

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00421

HPLC-TOF/MS 鉴别大鼠给药重楼提取物后尿液中甾体皂苷类成分

王本伟,张洁瑾,李悦悦,张海,赵亮,吕磊,张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科,上海 200438

[摘要] **目的** 采用高效液相-飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)联用技术快速分离并鉴别大鼠灌胃给予重楼提取物后尿液中甾体皂苷类成分,以探索重楼皂苷在大鼠体内的代谢途径。**方法** 选用SD大鼠,按照1.6 g/kg体质量灌胃给予重楼提取物,收集给药后24 h内的尿液。样品分析采用MG-C₁₈柱(3.0 mm×100 mm,3.0 μm),乙腈-0.1%甲酸水为流动相梯度洗脱,在TOF/MS电喷雾离子源下采集正、负离子模式下的数据。利用TOF/MS得到的精确相对分子质量,对照化学成分数据库,对尿液中的甾体皂苷类成分进行鉴别。**结果** 共鉴别出尿液中20个甾体皂苷原型成分,通过碎片离子以及与对照品相比较鉴别出2对同分异构体:重楼皂苷Ⅶ和偏诺皂苷元-3-O-α-L-鼠李吡喃糖基(1→4)-α-L-鼠李吡喃糖基(1→3)[α-L-鼠李吡喃糖基(1→2)]-β-D-葡萄糖吡喃糖苷,纤细薯蓣皂苷和偏诺皂苷元-3-O-α-L-鼠李吡喃糖基(1→2)[α-L-鼠李吡喃糖基(1→4)]-β-D-葡萄糖吡喃糖苷。**结论** 该方法准确、可靠,可成功用于重楼体内成分的鉴别,可为药动学和药效学研究提供参考。

[关键词] 高效液相-飞行时间质谱;重楼;甾体皂苷;尿

[中图分类号] R 917.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0421-04

HPLC-TOF/MS in identifying steroidal saponins in rat urine after oral administration of *Paris polyphylla* extract

WANG Ben-wei, ZHANG Jie-jin, LI Yue-yue, ZHANG Hai, ZHAO Liang, LÜ Lei, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To use high-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) for examining the steroidal saponins in rat urine after oral administration of *Paris polyphylla* extract, so as to lay a foundation for studying the metabolism of steroidal saponins *in vivo*. **Methods** SD rats were administered with an oral dose of 1.6 g *Paris polyphylla* extracts/kg body weight. The urine samples were collected 24 h after administration by oral gavage. The sample analysis was carried out on a reverse phase MG-C₁₈ column (3.0 mm×100 mm, 3.0 μm) using a gradient mobile phase system of acetonitrile-water containing 0.1% formic acid. TOF/MS was applied for qualitative analysis under positive and negative ion modes. The steroidal saponins in rat urine were identified by using the accurate molecular weight obtained by TOF/MS and formula database. **Results** A total of 20 steroidal saponins were identified in the rat urine, and two pairs of isomers were deduced through their fragment ions and standards: polyphyllin Ⅶ and pennogenin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→3)-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)]-β-D-glucopyranoside; and gracillin and pennogenin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→4)-β-D-glucopyranoside. **Conclusion** The established analysis method is accurate, reliable for identifying steroidal saponins *in vivo*, which paves a way for further pharmacokinetics and pharmacodynamics study of *Paris polyphylla*.

