

## 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内的代谢产物鉴定与代谢途径分析

邓放, 刘欣, 郑振兴, 李雪敏, 龚倩倩, 张梦姣, 段婷引

成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术对 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠血浆, 组织 (心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠), 尿液和粪便中的代谢产物进行鉴定分析, 并推测其在大鼠体内的代谢途径。方法 雄性 SD 大鼠 ig 给予 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素 (100 mg/kg), 收集血浆、组织、尿液以及粪便样品。样品处理后, 采用 Thermo Scientific Accucore™ C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×3 mm, 2.6 μm), 以 0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液为流动相梯度洗脱, 在电喷雾电离源正离子模式下采集生物样品的质谱数据。采用 Xcalibur 采集数据, 利用 Compound Discoverer 3.1 软件的化合物代谢产物预测模板进行分析, 结合相关文献以及 Mass Frontier 7.0 软件对代谢产物进行鉴定。结果 在大鼠的生物样本中检测到 33 个 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物, 21 个 6,7-二甲氧基香豆素代谢产物。在血浆、尿液、粪便、心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠中分别鉴定出 8、28、23、2、10、3、10、13、7、7 个 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物和 7、19、14、7、7、4、7、13、3、8 个 6,7-二甲氧基香豆素代谢产物。结论 通过液质联用技术推测出了 33 个 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物和 21 个 6,7-二甲氧基香豆素代谢产物, 阐明了 2 种香豆素在大鼠体内通过去甲基化、羟基化、水解、还原、甲基化、磺酸化、葡萄糖醛酸化等途径进行代谢, 对 2 种香豆素的代谢特点进行了比较分析, 为进一步研究中药中 2 种香豆素的作用机制和作用途径奠定了基础, 同时也为药物代谢研究提供一种综合研究方法。

**关键词:** 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 5,7-二甲氧基香豆素; 6,7-二甲氧基香豆素; 代谢产物; 代谢途径  
中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5629-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.016

## Metabolites and metabolic pathway analysis of 5,7-dimethoxycoumarin and 6,7-dimethoxycoumarin in rats

DENG Fang, LIU Xin, ZHENG Zhen-xing, LI Xue-min, GONG Qian-qian, ZHANG Meng-jiao, DUAN Ting-yin  
Ministry of Education, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To identify the metabolites of 5,7-dimethoxycoumarin and 6,7-dimethoxycoumarin in plasma, tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach and small intestine), urine and feces in rats by using hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). **Methods** SD male rats were ig 5,7-dimethoxycoumarin and 6,7-dimethoxycoumarin (100 mg/kg), the plasma, tissue, urine, and fecal samples were collected. After sample pretreatment, a Thermo Scientific Accucore™ C<sub>18</sub> column (100 mm × 3 mm, 2.6 μm) was used, the gradient elution was performed with 0.1% formic acid-0.1% formic acid acetonitrile as the mobile phase. The mass spectrometry data of biological samples were acquired in positive ion mode with an electrospray ionization source (ESI source). Xcalibur was used to collect data, and the compound metabolite prediction template of Compound Discoverer 3.1 software was used for analysis, and the metabolites were identified in combination with relevant literature and Mass Frontier 7.0 software. **Results** A total of 33 5,7-dimethoxycoumarin metabolites and 21 6,7-dimethoxycoumarin metabolites were detected in biological samples from rats. A total of 8, 28, 23, 2, 10, 3, 10, 13, 7, 7 metabolites of 5,7-dimethoxycoumarin and 7, 19, 14, 7, 7, 4, 7, 13, 3, 8 metabolites of 6,7-dimethoxycoumarin were identified in plasma, urine, feces, heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach and small intestine, respectively. **Conclusion** A total of 33 metabolites of 5,7-dimethoxycoumarin and 21 metabolites of 6,7-dimethoxycoumarin were identified by liquid chromatography-mass spectrometry. The

收稿日期: 2023-04-26

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目 (2022YFN0068)

作者简介: 邓放, 硕士生导师, 副教授, 从事中药药效物质基础和质量标准研究。E-mail: dengf99@163.com

metabolism of the two coumarins in rats was elucidated through demethylation, hydroxylation, hydrolysis, reduction, methylation, sulfation and glucuronidation. The metabolic characteristics of the two coumarins were compared and analyzed. This study laid a foundation for further study on the mechanism and pathway of action of the two coumarin in traditional Chinese medicine, and also provided a comprehensive research method for drug metabolism identification.

**Key words:** UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; 5,7-dimethoxycoumarin; 6,7-dimethoxycoumarin; metabolites; metabolic pathway

佛手为芸香科柑橘属植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实, 具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰的功效<sup>[1]</sup>。佛手中的化学成分主要为黄酮类、香豆素类、挥发油类、柠檬苦素类和多糖类等<sup>[2-4]</sup>。课题组前期基于网络药理学分析, 构建了佛手止咳化痰的活性成分-靶点网络, 筛选出 16 个核心成分, 6,7-二甲氧基香豆素和 5,7-二甲氧基香豆素按度值从高到底分别排在第 6 位和第 11 位。课题组前期对佛手进行多成分含量测定的结果表明, 佛手中 5,7-二甲氧基香豆素含量测定的平均值为 0.120%, 6,7-二甲氧基香豆素含量测定的平均值为 0.017%, 佛手中 5,7-二甲氧基香豆素的含量约为 6,7-二甲氧基香豆素含量的 7 倍, 相关文献中对佛手中 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素进行含量测定的结果分别为 0.094%~0.501%、0~0.075%<sup>[5]</sup>, 结果均表明佛手中 5,7-二甲氧基香豆素的含量大于 6,7-二甲氧基香豆素。目前研究发现, 6,7-二甲氧基香豆素有抑制炎症相关信号通路的功能, 可以减轻脂多糖诱导的肺组织损伤<sup>[6]</sup>; 6,7-二甲氧基香豆素具有平喘和气管舒张作用, 可以作用于维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ t (retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t, ROR $\gamma$ t) 及白细胞介素-23 (interleukin-23, IL-23) 环节, 抑制 Th17 细胞分化和扩增存活, 减少 IL-17 等炎症介质分泌, 发挥对实验性变应性鼻炎大鼠的干预作用<sup>[7-8]</sup>, 可能通过增加细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, cAMP) 浓度和阻断 L 型钙离子通道发挥气管舒张作用<sup>[9]</sup>。5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素互为同分异构体, 结合网络药理学的活性成分-靶点网络分析, 推测 5,7-二甲氧基香豆素可能也具有相似的作用。

近年的研究表明, 香豆素类化合物大多经过体内代谢排出体外, 香豆素类化合物进入体内后主要通过小肠被吸收, 经细胞色素 P450 催化反应<sup>[10]</sup>。香豆素类化合物的主要代谢器官为肝和肾<sup>[11]</sup>, 主要的代谢途径为羟基化、脱氢、去甲基化、水解及结合代谢<sup>[12]</sup>。6,7-二甲氧基香豆素的体内代谢研究已有文献报道, 其代谢产物主要为 6 位或 7 位甲氧基脱甲基并与 1 分子硫酸结合形成的硫酸酯结合物<sup>[13-14]</sup>,

相关文献对滨蒿内酯 (6,7-二甲氧基香豆素) 进行体内代谢研究, 鉴定出 19 种代谢产物<sup>[15]</sup>, 目前还未有 5,7-二甲氧基香豆素在体内的代谢研究。本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS), 对 SD 大鼠血浆、组织、尿液和粪便中的 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素主要代谢产物进行鉴定分析, 并研究其可能的代谢途径。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。大鼠饲养在 SPF 级动物实验室内, 室内温度 22~24 °C, 相对湿度 55%~60%, 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 自由饮水和进食。本动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准编号 2020-33)。

