

基于多成分序贯代谢的石榴皮 中枢神经系统保护作用物质基础研究

江晓泉¹, 杨文宁¹, 森慕黎¹, 罗志强², 李雪岩¹,
陈洪娇¹, 刘伟¹, 祁东盈¹, 汪国鹏³, 刘洋¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488;
3. 中财瀚熙(北京)生物科技发展有限公司, 北京 101503)

摘要:将序贯代谢法与超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)相结合,研究石榴皮发挥中枢神经系统保护作用的物质基础。首先制备石榴皮提取液,通过肠灌流和封闭肠环法收集肠壁代谢、肠道菌群代谢的血浆样品,经液相色谱-串联质谱分析以原型吸收入血成分和代谢产物;综合代谢组大鼠灌胃给药后,鉴定其血中移行成分;再结合以上结果对脑脊液样品进行解析,鉴定出入脑成分。结果表明,从提取液中共检测到鞣质类、黄酮类、酚酸类和异香豆素类等 38 个化学成分。肠壁代谢、肠道菌群代谢情况基本一致,检测到 30 个原型入血成分和 12 个代谢产物;综合代谢组血浆中检测到 7 个原型入血成分和 16 个代谢产物;在脑脊液中发现 2 个原型成分和 4 个代谢产物,分别是柠檬酸、鞣花酸和 2 个甲基鞣花酸同分异构体、二甲基鞣花酸、二甲基鞣花酸葡萄糖醛酸化物。本研究基于多成分序贯代谢靶向识别出石榴皮及其代谢产物中入脑成分,可为阐明石榴皮中枢神经系统保护作用提供证据。

关键词:石榴皮;多成分序贯代谢;超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS);入脑成分

中图分类号:O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2022)03-0312-14

doi:10.7538/zpzb.2021.0090

Material Basis Study on the Protective Effect of *Punica Granatum* L. on Central Nervous System Based on Multicomponent Sequential Metabolism

JIANG Xiao-quan¹, YANG Wen-ning¹, SEN Mu-li¹, LUO Zhi-qiang², LI Xue-yan¹,
CHEN Hong-jiao¹, LIU Wei¹, QI Dong-ying¹, WANG Guo-peng³, LIU Yang¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
2. School of Chinese Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
3. Zhongcai Health (Beijing) Biological Technology Development Co. Ltd., Beijing 101503, China)

Abstract: The blood-brain barrier (BBB) is a critical biological structure which maintains the bathing microenvironment of brain but prevents the therapeutic drugs for central nervous system (CNS) work at the same time. Traditional Chinese medicine (TCM) shows advantages of fewer adverse reactions, mild and long-lasting effects in treating CNS diseases, and screening brain-penetrable constituents from TCM is a

promising way for neuroprotective drug discovery. The purpose of the research is to study the material basis on the protective effect of *Punica Granatum* L. on CNS by combining sequential metabolism with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Many *in situ* models have been developed and widely used to study drug intestinal absorption, such as *in situ* closed-loop method, intestinal single-pass perfusion, intestinal recirculating perfusion, and intestinal perfusion with venous sampling (IPVS) method. In this study, the plasma samples of intestinal wall metabolism and intestinal flora metabolism were collected by intestinal perfusion and *in situ* closed-loop method, respectively, and the protoplasmic components and metabolites in the plasma sample were identified by UPLC-MS/MS after the extract of *Punica granatum* L. was prepared. Then, components in plasma were identified after the rats of comprehensive metabolism group were given the extract by intragastric administration. Finally, the components into the brain were found in the cerebrospinal fluid. A total of 38 chemical components were detected in the extract, including tannins, flavonoids, phenolic acids, and isocoumarins. The situations for intestinal wall metabolism and intestinal flora metabolism groups were similar, as the same 30 protoplasmic components and 12 metabolites were found. For the comprehensive metabolism group, 7 protoplasmic components and 18 metabolites were detected. 2 protoplasmic components and 4 metabolites were found in cerebrospinal fluid samples, including citric acid, ellagic acid, and two methyl ellagic acid isomers, dimethyl ellagic acid, and dimethyl ellagic acid glucuronide. The components into the brain of *Punica Granatum* L. and its metabolites were identified using multicomponent sequential metabolism, which provided evidence to clarify the protective effect of *Punica Granatum* L. on central nervous system. This study provides evidence that the intestinal perfusion and *in situ* closed-loop method can help filter out part of the unabsorbed components and reduce the workload of comprehensive metabolic component identification, and it is also a supplement to the missing components in the plasma of gavage group. In a word, compared with detecting the components in cerebrospinal fluid directly, the addition of multicomponent sequential metabolism can improve identification speed and accuracy greatly.

Key words: *Punica granatum* L.; multicomponent drug metabolism; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); components into the brain

石榴皮为石榴科植物石榴(*Punica granatum* L.)的干燥果皮,具有涩肠止泻、止血、驱虫的功效,用于治疗久泻、久痢、便血、脱肛、崩漏、白带、虫积腹痛等病症^[1]。现代研究表明^[2],石榴皮含有鞣质类、黄酮类、酚酸类、生物碱类和氨基酸类等化学成分,具有抑制大脑内脂质过氧化、减轻氧化应激、改善空间记忆、改善阿尔兹海默症等作用^[3-5]。但尚未有研究对其中枢神经系统保护作用的物质基础进行探究。

血脑屏障是限制中枢神经系统疾病药物发

挥药效的主要因素之一^[6]。中药在中枢神经系统保护方面具有不良反应少、作用温和持久等优势,但由于中药多成分、多靶点的特点,难以评估血脑屏障通过效应。基于此,本研究以石榴皮为研究对象,拟基于多成分药物代谢理论^[7],借助 UPLC-Q-Exactive MS 检测手段,首先通过肠灌流和封闭肠环给药的方法,考察石榴皮的肠吸收及代谢情况,过滤掉一部分未吸收成分,并鉴定出新生成的代谢产物;在肠代谢成分鉴定的基础上,模拟口服给药的方式对大

鼠进行灌胃,解析血中移行成分;最后,分析鉴定灌胃给药后大鼠脑脊液样品中石榴皮的成分及其代谢产物。结合多成分药物序贯代谢方法,逐步解析石榴皮及其代谢产物在大鼠体内的移行,靶向识别出石榴皮的入脑成分,希望为阐述石榴皮治疗中枢神经系统疾病的药效物质基础提供依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

UltiMate 3000-Q-Orbitrap;美国 Fisher 公司产品,配有 UltiMate 3000 超高效液相色谱仪、Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、DAD 检测器、Xcalibur 质谱工作站;BSA2202S 电子分析天平;德国 Sartorius 公司产品;BT-100-1F 蠕动泵、LSP02-1B 注射泵;保定兰格恒流泵有限公司产品;KQ5200E 超声波清洗器;昆山市超声仪器有限公司产品;HH-2A 电热恒温水浴锅;北京科伟永兴仪器有限公司产品;1-15PK 高速冷冻离心机;德国 Sigma 公司产品;CM-12 水浴氮吹仪;北京成萌伟业科技有限公司产品。

