10}H_{14}$	对伞花烃
13	24.69	287.055 0	0.1	(+) 287.055 0, 153.018 3	$C_{15}H_{10}O_6$	木犀草素
14	28.22	137.132 1	-2.6	(+) 137.127 6, 95.086 0, 81.069 9, 77.039 1	$C_{10}H_{16}$	β -蒎烯
15	29.41	445.114 0	-2.9	(-) 445.111 7, 357.095 2, 225.095 2, 181.064 7	$C_{22}H_{22}O_{10}$	田蓟苷
16	30.76	271.060 1	-0.6	(+) 271.059 1, 215.086 3, 153.020 7	$C_{15}H_{10}O_5$	芦荟大黄素
17	31.40	447.128 0	-1.2	(+) 447.128 6	$C_{22}H_{22}O_{10}$	异黄酮苷
18	35.52	271.058 7	-5.0	(+) 271.060 1	$C_{15}H_{10}O_5$	大黄素
19	35.71	301.074 3	2.1	(+) 301.070 7, 184.002 1	$C_{16}H_{12}O_6$	香叶木素
20	38.50	447.128 6	-0.8	(+) 429.117 3, 385.090 5, 237.075 4, 193.048 9	$C_{22}H_{22}O_{10}$	椴树素
21	46.13	283.024 8	-1.8	(-) 283.022 7, 239.033 9, 183.044 3	$C_{15}H_8O_6$	大黄酸
22	46.49	943.526 1	-4.7	(+) 943.526 1	$C_{48}H_{78}O_{18}$	醉鱼草苷
23	47.50	285.076 5	2.5	(+) 285.075 8, 270.056 0, 119.087 0, 67.053 4	$C_{16}H_{12}O_5$	刺槐素
24	51.82	359.112 5	-0.4	(+) 359.112 5, 298.083 9	$C_{19}H_{18}O_7$	5-羟基-6,7,8,4'-四甲氧基黄酮
25	58.68	457.366 6	-2.2	(+) 457.367 6, 439.348 8, 175.152 2, 133.107 9	$C_{30}H_{48}O_3$	齐墩果酸
26	59.68	255.064 8	-1.5	(+) 255.063 8, 199.075 0, 152.061 7	$C_{15}H_{10}O_4$	大黄酚
27	60.94	457.367 6	-1.0	(+) 457.367 6	$C_{30}H_{48}O_3$	熊果酸
28	61.45	153.128 5	-3.9	(-) 153.127 9	$C_{10}H_{18}O$	桉叶素

($t_R=24.71$ min) 相近, 峰 13 在正离子模式下的典型碎片离子 $[M+H]^+ m/z$ 287.054 7, 153.018 3, 85.019 3 与木犀草素在负离子模式下的碎片离子 $[M-H]^- m/z$ 285.040 8, 151.004 0, 83.016 0 分别多 2, 因此, 峰 13 被鉴定为木犀草素, 结果见图 4。峰 16 的保留时间($t_R=30.67$ min) 与芦荟大黄素对照品的保留时间($t_R=30.62$ min) 相近, 峰 16 在正离子模式下的碎片离子 $[M+H]^+ m/z$ 271.059 1, 153.020 7 与芦荟大黄素在负离子模式下的碎片离子 $[M-H]^- m/z$ 269.045 6, 151.003 8 分别多 2, 因

此, 峰 16 被鉴定为芦荟大黄素, 结果见图 5。峰 21 的保留时间($t_R=46.13$ min) 与大黄酸对照品的保留时间($t_R=46.14$ min) 相近, 且碎片离子 $[M-H]^- m/z$ 283.023 8, 239.034 2, 211.038 9, 183.044 2 与大黄酸对照品的碎片离子 $[M-H]^- m/z$ 283.025 4, 239.035 6, 211.040 5, 183.045 6 一致, 因此, 峰 21 被鉴定为大黄酸, 结果见图 6。其余成分, 结合文献报道^[9-14]和保留时间分别推断为丹酚酸 B、紫草酸 B、丹参素、反式桂皮酸、龙胆酸、香芹酚、橙皮素、 α -蒎烯、对伞花烃、 β -蒎烯、田蓟苷、异黄

