

基于多元统计分析和网络药理学的炒酸枣仁饮片质量标志物预测分析

李 泽¹, 杜 鹤¹, 解玉军¹, 衡依然¹, 段慧竹¹, 裴香萍¹, 闫 艳^{2*}, 杜晨晖^{1*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 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 基于多元统计分析和网络药理学分析预测炒酸枣仁饮片潜在的质量标志物(Q-Marker)。方法 利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱联用(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital trap mass spectrometry, UHPLC-Q-Orbitrap-MS)解析生、炒酸枣仁饮片的主要成分,运用多元统计分析结合VIP>1和P<0.05筛选出炮制前后潜在的差异化学成分。结合网络药理学筛选核心靶点构建“成分-靶点-通路”网络关系,预测炒酸枣仁潜在的Q-Marker,以潜在Q-Marker为指标对市售样品进行含量测定,验证Q-Marker的科学性。结果 生、炒酸枣仁共鉴定54个化学成分,包括斯皮诺素、当药黄素等黄酮类成分,酸枣仁皂苷A、酸枣仁皂苷B等皂苷类成分,以及木兰花碱、乌药碱等生物碱类成分;结合多元统计分析共找到木兰花碱、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷A、白桦脂酸等28个差异性成分;经网络药理学分析筛选出包括17个差异成分的Q-Marker库,分别为酸枣仁皂苷A、酸枣仁皂苷B、美洲茶酸、白桦脂酸、木兰花碱、乌药碱、去甲荷叶碱、巴婆碱、斯皮诺素、当药黄素、维采宁II、6'''-对-香豆酰斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、芹菜素、桦木酮酸、牡荆素、异牡荆素;结合课题组前期研究及市售样品测定结果,最终确定木兰花碱、乌药碱、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷A和B作为炒酸枣仁的Q-Marker。结论 分析预测的Q-Marker为炒酸枣仁的整体质量控制及临床应用提供科学依据,同时也为其功效关联物质的研究及作用机制的阐释奠定基础。

关键词: 多元统计分析; 网络药理学; 酸枣仁; 炒酸枣仁; 质量标志物; UHPLC-Q-Orbitrap-MS; 成分-靶点-通路; 木兰花碱; 乌药碱; 斯皮诺素; 6'''-阿魏酰斯皮诺素; 酸枣仁皂苷; 整体质量控制

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4811-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.006

Prediction and analysis of Q-Markers of fried *Ziziphi Spinosae Semen* pieces based on multivariate statistical analysis and network pharmacology

LI Ze¹, DU He¹, XIE Yu-jun¹, HENG Yi-ran¹, DUAN Hui-zhu¹, PEI Xiang-ping¹, YAN Yan², DU Chen-hui¹

1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

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

Abstract: Objective To explore the potential Q-Markers of fried *Suanzaoren* (*Ziziphi Spinosae Semen*, ZSS) (FZSS) based on multivariate statistical analysis and network pharmacology. **Methods** Ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital trap mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-MS) was used to analyze the main components in ZSS and FZSS, and the potential differential components between ZSS and FZSS were screened out by using multivariate statistical analysis combined with VIP > 1 and P < 0.05. Further, the main action targets were analyzed to construct the “component-target-pathway” network relationship through network pharmacology, and predict the potential Q-Markers of FZSS. The scientificity of potential Q-Markers was verified by the content determination of the potential Q-Markers in commercial samples. **Results** A total of 54 chemical components, including flavonoid (such as spinosin and swertisin), saponin (juzuboside A and juzuboside B, etc.) and

收稿日期: 2021-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603251); 国家自然科学基金项目(81603289); 山西省科技厅重点研发计划项目(201803D31087); 山西省教育厅高等学校青年科研人员培育计划(20); 山西省教育厅高等学校科技创新项目(2020L0422); 2019年山西省教育厅优秀研究生创新项目(2019SY515); 山西中医药大学科技创新团队项目(2018-TD-009); 山西中医药大学2021年科技创新能力培育计划(2021PY-QN-07)

作者简介: 李 泽(1996—), 女, 硕士, 研究方向为中药资源与开发。Tel: 18434376763 E-mail: leze163@163.com

***通信作者:** 闫 艳, 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药质量控制及中药体内过程研究。Tel: (0351)7018379 E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn
杜晨晖, 男, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础研究。Tel: (0351)3179982 E-mail: dch@sxtcm.edu.cn

alkaloid components (magnoflorine, coclaurine, etc.), were identified from ZSS and FZSS, and 28 differential components, such as magnoflorine, 6'''-feruloylspinosin, jujuboside A, and betulinic acid, were found through multivariate statistical analysis. A potential Q-Marker component library contained 17 potential bioactive components (including jujuboside A, jujuboside B, ceanothic acid, betulinic acid, magnoflorine, coclaurine, normuciferine, asimilobine, spinosin, swertisin, vicienin II, 6'''-p-coumaroylspinosin, 6'''-feruloylspinosin, apigenin, betulonic acid, vitexin, isovitexin) was screened by network pharmacology. Magnoflorine, coclaurine, spinosin, 6'''-feruloylspinosin, jujuboside A, and jujuboside B were finally identified as the Q-Markers of FZSS combined with the preliminary research of our research group and the results of the commercial samples. **Conclusion** The Q-Marker predicted in this study can provide a reference for the whole quality control and clinical application of FZSS. Meanwhile, it can also provide the basis for the further research on the efficacy-substance relation and mechanism of FZSS.

Key words: multivariate statistical analysis; network pharmacology; *Ziziphi Spinosae Semen*; fried *Ziziphi Spinosae Semen*; Q-Markers; UHPLC-Q-Orbitrap-MS; component-target-pathway; magnoflorine; coclaurine; spinosin; 6'''-feruloylspinosin; jujuboside; whole quality control

酸枣仁 *Ziziphi spinosae Semen* (ZSS) 来源于鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子, 其味甘酸、性平, 归心、肝、胆经, 具有养心益肝、安神、敛汗之功^[1]。现代研究表明, 酸枣仁主要药理作用有镇静催眠^[2-3]、抗惊厥^[4]、抗焦虑^[5]、改善心肌缺血^[6]、改善学习记忆能力^[7]等。在传统中医的临床用药中, 《本草图经》: “今医家两用, 睡多生使, 不得睡炒熟, 生熟便尔顿异”, 即酸枣仁生品与炮制品用来治疗不同的疾病。现代研究表明酸枣仁生品和炮制品均具有镇静安神作用, 以炒酸枣仁 *fried Ziziphi spinosae Semen* (FZSS) 的作用更强, 且目前临床使用最多的亦是炒酸枣仁。《中国药典》2020 年版中生、炒酸枣仁的质量标准相同, 但现代文献研究发现酸枣仁在炒制后斯皮诺素^[8]、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B^[9]等有效化学成分的含量及溶出率^[10]存在差异, 化学成分的改变是否会在一定程度上造成生、炒酸枣仁的临床应用有所不同? 基于此, 通过研究生、炒酸枣仁中药效物质基础差异, 从而预测炒酸枣仁饮片的质量标志物是非常有必要的。

中药质量标志物 (Q-Marker) 是近年来由刘昌孝院士团队提出的中药质量评价与质量控制的核心概念^[11-12]。中药 Q-Marker 是代表某种中药特征的标志物, 其来源明确, 与功效用途相关联, 是反映一味中药质量特征的化合物组合, 也是近年来开展中药质量控制和药效物质基础研究的一个重要方向。因此, 进一步明确炒酸枣仁饮片的 Q-Marker, 对于炒酸枣仁饮片的质量控制是十分必要的。本课题组前期对酸枣仁的化学成分^[13]、体内代谢^[14]、物质基础^[15]、作用机制^[16]进行深入研究, 并在研究其质量标志物方面取得一定进展^[17-18]。本研究结合课题组已有成果, 利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨

道阱质谱联用 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital trap mass spectrometry, UHPLC-Q-Orbitrap-MS) 与多元统计分析相结合的方法, 筛选出生、炒酸枣仁潜在的差异化学成分, 并运用网络药理学方法对这些潜在的化学标记物进行验证, 预测炒酸枣仁潜在的 Q-Marker, 阐明“成分-靶点-通路”之间的关系, 为炒酸枣仁饮片的整体质量控制及临床应用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 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、紫外检测器、自动进样器, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Thermo Scientific™ Q Exactive™ Orbitrap 质谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Waters e 2695 高效液相色谱仪, 配自动进样器、四元梯度泵、柱温箱、UV 检测器以及 Empower 色谱工作站, 美国 Waters 公司; ELSD 6000 蒸发光散射检测器, 美国奥泰公司; 油浴锅, 江苏科析仪器有限公司; Neofuge 13R 高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司; 涡旋仪, Thermo Scientific 公司; FA3204B 电子天平, 上海精科天美科学仪器有限公司; DNA120 离心浓缩仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 药材和试剂

