

· 药学基础 ·

基于模拟炮制技术探究远志炮制前后皂苷类成分转化规律

何梦娇, 庄梓鸣, 邢玥, 李浩然, 张学兰*, 赵鑫*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:探讨远志甘草汁煮和水煮前后皂苷类成分转化机制和含量变化规律。方法:采用模拟炮制技术制备远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII单体模拟甘草汁煮品和模拟水煮品,采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS)分析远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII单体模拟甘草汁煮品和模拟水煮品中的化学成分,采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(UPLC-QQQ-MS/MS)测定远志、甘草汁煮远志、水煮远志中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷的含量。结果:在甘草汁煮和水煮过程中,远志皂苷B可水解生成对甲氧基肉桂酸、desacysenegin III、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷;远志皂苷Z可水解生成3,4,5-三甲氧基肉桂酸、远志皂苷TF、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷;远志皂苷F可水解生成3,4,5-三甲氧基肉桂酸、远志皂苷G、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷;瓜子金皂苷XXVIII可水解生成细叶远志皂苷。远志经甘草汁煮和水煮后远志皂苷B含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),而远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);甘草汁煮品中远志皂苷Z和细叶远志皂苷含量较水煮品明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),以细叶远志皂苷含量变化最为显著,而远志皂苷B、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII在水煮品和甘草汁煮品中的含量无统计学差异。结论:甘草汁煮和水煮均可使远志中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII发生水解反应,通过脱糖生成次级苷和苷元(有机酸),从而导致远志炮制后皂苷类成分含量发生明显变化,且甘草汁可促进远志中某些皂苷水解为远志皂苷Z和细叶远志皂苷。本研究为揭示远志炮制机制提供了实验依据。

[关键词] 远志;皂苷类成分;模拟炮制;超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS);水解反应;甘草汁煮;减毒增效

[中图分类号] R22;R943.1;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)24-0169-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230867 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230427.1656.002>

[网络出版日期] 2023-04-28 10:53:50

Exploring of Transformation Rule of Saponins in Polygalae Radix Before and After Processing Based on Simulated Processing Technology

HE Mengjiao, ZHUANG Ziming, XING Yue, LI Haoran, ZHANG Xuelan*, ZHAO Xin*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the transformation mechanism and content variation of saponins from Polygalae Radix before and after being boiled with licorice juice and water. **Method:** Simulated licorice juice boiled products and simulated water boiled products of onjisaponin B, onjisaponin Z, onjisaponin F, polygalasaponin XXVIII were prepared by simulated processing technology, and analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-

[收稿日期] 2023-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82173974);国家中医药管理局中药炮制技术传承地项目(国中医药科技中药[2022]59号);国家重点研发计划项目(2018YFC1707204)

[第一作者] 何梦娇,在读博士,从事中药炮制原理与饮片质量控制研究, E-mail:17864190915@163.com

[通信作者] * 张学兰,硕士,教授,从事中药炮制原理与饮片质量控制研究, Tel:0531-89628081, E-mail:zhang8832440@sina.com;

* 赵鑫,博士,讲师,从事中药炮制原理与饮片质量控制研究, E-mail:zhaoxin151223@126.com

Exactive Orbitrap/MS)。Then the contents of onjisaponin B, onjisaponin Z, onjisaponin F, polygalasaponin X X VIII and tenuifolin in Polygalae Radix, licorice-boiled Polygalae Radix and water-boiled Polygalae Radix were determined by UPLC-triple quadrupole tandem mass spectrometry(UPLC-QQQ-MS/MS)。 **Result:** During the boiling process with licorice juice and water, onjisaponin B could be hydrolyzed to produce 4-methoxycinnamic acid, desacylsenegin III, polygalasaponin X X VIII and tenuifolin, onjisaponin Z could be hydrolyzed to produce 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid, onjisaponin TF, polygalasaponin X X VIII and tenuifolin, onjisaponin F could be hydrolyzed to produce 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid, onjisaponin G, polygalasaponin X X VIII and tenuifolin, and polygalasaponin X X VIII was hydrolyzed to produce tenuifolin. After being boiled with licorice juice or water, the content of onjisaponin B decreased significantly($P<0.05$, $P<0.01$), but the contents of onjisaponin Z, onjisaponin F, polygalasaponin X X VIII and tenuifolin increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$) in Polygalae Radix. Compared with the water-boiled products, the contents of onjisaponin Z and tenuifolin increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), and the change of tenuifolin content was the most significant in the licorice-boiled products. However, there was no significant difference in the content of onjisaponin B, onjisaponin F and polygalasaponin X X VIII between the water-boiled products and the licorice-boiled products. **Conclusion:** Being boiled with licorice juice or water can hydrolyze onjisaponin B, onjisaponin Z, onjisaponin F and polygalasaponin X X VIII, and generate secondary glycosides and aglycones(organic acids) through deglycosylation, which leads to obvious changes in the contents of onjisaponins after Polygalae Radix being processed. It is inferred that licorice juice can promote the hydrolysis of some onjisaponins in Polygalae Radix to onjisaponin Z and tenuifolin. This study provides an experimental basis for revealing processing mechanism of Polygalae Radix.

