

红参和红景天配伍前后主要成分及抗疲劳活性的变化

李晶¹, 李瑞刚², 睢博文¹, 李娜¹, 赵幻希¹, 王楠¹, 越皓^{1*}

(1. 长春中医药大学 吉林省人参科学研究院, 长春 130117;

2. 长春中医药大学 附属第三临床医院, 长春 130000)

[摘要] 目的:初步阐释红参和红景天在化学和药效学层面的配伍机制,为临床应用提供理论依据。方法:利用高分离度快速液相色谱与四极杆-飞行时间质谱联用(RRLC-Q-TOF-MS)分析了红参和红景天配伍前后化学成分的变化,并通过负重游泳实验及血清尿素、血乳酸、肝糖原的测定考察了红参和红景天配伍前后的抗疲劳活性变化。结果:在红参和红景天配伍合提液中共鉴别了51种化学成分,丙二酰基人参皂苷(mRg₁, mRb₁, mRb₂, mRb₃和 mRd等)含量明显降低,人参皂苷(Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rd, F₂和 Rg₃等)含量明显升高。药效实验显示,与空白组比较,合提液组和合并液组小鼠竭力游泳时间均明显延长($P < 0.01$);两组小鼠的血清尿素氮($P < 0.05$, $P < 0.01$)和乳酸($P < 0.05$, $P < 0.01$)水平明显降低,而肝糖原水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。红参和红景天配伍合提液抗疲劳作用较红参和红景天单煎合并液明显增强。结论:该研究在化学成分变化方面揭示了红参和红景天配伍过程中的增效机制,为临床应用和产品开发提供了理论参考。

[关键词] 红参; 红景天; 化学成分; 配伍; 抗疲劳

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0087-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201515

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200416.1404.002.html>

[网络出版日期] 2020-4-16 14:12

Changes in Effective Compounds and Anti-fatigue Activity Before and After Compatibility of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma

LI Jing¹, LI Rui-gang², SUI Bo-wen¹, LI Na¹, ZHAO Huan-xi¹, WANG Nan¹, YUE Hao^{1*}

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. The Third Clinical Medical Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130000, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily interpret the compatibility of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma in chemical and pharmacodynamic levels, and provide theoretical basis for its clinical application. **Method:** Rapid resolution liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry(RRLC-Q-TOF-MS) was applied to identify and analyze the changes in chemical components of the Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma before and after compatibility. The anti-fatigue activity before and after compatibility of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma was detected by weight-loading swimming experiment and determination of levels of serum urea, blood lactic acid and hepatic glycogen. **Result:** A total of 51 compounds were identified in mixture decoction of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma. Malonyl ginsenoside mRg₁, mRb₁, mRb₂, mRb₃ and mRd contents were significantly decreased, while ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rd, F₂ and Rg₃ contents were significantly increased in the compatibility mixture.

[收稿日期] 20191203(004)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20170307006YY)

[第一作者] 李晶, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, Tel:0431-86763993, E-mail:jingli2017@aliyun.com

[通信作者] *越皓, 博士, 研究员, 从事中药化学分析研究, Tel:0431-86763993, E-mail:yuehao@sohu.com

According to pharmacodynamics study, as compared with those in the blank control group, swimming time of mice was significantly prolonged in all other groups ($P < 0.01$), serum urea nitrogen ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and lactic acid ($P < 0.05$, $P < 0.001$) levels of mice in the combined decoction and the single decoction groups were significantly lowered, while liver glycogen levels were significantly elevated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The anti-fatigue ability of the combined decoction of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma was higher than that of the single decoctions. **Conclusion:** In this article, the effect enhancing mechanism of compatibility of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra with Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizoma was revealed based on the chemical changes, providing theoretical reference for the clinical application and development of products.

[Key words] Ginseng Radix et Rhizoma Rubra; Rhodiolae Crenulate Radix et Rhizomachemical; component; compatibility; anti-fatigue

疲劳是过度劳累,运动和睡眠不足引起的身体或精神疲惫。它也可能是由于药物、疾病、焦虑或抑郁症引起的症状。由于疲劳在现代社会中成为影响人类健康,工作效率和生活质量的严重问题,因此,抗疲劳保健食品的研发具有重要意义。

人参是一种名贵中药,红参为人参经蒸制等加工后的干燥根和根茎。其味甘,微苦,性温。具大补元气,复脉固脱,益气摄血的功效,为补脾益气之要药,临床用于脾气不足诸证,症见体倦乏力,倦怠无力等。现代研究表明,红参中人参皂苷 Rg_1 , Rb_2 , Rb_1 , Rb_3 , Re 和特有的成分人参皂苷 Rg_3 , Rh_1 和 Rh_2 ^[1-2] 都有很好的抗疲劳作用^[3-5]。红景天性寒,味甘涩,入脾肺经,具有健脾益气,清肺止咳,活血的功效,临床可用于脾气虚证,症见体倦乏力、面色萎黄、少气懒言等。现代研究表明,红景天中的主要活性成分红景天苷可通过调节抗氧化系统^[6]、能量代谢系统^[7]及中枢系统^[8]三方面,发挥抗疲劳作用^[9-11]。此二药均可用于气虚乏力之诸证,合用可达到扶正固本、补气补血补神,平衡脏腑的阴阳气血平衡,从而使人体正气兼顾,抗疲劳作用得以全面增强;红景天性寒,红参性温,二药合用,寒温并用,使温补之中不致偏燥之性,相得益彰。

目前,在保健食品的开发中常以二药配伍应用,何正军等^[12]研制以红景天和人参为主要原料的软胶囊,具有提高缺氧耐受力的保健功能;另有人研制了以红景天和人参为主要药材的保健食品,具有增强免疫力的功效^[13-14];王鹏丽等^[15]研制出具有抗疲劳和常压耐缺氧作用的复方红景天颗粒剂,主要原料药材同样是红景天和人参。对两种药物配伍前后化学成分变化的研究,有利于阐明配伍机制。本实验在前期工作的基础上^[16],利用液相色谱质谱联用技术(RRLC-Q-TOF-MS),对红参和红景

