

开心散乙醇提取物中远志皂苷的入血成分及体内代谢产物分析

Reeju Maharjan¹, Chiranjivi Thapa¹, 汪娜¹, Ram Chaulagain¹,
薛迪¹, 贾永明¹, 邓竹君¹, 黄树明², 刘学伟^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:** 鉴定开心散 60% 乙醇提取物(KXS-60% E)及其血中移行成分中的远志皂苷类成分,分析大鼠体内远志皂苷类成分的代谢产物。**方法:** 应用 UPLC-TOF-MS 技术,分析 TOF-MS/MS 给出的二级离子信息,结合液质联用工作站 MassLynx v4.1 分析软件及现有的文献数据库,鉴定 KXS-60% E 中远志皂苷类成分、灌服 KXS-60% E 后血清中的远志皂苷类成分及其代谢产物。**结果:** 鉴定了 KXS-60% E 中 14 个远志皂苷类成分,主要为三萜型皂苷;鉴定了大鼠口服 KXS-60% E 后血中的 5 个原型皂苷类成分及 4 个代谢产物。**结论:** 远志皂苷类成分及 4 个代谢产物可能是 KXS-60% E 潜在的活性成分及直接药效物质基础,这将有助于阐明开心散防治阿尔兹海默症的有效成分及作用机制。

[关键词] 开心散;血清药物化学;远志;皂苷类;代谢产物;乙醇提取物;远志皂苷 B

[中图分类号] R969.1;R945;R284;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0118-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190118

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1132.014.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 11:32

Identification of Polygala Saponins and Their Metabolites *in Vivo* from Ethanol Extract of Kaixinsan

Reeju Maharjan¹, Chiranjivi Thapa¹, WANG Na¹, Ram Chaulagain¹, XUE Di¹,
JIA Yong-ming¹, DENG Zhu-jun¹, HUANG Shu-ming², LIU Xue-wei^{1*}
(1. Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;
2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** Polygala saponins in the 60% ethanol extract of Kaixinsan (KXS-60% E) were identified, and the polygala saponins as well as their metabolites were analyzed in rat plasma after oral administration of KXS-60% E. **Method:** Ion fragments data of polygala saponins in KXS-60% E was identified by UPLC-TOF-MS. Similarly, the polygala saponins and their metabolites were also identified in rat plasma after oral administration of KXS-60% E with the ion fragments data, MassLynx v4.1 software and databases in the literatures. **Result:** A total of 14 polygala saponins which were mainly triterpene saponins, were identified in KXS-60% E *in vitro*. Moreover, 5 polygala saponins as well as 4 metabolites were identified in rat plasma. **Conclusion:** Five polygala saponins as well as four metabolites may be the potential bioactive compounds and direct pharmacodynamic basis of KXS-60% E. Further study on these constituents may find out the effective compounds in KXS-60% E and clarify the mechanism on treatment of Alzheimer's disease.

[Key words] Kaixinsan; serum pharmacology; Polygalae Radix; saponins; metabolites; ethanol extract; onjisaponin B

[收稿日期] 20170406(002)

[基金项目] 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目(2016-KYYWF-0865)

[第一作者] Reeju Maharjan, 在读学士,从事临床医学研究, Tel:0452-2663615, E-mail: reeju.maharjan@yahoo.com

[通讯作者] * 刘学伟, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事天然药物防治神经退行性疾病的活性成分筛选及作用机制研究, Tel:0452-2663804, E-mail: lxw_qmu@126.com

开心散是古代经典名方,首载于唐代孙思邈的《备急千金要方》,由人参、远志、茯苓、石菖蒲组成,是补气健脑、开窍益智的基础方剂,原方或类方常用于治疗阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)等痴呆类疾病,但其药效物质基础仍未完全确定。前期研究结果显示开心散 60% 乙醇提取物 [KXS-60% E, 人参-茯苓-远志-石菖(3:3:2:2)] 能改善由 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β) 诱导的动物认知功能障碍^[1],缓解 A β 诱导的 PC12 细胞及在体动物海马神经元损伤^[1-2],改善 A β 诱导的长时程增强(LTP)抑制^[3],提示开心散中基于 A β 靶点的活性成分客观存在。

