

基于体内-体外物质组关联分析酸枣仁潜在效应物质

闫艳^{1*}, 李强^{1,2}, 杜晨晖³, 贾金萍⁴, 冯红霞³, 秦雪梅^{1*}

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化工学院, 山西 太原 030006;
3. 山西中医学院中药学院, 山西 太原 030619; 4. 山西大学大型科学仪器中心, 山西 太原 030006)

摘要: 建立 UHPLC Q Exactive 轨道离子阱高分辨质谱分析酸枣仁水提物体内外化学成分的方法。借助高分辨质谱仪提供的化合物精确相对分子质量, 结合色谱保留时间、紫外吸收光谱和二级质谱等信息, 在酸枣仁水提物中共鉴定和推断出 25 个化合物, 其中 12 个黄酮化合物、8 个三萜皂苷化合物、2 个脂肪酸和 3 个生物碱, 基本阐明了酸枣仁水提物中主要化学成分。通过体内-体外物质组关联, 分析正常大鼠灌胃酸枣仁水提物后尿液中代谢物, 共鉴定和推断出 20 个代谢物, 包括 16 个原形化合物和 4 个代谢产物; 并对体内成分镇静催眠作用的相关文献进行挖掘, 初步遴选斯皮诺素、当药黄素、酸枣仁皂苷 A 和 B 为其发挥镇静催眠作用的潜在效应物质。为后期效应物质的进一步确证提供实验基础。

关键词: 酸枣仁; 体内-体外物质组关联; 高分辨质谱; 效应物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0283-08

Investigation of the potentially effective components of Semen Ziziphi Spinosae based on “*in vitro to in vivo*” translation approach

YAN Yan^{1*}, LI Qiang^{1,2}, DU Chen-hui³, JIA Jin-ping⁴, FENG Hong-xia³, QIN Xue-mei^{1*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China, 3. College of Chinese Materia Medica, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China; 4. Scientific Instrument Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The study aims to investigate the effective components of Semen Ziziphi Spinosae (SZR) in nourishing the heart and tranquilizing the mind. A method of ultra high liquid chromatography (UHPLC) coupled with Q Exactive high resolution mass spectrometry (HR-MS) was developed. Based on the UV spectra, retention time and MS spectra, 25 compounds of SZR extract were identified or tentatively characterized, including 12 flavonoids, 8 triterpenoids saponins, 2 fatty acid and 3 alkaloids. The study illuminated the major chemical components. Twenty bioactive components were determined in rat urine after oral administration of SZR extract by “*in vitro to in vivo*” translation approach, including 16 prototype compounds and 4 metabolites. Spinosin, swertisin, jujuboside A and B were considered as the effective and active constituents in SZR of the sedative and hypnotic effects, which embodies characteristics of multiple components. It was beneficial exploration for searching the effective and active constituents of SZR in nourishing the heart and tranquilizing the mind.

Key words: Semen Ziziphi Spinosae; “*in vitro to in vivo*” translation approach; high resolution mass spectrometry; effective and active constituent

收稿日期: 2016-06-29; 修回日期: 2016-09-19.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603289); 山西省卫生与计划生育委员会科技攻关项目 (2014097); 山西省青年科技研究基金项目 (2012021031-5).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7018379, E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn; qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0644

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F.Chou) 的干燥成熟种子, 味甘、性平、有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津之功效。现代药理研究表明, 酸枣仁具有镇静催眠、抗心律失常、抗氧化、免疫增强等作用。酸枣仁用于治疗失眠已有悠久的历史^[1]。在治疗失眠的中药制剂中, 使用频率高达 67.3%, 远超其他常用安神类中药^[2]。

目前从酸枣仁中分离鉴定出的化合物约有百余种, 按结构分类以达玛烷型四环三萜皂苷、五环三萜、黄酮碳苷、生物碱和脂肪油为主, 其本底化学成分基本清晰。但现有酸枣仁效应物质研究多局限于个别或孤立几个成分的跟踪研究。亦或是研究酸枣仁乙醇提取物、总黄酮提取物及单体化合物灌胃给予大鼠后血浆、尿液和粪便中化学成分^[3–8]。以上工作初步阐明了酸枣仁催眠作用的部分效应物质。然而这种追踪酸枣仁中一种或几种效应物质的研究模式, 难以从整体上揭示其效应物质的全貌, 缺乏对其体内药效物质与体内处置特征的整体认识。沟通体外化学成分群与体内化学成分群的关系, 是从整体上把握中药效应物质的关键。

酸枣仁临床用于治疗失眠以口服水煎液为主要给药形式, 其体内 (吸收、分布、代谢、排泄, 即 ADME) 过程是其发挥药理作用、产生疗效的基础。由于血浆中药物及其代谢产物的含量较少且处于动态变化中, 在收集过程中可能会造成某些成分的丢失。而通常尿液中的代谢产物与血浆中的基本一致, 且易富集。如果能在尿液中检测到这些产物, 证明其能够被吸收, 可逆向鉴定被吸收的化学成分^[9]。本文以 UHPLC Q Exactive HR-MS 为技术手段, 全面分析酸枣仁水提取物化学成分及体内成分, 并对体内成分镇静催眠作用相关文献进行挖掘, 初步遴选潜在效应物质。为后期效应物质的进一步确证提供实验依据; 为多组分协同作用及药动学研究提供实验基础。