### 1.2 药品与试剂

对照品 5,7-二甲氧基香豆素 (批号 1211325801)、6,7-二甲氧基香豆素 (批号 1211201901) 均购自于四川恒诚致远生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%; 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 购自美国 Fisher 公司; 乙醇 (分析纯)、水合氯醛购自成都市科隆化学品有限公司; 水为蒸馏水, 购自屈臣氏; 0.9%氯化钠注射液购自四川科伦药业股份有限公司。

### 1.3 仪器

Vanquish 型 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS、Compound Discoverer 3.1、Xcalibur、Mass Frontier 7.0 软件 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Discovery DV215CD 型十万分之一天平 (美国 Ohaus Corporation 公司); BS124S 型万分之一分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); ZDHW 型电热套 (北京中兴伟业仪器厂); UPH-I-10-T 型优普超纯水器 (成都超纯科技有限公司); TDZ4A-WS 型台式低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); RG-160AT 型台式高速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 超低温冷冻冰箱 (海尔集团); LC-DCY-

12G 型干式氮吹浓缩仪 (上海力辰邦西仪器科技有限公司); XK80-A 型快速混匀器 (江苏新康医疗器械有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器 (频率 40 kHz, 功率 650 W, 昆山市超声仪器有限公司); JCS-300 型电子天平 (凯丰集团有限公司); RE-5203 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

## 2 方法

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素对照品适量, 用甲醇配制成质量浓度均为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合对照品溶液。

### 2.2 大鼠给药溶液的制备

分别取 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素适量, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液分别配制成质量浓度均为 10  $\text{mg}/\text{mL}$  的混悬溶液。

### 2.3 动物给药及生物样品的采集

取 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 随机分成 A、B、C、D、E 5 组, 每组各 3 只, 其中 E 组为空白组, 其余各组均为给药组。空白组 ig 0.5% CMC-Na 溶液, A、B 组 ig 5,7-二甲氧基香豆素单体化合物溶液 (100  $\text{mg}/\text{kg}$ ), C、D 组 ig 6,7-二甲氧基香豆素单体化合物溶液 (100  $\text{mg}/\text{kg}$ )。给药前禁食 12 h, 自由饮水。

A、C 组大鼠分别于给药后 1 h, ip 水合氯醛溶液麻醉, 腹主动脉取血置于肝素钠抗凝管中, 3500  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min 分离得到血浆, 同时取血后立即取出心、肝、脾、肺、肾、胃和小肠, 称定质量; B、D 组大鼠末次给药后置于代谢笼中, 收集 24 h 内的尿液和粪便; E 组大鼠同法取得空白的血浆、尿液、粪便、心、肝、脾、肺、肾、胃和小肠, 所有生物样品均于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻保存备用。

### 2.4 生物样品的处理

**2.4.1 血浆样品的制备** 同组大鼠血浆等体积混合, 取 200  $\mu\text{L}$  混合血浆于 EP 管中, 加入 800  $\mu\text{L}$  甲醇, 涡旋 5 min, 12 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min, 转移上清液,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  下氮气吹干, 100  $\mu\text{L}$  50% 甲醇复溶, 涡旋 5 min, 12 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min, 取上清液即得。

**2.4.2 组织样品的制备** 取各组织 0.2 g, 加入 0.4 mL 生理盐水匀浆, 同组大鼠组织匀浆等体积混合, 取 200  $\mu\text{L}$  混合组织匀浆置于 EP 管中, 加入 800  $\mu\text{L}$  甲醇, 后续处理同血浆样品处理方法。

**2.4.3 尿液样品的制备** 同组大鼠尿液等体积混合, 取 200  $\mu\text{L}$  混合尿液置于 EP 管中, 加入 800  $\mu\text{L}$

甲醇, 后续处理同血浆样品处理方法。

**2.4.4 粪便样品的制备** 粪便样品  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘干, 取 0.5 g, 加入 5 mL 甲醇, 超声 30 min, 12 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min, 转移上清液,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  下氮气吹干, 200  $\mu\text{L}$  50% 甲醇复溶, 涡旋 5 min, 12 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min, 取上清液即得。

### 2.5 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析

**2.5.1 色谱条件** Thermo Scientific Accucore<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱 (100  $\text{mm}\times 3\text{ mm}$ , 2.6  $\mu\text{m}$ ); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) -0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 5% B; 2~8 min, 5%~20% B; 8~18 min, 20%~40% B; 18~23 min, 40%~80% B; 23~25 min, 80%~95% B; 25~30 min, 95% B。进样量 3  $\mu\text{L}$ ; 体积流量 0.3  $\text{mL}/\text{min}$ ; 柱温  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

**2.5.2 质谱条件** 离子源为 ESI 电喷雾离子源, 正离子模式检测; 喷雾电压 3.2 kV; 离子源温度  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气体积流量 35  $\text{L}/\text{min}$ , 辅助气体积流量 10  $\text{L}/\text{min}$ ; 离子传输管温度  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。扫描模式为全扫描/数据依赖二级扫描 (Full MS/dd-MS<sup>2</sup>), 一级分辨率 35 000, 二级分辨率 17 500, 扫描范围  $m/z$  100~1500, 碰撞能量梯度为 20、40、60 eV。

### 2.6 数据处理和分析

采用 Xcalibur 4.6 软件采集质谱数据, Compound Discoverer 3.1 软件进行定性分析, 分析 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内原型成分和代谢产物, 并推测代谢途径。对于原型成分, 选用天然产物未知化合物鉴定模板, 对未知化合物进行分子式拟合, 同时根据精确相对分子质量和二级碎片离子信息等结合 mzVault 和 mzCloud 等数据库进行匹配, 并通过对照品比对、参考相关文献和利用 Mass Frontier 7.0 质谱解析软件对原型成分进行鉴别。对于代谢产物, 以鉴定的原型成分为母体化合物, 建立代谢产物预测模板, 对可能的代谢产物进行预测, 对预测结果中的可能的代谢产物结合参考文献和 Mass Frontier 7.0 质谱解析软件进行分析鉴定。

## 3 结果

通过对比给药前后的生物样品图谱信息, 结合色谱保留时间、精确相对分子质量、多级碎片离子等信息的分析, 结合相关文献数据<sup>[16-17]</sup>, 共鉴定出 33 个 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物和 21 个 6,7-二甲氧基香豆素代谢产物, 详见表 1、2。其中, 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物在血浆中鉴定出 8 个, 尿

表1 大鼠血浆、尿液、粪便和组织中5,7-二甲基香豆素的代谢产物质谱信息及分布情况

Table 1 Mass spectrometric information and distribution of 5,7-dimethoxycoumarin metabolites in rat plasma, urine, feces and tissues

