

体外共孵育法研究肠道菌群对苍术炒焦前后醇提取物及增量成分苍术苷 A 的代谢规律

曹皇亮^{1,2,3}, 刘春莲^{1,2,3}, 陈高源^{1,2,3}, 姚丁^{1,2,3}, 肖扬鑫^{1,2,3}, 刘艳菊^{1,2,3*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065
2. 湖北省中药炮制技术工程中心, 湖北 武汉 430065
3. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 明确生、焦苍术醇提取物在肠道菌群作用下成分的代谢差异, 以及关键增量成分苍术苷 A 的代谢转化规律。方法 采用体外共孵育方法, 将生苍术、焦苍术醇提取物以及炒焦增量成分苍术苷 A 与小鼠肠道菌群共孵育, 运用 UHPLC-LTQ-Qorbitrap 技术, 分析生苍术、焦苍术醇提取物共孵育后的转化情况, 并对苍术苷 A 的代谢产物进行鉴定分析。结果 生苍术、焦苍术醇提取物与小鼠肠道菌群共孵育后原型成分苍术苷 A、5-羟甲基糠醛、苍术素、白术内酰胺、2-(联苯基-4-基)乙醛、二乙酰苍术素醇、白术内酯 II、羟甲香豆素、乙酰苍术素醇、白术内酯 I、 β -石竹烯、3 β -乙酰氧基苍术酮、苍术酮 13 种成分峰面积均降低, 其中, 苍术素、二乙酰苍术素醇、羟甲香豆素、苍术酮 4 个成分在焦苍术中降低尤为明显; 3 β -乙酰氧基-白术内酯 I、 β -香根草烯、白术内酯 III、愈创木烯、芹烷二烯酮 5 个成分峰面积在生、焦苍术醇提取物与菌群共孵育后均增加, 其中, 3 β -乙酰氧基-白术内酯 I、愈创木烯、芹烷二烯酮在焦苍术中增加尤为明显; 苍术苷 A 经肠道菌群代谢转化产生了新成分, 根据数据分析, 推测出其中与其羟化、羰基化、乙酰化相关的 4 种代谢物。结论 肠道菌群对生苍术、焦苍术醇提取物成分有转化作用, 且对 2 种饮片成分代谢转化程度存在差异, 大多成分在焦苍术中转化(或生成)率更高, 这可能是焦苍术增强固肠止泻作用关键原因; 苍术苷 A 的代谢产物鉴定结果进一步验证了肠道菌群对成分影响的关键作用。

关键词: 苍术; 焦苍术; 苍术苷 A; 肠道菌群; 成分转化; 体外共孵育法; UHPLC-LTQ-Qorbitrap 技术; 苍术素; 二乙酰苍术素醇; 羟甲香豆素; 苍术酮; 3 β -乙酰氧基-白术内酯 I; β -香根草烯; 白术内酯 III; 愈创木烯; 芹烷二烯酮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2641-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.015

Metabolic regularity of intestinal flora on alcohol extracts of *Atractylodis Rhizoma* before and after stir-frying and incremental component atractyloside A by *in vitro* co-incubation method

CAO Huangliang^{1,2,3}, LIU Chunlian^{1,2,3}, CHEN Gaoyuan^{1,2,3}, YAO Ding^{1,2,3}, XIAO Yangxin^{1,2,3}, LIU Yanju^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China
2. Hubei Engineering Research Center of Chinese Material Medica Processing Technology, Wuhan 430065, China
3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To clarify the metabolic differences of ethanol extract of Cangzhu (*Atractylodis Rhizoma*) and ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* under the action of intestinal flora, as well as the metabolic transformation rules of the key component atractyloside A. **Methods** This study adopted further *in vitro* co-incubation method to co-incubate ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma*, ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma*, and atractyloside A, the incremental component of stir-coke, with mouse intestinal bacterial solution. UHPLC-LTQ-Orbitrap technology was used to analyze the transformation of ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma* and ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* after co-incubation and the metabolites of atractyloside A were identified and analyzed. **Results** The peak area of 13 components of atractyloside A, 5-hydroxymethylfurfural, atractylochin, atractylenolactam, 2-(biphenyl-4-yl)acetaldehyde, diacetyltractylochinol, atractylenolide II, hymecromone, acetyltractylochinol,

收稿日期: 2023-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074018); 湖北省中央引导地方发展项目(2020ZYD030)

