

# UPLC/Q-TOF MS 鉴定人参皂苷 Rh2 在大鼠体内的代谢产物

邓 洋, 钟大放, 谢 岑, 陈笑艳

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

## Metabolism Investigation of Ginsenoside Rh2 in Rat Using UPLC/Q-TOF MS

DENG Pan, ZHONG Da-fang, XIE Cen, CHEN Xiao-yan

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** An ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS) was used for the identification of metabolites in rats after oral administration of ginsenoside Rh2. The plasma, bile, urine and feces samples were collected after single oral administration of 50 mg·kg<sup>-1</sup> Rh2 to rats. The samples were prepared by protein precipitation with acetonitrile. After comparison with the blank samples, identification of the metabolites and their structural elucidation were performed by investigating their accurate mass data, and product ion spectra obtained from positive and negative ion detection mode using MS<sup>E</sup> data collection function (where E represents collision energy). The results reveal that the major metabolic pathways of Rh2 include deglycosylation, oxygenation, desaturation and sulfate conjugation. Protopanaxadiol is detected in rat feces. Neither parent compound nor metabolites are found in rat urine. Glutathione adduct of Rh2 is found as one of the major metabolites in rat bile, and cysteine-adduct metabolites are detected in feces. These results are helpful for the understanding of Rh2 metabolism in rat.

**Key words:** ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS); ginsenoside Rh2; metabolite

中图分类号: O 657.63      文献标识码: A      文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0083-03

人参皂苷 Rh2 (简称 Rh2) 是从人参中提取的天然活性成分, 属于二醇组皂苷<sup>[1]</sup>。已有大量体内实验研究证实, Rh2 可以通过诱导分化或凋亡, 抑制多种肿瘤细胞的生长与增殖, 因此, Rh2 在肿瘤治疗方面的作用备受关注<sup>[2-3]</sup>。Qian 等<sup>[4]</sup>采用 LC-MS/MS 法研究了 Rh2 在大鼠体内的代谢, 在大鼠粪中检测到原人参二醇 (PPD) 和 2 种氧化代谢产物。Gu 等<sup>[5]</sup>采用 TOF-MS 法初步研究了 Rh2 在大鼠体内的代谢, 在大鼠粪中检测到 PPD, 在尿样中检测到 Rh2 的硫酸结合物。本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法 (UPLC/Q-TOF MS) 检测大鼠灌胃给予人参皂苷 Rh2 后, 血浆、胆汁、尿样和粪样中可能的代谢物, 以及 Rh2 在大鼠体内的生物转化特征。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

Acquity Ultra 超高效液相色谱系统及 Synapt Q-TOF 质谱仪: 美国 Waters 公司产品。数据处理采

用 Masslynx V4.1, MetaboLynx 及 MassFragment™ 软件。

## 1.2 材料、试剂与动物

人参皂甙 Rh2 (纯度 99%) 和原人参二醇 (纯度 98%): 上海中药现代化研究中心提供; 乙腈 (色谱纯): 德国 Sigma 公司产品; 醋酸铵 (色谱纯): 美国 Tedia 公司产品; 水为 Millipore 超纯水。实验动物为雄性 SD 大鼠 (体重 250~300 g): 购自上海实验动物研究中心。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 样品预处理** 取 100  $\mu\text{L}$  血浆、尿或胆汁, 加入 200  $\mu\text{L}$  乙腈沉淀, 11 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取出全部上清液于 40  $^{\circ}\text{C}$  空气流下吹干; 粪样加入 2 mL 甲醇匀浆后超声提取, 残留物吹干后以  $V(5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 醋酸铵}):V(\text{乙腈})=80:20$  复溶, 取 10  $\mu\text{L}$  进样。