天醇提取后的合并液及红参和红景天的合提液进行化学成分的分析,并通过药效学实验进行验证,试图从化学和药效学的角度对两者配伍应用的机制进行探讨,以期开发具有抗疲劳功能的保健食品提供依据。

1 材料

红参购于吉林省抚松县万良人参市场,红景天药材由北京同仁堂提供,长春中医药大学王淑敏教授鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的根和景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulata* 的干燥根和根茎。甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司),其余试剂均为国产分析纯。小鼠血清尿素氮、乳酸、肝糖原检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20171221, 20171227, 20171222)。

60 只健康昆明种清洁级小鼠,体质量(20±2)g,雄性。实验用饲料为鼠专用饲料,所有实验动物及饲料均购于吉林大学白求恩医学院实验动物中心,合格证号 SCXK(吉)2013-0005。实验室温度(23±2)℃,12 h 昼夜循环,自由饮食饮水,适应性喂养 1 周。动物操作均符合长春中医药大学动物伦理委员会规定。

1200 型高分离度快速液相色谱系统和 6520 型 Q-TOF 质谱仪, Eclipse Plus- C_{18} 色谱柱(美国 Agilent 公司); AR2140 型 1/1 万电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 红参和红景天按 1:1(各取 40 g)混和后,加入 80% 乙醇,料液比(1:10),提取 120 min,提取 3 次,最终得到含生药量 104 g·L⁻¹ 的溶液,即得红参-红景天合提液;制备红参、红景天单提液,方法同上,最终得到含生药量 104 g·L⁻¹ 的溶液;将 2 种单提液按 1:1 混合,即得到质量浓度

104 g·L⁻¹的红参-红景天合并液。精密量取合提液和合并液各1 mL,水浴60℃挥干后,加入适量甲醇溶解后,转移至2 mL量瓶中,加入甲醇至刻度,摇匀,以0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 RRLC-Q-TOF-MS 条件 色谱条件:Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm);流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序(0~5 min, 15%~17%B;5~10 min, 17%~19%B;10~20 min, 19%~21%B;20~26 min, 21%~28%B;26~37 min, 28%~30%B;37~45 min, 30%~36%B;45~50 min, 36%~45%B;50~58 min, 45%~65%B;58~60 min, 65%~80%B);柱温为35℃;流速为0.3 mL·min⁻¹;进样量为5 μL。

质谱条件:电喷雾负离子扫描模式(ESI⁻);干燥气(N₂),流速9 L·min⁻¹,温度300℃;雾化气压力2.41×10⁵ Pa;毛细管电压3.5 kV;碎裂电压175 V;锥孔电压65 V;质量扫描范围 m/z 100~2 000。

2.3 抗疲劳功能评价

2.3.1 动物分组与给药 随机分成空白组,合并液组和合提液组,每组20只。合并液组和合提液组给予2.1项下制备的相应溶液,动物给药剂量为1 040 mg·kg⁻¹,给药体积为0.01 mL·g⁻¹。空白组小鼠给予同体积的生理盐水,各组小鼠灌胃30 d。

2.3.2 负重游泳时间的测定 末次给药30 min后,每组随机选取10只小鼠,将小鼠尾根部负荷体质量5%的铅皮,置于游泳箱内。水深不少于30 cm,水温(25±1.0)℃,记录小鼠自游泳开始至死亡的时间,即小鼠负重游泳时间。

2.3.3 小鼠血清尿素氮、乳酸及肝糖原水平的测定^[17] 末次给药30 min后,每组中随机选取10只小鼠,在30℃水中不负重游泳90 min,休息60 min后眼球取血约0.5 mL,脱颈处死,迅速取肝脏,血液样品离心后收集血清,参照试剂盒说明书进行血清尿素氮、血乳酸及肝糖原水平检测。

2.4 统计学方法 采用SPSS 16.0软件对所有数据进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异, $P < 0.01$ 作为极显著性差异。

3 结果与分析

3.1 红参与红景天配伍过程中主要化学成分测定
红参与红景天合并液和红参与红景天合提液液相色谱见图1。

3.1.1 红参与红景天配伍溶液中的人参皂苷 利

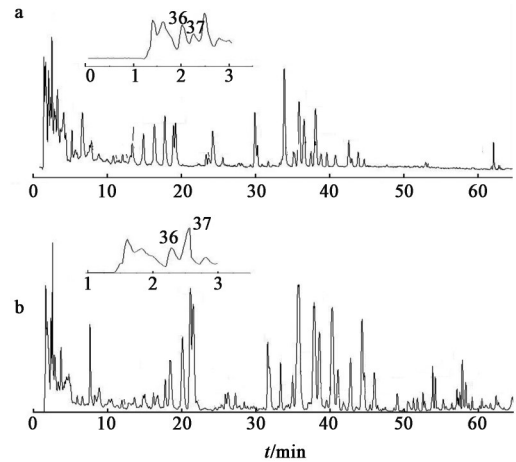


图1 红参与红景天合并液(a)和红参与红景天合提液(b)液相色谱

Fig. 1 Total ion flow chart of mixture decoction (a) and mixtures (b) of various single drug decoction of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra-Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma

用HPLC-ESI-MS技术,首先液相色谱可以较好地分离溶液中皂苷类化合物,在电喷雾负离子模式一级谱中,人参皂苷准分子离子以 $[M-H]^-$ 或 $[M+HCOO]^-$ 形式存在,获得其相对分子质量信息,通过多级串联质谱分析,确定苷元类型、所联糖基的种类和数量,最后确定皂苷的结构。下面以峰17的ESI-MS数据说明人参皂苷的鉴定方法。见图2。

