

· 药理 ·

人参提取物及大鼠灌胃给药后人血成分的定性研究

苗凤茹¹, 刘光宇², 林力^{2*}

(1. 航天中心医院神经内科, 北京 100049; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] **目的:** 对人参提取物及给药后大鼠血浆进行成分的定性研究。**方法:** 应用 ABI 4000Q TRAP 质谱, 结合参考文献和对照品对人参提取物及入血成分进行定性研究。**结果:** 从人参提取物中共分析鉴定了 10 个成分, 其中根据已知对照品确定的 4 个化合物, 推测未知的化合物 6 个。大鼠血浆中测定到 7 个化合物。**结论:** 人参提取物中可能含有人参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁, Rd, Rc, Rb₂, Rb₃, Rf, Rg₂, R₀, 大鼠血浆中没有测到 Rf, Rg₂, R₀。

[关键词] 人参; 定性; 液质联用

[中图分类号] R284.1; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)02-0148-07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1338.006.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:38

Study on Constituents of Ginsenoside Extraction *in vitro* and its Absorption in Serum of Rats after Oral Administration

MIAO Feng-ru¹, LIU Guang-yu², LIN Li^{2*}

(1. Department of Neurology, Aerospace Central Hospital, Beijing 100049, China;

2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain chemical constituent information of Ginseng extraction and its absorption in rat serum. **Method:** ABI 4000Q TRAP Mass was applied to determine and the compounds were analyzed with mass combined with references and standards. **Result:** Ten compounds in Ginseng extract and seven compounds in rat serum were identified. **Conclusion:** They are R_{g₁}, Re, Rb₁, Rd, Rc, Rb₂, Rb₃, Rf, Rg₂ and R₀ in Ginseng extract while ginsenoside Rf, Rg₂ and R₀ were not detected in rat serum.

[Key words] Ginseng Radix et Rhizoma; qualitative analysis; LC-MS/MS

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根, 性平味甘微苦, 归脾、肺、心经, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津止渴、安神益智之功能, 用于体虚欲脱、肢冷脉微、脾虚食少、肺虚喘咳、心力衰竭等症。现代药理研究证实人参有强心、

镇静, 以及激活消化系统功能的作用^[1-5]。人参皂苷是人参所含的最为重要的一类生理活性物质, 约占人参组成的 3%。目前, 已有多篇应用液质对人参皂苷成分进行的定性研究^[6-9], 但这些文章多以负离子模型进行分析, 且缺少体内入血成分的定性研究, 本文应用 ESI 的正离子模式, 通过 AB 质谱的 Q3 MS-IDA-EPI-EPI 和 Q3 MS-MRM 方式, 分别对人参中总皂苷及其给药后大鼠血浆进行定性分析, 为下一步血药浓度的测定和复方应用中的配伍机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂 人参皂苷 R_{g₁} 对照品, 中药药品生物制品检定所, 批号 110810-200424; 人参皂苷 Re

[收稿日期] 20120831(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102795); 国家中医药管理局课题(06-07ZP49)

[第一作者] 苗凤茹, 本科, 主管护师, 从事护理及临床药学, Tel: 010-59971350, E-mail: fengrumiao@sina.com

[通讯作者] * 林力, 博士, 副研究员, 从事药物分析及药代动力学, Tel: 010-62835618, E-mail: temlinli@gmail.com

对照品,中药药品生物制品检定所,批号 110754-200421;人参皂苷 Rb₁ 对照品,中药药品生物制品检定所,批号 110704-200420;人参皂苷 Rd 对照品,南京青泽医药,纯度 > 98%;人参总皂苷,由中国中医科学院西苑医院药学室提供,批号 040801。

甲酸和乙腈均为色谱纯,分别购自美国 Fisher 公司和 J. T. BAKER 公司;水为娃哈哈饮用纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司生产;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重为(220 ± 20) g,中国医学科学院动物实验研究中心提供,许可证号 SCXY(京)2004-0001。

