

人参次苷 H 滴丸原料药中皂苷含量测定及细胞膜色谱技术对效应成分筛选

马晓伟¹, 于蒙蒙¹, 晋兴华², 何嘉辉¹, 徐亮³, 何毅⁴, 聂朝宏⁵, 宋兆辉^{4*}, 肖学风^{1*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

3. 天津医学高等专科学校 健康教育与技术服务中心, 天津 300222

4. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

5. 北京四环制药有限公司 临床开发中心, 北京 101113

摘要: 目的 建立高效液相色谱串联三重四级杆质谱法 (HPLC-MS/MS) 测定人参次苷 H 滴丸 (SGHDP) 原料药中拟人参皂苷 RT5、20(S)-人参皂苷 Rh₁、20(S)-人参皂苷 Rh₂ 的方法并采用细胞膜色谱 (CMC) 技术筛选效应成分。方法 采用 Century SIL BDS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.2% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 正离子多重反应监测 (MRM) 模式进行扫描定量, 并对 CMC 技术中所得的红细胞膜固相化 SGHDP 的效应成分进行确定。结果 拟人参皂苷 RT5、20(S)-人参皂苷 Rh₁、20(S)-人参皂苷 Rh₂ 分别在 0.095~0.235、0.042~0.168、0.105~0.419 mg/mL 线性关系良好 ($r^2 \geq 0.999$), 3 种成分的平均加样回收率分别为 99.95%、100.12%、100.06%, RSD 分别为 1.06%、0.96%、0.91%。SGHDP 原料药中拟人参皂苷 RT5、20(S)-人参皂苷 Rh₁、20(S)-人参皂苷 Rh₂ 质量分数分别为 21.24%、21.42%、29.70%。红细胞膜固相化 SGHDP 的效应成分为 20(S)-人参皂苷 Rh₂。结论 该方法对 SGHDP 原料药中 3 种人参皂苷含量的测定准确、可靠, 为 SGHDP 的质量控制提供了新的参考依据。20(S)-人参皂苷 Rh₂ 为红细胞膜固相化成分, 推测其可能是 SGHDP 的效应成分, 与前期的抗癌及抗抑郁的研究结果一致。

关键词: 人参次苷 H 滴丸; 原料药; 拟人参皂苷 RT5; 20(S)-人参皂苷 Rh₁; 20(S)-人参皂苷 Rh₂; 高效液相色谱串联三重四级杆质谱法; 含量测定; 细胞膜固相色谱; 效应成分

中图分类号: R286.02; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)11-2545-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.009

Active ingredients screening by cell membrane chromatography and simultaneous quantitation of ginsenosides in bulk drug of secondary ginsenoside H dripping pills

MA Xiao-wei¹, YU Meng-meng¹, JIN Xing-hua², HE Jia-hui¹, XU Liang³, HE Yi⁴, NIE Zhao-hong⁵, SONG Zhao-hui⁴, XIAO Xue-feng¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. School of Pharmacology Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3. Health education and technical service center, Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

4. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

5. Clinical development center, Beijing Sihuan Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101113, China

Abstract: Objective To establish a HPLC-MS/MS method for simultaneous determination and active ingredients screening of pseudoginsenoside RT5, 20(S)-ginsenoside Rh₁ and 20(S)-ginsenoside Rh₂ by cell membrane chromatography (CMC) in secondary ginsenoside H dripping pills (SGHDP). **Methods** The samples were separated on Century SIL BDS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5

收稿日期: 2018-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774227)

作者简介: 马晓伟 (1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药新药和药代动力学研究。Tel: 13042208132 E-mail: 1540550932@qq.com

*通信作者 肖学风 (1966—), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药新药和药代动力学研究。Tel: 13820066504 E-mail: kai1219@163.com