编号	分子式	$t_R/\text{min}$	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	二级碎片 ( $m/z$ )	代谢途径	来源
MC0	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	17.93	207.065 08	-0.53	192.041 56, 179.070 24, 163.075 20, 151.075 27, 148.051 79, 121.064 93	原型	a~j
MC1	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	5.60	255.049 99	0.24	237.039 20, 223.023 30, 209.044 57, 195.028 84, III		b
MC2	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5.94	241.071 12	1.91	223.060 30, 195.065 57, 179.070 50, 167.070 51, I, III		j
MC3	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	6.41	241.071 24	2.41	223.060 36, 195.065 41, 179.070 47, 167.070 50, I, III		e, j
MC4	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S	6.98	289.001 22	-0.14	209.044 30, 194.020 95, 181.049 33, 163.038 91, III, V, VII b, c		
MC5	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>11</sub>	7.17	385.077 42	2.29	209.044 71, 194.021 45, 153.054 81	III, V, VI	a, h, j
MC6	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>11</sub>	7.56	385.076 32	-0.57	209.044 33, 194.020 95, 166.026 05, 163.038 91, III, V, VI		b
MC7	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	7.97	239.091 23	-0.71	221.080 69, 193.085 83	I, IV	b, c
MC8	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S	8.23	303.016 97	0.20	223.059 94, 208.036 56, 165.018 28, 163.038 80	III, VII	b, c
MC9	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S	8.36	289.000 82	-1.52	209.044 30, 194.020 95, 163.039 06, 153.054 96	III, V, VII	b, c
MC10	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	8.43	369.082 55	2.52	193.049 93, 178.026 60, 165.054 90, 149.059 97, V, VI		c, g, h
MC11	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	8.86	213.075 55	-0.94	195.065 17, 167.070 27, 153.054 58	I, II, V	b, c
MC12	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	9.02	209.044 36	-0.43	194.021 00, 181.049 50, 166.026 26, 153.054 46	III, V	b, c, e
MC13	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	9.13	369.082 15	1.44	193.049 84, 178.026 31, 165.054 76, 149.059 98, V, VI		a, c~e, g~j
MC14	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S	9.15	303.016 63	-0.92	223.059 92, 208.036 54, 193.049 51, 165.018 16	III, VII	b, c
MC15	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S	9.16	289.001 01	-0.87	209.044 33, 194.020 98, 163.039 20, 153.054 86	III, V, VII	b
MC16	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	9.66	273.006 71	1.32	193.049 87, 178.026 05, 165.055 31, 149.059 94, V, VII		a~c, g, h
MC17	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S	9.81	289.000 92	-1.18	209.044 37, 194.020 97, 163.038 88, 153.054 78	III, V, VII	b
MC18	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	9.82	209.044 27	-0.86	194.021 04, 181.048 86, 166.026 02, 163.038 94, III, V		b
MC19	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	9.94	243.086 35	0.16	225.075 39, 207.065 12, 197.080 70, 179.070 16	I, II, III	b, c
MC20	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	10.04	273.006 81	1.68	193.050 00, 178.026 58, 165.054 98, 149.060 09, III, VII		a~d, g~i
MC21	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S	10.13	303.016 94	0.10	223.060 04, 208.036 59, 193.013 18, 165.018 60	III, VII	b
MC22	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	10.19	211.06010	0.00	193.049 42, 183.065 03, 165.054 58, 149.059 68	I, V	b, c
MC23	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	10.31	239.055 11	0.42	224.031 39, 209.008 07, 206.020 75, 195.029 25	III	b, c
MC24	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	10.72	209.044 59	0.67	194.021 04, 181.049 62, 166.026 29, 163.038 94, III, V		b, c
MC25	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	11.12	213.075 58	-0.80	195.064 93, 167.070 14, 153.054 52	I, II, V	a~c, e, g~i
MC26	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	12.26	193.049 68	0.73	178.026 92, 165.054 73, 149.059 80, 137.059 47, V		b, c, e, g~i
MC27	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	12.38	223.060 17	0.31	208.036 64, 193.013 18, 180.041 75, 179.070 43, III		a~c, e~j
MC28	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	13.03	193.049 64	0.52	178.025 97, 165.054 79, 149.059 77, 137.059 75, V		a~c, e~j
MC29	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	13.16	223.059 95	-0.67	208.036 58, 193.013 14, 180.042 02, 165.018 19, III		b, c, e, h
MC30	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	13.17	227.091 22	-0.79	209.080 81, 181.085 80, 167.070 25	I, II	b, c
MC31	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	13.70	225.075 87	0.53	207.065 05, 192.041 55, 183.065 12, 181.085 75, II		b, c, h
MC32	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	14.07	253.070 66	0.00	238.047 24, 223.023 61, 220.036 51, 209.044 22, III, IV		a, b, e~i
MC33	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	15.86	223.060 1	0.00	208.036 58, 193.012 95, 180.041 26, 165.018 11, III		b, c, e, g, h, j

a-血浆 b-尿液 c-粪便 d-心 e-肝 f-脾 g-肺 h-肾 i-胃 j-小肠 I-水解 II-还原 III-羟基化 IV-甲基化 V-去甲基化 VI-葡萄糖醛酸化 VII-磺酸化, 表2同

a-plasma b-urine c-feces d-heart e-liver f-spleen g-lung h-kidney i-stomach j-small intestine I-hydrolysis II-reduction III-hydroxylation IV-methylation V-demethylation VI-glucuronic acid VII-sulfonation, same as table 2

表2 大鼠血浆、尿液、粪便和组织中6,7-二甲氧基香豆素的代谢产物质谱信息及分布情况

Table 2 Mass spectrometric information and distribution of 6,7-dimethoxycoumarin metabolites in rat plasma, urine, feces and tissues

编号	分子式	$t_R/\text{min}$	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 ( $m/z$ )	代谢途径	来源
MS0	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	12.42	207.065 28	0.43	192.041 84, 179.070 28, 163.075 06, 151.075 45, 148.052 23, 121.064 99	原型	a~j
MS1	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2.05	241.070 92	1.08	223.060 49, 195.065 43, 179.070 56, 167.070 43, 151.075 67	I, III	e, j
MS2	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	3.05	241.070 98	1.33	223.060 55, 195.065 64, 179.070 57, 167.070 60, 151.075 65	I, III	e, h, j
MS3	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	6.17	227.054 90	-0.48	195.023 90, 181.049 48, 149.023 38	I, III, V	b, c, h
MS4	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	6.34	369.082 70	2.93	193.049 96, 178.026 43, 165.054 67, 149.059 91, 137.059 89, 133.028 73, 122.036 69	V, VI	a~d, g, h
MS5	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	6.68	273.006 10	-0.92	193.049 53, 178.026 02, 165.054 38, 149.059 80, 137.059 69, 133.028 44, 122.036 26	V, VII	b, c, g
MS6	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	6.84	369.082 52	2.44	193.049 94, 178.026 54, 165.054 86, 149.059 62, 137.059 86, 133.028 70, 122.036 40	V, VI	a~e, g~j
MS7	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	7.44	273.006 81	1.68	193.049 94, 178.026 41, 165.054 95, 149.060 20, 137.059 92, 133.028 72, 122.036 65	V, VII	a~f, h, j
MS8	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	7.65	209.044 56	0.53	194.020 97, 181.048 90, 166.026 10, 163.038 65, 153.054 61	III, V	b
MS9	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>11</sub>	7.71	385.076 57	0.08	209.044 34, 194.021 01, 181.049 62, 166.025 91, 163.038 53, 153.054 58	III, V, VI	b, h, j
MS10	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	7.78	243.086 47	0.66	225.075 71, 207.065 20, 197.080 80, 179.070 22	I, II, III	b, h
MS11	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	8.43	213.075 64	-0.52	195.063 67, 167.070 14, 139.075 53	I, II, V	b, c
MS12	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	8.77	399.093 38	2.98	223.060 47, 208.037 02, 193.013 84, 190.026 35, 162.031 51	III, VI	a~d, g, h, j
MS13	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S	8.83	289.001 22	-0.14	209.044 39, 194.020 98, 181.049 10, 166.025 96, 163.038 83, 153.054 46	III, V, VII	b, c, h
MS14	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S	9.16	303.016 97	0.20	223.059 98, 208.036 50, 190.025 96, 162.031 11	III, VII	b
MS15	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	9.52	193.049 39	-0.78	178.025 92, 165.054 47, 149.059 45, 137.059 65, 133.028 35, 122.036 32	V	a~j
MS16	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	9.63	227.091 40	0.00	209.080 25, 195.065 00, 181.085 28, 167.070 22	I, II	b
MS17	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	9.98	193.049 64	0.52	178.025 99, 165.054 61, 149.059 51, 137.059 59, 133.028 40, 122.036 45	V	a~j
MS18	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	10.09	213.075 58	-0.80	195.065 14, 167.070 22, 139.075 32	I, II, V	b, c
MS19	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	10.71	225.075 61	-0.62	207.065 06, 192.041 84, 183.065 34, 181.086 03, 179.070 13, 163.075 26, 151.075 27	I	a~c, h
MS20	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	12.01	253.070 60	-0.24	238.046 94, 223.023 50, 209.044 22, 182.057 28, 167.033 77	III, IV	b, c
MS21	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	12.19	223.059 88	-0.99	208.036 48, 193.013 37, 190.025 97, 162.031 04	III	b~h

