

基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析西洋参果总皂苷的人血成分

张楠淇¹, 李平亚¹, 王翠竹¹, 李卓¹, 王振洲¹, 崔涛², 刘金平^{1*}

(1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海 201206)

[摘要] 目的:研究西洋参果总皂苷(TSPQF)灌胃给予大鼠后的入血成分,为其药效物质基础研究提供参考。方法:选取雄性 Wistar 大鼠为实验对象,以 2.6 g·kg⁻¹灌胃给予 TSPQF,收集血清样品,采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术与多元统计分析相结合的方法快速分析并鉴定吸收入血的原型成分及其代谢产物。结果:大鼠含药血清中共鉴定了9个人血成分,其中5个人血成分为原型成分,分别为拟人参皂苷 F₁₁, 人参皂苷 Rc, Rb₃, Rd 和原人参三醇;其余4个为代谢产物,分别为原人参三醇,人参皂苷 CK, 人参皂苷 Rh₂ 和拟人参皂苷 RT₅。结论:9个人血成分可能是 TSPQF 在体内直接作用物质,为揭示 TSPQF 的药效物质基础提供了科学依据。

[关键词] 西洋参果; 总皂苷; 入血成分; 人参皂苷类成分; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用; 灌胃给药

[中图分类号] R969.1; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0117-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060117

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1042.008.html>

[网络出版时间] 2016-11-29 10:42

Absorbed Components Analysis of Total Saponins from Panacis Quinquefolii Radix Fruit in Rat Serum by UPLC-Q-TOF/MS

ZHANG Nan-qi¹, LI Ping-ya¹, WANG Cui-zhu¹, LI Zhuo¹, WANG Zhen-zhou¹,
CUI Tao², LIU Jin-ping^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Waters Technology (Shanghai) Co. Ltd., Shanghai 201206, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze and identify the constituents in rat serum after oral administration of total saponins from Panacis Quinquefolii Radix fruit (TSPQF), and provide a reference for the pharmacodynamics material basis research. **Method:** The male Wistar rats were selected as experimental animals, rats were intragastric administered TSPQF at a dose of 2.6 g·kg⁻¹. The serum samples were collected and pretreated. The absorbed prototype constituents and their metabolites in rat plasma were rapidly analyzed and identified by combination of UPLC-Q-TOF/MS and multivariate statistical analysis. **Result:** A total of 9 absorbed components were detected and identified, including 5 prototype components, such as pseudoginsenoside F₁₁, ginsenoside Rc, Rb₃, Rd and protopanaxatriol. The other 4 metabolites were protopanaxadiol, pseudoginsenoside RT₅, ginsenoside CK, Rh₂, respectively. **Conclusion:** These nine constituents absorbed into blood may be the potential bioactive components in TSPQF, this result can provide a scientific basis for clarifying its substance basis of pharmacodynamics.

[Key words] Panacis Quinquefolii Radix fruit; total saponins; absorbed constituents in rat serum; ginsenoside; UPLC-Q-TOF/MS; intragastric administration

[收稿日期] 20160905(006)

[基金项目] 吉林省科技发展计划重点科技成果转化项目(20140307005YY)

[第一作者] 张楠淇,在读博士,从事天然药物化学成分及生物活性的研究, Tel:18626531357, E-mail:zhang72527@126.com

[通讯作者] *刘金平,教授,从事天然药物化学成分及生物活性的研究, Tel:18584330726, E-mail:liujp@jlu.edu.cn

西洋参是珍贵药用植物,具有补脾降火、生津滋阴、除烦倦的功效^[1]。西洋参果为其成熟果实,商品名为洋参果^[2]。洋参果含有多种与西洋参相同或相似的生理活性物质,如皂苷类、脂肪酸类、糖类、氨基酸类、黄酮类、无机元素类及挥发油类等化学成分,其中皂苷类成分为其主要活性成分^[3]。现代药理研究结果表明,西洋参果总皂苷(total saponins from *Panacis Quinquefolii* Radix fruit, TSPQF)具有抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗心肌缺血以及神经保护等显著作用^[4-9]。为充分利用 TSPQF,提升洋参果的经济价值,对其进行深入研究是非常必要的。

中药口服给药后,药物成分需在血中转运到达作用部位后才会发挥作用,中药含有许多成分,但进入血液的成分才有可能成为有效成分。因此,血清中含有的成分与药物在体内直接作用物质密切相关。血清中的移行成分包括原型成分和代谢产物。目前有关 TSPQF 的研究主要集中在体外成分分析和生物活性筛选等方面,尚无其入血成分的定性分析报道。文献已报道的入血成分研究方法包括 HPLC-UV, HPLC-DAD, HPLC-ELSD, HPLC-MS/MS 及 UPLC-Q-TOF/MS 等。其中, UPLC 相对于 HPLC 分离效果好、分析速度快,非常适合于多组分快速检测。Q-TOF/MS 能够进行相对分子质量的精确测定,选择性高、灵敏度好,适合复杂基质中组分的准确性。故本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 对 TSPQF 灌胃给药后的大鼠血清进行研究,通过与给药前总皂苷色谱及空白组提取离子色谱进行比对并结合多元统计分析,考察灌胃给予大鼠 TSPQF 后吸收入血的原型成分和代谢产物。该方法可快速、全面地检测潜在的活性成分,为进一步阐明药效物质基础和建立全面的质量控制提供参考依据。

