

## UHPLC-MS 法鉴定大鼠灌服开心散后血中远志糖酯类化合物及其代谢产物

汪娜<sup>1</sup>, Hassan AHMAD<sup>1</sup>, 贾永明<sup>1</sup>, 薛迪<sup>1</sup>, Ram CHAULAGAIN<sup>1</sup>,  
黄树明<sup>2</sup>, 刘学伟<sup>1\*</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** 本研究利用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术 (UHPLC-TOF/MS), 借助液质联用工作站 Masslynx V4.1 分析软件, 结合现有文献及相关数据库, 鉴定了开心散 60% 乙醇提取物 (KXS-60% E) 中 20 个远志糖酯类成分; 在此基础上, 进一步指认并鉴定了灌服 KXS-60% E 后大鼠血中的 14 个远志糖酯类化合物及 4 个来源于远志糖酯类成分的代谢产物。以上研究结果表明, 远志糖酯类化合物及其代谢产物是 KXS-60% E 的主要血中移行成分, 原形及代谢产物可能是开心散防治 AD 的潜在药效物质基础。

**关键词:** 开心散; 血中移行成分; 远志糖酯; 代谢产物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1592-07

## Identification of polygala oligosaccharide esters and their metabolites in rat plasma after oral administration of ethanol extract of Kai Xin San by UHPLC-MS

WANG Na<sup>1</sup>, Hassan AHMAD<sup>1</sup>, JIA Yong-ming<sup>1</sup>, XUE Di<sup>1</sup>, Ram CHAULAGAIN<sup>1</sup>,  
HUANG Shu-ming<sup>2</sup>, LIU Xue-wei<sup>1\*</sup>

(1. Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Using a UHPLC-TOF/MS method combined with software of Masslynx V4.1 and database in the literatures, a total of 20 polygala oligosaccharide esters (POEs) were identified in 60% ethanol extract of Kai Xin San (KXS-60%E). Furthermore, 14 POEs as well as 4 POE-metabolites were identified in rat plasma. The results revealed that POEs and POE-metabolites which were identified in rat plasma, were key components in KXS-60%E and the potential bioactive compounds for KXS action in the treatment of AD.

**Key words:** Kai Xin San; blood transitional component; polygala oligosaccharide ester; metabolite

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-06-30.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81303248); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划 (UNPYSCT-2016116); 齐齐哈尔医学院校内博士创新基金资助项目 (QY2016B-09); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (H2015028); 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目 (2016-KYYWF-0865).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-452-2663804, E-mail: liuxuewei2001@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0373

开心散由“人参、远志、茯苓、石菖蒲”组成, 首见于唐代孙思邈的《备急千金要方》, 是治疗以“好忘”为主要症状的中医情志疾病的经典方剂。近年来研究证实, 开心散在治疗痴呆、抑郁及神经衰弱等疾病中具有明显的药理作用<sup>[1-4]</sup>, 且开心散的组成药物远志、石菖蒲、人参及茯苓在治疗痴呆类疾病中的使用频率明显高于其他药物<sup>[5]</sup>, 进一步提示该方具有防

治痴呆的药效学特征。

课题组近年来发现开心散 60%乙醇提取物 (KXS-60% E, 人参-茯苓-远志-石菖蒲比例为 3:3:2:2) 能明显缓解由  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ ) 引起的动物认知功能障碍、离体及在体细胞损伤、神经元凋亡及 LTP 抑制等<sup>[6-8]</sup>, 提示 KXS-60%E 中防治 AD 的药效活性成分客观存在。前期, 课题组建立了 KXS-60% E 体外成分的 UHPLC-MS 分析方法, 并对体外成分及大鼠灌服药物后含药血清样品进行了初步研究, 发现在 KXS-60% E 中远志对全方的贡献度最大<sup>[9, 10]</sup>, 但具体的化合物结构鉴定工作尚未进行。

糖酯类成分是远志中特有的一类成分, 该类成分以蔗糖为母核, 并以不同的糖苷键连接单糖。近年来对开心散中糖酯成分的活性研究逐渐引起人们的重视。研究表明, 糖酯类化合物可作为抗老化和脑保护新药开发的先导化合物<sup>[11]</sup>。Sibiricose A5、A6, 远志酮 III 和 3,6-二芥子酰基蔗糖酯等相继被证实为活性成分<sup>[12]</sup>。目前, 3,6-二芥子酰基蔗糖已收录于 2010 年《中国药典》, 作为评价远志药材质量标准的标志性成分, 提示糖酯类化合物可能是远志中重要的生物活性物质。

