

## 基于灰色关联分析方法研究炒酸枣仁镇静催眠作用谱效关系

杨超<sup>1</sup>, 朱晓钗<sup>1</sup>, 万浩婷<sup>1</sup>, 刘晴<sup>1</sup>, 刘晓<sup>1\*</sup>, 蔡宝昌<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京海昌中药集团有限公司, 江苏 南京 210061

**摘要:**目的 采用基于灰色关联分析方法的谱效相关研究手段筛选炒酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* 发挥镇静催眠作用的药效物质基础。方法 ip 对氯苯丙氨酸建立大鼠失眠模型, 造模结束后 ig 给予炒酸枣仁水煎液, 分别于给药后不同时间点采集各实验组大鼠大脑皮层、下丘脑及血浆样品, 采用酶联免疫试剂盒方法测定相关药效指标, 建立各个药效指标的效应-时间曲线; 同时利用 UHPLC-Q-TOF-MS 分析技术对其中化学成分进行监测, 建立各成分的响应强度-时间曲线, 使用灰色关联统计方法, 对各药效指标的效应-时间曲线与各成分的响应强度-时间曲线分别进行拟合, 计算得到各成分与药效的相关度, 再将代谢产物归属为原型化学成分, 进行权重计算, 得到相关系数, 并进行排序, 客观反映炒酸枣仁水煎液中化学成分与药效的动态发展过程和内在联系。结果 于大鼠大脑皮层、下丘脑及血浆中共发现药物相关移行成分 23 种, 其中 7 种为原型成分, 16 种为代谢产物。灰色关联分析结果表明, 斯皮诺素、山茶苷 B、6'''-阿魏酰斯皮诺素、维采宁-2、莲心季铵碱、去甲异紫堇定、酸枣仁碱 F、白桦脂酸共 8 种化学成分的相关系数较高。结论 推测斯皮诺素、山茶苷 B、6'''-阿魏酰斯皮诺素、维采宁-2、莲心季铵碱、去甲异紫堇定、酸枣仁碱 F、白桦脂酸为炒酸枣仁发挥镇静催眠作用的主要化学物质基础。

**关键词:** 酸枣仁; 炒制; 镇静催眠; 谱效相关; 灰色关联度; 斯皮诺素; 山茶苷 B; 6'''-阿魏酰斯皮诺素; 维采宁-2; 莲心季铵碱; 去甲异紫堇定; 酸枣仁碱 F; 白桦脂酸; UHPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)17-5267-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.17.019

## Spectrum-effect relationship study on parched *Ziziphi Spinosae Semen* for its sedative and hypnotic effects based on gray correlation analysis

YANG Chao<sup>1</sup>, ZHU Xiao-chai<sup>1</sup>, WAN Hao-ting<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>1</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>, CAI Bao-chang<sup>1,2</sup>

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Nanjing Haichang Chinese Medicine Corporation, Nanjing 210061, China

**Abstract: Objective** To find out the main chemical materials for sedative and hypnotic effects in parched Suanzaoren (*Ziziphi Spinosae Semen*, ZSS) decoction using spectrum-effect relationship based on gray correlation analysis. **Methods** The model of insomnia rats was established by intraperitoneal injection of *p*-chlorophenylalanine. After molding, decoction of parched ZSS was given by ig administration. The cerebral cortex, hypothalamus and plasma samples of rats in each group were collected, to be used for determination of pharmacodynamic indexes. The pharmacodynamic efficacy-time curves were established. Meanwhile, the chemical constituents were detected by UHPLC-Q-TOF-MS method, in which way the intensity-time curves of chemicals were obtained. The efficacy-time curves and intensity-time curves were finally fitted by gray correlation analysis. The correlation degree between each component and pharmacodynamic index was calculated and sorted, so as to reflect the dynamic development process of each component and pharmacodynamic index objectively. **Results** A total of 23 chemical constituents were found in cerebral cortex, hypothalamus and plasma in all, among which seven were prototype components and 16 were metabolites. The results of gray

收稿日期: 2021-08-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573603)

作者简介: 杨超 (1997—), 男, 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事中药炮制机制研究。

Tel: 15105179178 E-mail: yc1287425647@163.com

\*通信作者: 刘晓 (1981—), 女, 辽宁抚顺人, 沈阳药科大学 67 期中药专业校友, 博士, 副研究员, 江苏省第五期“333 高层次人才培养工程”培养对象, 从事中药炮制机制与功效物质基础研究。Tel: 15261873181 E-mail: 300999@njucm.edu.cn

蔡宝昌 (1952—), 男, 江苏南京人, 博士, 教授, 主要从事中药饮片炮制工艺规范化研究。E-mail: bccai@126.com

correlation analysis showed that the correlation coefficients of spinosin, camelliaside B, 6''-feruloylspinosin, vicenin-2, lotusine, norisocorydine, sanjoinine F, and betulinic acid were relatively higher. **Conclusion** It was speculated that spinosin, camelliaside B, 6''-feruloylspinosin, vicenin-2, lotusine, norisocorydine, sanjoinine F and betulinic acid might be the main chemical materials in parched ZSS to exert sedative and hypnotic effects.