1 材料

Xevo G2 型 Q-TOF 四级杆飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司), N-A35 型氮气发生器(上海金浪科技有限公司), RCT-3200 型超纯水仪(长春博莱帕特科技发展有限公司), DCY-12S 型氮吹仪(青岛海科仪器有限公司), TGL-16aR 型飞鸽超高速离心机(上海安亭科学仪器厂), FA1104N 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。

西洋参果总皂苷(TSPQF)由吉林大学再生医学科学研究所提供,经吉林大学药学院李平亚教授鉴定,批号 151216,总皂苷质量分数 85%;取 TSPQF 适量,加水溶解,配制成 260 g·L⁻¹ 溶液。人参皂苷 Rg₁, Re, Rd, Rb₁, Rb₂, Rg₃, Rh₂, Rg₂ 和拟人参皂苷

F₁₁, 原人参二醇,原人参三醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110703-201529, 110754-201525, 111818-201302, 110704-201424, 111715-201203, 110804-201504, 111748-200501, 111779-200801, 110841-201406, 111747-200501, 111755-200601);人参皂苷 Rc, Rb₃ 和拟人参皂苷 RT₅, 人参皂苷 CK 均为自制,经 HPLC 以不加校正因子的自身对照法进行纯度检查,纯度均 >98.5%;水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲酸、甲醇均为质谱纯,其余试剂均为分析纯。

雄性 Wistar 大鼠,体重(200 ± 20) g,由吉林大学基础医学院实验动物中心部提供,合格证号 SCXK(吉)2013-0001。饲养温度(25 ± 2) °C,相对湿度(50 ± 5)%,给药前禁食不禁水 12 h。大鼠随机分成 2 组(n = 8),给药组灌胃给予 TSPQF,给药体积 0.01 mL·g⁻¹,空白组灌胃相同体积水。经吉林大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法与结果

2.1 TSPQF 入血成分的测定

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),柱温 40 °C,样品管理器温度 20 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,流动 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min, 20% ~ 21% B; 3 ~ 5 min, 21% ~ 22% B; 5 ~ 7 min, 22% ~ 23% B; 7 ~ 10 min, 23% ~ 25% B; 10 ~ 11 min, 25% ~ 28% B; 11 ~ 17 min, 28% ~ 30% B; 17 ~ 22 min, 30% ~ 35% B; 22 ~ 27 min, 35% ~ 60% B; 27 ~ 31 min, 60% ~ 90% B; 31 ~ 32 min, 90% ~ 100% B; 32 ~ 36 min, 100% B; 36 ~ 42 min, 100% ~ 20% B)。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化源(ESI),正离子检测模式。全扫描范围 m/z 100 ~ 1 200。毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 40 V,源温度 110 °C,脱溶剂气温度 280 °C,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量 600 L·h⁻¹,氩气流量 0.15 mL·min⁻¹。采用亮氨酸-脑啡肽([M + H]⁺ = 556.277 1)作为校正标准液确保数据采集的准确性和重复性。

2.1.3 血清样本的处理 给药 1 h 后,所有大鼠按 5 mL·kg⁻¹ 注射 10% 水合氯醛麻醉,肝门静脉取血,置于 10 mL 肝素化的离心管中,4 °C 下以 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液。上清液加入 4 倍量甲醇沉淀,涡旋混匀 3 min,混合液于 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,除去蛋白质,吸取上清液,氮气吹干。所得残渣用甲醇复溶,过 0.22 μm 微孔滤膜,进行

UPLC-Q-TOF/MS 分析。

2.1.4 数据处理 采用 MarkerLynx XS 软件对血清样本的 UPLC-Q-TOF/MS 数据文件进行峰检测、校准、同位素消除等分析,将其处理和转换为多元数据矩阵,提取变量包括保留时间、精确相对分子质量和峰强度,导入 Simca-P 13.0 进行偏最小二乘法分析(PLS-DA),强化组间差异,尽可能减少或消除组内差异,得得分图和载荷图,在载荷图中观察外围离散的离子的趋势图,选择在空白样品中含量为零或接近于零(误差范围内)而在含药样品中较高的离子,即为潜在的中药体内成分。根据精确的相对分子质量及 MS/MS 碎片数据鉴定原型成分及代谢产物的结构。

2.2 TSPQF 及生物样品色谱图的建立与分析 对 TSPQF 及给药组大鼠血清样品、空白组大鼠血清样品进行了定性分析。TSPQF 中所含的各单体皂苷在 30 min 内得到较好的分离,3 种样品的典型总离子流图见图 1。结果显示血液中所含有的内源性物质同时也获得了良好的检测,但因其质谱响应值高于 TSPQF 体内成分,干扰明显,故在所采集的色谱图中直观上难以发现 TSPQF 的体内成分。因此,在此基础上结合主成分分析(PCA)和 PLS-DA 检测和鉴定 TSPQF 的入血成分。

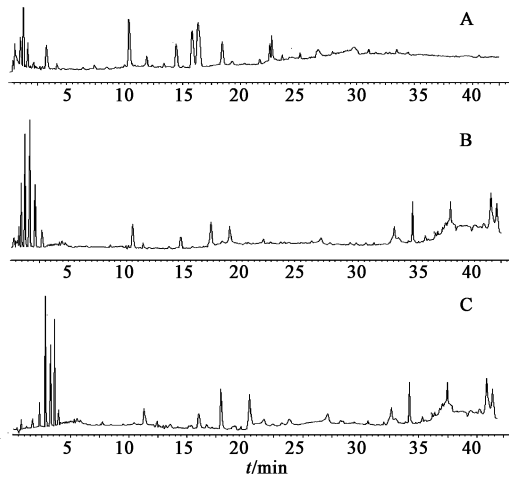


图 1 西洋参总皂苷(A),空白血清(B)和给药血清(C)的正离子检测模式总离子流

Fig. 1 TIC of total saponins from Panacis Quinquefolii Radix fruit (A), blank serum (B) and administration serum (C) under positive ion detection mode