鉴于前期研究中 KXS-60% E 防治 AD 的药理作用及目前糖酯类化合物的药理活性, 有必要对 KXS-60% E 中远志糖酯类成分进行深入的研究。因此, 本研究在前期研究基础上, 进一步对大鼠口服 KXS-60% E 后的血清移行成分—远志糖酯类成分及代谢产物进行鉴定, 为糖酯类化合物的药理活性及开心散防治 AD 的直接药效物质基础提供实验依据。

## 材料与方法

**仪器** 美国 Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪 (四元梯度泵-在线真空脱气机-自动进样器-二极管阵列检测器-柱温箱); 美国 Waters LCT Premier XE 飞行时间质谱仪 (电喷雾离子源-正负离子扫描方法-Lockspray); MassLynx V4.1 工作站等。

**药品与试剂** 乙腈 (色谱级, 德国, Merck 公司); 甲醇 (色谱级, 美国, Fisher 公司); 蒸馏水 (中国, 广州屈臣氏食品饮料有限公司); 甲酸 (色谱级, 中国, 天津科密欧化学试剂有限公司); KXS-60% E 由课题组前期制备<sup>[9]</sup>。

**实验动物** Wistar 大鼠, 雄性, 体重 220~240 g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供 (清洁级, 许可证号为: SCXK 沪 2006-003), 室温饲养, 自由摄

食饮水。于实验前 12 h 禁食不禁水。

**空白及含药血清样品的制备** 雄性 Wistar 大鼠 10 只, 随机分为空白组及给药组。给药组按 5.4 g·kg<sup>-1</sup> 体重灌服 KXS-60% E 药粉 (用蒸馏水按 1.08 g·mL<sup>-1</sup> 浓度配制, 超声混匀), 给药 30 min 后采用乙醚吸入麻醉法, 待动物麻醉后, 自眼底留取静脉血 1.5 mL, 4℃、13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 分离获得含药血清备用。空白组给予同体积蒸馏水, 采用相同方法制备空白血清。取大鼠空白血清及给药血清各 0.5 mL 上样到预先以甲醇 2 mL、水 2 mL 活化平衡好的 SPE 柱上, 分别以水 4 mL 和甲醇 2 mL 淋洗, 淋洗液弃去, 再以甲醇 3 mL 洗脱, 收集洗脱液, 35℃下空气流吹干, 残渣用流动相 100  $\mu$ L 复溶, 超声 1 min, 再混悬振荡 30 s 后于 4℃、13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上层清液, 进样 2  $\mu$ L 供 UHPLC 分析。

**色谱条件**<sup>[9]</sup> 色谱柱: ACQUITY UPLC™ BEH C18 column (50 mm×2.1 mm ID, 1.7  $\mu$ m); 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 流动相: A: 0.1% 甲酸-水溶液, B: 0.1% 甲酸-乙腈溶液; 流动相梯度洗脱: 0~5 min, 5%~30% A; 5~12 min, 30%~50% A; 12~15 min, 50%~80% A; 15~16 min, 80%~100% A; 柱温: 40℃; 进样体积: 2  $\mu$ L。

**质谱条件**<sup>[9]</sup> 电喷雾离子源 (ESI), 采用正负离子扫描检测; 毛细管电压为 1 000 V; 样本锥孔电压为 40 V; 离子源温度为 100℃; 脱溶剂温度为 350℃; 脱溶剂气流量扫描为 700 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流量为 10 L·h<sup>-1</sup>; 微通道板电压为 2 300 V, 扫描时间为 0.3 s; 准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽 (leucine-enkephalin, [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  556.277 1), 浓度为 1.0 ng·mL<sup>-1</sup>, 校正溶液进样速度为 30  $\mu$ L·min<sup>-1</sup>, 校正频率为 15 s; 扫描方式为全扫描, 质量扫描范围  $m/z$  100~2 000。

**远志糖酯类成分的结构鉴定** UHPLC-TOF-MS 检出的信息可以确定化合物的分子质量及色谱峰的来源归属, 能够界定化合物的检索范围。对单个化合物进行 Q-TOF-MS/MS 扫描可以获得碎片离子信息。同时, 利用 Masslynx V 4.1 的数据平台, 可以确定其分子式的可能组成。在鉴定时, 利用化合物的精确分子质量或分子式检索现有的化合物, 综合对比化合物的归属、母离子、子离子的信息, 并参考相关研究的文献, 确定化合物的结构。

