

基于肠道菌群转化的酸枣仁质量标志物预测分析

崔小芳¹, 杜晨晖^{1*}, 裴香萍¹, 秦雪梅², 闫艳^{2*}

1. 山西中医药大学中药学院, 山西 太原 030619

2. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 从肠道菌群代谢转化的角度, 研究酸枣仁水提取物转化前后原型及代谢产物。 **方法** 酸枣仁水提取物与正常人肠道菌群在厌氧条件下分别共孵育 0.083、1、4、12、24 h。采用超高效液相色谱-高分辨质谱分析技术, 对孵育液中的化合物进行鉴定并分析代谢途径, 继而以化合物峰面积百分比为指标, 绘制不同时间点孵育液中黄酮、皂苷和生物碱类成分的变化规律。 **结果** 酸枣仁水提取物中共表征了 31 种原型成分, 转化后的提取物中鉴定了 4 个代谢产物。苯基异喹啉类生物碱转化 24 h 内无明显降解。黄酮类成分的代谢反应类型丰富且反应程度剧烈, 在 24 h 内降解完全。酸枣仁皂苷 A 和 B 主要发生水解反应。乌药碱、酸李碱、山柰酚-3-O-芸香糖苷、斯皮诺素、维采宁、酸枣仁皂苷 A 和 B 可作为酸枣仁潜在质量标志物 (Q-marker)。 **结论** 将肠道菌群体外转化作为逆向佐证体内研究结果的一种方式, 为中药 Q-marker 的预测提供一种新思路和新途径。

关键词: 酸枣仁提取物; 肠道菌群; 代谢产物; 高分辨质谱; 质量标志物; 乌药碱; 酸李碱; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 斯皮诺素; 维采宁; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4634-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.016

Investigation and predictive analysis on Q-marker of *Ziziphi Spinosae Semen* based on human intestinal microbiota transformation

CUI Xiao-fang¹, DU Chen-hui¹, PEI Xiang-ping¹, QIN Xue-mei², YAN Yan²

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective The aim of this work was to investigate the quality markers (Q-markers) of *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) based on biotransformation by human intestinal microbiota. **Methods** In this study, *in vitro* biotransformation of ZSS aqueous extract by normal human intestinal microbiota was analyzed using UPLC-Q-Orbitrap-MS. Furthermore, the time course of the biotransformation was studied to probe into the biotransformation mechanism of compounds in ZSS by human intestinal flora. The change rules of flavonoids, saponins and alkaloids in the incubation solution at different time points were plotted based on the percentage of peak area of compounds. **Results** A total of 31 original ingredients and four metabolites were characterized in transformed ZSS aqueous extract by human intestinal microbiota. No obvious degradation was observed for benzyloisoquinoline alkaloids within 24 h. As far as flavones concerned, a wide range of metabolic reactions as well as significant reaction were shown. Meanwhile, these flavonoids were completely degraded during 24 h. In addition, both jujuboside A and jujuboside B were metabolized to their saponins by deglycosylation reactions. Thus, coclaurine, zizyphusine, kaempferol-3-O-rutinoside, spinosin, vicenin II, jujuboside A, and jujuboside B were referred as prospective Q-markers. **Conclusion** The results indicated that the chemical compounds in ZSS were obviously affected by transformation. Intestinal transformation studies play an important role for the elucidation of therapeutic material basis of ZSS and it should be taken into account during the process of the investigation of Q-marker.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen* aqueous extract; human intestinal microflora; metabolites; Q-Orbitrap-MS; Q-marker; coclaurine; zizyphusine; kaempferol-3-O-rutinoside; spinosin; vicenin II; jujuboside A; jujuboside B

收稿日期: 2019-05-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603289); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603251); 山西省重点研发计划项目 (201803D31087); 山西省科技攻关计划——振东专项 (2016ZD0105); 山西省科技攻关计划——振东专项 (2016ZD0104); 晋药综合开发利用协同创新中心项目 (2017-JYXT-25); 山西中医药大学科技创新团队 (2018-TD-009)

作者简介: 崔小芳, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与开发。E-mail: cui_sunflower@163.com

*通信作者 杜晨晖, 男, 副教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)3179979 E-mail: 13653412562@163.com

闫艳, 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药体内过程研究及中药质量控制。Tel: (0351)7018379 E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

中药质量标志物 (Q-marker) 是中药质量研究的核心概念, 按照中药 Q-marker 的定义要求, 其发现和确定应遵循有效、传递与溯源及可测等原则^[1]。基于对药物传输及体内过程的基本认识, 吸收入血直至到达靶器官的成分才可能是最终的效应成分。从质量传递与溯源的角度, 血中的效应成分是质量传递体系的最终环节, 也是中药 Q-marker 确定的重要依据^[2]。