作者简介: 曹皇亮, 硕士研究生, 研究方向为中药饮片炮制工艺、质量控制及原理。E-mail: 1160349122@qq.com

*通信作者: 刘艳菊, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药饮片炮制工艺、质量控制及原理。Tel: (027)68890101 E-mail: lyj1965954@sohu.com

atractylenolide I, β -caryophyllene, 3 β -acetoxyatractyloketone, atractyloides ketone were all decreased after co-breeding with the intestinal flora of mice. Atractylodin, diacetylactyloside alcohol, hymecromone, atractylon were particularly decreased in deep-fried *Atractylodis Rhizoma*. The peak area of 3 β -acetoxy-atractylenolide I, β -vetiverene, atractylenolide III, guaiene and 7(11)-dien-8-one increased after co-culture of ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma* and ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* with bacterial community, and the increase of 3 β -acetoxy-atractylenolide I, guaiene and selina-4(14),7(11)-dien-8-one was particularly obvious in deep-fried *Atractylodis Rhizoma*. Atractyloside A was metabolized by intestinal flora to produce new components. According to the data analysis, four metabolites related to hydroxylation, carbonylation and acetylation were deduced. **Conclusion** The intestinal flora had a transformation effect on ethanol extracts of *Atractylodis Rhizoma* and deep-fried *Atractylodis Rhizoma*, and there were differences in the metabolic transformation degree of two components, and most components had a higher transformation (or formation) rate in ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma*, which may be the key reason for the enhancement of intestinal strengthening and anti-diarrhea effect of ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma*. The metabolic product identification results of atractyloside A further verified the key role of intestinal flora in the influence of components.

Key words: *Atractylodis Rhizoma*; deep-fried *Atractylodis Rhizoma*; atractyloides A; gut microbiota; component transformation; *in vitro* co-incubation method; UHPLC-LTQ-Orbitrap technology; diatractylodin; diacetylactylosidinol; hymecromone; atractyloides ketone; 3 β -acetoxy-atractylenolide I; β -vetiverene; atractylenolide III; guaiene; selina-4(14),7(11)-dien-8-one

苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.或北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz.的干燥根茎,味辛、苦,性温,归脾、胃、肝经,是临床常用中药,具有燥湿健脾、祛风散寒、明目之功效^[1]。临床上常用苍术炮制品有麸炒苍术和焦苍术。苍术苷 A 为愈创木烷型倍半萜苷类化合物,课题组前期以茅苍术为对象,研究发现苍术炒焦前后化学成分的种类变化不明显,但部分成分含量差异显著,其中苍术苷 A 的含量增加 50%以上^[2-4]。苍术炒焦后固肠止泻作用增强,课题组已证明,肠道菌群在焦苍术增强药效作用上发挥了关键作用,焦苍术可调整模型动物肠道菌群结构和丰度,增加有益菌的丰度、降低有害菌的丰度,并影响肠道菌群的代谢物短链脂肪酸^[5],且苍术苷 A 具有与焦苍术类似作用^[6]。肠道菌群作为一个复杂的微生态系统,在保障和调节机体功能上发挥重要作用^[7-8]。大多数中药经口服给药后,其成分不可避免地与肠道菌群发生相互作用。研究表明,肠道菌群能产生各种代谢酶,特异性地参与中药有效成分的代谢与结构重塑,使中药有效成分表现出不同的药理与毒理活性^[9-10]。课题组前期研究表明,苍术炒焦后增量成分苍术苷 A 具有促进胃肠动力和保护胃黏膜,对抗消化道炎症的作用,但其口服生物利用度较低^[11-12]。因此推测苍术苷 A 可能在肠道菌群的作用下转变为易吸收的成分,从而发挥药物疗效。

基于上述研究基础,为进一步探讨肠道菌群对生、焦苍术成分转化的影响及其差异比较,初步阐明焦苍术发挥药效的物质基础,本实验采用体外共孵育法,运用 UHPLC-LTQ-Orbitrap 技术研究肠道

菌群对生、焦苍术醇提物及炮制增量成分苍术苷 A 转化的影响,并深入分析苍术苷 A 的代谢产物,以期从肠道菌群对成分影响角度,揭示苍术炒焦增强“固肠止泻”的物质基础。本研究结果为进一步深入研究苍术醇提物的体内菌群代谢以及苍术苷 A 的关键代谢菌种分析提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

