

四君子汤非多糖功效组分的体外人源肠、肝微粒体代谢研究

沈 怡, 马 萍, 董邦健, 彭崇胜, 李晓波*

上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要: 目的 对四君子汤非多糖组分的主要活性成分进行人源肠、肝微粒体中的代谢过程研究, 明确其在肠、肝中的代谢轮廓及代谢差异, 为其临床应用提供科学证据。方法 应用 Acquity UPLC I-class/VION IMS QTOF 技术分析四君子汤非多糖组分中主要活性成分(异甘草苷、甘草素、甘草酸、甘草次酸、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 CK、白术内酯 III)在人源肠、肝微粒体孵育体系下的代谢产物以及代谢转化途径。结果 甘草酸、甘草次酸在人源肠、肝微粒体中均以 I 相代谢为主; 而甘草素、异甘草苷、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 CK 则以肠 II 相代谢为主。白术内酯 III 在肠、肝微粒体中代谢均不显著, 而四君子汤非多糖功效组分中其他化合物在肠微粒体中代谢速度均比在肝微粒体中更快。此外, 甘草皂苷、人参皂苷主要进行脱糖基反应; 异甘草苷以脱糖、羟基化等反应为主; 甘草素则以葡萄糖醛酸结合为主; 白术内酯 III 则主要发生水解、羟基化反应。结论 阐明了四君子汤非多糖组分中主要活性成分在人体肠道及肝脏中的代谢轮廓及代谢差异, 为后续进行四君子汤非多糖功效组分的药效研究提供了数据支持, 也为中药复方的功效组分研究提供了思路和策略。

关键词: 四君子汤; 人源肠微粒体; 人源肝微粒体; 体外代谢; 异甘草苷; 甘草素; 甘草酸; 甘草次酸; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 CK; 白术内酯 III

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)15-4905-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.016

In vitro metabolism of non-polysaccharide components in Sijunzi Decoction by human intestinal and liver microsomes

SHEN Yi, MA Ping, DONG Bang-jian, PENG Chong-sheng, LI Xiao-bo

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Objective To study the metabolism of non-polysaccharide components of Sijunzi Decoction (四君子汤) in human intestinal and liver microsomes, clarify their metabolic profiles and metabolic differences, and provide support for their clinical application. **Methods** Acquity UPLC I-class/VION IMS QTOF was applied to analyze the metabolites and metabolic transformation of non-polysaccharide components (isoliquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, glycyrrhetinic acid, ginsenoside Rb₁, ginsenoside CK, atractylenolide III) of Sijunzi Decoction in human intestinal and liver microsomes. **Results** Glycyrrhizic acid and glycyrrhetinic acid were mainly metabolized by phase I in human intestinal and liver microsomes, while isoliquiritin, liquiritigenin, ginsenoside Rb₁, and ginsenoside CK were mainly metabolized by phase II in human intestinal microsomes. Atractylenolide III was less metabolized in both intestinal and liver microsomes, while other compounds in the non-polysaccharide components of Sijunzi Decoction were metabolized more rapidly in human intestinal microsomes than in liver microsomes. Glycyrrhizic acid and ginsenoside mainly underwent deglycosylation. Isoliquiritin mainly underwent deglycosylation and hydroxylation. Liquiritigenin mainly took combination reaction with glucuronic acid. Atractylenolide III mainly underwent hydrolysis and hydroxylation. **Conclusion** This study elucidates the metabolic profiles and metabolic differences of the non-polysaccharide components of Sijunzi Decoction in human intestinal and liver microsomes, which is important for clarifying the metabolic transformation process of Sijunzi Decoction in the body, and also provides ideas and strategies for traditional Chinese medicine prescriptions.

Key words: Sijunzi Decoction; human intestinal microsome; human liver microsome; *in vitro* metabolism; isoliquiritin; liquiritigenin; glycyrrhizic acid; glycyrrhetinic acid; ginsenoside Rb₁; ginsenoside CK; atractylenolide III

收稿日期: 2023-02-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973441)

作者简介: 沈 怡(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生药学。E-mail: shenyi-2020@sjtu.edu.cn

*通信作者: 李晓波, 女, 博士, 从事生药学研究。E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

四君子汤由人参、白术、茯苓、炙甘草组成，为中医临床治疗脾虚证的经典方剂。现代药理学研究证实，四君子汤主要具有胃肠道调节及免疫调节作用，包括改善胃肠运动、降低胃肠道炎症及调节肠道菌群平衡等^[1]。课题组前期研究表明，四君子汤中的多糖和非多糖组分均是改善脾虚证的重要物质基础，其中多糖活性组分 S-3 通过调节肠道菌群组成及短链脂肪酸含量从而增强肠道免疫功能^[2]，非多糖组分则显著改善脾虚证大鼠的免疫低下、激素分泌异常及肠道菌群紊乱现象^[3]。四君子汤非多糖组分化学组成复杂，主要包括黄酮、皂苷、萜类等成分，前期已定性鉴定了 449 个化合物，并定量分析了 19 个主要成分^[4]。药动学研究发现^[5]人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 等在体内保留时间较长，可能经过多重代谢；而甘草素等黄酮苷元类成分具有明显的肝肠循环，提示其在肠、肝中可能发生差异代谢；网络药理学及药效学实验证明甘草素、甘草次酸、异甘草苷、人参皂苷 CK、白术内酯 I、白术内酯 II 能通过调节局部黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）/磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路发挥显著的肠上皮修复作用；其中，具有显著生物活性的人参皂苷 CK 为人参皂苷 Rb₁ 的代谢产物，甘草次酸为甘草酸的代谢产物，白术内酯 I、白术内酯 II 和白术内酯 III 发生相互转换^[4-5]。因此推测甘草酸、甘草次酸、异甘草苷、甘草素、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 CK、白术内酯 III 可能为四君子汤非多糖组分针对脾虚证引起的“纳少、神失”起主要治疗作用的功效物质。但其在肠、肝中具体代谢过程及差异研究尚不完善。本研究对上述 7 个活性成分（异甘草苷、甘草素、甘草酸、甘草次酸、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 CK、白术内酯 III）进行人源肠微粒体（human intestine microsomes，HIM）、人源肝微粒体（human liver microsomes，HLM）中的 I 相和 II 相代谢研究，阐明其在 HIM、HLM 中的代谢轮廓以及二者的代谢差异，为临床四君子汤治疗脾虚证的物质基础研究提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

异甘草苷对照品（批号 wkq17051906）购自四川省维克奇生物科技有限公司；对照品甘草素（批号 DSTDG001001）、甘草酸（批号 DST210620-006）、

甘草次酸（批号 DST180314-007）、人参皂苷 Rb₁（批号 DSTDR000601）、白术内酯 III（批号 DSTDB001601）、人参皂苷 CK（批号 DSTDR003001）均购自成都德思特生物技术有限公司，上述对照品质量分数均大于 98%；3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸（3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate，CHAPS，批号 HY-15435）购自上海皓元生物医药科技有限公司；β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐水合物（β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate，NADP，批号 SLCG0842）、葡萄糖-6-磷酸钠脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase，G-6-P-DH，批号 SLCK2790）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；六水合氯化镁（批号 20200509）购自国药集团化学试剂有限公司；尿苷二磷酸葡萄糖醛酸（uridine 5'-diphosphoglucuronic acid trisodium salt，UDPGA，批号 C12209586）、D-葡萄糖-6-磷酸二钠盐（D-glucose-6-phosphate sodium salt，G-6-P，批号 C12766997）均购自上海麦克林生化科技有限公司；磷酸盐缓冲液（批号 GP21040152242）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；色谱级甲醇（批号 203398）购自美国 Fisher Chemical；HIM（批号 1610314）、HLM（批号 2010065）购自 Xeno Tech 有限责任公司（美国）。

1.2 仪器

Acquity I-class 超高效液相-VION 离子淌度四极杆-飞行时间质谱联用仪（美国 Waters 公司）；5417R 型低温高速离心机、恒温振荡器（德国 Eppendorf 公司）；G-560E 型涡旋仪（美国 BOHEMIA 公司）；SPD2010 型真空离心浓缩仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 样品储备液配制

取 G-6-P-DH、NADP、G-6-P、UDPGA、CHAPS 适量，并用 100 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）溶解，分别制备浓度为 100 mmol/L、75 mmol/L、50 U/mL、42 mmol/L、62.5 mmol/L 的储备液；取六水合氯化镁适量，用超纯水溶解后制备得到浓度为 833 mmol/L 的储备液；取对照品异甘草苷、甘草素、甘草酸、甘草次酸、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 CK、白术内酯 III 适量，以 70% 甲醇溶解制备得到混合储备液（ECS），其中甘草次酸浓度为 1 mmol/L、白术内酯 III 浓度为 2 mmol/L，其他化合物浓度均为 1.25 mmol/L。

2.2 I 相代谢孵育体系配制

向 1.5 mL 离心管中分别加入 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 190 μ L、HIM 或 HLM 储备液 20 μ L、NADP 储备液 5 μ L、G-6-P 储备液 10 μ L、六水合氯化镁储备液 3 μ L、供试品储备液 2 μ L, 将离心管放入恒温振荡器内 (37 $^{\circ}$ C、300 r/min) 预孵育 5 min, 再加入 G-6-P-DH 储备液 20 μ L, 形成 I 相反应体系共 250 μ L。以空白溶剂作为阴性对照。样品分别孵育 0、15、30、60、90、120 min。其中反应体积中有机相甲醇 (由供试品储备液引入) 的质量分数低于 1%。加入 1 mL 正丁醇 (水饱和) 并置于冰中终止反应, 再将样品涡旋 1 min 后, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 20 min; 吸取上清液在真空离心机中浓缩挥干, 以甲醇-水溶液 (70:30) 80 μ L 复溶, 复溶液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 7 μ L 进样分析。