液中鉴定出 28 个, 粪便中鉴定出 23 个, 心组织中鉴定出 2 个, 肝组织中鉴定出 10 个, 脾组织中鉴定出 3 个, 肺组织中鉴定出 10 个, 肾组织中鉴定出 13 个, 胃组织中鉴定出 7 个, 小肠组织中鉴定出 7 个。6,7-二甲氧基香豆素在在血浆中鉴定出 7 个, 尿液中鉴定出 19 个, 粪便中鉴定出 14 个, 心组织中鉴定出 7 个, 肝组织中鉴定出 7 个, 脾组织中鉴定出 4 个, 肺组织中鉴定出 7 个, 肾组织中鉴定出 13 个, 胃组织中鉴定出 3 个, 小肠组织中鉴定出 8 个。

### 3.1 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物的分析鉴定

**3.1.1 5,7-二甲氧基香豆素原型** MC0 准分子离子峰  $m/z$  207.065 08 [M+H]<sup>+</sup>,  $t_R$  为 17.93 min, 二级质谱图如图 1 所示, 箭头注释碎片离子的相对分子质量, 图中有碎片离子  $m/z$  192.041 56 [M+H-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  179.070 24 [M+H-CO]<sup>+</sup>、 $m/z$  163.075 20 [M+H-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  151.075 27 [M+H-CO-CO]<sup>+</sup>、 $m/z$  148.051 79 [M+H-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 其色谱行为、一级和二级质谱信息与 5,7-二甲氧基香豆素对照品一致,

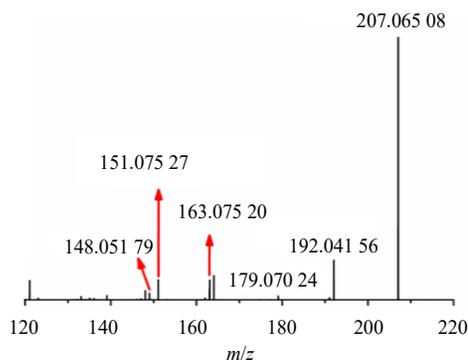


图1 正离子模式下5,7-二甲氧基香豆素的二级碎片离子图  
Fig. 1 Second order fragment ion diagram of 5,7-dimethoxycoumarin in positive ion mode

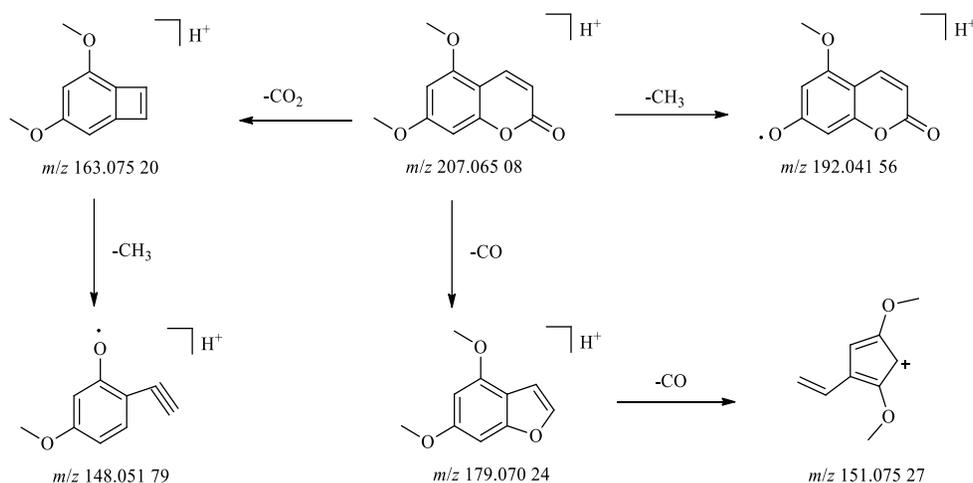


图2 5,7-二甲氧基香豆素可能的裂解途径

Fig. 2 Possible cleavage pathway of 5,7-dimethoxycoumarin

$m/z$  223.060 30  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  195.065 57  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  179.070 50  $[M+H-H_2O-CO_2]^+$ 、 $m/z$  167.070 51  $[M+H-H_2O-2CO]^+$ 、 $m/z$  151.075 65  $[M+H-H_2O-CO-CO_2]^+$ 等。因此，推测 **MC2** 和 **MC3** 为5,7-二甲氧基香豆素的羟基化和水解代谢产物。

**MC11** 和 **MC25** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  213.075 55  $[M+H]^+$ 和  $m/z$  213.075 58  $[M+H]^+$ ，与 **MC0** 相比均差6 ( $-CH_2+2H+H_2O$ )，均具有特征碎片离子  $m/z$  195.065 17  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  167.070 27  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  153.054 58  $[M+H-C_2H_4O_2]^+$ 等。因此，推测 **MC11** 和 **MC25** 为5,7-二甲氧基香豆素的去甲基化、还原和水解的代谢产物。**MC12**、**MC18** 和 **MC24** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  209.044 36  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  209.044 27  $[M+H]^+$ 和  $m/z$  209.044 59  $[M+H]^+$ ，均比 **MC0** 多2

故 **MC0** 确定为5,7-二甲氧基香豆素原型，其可能的裂解途径见图2。

**3.1.2 I相代谢产物的鉴定** **MC1** 的准分子离子峰为  $m/z$  255.049 99  $[M+H]^+$ ， $t_R$  为5.60 min，比 **MC0** 多48 ( $3O$ )，具有特征碎片离子  $m/z$  237.039 20  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  223.023 30  $[M+H-CH_3OH]^+$ 、 $m/z$  209.044 57  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 和  $m/z$  193.048 23  $[M+H-H_2O-CO_2]^+$ ，推断 **MC1** 为5,7-二甲氧基香豆素的三羟基化代谢产物。

**MC2** 和 **MC3** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  241.071 12  $[M+H]^+$ 和  $m/z$  241.071 24  $[M+H]^+$ ，与 **MC0** 相比均差34 ( $O+H_2O$ )，均具有特征碎片离子

( $-CH_2+O$ )，特征离子为  $m/z$  194.021 00  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  181.049 50  $[M+H-CO]^+$ 、 $m/z$  166.026 26  $[M+H-CO-CH_3]^+$ 和  $m/z$  153.054 46  $[M+H-CO-CO]^+$ 等，故推断 **MC12**、**MC18** 和 **MC24** 为5,7-二甲氧基香豆素的去甲基化和羟基化的代谢产物。