为分析药物的潜在活性成分,课题组利用 UPLC-TOF-MS 技术建立了 KXS-60% E 体外成分以及大鼠灌服药物后含药血清样品的分析方法,归属了体外成分的主要色谱峰的来源,并在此基础上,指认了灌服 KXS-60% E 后大鼠血清中 41 个血中移行成分,包括 28 个药物原型成分及 13 个代谢产物。近期研究结果提示,在 KXS-60% E 中,远志对全方的贡献度最大^[4-5],而作为远志活性成分的远志皂苷类成分的鉴定工作尚未进行。此外,开心散醇提取物中远志皂苷的体内代谢产物仍鲜有报道。在前期研究基础上,本实验针对血清移行成分——远志皂苷类成分及其代谢产物进行了鉴定,为分析开心散防治 AD 的直接药效物质基础及远志皂苷类成分的体内药动学特征提供实验依据。

1 材料

ACQUITY™ 型 UPLC 液相色谱仪和 LCT Premier XE 型飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司),CT-15RE 型高速冷冻离心机(日本日立公司)。人参、茯苓、远志、石菖蒲药材均购自世一堂中药材有限公司,经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定,分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎,多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核,远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的干燥根,天南星科植物石菖蒲 *Acortus tatarinowii* 的干燥根茎,符合 2015 年版《中国药典》的相关规定;水为蒸馏水,乙腈、甲醇和甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雌性清洁级 Wistar 大鼠,体重 220 ~ 240 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2006-0003,室温饲养,自由摄食饮水。于实验前 12 h 禁食不禁水。实验动物使用经黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准,批准号

2013HZYLL-012。

2 方法与结果

2.1 开心散 60% 乙醇提取物(KXS-60% E)的制备^[4] 按原处方比例称取药材,结合实验室前期研究结果所获得的最佳提取工艺,即加 12 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次,提取时间分别为 2, 1.5 h,合并提取液,过 16 层纱布,滤液减压回收后干燥(80 °C 水浴浓缩至稠膏,干燥箱 80 °C 干燥至恒重),粉碎过 80 目筛,于低温冰箱内冷藏备用。

2.2 空白及含药血清样品的制备 雄性 Wistar 大鼠 10 只随机分为空白组及给药组,空白组大鼠采用乙醚吸入麻醉法,待动物麻醉后,自眼底静脉丛取血 1.5 mL,于 4 °C, 13 000 × g 离心 10 min,得空白血清备用。参考前期研究基础^[1,4],给药组按 5.4 g·kg⁻¹ 灌服 KXS-60% E 药粉,给药 30 min 后采用相同方法制备含药血清。取大鼠空白血清及给药血清各 0.5 mL 上样到预先用甲醇、水各 2 mL 活化平衡好的固相萃取柱上,分别加水 4 mL 和甲醇 2 mL 淋洗,淋洗液弃去,加甲醇 3 mL 洗脱,收集洗脱液,35 °C 下空气流吹干,残渣用流动相 100 μ L 复溶,超声 1 min,混悬震荡 30 s,于 4 °C, 13 000 × g 离心处理 10 min,取上层清液,进样 2 μ L 供 UPLC 分析。

2.3 检测条件^[4]

2.3.1 色谱条件 进样量 2 μ L,柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 30% A; 5 ~ 12 min, 30% ~ 50% A; 12 ~ 15 min, 50% ~ 80% A; 15 ~ 16 min, 80% ~ 100% A),样品不经紫外检测器直接导入质谱仪进行正负离子扫描分析。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),采用正负离子扫描检测,毛细管电压 1 kV,样本锥孔电压 40 V,离子源温度 100 °C,脱溶剂温度 350 °C,脱溶剂气流量设定 700 L·h⁻¹,锥孔气流量 10 L·h⁻¹,微通道板电压 2.3 kV,扫描时间 0.3 s;准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin, [M + H]⁺ 556.277 1),质量浓度 1.0 μ g·L⁻¹,校正溶液进样速度 30 μ L·min⁻¹,校正频率 15 s;扫描方式为全扫描,质量扫描范围 m/z 100 ~ 2 000。

2.4 远志皂苷类成分的结构鉴定 UPLC-TOF-MS 检出的信息可以确定化合物的相对分子质量及色谱峰的来源归属,能够界定检索化合物的范围。对单个化合物进行 TOF-MS/MS 扫描可以获得碎片离子信息。利用 MassLynx v4.1 的数据平台,可以确定其分子式的可能组成。在鉴定时,利用化合物的精