1.3 仪器 API 4000 Q-TRAP 型三重四极杆串联质谱仪,配有离子喷雾离子源以及 Analysis 1.4.2 数据处理系统,美国 Applied Biosystem 公司; Agilent 1200 高效液相色谱系统,美国 Agilent 公司; Micro 22R 型台式高速冷冻离心机,德国 Hettich 公司; Biomedical Freezer 型超低温冰箱,日本 SANYO 公司; AG-245 型分析天平和 320 pH 计,美国 Mettler Toledo 公司; M18780 型氮吹仪,美国 Pierce 公司; MS1 Minishaker 型涡流混合器,德国 IKA 公司; 10 ~ 1 000 μL 移液枪, Socorex 公司出品。

1.4 供试品的制备 对于体外定性研究,取人参总皂苷适量溶于 50% 甲醇溶液中,滤过后待测;对于入血成分定性,取人参总皂苷适量溶于蒸馏水中,按 50 mg·kg⁻¹ 大鼠灌胃给药后 1.0 h 取全血,离心后取血浆,加入 2 倍量丙酮沉淀蛋白,离心后氮气吹干,流动相复溶后待测。

1.5 测定方法 色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液,梯度洗脱(0 ~ 15 min, 20% ACN;

15.01 ~ 25 min, 17% ACN; 35 min, 25% ACN; 40 ~ 60 min, 20% ACN),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。

质谱条件:离子喷射电压(IS)4 500 V,源内气体 GS1 为 50 psi,源内气体 GS2 为 45 psi,气帘气体 10 psi,碰撞气(CAD) Medium,源内温度 600 ℃;检测方式:正离子检测;扫描方式:有效组分采用 Q3 MS-IDA-EPI-EPI 方式,血浆中成分采用 Q3 MS-MRM 方式,扫描范围 *m/z* 200 ~ 1 250。

2 结果

2.1 定性分析色谱图 在保证分离度的基础上,采用尽可能少的时间分析提取物中的成分是复杂体系定性定量分析的一个重点和难度,本实验在反复摸索不同流动相和洗脱条件基础上,最终确定了分离条件,其总离子流图见图 1,在此基础上应用 4 000 Q 上 IDA 方式进行定性分析。

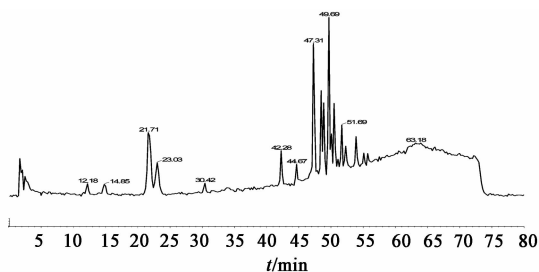


图 1 人参提取物的总离子流(正离子)

2.2 人参提取物中皂苷类成分鉴定

2.2.1 人参皂苷 Rg₁ 分子式 C₄₂H₇₂O₁₄,精确相对分子质量为 800.492 2,属于人参三醇型。一级质谱保留时间 21.62 min 出现 *m/z* 823.4, 839.4 的峰,分别为 [M + Na]⁺ 和 [M + K]⁺ 峰。以 *m/z* 823.4 为母离子进行二级质谱时分别产生 *m/z* 643.3, 203.1 的碎片(图 2),碎片 *m/z* 643.3 为母离子失去一分子末端葡萄糖和一分子水,即 [M - glc - H₂O]⁺,碎片