宋兆辉 (1978—), 男, 高级工程师, 主要从事中药新药开发与质量控制研究。E-mail: songzh@tasly.com

μm) eluted with 0.2% formic acid aqueous solution-acetonitrile in a gradient mode, and the target compounds were analyzed by positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode, and active ingredients of SGHDP obtained in solid-phase of biomembrane by CMC technology were determined at the same time. **Results** The linear ranges of pseudoginsenoside RT5, 20(S)-ginsenoside Rh₁, and 20(S)-ginsenoside Rh₂ were 0.095—0.235, 0.042—0.168, and 0.105—0.419 mg/mL; the extraction recoveries were 99.95%, 100.12%, and 100.06%; and RSD were 1.06%, 0.96%, and 0.91%, respectively. The contents of pseudoginsenoside RT5, 20(S)-ginsenoside Rh₁, and 20(S)-ginsenoside Rh₂ in SGHDP were 21.24%, 21.42%, and 29.70%, respectively. 20(S)-Ginsenoside Rh₂ was the active ingredient obtained by biomembrane using as a new quality control maker for SGHDP. **Conclusion** The developed method is accurate and reliable for the determination of three ginsenosides in SGHDP, and provides a new reference for quality control of SGHDP. 20(S)-Ginsenoside Rh₂ is a immobilization component of red cell membrane, speculated to be the active ingredient of SGHDP, which is in consistent with previous studies on antitumor and antidepressant.

Key words: secondary ginsenoside H dripping pills; active pharmaceutical ingredient; pseudoginsenoside RT5; 20(S)-ginsenoside Rh₁; 20(S)-ginsenoside Rh₂; HPLC-MS/MS; quantitative analysis; biomembrane extraction; active ingredients

人参次苷 H 滴丸 (secondary ginsenoside H dripping pills, SGHDP) 是在研的 5 类新药, 以 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 为主要成分, 具有培元固本、补益气血的功效, 临床可用于癌症治疗的辅助用药^[1]。药理实验证明, SGHDP 对小鼠 U14 宫颈癌和 H22 肝癌具有良好的抑制作用, 抑瘤效果与参一胶囊相似。对 U14 宫颈癌的抑瘤效果尤其明显, 肿瘤抑制率高达 53.83%^[2]。本课题组前期研究发现, SGHDP 对慢性温和不可预知应激所致的抑郁模型大鼠具有良好的抗抑郁作用^[3], 实验结论与 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 具有抗癌及抗癌相关抑郁作用的报道一致^[4-9]。

细胞膜色谱 (cell membrane chromatography, CMC) 技术采用具有生物活性的细胞膜与中药提取液共温育, 使细胞膜受体与中药提取液中效应成分特异性结合而达到分离目的, 可实现中药提取液中效应成分的快速筛选^[10-11]。本实验通过建立高效液相色谱串联三重四级杆质谱 (HPLC-MS/MS)^[12] 方法对 SGHDP 原料药中拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 进行分析及定量, 并对红细胞膜固相化 SGHDP 效应成分进行确定, 为 SGHDP 生产前原料药的相关研究及效应成分的筛选提供参考依据。

1 仪器与材料

Agilent Technologies 6420 Triple Quad 串联三重四级杆液质联用仪, 美国 Agilent 公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, MassHunter 工作站软件, G1322A 脱气装置, G1312B 二元泵, G1367E 自动进样器, G1316A 柱温箱, 美国 Agilent 公司; KQ-500B 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Mili-Q Advantage A10 超纯水系统, 美国 Milipore 公司;

XS105 型十万分之一电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 5804 (R) 离心机, 德国 Eppendorf 公司; PH400pH 计, 上海安莱立思仪器科技有限公司; Vortex-Genie2 涡旋振荡器, 美国 Scientific industries; ALPHA1-4LD plus 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; DHZ-DA 大容量全温振荡器, 苏州培英设备有限公司; Thermo Multiskan GO 全波长酶标仪, 美国 Thermo 公司。