表 2 薄荷在大鼠体内的代谢物的鉴定
Table 2 Identification of metabolites *in vivo*

峰号	t_R/min	$[M-H]^-/[M+H]^+$ (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	分子式	鉴定化合物
M1	2.90	445.114 4	3.3	(+) 445.112 9	$C_{22}H_{20}O_{10}$	1-甲基大萹酚-8- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M2	3.33	623.121 6	-4.3	(+) 623.124 3	$C_{27}H_{26}O_{17}$	芦荟大萹素-1,8- <i>O</i> -二葡萄糖醛酸苷
M3	3.69	799.119 4	2.4	(+) 799.117 5	$C_{36}H_{30}O_{19}S$	丹酚酸 B-7- <i>O</i> -硫酸酯
M4	4.73	315.087 6	3.9	(+) 315.086 3	$C_{17}H_{14}O_6$	5-甲基香叶木素
M5	13.01	181.050 6	-1.0	(-) 181.049 3, 163.038 9, 135.044 4, 119.049 8	$C_9H_{10}O_4$	二氢咖啡酸
M6	14.57	357.081 6	-1.0	(+) 357.081 6, 181.048 5, 163.038 1	$C_{15}H_{16}O_{10}$	咖啡酸-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M7	14.78	211.060 2	-4.7	(-) 211.061 2	$C_{10}H_{12}O_5$	丹参素甲基化物
M8	15.20	625.177 8	0.7	(-) 625.177 4	$C_{28}H_{34}O_{16}$	氧化橙皮苷
M9	15.26	273.006 3	-4.2	(-) 273.007 5	$C_{10}H_{10}O_7S$	3-甲基咖啡酸-4- <i>O</i> -硫酸酯
M10	15.36	623.123 3	-1.6	(+) 623.124 3	$C_{27}H_{26}O_{17}$	大萹素-1,8- <i>O</i> -二葡萄糖醛酸苷
M11	15.39	258.990 7	-4.4	(-) 258.991 8, 179.034 3, 135.044 9	$C_9H_8O_7S$	咖啡酸-3- <i>O</i> -硫酸酯
M12	15.59	595.165 8	-3.1	(+) 595.165 8	$C_{27}H_{30}O_{15}$	芦荟大萹素- <i>O</i> -二葡萄糖苷
M13	15.85	623.195 9	-3.6	(-) 623.198 1	$C_{29}H_{36}O_{15}$	5-甲基橙皮苷
M14	15.96	623.158 0	-4.3	(+) 623.160 7	$C_{28}H_{30}O_{16}$	田蓟苷-5- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M15	16.72	431.097 0	-0.8	(+) 431.097 3	$C_{21}H_{18}O_{10}$	大萹酚-1- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M16	16.85	691.150 5	-4.9	(+) 691.153 9	$C_{28}H_{34}O_{18}S$	橙皮苷-5- <i>O</i> -硫酸酯
M17	16.91	461.107 8	-0.8	(+) 461.107 8	$C_{22}H_{20}O_{11}$	大萹素甲醚-4- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M18	17.20	639.119 2	-0.1	(+) 639.119 2	$C_{27}H_{26}O_{18}$	木犀草素-3',4'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M19	18.03	447.092 0	-0.3	(+) 447.092 1	$C_{21}H_{18}O_{11}$	芦荟大萹素-1- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M20	18.49	447.092 2	-0.9	(+) 447.092 2, 271.060 0	