2.3 II 相代谢孵育体系配制

向 1.5 mL 离心管中依次加入 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 165 μ L、HIM 或 HLM 储备液 20 μ L、NADP 储备液 5 μ L、G-6-P 储备液 10 μ L、氯化镁储备液 3 μ L、供试品储备液 2 μ L、G-6-P-DH 储备液 20 μ L, 形成 250 μ L 的 I 相反应体系从而启动 I 相代谢反应, 将其置于恒温振荡器中, 于 37 $^{\circ}$ C、300 r/min 振荡孵育 20 min。再加入 CHAPS 储备液 5 μ L, 置于恒温振荡器中 37 $^{\circ}$ C、300 r/min 振荡预孵育 10 min。最后加入 UDPGA 储备液 20 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C、300 r/min 振荡孵育 0、60、90、120 min。以空白溶剂作为阴性对照。其中反应体积中有机相甲醇 (由供试品储备液引入) 的质量分数低于 1%。加入 1 mL 正丁醇 (水饱和) 并置于冰中终止反应, 再将样品涡旋 1 min 后, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 20 min; 吸取上清液在真空离心机中浓缩挥干, 以甲醇-水溶液 (70:30) 80 μ L 复溶, 复溶液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 7 μ L 进样分析。

2.4 液质联用分析条件

2.4.1 色谱条件 Waters BEH C₁₈ UPLC 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 洗针液 90% 乙腈水溶液; 梯度洗脱: 0~3 min, 5%~20% B; 3~12 min, 20%~100% B; 12~19 min, 100%~95% B; 进样体积 7 μ L; 柱温 45 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.4 mL/min。

2.4.2 质谱条件 采用 MSE (低能量/高能量切换扫描) 的采集模式; 离子源为电喷雾正离子模式

(ESI⁺); 毛细管电压 2.0 kV; 锥孔电压 40 V; 雾化气温度 450 $^{\circ}$ C; 雾化气体流量 900 L/h; 锥孔反吹气体流量 50 L/h; 离子源温度 115 $^{\circ}$ C; 扫描范围 m/z 50~1500; 扫描速度 0.2 s; 采集间隔 0.5 s; 采集时间 0.5 s; 碰撞能量 6 eV。

2.5 数据处理及分析方法

采集的所有质谱信息利用 UNIFI 软件 (美国 Waters 公司) 进行数据处理, 通过文献以及 Chemspider 等数据库检索 ECS 中所有原型成分及可能存在的代谢产物, 建立 ECS 代谢产物库 (包含化合物名称、分子式、精确相对分子质量及化学结构), 将数据库导入 UNIFI 软件并与质谱信息比对。

将 ECS 中各化合物在肠、肝微粒体体系下孵育不同时间后的含量 (峰面积) 变化, 以不同时间点各化合物含量 (峰面积)/各化合物初始浓度即剩余底物浓度百分比对孵育时间作图, 得 I、II 相代谢消除曲线。

3 结果

3.1 ECS 在 HLM 体系中相对含量随时间的变化

ECS 储备液 (甘草次酸终浓度为 8 μ mol/L、白术内酯 III 终浓度为 16 μ mol/L, 其余化合物均为 10 μ mol/L) 经 HLM I、II 相体系孵育后, 空白对照、混合对照品以及不同孵育时间下 ECS 的总离子流见图 1。结果显示, 混合对照品中各单体化合物分离明显且分离度良好, 说明该色谱质谱条件较为合适, 可用于后续样品检测。

3.1.1 ECS 在 HLM I 相孵育体系下各成分相对含量的变化 ECS 中各化合物在肝微粒体下 I 相体系中孵育 120 min 的代谢消除曲线如图 2 所示。人参皂苷 Rb₁ 在 0~120 min 内含量持续下降, 终浓度仅为初始浓度的 15.99%, 提示其在肝中发生显著的 I 相代谢消除, 生成多种 I 相代谢产物^[6]; 而人参皂苷 CK 在孵育时间段内呈现出“降低-升高-降低”的变化趋势, 这提示可能存在人参皂苷 CK 作为中间代谢产物的复杂生物转化^[7]。人参皂苷 CK 孵育 90 min 后相较于 30 min, 相对含量增加了 2.33%, 推测人参皂苷 CK 可能由人参皂苷 Rb₁ 脱糖基转化而来。甘草酸在 0~120 min 内相对含量呈下降趋势, 且其在 0~30 min 内变化较快, 30 min 时相对含量相较于初始浓度减少 46.8%, 而后在 30~120 min 内含量变化幅度较小, 提示其进入肝脏后迅速发生 I 相代谢, 而甘草次酸在 30~60 min 内相对含量增加, 并在孵育 60 min 后相较于 30 min 含量增加 5.88%,

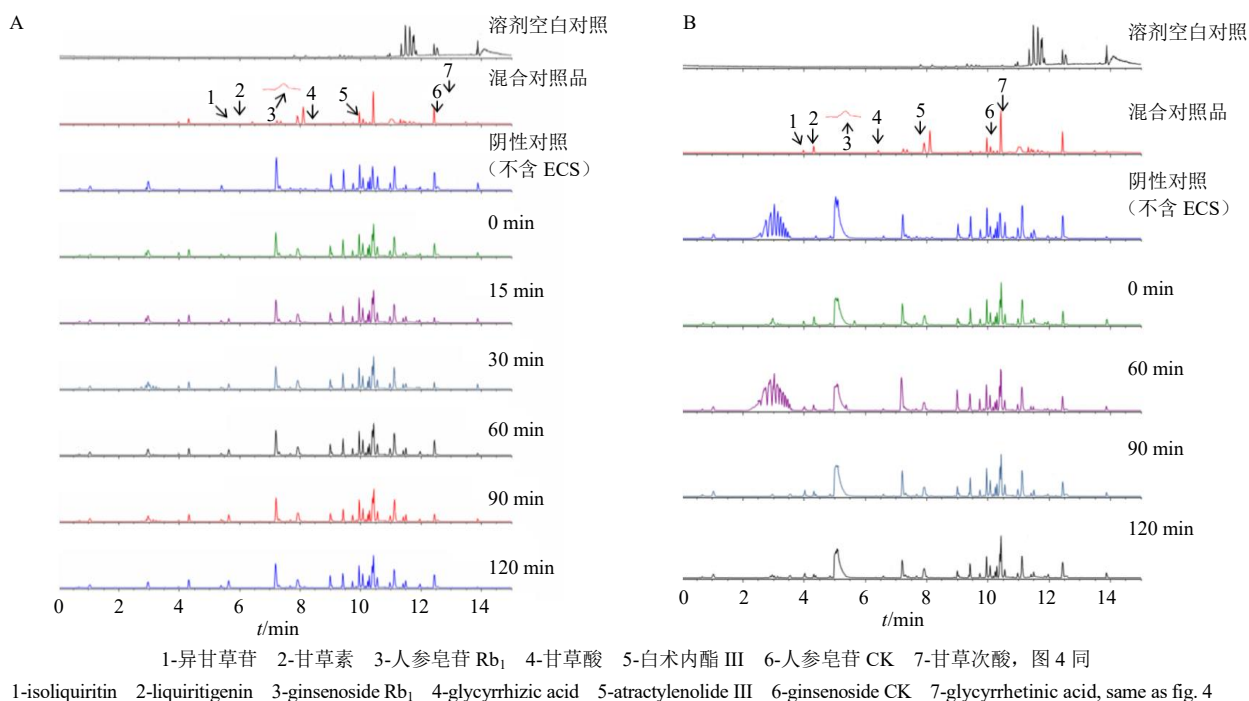


图 1 ECS 在 HLM I (A)、II (B) 相体系下经不同时间点孵育下总基峰色谱图

Fig. 1 Base peak ion chromatogram of ECS under incubation in HLM I (A) and II (B) phase system at different time points

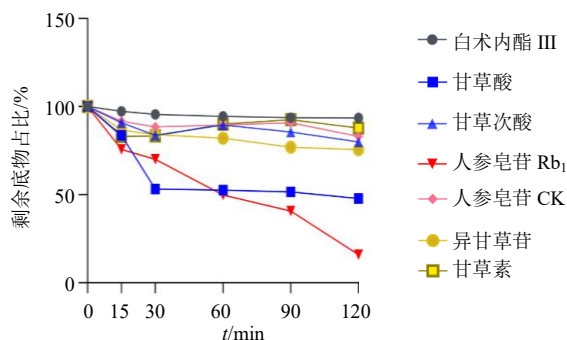


图 2 ECS 孵育后在 HLM 中的 I 相代谢消除曲线

Fig. 2 Phase I metabolic elimination curves of ECS in HLM after incubation

这可能源于甘草酸在 I 相体系中代谢生成。异甘草苷在 0~120 min 内表现出缓慢的下降趋势，而甘草素整体波动不大，但甘草素在 15~90 min 内相对含量略有上升，推测异甘草苷在 15~60 min 内可能水解、异构化后生成甘草素^[8]。

人参皂苷、甘草皂苷类成分在体内代谢率较大且发生初始反应时间较短，而甘草中的黄酮类成分代谢周期较长，其中皂苷类成分大部分需经代谢转化后再吸收入血发挥药效作用^[9]。

3.1.2 ECS 在 HLM II 相孵育体系下各成分相对含量的变化 ECS 中各化合物在肝微粒体 II 相体系下孵育后的代谢消除曲线如图 3 所示。人参皂苷 Rb₁

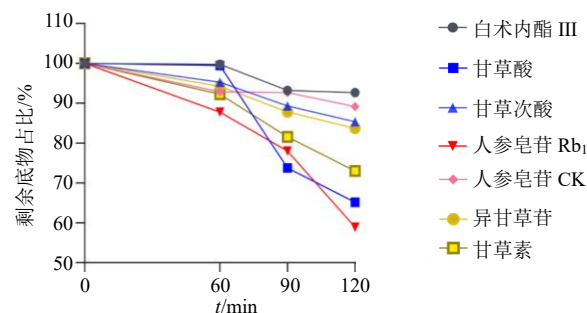


图 3 ECS 孵育后在 HLM 中的 II 相代谢消除曲线

Fig. 3 Phase II metabolic elimination curves of ECS in HLM after incubation

在 0~120 min 内相对含量明显减少，终浓度为初始浓度的 58.91%，提示其在肝中继续进行 II 相结合，而人参皂苷 CK 在 HLM II 相体系下含量变化较小，推测是因为人参皂苷 CK 作为次生代谢产物在体内直接被吸收利用，较少发生 II 相结合^[10]。甘草酸在 0~120 min 内相对含量持续降低；甘草酸在 0~120 min 也呈现出明显的下降趋势，尤其是在 60~120 min 内，其在孵育 120 min 后相对含量减少了 34.30%（相较于 60 min），提示甘草酸进入体内后先经 I 相代谢后进行 II 相结合；而甘草次酸在孵育全过程中代谢幅度不大，推测甘草次酸可能以 I 相代谢为主，或可能与其作为甘草酸的代谢产物有关。异甘草苷及甘草素的相对含量均呈现降低趋势，前者终浓度