收集市售不同产地生酸枣仁、炒酸枣仁各 10 批, 详细信息见表 1。由山西中医药大学杜晨晖教授鉴定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。样品保存于山西中医药大学中药资源与鉴定实验室。

对照品: 乌药碱 (批号 HC225036198)、木兰花

表1 市售生、炒酸枣仁样品来源

Table 1 Origin of ZSS and FZSS

序号	批号	产地来源	序号	批号	产地来源
ZSS1	181001	山西	FZSS1	1909001	河北
ZSS2	20190101	山东汶上	FZSS2	20190901	山西
ZSS3	201907	河北	FZSS3	180908006	河北
ZSS4	201913	东北	FZSS4	180601	山东
ZSS5	201901	陕北	FZSS5	190901	山东
ZSS6	201911015	河北邯郸	FZSS6	191001	河北
ZSS7	201912	山东	FZSS7	190403	河北邢台
ZSS8	201911	山东汶上	FZSS8	191009005	河北
ZSS9	201909	河北	FZSS9	190305	山东
ZSS10	201908	河北	FZSS10	10070114	山东济宁

碱(批号 20160710)、维采宁 II(批号 HV187847198)、斯皮诺素(批号 20160314)、6'''-阿魏酰斯皮诺素(批号 20160303)、酸枣仁皂苷 A(批号 20160315)均购于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;所有对照品经 HPLC 测定质量分数均大于 98%;色谱级、质谱级甲醇、乙腈和甲酸购自美国 Fisher 公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炒酸枣仁饮片制备方法

生酸枣仁(ZSS6)经检验质量符合《中国药典》2020年版一部酸枣仁项下规定。称取 50 g,锅温设置为 170 ℃,稳定 10 min 后将酸枣仁平铺于锅底,不断翻炒,炒制 5 min 后取出,放凉,即得炒酸枣仁,平行制备 6 份。酸枣仁粉碎过筛(60 目)。

2.2 生、炒酸枣仁化学成分分析

2.2.1 样品制备 精密称定生、炒酸枣仁粉末 2 g,置于索氏提取器中,加石油醚 50 mL 浸泡过夜,再加入 40 mL,90 ℃加热回流 4 h,药渣挥去溶剂转移至圆底烧瓶,加 50 mL 70%乙醇回流提取 2 h,过滤,药渣用 70%乙醇 5 mL 洗涤,合并滤液挥干,甲醇复溶并定容至 10 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜即得 UPLC-MS 供试品溶液。分别从各样品溶液中取等量溶液,混匀作为质量控制(quality control, QC)样品。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC® HSS T3 柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈,洗脱梯度:0~8 min, 5%~17%乙腈;8~10 min, 17%乙腈;10~11 min, 17%~18%乙腈;11~12 min, 18%~20%乙腈;12~17

min, 20%~23%乙腈;17~22 min, 23%~33%乙腈;22~30 min, 33%~60%乙腈;30~32 min, 60%~100%乙腈;32~34 min, 100%乙腈;34~36 min, 100%~5%乙腈;36~40 min, 5%乙腈;体积流量为 0.3 mL/min;柱温为 40 ℃;进样量 3 μL。

2.2.3 质谱条件 离子源为 ESI 源;正、负离子切换扫描;工作模式 Full MS/dd MS²;质谱参数为鞘气流速 40 arb (ESI⁺)、38 arb (ESI⁻);辅助气流速 5 arb (ESI⁺)、10 arb (ESI⁻);喷雾电压 3.2 kV (ESI⁺)、2.5 kV (ESI⁻);毛细管温度 320 ℃;离子源温度 350 ℃ (ESI⁺)、300 ℃ (ESI⁻);一级全扫描分辨率 70 000 FWHM,二级扫描分辨率为 17 500 FWHM,质荷比窗口宽度为 m/z 2.0;扫描范围 m/z 100~1500;动态排除持续时间 8 s。

2.2.4 统计方法 UPLC-MS 数据采用 Thermo 自带的 Compound Discoverer 2.0 软件对 LC-MS 数据进行峰的解卷积、峰对齐、峰校准和归一化等数据预处理,生成包含保留时间(retention time)和峰面积(peak area)的两维数据矩阵。此外,利用 Thermo Xcalibur 3.0 工作站同时匹配 mzCloud、ChemSpider、PlantCyc 在线数据库和自建化合物数据库对化合物进行鉴定。整理数据格式后,导入 SIMCA-P (Umetrics 公司)软件进行多元统计分析(PCA、OPLS-DA、S-plot)。采用 SPSS 16.0 软件对差异代谢物进行 t 检验,采用 GraphPad Prism (version 8.0, GraphPad Software, Inc.) 软件对差异代谢物进行半定量分析。

2.2.5 化学成分鉴定 结合文献检索及课题组前期研究成果^[19-20],在本次生、炒酸枣仁中共鉴定出 54 个成分,见表 2,其中正离子模式下鉴定出 35 个,负离子模式下鉴定出 42 个。54 个成分包括 12 个生物碱、15 个皂苷和 27 个黄酮类化合物。对比生、炒酸枣仁的图谱(图 1)可直观发现两者的化学成分基本相同,其中原酸枣仁皂苷 A(S-33)、芹菜素(F-40)、梓木酮酸(S-54)仅在生酸枣仁中可被鉴定,而牡荆素(F-7)、异牡荆素(F-15)、异当药黄素(F-17)、6'''-(N - β -D-glucopyranosyl)-2''',3'''-dihydro-2'''-oxo-3'''-yl-acetatespinosin(F-23)、6''-阿魏酰-6'''-香豆酰斯皮诺素(F-39)只在炒酸枣仁中检测到。由此可知,酸枣仁在炒制过程中部分化学成分发生变化。

2.2.6 多元统计分析 拟采用多元统计分析的方法对生、炒酸枣仁中差异性成分进行分析。主成分分

表 2 UPLC-MS 技术鉴定生、炒酸枣仁化学成分
Table 2 Identification of composition of ZSS and FZSS by UPLC-MS