$C_{21}H_{18}O_{11}$	大萹素-1- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M21	18.56	477.102 4	-0.8	(+) 447.102 8, 301.070 5, 286.047 9	$C_{22}H_{20}O_{12}$	3'-甲基木犀草素-4'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M22	18.73	331.175 2	0.2	(+) 331.175 1, 169.121 4, 123.115 0, 107.085 1	$C_{16}H_{26}O_7$	桉叶素- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M23	18.97	335.022 3	0.9	(+) 335.022 0	$C_{15}H_{10}O_7S$	大萹酚-1- <i>O</i> -硫酸酯
M24	19.29	195.065 5	-3.8	(-) 195.066 3	$C_{10}H_{12}O_4$	二氢阿魏酸
M25	19.47	415.066 9	-0.5	(+) 415.067 1	$C_{20}H_{16}O_{10}$	2-去甲基大萹酚-4- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M26	19.62	463.087 1	-1.0	(+) 463.086 7	$C_{21}H_{18}O_{12}$	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M27	19.76	461.069 2	-4.9	(+) 461.071 5	$C_{21}H_{16}O_{12}$	大萹酚-1- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M28	19.83	461.108 1	0.5	(+) 461.107 8	$C_{22}H_{20}O_{11}$	刺槐素-5- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M29	20.36	479.118 4	-0.9	(+) 479.118 4, 303.086 4, 177.054 5	$C_{22}H_{22}O_{12}$	橙皮素-3'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M30	21.74	351.015 9	-2.8	(+) 350.009 6	$C_{15}H_{10}O_8S$	大萹素-1- <i>O</i> -硫酸酯
M31	22.62	367.011 8	-0.8	(+) 367.011 8	$C_{15}H_{10}O_9S$	木犀草素-7- <i>O</i> -硫酸酯
M32	36.02	365.032 6	0.2	(+) 365.032 6, 285.071 0, 171.080 5	$C_{16}H_{12}O_8S$	刺槐素-5- <i>O</i> -硫酸酯
M33	43.36	195.065 2	-0.8	(+) 195.065 2, 163.039 1, 135.042 5, 77.038 9	$C_{10}H_{10}O_4$	3-甲基咖啡酸
M34	45.91	232.976 3	0.6	(-) 232.976 2	$C_7H_6O_7S$	龙胆酸-3- <i>O</i> -硫酸酯
M35	48.39	461.144 2	-1.2	(+) 461.144 2, 237.075 3, 207.064 6, 193.048 3	$C_{23}H_{24}O_{10}$	椴树素甲基化物
M36	50.70	461.144 1	-0.3	(+) 461.144 2, 399.107 7, 281.099 8, 207.061 7	$C_{23}H_{24}O_{10}$	5-甲基田蓟苷
M37	54.27	362.981 3	-1.0	(-) 362.981 6	$C_{15}H_8O_9S$	大萹酚-1- <i>O</i> -硫酸酯
M38	57.49	543.043 9	3.1	(+) 543.043 9	$C_{21}H_{18}O_{15}S$	木犀草素-3'- <i>O</i> -硫酸酯-4'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷
M39	62.48	167.144 1	0.3	(-) 167.144 1	$C_{11}H_{20}O$	桉叶素甲基化物