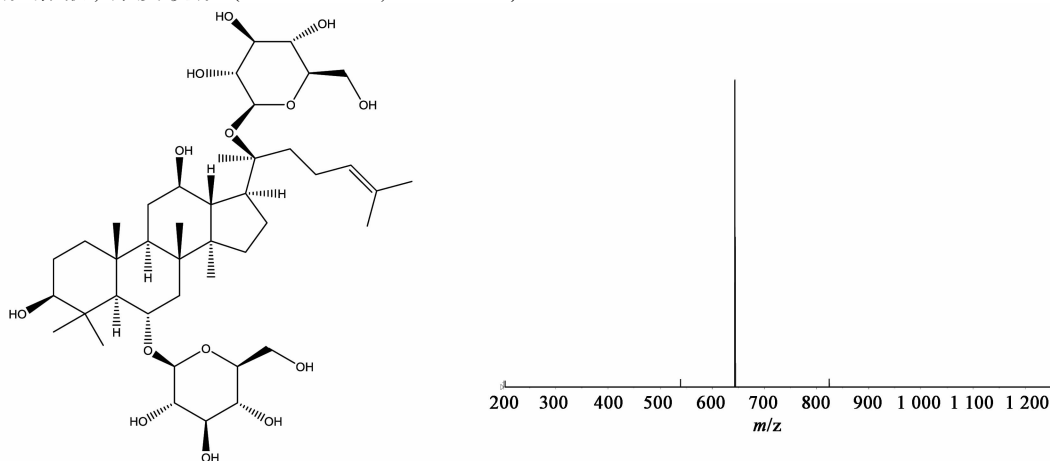


图 2 人参皂苷 Rg₁ 的结构式及其二级质谱

m/z 203.1 为 $[\text{glc} + \text{Na}]^+$ 产生的, 结合参考文献和对照品质谱图将其定性为人参皂苷 Rg_1 。

2.2.2 人参皂苷 Re 分子式 $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$, 精确相对分子质量为 946.5501, 属于人参三醇型。一级质谱在保留时间 22.86 min 出现 m/z 969.6 和 m/z 985.7 的峰, 分别为 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 峰。以 m/z 969.6 为母离子时 (图 3) 产生的碎片 m/z 789.4 为 $[\text{M} - \text{glc} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 碎片 m/z 343.0 为 $[\text{glc} - \text{glc} + \text{H}]^+$, 结合参考文献和对照品质谱图将其定性为人参皂苷 Re 。

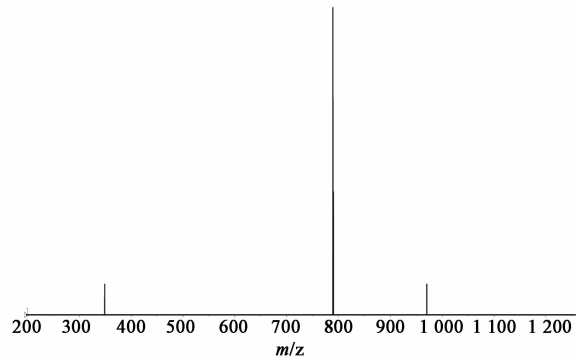
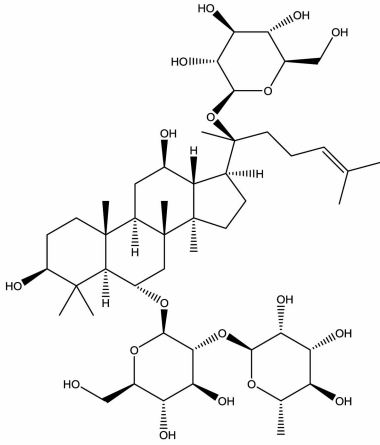


图 3 人参皂苷 Re 的结构式及其二级质谱

2.2.3 人参皂苷 Rb_1 分子式 $\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$, 精确相对分子质量为 1108.6029, 属于人参二醇型。一级质谱在保留时间 47.52 min 上出现 m/z 1131.5 和 m/z 1147.5 的峰, 为 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 峰。以 m/z 1131.5 为母离子进行二级质谱时产生的碎片中 (图 4), m/z 789.4 为母离子失去一个由双糖组成的糖链和一分子水, $[\text{M} - (\text{glc} - \text{glc}) - \text{H}_2\text{O}]^+$, 碎片 m/z 365.0 为 $[\text{glc} - \text{glc} + \text{Na}]^+$ 生成, 结合参考文献和对照品质谱图将其定性为人参皂苷 Rb_1 。

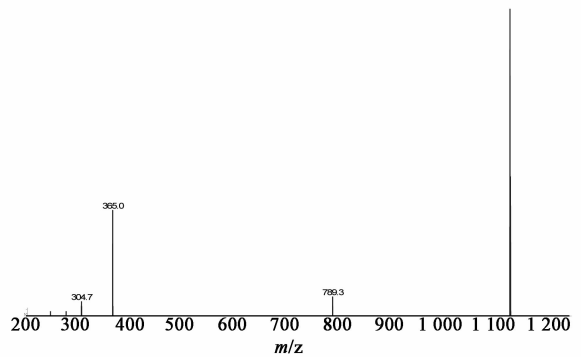
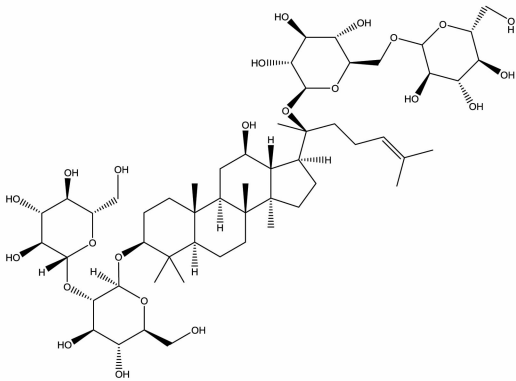