1.2 药物与试剂

石榴皮饮片:购于北京同仁堂长阳药店有限公司新悦都店,由北京中医药大学王晶娟教授鉴定为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮;甲醇、乙腈(色谱纯),乙腈、甲酸(质谱纯):美国赛默飞世尔科技有限公司产品;磷酸(色谱纯):天津市光复精细化工研究所产品;无水乙醇(分析纯):天津大茂化学试剂厂产品;氯化钠注射液:石家庄四药有限公司产品;医用胶:北京康派特医疗器械有限公司产品;水合氯醛(分析纯):福晨天津化学试剂有限公司产品;肝素钠注射液:上海上药第一生化药业有限公司产品;屈臣氏饮用水:广州屈臣氏食品饮料有限公司产品;Oasis HLB C18 固相萃取柱:美国 Waters 公司产品。

1.3 实验动物

SD 雄性大鼠(SPF 级,体质量 220~250 g,合格证号 SCXK(京)2019-0010):购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,已通过北京中医药大学伦理部的伦理审批(审批号 BUCM-4-2019060515-1028)。将大鼠饲养于昼夜节律光

照条件下(温度 25~27 ℃,相对湿度 50%~70%),实验前适应性饲养 14 天,自由进食进水。

1.4 实验方法

1.4.1 石榴皮提取液的制备 称取 179.99 g 石榴皮粉末,加入 1.8 L 50%乙醇,室温浸提 30 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于 50 ℃水浴挥至近 180 mL,得到约 1 g/mL 石榴皮提取液,稀释 1 000 倍,过 0.22 μm 微孔滤膜,待测。

1.4.2 肠代谢成分鉴定 肠壁代谢组(肠灌流):随机选取 4 只禁食(不禁水)12 h 的大鼠,腹腔注射 10%水合氯醛,腹主动脉采血,并于 37 ℃水浴加热,用于补充手术过程中损失的血液。另取禁食的大鼠,麻醉,沿腹中线剪开腹腔,选择十二指肠以下约 10 cm 的空肠作为供试肠段,先用 37 ℃生理盐水缓慢冲出肠内容物至流出液澄清,继续充入空气将生理盐水排净。将石榴皮提取液注入肠段,末端开口排出,通过注射泵控制流速 0.2 mL/min。用 37 ℃生理盐水润湿的纱布覆盖在裸露肠段上,保温灯加热。剖离颈静脉,插入静脉留滞针,通过蠕动泵连接到盛有供血的离心管中;在肠系膜静脉插入充满肝素钠的静脉留滞针,结扎周围多余血管,另一端通过蠕动泵收集血液至干净离心管,结扎肝门静脉。开启蠕动泵,以流速 0.3 mL/min 进行颈静脉输血,肠系膜静脉连续采血 2 h 后处死大鼠。对照组注射泵给予生理盐水,其余操作相同。

肠道菌群代谢组(封闭肠环):大鼠麻醉后选取盲肠以下约 8 cm 的结肠作为供试肠段,将石榴皮提取液注入肠腔,当药液到达肠段末端,用手术线结扎,并结扎药液进口处。结扎肝门静脉,颈静脉供血,肠系膜静脉采血,其余操作同“肠壁代谢组”。采血 2 h 后处死大鼠。对照组注射泵给予生理盐水,其余操作相同。

1.4.3 综合代谢成分鉴定 选取 3 只 SD 雄性大鼠,每天早、晚均灌胃 2 mL 石榴皮提取液,连续灌胃 3 天,第 4 天上午给药 1 h 后,腹腔注射 10%水合氯醛进行麻醉处理,采集脑脊液后,腹主动脉采血。空白组给予生理盐水。

1.4.4 血液样品处理 将收集的血液样品于 4 ℃以 4 000 r/min 离心 10 min,分离得到血浆后,分别用以下 2 种方法处理:1) 固相萃取柱

法:取 1.5 mL 血浆样品,加入等体积的 4% 磷酸溶液混合,涡旋 2 min,静置 5 min 后上样于 SPE 柱,分别使用 5% 甲醇和水冲洗 SPE 柱,乙腈-甲醇溶液(90 : 10,V/V)进行洗脱,收集洗脱液,氮气吹干,1 mL 甲醇复溶,过 0.22 μm 微孔滤膜,待液相色谱-质谱分析。2) 有机试剂沉淀法:取 1 mL 血浆样品,加入等体积的乙腈混合,涡旋 2 min,于 4 ℃ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,待液相色谱-质谱分析。

1.4.5 脑脊液样品处理 向综合代谢组的脑脊液样品中加入等体积的乙腈混合,涡旋 2 min,于 4 ℃ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,待液相色谱-质谱分析。

1.4.6 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC BEH Shield RP C18 柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm);体积流量 0.3 mL/min;进样体积 5 μL;流动相:0.1% 甲酸(A)-乙腈(B);梯度洗

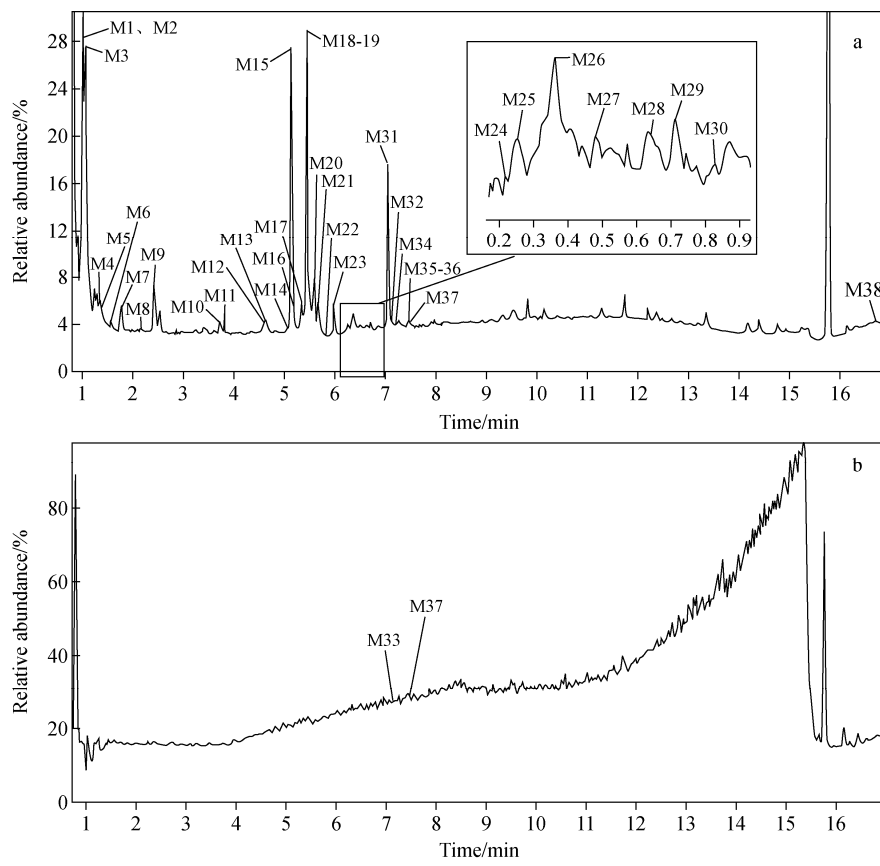
脱:0~2 min(95% A),2~17 min(95%~2% A),17~20 min(2% A),20~23 min(2%~95% A),23~25 min(95% A);柱温 40 ℃。

