

人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 体外消化产物的 UHPLC-TSQ MS 分析

牛华周, 郭雨欣, 周婷, 李慧, 吴巍

(长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117)

摘要: 本研究采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱 (ultra-high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, UHPLC-TSQ MS) 法分析人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 在模拟唾液、胃液和肠液中的降解产物。在人参皂苷 Rb₁ 的消化产物中发现了 Rd、Rg₃、Rg₅、Rk₁, 其中在肠液中还发现了 F₂, 表明 F₂ 是肠液中特有的降解产物, 降解途径为 Rb₁→Rd→Rg₃→Rg₅/Rk₁, Rb₁→Rd→F₂。在人参皂苷 Rg₁ 的消化产物中发现了 F₁ 和 Rh₁, 降解途径为 Rg₁→F₁ 和 Rg₁→Rh₁。定量结果表明: 降解产物含量在消化液中随时间而变化; 在胃液中, Rg₃、Rd、Rg₅、F₁、Rh₁ 和 Rk₁ 的达峰时间分别为 1、2、4、2、2、4 h; 在肠液中, 7 种降解产物的达峰时间均为 4~6 h。另外, 皂苷在唾液中的降解较胃液和肠液温和, 而在胃肠道中的降解更广泛; 在消化过程中, Rg₁ 比 Rb₁ 更易降解。人参皂苷在消化道内会发生水解反应生成多种小分子皂苷, 为 Rb₁ 和 Rg₁ 开发和利用提供了重要的化学与生物学基础。

关键词: 超高效液相色谱-三重四极杆质谱 (UHPLC-TSQ MS); 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rg₁; 体外消化产物

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0800-10

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0079

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0079

Analysis of Ginsenosides Rb₁ and Rg₁ Digestion Products *in vitro* Based on UHPLC-TSQ MS

NIU Hua-zhou, GUO Yu-xin, ZHOU Ting, LI Hui, WU Wei

(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: A method of ultra-high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-TSQ MS) was used to study the products of protopanaxadiol ginsenoside Rb₁ and protopanaxatriol ginsenoside Rg₁ in simulated digestion solution *in vitro* for researching the digestion characteristics of ginsenoside. The result showed that ginsenoside Rd, Rg₃, Rg₅, and Rk₁ are found in the digestion products of ginsenoside Rb₁. In addition, ginsenoside F₂ is found in the simulated intestinal juice, suggesting that it is the peculiar degradation product. Therefore, the degradation pathways of ginsenoside Rb₁ are as follows: ginsenoside Rb₁→ginsenoside Rd→ginsenoside Rg₃→ginsenoside Rg₅/Rk₁, ginsenoside Rb₁→ginsenoside Rd→ginsenoside F₂. In the digestive fluids of Rg₁, both F₁ and Rh₁ are identified. The degradation pathways of ginsenoside Rg₁ are determined to be: ginsenoside Rg₁→ginsenoside F₁ and ginsenoside Rg₁→ginsenoside Rh₁. The results showed that the contents of degradation products in simulated saliva, simulated gastric juice

and simulated intestinal juice change with the digestion time. The digestion products ginsenoside Rd, Rg₃, Rg₅ and Rk₁ of ginsenoside Rb₁ are the highest after 2-6 h of simulated gastric juice digestion. Ginsenoside F₂ is only produced in simulated intestinal juice to digest, in simulated intestinal juice to digest after 4 h content to the maximum. In simulated intestinal fluid, the degradation products of ginsenosides Rb₁ and Rg₁ are the highest at 4-6 h of digestion. Ginsenoside Rg₁ is degraded in the mock digest to generate F₁ and Rh₁. Degradation products in simulated saliva, gastric juice and intestinal juice content gradually increased, in simulated gastric juice to digest its content reached the highest after 2 h. The degradation of ginsenosides in simulated saliva is milder compared to simulated gastric juice and simulated intestinal juice. However, the degradation products in simulated gastric juice are more abundant than in simulated intestinal juice. In the process of digestion, ginsenoside Rg₁ degrades more easily than Rb₁. Ginsenosides Rg₁ and Rb₁ are hydrolyzed in the digestive tract to produce a variety of small molecular saponins, which provide an important chemical and biological basis for the development and utilization of ginsenosides.

Key words: ultra-high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-TSQ MS); ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rg₁; products of digestion *in vitro*

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)为五加科植物人参干燥的根^[1], 人参皂苷为其主要的活性成分之一。根据苷元的不同, 人参皂苷可分为达玛烷型四环三萜类皂苷和齐墩果烷型皂苷^[2]。其中, 达玛烷型四环三萜类皂苷可分为二醇型人参皂苷(如人参皂苷 Rb₁、Rh₂、CK 和 Rg₃ 等)和三醇型人参皂苷(如人参皂苷 Rg₁、Rh₁、F₁ 和 Re 等)^[3]。在人参中, Rb₁ 和 Rg₁ 分别是含量较高的二醇型和三醇型人参皂苷^[4]。

皂苷类药物经口服后, 其成分在经过胃肠道时可能会受 pH 值、相关酶或微生物的影响, 导致种类和含量发生改变^[5]。研究表明^[6-9], 通常大分子人参皂苷(如 Re、Rb₁ 和 Rg₁ 等)在胃肠道中会消化生成极性较小的次级苷、苷元或其他代谢物, 如 Rg₅、Rg₃、Rh₁ 和 Rk₁ 等, 从而发挥药理作用。例如, 人参皂苷 Rh₁ 对肝损伤具有保护作用^[10]; 人参皂苷 Rg₃ 能够增加骨质疏松大鼠的骨密度, 改善肠道钙吸收^[10]; 人参皂苷 Rk₁ 可以减轻大鼠辐射所致的小肠损伤^[11]。因此, 探究人参皂苷在人体中的消化过程对揭示其作用机制具有重要意义。相较于体内消化研究, 体外模拟消化模型具有易操作、高可控性和稳定性等优点, 已成为探究人参皂苷消化过程的有力手段^[12]。人参皂苷药代动力学和代谢研究表明^[13-16], 单体皂苷在体外转化途径是脱糖过程, 但是由于二醇型和三醇型人参皂苷的糖苷键断裂方式不同, 其在胃肠道中的代谢途径存在差异。

