

# 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

张 琰, 李方形, 韩铭鑫, 郑 飞, 越 皓

(长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117)

**摘要:**通过高分离度快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF MS)和超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UPLC-QQQ MS)法对原人参三醇型皂苷 Re、R<sub>G1</sub>、R<sub>G2</sub>、Rh<sub>1</sub>、R<sub>f</sub>、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 在人肠道菌群中的转化产物进行定性、定量分析,确定原人参三醇型皂苷的代谢产物、转化途径和 60 h 时的转化率。结果表明,人参皂苷 Re 的转化产物为人参皂苷 R<sub>G1</sub>、R<sub>G2</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub> 和 PPT,转化率为 91%;人参皂苷 R<sub>G1</sub> 的转化产物为人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub> 和 PPT,转化率为 80%;人参皂苷 R<sub>G2</sub> 的转化产物为人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 和 PPT,转化率为 73%;人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 和 F<sub>1</sub> 主要通过 PPT 代谢,转化率分别为 82%和 81%;人参皂苷 R<sub>f</sub> 的转化产物为人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 和 PPT,转化率为 89%;三七皂苷 R<sub>1</sub> 的转化产物为人参皂苷 R<sub>G1</sub>、R<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub> 和 PPT,转化率为 79%。原人参三醇型皂苷类成分可被人肠道菌群代谢,主要通过丢失糖残基形成转化产物,而次级皂苷和苷元是人参在体内发挥药理作用的物质基础。

**关键词:**原人参三醇型皂苷;人肠道菌群;生物转化;高分离度快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF MS);超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UPLC-QQQ MS)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2020)01-0066-10

doi:10.7538/zpxb.2019.0046

## Analysis of Metabolites of Protopanaxatriol Saponins in Human Intestinal Flora by RRLC-Q-TOF MS and UPLC-QQQ MS

ZHANG Yan, LI Fang-tong, HAN Ming-xin, ZHENG Fei, YUE Hao

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

**Abstract:** Ginseng is popular among scholars at home and abroad, it is an important and widely used herbal medicine in Asia and western countries. Ginseng mainly contains ginsenosides, polysaccharides and amino acids. Ginsenoside is the main active ingredient of ginseng and has many pharmacological activities, it is mainly divided into two types

收稿日期:2019-04-10;修回日期:2019-06-05

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1702105);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20181270KJ);吉林省科技发展计划项目(20180311019YY)资助

作者简介:张 琰(1995—),女(汉族),吉林长春人,硕士研究生,药物分析专业。E-mail: 1073015393@qq.com

通信作者:郑 飞(1987—),女(汉族),吉林长春人,助理研究员,从事中药分析与肠道菌群研究。

E-mail: zhengfei@ccucm.edu.cn

越 皓(1977—),男(汉族),吉林长春人,研究员,从事药物分析研究。E-mail: jlsrskxyjy@126.com

according to its structure: protopanaxadiol (PPD) and protopanaxatriol (PPT). Ginseng products are usually administered orally, studies have shown that ginsenosides have low oral bioavailability and metabolized into secondary glycosides in the gastrointestinal tract to play its pharmacological role. In order to discover the metabolites of protopanaxatriol saponins in human intestinal flora, ginsenoside Re, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rf, F<sub>1</sub>, R<sub>1</sub> were incubated in bacterial solution, the identification and quantification of metabolites of protopanaxatriol ginsenosides were determined by using rapid resolution liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF MS) and ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QQQ MS). As a result, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> and PPT are transformation products of ginsenoside Re, with the conversion rate of 91%. Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> and PPT are transformation products of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, and the conversion rate is 80%. Ginsenoside Rh<sub>1</sub> and PPT are transformation products of ginsenoside Rg<sub>2</sub>, and the conversion rate is 73%. Ginsenoside Rh<sub>1</sub> and F<sub>1</sub> are mainly metabolized by PPT, the conversion rate is 82% and 81%, respectively. Ginsenoside Rh<sub>1</sub> and PPT are products of ginsenoside Rf, and the conversion rate is 89%. Ginsenoside Rg<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub> and PPT are conversion products of notoginsenoside R<sub>1</sub>, the conversion rate is 79%. The study suggested that protopanaxatriol ginsenosides can be metabolized by human intestinal flora, the transformation products are mainly formed by the loss of glucose residues, it is revealed that secondary ginsenoside is the material basis of pharmacological action *in vivo*.

**Key words:** Protopanaxatriol; human intestinal microflora; transformation; rapid resolution liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF MS); ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QQQ MS)

人参是五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根, 主要含有人参皂苷、多糖、氨基酸等成分。其中, 人参皂苷是人参的主要活性成分, 按照其化学结构可分为原人参二醇型皂苷(PPD)和原人参三醇型皂苷(PPT), 其中, 原人参三醇型皂苷 Re、Rg<sub>1</sub> 和原人参二醇型皂苷 Rb<sub>1</sub> 是药典和国家标准的定量检测指标。

原人参三醇型人参皂苷的结构示于图 1, 主要包括 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rf、Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub>, 具体化学结构信息列于表 1。其中, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rf、Rh<sub>1</sub> 和 F<sub>1</sub> 互为同分异构体, 区别在于葡萄糖的连接位置。

人参皂苷口服生物利用度较低, 在胃肠道内被代谢为次级糖苷来发挥药理作用。研究表明<sup>[1]</sup>, 去掉部分糖基的次级人参皂苷和皂苷元的生物活性更高。例如, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的代谢

产物人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 对 A375、T98G 和 L929 肿瘤细胞有明显抑制活性, 而人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 则无此活性; 人参皂苷 Re 是人参的主要药理活性成分, 具有抑制癌细胞增长、阻止癌细胞转移及保护神经等生理作用, 稀有人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在抗癌方面的疗效显著。