为初始浓度的 83.73%，后者终浓度为初始浓度的 73.04%，提示甘草素可能较依赖 II 相代谢^[1]。

综上，ECS 中各化合物在 HLM I 相和 II 相孵育体系中的含量变化结果显示，甘草酸及甘草次酸在 I 相体系下代谢消除更为显著，尤其是甘草酸在 HLM I 相体系孵育 120 min 时剩余底物浓度为初始浓度的 47.87%，而其在 II 相体系相同时间剩余底物浓度为初始浓度的 65.19%。人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 CK 在 I 相和 II 相体系下表现出一定差异，孵育 120 min 后，人参皂苷 Rb₁ 在 I 相孵育下终浓度仅为初始浓度的 15.99% 而在 II 相体系下终浓度却为初始浓度的 58.91%，提示其可能较为依赖 I 相代谢。异甘草苷在 HLM I 相体系下消除更为明显，提示其作为黄酮苷主要以 I 相代谢为主；甘草素则在 HLM II 相体系下代谢更为显著，最大消除量出现在 120 min 时为 26.96%，而甘草素在 I 相体系下其最大消除量为 16.94%，提示甘草素在体内可能以 II 相

代谢为主^[1]。白术内酯 III 在 I 相及 II 相体系下含量变化幅度较小，提示其经口服进入体内绝大部分以原型吸收^[12]。提示四君子汤经肝脏代谢时，甘草皂苷、人参皂苷类成分可能以 I 相代谢为主，而甘草黄酮类成分以 II 相代谢为主。

3.2 ECS 在 HIM 体系中不同孵育时间点下相对含量的变化

将 ECS（甘草次酸终浓度为 8 μmol/L、白术内酯 III 终浓度为 16 μmol/L，其余化合物均为 10 μmol/L）储备液经肠微粒体 I、II 相代谢孵育后，空白对照、混合对照品以及待测样品在不同孵育时间下的总基峰色谱图见图 4。结果显示，混合对照品中各单体化合物分离明显且分离度良好，说明该色谱质谱条件较为合适，可用于后续样品检测。

3.2.1 ECS 在 HIM I 相孵育体系下各成分相对含量的变化 ECS 中各化合物在 HIM I 相体系中孵育 120 min 后的代谢消除曲线如图 5 所示。甘草酸在

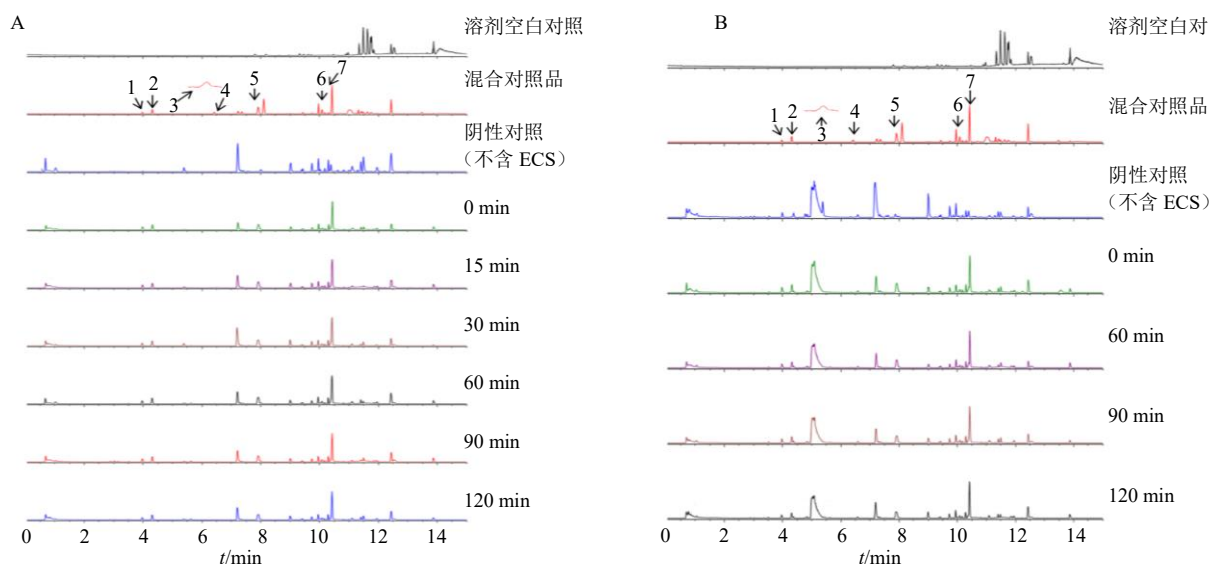


图 4 ECS 在 HIM I (A)、II (B) 相体系下经不同时间点孵育下总基峰色谱图

Fig. 4 Base peak ion chromatogram of ECS under incubation in HIM I (A) and II (B) phase system at different time points

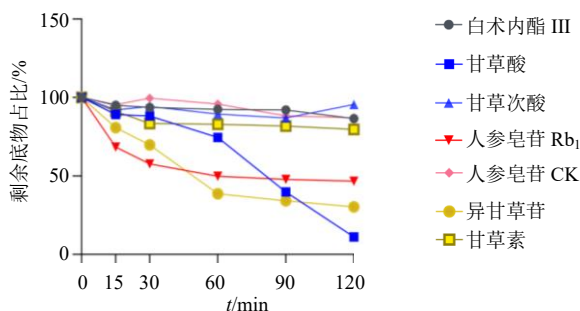


图 5 ECS 孵育后在 HIM 中的 I 相代谢消除曲线

Fig. 5 Phase I metabolic elimination curves of ECS in HIM after incubation

HIM I 相孵育 120 min 内相对含量持续下降，终浓度仅为初始浓度的 11.21%，而甘草次酸在孵育 90 min 后相对含量相较于初始浓度减少 13.04%，而在孵育 120 min 后其相对含量相较于 90 min 增加 8.59%，其微弱的变化可能与甘草酸水解生成甘草次酸有关。异甘草苷在 0~120 min 内的相对含量持续降低，至 120 min 时相对含量比初始浓度减少了 69.68%，说明其代谢周期较长，而在此过程中异甘草苷则生成多种代谢产物，这些代谢产物或许能够直接对机体产生相应的药效作用^[13-14]。而甘草素在

HIM I 相孵育体系中的整体代谢幅度较小(最大消除量为 20.37%)。就人参皂苷类成分而言,人参皂苷 Rb₁ 在孵育 30 min 后相对含量较其初始浓度减少了 42.27%,同时人参皂苷 CK 在孵育 30 min 后相对含量相较于 15 min 增加 4.15%,推测可能是因为人参皂苷 Rb₁ 在此时脱糖基生成人参皂苷 CK。上述结果表明,甘草皂苷类成分在肠微粒体中 I 相反应速度较快,而黄酮类成分代谢周期则相对较长。

3.2.2 ECS 在 HIM II 相孵育体系下各成分相对含量的变化 ECS 中各化合物经 HIM II 相体系孵育后的代谢消除曲线如图 6 所示。人参皂苷 Rb₁ 在孵育 120 min 时仅余初始浓度的 24.07%,说明其可能在肠道中继续发生 II 相代谢,而人参皂苷 CK 在 HIM II 相体系下变化不大,提示人参皂苷 CK 可能直接被机体吸收并发挥药效作用^[15]。异甘草苷孵育至 120 min 时仅余初始浓度的 25.55%,而甘草素的相对含量在孵育时间内持续降低至原始浓度的 39.32%,提示甘草素可能以 II 相代谢为主。甘草酸

在 0~120 min 内相对含量持续下降且其在 90~120 min 内下降速度更快,提示甘草酸在体内由 I 相至 II 相代谢;而甘草次酸在孵育 120 min 内含量变化不大,与其本身在体内吸收利用度较高相符^[16]。

比较 ECS 中各化合物在 HIM I 相和 II 相孵育体系中的代谢趋势,以揭示其不同代谢阶段中的代谢差异。结果显示,甘草酸在 I、II 相体系下均呈现持续下降趋势,但其在 I 相中的转变时间早于 II 相,推测其在体内可能由 I 相至 II 相代谢;而甘草次酸在体内能够直接被吸收利用,结果也表明它在 I、II 相中相对含量幅度波动较小。人参皂苷 Rb₁ 在 HIM II 相中相对含量呈现较为明显的变化,尤其孵育 60 min 后 Rb₁ 大量消除,提示其在肠道中以 II 相代谢转化为主;而人参皂苷 CK 在 HIM 体系下相对含量变化较小,据研究,人参皂苷 CK 能够直接对人体产生相应的药效作用^[17]。异甘草苷在 HIM I、II 相孵育体系下均表现出持续性的代谢消除(I 相 120 min 最大消除率为 69.68%,II 相 120 min 最大消除率为 74.45%);而甘草素则主要以 HIM 中的 II 相代谢消除为主(I 相中最大消除量为 20.37%,II 相为 60.68%)。综上,在 HIM 中甘草酸先进行 I 相代谢后再进行 II 相代谢而甘草次酸作为其 I 相产物,在体内能够被大量吸收利用并发挥药效作用。与之相反的是,人参皂苷 Rb₁、甘草素在 HIM II 相孵育下均表现出更为显著的消除趋势。

3.3 ECS 经 HIM、HLM 孵育后相对含量变化的比较

进一步分析 ECS 中各化合物在 HIM、HLM I、II 相体系下的代谢差异。如图 7 所示,ECS 经 HIM、HLM I 相孵育后,其组成成分中人参皂苷 Rb₁ 在