图 4 人参皂苷 Rb_1 的结构式及其二级质谱

2.2.4 人参皂苷 Rd 分子式 $\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$, 精确相对分子质量为 946.5501, 属于人参二醇型。一级质谱在保留时间 53.92 min 出现 m/z 969.5 的峰, 为 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰。以此为母离子进行二级质谱扫描时 (图 5), 产生的碎片 m/z 789.4 为 $[\text{M} - \text{glc} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 碎片 m/z 365.0 为 $[\text{glc} - \text{glc} + \text{Na}]^+$ 生成, 结合参考文献和对照品质谱图将其定性为人参皂苷 Rd 。

2.2.5 人参皂苷 Rc , Rb_3 和 Rb_2 分子式都是 $\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$, 精确相对分子质量为 1078.5924。其中 Rb_2 和 Rb_3 的结构非常相似, 同属于人参二醇型皂

苷。一级质谱上正离子选择 Mass Range 为 1100.0 ~ 1102.0, 得到 3 个峰, 保留时间分别为 48.79, 50.50, 51.20 min。对这 3 个峰位分别进行一级和二级质谱扫描, 发现其结构碎片相似, 质谱上是不能区别的。文献报道^[10] 在相似条件下三者的出峰顺序依次为 Rc , Rb_3 , Rb_2 , 依此可以初步推测其二级结构的归属。

t_R 48.79 min 一级质谱出现 m/z 1101.6, 1117.5 的峰, 推测其为 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 峰。二级质谱以 m/z 1101.6 为母离子时 (图 6), 碎片 m/z 789.3 为母离子失去末端的阿拉伯呋喃糖和末