2.3 多元统计分析 将 UPLC-Q-TOF/MS 原始数据文件转换得到的数据矩阵导入 Simca-P 13.0 软件中进行加入分组信息的 PLS-DA 分析。结果 PLS-DA 模型显示出很好的组间差异[隐变量反映自变

量的变异百分比(R^2X)0.432,隐变量反映因变量的变异百分比(R^2Y)0.999,隐变量预测自变量和因变量变异的累积百分比(Q^2)=0.910]。在得分图中,可明显观察到血浆样品被分成 2 个离散群,分别为空白组(CTR,得分矩阵右侧)和给药组(TSPGF,得分矩阵左侧),说明血清样品存在明显的差异,见图 2。载荷图中各点表示保留时间和 m/z 的变量,其与中心点的距离远近表示该变量为样品组分型做出的贡献大小,偏离越远的点,其在不同样品中含量变化越大,见图 2。结果显示给药 1 h 后血清与空白血清相比,差异显著化合物有 9 个,见表 1。通过一级、二级高分辨质谱的数据分析,并结合 TSPQF 图谱和文献资料研究^[10-12],确定了其中 5 个皂苷类化合物,分别为拟人参皂苷 F_{11} ,人参皂苷 Rc, Rb₃, Rd 和原人参三醇,这 5 个成分也存在于 TSPQF 中,推测其为原型药入血;其余 4 个根据其质荷比和离子碎片信息推测其可能为皂苷类化合物的代谢产物。

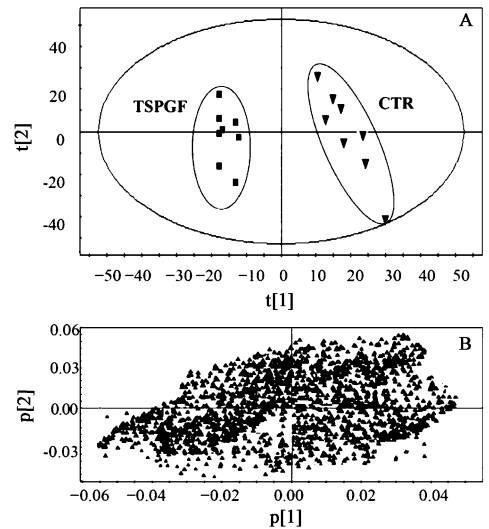


图 2 西洋参总皂苷给药组和空白组的 PLS-DA 得分矩阵(A)和载荷(B)

Fig. 2 PLS-DA score plot (A) and loading plot (B) of administration group with total saponins from Panacis Quinquefolii Radix fruit and blank group

2.4 TSPQF 中吸收入血原型成分的鉴定 在筛选出的离子峰中,既存在于给药血清中,又存在于 TSPQF 中的成分被认为是入血的原型成分。通过比对保留时间,MS, MS/MS 色谱图及对照品图谱,在大鼠血清中分析并鉴定了 5 个吸收入血的原型皂苷类成分,见表 1。与计算值比较,这些原型成分的精确相对分子质量误差均 $< 4 \times 10^{-6}$ 。其化学结构式见图 3。