THZ-98AB 型恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司; ES 225SM-MR 电子天平,瑞士 Precisa 公司; 1580R 型离心机,中国基因有限公司; Thermo U3000 液相色谱仪、Thermo Scientific LTQ-Orbitrap XL 组合式高分辨质谱仪,美国 Thermo Fisher 公司; Xcalibur 软件用于数据采集和处理。

1.2 药材与试剂

苍术药材采自湖北省英山县,经湖北中医药大学药学院杨红兵教授鉴定为菊科苍术属植物茅苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC.的干燥根茎。

苍术苷 A,批号 PS011500,购自成都普思生物科技有限公司,质量分数大于 98.0%,适用于 UPLC-LTQ-Orbitrap 分析。HPLC 级乙腈和甲醇,色谱纯,德国 Merck 公司; 甲酸,色谱纯,阿拉丁公司; 纯净水自制,艾柯实验室超纯水机,成都艾柯水处理设备有限公司; 通用厌氧培养液购自青岛海博生物技术有限公司。

1.3 动物

体质量 (20 \pm 2) g, 雄性 ICR 小鼠 10 只,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,许可证书: SCXK (辽) 2020-0001。动物研究按照湖北中医药

大学动物伦理委员会（中国武汉）批准的指导方针进行（批准代码：00273286，2021 年 12 月 10 日）。

2 方法与结果

2.1 肠道菌群对生苍术、焦苍术醇提物化学成分体外代谢转化研究

2.1.1 生苍术、焦苍术醇提物的制备

(1) 生苍术、焦苍术饮片的制备：按《中国药典》2020 年版制备生苍术饮片，按《湖北省中药饮片炮制规范》2018 年版制备焦苍术饮片。

(2) 生苍术、焦苍术醇提物的制备：取生苍术、焦苍术饮片，粉碎，过三号筛，分别用 8 倍量 80% 乙醇浸泡过夜，超声提取 3 次，每次 2 h，合并提取液并滤过，浓缩后冷冻干燥成冻干粉，置于 -20 °C 保存，备用^[5]。

2.1.2 厌氧培养基（GAM）的制备 称取厌氧培养粉 9.5 g，加热搅拌溶解于 1 000 mL 蒸馏水中，分装，121 °C 高压灭菌 15 min，备用^[13]。

2.1.3 小鼠肠道细菌混悬液的制备 收集 10 只正常 ICR 小鼠新鲜粪便混匀，称定质量并以每 g 小鼠新鲜粪便使用 4 mL 灭菌 PBS（含 0.01% 半胱氨酸）的比例进行匀浆，2 000 r/min 离心（离心半径 10 cm）10 min，获得上清液作为小鼠肠道菌群混合物。

2.1.4 共孵育样品的制备 取适量生、焦苍术提取液冻干粉，分别用厌氧培养基配制成质量浓度为 500 mg/mL 的生、焦苍术醇提物溶液，取 1 mL 接种到 9 mL 厌氧培养液中作为对照组，再取 1 mL 500 mg/mL 的生、焦苍术醇提物溶液分别接种到含有 1 mL 小鼠肠道菌群混悬液和 8 mL 厌氧培养液中作为实验组，平行操作 2 次。厌氧条件下于恒温振荡器 37 °C、150 r/min 孵育 72 h，然后向孵育的溶液中按 1:1 加入乙腈以终止反应，12 000 r/min 离心（离心半径 10 cm）10 min，上清液氮吹至干，残渣用 0.3 mL 甲醇溶解，于 UHPLC-LTQ-Orbitrap 分析。