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子^[3], 是中医药临床治疗失眠的首选中药^[4]。《名医别录》首次记载酸枣仁“治烦心不得眠, 补中, 益肝气”。目前从酸枣仁中分离鉴定了 130 余种化合物, 包括生物碱类、黄酮类和皂苷类等^[2]。纵观酸枣仁药效物质基础研究的历史长河, 在以活性为导向的传统分离模式下, 阐明了酸枣仁催眠作用的部分有效成分, 能够为其有效性、安全性及质量控制等提供科学数据支撑。在中医药整体观指导下, 本课题组^[5-6]采用体内-体外物质组关联和血清化学与网络药理学关联的方法初步遴选了酸枣仁体内潜在效应物质, 为酸枣仁 Q-marker 的预测和确定提供了良好的实验基础。然而, 血清化学研究中同样暴露了一些研究难点。酸枣仁中黄酮类和皂苷类化合物血药浓度较低, 不易检测。药物在吸收之前首先要经过胃肠消化道系统, 特别是肠道菌群的代谢转化作用。酸枣仁复杂化学成分体系是否也同样经历了肠道菌群生物转化生成其相应的代谢产物尚不明确, 文献研究表明^[7-11], 酸枣仁皂苷 A 和 B、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素和 6'''-对香豆酰斯皮诺素等单体化合物在大鼠或正常人肠道菌的作用下, 可发生去糖基化、去酰基化等反应, 并生成容易被吸收的苷元类化合物等。众所周知, 肠道菌群可通过还原、水解甲基化、乙酰化、脱糖基等一系列生化反应对中药进行代谢转化, 从而显著影响中药各类成分的体内吸收及生物活性^[12], 如人参皂苷主要肠道菌群代谢产物 Compound K 比人参皂苷原型化合物具有更高的生物利用度及生物活性^[13]。为此, 有必要从肠道菌群代谢的角度进一步分析酸枣仁中不同类型化合物的代谢行为。

本研究以酸枣仁水提取物为研究对象, 利用正常人体肠道菌群对其进行代谢转化研究; 整合 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术分析酸枣仁水提取物经正常人体肠道菌群代谢后的代谢产物及代谢途径, 为

酸枣仁 Q-marker 预测分析提供更加科学的依据。

1 材料

1.1 仪器

Dionex UHPLC Ultimate™ 3000 高效液相系统; Thermo-Q-Orbitrap-MS 质谱仪 (Thermo Scientific 公司), 配有电喷雾离子源 (ESI); Thermo Xcalibur 分析软件; YQX-II 厌氧培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司)。

1.2 药品与试剂

酸枣仁购自河北省安国市嘉润中药材有限公司, 经山西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为鼠李科酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。对照品乌药碱 (批号 HC225036198)、斯皮诺素 (批号 20160314)、牡荆素 (批号 HV055288198)、6'''-阿魏酰斯皮诺素 (批号 77690-92-7)、山柰酚 (批号 HK201888198)、酸枣仁皂苷 A (批号 20160315)、麦珠子酸 (批号 HA060808198)、美洲茶酸 (批号 21302-79-4)、白桦脂酸 (批号 472-15-1) 购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 酸枣仁皂苷 B (批号 20170210) 购于南京春秋生物工程有限公司; 异牡荆素 (批号 Y-116-171222) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 当药黄素 (批号 ST17240120MG)、山柰酚 3-O-芸香糖苷 (批号 ST08020120MG)、维采宁 (批号 ST16800120MG) 购自上海诗丹德科技有限公司; 芹菜素 (批号 140426) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 所有对照品质量分数均 > 98%; 厌氧培养基 (GAM 肉汤, 青岛宾得生物技术有限公司); 杜氏磷酸缓冲液 (DPBS, 北京索莱宝科技有限公司); 甲醇、乙腈和甲酸 (质谱级, 美国 Fisher 公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 酸枣仁提取物的制备

取酸枣仁饮片约 100 g, 粉碎 (过 1 号药典筛), 精密称定, 加 10 倍量水, 浸泡 30 min, 加热回流提取 2 h, 滤过; 滤渣再加 8 倍量水, 加热回流提取 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至 0.5 g/mL (生药量计), 真空冷冻干燥 24 h, 即得酸枣仁提取物, 4 °C 冷藏备用。精密称取酸枣仁提取物 225.5 mg, 加入 15 mL 无菌水, 制备 15 mg/mL 酸枣仁提取物溶液, 备用。采用课题组建立的 LC-MS/MS 法^[14]测得酸枣仁提取物中的乌药碱 1.05 μg/mL、维采宁

0.69 $\mu\text{g/mL}$ 、斯皮诺素 6.32 $\mu\text{g/mL}$ 、当药黄素 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、山柰酚 3-*O*-芸香糖苷 0.21 $\mu\text{g/mL}$ 、6'''-阿魏酰斯皮诺素 3.33 $\mu\text{g/mL}$ 、酸枣仁皂苷 A 1.97 $\mu\text{g/mL}$ 和酸枣仁皂苷 B 1.19 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 酸枣仁提取物肠道菌群转化样品的制备

6 名健康中国志愿者的新鲜粪便样本 (3 名男性和 3 名女性, 无吸烟史, 1 个月内未使用抗生素类药物) 用 10 倍无菌 DPBS 溶液稀释, 涡旋混匀, 以 2 000 r/min 离心 10 min, 上清液作为肠道菌群孵育液。将 10 mL GAM 培养液与 10 mL 肠道菌群孵育液混合于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下厌氧培养 9 h, 随后加入 15 mg/mL 酸枣仁提取物溶液 1 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 0.083、1、4、12、24 h, 每个时间点平行制备 2 份样品。同时制备肠道菌群-GAM 培养液及酸枣仁提取物-GAM 培养液 2 种阴性对照样品。肠道菌群代谢转化样品溶液以水饱和正丁醇萃取 3 次, 每次 10 mL, 以 4 500 r/min 离心 5 min, 移取并合并上层清液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 蒸干, 残渣加 50% 甲醇溶解, 定容至 1 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC[®] HSS T3 (150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~17% B; 8~10 min, 17% B; 10~11 min, 17%~18% B; 11~12 min, 18%~20% B; 12~22 min, 20%~33% B; 22~25 min, 33%~100% B; 25~27 min, 100% B; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 1 μL 。

2.3.2 质谱条件 离子源为 ESI 源, 扫描方式: ESI⁺ 模式和 ESI⁻ 模式切换; 毛细血管电压 3.2 kV (ESI⁺) 和 2.5 kV (ESI⁻); 离子源温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 辅助加热器温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气体体积流量 35 L/min, 辅助气体体积流量 10 L/min。使用 Full MS dd- ms^2 模式进行分析, 质量扫描范围 m/z 100~1 500, 碰撞能量 (NCE) 值 20%、30%、50%。

