

三七粉血清药物化学研究*

刘耀晨¹, 王德勤², 张洪兵^{3,4}, 郭海彪², 韩彦琪^{3,4},
林娟², 张铁军^{3,4,5**}, 许浚^{3,4,5**}

(1. 天津医科大学药学院 天津 300070; 2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司 广州 510515; 3. 天津药物研究院
天津市中药质量标志物重点实验室 天津 300301; 4. 天津药物研究院中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合
工程实验室 天津 300301; 5. 天津药物研究院释药技术与药代动力学国家重点实验室 天津 300301)

摘要:目的 采用超高效色谱-电喷雾/四级杆飞行时间串联质谱联用(UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)技术对三七粉中主要化学成分和血中移行成分进行准确快速鉴定。方法 采用Waters Xevo G2 Q-ToF高分辨质谱、Waters Acquity UPLC液相色谱系统、Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈色谱柱(2.1×100 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾(ESI)离子源,在正、负离子模式下采集数据,通过与对照品的保留时间及质谱信息对比,并结合文献报道及质谱数据库中相同成分或同类成分的精确分子质量、质谱裂解规律进行匹配,对三七粉中化学成分和血中移行成分进行快速准确识别。结果 三七粉中共鉴定得到54个化学成分,包括原人参二醇皂苷类36个,原人参三醇皂苷类14个,黄酮类1个,糖类1个,氨基酸类1个和酯类化合物1个。在给药大鼠血浆中共鉴定得到18个三七粉相关的外源性化合物,包括14个吸收原型药物成分和4个代谢物。结论 利用建立的定性分析方法快速准确地识别三七粉中主要化学成分和血中移行成分。明确了三七粉体外化学成分组-体内血行成分组的药效物质基础传递-转化过程,为三七粉的质量标志物确定与质量控制提供依据,也为其深入分子作用机制研究奠定基础。

关键词:三七粉 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 药效物质基础 质量标志物

doi: 10.11842/wst.20210615012 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) f. H. Chen 的干燥根和根茎,收载于《中国药典》,传统功效为活血化瘀、消肿止痛^[1]。三七中以皂苷类有效成分为主,还含有多种非皂苷类成分,如糖类、氨基酸、黄酮类等^[2]。三七粉是将三七药材经粉碎而成,作为中药饮片主要用于外伤出血、胸腹刺痛及跌扑肿痛等^[3]。三七粉的质量标准主要参考《中国药典》,但现行《中国药典》质量标准仅规定了三七粉中人参皂苷 R_{g₁}、R_{b₁}及三七皂苷 R₁的含测总量^[1],相关研究表明,三七皂苷成分主要与活血、抗炎、免疫调节、神经保护等药理作用相关^[4-10]。因此,现行标准不能真

正反映三七粉质量与疗效的关系。

为解决我国中药质量标准存在的问题,刘昌孝院士提出中药质量标志物(Q-Marker)的概念,明确了Q-Marker的基本条件,Q-Marker研究应对中药有效成分的传递和转化过程进行研究^[11,12]。三七粉以口服用药的形式通过体内传输发挥临床疗效,化学物质基础经过质量传递和代谢转化后体现出其特有的生物效应。入血成分及其代谢产物是三七粉最终的“效应成分”。从质量传递与溯源的角度,血中的效应成分是质量传递体系的最终环节,也是中药质量标志物确定的重要依据^[13]。因此,必须明确三七粉体外化学成分组-体内

收稿日期:2021-06-15

修回日期:2021-11-07

* 国家自然科学基金委员会重点项目(81830111):基于“成分构成-靶标网络-生物效应”多维整合的中药质量标志物发现与确认,负责人:许海玉;国家中医药管理局国家中医药国际合作专项(0610-2140NF020630):中国-德国中药与植物药创新研发国际合作基地,负责人:刘昌孝。

** 通讯作者:张铁军,研究员,主要研究方向:中药新产品开发和质量研究;许浚,研究员,主要研究方向:中药药效物质基础和质量研究。

血行成分组的传递-转化过程,为三七粉药效物质基础的传递过程提供清晰的路径。目前三七皂苷成分表征及单体皂苷的代谢转化研究已有报道^[14-20],但缺乏三七粉化学物质组及其体内血行成分组的表征。

本研究建立三七粉的化学指纹谱,运用液质联用技术对所含化学成分进行了全面分析;随后结合血清药物化学方法建立给药血浆的血行成分指纹谱,分析血中移行的原型药物成分及代谢物,明确体外化学成分-体内血行成分组的药效物质基础传递-转化过程,为三七粉的质量标志物确定与全面质量控制提供依据。同时为课题组后期深入三七粉分子作用机制,从成分的“有效性”方面框定其质量标志物奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器

Acquity UPLC 超液相色谱仪(美国 Waters 公司); Xevo G2 Q-Tof 高分辨质谱(美国 Waters 公司),配备 ESI 离子源; Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱(美国 Waters 公司); HAC-I 自动浓缩氮吹仪(天津市恒奥科技有限公司); 3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)

1.2 试剂

对照品人参皂苷 Re(批号 110754-201827)、人参皂苷 Rd(批号 111818-201603)、人参皂苷 Rg₁(批号 110704-201827)、三七皂苷 R₁(批号 10745-201820)均购于中国食品药品检定研究院,人参皂苷 Rc(批号 M29F11S109055)购自上海源叶生物科技有限公司,所有对照品质量分数均大于 98%; 色谱纯乙腈、甲醇和甲酸购自天津市康科德科技有限公司; 纯净水购自杭州娃哈哈饮用水有限公司; 三七粉购自广州白云山和记黄埔中药有限公司(批号 YPA8L0006)。

2 方法

2.1 三七粉样品溶液制备

取三七粉 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 10 mL, 超声提取 20 min, 重复 2 次合并提取液, 以 70% 甲醇稀释至 25 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得三七粉样品溶液供检测分析。