**Key words:** *Ziziphi Spinosae Semen*; stir-frying; sedative and hypnotic effects; spectrum-effect correlation; gray correlation analysis; spinosin; camelliaside B; 6''-feruloylspinosin; vicenin-2; lotusine; norisocorydine; sanjoinine F; betulinic acid; UHPLC-Q-TOF-MS

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bge.) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子,味甘酸、性平,归心、肝、胆经,始载于《神农本草经》,列为上品,具有养心益肝、安神、敛汗之功<sup>[1-2]</sup>。酸枣仁中化学成分主要为黄酮碳苷类、皂苷类、三萜类、生物碱、脂肪油等<sup>[3]</sup>;药理作用主要为镇静催眠、抗惊厥、抗心律失常、改善心肌缺血、增强免疫、保护神经系统等<sup>[4-6]</sup>。酸枣仁作为典型的种子类中药,临床应用前需经炒制入煎,酸枣仁经炒制后其在性状及化学成分上均发生改变:酸枣仁经炒制后其种皮开裂,略有焦香气逸出;酸枣仁中有效成分及有效部位的含量经炒制后发生一定变化<sup>[6-9]</sup>。目前,已有酸枣仁有效成分的相关研究多围绕生品展开,而针对临床最为常用的炒酸枣仁活性成分的报道却十分有限。

中药中化学成分的多样性和复杂性及其发挥药效作用的整体性和模糊性决定了全面、合理、准确地发现中药中的有效成分并以此作为评价中药的质量成为中医药研究过程中的一大难题。谱效关系法指的是采用中药化学成分的“谱”与中药临床作用的“效”结合的方式发现中药药效物质基础、对中药内在质量进行评价的方法<sup>[10-11]</sup>。其中化学成分的“谱”多为指纹图谱或特征图谱,具有整体性和模糊性特点;“效”多选择能够代表中药药效的指标,同时应具备经典、简便、灵敏的特征,以此适于与“谱”的数据结合起来进行数理统计方法分析,形成“谱”“效”相关联的数理模型<sup>[12-14]</sup>。

目前,谱效相关法在中药有效成分的研究中所采用的的数据处理方法有相关分析、回归分析、人工神经网络分析、主成分分析、聚类分析、灰色关联度分析等,其中灰色关联度分析是目前应用较为广泛的数据处理方法<sup>[15-17]</sup>。

为了阐明炒酸枣仁中与其镇静催眠作用密切相关的药效物质基础,直接服务临床合理用药与药品有效质控,本研究开展炒酸枣仁水煎液对对氯苯丙氨酸(*p*-chlorophenylalanine, PCPA)模型大鼠镇静催眠作用的药效评价,同时基于 UHPLC-Q-TOF-

MS 分析技术检测大鼠大脑皮层、下丘脑及血浆中药物化学成分的变化,并采用基于灰色关联度分析方法的谱效相关法来发现酸枣仁炒制后的药效物质基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

UHPLC-Q-TOF-MS 质谱联用系统: Shimadzu 30AD 超高效液相色谱系统, Shimadzu LC20ADXR 四元泵, SIL20ACXR 自动进样器, CT020AC 柱温箱, 日本岛津公司; Q-TOF-MS/MS 5600+ 质谱仪, ESI 离子源, 美国 AB Sciex 公司; Micro 型离心机, 美国 Thermo Fisher 公司; Milli Q 纯水仪, 美国 Merk 公司; 甲醇、乙腈, UHPLC-MS 级, 德国 Merk 公司; 超纯水, 自制; 甲酸, UHPLC-MS 级, 美国 ACS 恩科化学试剂有限公司。

### 1.2 药物

实验用生酸枣仁饮片产于山东, 经南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室李伟东教授鉴定为正品, 基原为鼠李科枣属植物酸枣 *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。

PCPA, 批号 AK-80383, 美国 Ark Pharm 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS), GE Healthcare Life Sciences, 批号 SH30256.01。

5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 酶联检测试剂盒 (批号 YFXER00123)、 $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 酶联检测试剂盒 (批号 YFXER00887)、多巴胺 (dopamine, DA) 酶联检测试剂盒 (批号 YFXER00053)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 酶联检测试剂盒 (批号 YFXER00023)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 酶联检测试剂盒 (批号 YFXER00022)。

### 1.3 动物

雄性 SD 大鼠 66 只, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 由上海杰思捷实验动物有限公司提供, 合格证编号: No. 311620400011760, 适应性饲养 7 d, 饲养环境温度、湿度及光照稳定, 饮食、饮水均自由。所有动物实验遵循南京中医药大学有关实验动物管理和使