2.4 数据处理与分析

使用 Xcalibur 软件进行数据采集与分析。质量精确度误差 $\leq \pm 5.0 \times 10^{-6}$ 。将化合物的精确相对分子质量和二级离子碎片信息与课题组自建的酸枣仁化学成分数据库信息 (包括中英文名称、分子式、精确相对分子质量、CAS 号) 进行比对, 并结合文献报道, 鉴定和推测酸枣仁提取物中化学成分及其代谢转化产物^[6]。对代表性化学成分的提取离子流

图峰面积进行积分, 计算其峰面积百分比 (PPA, $\text{PPA} = A_i/A_{\text{max}}$, A_i 是各个时间点化学成分的峰面积; A_{max} 是某个时间点化学成分最大的峰面积)。并使用 GraphPad Prism 6 软件绘制不同时间点肠道菌群转化化学成分峰面积百分比变化折线图。

3 结果

利用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 对酸枣仁提取物及其肠道菌群转化样品的化学成分进行分析。通过将酸枣仁提取物+GAM 培养液与 GAM 培养液比较, 共表征了 31 种化学成分, 包括生物碱类 4 种、黄酮类 18 种及三萜皂苷类 9 种; 酸枣仁提取物+肠道菌群+GAM 培养液与酸枣仁提取物+GAM 培养液比较, 鉴定了 4 个代谢产物, 表明代谢产物的生成是由肠道菌群转化产生的。

3.1 生物碱类

酸枣仁提取物中共鉴定了 4 个苜基异喹啉类生物碱。乌药碱通过与对照品的一级和二级质谱信息对比进行鉴定, 见表 1。化合物 A1 产生 m/z 314 [M]⁺ 分子离子峰, 依次产生碎片 m/z 269、237、209、175、151、107, 推断其为木兰箭毒碱^[15]。并推断化合物 A3 为酸李碱^[6]。化合物 A4 产生 m/z 268 [M+H]⁺ 分子离子峰, 依次产生碎片 m/z 251、236、219、191, 推断其为山矾碱^[16]。如图 1-A 所示, 4 个苜基异喹啉类生物碱的 PPA 在 24 h 的代谢转化周期内变化微弱。

3.2 三萜皂苷类

皂苷类成分是酸枣仁改善睡眠的主要药效成分之一。酸枣仁提取物中共鉴定了 9 个三萜类皂苷, 包括四环三萜 5 个和五环三萜 4 个。在负离子模式下, 当以精确相对分子质量 m/z 1 251.600 4 提取时, 出现 2 个色谱峰, 因此推测保留时间为 25.32 min 的化合物是酸枣仁皂苷 A₁, 为酸枣仁皂苷 A (质谱图见图 2-A) 的同分异构体。同样, 当提取精确相对分子质量为 m/z 1 089.547 6 时, 提取离子流图中出现 2 个色谱峰, 推测保留时间为 25.59 min 的化合物为酸枣仁皂苷 B₁, 为酸枣仁皂苷 B 的同分异构体。此外, 参考文献报道^[15]推测化合物 S5 为乙酰酸枣仁皂苷 B。

如图 1-B 所示, 乙酰酸枣仁皂苷 B 的降解速度较快, 在前 4 h 内降解了 40%, 24 h 可以达到完全降解, 推测其在肠道菌群作用下水解脱去 1 分子的乙酰基生成酸枣仁皂苷 B。值得注意的是, 酸枣仁皂苷 A 与酸枣仁皂苷 A₁ 降解的趋势一样, 而酸枣

表 1 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术鉴定酸枣仁水提取物及其肠道菌群转化物中化学成分

Table 1 Identification of chemical constituents in a *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) extract and metabolites in fermented ZSS by UPLC-Q-Orbitrap-MS