## 结果

### 1 开心散中远志糖酯类成分的鉴定

在 KXS-60% E 色谱峰中, 鉴定了全部 20 个远志

糖酯类成分 (图 1a, b)。根据结构不同分为两类: 母核中含有 2 个单糖的蔗糖酯 (图 1c) 和 3 个以上的寡糖酯 (图 1d)。其主要化合物鉴定信息及分子组成等见表 1。

## 2 开心散中远志糖酯类成分及其代谢物入血成分鉴定

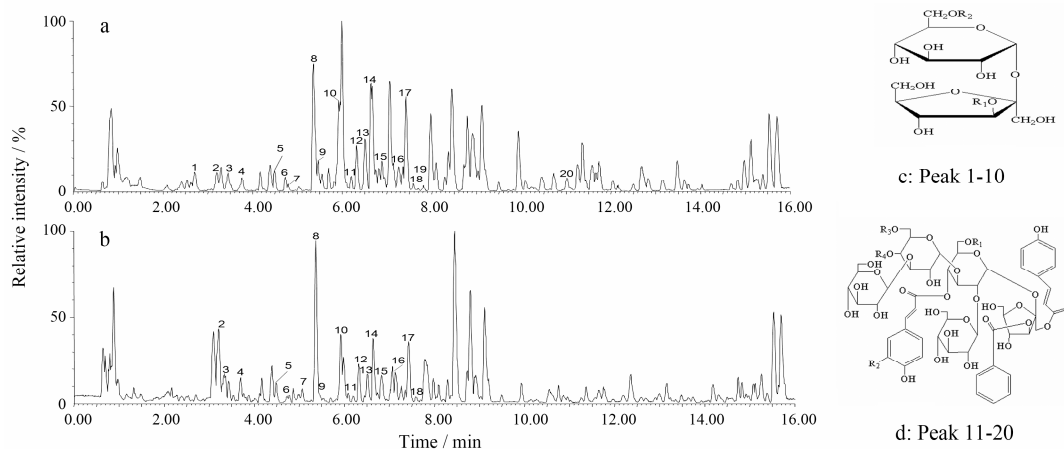
通过对比分析含药血清、空白血清中色谱峰的保留时间及质谱数据, 结合体外成分分析, 发现 Peak 1~5、8、10~14、16~18 均以原形成分吸收入血 (图 2、表 1), 另发现 4 个代谢产物 (图 2、表 2)。

代谢产物的结构鉴定与原形成分鉴定略有不同。以 M3 为例, 在负正模式下分别以  $m/z=283$   $[M+HCOO]^-$  及  $m/z=239$   $[M+H]^+$  被检出, 其分子质量可以确定为 238。利用 Masslynx V 4.1 的数据平台中“Elemental composition”功能, 可以推测其分子组成是  $C_{12}H_{14}O_5$  (i-Fit=0) 和  $C_{19}H_{11}$  (i-Fit=3.3)。二级质谱数据中, M3 在正离子模式下给出的数据是  $m/z=223$  和  $m/z=209$ 。分析这些离子碎片, 发现与 3,4,5-三甲氧基肉桂酸 (3,4,5-trimethoxycinnamylc acid) 离子裂解后碎片所

产生的离子峰相符, 离子碎片 223 是该化合物羧基被还原成醛基, 209 是进一步脱去了甲基而形成的羟基, 因此, M3 被确定为 3,4,5-三甲氧基肉桂酸。通过这种方式, 鉴定了其余的 3 个代谢产物, 化合物的相应信息见表 2。

## 讨论

本研究鉴定了开心散醇提取物中的远志糖酯类成分, 并对该类成分的大鼠血中移行情况进行分析。研究表明, 鉴定的 20 个糖酯类化合物主要分为两类: 母核中含有 2 个单糖的蔗糖酯和 3 个单糖以上的寡糖酯。体外成分分析中两类成分的色谱峰集中分布, 提示能够通过改变不同的溶液浓度, 实现对组分的进一步细化与富集。体内分析结果显示, 有 14 个原形成分是大鼠血中移行成分, 占体外该类成分的 70%, 提示该类成分是开心散醇提取物中的主要入血成分, Liu<sup>[13]</sup>的研究结果也显示, 在灌服了开心散水提取物的大鼠血清中, 有 8 个寡糖酯类成分被吸收入血, 与本研究结果相似。而对开心散的水提取物