1.4.7 质谱条件 电喷雾电离源(ESI),正、负离子检测模式;质量扫描范围 m/z 100~1 500;喷雾电压+3.5 kV(正离子模式)、-3.0 kV(负离子模式);鞘气压力 35 Pa;辅助气压力 15 Pa;辅助气温度 300 ℃;离子传输管温度 350 ℃;Full MS/dd-MS² 扫描模式,Full MS 分辨率 70 000,dd-MS² 分辨率 17 500;碰撞能量 20、40、60 eV。

2 结果与讨论

2.1 石榴皮提取液中化学成分鉴定

石榴皮提取液的总离子流图示于图 1。利用 Thermo Xcalibur Qual Browser 软件与 OTCML、HMDB 数据库比对,并结合参考文献,共鉴定出 38 个化合物,结果列于表 1。



注:a. 负离子模式;b. 正离子模式

图 1 石榴皮提取液的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of *Punica granatum* L. extract

表 1 石榴皮提取液中化合物 UPLC-MS/MS 分析鉴定结果

Table 1 Identification results of chemical constituents of *Punica granatum* L. extract by UPLC-MS/MS

编号 No.	保留时间 t_R /min	电离模式 Ionization mode	母离子 Parent ion (m/z)		误差 Error/ $\times 10^{-6}$	分子式 Molecular formula	MS ² 主要峰 Main peaks of MS ² (m/z)	鉴定结果 Identification result	参考文献 Reference
			理论值 Theoretical	实测值 Measured					
M1	1.01	[M-H] ⁻	481.0613	481.0624	2.283	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₄	463,437,419,301,284,257,229	六羟基联苯二甲酰基葡萄糖苷	[8-9]
M2	1.03	[M-H] ⁻	331.0660	331.0670	3.253	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	271,211,169,151,125	没食子酰基葡萄糖苷	[8-9]
M3	1.06	[M-H] ⁻	191.0186	191.0189	1.419	C ₆ H ₇ O ₇	129,111,87,85	柠檬酸	OTCML
M4	1.35	[M-H] ⁻	331.0660	331.0671	3.434	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	271,211,169,151,125	没食子酰基葡萄糖苷	[8]
M5	1.37	[M-H] ⁻	355.0296	355.0309	3.697	C ₁₄ H ₁₁ O ₁₁	337,249,205,193,163	诃子裂酸	[10]
M6	1.55	[M-H] ⁻	331.0660	331.0673	3.978	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	271,211,169,125	没食子酰基葡萄糖苷	[8]
M7	1.77	[M-H] ⁻	169.0131	169.0134	1.185	C ₇ H ₅ O ₅	125	没食子酸	[9]
M8	2.19	[M-H] ⁻	483.0769	483.0783	2.853	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	313,169,151,125	双没食子酰基葡萄糖苷	[8-9]
M9	2.41	[M-H] ⁻	781.0519	781.0534	1.935	C ₃₄ H ₂₁ O ₂₂	601,575,299,271	安石榴林	[8]
M10	3.72	[M-H] ⁻	305.0656	305.0667	3.707	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	287,261,219,179	没食子儿茶素	[11]
M11	3.79	[M-H] ⁻	483.0769	483.0783	3.102	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	313,169,151,125	双没食子酰基葡萄糖苷	[8-9]
M12	4.59	[M-H] ⁻	1083.0582	1083.0598	1.518	C ₄₈ H ₂₇ O ₃₀	721,601,575,301,271	安石榴苷	[8,12-13]
M13	4.62	[M-H] ⁻	1415.1349	1415.1342	-0.505	C ₃₆ H ₅₅ O ₅₈	—	二(六羟基联苯二甲酰基-没食子酰葡萄糖)-戊糖	[11]
		[M-2H] ²⁻	707.0633	707.0637	0.664	—	—		
M14	5.06	[M-H] ⁻	469.0038	469.0053	3.291	C ₂₁ H ₉ O ₁₃	425,407,379,301,300	瓦隆酸双内酯	[8]
M15	5.12	[M-H] ⁻	1083.0582	1083.0585	0.281	C ₄₈ H ₂₇ O ₃₀	781,721,601,575,301,271	安石榴苷	[8,12-13]
M16	5.21	[M-H] ⁻	483.0769	483.0785	3.288	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	313,169,151,125	双没食子酰基葡萄糖苷	[8-9]
M17	5.33	[M-H] ⁻	289.0707	289.0720	4.481	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	271,245,227,205,203,179,151,125	儿茶素	[14-15]
M18	5.44	[M-H] ⁻	1083.0582	1083.0583	0.170	C ₄₈ H ₂₇ O ₃₀	781,721,601,301,271	安石榴苷	[8,12-13]
M19	5.44	[M-H] ⁻	291.0135	291.0146	3.802	C ₁₃ H ₇ O ₈	247,219,191	短叶苏木酚酸	[9]

续表 1

编号 No.	保留时间 t_R/min	电离模式	母离子 Parent ion (m/z)		误差 Error/ $\times 10^{-6}$	分子式 Molecular formula	MS ² 主要峰 Main peaks of MS ² (m/z)	鉴定结果 Identification result	参考文献 Reference
		Ionization mode	理论值 Theoretical	实测值 Measured					
M20	5.59	[M-H] ⁻	799.0625	799.0644	2.164	C ₃₄ H ₂₃ O ₂₃	737, 301, 275, 257	石榴皮亭 A	HMDB
M21	5.66	[M-H] ⁻	633.0722	633.0736	2.164	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈	463, 301, 257, 229	鞣云实精	[8]
M22	5.78	[M-H] ⁻	289.0707	289.0721	5.000	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	271, 245, 227, 205, 203, 179, 151, 125	表儿茶素	OTCML&.[14]
M23	5.97	[M-H] ⁻	463.0507	463.0522	3.311	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₃	301, 300, 284, 272, 229	鞣花酸葡萄糖苷	[8]
M24	6.22	[M-H] ⁻	247.0237	247.0248	4.435	C ₁₂ H ₇ O ₆	219, 201, 191, 173, 117	云实素	[9]
M25	6.26	[M-H] ⁻	197.0444	197.0450	2.690	C ₉ H ₉ O ₅	169, 125	没食子酸乙酯	[9]
M26	6.36	[M-H] ⁻	951.0734	951.0750	1.670	C ₄₁ H ₂₇ O ₂₇	463, 301, 257, 229	石榴皮亭 B	[8]
M27	6.47	[M-H] ⁻	433.0402	433.0415	3.043	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂	301, 300, 229	鞣花酸戊糖苷	[13]
M28	6.65	[M-H] ⁻	953.0891	953.0911	2.086	C ₄₁ H ₂₉ O ₂₇	920, 337, 301, 275, 169	河黎勒酸	[16]
M29	6.71	[M-H] ⁻	447.0558	447.0573	3.440	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₂	301, 300, 284, 257, 229	鞣花酸鼠李糖苷	[13]
M30	6.82	[M-H] ⁻	609.1450	609.1469	3.117	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	343, 301, 300, 271, 255, 179, 151	芦丁	OTCML&.[8]
M31	7.04	[M-H] ⁻	300.9979	300.9987	0.806	C ₁₄ H ₅ O ₈	300, 284, 257, 229	鞣花酸	[15]
M32	7.09	[M-H] ⁻	463.0871	463.0887	3.342	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	301, 283, 273, 179, 151, 121	金丝桃苷	[14]
M33	7.10	[M+H] ⁺	303.0499	303.0500	0.201	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	285, 275, 257, 247, 229, 213, 201	槲皮素	[17]
M34	7.18	[M-H] ⁻	593.1501	593.1517	2.754	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	285, 284, 255, 227, 163, 151	百蕊草素 I	[8]
M35	7.43	[M-H] ⁻	435.1286	435.1299	3.141	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₀	273, 179, 167, 123	根皮苷	OTCML
M36	7.43	[M-H] ⁻	433.0765	433.0779	3.169	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	301, 300, 271, 255, 179, 151	槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷	[8]
M37	7.46	[M-H] ⁻	447.0922	447.0936	3.092	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	284, 255, 227	紫云英苷	OTCML
		[M+H] ⁺	449.1078	449.1078	0.027	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	287, 153, 85		
M38	16.63	[M-H] ⁻	455.3520	455.3531	2.456	C ₃₀ H ₄₉ O ₃	409, 407	熊果酸	[18]