[Key words] high-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry; *Paris polyphylla*; steroid saponin; urine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 421-424]

中药重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith Var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith Var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[1], 始

载于《神农本草经》,为我国南方地区少数民族常用的中草药之一^[2]。其味苦,微寒,有小毒,归肝经,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,临床上主要用于治疗毒蛇咬伤、惊风抽搐、跌打损伤等^[1]。现

[收稿日期] 2012-11-29 **[接受日期]** 2013-01-05

[作者简介] 王本伟,硕士生。E-mail: wangweistem@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

代药理研究表明,重楼的水提液和醇提液都具有良好的抑制 HeLa、HL-60 以及 HepG2 等肿瘤细胞增殖的能力^[3-8],一般认为甾体皂苷为其主要活性成分。迄今为止,已从重楼药材中分离鉴别出 50 多种甾体皂苷类成分,其中主要包括原型皂苷类、薯蓣皂苷类和偏诺皂苷类等。但是对重楼提取物经动物体内代谢后甾体皂苷成分的研究却鲜有报道。本研究采用高效液相-飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)联用技术,对大鼠灌胃给予重楼提取物后尿液中甾体皂苷类成分进行鉴别,探索重楼可能的药效成分,为药动学和药效学研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 HPLC 系统,包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱(安捷伦公司,美国); Agilent 6220 飞行时间质谱仪,配有标准电喷雾离子源,Masshunt 色谱工作站(安捷伦公司,美国); Dionex ASE350 加速溶剂萃取仪(戴安公司,美国); 电子天平(梅特勒公司,美国); DFT-200 手提式高速万能粉碎机(浙江林大机械有限公司,中国); 香港力康超纯水净化仪(力康公司,中国)。

1.2 试剂 重楼药材产自云南,并经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith Var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith Var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎; 对照品重楼皂苷Ⅶ和纤细薯蓣皂苷购于中国食品药品检定研究院,纯度均大于 98%; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂为分析纯。

1.3 动物 SD 雄性大鼠,7 周龄,清洁级,体质量(230±20) g,由第二军医大学实验动物中心提供。

2 方法和结果

2.1 HPLC-TOF/MS 条件 色谱柱: MG-C₁₈ 柱(3.0 mm×100 mm,3.0 μm); 流动相: 乙腈(A)与 0.1%甲酸水(B); 洗脱梯度: 0~15 min,15%~30% A; 15~45 min,30%~45% A; 45~60 min,45%~60% A。流速: 0.4 mL/min; 柱温: 25℃; 进样量: 8 μL; 离子源: ESI 正、负离子模式; 雾化气压力: 275.8 kPa(40 psi); 干燥气流速: 10 L/min; 干燥气温度: 350℃; 毛细管电压: 4 000 V; 碎片电压: 90 V 和 180 V; 质量数扫描范围: m/z 100~1 500。

2.2 加速溶剂萃取条件 萃取温度: 120℃; 压力:

1.17 MPa(1 700 psi); 静态萃取时间: 10 min; 循环次数: 1 次; 冲洗体积: 70%; 氮气吹扫时间: 120 s; 萃取溶剂: 70%乙醇; 萃取池: 100 mL。

2.3 对照品溶液制备 精密称取重楼皂苷Ⅶ 6.44 mg,纤细薯蓣皂苷 5.72 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,作为对照品储备液,分别取各对照品储备液稀释后进样分析。

2.4 灌胃药材提取液的制备 取重楼药材粉末(20~40 目)172 g,按 2.2 项下的方法进行加速溶剂萃取,萃取液在 45℃真空旋转浓缩仪中浓缩,然后转移到烘箱中 50℃真空干燥,得提取物 25.8 g,称取提取物 3.1 g,加 0.5%的吐温 80 水溶液 25 mL,超声溶解。

2.5 重楼甾体皂苷成分数据库的建立 根据重楼药材有关化学成分研究的文献,并结合 Agilent 提供的 formula-database-generator 软件,建立了重楼中甾体皂苷成分的数据库,包括化合物的名称、分子式以及精确相对分子质量。

2.6 样品采集与制备 取大鼠 3 只,实验前禁食 12 h,不禁水,按照 1.6 g/kg 体质量灌胃给予重楼提取物,然后收集给药后 24 h 内的尿液。尿液经 3 000×g 离心 10 min,取上清,置-40℃冰箱保存。