材料与方法

仪器 Thermo fisher U3000 超高效液相色谱仪, 配置在线脱气机、四元梯度泵、柱温箱、自动进样器 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Thermo Scientific™ Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪 (Germany); Xcalibur 软件; 十万分之一天平 (德国赛得利集团)。SPE C₁₈ 固相萃取小柱 (江苏, 汉邦)。

药品与试剂 酸枣仁皂苷 A (批号: A0274)、酸枣仁皂苷 B (批号: A0275)、斯皮诺素 (批号: 131217),

均购自中国食品药品检定研究院。当药黄素 (批号: 140516)、6''-阿魏酰斯皮诺素 (批号: 140215)、白桦脂酸 (批号: 150913), 纯度 ≥ 98%, 均购买于四川省维克奇生物科技有限公司。酸枣仁药材购自山西振东道地药材有限责任公司, 经山西中医学院中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为鼠李科植物酸枣 [*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F.Chou] 的干燥成熟种子。乙腈 (色谱纯, 迪马科技有限公司); 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

动物 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 (180~200 g), 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK (京) 2014-0001。

色谱条件 色谱柱: Agilent Poroshell 120 mm (3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm); 流动相: 乙腈 (A), 0.1% 甲酸水溶液 (B)。梯度洗脱: 0~10 min, 2%~17% A; 10~12 min, 17% A; 12~14 min, 17%~19% A; 14~25 min, 19%~33% A; 25~30 min, 33%~100% A; 30~35 min, 100% A; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; DAD 检测器扫描范围为 190~400 nm, 检测波长为 210、254 和 335 nm; 进样量 3 μL。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 扫描方式: 正负离子同时扫描; 喷雾电压: 3.5 kV; 鞘气流速为 35 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 辅助气流速为 10 psi; 毛细管温度: 320 °C; 探头加热器温度: 300 °C; 最大喷雾电流: 100 A; S-Lens 分辨率: 55; 扫描范围: *m/z* 100~1500; 质量分辨率: 70000。

对照品溶液的制备 取对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制备成 1 220 μg·mL⁻¹ 斯皮诺素、1 240 μg·mL⁻¹ 酸枣仁皂苷 A、1 260 μg·mL⁻¹ 酸枣仁皂苷 B、1 130 μg·mL⁻¹ 当药黄素、1 260 μg·mL⁻¹ 6''-阿魏酰斯皮诺素和 1 270 μg·mL⁻¹ 白桦脂酸的对照品储备液, 各取适量, 制成混合对照品溶液。

供试品溶液的制备 取酸枣仁药材粉碎, 称取 500 g, 加 8 倍量水, 加热回流提取 1 h, 滤过, 残渣加 8 倍量水, 回流提取 1 h, 滤过, 合并两次滤液, 浓缩, 60 °C 水浴蒸干得浸膏 (得率为 28.12%)。

SPE 小柱活化及上样: 甲醇活化固相萃取小柱, 蒸馏水洗脱至无醇味。称取酸枣仁水提物 1 g (相当于生药 3.6 g) 于锥形瓶中, 加水 20 mL, 超声溶解, 于活化后的固相萃取小柱上样, 先用蒸馏水 20 mL 洗脱, 然后用甲醇 20 mL 洗脱, 收集甲醇洗脱液, 浓缩至干, 加甲醇定容至 5 mL。

给药与样本采集 取实验环境下适应一周后的 SD 大鼠 12 只, 随机选 6 只作为酸枣仁水提物组, 按

30 g·kg⁻¹ 生药量给大鼠灌胃 (15 mL·kg⁻¹), 连续给药 4 天; 另取 6 只作为空白组, 给予等剂量的生理盐水。末次给药前禁食 12 h, 自由饮水, 于代谢笼中收集给药后 6、12 和 24 h 的尿液, 离心 15 min (5 000 r·min⁻¹), 取上清液, -80 °C 冷冻备用。

大鼠尿液样品的预处理 取 1.8 mL 尿液上样于活化后的 SPE C₁₈ 固相萃取小柱。水 15 mL 洗脱除杂, 70% 甲醇 15 mL 洗脱, 收集 70% 甲醇洗脱液, 浓缩至干, 加甲醇定容至 5 mL, 取上清液 1 μL, 供 UHPLC 分析。

结果

1 酸枣仁水提取物化学成分鉴定

采用 Q Exactive Orbitrap-HRMS 鉴别酸枣仁水提取物中的化学成分。首先对已知对照品化合物的保留时间、紫外吸收光谱图和质谱图进行分析; 对于未知化合物, 通过质谱与光谱数据, 并参考文献, 推断结构。在此条件下, 共鉴定了 25 个化合物, 其中 12 个黄酮、8 个三萜皂苷、2 个脂肪酸和 3 个生物碱 (图 1, 表 1)。