注: OTCML 和 HMDB 分别指 OTCML、HMDB 数据库

2.1.1 鞣质类化合物鉴定 从石榴皮提取液中鉴定出六羟基联苯二甲酰基葡萄糖苷、安石榴苷和鞣云实精等 17 个鞣质类化合物。下面以安石榴苷和鞣云实精为例进行质谱解析。

化合物 M12、M15 和 M18 的准分子离子分别为 m/z 1 083.059 8 $[M-H]^-$ 、 m/z 1 083.058 5 $[M-H]^-$ 、 m/z 1 083.058 3 $[M-H]^-$ ，Qual Browser 软件给出的精确分子式均为 $C_{48}H_{27}O_{30}$ (误差分别为 1.518×10^{-6} 、 0.281×10^{-6} 、 0.170×10^{-6})，二级碎片离子为 m/z 781 $[M-H-\text{ellagic acid}]^-$ 、 m/z 601 $[M-H-\text{ellagic acid}-162-H_2O]^-$ 和 m/z 301 $[\text{ellagic acid}-H]^-$ ，表明 3 个化合物的结构中均包含安石榴林和鞣花酸。通过与文献^[8,12-13] 对比，推测 M12、M15、M18 为安石榴苷的 3 个同分异构体。

化合物 M21 的准分子离子为 m/z 633.073 6 $[M-H]^-$ ，Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $C_{27}H_{21}O_{18}$ (误差为 2.164×10^{-6})，二级碎片离子有 m/z 463 $[M-H-170]^-$ 、 m/z 301 $[M-H-170-162]^-$ ，分别为失去 1 分子没食子酸，1 分子没食子酸和 1 分子葡萄糖基的碎片离子，此外还产生 m/z 257、229 碎片离子，表明 M21 中存在六羟基联苯二甲酰基基团和没食子酸结构。与文献^[8] 对比，推测其为鞣云实精。

2.1.2 黄酮类化合物鉴定 从石榴皮提取液中鉴定出芦丁、槲皮素、金丝桃苷等 7 个黄酮类化合物。下面以槲皮素为例进行质谱解析。

化合物 M33 的准分子离子为 m/z 303.050 0 $[M+H]^+$ ，Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $C_{15}H_{11}O_{17}$ (误差为 0.201×10^{-6})，二级碎片离子有 m/z 285 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 275 $[M+H-CO]^+$ 、 m/z 257 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 m/z 247 $[M+H-2CO]^+$ 、 m/z 229 $[M+H-2CO-H_2O]^+$ 、 m/z 213 $[M+H-2CO-O-H_2O]^+$ 和 m/z 201 $[M+H-3CO-H_2O]^+$ 。经与文献^[17] 对比，推测该化合物为槲皮素，其裂解途径示于图 2。

2.1.3 酚酸类化合物鉴定 从石榴皮提取液中鉴定出儿茶素、没食子酸和鞣花酸等 9 个酚酸类化合物。下面以没食子酸、没食子酸乙酯和鞣花酸及其糖苷为例进行质谱解析。

化合物 M7 和 M25 的准分子离子分别为 m/z 169.013 4 $[M-H]^-$ 、 m/z 197.045 0 $[M-H]^-$ ，Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $C_7H_5O_5$ 和 $C_9H_9O_5$ (误差为 1.185×10^{-6} 、 2.690×10^{-6})。M7 的二级碎片离子有 m/z 125 $[M-H-COO]^-$ ，为丢失 1 分子羧基形成的；M25 的二级碎片离子 m/z 169 $[M-H-C_2H_4]^-$ 为丢失 1 分子乙基形成的， m/z 125 $[M-H-C_2H_4-$

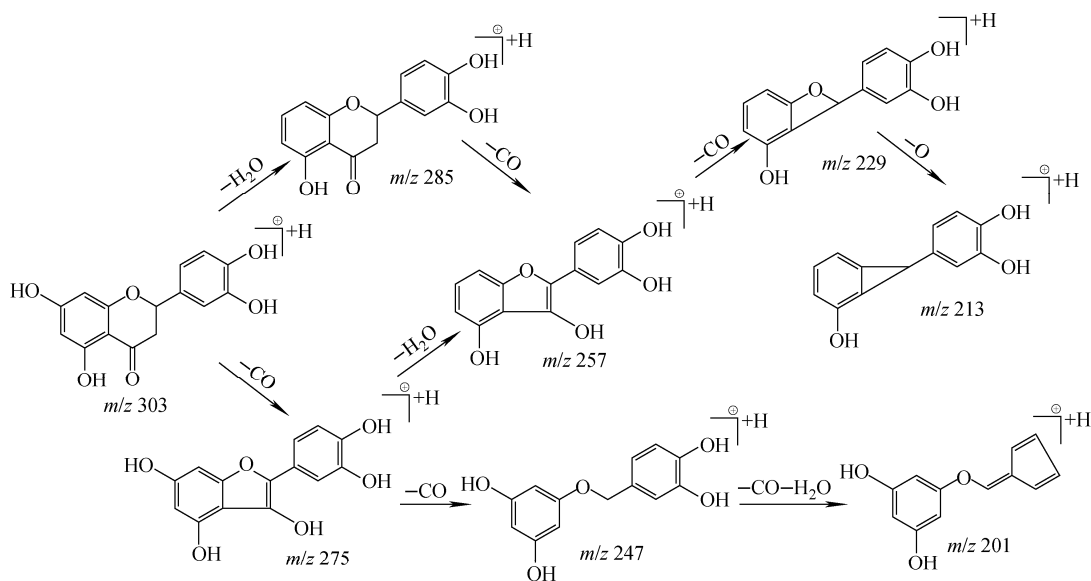


图 2 槲皮素的裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathways of paeoniflorin quercetin