编号	<i>t_R</i> /min	化合物	化学式	选择离子	<i>m/z</i>	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子
A1	8.54	木兰箭毒碱 (magnocurarine)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	[M] ⁺	314.174 5	-1.719	269.117 0, 237.091 0, 209.095 6, 175.075 0, 151.075 0, 107.049 4
A2	9.72	乌药碱* (coclaurine)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286.143 8	0.315	269.117 3, 254.093 8, 237.091 0, 209.096 1, 175.075 5, 143.049 3, 107.049 6
F1	10.12	维采宁* (vicenin II)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 8	2.973	503.120 4, 473.109 9, 383.077 9, 353.067 8, 325.072 5, 297.077 0
A3	10.35	酸李碱 (zizyphusine)	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	[M] ⁺	342.169 4	-1.709	297.111 6, 282.088 1, 265.085 3, 219.080 1, 166.077 1, 91.978 8, 58.066 0
F2	12.38	6'''-[4'''-(<i>O</i> -葡萄糖)]-香草酰斯皮诺素 (6'''-[4'''-(<i>O</i> -glu)]-vanilloyl-spinosin)	C ₄₂ H ₄₈ O ₂₃	[M-H] ⁻	919.252 6	2.563	757.200 1, 607.163 7, 427.103 8, 307.060 7, 292.038 2, 209.045 0
F3	12.89	6'''-[4'''-(<i>O</i> -葡萄糖)]-对羟基苯甲酰斯皮诺素 (6'''-[4'''-(<i>O</i> -glu)]- <i>p</i> -hydroxybenzoyl-spinosin)	C ₄₁ H ₄₆ O ₂₂	[M-H] ⁻	889.242 9	-2.915	727.189 2, 427.103 6, 307.061 5, 292.037 2
F4	12.93	异牡荆素 2''- <i>O</i> -β-葡萄糖苷 (isovitexin-2''- <i>O</i> -β-glucoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	595.164 4	-2.212	433.112 1, 415.101 4, 397.091 0, 367.081 1, 337.069 9, 313.070 1, 283.059 5
F5	13.52	山茶苷 B (camelliaside B)	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	725.194 2	2.641	674.530 1, 285.038 6, 284.032 8, 255.029 9, 227.034 9
A4	13.85	山矾碱 (caaverine)	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	268.132 8	-1.474	251.106 3, 236.082 4, 219.080 2, 191.085 3
F6	13.95	异斯皮诺素 (isospinosin)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	607.167 3	2.657	487.124 1, 427.103 6, 325.071 3, 307.061 6, 292.038 2, 281.046 2
F7	14.10	牡荆素* (vitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.111 7	-2.778	415.100 5, 397.091 1, 367.079 1, 337.069 2, 313.069 7, 283.058 7
F8	14.15	斯皮诺素* (spinosin)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	607.168 0	3.761	427.102 8, 325.070 8, 307.060 9, 297.040 2, 292.038 0
F9	14.43	异牡荆素* (isovitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.112 4	-2.018	415.101 6, 397.091 9, 367.081 4, 337.070 4, 313.070 5, 283.059 9
F10	15.01	当药黄素* (swertisin)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	445.114 4	2.243	325.073 4, 297.040 6, 282.053 8
F11	15.68	异当药黄素 (isoswertisin) (M1)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	445.114 1	2.666	325.072 0, 314.043 9, 297.040 5, 282.053 1, 269.047 3
F12	16.02	6'''-香草酰斯皮诺素 (6'''-vanilloyl-spinosin)	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	757.199 6	2.918	427.104 0, 325.070 0, 307.061 4, 292.037 8, 209.044 6
F13	16.16	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷* (kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 9	2.251	285.040 2, 255.029 7, 227.034 4
F14	16.37	6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素 (6'''- <i>p</i> -hydroxybenzoyl-spinosin)	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	727.190 2	4.640	427.103 0, 325.072 9, 307.060 9, 292.037 7, 239.055 4
F15	16.66	异牡荆素 2''- <i>O</i> -(6-阿魏酰)-葡萄糖苷 [isovitexin-2''- <i>O</i> -(6-feruloyl)-glucoside]	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	769.199 3	2.469	593.151 0, 413.088 0, 293.045 6, 235.061 4
F16	17.39	6'''-二羟苯基酰斯皮诺素 (6'''-dihydrophaseoyl-spinosin)	C ₄₃ H ₅₂ O ₁₉	[M-H] ⁻	871.303 7	2.140	607.170 4, 427.103 8, 325.070 1, 307.060 9, 292.037
F17	17.41	6'''-芥子酰斯皮诺素 (6'''-sinapoyl-spinosin)	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₉	[M-H] ⁻	813.226 2	2.485	427.103 4, 307.060 8, 297.039 6, 292.037 8, 265.071 9
F18	17.70	6'''-对香豆酰斯皮诺素 (6'''- <i>p</i> -coumaroyl-spinosin)	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	753.204 5	2.661	607.162 8, 427.103 5, 325.070 7, 307.060 6, 292.038 4, 265.071 0

续表 1

编号	t_R /min	化合物	化学式	选择离子	m/z	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子
F19	17.90	6'''-阿魏酰斯皮诺素* (6'''-feruloyl-spinosin)	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	783.215 2	2.082	607.166 7, 427.102 8, 325.071 9, 292.037 9, 235.060 7
F20	24.65	柚皮素 (naringenin) (M2)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.061 1	4.021	151.002 4, 119.048 7, 107.012 3, 93.032 8
F21	24.92	芹菜素* (apigenin) (M3)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 7	1.270	225.054 8, 151.002 2, 117.033 0
F22	25.08	山柰酚* (kaempferol) (M4)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 5	4.194	—
S1	25.23	酸枣仁皂苷 A* (jujuboside A)	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₆	[M+COOH] ⁻	1 251.598 1	-1.836	1 205.593 9, 1 073.551 0, 911.499 1, 749.447 0, 603.386 3
S2	25.32	酸枣仁皂苷 A ₁ (jujuboside A ₁)	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₆	[M+COOH] ⁻	1 251.602 9	1.975	—
S3	25.50	酸枣仁皂苷 B* (jujuboside B)	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	[M+COOH] ⁻	1 089.546 0	-1.464	1 043.540 5, 911.499 3, 749.447 1, 603.387 8, 161.043 7, 101.022 4
S4	25.59	酸枣仁皂苷 B ₁ (jujuboside B ₁)	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	[M+COOH] ⁻	1 089.550 5	2.685	—
S5	25.76	乙酰酸枣仁皂苷 B (acetyljujuboside B)	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₂	[M+COOH] ⁻	1 131.557 1	0.928	—
S6	26.81	美洲茶酸* (ceanothic acid)	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	[M-H] ⁻	485.327 5	2.800	423.326 8, 240.938 8, 91.980 0
S7	27.37	麦珠子酸* (alphitolic acid)	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.347 9	2.341	—
S8	27.65	表美洲茶酸 (epiceanothic acid)	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	[M-H] ⁻	485.327 5	2.800	440.930 4, 423.327 4
S9	28.65	白桦脂酸* (betulinic acid)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M-H] ⁻	455.353 3	2.983	—

*与对照品比对确认, A-生物碱 F-黄酮 S-皂苷 M-代谢产物

*Confirmed with reference compounds, A-alkaloids F-flavones S-saponins M-metabolites