高效液相色谱-质谱(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)技术具有较高的灵敏度、选择性和鉴定能力, 是鉴定人参皂苷代谢产物的有力手段^[15]。例如, Mi 等^[17]采用超高效液相色谱/离子淌度-四极杆飞行时间质谱(ultra-high-performance liquid chromatography/ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC/IM-QTOF MS)方法表征和比较不同提取物的人参皂苷组成, 在生物转化样品中鉴定出 248 种人参皂苷及代谢物。Chen 等^[18]应用超高效液相色谱-飞行时间质谱(ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-TOF MS/MS)技术研究亚洲人参和西洋参煎煮过程中三萜皂苷的动态变化, 高温蒸煮后可检出更多的稀有皂苷。

本工作拟采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UHPLC-TSQ MS)法对人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 在体外模拟消化过程中的消化产物进行定性和定量分析, 旨在研究其在机体内消化吸收特征和药效物质基础提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、TSQ 三重四极杆质谱仪、ST8R 型高速冷冻离心机: 美国 Thermo 公司产品; 超纯水机: 美国 Millipore 公司

产品; BT25S 型电子天平: 德国 Sartorius 公司产品; FDU-1100 冻干机: 宁波新芝生物科技股份有限公司产品; HH-4 型数显恒温水浴锅: 常州智博睿仪器制造有限公司产品; 恒温摇床: 金坛市盛威实验仪器公司产品; pH 计: 上海仪电科学仪器股份有限公司产品; 涡旋振荡器: 苏州捷美电子有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

人参皂苷 Rk₁、Rg₁、Rg₅、F₂、Rd、F₁、Rb₁、Rg₃ 和 Rh₁ 对照品: 纯度 > 97%, 源叶生物科技有限公司产品; 甲醇、乙腈、甲酸: 均为色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司产品; KCl: 国药集团化学试剂有限公司产品; NaCl(分析纯): 天津新通精细化工有限公司产品; CaCl₂(分析纯): 西陇化工股份有限公司产品; α -淀粉酶、酸性脂肪酶、胃蛋白酶和胰酶: 上海阿拉丁生物科技有限公司产品; 猪胆盐、NaHCO₃(分析纯): 源叶生物科技有限公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 Thermo Synchronis-C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm×1.7 μ m); 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸溶液; 二元线性梯度洗脱: 0~5 min(19%A), 5~25 min(19%~24%A), 25~70 min(24%~46%A), 70~77 min(46%~90%A), 77~80 min(90%A), 80~83 min(90%~19%A), 83~88 min(19%A); 进样量 2 μ L。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 负离子扫描模式, 喷雾电压 2.5 kV, 质量扫描范围 m/z 50~1 500, 雾化气温度 300 $^{\circ}$ C, 离子传输管温度 350 $^{\circ}$ C, 鞘气压强 35 MPa, 辅助气压强 10 MPa, 采用 Xcalibur 分析软件处理数据。

1.4 实验方法

1.4.1 标准品与对照品溶液的配制 精密称取各 1 mg Rk₁、Rg₁、Rg₅、F₂、Rd、Rb₁、F₁、Rk₁ 和 Rh₁ 于容量瓶中, 加入 1 mL 甲醇溶解并定容, 取 100 μ L 标准品溶液配制成 0.10 g/L 混合标准品溶液, 备用; 另取 1.0 g 人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 分别溶于 100 mL 超纯水中, 配制为 10 g/L 溶液, 备用。

1.4.2 消化液的配制 模拟唾液 (simulated saliva fluid, SSF) 的配制: 称取 1.13 g KCl、1.14 g NaHCO₃、0.12 g NaCl 和 0.17 g CaCl₂, 溶于 1.00 L 纯水中, 完全溶解后加入 1.00 g α -唾液淀粉酶调至 pH 7.0。

模拟胃液 (simulated gastric fluid, SGF) 的配制: 称取 1.65 g KCl、0.90 g NaHCO₃、4.65 g NaCl 和 0.26 g CaCl₂, 溶于 1.5 L 纯水中, 加入 1 mol/L HCl 调至 pH 2.0; 再加入 30 mL CH₃COONa(pH 5.0)、0.38 g 胃蛋白酶和 0.36 g 酸性脂肪酶, 再次加入 1 mol/L HCl 调至 pH 2.0。

模拟肠液 (simulated intestinal fluid, SIF) 的配制: 称取 4.59 g NaCl、0.56 g CaCl₂ 和 0.28 g KCl, 溶于 840 mL 纯水中, 加入 1.00 mol/L NaOH 调至 pH 7.5; 再加入 22.40 g 胆汁盐和 9.80 g 胰酶, 混匀, 加入 1.00 mol/L NaHCO₃(pH 5.0) 调至 pH 7.5。

1.4.3 人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 的消化过程 参考 Guo 等^[3] 的体外消化方法设计人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 的体外消化特征实验。

将 SSF 分别与人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁(10 g/L) 以 1:2 比例混合, 将其置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中振荡, 模拟口腔消化; 并分别于 0、10、20、30 min 取出 10 mL 混合物于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中使 α -淀粉酶失活; 取 3 份 1.5 mL 样品, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 过 0.22 μ m 滤膜, 取上清。

将剩余的人参皂苷模拟唾液消化溶液调至 pH 2.0, 与 SGF 按 1:1 比例混合, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中模拟消化; 并分别于 0、1、2、4 h 取出 12 mL 样品, 100 $^{\circ}$ C 灭活; 取 3 mL 样品, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 过 0.22 μ m 滤膜, 取上清。

利用 1 mol/L NaHCO₃ 溶液中和剩余的人参皂苷模拟胃液消化液溶液至 pH 7.0, 然后与 SIF 按 10:3 比例混合, 置于恒温摇床, 37 $^{\circ}$ C 模拟消化; 并分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 取出 12 mL 样品, 置于沸水中灭活; 再分别取 3.9 mL 样品, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 过 0.22 μ m 滤膜, 取上清。

1.4.4 消化产物样品的回收 将上清液浓缩, 按体积比 1:4 加入无水乙醇醇沉 24 h, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀, 挥干后加水复溶, 冻干; 用甲醇溶解冻干粉并定容至 1 mL, 稀释 10 倍后过 0.22 μ m 滤膜, 采用 UHPLC-TSQ MS 法进行成分分析和含量测定。