2.2 三七粉大鼠灌胃溶液制备

取三七粉适量, 加入羧甲基纤维素钠溶液制成混悬液, 并稀释至浓度为 0.3 g·mL⁻¹, 即得。

2.3 对照品溶液制备

精密称取适量人参皂苷 Re、Rd、Rg₁、Rc 和三七皂苷 R₁, 置于量瓶中, 加入甲醇, 制备成 0.1 mg·mL⁻¹ 各对照品储备液; 分别量取上述储备液适量, 稀释, 制备成均为 10 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。4℃ 下保存, 进样前经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.4 含药血清制备与处理

2.4.1 给药与采血

雄性 SD 大鼠(200±20 g), 饲养 1 周后, 随机分为两组并称定体重, 按 1 mL/100 g 的灌胃剂量, 空白组给予羧甲基纤维素钠溶液, 给药组灌以三七粉混悬液。

实验大鼠给药 4 h 后以 10% 水合氯醛麻醉, 肝门静脉取血置肝素化试管中, 于 4℃ 条件下 3500 rpm 离心 10 min 分离血浆, 置 -20℃ 冰箱中保存备用。

2.4.2 血浆样品的处理

取大鼠血浆样品 500 μL, 加入甲醇, 混匀, 于 4℃ 条件下 13000 rpm 离心 10 min, 上清液使用 N₂ 吹干, 残渣以甲醇复溶, 离心吸取上清液供检测分析。

2.5 LC-MS 分析

色谱分析采用 Waters Acquity UPLC 液相色谱系统, 色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm) 柱, 流动相系统由 A(0.1% 甲酸乙腈) 和 B(0.1% 甲酸水溶液) 组成, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 45℃, 进样量 5 μL。运用梯度洗脱, 梯度程序设置如下: 0-3 min, 8%-20% A; 3-6 min, 20%-25% A; 6-16 min, 25%-40% A; 16-22 min, 40%-65% A; 22-26 min, 65%-75% A; 26-27 min, 75%-95% A。

质谱分析采用 Waters Xevo G2 Q-Tof 高分辨质谱, 配备电喷雾离子源(ESI), 毛细管电压正离子模式 3.0 kV, 负离子模式 2kV。离子源温度 110℃, 样品锥孔电压 30V, 锥孔气流速 50 L·h⁻¹, 氮气脱气温度 350℃, 脱气流速 800 L·h⁻¹, 扫描范围 50-2000 m/z, 内参校准液亮氨酸脑啡肽用于分子量实时校正。

2.6 数据处理

2.6.1 三七粉化学成分鉴定

通过标准品参照、文献检索和数据库检索, 对比分析正负模式下的 MS、MS/MS 数据信息, 结合保留时间、峰强度等对各色谱峰进行结构鉴定与确证, 明确三七粉中所含的化学成分。