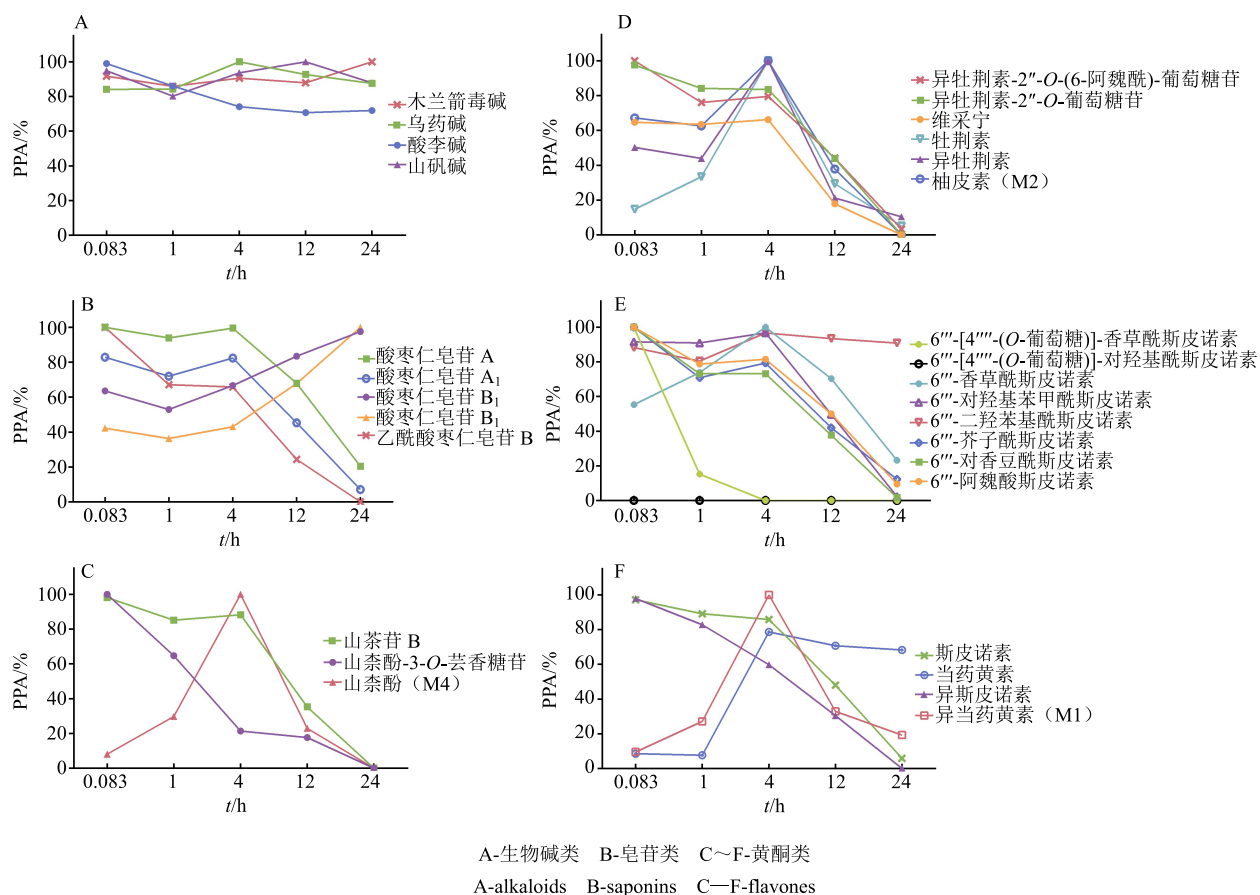


图 1 酸枣仁提取物与肠道菌群共孵育不同时间后不同类型化合物 PPA (n = 2)

Fig. 1 Percentage of peak area of compounds in fermented ZSS extract by human intestinal microflora at different time points (n = 2)

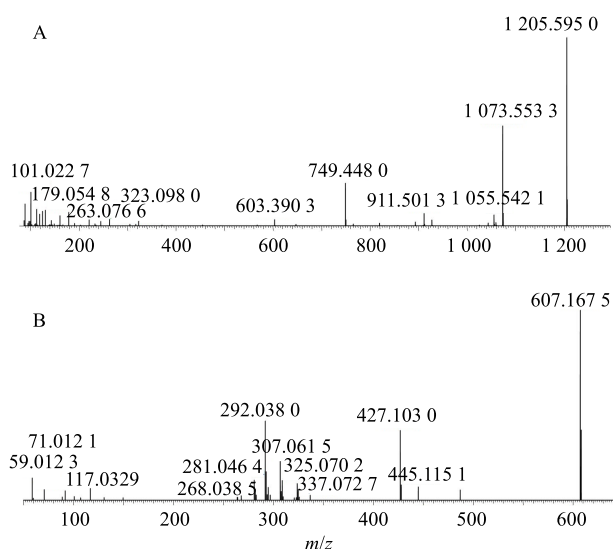


图 2 在负离子模式下酸枣仁皂苷 A (A) 和斯皮诺素 (B) 的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectra of jujuboside A (A) and spinosin (B) in ZSS in negative mode

仁皂苷 B 与酸枣仁皂苷 B₁ 增加趋势也一样, 因此, 推测酸枣仁皂苷 A 与酸枣仁皂苷 A₁ 在肠道菌群作用下发生了水解反应, 都可以脱去 1 分子葡萄糖, 分别转化为酸枣仁皂苷 B 与酸枣仁皂苷 B₁。此结果与解军波课题组^[7-8]研究结果一致。可见, 无论是单体化合物, 还是提取物, 酸枣仁皂苷类都会发生水解反应。遗憾的是, 酸枣仁皂苷元未被鉴定, 这一结果与文献报道^[7]的酸枣仁皂苷 A 在肠道菌群作用下可生成苷元的结果不完全一致。分析其原因可能是提取物中存在的其他类型成分影响了皂苷类成分的代谢速度, 代谢途径见图 3-A。