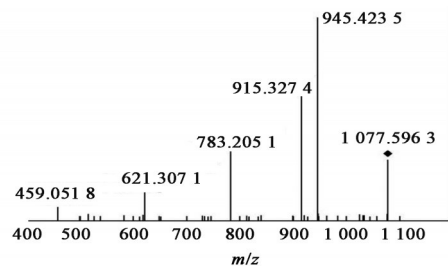


图2 峰17的二级串联质谱

Fig. 2 ESI-MS² spectrum of peak 17

峰17的出峰时间为37.768 min,根据其一级质谱图信息可知 m/z 1 077是峰17所代表的人参皂苷的准分子离子 $[M-H]^-$,可推断其理论相对分子质量为1 078;其二级串联质谱图显示, m/z 945, 915, 783, 621和459共5个碎片离子峰,分别对应 m/z 1 077离子脱去1个分子五碳糖基($M_w=132$),1个分子六碳糖基($M_w=162$),1个分子五碳糖基($M_w=132$)和1个分子六碳糖基($M_w=162$),1个分子五碳糖基($M_w=132$)和2个分子六碳糖基($M_w=162$),1个分子五碳糖基($M_w=132$)和3个分子六碳糖基($M_w=162$)。其中 m/z 459离子是二醇型人参皂苷的特征碎片离子,人参二醇型皂苷中相对分子质量是1 078

的有3个,分别是人参皂苷Rb₂, Rb₃和Rc,通过与文献[18-19]和对照品的对比,可以确定峰17所对应的化合物是人参皂苷Rc。利用相同的方法,可以推断其他人参皂苷的质谱数据,见表1。

表1 红参和红景天合提液中人参皂苷的MS/MS数据(n=3)

Table 1 MS/MS data of ginsenosides in mixture decoction of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma(n=3)

No.	名称	分子式	相对误差	[M-H] ⁻ / [M+HCOO] ⁻	MS/MS 碎片离子	合并液	合提液
1	20-glc-Rf	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	6.53	-/1 007.536 8	799,637,475	+	++
2	noto-R ₁	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	1.50/1.53	931.525 8/977.534 2	799,637,475	+	++
3	Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	13.12	-/845.501 5	637,475	+++	+++
4	Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	11.7	-/991.560 0	799,738,637,475	+++	+++
5	mRg ₁	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	5.87	885.490 5/-	781,637,475	++	+
6	mRf	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	5.31	855.489 6/-	781,637,475	++	++
7	Rf	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	13.76/17.74	799.495 9/845.505 4	637,475	++	+++
8	F ₃ /noto-R ₂	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	0.26/5.03	769.474 2/815.483 9	637,475	+	+++
9	Ra ₁ /Ra ₂	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1.65/2.23	1 209.625 4/1 255.630 0	1 107,945,783,621,459	+	++
10	Ra ₃	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	8.31	1 239.648 2/-	1 107,1 077,945,783,621,459	+	+
11	20(S)-Rg ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	1.69	-/829.496 9	637,475	++	+++
12	Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	2.44	1 107.598 4/-	945,783,621,459	+++	+++
13	F ₁	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	10.24	-/683.444 6	475	++	+++
14	20(R)-Rg ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	0.84	-/829.494 8	637,475	++	++
15	mRb ₁	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	12.15	1 193.610 6/-	1 107,945,783,621,459	+++	++
16	Rh ₁	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	2.34	-/683.439 2	459	+	++
17	Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	10.39/10.24	1 077.596 3/1 123.602 1	945,783,621,459	+++	+++
18	mRb ₂	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	0.69	1 163.584 7/-	1 077,915,783,621,459	++	++
19	Rb ₂	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	3.99/3.03	1 077.589 4/1 123.594 0	945,783,621,459	+++	+++
20	Rb ₃	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	8.35/10.24	1 077.594 1/1 123.602 1	945,783,621,459	++	++
21	mRb ₃	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	4.81	1 163.579 9/-	1 077,915,783,621,459	++	++
22	Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	2.01	945.540 9/991.547 2	783,621,459	+++	+++
23	mRd	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	0.87	1 031.542 3/-	945,783,765,621,459	++	++
24	Rs ₁	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	2.86/3.35	1 119.598 9/1 165.605 0	1 077,1059,945,783,621,459	++	++
25	Rs ₂	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	8.4/6.86	1 119.605 1/1 165.609 1	1 077,1059,945,783,621,459	++	++
26	Rg ₄ /Rg ₆	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	16.39	-/811.498 2	619,457	+	++
27	Rg ₄ /Rg ₆	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	10.60	-/811.493 5	619,457	+	++
28	Rk ₃ /Rh ₄	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	10.5	-/665.420 0	457	+	++
29	Rk ₅ /Rh ₄	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	0.3	-/665.427 2	457	+	++
30	F ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	5.55	-/829.500 1	621,459	++	+++
31	Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	4.82	-/829.499 5	621,459	++	++
32	Rg ₅ /Rk ₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	5.42	-/811.489 3	603,441	+	+++
33	Rg ₅ /Rk ₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	8.26	-/811.491 6	603,441	+	++
34	CK	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	1.05	-/667.442 0	459	-	++
35	Rh ₂	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	3.3	-/667.440 5	459	-	++

注:-.代表未检测到;+.峰面积<10⁵;++.峰面积(1~9)×10⁵;+..峰面积(1~9)×10⁶;+++..峰面积(1~9)×10⁷。丙二酰基人参皂苷(mRg₁, mRb₁, mRb₂, mRb₃, mRd, mRf);人参皂苷(Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf, Rg, Rh, Rs, F)(表2同)。

3.1.2 红参与红景天合提液中红景天的主要成分分析 红景天中的主要活性成分有红景天苷、红景天素、大花红景天素、没食子酸等。通过进行质谱图的选择离子提取,对质谱峰通过其[M-H]⁻或[M+HCOO]⁻准分子离子峰及二级质谱产生的碎片信息进行了化合物的归属,相应质谱数据见表2。