序号	化合物	tr/min	分子式	[M+H] ⁺	m/z	偏差/ (×10 ⁻⁶)	碎片离子	[M-H] ⁻ / [M-COOH] ⁻	m/z	偏差/ (×10 ⁻⁶)	碎片离子	ZSS	FZSS
A-1	3R-N-glc-3-hydroxy-indoleacetic acid	4.26	C ₁₆ H ₁₉ NO ₉	370.113 3	370.113 8	-0.000 5	146.060 29, 188.070 77, 190.050 03, 208.060 55, 212.071 04	368.098 7	368.098 9	-0.000 2	144.044 17, 146.023 44, 158.059 97, 176.070 62, 368.099 33	+	+
A-2	乌药碱	9.48	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.143 8	286.144 0	-0.000 2	107.049 65, 269.117 28, 286.143 89, 175.075 64, 237.091 16	-	-	-	-	+	+
A-3	juzirine	9.89	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	282.112 6	282.112 5	0.000 1	282.112 46, 188.070 68, 1 556.044 51, 128.049 68, 283.115 81	-	-	-	-	+	+
F-4	维采宁 II	10.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.145 0	595.165 7	-0.020 7	325.070 56, 457.113 31, 379.081 18, 295.060 06, 427.102 94	593.130 9	593.151 2	-0.020 3	539.152 40, 353.067 11, 297.077 06, 383.077 79, 413.088 41	+	+
A-5	去甲异紫堇碱	10.01	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	328.154 7	328.154 3	0.000 4	328.154 39, 297.112 34, 265.086 15, 282.088 93, 237.091 03	-	-	-	-	+	+
F-6	6'''-(4'''-O-葡萄糖)-香草酰斯皮诺素	12.28	C ₄₂ H ₄₈ O ₂₃	921.265 9	921.266 8	-0.000 9	327.086 58, 151.039 29, 351.086 82, 297.076 02, 429.118 68	919.251 4	919.252 7	-0.001 3	757.200 13, 209.045 06, 167.033 95, 292.037 46, 307.062 16	+	+
F-7	牡荆素	12.80	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.113 3	433.112 9	0.000 4	283.060 15, 313.070 71, 337.070 86, 367.081 51, 397.091 58	-	-	-	-	-	+
F-8	异牡荆素-2''-O-β-吡喃葡萄糖苷	12.98	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.145 0	595.165 7	-0.020 7	313.070 65, 433.113 10, 283.060 03, 337.070 56, 415.062 51	593.130 9	593.151 2	-0.020 3	293.045 99, 59.012 27, 413.088 44, 593.152 34, 71.012 21	+	+
A-9	木兰花碱	13.26	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	342.170 1	342.170 0	0.000 1	342.170 17, 58.066 14, 297.112 27, 265.082 27, 237.091 06	-	-	-	-	+	+
F-10	6'''-(4'''-O-葡萄糖)-阿魏酰斯皮诺素	13.41	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₃	947.281 6	947.282 5	-0.000 9	177.054 73, 327.086 36, 145.028 64, 351.086 30, 297.075 90	945.267 0	945.267 9	-0.000 9	783.215 21, 427.102 54, 292.038 12, 307.061 89, 235.060 94	+	+
F-11	山茶苷 B	13.43	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	727.209 0	727.208 0	0.001 0	287.055 02, 85.029 17, 71.050 07, 97.029 08, 129.054 68	725.194 3	725.193 4	0.000 9	284.032 68, 255.029 66, 227.034 36, 725.194 46, 151.002 47	+	+
F-12	异斯皮诺素	13.69	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.182 1	609.181 4	0.000 7	447.129096, 285.076 05, 327.086 49, 85.029 24, 297.076 08	607.167 5	607.166 8	0.000 7	292.038 12, 309.041 53, 281.045 68, 427.104 46, 117.032 98	+	+
A-13	山矾碱	13.78	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	268.1041	268.133 2	-0.029 1	251.106 54, 219.080 49, 191.085 57, 180.093 26, 268.133 03	-	-	-	-	+	+
F-14	斯皮诺素	13.86	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.182 1	609.181 4	0.000 7	327.086 43, 297.075 90, 351.086 43, 429.118 23, 381.096 92	607.167 5	607.166 8	0.000 7	292.038 12, 427.103 06, 307.061 46, 281.045 14, 59.012 18	+	+
F-15	异牡荆素	14.20	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.113 3	433.112 9	0.000 4	283.060 18, 295.060 82, 313.070 89, 337.070 92, 397.061 06	431.098 4	431.098 3	0.000 1	311.056 34, 283.061 22, 341.066 86, 431.098 42, 323.956 40	-	+
F-16	当药黄素	14.88	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 6	447.129 0	-0.000 4	297.075 65, 327.086 33, 351.086 24, 411.107 12, 267.065 00	445.114 0	445.114 0	0.000 0	297.040 62, 282.053 38, 328.823 46, 230.854 69, 310.821 75	+	+
F-17	异当药黄素	15.55	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 2	447.128 6	-0.000 4	447.128 85, 299.055 81, 327.086 33, 285.075 78, 313.031 32	-	-	-	-	-	+
F-18	6'''-香草酰斯皮诺素	16.02	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	759.214 0	759.213 1	0.000 9	327.086 46, 151.039 25, 351.086 67, 297.076 23, 429.118 19	757.199 1	757.198 5	0.000 6	209.044 43, 167.033 80, 427.102 11, 757.196 67, 292.037 05	+	+
F-19	山柰酚-3-O-芸香糖苷	16.06	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.166 6	595.165 7	0.000 9	287.05524, 85.029 22, 71.050 11, 129.054 93, 57.034 58	593.151 2	593.335 1	-0.183 9	285.040 53, 255.029 85, 227.034 71, 211.039 32	+	+
F-20	6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素	16.45	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₇	729.203 4	729.202 5	0.000 9	327.086 33, 121.028 72, 351.086 40, 297.075 90, 429.118 23	727.188 8	727.188 0	0.000 8	137.023 03, 179.034 00, 93.032 91, 239.055 82, 427.103 33	+	+

续表 2

序号	化合物	t _R /min	分子式	[M+H] ⁺	m/z	偏差/ (×10 ⁻⁶)	碎片离子	[M-H] ⁻ / [M-COOH] ⁻	m/z	偏差/ (×10 ⁻⁶)	碎片离子	ZSS	FZSS
F-21	异牡荊素-2"-O-(6-对香豆 酰)-吡喃葡萄糖苷	16.70	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇	741.203 5	741.202 5	0.001 0	147.044 27, 313.070 80, 283.060 18, 337.070 71, 433.112 88	739.188 5	739.188 0	0.000 5	293.045 78, 413.088 71, 161.059 43, 593.155 82, 205.050 00	+	+
F-22	异牡荊素-2"-O-(6-阿魏酰)- 吡喃葡萄糖苷	16.85	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₈	771.213 3	771.213 1	0.000 2	177.054 75, 313.070 62, 145.028 59, 283.060 06, 337.070 86	769.199 2	769.198 5	0.000 7	293.045 81, 413.088 50, 235.060 62, 193.050 02, 134.036 07	+	+
F-23	6'''-(N-β-D-glucopyranosyl)- 2'''',3'''-dihydro-2'''-oxo- 3'''-yl-acetate spinosin	17.60	C ₄₄ H ₄₈ NO ₂₂	-	-	-	-	958.262 3	958.263 1	-0.000 8	649.178 59, 469.114 59, 292.039 25, 146.023 77, 307.062 44	-	+
A-24	巴婆碱	17.84	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	268.104 3	268.103 3	0.001 0	251.106 86, 219.080 78, 191.085 83, 252.110 20, 286.083 36	-	-	-	-	+	+
F-25	6'''-芥子酰斯皮诺素	17.94	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₉	815.240 5	815.239 3	0.001 2	207.065 48, 327.086 55, 175.039 23, 351.083 80, 297.075 90	813.225 3	813.224 8	0.000 5	427.104 00, 292.038 21, 190.026 23, 311.079 50, 265.071 96	+	+
F-26	6'''-二羟苯基酰斯皮诺素	17.95	C ₄₀ H ₅₂ O ₁₉	873.317 6	873.318 4	-0.000 8	327.086 40, 351.086 36, 297.075 93, 323.091 55, 331.122 04	871.303 0	871.304 1	-0.001 1	427.103 24, 307.061 28, 607.161 68, 292.038 09, 309.041 78	+	+
F-27	6'''-对香豆酰斯皮诺素	18.29	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₇	755.218 9	755.218 2	0.000 7	147.044 28, 327.086 43, 351.068 62, 297.075 78, 429.116 94	753.203 7	753.203 6	0.000 1	145.028 15, 753.204 10, 163.038 88, 292.038 02, 119.048 65	+	+
F-28	6'''-阿魏酰斯皮诺素	18.48	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	785.228 6	785.228 7	-0.000 1	177.054 52, 327.085 97, 145.028 43, 351.086 00, 297.075 56	783.215 1	783.214 2	0.000 9	783.216 67, 134.035 98, 292.037 96, 427.103 94, 193.049 73	+	+
A-29	mucronine J	20.39	C ₂₇ H ₄₀ N ₄ O ₄	485.312 4	485.312 2	0.000 2	114.128 14, 72.081 64, 485.312 41, 58.066 10, 115.131 45	-	-	-	-	+	+
A-30	去甲荷叶碱	20.61	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	282.112 7	282.148 8	-0.036 1	265.122 28, 250.098 83, 234.103 39, 266.125 85, 282.149 08	-	-	-	-	+	+
F-31	6'''-(-)-phaseoylspinosin	21.18	C ₄₀ H ₅₀ O ₁₉	871.301 9	871.303 0	-0.001 1	327.086 43, 351.086 73, 297.075 81, 393.097 44, 429.118 29	869.287 4	869.288 1	-0.000 7	427.104 74, 292.037 72, 307.061 49, 607.162 60, 325.073 94	+	+
F-32	6'''-阿魏酰异斯皮诺素	21.87	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	785.228 6	785.228 7	-0.000 1	117.054 76, 447.128 94, 327.086 40, 145.028 63, 285.075 87	783.215 1	783.214 2	0.000 9	161.023 50, 783.213 38, 175.038 97, 325.070 74, 607.166 99	+	+
S-33	原酸枣仁皂苷 A	22.90	C ₆₄ H ₁₀₆ O ₃₂	-	-	-	-	1 385.659 2	1 385.659 4	-0.000 2	949.466 86, 1 081.508 54, 1 385.660 52, 625.360 84, 787.414 86	+	-
F-34	槲皮素	23.19	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-	-	-	-	301.035 4	301.035 3	0.000 1	310.035 49, 151.002 47, 178.997 50, 107.012 11, 65.001 66	+	+
A-35	sanjoinine A	23.38	C ₃₁ H ₄₂ N ₄ O ₄	535.292 1	535.327 9	-0.035 8	148.112 27, 149.115 72, 133.088 84, 105.070 53, 72.607 95	-	-	-	-	+	+
S-36	酸枣仁皂苷 H	23.54	C ₅₈ H ₉₆ O ₂₇	-	-	-	-	1 223.607 1	1 223.606 6	0.000 5	787.413 45, 625.360 35, 1 223.607 67, 919.456 12, 131.033 63	+	+
S-37	酸枣仁皂苷 G	24.86	C ₅₂ H ₈₆ O ₂₂	-	-	-	-	1 107.558 2	1 107.558 1	0.000 1	1 061.560 55, 929.511 90, 911.490 54, 749.445 98, 625.358 46	+	+
A-38	lotusanine A	25.02	C ₃₁ H ₄₂ N ₄ O ₄	535.292 1	535.327 9	-0.035 8	148.112 21, 149.115 83, 133.088 84, 287.175 66, 86.097 08	-	-	-	-	+	+
F-39	6'''-阿魏酰-6'''-香草酰 斯皮诺素	25.41	C ₄₆ H ₄₆ O ₂₁	-	-	-	-	933.245 9	933.249 0	-0.003 1	577.134 64, 292.038 54, 235.061 55, 175.039 25, 134.035 90	-	+
F-40	芹菜素	25.71	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-	-	-	-	269.045 5	269.045 7	-0.000 2	225.054 78, 151.002 53, 117.032 50, 133.813 17, 107.012 12	+	-