**MC19** 的准分子离子峰为  $m/z$  243.086 35  $[M+H]^+$ ，与 **MC0** 相比差36 ( $O+2H+H_2O$ )，具有特征碎片离子  $m/z$  225.075 39  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  207.065 12  $[M+H-2H_2O]^+$ 、 $m/z$  197.080 70  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  179.070 16  $[M+H-H_2O-CO-H_2O]^+$ 。因此，推测 **MC19** 为5,7-二甲氧基香豆素羟基化、还原和水解的代谢产物。**MC22** 的准分子离子峰为  $m/z$  211.060 10  $[M+H]^+$ ，比 **MC0** 多4 ( $-CH_2+H_2O$ )，其特征碎片离子  $m/z$  193.049 42、 $m/z$  183.065 03、 $m/z$  165.054 58、 $m/z$  149.059 68。因此，推测 **MC22** 为5,7-二甲氧基香豆素去甲基化和水解的代谢产物。**MC23** 的准分

子离子峰为  $m/z$  239.055 11  $[M+H]^+$ , 比 **MC0** 多 32 (2O), 特征碎片离子  $m/z$  224.031 39  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  209.008 07  $[M+H-OCH_2]^+$ 、 $m/z$  206.020 75  $[M+H-CH_3-H_2O]^+$ 、 $m/z$  195.029 25  $[M+H-OCH_2-CH_2]^+$ , 故推断 **MC23** 为 5,7-二甲氧基香豆素的双羟基化代谢产物。**MC26** 和 **MC28** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  193.049 68  $[M+H]^+$  和  $m/z$  193.049 64  $[M+H]^+$ , 均比 **MC0** 少 14 ( $-CH_2$ ), 且它们的特征碎片离子  $m/z$  178.026 92  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  165.054 73  $[M+H-CO]^+$ 、 $m/z$  149.059 80  $[M+H-CO_2]^+$  和  $m/z$  137.059 47  $[M+H-CO-CO]^+$  等分别比 5,7-二甲氧基香豆素的特征离子  $m/z$  192.041 56  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  179.070 24  $[M+H-CO]^+$ 、 $m/z$  163.075 20  $[M+H-CO_2]^+$ 、 $m/z$  151.075 27  $[M+H-CO-CO]^+$  少 14, 且裂解途径和 5,7-二甲氧基香豆素相似, 因此, 推断 **MC26** 和 **MC28** 为 5,7-二甲氧基香豆素的去甲基化代谢产物。**MC27**、**MC29** 和 **MC33** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  223.060 17  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  223.059 95  $[M+H]^+$  和  $m/z$  223.060 10  $[M+H]^+$ , 均比 **MC0** 多 16 (O), 特征离子表现  $m/z$  208.036 64  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  193.013 18  $[M+H-2CH_3]^+$ 、 $m/z$  180.041 75  $[M+H-CH_3-CO]^+$ 、 $m/z$  165.018 40  $[M+H-CH_3-CO-CH_3]^+$  和  $m/z$  163.039 11  $[M+H-2CH_3-OCH_2]^+$  等, 故推断 **MC27**、**MC29** 和 **MC33** 为 5,7-二甲氧基香豆素的羟基化代谢产物。**MC30** 的准分子离子峰为  $m/z$  227.091 22  $[M+H]^+$ , 与 **MC0** 相比差 20 ( $H_2O+2H$ ), 具有特征碎片离子  $m/z$  209.080 81  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  181.085 80  $[M+H-HCOOH]^+$ 、 $m/z$  167.070 25  $[M+H-C_2H_4O_2]^+$ 。因此, 推测 **MC30** 为 5,7-二甲氧基香豆素还原和水解的代谢产物。**MC31** 的准分子离子峰为  $m/z$  225.075 87  $[M+H]^+$ , 比 **MC0** 多 18 ( $H_2O$ ), 具有特征碎片离子  $m/z$  207.065 05  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  192.041 55  $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ 、 $m/z$  179.070 18  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  163.075 23  $[M+H-H_2O-COOH]^+$ , 故推断 **MC31** 为 5,7-二甲氧基香豆素的水解代谢产物。

**3.1.3 II 相代谢产物的鉴定** **MC4**、**MC9**、**MC15** 和 **MC17** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  289.001 22  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  289.000 82  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  289.001 01  $[M+H]^+$  和  $m/z$  289.000 92  $[M+H]^+$ , 与 **MC12**、**MC18** 或 **MC24** 相差 80 ( $SO_3$ ), 碎片离子与 **MC12**、**MC18** 或 **MC24** 的子离子一致。因此, **MC4**、**MC9**、

**MC15** 和 **MC17** 被推断为 **MC12**、**MC18** 或 **MC24** 的硫酸化代谢产物。**MC5** 和 **MC6** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  385.077 42  $[M+H]^+$  和  $m/z$  385.076 32  $[M+H]^+$ , 与 **MC12**、**MC18** 或 **MC24** 相差 176 ( $C_6H_8O_6$ ), 特征碎片离子  $m/z$  209.044 71  $[M-GluA]^+$  等与 **MC12**、**MC18** 或 **MC24** 准分子离子峰一致, 其他子离子也一致。因此, **MC5** 和 **MC6** 被推断为 **MC12**、**MC18** 或 **MC24** 的葡萄糖醛酸化代谢产物。

**MC7** 的准分子离子峰为  $m/z$  239.091 23  $[M+H]^+$ , 比 **MC31** 多 14 ( $CH_2$ ), 具有特征碎片离子  $m/z$  221.090 69  $[M+H-H_2O]^+$  和  $m/z$  193.085 83  $[M+H-HCOOH]^+$ 。因此, 推测 **MC7** 为 **MC31** 甲基化的代谢产物。

**MC8**、**MC14** 和 **MC21** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  303.016 97  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  303.016 63  $[M+H]^+$  和  $m/z$  303.016 94  $[M+H]^+$ , 比 **MC27**、**MC29** 或 **MC33** 多 80 ( $SO_3$ ), 它们的特征碎片离子  $m/z$  223.059 94  $[M+H-SO_3]^+$  等和 **MC27**、**MC29** 或 **MC33** 的准分子离子峰一致, 故推断 **MC8**、**MC14** 和 **MC21** 为 **MC27**、**MC29** 或 **MC33** 的硫酸化代谢产物。

**MC10** 和 **MC13** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  369.082 55  $[M+H]^+$  和  $m/z$  369.082 15  $[M+H]^+$ , 均较 **MC26** 或 **MC28** 多 176 ( $C_6H_8O_6$ ), 均有特征离子为  $m/z$  193.049 93  $[M+H-GluA]^+$  等, 故推断 **MC10** 和 **MC13** 为 **MC26** 或 **MC28** 的葡萄糖醛酸化代谢产物。**MC16** 和 **MC20** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  273.006 71  $[M+H]^+$  和  $m/z$  273.006 81  $[M+H]^+$ , 与 **MC26** 或 **MC28** 相差 80 ( $SO_3$ ), 具有特征碎片离子  $m/z$  193.049 87、 $m/z$  178.026 05、 $m/z$  165.055 31、 $m/z$  149.059 94 和  $m/z$  137.059 95 等, 与 **MC26** 或 **MC28** 的子离子一致。因此, **MC16** 和 **MC20** 被推断为 **MC26** 或 **MC28** 的硫酸化代谢产物。

**MC32** 的准分子离子峰为  $m/z$  253.070 66  $[M+H]^+$ , 比 **MC23** 多 14 ( $CH_2$ ), 特征碎片离子  $m/z$  238.047 24  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  223.023 61  $[M+H-OCH_2]^+$ 、 $m/z$  220.036 51  $[M+H-CH_3-H_2O]^+$ 、 $m/z$  209.044 22  $[M+H-OCH_2-CH_2]^+$  分别比 **MC23** 的碎片离子  $m/z$  224.031 39  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  209.008 07  $[M+H-OCH_2]^+$ 、 $m/z$  206.020 75  $[M+H-CH_3-H_2O]^+$ 、 $m/z$  195.029 25  $[M+H-OCH_2-CH_2]^+$  多 14, 故推断 **MC32** 为 **MC23** 的甲基化代谢产物。