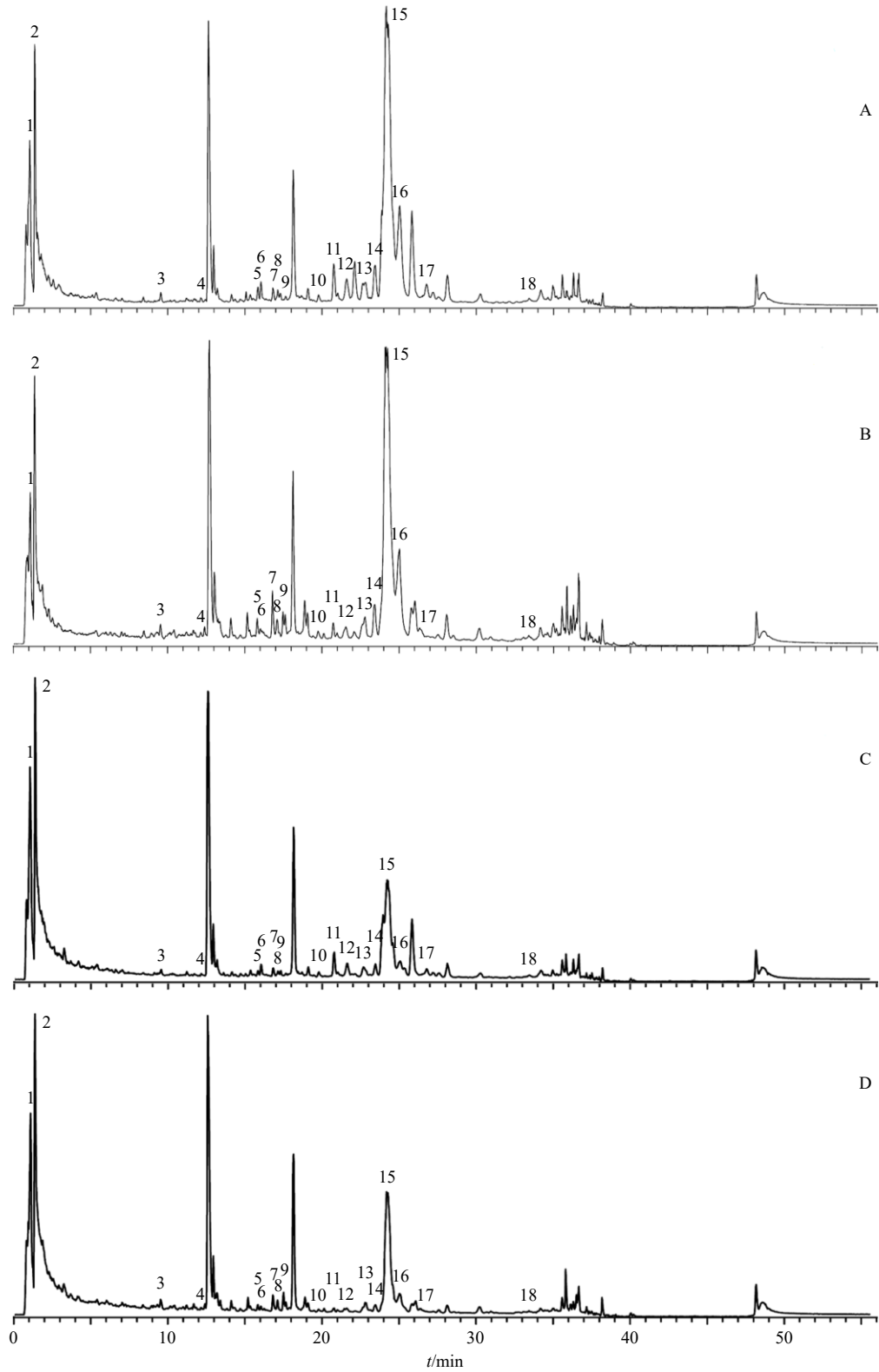
2.1.5 色谱与质谱条件

(1) 色谱条件：采用 Welch Xtimate® UHPLC C₁₈（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）色谱柱；采用含 0.1% 甲酸水溶液-乙腈流动相体系，梯度洗脱：0~15 min，20%~50% 乙腈；15~30 min，50%~60% 乙腈；30~35 min，60%~95% 乙腈；35~45 min，95% 乙腈；45~46 min，95%~20% 乙腈；46~56 min，20% 乙腈。体积流量为 0.3 mL/min；注射量 5 μL。

(2) 质谱条件：电喷雾离子源（ESI）正离子模式，鞘气（N₂）和辅助气（Ar）体积流量分别为 40

arb 和 10 arb；毛细管温度为 300 °C；离子源电压 2.5 kV，电流 100 μA；一级质谱采集范围 *m/z* 100~1 000，分辨率为 60 000。多级质谱采用高能碰撞诱导解离（HCD）模式，依赖一级质谱扫描中的第 1 到第 4 强峰，分辨率 *R* 设为 15 000；HCD 裂解能量为归一化能量 50%。