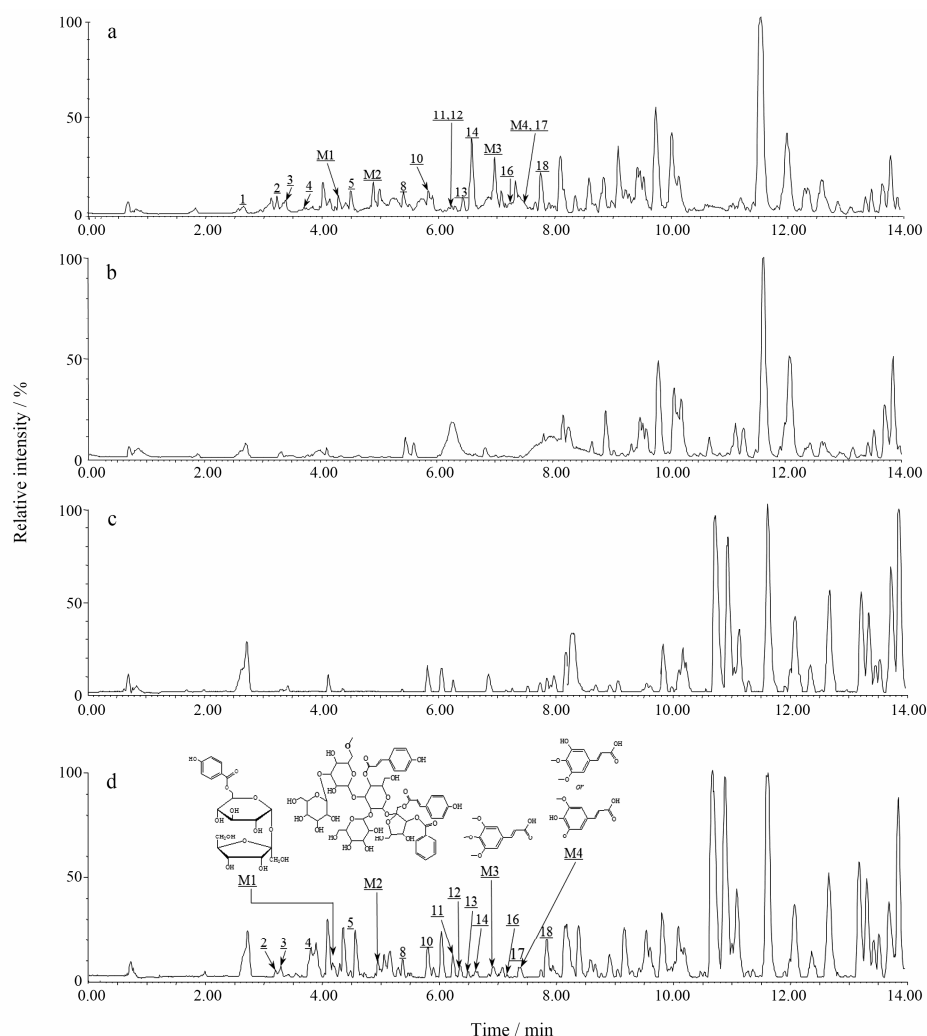
**Figure 1** The UHPLC-MS chromatograms of polygala oligosaccharide esters (POEs) in KXS-60% E *in vitro*. a: ESI<sup>-</sup>; b: ESI<sup>+</sup>; c: Chemical structure of sucrose esters; d: Chemical structure of oligosaccharides. The number of Peak 1–20 in this figure was consistent with that in Table 1

**Table 1** Characterization of 20 POEs in KXS-60% E by UHPLC-MS/MS. HB: *p*-Hydroxy-benzoyl; MHC: 3-Methoxy-4-hydroxy-cinnamoyl; HDC: 4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-cinnamoyl; TMC: 3,4,5-Trimethoxy-cinnamoyl; HC: 4-Hydroxy-cinnamoyl; Ac: Acetyl; Glu: Glucose; HHC: 4-Hydroxy-3-hydroxymethyl-cinnamoyl; \*Detected in rat plasma