确相对分子质量或分子式检索现有的化合物, 综合对比化合物的归属、母离子、子离子的信息, 并参考相关研究的文献以确定化合物的结构。

2.5 KXS-60% E 中远志皂苷类成分的鉴定 在 KXS-60% E 中, 鉴定了全部 14 个远志皂苷类成分, 见图 1, 主要以三萜皂苷类成分为主, 见图 2, 其主要化合物的鉴定信息及分子组成等见表 1。

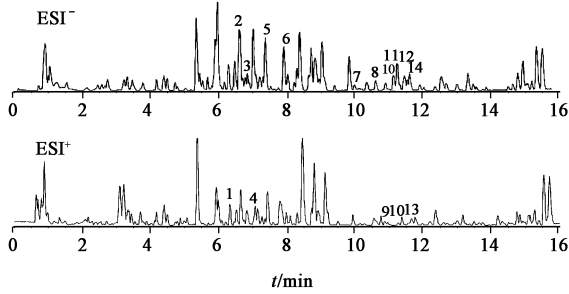


图 1 KXS-60% E 的 UPLC-TOF-MS 总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatograms of KXS-60% E by UPLC-TOF-MS

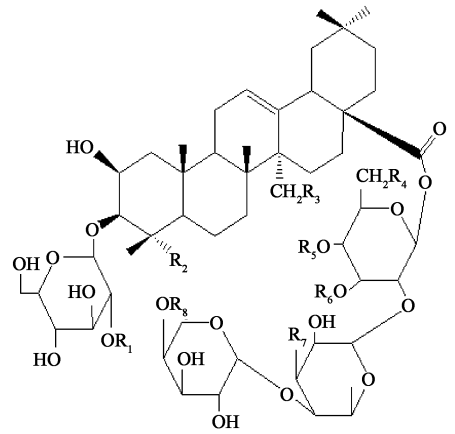


图 2 远志皂苷类成分的母核结构

Fig. 2 Structural identification of polygala saponins

2.6 KXS-60% E 中远志皂苷及其代谢物血中移行成分的鉴定 通过对比分析含药血清、空白血清中色谱峰的保留时间及质谱数据, 结合体外成分分析, 发现了峰 1~5 均以原型成分吸收入血, 见图 3 和

表 1 KXS-60% E 中远志皂苷类成分正、负离子扫描二级质谱数据及鉴定

Table 1 MS/MS informations and identification of polygala saponins in KXS-60% E under positive and negative ion scanning model