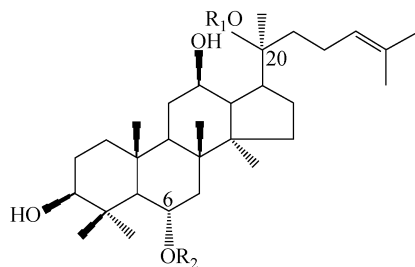


图 1 原人参三醇(PPT)型人参皂苷的化学结构  
Fig. 1 Chemical structures of protopanaxatriol (PPT)-type ginsenosides

表 1 原人参三醇型人参皂苷的化学结构信息

Table 1 Chemical structure information of protopanaxatriol-type ginsenosides

原人参三醇型皂苷 Protopanaxatriol	相对分子质量 Molecular weight	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Re	946.5501	Glc	Glc(2→1)Rha
Rg <sub>1</sub>	800.4922	Glc	Glc
Rg <sub>2</sub>	784.4973	H	Glc(2→1)Rha
Rf	800.4922	H	Glc(2→1)Glc
Rh <sub>1</sub>	638.4394	H	Glc
F <sub>1</sub>	638.4394	Glc	H
R <sub>1</sub>	932.5345	Glc	Glc(2→1)Xyl

注: Glc 表示葡萄糖; Xyl 表示木糖; Rha 表示鼠李糖

本研究拟利用高分离度快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF MS)和超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UPLC-QQQ MS)对原三醇型人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 在人肠道菌群中的生物转化产物进行定性、定量分析,考察其转化途径和转化率,明确原三醇型人参皂苷的化学结构与生物转化效率的关系,揭示人参皂苷生物利用度差异机理,为人参在临床的安全有效使用提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

6520 Accurate-Mass Q-TOF MS(配有电喷雾离子源 ESI)、Masshunter Qualitative AnalysisB.03.01 数据处理系统;美国 Agilent 公司产品;UPLC-TSQ-Endure 仪;美国 Thermo 公司产品。

### 1.2 主要材料与试剂

人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 对照品(纯度均≥98%);上海源叶生物科技有限公司产品;甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯);美国 Tedia 公司产品。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 对照品溶液的制备** 分别取约 10 mg 人参皂苷对照品 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 于 10 mL 容量瓶中,精密称定,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成标准储备液,备用。

**1.3.2 人体肠道菌群的制备** 将新鲜人粪便转移至厌氧培养箱中,在厌氧无菌操作条件下,于 37 °C 培养 24 h,从中取出适量菌液,在 37 °C 厌氧条件下活化培养,即为离体肠道菌液。

**1.3.3 样品制备** 参考文献[10]的实验方法,

准确称取适量人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 标准品,用适量二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成 0.1 g/L 储备液。实验分为空白组(1)、阴性对照组(2)和实验组(3)。第 1 组加适量厌氧液体培养基(GAM)和菌液,培养 60 h;第 2 组加入适量 GAM 和人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 储备液,培养 60 h;第 3 组分别加入适量 GAM、菌液和人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 储备液,密封,转移到恒温振荡培养箱中,在 37 °C 和 100 r/min 下培养,分别于 0、1、2、4、6、8、12、24、48、60 h 取样,用同 GAM 体积的乙酸乙酯灭活,再加入同体积的水饱和正丁醇萃取,合并提取液,回收溶剂,将残留物溶于甲醇,定容,过滤,待测。

**1.3.4 Agilent 6520 Q-TOF MS 色谱条件:** Supelco Ascentis Express C18 色谱柱(5 cm×3.0 mm×2.7 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~5 min(15%~19%B),5~10 min(19%B),10~13 min(19%~25%B),13~15 min(25%~28%B),15~18 min(28%B),18~22 min(28%~30%B),22~25 min(30%~35%B),25~30 min(35%~40%B),30~35 min(40%~60%B),35~38 min(60%~80%B),38~40 min(80%~100%B),40~42 min(100%B);流速 0.5 mL/min;进样量 5 μL。

质谱条件:电喷雾负离子扫描模式(ESI<sup>-</sup>);干燥气流速(N<sub>2</sub>)9 L/min,温度 300 °C;雾化气压 2.41×10<sup>5</sup> 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。

**1.3.5 Thermo UPLC-QQQ MS 色谱条件:** Thermo Synchronis-C18 色谱柱(100 mm×2.1

mm $\times$ 1.7  $\mu$ m);流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~5 min(20% B), 5~15 min(20%~30% B), 15~40 min(30%~40% B), 40~45 min(40%~90% B), 45~47 min(90% B), 47~50 min(90%~20% B), 50~55 min(20% B);流速 0.2 mL/min;进样量 5  $\mu$ L。

质谱条件:电喷雾负离子扫描模式,多反应离子检测(MRM),喷雾电压 4 000 V,辅助气流速 5 L/min,传输毛细管温度 350  $^{\circ}$ C,雾化器温度 300  $^{\circ}$ C,质量扫描范围  $m/z$  100~2 000。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RRLC-Q-TOF MS 化学成分分析

利用 RRLC-Q-TOF MS 对肠道菌群中人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 的转化产物进行鉴定,分析其转化途径。在负离子模式一级质谱图中,准分子离子主要以[M-H]<sup>-</sup>和[M+HCOOH-H]<sup>-</sup>的形式存在。继续进行串联质谱分析,可以获得更多碎片离子结构