2.1.6 体外代谢转化分析结果 运用 UHPLC-LTQ-Orbitrap 技术，在正离子模式下分析苍术、焦苍术醇提物与小鼠肠道菌群共孵育后成分转化情况，图谱见图 1。根据 HMDB 数据库，结合与对照品比对，共鉴定了 18 个成分，计算在菌群条件下上述 18 种成分峰面积变化率，计算公式为成分变化率=(共孵育对照组成分峰面积-共孵育实验组成分峰面积)/对照组成分峰面积，结果见表 1、2。实验结果表明，苍术、焦苍术醇提物与小鼠肠道菌群共孵育后成分变化规律一致，苍术苷 A、苍术素等 13 个成分峰面积均降低，其中苍术苷 A、5-羟甲基糠醛、苍术素、白术内酰胺、2-(联苯基-4-基)乙醛、二乙酰苍术素醇、羟甲香豆素、乙酰苍术素醇、白术内酯 I、β-石竹烯、苍术酮 11 种成分，在焦苍术醇提物菌群共孵育组的峰面积下降率高于生苍术菌群共孵育组；而 3β-乙酰氧基-白术内酯 I、β 香根草烯、白术内酯 III、愈创木烯、芹烷二烯酮 5 个成分峰面积在生、焦苍术醇提物与菌群共孵育后均增加，其中 3β-乙酰氧基-白术内酯 I，愈创木烯和芹烷二烯酮在焦苍术醇提物与菌群共孵育组峰面积增加率高于生苍术菌群共孵育，可见生、焦苍术醇提物中同一成分共孵育后变化趋势一致，但变化率存在差异，对该差异进行比较，计算公式为 Δ 变化率=焦苍术共孵育实验组变化率-生苍术共孵育实验组变化率，结果见表 3。上述结果表明，生、焦苍术醇提物中的成分能够在肠道菌群作用下发生代谢转化。其中苍术苷 A、白术内酯 I、白术内酯 II、3β-乙酰氧基苍术酮 4 种共有成分均被转化而使成分峰面积显著降低，但它们在生、焦苍术 2 种醇提物中成分转化率相差较小，即 Δ 变化率均在 ±5% 以内；苍术素、二乙酰苍术素醇、羟甲香豆素、苍术酮等虽也是被转化而降低的成分，但它们在焦苍术中成分降低的更为明显，Δ 变化率在 15% 以上。同时，因转化生成而增加的成分中，3β-乙酰氧基-白术内酯 I、愈创木烯、芹烷二烯酮 3 种成分在焦苍术中增加的更为明显，而白术内酯 III 在生苍术中增加的更明显。综合分析认为，在复杂的物质环境下，肠道微生态对 2 种饮片中的物



A-生苍术对照组; B-生苍术实验组; C-焦苍术对照组; D-焦苍术实验组。

A-control group of ethanol extract of *Atractylodes Rhizoma*; B-experimental group of ethanol extract of *Atractylodes Rhizoma*; C-control group of alcoholic extract of deep-fried *Atractylodes Rhizoma*; D-experimental group of alcoholic extract of deep-fried *Atractylodes Rhizoma*.

图 1 生苍术、焦苍术醇提取物与肠道菌群共孵育的正离子模式总离子流 (TIC) 图

Fig. 1 Total ion current (TIC) plots of positive ion pattern of co-incubation of ethanol extract of *Atractylodes Rhizoma* and deep-fried *Atractylodes Rhizoma* with intestinal flora

表 1 生苍术醇提物与肠道菌群共孵育的 UPLC-LTQ/Orbitrap-MS/MS 定性分析结果

Table 1 Qualitative analysis of UPLC-LTQ/Orbitrap-MS/MS for co-incubation of ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma* with intestinal flora