$\text{COO}]^-$ 为丢失 1 分子乙基、1 分子羧基形成的。结合文献^[9],推测 M7 和 M25 分别为没食子酸、没食子酸乙酯,其裂解途径示于图 3。

化合物 M23、M27、M29 和 M31 的准分子离子分别为 m/z 463.052 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 m/z 433.041 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 m/z 447.057 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 和 m/z 300.998 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$,Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_{13}$ 、 $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_{12}$ 、 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_{12}$ 和 $\text{C}_{14}\text{H}_5\text{O}_8$ (误差为 3.311×10^{-6} 、 3.043×10^{-6} 、 3.440×10^{-6} 和 0.806×10^{-6})。M31 的二级碎片离子有 m/z 300 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 m/z 284 $[\text{M}-\text{H}-\text{OH}]^-$ 、 m/z 257 $[\text{M}-\text{H}-\text{COO}]^-$ 、 m/z 229 $[\text{M}-\text{H}-\text{COO}-\text{CO}]^-$,与文献^[15]报道一致,推测化合物 M31 为鞣花酸,其质谱裂解途径示于图 4。化合物 M23、M27 和 M29 的碎片离子有 m/z 301、300、257、229 等,表明这 3 个化合物结构中可能存在鞣花酸,其中 m/z 301 碎片离子分别为 $[\text{M}-\text{H}-162]^-$

(M23), $[\text{M}-\text{H}-132]^-$ (M27) 和 $[\text{M}-\text{H}-146]^-$ (M29),结合文献^[8,13],推测其分别由 M23、M27、M29 失去 1 分子葡萄糖、1 分子戊糖、1 分子鼠李糖后形成的,即 M23、M27、M29 分别为鞣花酸葡萄糖苷、鞣花酸戊糖苷和鞣花酸鼠李糖苷。

2.1.4 异香豆素类化合物鉴别 从石榴皮提取液中鉴定出 3 个异香豆素类化合物,以云实素为例进行结构鉴定。

化合物 M24 的准分子离子为 m/z 247.024 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$,Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_6$ (误差为 4.435×10^{-6}),二级碎片离子有 m/z 219、201、191、173 和 117,其中 m/z 219 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$ 和 m/z 191 $[\text{M}-\text{H}-2\text{CO}]^-$ 分别为失去 1 分子羰基和 2 分子羰基的碎片离子,与文献^[9]比对,推测该化合物为云实素。

2.1.5 其他类别化合物鉴定 从石榴皮提取液中还鉴定出柠檬酸与熊果酸。化合物 M3 的

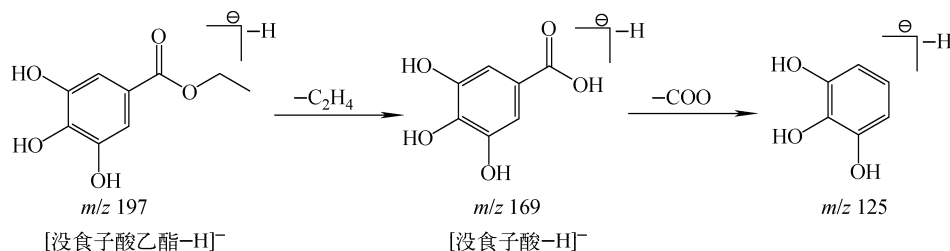


图 3 没食子酸、没食子酸乙酯的裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathways of gallic acid and ethyl gallate

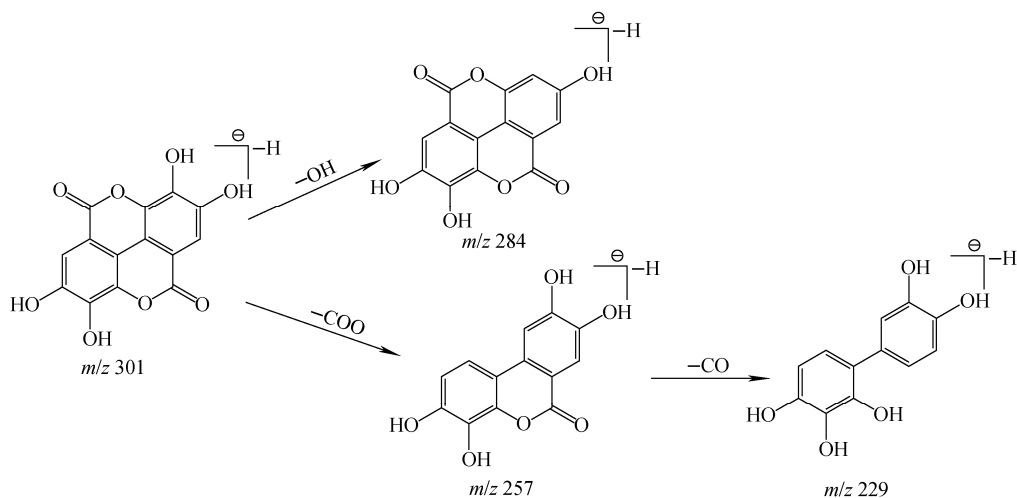


图 4 鞣花酸的裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathways of ellagic acid

准分子离子为 m/z 191.018 9 $[M-H]^-$,Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $C_6H_7O_7$ (误差为 1.419×10^{-6}),二级碎片离子有 m/z 129、111、87 和 85。通过与 OTCML 数据库对比,推测该化合物为柠檬酸。

化合物 M38 的准分子离子为 m/z 455.353 1 $[M-H]^-$,Qual Browser 软件给出的精确分子式为 $C_{30}H_{47}O_3$ (误差为 1.419×10^{-6}),二级碎片离子有 m/z 409 $[M-H-HCOOH]^-$ 和 m/z 407 $[M-H-CH_4O_2]^-$ 。通过参考文献^[18],

因其同分异构体齐墩果酸无 m/z 409 碎片离子,推断 M38 可能为熊果酸。

2.2 原型入血成分鉴定

对肠代谢血浆样品中原型入血成分进行统计,从血浆样品中共检测到 30 个石榴皮原型入血成分,肠壁代谢组和肠道菌群代谢组的血浆样品中检测到的原型入血成分无差别,表明它们可通过肠壁吸收;综合代谢组血浆样品中共检测到 7 个原型入血成分,且均为肠吸收入血成分,详细情况列于表 2。

表 2 石榴皮原型入血成分
Table 2 Prototype constituents into blood of Punica granatum L.