[Keywords] Polygalae Radix; saponins; simulated processing; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS); hydrolysis reaction; bioling with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma juice; reduce toxicity and increase effectiveness

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 或叶远志 *P. sibirica* 的干燥根,具有安神益智,交通心肾,祛痰,消肿的功效。远志生用有毒,明代《药品化义》记载“辛重暴悍,戟喉刺舌,与南星、半夏相类”^[1]。现代研究表明,长期过量服用生远志可导致实验动物的胃肠运动障碍和胃肠黏膜损伤^[2-3]。远志经甘草汁煮、甘草炆法炮制后毒性显著降低^[4-5],甘草汁煮和甘草炆还可增强远志的益智作用^[6-7],因此,远志一般需炮制后入药。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录了甘草汁煮远志。远志主要含有皂苷类、咕吨酮类、寡糖酯类、有机酸类等成分。远志皂苷是远志的主要活性成分,具有抗阿尔茨海默病、抗氧化、保护心脑血管作用,但同时也是远志的主要毒性成分^[8-9]。

目前多采用液相色谱-质谱联用法(LC-MS)定性分析远志炮制前后皂苷类成分的变化,证明远志经甘草汁煮制后,远志皂苷B、远志皂苷Gg、远志皂苷Wg、远志皂苷Vg含量降低,而细叶远志皂苷、远志皂苷K、瓜子金皂苷X X VIII含量升高^[10-12];或将样

品按2020年版《中国药典》用碱水解后正丁醇萃取再用高效液相色谱法(HPLC)测定远志炮制前后细叶远志皂苷含量^[13],但该方法不能反映远志炮制前后细叶远志皂苷含量的真实变化,且操作繁琐。本课题组前期测定了远志甘草汁蒸制过程中远志皂苷B和细叶远志皂苷含量^[14],并利用高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS)分析远志皂苷B模拟炮制后化学成分的变化^[15],结果表明远志皂苷B可水解为细叶远志皂苷。但缺乏远志炮制前后皂苷类成分转化规律的系统研究。本实验拟采用模拟炮制和超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS)研究远志甘草汁煮、水煮过程中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F及瓜子金皂苷X X VIII的转化机制,进一步采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(UPLC-QQQ-MS/MS)同时测定远志不同炮制品中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X X VIII、细叶远志皂苷的含量,为远志炮制原理、炮制工艺和质量标准研究提供实验依据。

1 材料

Ultimate 3000型超高效液相色谱仪、四极杆-静电场轨道阱型高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔公司), 1290型超高效液相色谱仪、6460型三重四极杆质谱仪(美国安捷伦科技公司), MS105DU型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒托利多公司), DS-Y500型粉碎机(上海顶帅电器有限公司), KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

远志皂苷B对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 MUST-21062911, 纯度 $\geq 99.1\%$), 远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII对照品(成都埃法生物科技有限公司, 批号分别为 AFBJ1306、AFBJ1305、AFBJ1302, 纯度均 $\geq 95\%$), 细叶远志皂苷对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号 R23N8F49013, 纯度 $\geq 98\%$), 水为屈臣氏饮用水, 甲酸、乙腈、甲醇均为质谱级, 其余试剂为分析纯。甘草饮片购自山东建联盛嘉中药有限公司(批号 20211001), 4批远志饮片分别购自山东百味堂中药饮片有限公司(批号 210701)、山东建联盛嘉中药有限公司(批号 20211103)、河北康派中药材有限公司(批号 A210801)、安国宏仁药业有限公司(批号 202103001-8), 经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定符合2020年版《中国药典》要求。

2 方法与结果

2.1 4种远志皂苷化合物模拟炮制品的定性分析

2.1.1 甘草汁的制备 称取净甘草片20 g, 加12倍量水, 煎煮2次, 一煎2 h, 二煎1 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至200 mL, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII对照品各1.0 mg, 精密称定, 分别加水溶解定容至2 mL量瓶中, 即得各对照品溶液。精密移取远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII对照品溶液各0.2 mL于1 mL量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.1.3 模拟炮制供试品溶液的制备 精密移取4份远志皂苷B对照品溶液各0.4 mL, 分别加甘草汁2 μ L, 100 $^{\circ}$ C水浴分别加热2、4、6、8 h, 放至室温后分别加水定容至1 mL量瓶中, 即得远志皂苷B模拟甘草汁煮2、4、6、8 h样品溶液。精密移取远志皂苷B模拟甘草汁煮不同时间样品溶液各0.2 mL, 加水定容至同一1 mL量瓶中, 摇匀, 用0.22 μ m微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得远志皂苷B模拟甘草汁煮供试品溶液。同法制得远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子