| 峰号 | tr/ min | 分子式 | 理论值 (m/z) | 实测值 (m/z) | 误差 ($\times 10^{-6}$) | 二级碎片离子 (m/z) | 化合物归属 | 峰面积 | | 峰面积变 化率/% |
|----|------------|---|--------------|--------------|----------------------------|--|----------------|---------------|---------------|--------------|
| | | | | | | | | 对照组 | 实验组 | |
| 1 | 1.39 | C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀ | 447.224 5 | 447.227 1 | 5.813 6 | 285, 267, 249 | 苍术苷 A | 1 083 897 | 490 658 | 54.7 ↓ |
| 2 | 1.60 | C ₆ H ₆ O ₃ | 127.038 9 | 127.039 0 | 0.787 2 | 109, 81, 53 | 5-羟甲基糠醛 | 0 | 0 | - |
| 3 | 9.58 | C ₁₅ H ₂₄ O ₂ | 237.184 9 | 237.185 2 | 1.264 8 | 219, 201, 161, 149, 95, 81 | 3β-乙酰氧基-白术内酯 I | 70 078 999 | 95 565 866 | 36.4 ↑ |
| 4 | 12.15 | C ₁₅ H ₂₂ | 203.179 4 | 203.179 7 | 1.476 5 | 161, 147, 133, 119, 95 | β-香根草烯 | 43 466 664 | 45 195 594 | 3.9 ↑ |
| 5 | 15.86 | C ₁₅ H ₂₀ O ₃ | 249.148 5 | 249.148 9 | 1.605 5 | 232, 203, 189, 163, 105 | 白术内酯 III | 45 926 836 | 63 372 165 | 37.9 ↑ |
| 6 | 16.05 | C ₁₃ H ₁₀ O | 183.080 4 | 183.080 6 | 1.092 4 | 168, 165, 155, 141, 129, 115 | 苍术素 | 71 825 938 | 52 293 263 | 27.2 ↓ |
| 7 | 16.84 | C ₁₅ H ₁₉ NO | 230.153 9 | 230.154 1 | 0.869 0 | 215, 202, 185, 174, 160, 124 | 白术内酰胺 | 35 035 320 | 30 884 383 | 11.8 ↓ |
| 8 | 17.32 | C ₁₄ H ₁₂ O | 197.096 1 | 197.096 1 | 0.000 0 | 178, 167, 153, 141, 128, 115 | 2-(联苯基-4-基)乙醛 | 41 256 409 | 19 314 053 | 53.2 ↓ |
| 9 | 17.52 | C ₁₇ H ₂₀ O ₄ | 289.143 4 | 289.143 7 | 1.037 5 | 155, 117, 105 | 二乙酰苍术素醇 | 33 764 134 | 23 732 578 | 29.7 ↓ |
| 10 | 19.79 | C ₁₅ H ₂₀ O ₂ | 233.153 6 | 233.154 2 | 2.573 4 | 215, 205, 197, 187, 177, 159, 151, 145 | 白术内酯 II | 95 989 605 | 80 427 283 | 19.4 ↓ |
| 11 | 20.83 | C ₁₀ H ₈ O ₃ | 177.054 6 | 177.055 0 | 2.259 2 | 149, 145, 89 | 羟甲香豆素 | 130 332 740 | 61 716 572 | 52.6 ↓ |
| 12 | 21.65 | C ₁₅ H ₁₂ O ₃ | 241.085 9 | 241.085 9 | 0.000 0 | 233, 213, 199, 171, 143, 115 | 乙酰苍术素醇 | 88 036 171 | 34 992 270 | 60.3 ↓ |
| 13 | 22.84 | C ₁₅ H ₂₄ | 205.195 1 | 205.195 5 | 1.949 4 | 177, 163, 149 | 愈创木烯 | 6 002 960 098 | 6 902 069 788 | 14.9 ↑ |
| 14 | 23.51 | C ₁₅ H ₁₈ O ₂ | 231.138 0 | 231.138 1 | 0.432 6 | 213, 203, 189, 185, 175, 157, 105 | 白术内酯 I | 657 662 022 | 555 983 464 | 18.3 ↓ |
| 15 | 24.27 | C ₁₅ H ₂₄ | 205.195 1 | 205.195 5 | 1.949 4 | 163, 149, 135, 123, 109 | β-石竹烯 | 527 715 952 | 106 125 645 | 79.9 ↓ |
| 16 | 25.08 | C ₁₅ H ₂₂ O | 219.174 3 | 219.174 7 | 1.825 0 | 201, 191, 175, 159, 145, 123, 95 | 芹烷二烯酮 | 1 683 004 570 | 1 791 057 851 | 6.4 ↑ |
| 17 | 26.84 | C ₁₇ H ₂₂ O ₃ | 275.164 2 | 275.164 7 | 1.817 1 | 215, 197, 145, 119 | 3β-乙酰氧基苍术酮 | 180 865 415 | 13 027 602 | 92.8 ↓ |
| 18 | 33.67 | C ₁₅ H ₂₀ O | 217.158 7 | 217.158 4 | 1.381 5 | 199, 189, 171, 161, 143 | 苍术酮 | 3 756 324 | 661 691 | 82.4 ↓ |

“↑”表示实验组中成分峰面积增加；“↓”表示实验组中成分峰面积降低；表 2 同。

“↑” indicates an increase in peak area of components in experimental group; “↓” indicates a decrease in peak area of components in experimental group, same as table 2.