信息以对其进行分析和鉴定,推测其可能的结构和分子式,结果列于表 2。

空白组,阴性对照组,人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、Rf、R<sub>1</sub> 和 Rg<sub>2</sub> 在离体肠道菌群代谢 8 h 后转化的总离子流图示于图 2。与空白组和阴性对照组相比,人参皂苷 Re 实验组除原型化合物 Re,可检测到 5 个代谢产物,分别为  $m/z$  845.488 4(M1)、829.490 6(M4)、683.435 3(M3)、683.434 1(M5)、521.388 1(M6)。M1、M4、M3、M5、M6、M9 的二级质谱图示于图 3。

产物 M1( $m/z$  845.488 4[M+COOH]<sup>-</sup>)的保留时间为 12.402 min,  $m/z$  845.488 4 比人参皂苷 Re 减少 146 u,推测为失去 1 分子鼠李糖。M1 的二级质谱主要碎片离子为  $m/z$  799.477 8、637.426 5、475.376 9,与标准品 Rg<sub>1</sub> 的保留时间和二级质谱数据一致,确定 M1 为 Rg<sub>1</sub>。产物 M4( $m/z$  829.490 6[M+COOH]<sup>-</sup>)的保留时间为 19.912 min,比人参皂苷 Re 的相对分子质量减少 162 u,推测为失去 1 分子葡萄糖。

表 2 原人参三醇型皂苷 Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、Rf、F<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 在人肠道菌群体外代谢的 MS/MS 数据( $n=3$ )

Table 2 MS/MS data of the original three alcohol ginsenoside Re, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rf, F<sub>1</sub> and R<sub>1</sub> in human intestinal flora metabolism *in vitro*

序号 No.	名称 Name	分子式 Molecular formula	理论质量值 Calcd Mass	[M-H] <sup>-</sup> / [M+HCOO] <sup>-</sup> ( $m/z$ )	碎片离子 Fragment ions( $m/z$ )	相对误差 Relative error/ 10 <sup>-6</sup>
M1	Rg <sub>1</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	845.4904	845.4884	637.4256[M-H-Glc] <sup>-</sup> , 475.3769[M-H-Glc-Glc] <sup>-</sup>	2.3
M2	Re	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	991.5483	945.5407/991.5499	799.4818[M-H-Rha] <sup>-</sup> , 783.4866[M-H-Glc] <sup>-</sup> , 637.4339[M-H-Rha-Glc] <sup>-</sup> , 475.2391[M-H-Rha-Glc-Glc] <sup>-</sup>	1.6
M3	Rh <sub>1</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	683.4376	683.4353	475.3748[M-H-Glc] <sup>-</sup>	3.3
M4	Rg <sub>2</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	829.4955	829.4906	637.4330[M-H-Rha] <sup>-</sup> , 475.3819[M-H-Rha-Glc] <sup>-</sup>	5.9
M5	F <sub>1</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	683.4376	683.4341	475.3866[M-H-Glc] <sup>-</sup>	5.1
M6	PPT	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	521.3848	521.3881	475.3819[M-H] <sup>-</sup>	6.3
M7	Rf	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	845.4904	799.4960/845.4937	637.4394[M-H-Glc] <sup>-</sup> , 475.3766[M-H-Glc-Glc] <sup>-</sup>	3.9
M8	R <sub>1</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub>	977.5327	931.5433/977.5539	799.4818[M-H-Xyl] <sup>-</sup> , 637.4866[M-H-Xyl-Glc] <sup>-</sup> , 475.3846[M-H-Xyl-Glc-Glc] <sup>-</sup>	9.0
M9	R <sub>2</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	815.4798	769.4544/815.4878	637.4866[M-H-Xyl] <sup>-</sup> , 475.2391[M-H-Xyl-Glc] <sup>-</sup>	9.8