金皂苷XXVIII模拟甘草汁煮供试品溶液。将甘草汁替换为水, 其他操作同模拟甘草汁煮, 即得远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII模拟水煮供试品溶液。

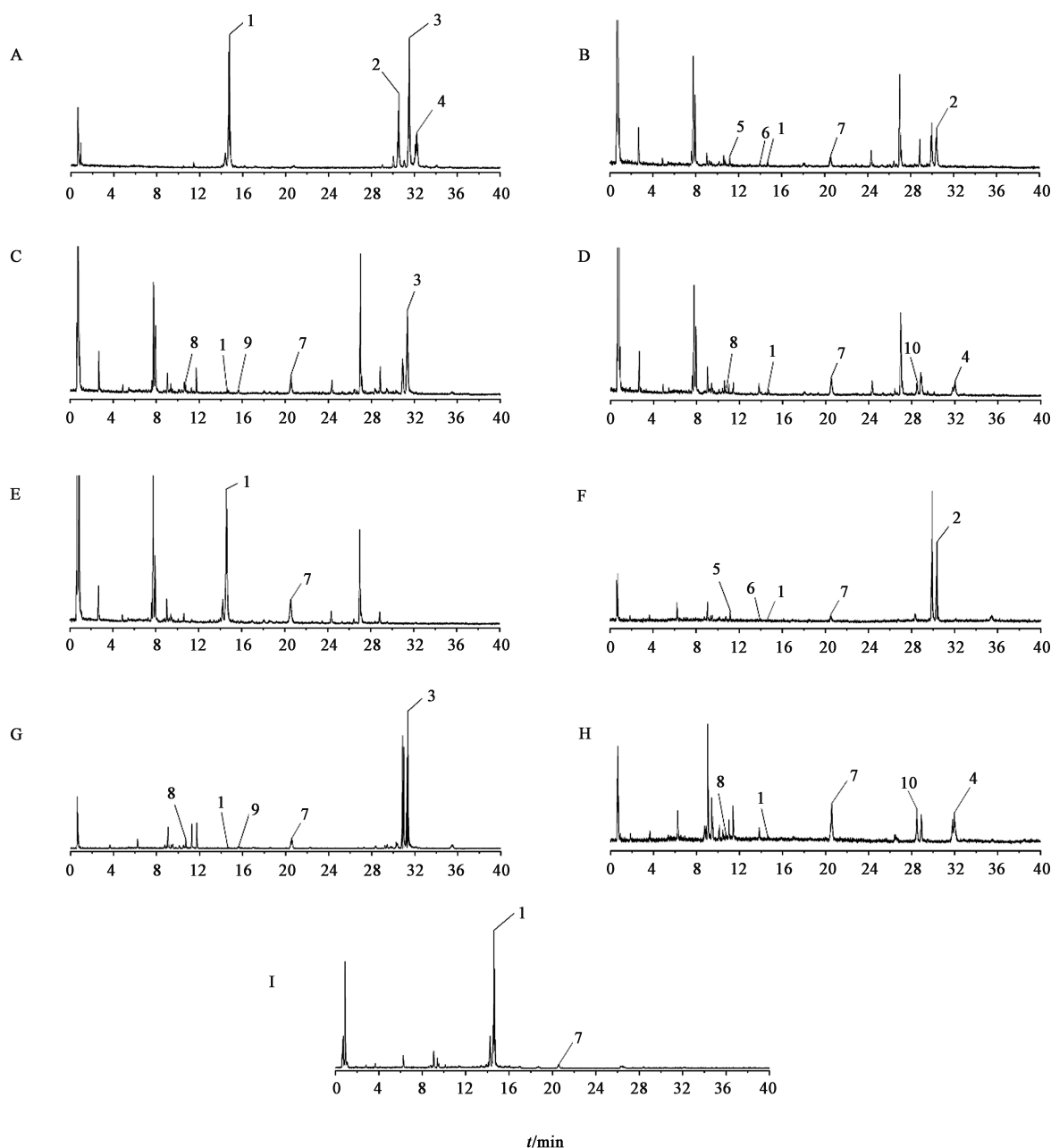
2.1.4 色谱条件 Halo C₁₈色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μ m), 流动相为0.05%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 5%~12% B; 5~10 min, 12%~25% B; 10~18 min, 25% B; 18~23 min, 25%~30% B; 23~28 min, 30%~37% B; 28~40 min, 37% B), 流速0.3 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温35 $^{\circ}$ C, 进样量5 μ L。