编号 No.	化合物 Compound	肠壁代谢组血浆 S1	肠道菌群代谢组血浆 S2	综合代谢组血浆 S3
		Plasma of intestinal	Plasma of intestinal	Plasma of comprehensive
		wall metabolism group S1	flora metabolism group S2	metabolism group S3
M1	六羟基联苯二甲酰基葡萄糖苷	Y	Y	ND
M2	没食子酰基葡萄糖苷	Y	Y	Y
M3	柠檬酸	Y	Y	Y
M4	没食子酰基葡萄糖苷	Y	Y	Y
M6	没食子酰基葡萄糖苷	Y	Y	ND
M7	没食子酸	Y	Y	ND
M8	双没食子酰基葡萄糖苷	Y	Y	Y
M9	安石榴林	Y	Y	ND
M10	没食子儿茶素	Y	Y	ND
M11	双没食子酰基葡萄糖苷	Y	Y	ND
M16	双没食子酰基葡萄糖苷	Y	Y	ND
M17	儿茶素	Y	Y	ND
M18	安石榴苷	Y	Y	ND
M19	短叶苏木酚酸	Y	Y	ND
M20	石榴皮亭 A	Y	Y	ND
M21	鞣云实精	Y	Y	ND
M22	表儿茶素	Y	Y	ND
M23	鞣花酸葡萄糖苷	Y	Y	Y
M24	云实素	Y	Y	ND
M25	没食子酸乙酯	Y	Y	ND
M27	鞣花酸戊糖苷	Y	Y	ND
M29	鞣花酸鼠李糖苷	Y	Y	ND
M30	芦丁	Y	Y	ND
M31	鞣花酸	Y	Y	Y
M32	金丝桃苷	Y	Y	ND
M33	槲皮素	Y	Y	ND
M34	百蕊草素 I	Y	Y	ND
M35	根皮苷	Y	Y	ND
M36	槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷	Y	Y	ND
M37	紫云英苷	Y	Y	Y

注:Y 表示检测到的成分;ND 表示未检测到的成分

实验结果表明,除鞣花酸、鞣质类成分外,黄酮类、酚酸类和异香豆素类成分均能以原型吸收入血,原型入血成分多达30个,但综合代谢组血浆样品的原型入血成分仅有7个。这可能是因为灌胃给药量较少,部分含量低的入血成分不足以被检测到;此外,由于灌胃后定点采血,部分成分因吸收慢尚未进入血液,或成分吸收、代谢、排泄快,以代谢产物形式存在于血液循环中或排出体外,导致血液中检测不到原型入血成分。

通过肠道灌流和封闭肠环的方法能够过滤掉一部分未被吸收的成分,降低综合代谢成分鉴定的工作量,同时也是对定点灌胃采血遗漏成分的补充,可提高血中移行成分鉴定的全面性和准确性。

2.3 代谢产物鉴定

在肠壁代谢组与肠道菌群代谢组血浆样品中鉴定出12个相同的代谢产物,列于表3,两组代谢产物结果基本无差异。目前尚未见关于肠壁细胞对石榴皮代谢作用的研究,除肠道菌群外,肠壁代谢作用对石榴皮代谢极为重要,但由于实验只能定性判断代谢成分,不排除灌流实验中有残存的肠道菌群介导代谢的可能。

在肠壁代谢组、肠道菌群代谢组和综合代谢组血浆样品中共鉴定出18种代谢产物,包括山柰酚、没食子酸甲酯、鞣花酸的甲基化和葡萄糖醛酸化或糖苷化、尿石素A及其硫酸化物、尿石素C和尿石素D的甲基化物与糖基化物,详细信息列于表3。除山柰酚外,主要代谢成分是通过安石榴苷、安石榴林等鞣质类代谢产生,结合文献^[9,19]分析其代谢方式,示于图5。以安石榴苷为代表的石榴皮鞣质类成分主要代谢途径包括水解、还原、甲基化、葡萄糖醛酸化和硫酸化。

代谢产物中含有多种鞣花酸和鞣质类成分的代谢产物,这与药典^[1]含量测定考察项相符,表明鞣花酸及鞣质类是保证药效的重要成分。据文献^[9,19-20]报道,石榴皮中的鞣质类成分在肠道菌群作用下能代谢生成尿石素类成分,与其前体化合物相比更容易被吸收,且被证实在体内外具有抗炎、抗氧化、抗癌、调节脂质代谢和保护胃肠道等多种活性^[21-22]。综合代谢组血

浆中检测到了尿石素C、尿石素C葡萄糖醛酸化物、尿石素C双葡萄糖醛酸化物、尿石素A、尿石素A硫酸化物、尿石素A葡萄糖醛酸化物;在肠壁代谢组和肠道菌群代谢组的代谢产物中发现了甲基尿石素D葡萄糖醛酸化物、尿石素A葡萄糖醛酸化物。综合代谢组检测到的尿石素类成分较肠代谢组多,这可能与生成尿石素代谢物所需的时间较长有关,综合代谢组连续灌胃给药3天,尿石素类成分被检测到的几率更高;此外,由于灌胃给药时体内肠道封闭,此时的厌氧环境更利于肠道菌群生长。

2.4 入脑成分鉴定

对综合代谢组脑脊液样品进行鉴定,共检测到6个成分。柠檬酸和鞣花酸均能以原型入脑;此外,2个甲基鞣花酸同分异构体、二甲基鞣花酸和二甲基鞣花酸葡萄糖醛酸化物也能在脑脊液中检测到。脑脊液样品的质谱结果显示,检测到的化合物响应值均较小,大部分入脑成分无二级结构。在肠代谢组、综合代谢组血中移行成分鉴定结果的基础上,根据脑脊液样品中不同成分的分子离子峰和保留时间进行鉴别,可有效提高质谱解析的效率和鉴定结果的全面性、准确性。

体内外实验发现,鞣花酸可有效逆转创伤性脑损伤引起的记忆障碍^[24],并能抑制细胞凋亡、炎症反应,下调JNK/p38MAPK活性,对缺氧缺血性脑损伤起到神经保护作用^[25]。此外,鞣花酸及其甲基衍生物是有效的自由基清除剂^[26],其甲基衍生物还可诱导神经球干细胞向神经元分化^[27],表明筛选出的入脑成分是石榴皮发挥中枢神经系统保护作用的重要成分。

3 结论

将序贯代谢法与超高效液相色谱-串联质谱相结合,研究了石榴皮中发挥中枢神经系统保护作用的物质基础。从石榴皮提取液中鉴定出38个化学成分,其中30个成分经肠吸收以原型入血;并检测到18个代谢产物,主要为安石榴苷、安石榴林等鞣质类经水解、还原、甲基化、葡萄糖醛酸化和硫酸化等反应产生。筛选出6个入脑成分,柠檬酸、鞣花酸以原型入脑,经代谢生成的2个甲基鞣花酸同分异构体、二甲基鞣花酸和二甲基鞣花酸葡萄糖醛酸化物也

表 3 石榴皮代谢成分鉴定结果
Table 3 Identification results of the metabolites of *Punica granatum* L.