峰36的出峰时间为2.061 min,如图3a所示,二级质谱产生的碎片 *m/z* 125 为准分子离子[M-H]⁻ *m/z* 169 脱去 COO 所得,可作为没食子酸结构的质谱鉴别特征, *m/z* 151 为准分子离子[M-H]⁻ *m/z* 169 脱去 1 个分子 H₂O 所得,再通过与文献[20]的对比,可以确定峰36所对应的化合物是没食子酸。峰38的出峰时间为6.485 min,如图3b所示,分子离子峰为[M-H]⁻ *m/z* 197,其二级质谱图中的主要碎片离子有 *m/z* 169 [M-H-2CH₂]⁻, *m/z* 124 [M-H-2CH₂-COOH]⁻,推测为没食子酸的衍生物,分子式比没食子酸多 C₂H₄,即可确定峰38所对应的化合物为没食子酸乙酯。

红景天苷是红景天中主要的活性成分,其理论相对分子质量为300,以红景天苷的准分子离子[M+HCOO]⁻ *m/z* 345 为基峰判断标准进行质谱图的选择离子提取,得到峰37,峰37的出峰时间为

2.344 min,对 *m/z* 345 进行二级串联质谱分析(图3c),其中出现的主要碎片离子为 *m/z* 299, 119 和 179, *m/z* 299 为[M-H]⁻峰, *m/z* 119 是 *m/z* 299 脱掉 1 个分子葡萄糖基后的碎片离子, *m/z* 179 是其脱掉的葡萄糖基碎片,二者即为红景天苷的特征性碎片离子,可以确定峰37所对应的化合物是红景天苷。

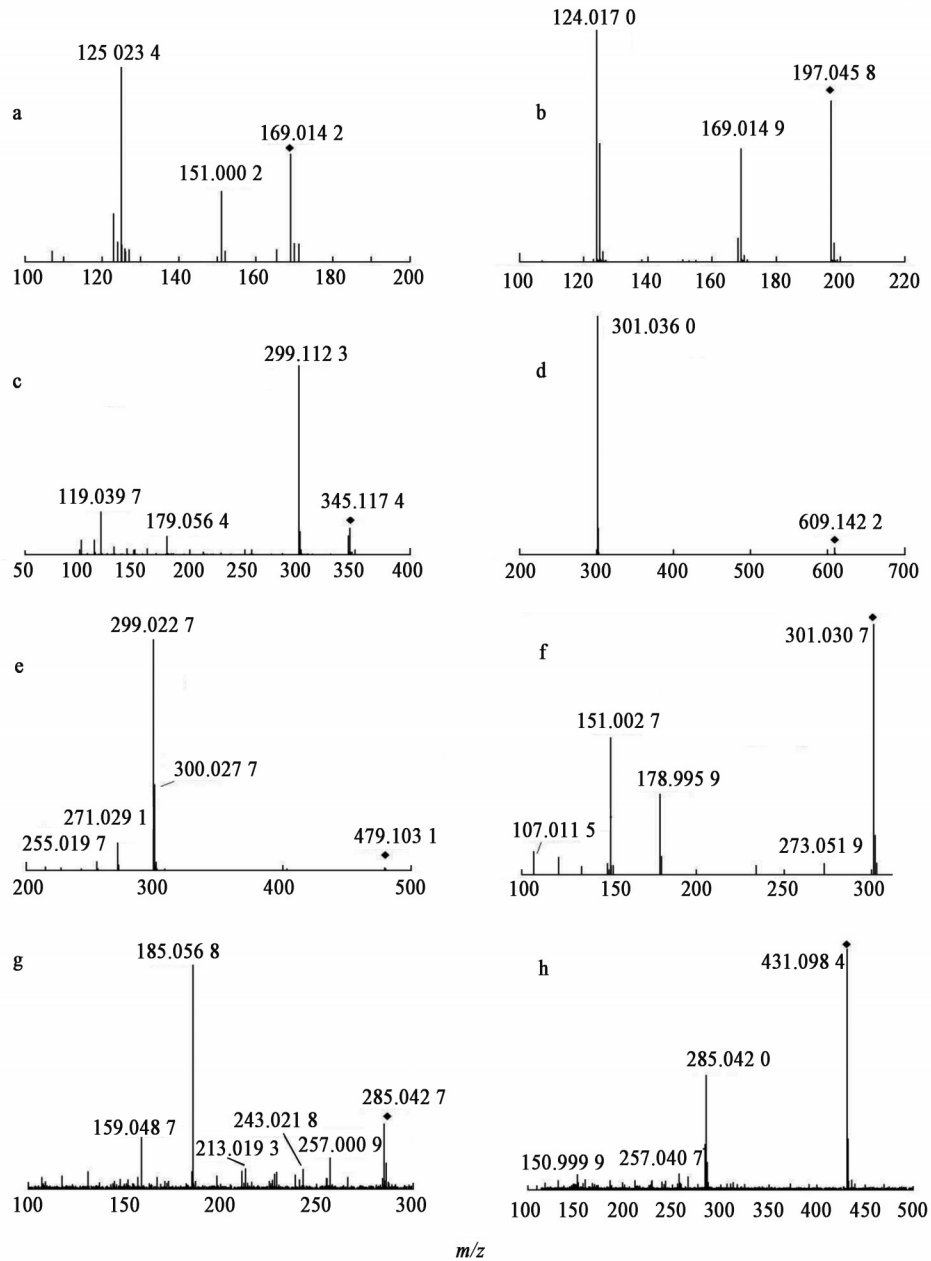
红景天素和大花红景天素是红景天中的特征成分,他们的理论相对分子质量分别为610和480,分别以他们的准分子离子[M-H]⁻ *m/z* 609 和 *m/z* 479 为基峰判断标准进行质谱图的选择离子提取,分别得到峰45和峰51。峰45的保留时间为16.662 min,对其二级质谱碎片离子(图3d)进行归属, *m/z* 301 是准分子离子失去 1 个分子鼠李糖和葡萄糖基后的碎片[M-H-Rha-Glu]⁻,其是黄酮苷元草质素,通过与文献[21]对比,推测峰45为红景天素。峰51的保留时间为44.065 min,其二级质谱的主要碎片离子(图3e)有 *m/z* 300, 299, 271 和 255,通过对大花红景天素的化学结构的分析^[21],并结合参考文献[21],峰51被鉴定为化合物大花红景天素。