2.1.5 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 负离子模式检测, 采用一级质谱全扫描结合自动触发二级质谱(Full MS/dd-MS²)扫描模式, 质谱采集范围 m/z 130~1 950, 一级质谱分辨率70 000, 二级质谱分辨率17 500, 鞘气流速45 arb, 辅助气流速10 arb, 喷雾电压3.00 kV, 毛细管温度350 $^{\circ}$ C, 辅助气加热器温度350 $^{\circ}$ C, 高压环形离子导入装置电压55.0 V, 碰撞能量10、20、35 eV。

2.1.6 模拟炮制品成分鉴定 取2.1.2项下混合对照品溶液和远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII的模拟炮制供试品溶液, 按2.1.4和2.1.5项下条件检测, 得总离子流图, 见图1。应用Xcalibur 4.0软件对UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS结果进行分析, 通过比较测得精确分子量、出峰时间与对照品及文献进行比对, 鉴定结果见表1。结果在4种远志皂苷对照品模拟甘草汁煮和模拟水煮供试品中均检测出了其次级苷和苷元(有机酸), 表明远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXVIII在模拟炮制过程中发生了水解反应, 脱糖生成次级苷和苷元。在模拟甘草汁煮和模拟水煮过程中, 远志皂苷B水解生成对甲氧基肉桂酸、desacylsenegin III、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷, 远志皂苷Z水解生成3, 4, 5-三甲氧基肉桂酸、远志皂苷TF、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷, 远志皂苷F水解生成3, 4, 5-三甲氧基肉桂酸、远志皂苷G、瓜子金皂苷XXVIII、细叶远志皂苷, 瓜子金皂苷XXVIII水解生成细叶远志皂苷, 具体转化途径见增强出版附加材料。

2.2 远志不同炮制品中5种远志皂苷的定量分析

2.2.1 远志及其炮制品样品的制备 远志: 取远志饮片, 除去残留的木心。甘草汁煮远志: 取去心净远志50 g, 加甘草汁30 mL、水500 mL, 闷润1 h, 加热保持微沸状态, 每隔1 h, 加水500 mL, 煮8 h至汤液吸尽, 口尝无刺喉感, 取出, 50 $^{\circ}$ C烘干。水煮远



注:A.混合对照品;B.模拟甘草汁煮远志皂苷B;C.模拟甘草汁煮远志皂苷Z;D.模拟甘草汁煮远志皂苷F;E.模拟甘草汁煮瓜子金皂苷X XⅧ;F.模拟水煮远志皂苷B;G.模拟水煮远志皂苷Z;H.模拟水煮远志皂苷F;I.模拟水煮瓜子金皂苷X XⅧ;1.瓜子金皂苷X XⅧ;2.远志皂苷B;3.远志皂苷Z;4.远志皂苷F

图1 4种远志皂苷化合物模拟炮制供试品的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of simulated processing samples of four onjisaponins

志:将甘草汁替换为水,其余操作同甘草汁煮远志。

2.2.2 混合对照品溶液制备 分别取远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ、细叶远志皂苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成质量浓度分别为32.10, 20.00, 40.00, 32.40, 20.80 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称取各样品粉末0.2 g(过三号筛),置具塞锥形瓶中,精密加入50%

甲醇10 mL,称定质量,超声1 h,用50%甲醇补足损失质量,摇匀,5 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径6.24 cm),取上清液,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.4 色谱条件 采用Halo C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,2.7 μm),流动相0.05%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%~95%B),流速0.3 mL·min⁻¹,柱温35 °C,进样量5 μL。

表 1 4 种远志皂苷化合物模拟炮制品成分鉴定

Table 1 Identification of simulated processing samples of four onjisaponins

No.	<i>t_R</i> /min	化合物名称	分子式	离子模式	母离子 <i>m/z</i>	δ/ppm	碎片离子
1	14.58	瓜子金皂苷 X XⅧ	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₄	[M-H] ⁻	1 103.527 3	0.09	455.316 7、425.305 9、113.022 8
2	30.45	远志皂苷 B	C ₇₅ H ₁₁₂ O ₃₅	[M-H] ⁻	1 571.690 6	0.00	1 169.588 0、567.193 4、425.306 2
3	31.54	远志皂苷 Z	C ₇₁ H ₁₀₆ O ₃₂	[M-H] ⁻	1 469.657 3	1.09	1 245.598 5、1 007.525 9、425.305 6
4	32.07	远志皂苷 F	C ₇₅ H ₁₁₂ O ₃₆	[M-H] ⁻	1 587.683 2	1.45	1 557.671 6、1 126.565 4、425.306 6
5	11.14	对甲氧基肉桂酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	177.054 4	4.52	162.031 5、107.045 0、133.064 3
6	14.00	desacylsenegin Ⅲ ^[16]	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₃₃	[M-H] ⁻	1 411.638 5	0.21	1 249.584 7、455.314 4、425.305 6
7	20.60	细叶远志皂苷	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₂	[M-H] ⁻	679.368 1	1.91	455.313 2、425.305 3、167.321 5
8	10.72	3,4,5-三甲氧基肉桂酸	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	237.076 2	0.42	229.621 4、177.054 5、133.063 9
9	15.56	远志皂苷 TF ^[17]	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈	[M-H] ⁻	1 249.584 8	0.40	1 206.370 1、506.439 0、425.307 0
10	28.52	远志皂苷 G ^[18]	C ₇₀ H ₁₀₄ O ₃₂	[M-H] ⁻	1 455.640 3	1.99	710.248 7、455.319 6、425.304 5