2.6.2 入血原型成分及代谢产物鉴定

通过比对三七粉样品、大鼠给药血浆及空白血浆

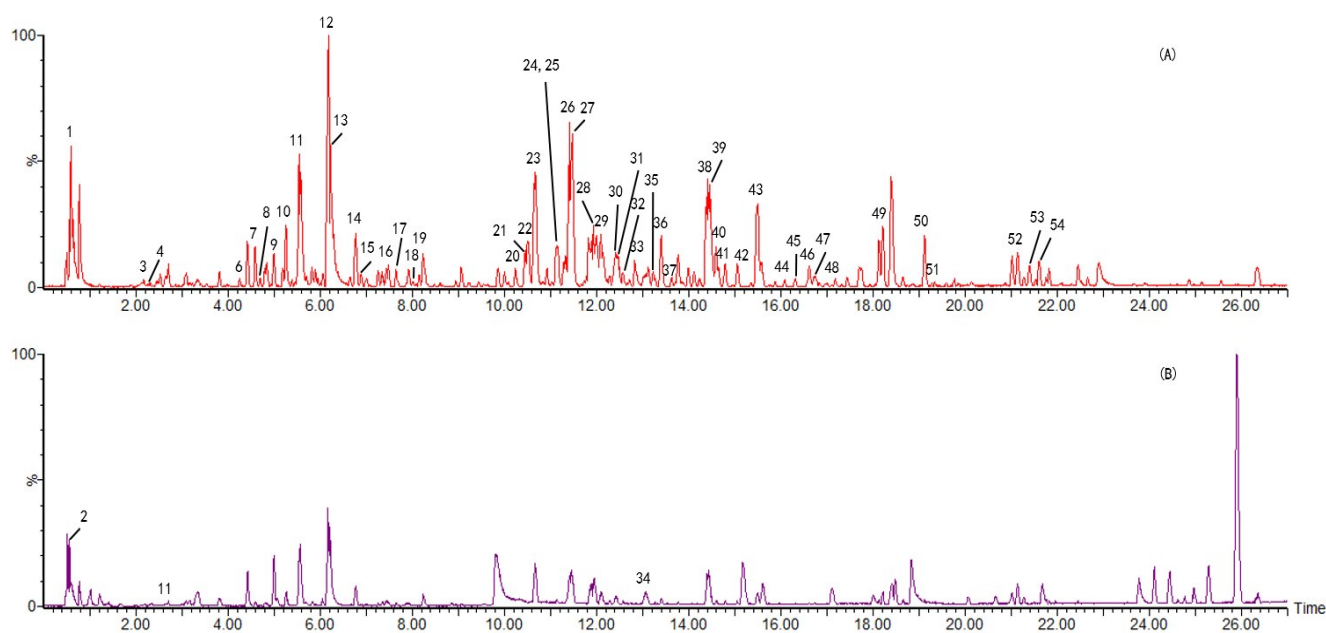


图1 三七粉BPI色谱图

注:(A)负离子模式;(B)正离子模式

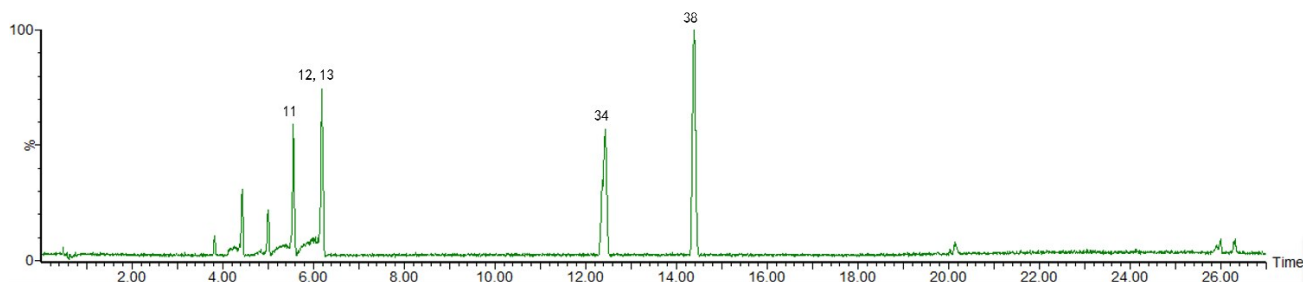


图2 混合对照品负离子模式BPI色谱图

样品的色谱图,结合标准品色谱图和文献检索,对比各色谱峰的MS、MS/MS数据信息,对三七粉吸收入血的原型成分进行结构鉴定;进一步分析原型成分的裂解规律,结合碎片离子的特征中性丢失,比对相关代谢产物的MS、MS/MS质谱信息,对其结构进行鉴定,明确体内代谢途径。

3 结果与分析

3.1 三七粉样品分析

采用“2.5”项下优化的条件,对三七粉样品溶液进行检测分析,正、负离子模式下,三七粉样品及混合对照品的BPI色谱图(图1-图2)。按照“2.6.1”项下数据处理方法确定化学成分结构,对三七粉主要化学成分进行表征,共鉴定得到54个化合物(表1),其中原人参

二醇皂苷类36个,原人参三醇皂苷类14个,黄酮类1个,糖类1个,氨基酸类1个和酯类化合物1个。

3.1.1 皂苷类

三七粉中皂苷类化合物,结构中含有葡萄糖、鼠李糖等多个糖基取代,在质谱中容易逐级丢失产生一系列特征碎片离子,进一步断裂C-17支链取代烷基,形成84 Da的特征中性丢失^[16]。

原人参二醇型皂苷类化合物,以人参皂苷Rb₁为例,其C-3位和C-20位羟基均有二糖取代,分别由两分子葡萄糖2→1位相连和两分子葡萄糖6→1位相连。在质谱中分子离子[M-H]⁻ *m/z* 1107连续丢失四分子葡萄糖,形成 *m/z* 945、*m/z* 783、*m/z* 621的碎片离子及 *m/z* 459的原人参二醇型皂苷元离子,进一步失去C-17支链产生 *m/z* 375的碎片离子,所得碎片信息与文献数据一致,MS/MS谱图见图3。

表1 三七粉化学成分LC-MS数据

No.	t _R (min)	Ion mode	Expected	Detected	Error (ppm)	Formula	MS/MS fragmentation	Identification
1	0.55	-*	387.1139	387.1145	1.55	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341	蔗糖
2	0.63	+	177.0511	177.0514	1.69	C ₅ H ₈ O ₅ N ₂	160,159,131,116	三七素
3	2.17	-*	879.4953	879.4977	2.73	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₆	833,671,653,509	三七皂苷J
4	2.31	-*	879.4953	879.4969	1.82	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₆	833,671,653,483	三七皂苷J异构体
5	2.71	+	303.0505	303.0503	-0.06	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	275,165	槲皮素
6	4.26	-*	1139.5849	1139.5834	-1.32	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₃	1093,961,799,475	Yesaninoside H
7	4.59	-*	1007.5427	1007.5436	0.89	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961,799,637,475	三七皂苷 R ₃ /R ₆ /20-氧代人参皂苷 Rf
8	4.70	-*	1153.6006	1153.5999	-0.61	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107,961,799,637,475	Yesaninoside E
9	4.84	-*	1007.5427	1007.5436	0.89	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961,799,637,475	三七皂苷 R ₃ /R ₆ /20-氧代人参皂苷 Rf
10	5.25	-*	1007.5457	1007.5427	3.87	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961,799,637,619,475	三七皂苷 M
11 ^a	5.56	-*	977.5321	977.5309	-1.23	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931,799,637,475	三七皂苷 R ₁
12 ^a	6.18	-*	845.4899	845.4899	0.00	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799,637,475	三七皂苷 Rg ₁
13 ^a	6.23	-*	991.5478	991.5492	1.41	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945,799,637,475	人参皂苷 Re
14	6.77	-	885.4848	885.4852	0.45	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	841,799,637,475	丙二酰基人参皂苷 Rg ₁
15	6.89	-*	1169.5955	1169.5992	3.16	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₄	1123,961,799,637,475	人参皂苷 A
16	7.44	-*	885.4848	885.4852	0.45	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	841,799,781,637,475	丙二酰基人参皂苷 Rg ₁ 异构体
17	7.64	-*	1005.5270	1005.5336	6.56	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₉	959,797,635,473	三七皂苷 G
18	8.15	-*	1167.5799	1167.5765	-2.91	C ₅₄ H ₉₀ O ₂₄	1121,959,915,797,637	三七皂苷 B
19	8.24	-*	815.4793	815.4786	-0.86	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769,637,475	三七皂苷 R ₂ 异构体