SGHDP 原料药 (批号 20141201、20161118、20170112) 由天士力医药集团股份有限公司提供; 拟人参皂苷 RT5 对照品 (批号 K06M6C1)、20(S)-人参皂苷 Rh₂ 对照品 (批号 Z26J8X38638) 均购于上海源叶生物科技有限公司; 20(S)-人参皂苷 Rh₁ 对照品 (批号 DST170405-035) 购于成都德思特生物技术有限公司; 各对照品质量分数均为 98.0% 以上; BCA 总蛋白定量测试盒 (批号 WO41) 购于南京建成生物工程研究所; 阿氏液购于北京索莱宝科技有限公司。Na₂HPO₄·12H₂O、KH₂PO₄、冰醋酸均购于天津市风船化学试剂科技有限公司; 氯化钠、氯化钾均购于国药集团化学试剂有限公司; EDTA-Na₂ 购于北京索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购于天津市康科德科技有限公司; 甲酸为分析纯, 购于天津大学科威公司; 实验用水均为超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Century SIL BDS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序为 0~18 min, 35%~55% 乙腈; 18~19 min, 55%~60% 乙腈; 19~29 min,

60%~70%乙腈; 29~33 min, 70%~90%乙腈; 检测波长 203 nm; 进样量 10 μL; 柱温 35 °C; 体积流量 1 mL/min; 柱后分流体积比为 1:1; 测定时间 33 min。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正离子检测模式, 多重反应监测模式 (MRM) 扫描, 毛细管电压 4 000 V, 干燥气温度 300 °C, 雾化气 (N₂) 体积流量 11.0 L/min, 雾化器压力 103.425 kPa (15 psi)。优化的 3 种目标成分的质谱条件参数见表 1。

表 1 3 种皂苷类化合物的质谱分析参数
Table 1 MS/MS parameters of three ginsenosides

化合物	MRM 离子对 (m/z)	扫描时 间/ms	裂解电 压/V	碰撞能 量/eV
拟人参皂苷 RT5	655.3/457.3	500	115	10
20(S)-人参皂苷 Rh ₁	603.3/423.2	500	135	12
20(S)-人参皂苷 Rh ₂	587.3/407.3	500	150	14

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 对照品适量, 精密称定, 加入甲醇溶液超声溶解, 摇匀并定容至刻度, 得质量浓度分别为 293.2、167.6、418.8 μg/mL 的混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 SGHDP 原料药 (批号 20141201) 约 5 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入甲醇 8 mL, 超声提取 5 min, 室温放置, 冷却后定容。摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.2.3 细胞膜混悬液及 CMC 样品的制备 取与阿氏液按 1:1 混合的兔心脏血, 置于 50 mL 离心管中, 1 500×g, 4 °C, 离心 15 min, 除去上清液; 沉淀加入 30 mL 生理盐水, 涡旋混匀, 6 000×g, 4 °C、离心 5 min, 除去上清液及沉淀上层白色绒毛状物, 重复洗涤 3 次, 得纯净的红细胞沉淀; 吸取红细胞沉淀按 1:30 比例分散于破膜液 (EDTA-Na 37.2 mg/L, Na₂HPO₄·12H₂O 1.790 7 g/L, pH 8.0) 中, 剧烈摇晃使细胞充分破裂, 离心取细胞膜沉淀, 生理盐水反复洗涤, 直至得纯净的细胞膜沉淀, 加入适量生理盐水混悬, BCA 法测定总蛋白量, 使蛋白质量浓度约为 1 mg/mL, 即得细胞膜混悬液。

将细胞膜混悬液与 2 mg/mL SGHDP 原料药(批

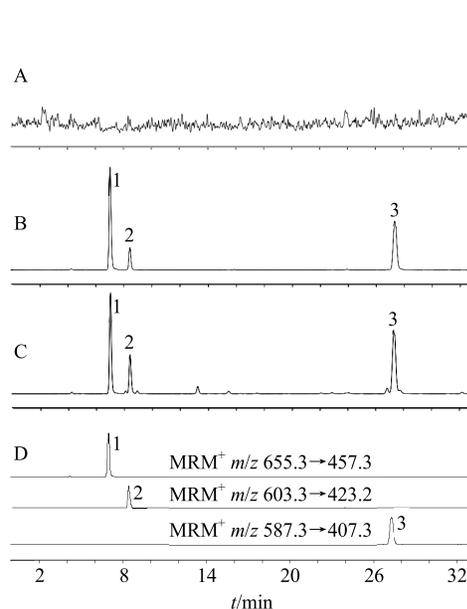
号 20141201, 50%乙醇溶解)涡旋混匀后置于 37 °C 振荡孵育 30 min; 振荡结束后离心除去上清液, 沉淀用 5 mmol/L PBS (pH 7.4) 反复洗涤 4 次, 加入 20%冰醋酸溶液 2 mL, 涡旋 2 min, 2 000×g, 4 °C、离心 5 min, 取上清液; 上清液中加入 3 倍体积乙腈, 15 000×g, 4 °C、离心 40 min, 沉淀蛋白; 将上清液冷冻干燥, 干燥物用 300 μL 乙腈复溶, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得 CMC 样品。