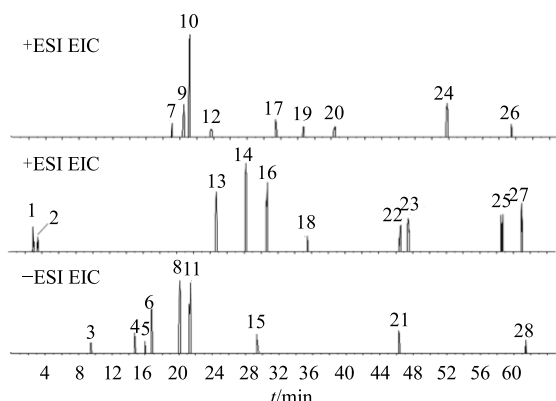


图 1 薄荷入血原型成分的提取离子流图

Fig. 1 EICs of prototype components of *M. haplocalyx* in rat plasma

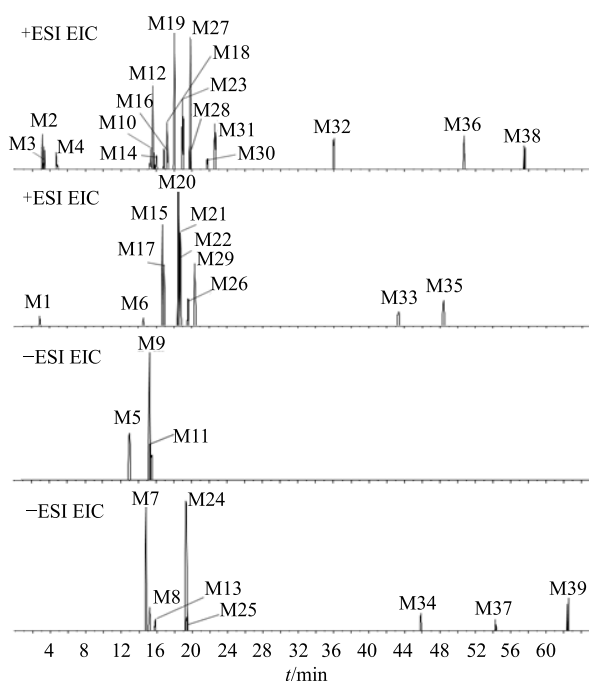


图 2 薄荷代谢物的提取离子流图

Fig. 2 EICs of metabolites of *M. haplocalyx*

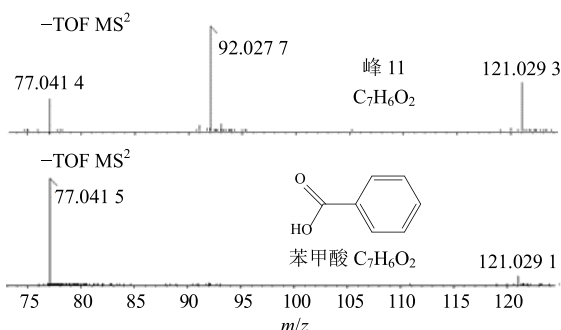


图 3 峰 11 和苯甲酸的质谱碎片信息

Fig. 3 MS spectra of peak 11 and benzoic acid

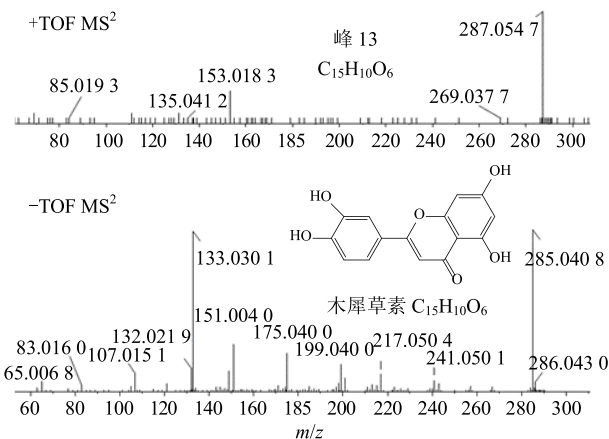


图 4 峰 13 和木犀草素的质谱碎片信息

Fig. 4 MS spectra of peak 13 and luteolin

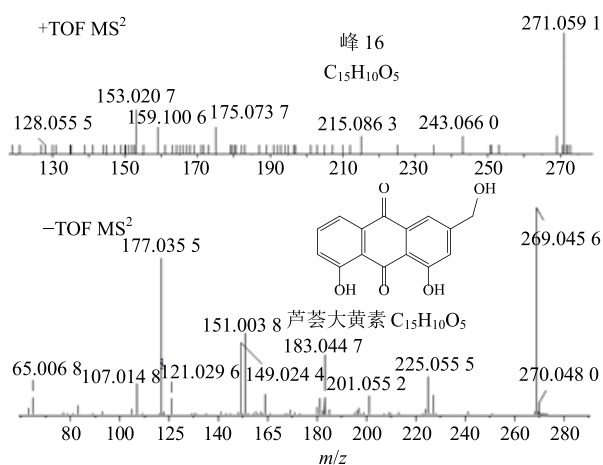


图 5 峰 16 和芦荟大黄素的质谱碎片信息

Fig. 5 MS spectra of peak 16 and aloe-emodin

酮苷、香叶木素、椴树素、醉鱼草苷、刺槐素、5-羟基-6,7,8,4'-四甲氧基黄酮、齐墩果酸、熊果酸和桉叶素。峰 20 ($t_R=38.50$ min) 的二级质谱数据中, $[M+H]^+$ m/z 447.128 6, 429.117 3, 385.090 5, 270.061 8, 237.075 4, 193.048 9, 153.022 0 与文献报道^[14]的椴树素的质谱碎片离子相似, 因此, 峰 20 推断为椴树素, 结果见图 7。峰 23 ($t_R=47.50$ min) 的二级质谱数据中, $[M+H]^+$ m/z 285.075 8, 270.056 0, 119.087 0, 81.069 3 与文献报道^[11]的刺槐素的质谱碎片离子相似, 因此, 峰 23 推断为刺槐素, 结果见图 8。