用的规定,均符合 3R 原则。

## 2 方法

### 2.1 供试品提取液的制备

取生酸枣仁饮片适量,置炒制容器内,文火加热,用红外测温仪测量药温,保持药温为 130~150 °C,炒制时间约为 7 min 至鼓起,色微变深,取出,放凉<sup>[1,18]</sup>。所得炒酸枣仁饮片依《中国药典》2020 年版中“酸枣仁”项下进行检验,其中水分、酸枣仁皂苷 A 与斯皮诺素含量均符合要求。

称取炒酸枣仁粉末(过 60 目筛),加入 10 倍量水浸泡 15 min 后,武火煮沸后调至中火保持微沸,煎煮 1 h,2 层纱布滤出药液,剩余药渣加入 8 倍量水煎煮 1 h,2 层纱布滤出药液,于 60 °C 条件下低压浓缩,将药液浓缩至 2.00 g/mL<sup>[19]</sup>。

### 2.2 大鼠分组与 PCPA 失眠模型建立

大鼠适应性饲养 7 d 后,将 66 只雄性 SD 大鼠随机分为 11 组,每组 6 只,分别为给药 1~11 组,每组大鼠先 ip PCPA (350 mg/kg) 造模<sup>[20-21]</sup>,于每天 8:00~9:00 时注射,连续 2 d,观察大鼠活动明显增加,毛发竖起,同时结合生理生化指标的测定确定造模是否完成。

### 2.3 大鼠给药与取材

于造模完成后的第 1 天 9:00 时按照大鼠体质量对所有给药组的大鼠 ig 给予炒酸枣仁水煎液(15 g/kg),并于给药后 0.5、1、2、4、8 h,对给药 1~5 组的大鼠进行眼底静脉丛取血,取血后,将大鼠脱颈处死,并于冰上迅速取出下丘脑、大脑皮层。此后连续 6 d,每天 9:00 时对剩余 6~11 组大鼠进行 ig 并于第 2、3、4、5、6、7 天给药 30 min 后进行眼底静脉丛取血和下丘脑、大脑皮层的取材。将每个时间点所取得的血浆和下丘脑、大脑皮层冻存于-80 °C 待测。

### 2.4 样品制备

大脑皮层、下丘脑及血浆样品采用蛋白沉淀法进行处理:将组织样品用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 冲洗去除表面残留的血液及杂质,称定质量,记录后剪碎,组织质量与 PBS 体积比例按 1:9 加入预冷的 PBS 匀浆,4 °C 条件下 5000 r/min 离心 10 min,取上清 2 mL 加入 5 倍量甲醇,涡旋 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液以同样的条件再离心 5 min,上清液存于 4 °C 备用;取 100 μL 血浆样品于 2 mL 离心管中,加入 5 倍量甲醇,涡旋 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液以同样的条件

再离心 5 min,上清液存于 4 °C 备用。

### 2.5 液相色谱条件

色谱柱为 Waters C<sub>18</sub> 反相色谱柱(Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>, 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱程序:0~1 min, 5%~45% 乙腈;1~20 min, 45%~95% 乙腈;20~22 min, 95%~100% 乙腈;22~23 min, 100% 乙腈;柱温为室温;体积流量 0.3 mL/min;进样量 3 μL。

### 2.6 质谱条件

质谱扫描模式为正、负离子分别进行。喷雾辅助气体:雾化气(Gas 1) 379.21 kPa (55 psi);辅助加热器(Gas 2) 379.21 kPa (55 psi);气帘气 241.32 kPa (35 psi);离子源温度 550 °C;离子喷雾电压(ISVF):+4500 V/-4500 V;去簇电压(DP)+60 V/-60 V;碰撞能量(CE)+60 V/-60 V;TOF MS 扫描范围 *m/z* 100~2000;TOF MS/MS 扫描范围 *m/z* 50~1500。

### 2.7 数据处理

Analyst TF 1.6 软件采集并处理由 UHPLC-Q-TOF-MS 得到的原始数据,收集化合物保留时间、分子质荷比、质量误差、二级碎片信息、响应值等主要参数信息以进行化合物归属和结构推断。通过检索 CNKI、PubMed、ChemiBook、SciFinder 等网络数据库收集整理酸枣仁化学成分的有关信息,建立包含化学成分名称、分子式、mol 结构式等信息的数据库以供后续化学成分的匹配鉴定<sup>[22]</sup>。Peakview 1.2 软件用以化学成分的匹配鉴定,鉴定过程包括一级质量数匹配和二级碎片结构匹配。