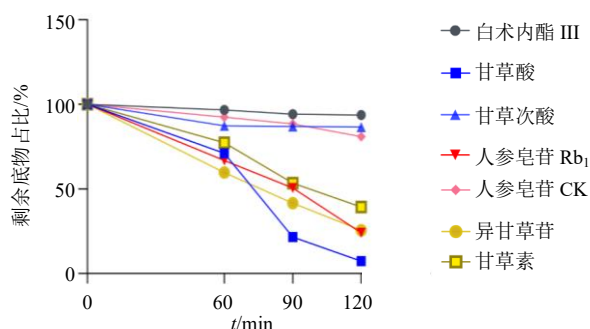


图 6 各化合物在 HIM 中的 II 相代谢消除曲线

Fig. 6 Phase II metabolic elimination curves of ECS in HIM after incubation

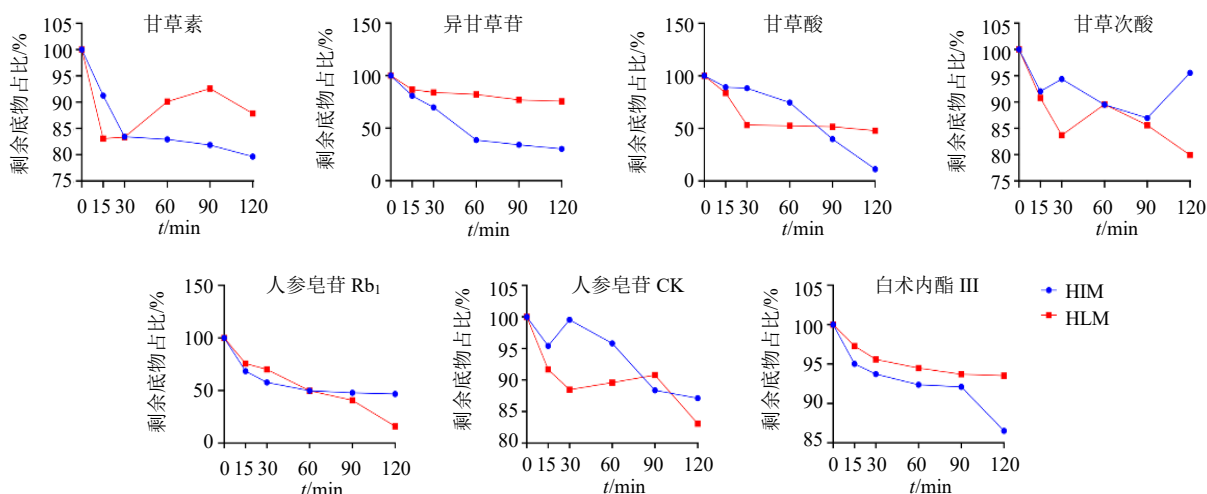


图 7 ECS 中各化合物在 HIM、HLM I 相体系下相对含量变化

Fig. 7 Relative content change of each compound in ECS in HIM and HLM after phase I incubation

HIM、HLM I 相体系下均于 0~30 min 内快速发生代谢消除 (30 min 相较于初始浓度分别减少了 42.27%、30.00%), 其后代谢趋为平缓; 而其代谢产物人参皂苷 CK 在 HIM、HLM I 相体系下变化有所不同, 它在 HIM 中 15~30 min 相对含量增加, 并在 HLM 中 30~90 min 呈现出相对含量增加的趋势, 提示人参皂苷 CK 经口服到达肠道后先在肠道发生 I 相代谢后经肠肝循环继续进入肝脏代谢^[18]。ECS 中的甘草酸在 HIM I 相体系下发生显著代谢, 而其在肝微粒体中 I 相代谢主要发生在 0~30 min, 表明其主要在肠道中发生相关代谢^[19]; 其水解产物甘草次酸在 HIM、HLM I 相体系中的变化却不显著。异甘草苷的相对含量在 HIM、HLM I 相体系下均呈降低趋势, 但它在 HIM 中的最大消除量 (初始浓度的 69.68%) 尤为显著, 说明它 I 相代谢时以肠道代谢为主; 而其代谢产物甘草素在肠、肝微粒体中仅发生少量代谢, 提示甘草素可能以 II 相代谢为主。

如图 8 所示, ECS 经 HIM、HLM II 相孵育后, 人参皂苷 Rb₁ 在 HIM 体系下相对含量变化更为显著, 120 min 时剩余底物浓度仅为初始浓度的 24.07%, 而其在 HLM 体系下终浓度为初始浓度的 58.91%, 提示其在肠道中更容易发生 II 相代谢; 而其代谢产物人参皂苷 CK 在 HIM、HLM II 相体系下波动不大。异甘草苷和甘草素在 HIM、HLM II 相体系下孵育 120 min 内均呈现持续性消除现象, 而二者均于 HIM 体系中代谢消除更为显著 (异甘草苷在 HLM、HIM 体系最大消除量均出现在 120 min, 分别为 16.27%、74.45%; 甘草素在 HLM、HIM 体系下最大消除量同样出现在 120 min 时, 分别为 26.96%、60.68%), 这与文献中异甘草苷及甘草素可能以肠微粒体中 II 相结合为主的结果一致^[20]。相较于 HLM 体系, 甘草酸在 HIM II 相体系下代谢更为显著。推测其经口服后大部分在肠道内发生代谢, 小部分入血后在肝脏中进行 II 相反应; 而甘草次酸变化幅度较小。

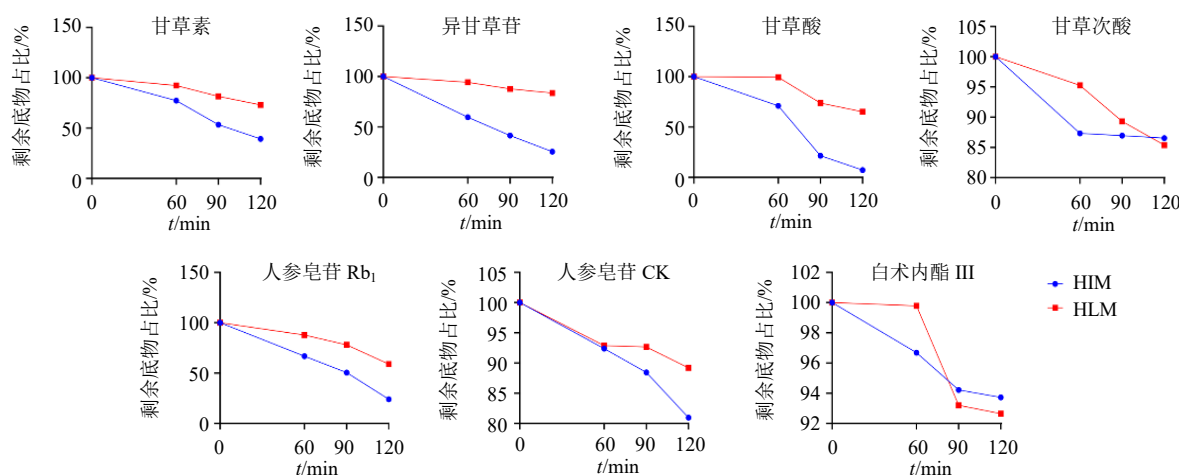


图 8 ECS 中各化合物在 HIM、HLM II 相体系下相对含量变化

Fig. 8 Relative content change of each compound in ECS in HIM and HLM after phase II incubation

综上, HIM、HLM I 相孵育体系下, 甘草酸、人参皂苷 Rb₁、异甘草苷均以肠道代谢为主; 而人参皂苷 CK、甘草次酸、甘草素在 I 相体系中代谢不明显。HIM、HLM II 相孵育体系下, 甘草皂苷、人参皂苷类、甘草黄酮类成分主要以 HIM 中 II 相代谢为主, 而白术内酯 III 在 HIM、HLM 中相对含量波动幅度较小。由此提示, 四君子汤经口服进入体内, 原型皂苷、黄酮类成分先经肠道代谢, 后经肝肠循环进入肝脏代谢; 极性大、相对分子质量小的内酯类成分可直接进入机体发挥作用; 而代谢产物受原型成分代谢转换的影响, 消除量低、消除时间

长, 提示它们可能是体内延长功效的主要活性物质。

3.4 ECS 中各化合物在 HIM、HLM 体系中的 I、II 相代谢产物及其代谢途径

ECS 分别经 HIM、HLM 孵育后, 共检测到 35 个原型及代谢产物, 其中分别在肠微粒体中检测到 30 个 (原型成分 7 个、代谢成分 23 个)、肝微粒体中检测到 32 个 (原型成分 7 个、代谢成分 25 个), 二者共有成分 27 个。I 相体系下主要发生氧化、脱氢、水解反应, II 相体系下发生葡萄糖醛酸结合, 与前人研究相符合^[21-23]。ECS 在 HIM、HLM I、II 相体系孵育下的代谢产物及碎片离子见表 1。