将 CMC 样品制备中的 2 mg/mL SGHDP 原料药替换为 5 mmol/L PBS (pH 7.4), 按上述方法制备, 即得空白对照样品。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性考察 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 甲醇为空白对照溶液, 在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析。由图 1 可见, 各成分分离较好, 拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 保留时间分别为 6.9、8.3、27.3 min。结果表明空白对照溶液及其他成分对测定拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 无干扰, 说明该方法专属性良好。

2.3.2 线性范围、检测限及定量限 将混合对照品



1-拟人参皂苷 RT5 2-20(S)-人参皂苷 Rh₁ 3-20(S)-人参皂苷 Rh₂
A-空白对照溶液 B-混合对照品溶液 C-供试品溶液 D-MRM 模式下 3 种皂苷类成分
1-pseudoginsenoside RT5 2-20(S)-ginsenoside Rh₁ 3-20(S)-ginsenoside Rh₂
A-blank solution B-reference solution C-sample solution D-three ginsenosides in MRM mode

图 1 SGHDP 各样品溶液 HPLC-MS/MS 色谱图
Fig. 1 HPLC-MS/MS chromatograms of every solution in SGHDP

储备液逐级稀释至拟人参皂苷 RT5 质量浓度为 0.095、0.117、0.147、0.191、0.235 mg/mL, 20(S)-人参皂苷 Rh₁ 质量浓度为 0.042、0.055、0.109、0.134、0.168 mg/mL, 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 质量浓度为 0.105、0.136、0.272、0.335、0.419 mg/mL 的系列质量浓度梯度混合对照品溶液, 分别吸取该质量浓度梯度溶液, 在“2.1.1”“2.1.2”项色谱和质谱条件下进行分析, 测定对照品各成分的峰面积, 重复测定 3 次, 取平均值; 以峰面积平均值 (Y) 对相应质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程、相关系数及线性范围; 按信噪比 (S/N) 为 3 和 10 分别计算各成分的检测限及定量限; 结果分别为拟人参皂苷 RT5 $Y=1 \times 10^6 X+97\ 929$, $r^2=0.999\ 0$, 线性范围 0.095~0.235 mg/mL, 检测限 0.029 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 0.096 $\mu\text{g/mL}$; 20(S)-人参皂苷 Rh₁ $Y=618\ 211 X+14\ 911$, $r^2=0.999\ 3$, 线性范围 0.042~0.168 mg/mL, 检测限 0.200 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 0.665 $\mu\text{g/mL}$; 20(S)-人参皂苷 Rh₂ $Y=564\ 709 X+118\ 261$, $r^2=0.999\ 2$, 线性范围 0.105~0.419 mg/mL, 检测限 0.226 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 0.754 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.3 精密度试验 吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析测定。连续进样 6 次, 测定各成分对照品的峰面积, 计算得拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 各成分峰面积的 RSD 分别为 1.77%、1.47%、1.18%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取 SGHDP 原料药 (批号 20141201) 6 份, 每份约 5 mg, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析测定, 记录各成分峰面积并计算相应质量分数, 计算得拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 各成分质量分数的 RSD 分别为 1.48%、1.02%、0.85%, 结果表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取 SGHDP 原料药 (批号 20141201) 约 5 mg, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析测定, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录各成分峰面积, 计算得样品中拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 各成分峰面积的 RSD 分别为 1.06%、1.25%、1.15%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 称取已知 3 种指标成分量