2.2.5 质谱条件 采用电喷雾离子源,负离子模式检测,多重反应监测模式(MRM)扫描,干燥气流速 11 L·min⁻¹,干燥气温度 300 ℃,毛细管电压 4 kV,雾化器压力 30 psi(1 psi≈6.895 kPa)。5 个化合物测定的 MRM 参数见表 2,提取离子流图见增强出版附加材料。

表 2 5 种远志皂苷的 MRM 参数

Table 2 MRM parameters of five onjisaponins

化合物名称	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压/V	碰撞能/eV
远志皂苷 B	1 571.9	567.2	380	92
远志皂苷 Z	1 469.6	405.1	380	80
远志皂苷 F	1 587.4	455.5	380	88
瓜子金皂苷 X XⅧ	1 103.5	337.0	360	73
细叶远志皂苷	679.3	425.2	240	36

2.2.6 线性关系考察 精密移取 2.2.2 项下混合对

照品溶液,用 50% 甲醇稀释配制成系列浓度,远志皂苷 B 质量质量浓度分别为 32.10、6.420、1.284、0.256 8、0.192 6 mg·L⁻¹;远志皂苷 Z 质量浓度分别为 20.00、4.000、0.800 0、0.160 0、0.120 0 mg·L⁻¹;远志皂苷 F 质量浓度分别为 40.00、8.000、1.600、0.320 0、0.240 0 mg·L⁻¹;瓜子金皂苷 X XⅧ质量浓度分别为 32.40、6.480、1.296、0.259 2、0.194 4 mg·L⁻¹;细叶远志皂苷质量浓度分别为 20.80、4.160、0.832 0、0.166 4、0.124 8 mg·L⁻¹。按照 2.2.4 项下色谱条件和 2.2.5 项下质谱条件进样测定,以峰面积(*Y*)对进样浓度(*X*)进行线性回归,绘制标准曲线。将混合对照品溶液逐步稀释、测定,分别以信噪比为 3 和 10 时对照品浓度作为最低检测限和最低定量限。结果见表 3,结果表明 5 种化合物在各自的进样浓度范围内线性关系良好。

表 3 5 种远志皂苷线性关系考察

Table 3 Linear relationships of five onjisaponins

化合物名称	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg·L ⁻¹	最低检测限/μg·L ⁻¹	最低定量限/μg·L ⁻¹
远志皂苷 B	<i>Y</i> =320.28 <i>X</i> +147.32	0.999 6	0.192 6~32.10	4.89	14.29
远志皂苷 Z	<i>Y</i> =635.65 <i>X</i> +143.44	0.999 4	0.120 0~20.00	2.47	9.22
远志皂苷 F	<i>Y</i> =14.992 <i>X</i> +6.530 4	0.999 8	0.240 0~40.00	62.88	149.61
瓜子金皂苷 X XⅧ	<i>Y</i> =218.55 <i>X</i> +155.11	0.999 5	0.194 4~32.40	3.17	11.56
细叶远志皂苷	<i>Y</i> =861.48 <i>X</i> +1 035.7	0.999 5	0.124 8~20.80	0.29	0.93

2.2.7 精密度试验 取同一供试品溶液,按照 2.2.4 项下色谱条件和 2.2.5 项下质谱条件连续进样 6 次,分别记录远志皂苷 B、远志皂苷 Z、远志皂苷 F、瓜子金皂苷 X XⅧ、细叶远志皂苷的峰面积,计算相对标准偏差(RSD)分别为 1.64%、2.43%、2.14%、1.85%、2.20%。表明该仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,按照 2.2.4

项下色谱条件和 2.2.5 项下质谱条件分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样测定,结果远志皂苷 B、远志皂苷 Z、远志皂苷 F、瓜子金皂苷 X XⅧ、细叶远志皂苷峰面积 RSD 分别为 2.57%、2.36%、2.62%、2.21%、2.69%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一样品,平行 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.4 项下色谱条件和