表 1 ECS 中各化合物在 HIM、HLM 体系内的代谢产物

Table 1 Identification of each compound in ECS in HLM and HIM incubation

原型化合物	编号	代谢阶段		<i>t_R</i> /min	代谢途径	分子式	分子离子峰 (<i>m/z</i>)	离子模式	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (<i>m/z</i>)
		HIM	HLM							
异甘草苷	M0		—	3.98	—	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.132 2	[M+H] ⁺	-3.365 6	419.132 2, 257.079 6, 137.023 0
		—					419.135 7	[M+H] ⁺	4.908 2	419.135 7, 257.081 7, 137.023 6
	M1		I	5.64	脱糖	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.081 0	[M+H] ⁺	0.479 5	257.081 0, 137.023 6
		I					257.081 8	[M+H] ⁺	3.698 6	257.081 8, 137.024 0
	M2		I	4.32	脱糖、异构化	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.080 8	[M+H] ⁺	0.708 4	257.080 8, 137.023 0, 117.033 2
		I					257.081 8	[M+H] ⁺	3.823 2	257.081 8, 137.023 6, 117.034 2
	M3		I	3.90	脱糖、氧化	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.075 2	[M+H] ⁺	-2.181 8	273.075 2, 247.132 2, 229.121 7, 153.069 8
		I					273.073 5	[M+H] ⁺	-8.072 8	273.073 5, 153.069 1
	M4		I	3.75	脱糖、氧化	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.074 6	[M+H] ⁺	-4.314 1	273.074 6, 229.141 3
		I					273.076 5	[M+H] ⁺	2.850 5	273.076 5, 224.126 8
	M5		I	4.04	脱糖、脱氢	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.064 5	[M+H] ⁺	-2.812 6	255.064 5, 145.028 3
		I					255.066 1	[M+H] ⁺	3.735 3	255.066 1, 145.028 6
	M6		II	3.33	葡萄糖醛酸化	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.165 8	[M+H] ⁺	-3.714 2	595.165 8, 481.257 4, 235.178 3
	M7		II	11.97	葡萄糖醛酸化、羟基化	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	628.184 4	[M+NH ₄] ⁺	-4.430 6	628.184 4, 310.305 0
		II					628.187 8	[M+NH ₄] ⁺	0.946 3	628.187 8, 310.306 7
	M8		II	3.54	脱糖、葡萄糖醛酸化	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.092 9	[M+Na] ⁺	-4.323 2	455.092 9, 257.079 6, 137.022 8
甘草素	M9		II	3.32	脱糖、葡萄糖醛酸化	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.110 8	[M+H] ⁺	-4.987 1	433.110 8, 257.079 6
	M0		—	4.32	—	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.081 0	[M+H] ⁺	0.708 4	257.081 0, 137.023 0, 117.033 2
		—					257.081 8	[M+H] ⁺	3.823 2	257.081 8, 137.023 6, 117.034 2
	M1		I	5.64	异构化	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.081 0	[M+H] ⁺	0.479 5	257.081 0, 137.023 6
		I					257.081 8	[M+H] ⁺	3.698 6	257.081 8, 137.024 0
	M2		I	3.90	氧化	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.075 2	[M+H] ⁺	-2.181 8	273.075 2, 153.069 8
		I					273.073 5	[M+H] ⁺	-8.072 8	273.073 5, 153.069 1
	M3		I	3.75	氧化	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.074 6	[M+H] ⁺	-4.314 1	273.074 6, 229.141 3
		I					273.076 5	[M+H] ⁺	2.850 5	273.076 5, 224.126 8
	M4		I	4.04	脱氢	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.064 5	[M+H] ⁺	-2.812 6	255.064 5, 145.028 3
		I					255.066 1	[M+H] ⁺	3.735 3	255.066 1, 145.028 6
	M5		II	3.54	葡萄糖醛酸化	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.092 9	[M+H] ⁺	-4.323 2	455.092 9, 257.079 6, 137.022 8
	M6		II	3.32	葡萄糖醛酸化	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.110 8	[M+H] ⁺	-4.987 1	433.110 8, 257.079 6
	M0		—	5.37	—	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 109.609 0	[M+H] ⁺	-1.352 0	1 109.609 0, 929.545 2, 605.440 5, 163.060 1
		—					1 109.613 1	[M+H] ⁺	2.278 9	1 109.613 1, 605.442 8, 163.060 8
人参皂苷 Rb ₁	M1		I	5.38	脱糖	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947.556 8	[M+H] ⁺	-0.641 6	947.556 8, 605.440 5, 407.366 5
		I					947.560 3	[M+H] ⁺	3.037 2	947.560 3, 605.442 8, 163.060 8
	M2		I	11.86	脱糖	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	802.533 5	[M+H] ⁺	2.936 7	802.533 5, 643.406 9, 283.263 0
		I					802.532 8	[M+H] ⁺	2.073 0	802.532 8, 643.394 4, 146.981 4
	M3		I	10.09	脱糖	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	623.454 0	[M+H] ⁺	3.770 8	623.454 0, 425.377 9, 163.059 8
		I					623.454 7	[M+H] ⁺	3.134 3	623.454 7, 425.378 5, 133.101 6
	M4		I	9.99	脱糖	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	461.400 1	[M+H] ⁺	2.633 7	461.400 1, 341.303 0, 247.043 7

续表 1

原型化合物	编号	代谢阶段		t_R/min	代谢途径	分子式	分子离子峰 (m/z)	离子模式	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
		HIM	HLM							
人参皂苷 CK	M0		—	10.09	—	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_8$	623.454 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.770 8	623.454 0, 425.377 9, 163.059 8
		—					623.454 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.134 3	623.454 7, 425.378 5, 133.101 6
	M1		I	9.99	脱糖	$\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_3$	461.400 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	2.633 7	461.400 1, 341.303 0, 247.043 7
白术内酯 III	M0		—	7.92	—	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	249.149 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	5.227 0	249.149 8, 231.139 3, 213.128 7
		—					249.149 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.003 4	249.149 5, 231.138 7, 213.128 4
	M1		I	7.91	脱水	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	231.139 3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	5.902 1	231.139 3, 203.144 7, 185.133 9
		I					231.139 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.545 4	231.139 0, 203.143 7, 185.133 5
	M2		I	3.91	氧化	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$	265.142 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-3.297 9	265.142 6, 247.135 3, 229.121 7, 201.127 1
		I					265.144 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	5.319 9	265.144 8, 247.134 0, 229.1233
	M3		I	4.77	氧化	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$	265.142 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-3.811 6	265.142 4, 247.135 2, 229.121 8
		I					265.143 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-1.339 3	265.143 1, 247.133 9, 229.121 7
	M4		I	4.55	氧化	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$	265.142 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-2.711 5	265.142 7, 247.135 4, 229.122 6
	M5		I	9.39	水解	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$	289.141 8	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	8.678 5	289.141 8, 253.273 4, 149.061 5
		I					289.142 2	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	2.855 4	289.142 2, 252.268 8, 149.060 2
	M6		I	2.90	水解、氧化	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6$	321.129 9	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	-7.191 4	321.129 9, 283.173 5, 158.095 8
		I					321.132 1	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	3.105 3	321.132 1, 237.134 1, 145.049 7
	M7*		I	7.17	水解、氧化	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$	283.153 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-3.535 6	283.153 0, 201.046 9
	M8		II	6.93	葡萄糖醛酸化	$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_9$	425.180 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-1.456 4	425.180 0, 281.187 0
甘草酸		II					425.180 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-0.912 6	425.180 2, 256.261 4
	M0		—	6.43	—	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	823.409 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-2.067 0	823.409 4, 453.333 7
		—					823.412 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	2.084 6	823.412 8, 453.338 4
	M1		I	10.42	脱糖	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	471.348 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.928 4	471.348 7, 317.212 1, 189.164 3
	M2		I	9.01	脱糖、氧化	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	487.343 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.293 9	487.343 9, 189.164 5
		I					487.343 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.563 5	487.343 5, 189.164 2
	M3		I	7.35	脱糖、氧化	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	487.344 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.411 6	487.344 0, 256.264 4
		I					487.344 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	5.574 3	487.344 5, 256.264 3
	M4		I	9.02	脱糖、脱氢	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$	469.333 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.010 4	469.333 1, 149.096 7
		I					469.333 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.006 0	469.333 1, 149.133 4
	M5		I	9.58	脱糖、脱氢、氧化	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$	485.327 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.037 5	485.327 6, 330.301 2, 284.295 7
		I					485.328 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.081 2	485.328 1, 330.301 7, 284.294 6
	M6		II	3.84	脱糖、葡萄糖醛酸化	$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{10}$	647.380 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	2.304 9	647.380 5, 472.248 3
		II					647.377 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-2.404 8	647.377 4, 472.243 5

续表 1

原型化合物	编号	代谢阶段		t_R/min	代谢途径	分子式	分子离子峰 (m/z)	离子模式	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
		HIM	HLM							
甘草次酸	M0	—	—	10.42	—	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	471.348 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.928 4	471.348 7, 317.212 1, 189.164 3
							471.348 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.260 7	471.348 9, 317.211 7, 189.164 4
	M1	I	I	9.01	氧化	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	487.343 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.293 9	487.343 9, 189.164 5
							487.343 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.563 5	487.343 5, 189.164 2
	M2	I	I	7.35	氧化	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	487.344 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.411 6	487.344 0, 256.264 4
							487.344 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	5.574 3	487.344 5, 256.264 3
	M3	I	I	9.02	脱氢	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$	469.333 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.010 4	469.333 1, 149.096 7
							469.333 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.006 0	469.333 1, 149.133 4
	M4	I	I	9.58	脱氢、氧化	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$	485.327 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.037 5	485.327 6, 330.301 2, 284.295 7
							485.328 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	4.081 2	485.328 1, 330.301 7, 284.294 6
	M5	II	II	3.84	葡萄糖醛酸化	$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{10}$	647.380 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	2.304 9	647.380 5, 472.248 3
							647.377 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	-2.404 8	647.377 4, 472.243 5

M0 为原型化合物, “—” 代表原型化合物未进入代谢阶段, 空格则代表未发现其进行 I/II 相阶段的代谢, * 代表此前未见报道的、新发现的代谢产物

M0 is a prototype compound, “—” means that the prototype compound has not entered the metabolic stage, blank space means that it has not been found to undergo I/II phase metabolism, and * means a newly discovered metabolite that has not been reported before

3.4.1 异甘草苷代谢产物鉴定 异甘草苷及甘草素经 HIM、HLM 体系孵育后, 其二者的代谢途径如图 9 所示。**M0** 的 t_R 为 3.98 min, 准分子离子峰为 m/z 419.133 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 与对照品比对后确定为异甘草苷。**M1**~**M5** 均为其 I 相代谢产物, 主要的代谢方式包括脱氢、羟基化等。**M6**~**M9** 则为其 II 相代谢产物, 主要进行了葡萄糖醛酸化结合反应。**M1** 的 t_R 为 5.64 min, 主要碎片离子包括 m/z 257.081 0、137.023 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 经文献对比后确定其为异甘草苷脱糖产物异甘草素^[24]。