3.2 代谢物的鉴定

薄荷入血原型成分的代谢途径主要包括氧化、还原、甲基化、硫酸酯化和葡萄糖醛酸化等, 以薄

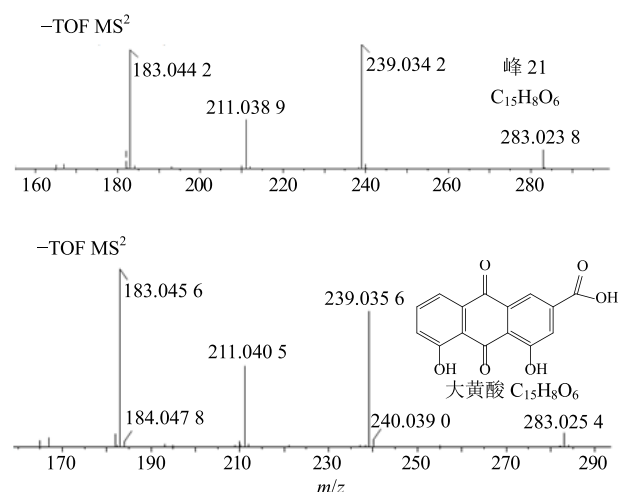


图6 峰21和大黄酸的质谱碎片信息

Fig. 6 MS spectra of peak 21 and rhein

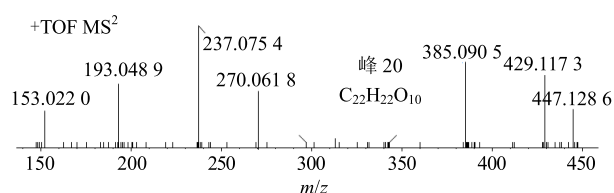


图7 峰20的质谱碎片信息

Fig. 7 MS spectra of peak 20

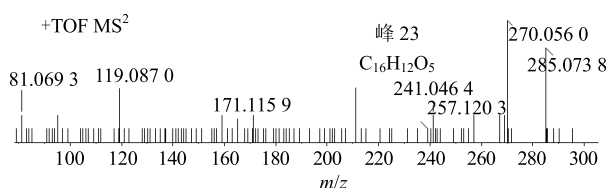


图8 峰23的质谱碎片信息

Fig. 8 MS spectra of peak 23

荷中的木犀草素、大黄素和咖啡酸为例说明黄酮类、蒽醌类和酚酸类等主要非挥发性成分的代谢途径。

3.2.1 木犀草素的体内代谢物 M18、M21、M26、M31 和 M38 的分子式分别为 $C_{27}H_{26}O_{18}$ (相对分子质量 638.111 9, $t_R=17.20$ min)、 $C_{22}H_{20}O_{12}$ (相对分子质量 476.095 5, $t_R=18.56$ min)、 $C_{21}H_{18}O_{12}$ (相对分子质量 462.079 8, $t_R=19.62$ min)、 $C_{15}H_{10}O_9S$ (相对分子质量 366.004 6, $t_R=22.62$ min) 和 $C_{21}H_{18}O_{15}S$ (相对分子质量 542.036 6, $t_R=57.49$ min)。**M18** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 639.119 2, 与木犀草素 ($C_{15}H_{10}O_6$) 相比, 增加了 352 ($M+2C_6H_8O_6$), 根据精确相对分子质量及误差, 可以推测 **M18** 为木犀草素-3',4'-*O*-葡萄糖醛酸苷; **M21** 的

准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 477.102 4, 与木犀草素相比, 增加了 190 ($M+CH_2+C_6H_8O_6$), 其二级质谱碎片离子 m/z 301.070 5 $[M+H-C_6H_8O_6]^+$, 286.047 9 $[M+H-C_6H_8O_6-CH_2]^+$, 初步推断 **M21** 为 3'-甲基木犀草素-4'-*O*-葡萄糖醛酸苷; **M26** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 463.087 1, 与木犀草素相比, 增加了 176 ($M+C_6H_8O_6$), 可以推测 **M26** 为木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷; **M31** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 367.011 8, 与木犀草素相比, 增加了 80 ($M+SO_3$), 可以推测 **M31** 为木犀草素-7-*O*-硫酸酯; **M38** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 543.043 9, 与木犀草素相比, 增加了 256 ($M+SO_3+C_6H_8O_6$), 可以推测 **M38** 为木犀草素-3'-*O*-硫酸酯-4'-*O*-葡萄糖醛酸苷, 经 SciFinder 检索, 该化合物为未曾报道过的木犀草素的新代谢物, 木犀草素的代谢途径见图 9。