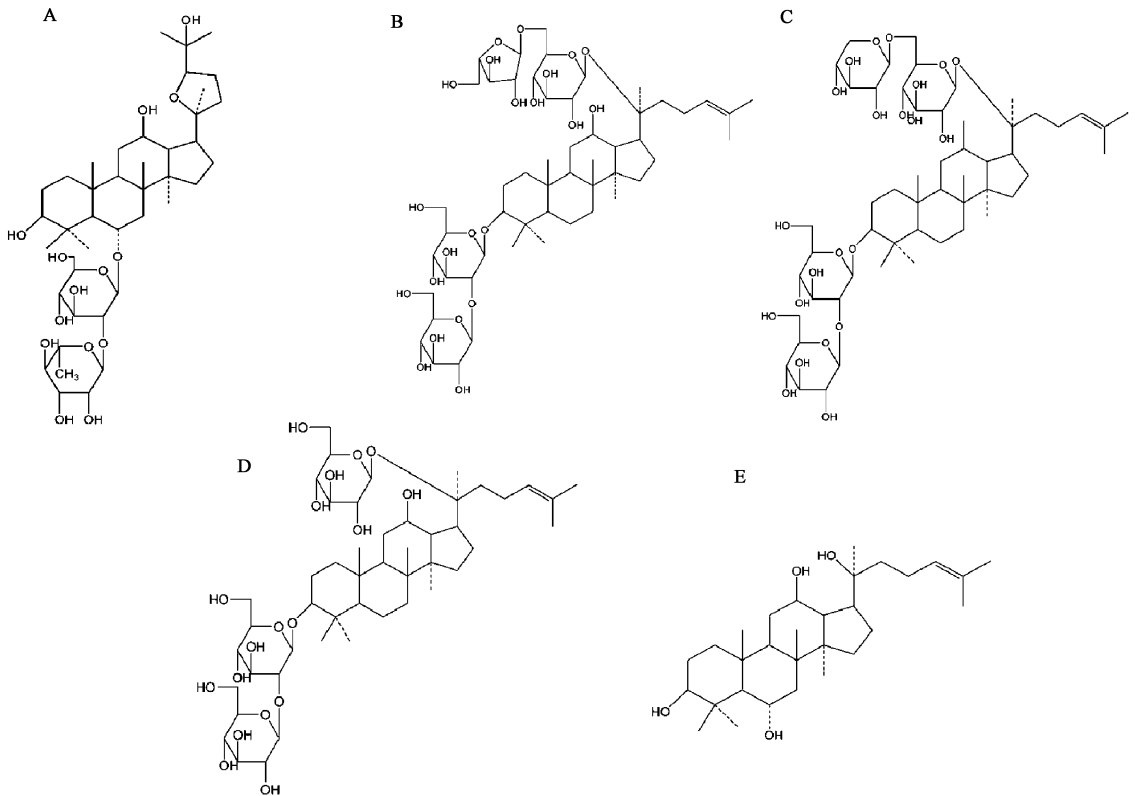
2.4.1 拟人参皂苷 F_{11} 一级质谱在保留时间

表 1 西洋参皂苷中入血原型成分及代谢产物的 LC-MS 数据及鉴定

Table 1 LC/MS data and identification of absorbed prototype compounds and metabolite from TSPQF

No.	t_R /min	m/z 测定值	m/z 计算值	δ	MS/MS 碎片信息	分子式	鉴定结果	备注
1	10.36	801.500 1 [M + H] ⁺	801.500 0 [M + H] ⁺	0.1×10^{-6}	143.108 2 [M + H - C ₃₃ H ₅₇ O ₁₂] ⁺ 457.159 9 [M + H - glc - rha - 2H ₂ O] ⁺ 783.488 7 [M + H - H ₂ O] ⁺	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	拟人参皂苷 F ₁₁	原型成分
2	14.62	1 101.581 8 [M + Na] ⁺	1 101.582 2 [M + Na] ⁺	-0.4×10^{-6}	789.479 3 [M + Na - glc - araf] ⁺	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	人参皂苷 Rc	原型成分
3	16.28	1 101.581 3 [M + Na] ⁺	1 101.582 2 [M + Na] ⁺	-0.8×10^{-6}	789.479 6 [M + Na - glc - xyl] ⁺ 335.219 7 [glc + xyl] ⁺	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	人参皂苷 Rb ₃	原型成分
4	17.21	655.441 9 [M + H] ⁺	655.442 1 [M + H] ⁺	-0.3×10^{-6}	439.330 6 [M + H - glc - 3H ₂ O] ⁺ 143.126 1 [M + H - C ₃₃ H ₅₇ O ₁₂] ⁺	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₀	拟人参皂苷 RT ₅	代谢产物
5	18.49	969.541 9 [M + Na] ⁺	969.539 9 [M + Na] ⁺	2.0×10^{-6}	789.479 9 [M - glc] ⁺ 365.108 0 [2glc + Na] ⁺	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	人参皂苷 Rd	原型成分
6	19.45	645.434 7 [M + Na] ⁺	645.434 3 [M + Na] ⁺	0.6×10^{-6}	483.391 2 [M + Na - glc] ⁺	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	人参皂苷 CK	代谢产物
7	20.09	483.381 9 [M + Na] ⁺	483.381 4 [M + Na] ⁺	1.0×10^{-6}	429.382 2 [M + Na - 3H ₂ O] ⁺	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	原人参二醇	代谢产物
8	21.49	645.434 0 [M + Na] ⁺	645.434 3 [M + Na] ⁺	-0.4×10^{-6}	483.392 4 [M + Na - glc] ⁺ 365.101 1 [2glc + Na] ⁺	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	人参皂苷 Rh ₂	代谢产物
9	27.12	477.392 9 [M + H] ⁺	477.394 4 [M + H] ⁺	-3.1×10^{-6}	459.268 3 [M + H - H ₂ O] ⁺	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	原人参三醇	原型成分

注:表格中 glc, xyl, araf, rha 分别表示葡萄糖、木糖、阿拉伯呋喃糖和鼠李糖。



A. 拟人参皂苷 F₁₁; B. 人参皂苷 Rc; C. 人参皂苷 Rb₃; D. 人参皂苷 Rd; E. 原人参三醇

图 3 TSPQF 中吸收入血原型成分的化学结构式

Fig. 3 Chemical structures of absorbed prototype compounds in TSPQF

10.36 min 出现 m/z 801.500 1 的峰, 推测其为 [M + H]⁺ 峰。以 m/z 801.500 1 为母离子进行 MS/MS

扫描, 产生 3 个主要碎片离子, m/z 143.108 2, 为侧链断裂碎片; m/z 457.159 9 为母离子失去 1 分子葡

葡萄糖, 1 分子鼠李糖和 2 分子水 [M - glc - rha - 2H₂O]⁺ 峰, 碎片 *m/z* 783.488 7 为 [M - H₂O]⁺ 峰, 结合文献 [13], 并与拟人参皂苷 F₁₁ 对照品质谱图对照, 基本一致。将其鉴定为拟人参皂苷 F₁₁, 分子式 C₄₂H₇₂O₁₄, 属于奥克梯隆型三萜皂苷, 见图 4。