No.	Identified compound	$t_R$ /min	$[M+HCOO]^-$ ( $m/z$ )			ESI-MS/MS (-) ( $m/z$ )	ESI-MS/MS (+) ( $m/z$ )	Elemental composition	Substituent Group
			Measured	Calculated	$\Delta$ (ppm)				
1*	Sibiricose A3	2.64	507.136 5	507.135 0	3.0	507 $[M+HCOO]^-$ ; 323 $[M-H-HB]^-$ ; 137 $[HB-H]^-$	—	$C_{19}H_{26}O_{13}$	$R_1=H$ , $R_2=HB$
2*	Arillanin C	3.30	563.159 0	563.161 2	-3.9	563 $[M+HCOO]^-$ ; 323 $[M-H-MHC]^-$	519 $[M+H]^+$ ; 325 $[M+H-MHC]^+$	$C_{22}H_{30}O_{14}$	$R_1=HDC$ , $R_2=H$
3*	Sibiricose A6	3.43	593.173 8	593.171 8	3.4	593 $[M+HCOO]^-$ ; 323 $[M-H-TMC]^-$ ; 223 $[TMC-H]^-$	549 $[M+H]^+$ ; 325 $[M+H-TMC]^+$	$C_{23}H_{32}O_{15}$	$R_1=HDC$ , $R_2=H$