## 3 结果

### 3.1 脑和血液中药物相关移行成分特征图谱建立

检测所得的正、负离子模式下大鼠大脑皮层、下丘脑及含药血浆基准峰色谱图(base peak chromatograms, BPC)见图 1。利用 Peakview 软件、MetabolitePilot 2.0.2 软件对生物样品中化学成分进行鉴定,筛选出各时间点均有响应的成分以供后续灰色关联计算,共鉴定出 23 种源于酸枣仁水煎液的化学成分及其在大鼠体内的代谢产物,包括 7 种原型化合物与 16 种代谢产物。其中,大鼠大脑皮层、下丘脑、血浆中分别检出 8、9、14 种,具体信息见表 1~3。

### 3.2 不同时间点药效指标获得

PCPA 失眠模型建立后,可见大鼠出现昼夜节律消失,白天也活动不停,皮毛蓬松少光泽,产生

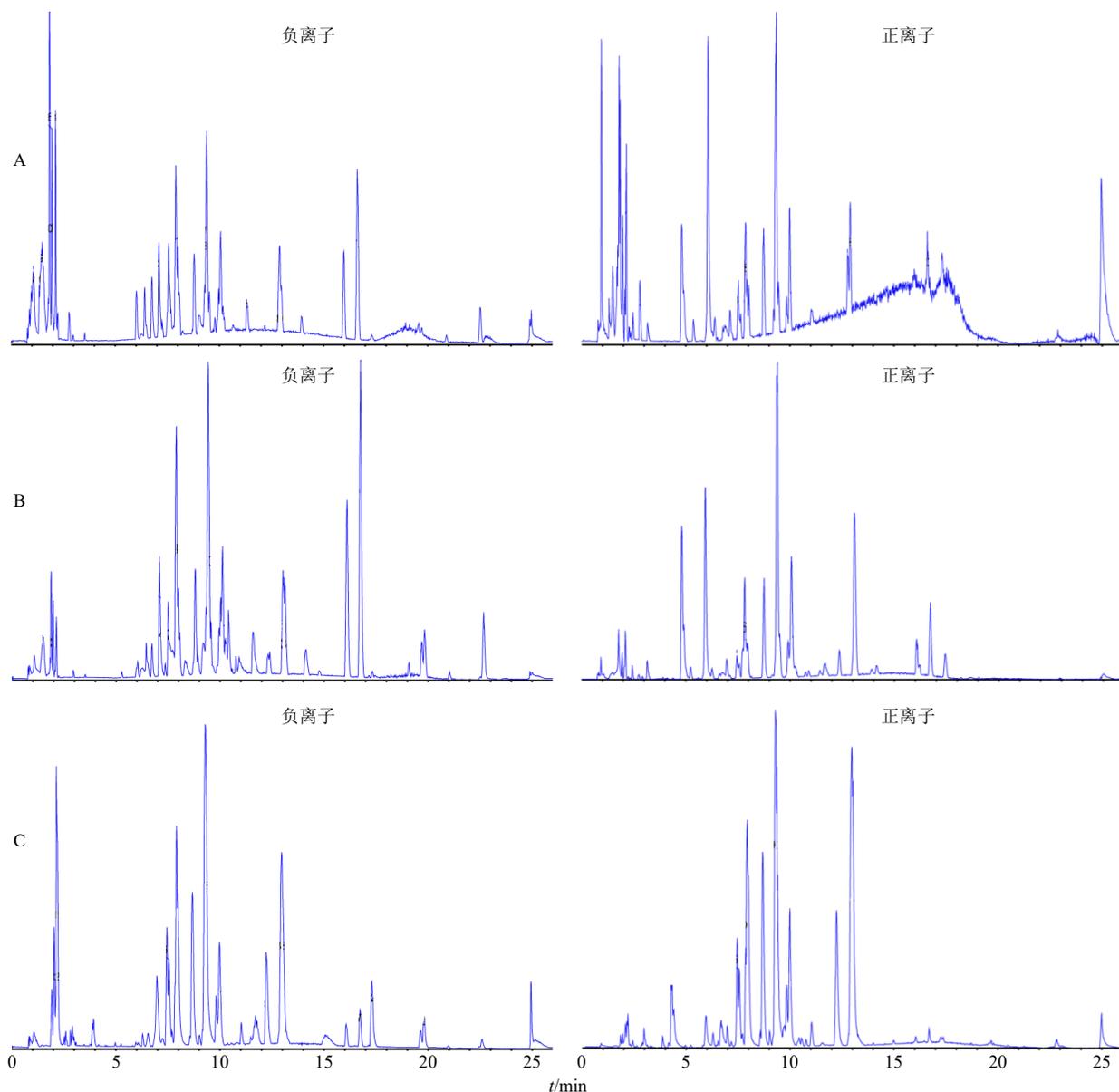


图 1 正、负离子模式下大鼠大脑皮层 (A)、下丘脑 (B)、血浆 (C) 样品质谱检测 BPC 图

Fig. 1 BPC of rats cerebral cortex (A), hypothalamus (B), and plasma (C) samples detection under positive and negative ion modes