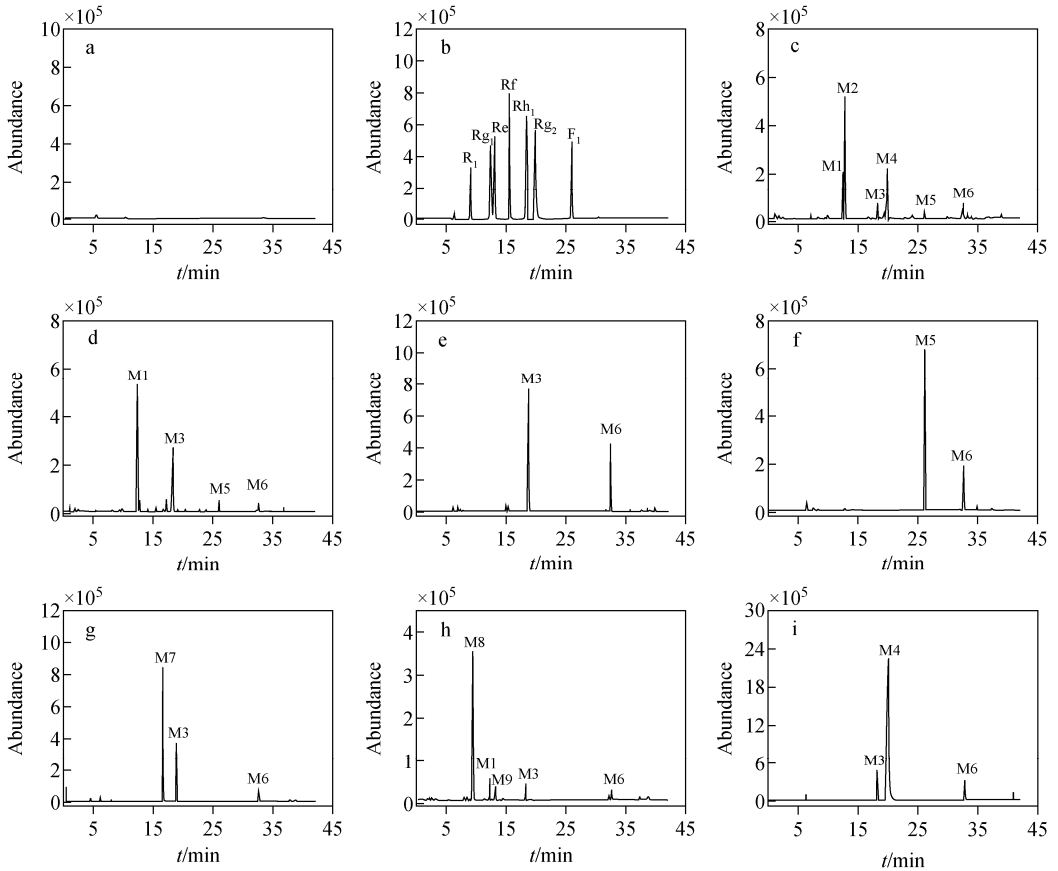


图2 空白组(a),阴性对照组(b),人参皂苷 Re(c)、Rg<sub>1</sub>(d)、Rh<sub>1</sub>(e)、F<sub>1</sub>(f)、Rf(g)、R<sub>1</sub>(h)和Rg<sub>2</sub>(i)在离体肠道菌群代谢8 h后转化的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms of the metabolites of group (a), control group (b), Re (c), Rg<sub>1</sub> (d), Rh<sub>1</sub> (e), F<sub>1</sub> (f), Rf (g), R<sub>1</sub> (h) and Rg<sub>2</sub> (i) in human intestinal bacteria

M4的二级质谱主要碎片离子为  $m/z$  783.496 5、637.433 0、475.381 9,其丢失1分子鼠李糖(146 u)形成碎片离子  $m/z$  637.433 0,进一步丢失1分子葡萄糖(162 u)形成碎片离子  $m/z$  475.381 9,推测M4为Rg<sub>2</sub>。转化产物M3和M5( $m/z$  683.435 3[M+COOH]<sup>-</sup>)的保留时间分别为19.035、23.344 min,2个转化产物的相对分子质量均比人参皂苷Rg<sub>1</sub>减少162 u,推测为Re继续丢失1分子葡萄糖,二者互为同分异构体。M3的二级碎片离子有  $m/z$  637.435 1、475.374 8,M5的二级碎片离子有  $m/z$  637.435 8、475.386 6,通过与标准品对比发现,M3、M5分别与标准品Rh<sub>1</sub>和F<sub>1</sub>的保留时间和二级质谱数据一致,确定其分别为人参皂苷Rh<sub>1</sub>和F<sub>1</sub>。转化产物M6( $m/z$  521.388 1[M+COOH]<sup>-</sup>)的保留时间为32.712 min,其相对分子质量比人参皂苷Re减少486 u,推测

为Re丢失3分子葡萄糖所致。M6的二级碎片离子为  $m/z$  475.381 9[M-H]<sup>-</sup>,与标准品PPT的保留时间和二级质谱数据一致,因此确定M6为PPT。

人参皂苷Rg<sub>1</sub>在离体人肠道菌群8 h时,除原型药物Rg<sub>1</sub>外,还检测到3个代谢产物。与标准品对比发现,三者分别与Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、PPT的保留时间和二级质谱数据一致,由此确定M3、M5、M6分别为Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、PPT。

人参皂苷Rh<sub>1</sub>在离体人肠道菌群8 h时,除原型药物Rh<sub>1</sub>外,还检测到1个代谢产物,与标准品PPT的保留时间和二级质谱数据一致,确定为PPT。

人参皂苷F<sub>1</sub>在离体人肠道菌群8 h时,除原型药物F<sub>1</sub>外,还检测到1个代谢产物,与标准品PPT的保留时间和二级质谱数据一致,确定为PPT。