20	10.23	-*	1315.6534	1315.6511	-1.75	C ₆₀ H ₁₀₂ O ₂₈	1269,1107,945,783,621	人参皂苷 Ra ₀
21	10.45	-*	845.4899	845.4911	1.42	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799,637,475	人参皂苷 Rf
22	10.50	-*	1285.6429	1285.6429	0.00	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1239,1107,945,783,621,459	三七皂苷 Fa
23	10.67	-*	815.4793	815.4789	-0.49	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769,637,475	三七皂苷 R ₂
24	11.14	-*	1285.6429	1285.6384	-3.50	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1107,945,783,621,459	人参皂苷 Ra ₃
25	11.16	-*	1285.6429	1285.6393	-2.80	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1107,945,783,621,459	三七皂苷 R ₄
26	11.40	-*	829.4949	829.4913	-4.34	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,637,475,329	人参皂苷 Rg ₂
27	11.48	-*	683.4370	683.4355	-2.19	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	637,475	人参皂苷 Rh ₁
28	11.93	-*	1154.6006	1154.6025	1.65	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107,945,783,621,459	人参皂苷 Rb ₁
29	12.12	-	1193.5955	1193.5939	-1.34	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1149,987,825,679,553	丙二酰基人参皂苷 Rb ₁
30	12.40	-	1193.5955	1193.5939	-1.34	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1149,1107,1089,945,783,621,475	丙二酰基人参皂苷 Rb ₁ 异构体
31	12.46	-	1193.5955	1193.5930	-2.09	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1149,1107,1089,945,783,621,475	丙二酰基人参皂苷 Rb ₁ 异构体
32	12.50	-	885.4848	885.4843	-0.56	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	841,679,533	丙二酰基人参皂苷 Rg ₁ 异构体
33	12.87	-	1193.5955	1193.5930	-2.09	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1149,1107,1089,945,783,621,475	丙二酰基人参皂苷 Rb ₁ 异构体
34 ^a	13.05	+ [#]	1101.5822	1101.5779	-3.90	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	749,587,425	人参皂苷 Re
35	13.23	-*	1123.5900	1123.5856	-3.92	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077,915,783,621,489	人参皂苷 Rb ₂
36	13.41	-*	683.4370	683.4349	-3.07	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	673,475	人参皂苷 F ₁
37	13.63	-*	1123.5900	1123.5862	-3.38	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077,945,783,621,475	人参皂苷 Rb ₃
38 ^a	14.41	-*	991.5478	991.5484	0.61	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945,783,621,459	人参皂苷 Rd
39	14.45	-*	991.5478	991.5474	-0.40	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	783,621,459,327	三七皂苷 K
40	14.59	-	1031.5427	1031.5416	-1.07	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	987,945,927,825,621,459	丙二酰基人参皂苷 Rd
41	14.79	-	1031.5427	1031.5417	-0.97	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	987,945,927,825,621,459	丙二酰基人参皂苷 Rd 异构体
42	15.06	-	1031.5427	1031.5417	-0.97	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1031,987,945,825,621,459	丙二酰基人参皂苷 Rd 异构体
43	15.49	-*	991.5478	991.5477	-0.10	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945,783,621,459	绞股蓝皂苷 XVII
44	16.08	-	1031.5427	1031.5396	-3.01	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	987,945,927,799	丙二酰基人参皂苷 Rd 异构体