表 1 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 系统检测得到的大鼠大脑皮层中的相关化学成分

Table 1 Detection of chemical constituents in rat cerebral cortex by UHPLC-Q-TOF-MS system

序号	$t_R$ /min	代号	分子式	MS <sup>1</sup>	偏差/ ( $\times 10^{-6}$ )	MS <sup>2</sup>	原型成分	代谢途径推测
1	0.88	M1	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	315.081 6 [M-H] <sup>-</sup>	-8.5	135.029 2, 102.055 8, 78.960 1	去甲异紫堇定	丢失 NH <sup>-</sup> +异丙基化
2	0.96	M2	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	611.145 9 [M-H] <sup>-</sup>	8.4	272.089 7, 179.045 5, 143.045 9	斯皮诺素	丢失 CH <sub>2</sub> +水解
3	1.84	P1	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	607.175 2 [M-H] <sup>-</sup>	3.6	607.171 5, 427.104 5, 324.064 2	斯皮诺素	-
4	2.00	M3	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	607.174 0 [M-H] <sup>-</sup>	1.7	607.171 5, 427.104 5, 324.064 2	6''-阿魏酰斯皮诺素	丢失 C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
5	2.41	M4	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	359.073 1 [M-H] <sup>-</sup>	-7.9	179.035 6, 161.024 0, 133.028 8	山茶苷 B	丢失 C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> 和 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> +过氧化
6	7.41	P2	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub>	313.168 3 [M-H] <sup>-</sup>	2.0	185.007 1, 120.049 3, 100.933 5	莲心季铵碱	-
7	12.77	P3	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	549.308 2 [M-H] <sup>-</sup>	-1.2	402.993 7, 367.017 2, 284.270 5	酸枣仁碱 F	-
8	14.06	P4	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	455.353 1 [M-H] <sup>-</sup>	5.7	455.354 3	白桦脂酸	-

表2 UHPLC-Q-TOF-MS系统检测得大鼠下丘脑中的相关化学成分

Table 2 Detection of chemical constituents in rat hypothalamus by UHPLC-Q-TOF-MS system

序号	<i>t<sub>R</sub></i> /min	代号	分子式	MS <sup>1</sup>	偏差/ (×10 <sup>-6</sup> )	MS <sup>2</sup>	原型成分	代谢途径
1	1.41	M5	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	285.073 1 [M-H] <sup>-</sup>	-3.2	155.045 7, 128.036 5, 113.036 4	去甲异紫堇定	丢失 NH <sup>+</sup> + 丙基苯基化
2	1.79	P1	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	607.174 3 [M-H] <sup>-</sup>	2.3	303.080 9, 285.073 8, 182.045 0	斯皮诺素	-
3	1.89	M6	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	283.065 3 [M-H] <sup>-</sup>	4.4	151.034 9, 122.033 3, 108.013 5	山茶苷 B	丢失 C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> + 甲基化
4	1.93	M7	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	323.088 8 [M-H] <sup>-</sup>	-9.8	187.049 4, 163.051 1, 124.039 6	山茶苷 B	丢失 C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 和 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> + 去甲基化
5	3.37	M8	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	447.134 5 [M-H] <sup>-</sup>	1.8	447.135 8, 267.114 1, 149.001 0	斯皮诺素	丢失 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> + 水解
6	5.96	P5	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	282.148 9 [M+H] <sup>+</sup>	-2.1	267.066 0, 239.070 0, 169.064 8	去甲异紫堇定	-
7	7.24	M9	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	311.169 0 [M-H] <sup>-</sup>	2.1	239.078 2, 198.029 9, 184.013 6	莲心季铵碱	丢失 OH 和 O + 羟基氨基化
8	7.93	P2	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub>	313.168 3 [M-H] <sup>-</sup>	-6.5	185.007 1, 120.049 3, 100.933 5	莲心季铵碱	-
9	13.03	P3	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	549.308 2 [M-H] <sup>-</sup>	-1.2	402.993 7, 367.017 2, 284.270 5	酸枣仁碱 F	-

表3 UHPLC-Q-TOF-MS系统检测得到大鼠血浆中的相关化学成分

Table 3 Detection of chemical constituents in rat plasma by UHPLC-Q-TOF-MS system