2.7 样品前处理 尿液置室温解冻后,取 600 μL,加 2.4 mL 正丁醇,涡旋 60 s,4 500×g 离心 10 min,将上层液体转移到新的 EP 管,在真空旋转挥发仪中挥干,然后加 100 μL 甲醇复溶,12 000×g 高速离心 10 min,取上清液进样分析。

2.8 尿液中甾体皂苷类成分鉴别 由 HPLC-TOF/MS 得到大鼠空白尿液和给药后的样品总离子流图谱,给药后的样品图谱见图 1,比较空白尿液和样品图谱,结合已建立的重楼中甾体皂苷成分的数据库,分析差异峰,确定潜在的目标化合物。

在正离子模式质谱图上主要得到[M+H]⁺、[M+Na]⁺和[M+NH₄]⁺的准分子离子峰,在负离子模式下主要得到[M-H]⁻、[M+HCOO]⁻的准分子离子峰。根据正、负离子模式下 TOF/MS 给出的精确相对分子质量,确定化合物的精确相对分子质量,应用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算可能的分子组成(误差<5×10⁻⁶),然后与建立的数据库进行匹配,找出潜在的化合物。从尿液样品的 LC-TOF/MS 谱图中共鉴别出 20 个甾体皂苷类成分,其中峰 3 和峰 9、峰 12 和峰 17 具有相同的精确相对分子质量,确定为 2 对同分异构体。结果见表 1。

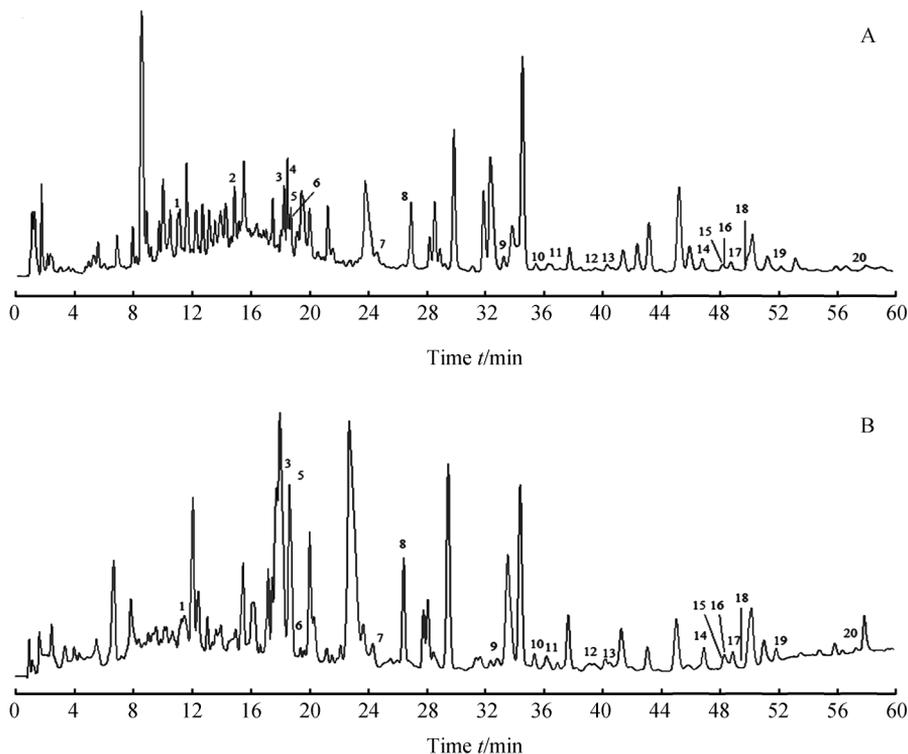


图1 大鼠灌胃给药后尿液中甾体皂苷类成分 TOF/MS 总离子流图谱

Fig 1 Total ion current chromatograms of steroidal saponins in rat urine after oral administration

1-20; Please see Tab 1 for the represented compounds. A; Positive ion mode; B; Negative ion mode