### 3.2 6,7-二甲氧基香豆素代谢产物的分析鉴定

**3.2.1 6,7-二甲氧基香豆素原型 MS0 准分子离子**

峰  $m/z$  207.065 28  $[M+H]^+$ ,  $t_R$  为 12.42 min, 二级质谱图如图 3 所示, 箭头注释碎片离子的相对分子质量, 图中有碎片离子  $m/z$  192.041 84  $[M+H-CH_3]^+$ 、 $m/z$  179.070 28  $[M+H-CO]^+$ 、 $m/z$  163.075 06  $[M+H-CO_2]^+$ 、 $m/z$  151.075 45  $[M+H-2CO]^+$ 、 $m/z$  148.052 23  $[M+H-CO_2-CH_3]^+$ , 其色谱行为、一级和二级质谱信息与 6,7-二甲氧基香豆素对照品一致, 故 **MS0** 确定为 6,7-二甲氧基香豆素原型, 其可能的裂解途径见图 4。

**3.2.2 I 相代谢产物的鉴定** **MS1** 和 **MS2** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  241.070 92  $[M+H]^+$  和  $m/z$  241.070 98  $[M+H]^+$ ,  $t_R$  分别为 2.05、3.05 min, 均较

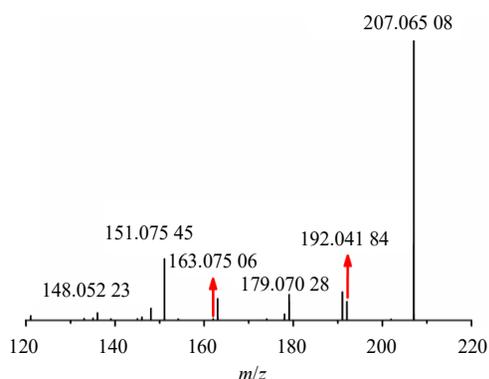


图 3 正离子模式下 6,7-二甲氧基香豆素的二级碎片离子图  
Fig. 3 Second order fragment ion diagram of 6,7-dimethoxycoumarin in positive ion mode

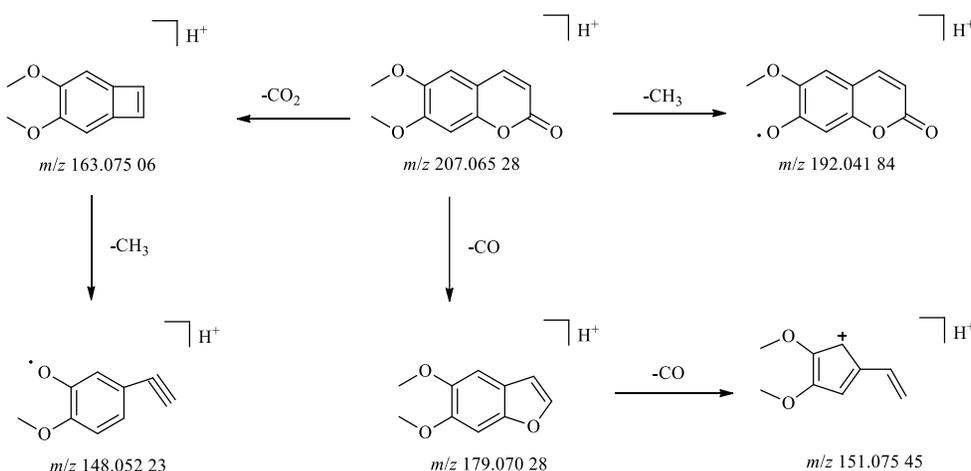


图 4 6,7-二甲氧基香豆素可能的裂解途径

Fig. 4 Possible cleavage pathway of 6,7-dimethoxycoumarin

**MS0** 多 34 ( $O+H_2O$ ), 均有特征离子  $m/z$  223.060 49  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  195.065 43  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  179.070 95  $[M+H-H_2O-CO_2]^+$ 、 $m/z$  167.070 43  $[M+H-H_2O-2CO]^+$ 、 $m/z$  151.075 67  $[M+H-H_2O-CO-CO_2]^+$  等, 故推断 **MS1** 和 **MS2** 为 6,7-二甲氧基香豆素羟基化和水解的代谢产物。

**MS3** 的准分子离子峰为  $m/z$  227.054 90  $[M+H]^+$ , 与 **MS0** 相差 20 ( $-CH_2+O+H_2O$ ), 特征碎片离子表现为  $m/z$  195.023 90  $[M+H-CH_3OH]^+$ 、 $m/z$  181.049 48  $[M+H-HCOOH]^+$ 、 $m/z$  149.023 38  $[M+H-CH_3OH-HCOOH]^+$ 。因此, 推测 **MS3** 为 6,7-二甲氧基香豆素去甲基化、羟基化和水解的代谢产物。**MS8** 准分子离子峰为  $m/z$  209.044 56  $[M+H]^+$ , 比 **MS0** 多 2 ( $-CH_2+O$ ), 较 6,7-二甲氧基香豆素多 2 ( $-CH_2+O$ ), 特征离子为  $m/z$  194、 $m/z$  181、 $m/z$  166、 $m/z$  163 和  $m/z$  153, 故推断 **MS8** 为

6,7-二甲氧基香豆素的去甲基化和羟基化的代谢产物。**MS10** 的准分子离子峰为  $m/z$  243.086 47  $[M+H]^+$ , 与 **MS0** 相差 36 ( $O+2H+H_2O$ ), 特征碎片离子表现为  $m/z$  225.075 71  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  207.065 20  $[M+H-2H_2O]^+$ 、 $m/z$  197.080 80  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  179.070 22  $[M+H-H_2O-CO-H_2O]^+$ 。因此, 推测 **MS10** 为 6,7-二甲氧基香豆素羟基化、还原和水解的代谢产物。**MS11** 和 **MS18** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  213.075 64  $[M+H]^+$  和  $m/z$  213.075 58  $[M+H]^+$ , 均较 **MS0** 多 6 ( $-CH_2+2H+H_2O$ ), 均有特征离子  $m/z$  195.063 67  $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  167.070 14  $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $m/z$  139.075 53  $[M+H-H_2O-2CO]^+$  等, 故推断 **MS11** 和 **MS18** 为 6,7-二甲氧基香豆素去甲基化、还原和水解的代谢产物。**MS15** 和 **MS17** 的准分子离子峰分别为  $m/z$  193.049 39  $[M+H]^+$  和  $m/z$  193.049 64

[M+H]<sup>+</sup>, 均比 MS0 少 14 (-CH<sub>2</sub>), 特征碎片离子为  $m/z$  178.025 92 [M+H-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  165.054 47 [M+H-CO]<sup>+</sup>、 $m/z$  149.059 45 [M+H-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 和  $m/z$  137.059 65 [M+H-CO-CO]<sup>+</sup> 等, 且裂解途径和 6,7-二甲氧基香豆素相似, 因此, 推断 MS15 和 MS17 为 6,7-二甲氧基香豆素的去甲基化代谢产物。MS16 的准分子离子峰为  $m/z$  227.091 40 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS0 相差 20 (2H+H<sub>2</sub>O), 特征碎片离子表现为  $m/z$  209.080 25 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>、 $m/z$  195.065 00 [M+H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  181.085 28 [M+H-HCOOH]<sup>+</sup>、 $m/z$  167.070 22 [M+H-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>。因此, 推测 MS16 为 6,7-二甲氧基香豆素还原和水解的代谢产物。MS19 的准分子离子峰为  $m/z$  225.075 61 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS0 相差 18 (H<sub>2</sub>O), 特征碎片离子表现为  $m/z$  207.065 06 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>、 $m/z$  192.041 84 [M+H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  179.070 13 [M+H-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup>、 $m/z$  163.075 26 [M+H-H<sub>2</sub>O-COOH]<sup>+</sup>。因此, 推测 MS19 为 6,7-二甲氧基香豆素的水解代谢产物。MS21 准分子离子峰为  $m/z$  223.059 88 [M+H]<sup>+</sup>, 比 MS0 多 16 (O), 特征离子为  $m/z$  208.036 48 [M+H-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  193.013 37 [M+H-OCH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  190.025 97 [M+H-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 和  $m/z$  162.031 04 [M+H-OCH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 故推断 MS21 为 6,7-二甲氧基香豆素羟基化的代谢产物。