编号 No.	保留时间 t_R/min	分子式 Molecular formula	电离模式 Ionization mode	母离子 Parent ion (m/z)		误差 Error/ $\times 10^{-6}$	MS ² 主要峰 Main peaks of MS ² (m/z)	鉴定结果 Identification result	参考文献 Reference	S1	S2	S3
				Theoretical	实测值 Measured							
M39	4.57	C ₈ H ₇ O ₅	[M-H] ⁻	183.0288	183.0292	2.132	168,140,124	没食子酸甲酯	OTCML&[9]	Y	Y	Y
M40	6.53	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.1078	449.1098	4.302	273,259	甲基尿石素 D 葡萄糖醛化物	[9]	Y	Y	ND
M41	7.35	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₇	[M-H] ⁻	595.0930	595.0947	2.948	419,243	尿石素 C 双葡萄糖醛化物	[9]	ND	ND	Y
M42	8.33	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	[M-H] ⁻	477.0664	477.0682	3.863	315,300	甲基鞣花酸葡萄糖苷	[9]	Y	Y	ND
M43	8.39	C ₁₉ H ₁₅ O ₁₁	[M-H] ⁻	419.0609	419.0625	3.919	243	尿石素 C 葡萄糖醛化物	[9,19]	ND	ND	Y
M44	8.61	C ₁₉ H ₁₅ O ₁₀	[M-H] ⁻	403.0660	403.0671	2.745	227,175	尿石素 A 葡萄糖醛化物	[19]	Y	Y	Y
M45	8.61	C ₁₃ H ₇ O ₄	[M-H] ⁻	227.0339	227.0342	1.563	199,183	尿石素 A	[23]	ND	ND	Y
M46	8.75	C ₂₁ H ₁₅ O ₁₄	[M-H] ⁻	491.0456	491.0471	3.092	315,300	甲基鞣花酸葡萄糖醛化物	[9,19]	Y	Y	Y
M47	8.80	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₄	[M-H] ⁻	505.0613	505.0626	2.650	329,314,300	二甲基鞣花酸葡萄糖醛化物	[9,19]	Y	Y	Y
M48	8.90	C ₁₉ H ₁₅ O ₁₁	[M-H] ⁻	419.0609	419.0621	2.965	243	尿石素 C 葡萄糖醛化物	[9,19]	ND	ND	Y
M49	10.05	C ₁₅ H ₇ O ₈	[M-H] ⁻	315.0135	315.0148	3.988	300	甲基鞣花酸	[9,19]	Y	Y	Y
M50	10.48	C ₁₅ H ₇ O ₈	[M-H] ⁻	315.0135	315.0150	4.465	300	甲基鞣花酸	[9,19]	Y	Y	Y
M51	11.12	C ₁₆ H ₉ O ₈	[M-H] ⁻	329.0292	329.0305	3.849	314,299	二甲基鞣花酸	[19]	Y	Y	Y
M52	11.66	C ₁₆ H ₉ O ₈	[M-H] ⁻	329.0292	329.0302	2.907	314,299	二甲基鞣花酸	[19]	Y	Y	Y
M53	12.22	C ₁₆ H ₉ O ₈	[M-H] ⁻	329.0292	329.0305	3.849	314,299	二甲基鞣花酸	[19]	Y	Y	Y
M54	12.60	C ₁₅ H ₉ O ₆	[M-H] ⁻	285.0394	285.0406	4.194	267,257,243,241	山柰酚	[14]	Y	Y	Y
M55	13.42	C ₁₃ H ₇ O ₅	[M-H] ⁻	243.0288	243.0285	-1.110	215,199	尿石素 C	[9]	ND	ND	Y
M56	14.21	C ₁₃ H ₇ O ₇ S	[M-H] ⁻	306.9907	306.9919	3.942	227,183	尿石素 A 硫酸化物	[19]	ND	ND	Y

注: S1、S2、S3 分别表示肠壁代谢组、肠道菌群代谢组和综合代谢组血浆样品

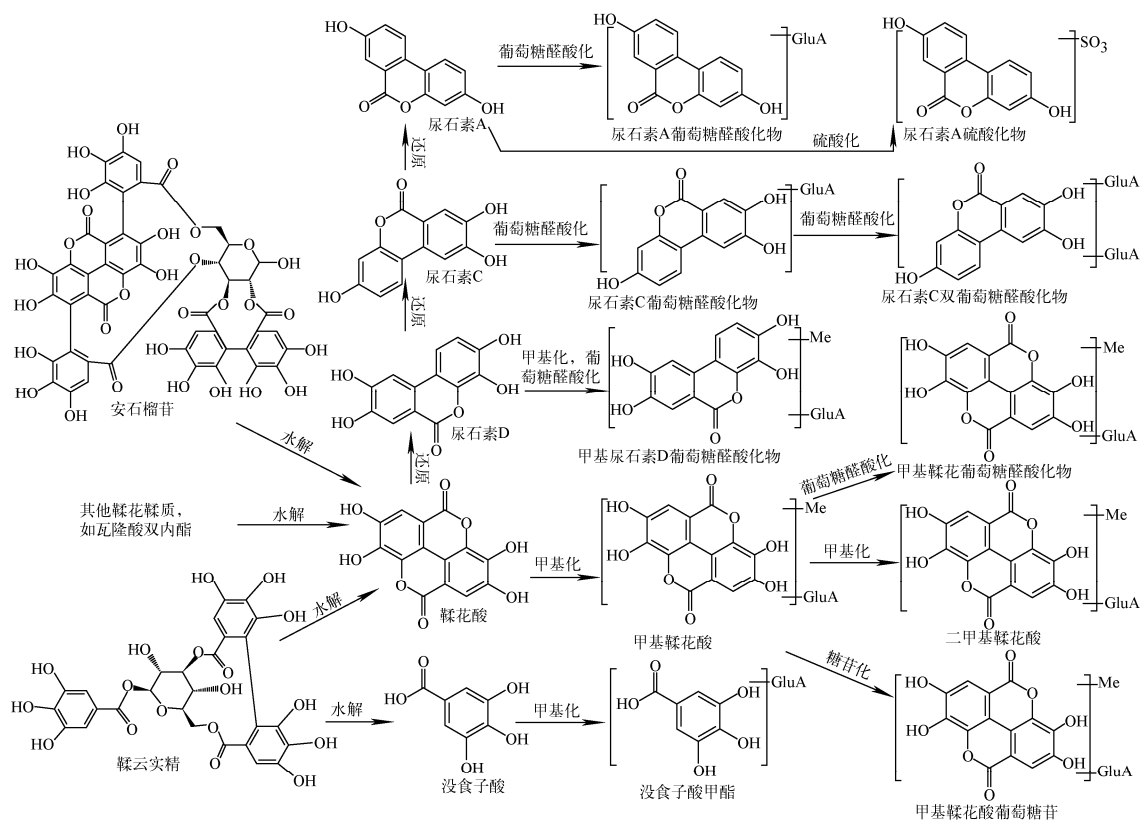


图5 石榴皮中主要鞣质类成分代谢途径

Fig. 5 Metabolic pathways of the main tannins in *Punica granatum* L.

能透过血脑屏障入脑。该研究基于多成分药物代谢理论,将序贯代谢法与液相色谱-质谱联用技术相结合,靶向识别出石榴皮及其代谢产物中入脑成分,为多成分药物治疗中枢神经系统疾病的物质基础研究提供了思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] AHMADIANKIA N. *Punica granatum* molecular targets of pomegranate (*Punica granatum*) in preventing cancer metastasis[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(9): 977-988.
- [3] NAYEEN S, SIDDALINGASWAMY M, SING-SIT D, KHANUM F. Anti-depressive effect of polyphenols and omega-3 fatty acid from pomegranate peel and flax seed in mice exposed to chronic mild stress[J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2013, 67(7): 501-508.
- [4] SHALINI A, PRABHAY T, RAVICHANDRA V, DEBASHREE D, FORUM M. Effect of

Punica granatum peel extract on learning and memory in rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2010, 3(9): 687-690.