序为人参皂苷 Rc 先于人参皂苷 Rb₃, 依此可初步推测其二级结构的归属。

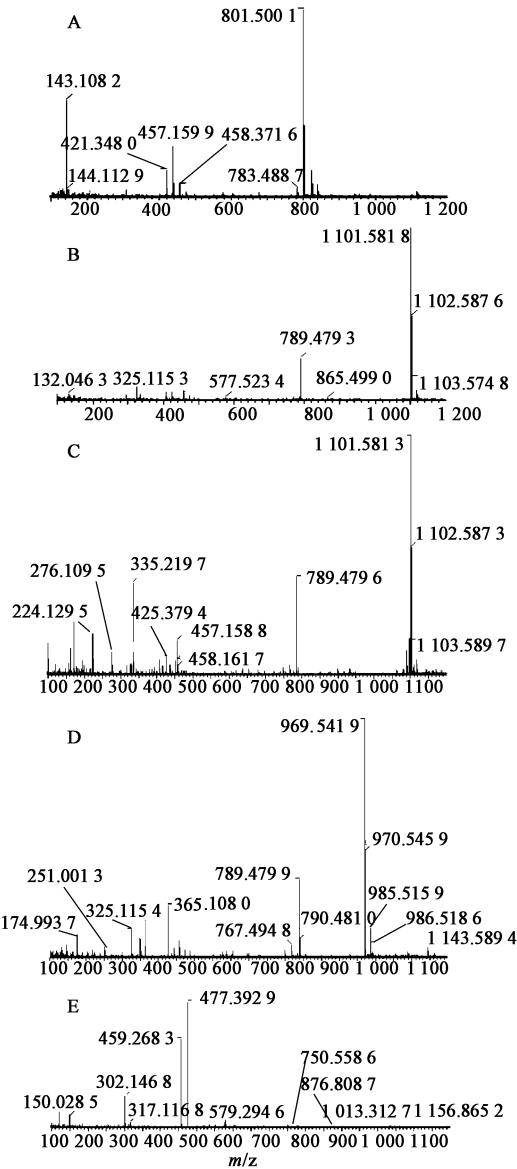
保留时间为 14.62 min 一级质谱出现 *m/z* 1 101.581 8 的峰, 推测其为 [M + Na]⁺ 峰。以 *m/z* 1 101.581 8 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生碎片 *m/z* 789.479 3, 为母离子失去 1 分子阿拉伯呋喃糖和 1 分子葡萄糖 [M - glc - araf]⁺ 峰, 结合文献 [14], 并与人参皂苷 Rc 对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为人参皂苷 Rc, 分子式 C₅₃H₉₀O₂₂, 属于人参二醇型皂苷。保留时间为 16.28 min 一级质谱出现 *m/z* 1 101.581 3 的峰, 推测其为 [M + Na]⁺ 峰。以 *m/z* 1 101.581 3 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生 2 个主要碎片离子, *m/z* 789.479 6, 为母离子失去 1 分子的葡萄糖和 1 分子的木糖 [M - glc - xyl]⁺ 峰, *m/z* 335.219 7 为 [glc + xyl]⁺ 峰, 结合文献 [12], 并与人参皂苷 Rb₃ 对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为人参皂苷 Rb₃, 分子式 C₅₃H₉₀O₂₂, 属于人参二醇型皂苷, 见图 4。

2.4.3 人参皂苷 Rd 一级质谱在保留时间 18.49 min 出现 *m/z* 969.541 9 的峰, 推测其为 [M + Na]⁺ 峰。以 *m/z* 969.541 9 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生 2 个主要碎片离子, *m/z* 789.479 9 为母离子失去 1 分子葡萄糖 [M - glc]⁺ 峰, *m/z* 365.108 0 为 [2glc + Na]⁺ 峰, 结合文献 [15], 并与人参皂苷 Rd 对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为人参皂苷 Rd, 分子式 C₄₈H₈₂O₁₈, 属于人参二醇型皂苷, 见图 4。

2.4.4 原人参三醇 一级质谱在保留时间 27.12 min 出现 *m/z* 477.392 9 的峰, 推测其为 [M + H]⁺ 峰。以 *m/z* 477.392 9 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生碎片 *m/z* 459.268 3 为母离子脱去 1 分子水 [M + H - H₂O]⁺ 峰, 结合文献 [16], 并与原人参三醇对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为原人参三醇, 分子式为 C₃₀H₅₂O₄, 见图 4。

2.5 谢产物的鉴定 原型成分在体内经过 I 相和 II 相代谢来进行生物转化, I 相代谢主要包括氧化、去甲基化和水解反应等。大部分代谢产物仍保留原型化合物的母核结构, 故可通过对断裂碎片的分析来鉴定代谢产物。只存在于给药血清样品中的成分可认为是与药物相关的代谢产物。在大鼠给药血清中共鉴定了 4 个代谢产物, 见表 1。与计算值比较, 这些原型成分的精确相对分子质量误差均 < 4 × 10⁻⁶, 其化学结构式见图 5。