3.3 黄酮类

酸枣仁黄酮类化合物按照糖基类型不同主要分为 O-糖苷和 C-糖苷 2 种。本研究从提取物中鉴定了 18 个原型化合物, 转化的提取物中鉴定了 4 个代谢产物 (M1、M2、M3、M4)。

3.3.1 O-糖苷类 O-糖苷类主要以山柰酚为母核。山柰酚-3-O-芸香糖苷和山柰酚通过与对照品比较进行鉴定, 见表 1。在负离子模式下, 化合物 F5 产生 m/z 725 [M-H]⁻ 分子离子峰, 并可产生 m/z 285 [M-H]⁻ 的特征峰, 参考文献推断其为山茶苷 B^[15]。如图 1-C 所示, 山茶苷 B 可脱掉 1 分子木糖生成山柰酚-3-O-芸香糖苷, 而山柰酚-3-O-芸香糖苷可继续脱掉芸香糖生成山柰酚 (M4)。在 24 h 内, 山茶苷 B 和山柰酚-3-O-芸香糖苷 2 个糖苷降解完全。在 4 h

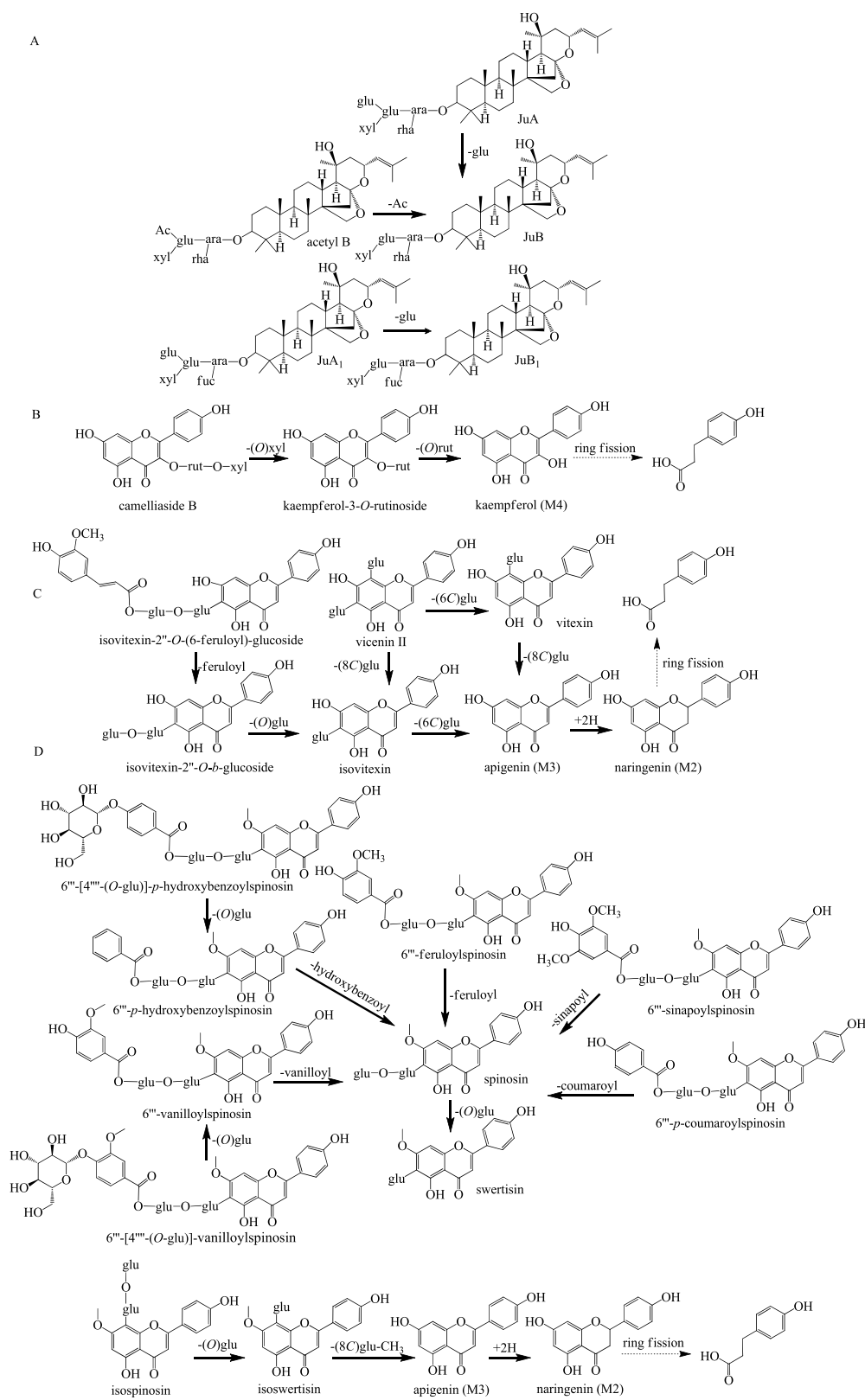
内, 山柰酚生成率达到 100%。4 h 后, 山柰酚开始降解, 并在 24 h 完全降解。其减少的原因可能是山柰酚在肠道菌群作用下, 发生了环裂解反应, 生成小分子酚酸类所致^[17], 代谢途径见图 3-B。