续表 2

序号	化合物	t_R/min	分子式	$[\text{M}+\text{H}]^+$	m/z	偏差/ ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	$[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{COOH}]^-$	m/z	偏差/ ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	ZSS	FZSS
A-41	amphibine D	25.83	$\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_5$	632.381 4	632.380 6	0.000 8	148.112 24, 289.191 13, 261.196 26, 344.196 96, 149.115 75	630.366 6	630.366 1	0.000 5	342.182 46, 630.367 68, 273.124 60, 134.059 60, 247.144 60	+	+
F-42	6'',6'''-对阿魏酰 斯皮诺素	26.28	$\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{O}_{21}$	961.276 1	961.277 2	-0.001 1	177.054 79, 327.086 52, 145.028 66, 393.097 11, 351.086 15	959.261 5	959.262 3	-0.000 8	160.015 41, 175.038 88, 134.035 81, 603.150 51, 235.060 68	+	+
S-43	酸枣仁皂苷 A	27.06	$\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	-	-	-	-	1 205.597 8	1 205.596 1	0.001 7	107 3.554 44, 749.448 73, 101.022 76, 113.022 87, 911.501 16	+	+
S-44	酸枣仁皂苷 C	27.12	$\text{C}_{58}\text{H}_{96}\text{O}_{27}$	-	-	-	-	1 281.612 4	1 281.611 0	0.001 4	123 5.606 81, 107 3.554 57, 749.449 16, 105 5.543 70, 108 9.544 31	+	+
S-45	酸枣仁皂苷 A ₁	27.53	$\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	-	-	-	-	1 251.601 0	1 251.600 4	0.000 6	120 5.595 95, 107 3.554 20, 749.449 28, 101.022 77, 125.022 93	+	+
S-46	酸枣仁皂苷 B	28.17	$\text{C}_{52}\text{H}_{84}\text{O}_{21}$	-	-	-	-	1 043.544 6	1 043.542 1	0.002 5	911.502 44, 749.449 16, 101.022 82, 603.391 24, 893.491 76	+	+
S-47	酸枣仁皂苷 I	28.24	$\text{C}_{53}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$	-	-	-	-	1 119.558 2	1 119.558 1	0.000 1	107 3.554 44, 911.503 30, 749.448 85, 603.393 49, 101.022 79	+	+
S-48	乙酰酸枣仁皂苷 B	29.49	$\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$	-	-	-	-	1 131.558 2	1 131.558 1	0.000 1	749.449 46, 102 5.532 96, 911.500 49, 893.489 44, 104 3.547 73	+	+
S-49	24-羟基美洲茶酸	31.25	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6$	-	-	-	-	501.322 4	501.322 1	0.000 3	501.323 03, 471.312 71, 427.323 97, 91.979 80, 472.315 37	+	+
S-50	表美洲茶酸	33.11	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	-	-	-	-	485.327 2	485.327 2	0.000 0	485.327 36, 423.327 55, 486.330 93, 609.911 46, 265.754 12	+	+
S-51	27-羟基美洲茶酸	33.25	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6$	-	-	-	-	501.322 4	501.322 1	0.000 3	501.322 72, 471.312 13, 427.321 93, 409.311 49, 60.991 46	+	+
S-52	美洲茶酸	34.25	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	-	-	-	-	485.327 2	485.327 2	0.000 0	485.327 70, 423.327 88, 60.991 55, 486.331 15, 424.329 38	+	+
S-53	白桦脂酸	35.26	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	-	-	-	-	455.353 1	455.353 1	0.000 0	455.353 42, 61.986 80, 456.356 96, 97.654 97, 115.919 27	+	+
S-54	桦木酮酸	35.76	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	-	-	-	-	455.353 1	455.353 1	0.000 0	455.353 33, 116.927 06, 100.931 76, 180.889 25, 254.850 33	+	-

A-生物碱类成分, F-黄酮类成分, S-皂苷类成分; “+”表示检测到, “-”表示未检测到

A-alkaloids components, F-flavonoid components, S-saponin components; “+” detected, “-” undetected

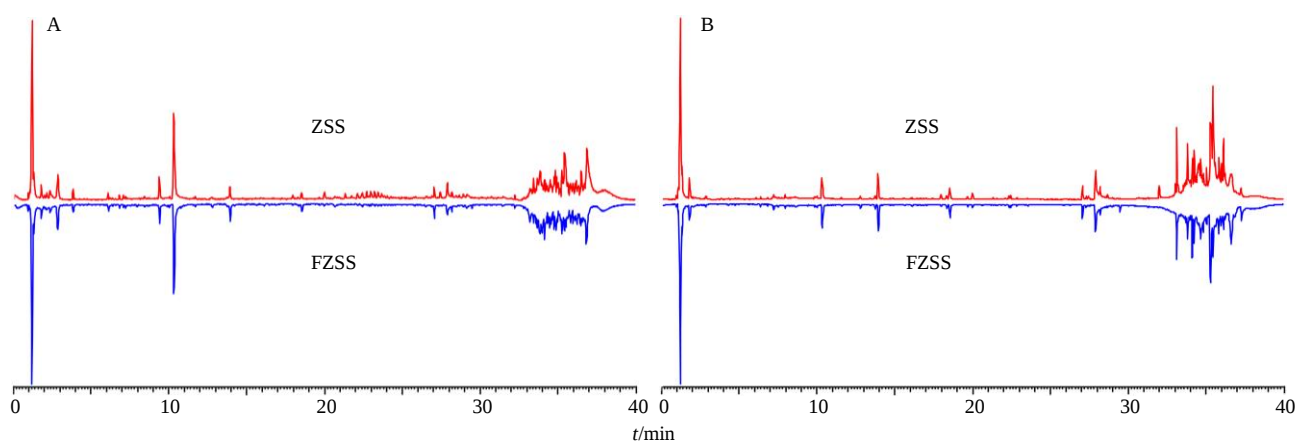


图 1 生、炒酸枣仁正 (A)、负 (B) 离子模式下基峰图

Fig. 1 Basepeak image of ZSS and FZSS in positive (A) and negative (B) ion mode

析 (principal component analysis, PCA) 的得分散点图能直观地显示不同样品之间的整体差异, 由图 2-A 和图 3-A 所示, 正、负离子模式下, QC 样本均紧密的聚集在一起, 表明实验过程仪器精密度良好。正离子模式下, 由主成分 1 (58.7%) 和主成分 2

(20.4%) 为坐标构建 PCA 得分散点图, 生、炒酸枣仁可沿 t_1 轴分开; 负离子模式下, 由主成分 1 (54.8%) 和主成分 2 (27.4%) 为坐标构建 PCA 得分散点图, 生、炒酸枣仁可沿 t_2 轴分开, 直观表明出生、炒酸枣仁之间具有良好的分离趋势, 说明生、