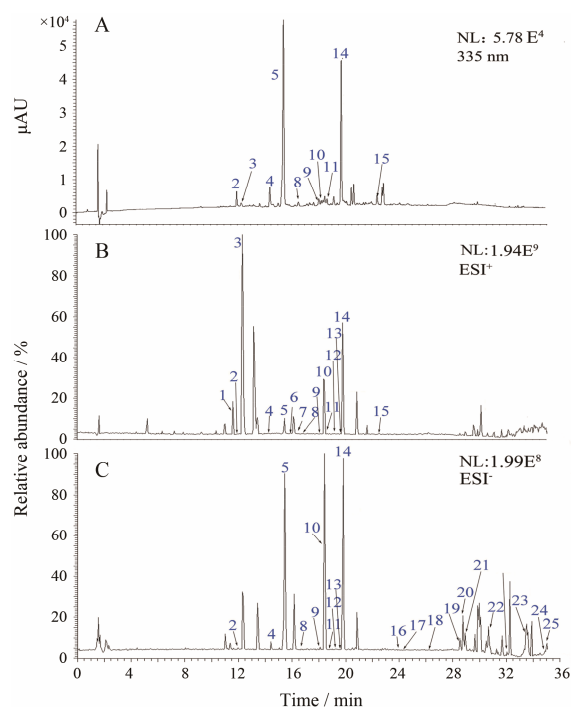


Figure 1 The base peak ion (BPI) chromatograms of extract from Semen Ziziphi Spinosa (SZR). A: UHPLC chromatogram (335 nm); B: Positive scan; C: Negative scan. The peaks from 1 to 25 are corresponding to Table 1

1.1 三萜皂苷类 酸枣仁中含有丰富的三萜皂苷化合物, 分别为四环三萜类达玛烷型和五环三萜羽扇

豆烷型。这些化合物紫外吸收较弱, 为末端吸收。首先将对照品酸枣仁皂苷 A 和 B 的裂解行为进行解析。在负离子模式下, 酸枣仁皂苷 A 产生 m/z 1 251 [M-H+HCOO]⁻ 峰和 1 205 [M-H]⁻ 准分子离子峰, 依次脱掉木糖 (Xyl)、葡萄糖 (Glu)、鼠李糖 (Rha) 和阿拉伯糖 (Ara), 分别产生碎片离子 m/z 1 073、911、749、603 和苷元离子 m/z 471 [M-H-Xyl-Rha-Ara-2glu]⁻。酸枣仁皂苷 B 产生 m/z 1 089 [M-H+HCOO]⁻ 峰和 1 043 [M-H]⁻ 准分子离子峰, 依次脱掉 Xyl、Glu、Rha 和 Ara, 分别产生碎片离子 m/z 911、749、603 和苷元离子 471 [M-H-Xyl-Rha-Ara-Glu]⁻。

在负离子模式下, 化合物 20 产生 m/z 1 281 [M-H+HCOO]⁻ 峰和 1 235 [M-H]⁻ 准分子离子峰, 依次脱去 3 个 Glu 和 1 个 Rha, 产生 m/z 1 073、911、749 和 603 碎片离子。参考文献^[10], 推测为酸枣仁皂苷 C。化合物 17 产生 m/z 1 269 [M-H+HCOO]⁻ 峰和 1 223 [M-H]⁻ 分子离子峰, 并产生碎片 m/z 1 091 [M-H-Xyl]⁻, 929 [M-H-Xyl-Glu]⁻, 767 [M-H-Xyl-2Glu]⁻, 621 [M-H-Xyl-2Glu-Rha]⁻ 或 [M-H-Xyl-2Glu-Fuc]⁻。参考文献^[10], 推测其为原酸枣仁皂苷 B 或者 B₁。另推测化合物 16 和 18 分别为酸枣仁皂苷 G 和 H^[10]。由此可见, 这类化合物均产生较强的 [M-H+HCOO]⁻ 峰。

白桦脂酸是酸枣仁中代表性的五环三萜皂苷类化合物。在负离子模式下, 给出 m/z 455 [M-H]⁻ 的准分子离子峰。同时推测化合物 22 为美洲茶酸^[11]。

1.2 黄酮类 黄酮类化合物是酸枣仁中含量较高的一类化合物。首先对斯皮诺素、当药黄素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素对照品进行分析, 在 270 nm (带 II) 和 335 nm (带 I) 有较强的紫外吸收。在正离子模式下, 斯皮诺素产生 m/z 609 [M+H]⁺ 分子离子峰, 脱掉 1 个 Glu 产生 m/z 447, 该碎片丢失一分子 Glu 生成 m/z 285; 丢失 C₄H₈O₄ (120 Da) 产生主要特征碎片 m/z 327; 丢失一分子 H₂O 生成碎片离子 m/z 429。 m/z 429 丢失中性碎片 C₂H₆O₃、CH₄O₂、H₂O、2H₂O 和 C₅H₈O₄, 分别产生一系列的碎片离子 m/z 351、381、411、393 和 297。当药黄素产生 m/z 447 [M+H]⁺ 准分子离子峰、碎片峰 m/z 429 [M+H-H₂O]⁺, 并产生同斯皮诺素相同的一系列碎片 m/z 351、411、393、381 和 297。6'''-阿魏酰斯皮诺素产生 m/z 785 [M+H]⁺ 的准分子离子峰, 脱掉 C₄H₈O₄ 而产生碎片离子 m/z 665; 脱掉阿魏酰基产生碎片离子 m/z 609, 并依次产生碎片离子 m/z 447、429、393、351、327、297 和 285。以上结果表明, 黄酮碳糖 (C 糖) 的裂解途径主要发生在糖链部分^[12]。

Table 1 Identification of chemical constituents and metabolites by UHPLC Q Exactive HR-MS. *Compared with reference substance. M: metabolites