续表

No.	t _R (min)	Ion mode	Expected	Detected	Error (ppm)	Formula	MS/MS fragmentation	Identification
45	16.31	—	1031.5427	1031.5443	1.55	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	987,945,781	丙二酰基人参皂苷 Rd 异构体
46	16.62	—*	961.5372	961.5333	-4.06	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915,783,621,459	三七皂苷 Fe
47	16.74	—*	961.5372	961.5374	0.21	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915,783,621,459	三七皂苷 Fd
48	16.98	—*	797.4687	797.4662	-3.13	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₂	751,619	三七皂苷 T5
49	18.21	—*	829.4949	829.4929	-2.41	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,621,459	人参皂苷 F ₂
50	19.12	—*	829.4949	829.4927	-2.65	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,621,459	20(S)-人参皂苷 R _{g3}
51	19.34	—*	829.4949	829.4956	0.84	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,621,459	20(R)-人参皂苷 R _{g3}
52	21.14	—*	723.3803	723.3808	0.69	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₄	677	姜糖酯 B
53	21.39	—*	811.4844	811.4813	-3.82	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765,603	人参皂苷 Rk ₁
54	21.61	—*	811.4844	811.4811	-4.07	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765,603	人参皂苷 R _{g5}

注:a:与标准品比对确证;*:[M+HCOO]⁻;#: [M+Na]⁺

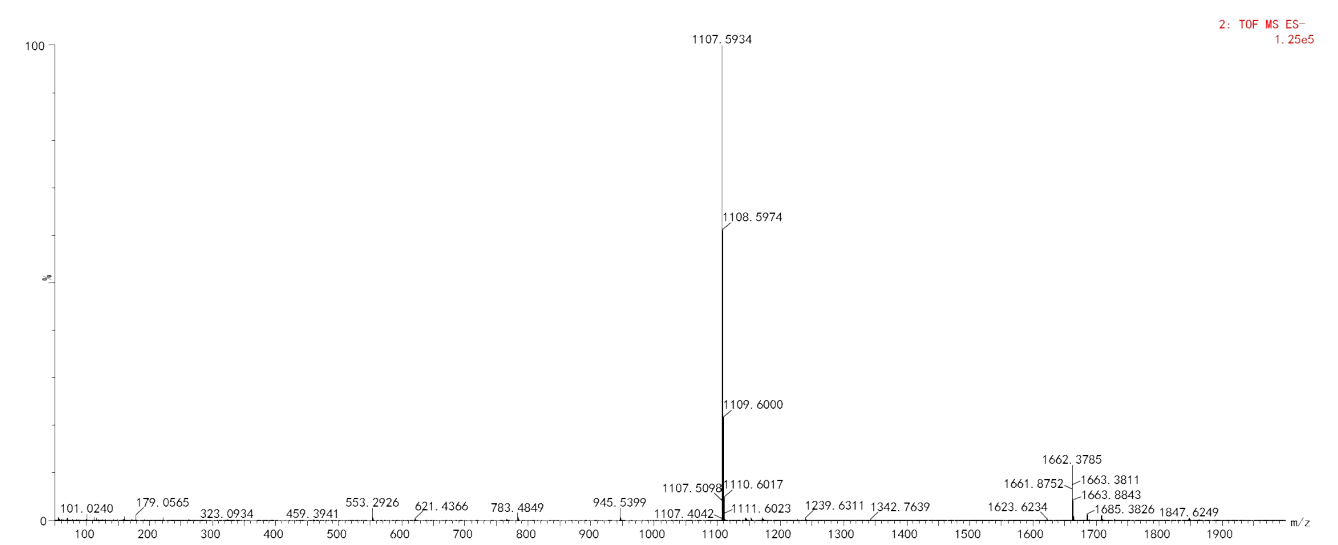


图3 人参皂苷 Rb₁的 MS/MS 谱图

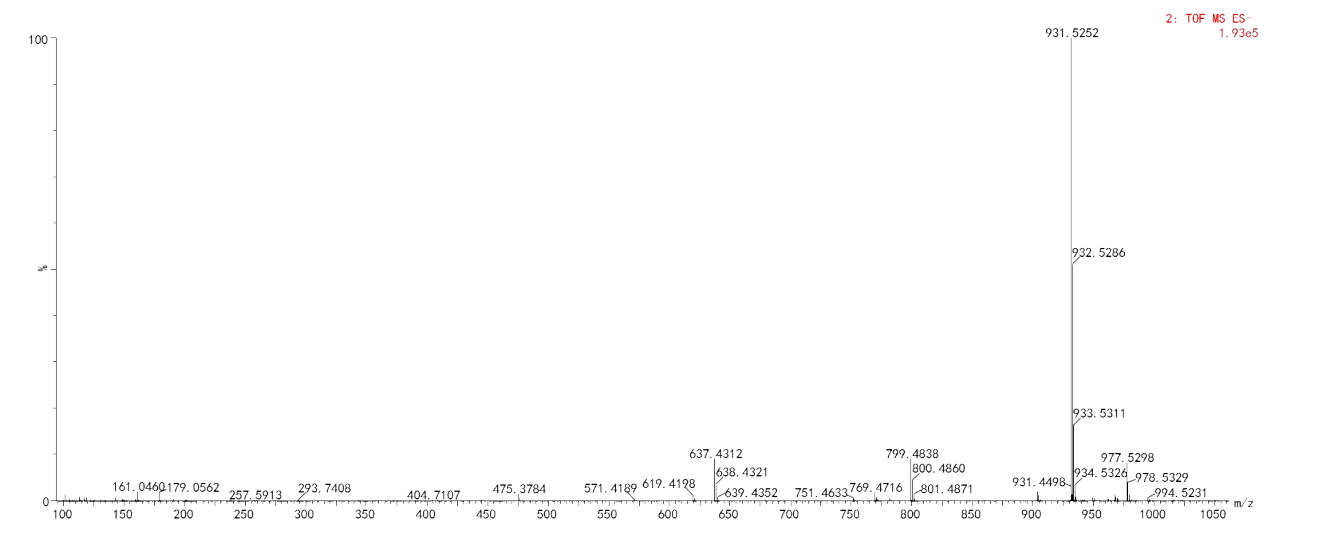


图4 三七皂苷 R₁的 MS/MS 谱图

原人参三醇型皂苷类化合物,以三七皂苷 R_1 为例,C-6位羟基由一分子葡萄糖与一分子木糖2→1位相连取代,C-20位羟基被一分子葡萄糖取代。在质谱中, $[M-H]^-$ m/z 931的分子离子连续丢失一分子木糖和两分子葡萄糖,形成 m/z 799、 m/z 637的碎片离子及 m/z 475的原人参三醇型皂苷元离子,进一步断裂C-17烷基支链失去84 Da,产生 m/z 391的碎片离子所得,碎片信息与文献数据一致,MS/MS谱图见图4。

3.1.2 氨基酸类

正离子模式下检测到三七素 $[M+H]^+$ m/z 177的分

子离子,丢失一分子 NH_3 和 H_2O 产生 m/z 160和159碎片离子, m/z 159碎片离子丢失一分子CO产生 m/z 131碎片离子, m/z 160碎片离子可发生重排并丢失一分子 CO_2 产生 m/z 116关键碎片离子,所得碎片信息与文献数据一致^[21],MS/MS谱图见图5。

3.1.3 黄酮类

正离子模式下检测到槲皮素 $[M+H]^+$ m/z 303的分子离子,可丢失一分子 H_2O 形成碎片 m/z 285碎片离子,继续丢失一个CO产生 m/z 257碎片离子^[22],所得碎片信息与文献数据一致,MS/MS谱图见图6。