No.	Identified compound	$t_R$ /min	[M+HCOO] <sup>-</sup> ( $m/z$ )			ESI-MS/MS (-) ( $m/z$ )	ESI-MS/MS (+) ( $m/z$ )	Elemental composition	Substituent Group
			Measured	Calculated	$\Delta$ (ppm)				
4 <sup>*</sup>	Sibiricoside A1	3.76	593.171 6	593.171 8	-0.3	593 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 323 [M-H-TMC] <sup>-</sup> ; 223 [TMC-H] <sup>-</sup>	549 [M+H] <sup>+</sup> ; 325 [M+H-TMC] <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =HDC
5 <sup>*</sup>	Sibiricoside A2	4.53	607.187 0	607.187 4	-0.7	607[M+HCOO] <sup>-</sup> ; 223 [TMC-H] <sup>-</sup> ; 323 [M-H-TMC] <sup>-</sup>	563 [M+H] <sup>+</sup> ; 339 [M+H-TMC] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	R <sub>1</sub> =TMC, R <sub>2</sub> =H
6	Tenuifolioside B	4.73	713.192 4	713.192 9	-0.7	713 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 323 [M-H-HB-HDC] <sup>-</sup>	669 [M+H] <sup>+</sup> ; 549 [M+H-HB] <sup>+</sup> ; 325 [M+H-HB-HDC] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>17</sub>	R <sub>1</sub> =HDC, R <sub>2</sub> =HB
7	3,6-Disinapoylsucrose & Sibiricoside A4	4.80	799.225 7	799.229 7	-5.0	799 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 323 [M-H-2HDC] <sup>-</sup>	755 [M+H] <sup>+</sup> ; 549 [M+H-HDC] <sup>+</sup> ; 325 [M+H-2HDC] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =HDC
8 <sup>*</sup>	Sibiricoside A4 & 3,6-Disinapoylsucrose	5.36	799.233 1	799.229 7	4.3	799 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 547 [M-H-HDC] <sup>-</sup> ; 323 [M-H-2HDC] <sup>-</sup>	755 [M+H] <sup>+</sup> ; 549 [M+H-HDC] <sup>+</sup> ; 325 [M+H-2HDC] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =HDC
9	Arillanin A	5.47	769.220 1	769.219 1	1.3	769 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 499 [M-H-HDC] <sup>-</sup> ; 529 [M-H-MHC] <sup>-</sup> ; 323 [M-H-HDC-MHC] <sup>-</sup>	725 [M+H] <sup>+</sup> ; 325 [M+H-HDC-MHC] <sup>+</sup>	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>18</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =HDC
10 <sup>*</sup>	Tenuifolioside A	5.89	727.209 0	727.208 6	0.6	727 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 543 [M-H-HB] <sup>-</sup> ; 443 [M-H-TMC] <sup>-</sup>	683 [M+H] <sup>+</sup> ; 545 [M+H-HB] <sup>+</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>	R <sub>1</sub> =TMC, R <sub>2</sub> =HB
11 <sup>*</sup>	Tenuifolioside K	6.20	1 311.382 1	1 311.382 7	-0.4	1 311 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 119 [M-H-HC] <sup>-</sup> ; 1 077 [M-H-HC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	1 267 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 121 [M+H-HC] <sup>+</sup> ; 1 079 [M+H-HC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>57</sub> H <sub>70</sub> O <sub>32</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =H, R <sub>2</sub> =Ac
12 <sup>*</sup>	Tenuifolioside C & Tenuifolioside E	6.37	1 341.392 4	1 341.393 2	-0.5	1 341 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 119 [M-H-MHC] <sup>-</sup>	1 297 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 121 [M+H-MHC] <sup>+</sup> ; 1 079 [M+H-MHC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>58</sub> H <sub>72</sub> O <sub>33</sub>	R <sub>1</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =H
13 <sup>*</sup>	Tenuifolioside I or Tenuifolioside J	6.52	1 353.389 1	1 353.393 2	-3.0	1 353 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 119 [M-H-HC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 1 101 [M-H-HC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	1 309 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 163 [M+H-HC] <sup>+</sup> ; 1 121 [M+H-HC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 1 103 [M+H-HC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>61</sub> H <sub>96</sub> O <sub>30</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =R <sub>4</sub> =H
14 <sup>*</sup>	Tenuifolioside B & Tenuifolioside D	6.59	1 383.404 0	1 383.403 8	0.2	1 383 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 337 [M-H] <sup>-</sup> ; 1 161 [M-H-MHC] <sup>-</sup> ; 1 119 [M-H-MHC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 1 077 [M-H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 973 [M-H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-(HB-OH)] <sup>-</sup>	1 339 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 163 [M+H-MHC] <sup>+</sup> ; 1 121 [M+H-MHC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 1 079 [M+H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>60</sub> H <sub>74</sub> O <sub>34</sub>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =Ac
15	Tenuifolioside C & Tenuifolioside E	6.75	1 341.392 8	1 341.393 2	-0.2	1 341 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 119 [M-H-MHC] <sup>-</sup>	1 297 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 121 [M+H-MHC] <sup>+</sup> ; 1 079 [M+H-MHC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>58</sub> H <sub>72</sub> O <sub>33</sub>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> =Ac, R <sub>4</sub> =Glu
16 <sup>*</sup>	Tenuifolioside B & Tenuifolioside D	7.13	1 383.404 5	1 383.403 8	-0.3	1 383 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 161 [M-H-MHC] <sup>-</sup> ; 973 [M-H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-(HB-OH)] <sup>-</sup>	1 339 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 163 [M+H-MHC] <sup>+</sup> ; 1 079 [M+H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>60</sub> H <sub>74</sub> O <sub>34</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> =H
17 <sup>*</sup>	Tenuifolioside A	7.43	1 425.414 0	1 425.414 4	-0.3	1 425 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 379 [M-H] <sup>-</sup> ; 1 203 [M-H-HHC] <sup>-</sup>	1 381 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 205 [M+H-HHC] <sup>+</sup> ; 1 163 [M+H-HHC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 1 179 [M+H-HHC-3C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>62</sub> H <sub>76</sub> O <sub>35</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub> OH
18 <sup>*</sup>	Reinioside J	7.59	1 383.401 6	1 338.403 8	-1.8	1 383 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 161 [M-H-MHC] <sup>-</sup>	1 339 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 163 [M+H-MHC] <sup>+</sup> ; 1 297 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 1 079 [M+H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>60</sub> H <sub>74</sub> O <sub>34</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> =H
19	Tenuifolioside I & Tenuifolioside J	7.80	1 353.394 0	1 353.393 2	0.3	1 353 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 161 [M-H-HC] <sup>-</sup> ; 1 119 [M-H-HC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 1 101 [M-H-HC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	C <sub>61</sub> H <sub>96</sub> O <sub>30</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>4</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H,
20	Tenuifolioside N	11.02	1 455.420 5	1 455.424 9	-3.8	1 455 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 1 233 [M-H-MHC] <sup>-</sup> ; 1 191 [M-H-MHC-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 1 149 [M-H-MHC-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	C <sub>63</sub> H <sub>78</sub> O <sub>36</sub>	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =Ac, R <sub>2</sub> =O

Continued



**Figure 2** The POEs and POE-metabolites in rat plasma after oral administration of KXS-60% E. a: Control, ESI<sup>-</sup>; b: KXS, ESI<sup>-</sup>; c: Control, ESI<sup>+</sup>; d: KXS, ESI<sup>+</sup>; M: POE-metabolites. The number of peak 1–5, 8, 10–14, 16–18 in this figure was consistent with that in Table 1, while M1–M4 was consistent with that in Table 2