红景天中含有的黄酮类化合物除红景天素外还有槲皮素、山柰酚等,他们的理论相对分子质量分别为302和286,分别以他们的准分子离子[M-H]⁻ *m/z*

表2 红参与红景天合提液中来自红景天中化学成分 MS/MS 数据 (n=3)

Table 2 MS/MS data of chemical components from *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* in mixture decoction of *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra* and *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* (n=3)

No.	名称	分子式	δ/ppm	[M-H] ⁻ /[M+HCOO] ⁻	MS/MS 碎片离子	合并液	合提液
36	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	0	169.014 2/-	151, 125	+++	+++
37	红景天苷	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	2.01/4.93	-/345.117 4	299, 179, 119	++	+++
38	没食子酸乙酯	C ₉ H ₁₀ O ₅	1.52	197.045 8/-	169, 124	+++	+++
39	槲皮素-3-O-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6.49	447.096 2	301	++	++
40	山柰酚-3-O-半乳糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	13.42	447.099 3	285, 151	+	+
41	槲皮素-3-O-半乳糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6.7	463.085 1	301	++	++
42	山柰酚-3-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2.91	447.092 0	285, 151	+	+
43	山柰酚-3-O-鼠李糖半乳糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	7.59	593.155 7	285	++	++
44	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	4.97	463.090 5	301	++	++
45	红景天素	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	6.40	609.142 2	301	++	++
46	草质素-7-O-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.57	447.094 0	301	+++	+++
47	山柰酚-3-O-芸香苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	3.2	593.149 3	285	++	++
48	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	15.61	301.030 7	178, 151, 121, 107	+	+
49	山柰酚-3-O-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	0	431.098 4	285, 257, 151	++	++
50	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	7.72	285.042 7	185, 159, 93	+++	+++
51	大花红景天素	C ₂₅ H ₂₀ O ₁₀	9.81	479.103 1	300, 299, 271, 255	++	+++



a. 没食子酸; b. 没食子酸乙酯; c. 红景天苷; d. 红景天素; e. 大花红景天素; f. 槲皮素; g. 山柰酚; h. 山柰酚-鼠李糖苷

图3 红景天主要化学成分的二级串联质谱

Fig. 3 ESI-MS² spectrum of main chemical components in *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma*

301和285为基峰判断标准进行质谱图的选择离子提取,分别得到峰48和峰50。峰48的保留时间为22.863 min,对其二级质谱碎片离子(图3f)进行归属,准分子离子[M-H]⁻ *m/z* 301失去1个分子CO生成 *m/z* 273,其中 *m/z* 151和179是特征性离子^[21], *m/z* 151失去1个分子CO₂生成 *m/z* 107。峰50的保留时间为30.368 min, *m/z* 285失去1个中性小分子CO,得到 *m/z* 257[M-H-CO]⁻碎片离子,再失去1个中性小分子CH₂,得到 *m/z* 243[M-H-CO-CH₂]⁻碎片离子, *m/z* 257[M-H-CO]⁻碎片离子失去1个中性

小分子CO₂,得到 *m/z* 213[M-H-CO-CO₂]⁻的碎片离子,如图3g。分别对比相关的参考文献[22-25],判断出峰顺序,比较碎片离子,推测峰48和峰50分别为化合物槲皮素和山柰酚。

黄酮类化合物的糖苷化合物也普遍存在于红景天药材中,通过一级质谱得到化合物相对分子质量信息后,在二级质谱中糖苷键易断裂失去糖基得到苷元碎片信息,是相应黄酮苷类化合物的特征峰,并从丢失的碎片信息可推测出苷元上所连接的糖基种类和数量,从而确定黄酮苷类化合物的结

构。保留时间为23.906 min时观察到 m/z 431 的准分子离子峰 $[M-H]^-$, 理论相对分子质量为432, 二级质谱分析显示了 m/z 285 的异鼠李素母离子特征碎片(图3h), 表明在碰撞过程中丢失了1个鼠李糖苷, 对比相关文献[26], 推断峰49为山柰酚-鼠李糖苷。同法推测出峰39~44, 峰46和峰47分别为槲皮素-鼠李糖苷、山柰酚-半乳糖苷、槲皮素-半乳糖苷、山柰酚-葡萄糖苷、山柰酚-鼠李糖半乳糖苷、槲皮素-葡萄糖苷、草质素-鼠李糖苷和山柰酚-芸香苷, 相应的质谱数据列于表2, 具有相同质谱信息的化合物的出峰顺序是通过与相应的文献[27-29]比较初步确定。

通过进行质谱图的选择离子提取, 以合并液中的人参皂苷 Rc(峰17)峰面积为标准参照, 其他色谱峰面积与其比值即为相对峰面积, 将部分化合物的色谱相对峰面积进行比较分析, 得出合并液和合提液中部分化合物的含量变化见表3。红参和红景天合提液中可以分辨出新的皂苷峰 CK(峰34)和 Rh₂(峰35)(图1b), 与合并液相比, 峰面积下降的峰有 mRg₁, mRb₁, mRb₂, mRb₃ 和 mRd, 峰面积显著升高的二醇型人参皂苷有 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rd, F₂, Rg₃, CK, Rh₂ 和 Rg₅/Rk₁, 峰面积显著升高的三醇型人参皂苷有 Rg₁, Re, 20(S)-Rg₂, F₁, Rh₁, Rg₄/Rg₆ 和 Rk₃/Rh₄, 红景天中的化合物峰面积显著升高的有没食子酸、红景天苷和没食子酸乙酯等。