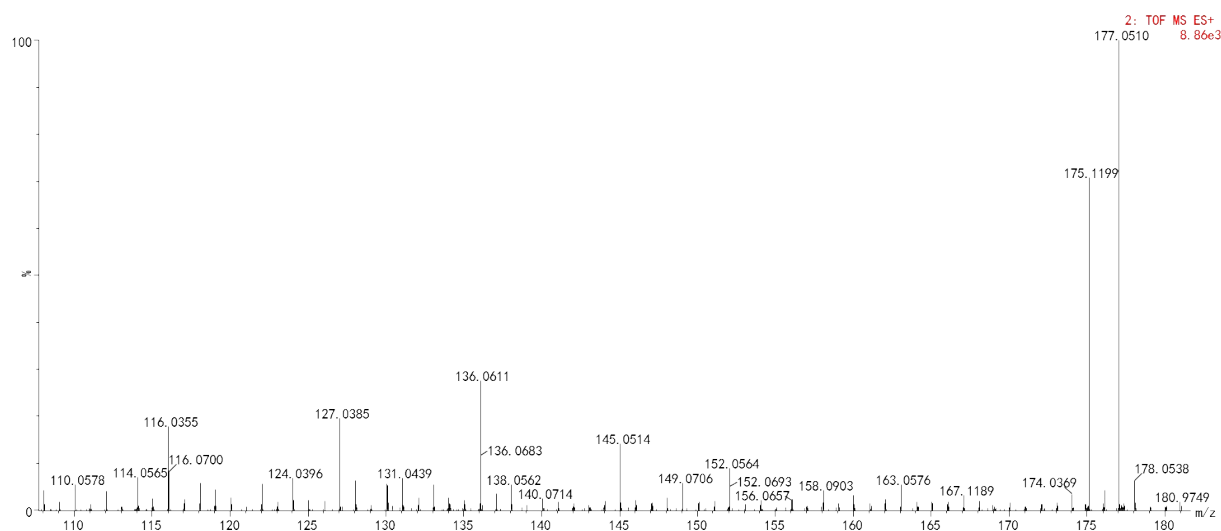


图5 三七素的MS/MS谱图

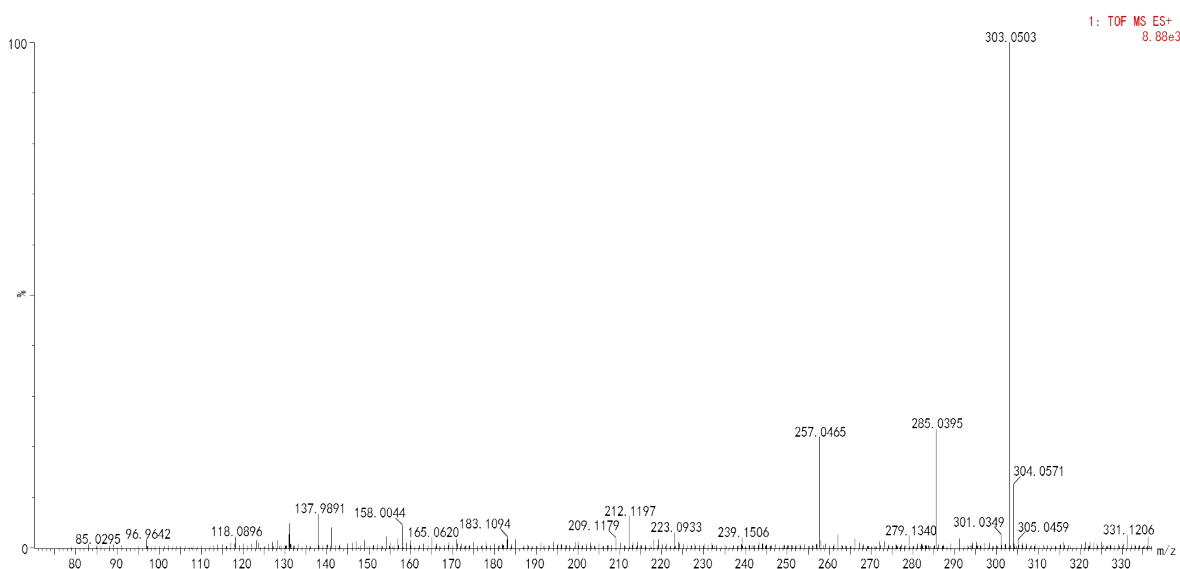


图6 槲皮素的MS/MS谱图

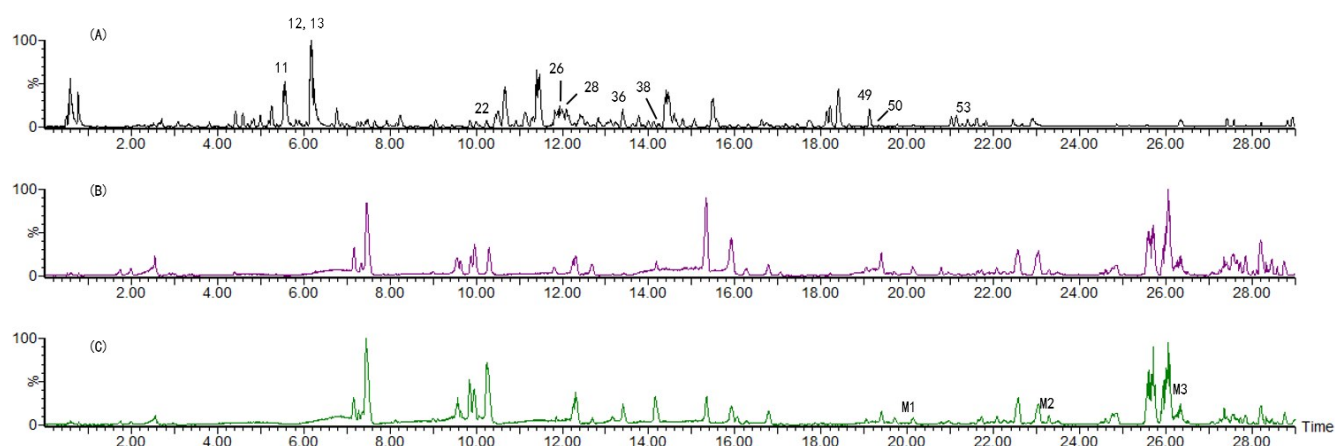


图7 负离子模式BPI色谱图

注:(A)三七粉;(B)空白血浆;(C)给药血浆

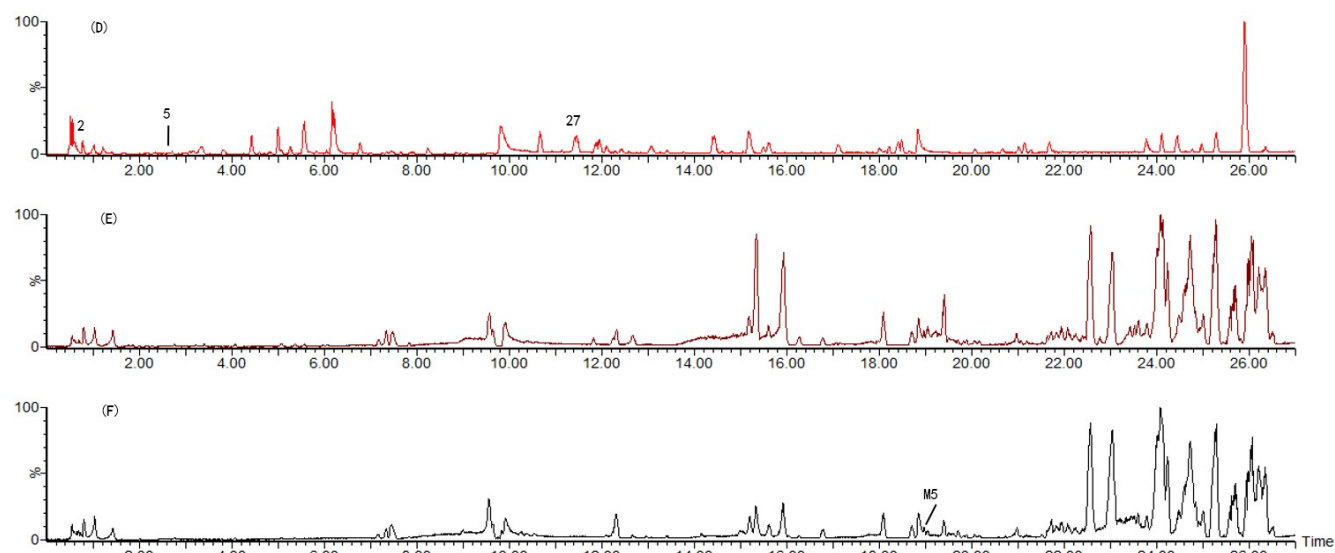


图8 正离子模式BPI色谱图

注:(D)三七粉;(E)空白血浆;(F)给药血浆

3.2 三七粉血浆样品分析

采用“2.5”项下优化的条件,对三七粉、大鼠空白血浆及给药血浆样品进行检测分析,负、正离子模式下,三七粉、大鼠空白血浆和给药血浆样品的BPI色谱图如图7、图8所示。按照“2.6”项下数据处理方法确定化学成分结构,在给予三七粉的大鼠血浆中共鉴定得到14个吸收原型药物成分和4个代谢物(表2-表3)。