序号	<i>t<sub>R</sub></i> /min	代号	分子式	MS <sup>1</sup>	偏差/ (×10 <sup>-6</sup> )	MS <sup>2</sup>	原型成分	代谢途径
1	1.88	M10	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	383.123 4 [M-H] <sup>-</sup>	5.5	202.048 1, 180.066 4, 163.039 5	斯皮诺素	丢失 O 和 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> + 丢失羟甲基
2	2.01	P6	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.151 1 [M-H] <sup>-</sup>	-3.8	391.082 9, 337.072 2, 307.061 8	维采宁-2	-
3	2.05	P5	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	326.139 7 [M-H] <sup>-</sup>	8.9	267.066 0, 239.070 0, 169.064 8	去甲异紫堇定	-
				328.154 3 [M+H] <sup>+</sup>	2.9			
4	2.09	M11	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	401.113 3 [M-H] <sup>-</sup>	-2.7	225.101 6, 181.077 3, 157.076 9	斯皮诺素	丢失 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> + 脱羧
5	2.35	M12	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	417.120 3 [M-H] <sup>-</sup>	3.0	417.198 6, 357.178 9, 241.084 4	斯皮诺素	丢失 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> + 丢失 CO
6	2.16	P1	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	607.166 8 [M-H] <sup>-</sup>	5.4	303.080 9, 285.073 8, 182.045 0	斯皮诺素	-
				609.181 4 [M+H] <sup>+</sup>	2.6			
7	2.20	P7	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>19</sub>	725.193 5 [M-H] <sup>-</sup>	-3.3	284.033 3, 255.030 5, 227.035 4	山茶苷 B	-
8	2.44	M13	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	329.104 1 [M-H] <sup>-</sup>	-4.9	187.064 2, 172.050 6, 143.045 8	山茶苷 B	丢失 C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> 和 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> + 水解
9	2.44	M14	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	329.104 7 [M-H] <sup>-</sup>	5.0	241.123 9, 225.094 9, 134.074 3	去甲异紫堇定	丢失 NH <sup>-</sup> + 羧酸乙基化
10	2.62	M15	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	329.161 8 [M-H] <sup>-</sup>	-4.4	177.003 8, 154.995 1, 95.955 9	莲心季铵碱	氧化
11	2.72	M16	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.100 9 [M-H] <sup>-</sup>	5.9	255.086 5, 222.990 2, 213.058 3	斯皮诺素	丢失 CH <sub>2</sub> 和 C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
12	8.23	P2	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub>	313.168 3 [M-H] <sup>-</sup>	8.3	185.007 1, 120.049 3, 100.933 5	莲心季铵碱	-
13	12.77	P3	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	549.308 2 [M-H] <sup>-</sup>	-10.2	402.993 7, 367.017 2, 284.270 5	酸枣仁碱 F	-
14	14.06	P4	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	455.353 1 [M-H] <sup>-</sup>	5.7	455.354 3	白桦脂酸	-

一定的兴奋性行为, 出现互相攻击现象, 同时经检测大鼠大脑皮层及下丘脑中 5-HT、GABA、DA、NE、IL-1β 含量发现, 模型组与空白组的药效指标具有明显差异, 说明造模成功。经给药后, 检测各组大鼠大脑皮层、下丘脑中各项药效指标含量, 比较发现, 炒酸枣仁水煎液组的大鼠大脑皮层中 5-HT、GABA、NE、IL-1β 以及下丘脑中的 DA、NE 的含量较模型组具有显著性差异, 因此这 6 项药效指标被用于后续谱-效相关实验。各给药组大鼠药效

指标检测结果见表 4。

### 3.3 谱效关系研究

灰色系统理论对系统动态发展过程量化分析以考察系统诸因素之间的相关程度, 其主要方法一方面是根据两序列间发展过程或量级的相似性构造关联度, 另一方面是通过反映两序列发展趋势或曲线形状的相似性构造关联度, 该种通过发展趋势或曲线形状的相似性发现 2 个因素之间的影响程度的方法能够为决策和判断主要因素提供参考<sup>[23-24]</sup>。在发

表4 各给药组大鼠大脑皮层、下丘脑及血浆中药效指标检测结果 (n = 6)

Table 4 Indicators of efficacy in rats cerebral cortex and hypothalamus of different groups after administration (n = 6)

组别	5-HT/(ng·L <sup>-1</sup> )			GABA/(ng·mL <sup>-1</sup> )			DA/(ng·L <sup>-1</sup> )		NE/(ng·L <sup>-1</sup> )		IL-1β/(ng·L <sup>-1</sup> )	
	大脑皮层	下丘脑	血浆	大脑皮层	下丘脑	大脑皮层	下丘脑	大脑皮层	下丘脑	大脑皮层	下丘脑	
1	413.89	-	276.91	27.19	-	-	94.37	139.52	152.58	31.36	-	
2	389.65	-	403.46	27.72	-	-	92.27	131.33	146.02	31.85	-	
3	409.82	-	440.46	29.01	-	-	83.26	132.60	127.09	38.17	-	
4	393.89	-	318.28	28.67	-	-	100.04	134.50	129.13	34.67	-	
5	387.10	-	332.88	27.87	-	-	98.08	135.48	131.68	32.13	-	
6	427.97	-	376.20	27.61	-	-	88.43	148.80	136.67	31.60	-	
7	429.32	-	270.09	25.31	-	-	105.47	132.08	143.99	33.12	-	
8	359.81	-	410.28	30.09	-	-	110.08	147.70	117.51	37.96	-	
9	414.74	-	258.90	27.50	-	-	99.19	137.61	148.75	34.62	-	
10	388.46	-	278.37	25.29	-	-	104.23	132.42	120.65	34.62	-	
11	401.01	-	318.77	24.17	-	-	112.52	138.94	119.36	36.86	-	