3.3.2 C-糖苷类 黄酮 C-糖苷是酸枣仁中一类特征性成分。牡荆素和异牡荆素 7 位均为羟基, 且分别具有 1 个 8-C 糖和 6-C 糖的同分异构体。维采宁 7 位为羟基, 且同时具有 8-C 和 6-C 2 个糖的黄酮糖苷化合物。当药黄素和异当药黄素 7 位均是甲氧基, 且分别具有 1 个 6-C 糖和 8-C 糖的糖苷类化合物。

如图 1-D 所示, 提取物转化 4 h 后, 异牡荆素-2''-O-(6-阿魏酰)-葡萄糖苷、异牡荆素 2''-O-β-葡萄糖苷和维采宁开始降解。与此同时, 牡荆素和异牡荆素的 PPA 达到最高点。据此推测异牡荆素-2''-O-(6-阿魏酰)-葡萄糖苷水解掉 1 分子阿魏酰基 (F) 生成异牡荆素 2''-O-β-葡萄糖苷。异牡荆素 2''-O-β-葡萄糖苷和维采宁均可脱掉 1 分子葡萄糖生成异牡荆素 (6-C)。同时维采宁也可脱掉 1 分子葡萄糖生成牡荆素 (8-C)。此外, 转化 4 h 后, 牡荆素和异牡荆素均开始降解, 且 24 h 内降解完全。以上结果与文献报道一致^[17]。牡荆素和异牡荆素可以降解生成芹菜素; 继而芹菜素通过加氢还原反应生成柚皮素^[17-18]。然而, 本实验中仅检测到了柚皮素 (M2), 且其在 4 h 时 PPA 最高, 随后开始逐渐降低。其原因可能是柚皮素在肠道菌群作用下同样发生了开环反应^[19-20], 见图 3-C。

当药黄素为母核的黄酮类化合物是酸枣仁中另一类主要的化合物。酸枣仁提取物中共鉴定了 10 种原型化合物。斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素均以当药黄素为母核。在负离子模式下, 化合物 F12、F14、F16、F17 和 F18 分别产生 m/z 757 [M-H]⁻、 m/z 727 [M-H]⁻、 m/z 871 [M-H]⁻、 m/z 813 [M-H]⁻ 和 m/z 753 [M-H]⁻ 准分子离子峰, 并均产生了与斯皮诺素相同的碎片离子 m/z 427、325、307、292, 推断它们为斯皮诺素的系列衍生物, 具体见表 1。

如图 1-E 所示, 从 4 h 开始, 斯皮诺素系列衍生物 6'''-[4'''-(O-葡萄糖)]-香草酰斯皮诺素、6'''-[4'''-(O-葡萄糖)]-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-香草酰斯皮诺素、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-芥子酰斯皮诺素、6'''-对香豆酰斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素的 PPA 均减少。推测含有酰基取代基团的斯皮诺素衍生物均可被肠道菌群水解转化为斯皮诺素, 见图 3-D。如图 1-F 所示, 4 h 之前, 斯皮



实线箭头所指为检测到的代谢物 虚线箭头所指为未检测到的代谢物
 Solid arrows represent detected metabolites; Dotted arrows represent non-detected metabolites

图 3 在肠道菌群作用下酸枣仁水提取物中化合物的代谢途径

Fig. 3 Proposed metabolic pathway of compounds in fermented ZSS extract by human intestinal microflora

诺素降解速率缓慢; 4 h 后其降解速率显著增加, 24 h 内全部降解。与之相反, 当药黄素的 PPA 在前 4 h 明显增加, 4 h 后其不再降解, 推测斯皮诺素被肠道菌群水解脱掉 1 分子葡萄糖生成当药黄素。这一结果与文献报道^[9-11]一致。值得注意的是, 异斯皮诺素从反应开始时即发生降解, 24 h 内全部降解; 而异当药黄素的 PPA 呈现出先上升后下降的趋势, 推测异斯皮诺素脱掉 1 分子葡萄糖生成代谢产物异当药黄素 (M1), 而异当药黄素继续脱糖生成芹菜素, 芹菜素发生氢化反应生成柚皮素 (M2), 见图 3-D。

4 讨论

本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术分析了酸枣仁水提取物经肠道菌群代谢转化后样品中的化学成分。酸枣仁水提取物中共鉴定了 31 个原型成分, 包括生物碱、皂苷和黄酮类; 肠道菌群转化后的提取物中鉴定了 4 个代谢产物。酸枣仁水提取物中黄酮类成分种类丰富且含量较高, 具有改善睡眠和抗抑郁等重要功能^[21-22]。在本研究中发现无论是黄酮 O-糖苷还是 C-糖苷, 均发生了明显的肠道代谢反应, 且 O-糖苷比 C-糖苷转化更快。对于斯皮诺素系列衍生物 (C-糖) 而言, 正常人体肠道菌群可有效水解衍生物上的芥子酰、对香豆酰、阿魏酰、香草酰与对羟基苯甲酰等基团, 生成共同的代谢产物斯皮诺素。斯皮诺素继而生成当药黄素 (6-C 糖), 且未进一步被代谢。然而, 异当药黄素 (8-C 糖) 可以继续发生水解反应。此外, 维采宁 (同时具有 6-C 和 8-C) 可水解脱去葡萄糖, 生成牡荆素和异牡荆素, 继而生成柚皮素。由此可见, 除了当药黄素外, 其他黄酮-C 糖均可被肠道菌群水解脱去葡萄糖生成相应的苷元。以山柰酚为母核的 O-糖苷和以斯皮诺素为母核的 C-糖苷均可被肠道菌群代谢。从肠道菌群代谢的角度解释了黄酮类化合物血清浓度低的原因。综上, 从肠道菌群代谢的角度表明山柰酚-3-O-芸香糖苷、斯皮诺素和维采宁可作为酸枣仁的潜在 Q-marker。