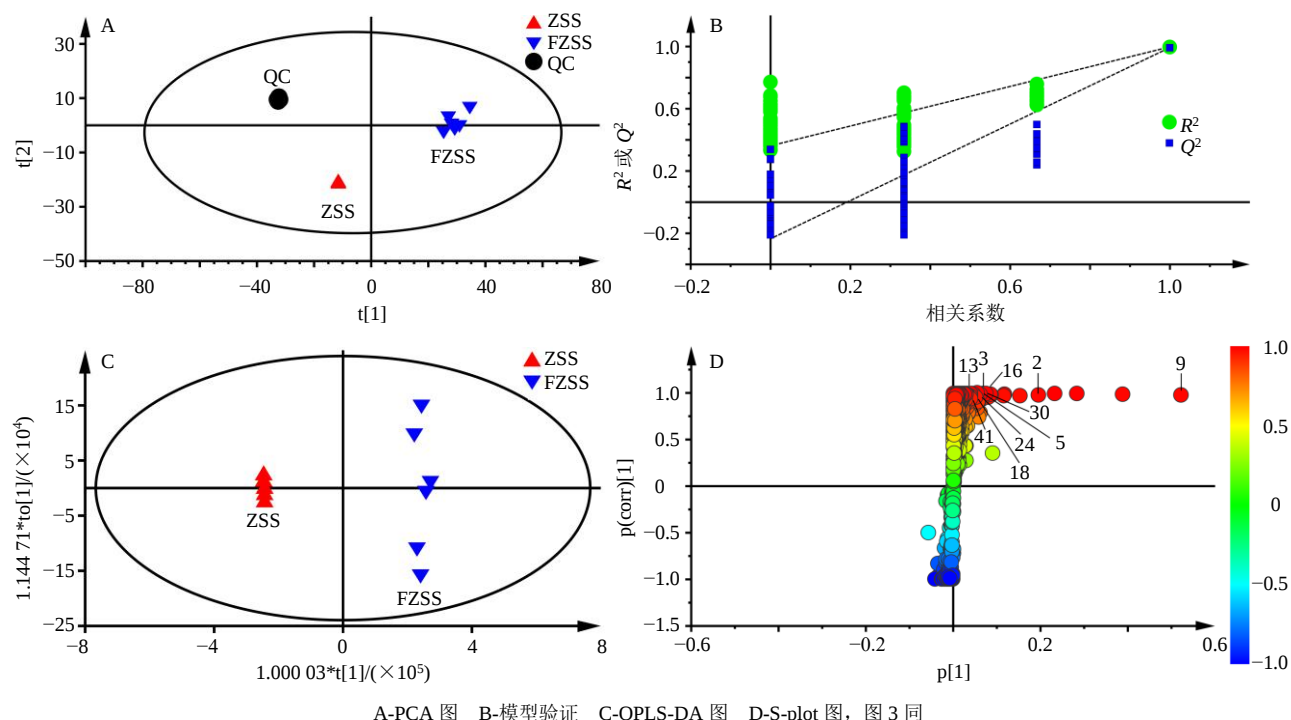


图 2 UHPLC-MS 正离子多元统计分析 ($n = 6$)

Fig. 2 Multiple statistical analysis in positive ion by UHPLC-MS ($n = 6$)

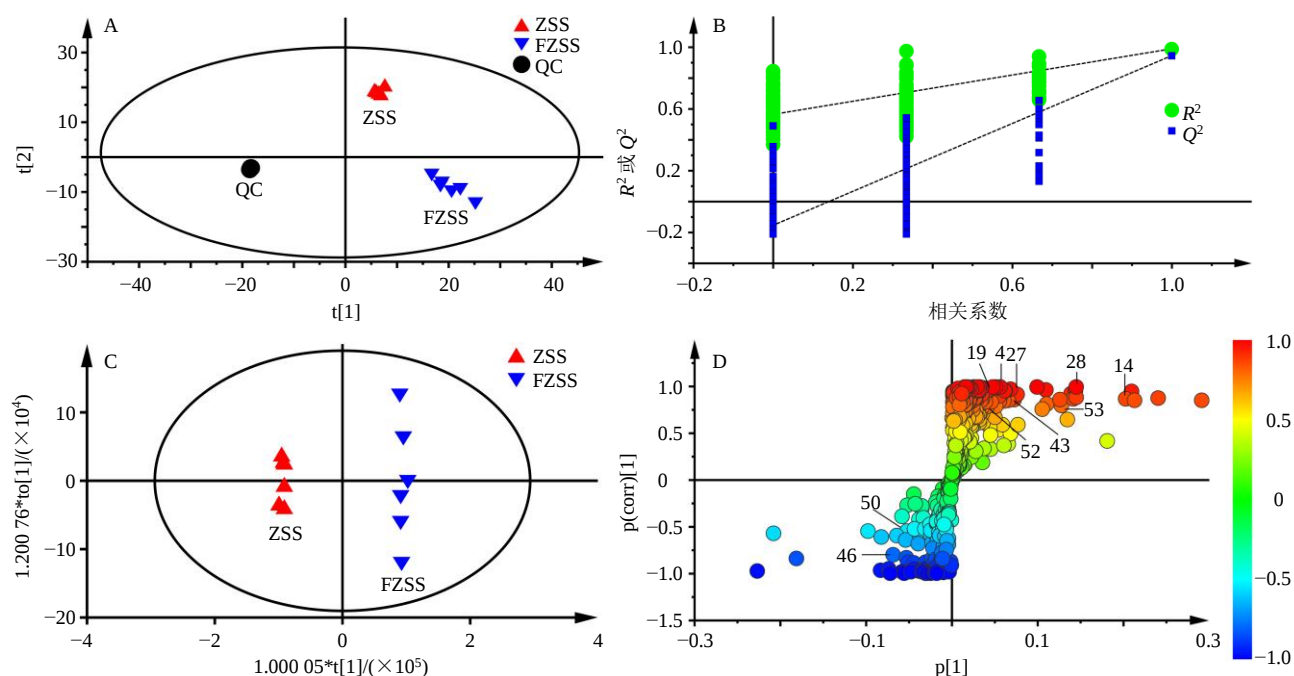


图 3 UHPLC-MS 负离子多元统计分析 ($n = 6$)

Fig. 3 Multiple statistical analysis in negative ion by UHPLC-MS ($n = 6$)

炒酸枣仁中化学成分存在一定差异。

PCA 为无监督的分析方法,在确定差异成分时不能忽略组内误差,也不能消除与研究目的无关的随机误差^[21]。因此,需要采用有监督的 OPLS-DA,以确定生、炒酸枣仁之间的化学差异成分。首先采用排列模型验证 PLS-DA 模型的拟合程度,正离子模式下 200 个排列模型(图 2-B)的参数为 $R^2=0.998$ 、 $Q^2=0.993$;负离子模式下 200 个排列模型(图 3-B)的参数为 $R^2=0.990$ 、 $Q^2=0.946$,且 Q^2 回归线与左边纵轴均相交于零点以下,说明模型有效,可以继续鉴定差异性化学成分。进一步采用 OPLS-DA 分析,寻找二者之间的差异成分,图 2-C 和图 3-C 中,在正、负离子模式下,生、炒酸枣仁之间均能明显分开。

将 $VIP>1$ 和 $P<0.05$ 作为筛选差异化合物的判定标准,寻找生、炒酸枣仁分别在正、负离子模式下的潜在差异化合物。由图 2-D 和图 3-D 可知,在正离子模式下共找出 10 个差异化合物,在负离子模式下共找出 10 个差异化合物,包括 7 个黄酮类、5 个皂苷类和 8 个生物碱类成分。

对 20 个差异性化合物进行相对含量分析,结果见图 4,其中乌药碱(2)、木兰花碱(9)、山矾碱(13)等 9 个生物碱类成分在炒制之后相对含量显著上升($P<0.05$);斯皮诺素(14)、6'''-阿魏酰斯皮诺素(28)、维采宁 II(4)等 6 个黄酮类成分在炒酸枣仁中的相对含量显著高于酸枣仁($P<0.05$);除酸枣仁皂苷 B(46)和表美洲茶酸(50)在炒制之后含量下降外,其余酸枣仁皂苷 A(43)、白桦脂