的 SGHDP 原料药 (批号 20141201) 约 2.5 mg, 共 9 份, 平均分为 3 组, 每组分别精密加入低、中、高 (分别为样品含有量的 80%、100%、120%) 3 个质量浓度的对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法平行处理 9 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析测定, 根据各成分峰面积计算 9 份供试品中各成分量、平均回收率与 RSD 值, 拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 的平均加样回收率分别为 99.95%、100.12%、100.06%, RSD 分别为 1.06%、0.96%、0.91%。结果表明, 该方法对各待测成分的回收率良好。

2.4 样品测定

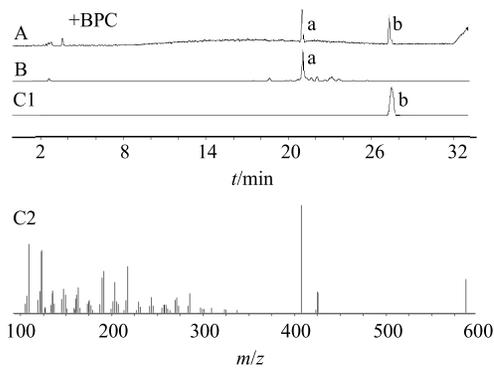
取 3 批不同批次 SGHDP 原料药 (批号 20141201、20161118、20170112), 每份约 5 mg, 每批次均按“2.2.2”项下方法平行制备 2 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析测定, 记录各成分峰面积, 计算得 20141201 批次原料药中拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 各成分质量分数结果分别为 21.49%、21.34%、29.36%; 20161118 批次原料药中拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 各成分质量分数结果分别为 21.26%、21.42%、29.67%; 20170112 批次原料药中拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 各成分平均质量分数结果分别为 21.24%、21.42%、29.70%。结果表明, 3 种皂苷类成分不同批次间差异较小。

2.5 CMC 样品中效应成分的筛选

分别吸取“2.2.3”项下 CMC 样品及空白对照样品, 进行全波长扫描, 并在“2.1”项色谱和质谱条件下进行分析测定。CMC 样品图谱 (图 2-A) 显示, 样品中出现 2 个响应较高的离子峰, 峰 a 和峰 b, 保留时间分别为 21.0、27.3 min。由空白样品图谱 (图 2-B) 可知, 峰 a 为空白样品中的成分。将 CMC 样品图谱与 SGHDP 样品的 HPLC-MS/MS 色谱图进行比较, 推测峰 b 所代表的成分可能是 20(S)-人参皂苷 Rh₂。取 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 对照品进样, 相同色谱及质谱条件下进行分析, 即得人参皂苷 Rh₂ 对照品图谱 (图 2-C1), 结合出峰时间及二级质谱碎片信息 (图 2-C2), 确定峰 b 所代表成分为 20(S)-人参皂苷 Rh₂。由此确定, SGHDP 中细胞膜固相化成分为 20(S)-人参皂苷 Rh₂, 推测 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 可能是 SGHDP 的效应成分。

3 讨论

在色谱及质谱条件的优化过程中, 本实验对水-



a-空白未知成分 b-20(S)-人参皂苷 Rh₂ A-CMC 样品 B-空白对照样品 C-20(S)-人参皂苷 Rh₂ 对照品
a-unknown component in blank b-ginsenoside Rh₂ A-CMC solution B-blank solution C-reference solution of ginsenoside Rh₂

图 2 CMC 技术各样品溶液 HPLC-MS/MS 谱图

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatograms of every solution by CMC

乙腈、0.2%甲酸水溶液-乙腈流动相系统进行梯度洗脱比较，经过图谱比对发现，以 0.2%甲酸水溶液-乙腈流动相系统中峰型及分离度较优，且分离时间短。由于甲酸的加入，20(S)-人参皂苷 Rh₁ 和 Rh₂ 母核结构均脱掉 2 分子水，但并不影响成分的稳定性及定量分析，综合考虑，最终选择 0.2%甲酸水溶液-乙腈为流动相。正、负离子模式下分别进行检测，发现与负离子模式相比，正离子模式下 3 种成分的响应值均有所提高，且正离子模式下产生的碎片离子数量明显增加，人参皂苷 [M+H]⁺ 准分子离子峰稳定。因此选择在正离子模式下进行检测。