- [5] MORZELLE M C, SALGADO J M, TELLES M, MOURELLE D, BACHIEGA P, BUCK H S, VIEL T A. Neuroprotective effects of pomegranate peel extract after chronic infusion with amyloid- β peptide in mice[J]. Plos One, 2016, 11(11): e0166123.
 - [6] HE Q, LIU J, JIANG L, LIU X, LI W, LIU Z, DING Z, TUO D. Towards improvements for penetrating the blood-brain barrier-recent progress from a material and pharmaceutical perspective[J]. Cells, 2018, 7(4): 24.
 - [7] 刘洋,潘艳丽,王晶娟,翟华强,张强,项佳媚,隗丽,杨文宁,关键雷,郭怡祯. 多成分药物代谢理论及技术方法分析[J]. 中草药,2014,45(12): 1 663-1 667.
- LIU Yang, PAN Yanli, WANG Jingjuan, ZHAI Huaqiang, ZHANG Qiang, XIANG Jiamei, WEI Li, YANG Wenning, GUAN Jianlei, GUO Yizhen. Analysis on theory and technology meth-

- od of multicomponent drug metabolism[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45 (12): 1 663-1 667(in Chinese).
- [8] ABDULLA R, MANSUR S, LAI H, UBUL A, SUN G, HUANG G, ASIA H A. Qualitative analysis of polyphenols in macroporous resin pretreated pomegranate husk extract by HPLC-QTOF-MS[J]. Phytochem Anal, 2017, 28(5): 465-473.
- [9] YISIMAYILI Z, ABDULLA R, TIAN Q, WANG Y, CHEN M, SUN Z, LI Z, LIU F, AISA H A, HUANG C. A comprehensive study of pomegranate flowers polyphenols and metabolites in rat biological samples by high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2019, 1 604: 460-472.
- [10] FAHMY N M, AI-SAYED E, ABDEL-DAIM M M, KARONEN M, SINGAB A N. Protective effect of Terminalia muelleri against carbon tetrachloride-induced hepato and nephro-toxicity in mice and characterization of its bioactive constituents[J]. Ther Delivery, 2016, 54(2): 303-313.
- [11] MENA P, CALANI L, DALL'ASTA C, GALAVERNA G, GARCIA-VIGUERA C, BRUNI R, CROZIER A, DEL RIO D. Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSⁿ [J]. Molecules, 2012, 17(12): 14 821-14 840.
- [12] CERDA B, CERON J J, TOMAS-BARBERAN F A, ESPIN J C. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(11): 3 493-3 501.
- [13] ABID M, YAICH H, CHEIKHROUHOUS, KHEMAKHEM I, BOUAZIZ M, ATTIA H, AYADI M A. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels[J]. J Food Sci Technol, 2017, doi: 10. 1007/s13197-017-2727-0.
- [14] 王腾华. 卫矛抗炎物质基础及其质量控制研究[D]. 广东:广州中医药大学, 2016.
- [15] 汤逊尤. 场强化辅助多相体系萃取分离鬼箭羽中有效成分的研究[D]. 广州:广东药科大学, 2017.
- [16] PFUNDSTEIN B, EL DESOUKY S K, HULL W E, HAUBNER R, ERBEN G, OWEN R W. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities[J]. Phytochemistry, 2010, 71 (10): 1 132-1 148.
- [17] 李宇航,戴海学,汪明明,李晓蓉,王丽娟,薛明. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, 30(6): 374-378.
- LI Yuhang, DAI Haixue, WANG Mingming, LI Xiaorong, WANG Lijuan, XUE Ming. Elucidation of quercetin by electron spray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(6): 374-378(in Chinese).
- [18] 孙玉明,王月月,蔡蕊,张华,王玉林. 高效液相色谱-光电二极管阵列-高分辨质谱联用鉴定马鞭草提取物中的化学成分[J]. 色谱, 2017, 35(9): 987-994.
- SUN Yumin, WANG Yueyue, GAI Rui, ZHANG Hua, WANG Yulin. Identification of the chemical compositionsof *Verbena officinalis* L. extract by high performance liquid chromatography-photodiode array-high resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(9): 987-994(in Chinese).
- [19] NUNEZ-SANCHEZ M A, GARCIA-VILLALBA R, MONEDERO-SAIZ T M, GARCIA-TALAVERA N V, GOMEZ-SANCHEZ M B, SANCHEZ-ÁLVAREZ C, GARCIA-ALBERT A M, RODRIGUEZ-GIL F J, RUIZ-MARIN M, PASTOR-QUIRANTE F A, MARTINEZ-DIAZ F, YANEZ-GASCON M J, GONZALEZ-SARRIAS A, TOMAS-BARBERAN F A, ESPIN J C. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients[J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(6): 1 199-1 211.
- [20] BIALONSKA D, RAMNANI P, KASIMSETTY S G, MUNTHA K R, GIBSON G R, FERREIRA D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota[J]. Int J Food Microbiol, 2010, 140(2/3): 175-182.

- [21] TOMAS-BARBERAN F A, GONZALEZ-SARRIAS A, GARCIA-VILLALBA R, NUNEZ-SANCHEZ M A, SELMA M W. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(1): 1-36.
- [22] KUJAWSKA M, JODYNIS-LIEBERT J. Potential of the ellagic acid-derived gut microbiota metabolite-urolithin A in gastrointestinal protection[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(23): 3 170-3 181.
- [23] 周本宏, 涂杰, 金龙, 吴玥, 罗毅, 刘刚, 周静. 石榴皮鞣质在大鼠体内的代谢产物分析[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(10): 821-824.
ZHOU Benhong, TU Jie, JIN Long, WU Yue, LUO Yi, LIU Gang, ZHOU Jing. Metabolites of tannins in *Punica granatum* L. husk in rat urine[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2014, 49(10): 821-824(in Chinese).
- [24] AHMED T, SETZER W N, NABAVI S F, ORHAN I E, BRAIDY N, SOBARZO-SANCHEZ E, NABAVI S M. Insights into effects of ellagic acid on the nervous system: a mini review[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22: 1 350-1 360.
- [25] CHEN S Y, ZHENG K, WANG Z Q. Neuro-protective effects of ellagic acid on neonatal hypoxic brain injury via inhibition of inflammatory mediators and down-regulation of JNK/p38 MAPK activation[J]. *Trop J Pharm Res*, 2016, 15(2): 241-251.
- [26] TIWARI M K, MISHRA P C. Modeling the scavenging activity of ellagic acid and its methyl derivatives towards hydroxyl, methoxy, and nitrogen dioxide radicals[J]. *J Mol Model*, 2013, 19(12): 5 445-5 456.
- [27] 钟凯龙, 王永胜, 陈方, 叶岩荣. 基于血脑屏障转运体的中枢神经系统疾病治疗策略探讨与展望[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(8): 953-960.
ZHONG Kailong, WANG Yongsheng, CHEN Fang, YE Yanrong. Exploration and expectation on treatment strategies of central nervous system diseases based on transporters at blood-brain barrier[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2020, 25(8): 953-960 (in Chinese).
- (收稿日期:2021-06-03;修回日期:2021-08-22)