2.2.5 项下质谱条件进样测定,结果远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ、细叶远志皂苷平均质量分数分别为378.90、12.04、1 018.35、355.61、29.48 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为2.42%、2.95%、2.39%、1.50%、2.01%,表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收试验 取已知含量的同一样品粉末,共6份,各约0.2 g,精密称定,分别加入混合对照品溶液1 mL(远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ、细叶远志皂苷的质量分数分别为55.00、2.50、180.00、60.00、6.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),按照2.2.3项下方法制备供试品溶液,按照2.2.4项下色谱条件和2.2.5项下质谱条件进样测定,计算加样回收率。结果远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ、细叶远志皂苷的平均回收率分别为97.82%、98.20%、96.77%、98.90%、97.29%, RSD 分别为2.40%、2.44%、1.70%、2.02%、1.54%。表明该方法回收率符合含量测定要求。

2.2.11 样品含量测定 取远志不同炮制品粉末各0.2 g,精密称定,按照2.2.3项下方法制备供试品溶液,平行制备3份,按照2.2.4项下色谱条件和2.2.5项下质谱条件进样测定,带入各化合物的回归方程,计算各样品中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ、细叶远志皂苷的质量分数,采用单因素方差分析对远志不同炮制品中5种远志皂苷质量分数进行差异比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。结果显示,远志经甘草汁煮和水煮后,远志皂苷B质量分数均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ、细叶远志皂苷质量分数均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与水煮品比较,甘草汁煮品中远志皂苷Z、细叶远志皂苷质量分数明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),以细叶远志皂苷质量分数增加最为显著,而远志皂苷B、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ质量分数变化无统计学意义。见表4。

表4 远志不同炮制品中5种远志皂苷质量分数比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Contents of five onjisaponins in different Polygalae Radix processed products ($\bar{x}\pm s$, $n=3$) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$							
No.	批号	样品	远志皂苷B	远志皂苷Z	远志皂苷F	瓜子金皂苷X XⅧ	细叶远志皂苷
1	210701	远志	352.53 $\pm$ 15.32	11.07 $\pm$ 0.41	1 020.69 $\pm$ 10.02	320.13 $\pm$ 6.71	29.69 $\pm$ 1.07
		水煮远志	295.97 $\pm$ 2.92 ¹⁾	12.26 $\pm$ 0.32 ²⁾	1 195.58 $\pm$ 11.54 ²⁾	346.05 $\pm$ 1.86 ²⁾	308.15 $\pm$ 1.62 ²⁾
		甘草汁煮远志	284.22 $\pm$ 9.27 ²⁾	13.29 $\pm$ 0.24 ^{2,3)}	1 222.61 $\pm$ 22.97 ²⁾	356.88 $\pm$ 3.95 ²⁾	349.43 $\pm$ 2.61 ^{2,4)}
2	20211103	远志	281.05 $\pm$ 10.32	13.69 $\pm$ 0.38	885.00 $\pm$ 18.75	297.02 $\pm$ 1.94	27.35 $\pm$ 1.06
		水煮远志	237.33 $\pm$ 8.60 ²⁾	15.14 $\pm$ 0.31 ²⁾	1 012.72 $\pm$ 18.52 ²⁾	354.85 $\pm$ 5.56 ²⁾	269.05 $\pm$ 4.86 ²⁾
		甘草汁煮远志	233.13 $\pm$ 4.24 ²⁾	16.33 $\pm$ 0.42 ^{2,3)}	1 023.52 $\pm$ 33.78 ²⁾	366.83 $\pm$ 10.85 ²⁾	339.89 $\pm$ 3.31 ^{2,4)}
3	A210801	远志	253.94 $\pm$ 4.73	20.96 $\pm$ 0.49	1 065.06 $\pm$ 38.30	339.94 $\pm$ 1.96	19.28 $\pm$ 0.48
		水煮远志	240.10 $\pm$ 2.18 ¹⁾	36.33 $\pm$ 0.24 ²⁾	1 183.90 $\pm$ 13.55 ¹⁾	354.49 $\pm$ 1.20 ¹⁾	298.83 $\pm$ 1.34 ²⁾
		甘草汁煮远志	238.00 $\pm$ 5.34 ¹⁾	37.57 $\pm$ 0.45 ^{2,3)}	1 235.75 $\pm$ 35.44 ²⁾	357.57 $\pm$ 5.42 ¹⁾	401.39 $\pm$ 1.35 ^{2,4)}
4	202103001-8	远志	246.00 $\pm$ 7.89	10.31 $\pm$ 0.55	824.22 $\pm$ 33.02	259.31 $\pm$ 6.08	9.86 $\pm$ 0.30
		水煮远志	224.25 $\pm$ 5.62 ¹⁾	17.16 $\pm$ 0.51 ²⁾	939.55 $\pm$ 21.70 ¹⁾	303.99 $\pm$ 5.61 ²⁾	260.79 $\pm$ 2.78 ²⁾
		甘草汁煮远志	219.93 $\pm$ 2.91 ¹⁾	18.87 $\pm$ 0.68 ^{2,3)}	951.35 $\pm$ 26.55 ¹⁾	311.59 $\pm$ 2.27 ²⁾	377.23 $\pm$ 5.44 ^{2,4)}