No.	化合物	负离子 m/z	正离子 m/z	分子式	取代基
1 ¹⁾	polygalasaponin X VIII	1 295 [M + HCOO] ⁻ , 1 249 [M - H] ⁻ , 1 087 [M - H - (Glu - H ₂ O)] ⁻	1 251 [M + H] ⁺ , 1 089 [M + H - (Glu - H ₂ O)] ⁺ , 777 [M + H - 2 (Glu - H ₂ O) - Xyl] ⁺	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈	R1 = Glu, R2 = CHO, R3 = R5 = R6 = R8 = H, R4 = R7 = OH
2 ¹⁾	polygalasaponin XXIV	1 295 [M + HCOO] ⁻ , 1 119 [M - H - HC] ⁻ , 1 077 [M - H - HC - C ₂ H ₂ O - H] ⁻	-	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₄	R1 = Glu, R2 = COOH, R3 = R4 = R6 = OH, R5 = R8 = H, R7 = O - Api
3 ¹⁾	polygalasaponin XXII	1 235 [M - H] ⁻ , 1 073 [M - H - (Glu - H ₂ O)] ⁻ , 941 [M - H - (Glu - H ₂ O) - (Xyl - H ₂ O)] ⁻	-	C ₅₈ H ₉₂ O ₂₈	R1 = R3 = R5 = R8 = H, R2 = COOH, R4 = R7 = OH, R6 = Api
4 ¹⁾	polygalasaponin XXI	1 103 [M - H] ⁻ , 1 073 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 911 [M - H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O)] ⁻	1 087 [M + H] ⁺ , 1 075 [M + H - CH ₂ O] ⁺ , 913 [M + H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O)] ⁺ , 797 [M + H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O) - Xyl] ⁺	C ₅₁ H ₆₀ O ₂₇	R1 = R3 = R5 = R6 = R8 = H, R2 = COOH, R4 = R7 = OH
5 ¹⁾	polygalasaponin XXXV	1 395 [M + HCOO] ⁻ , 1 349 [M - H] ⁻ , 1 319 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1 157 [M - H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O)] ⁻	1 351 [M + H] ⁺ , 1 321 [M + H - CH ₂ O] ⁺ , 1 159 [M + H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O)] ⁺ , 995 [M + H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O) - (Gal - H ₂ O)] ⁺	C ₆₃ H ₉₈ O ₃₁	R1 = R4 = H, R2 = COOH, R3 = R7 = OH, R5 = R6 = Ac, R8 = Glc
6	polygalasaponin XIX	1 381 [M - H] ⁻ , 1 219 [M - H - (Glu - H ₂ O)] ⁻	1 383 [M + H] ⁺ , 1 221 [M + H - (Glu - H ₂ O)] ⁺ , 1 059 [M + H - 2 (Glu - H ₂ O)] ⁺	C ₆₄ H ₁₀₂ O ₃₂	R1 = Glu, R2 = CHO, R3 = R5 = R8 = H, R4 = R7 = OH, R6 = Api
7	arilloside E	1 485 [M + HCOO] ⁻ , 1 439 [M - H] ⁻ , 1 409 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1 247 [M - H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O)] ⁻ , 969 [M - H - CH ₂ O - (Glu - H ₂ O) - (Gal - H ₂ O) - Xyl] ⁻	-	C ₆₆ H ₁₀₄ O ₃₄	R1 = R4 = R5 = H, R2 = COOH, R3 = R7 = OH, R6 = Ac, R8 = Xyl (2, 1) Gal - (3, 1) Xyl

续表 1

No.	化合物	负离子 m/z	正离子 m/z	分子式	取代基
8	onjisaponin G	1 459 [M + HCOO] ⁻	1 457 [M + H] ⁺ , 1 427 [M + H - CH ₂ O] ⁺ , 1 265 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁺ , 1 133 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)-(Api - H ₂ O)] ⁺ , 943 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)-(Api - H ₂ O)-TMC] ⁺	C ₇₀ H ₁₀₄ O ₃₂	R1 = R4 = R6 = H, R2 = COOH, R3 = OH, R5 = TMC, R7 = O - Api, R8 = Xyl
9	Z-senegasaponin B 或 E-senegasaponin B	-	1 427 [M + H] ⁺ , 1 397 [M - H - CH ₂ O] ⁺ , 1 235 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁺ , 1 273 [M + H - CH ₂ O - Glu - Gal] ⁺ , 913 [(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)] ⁺	C ₆₉ H ₁₀₂ O ₃₁	R1 = R4 = R6 = H, R2 = COOH, R3 = R7 = OH, R5 = MC, R8 = O - Api, R8 = Xyl
10	polygalasaponin XXXXII	1 469 [M - H] ⁻ , 1 439 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1 277 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁻ , 1 115 [M - H - CH ₂ O - 2Glu] ⁻	1 471 [M + H] ⁺ , 1 441 [M + H - CH ₂ O] ⁺ , 1 279 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁺ , 1 117 [M - H + CH ₂ O - 2 (Glu - H ₂ O)] ⁺ , 841 [M + H - CH ₂ O - 2 (Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)-Xyl] ⁺	C ₆₇ H ₁₀₆ O ₃₅	R1 = R8 = Glu, R2 = COOH, R3 = R4 = R6 = H, R5 = Ac, R7 = OH
11	onjisaponin E	1 485 [M - H] ⁻ , 1 455 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1 265 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁻ , 1 131 [M - H - CH ₂ O - 2 (Glu - H ₂ O)] ⁻ , 1 015 [M - H - CH ₂ O - 2 (Glu - H ₂ O)-Xyl] ⁻ , 795 [M - H - CH ₂ O - 2 (Glu - H ₂ O)-Xyl - TMC] ⁻	-	C ₇₁ H ₁₀₆ O ₃₃	R1 = R8 = Glu, R2 = COOH, R3 = R7 = OH, R5 = TMC, R4 = R6 = H
12	senegin II 或 Z-senegin II	1 455 [M - H] ⁻ , 1 425 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1 263 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁻ , 1 101 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)] ⁻	1 457 [M + H] ⁺ , 1 427 [M + H - CH ₂ O] ⁺ , 1 265 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁺ , 913 [M + H - CHO-(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)-DMC] ⁺	C ₇₀ H ₁₀₄ O ₃₂	R1 = Glu, R2 = COOH, R3 = OH, R4 = R6 =, R5 = DMC, R7 = CH ₃ , R8 = Gal
13	senegin II 或 Z-senegin II	1 455 [M - H] ⁻ , 1 425 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1263 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁻ , 1 101 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)] ⁻	1 457 [M + H] ⁺ , 1 427 [M + H - CH ₂ O] ⁺ , 1 265 [M + H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁺ , 913 [M + H - CHO-(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)-DMC] ⁺	C ₇₀ H ₁₀₄ O ₃₂	R1 = Glu, R2 = COOH, R3 = OH, R4 = R6 = H, R5 = DMC, R7 = CH ₃ , R8 = Gal
14	Z-senegasaponin B 或 E-senegasaponin B	1 425 [M - H] ⁻ , 1 395 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 1 233 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)] ⁻ , 1 271 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)] ⁻ , 911 [M - H - CH ₂ O-(Glu - H ₂ O)-(Gal - H ₂ O)-MC] ⁻	-	C ₆₉ H ₁₀₂ O ₃₁	R1 = R4 = R6 = H, R2 = COOH, R3 = R7 = OH, R5 = MC, R8 = O - Api, R8 = Xyl (2,1) Gal