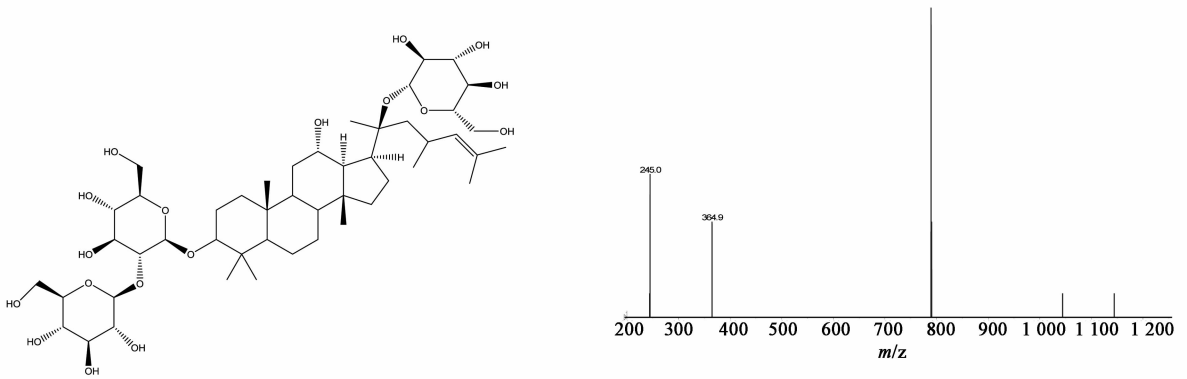


图5 人参皂苷 Rd 的结构式及其二级质谱

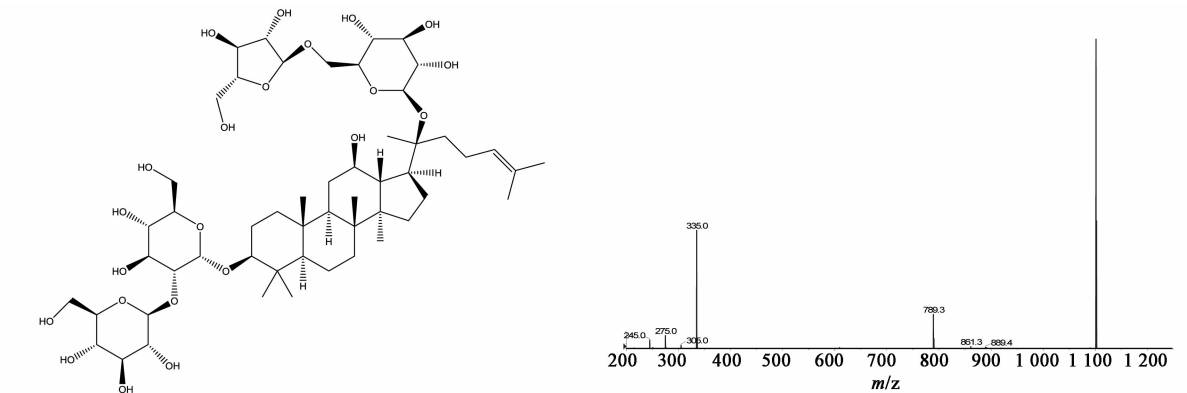


图6 人参皂苷 Rc 的结构式及其二级质谱

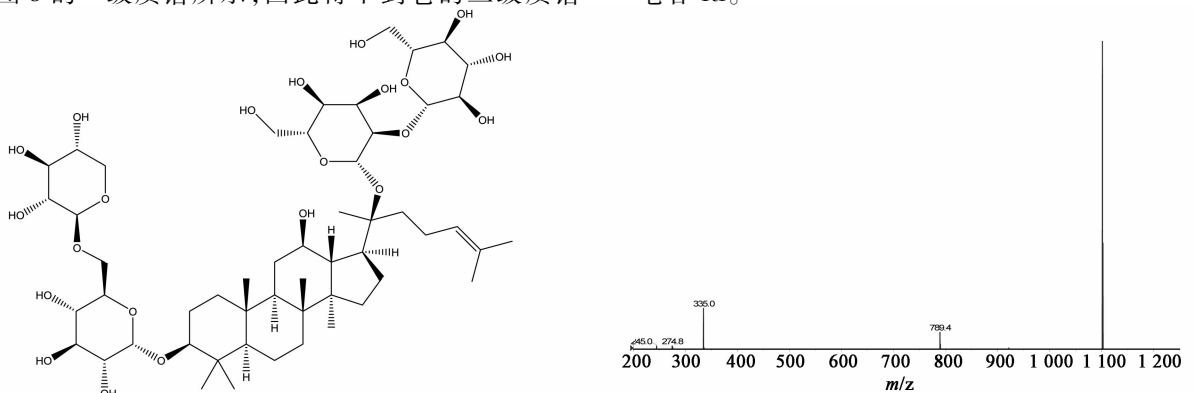
端的葡萄糖 $[M - \text{glc} - \text{araf}]^+$, 碎片 m/z 335.0 为 $[\text{glc} + \text{araf}]^+$, 可以初步定性为人参皂苷 Rc。

t_R 50.53 min 一级质谱出现 m/z 1 101.5 和 m/z 1 117.6 的峰, 推测其为 $[M + \text{Na}]^+$ 和 $[M + \text{K}]^+$ 峰。二级质谱以 m/z 1 101.6 为母离子时(图7), 碎片 m/z 789.3 为母离子失去一分子的葡萄糖和一分子的木糖 $[M - \text{glc} - \text{xyl}]^+$, 碎片 m/z 335.0 为 $[\text{glc} + \text{xyl}]^+$, 可以初步定性为人参皂苷 Rb₃。

t_R 51.20 min 一级质谱出现 m/z 1101.6 的峰, 推测其为 $[M + \text{Na}]^+$ 峰。由于人参皂苷 Rb₂ 含量少, 如图8的一级质谱所示, 因此得不到它的二级质谱