注:与同批次远志比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与同批次水煮远志比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

3 讨论

课题组前期曾尝试采用UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS技术只对远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ单体模拟炮制8 h产物进行分析,但发现瓜子金皂苷X XⅧ在远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F单体模拟炮制产物含量无法达到仪器的响应值,易忽略该皂苷的产生。因此,本研究合并了各单体分别模拟炮制2、4、6、8 h的产物作为供试品溶液进行成分鉴定。本研究采用UPLC-QQQ-MS/MS法同时测定远志不同炮制品中

远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ及细叶远志皂苷含量,结果表明,方法准确、灵敏、快速,可用于远志饮片的质量控制。

定性分析实验表明,在模拟甘草汁煮和模拟水煮过程中,远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷X XⅧ均转化为其分子量更小的次级苷和苷元(有机酸),说明远志皂苷中糖分子的半缩醛羟基与羧基形成的酯键以及不同糖分子半缩醛羟基之间形成的苷键不稳定,在甘草汁煮和水煮过程中易断裂,发生了水解反应,通过脱糖生成次级苷

和苷元(有机酸)。定量分析实验表明,远志经甘草汁煮和水煮后远志皂苷B含量明显降低,而远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXⅧ及细叶远志皂苷含量明显升高,说明远志甘草汁煮和水煮远志皂苷类成分发生了水解反应,生成了分子量更小的次级苷。与水煮品比较,甘草汁煮品中远志皂苷Z和细叶远志皂苷含量明显升高,表明甘草汁对远志中其他皂苷水解为远志皂苷Z以及细叶远志皂苷具有促进作用。

据文献报道,远志中的远志皂苷O、远志皂苷S含有远志皂苷Z母核,远志皂苷S、远志皂苷T含有远志皂苷F母核,远志中绝大多数四糖苷以上的皂苷类成分含有瓜子金皂苷XXⅧ和细叶远志皂苷母核^[19]。本研究表明,在模拟炮制过程中,远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F均可水解为瓜子金皂苷XXⅧ和细叶远志皂苷,瓜子金皂苷XXⅧ可水解为细叶远志皂苷。本课题组前期研究发现,细叶远志皂苷性质稳定,在甘草汁煮和水煮过程中未发生变化。远志经甘草汁煮和水煮后远志皂苷B含量明显降低,瓜子金皂苷XXⅧ、细叶远志皂苷含量明显增加,其原因可能是在甘草汁和水煮过程中,远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F等含有瓜子金皂苷XXⅧ和细叶远志皂苷母核的皂苷类成分发生了水解反应,生成瓜子金皂苷XXⅧ和细叶远志皂苷。远志经甘草汁煮和水煮后远志皂苷Z、远志皂苷F含量明显增加,推测原因可能是由于炮制过程中远志皂苷O、远志皂苷S、远志皂苷T等皂苷水解所致。

本研究发现,与水煮品比较,甘草汁煮品中远志皂苷Z和细叶远志皂苷含量明显升高,表明甘草汁对远志中某些皂苷水解为远志皂苷Z和细叶远志皂苷具有促进作用,其原因可能是因为甘草汁呈酸性(pH=5.7),与水比较,更利于某些皂苷类成分的水解。有文献报道远志炮制后细叶远志皂苷皂苷含量变化不大^[14],而本实验发现远志经甘草汁煮和水煮后细叶远志皂苷含量显著升高,推测其原因可能与供试品溶液的制备方法不同有关。文献[14]在供试品溶液制备时,加入了适量10%氢氧化钠溶液进行水解,碱水解法会使甘草汁煮远志和水煮远志中大对数皂苷类成分水解为细叶远志皂苷,从而掩盖远志炮制过程中细叶远志皂苷含量变化的真实情况。

中医传统理论认为,远志经甘草汁煮后可缓和燥性,消除麻味,并可增强安神益智作用,但其炮制

机理尚未阐明。研究表明,远志皂苷的毒性与糖基含量有关,远志皂苷B水解为细叶远志皂苷后胃肠毒性显著降低^[20]。对甲氧基肉桂酸可以改善认知障碍^[21],3,4,5-三甲氧基肉桂酸具有安眠作用^[22],细叶远志皂苷具有改善学习记忆、认知功能的作用^[23]。远志经甘草汁煮和水煮后,对甲氧基肉桂酸、3,4,5-三甲氧基肉桂酸含量显著升高^[24]。结合本研究结果,作者认为甘草制远志减毒增效与远志炮制后皂苷类成分水解密切相关。