酸枣仁中生物碱类成分主要以苜基异喹啉类为主, 具有镇静催眠、抗抑郁等药理作用^[23-24]。本研究发现苜基异喹啉类生物碱类成分未发生明显的代谢转化。课题组前期体内代谢研究结果表明苜基异喹啉类生物碱主要发生肝脏 I 相代谢反应^[5-6]。此结果与肠道菌群代谢结果相一致。因此, 乌药碱和酸李碱可作为酸枣仁的潜在 Q-marker。

酸枣仁皂苷是酸枣仁中另一类重要的活性成

分。本研究表明, 在 24 h 内肠道菌群对酸枣仁水提取物中皂苷类化合物的水解是不彻底的, 酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 均可检测到。课题组前期研究表明大鼠 ig 给予酸枣仁水提取物后, 酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和酸枣仁皂苷 B₁ 在 6 h 的尿液和血液中均可被检测到, 而 24 h 时酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 在尿液中仍可被检测到^[5-6]。体内代谢与体外代谢研究结果相互吻合。综上, 体内外代谢研究均提示酸枣仁达玛烷型皂苷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血液到达靶器官。以上研究从肠道菌群代谢的角度进一步佐证了酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 可作为酸枣仁的 Q-marker。

综上所述, 在正常人体肠道菌群作用下, 苜基异喹啉类生物碱类成分未发生明显代谢反应; 皂苷类成分主要被肠道菌群水解为次级皂苷; 而黄酮类成分的代谢反应类型丰富、且程度剧烈, 不同类型的黄酮成分均可被水解为苷元。以酸枣仁水提取物 (标准汤剂) 为核心样本进行质量研究, 确定 Q-marker, 有助于向药材和饮片及炮制品溯源, 并向复方制剂和中成药延伸。以上肠道菌群代谢研究结果为酸枣仁 Q-marker 的预测提供了一种逆向佐证的方式, 为中药 Q-marker 的发现提供一种新思路和新途径。

参考文献

- [1] 张铁军, 白 钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196.
- [2] 闫 艳, 张 敏, 崔小芳, 等. 酸枣仁化学成分体内过程及其质量标志物研究思路探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 299-309.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 杜晨晖, 崔小芳, 裴香萍, 等. 酸枣仁皂苷类成分及其对神经系统作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1258-1268.
- [5] 李 强, 杜晨晖, 张 敏, 等. 血清化学与网络药理学关联研究酸枣仁的体内效应成分 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1936-1943.
- [6] 闫 艳, 李 强, 杜晨晖, 等. 基于体内-体外物质组关联分析酸枣仁潜在效应物质 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 283-290.
- [7] Zhang Y, Xie J B, Zhang Y Q, *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(8): 1841-1849.
- [8] Zhang Y Q, Zhang Y, Zhang K S, *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(7): 691-696.
- [9] Zhang T, Xie J B, Zhang Y Q, *et al.* High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applied for metabolic study of spinosin by rat intestinal flora [J]. *J Liq Chromatogr*, 2013, 36(10): 1391-1400.
- [10] Song P P, Zhang Y Q, Qiao L D, *et al.* A new HPLC-MS/MS method for investigating degradation kinetics of 6''-feruloylspinosin and identifying its metabolites by rat intestinal bacterial flora *in vitro* [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2016, 39(15): 724-729.
- [11] Jiao L J, Li Y X, Zhang Y Q, *et al.* Degradation kinetics of 6''-*p*-coumaroylspinosin and identification of its metabolites by rat intestinal flora [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(22): 4449-4455.
- [12] 汤 齐, 高 霞, 耿 婷, 等. 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3629-3635.
- [13] Oh J, Kim J S. Compound K derived from ginseng: Neuroprotection and cognitive improvement [J]. *Food Funct*, 2016, 7(11): 4506-4515.
- [14] 张 敏, 杜晨晖, 马 敏, 等. 酸枣仁饮片汤剂质量评价研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4520-4527.
- [15] Zhang F X, Li M, Qiao L R, *et al.* Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Zizyphus* species [J]. *J Pharm Biomed*, 2016, 122(15): 59-80.
- [16] Park M K, Park J H, Shin Y G, *et al.* Analysis of alkaloids in the Seeds of *Zizyphus jujuba* by high performance liquid chromatography [J]. *Arch Pharm Res*, 1991, 14(2): 99-102.
- [17] Maren V, Selma E, Freda M F, *et al.* Mutual interaction of phenolic compounds and microbiota: Metabolism of complex phenolic apigenin C- and kaempferol O-derivatives by human fecal samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 66(2): 485-497.
- [18] Annett B, Michael B. Intestinal bacterium *Eubacterium cellulosolvens* deglycosylates flavonoid C- and O-glucosides [J]. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(22): 8151-8153.
- [19] Schneider H, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus* [J]. *Arch Microbiol*, 2000, 173(1): 71-75.
- [20] 潘亚平, 张振海, 丁冬梅, 等. 黄酮类化合物肠道细菌生物转化的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(19): 3239-3245.
- [21] 赵启铎, 舒乐新, 王 颖, 等. 酸枣仁总黄酮抗抑郁作用的实验研究 [J]. *天津中医药*, 2011, 28(4): 335-337.
- [22] Zhang Y Q, Qiao L D, Song M Y, *et al.* HPLC-ESI-MS/MS analysis of the water-soluble extract from *Ziziphi Spinosae Semen* and its ameliorating effect of learning and memory performance in mice [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(40): 509-516.
- [23] 左 军, 王海鹏, 柴剑波, 等. 酸枣仁抗抑郁作用现代药理研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(7): 179-181.
- [24] 黄之镡, 马伟光. 酸枣仁及活性物质的药理研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2018, 27(3): 57-60.