**1.3.2 色谱条件** Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1  $\text{mm}\times 100\text{ mm}\times 1.8\ \mu\text{m}$ ); 流动相: A 泵为 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸铵, B 泵为乙腈; 流速: 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 采用梯度程序洗脱; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.3.3 质谱条件** ESI 电离源, 正离子方式检测时喷雾电压为 3.0 kV, 负离子方式检测时喷雾电压为 2.5 kV, 雾化气流量 800  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 去溶剂温度 350  $^{\circ}\text{C}$ , 离子源温度 120  $^{\circ}\text{C}$ 。低能量扫描时传输碰撞能量为 4 eV, 阱碰撞能量为 6 eV; 高能量扫描时传输碰撞能量为 15 eV, 阱碰撞能量为 25~45 eV。选取 400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  亮氨酸-脑啡呋用于外标 (Lock Spray™) 校正, 流速 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

对 Rh2 标准品溶液在正、负离子检测模式下进行 UPLC/MS<sup>E</sup> Q-TOF 分析, Rh2 在正离子检测模式下极易发生源内脱水, 基峰离子  $m/z$  587 是由原形脱去 2 分子水形成, 主要碎片离子为脱去糖基的  $m/z$  425 以及进一步脱水的  $m/z$  407。在负离子模式下, Rh2 主要形成  $m/z$  681 的加合离子  $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}]^{-}$ , 同时有少量的  $m/z$  621 的  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$  准分子离子生成, 主要碎片离子为脱去甲基戊烯侧链 ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ) 的  $m/z$  537, 脱去糖基的  $m/z$  459 和在此基础上脱甲基戊烯侧链的  $m/z$  375。推测的 Rh2 碎片离子示于图 1。本试验将根据这些质谱断裂特点以及对照品, 鉴定大鼠血浆、胆汁和粪中的代谢产物。

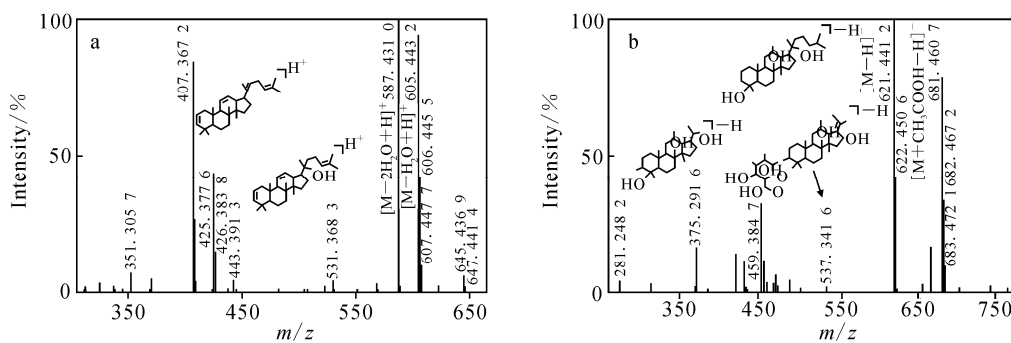


图 1 人参皂甙 Rh2 对照品在高碰撞能量正离子 (a) 和负离子 (b) 检测模式下的全扫描质谱图  
Fig.1 Mass spectra of the reference substance ginsenoside Rh2 under high energy with positive(a) and negative(b) detection mode

采用 mass defect filtering (MDF) 功能对大鼠样品数据进行处理, 大鼠尿样中未检测到原形和代谢物。在血浆中共检测到 9 种一相代谢物, 胆汁中检测到 6 种一相代谢物和 1 种谷胱甘肽 (GSH) 结合物, 粪中除有原形外还检测到 14 种一相代谢物、1 种硫酸结合物和 2 种半胱氨酸 (Cys) 结合物, 结合 MS<sup>E</sup> 功能下采集的前体离子及碎片离子的信息, 推测 Rh2 在大鼠体内的代谢途径, 列于表 1。人参皂甙类化合物 Rh2 和 PPD 在正负离子检测模式下均有响应, 在正离子检测时代谢物产生一系列脱水离子, 不易判断其准确分子质量; 在负离子检测时可以形成  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$  的准分子离子和  $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}]^{-}$  的乙酸加合离子, 有助于代谢物准确分子质量的判断。因此本研究采用正、负