2 结果与讨论

2.1 人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 不同消化液中消化产物成分分析

2.1.1 人参皂苷 Rb₁ 在口腔、胃和肠模拟消化过程中结构变化分析 利用 UHPLC-TSQ MS 法

对体外模拟唾液、胃液和肠液消化 Rb₁ 产物进行鉴定, 分析其转化途径。在ESI⁻模式下, 质谱图中的准分子离子主要以[M-H]⁻和[M+HCOO]⁻形式存在, 对比标准品的分子离子质量和保留时

间, 对其进行初步鉴定; 通过质谱直接进样方法优化不同消化产物的离子化条件及碰撞能, 建立选择反应监测(SRM)方法进行定性、定量分析, 相关信息和推测结果列于表1。

表1 二醇型人参皂苷 Rb₁ 在模拟消化液中的消化产物数据(n=3)

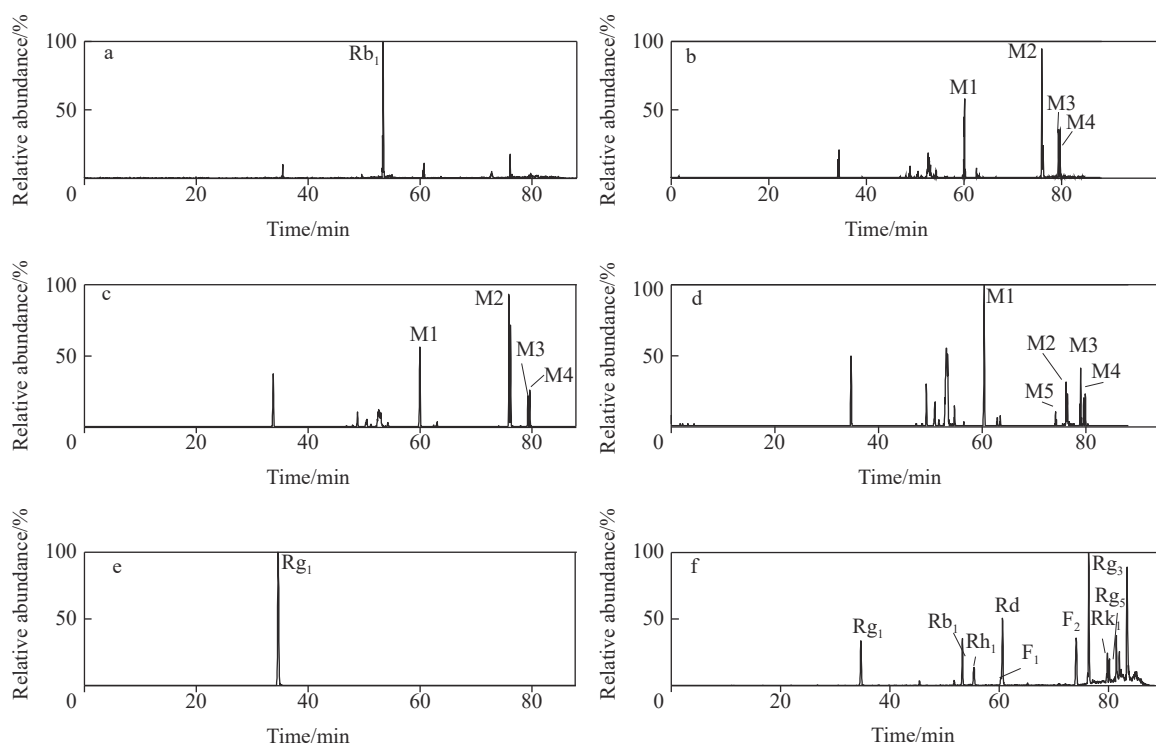
Table 1 Data of digestive products of protopanaxadiol ginsenoside Rb₁ in simulated digestive fluid (n=3)

序号 No.	化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	分子式 Molecular formula	[M-H] ⁻ /[M+HCOO] ⁻ (m/z)	碰撞能 Collision energy/eV	碎片离子 Fragment ion (m/z)	名称 Name
1	M1	60.35	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.41/991.39	30.78, 36.44, 59.33	783.33, 621.26, 59.33	Rd
2	M2	76.04	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.39/829.32	27.55, 35.38, 52.93	621.33, 459.31, 375.31	Rg ₃
3	M3	79.44	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.38/845.30	13.34, 25.12, 34.78	765.11, 603.25, 113.11	Rk ₁
4	M4	79.74	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.35/846.11	25.52, 33.71, 39.88	603.26, 71.28, 59.33	Rg ₅
5	M5	73.78	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.41/829.39	17.74, 27.24, 30.55	621.26, 119.13, 55.29	F ₂

人参皂苷 Rb₁ 在模拟消化液中消化产物和标准品的离子流图示于图1。可见, 在模拟唾液和胃液中检测出4个消化产物, 在肠消化液中检测出5个消化产物; 与模拟唾液和胃液中消化产物不同的是, 在肠消化液中检测出消化产物M5, 其相关质谱信息示于图2、3。在负离子模式下, 消化产物所产生的主要是[2M-H]⁻、[M+HCOO]⁻、

[M-H]⁻等离子峰, 二级质谱碎片离子主要包括[M-glc-H]⁻、[M-glc-glc-H]⁻, 可能同时伴随 m/z 较小的特征碎片离子。根据相关碎片离子信息, 结合标准品对 Rb₁ 的消化产物进行结构鉴定。