3.2 合并液和合提液对小鼠游泳力竭时间的影响 连续给药30 d后, 各组与空白组比较, 合提液组和合并液组小鼠的力竭游泳时间均显著延长 ($P < 0.01$), 结果表明, 2种给药方式均可延长小鼠负重游泳力竭时间, 加强小鼠运动耐力。合提液组与合并液组比较, 小鼠的力竭游泳时间具有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明两种药物混合后提取更有利于延长小鼠负重游泳力竭时间。见表4。

3.3 合并液和合提液对小鼠血清尿素氮、乳酸及肝糖原水平的影响 末次给药30 min后, 对各组小鼠血清尿素氮、血乳酸及肝糖原水平进行检测, 结果显示, 与空白组比较, 合提液组和合并液组小鼠血清尿素氮水平均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 两组小鼠肝糖原水平均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 合提液组和合并液组均能明显降低小鼠血清中乳酸含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 结果表明, 合并液组和合提液组均能有效降低血清尿素氮的水平, 促进肝脏中糖原合成, 减少运动引起的肝糖原消耗, 并能够不同程度的抑制运动后乳酸含量的升高, 减轻机体

表3 红参和红景天合并液和合提液中化合物相对峰面积的比较
Table 3 Comparison of HPLC relative peak area of mixtures of various single drug decoction and mixture decoction of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma

No.	化合物	合并液	合提液
3	Rg ₁	2.09	8.20
4	Re	1.95	6.33
5	mRg ₁	0.12	0.02
12	Rb ₁	1.21	2.30
13	F ₁	0.07	0.65
14	20(S)-Rg ₂	0.32	0.58
15	mRb ₁	0.41	0.21
16	Rh ₁	0.08	0.13
18	mRb ₂	0.21	0.12
19	Rb ₂	0.91	1.72
20	Rb ₃	0.17	0.57
21	mRb ₃	0.23	0.14
22	Rd	0.59	1.50
23	mRd	0.31	0.07
26	Rg ₄ /Rg ₆	0.04	0.28
27	Rg ₄ /Rg ₆	0.04	0.42
28	Rk ₃ /Rh ₄	0.04	0.46
29	Rk ₃ /Rh ₄	0.06	0.49
30	F ₂	0.14	0.71
31	Rg ₃	0.11	0.63
32	Rg ₅ /Rk ₁	0.03	0.74
33	Rg ₅ /Rk ₁	0.03	0.51
34	CK	-	0.41
35	Rh ₂	-	0.32
36	没食子酸	0.92	1.45
37	红景天苷	0.56	2.12
38	没食子酸乙酯	0.92	1.57

表4 各组小鼠负重游泳力竭时间、血清尿素氮、血乳酸及肝糖原水平的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Changes in weight loading swimming, serum urea nitrogen, lactic acid and hepatic glycogen of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	游泳时间/s	血清尿素氮 /mmol·L ⁻¹	血乳酸 /mmol·L ⁻¹	肝糖原 /mmol·L ⁻¹
空白	156.00±33.95	14.33±2.79	6.57±0.70	8.63±1.03
合提	495.43±110.13 ^{2,3)}	8.73±0.65 ^{2,4)}	4.52±0.48 ²⁾	12.45±1.26 ^{2,3)}
合并	355.14±97.64 ²⁾	10.96±1.70 ¹⁾	5.16±1.09 ¹⁾	11.09±0.99 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与合并液组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

代谢产物的堆积,从而提高机体抗疲劳能力。合提液组与合并液组比较,小鼠血清尿素氮及肝糖原水平分别具有极显著性($P < 0.01$)和显著性差异($P < 0.05$),表明合提液的抗疲劳效果更加显著。见表4。

4 讨论

本文采用了RRLC-ESI-MS/MS联用技术,对合提液和合并液进行主要化学成分分析,综合实验结果,丙二酰基类人参皂苷,如 mRg_1, mRb_1, mRb_2 ,是来自红参中天然存在的化合物,其在合提液中相对合并液减少,可能由于在某些条件下,丙二酰基人参皂苷水解脱去了丙二酰基,生成了相应的人参皂苷,因此在合提液中 Rg_1, Rb_1, Rb_2 的相对含量增加,此外人参皂苷 Rg_3 的相对含量增加明显,红参中含量较少的成分如人参皂苷 Rh_2, Rg_4, Rg_5 等,在合提液中有所增加,有文献报道,人参皂苷 Rg_1 可以保护肝脏因急性力竭运动所导致的氧化损伤^[30],人参皂苷 Rb_1 能够提高机体运动耐力,上调机体抗氧化酶活性,降低脂质过氧化反应,对力竭运动诱导的氧化应激及氧化损伤具有保护作用^[31],从而发挥抗疲劳作用,人参皂苷 Rg_3 被认为是人参抗疲劳作用的最主要活性物质之一,研究发现,在模拟高原环境下,人参皂苷 Rg_3 可延长大鼠力竭游泳时间,提高骨骼肌线粒体对自由基的消除作用和供能效力^[32],并能通过调节中枢神经和交感神经系统,缓解由于疲劳产生的失眠^[33]。人参皂苷 Rh_2, Rg_5 在改善抗氧化功能和抗炎方面具有一定作用^[34-35],而疲劳发生的机制与抗氧化功能的损伤以及炎症反应有关^[36-38]。此外,合提液中的稀有人参皂苷的种类和相对含量明显增多,如人参皂苷 Rh_1, Rk_3, Rh_4 和CK等,他们可能在缓解疲劳功能中发挥重要作用。