图, 没有结构的进一步信息, 根据其相对分子质量和出峰顺序推测其为 Rb₂。

2.2.6 人参皂苷 Rf 分子式 $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$, 精确相对分子质量为 800.4922, 属于人参三醇型。一级质谱选择 823.0 ~ 825.0 得到两个峰, 保留时间分别为 21.64, 42.27 min。已知 t_R 21.64 min 为人参皂苷 Rg₁, t_R 42.27 min 的一级质谱 m/z 823.3, 属于 $[M + \text{Na}]^+$ 。以此为母离子行二级质谱时(图9), 碎片 m/z 365.0 为母核上脱落的糖链加钠峰 $[\text{glc} - \text{glc} + \text{Na}]^+$ 生成, 结合文献报道^[10] 可以初步定性为人参皂苷 Rf。

图7 人参皂苷 Rb₃ 的结构式及其二级质谱

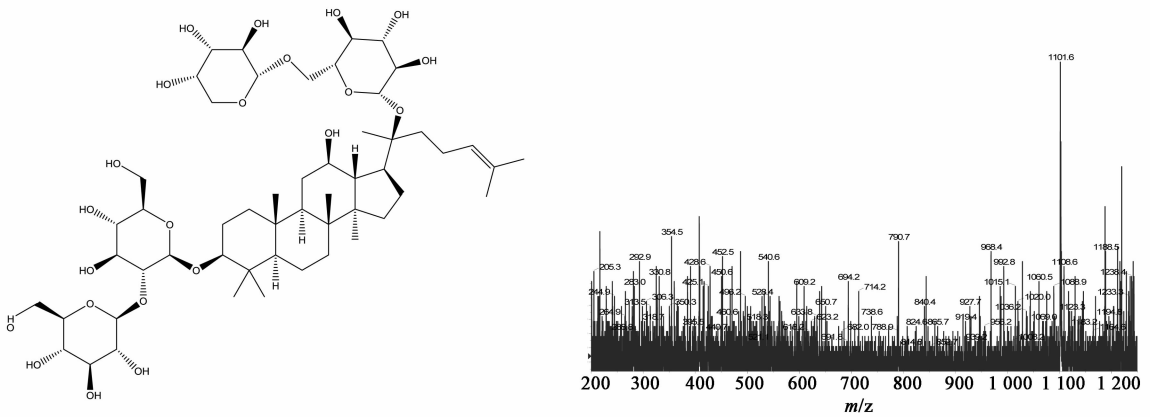


图 8 人参皂苷 Rb₂ 的结构式及其二级质谱

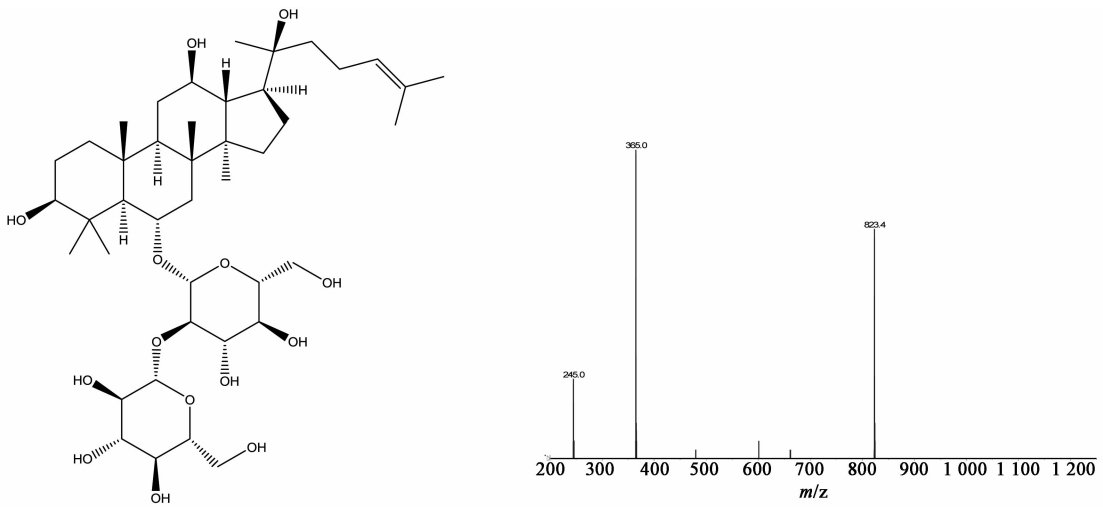


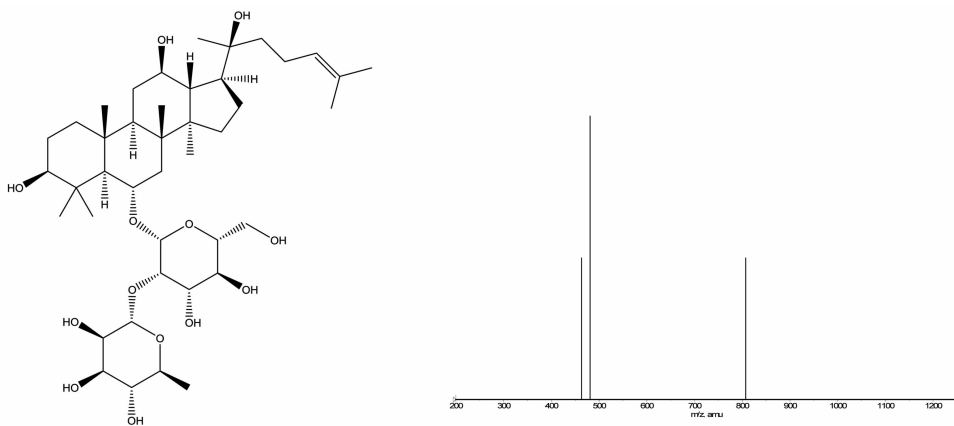
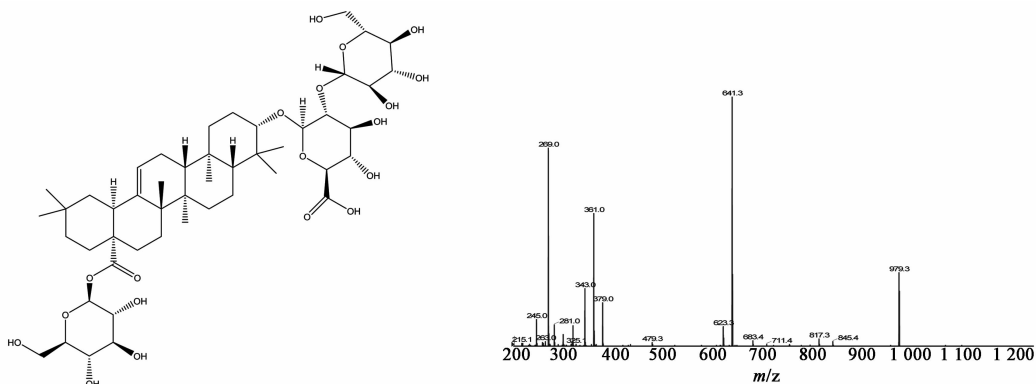