表1 大鼠尿液中的甾体皂苷类成分质谱分析结果

Tab 1 LC-TOF/MS analysis results of steroidal saponins in rat urine

No.	Compound	Rt t/min	MF	Positive ion mode		Negative ion mode	
				M+X	m/z	M+X	m/z
1	-	11.568	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	M+Na	925.597 6	M+HCOO	947.453 5
2	Saponin TH	15.568	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₇	M+NH ₄	1 228.608		
3	-	18.153	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	M+H	1 031.545	M-H	1 029.67
4	Pseudoproto-Pb	18.258	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₅	M+H	1 177.602		
5	Polyphyllin G	18.469	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₂	M+H-H ₂ O	1 017.514	M+HCOO	1 079.498
6	Polyphyllin III	18.597	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₂	M+H	1 047.534	M+HCOO	1 091.526
7	Pariyunnanoside B	24.644	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₁	M+H/Na	1 017.505 9/1 039.485 8	M+HCOO	1 061.521
8	-	26.925	C ₃₉ H ₆₀ O ₁₈	M+H/Na	817.574 5/839.554 5	M-H	815.574 6
9	Polyphyllin VII	33.771	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	M+NH ₄	1 048.543	M+HCOO	1 075.527
10	Chonglouoside H	35.417	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₇	M+Na	893.454 6	M+HCOO	915.468 3
11	Polyphyllin VI	36.283	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₃	M+Na	761.409 4	M+HCOO	783.416 3
12	-	39.608	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	M+NH ₄	902.511 3	M+HCOO	929.484 7
13	-	41.511	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₃	M+Na	747.386 8	M+HCOO	769.406 4
14	Polyphyllin II	46.763	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₀	M+Na	1 037.507	M+HCOO	1 059.546
15	Reclinatoside	48.108	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₀	M+Na	1 023.496	M+HCOO	1 045.534
16	Dioscin	48.143	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	M+H	869.481 4	M+HCOO	913.495 9
17	Gracillin	48.716	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	M+H/Na	885.474 8/907.453 3	M+HCOO	929.488 4
18	Polyphyllin I	49.897	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	M+H/Na	855.479 0/877.451 1	M+HCOO	899.475 7
19	Polyphyllin V	52.085	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₃	M+H/Na	723.426 3/745.406 4	M+HCOO	767.431 6
20	-	57.898	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₂	M+H/Na	709.428 2/731.407 6	M+HCOO	753.411 7

-: Unnamed compound; Rt: Retention time; MF: Molecular formula

2.8.1 峰3和峰9同分异构体鉴别 在正、负离子模式质谱图上峰3分别为[M+H]⁺和[M-H]⁻峰,

峰9分别为[M+NH₄]⁺和[M+HCOO]⁻峰,通过Agilent MassHunter软件计算峰3和峰9具有相同

的分子式 $C_{51}H_{82}O_{21}$, 通过比对重楼的数据库, 发现这一组化合物为重楼皂苷 VII 及其同分异构体。经过查阅其结构式发现这一对同分异构体的差异仅表现在糖链中一个鼠李糖的连接位点不同, 因此质谱很难将其区分, 所以选择对照品重楼皂苷 VII 单独进样, 发现重楼皂苷 VII 的出峰位置和峰 9 吻合, 因此峰 9 为重楼皂苷 VII, 峰 3 为偏诺皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)- α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

2.8.2 峰 12 和峰 17 同分异构体鉴别 峰 12 在质谱图上分别表现为 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+HCOO]^-$, 峰 17 为 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M+HCOO]^-$, 通过 Agilent MassHunter 软件计算峰 12 和峰 17 具有相同的分子式 $C_{45}H_{72}O_{17}$, 为纤细薯蓣皂苷及其同分异构体。在正离子模式下峰 17 同时还出现了 723.43、577.38 和 415.33 的碎片离子, 推测其可能分别丢失了 1 个葡萄糖基、1 个葡萄糖基和 1 个鼠李糖基以及 2 个葡萄糖基和 1 个鼠李糖基, 这种结构和纤细薯蓣皂苷相吻合, 同时进样纤细薯蓣皂苷对照品, 其出峰位置刚好在峰 17 位, 因此推断峰 17 为纤细薯蓣皂苷, 峰 12 为偏诺皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 2)- α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