在配伍提取过程中,人参皂苷可能发生了转化,由原型成分转化生成了其次级转化产物,如原人参二醇型人参皂苷 Rb_1, Rb_2 可分别脱掉C-20位的1个分子葡萄糖和阿拉伯糖转化为Rd,Rd有两条转化方式,如果Rd脱掉C-20位的1分子葡萄糖转化为 Rg_3 ,继而 Rg_3 的相对含量增高, Rg_3 进一步脱水转化为 Rg_5 和 Rk_1 ;如果Rd脱掉C-3位的1分子葡萄糖转化为 F_2, F_2 脱掉C-20位的1分子葡萄糖转化为 Rh_2 。原人参三醇型人参皂苷Re可脱掉C-20位的1分子葡萄糖或C-6位的1分子鼠李糖生成 Rg_2 或 Rg_1, Rg_2 脱去C-6位的鼠李糖转化成 Rh_1 ,或者通过脱水后生成 Rg_4 和 Rg_6 ; Rg_1 脱掉C-20位的1分子葡萄糖得到 Rh_1, Rh_1 进一步脱水生成 Rk_3 和 Rh_4 。由于组方中另一药材红景天中有大量酚类物质存在,如没食子

酸、红景天苷、酪醇和没食子酸乙酯等,故提取液呈酸性,且醇提取液较水提取液酸性略强^[39]。笔者对合提液和相同条件下提取得到的红参提取液的pH进行了测定,发现他们的pH分别为3.92和4.88,因此推测,配伍提取过程中,提取液酸性的变化是导致红参中的主要活性成分人参皂苷发生转化的可能原因。

同时对来自红景天的主要化学成分进行了分析,与合并液相比,酸性成分没食子酸、红景天苷和没食子酸乙酯的相对峰面积显著升高,其中没食子酸具有抗氧化、抗炎、调节糖代谢和脂代谢的作用^[40-43]。剧烈运动会增加耗氧量,并且由于活性氧生成量的增加而导致氧化应激^[44],红景天苷被认为是红景天中标志性的活性成分,据报道,红景天苷可提高运动耐力,提高游泳等运动后动物肝糖原水平,降低肝脏中丙二醛(MDA)水平,增加抗氧化酶,如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化谷胱甘肽的活性^[45],表明红景天苷能够提高工作效率,具有抗应激能力,有效预防疲劳运动后的氧化应激。来自红景天中的主要化合物还有黄酮类及其苷类化合物,他们在抗氧化和抗炎方面发挥重要作用^[46-51]。来自红景天中的有效活性成分在配伍提取后含量的变化,可能是提取过程中,化合物分子结构的不同导致化学成分溶出度变大,红参可以促进红景天中的有效成分的溶出。

体内实验结果显示,合并液和合提液均具有抗疲劳的作用,而合提液增加力竭运动过程中肝糖原的储备和降低血清尿素氮和乳酸水平的作用更强,进而调节机体代谢状态,提高运动能力,所以具有更强的抗疲劳作用。

本研究利用现代科学手段,在化学成分变化程度上对红参和红景天配伍抗疲劳作用的增效机制进行了研究,比较了配伍前后抗疲劳作用的变化,证明了两者的配伍后抗疲劳作用的增强,不仅为抗疲劳功能产品的开发提供了物质基础和配伍机制相关的理论依据,同时为中药配伍的机制研究提供新思路。

[参考文献]

- [1] 郑重,宋凤瑞,刘淑莹,等. 人参、红参皂苷类成分指纹图谱研究[J]. 质谱学报,2012,33(6):327-333.
- [2] 陈燕. 鲜人参、生晒参和红参的比较研究[J]. 海峡药学,2006,18(4):137-139.
- [3] 黄宝亮,刘博宇,王佳奇,等. 红参非皂苷类物质精