M2 的 t_R 为 4.32 min, 由准分子离子峰 m/z 257.080 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$, 并根据甘草素对照品的 t_R 、准分子离子峰及主要碎片离子, 确认 **M2** 为甘草素。**M3** 的 t_R 为 3.90 min, 准分子离子峰为 m/z 273.075 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 主要碎片离子包括 m/z 273.075 2、247.132 2、229.121 7、153.069 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$; **M4** 的 t_R 为 3.75 min, 准分子离子峰为 m/z 273.074 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 主要碎片离子包括 m/z 273.074 6、229.141 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, **M3**、**M4** 相较于甘草素都增加了 16, 推测二者为 **M2** 的羟基化产物, 且 **M3** 中碎片离子 m/z

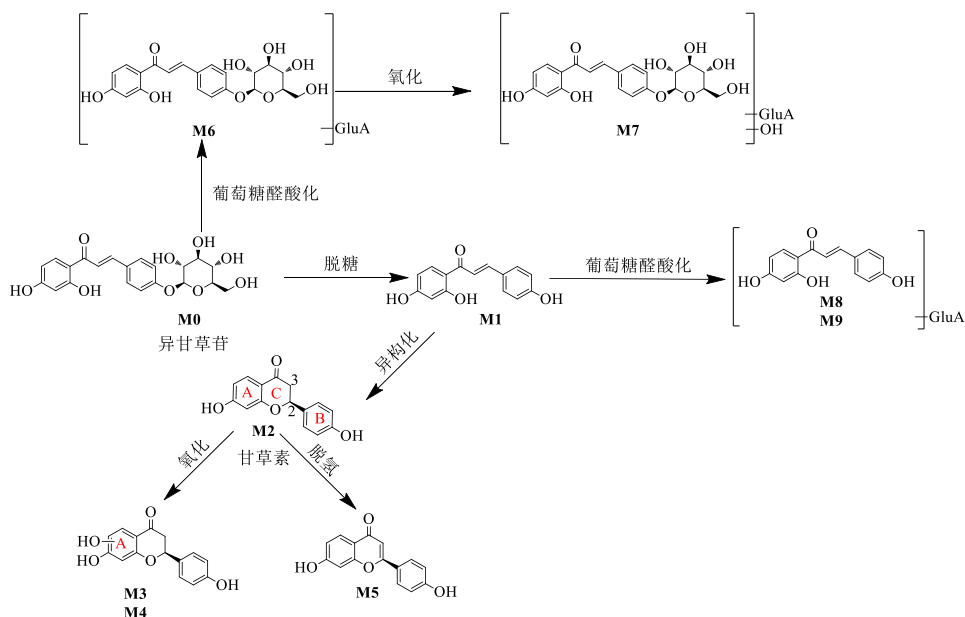


图 9 异甘草苷在 HIM、HLM 体系下可能的代谢途径

Fig. 9 Proposed metabolic profiles of isoliquiritin in HIM and HLM

153.069 8 $[M+H]^+$ 比甘草素 A 环特征碎片多 16, 提示其为 A 环羟基化产物。**M5** 的 t_R 为 4.04 min, 准分子离子峰 m/z 255.065 2 $[M+H]^+$ 确定其分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$, 结合文献报道^[8], 推测其可能在甘草素 C 环 2、3 位脱氢形成双键。**M6** 的 t_R 为 3.33 min, 准分子离子峰为 m/z 595.163 5 $[M+H]^+$, 比异甘草苷多 176, 推测其为异甘草苷葡萄糖醛酸产物, 且其仅在 HLM 体系中检测到。**M7** 的 t_R 为 11.97 min, 准分子离子峰为 m/z 628.184 4 $[M+NH_4]^+$, 比异甘草苷多 192 (包括加合离子 NH_4^+), 提示其在异甘草苷的结构基础上发生了葡萄糖醛酸化及羟基化反应。**M8**、**M9** 的 t_R 分别为 3.54、3.32 min, 准分子离子峰分别为 m/z 455.092 9 $[M+Na]^+$ 、433.112 9 $[M+H]^+$, 与甘草素 m/z 257.080 8 $[M+H]^+$ 对比后推测其进行了葡萄糖醛酸结合, 同时它们都具有特征性中性丢失 176 的离子 m/z 257.079 6 $[M+H]^+$, 推测 **M8**、**M9** 均为甘草素的葡萄糖醛酸结合产物, 且其只在 HIM 孵育体系中发现。

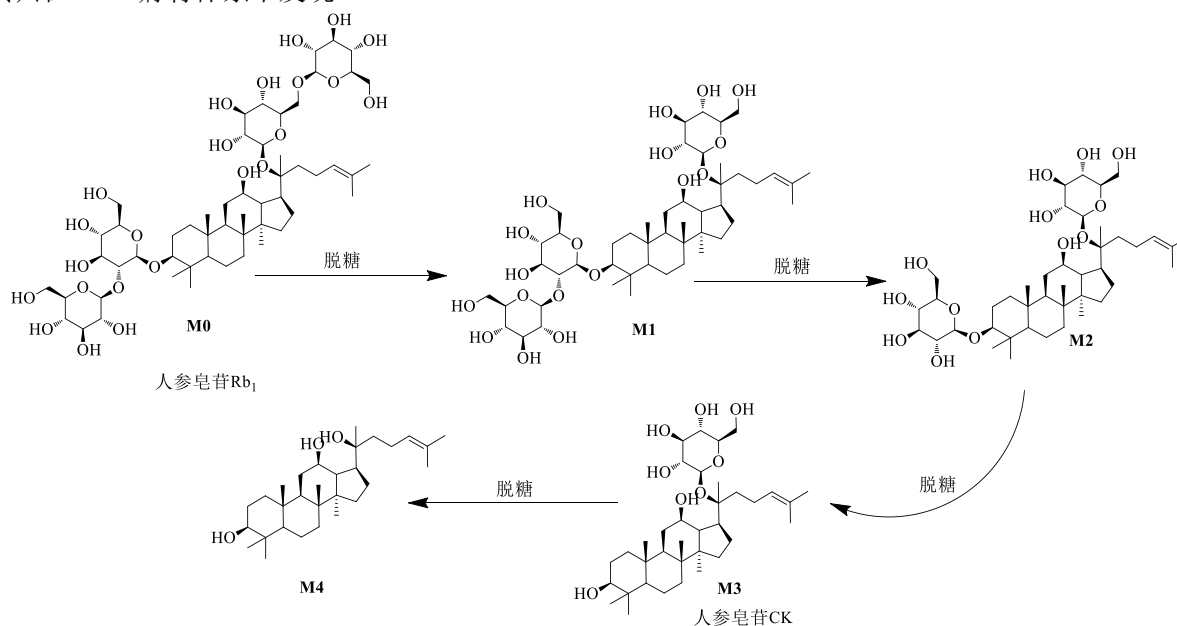


图 10 人参皂苷 Rb_1 在 HIM、HLM 体系下可能的代谢途径

Fig. 10 Proposed metabolic profiles of ginsenoside Rb_1 in HIM and HLM

3.4.3 甘草酸代谢产物鉴定 甘草酸以及甘草次酸经 HIM、HLM 体系孵育后, 二者的代谢途径如图 11 所示。**M0** 的 t_R 为 6.43 min, 准分子离子峰 m/z 823.409 4 $[M+H]^+$ 确定其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$, 与对照品比对后确定其为甘草酸。**M1** 的 t_R 为 10.42 min, 准分子离子峰 m/z 471.348 7 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{30}H_{46}O_4$, 与对照品比对后确定其为甘草次酸。**M2**、**M3** 的 t_R 分别为 9.01、7.35 min, 准分子离子

3.4.2 人参皂苷 Rb_1 代谢产物鉴定 人参皂苷 Rb_1 以及人参皂苷 CK 经 HIM、HLM 体系孵育后, 二者的代谢途径如图 10 所示。**M0** 的 t_R 为 5.37 min, 准分子离子峰 m/z 1109.611 6 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{54}H_{92}O_{23}$, 经对照品比对后确定其为人参皂苷 Rb_1 。**M1** 的 t_R 为 5.38 min, 准分子离子峰 m/z 947.556 8 $[M+H]^+$ 确定其分子式为 $C_{48}H_{82}O_{18}$, 其特征碎片离子 m/z 605.440 5 为其脱去 1 个糖基生成, 判断其可能为人参皂苷 Rd ^[25];**M2** 的 t_R 为 11.86 min, 准分子离子峰 m/z 802.533 5 $[M+H]^+$ 确定其分子式为 $C_{42}H_{72}O_{13}$, 碎片离子 m/z 643.406 9 为其丢失 GluA 片段, 与人参皂苷 F2 相符^[25]。**M3** 的 t_R 为 10.09 min, 准分子离子峰 m/z 623.454 0 $[M+H]^+$ 确定其分子式为 $C_{36}H_{62}O_8$, 与对照品对比后确定其为人参皂苷 CK^[18,25];**M4** 的 t_R 为 9.99 min, 准分子离子峰 m/z 461.400 1 $[M+H]^+$ 确定其分子式为 $C_{30}H_{52}O_3$, 据文献报道推测其为人参皂苷 Rb_1 阶段性脱糖的终产物 PPD^[25]。

峰分别为 m/z 487.343 9、487.344 0 $[M+H]^+$, 相比甘草次酸的相对分子质量多了 16, 据报道甘草次酸在体内代谢过程中极易发生羟基化反应^[24], 因此推测它们为甘草次酸羟基化产物。**M4** 的 t_R 为 9.02 min, 准分子离子峰 m/z 469.333 1 $[M+H]^+$, 相比 **M1** 减少 2, 可能为甘草次酸的脱氢产物;**M5** 的 t_R 为 9.58 min, 具有 m/z 485.327 6 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 比 **M4** 大 16, 推测其为甘草次酸发生脱氢、加