**Table 2** Characterization of POE-metabolites in rat plasma by UPLC-MS/MS

No.	Identified compound	<i>t<sub>R</sub></i> /min	[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )			ESI-MS/MS (-) ( <i>m/z</i> )	ESI-MS/MS (+) ( <i>m/z</i> )	Elemental composition
			Measured	Calculated	Δ(ppm)			
M1	Tenuifoliside B-(HDC)	4.29	463.144 8	463.145 2	-1.8	507 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 137 [HB-H] <sup>-</sup>	463 [M+H] <sup>+</sup> ; 325 [M-HB+H] <sup>+</sup> ; 139 [HB+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>
M2	Tenuifolioside K-(CH <sub>2</sub> O)	4.90	1 239.396 0	1 239.397 9	-3.4	1 237 [M-H] <sup>-</sup> ; 1 136 [M-H-C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O+H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 1 034 [M-H-2C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O+H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	1 239 [M+H] <sup>+</sup> ; 1 138 [M+H-C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 1 036 [M+H-2C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>56</sub> H <sub>70</sub> O <sub>31</sub>
M3	3,4,5-Trimethoxycinnamyl acid	6.92	239.091 0	239.091 9	-3.8	283 [M+HCOO] <sup>-</sup> ; 237 [M-H] <sup>-</sup> ; 221 [M-O-H] <sup>-</sup>	239 [M+H] <sup>+</sup> ; 223 [M-O+H] <sup>+</sup> ; 209 [M-O-CH <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
M4	3,4,5-Trimethoxycinnamyl acid-(CH <sub>2</sub> )	7.35	225.074 1	225.076 3	-4.1	223 [M-H] <sup>-</sup> ; 209 [M-O+H] <sup>+</sup> ; 269 [M+HCOO] <sup>-</sup>	225 [M+H] <sup>+</sup> ; 209 [M-O+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>

研究结果显示, 在开心散中有 26 个原形成分被吸收入血, 主要以人参皂苷为主, 而血中检测到的 3 个代谢物也主要来源于人参皂苷, 这与本研究的分析结果存在着一定差异<sup>[14, 15]</sup>, 可能是由于提取物不同及检测条件与方法上的差异而引起的, 提示在药效物质基础判定应充分建立在药理学基础之上。

寡糖酯类成分是远志中特有的一类糖酯类成分, 该类成分以蔗糖为母核, 并以不同的糖苷键连接单糖 (以葡萄糖为主, 少数为鼠李糖)。Yang 等<sup>[11]</sup>的研究结果表明, 寡糖酯类化合物可能是远志中主要的生物活性物质, 并可作为抗老化和脑保护新药开发的先导化合物。近年来对开心散中寡糖酯的活性研

究逐渐引起人们的重视,石任兵教授所领导的课题组<sup>[12,16]</sup>研究发现,开心散中 sibiricose A5、A6, 远志酮III和 3,6-二芥子酰基蔗糖等均为有效成分,并建立了开心散类药有效组分的远志特征图谱质量表征方法,并分别对 3,6-二芥子酰基蔗糖等进行了药动学研究,为该类研究提供了可供借鉴的方法,也反映出远志中寡糖酯类成分的潜在的活性作用。目前,3,6-二芥子酰基蔗糖已收录于 2010 年《中国药典》,作为评价远志药材质量标准的标志性成分。

值得注意的是,糖酯类成分存在于多种植物中,但母核结构中含有三糖及以上的寡糖多酯,只在远志属植物中被发现,因此有研究认为,该类成分可能具有某些特殊的药理作用<sup>[17]</sup>。本研究结果表明, tenuifoliside A、tenuifoliside C (E)、tenuifoliose B (D)、tenuifoliside K 及 tenuifoliside I (J) 是药物的吸收入血成分,有些化合物已被证实具有明显的生物活性,如 tenuifoliside A 可以促进原代培养大鼠海马神经元的存活,具有神经营养作用,其机制可能与激活 Trek/BDNF/ERK 循环通路有关<sup>[18]</sup>。Tenuifoliside B 能够通过增强胆碱能系统而改善东莨菪碱诱导的小鼠/大鼠被动回避行为的损伤,提示 tenuifoliside B 是增强认知功能和脑保护作用的活性成分<sup>[19]</sup>。