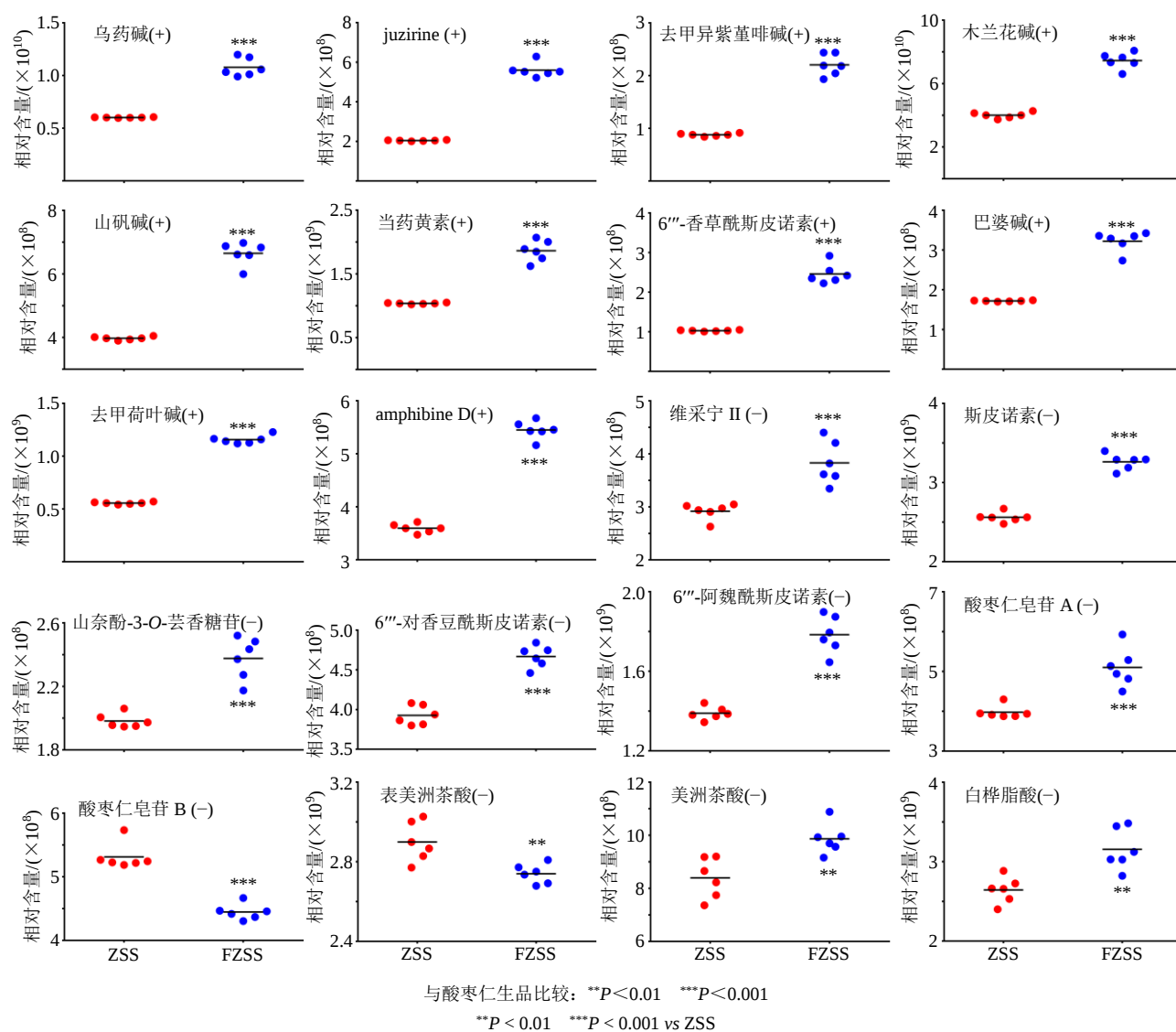


图 4 差异性成分的相对含量变化 ($n = 6$)

Fig. 4 Changes of differential components ($n = 6$)

酸(53)等3个皂苷类化合物在炒制之后相对含量显著上升($P<0.05$)。生物碱、黄酮和皂苷类成分相对含量升高可能是由于炒制后酸枣仁质地酥脆,利于有效成分的溶出^[8-9],且高温会造成黄酮类物质的糖苷键断裂而使结合态的黄酮游离出来^[22],从而导致黄酮类成分的含量增加。

2.3 潜在质量标志物的作用靶标及网络预测

通过检索中药系统药理数据库 TCMSP (<https://tcmbspw.com/tcmbsp.php>) 和 ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>) 查询差异化合物的作用靶点,将获得的靶点蛋白导入在线 STRING 11.0 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 获得 PPI 网络。然后将 Uniprot ID 导入 David 6.8 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>) 对潜在的核心靶点蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。最后,通过 Cytoscape 3.8.2 软件 (美国 Bethesda Softworks 公司) 分别建立化学成分及入血成分的“成分-靶点-通路”网络关系,并对结果进行综合分析。

2.3.1 靶点蛋白与蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析 通过检索中药系统药理数据库 (TCMSP, <http://tcmbspw.com/tcmbsp.php>) 和 (ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>) 查询 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 直观分析和多元统计所得 28 个差异物的作用靶点,最终找到 20 个差异化合物的 389 个靶点蛋白 (表 3)。通过 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 将预测出的靶点蛋白名转换为对应的基因名。将获得的基因名导入 STRING 11.0 网站 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 物种选择为人 (homo sapiens), 最高置信度蛋白交互参数评分值 >0.90 , 其他参数设置不变, 去掉网络中的单一节点, 获得 PPI 网络, 导入 Cytoscape 3.8.2 进行作图, 见图 5。

将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.8.2 进行拓扑特征分析, 选取在度中心性 (degree)、中介中心性 (betweenness)、接近中心性 (closeness) 3 个参数均大于中位数且 $\text{degree} \geq 10$ 的点作为核心靶点, 经筛选后共得到 52 个核心靶点, 见表 4, 其主要与酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、美洲茶酸、白桦脂酸、

表 3 化合物与靶点数

Table 3 Compound and target number

序号	成分	靶点数	PubChem CID	Mol ID	生物利用度 (OB)	药物相似性 (DL)
1	6"-对香豆酰斯皮诺素	6	51859291	MOL001547	5.73	0.28
2	6"-阿魏酰斯皮诺素	12	21597353	—	—	—
3	斯皮诺素	8	155692	MOL001540	6.31	0.72
4	当药黄素	13	124034	MOL001542	31.83	0.75
5	维采宁 II	7	3084407	MOL001543	3.42	0.78
6	山奈酚-3-O-芸香糖苷	2	5318767	MOL002693	3.64	0.73
7	山矾碱	1	23335	—	—	—
8	美洲茶酸	11	161352	MOL001521	33.41	0.77
9	juzirine	2	3085285	—	—	—
10	白桦脂酸	18	64971	MOL000211	55.38	0.78
11	巴婆碱	19	160875	MOL012974	25.34	0.33
12	去甲荷叶碱	25	41169	MOL006986	22.63	0.36
13	乌药碱	23	23335	MOL001522	42.35	0.24
14	木兰花碱	43	73337	MOL002891	0.48	0.55
15	酸枣仁皂苷 A	18	51346169	MOL001526	8.04	0.02
16	酸枣仁皂苷 B	18	24721031	MOL001528	13.60	0.02
17	芹菜素	121	5280443	MOL000008	23.06	0.21
18	牡荆素	12	5280441	MOL004925	3.05	0.71
19	异牡荆素	12	162350	MOL002322	31.29	0.72
20	桦木酮酸	18	122844	MOL001996	16.83	0.78

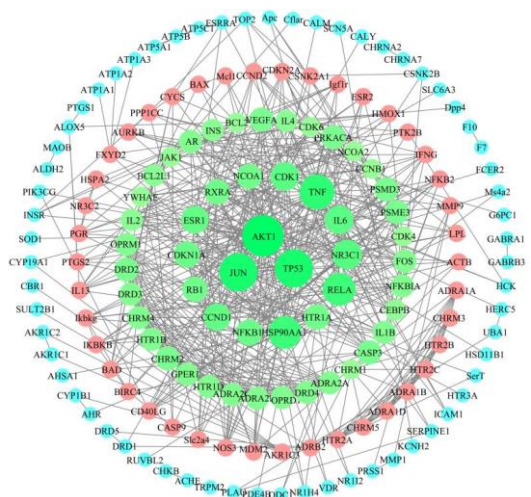


图5 PPI网络

Fig. 5 PPI network

木兰花碱、乌药碱、去甲荷叶碱、巴婆碱、斯皮诺素、当药黄素、维采宁 II、6'''-对香豆酰斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、芹菜素、桦木酮酸、牡荆素、异牡荆素 17 个成分相关。