CMC 技术具有色谱高效分离和以生物活性特异性筛选的特性，该技术将活性筛选、分离与化合物的检测、分析鉴定结合，已逐渐发展成为现代中药药效物质基础研究的重要方法与手段，成功筛选出部分治疗肿瘤、心血管疾病、糖尿病、过敏反应等疾病药物的效应成分^[13-16]。根据细胞膜是否固定在色谱载体上将 CMC 技术分为细胞膜生物亲和色谱技术和细胞膜固相色谱技术^[10]。本实验前期利用细胞膜生物亲和色谱技术，将提取的细胞膜包被在大孔硅胶颗粒表面制备成 CMC 柱，与高效液相色谱联合进行有效成分的分离洗脱，未得到分离洗脱成分，故无法确定有效成分结合后难以被洗脱还是未结合。且当下细胞膜生物亲和色谱技术设备为特殊定制，还未达到商业化生产，一定程度上限制了该技术的普及。而细胞膜固相色谱技术直接将具有生物活性的细胞膜与中药提取液共温育，处理后样

品再利用色谱技术解析与细胞膜作用的效应成分，实现了细胞膜所处的生物学环境的保持，避免了色谱分析过程中低氧、低离子、高压环境对细胞膜受体及离子通道活性的影响，同时满足了细胞生物学及色谱技术所要求最适条件。另外 20%冰醋酸溶液的加入使细胞膜上受体蛋白变性，得效应成分解离液进行分析鉴定，避免了细胞膜生物亲和色谱技术中无法确定药液成分未结合还是结合后难以被洗脱的情况。

CMC 样品溶剂可一定程度上影响细胞膜活性。SGHDP 主要成分为皂苷类成分，难溶于水，可溶于甲醇、乙醇^[2]。为尽可能降低温育过程中有机溶剂对细胞膜活性的影响，经过不断实验摸索，最终确定以 50%乙醇为溶剂，超声 10 min 制备 SGHDP 原料药溶液，在一定程度上既保证了细胞膜活性，又满足了 SGHDP 原料药的溶解性。

前期实验研究中，均选择 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂ 为主要研究对象，建立了薄层色谱法、HPLC 和 UPLC 方法对 SGHDP 中皂苷成分进行定性及定量研究^[2,17]，精确度较低且仅在 203 nm 波长下进行检测，限制了其他最大吸收波长下成分的检出。本实验采用 HPLC-MS/MS 法对 SGHDP 原料药进行全波长扫描，并对响应较高的 3 种成分进行鉴定，分别确定为拟人参皂苷 RT5 及 20(S)-人参皂苷 Rh₁、Rh₂，并进一步对 3 种成分进行定量研究。本实验建立的 HPLC-MS/MS 方法与以往方法相比更为精确，测定成分进一步全面，在 SGHDP 原料药的质量控制方面进一步完善，为 SGHDP 质量的综合考察提供了新的参考依据。

CMC 样品分析结果显示，20(S)-人参皂苷 Rh₂ 为红细胞膜固相化成分，推测 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 可能是 SGHDP 的效应成分，与文献报道的 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 具有抗癌及抗抑郁作用一致^[18-20]。研究发现，许多具有细胞毒作用的抗癌药物通过改变细胞膜及其膜蛋白特性而产生细胞毒作用，发挥抗肿瘤效果^[21-22]。红细胞 CMC 模型作为一种筛选细胞毒活性成分的常用模型，具有制作简便、重复性好的优点。药理实验结果显示，20(S)-人参皂苷 Rh₂ 单一成分与 SGHDP 均有抗肿瘤活性，且经过折算后的相同剂量 20(S)-人参皂苷 Rh₂ 单一成分与 SGHDP 的抑瘤率相近，证明 SGHDP 中发挥抗肿瘤作用的主要活性成分为 20(S)-人参皂苷 Rh₂^[2]，与本实验中 CMC 筛选出的效应成分 20(S)-人参皂苷 Rh₂