No.	t_R /min	UV /nm	Compound	[M+H] ⁺	Fragment ion	Error/ ppm	[M-H] ⁻	Error/ ppm	Fragment ion	Formula	Urine (time/h)
1 (M1)	11.67	235, 284	Coclaurine	286.142 36	269, 237, 219	0.944	-	-	-	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	6, 12, 24
2 (M2)	11.98	272, 335	Vicenin II	595.166 44	433, 313	0.693	593.152 10	2.004	503, 473, 383, 353, 297	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	6, 12, 24
3 (M3)	12.33	270, 303	Zizyphusine	342.168 49	297, 282, 266, 237	0.045	-	-	-	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	6, 12, 24
4 (M4)	14.39	272, 338	Isovitexin-2''-O-β-D-glucopy-ranoside	595.166 44	433, 415, 397, 379, 337, 313, 283	0.693	593.149 91	-1.663	413, 293	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	6, 12, 24
5 (M5)	15.47	272, 338	Spinosin*	609.178 96	447, 429, 411, 381, 351, 327, 297, 285	-2.293	607.164 21	0.417	487, 445, 427, 367, 337, 307, 292, 281	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	6, 12, 24
M6	17.45	284	Swertisin-furane-glycoside-gluA	-	-	-	579.245 42	1.817	403, 385	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	6, 12, 24
6	15.88	274, 338	Isovitexin	433.113 89	415, 397, 367, 337, 313, 283	2.232	-	-	-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-
7	16.42	272, 372	Caaverine	268.133 30	252, 236, 219, 191	0.095	-	-	-	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	-
8 (M7)	16.54	272, 338	Swertisin*	447.126 43	429, 411, 393, 381, 351, 297, 267	3.191	445.111 91	4.666	325, 297, 282	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	6, 12, 24
9 (M8)	18.03	268, 349	Kaempferol-3-rutinoside	595.166 26	449, 287	0.513	593.148 74	-2.287	285, 255, 227	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	6
10 (M9)	18.23	271, 336	6'''-p-Hydroxyl benzoylspinosin	729.201 84	429, 411, 381, 351, 327, 297	-0.941	727.188 54	2.288	427, 325, 307, 292, 281	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₇	6, 24
M10	19.42	284	Phenolic-glycoside-gluA	-	-	-	477.177 43	1.907	301, 271, 253	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₄	6, 12, 24
11	18.51	274, 335	Nervilifordin J	771.208 80	433, 415, 379, 337, 313, 283	-4.007	769.195 62	-2.367	593, 413, 311, 293	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₈	-
12	19.18	274, 336	6'''-Sinapoylspinosin	815.240 17	695, 609, 447, 429, 351, 327, 297, 285	1.061	813.225 46	2.219	427, 307, 292, 281, 265, 251	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₉	-
13 (M11)	19.69	275, 331	6'''-p-Coumaroylspinosin	755.217 90	429, 381, 351, 327, 147	-0.365	753.200 07	-2.456	427, 307, 292, 265, 205	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₇	6, 24
14 (M12)	19.79	272, 338	6'''-Feruloylspinosin*	785.230 96	665, 609, 447, 429, 393, 351, 327, 297, 285	2.826	783.210 82	-3.946	607, 427, 307, 292, 235, 193	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	6, 24
M13	22.79	-	Methylapigenin-gluA	-	-	-	461.145 05	0.827	285, 267, 241	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	6, 12, 24
15	22.44	274, 335	7-O-(6'''-O-Feruloylglucosyl)-isocytiside or 4-O-(6'''-O-feruloyl glucosyl)-swertisin	785.227 62	-	-1.427	-	-	-	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	-
16 (M14)	23.98	-	Jujuboside H	-	-	-	1 223.600 59	-4.032	1 091, 919, 787, 625, 479	C ₅₈ H ₉₆ O ₂₇	6
17 (M15)	24.31	-	Protojujuboside B or B1	-	-	-	1 269.605 47	-4.413	1 223, 1 091, 929, 767, 621	C ₅₈ H ₉₆ O ₂₇	6
18 (M16)	26.26	-	Jujuboside G	-	-	-	1 107.559 81	-2.845	1 061, 929, 767, 621	C ₅₂ H ₈₆ O ₂₂	6, 12, 24
M17	28.42	283	Methylapigenin	-	-	-	285.113 49	4.700	267, 241	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	6, 12, 24
19 (M18)	28.54	-	Jujuboside A*	1 229.593 26	-	-	1 251.596 56	-4.113	1 205, 1 073, 1 043, 911, 749, 603, 471	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₆	6, 12, 24
20 (M19)	28.60	-	Jujuboside C	-	-	-	1 281.611 94	0.944	1 235, 1 073, 911, 749, 603	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	24
21 (M20)	29.24	-	Jujuboside B*	-	-	-	1 089.543 09	2.047	1 043, 911, 749, 603, 471	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	6, 12, 24
22	30.94	-	Ceanothic acid	-	-	-	485.325 26	-1.836	-	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	-
23	33.34	-	Betulinic acid *	-	-	-	455.351 23	-1.629	-	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-
24	34.93	-	Palmitic acid	-	-	-	255.232 85	1.500	-	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-
25	35.03	-	Oleic acid	-	-	-	281.248 47	3.425	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-

在正离子模式下，化合物 **10**、**12** 和 **13** 都产生 m/z 429、381、351、327、297 的碎片离子，显示出与斯皮诺素类似的质谱行为和紫外光谱吸收 (表 1)。

参考文献^[13]，推断其分别为 6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-芥子酰斯皮诺素和 6'''-对香豆酰斯皮诺素。化合物 **6** 产生 m/z 433 分子离子峰，并依次产生碎片