“-” 未检测到  
“-” not detected

现炒酸枣仁进入体内的化学成分及其代谢产物的基础上, 将其与药效指标结合进行灰色关联计算, 得出体内 7 种原型化学成分及 16 种代谢产物的相关系数。各成分与药效指标的相关系数见表 5~7。在确定炒酸枣仁水煎液中化学成分在体内原型及代谢产物的相关系数后, 对所有代谢产物进行归属, 将大脑皮层、下丘脑及血浆中代谢产物的相关系数分别进行归一化处理, 权重分配计算, 再将其归属为原型化学成分后进行加和, 计算炒酸枣仁水煎液中化学成分对其镇静催眠药效的贡献度, 以发现炒酸

枣仁水煎液发挥镇静催眠作用的药效物质基础, 结果见表 8。

#### 4 讨论

通过谱-效相关方法研究炒酸枣仁水煎液中化学成分与药效关联度, 发现斯皮诺素作为其主要成分, 在结合原型及体内代谢产物的综合评分上, 体现出最强药效作用, 与文献报道一致<sup>[25-27]</sup>, 其进入体内发生代谢后, 产生的 M1、M4、M6、M8、M10、M11、M12、M13、M16 等代谢产物也表现出较高的相关性; 山茶苷 B、6''-阿魏酰斯皮诺素、维采

表5 大鼠大脑皮层中 8 种化学成分灰色关联度及排序结果

Table 5 Grey correlation degrees and ranking results of 8 chemical components in cerebral cortex of rats

序号	成分	灰色关联度				平均值	序号	成分	灰色关联度				平均值
		5-HT	GABA	NE	IL-1β				5-HT	GABA	NE	IL-1β	
1	M1	0.852 9	0.821 0	0.837 4	0.833 0	0.836 1	5	M4	0.875 4	0.888 2	0.883 3	0.880 7	0.881 9
2	M2	0.700 2	0.693 1	0.702 4	0.687 9	0.695 9	6	P2	0.894 4	0.893 6	0.650 4	0.911 4	0.837 5
3	P1	0.804 4	0.818 1	0.818 4	0.825 1	0.816 5	7	P3	0.824 0	0.826 4	0.816 1	0.813 9	0.820 1
4	M3	0.774 3	0.773 4	0.773 8	0.780 6	0.775 5	8	P4	0.723 9	0.728 3	0.731 9	0.733 0	0.729 3

表6 大鼠下丘脑中 9 种化学成分灰色关联度及排序结果

Table 6 Grey correlation degrees and ranking results of nine chemical components in hypothalamus of rats

序号	成分	灰色关联度			平均值	序号	成分	灰色关联度			平均值	序号	成分	灰色关联度			平均值
		DA	NE	NE				DA	NE	NE				DA	NE	NE	
1	M5	0.614 2	0.614 8	0.614 5	4	M7	0.722 4	0.718 1	0.720 3	7	M9	0.636 1	0.612 0	0.624 0			
2	P1	0.766 1	0.789 8	0.777 9	5	M8	0.897 9	0.918 5	0.908 2	8	P2	0.866 4	0.869 5	0.867 9			
3	M6	0.844 0	0.845 7	0.844 8	6	P5	0.936 7	0.933 7	0.935 2	9	P3	0.862 2	0.863 1	0.862 7			

表7 大鼠血浆中14种化学成分与5-HT灰色关联度及排序结果

Table 7 Grey correlation degrees and ranking results of 14 chemical components in plasma of rats

序号	成分	5-HT 灰色关联度	序号	成分	5-HT 灰色关联度
1	M10	0.853 6	8	M13	0.800 8
2	P6	0.854 7	9	M14	0.783 6
3	P5	0.737 9	10	M15	0.787 2
4	M11	0.848 2	11	M16	0.855 3
5	M12	0.830 0	12	P2	0.862 3
6	P1	0.683 5	13	P3	0.883 0
7	P7	0.830 0	14	P4	0.895 6

表8 炒酸枣仁水煎液中化学成分与药效关联度及排序结果

Table 8 Correlation coefficients and ranking results of chemical constituents in decoction of parched ZSS

序号	成分	相关系数	排名
1	斯皮诺素	0.826 0	1
2	莲心季铵碱	0.482 9	3
3	酸枣仁碱 F	0.325 6	5
4	白桦脂酸	0.191 9	6
5	去甲异紫堇定	0.479 6	4
6	维采宁-2	0.074 3	8
7	山茶苷 B	0.498 4	2
8	6"-阿魏酰斯皮诺素	0.108 9	7