完全一致,再次验证了红细胞 CMC 模型筛选细胞毒活性成分的可靠性。

参考文献

- [1] 周宏宇,王 玉,宋兆辉,等. UPLC 测定人参次苷 H 滴丸中人参皂苷 Rh₁ 和 Rh₂ 含量 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(13): 1497-1500.
- [2] 张兰兰. 不同来源人参皂苷的比较及人参次苷 H 的研究 [D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [3] 杨晓琨,马晓伟,申 琳,等. 人参次苷 H 滴丸对慢性温和不可预见性应激大鼠的抗抑郁作用 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(7): 1177-1183.
- [4] Wang Y, Hao Y, Lou J L, *et al.* Effect of ginsenoside Rg₁ and Rh₁ on the anti-tumor activity of dendritic cell [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2004, 20(10): 1759-1764.
- [5] Lee Y J, Jin Y R, Lim W C, *et al.* A ginsenoside-Rh₁, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells [J]. *J Steroid Biochem*, 2003, 84(4): 463-468.
- [6] Hou J G, Xue J J, Lee M, *et al.* Long-term administration of ginsenoside Rh₁ enhances learning and memory by promoting cell survival in the mouse hippocampus [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(1): 234-240.
- [7] Yong B K. The ginsenoside, Rh₂, induces apoptosis in endometrial cancer cells [J]. *J Cancer Sci Ther*, 2017, 9(4): 55.
- [8] 刘小霞,陈 益,熊 伟,等. 人参皂苷 Rh₂ 通过自噬途径对 KG1 α 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 305-311.
- [9] Liu S L, Chen M R, Li P C, *et al.* Ginsenoside Rh₂ inhibits cancer stem-like cells in skin squamous cell carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(2): 499-508.
- [10] 陈媛媛,郭 姣. 细胞膜色谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 383-387.
- [11] Wang J, Chen Y M, Dai C X, *et al.* Ginsenoside Rh₂ alleviates tumor-associated depression in a mouse model of colorectal carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5): 2189-2195.
- [12] 葛 雯,李海波,何亮伟,等. UPLC-QqQ-MS/MS 同时测定热毒宁注射液中 6 个活性成分 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2225-2230.
- [13] 陈 颖,柏自松,朱 彦,等. 细胞膜色谱技术及其在中药活性成分筛选和安全性评价中的应用 [J]. 天津中医药大学学报, 2015, 34(6): 373-378.
- [14] 侯晓芳,杜 晖,贺晓双,等. 细胞膜色谱法用于药物与受体相互作用研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(12): 882-888.
- [15] 张聪聪,陈 刚,刘家兰,等. 细胞膜色谱法在中药研究中的应用进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1881-1886.
- [16] 朱 荃. 细胞膜固相相色谱及其在中药效应-物质基础研究中的应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(1): 8-13.
- [17] 张兰兰,高文远,宋兆辉,等. 人参次苷 H 滴丸定性与定量方法研究 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9): 774-802.
- [18] Wang M, Yan S J, Zhang H T, *et al.* Ginsenoside Rh₂ enhances the antitumor immunological response of a melanoma mice model [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13: 681-685.
- [19] Zhu C L, Liu F, Qian W B, *et al.* Combined effect of sodium selenite and ginsenoside Rh₂ on HCT116 human colorectal carcinoma cells [J]. *Arch Iran Med*, 2016, 19(1): 23-29.
- [20] Shi Q Q, Li J, Feng Z Q, *et al.* Effect of ginsenoside Rh₂ on the migratory ability of HepG2 liver carcinoma cells: Recruiting histone deacetylase and inhibiting activator protein 1 transcription factors [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10: 1779-1785.
- [21] Aranea G, Donelli G. Cell membranes as target for anticancer agents [J]. *Phamr Res*, 1991, 24(3): 205-217.
- [22] 张 博,贺浪冲. 用细胞膜色谱法分析金刷把中具有细胞毒活性的有效成分 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(15): 2303-2304.