2.5.1 拟人参皂苷 RT₅ 一级质谱在保留时间

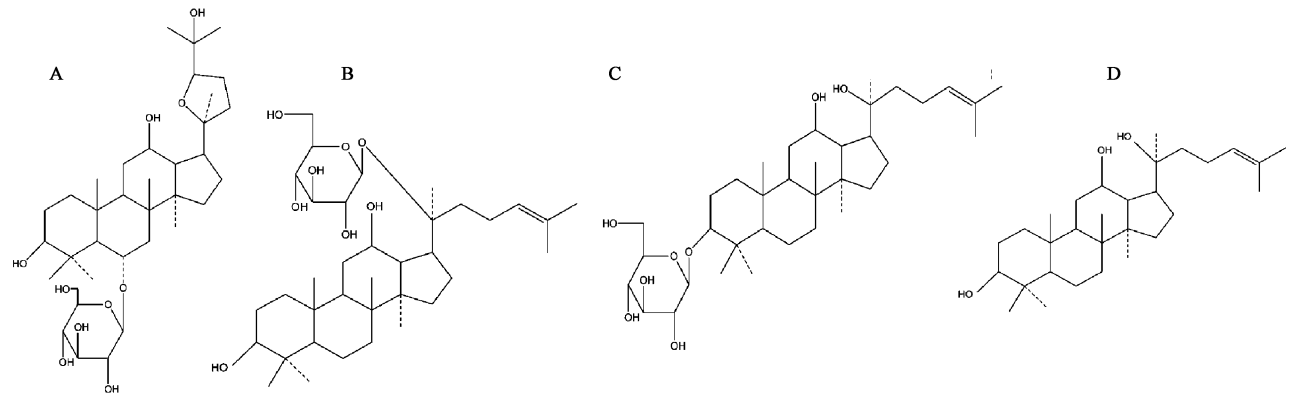


A. 拟人参皂苷 F₁₁; B. 人参皂苷 Rc; C. 人参皂苷 Rb₃; D. 人参皂苷 Rd; E. 原人参三醇

图 4 原型成分分子离子的质谱

Fig. 4 Fragment ion mass spectrum of absorbed prototype compounds in TSPQF

2.4.2 人参皂苷 Rc, Rb₃ 人参皂苷 Rc, Rb₃ 同属于人参二醇型皂苷, 化学结构非常相似。一级质谱正离子模式扫描在保留时间 14.62 min 和 16.28 min 处得到 2 个峰。对这 2 个峰分别进行二级质谱扫描, 发现其结构碎片相似, 质谱上无法准确区分。根据文献报道^[10] 和对照图谱, 在相似条件下出峰顺



A. 拟人皂苷 RT₅; B. 人参皂苷 CK; C. 人参皂苷 Rh₂; D. 原人参二醇

图 5 TSPQF 中吸收入血代谢产物化学结构式

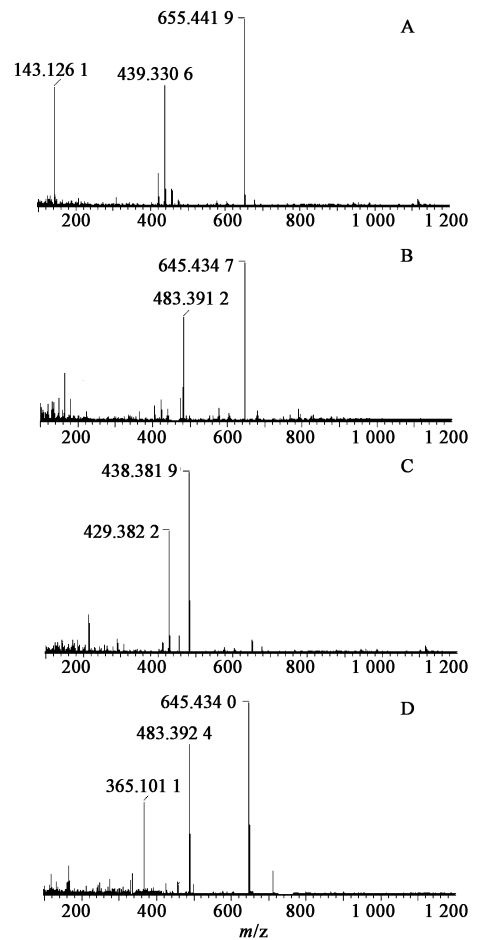
Fig. 5 Chemical structures of absorbed metabolite in TSPQF

17.21 min 时, 出现 m/z 655.441 9 的峰, 推测为 $[M + H]^+$ 峰, 以 m/z 655.441 9 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生 2 个主要碎片离子, m/z 439.330 6 为母离子脱去 1 分子葡萄糖和 3 分子水 $[M - \text{glc} - 3\text{H}_2\text{O}]^+$ 峰, m/z 143.126 1 为侧链断裂峰, 结合文献 [13], 并与拟人皂苷 RT₅ 对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为拟人皂苷 RT₅, 分子式为 C₃₆H₆₂O₁₀, 属于奥克梯隆型三萜皂苷。其代谢途径推测为拟人皂苷 F₁₁ 在体内失去 1 分子的葡萄糖, 见图 6。

2.5.2 人参皂苷 CK 一级质谱在保留时间 19.45 min 时, 出现 m/z 645.434 7 的峰, 推测为 $[M + \text{Na}]^+$ 峰, 以 m/z 645.434 7 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生碎片 m/z 483.391 2 为母离子失去 1 分子葡萄糖 $[M + \text{Na} - \text{glc}]^+$ 峰, 结合文献 [17], 并与人参皂苷 CK 对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为人参皂苷 CK, 分子式 C₃₆H₆₂O₈, 属于人参二醇型皂苷。其代谢途径推测为人参二醇型皂苷在体内失去 3 分子糖, 见图 6。

2.5.3 原人参二醇 一级质谱在保留时间 20.09 min 时, 出现 m/z 483.381 9 的峰, 推测为 $[M + \text{Na}]^+$ 峰, 以 m/z 483.381 9 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生碎片 m/z 429.382 2 为母离子失去 3 分子水加钠 $[M - 3\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合文献 [16], 并与原人参二醇对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其鉴定为原人参二醇, 分子式 C₃₀H₅₂O₃。其代谢途径推测为人参二醇型皂苷在体内脱糖, 见图 6。