宁-2等黄酮类成分,其体内代谢产物均比其原型化学成分表现出更好相关性,说明中药中的化学成分在进入体内发生代谢后同样发挥重要的作用,这也是中药治疗疾病、发挥药效的多样性与复杂性的体现。对于生物碱类成分,由于其相对分子质量较小,结构较简单,能够快速到达体内,因此莲心季铵碱、去甲异紫堇定、酸枣仁碱 F 在炒酸枣仁发挥镇静催眠作用的过程中有着较好的相关性,这表明中药中复杂多样的化学成分在治疗疾病时通过多成分、多靶点、多途径的方式综合作用而发挥药效。

《中国药典》中“酸枣仁”项下规定的含量测定的指标性成分酸枣仁皂苷 A,在实验结果中并未表现出良好的药效作用,这可能是其结构较为复杂且极性较大,在体内的生物利用度较低导致其难以发挥药效<sup>[28]</sup>。

**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] 江苏新医学院. 中药大辞典-上册 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.

[3] 刘朋朋. 酸枣仁化学成分及其四种皂苷含量测定研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

[4] Fang XSh, Hao J F, Zhou H Y, *et al.* Pharmacological studies on the sedative-hypnotic effect of *Semen Ziziphi Spinosae* (Suanzaoren) and *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* (Danshen) extracts and the synergistic effect of their combinations [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(1): 75-80.

[5] 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.

[6] 贾天柱. 再论中药生熟的变化与作用 [J]. 中成药, 2006, 28(7): 984-986.

[7] 李晓东, 杨培民, 齐立红. 酸枣仁炮制前后有效成分的比较分析 [J]. 山东中医杂志, 1999(5): 33-34.

[8] 王健, 林晓. 生、炒酸枣仁中酸枣仁皂甙 A 和 B 的含量比较 [J]. 中成药, 1994, 16(10): 24-25.

[9] 李泽, 杜鹤, 解玉军, 等. 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 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4811-4824.

[10] 张晓娟, 左冬冬, 谢国梁, 等. “谱效相关”研究新进展 [J]. 中医学报, 2015, 43(1): 78-80.

[11] 帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1303-1311.

[12] 秦昆明, 郑礼娟, 沈保家, 等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 26-31.

[13] 潘学强, 黄菊英, 龚慕辛, 等. 谱效相关分析方法在中药药效物质基础研究中的应用进展 [J]. 北京中医药, 2013, 32(10): 731-735.

[14] 万新军. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(10): 52-53.

[15] Wang Y L, Zhang Q, Yin S J, *et al.* Screening of blood-activating active components from Danshen-Honghua herbal pair by spectrum-effect relationship analysis [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 149-158.

[16] Shen C H, Liu C T, Song X J, *et al.* Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rubia cordifolia* L. by spectrum-effect relationships [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1090: 73-80.

[17] Wang Y H, Li Y, Zhang Y, *et al.* Multi-dimensional spectrum-effect relationship of the impact of Chinese herbal formula Lichong Shengsui Yin on ovarian cancer [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): E979.

[18] 耿欣, 李廷利. 正交设计法优化炒酸枣仁的炮制工艺

- [J]. 中医药学报, 2016, 44(4): 60-62.
- [19] 李玉娟, 梁鑫淼, 肖红斌, 等. 生、炒酸枣仁镇静催眠作用及化学成分比较 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(1): 35-37.
- [20] 肖成荣, 马增春, 李海静, 等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 326.
- [21] 张舜波, 王平, 田代志, 等. 酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 124-127.
- [22] Zhu X C, Liu X, Pei K, *et al.* Development of an analytical strategy to identify and classify the global chemical constituents of *Ziziphi Spinosae Semen* by using UHPLC with quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with multiple data-processing approaches [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(17): 3389-3396.
- [23] 罗丹. 新的灰色关联度模型的构造及其应用 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2018, 43(11): 8-12.
- [24] 杨龙飞, 高燕, 赵渤海. 丹红注射液指纹图谱的灰色关联度分析及谱效相关数学模型研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 878-881.
- [25] 祝凌丽. 斯皮诺素对中枢神经系统药理作用的研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2018, 34(06): 120-122.
- [26] Wang L E, Bai Y J, Shi X R, *et al.* Spinosin, a C-glycoside flavonoid from semen *Ziziphi Spinozae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system [J]. *Pharmacol Biochem Behavior*, 2008, 90(3): 399-403.
- [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 Behavior*, 2015, 128: 41-49.
- [28] 张妍, 解军波, 张彦青. HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中酸枣仁皂苷 A 含量及其药动学研究 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(3): 110-114.

[责任编辑 郑礼胜]