3 讨论

3.1 样品的采集 通过药代动力学实验发现, 重楼中的甾体皂苷在大鼠体内的达峰时间和平均滞留时间都非常长, 平均滞留时间高达 20 h, 因此我们在采集尿液时, 选择了 24 h 内的尿液, 以保证收集到足够的样品。

3.2 实验条件的优化 为了获得更高的灵敏度和比较好的色谱分离, 在方法的建立过程中, 考察了 3 种色谱柱: Agilent XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5.0 μ m), Agilent SB-C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5.0 μ m) 和 MG-C₁₈ 柱(3.0 mm \times 100 mm, 3.0 μ m), 考虑到保留时间和分离效果, 最终选择了 MG-C₁₈ 柱。流动相主要考察了甲醇-0.1% 甲酸水(V/V), 乙腈-水, 乙腈-0.1% 甲酸水(V/V), 结果表明乙腈-0.1% 甲酸水(V/V) 洗脱能力较强, 而且响应也高, 因此选择乙腈-0.1% 甲酸水(V/V) 为流动相。质谱条件考察了不同的雾化气压力(35 psi、40 psi 和 45 psi)、干燥气流速(9 L/min、10 L/min 和 11 L/min) 和碎片电压(90 V、120 V、150 V、180 V、210 V 和 240 V) 对实验结果的影响, 结果表明雾化气压力为 275.8 kPa(40 psi), 干燥气流速为 10 L/min, 碎片电

压 90 V(正离子模式)、180 V(负离子模式)时, 质谱信号最好。

3.3 样品的处理 生物基质样品处理的原则是在不损失待测成分的前提下尽可能降低干扰。在尿液的处理过程中我们考察了样品浓缩后直接进样、甲醇沉淀杂质后浓缩进样以及正丁醇液液萃取后浓缩进样, 发现水饱和的正丁醇萃取后进样能够减少杂质的干扰, 而且也不降低峰的响应, 因此最终选择用液液萃取处理样品。

本实验基于 HPLC-TOF/MS 建立了一整套生物基质样品采集、分离分析方法, 并成功地从大鼠尿液中鉴别出 20 种甾体皂苷类成分。此方法准确、可靠, 可为其他生物基质样品的分离分析提供有益的参考。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 243-244.
- [2] 刘圆, 张浩. 中国民族药理学概论[M]. 成都: 四川民族出版社, 2007: 246-250.
- [3] Sun J, Liu B R, Hu W J, Yu L X, Qian X P. *In vitro* anticancer activity of aqueous extracts and ethanol extracts of fifteen traditional Chinese medicine on human digestive tumor cell lines[J]. *Phytother Res*, 2007, 21: 1102-1104.
- [4] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, Yan L L, Ma C Y, Liu C X. Antitumor and antimetastatic activities of rhizoma *Paridis saponins*[J]. *Steroids*, 2009, 74: 1051-1056.
- [5] Yan L L, Zhang Y J, Gao W Y, Man S L, Wang Y. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of steroid saponins of *Paris polyphylla* var *yunnanensis*[J]. *Exp Oncol*, 2009, 31: 27-32.
- [6] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, Ma C Y, Yang L. *Paridis saponins* inhibiting carcinoma growth and metastasis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34: 43-50.
- [7] Zhao Y, Kang L P, Liu Y X, Liang Y G, Tan D W. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities[J]. *Planta Med*, 2009, 75: 356-363.
- [8] Cheng Z X, Liu B R, Qian X P, Ding Y T, Hu W J, Sun J, et al. Proteomics analysis of anti-tumor effects by rhizoma *Paridis* total saponin treatment in HepG2 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120: 129-137.