- 酸双糖苷对小鼠疲劳及免疫功能的影响[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(15): 1296-1301.
- [4] 黄宝亮, 丁传波, 王佳奇, 等. 红参中精氨酸双糖苷对小鼠的抗疲劳作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2017, 43(5): 897-902.
- [5] 张艳. 人参皂苷 R_g₃ 的抗疲劳作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [6] XU J, LI Y. Effects of salidroside on exhaustive exercise-induced oxidative stress, in rats[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(5): 1195-1198.
- [7] 占海思, 潘涛. 红景天在心肌缺血再灌注损伤中保护机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 231-234.
- [8] 盖磊煜, 郑秀海. 红景天对运动性疲劳小鼠中枢神经系统神经递质变化的影响[J]. 中国医学创新, 2016, 13(25): 15-18.
- [9] KANG D Z, HONG H D, KIM K I, et al. Anti-fatigue effects of fermented *Rhodiola rosea* extract in mice [J]. Prev Nutr Food Sci, 2015, 20(1): 38-42.
- [10] PUNJA S, SHAMSEER L, OLSON K, et al. *Rhodiola rosea* for mental and physical fatigue in nursing students: a randomized controlled trial[J]. PLoS One, 2017, 9(9): e108416.
- [11] LEKOMTSEVA Y, ZHUKOVA I, WACKER A. *Rhodiola rosea* in subjects with prolonged or chronic fatigue symptoms: results of an open-label clinical trial [J]. Complement Med Res, 2017, 24(1): 46-52.
- [12] 何正军, 赵文吉, 尼科, 等. 红景天人参银杏叶软胶囊的研制[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(2): 88-92.
- [13] 耿聪, 孙德亚, 刘竞研, 等. HPLC法测定人参强力胶囊中红景天苷的含量[J]. 特产研究, 2012, 34(4): 61-62.
- [14] 樊艳霞. 增强免疫力保健食品人参红景天片的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [15] 王鹏丽, 周婉婷, 吕琪琪, 等. 复方红景天颗粒剂对小鼠抗疲劳及常压耐缺氧作用的研究[J]. 甘肃科技, 2018, 34(1): 28-29.
- [16] 李晶, 朱娜, 郑飞, 等. 红参红景天混合物提取工艺及其抗疲劳作用研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 181-185.
- [17] 王忠, 厉彦翔, 骆新. 桑葚多糖抗疲劳作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 234-236.
- [18] 张旭, 宋凤瑞, 王隶书, 等. 人参参与藜芦配伍化学成分变化的 HPLC-ESI-MS 与 ESI-MS 研究[J]. 化学学报, 2007, 65(9): 829-833.
- [19] FUZZATI N, GABETTA B, JAYAKAR K, et al. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in *Panax ginseng* roots[J]. J Chromatogr A, 1999, 854(1/2): 69.
- [20] 王晴, 卢志威, 刘月红, 等. UPLC-Q-TOF/MS. E 结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1922-1931.
- [21] 赵亮, 齐特, 葛贝康, 等. UPLC-MS/MS 法测定红景天提取物中 6 种活性成分的含量[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(5): 975-979.
- [22] 陈貌连, 宋凤瑞, 郭明全, 等. 刺五加叶中黄酮类化合物的结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 805-808.
- [23] 赵安琦, 李博, 张慧荣, 等. 应用电喷雾质谱技术分析鉴定桑叶中黄酮类化合物[J]. 分子科学学报, 2014, 30(4): 293-298.
- [24] 梁艳, 于世锋, 陈卫军, 等. 山柰酚的电喷雾质谱裂解途径[J]. 应用化学, 2009, 26(10): 1250-1252.
- [25] 梁艳. 蜂蜜酚类化合物的色谱分析及其电喷雾质谱裂解途径的研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [26] 吴春燕, 须海荣, JULIEN H, 等. 不同茶树品种中黄酮苷含量的测定[J]. 茶叶科学, 2012, 32(2): 122-128.
- [27] 杨云舒, 李荣, 姜子涛, 等. 月桂叶中黄酮类成分的分析鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(7): 270-275.
- [28] RIO D D, STEWART A J, MULLEN W, et al. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(10): 2807-2815.
- [29] LIN L Z, CHEN P, HARNLY J M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(17): 8130-8140.
- [30] KORIVI M, HOU C W, HUANG C Y, et al. Ginsenoside-R_g₁ protects the liver against exhaustive exercise-induced oxidative stress in rats [J]. Evid-Based Compl Alt, 2011, 2012(2): 932165.
- [31] QI B, ZHANG L, ZHANG Z, et al. Effects of ginsenosides R_b₁ on exercise-induced oxidative stress in forced swimming mice [J]. Pharmacogn Mag, 2014, 10(40): 458-463.
- [32] 杨佳丹, 向荣凤, 戴青, 等. 人参皂苷 R_g₃ 对模拟高原缺氧大鼠的抗疲劳效应和骨骼肌线粒体功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(2): 110-115.
- [33] XU Y, WANG C, SHAN Y, et al. Effect of ginsenoside R_g₃ on tyrosine hydroxylase and related mechanisms; in the forced swimming-induced fatigue rats [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(1): 138-147.
- [34] CHOI W Y, LIM H W, LIM C J. Anti-inflammatory, antioxidative and matrix metalloproteinase inhibitory properties of 20 (R) -ginsenoside Rh₂ in cultured

- macrophages and keratinocytes [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2): 310-316.
- [35] 刘志, 夏娟, 李伟, 等. 天冬氨酸降解人参二醇组皂苷及其美拉德反应产物的抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2018, 39(7): 20-26.
- [36] FERREIRA L F L, CAMPBELL K S K, REID M B M. Effectiveness of sulfur-containing antioxidants in delaying skeletal muscle fatigue [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2011, 43(6): 1025-1031.
- [37] 郭鑫, 于天源, 周婧, 等. 肌肉疲劳及肌肉损伤机制研究综述[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(7): 2720-2724.
- [38] KARSHIKOFF B, SUNDELIN T, LASSELIN J. Role of inflammation in Human Fatigue: relevance of multidimensional assessments and potential neuronal mechanisms[J]. *Front Immuno*, 2017, 8(9): 21.
- [39] 余华, 何志礼. 红景天有效成分的提取和加工适应性研究[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(8): 47-49.
- [40] KROES B H, VAN D B A J, QUARLES V U H C, et al. Anti-inflammatory activity of gallic acid[J]. *Planta Med*, 1992, 58(6): 499-504.
- [41] HUANG D W, CHANG W C, WU S B, et al. Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet [J]. *Nutr Res*, 2016, 36(2): 150-160.
- [42] BAK E J, KIM J, JANG S, et al. Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2013, 73(8): 607-614.
- [43] RASOOL M K, SABINA E P, RAMYA S R, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of gallic acid in paracetamol-induced liver damage in mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(5): 638-643.
- [44] KAN N W, HUANG W C, LIN W T, et al. Hepatoprotective effects of ixora parviflora extract against exhaustive exercise-induced oxidative stress in mice[J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 10721-10732.
- [45] XU J, LI Y. Effects of salidroside on exhaustive exercise-induced oxidative stress in rats [J]. *Mol Med Report*, 2012, 6(5): 1195-1198.
- [46] LUIZ B J, DE A B G V, DOMINGOS OLÍVIA DA SILVA, et al. The correlation between chemical structures and antioxidant, prooxidant, and antitrypanosomatid properties of flavonoids [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1-12.
- [47] LI Y, WU J, SHI R, et al. Antioxidative effects of rhodiola genus: phytochemistry and pharmacological mechanisms against the diseases [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(15): 1692-1708.
- [48] ZHANG S Q, LIU C J, BI H M, et al. Extraction of flavonoids from *Rhodiola sachlensis* A. Bor by UPE and the antioxidant activity of its extract [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(2): 178-187.
- [49] STRZYGA-ŁACH P, CZECZOT H. The role of flavonoids in the modulation of inflammation [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2016, 40(236): 134-140.
- [50] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山柰酚生物功能研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(4): 86-91.
- [51] 周霄楠, 韩超, 宋鹏琰, 等. 木犀草素和槲皮素体外抗炎作用研究[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(10): 56-61.

[责任编辑 顾雪竹]