图 9 人参皂苷 Rf 的结构式及其二级质谱

2.2.7 人参皂苷 Rg₂ 人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 Rg₃ 和人参皂苷 F₂ 分子式相同,为 C₄₂H₇₂O₁₃,其精确相对分子质量为 784.497 3。其中人参皂苷 Rg₂ 属于人参三醇型皂苷,人参皂苷 Rg₃ 和人参皂苷 F₂ 属于人参二醇型皂苷。一级质谱选择 806.5 ~ 808.5 得到一个保留时间为 47.07 min 峰,一级质谱为 m/z 807.5,属于 $[M + Na]^+$ 。以此为母离子行二级质谱时(图 10),碎片 m/z 481.2 为三醇皂苷元失水加钠峰,碎片 m/z 463.2 为在此基础上再失去一分子水峰,由此可以排除二醇型的人参皂苷 Rg₃ 和人参皂苷 F₂,综上将其初步定性为人参皂苷 Rg₂。

2.2.8 人参皂苷 R₀ 分子式 C₄₈H₇₆O₁₉,精确相对分子质量为 956.498 1,属于齐墩果酸型皂苷。一级质谱选择 978.5 ~ 980.5 得到一个保留时间为 49.69 min 峰,一级质谱为 979.5,属于 $[M + Na]^+$ 。以此为母离子行二级质谱时(图 11),碎片 m/z 817.3 为人参皂苷 R₀ 失去末端的一个葡萄糖, $[M - glc]^+$; 碎片 m/z 641.3 为人参皂苷 R₀ 失去末端的双糖链