注: TMC. 3, 4, 5-trimethoxy-cinnamoyl; MC. 4-methoxy-cinnamoyl; Glu. glucose; Xyl. xylose; Api. apiose; Gal. galactose; Ac. 乙酰基; DMC. 3, 5-dimethoxy-cinnamoyl;¹⁾ 血中移行成分(表 2 同)。

表 1; 另发现 4 个代谢产物(峰 M1 ~ M4), 见图 3 和表 2。远志皂苷类成分血中移行成分的 UPLC-TOF-

MS 总离子流见图 3。代谢产物的鉴定与原型成分鉴定略有不同。以 M3 为例, 在正、负离子模式下

分别以 m/z 239 $[M + H]^+$ 及 m/z 283 $[M + HCOO]^-$ 被检出,其相对分子质量可以确定为 238 Da, 利用 MassLynx v4.1 软件中的 elemental composition 功能,推测其分子组成为 $C_{12}H_{14}O_5$ (i -Fit = 0) 和 $C_{19}H_{11}$ (i -Fit = 3.3)。二级质谱数据中, M3 在正离子模式下给出的数据为 m/z 223 和 m/z 209。分析这些离子碎片,发现与 3,4,5-三甲氧基肉桂酸 (3,4,5-trimethoxybenzoic acid, TCMA) 离子裂解后碎片所产生的离子峰相符。离子碎片 m/z 223 是该化合物羧基被还原成醛基, m/z 209 是进一步脱去了甲基而形成的羟基。因此, M3 被确定为 TCMA。通

过这种方式,鉴定了 4 个代谢物。化合物的二级离子信息见表 2。

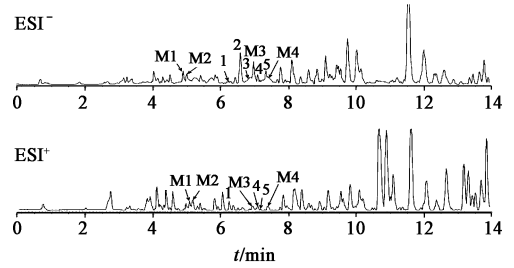


图 3 远志皂苷类成分血中移行成分 UPLC-TOF-MS 的总离子流
Fig. 3 Total ion chromatograms of polygala saponins in rat plasma by UPLC-TOF-MS

表 2 远志皂苷类成分的代谢产物在正、负离子扫描模式下的二级质谱数据及其鉴定

Table 2 MS/MS informations and identification of metabolites originating from polygala saponins under positive and negative ion scanning model