离子检测相结合的方式,对比不同检测模式下代谢物的质谱响应及碎片离子,使代谢物得以充分确认。Rh2具有多种氧化代谢产物,其氧化位点不同,从而产生了多种同分异构体。本研究采用UPLC法使这些同分异构体得到良好色谱分离,通过使用Q-TOF质谱的MS<sup>E</sup>数据采集方式获得了较为丰富的代谢物信息。

表1 人参皂苷Rh2大鼠体内代谢物的鉴定  
Table 1 Identification of ginsenoside Rh2 metabolites in rats

编号	代谢途径	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup>	质量偏差		保留时间 /min	排泄途径	主要二级碎片离子
			$\mu$	ppm			
M0	Rh2	623.452	-0.4	-0.7	11.87	粪	425.378, 407.368
M1	M2去4H	457.367	-1.6	-3.6	12.63	粪	439.357, 421.345, 403.337
M2	原人参二醇	461.400	0.9	1.9	11.72	粪	425.378, 407.367
M3-1	M2单氧化	477.396	1.0	2.2	12.3	粪	459.379, 441.370, 423.356
M3-2	M2单氧化	477.394	-0.9	-1.8	13.01	血浆, 粪	441.372, 341.304
M3-3	M2单氧化	477.390	-4.1	-8.5	13.21	血浆, 粪	459.379, 441.370, 423.356
M3-4	M2单氧化	477.393	-1.1	-2.2	13.59	血浆, 粪	441.372, 377.306, 359.295, 341.284
M3-5	M2单氧化	477.394	-0.4	-0.8	14.86	血浆	441.372
M4-1	M2氧化形成羧酸	491.373	-0.5	-1.1	8.59	血浆	445.369*, 375.288*
M4-2	M2氧化形成羧酸	491.372	-1.3	-2.7	9.84	血浆	445.369*
M5-1	M2双氧化	493.386	-3.5	-7.1	8.12	血浆	457.361, 357.277
M5-2	M2双氧化	493.390	0.9	1.9	11.07	粪	457.367, 439.359
M5-3	M2双氧化	493.389	-0.3	-0.6	11.38	血浆、粪	475.378, 457.367, 439.359
M6	M2烯变为二醇	495.407	2.0	4.0	9.19	粪	459.358, 441.369, 423.361
M7	M2羟基化硫酸结合	557.350	-1.4	-2.5	7.01	粪	521.331, 503.318, 391.284*
M8	M2+H <sub>2</sub> O+半胱氨酸	598.412	-2.2	-3.7	8.08	粪	580.398, 441.371
M9-1	单氧化	639.446	-0.9	-1.4	8.93	胆汁, 粪	375.289*
M9-2	单氧化	639.444	-3.0	-4.7	9.64	胆汁, 血浆, 粪	621.437, 603.425, 477.355, 375.288*
M9-3	单氧化	639.447	0.0	0.0	9.8	血粪	375.289*
M9-4	单氧化	639.450	2.3	3.6	10.83	胆汁, 粪	375.286*
M10-1	双氧化	655.442	-0.2	-0.3	8.23	胆汁	457.356, 439.325
M10-2	双氧化	655.444	2.1	3.2	8.53	胆汁	457.364, 439.352
M11	烯变为二醇	657.460	2.5	3.7	7.72	胆汁	441.349
M12	H <sub>2</sub> O+半胱氨酸	760.469	2.1	2.7	6.47	粪	742.456, 441.370
M13	谷胱甘肽结合	946.541	-7.4	-7.9	5.56	胆汁	272.087*

注: \*为负离子检测模式下的特征碎片离子

### 3 结论

人参皂苷Rh2在大鼠体内的代谢途径主要为去糖基,氧化,脱氢和硫酸结合。对比代谢物在正、负离子检测模式下的质谱裂解规律,有助于代谢物确认和结构解析。Rh2的谷胱甘肽结合物是大鼠胆汁中的主要代谢物之一,这提示Rh2在大鼠体内可能形成反应性代谢产物中间体,并与GSH发生共价结合,这对解释Rh2的药理活性具有一定作用。

(下转第88页)