综上所述,本研究基于模拟炮制和UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS分析了远志甘草汁煮和水煮过程中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXⅧ的转化机制,并采用UPLC-QQQ-MS/MS明确了远志不同炮制品中远志皂苷B、远志皂苷Z、远志皂苷F、瓜子金皂苷XXⅧ及细叶远志皂苷的含量差异,为揭示远志炮制原理,制定远志工艺和质量标准提供了重要依据。但由于对照品缺乏,远志炮制前后其他皂苷类成分转化规律尚不清楚;甘草汁在远志炮制过程中其他皂苷类成分转化中的作用还需进一步挖掘。后续将进一步研究远志炮制前后其他皂苷类成分转化规律,探讨皂苷类成分水解前后毒性和药效差异及甘草汁在远志炮制减毒增效中的作用机制,以期更深入阐释远志炮制减毒增效机理。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 贾所学. 药品化义[M]. 太原:山西科学技术出版社, 2009:29.
- [2] 王瑞,吴桐,刘悦,等. 远志和蜜远志对小鼠胃肠的急性毒性作用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(8):88-90.
- [3] 杨伟峰,王建,刘丽娜,等. 生远志及其总皂苷与蜜远志对大鼠胃肠电慢波的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3):28-31.
- [4] 王建,郭娟,武云. 远志不同炮制品对胃肠运动及消化功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3): 120-122.
- [5] CUI Y, ZHAO X, TANG Y, et al. Comparative study on the chemical components and gastrointestinal function on rats of the raw product and licorice-simmered product of *Polygala tenuifolia* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8855536.
- [6] 郭常润. 远志不同炮制品对东莨菪碱模型小鼠模型学习记忆的影响[J]. 山东化工, 2015, 44(4):10-12.

- [7] 赵鑫,崔月莉,吴鹏,等. 远志与炆远志对心肾不交失眠大鼠学习记忆,HPA轴功能及神经递质的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(11):147-154.
- [8] ZHAO X, CUI Y L, WU P, et al. Polygalae Radix: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics [J]. Fitoterapia, 2020, 147: 104759.
- [9] 高丽娜,周长征,刘青芝,等. 远志皂苷类化合物及其药理作用研究进展[J]. 北京联合大学学报:自然科学版,2022,36(3):58-64.
- [10] 王均秀,李慧芬,张学兰,等. 远志和制远志大孔树脂不同分离部位提取物总量及HPLC指纹图谱比较[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(8):1696-1698.
- [11] 孟艳,吴鹏,张学兰,等. 高效液相色谱-飞行时间质谱法快速鉴定远志生、制饮片的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(20):17-20.
- [12] 王雪洁,李震宇,薛水玉,等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究[J]. 中草药,2012,43(9):1727-1737.
- [13] 丁平平,易斌,陈华师,等. 基于化学成分变化对炆远志“减毒”效应研究[J]. 广东药科大学学报,2022,38(4):45-51.
- [14] 梁晓,张学兰,李慧芬,等. 甘草汁蒸制远志对远志皂苷B和细叶远志皂苷含有量的影响[J]. 中成药,2015,37(4):824-827.
- [15] 曲丛丛,吴鹏,张学兰,等. HPLC-TOF/MS法研究远志炮制过程中寡糖酯和皂苷类成分的转化机制[J]. 中药材,2018,41(3):576-580.
- [16] YOSHIKAWA M, MURAKAMI T, MATSUDA H, et al. Bioactive saponins and glycosides. II. Senegae Radix. (2): Chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin c, Z-senegasaponin c, and Z-senegins II, III, and IV. [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1996, 44(7):1305-1313.
- [17] LING Y, LI Z, CHEN M, et al. Analysis and detection of the chemical constituents of Radix Polygalae and their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 85:1-13.
- [18] LING Y, LI Z, CHEN M, et al. Analysis of multiple constituents in Cong-Ming-Tang, a Chinese herbal formula for the treatment of amnesia, by high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Phytochem Anal, 2013, 24(6):677-688.
- [19] LIU J, YANG X, HE J, et al. Structure analysis of triterpene saponins in *Polygala tenuifolia* by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2007, 42 (7) : 861-873.
- [20] WEN L, XIA N, TANG P, et al. The gastrointestinal irritation of polygala saponins and its potential mechanism *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:918048.
- [21] JEONG Y, BAE H J, PARK K, et al. 4-Methoxycinnamic acid attenuates schizophrenia-like behaviors induced by MK-801 in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 285: 114864.
- [22] LEE C I, HAN J Y, HONG J T, et al. 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic acid (TMCA), one of the constituents of Polygalae Radix enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic systems in mice [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(10):1244-1251.
- [23] 冯菲,李珩玉,赵宏伟,等. 细叶远志皂苷治疗痴呆的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 258-265.
- [24] 宋梦晗,吴鹏,张学兰,等. HPLC法比较远志3种炮制品中8种有机酸[J]. 中成药, 2016, 38(7): 1565-1569.

[责任编辑 李嘉麟]