葡萄糖-葡萄糖醛酸 $[M - glc - glcUA]^+$; 碎片 m/z 361.0 为双糖链的加钠峰, $[glc - glcUA + Na]^+$, 综上将其初步定性为人参皂苷 R₀。

2.3 大鼠血浆中皂苷类成分 根据 2.2 项下人参总皂苷中明确的各成分的保留时间和二级质谱相关信息,采用 MRM-IDA-EPI 方式对血浆中成分进行定性分析。其中 MRM 方式中所的选择离子对如下所示:人参皂苷 Rg₁ 为 823.6/191.9 和 823.6/203.1,人参皂苷 Rg₂ 为 807.5/481.2 和 807.5/463.2,人参皂苷 Re 和 Rd 为 969.7/789.5 和 969.7/203.1,人参皂苷 Rb₁ 为 1 131.8/789.5 和 1 131.8/365.1,人参皂苷 Rc/Rb₃ 为 1 101.6/789.3 和 1 101.6/335.0,人参皂苷 Rf 为 823.3/365.0 和 823.3/245.0,人参皂苷 R₀ 为 979.5/817.3 和 979.5/361.0。结果显示在大鼠血浆中没有测到人参皂苷 Rg₂, Rf, R₀, 人参皂苷 Rg₁, Re 虽然强度太低而无法进行二级质谱的测定,但在总离子流图上测通过 MRM 方式可以测到,因此体内血浆中可以定性 7 种

图 10 人参皂苷 R_{g2} 的结构式及其二级质谱图 11 人参皂苷 R₀ 的结构式及其二级质谱

成分,分别为 R_{g1}, R_e, R_{b1}, R_d, R_c, R_{b3}, R_{b2}。

3 讨论

人参皂苷一级质谱中的分子离子峰较弱,正离子中通常的基峰为 $[M + Na]^+$, 有时会出现 $[M + K]^+$ 的加合离子峰,有时这些加合峰的峰强要远高于分子离子峰,其原因可能在于天然中草药在自然环境中摄取而成。人参皂苷二级质谱中糖苷链比较容易断裂下来。对于两个以上的糖组成的糖苷链,越接近皂苷元的糖断裂机会越少,因此皂苷元的峰强度一般很低。人参皂苷的质谱中如有较强的 $[M - H - 162]^-$ 峰,则表明结构中含有位于端基的六碳糖;如出现 $[M - H - 146]^-$ 峰,表明结构中含有位于端基的甲基五碳糖;如出现 $[M - H - 132]^-$ 峰,表明结构中含有端基五碳糖。若同时出现 $[M - H - 162]^-$ 和 $[M - H - 132]^-$ 峰,表明分子中同时含有六碳糖和五碳糖,且两种糖均为末端糖^[10]。

【参考文献】

- [1] 何道同,王兵,陈珺明. 人参皂苷药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(7): 118.
- [2] 毛晶晶,张彤,王冰,等. 20(S)-原人参二醇的药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17

(24): 274.

- [3] 石楸鸣. 人参皂苷的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(30): 2967.
- [4] 高伟博,米钧,秦秋杰,等. 人参及其炮制品抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 210.
- [5] 刘洁,刘芬,王秋静,等. 人参二醇组皂苷对心肌梗死犬血清一氧化氮、一氧化氮合酶水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4): 46.
- [6] 王占良,王弘,陈世忠. 高效液相色谱-二极管阵列检测/质谱法分析生脉饮煎剂中的人参皂苷类成分[J]. 色谱, 2004, 24(4): 325.
- [7] 郭继芬,钟大放,乔善义,等. 液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析人参皂苷[J]. 质谱学报, 2003, 24(4): 477.
- [8] 马小琼,徐青,梁鑫淼. 液相色谱-大气压化学电离质谱法分析人参中的人参皂苷[J]. 色谱, 2005, 23(4): 389.
- [9] 胡春秀,孔宏伟,朱超,等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱快速分析人参根中的皂苷化合物[J]. 色谱, 2011, 31(6): 488.
- [10] 马晓琼. 人参化学物质基础分析方法研究[D]. 大连:中国科学院研究生院大连化学物理研究所, 2005.

[责任编辑 邹晓翠]