离子 m/z 415 $[M+H-2H_2O]^+$ 、397 $[M+H-2H_2O]^+$ 、367 $[M+H-2H_2O-CH_2O]^+$ 、337 $[M+H-2H_2O-2CH_2O]^+$ 、313 $[M+H-2H_2O-C_4H_6O_3]^+$ 和 283 $[M+H-2H_2O-C_4H_6O_3-CH_2O]^+$, 以上碎片为黄酮 C 糖的特征碎片, 推断其为异牡荪素^[13]。在正离子模式下, 化合物 **2**、**4** 和 **9** 均产生 m/z 595 $[M+H]^+$ 分子离子峰。其中化合物 **2** 产生 m/z 433 $[M+H-Glu]^+$ 和 313 $[M+H-Glu-120Da]^+$ 碎片峰, 推断为文赛宁-2^[13]; 化合物 **4** 产生碎片 m/z 433 $[M+H-Glu]^+$, 并依次产生 m/z 415、397、379、337、313 和 283 碎片, 推测为异牡荪素-2''-*O*- β -D-葡萄糖^[13]; 而化合物 **9** 产生 m/z 449 $[M+H-Rha]^+$ 和 287 $[M+H-Rha-Glu]^+$ 碎片, 推断为山柰酚-3-*O*-芸香糖^[11]。在正离子模式下, 化合物 **11** 产生 m/z 771 的分子离子峰, 丢失碎片 $C_{11}H_{10}O_4$, 产生 m/z 433, 并依次碎裂为 m/z 415 $[M+H-C_{11}H_{10}O_4-H_2O]^+$ 、379 $[M+H-C_{11}H_{10}O_4-3H_2O]^+$ 和 337 $[M+H-C_{11}H_{10}O_4-2H_2O-C_2H_4O_2]^+$, 推断其为 nerverilifordin J^[14]。另外, 尝试推断化合物 **15** 为 7-*O*-(6'''-*O*-阿魏酰葡萄糖)-异金雀黄花素或 4-*O*-(6'''-*O*-阿魏酰葡萄糖)-当药黄素^[13]。

1.3 生物碱类化合物 由于缺乏对照品, 根据紫外光谱图和质谱信息, 并参考文献, 推断了化合物 **1**、**3** 和 **7**。在正离子模式下, 化合物 **1** 产生 m/z 286 $[M+H]^+$ 分子离子峰, 依次产生碎片 m/z 270 $[M-CH_3]^+$ 、237 $[M-CH_3O-H_2O]^+$ 和 219 $[M-CH_3O-2H_2O]^+$, 推断其为乌药碱^[14]。化合物 **3** 产生 m/z 342 $[M+H]^+$ 分子离子峰, 并产生碎片离子 m/z 297 $[M-3CH_3]^+$ 、 m/z 282 $[M-4CH_3]^+$ 和 m/z 265 $[M-3CH_3-CH_3O]^+$, 推测其为酸李碱^[14]。化

合物 **7** 产生 m/z 268 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 二级碎片分别为 m/z 252 $[M-CH_3]^+$ 和 218 $[M-CH_3O-H_2O]^+$, 推断其为山矾碱^[15]。

1.4 脂肪酸类 结合质谱数据, 化合物 **24** 和 **25** 分别推断为棕榈酸和油酸^[16]。

2 酸枣仁口服给予大鼠后尿液中代谢产物的鉴定

上述结果表明酸枣仁水提物中化学成分复杂, 采用已建立的液质联用分析方法, 进一步将其生物体内的复杂动态物质组与体外物质组进行关联分析研究。结合酸枣仁水提物中化学成分的质谱裂解规律, 鉴定尿液中的原形成分, 并推断和解释代谢物。通过比较给药后尿液和空白尿液色谱图, 扣除内源性成分, 并采用提取离子流 (EIC) 方法, 以 5 ppm 为准, 在正常大鼠给药后 6、12 和 24 h 的尿液中共检测到 20 个代谢物 (表 1, 图 2)。

2.1 原形化合物的鉴定 尿液中 16 个原形化合物包括 2 个生物碱、8 个黄酮和 6 个三萜皂苷。其中文赛宁、异牡荪素-2''-*O*- β -D-葡萄糖、斯皮诺素和当药黄素在 3 个时间点均被检测到。6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-对香豆酰斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素在 6 和 24 h 被检测到, 推断三者可能发生了肝胆循环。而山柰酚-3-*O*-芸香糖苷仅在 6 h 尿液中被检测到, 说明氧糖苷容易发生水解反应被代谢。在 3 个时间点均检测到乌药碱和酸李碱。

另外, 采用 EIC 法, 共检测到 6 个三萜皂苷, 分别为酸枣仁皂苷 A、B、C、G、H 和原酸枣仁皂苷 B 或 B₁。其中酸枣仁皂苷 H、原酸枣仁皂苷 B 或 B₁ 仅