2.5.4 人参皂苷 Rh₂ 一级质谱在保留时间 21.49 min 时, 出现 m/z 645.434 0 的峰, 推测为 $[M + \text{Na}]^+$ 峰, 以 m/z 645.434 0 为母离子进行 MS/MS 扫描, 产生 2 个主要碎片离子, m/z 483.392 4 为母



A. 拟人皂苷 RT₅; B. 人参皂苷 CK; C. 原人参二醇; D. 人参皂苷 Rh₂

图 6 代谢产物子离子质谱

Fig. 6 Fragment ion mass spectrum of absorbed metabolite in TSPQF

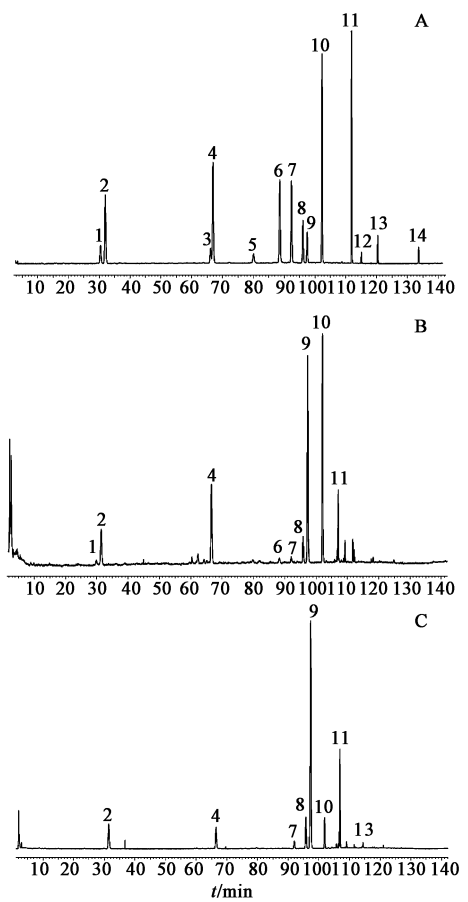
离子失去 1 分子葡萄糖 $[M + \text{Na} - \text{glc}]^+$ 峰, m/z 365.101 1 为 $[2\text{glc} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合文献 [18], 并与人参皂苷 Rh₂ 对照品质谱图对照, 基本一致, 故将其

鉴定为人参皂苷 Rh_2 , 分子式 $C_{36}H_{62}O_8$ 。其代谢途径推测为人参皂苷 Rg_3 在体内脱去 1 分子葡萄糖, 见图 6。

3 讨论

一直以来, 科研工作者对西洋参的主要研究都集中在根部, 其地上部分洋参果的研究很少。洋参果与西洋参具有相似的化学成分和相近的药理作用, 为了充分综合利用西洋参地上部分资源, 提升该药材产业的经济价值, 对 TSPQF 及其生物活性进行深入研究是非常有必要的。在进行入血成分分析前, 先采用 HPLC-ELSD 对比了 TSPQF 和西洋参总皂苷(TSPQ)的异同。色谱条件为 Unitary C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.3 mL·min⁻¹, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~14 min, 20%~21% A; 14~36 min, 21%~23% A; 36~55 min, 23%~28% A; 55~96 min, 28%~35% A; 96~112 min, 35%~60% A; 112~127 min, 60%~90% A; 127~134 min, 90%~100% A; 134~140 min, 100% A)。外标法测定各单体皂苷的含量。结果 TSPQ 中人参皂苷 Rg_1 , Re , PF_{11} , Rb_1 , Rc , Rb_2 , Rb_3 , Rd , Rg_3 的质量分数分别为 4.26%, 8.35%, 8.48%, 2.95%, 3.16%, 3.20%, 8.60%, 11.21% 和 3.25%; 人参皂苷 Rh_2 , Rg_2 , RT_5 和原人参二醇, 原人参三醇在此条件下未检出。TSPQF 中人参皂苷 Re , PF_{11} , Rc , Rb_2 , Rb_3 , Rd , Rg_3 , Rh_2 和原人参三醇的质量分数分别为 9.28%, 8.74%, 6.26%, 5.88%, 15.34%, 8.41%, 2.63%, 2.81% 和 9.09%; 人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , 原人参二醇, RT_5 , Rg_2 在此条件下未检出。结果表明 TSPQ 和 TSPQF 中单体皂苷成分相近, 都含有人参皂苷 Re , Rc , Rb_2 , Rb_3 , Rd , Rg_3 , PF_{11} , 人参皂苷 Rh_2 和原人参三醇仅在 TSPQF 中检测到。

皂苷类药物的多成分定性分析是十分复杂的, 并且基质环境比较复杂, 采用常规的分离鉴定技术难度较大。UPLC-Q-TOF/MS 技术进行中药化学成分分析时, 可同时得到化合物的保留时间、相对分子质量及特征结构碎片等丰富信息^[19]。本实验基于 UPLC-Q-TOF/MS 提供的高选择性、高灵敏度、高质量质谱数据, 结合多元统计分析技术, 对 TSPQF 入血成分进行了鉴定, 共鉴定出 9 个化合物。结果表明有 5 个成分为原型药入血, 分别为拟人参皂苷 F_{11} , 人参皂苷 Rc , Rb_3 , Rd 和原人参三醇, 其余 4 个可能为皂苷化合物的代谢产物, 推测为拟人参皂苷 RT_5 , 人参皂苷 CK , 原人参二醇和人参皂苷 Rh_2 。这