**3.2.3 II 相代谢产物的鉴定** MS4 和 MS6 的准分子离子峰分别为  $m/z$  369.082 70 [M+H]<sup>+</sup> 和  $m/z$  369.082 52 [M+H]<sup>+</sup>, 均较 MS15 或 MS17 多 176 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), 均有特征离子为  $m/z$  193.049 96 [M+H-GluA]<sup>+</sup> 等, 故推断 MS4 和 MS6 为 MS15 或 MS17 的葡萄糖醛酸化代谢产物。MS5 和 MS7 的准分子离子峰分别为  $m/z$  273.006 10 [M+H]<sup>+</sup> 和  $m/z$  273.006 81 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS15 或 MS17 相差 80 (SO<sub>3</sub>), 特征碎片离子与 MS15 和 MS17 的子离子一致。因此, MS5 和 MS7 被推断为 MS15 或 MS17 的硫酸化代谢产物。

MS9 的准分子离子峰为  $m/z$  385.076 57 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS8 相差 176 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), 特征碎片离子与 MS8 的碎片离子一致。因此, MS9 被推断为 MS8 葡萄糖醛酸化的代谢产物。MS12 的准分子离子峰为  $m/z$  399.093 38 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS21 相差 176 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), 特征碎片离子与 MS21 的碎片离子一致。因此, MS12 被推断为 MS21 葡萄糖醛酸化的代谢产物。MS13 的准分子离子峰为  $m/z$  289.001 22 [M+

H]<sup>+</sup>, 与 MS8 相差 80 (SO<sub>3</sub>), 特征碎片离子与 MS8 的碎片离子一致。因此, MS13 被推断为 MS8 硫酸化的代谢产物。MS14 的准分子离子峰为  $m/z$  303.016 97 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS21 相差 80 (SO<sub>3</sub>), 特征碎片离子与 MS21 的碎片离子一致。因此, MS14 被推断为 MS21 硫酸化的代谢产物。

MS20 的准分子离子峰为  $m/z$  253.070 60 [M+H]<sup>+</sup>, 与 MS0 相差 46 (2O+CH<sub>2</sub>), 特征碎片离子表现为  $m/z$  238.046 94 [M+H-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  223.023 50 [M+H-OCH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  209.044 22 [M+H-OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>。因此, MS20 被推断为 6,7-二甲氧基香豆素双羟基化和甲基化的代谢产物。

### 3.3 代谢途径分析

本研究鉴定了 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内的代谢产物, 在此基础上对 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内的代谢途径进行了推测, 如图 5、6 所示。

## 4 讨论

实验结果表明, 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素原型在血浆和各组织中均有分布, 说明 2 种香豆素在大鼠体内的吸收和分布较好, 与文献报道相似<sup>[18]</sup>。5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素均以尿液和粪便中的代谢产物居多, 结合相关文献数据<sup>[19]</sup>, 推测 2 种香豆素主要在肝肾中进行代谢。5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素的代谢产物在肝、肺、肾 3 种组织中分布较多, 在肺部主要检测到的代谢产物为去甲基化代谢产物, 包括去甲基化、结合葡萄糖醛酸或磺酸的代谢产物, 推测与佛手发挥止咳化痰功效的关联较大。

本研究检测到的 5,7-二甲氧基香豆素代谢产物有 33 种, 6,7-二甲氧基香豆素代谢产物有 21 种, 5,7-二甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内均发生去甲基化、羟基化、水解、还原、甲基化、磺酸化、葡萄糖醛酸化等代谢反应。5,7-二甲氧基香豆素的羟基化代谢产物有 22 个, 较 6,7-二甲氧基香豆素多 11 个, 推测原因为 5,7-二甲氧基香豆素的 2 个甲氧基处于间位, 取代基的供电子效应更强, 芳环上更容易发生羟基化反应。6,7-二甲氧基香豆素的代谢产物中, 有 19 种代谢产物与 5,7-二甲氧基香豆素的代谢产物具有相同的相对分子质量及相似的代谢途径, 仅有 2 种代谢产物的代谢途径与之不同。本研究未对代谢产物中的同分异构体进行鉴定, 下一步可以结合核磁共振等方法鉴定出代谢产物的确切结构。

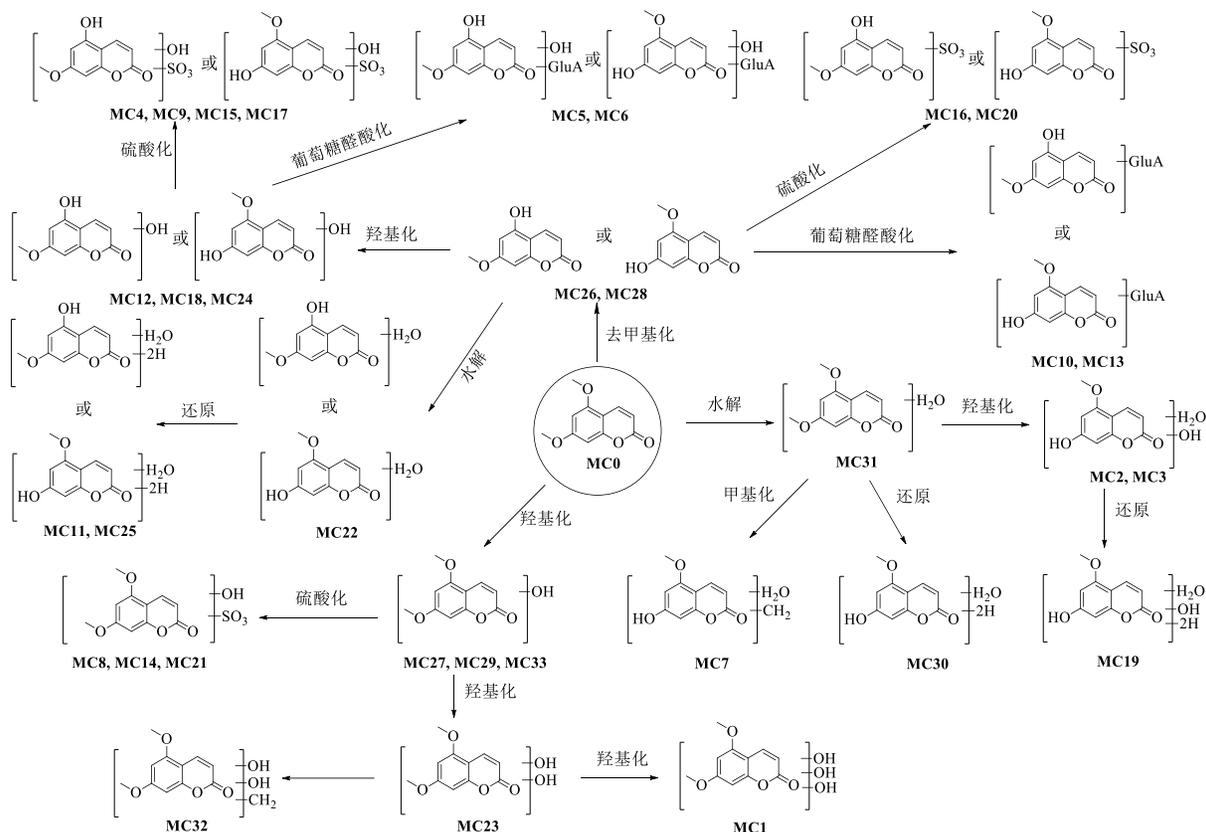


图5 5,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 5 Possible metabolic pathway of 5,7-dimethoxycoumarin in rats