2.3.2 功能富集分析与通路分析 GO 功能分析主要用于描述基因靶点的功能，包括细胞功能、分子功能和生物功能。KEGG 富集分析可以得到潜在靶点所富集的信号通路。GO 富集分析根据 $P < 0.001$ 、富集倍数值 (FDR) < 0.001 的条件筛选出 63 个 GO 条目，其中生物过程 (biological process, BP) 占 39 个，主要富集于对药物的反应 (response to drug)、细胞增殖调控 (regulation of cell proliferation)、凋亡过程调控 (regulation of apoptotic process)、炎症反应 (inflammatory response) 等过程；分子功能

表4 核心靶点

Table 4 Core targets

序号	靶点蛋白	基因名	度值	序号	靶点蛋白	基因名	度值
1	RAC- α serine/threonine-protein kinase	AKT1	30	27	α -2B adrenergic receptor	ADRA2B	13
2	transcription factor AP-1	JUN	27	28	α -2A adrenergic receptor	ADRA2A	13
3	cellular tumor antigen p53	TP53	27	29	δ -type opioid receptor	OPRD1	13
4	tumor necrosis factor	TNF	24	30	5-hydroxytryptamine receptor 1D	HTR1D	13
5	transcription factor p65	RELA	22	31	μ -type opioid receptor	OPRM1	13
6	eat shock protein HSP 90- α	HSP90AA1	22	32	5-hydroxytryptamine receptor 1B	HTR1B	13
7	glucocorticoid receptor	NR3C1	19	33	interleukin-1 β	IL1B	13
8	cell division control protein 2 homolog	CDK1	18	34	α -2C adrenergic receptor	ADRA2C	13
9	interleukin-6	IL6	18	35	dopamine D3 receptor	DRD3	13
10	G1/S-specific cyclin-D1	CCND1	17	36	G-protein coupled estrogen receptor 1	GPER1	13
11	estrogen receptor	ESR1	17	37	NF- κ B inhibitor α	NFKBIA	13
12	nuclear factor NF- κ B p105 subunit	NFKB1	16	38	androgen receptor	AR	13
13	cyclin-dependent kinase inhibitor 1	CDKN1A	16	39	muscarinic acetylcholine receptor M4	CHRM4	13
14	nuclear receptor coactivator	NCOA1	15	40	Bcl-2-like protein 1	BCL2L1	12
15	retinoblastoma-associated protein	RB1	15	41	interleukin-4	IL4	12
16	retinoic acid receptor RXR- α	RXRA	15	42	interleukin-2	IL2	12
17	5-hydroxytryptamine receptor 1A	HTR1A	15	43	insulin	INS	12
18	proteasome activator complex subunit 3	PSME3	14	44	CCAAT/enhancer-binding protein β	CEBPB	11
19	mRNA of PKA catalytic subunit C- α	PRKACA	14	45	cell division protein kinase 6	CDK6	10
20	muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2	14	46	14-3-3 protein ϵ	YWHAE	10
21	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3	14	47	G2/mitotic-specific cyclin-B1	CCNB1	10
22	caspase-3	CASP3	14	48	muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1	10
23	dopamine D2 receptor	DRD2	14	49	cell division protein kinase 4	CDK4	10
24	vascular endothelial growth factor A	VEGFA	14	50	apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	10
25	proto-oncogene c-Fos	FOS	13	51	tyrosine-protein kinase JAK1	JAK1	10
26	dopamine D4 receptor	DRD4	13	52	nuclear receptor coactivator 2	NCOA2	10

(molecular function, MF) 占 18 个, 明显富集于多巴胺、肾上腺素等神经递质受体 (dopamine neurotransmitter receptor activity、alpha2-adrenergic receptor activity) 和蛋白质 (protein binding); 细胞组成 (cellular component, CC) 占 6 个, 可以看出主要富集在细胞质膜 (integral component of plasma membrane)、突触 (axon terminus) 等区域。

KEGG 富集分析得到 89 条通路, 以 $P < 0.001$ 、 $FDR < 0.001$ 的条件筛选 58 条通路。选择前 20 条, 以通路为纵坐标, FDR 为横坐标构建气泡图 (图 6)。

圆圈的大小代表核心靶点中参与此途径的基因个数, 图中显示癌症途径 (pathways in cancer) 中参与的基因最多, 为 22 个。此外, 还包括乙型肝炎 (hepatitis B) 等疾病通路和环磷酸腺苷 (cyclic AMP, cAMP) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction) 等作用通路, 表明炒酸枣仁可能通过调控这些通路达到干预疾病的作用。

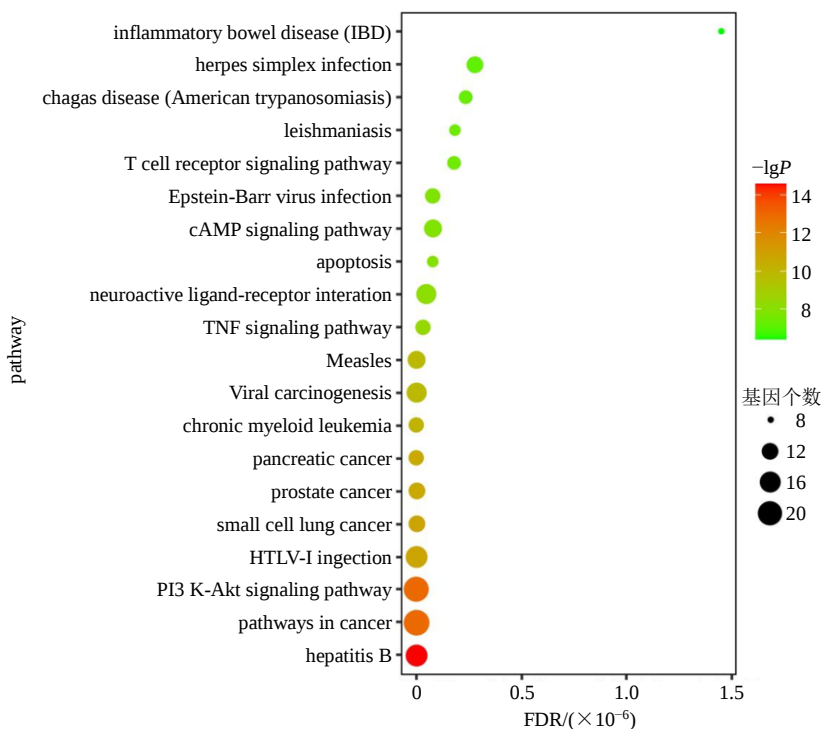


图 6 KEGG 富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis result of KEGG

2.3.3 “成分-靶点-通路”网络构建 将 52 个核心靶点相关的 17 个成分、58 条通路运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建 “成分-靶点-通路”网络, 见图 7。由图可发现化合物、靶点、通路间存在错综复杂的关系, 符合中药 “多成分、多靶点” 的特点。利用 Network Aalyzer 插件对该网络进行拓扑分析, 获得节点度 (degree) 值, 根据度值判断节点在网络中的重要性, 推测炒酸枣仁干预疾病的机制可能是 17 个主要活性成分通过癌症途径 (度值 22)、PI3K-Akt 信号传导途径 (PI3K-Akt signaling pathway) (度值 21)、神经活性配体-受体相互作用 (度值 15)、cAMP 信号通路 (度值 13)、TNF 信号通路 (度值 11) 等多条途径, 作用在 RELA、NFKB1 (度值 42)、AKT1

(度值 40)、TNF、TP53 (度值 28)、JUN (度值 22) 等关键靶标。上述结果表明, 本实验筛选出的化学成分可作为炒酸枣仁的活性成分进行深层次研究。

2.3.4 Q-Marker 的确定 基于多元统计分析和网络药理学分析, 筛选出酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、美洲茶酸、白桦脂酸、木兰花碱、乌药碱、去甲荷叶碱、巴婆碱、斯皮诺素、当药黄素、维采宁 II、6'''-对香豆酰斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、芹菜素、桦木酮酸、牡荆素、异牡荆素等 17 个有效活性成分作为炒酸枣仁的潜在 Q-Marker 库。

课题组前期利用血清化学与网络药理学结合发现乌药碱、酸李碱、芹菜素、斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 可作为酸枣仁治疗失眠的体内潜在效应物质^[16];