1. 人参皂苷 Rg_1 ; 2. 人参皂苷 Re ; 3. 拟人参皂苷 RT_5 ; 4. 拟人参皂苷 F_{11} ; 5. 人参皂苷 Rg_2 ; 6. 人参皂苷 Rb_1 ; 7. 人参皂苷 Rc ; 8. 人参皂苷 Rb_2 ; 9. 人参皂苷 Rb_3 ; 10. 人参皂苷 Rd ; 11. 人参皂苷 Rg_3 ; 12. 原人参三醇; 13. 人参皂苷 Rh_2 ; 14. 原人参二醇

图 7 混合对照品(A), TSPQ(B)和 TSPQF(C)的 HPLC-ELSD
Fig. 7 HPLC-ELSD of mixed reference standard (A), TSPQ (B) and TSPQF (C)

9 个成分具有抗肿瘤、抗心肌缺血及神经保护等生物活性^[20-26], 因此推测这 9 个成分可能是 TSPQF 体内直接作用物质, 对阐明 TSPQF 的药效物质基础具有重要意义, 为 TSPQF 在临床上的广泛应用奠定了理论基础。

[参考文献]

[1] 马晓宁. 西洋参地上部分总皂苷水解产物的药学研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2008.
[2] 井玥. 西洋参果的化学成分研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2007.
[3] 李艳娇. 西洋参果中皂苷成分及其生物活性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
[4] Kitts D D, Wijewickreme A N, HU C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 203(1/2): 1-10.
[5] XIE J T, Aung H H, WU J A, et al. Effects of American

- ginseng berry extract on blood glucose levels in ob/ob mice[J]. *Am J Chin Med*, 2002,30(2/3):187-194.
- [6] XIE J T, WU J A, Mehendale S, et al. Anti-hyperglycemic effect of the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in ob/ob mice [J]. *Phytomedicine*, 2004, 11(2/3):182-187.
- [7] 高燕,杨砚军,宋永贤. 西洋参果总皂苷降血脂作用的研究[J]. *中华中医药学刊*, 1997, 16(4):39-40.
- [8] 卢爱萍,刘金平,卢丹,等. 西洋参果总皂苷对冠状动脉结扎犬血流动力学及心肌缺血的影响[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2006, 32(3):383-386.
- [9] 于静华,刘春禹,宋宇,等. 洋参果总皂苷对缺氧及缺氧/复氧损伤心肌细胞的保护作用[J]. *吉林中医药*, 2005, 25(10):54-55.
- [10] 陈金鸾,孟繁玉,王振洲,等. 林下山参片人参总皂苷及19种单体人参皂苷(元)的含量测定[J]. *人参研究*, 2015(4):2-5.
- [11] LIU R, MA R, YU C, et al. Quantitation of eleven active compounds of Aidi injection in rat plasma and its application to comparative pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.07.059.
- [12] 苗凤茹,刘光宇,林力. 人参提取物及大鼠灌胃给药后入血成分的定性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(2):148-153.
- [13] 王金辉,李锐. 拟人参皂苷 F₁₁ 在大鼠体内的药物代谢研究[J]. *药学报*, 2001, 36(6):427-431.
- [14] 闫寒,赵松岩,刘运嘉,等. LC-MS-MS法测定参体和参须中人参皂苷 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6):105-107.
- [15] 杨柳,许舜军,曾星,等. 大鼠尿中人参皂苷 Rd 及其代谢物的 LC-MS 研究[J]. *药学报*, 2006, 41(8):742-746.
- [16] 孔令提. 人参皂苷元的药代动力学研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2013.
- [17] XIAO J, CHEN D, LIN X X, et al. Screening of drug metabolizing enzymes for the ginsenoside compound K *in vitro*: An efficient anti-cancer substance originating from *Panax ginseng* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0147183.
- [18] 李海军. 林下参化学成分及 SD 大鼠皮下注射 Rh₂ 药理和药动学的研究[D]. 长春:吉林大学, 2012.
- [19] 苗凤茹,刘光宇,林力. 延胡索总生物碱大鼠灌胃给药后入血成分的定性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(1):166-170.
- [20] WANG Y, DONG J, LIU P, et al. Ginsenoside Rb₂ attenuates oxidative stress and preserves endothelial function in renal arteries from hypertensive rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13):3171-3181.
- [21] XIE Z, SHI M, ZHANG C, et al. Ginsenoside Rd protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via decreasing the expression of the NMDA receptor 2B subunit and its phosphorylated product [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(8):2149-2159.
- [22] ZHANG K, LI Y. Effects of ginsenoside compound K combined with cisplatin on the proliferation, apoptosis and epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells of human breast cancer [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(4):561-568.
- [23] WANG J, CHEN Y, DAI C, et al. Ginsenoside Rh₂ alleviates tumor-associated depression in a mouse model of colorectal carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5):2189-2195.
- [24] FU K, LIN H, Miyamoto Y, et al. Pseudoginsenoside-F₁₁ inhibits methamphetamine-induced behaviors by regulating dopaminergic and GABAergic neurons in the nucleus accumbens [J]. *Psychopharmacology*, 2016, 233(5):831-840.
- [25] Lee Y J, JIN Y R, Lim W C, et al. Ginsenoside Rc and Re stimulate c-fos expression in MCF-7 human breast carcinoma cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(1):53-57.
- [26] HUANG J, PENG K, WANG L, et al. Ginsenoside Rh₂ inhibits proliferation and induces apoptosis in human leukemia cells via TNF- α signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48(8):750-755.

[责任编辑 刘德文]