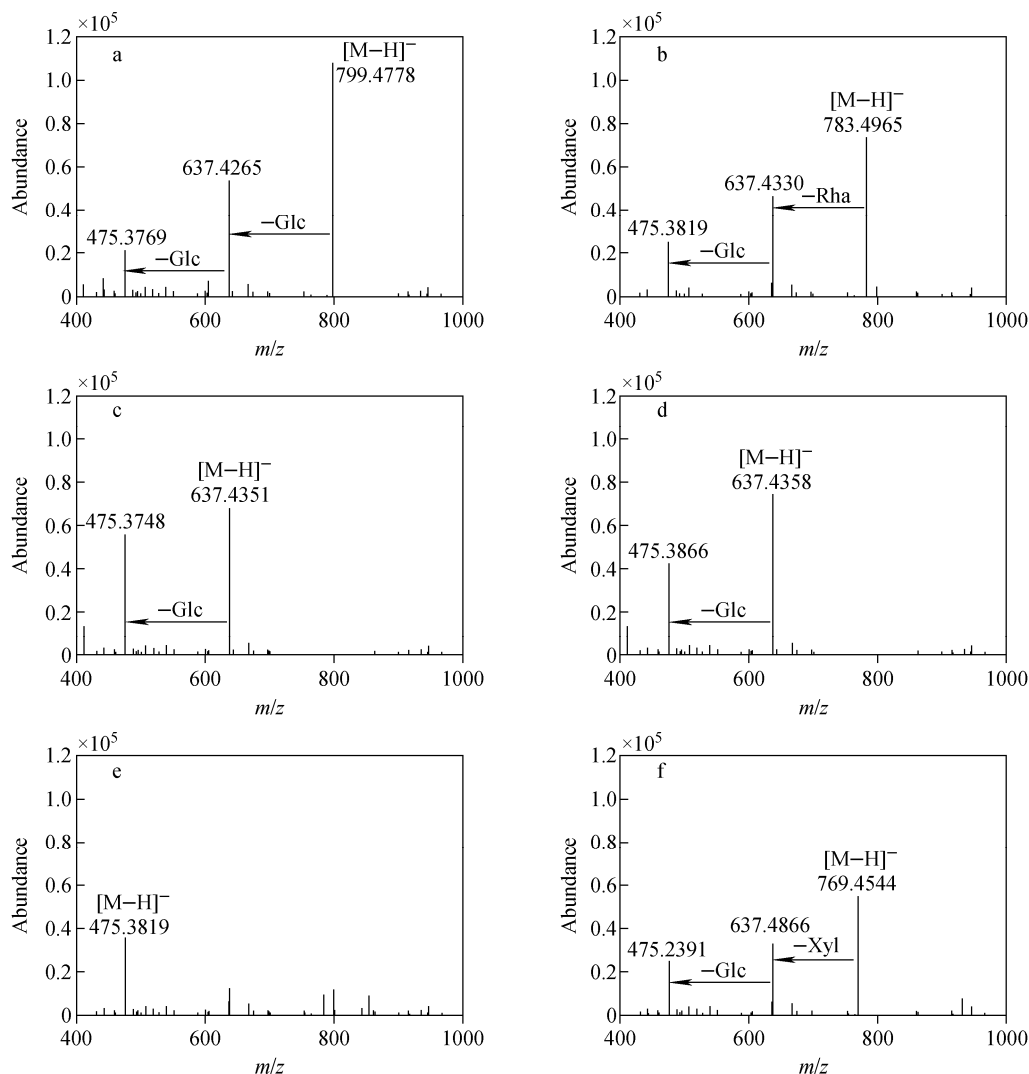


图3 M1(a)、M4(b)、M3(c)、M5(d)、M6(e)、M9(f)的二级质谱图

Fig. 3 MS<sup>2</sup> spectra of M1 (a), M4 (b), M3 (c), M5 (d), M6 (e), M9 (f)

人参皂苷 R<sub>f</sub> 在离体人肠道菌群 8 h 时,除原型药物 R<sub>f</sub> 外,还检测到 2 个代谢产物,分别与标准品 R<sub>h</sub><sub>1</sub>、PPT 的保留时间和二级质谱数据一致,确定为 R<sub>h</sub><sub>1</sub> 和 PPT。

人参皂苷 R<sub>1</sub> 在离体人肠道菌群 8 h 时,除原型药物 R<sub>1</sub> 外,还检测到  $m/z$  845.494 7(M1)、815.479 8(M9)、683.438 7(M3)、521.384 7(M6) 4 个代谢产物。其中,产物 M9( $m/z$  815.479 8 [M+COOH]<sup>-</sup>) 的提取离子流色谱图中有 1 个色谱峰,保留时间为 13.235 min, M9( $m/z$  815.479 8) 比人参皂苷 R<sub>1</sub> 减少 162 u, 推测为减少 1 分子葡萄糖。M9 的二级质谱主要碎片离子为  $m/z$  637.486 6、475.239 1, 其与标准品 R<sub>2</sub> 的保留时间和二级质谱数据一致,确定 M9

为 R<sub>2</sub>。R<sub>1</sub> 的其他 3 个代谢产物分别与标准品 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>h</sub><sub>1</sub>、PPT 的保留时间和二级质谱数据一致,确定其分别为 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>h</sub><sub>1</sub>、PPT。

人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>2</sub> 在离体人肠道菌群 8 h 时,除原型药物 R<sub>g</sub><sub>2</sub> 外,还检测到 2 个代谢产物,分别与标准品 R<sub>h</sub><sub>1</sub>、PPT 的保留时间和二级质谱数据一致,确定其分别为 R<sub>h</sub><sub>1</sub>、PPT。

Zhou 等<sup>[13]</sup> 研究表明,在肠道菌群中人参皂苷 R<sub>e</sub> 可以被 *Bacteroides* spp. 菌群代谢为 R<sub>g</sub><sub>1</sub>。人参皂苷的代谢途径包括肠道菌群通过选择性消除糖基部分而发生的脱糖基化反应,推测原人参三醇型皂苷在人肠道菌群中的代谢途径示于图 4。