3.2.2 大黄素的体内代谢物 M10、M20 和 M30 的分子式分别为 $C_{27}H_{26}O_{17}$ (相对分子质量 622.117 0, $t_R=15.36$ min)、 $C_{21}H_{18}O_{11}$ (相对分子质量 446.084 9, $t_R=18.49$ min) 和 $C_{15}H_{10}O_8S$ (相对分子质量 350.009 6, $t_R=21.74$ min)。**M10** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 623.123 3, 与大黄素 ($C_{15}H_{10}O_5$) 相比, 增加了 352 ($M+2C_6H_8O_6$), 可以推测 **M10** 为大黄素-1,8-*O*-二葡萄糖醛酸苷; **M20** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 447.092 2, 与大黄素相比, 增加了 176 ($M+C_6H_8O_6$), 其典型的碎片离子 m/z 271.060 0 $[M+H-C_6H_8O_6]$, 说明 **M20** 为大黄素-1-*O*-葡萄糖醛酸苷; **M30** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 351.015 9, 与大黄素相比, 增加了 80 ($M+SO_3$), 可以推测 **M30** 为大黄素-1-*O*-硫酸酯; 另外, 也证实了大黄素、大黄酚、芦荟大黄素和大黄酸可以在体内互相转化, 这与文献报道一致^[15-16], 大黄素的代谢途径见图 10。

3.2.3 咖啡酸的体内代谢物 M5、M6、M9、M11、M24 和 M33 的分子式分别为 $C_9H_{10}O_4$ (相对分子质量 182.057 9, $t_R=13.01$ min)、 $C_{15}H_{16}O_{10}$ (相对分子质量 356.074 4, $t_R=14.57$ min)、 $C_{10}H_{10}O_7S$ (相对分子质量 274.014 7, $t_R=15.26$ min)、 $C_9H_8O_7S$ (相对分子质量 259.999 1, $t_R=15.39$ min)、 $C_{10}H_{12}O_4$ (相对分子质量 196.073 6, $t_R=19.29$ min) 和 $C_{10}H_{10}O_4$ (相对分子质量 194.057 9, $t_R=43.36$ min), **M5** 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 181.050 6, 与咖啡酸 ($C_9H_8O_4$) 相比, 增加了 2 ($M+2H$), 根据精确相对分子质量及误差, 可以推测 **M5** 为咖啡酸