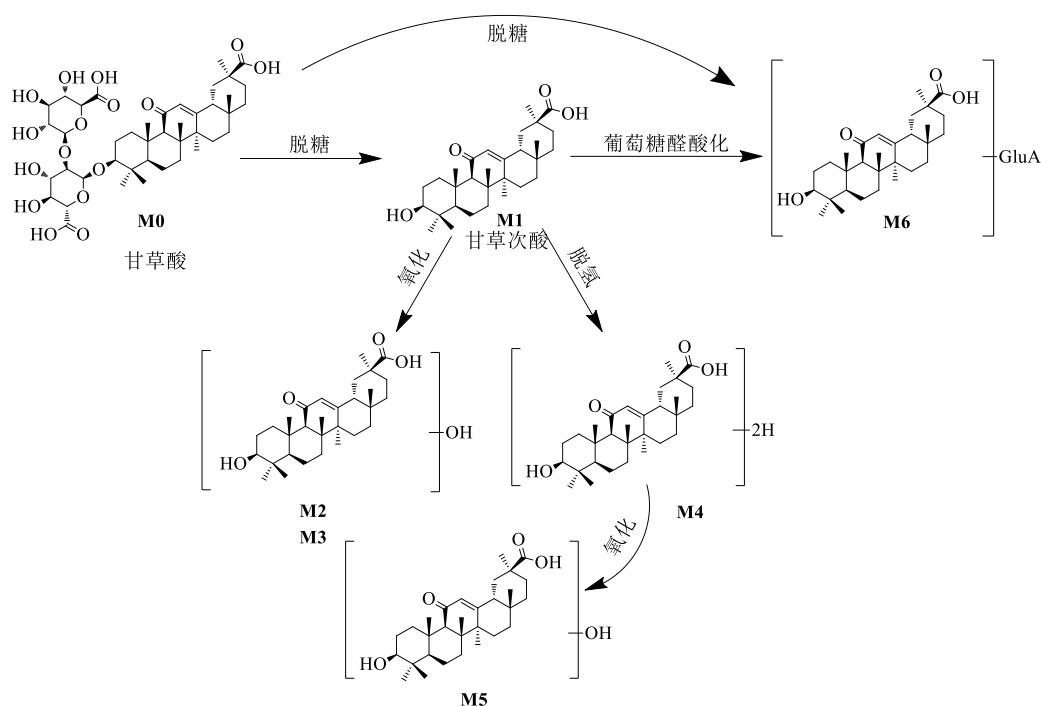


图 11 甘草酸在 HIM、HLM 体系下可能的代谢途径

Fig. 11 Proposed metabolic profiles of glycyrrhizic acid in HIM and HLM

氧后的产物；**M6** 的 t_R 为 3.84 min，准分子离子峰 m/z 647.380 5 $[M+H]^+$ ，比甘草次酸多 176，推测其可能为甘草次酸葡萄糖醛酸结合产物，或者为甘草酸脱去 1 分子葡萄糖醛酸基团所得。

3.4.4 白术内酯 III 代谢产物鉴定 白术内酯 III 在经 HIM、HLM 孵育后检测到 8 个代谢成分，其代谢途径如图 12 所示。**M0** 的 t_R 为 7.92 min，准分子离子峰 m/z 249.149 8 $[M+H]^+$ 确定其分子式为

$C_{15}H_{20}O_3$ ，与对照品比对后确定其为白术内酯 III。

M1 的 t_R 为 7.91 min，准分子离子峰 m/z 231.139 3 $[M+H]^+$ ，确定其分子式为 $C_{15}H_{18}O_2$ ，据文献可知其为白术内酯 III 脱水后的产物白术内酯 I^[26]。**M2**~**M4** 的 t_R 分别为 3.91、4.77、4.55 min，准分子离子峰分别为 m/z 265.142 6、265.142 4、265.142 7 $[M+H]^+$ ，均比白术内酯 III 的相对分子质量大 16；且 **M2**~**M4** 的主要碎片离子 m/z 265.142 6、247.135 3、

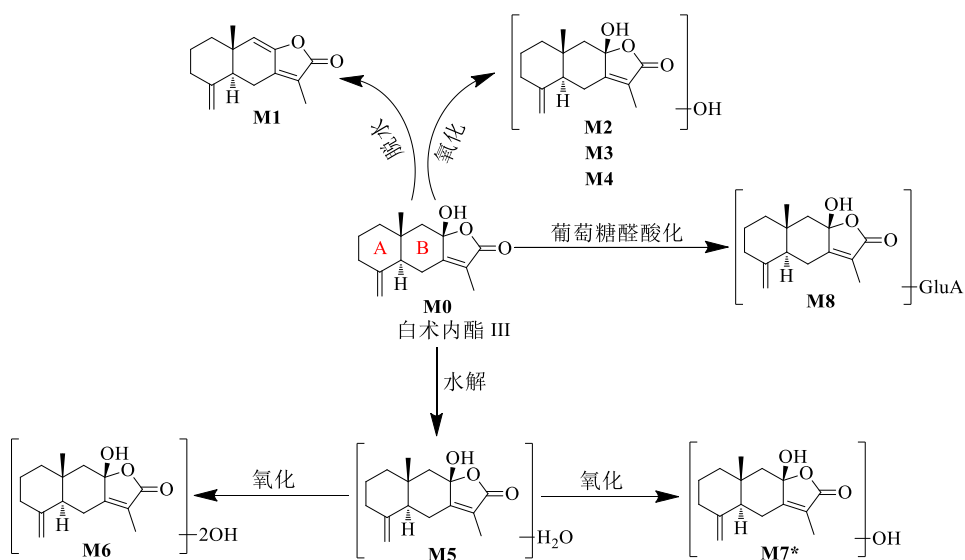


图 12 白术内酯 III 在 HIM、HLM 体系下可能的代谢途径

Fig. 12 Proposed metabolic profiles of atractylenolide III in HIM and HLM

229.121 7 $[M+H]^+$ 同样比 **M0** 特征碎片离子 m/z 249.149 8、231.138 7、213.128 7 $[M+H]^+$ 大 16。将 **M2**~**M4** 中的特征性碎片离子 m/z 247.135 3、229.121 7 $[M+H]^+$ 与 **M0** 的 A、B 环特征性离子进行对比后,发现其氧原子应该加成在白术内酯 **III** 的 A、B 环上^[26]。**M5** 的 t_R 为 9.39 min, 准分子离子峰 m/z 289.142 2 $[M+Na]^+$, 比 **M0** 多 40 (包括加合离子 Na^+), 推测其可能为 **M0** 的水解产物;**M6** 的 t_R 为 2.90 min, 具有 m/z 321.129 9 $[M+Na]^+$ 准分子离子峰, 比 **M0** 多 72 (包括加合离子 Na^+), 推测其可能为白术内酯 **III** 发生水解及二氧化后的产物。**M7** 的 t_R 为 7.17 min, 准分子离子峰 m/z 283.153 0 $[M+H]^+$, 相比 **M0** 增加 34, 推测为 **M0** 单氧化及水解后产物, 且其为白术内酯 **III** 新出现的代谢产物。它的碎片离子 m/z 201.046 9 $[M+H]^+$ 比 **M0** 的 A 环特征性离子 m/z 185 $[M+H]^+$ 大 16, 提示其在 A 环发生单氧化, 该化合物首次检测得到, 且仅在 HLM 体系中检测得到。**M8** 的保留时间为 6.93 min, 准分子离子峰 m/z 425.180 0 $[M+H]^+$, 比 **M0** 大 176, 推测其在 **M0** 上加成 1 个葡萄糖醛酸基团, 为其 II 相葡萄糖醛酸化产物。

4 讨论

中药以口服为主, 通过胃肠道处置后再经血液循环到达肝脏等器官进行代谢而发挥作用。在这个过程中, 80% 药物的代谢主要发生在肝脏或其他组织的内质网中; 滑面内质网中含有丰富的药物代谢酶, 如细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450s) 和葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphoglucuronosyl transferases, UGTs), 它们不仅存在于肝脏, 小肠也是其主要部位, 提示药物在进入肝脏代谢前可能首先经过肠道代谢。但目前关于四君子汤代谢的研究以动物模型为主, 这与人体代谢可能存在一定差异。本研究采用 HIM、HLM 孵育技术, 探究 ECS 在 HIM、HLM 中的代谢轮廓及二者间代谢差异, 发现 ECS 中甘草皂苷类成分主要进行肠 I 相代谢, 而人参皂苷类、甘草黄酮类成分则以肠 II 相代谢为主, 此外, 白术内酯类成分在肠、肝中代谢均不显著。

药物在体内代谢包括 I 相及 II 相 2 个阶段, I 相反应包括氧化、还原以及水解, II 相反应以结合为主。化合物在 I 相反应中暴露出极性基团、极性增强并在 II 相体系下与内源性物质结合并排出体外。研究表明甘草酸、人参皂苷 **Rb₁** 作为原型化合

物因相对分子质量较大, 口服进入胃肠道后难以被直接吸收利用, 生物利用度很低^[24-25], 大多倾向于在肠道内发生阶梯式脱糖反应^[27]; 而甘草次酸、人参皂苷 **CK** 作为它们的 I 相活性产物, 也是它们在体内重要吸收利用形式。同时有文献提出甘草素主要以 II 相葡萄糖醛酸结合为主^[11], 从而发挥抗炎等药理活性。本研究结果显示 ECS 在微粒体孵育体系下, 甘草皂苷可能以 I 相代谢为主, 且在肠道中代谢消除更为显著, 而甘草次酸作为其次级代谢产物在 I 相体系下相对含量变化不明显, 可能是因为它作为苷元经皂苷母核水解后生成, 极性增强, I 相反应减弱。此外, 白术内酯 **III** 在 HIM、HLM 体系下含量变化较小, 这可能是因为其能够直接被吸收并发挥改善神经细胞损伤等作用^[28]。研究表明, ECS 中各化学成分原型以及代谢产物对于肠道修复、神经保护均具有一定的作用。如人参皂苷 **Rb₁** 及其 I 相代谢产物人参皂苷 **CK** 能够通过改变肠道菌群的组成比例进而对肠道起到一定的保护作用^[29-30]; 也有报道提到甘草酸、甘草次酸 (甘草酸水解产物)、异甘草苷、白术内酯 **III** 对于减轻神经毒性、改善神经细胞损伤具有一定的作用^[13-14,31-33]。四君子汤亦被证实具有保护肠道、减少神经损伤作用^[34], 这更体现出 ECS 作为其功效组分的重要意义。由此推测, 四君子汤中的 ECS 经口服进入人体到达胃肠道后, 皂苷类成分包括人参皂苷 **Rb₁**、甘草酸均先在肠道内发生脱糖基反应, 后再吸收入血到达肝脏, 此二者分别与其代谢产物人参皂苷 **CK**、甘草次酸共同发挥抗炎、保护肠道等作用; 异甘草苷进入肠道后发生水解等反应, 生成相应代谢产物, 且其与代谢产物甘草素均能够对神经细胞损伤起到一定的修复作用。