3.2.1 三七粉血浆样品代谢物鉴定

吸收入血的原型药物成分在体内不同药物代谢酶的作用下,经过Ⅰ相和Ⅱ相代谢反应,原型成分的化学结构和精确质量数都会被改变。然而,绝大多数

代谢物仍然保留了其原型的结构特征,通过分析裂解规律来进行代谢物的鉴定。

M1在负离子模式下产生 $[M-H]^-$ m/z 475的分子离子及 m/z 391的碎片离子,形成84 Da的特征中性丢失,被鉴定为原人参三醇。M2的在质谱图中具有与M1一致的裂解行为,但其分子离子 $[M-H]^-$ m/z 473比M1小2 Da,推测为脱氢原人参三醇。

M3在负离子模式下显示 $[M-H]^-$ m/z 459的分子离子,失去84 Da产生了 m/z 375的碎片离子,质谱裂解行为与原人参三醇一致,因此被鉴定为原人参二醇。

M4在质谱图中显示 $[M+Na]^+$ m/z 645的分子离子,正离子模式下丢失一分子葡萄糖和一分子水,产生

表2 三七粉吸收入血原型成分LC-MS数据

No.	t _R (min)	Ion mode	Expected	Detected	Error (ppm)	Formula	MS/MS fragmentation	Identification
2	0.80	+	177.0511	177.0511	0.00	C ₅ H ₈ O ₅ N ₂	116,160,159,131	三七素
5	2.77	+	303.0505	303.0508	0.99	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	275,165	槲皮素
11 ^a	5.56	- [*]	977.5321	977.5303	-1.84	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931,799,637,475	三七皂苷 R ₁
12 ^a	6.18	- [*]	845.4899	845.489	-1.06	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799,637,475	人参皂苷 Rg ₁
13 ^a	6.19	- [*]	991.5478	991.5464	-1.41	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945,799,637,475	人参皂苷 Re
22	10.50	- [*]	1285.6 429	1285.6394	-2.72	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1239,1107,945,783,621,459	三七皂苷 Fa
26	11.40	- [*]	829.4937	829.4949	-1.45	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,637,475,329	人参皂苷 Rg ₂
27	11.83	+	639.4472	639.4417	-8.60	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	441,423,405	人参皂苷 Rh ₁
28	11.86	- [*]	1154.6006	1154.6073	5.80	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107,945,783,621,459	人参皂苷 Rb ₁
36	13.41	- [*]	683.4349	683.437	3.07	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	673,475	人参皂苷 F ₁
38 ^a	14.15	- [*]	991.5478	991.5460	-1.82	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945,783,621,459	人参皂苷 Rd
49	19.15	- [*]	829.4949	829.4927	-2.65	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,621,459	人参皂苷 F ₂
50	19.40	- [*]	829.4949	829.4963	1.69	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783,621,459	人参皂苷 Rg ₃
53	21.44	- [*]	811.4813	811.479	-2.83	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765,603	人参皂苷 Rk ₁

注:a:与标准品比对确证;^{*}:[M+HCOO]⁻

表3 三七粉大鼠血浆代谢物LC-MS数据

No.	t _R (min)	Ion mode	Expected	Detected	Error (ppm)	Formula	MS/MS fragmentation	Identification
M1	20.77	-	475.3787	475.3786	-0.21	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	457,391	原人参三醇
M2	23.56	- [*]	519.3686	519.3696	1.93	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	473,455,389	脱氢原人参三醇
M3	26.37	-	459.3838	459.3843	1.09	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	441,375	原人参二醇
M4	28.20	+ [#]	645.4343	645.4372	4.49	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	465,203	人参皂苷 C-K

注:^{*}:[M+HCOO]⁻; [#]:[M+Na]⁺

[M+Na-glc-H₂O]⁺ m/z 465 和 [glc+H₂O+Na]⁺ m/z 203 的碎片离子,经与文献比对鉴定为人参皂苷 C-K^[23]。

4 讨论

本研究中,采用UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS的技术方法,优化液相色谱、质谱分离检测条件,建立三七粉指纹谱分析所含化学成分,经与标准品和文献数据比对,分析其质谱裂解规律,结果在三七粉样品中共鉴定得到54个化学成分,以皂苷类化合物为主,包括原人参二醇皂苷类36个,原人参三醇皂苷类14个,黄酮类1个,糖类1个,氨基酸类1个和酯类化合物1个。

在三七粉化学成分研究的基础上,进一步建立给药血浆的血行指纹谱,通过比对三七粉、大鼠给药血浆及空白血浆样品的色谱图,筛选分析血中移行的原型药物成分及代谢物,结果在大鼠血浆中共鉴定得到

18个三七粉相关的外源性化合物,包括14个吸收原型药物成分和4个代谢物。吸收原型药物成分中原人参三醇皂苷类有6个分别为三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 F₁;原人参二醇皂苷类有6个,分别为人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、人参皂苷 F₂、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rk₁、三七皂苷 Fa;氨基酸类成分有1个为三七素;黄酮类成分有1个,为槲皮素。代谢物中原人参二醇和人参皂苷 C-K来源于原人参二醇型皂苷;原人参三醇和脱氢原人参三醇来源于原人参三醇型皂苷^[24]。在给药大鼠血浆中检测到的吸收原型成分及其代谢产物可能是三七粉潜在真正的活性成分,并与三七粉的药理作用直接相关,为后期课题组进行三七粉传统功效的作用机制研究奠定基础,它们作为三七粉最终的“效应成分”可作为其质量标志物的候选。

参考文献

1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科

技出版社, 2020.