值得一提的是,代谢产物 3,4,5-trimethoxycinnamyllic acid 及 3,4,5-trimethoxycinnamyllic acid -(CH<sub>2</sub>) 既是远志皂苷类如 onjisaponin G、E 的代谢产物,又是远志糖酯类成分如 sibiricose A1、sibiricose A6、tenuifoliside B、3,6'-disinapoyl sucrose 和 arillanin A 的代谢产物,研究表明,二者均易透过胃肠单层细胞膜,在大鼠体内吸收良好,生物利用度高,且活性作用已有部分阐明,因此,应进一步对其作用机制进行深入分析,以全面阐明开心散及远志的直接药效物质基础。

## References

- [1] Chu H, Zhang A, Han Y, et al. Metabolomics approach to explore the effects of Kai-Xin-San on Alzheimer's disease using UPLC/ESI-Q-TOF mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1015-1016: 50-61.
- [2] Lin Z, Gu J, Xiu J, et al. Traditional Chinese medicine for senile dementia [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2012, 2012: 692621-692633.
- [3] Sun ZK, Yang HQ, Chen SD. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Transl Neurodegener, 2013, 2: 6.
- [4] Yan L, Hu Q, Mak MS, et al. A Chinese herbal decoction, reformulated from Kai-Xin-San, relieves the depression-like symptoms in stressed rats and induces neurogenesis in cultured neurons [J]. Sci Rep, 2016, 6: 30014.
- [5] May BH, Lu C, Lu Y, et al. Chinese herbs for memory disorders: a review and systematic analysis of classical herbal literature [J]. J Acupunct Meridian Stud, 2013, 6: 2-11.
- [6] Li Y, Liu B, Liu XW, et al. Mechanism research of Kai-xin granule on A $\beta$ -induced cognitive impairment in rats [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2016, 33: 34-37.
- [7] Wen W, Zhang C, Liu M, et al. The protective effect of the serum containing drugs of Kaixin san against A $\beta$ -induced toxicity in PC12 cells [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2012, 29: 80-81.
- [8] Huang SM, Ren LM, Li JY, et al. Kaixin san improving A $\beta$ <sub>1-42</sub> inhibition *in vivo* hippocampal LTP [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2013, 30: 61-63.
- [9] Liu XW, Liu S, Huang SM, et al. Plasma pharmacochimistry study of effective extractive from Kai-xinsan on Alzheimer's disease [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 179-183.
- [10] Liu XW, Zhang B, Wang N, et al. Research overview of Kai xinsan in preventing and treating AD based on serum pharmacochimistry of TCM [J]. Acta Chin Med and Pharm (中医药学报), 2016, 44: 101-104.
- [11] Yang XD, Zhang L, Liang B, et al. Oligosaccharide esters isolated from plants of Polygalaceae [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33: 954-958.
- [12] Jiang YY, Dai Y, Ba YY, et al. Quality representation of Yuanzhi (Radix Polygalae) based on characteristic chromatograms of drug-like effective components of Kai Xin San-Yuanzhi [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2011, 34: 544-547.
- [13] Liu CF, Yang WZ, Liu KD, et al. Characterization of chemical constituents and *in vivo* metabolites of Kai-Xin-San prescription by HPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> [J]. J Chin Pharm Sci, 2012, 21: 569-576.
- [14] Lü CX, He BS, Sui ZY, et al. Identification and determination of the major constituents in Kai-Xin-San by UPLC-Q/TOF MS and UFLC-MS/MS method [J]. J Mass Spectrom, 2016, 51: 479-490.
- [15] Zhang XW, Li Q, Lü CX, et al. Characterization of multiple constituents in Kai-Xin-San prescription and rat plasma after oral administration by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2015, 38: 2068-2075.
- [16] Ba YY, Jiang YY, Liu Y, et al. Comparative pharmacokinetics

- of 3,6'-disinapoyl sucrose after oral administration of pure 3,6'-disinapoyl Sucrose, Radix Polygalae extract and Kaixinsan in acquired dysmnesia model rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 138–142.
- [17] Li CJ. The Bioactivity of Chemical Constituents in *Polygala tenuifolia* and *Polygala glomerata* Lour (远志和华南远志的化学成分及其生物活性研究) [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2008.
- [18] Yu BY. The Mechanism of Antidepressive Effects by Kai-Xin-San on CMS rats and Studies on Neuroprotective Effects of Tenuifoliside A via ERK and PI3K Pathway (开心散治疗 CMS 抑郁模型大鼠的作用机制及活性成分 Tenuifoliside A 基于 ERK 和 PI3K 通路介导的神经保护机制研究) [D]. Zhangjiakou: Hebei North University, 2013.
- [19] Ikeya Y, Takeda S, Tunakawa M, et al. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 1081–1085.