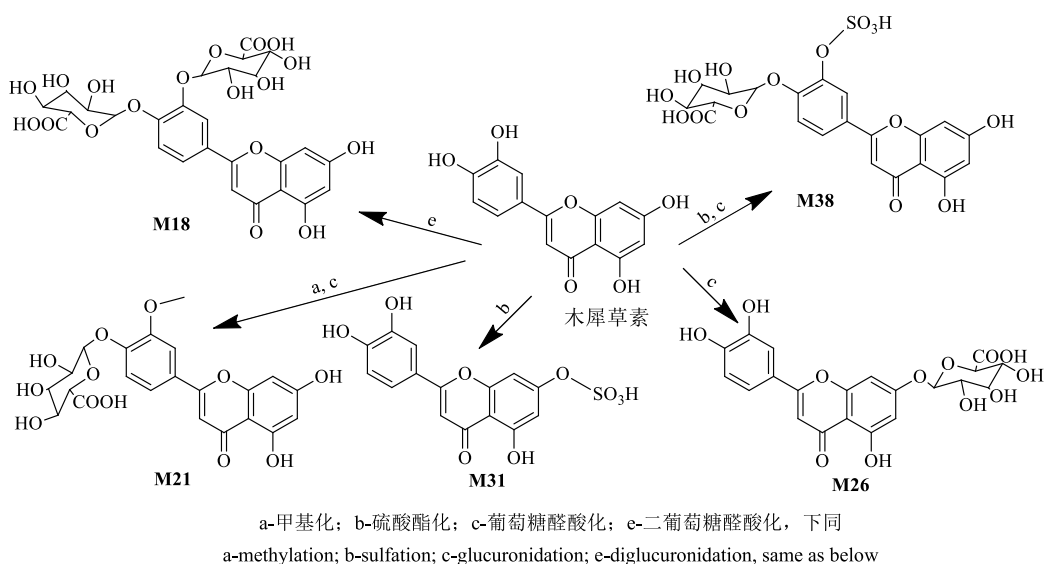


图9 木犀草素的代谢途径

Fig. 9 Metabolic pathways of luteolin

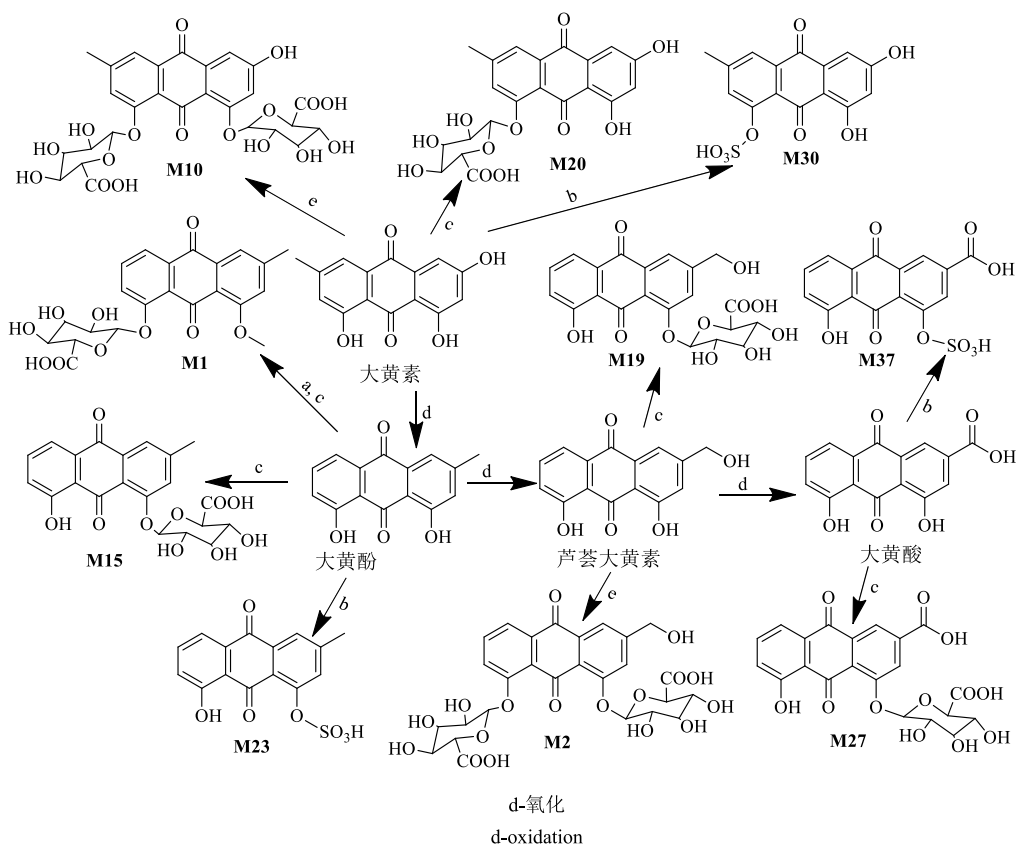


图10 大黄素的代谢途径

Fig. 10 Metabolic pathways of emodin

的还原代谢物, 即二氢咖啡酸。

M6的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 357.081 6, 与咖啡酸相比, 增加了 176 ($M+C_6H_8O_6$), 同时, 其典型的碎片离子 m/z 181.048 5 $[M+H-C_6H_8O_6]^+$,

推断 **M6** 为咖啡酸-3-*O*-葡萄糖醛酸苷。

M9的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 273.006 3, 与咖啡酸相比, 增加了 94 ($M+CH_2+SO_3$), 因此, 推测 **M9** 为 3-甲氧基咖啡酸-4-*O*-硫酸酯; **M11** 的准

分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 258.990 7, 与咖啡酸相比, 增加了 80 ($M+SO_3$), 其典型的碎片离子 m/z 179.034 3 $[M-H-C_6H_5O_6]^-$, 推测 **M11** 为咖啡酸-3-*O*-硫酸酯; **M24** 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 195.065 5, 与咖啡酸相比增加了 16 ($M+CH_2+2H$), 与文献报道的一致^[17], 因此, 推测 **M24** 为二氢阿魏酸; **M33** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 195.065 2, 与咖啡酸相比增加了 14 ($M+CH_2$), 因此, 推测 **M33** 为 3-甲氧基咖啡酸, 咖啡酸的代谢途径见图 11。