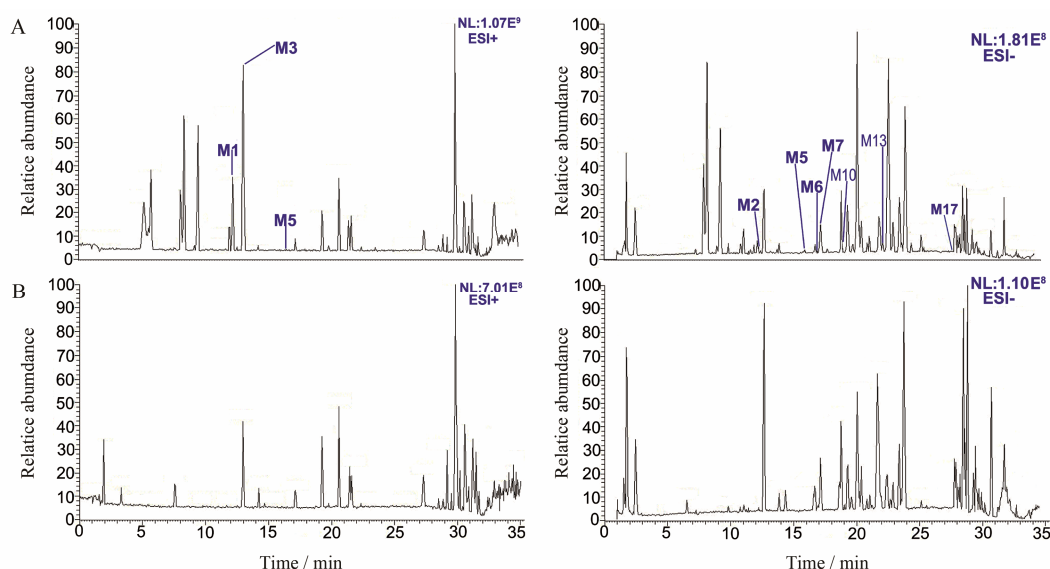


Figure 2 The BPI chromatographs of urine samples. A: Urine after oral administration of SZR; B: Blank urine. M1–3, M5–7, M10, M13 and M17 are corresponding to Table 1

存在于 6 h 尿液中。

2.2 相关代谢产物的鉴定 本文尝试推断了 4 个新

的代谢产物, 分别为 M6、M10、M13 和 M17。详细的代谢途径见图 3。在负离子模式下, M6 产生 m/z

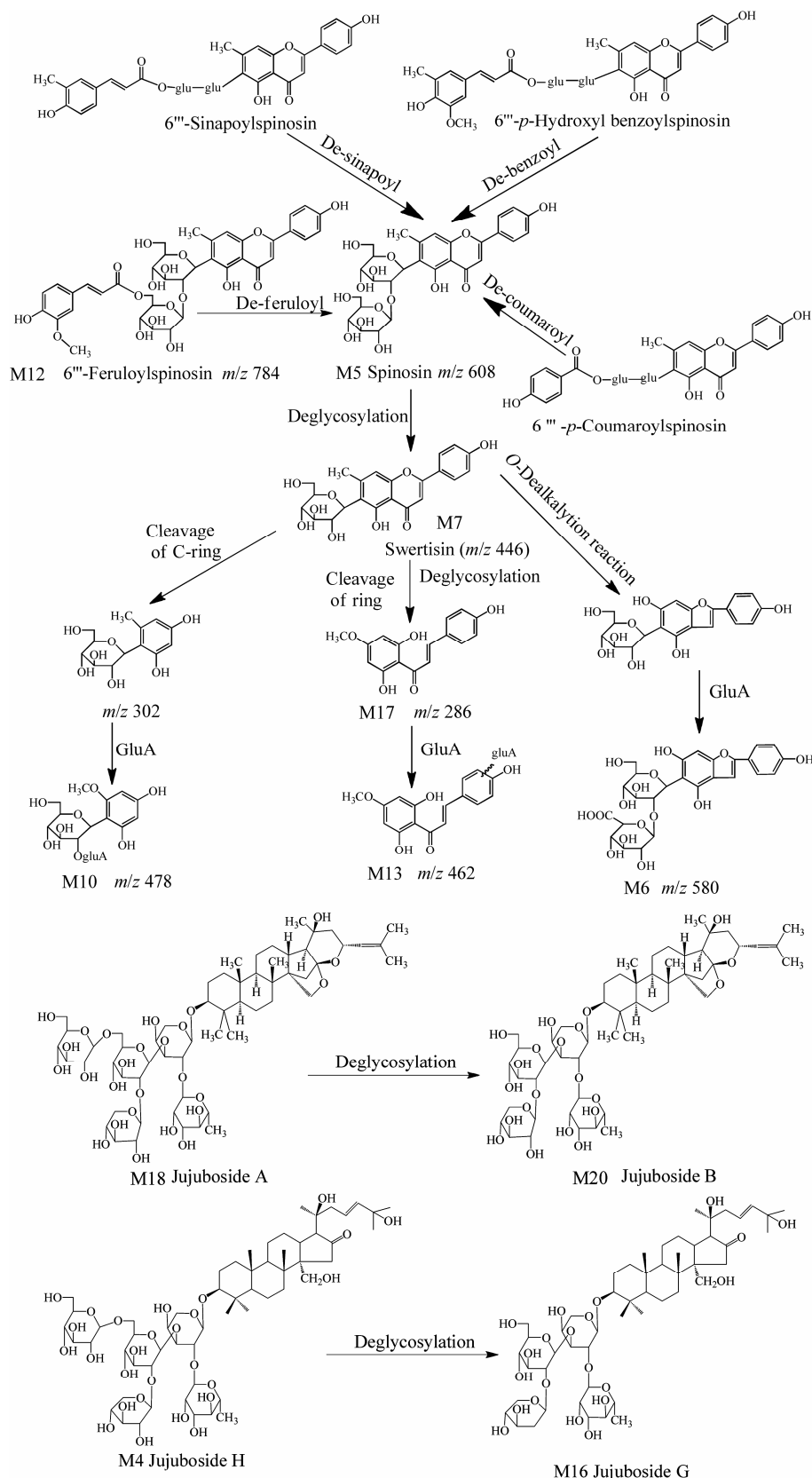


Figure 3 Structural skeleton of flavonoids and triterpenoids and their potential metabolic pathways