No.	化合物	负离子 m/z	正离子 m/z	分子式
M1	senegasaponin-CH ₂ O	1 395 $[M - H]^-$, 1 233 $[M - (Glu - H_2O)]^-$, 1 289 $[M - H - (Glu - H_2O) - Gal]^-$, 1 307 $[M - H - CH_2O - (Glu - H_2O)]^-$	1 397 $[M + H]^+$, 1 235 $[M - (Glu - H_2O)]^+$	$C_{68}H_{100}O_{30}$
M2	polygalasaponin XXXV -Glu	1 187 $[M - H]^-$, 1 025 $[M - H - Glu]^-$, 891 $[M - H - Xyl]^-$	1 189 $[M + H]^+$, 1 221 $[M + Na]^+$, 1 027 $[M + H - (Glu - H_2O)]^+$, 893 $[M + H - Xyl]^+$	$C_{57}H_{88}O_{26}$
M3	3,4,5-trimethoxycinnamyllic acid	283 $[M + HCOO]^-$, 237 $[M - H]^-$, 221 $[M - O - H]^-$	239 $[M + H]^+$, 223 $[M - O + H]^+$, 209 $[M - O - CH_2 + H]^+$	$C_{12}H_{14}O_5$
M4	3,4,5-trimethoxycinnamyllic acid - CH ₂	223 $[M - H]^-$, 209 $[M - O + H]^+$, 269 $[M + HCOO]^-$	225 $[M + H]^+$, 209 $[M - O + H]^+$	$C_{11}H_{12}O_5$

3 讨论

开心散是防治 AD 的经典基础复方。现代药理研究证实,开心散在改善拟 AD 动物认知功能障碍、保护神经元、调节胆碱酶系统功能、抗氧化应激等方面均具有明显作用^[6]。1 项关于 110 味治疗痴呆的中药古代临床应用分析结果显示,开心散的各个组成药物,远志、石菖蒲、人参及茯苓的使用频率分别处于第 1,2,3,9 位,明显高于其他药物^[7]。课题组近年来的研究结果进一步证实开心散[人参-茯苓-远志-石菖蒲(3:3:2:2)]60% 乙醇提取物具有明显的防治 AD 的潜在特征,提示其药效物质基础客观存在。

在前期研究基础上,本文分析并鉴定了 KXS-60% E 中 14 个远志皂苷类成分。在灌服 KXS-60% E 的大鼠血清中,发现了 5 个远志皂苷原型成分及 4 个可能来源于远志皂苷类成分的代谢产物,这与现有研究中关于开心散水提取物的体外及体内成分分析结果存在交叉和不同。刘春芳等^[8]利用 HPLC-

DAD-ESI-MS 检测并鉴定了开心散水提取物中的 14 个远志皂苷类成分,其中 5 个为血中移行成分。LYU 等^[9]也鉴定了开心散水提取物中的 21 远志皂苷类成分。体内外成分鉴定上的差异可能是由提取物及检测条件不同而造成的,提示建立在药效学基础之上的综合分析及活性作用的再验证对阐明开心散的药效物质基础更有意义。

本研究所鉴定的原型成分均是以 polygalasaponin 为母核的三萜类皂苷,其抗痴呆的药理活性也不断被发现。远志皂苷能够改善由 $A\beta$ 脑内注射诱导的拟痴呆动物模型^[10-12]及快速老化小鼠^[13]的学习记忆障碍,其作用机制可能与提高脑内单胺类神经递质的含量、保护中枢胆碱能系统功能有关;离体试验证实,远志皂苷元能明显改善由 $A\beta$ 诱导的细胞毒性作用^[14]; onjisaponin B 能改善 APP/PS1 转基因小鼠的认知功能,其作用机制可能与减少 $A\beta$ 的产生有关^[15]。此外, onjisaponin B 能通过磷酸腺苷蛋白激酶-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

(AMPK-mTOR) 信号通路诱导自噬, 进而增强突触传递功能及改善 $A\beta$ 诱导的氧化应激损伤^[16]; 从远志中分离出的 polygalasaponin XXXII 能显著改善由东莨菪碱诱导的小鼠认知功能障碍, 提高海马齿状回突触传递功能, 同时加速海马中环磷酸腺苷 (cAMP) 效应元件的磷酸化作用, 活化促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 进而增强脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达^[17]。该课题组近期研究发现, polygalasaponin XXXII 能上调磷酸化酪氨酸激酶 B (TrkB) 的水平, 进而从 BDNF/TrkB /MAPK 信号通路角度解释了其改善拟 AD 小鼠认知功能障碍的生物学机制^[18]。