另外, 本研究对 ECS 在 HIM、HLM 中的代谢轮廓也进行了分析。ECS 中化合物以脱氢、羟基化、氧化、水解、葡萄糖醛酸化为主^[26,35-36], 与实验结果相符。一直以来针对白术内酯 **III** 的报道较少, **M7** 为本研究新发现的 I 相代谢产物, 为白术内酯 **III** 发生单氧化及水解后生成, 且仅在 HLM 体系中检测发现, 这可能源于肝脏中含有大量 CYP450s 供其结合并发生相应代谢^[37], 其生理活性有待进一步研究。与此同时, 在甘草素的代谢过程中, 仅在 HIM 体系下发现了 2 种甘草素葡萄糖醛酸化产物, 提示甘草素经口服到达胃肠道后能够快速发生代谢, 且有研究发现, 相较于肝脏, 甘草素在肠道中更易产

生多种葡萄糖醛酸结合产物^[38]。此外,四君子汤中人参皂苷 Rb₁、甘草酸等糖苷类物质含量较高,且具有较强的修复肠道损伤等作用^[39-40],而苷元类成分虽在方剂中含量较低,却能够直接对机体发挥作用。本研究发现,上述糖苷类物质在肠道及肝脏中能够与苷元发生相应转化,使得体内苷元含量增加,进而起到保护肠道、改善神经损伤等作用,这体现了中药多成分的协同作用及建立功效组分群的意义,也潜在证明了 ECS 或许能够在很大程度上代表四君子汤非多糖物质的药效基础。

本研究为更好地阐明 ECS 在人体内的真实代谢过程,以 ECS 在 HIM、HLM 中的代谢过程为重要研究对象,阐明其代谢轮廓差异并预测其在人体内的代谢路径,为四君子汤非多糖功效组分的体内研究提供了切实可靠的证据,同时也推动了其治疗脾虚证的药效物质基础研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王瑞君. 白术和四君子汤复方活性多糖的筛选、结构表征及体外胃肠代谢研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
- [2] Gao B B, Wang R J, Peng Y, *et al.* Effects of a homogeneous polysaccharide from Sijunzi Decoction on human intestinal microbes and short chain fatty acids *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 465-473.
- [3] Guan Z B, Wang M, Cai Y, *et al.* Rapid characterization of the chemical constituents of Sijunzi Decoction by UHPLC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1086: 11-22.
- [4] Dong B J, Peng C S, Ma P, *et al.* An integrated strategy of MS-network-based offline 2DLC-QTOF-MS/MS coupled with UHPLC-QTRAP®-MS/MS for the characterization and quantification of the non-polysaccharides in Sijunzi Decoction [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(13): 3511-3527.
- [5] Dong B, Ma P, Chen X, *et al.* Drug-polysaccharide/herb interactions and compatibility rationality of Sijunzi Decoction based on comprehensive pharmacokinetic screening for multi-components in rats with spleen deficiency syndrome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115871.
- [6] Zhang X Y, Chen S, Duan F P, *et al.* Prebiotics enhance the biotransformation and bioavailability of ginsenosides in rats by modulating gut microbiota [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(2): 334-343.
- [7] Guo Y P, Shao L, Wang L, *et al.* Bioconversion variation of ginsenoside CK mediated by human gut microbiota from healthy volunteers and colorectal cancer patients [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 28.
- [8] 李元元, 江振作, 张蕾, 等. UPLC-Q-TOF/MS 法鉴定大鼠体内甘草素的代谢产物 [J]. 天津中医药, 2015, 32(12): 757-762.
- [9] 宋玮, 郑伟, 张洁, 等. 中药皂苷类成分的体内代谢研究进展 [J]. 药科学报, 2018, 53(10): 1609-1619.
- [10] Lee J Y, Choi H Y, Park C S, *et al.* Total saponin extract, ginsenoside Rb₁, and compound K alleviate peripheral and central neuropathic pain through estrogen receptors on rats [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(4): 2119-2132.
- [11] 樊慧蓉, 董世奇, 李全胜, 等. 甘草素在体外不同种属肝微粒体中的代谢差异研究 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 320-326.
- [12] 朱钊铭, 李汉成, 罗佳波. HPLC-MS 法同时测定白术内酯 I、II、III 及其在大鼠体内的药动学 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(6): 25-29.
- [13] Li Y J, Song W, Tong Y, *et al.* Isoliquiritin ameliorates depression by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis via miRNA-27a/SYK/NF-κB axis [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 1.
- [14] He Y F, Ci X Y, Xie Y, *et al.* Potential detoxification effect of active ingredients in liquorice by upregulating efflux transporter [J]. *Phytomedicine*, 2019, 56: 175-182.
- [15] Tang M S, Xie X, Yang Y Y, *et al.* Ginsenoside compound K-a potential drug for rheumatoid arthritis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105498.
- [16] Yan M, Guo L, Yang Y, *et al.* Glycyrrhetic acid protects α-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through regulating transporters, inflammation and apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 701240.
- [17] Zhang M M, Li Y X, Wang X Y. Recent studies on the pharmacological activities and structural modifications of compound-K [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2022, 22(22): 2847-2863.
- [18] Wang B, Dong J X, Xu J, *et al.* Ginsenoside CK inhibits obese insulin resistance by activating PPARγ to interfere with macrophage activation [J]. *Microb Pathog*, 2021, 157: 105002.
- [19] Akao T. Distribution of enzymes involved in the metabolism of glycyrrhizin in various organs of rat [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(10): 1036-1044.
- [20] Zhang L, Wang C X, Wu J, *et al.* Metabolic profiling of mice plasma, bile, urine and feces after oral administration of two licorice flavonones [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112892.

- [21] Seong S J, Kang W Y, Heo J K, *et al.* A comprehensive *in vivo* and *in vitro* assessment of the drug interaction potential of red ginseng [J]. *Clin Ther*, 2018, 40(8): 1322-1337.
- [22] Deng M, Chen H J, Long J Y, *et al.* Atractylenolides (I, II, and III): A review of their pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Arch Pharm Res*, 2021, 44(7): 633-654.
- [23] Negreira N, Erratico C, Kosjek T, *et al.* *In vitro* Phase I and Phase II metabolism of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP), methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(19): 5803-5816.
- [24] 郭一婷, 程瑶, 邵云云, 等. 芍药甘草汤主要成分在正常及多囊卵巢综合征大鼠尿液和粪便中的代谢产物分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 103-112.
- [25] Tan J S, Yeo C R, Popovich D G. Fermentation of protopanaxadiol type ginsenosides (PD) with probiotic *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(13): 5427-5437.
- [26] Jiang Z H, Peng C Y, Huang W P, *et al.* A high throughput three-step ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method to study metabolites of atractylenolide-III [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(2): 163-176.
- [27] Yang L, Zou H C, Gao Y C, *et al.* Insights into gastrointestinal microbiota-generated ginsenoside metabolites and their bioactivities [J]. *Drug Metab Rev*, 2020, 52(1): 125-138.
- [28] Zhao H, Ji Z H, Liu C, *et al.* Neuroprotection and mechanisms of atractylenolide III in preventing learning and memory impairment induced by chronic high-dose homocysteine administration in rats [J]. *Neuroscience*, 2015, 290: 485-491.
- [29] Yang X Y, Dong B J, An L J, *et al.* Ginsenoside Rb₁ ameliorates glycemic disorder in mice with high fat diet-induced obesity *via* regulating gut microbiota and amino acid metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 756491.
- [30] Chen H M, Shen J J, Li H F, *et al.* Ginsenoside Rb₁ exerts neuroprotective effects through regulation of *Lactobacillus helveticus* abundance and GABA_A receptor expression [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(1): 86-95.
- [31] Yang G Y, Li J, Cai Y L, *et al.* Glycyrrhizic acid alleviates 6-hydroxydopamine and corticosterone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through modulating autophagy [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(10): 1914-1926.
- [32] Du Y X, Luo M, Du Y H, *et al.* Liquiritigenin decreases $\alpha\beta$ levels and ameliorates cognitive decline by regulating microglia M1/M2 transformation in AD mice [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(2): 349-358.
- [33] Zhou K C, Chen J, Wu J Y, *et al.* Atractylenolide III ameliorates cerebral ischemic injury and neuroinflammation associated with inhibiting JAK2/STAT3/Drp1-dependent mitochondrial fission in microglia [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59: 152922.
- [34] 高蓓蓓, 彭颖, 李晓波. 四君子汤复方多糖肠道免疫调节作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 462-467.
- [35] Li X, Sun R, Liu R. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144: 210-226.
- [36] Li L, Chen X Y, Zhou J L, *et al.* *In vitro* studies on the oxidative metabolism of 20(S)-ginsenoside Rh₂ in human, monkey, dog, rat, and mouse liver microsomes, and human liver S9 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(10): 2041-2053.
- [37] Lim H, Jeon H, Hong S, *et al.* Catalytic approach to *in vivo* metabolism of atractylenolide III using biomimetic iron-porphyrin complexes [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(52): 33048-33054.
- [38] Zhang L, Zhao H Y, Liu Y, *et al.* Metabolic routes along digestive system of licorice: Multicomponent sequential metabolism method in rat [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(6): 902-912.
- [39] Zeeshan M, Atiq A, Ain Q U, *et al.* Evaluating the mucoprotective effects of glycyrrhizic acid-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis *via* suppression of inflammatory mediators and oxidative stress [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(5): 1539-1553.
- [40] 孟欢, 侯晓婷, 张华敏, 等. 中药天然产物治疗炎症性肠病的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3349-3369.

[责任编辑 李亚楠]