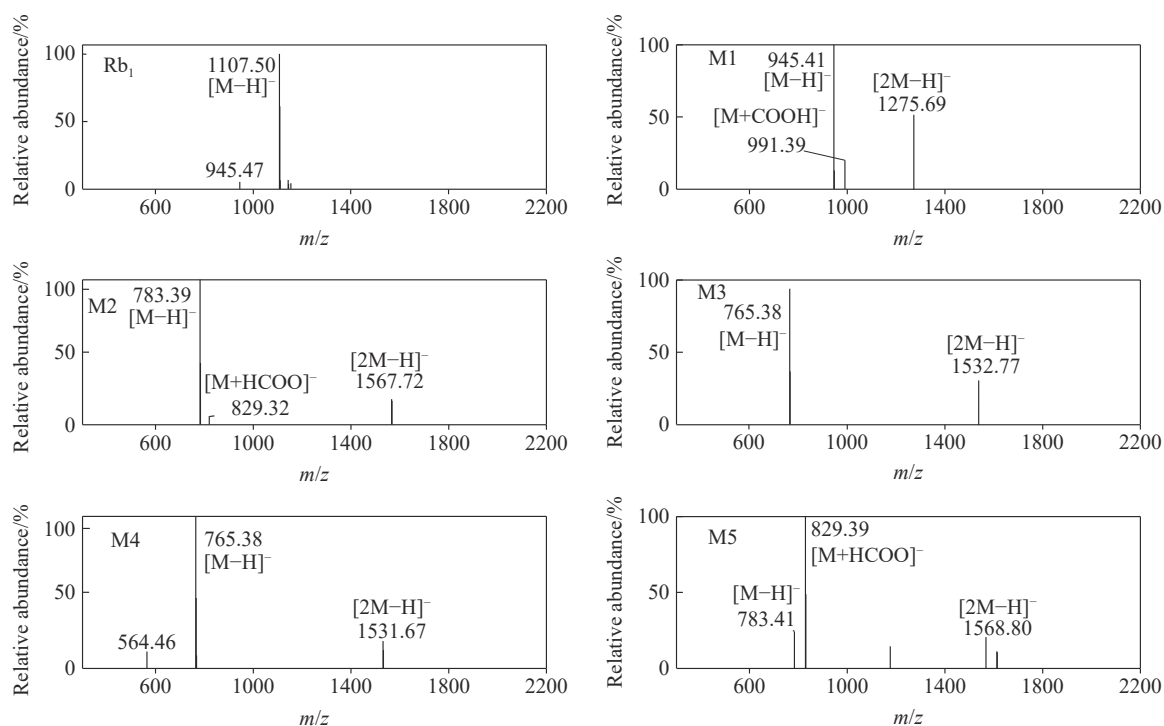
消化产物 M1(m/z 945.41[M-H]⁻、m/z 991.39[M+HCOO]⁻)的保留时间为60.01 min, 与人参皂苷 Rb₁ 相比分子质量减少162 u, 推测为 C₂₀ 位



注: a. 人参皂苷 Rb₁; b. 人参皂苷 Rb₁ 的模拟唾液消化产物; c. 人参皂苷 Rb₁ 的模拟胃液消化产物; d. 人参皂苷 Rb₁ 的模拟肠液消化产物; e. 人参皂苷 Rg₁; f. 混合标准品

图1 人参皂苷 Rb₁ 在消化液中的消化产物色谱图

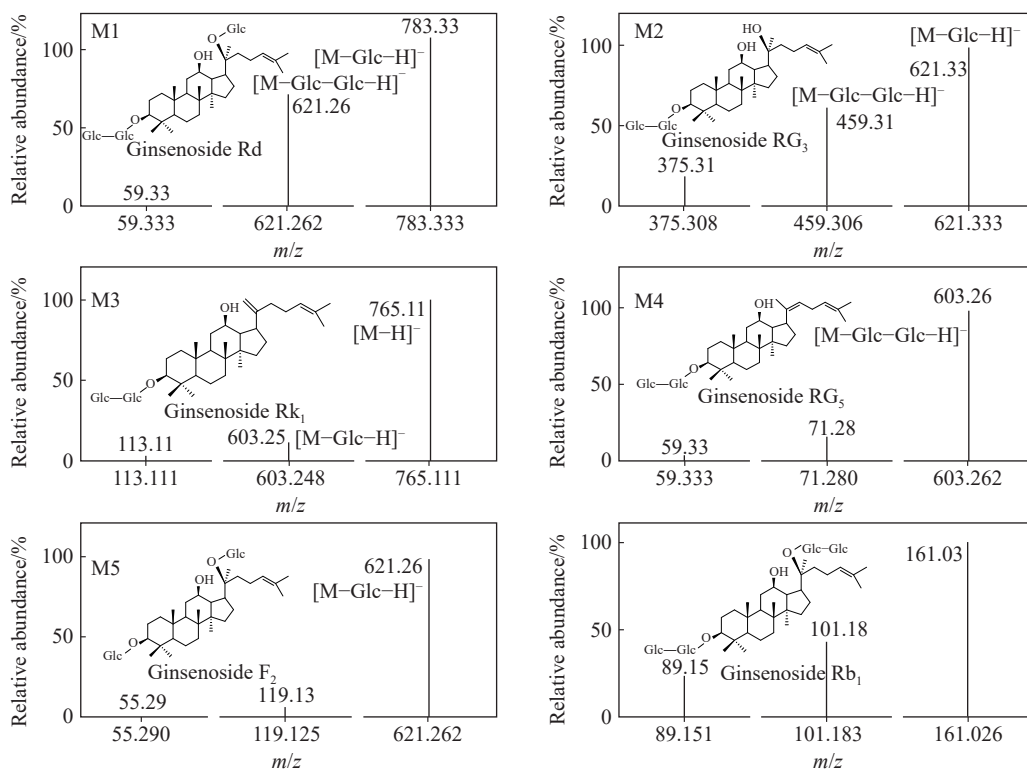
Fig. 1 Chromatograms of digestive products of ginsenoside Rb₁ in digestive fluid



注: M1~M5 分别为人参皂苷 Rd、Rg₃、Rk₁、Rg₅、F₂

图 2 人参皂苷 Rb₁ 及其消化产物 M1、M2、M3、M4 和 M5 的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of ginsenoside Rb₁ and its digestion products of M1, M2, M3, M4 and M5



注: M1~M5 分别为人参皂苷 Rd、Rg₃、Rk₁、Rg₅ 和 F₂

图 3 M1、M2、M3、M4、M5 和人参皂苷 Rb₁ 的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of M1, M2, M3, M4, M5 and Rb₁

糖苷键断裂脱去 1 分子葡萄糖生成人参皂苷 Rd, 且 M1 的二级质谱主要碎片离子有 m/z 783.33 [M-glc-H]⁻, m/z 621.26 [M-glc-glc-H]⁻ 和 m/z 59.33, 质谱数据与人参皂苷 Rd 一致, 确定其为人参皂苷 Rd。

消化产物 M2 (m/z 783.39 [M-H]⁻, m/z 829.32 [M+HCOO]⁻) 的保留时间为 76.04 min, M5 (m/z 783.41 [M-H]⁻, m/z 829.39 [M+HCOO]⁻) 的保留时间为 73.78 min, M2 的二级质谱主要碎片离子有 m/z 621.33、459.31、375.31, M5 的二级质谱主要碎片离子有 m/z 621.26、119.13、55.29, M2 和 M5 均比人参皂苷 Rb₁ 减少 324 u, 推测为人参皂苷 Rb₁ 的 C₂₀ 位糖苷键断裂脱去 1 分子葡萄糖生成人参皂苷 Rd, 然后人参皂苷 Rd 的 C₂₀ 或 C₃ 位糖