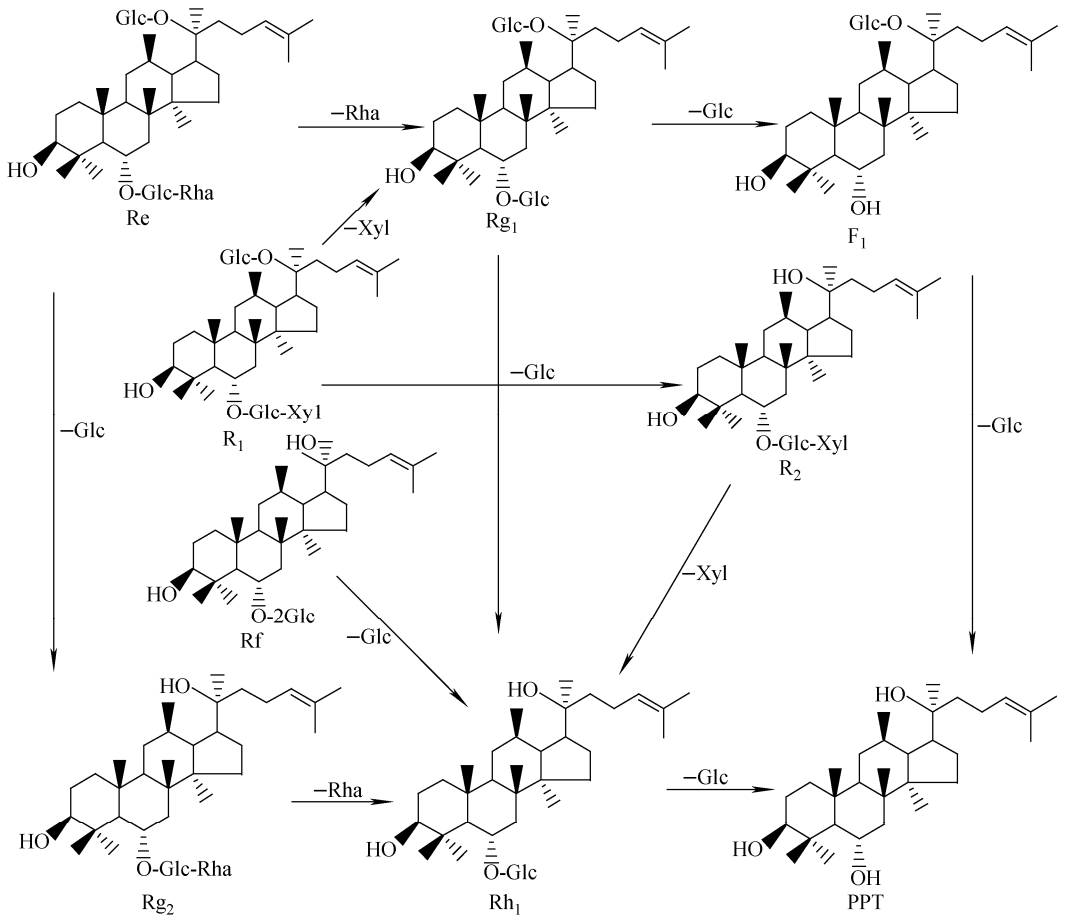


图 4 原人参三醇型皂苷经离体肠道菌群的代谢途径

Fig. 4 Metabolic pathway of the protopanaxatriol ginsenosides isolated from the intestinal flora

## 2.2 定量分析

取人参皂苷 Re、R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>h</sub><sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、R<sub>f</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub><sub>2</sub> 的标准品溶液,检测后以峰面积为纵坐标,浓度

(mg/L)为横坐标绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数,并以信噪比  $S/N=3$  计算检测限,  $S/N=10$  计算定量限,结果列于表 3。

表 3 原人参三醇型皂苷及其转化产物的回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficient ( $r^2$ ), linear ranges, limit of detection (LODs) and limit of quantification (LOQs) of protopanaxatriol ginsenosides and transformation products

人参皂苷 Ginsenoside	线性回归方程 Linear regression equations	相关系数 Correlation coefficients ( $r^2$ )	线性范围 Linear ranges/ (mg/L)	检测限 LODs/ (mg/L)	定量限 LOQs/ (mg/L)
R <sub>g</sub> <sub>1</sub>	$y=28420x+18421$	0.996	0.2~125	0.006	0.02
Re	$y=187120x+3370$	0.997	0.01~200	0.001	0.03
R <sub>h</sub> <sub>1</sub>	$y=15250x+10190$	0.995	0.1~114	0.005	0.016
R <sub>f</sub>	$y=24620x+10493$	0.991	0.04~109	0.003	0.01
R <sub>1</sub>	$y=14950x+38464$	0.994	0.1~131	0.0016	0.05
F <sub>1</sub>	$y=18450x+12930$	0.992	0.05~127	0.002	0.07
R <sub>g</sub> <sub>2</sub>	$y=29350x+184785$	0.995	0.06~136	0.008	0.027
PPT	$y=18750x+3648$	0.991	0.01~90	0.005	0.016
R <sub>2</sub>	$y=25142x+20791$	0.993	0.01~121	0.004	0.013

原人参三醇型皂苷在人肠道菌群转化产物的浓度-时间曲线示于图 5。人参皂苷 Re 在 4 h 时开始转化,产物 Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、PPT 的含量分别在 8、8、24、48、60 h 时达到最大。随着

转化时间延长,Re、Rg<sub>1</sub> 和 Rg<sub>2</sub> 转化生成 Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>; PPT 在转化后期呈上升趋势,48 h 以后趋于平稳,第 60 h 人参皂苷 Re 转化率为 91%。