579 [M-H]⁻ 分子离子峰及碎片离子 m/z 403 [M-H-glucuronic acid (gluA)]⁻ 和 385 [M-H-gluA-H₂O]⁻, 推断为代谢产物 swertisin-furane-glycoside-gluA^[17]。M10 产生 m/z 477 [M-H]⁻ 分子离子峰及碎片离子 m/z 301 [M-H-gluA]⁻, 推断其为 phenolic-glycoside-gluA。其代谢途径可能是当药黄素在肠道菌群的作用下发生了环裂解反应, 进而在肝脏发生了 II 相结合反应^[18]。M13 产生 m/z 461 [M-H]⁻ 分子离子峰及碎片离子 m/z 285 [M-H-gluA]⁻ 和 267 [M-H-gluA-H₂O]⁻, 推断为代谢物 methylapigenin-gluA。其代谢途径可能是当药黄素在肠道菌群的作用下发生脱糖和环裂解反应。M17 产生 m/z 285 [M-H]⁻ 的分子离子峰和碎片离子 m/z 267 [M-H-H₂O]⁻, 推断为代谢物 methylapigenin。综上, 黄酮类化合物在体内的代谢反应主要为肠道水解反应和环裂解反应, 并在肝脏发生 I 相氧化反应、脱烷基及 II 相葡萄糖醛酸结合反应。

讨论

在以往的酸枣仁化学成分定性分析研究中, 多针对酸枣仁醇提物、总黄酮和总皂苷, 未见水提取物中化学成分的研究报道。然而, 酸枣仁日常保健和临床用药, 多为水煎液。因此以酸枣仁水提取物中化学成分为研究对象更贴近中医临床应用。

以口服给予酸枣仁水提物后大鼠尿液为研究对象, 将体内复杂动态物质组与体外物质组进行关联分析。黄酮类化合物及代谢产物是大鼠口服酸枣仁水提物后尿液中的一类重要成分。以斯皮诺素为母核的系列化合物, 6'''-阿魏酰斯皮诺素、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-芥子酰斯皮诺素和 6'''-对香豆酰斯皮诺素在体内发生了脱阿魏酰基、对羟基苯甲酰基、芥子酰基和香豆酰基反应, 生成斯皮诺素, 并在肠道菌的作用下发生脱糖反应生成当药黄素 (图 3)。研究表明, 斯皮诺素能够协同戊巴比妥钠小鼠睡眠, 缩短睡眠潜伏期, 延长睡眠时间, 其作用机制与突出后 5-HT_{1A} 受体相关^[19]。当药黄素也具有镇静催眠作用^[20]。因此, 斯皮诺素和当药黄素应为酸枣仁发挥镇静催眠作用的潜在效应物质。

以酸枣仁皂苷 A 和 B 为代表的四环三萜皂苷在体内的代谢反应主要为肠道糖苷键水解反应。谢军波课题组^[21, 22]对酸枣仁皂苷 A 的体外肠道菌代谢研究表明, 其可以在 4~6 h 内迅速脱掉一个 Glu 后代谢成酸枣仁皂苷 B。与之类似, 本实验中酸枣仁皂苷 H 仅在 6 h 尿液中被检测到。而化学结构与酸枣仁皂苷 H 相差一个 Glu 的酸枣仁皂苷 G 在 3 个时间点内均被

检测到, 可能是酸枣仁皂苷 H 在肠道内脱糖基后生成了酸枣仁皂苷 G。而本实验中酸枣仁皂苷 A 和 B 在 3 个时间点均被检测到。由此可见, 酸枣仁皂苷类化合物在肠道内的水解是不完全的, 其原形及其代谢产物均可进入体循环发挥其生物学作用, 并可能经尿液排泄。文献^[23]报道, 含酸枣仁皂苷 A 4.3% 和 B 5.0% 为主的总皂苷具有镇静催眠作用, 酸枣仁皂苷 A 和 B 应该是其发挥镇静催眠作用的潜在效应物质。另外, 在尿液中推断出了两个原形化合物乌药碱和酸李碱, 分别属于苜基异喹啉类和阿朴菲类。研究表明^[24, 25]酸枣仁环肽类生物碱具有镇静催眠作用, 而乌药碱和酸李碱不具有镇静催眠活性, 且对环肽类生物碱镇静催眠作用不具有协同效应。

综上, 本文以体内、体外相结合为前提, 以化学成分转移和转变为基础, 以明确酸枣仁体内潜在效应物质为目的, 采用 UHPLC Q Exactive 轨道离子阱高分辨质谱首先表征了酸枣仁水提取物中丰富的化学成分; 其次, 通过体内-体外物质组关联分析了体内化学成分; 并进行体内成分镇静催眠作用文献挖掘, 初步遴选斯皮诺素、当药黄素、酸枣仁皂苷 A 和 B 为其发挥镇静催眠作用的潜在效应物质。本研究仅揭示了酸枣仁水提物在体内复杂代谢过程的冰山一角, 尿液中检测的其他原形成分和代谢产物是否也具有镇静催眠作用? 酸枣仁水提物中三萜皂苷、黄酮和生物碱类在体内是如何整体协调吸收, 进而发挥作用的? 这些问题尚待深入研究。