苷键断裂, 再次脱去 1 分子葡萄糖生成人参皂苷 Rg₃ 和 F₂。通过与人参皂苷 F₂ 和 Rg₃ 标准品的保留时间和质谱数据进行对比, 确定消化产物 M2 和 M5 分别为人参皂苷 Rg₃ 和 F₂。

消化产物 M3 (m/z 765.38 [M-H]⁻) 和 M4 (m/z 765.35 [M-H]⁻) 均比人参皂苷 F₂ 或 Rg₃ 少 18 u, M3 的二级质谱主要碎片离子有 m/z 603.25、113.11, M4 的二级质谱主要碎片离子有 m/z 603.26、71.28、59.33, 推测分别是由人参皂苷 Rg₃ 脱水缩合生成 Rk₁ 和 Rg₅。通过与标准品的保留时间和质谱信息对比, 确定消化产物 M3 和 M4 分别为人参皂苷 Rk₁ 和 Rg₅。

人参皂苷 Rb₁ 在消化过程中的转化途径示于图 4。

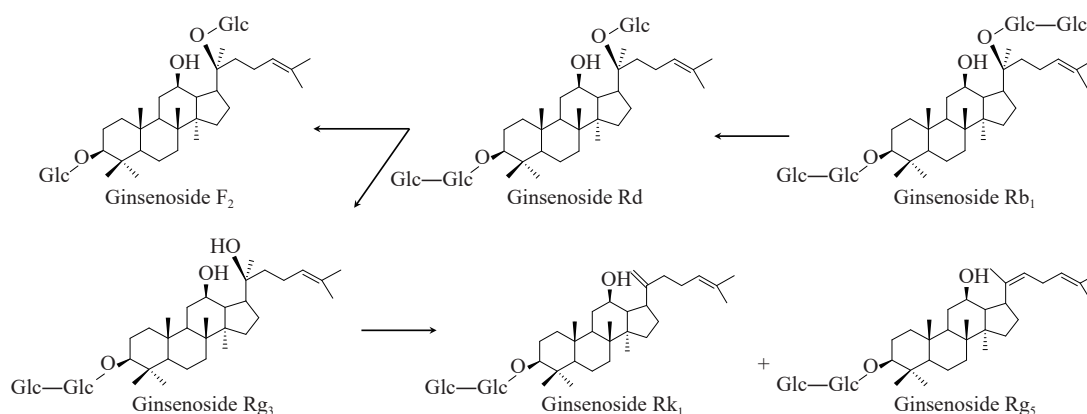


图 4 人参皂苷 Rb₁ 在模拟消化液中消化产物的产生途径

Fig. 4 Pathways of ginsenoside Rb₁ to produce digestive products in simulated digestive fluid

2.1.2 人参皂苷 Rg₁ 在模拟消化过程中的稳定性分析 利用 UHPLC-TSQ MS 技术检测人参皂苷 Rg₁ 在模拟唾液、胃液和肠液的消化产物, 分析鉴定其转化途径。Rg₁ 在模拟消化液中的消化产物和标准品的总离子流图示于 5a~5d, 在负离子模式下, 生成 2 个消化产物, 其质谱图示于图 5e~5h。

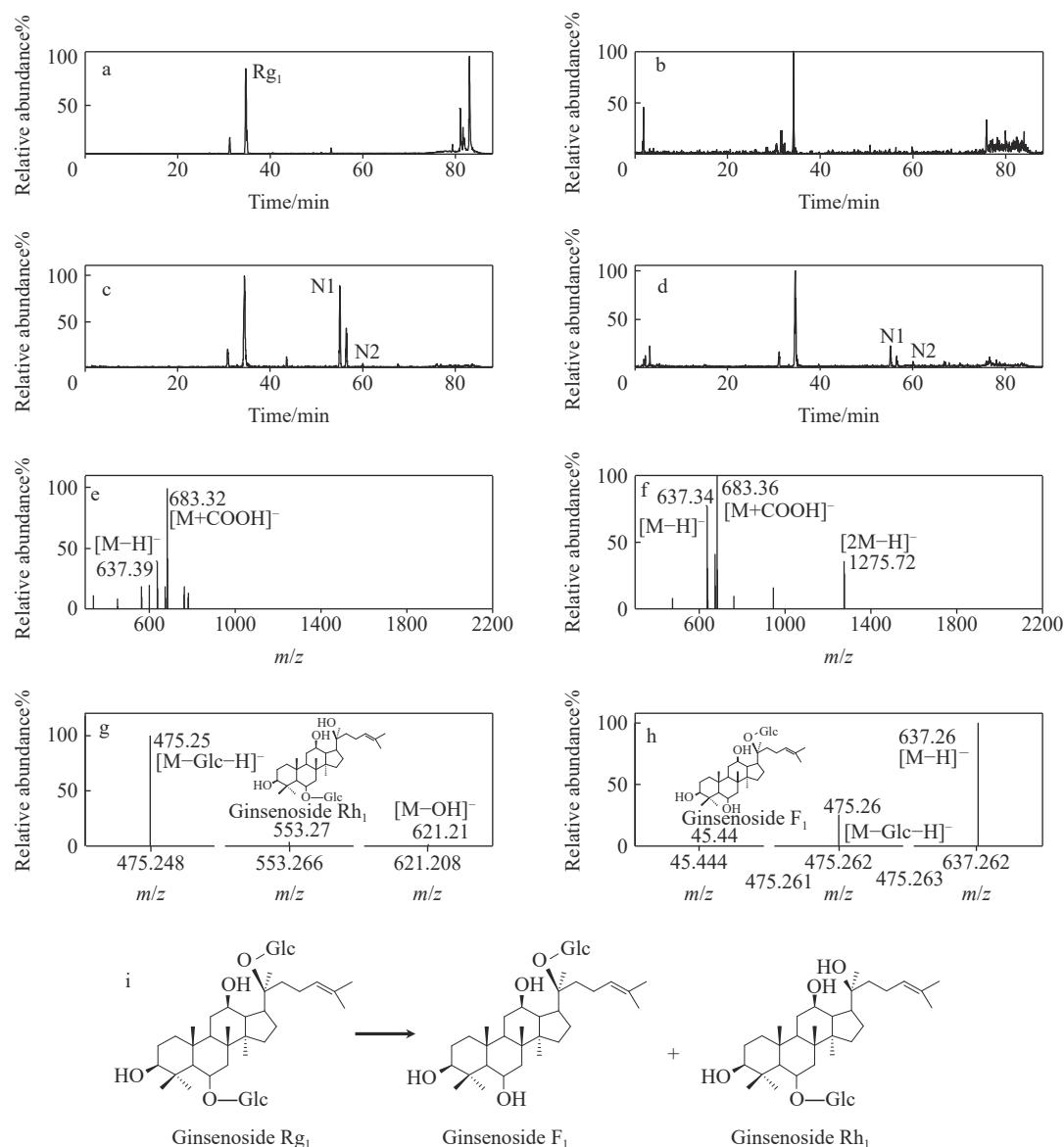
消化产物 N1 (m/z 637.34 [M-H]⁻, m/z 683.36 [M+HCOO]⁻) 和 N2 (m/z 637.46 [M-H]⁻, m/z 683.33 [M+HCOO]⁻) 的保留时间分别为 55.15、60.06 min, N1 和 N2 均比人参皂苷 Rg₁ 减少 162 u, 推测为人参皂苷 Rg₁ 的消化产物在 C₆ 或者 C₂₀ 位糖苷键断裂失去 1 分子葡萄糖, 生成人参皂苷 Rh₁ 或 F₁。其中, N1 的二级碎片离子有 m/z 621.21、553.27、475.25, N2 的二级碎片离子有 m/z 637.26、475.26、