- 2 杨娟, 袁一征, 尉广飞, 等. 三七植物化学成分及药理作用研究进展. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(10):1641-1647.
- 3 邢娜, 彭东辉, 张志宏, 等. 炮制对三七化学成分及药理作用影响的研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16):210-217.
- 4 Zhao J, He B, Zhang S, *et al.* Ginsenoside Rg1 alleviates acute liver injury through the induction of autophagy and suppressing NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Int J Med Sci*, 2021, 18(6): 1382-1389.
- 5 Luo M, Yan D, Sun Q, *et al.* Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4):2994-3004.
- 6 Kang N, Gao H, He L, *et al.* Ginsenoside Rb1 is an immune-stimulatory agent with antiviral activity against enterovirus 71. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266:113401.
- 7 Gao H, Kang N, Hu C, *et al.* Ginsenoside Rb1 exerts anti-inflammatory effects in vitro and in vivo by modulating toll-like receptor 4 dimerization and NF- κ B/MAPKs signaling pathways. *Phytomedicine*, 2020, 69:153197.
- 8 Zhu T, Xie W J, Wang L, *et al.* Notoginsenoside R1 activates the NAMPT-NAD(+) -SIRT1 cascade to promote postischemic angiogenesis by modulating Notch signaling. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140:111693.
- 9 Guo S, Xi X, Li J. Notoginsenoside R1: A systematic review of its pharmacological properties. *Pharmazie*, 2019, 74(11):641-647.
- 10 Xu C, Wang W, Wang B, *et al.* Analytical methods and biological activities of *Panax notoginseng* saponins: Recent trends. *J Ethnopharmacol*, 2019, 236:443-465.
- 11 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径. 中草药, 2018, 49(1):1-13.
- 12 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念. 中草药, 2016, 47(9):1443-1457.
- 13 赵鸿鹏, 许浚, 张洪兵, 等. 基于质量传递与溯源的中药质量标志物(Q-Marker)的发现策略及应用. 中草药, 2021, 52(9):2557-2565.
- 14 Lai C J, Tan T, Zeng S L, *et al.* An integrated high resolution mass spectrometric data acquisition method for rapid screening of saponins in *Panax notoginseng* (Sanqi). *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109: 184-191.
- 15 Zhang S, Ju Z, Guan H, *et al.* Dose-dependent exposure profile and metabolic characterization of notoginsenoside R1 in rat plasma by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(11):e4670.
- 16 赵静, 秦振娟, 彭冰, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究. 质谱学报, 2017, 38(1):97-108.
- 17 刘进怀, 王璇, 蔡少青, 等. 中药三七化学成分的HPLC/ESI-MS分析(英文). *J Chin Pharm Sci*, 2004(4):225-237.
- 18 Li X, Wang G, Sun J, *et al.* Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total panax notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional Chinese medicine (TCM) in rats. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(5):847-851.
- 19 Yang L, Xu S, Liu C, *et al.* In vivo metabolism study of ginsenoside Re in rat using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395:1441-1451.
- 20 宋玮, 郑伟, 张洁, 等. 中药皂苷类成分的体内代谢研究进展. 药理学, 2018, 53(10):1609-1619.
- 21 Ling K H, Jiang L A, Chan Y C. Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of underivatized dencichine (beta-N-oxalyl-L-alpha, beta-diaminopropionic acid) in *Panax* medicinal plant species. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(10):1237-1244.
- 22 李宇航, 戴海学, 汪明明, 等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析. 质谱学报, 2009, 30(6):374-378.
- 23 Zhu H, Shen H, Xu J, *et al.* Comparative study on intestinal metabolism and absorption in vivo of ginsenosides in sulphur-fumigated and non-fumigated ginseng by ultra performance liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometry based chemical profiling approach. *Drug Testing Anal*, 2015, 7:320-330.
- 24 宋玮, 郑伟, 张洁, 等. 中药皂苷类成分的体内代谢研究进展. 药理学, 2018, 53(10):1609-1619.

Study on the Serum Pharmacochemistry of *Radix Notoginseng* Powder

Liu Yaochen¹, Wang Degin², Zhang Hongbing^{3,4}, Guo Haibiao², Han Yanqi^{3,4},
Lin Juan², Zhang Tiejun^{3,4,5}, Xu Jun^{3,4,5}

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Guangzhou Baiyun Mountain Hutchison Whampoa Traditional Chinese Medicine Co. Ltd., Guangzhou 510515, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 4. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 5. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China)

Abstract: Objective To establish a method to recognize and classify the main chemical constituents and constituents absorbed into blood of *Radix Notoginseng* Powder accurately and rapidly by applying novel ultra-performance liquid chromatography tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). Methods ACQUITY UPLC® BEH C18 chromatographic column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was employed to UPLC analysis with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid acetonitrile–0.1% formic acid aqueous solution. ESI ion source was used to ensure the data collected in positive and negative ion mode. The chemical components in *Radix Notoginseng* powder and the transitional components in blood were quickly and accurately identified by comparing the retention time and mass spectrometry information with the reference substance, combined with the literature reports and the accurate molecular weight and mass spectrometry cracking law of the same or similar components in the mass spectrometry database. Results A total of 54 chemical components were identified, including 36 protopanaxadiol saponins, 14 protopanaxatriol saponins, 1 flavonoid, 1 carbohydrate, 1 amino acid and 1 ester. A total of 18 exogenous compounds related to *Radix Notoginseng* Powder were identified in the plasma of rats, including 14 absorbed prototype components and 4 metabolites. Conclusion The qualitative method established in this study could be used to rapidly and accurately identify the chemical constituents and constituents absorbed into blood of *Radix Notoginseng* Powder. This study clarified the transfer–transformation process of pharmacodynamic substances from in vivo to blood, and provided the basis for the determination of the quality marker and quality control of the *Radix Notoginseng* Powder. Lay the foundation for molecular mechanism research deeply.

Keywords: *Radix Notoginseng* Powder, UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS, Pharmacodynamic substances, Quality marker

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)