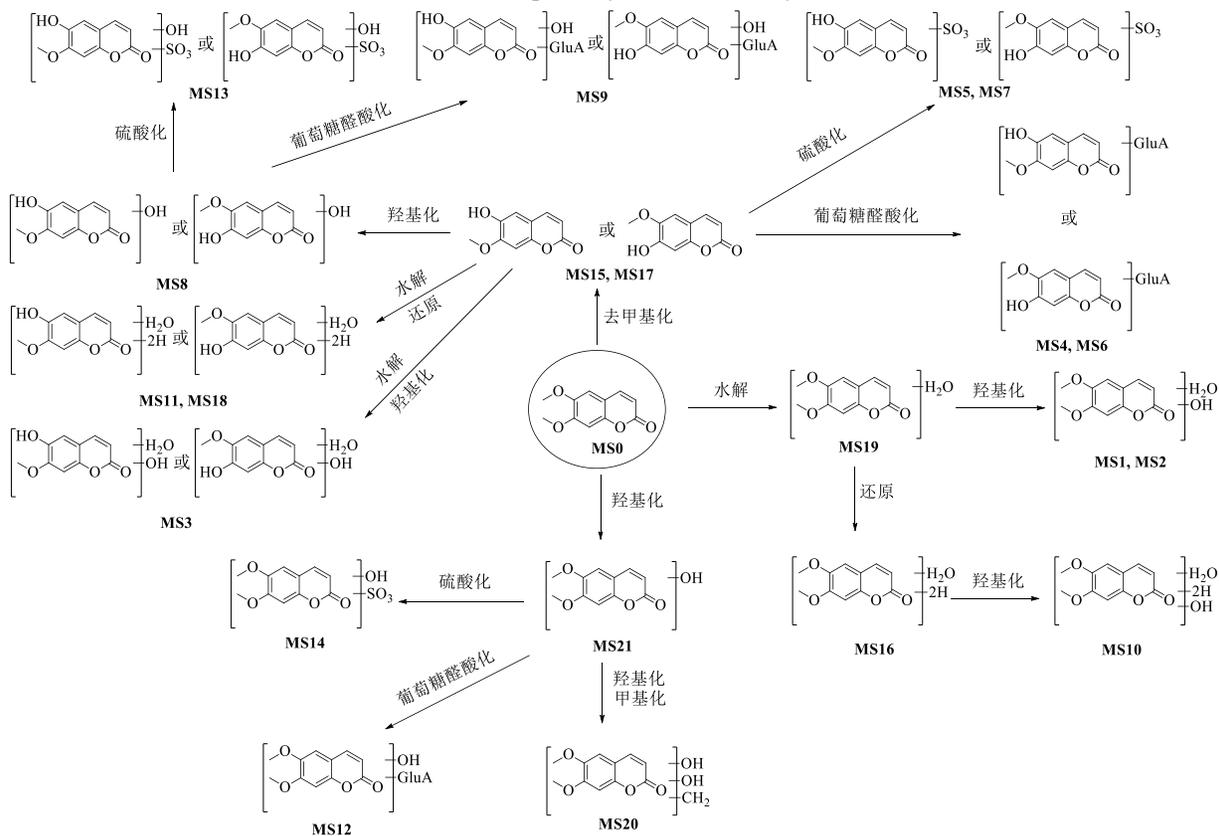


图6 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 6 Possible metabolic pathway of 6,7-dimethoxycoumarin in rats

5,7-二甲氧基香豆素在佛手中含量较高,在大鼠体内的代谢途径较多、代谢产物较丰富,推测佛手中5,7-二甲氧基香豆素较6,7-二甲氧基香豆素发挥更为主要的作用。课题组前期通过网络药理学对佛手发挥止咳化痰功效的有效成分进行了分析,结果显示6,7-二甲氧基香豆素关联更大,可能是由于目前6,7-二甲氧基香豆素与止咳化痰相关的研究较多,而5,7-二甲氧基香豆素几乎没有与止咳化痰相关的研究。2种香豆素与佛手止咳化痰功效相关的可能性可以通过体内外药理实验进行验证,进一步阐明佛手止咳化痰功效的物质基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 185-186.
- [2] 崔红花, 高幼衡, 梁盛林, 等. 川佛手化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1304-1306.
- [3] 秦枫. 川佛手化学成分的研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2008.
- [4] 赵永艳, 胡瀚文, 彭腾, 等. 佛手的化学成分药理作用及开发应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(11): 2734-2736.
- [5] 魏莹, 陈珍, 杨兰, 等. HPLC法同时测定不同产地佛手中5个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2180-2184.
- [6] Niu N, Li B L, Hu Y, *et al.* Protective effects of scoparone against lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 127-133.
- [7] 杨燕, 王庆伟, 张琰. 滨蒿内酯的研究进展 [J]. 中国药业, 2011, 20(19): 1-3.
- [8] 王珍, 成丽兰, 章诗富, 等. 滨蒿内酯对实验性变应性鼻炎大鼠维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ t 及相关因子表达的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2019, 26(2): 84-87.
- [9] Sánchez-Recillas A, Estrada-Soto S, Millán-Pacheco C, *et al.* Calcium channel blockade mediates the tracheal relaxation of 6,7-dimethoxycoumarin isolated from *Magnolia mexicana* [J]. *Rev Bras De Farmacogn*, 2023, 33(3): 641-650.
- [10] 徐倩, 徐国兵. 香豆素类化合物代谢研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 222-225.
- [11] 雷震, 马卫东, 於凯芹, 等. 香豆素类化合物的体内代谢研究进展 [J]. 中国药业, 2016, 25(23): 5-8.
- [12] Xiao Y, Wang Y K, Xiao X R, *et al.* Metabolic profiling of coumarins by the combination of UPLC-MS-based metabolomics and multiple mass defect filter [J]. *Xenobiotica*, 2020, 50(9): 1076-1089.
- [13] 季红, 王沛, 于治国, 等. 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内主要代谢产物的研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(3): 40-41.
- [14] 刘志伟. 茵陈有效成分6,7-二甲氧基香豆素在白鼠体内主要代谢产物的研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(12): 703-705.
- [15] 肖瑶. 茵陈蒿的化学成分及其代谢研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
- [16] Leonart L P, Gasparetto J C, Pontes F L D, *et al.* New metabolites of coumarin detected in human urine using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 2031.
- [17] Feng W Y, Wen J, Stauber K. *In vitro* drug metabolism investigation of 7-ethoxycoumarin in human, monkey, dog and rat hepatocytes by high resolution LC-MS/MS [J]. *Drug Metab Lett*, 2018, 12(1): 33-53.
- [18] 李杨杨, 黄成, 孟晓明, 等. 茵陈中6,7-二甲氧基香豆素在MDCK模型中的吸收机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 973-977.
- [19] Lv J L, Li R S, Jin S Y, *et al.* Changes of pharmacokinetics of 6,7-dimethoxycoumarin in a rat model of alpha-naphthylisothiocyanate-induced experimental hepatic injury after Yinchenhao Decoction (茵陈蒿汤) treatment [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(11): 831-836

[责任编辑 李亚楠]