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 在第 2 h 时检测到转化产物

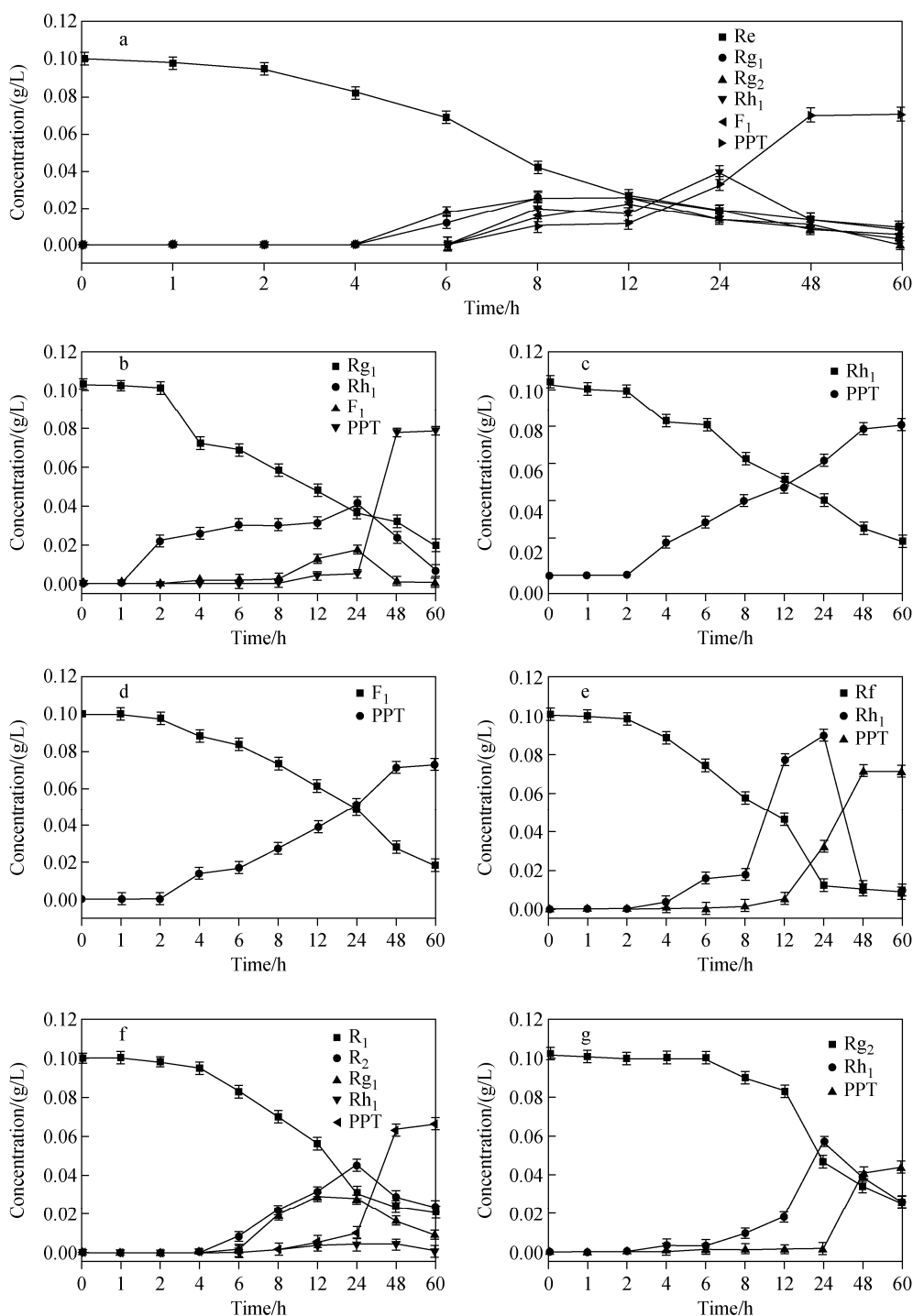


图 5 人参皂苷 Re(a)、Rg<sub>1</sub> (b)、Rh<sub>1</sub> (c)、Rf(d)、F<sub>1</sub> (e)、R<sub>1</sub> (f)、Rg<sub>2</sub> (g)及其转化产物的浓度-时间曲线图

Fig. 5 Curve-time of ginsenoside Re (a), Rg<sub>1</sub> (b), Rh<sub>1</sub> (c), Rf (d), F<sub>1</sub> (e), R<sub>1</sub> (f), Rg<sub>2</sub> (g) and their transformation products in human intestinal flora

Rh<sub>1</sub>,随着转化时间延长,Rh<sub>1</sub>的含量增加,Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>含量在第24 h达到最大。在第4 h检测到少量F<sub>1</sub>,第12 h有少量PPT生成,第24 h出现拐点,PPT含量增加,48 h以后趋于平稳。转化过程中,人参皂苷C-20位的活性大于C-6位,因此Rh<sub>1</sub>的含量大于F<sub>1</sub>。在转化60 h时,Rg<sub>1</sub>转化率为80%。

人参皂苷Rh<sub>1</sub>在第2 h开始转化,4 h时检测到产物PPT,48 h时含量趋于平衡,60 h后Rh<sub>1</sub>转化率为82%。

人参皂苷F<sub>1</sub>在转化4 h时检测到产物PPT,48 h后含量趋于平衡,60 h时F<sub>1</sub>转化率为81%。

人参皂苷Rf在2 h开始转化,水解掉C-6位上的葡萄糖生成Rh<sub>1</sub>,转化6 h时检测到PPT,随着转化时间的延长,Rh<sub>1</sub>和PPT的含量增加,PPT在48 h以后含量达到最大,在24 h时原型药物出现拐点,此时大部分原型药物发生转化,在60 h以后主要以PPT形式存在,原型药物转化率为89%。

人参皂苷R<sub>1</sub>在4 h时开始转化,6 h时检测到Rg<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>,8 h时检测到Rh<sub>1</sub>、PPT;Rh<sub>1</sub>、PPT在转化24、60 h时含量达到最大,24 h时出现拐点,自此R<sub>2</sub>大部分开始转化,PPT的含量开始增加,R<sub>1</sub>在60 h时转化率为79%。

人参皂苷Rg<sub>2</sub>在4 h时检测到Rh<sub>1</sub>,6 h时检测到少量PPT,24 h时Rh<sub>1</sub>含量达到最大,自此之后大部分转化为PPT,其含量在48 h后开始稳定,在60 h时含量达到最大,Rg<sub>2</sub>在60 h时转化率为73%。

### 3 结论

本研究通过RRLC/Q-TOF MS分析鉴定了Re、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rf、Rh<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、R<sub>1</sub>在离体肠道菌群的生物转化情况,并推测其转化机制。人参皂苷Re转化途径为Re→Rg<sub>1</sub>/Rg<sub>2</sub>→Rh<sub>1</sub>/F<sub>1</sub>→PPT;人参皂苷Rg<sub>1</sub>转化途径为Rg<sub>1</sub>→Rh<sub>1</sub>/F<sub>1</sub>→PPT;人参皂苷Rg<sub>2</sub>转化途径为Rg<sub>2</sub>→Rh<sub>1</sub>→PPT;人参皂苷Rh<sub>1</sub>和人参皂苷F<sub>1</sub>主要通过PPT代谢;人参皂苷Rf转化途径为Rf→Rh<sub>1</sub>→PPT;三七皂苷R<sub>1</sub>代谢途径为R<sub>1</sub>→Rg<sub>1</sub>/R<sub>2</sub>→Rh<sub>1</sub>→PPT。利用UPLC-QQQ MS定量分析各人参皂苷的转化率,发现除人参皂