据国内外文献记载酸枣仁的化学成分主要含皂苷类、黄酮类、生物碱类等化学成分^[18], 其中酸枣仁中黄酮类成分种类丰富且含量较高, 具有改善睡眠^[25]、抗抑郁^[26]、抗焦虑^[27]和改善记忆功能^[28]等重要功能; 皂苷类成分与黄酮类成分发挥同样的作

表 5 生、炒酸枣仁样品含量测定结果 (n = 4)
Table 5 Determination results of ZSS and FZSS (n = 4)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	乌药碱	木兰花碱	斯皮诺素	6'''-阿魏酰斯皮诺素	酸枣仁皂苷 A	酸枣仁皂苷 B
ZSS1	0.11	0.96	0.41	0.26	0.59	0.24
ZSS2	0.08	0.98	0.74	0.31	0.53	0.34
ZSS3	0.10	1.26	0.65	0.30	0.63	0.21
ZSS4	0.10	1.15	0.69	0.32	0.50	0.14
ZSS5	0.12	1.23	0.65	0.35	0.48	0.11
ZSS6	0.14	1.21	0.81	0.49	0.56	0.19
ZSS7	0.11	1.00	0.73	0.34	0.70	0.17
ZSS8	0.09	1.14	0.50	0.29	0.60	0.15
ZSS9	0.06	0.99	0.71	0.21	0.61	0.19
ZSS10	0.12	1.32	0.71	0.37	0.57	0.16
均值	0.10±0.02	1.13±0.13	0.64±0.11	0.31±0.04	0.57±0.06	0.19±0.06
FZSS1	0.11	0.96	0.53	0.41	0.96	0.25
FZSS2	0.10	1.10	0.76	0.33	0.71	0.22
FZSS3	0.15	1.09	0.76	0.40	0.71	0.45
FZSS4	0.11	1.12	0.70	0.34	0.81	0.24
FZSS5	0.11	1.20	0.65	0.33	0.86	0.22
FZSS6	0.11	0.82	0.54	0.29	0.82	0.16
FZSS7	0.07	0.79	0.47	0.21	0.50	0.14
FZSS8	0.13	0.86	0.67	0.37	0.63	0.20
FZSS9	0.08	1.53	0.75	0.40	0.70	0.36
FZSS10	0.05	1.04	0.51	0.28	0.70	0.35
均值	0.10±0.03	1.05±0.21	0.63±0.11	0.34±0.06	0.74±0.12*	0.26±0.09

与 ZSS 均值比较: *P<0.05

*P < 0.05 vs ZSS mean value

用^[13], 并对阿尔茨海默症有一定疗效^[29]; 生物碱类成分也具有镇静催眠、抗抑郁等药理作用^[30]。故本实验利用 UHPLC-MS 技术对生、炒酸枣仁的化学成分进行全面表征, 结合多元统计分析筛选生、炒酸枣仁中 20 个潜在的化学标记物, 19 个化合物的相对含量在炒制之后上升。之后进行网络建模分析, 构建“成分-靶点-通路”网络关系图, 进一步结合课题组前期研究初步选择 6 种成分为酸枣仁的主要药效基础物质。并对其含量测定, 明确其可测性, 最终确定木兰花碱、乌药碱、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 等 6 种成分可作为炒酸枣仁的 Q-Marker。

本研究中市售样品测定结果表明生、炒酸枣仁中 5 种化合物含量无显著差异, 首先可能由于生、炒酸枣仁收集于不同产地、不同生产时间, 导致样

本本身不均一; 也可能由于目前酸枣仁炒制标准没有统一而明确的参数, 导致不同饮片公司炒制酸枣仁所执行的标准不统一。后期可将本研究确定的 6 种 Q-Marker 作为指标, 结合药效评价研究, 对酸枣仁的炒制方法进行优化, 明确炒制过程中锅温、时间、投料量等具体参数, 进一步规范酸枣仁的炮制标准。此外, 本研究发现生、炒酸枣仁化学成分的差异主要为化学成分含量的差异, 未发现显著的化学成分结构变化。为了更加准确地将 6 种 Q-Marker 应用于酸枣仁饮片质量控制与指导临床, 应通过大样本、多批次比较研究, 明确 6 种 Q-Marker 分别在生、炒酸枣仁中的含量限度范围, 为酸枣仁饮片的质量控制研究提供科学参考。综上, 本实验为生、炒酸枣仁质量标准的提升及全程质量控制提供参考, 同时也为含有生、炒酸枣仁的复方 Q-Marker

的筛选提供参考,但还需对 Q-Marker 的药效活性及作用机制进行验证和阐释,从而为炒酸枣仁饮片的质量追溯和评价体系提供更为全面的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 382.
- [2] Jiang J G, Huang X J, 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(4): 310-320.
- [3] 任晓宇, 李廷利. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺小鼠肝功能和特定肠道菌的影响 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(2): 226-231.
- [4] 赵连红, 乔卫, 许岚. 酸枣仁中生物碱抗惊厥作用的实验研究 [J]. *天津药学*, 2007, 19(1): 4-5.
- [5] 荣春蕾, 代永霞, 崔瑛. 酸枣仁对阴虚小鼠焦虑行为的影响 [J]. *中药材*, 2008, 31(11): 1703-1705.
- [6] 张玮, 袁秉祥, 于晓江, 等. 酸枣仁总皂苷对大鼠急性心肌缺血的保护作用 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2005, 26(4): 333-335.
- [7] 侯建平, 张恩户, 胡悦, 等. 酸枣仁对小鼠学习记忆能力的影响 [J]. *广西中医学院学报*, 2002, 5(3): 11-13.
- [8] 李会军, 李萍. HPLC 法测定酸枣仁不同炮制品中两种黄酮碳苷的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(4): 23-25.
- [9] 于定荣, 杨梓懿, 邹建武. 酸枣仁不同炮制品中酸枣仁皂苷 A 和 B 及浸出物含量的测定 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(11): 2875-2876.
- [10] 刘福祥, 高剑锋. 炒制程度对酸枣仁提取物的影响(简报) [J]. *中国中药杂志*, 1990, 15(5): 28-29.
- [11] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [12] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 杜晨晖, 裴香萍, 张敏, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学的酸枣仁改善失眠大鼠睡眠作用机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2405-2412.
- [16] 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.
- [17] 崔小芳, 杜晨晖, 裴香萍, 等. 基于肠道菌群转化的酸枣仁质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4634-4642.
- [18] 闫艳, 申晨曦, 张福生, 等. 酸枣仁与理枣仁的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4769-4784.
- [19] 杜晨晖, 李泽, 崔小芳, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 技术研究酸枣仁发酵过程中的化学成分转化 [J]. *高等学校化学学报*, 2019, 40(8): 1614-1620.
- [20] Yan Y, Shen C X, Pei X P, *et al.* Compare the chemical profiling of *Ziziphi Spinosae Semen* and *Ziziphi Mauritiana Semen* using untargeted metabolomics [J]. *J Food Compos Anal*, 2020, 94: 103635.
- [21] 华愉教, 侯姬, 王胜男, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术的野生与栽培太子参化学成分分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(4): 272-276.
- [22] Hollman P C, Katan M B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(9): 937-942.
- [23] Du C, Yan Y, Shen C, *et al.* Comparative pharmacokinetics of six major compounds in normal and insomnia rats after oral administration of *Ziziphi Spinosae Semen* aqueous extract [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10(4): 385-395.
- [24] 杨馥源, 魏洁, 王玉龙, 等. 山西产酸枣仁 HPLC-UV-ELSD 特征图谱及 7 个化学成分的含量测定 [J]. *山西医科大学学报*, 2021, 52(2): 194-200.
- [25] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, *et al.* Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi Spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT(1A) receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 404-409.
- [26] 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.
- [27] Liu J, Zhai W M, Yang Y X, *et al.* GABA and 5-HT systems are implicated in the anxiolytic-like effect of spinosin in mice [J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2015, 128: 41-49.
- [28] Lee H E, Jeon S J, Ryu B, *et al.* Swertisin, a C-glucosylflavone, ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice with its adenosine A1 receptor antagonistic property [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 306: 137-145.
- [29] Liu Z, Zhao X, Liu B, *et al.* Jujuboside A, a neuroprotective agent from *Semen Ziziphi Spinosae* ameliorates behavioral disorders of the dementia mouse model induced by A β 1-42 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 738: 206-213.
- [30] 黄之镨, 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.

[责任编辑 郑礼胜]