此外, 对代谢产物的鉴定结果显示, 远志皂苷类成分在体内易发生糖苷键的水解反应, 脱去末端的部分糖基; 值得注意的是, 代谢产物 TCMA 及 TCMA-CH₂ 既是远志皂苷类如 onjisaponin G, E 的代谢产物, 又是远志糖酯类成分如 sibiricose A1, sibiricose A6, tenuifoliside B, 3, 6'-disinapoyl sucrose, arillanin A 的代谢产物。研究表明 TCMA 及 TCMA-CH₂ 均易透过胃肠单层细胞膜, 在大鼠体内吸收良好、生物利用度高, 对其活性作用的进一步确定将有助于全面认识和阐明开心散及远志的直接药效物质基础。

[参考文献]

[1] 李炎, 刘斌, 刘学伟, 等. 开心颗粒改善 $A\beta$ 诱导大鼠认知障碍的机制研究[J]. 中医药信息, 2016, 33(2): 34-37.

[2] 温薇, 张超, 刘明, 等. 开心散含药血清对 $A\beta$ 诱发的 PC12 细胞损伤的改善作用[J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 80-81.

[3] 黄树明, 张博, 任利民, 等. 开心散改善 $A\beta_{1-42}$ 所致在体小鼠海马 LTP 抑制的实验研究[J]. 中医药信息, 2013, 30(6): 61-63.

[4] 刘学伟, 刘爽, 黄树明. 抗老年性痴呆复方开心散有效提取物血清药物化学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 179-183.

[5] 刘学伟, 张博, 汪娜, 等. 开心散血中移行成分的抗痴呆作用研究概况[J]. 中医药学报, 2016, 44(2): 101-104.

[6] 张博, 黄树明. 开心散治疗老年性痴呆的研究进展[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 193-196.

[7] May B H, LU C, LU Y, et al. Chinese herbs for memory disorders: a review and systematic analysis of classical

herbal literature[J]. J Acupunct Meridian Stud, 2013, 6(1): 2-11.

[8] 刘春芳, 杨文志, 刘珂弟, 等. HPLC/DAD/ESI-MSⁿ 方法鉴定开心散的化学成分及其体内代谢产物[J]. 中国药学: 英文版, 2012, 72(6): 569-576.

[9] LYU C X, HE B S, SUI Z Y, et al. Identification and determination of the major constituents in Kai-Xin-San by UPLC-Q/TOF MS and UFLC-MS/MS method[J]. J Mass Spectrom, 2016, 51(7): 479-490.

[10] 陈庆林, 陈勤, 金蓓蓓. 远志皂苷对 AD 小鼠学习记忆能力及中枢胆碱能系统标志酶活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 33-36.

[11] 叶海燕, 陈勤. 远志皂苷对 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 AD 大鼠学习记忆功能障碍的保护作用研究[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(22): 2674-2678.

[12] 蒋辉, 徐运, 姜亚军. 远志皂苷元对 AD 模型小鼠学习记忆能力的影响及其机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(11): 1153-1155.

[13] 郑璐, 邱蕾, 张瑶, 等. 远志皂苷对快速脑老化鼠学习记忆能力的改善及对神经递质的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(3): 183-186.

[14] 陈勤, 李磊珂. 远志皂苷对 β 淀粉样蛋白 1-40 诱导的体外培养皮层神经细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1336-1339.

[15] LI X H, CUI J, YU Y, et al. Traditional Chinese nootropic medicine *Radix Polygalae* and its active constituent onjisaponin B reduce β -amyloid production and improve cognitive impairments [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151147.

[16] WU A G, Wong W, XU S W, et al. Onjisaponin B derived from *Radix Polygalae* enhances autophagy and accelerates the degradation of mutant α -synuclein and huntingtin in PC12 cells [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 22618-22641.

[17] XU W, HU J F, YUAN Y H, et al. Polygalasaponin XXXII from *Polygala tenuifolia* root improves hippocampal-dependent learning and memory [J]. Acta Pharmacologica Sin, 2009, 30(9): 1211-1219.

[18] ZHOU H, XUE W, CHU S F, et al. Polygalasaponin XXXII, a triterpenoid saponin from *Polygalae Radix*, attenuates scopolamine-induced cognitive impairments in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(8): 1045-1053.

[责任编辑 刘德文]