References

- [1] Zhang ZJ, Jin Kui Yao Lue (金匱要略) [M]. Beijing: China Braille Press, 2013.
- [2] Zhu HX, Hu XJ. Study of modern using medicine regulation in the treatment of insomnia with TCM [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2008, 26: 775-776.
- [3] Cao JX, Zhang QY, Cui SY, et al. Hypnotic effect of jujubosides from Semen Ziziphi Spinosae [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130: 163-166.
- [4] Chen J, Maiwulanjiang M, Lam KYC, et al. A standardized extract of the fruit of *Ziziphus jujuba* (jujube) induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: a signaling mediated by protein kinase A [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62: 1890-1897.
- [5] Guo SM, Fan XW, He JW. Hypnotic effect of flavonoids from Semen Ziziphi Spinosae [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1998, 21: 578-579.
- [6] Jiang JG, Huang XJ, Chen J, et al. Comparison of the

- sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen *Ziziphus jujube* [J]. Nat Prod Res, 2007, 21: 310–320.
- [7] Ma Y, Han H, Nam SY, et al. Cyclopeptide alkaloid fraction from *Zizyphi Spinosa* Semen enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117: 318–324.
- [8] Qiao W. Study on the Sedative and Hypnosis Active Component from *Zizyphus vulgaris* var *Spinosa* (酸枣仁镇静催眠有效成分的研究) [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2002.
- [9] Chen L X, Yang LG, Xia GY, et al. Traditional Chinese medicine preparation method of the chemical constituents of the body metabolites [J]. Int J Pharm Res (国际药学研究杂志), 2013, 40: 711–719.
- [10] Ma JJ, Kang LP, Zhou WB, et al. Identification and characterization of saponins in extract of *Zizyphi spinosae* Semen (ZSS) by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF-MS^E) [J]. J Med Plants Res, 2011, 5: 6152–6159.
- [11] Yang B, Yang HS, Chen F, et al. Phytochemical analyses of *Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa* seed by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Analyst, 2013, 138, 6881–6888.
- [12] Ren Y, Wang PY, Wu CS, et al. Identification of the metabolites after oral administration of extract of *Zizyphi Spinosa* Semen to rats or dogs by high-performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27: 17–26.
- [13] Niu CY, Wu CS, Sheng YX, et al. Identification and characterization of flavonoids from Semen *Zizyphi Spinosa* by high-performance liquid chromatography / linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry [J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12: 300–312.
- [14] Sun S, Liu H, Xu S, et al. Quality analysis of commercial samples of *Zizyphi spinosae* semen (suanzaoren) by means of chromatographic fingerprinting assisted by principal component analysis [J]. J Pharm Anal, 2014, 4: 217–222.
- [15] Man KP, Park JH, Shin YG, et al. Analysis of alkaloids in the seeds of *Zizyphus jujuba*, by high performance liquid chromatography [J]. Arch Pharm Res, 1991, 14: 99–102.
- [16] Guo S, Duan JA, Tang YP, et al. UHPLC-TOFMS coupled with chemometric method as a powerful technique for rapid exploring of differentiating components between two *Zizyphus species* [J]. J Sep Sci, 2011, 34: 659–666.
- [17] Bao KD, Li P, Qi LW, et al. Characterization of flavonoid metabolites in rat plasma, urine, and feces after oral administration of Semen *Zizyphi Spinosa* extract by HPLC-diode-array detection (DAD) and ion-trap mass spectrometry (MSⁿ) [J]. Chem Pharm Bull, 2009, 57: 144–148.
- [18] Liu B. The Study and Analysis on the *in vivo* Metabolism of the Components in Traditional Chinese Medicine (中药成分体内代谢与分析研究) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [19] Wang LE, Cui XY, Cui SY, et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of Semen *Zizyphi spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT_{1A} receptors [J]. Phytomedicine, 2010, 17: 404–409.
- [20] Cheng G, Bai YJ, Zhao YY, et al. Flavonoids from *Zizyphus jujuba* Mill var. *spinosa* [J]. Tetrahedron, 2000, 56: 8915–8920.
- [21] Zhang Y, Xie JB, Zhang YQ, et al. Degradation kinetics of jujuboside A by rat intestinal flora and identification of the metabolites by HPLC-MS/MS [J]. Int J Food Prop, 2014, 17: 1841–1849.
- [22] Zhang YQ, Zhang Y, Zhang KS, et al. Degradation kinetics of jujuboside B by rat intestinal flora *in vitro* with an RRLC-MS-MS method [J]. J Chromatogr Sci, 2014, 52: 691–696.
- [23] Cao JX, Zhang QY, Cui SY, et al. Hypnotic effect of jujubosides from Semen *Zizyphi Spinosa* [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130: 163–166.
- [24] Li L, Liu GY, Liu JS, et al. Optimized compatibility of sedative-hypnotic components in *Zizyphi Spinosa* Semen by uniform design [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 1374–1377.
- [25] Han BH, Park MH. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa* [J]. Arch Pharm Res, 1987, 10: 203–207.