45.44, 通过与标准品的保留时间和质谱信息进行对比, 确定消化产物 N1、N2 分别为人参皂苷 Rh₁ 和 F₁。人参皂苷 Rg₁ 在模拟消化液中的转化途径示于图 5i。

2.2 人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 在模拟消化过程中含量变化的分析

取 Rb₁、Rg₁、Rk₁、Rg₃、Rg₅、F₂、Rd、Rb₁、F₁ 和 Rh₁ 分别配制 1.0 g/L 标准品溶液, 进行梯度稀释后, 按 1.3 节方法进行测定, 以对照品质量浓度 (x) 为横坐标, 待测物峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归计算, 得到标准品的线性回归方程和相关系数, 并计算定量限与检出限, 所有样品平行测定 3 次, 结果列于表 2。

人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 的消化产物在模拟消化过程中的含量变化列于表 3。在唾液消化过程



注: a. Rg_1 标准品; b. 模拟唾液消化产物; c. 模拟胃液消化产物; d. 模拟肠液消化产物; e, g. 消化产物 N1; f, h. 消化产物 N2
 图 5 人参皂苷 Rg_1 在消化液中消化产物的总离子流图(a~d)、一级(e, f)和二级(g, h)质谱图及转化途径(i)
 Fig. 5 Total ion chromatograms (a-d), mass spectra (e, f), MS/MS spectra (g, h) and pathway (i) of digestive products of ginsenoside Rg_1 in simulated digestive fluid

中, 人参皂苷开始转化, 随着消化时间的增加, 人参皂苷 Rb_1 含量逐渐降低, Rd 含量逐渐增加。

从表 3 可见, 在消化液消化的过程中, 消化产物的含量变化呈现一定的波动性, 在模拟胃液消化 2 h 时, Rd 含量最高, 为 (7.63 ± 0.39) mg/L, 转化率约为 2.04%, 表明在消化过程中人参皂苷 Rd 逐渐转化为其他消化产物; 人参皂苷 Rg_3 在模拟肠液消化 6 h 后的含量最高, 为 (22.3 ± 0.49) mg/L, 转化率约为 5.95%, 其含量呈现一定的波动性, 表明人参皂苷 Rg_3 在此消化过程中生

成了人参皂苷 Rg_5 和 Rk_1 。

人参皂苷 F_2 在肠模拟消化液中生成, 肠液模拟消化 4 h 后的含量最高, 为 (12.43 ± 0.24) mg/L, 转化率约为 3.32%; 人参皂苷 Rg_5 在肠消化 6 h 后的含量到达峰值, 为 (6.98 ± 0.38) mg/L, 其转化率约为 1.97%; 人参皂苷 Rk_1 在胃液模拟消化 4 h 后的含量最高, 为 (12.81 ± 0.44) mg/L, 其转化率约为 3.53%。人参皂苷 Rg_5 和 Rk_1 含量发生变化, 可能由于消化过程人参皂苷的结构发生变化是一个动态、可逆的过程。

表2 人参皂苷及其消化产物的回归方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限

Table 2 Regression equation, correlation coefficient, linear range, the limit of detection and the limit of quantification of ginsenosides and its digestive products

序号 No.	人参皂苷 Ginsenoside	线性范围 Linear range/(mg/L)	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	定量限 LOQ/ (mg/L)	检出限 LOD/ (mg/L)
1	Rg ₁	5~100	$y=2.98 \times 10^6 x + 3.73 \times 10^6$	0.992	0.76	0.23
2	Rb ₁	5~100	$y=7.49 \times 10^6 x + 5.70 \times 10^6$	0.995	0.04	0.01
3	Rd	1~100	$y=9.61 \times 10^6 x + 2.18 \times 10^7$	0.990	0.21	0.05
4	Rg ₃	5~100	$y=8.00 \times 10^6 x + 6.32 \times 10^7$	0.991	0.25	0.04
5	Rk ₁	5~100	$y=1.47 \times 10^6 x + 1.05 \times 10^7$	0.994	0.15	0.03
6	Rg ₅	5~100	$y=2.90 \times 10^6 x + 1.55 \times 10^7$	0.991	0.04	0.01
7	F ₂	1~100	$y=4.49 \times 10^6 x + 1.23 \times 10^7$	0.992	0.06	0.01
8	Rh ₁	5~100	$y=1.07 \times 10^6 x + 1.14 \times 10^7$	0.995	5.00	1.00
9	F ₁	10~100	$y=1.32 \times 10^4 x - 2.11 \times 10^3$	0.996	6.40	2.15

表3 模拟消化人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 及其消化产物的变化Table 3 Ginsenosides Rb₁ and Rg₁ and their simulated digestion products