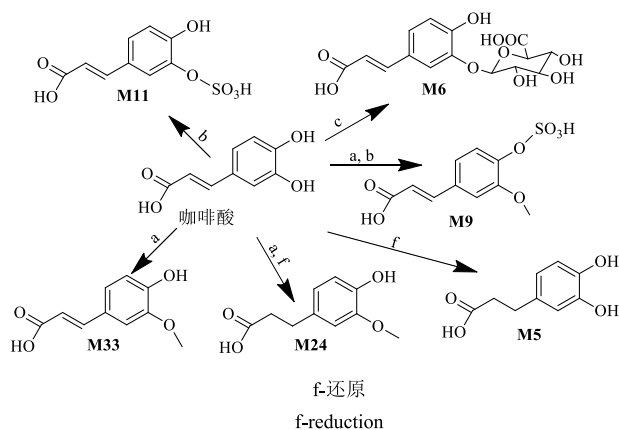


图 11 咖啡酸的代谢途径

Fig. 11 Metabolic pathways of caffeic acid

4 讨论

UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术利用提取离子流色谱图, 可以从复杂的生物样品基质中得到无干扰的代谢产物的质谱信息。故本实验采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定了大鼠血浆中薄荷的入血成分及代谢产物。在大鼠血浆中, 共检测到 28 个入血原型成分、39 个代谢产物, 并且发现 1 个木犀草素的新代谢物, 结果表明薄荷入血成分的代谢途径包括: I 相代谢(氧化、还原)和 II 相代谢(甲基化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸化), 其中以 II 相代谢反应为主。

到目前为止, 还没有文献报道关于薄荷体内代谢的研究, 本实验运用高分辨质谱对薄荷进行体内研究, 发现薄荷的入血原型成分, 并鉴定了其代谢物, 为薄荷的进一步开发和临床合理应用奠定了理论基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 房海灵, 李维林, 任冰如, 等. 薄荷属植物的化学成分及药理学研究进展 [J]. 中国药业, 2010, 19(10): 13-17.
- [3] 康连森, 邢晓轲, 卫世乾. 薄荷提取物的抗菌活性研究 [J]. 南阳师范学院学报, 2013, 12(6): 21-23.
- [4] 景玉霞, 兰 卫. 薄荷的化学成分和药理作用 [J]. 新疆中医药, 2012, 30(4): 122-124.
- [5] 陈智坤, 梁呈元, 任冰如, 等. 薄荷属植物挥发性成分及药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(6): 856-861.
- [6] 沈梅芳, 李小萌, 单琪媛. 薄荷化学成分与药理作用研究新进展 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(7): 1484-1487.
- [7] Wang J W, Qi P, Hou J J, *et al.* Profiling and identification of metabolites of isorhynchophylline in rats by ultra high performance liquid chromatography and linear ion trap Orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1033/1034: 147-156.
- [8] Ma H L, Liu Y, Mai X, *et al.* Identification of the constituents and metabolites in rat plasma after oral administration of Huanglian Shangqing Pills by ultra high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. [J]. *J Pharm Biomed Analysis*, 2016, 125: 194-204.
- [9] 徐凌玉, 李振麟, 蔡芷辰, 等. 薄荷化学成分的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2798-2802.
- [10] 李 祥, 邢文峰. 薄荷的化学成分及临床应用研究进展 [J]. 中南药学, 2011, 9(5): 362-365.
- [11] 陈向阳, 张 乐, 吴 莹. LCMS-IT-TOF 法快速分析薄荷黄酮部位的主要化学成分 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 546-550.
- [12] She G M, Xu C, Liu B, *et al.* Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(4): 359-362.
- [13] 陈向阳. 薄荷酚类部位化学成分及抗炎活性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [14] 林 彤, 段金彪, 钱大玮, 等. HPLC-MS/MS 联用技术分析鉴定苏薄荷中的黄酮类成分 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 111-115.
- [15] 徐锦优, 孙景清, 陈琼华, 等. 中药大黄的综合研究 X. 蒽醌衍生物在体内的代谢转化 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1966, 6(2): 112-117.
- [16] 田 杰, 陈 璇, 白小红. 基于中空纤维液相微萃取的大鼠体内大黄素及其代谢物分析 [J]. 色谱, 2012, 30(5): 507-514.
- [17] 陈志康, 朱桐君, 陈醒言, 等. 咖啡酸体内代谢的探讨 [J]. 温州医学院学报, 1981(1): 11-14.