苷Rg<sub>2</sub>和R<sub>1</sub>外,其他皂苷在60 h的转化率均超过80%,其中Re和Rg<sub>1</sub>均生成Rh<sub>1</sub>和F<sub>1</sub>,但Rh<sub>1</sub>的含量大于F<sub>1</sub>,表明人参皂苷C20位比C6位活泼,糖苷键易断裂生成次级皂苷,次级皂苷或苷元能够提高人参的生物利用度和生物活性。

### 参考文献:

- [1] 张丽娜,明有山,曲波权,全艳玲,丛景香,吴秀红. 微生物转化人参皂苷Re为人参皂苷Rh<sub>1</sub>的研究[J]. 中国酿造,2017,36(11):114-117.  
ZHANG Li'na, MING Youshan, QU Boquan, QUAN Yanling, CONG Jingxiang, WU Xiuhong. Microbial transformation of ginsenoside Re into ginsenoside Rh<sub>1</sub>[J]. China Brewing, 2017, 36(11): 114-117(in Chinese).
- [2] WAN J Y, WANG C Z, LIU Z, ZHANG Q H, MUSCH M W, BISSONNETTE M, CHANG E B, LI P, QI L W, YUAN C S. Determination of American ginseng saponins and their metabolites in human plasma, urine and feces samples by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1 015/1 016: 62-73.
- [3] 郑飞,张琰,韩铭鑫,乔梦丹,戴雨霖,越皓,刘淑莹. RRLC-Q-TOF MS法分析鲜人参和仙人掌果配伍发酵前后人参皂苷成分的变化[J]. 质谱学报,2018,39(5):532-539.  
ZHENG Fei, ZHANG Yan, HAN Mingxin, QIAO Mengdan, DAI Yulin, YUE Hao, LIU Shuying. Study on the component content change of ginsenosides in fermenting fresh ginseng and prickly pear by RRLC-Q-TOF-MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(5): 532-539(in Chinese).
- [4] 赵静,秦振娟,彭冰,刘永刚,刘勇. 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[J]. 质谱学报,2017,38(1):97-108.  
ZHAO Jing, QIN Zhenxian, PENG Bing, LIU Yonggang, LIU Yong. Fragmentation pathway of ginsenosides in panaxnotoginseng using electrospray ionization-quadrupole/time-of-flight mass spectrometer[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(1): 97-108(in Chinese).
- [5] DONG W W, ZHAO J, ZHONG F L, ZHU W J, JIANG J, WU S Q, YANG D C, LI D H,

- QUAN L H. Biotransformation of Panax ginseng extract by rat intestinal microflora: identification and quantification of metabolites using LC-MS/MS[J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(4): 540-547.
- [6] ZHOU F, ZHANG P C, CHEN X X, YAN J Y, YAO J G, YU Z, CHEN X L. Ginsenoside Rb1 protects the intestinal mucosal barrier following peritoneal air exposure[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 12(4): 2 563-2 567.
- [7] WANG H Y, HUA H Y, LIU X Y, LIU J H, YU B Y. *In vitro* biotransformation of red ginseng extract by human intestinal microflora: metabolites identification and metabolic profile elucidation using LC-Q-TOF/MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 98: 296-306.
- [8] 乔梦丹,刘尚,张琰,李晶,郑飞,戴雨霖,越皓. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 研究人参皂苷在发酵过程中的生物转化[J]. 高等学校化学学报, 2018,39(2):219-225.
- QIAO Mengdan, LIU Shang, ZHANG Yan, LI Jing, ZHENG Fei, DAI Yulin, YUE Hao. Bio-transformation of ginsenoside in fermentation based on UPLC-Q-Orbitrap MS/MS[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2018, 39(2): 219-225(in Chinese).
- [9] 戴雨霖,乔梦丹,越皓,宋岩. 高分离度液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用法检测不同种类茶叶对人参皂苷的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2018,34(1):17-19.
- DAI Yulin, QIAO Mengdan, YUE Hao, SONG Yan. Study the effect of ginsenosides from different kinds of tea by RRLC-Q-ToF MS[J]. Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 34(1): 17-19(in Chinese).
- [10] LI C, LI Q, LIU Y Y, WANG M X, PAN C S, YAN L, CHEN Y Y, FAN J Y, HAN J Y. Protective effects of Notoginsenoside R1 on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2014, 306(2): 111-133.
- [11] BEA 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.
- [12] 郑飞,王微,于珊珊,戴雨霖,刘尚,文连奎,越皓. 高效液相色谱-飞行时间质谱联用法分析人参与人参皂苷与山楂配伍过程中的水解行为[J]. 应用化学,2017,34(6):723-728.
- ZHENG Fei, WANG Wei, YU Shanshan, DAI Yulin, LIU Shang, WEN Liankui, YUE Hao. Hydrolysis behaviors of combined dectotion of panax ginseng and ginsenosides with hawthorn by HPLC-Q-TOF MS/MS[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2017, 34(6): 723-728 (in Chinese).
- [13] ZHOU S S, XU J, ZHU H, WU J, XU J D, YAN R, LI X Y, LIU H H, DUAN S M, WANG Z, CHEN H B, SHEN H, LI S L. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 22 474.