消化过程 Digestive process	消化时间 Digestion time/h	人参皂苷Rb ₁ 及消化产物 Ginsenoside Rb ₁ and digestion products/ (mg/L)					人参皂苷Rg ₁ 及消化产物 Ginsenoside Rg ₁ and digestion products/ (mg/L)			
		Rb ₁	Rd	Rg ₃	F ₂	Rk ₁	Rg ₅	Rg ₁	F ₁	Rh ₁
未消化	—	374.88±3.39	—	3.63±0.15	—	4.23±0.22	0.81±0.13	331.35±1.61	6.84±0.91	1.04±0.21
唾液消化	1/6	390.25±2.32	2.17±0.13	5.07±0.16	—	4.71±0.21	0.37±0.02	322.44±3.22	7.17±0.45	3.98±0.84
	1/3	300.22±3.43	4.99±0.33	8.82±0.43	—	4.06±0.32	2.27±0.21	305.80±2.11	8.19±0.65	6.38±0.73
	1/2	270.98±2.49	5.11±0.27	20.17±0.29	—	3.80±0.19	3.29±0.31	304.50±1.97	14.00±1.37	9.06±0.61
胃液消化	1	253.52±2.56	7.18±0.37	44.20±0.29	—	5.00±0.27	4.38±0.24	190.72±2.39	75.88±0.27	57.96±1.76
	2	245.52±2.18	7.63±0.39	4.69±0.25	—	3.32±0.18	2.66±0.21	177.09±1.48	82.11±1.25	65.91±2.89
	3	239.51±3.10	6.23±0.41	3.95±0.34	—	1.57±0.26	2.01±0.13	175.99±2.89	74.29±0.79	62.61±1.44
	4	234.55±2.51	5.04±0.38	11.05±0.51	—	12.81±0.44	8.79±0.41	170.52±1.81	49.16±0.14	42.12±1.05
肠液消化	1	229.41±2.79	3.49±0.24	5.94±0.31	8.10±0.26	1.43±0.13	1.37±0.14	198.39±1.64	47.72±0.17	24.24±2.27
	2	223.71±1.97	2.10±0.15	0.72±0.47	0.83±0.12	2.14±0.26	1.33±0.08	189.79±2.74	46.53±0.41	21.13±0.97
	3	216.67±2.09	1.64±0.13	1.06±0.21	3.23±0.31	1.49±0.24	1.40±0.11	184.62±2.14	40.26±0.40	20.18±1.25
	4	210.56±1.99	4.35±0.21	5.45±0.32	12.43±0.24	1.45±0.30	1.51±0.19	183.95±1.70	48.97±1.71	23.91±1.61
	5	199.47±2.01	5.92±0.44	6.77±0.48	11.71±0.41	2.17±0.22	1.56±0.33	183.29±1.98	55.05±0.69	28.71±1.95
	6	174.73±1.36	6.64±0.32	22.3±0.49	11.49±1.79	9.54±0.35	6.98±0.38	181.66±2.32	45.75±1.12	22.97±0.71

人参皂苷 Rg₁ 在模拟消化过程中生成了人参皂苷 F₁ 和 Rh₁。在模拟唾液和胃液中, 人参皂苷 Rg₁ 脱去 C₂₀ 的葡萄糖转化为人参皂苷 Rh₁, 其含量逐渐增加。在模拟胃液消化 2 h 时, 人参皂苷 F₁ 含量最高, 为 (82.11±1.25) mg/L, 转化率约为 24.86%; 人参皂苷 Rh₁ 在口腔和胃模拟消化过程中的含量逐渐增加, 在胃液消化 2 h 后的含量达到最高, 为 (65.91±2.89) mg/L, 转化率约为

19.91%; 在肠模拟消化液中, 人参皂苷 F₁ 和 Rh₁ 含量逐渐降低, 表明有新的消化产物生成。

3 结论

本研究采用 UHPLC-TSQ MS 技术系统地分析了二醇型人参皂苷 Rb₁ 和三醇型人参皂苷 Rg₁ 在体外模拟消化过程中的转化产物及其含量变化。研究发现, 人参皂苷 Rb₁ 在模拟唾液和

胃液的消化过程中, C₂₀ 位糖苷键逐级断裂, 生成人参皂苷 Rd 和 Rg₃, 随后 C₂₀ 位发生脱水反应形成不同位置的双键, 生成人参皂苷 Rg₅ 和 Rk₁。在肠液中, C₃ 位糖苷键水解生成 F₂。模拟胃液中的酸性环境使消化产物 Rd、Rg₃、Rg₅ 和 Rk₁ 含量最高, 表明在酸性条件下, C₂₀ 位糖苷键易水解生成次级苷或苷元, 产物种类丰富^[19]。相比之下, 模拟肠液可促使 C₃ 位糖苷键水解生成次级苷。

在人参皂苷 Rg₁ 的转化过程中, 模拟消化液中生成了人参皂苷 Rh₁ 和 F₁, 监测其含量变化发现, 尽管母核相同, 取代基不同仍使得这些化合物在消化液中的稳定性存在差异。例如, 在酸性条件下, C₆ 和 C₂₀ 位糖苷键更易水解, 生成小分子人参皂苷 Rh₁ 和 F₁。然而在肠液中, Rh₁ 和 F₁ 含量降低, 表明肠液对 C₆ 和 C₂₀ 位糖苷键的水解能力较弱, 同时 Rh₁ 和 F₁ 可能在肠液中进一步降解为皂苷苷元^[20]。综上, 人参皂苷在胃肠道中通过脱糖反应生成小分子皂苷, 促进其在胃肠道的吸收并增强药理作用。

本实验以人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 为代表, 研究了人参皂苷在体外消化液中的消化过程, 揭示了其在不同消化液中的转化途径, 这不仅为人参皂苷的药物开发与应用提供了理论支持, 也为进一步研究其在体内的生物利用度和药理活性奠定了基础。

参考文献:

- [1] LI X, CHU S, LIN M, GAO Y, LIU Y, YANG S, ZHOU X, ZHANG Y, HU Y, WANG H, CHEN N. Anticancer property of ginsenoside Rh₂ from ginseng[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 203: 112-112-630.
- [2] ONG W Y, FAROOQUI T, KOH H L, FAROOQUI A A, LING E A. Protective effects of ginseng on neurological disorders[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2015, 7: 129.
- [3] GUO D, LEI J, HE C, PENG Z, LIU R, PAN X, MENG J, FENG C, XU L, CHENG Y, CHANG M, GENG X. *In vitro* digestion and fermentation by human fecal microbiota of polysaccharides from *Clitocybe squamulose*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208(7): 343-355.
- [4] 李忆红, 梁雨璐, 解嘉琪, 王灿, 黄建梅. 中药皂苷类化合物生物转化研究进展[J]. *中草药*, 2024, 55(3): 989-1003.
- [5] LI Yihong, LIANG Yulu, XIE Jiaqi, WANG Can, HUANG Jianmei. Research progress on biotransformation of saponins from traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2024, 55(3): 989-1003(in Chinese).
- [6] BAE E A, HAN M J, KIM E J, KIM D H. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh₂ by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2004, 27(1): 61-67.
- [7] 陈思键, 吴冬雪, 刘淑莹, 赵幻希, 修洋. 人参皂苷化学转化与生物转化研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(5): 1539-1545.
- [8] CHEN Sijian, WU Dongxue, LIU Shuying, ZHAO Huanxi, XIU Yang. Research progress on chemical transformation and biotransformation of ginsenoside[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(5): 1539-1545(in Chinese).
- [9] 张琰, 李方形, 韩铭鑫, 郑飞, 越皓. 通过 RRLC-Q-TOF MS 和 UPLC-QQQ MS 分析原人参三醇型皂苷在人肠道菌群中的代谢产物[J]. *质谱学报*, 2020, 41(1): 66-75.
- [10] ZHANG Yan, LI Fangtong, HAN Mingxin, ZHENG Fei, YUE Hao. Analysis of metabolites of protopanaxatriol saponins in human intestinal flora by RRLC-Q-TOF MS and UPLC-QQQ MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2020, 41(1): 66-75(in Chinese).
- [11] LI F, ZHANG M, CAI Y, WU Y, WANG Y, LUO J, PI Z, DAI Y, ZHENG F, YUE H. Total ginsenoside wild ginseng root improves spleen qi deficiency by regulating intestinal microbes and flora metabolites[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2023, 16(11): 105232-105249.
- [12] 韩冰, 李静娜, 吕西雨, 陈明月, 杜德峰, 李菲, 张超. 肠道菌群代谢转化中药皂苷类成分研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6922-6932.
- [13] HAN Bing, LI Jingna, LV Xiyu, CHEN Mingyue, DU Defeng, LI Fei, ZHANG Chao. Research progress on metabolic transformation of traditional Chinese medicine saponins by intestinal flora[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, 54(20): 6922-6932(in Chinese).
- [14] 周红, 张亚维, 张堃, 白登彦. 人参皂苷 Rg₃ 对骨质疏松大鼠骨代谢及肠钙吸收功能的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2024, 49(2): 141-146.
- [15] ZHOU Hong, ZHANG Yawei, ZHANG Kun, BAI Dengyan. Effects of Ginsenoside Rg₃ on bone metabolism and intestinal calcium absorption in osteo-

- porosis rats[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2024, 49(2): 141-146(in Chinese).
- [11] LIU R, GAO Y, YUAN Y, WU Q, ZHI Z, MUHINDO E M, WU T, SUI W, ZHANG M. Transformation of ginsenosides by moderate heat-moisture treatment and their cytotoxicity toward HepG2 cells[J]. Food Research International, 2022, 156: 111 155-111 165.
- [12] KIM E O, CHA K H, LEE E H, KIM S M, CHOI S W, PAN C H, UM B H. Bioavailability of ginsenosides from white and red ginsengs in the simulated digestion model[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(41): 10 055-10 063.
- [13] BECCARIA M, CABOOTER D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis[J]. The Analyst, 2020, 145(4): 1 129-1 157.
- [14] BI Y, LI Q, TAO W, TANG J, YOU G, YU L. Ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rh₁ prevent liver injury induced by acetaminophen in mice[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(8): 13 816-13 830.
- [15] 高月, 修洋, 赵幻希, 刘淑莹. 基于 HPLC-ESI-MSⁿ 的杂多酸化学转化原人参三醇型皂苷 Re, 20(S)-Rf 研究[J]. 质谱学报, 2017, 38(2): 203-210.
GAO Yue, XIU Yang, ZHAO Huanxi, LIU Shuying. Chemical transformation of protopanaxatriol-type ginsenosides Re and 20(S)-Rf by heteropoly acid based on HPLC-ESI-MSⁿ analysis[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(2): 203-210(in Chinese).
- [16] 周中流, 李春燕, 陈林浩, 杨雅琳, 尹文清, 刘斌. 天然产物皂苷类化合物生物转化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 173-192.
ZHOU Zhongliu, LI Chunyan, CHEN Linhao, YANG Yalin, YIN Wenqing, LIU Bin. Biotransformation of natural saponins[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(16): 173-192(in Chinese).
- [17] MI Y, XU X, HONG L, JIANG M, CHEN B, LI X, WANG H, ZOU Y, ZHAO X, LI Z, GUO D, YANG W. Comparative characterization of the ginsenosides from six *Panax* herbal extracts and their *in vitro* rat gut microbial metabolites by advanced liquid chromatography-mass spectrometry approaches[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(24): 9 391-9 403.
- [18] CHEN L, ZHANG Y, YANG X, XU J, WANG Z, SUN Y, XU W, WANG Y. Application of UPLC-Triple TOF-MS/MS metabolomics strategy to reveal the dynamic changes of triterpenoid saponins during the decocting process of Asian ginseng and American ginseng[J]. Food Chemistry, 2023, 424: 136 425-136 436.
- [19] 沈慧玲, 杨树江, 王可. 人参中稀有皂苷转化工艺研究进展[J]. 食品安全导刊, 2023(12): 172-174.
SHEN Huiling, YANG Shujiang, WANG Ke. Study on the transformation technology of rare ginsenosides in *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. China Food Safety Magazine, 2023(12): 172-174(in Chinese).
- [20] 袁松竹, 王斌, 周旋, 赵升铭, 王义, 雷军, 陈屏. 稀有人参皂苷生物转化的研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 480-489.
YUAN Songzhu, WANG Bin, ZHOU Xuan, ZHAO Shengming, WANG Yi, LEI Jun, CHEN Ping. Research progress on the biotransformation of rare ginsenosides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 480-489(in Chinese).

(收稿日期: 2024-05-17; 修回日期: 2024-07-22)