表 2 焦苍术醇提物与肠道菌群共孵育的 UPLC-LTQ/Orbitrap-MS/MS 定性分析结果

Table 2 Qualitative analysis of UPLC-LTQ/Orbitrap-MS/MS for co-incubation of ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* with intestinal flora

| 峰号 | tr/ min | 分子式 | 理论值 (m/z) | 实测值 (m/z) | 误差 ($\times 10^{-6}$) | 二级碎片离子 (m/z) | 化合物归属 | 峰面积 | | 峰面积变 化率/% |
|----|------------|---|--------------|--------------|----------------------------|--|----------------|---------------|---------------|--------------|
| | | | | | | | | 对照组 | 实验组 | |
| 1 | 1.39 | C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀ | 447.224 5 | 447.227 1 | 5.813 6 | 285, 267, 249 | 苍术苷 A | 775 042 | 337 752 | 56.4 ↓ |
| 2 | 1.60 | C ₆ H ₆ O ₃ | 127.038 9 | 127.039 0 | 0.787 2 | 109, 81, 53 | 5-羟甲基糠醛 | 28 631 133 | 24 948 229 | 12.9 ↓ |
| 3 | 9.58 | C ₁₅ H ₂₄ O ₂ | 237.184 9 | 237.185 2 | 1.264 8 | 219, 201, 161, 149, 95, 81 | 3β-乙酰氧基-白术内酯 I | 52 258 497 | 81 181 361 | 55.3 ↑ |
| 4 | 12.15 | C ₁₅ H ₂₂ | 203.179 4 | 203.179 7 | 1.476 5 | 161, 147, 133, 119, 95 | β-香根草烯 | 25 574 152 | 25 621 044 | 0.2 ↑ |
| 5 | 15.86 | C ₁₅ H ₂₀ O ₃ | 249.148 5 | 249.148 9 | 1.605 5 | 232, 203, 189, 163, 105 | 白术内酯 III | 21 677 660 | 24 551 001 | 13.3 ↑ |
| 6 | 16.05 | C ₁₃ H ₁₀ O | 183.080 4 | 183.080 6 | 1.092 4 | 168, 165, 155, 141, 129, 115 | 苍术素 | 56 777 942 | 22 235 346 | 60.8 ↓ |
| 7 | 16.84 | C ₁₅ H ₁₉ NO | 230.153 9 | 230.154 1 | 0.869 0 | 215, 202, 185, 174, 160, 124 | 白术内酰胺 | 19 180 682 | 13 559 547 | 29.3 ↓ |
| 8 | 17.32 | C ₁₄ H ₁₂ O | 197.096 1 | 197.096 1 | 0.000 0 | 178, 167, 153, 141, 128, 115 | 2-(联苯基-4-基)乙醛 | 32 242 823 | 6 046 677 | 81.2 ↓ |
| 9 | 17.52 | C ₁₇ H ₂₀ O ₄ | 289.143 4 | 289.143 7 | 1.037 5 | 155, 117, 105 | 二乙酰苍术素醇 | 21 917 999 | 9 433 806 | 56.9 ↓ |
| 10 | 19.79 | C ₁₅ H ₂₀ O ₂ | 233.153 6 | 233.154 2 | 2.573 4 | 215, 205, 197, 187, 177, 159, 151, 145 | 白术内酯 II | 53 864 547 | 43 522 542 | 19.2 ↓ |
| 11 | 20.83 | C ₁₀ H ₈ O ₃ | 177.054 6 | 177.055 0 | 2.259 2 | 149, 145, 89 | 羟甲香豆素 | 86 600 958 | 15 223 736 | 82.4 ↓ |
| 12 | 21.65 | C ₁₅ H ₁₂ O ₃ | 241.085 9 | 241.085 9 | 0.000 0 | 233, 213, 199, 171, 143, 115 | 乙酰苍术素醇 | 66 649 063 | 11 907 235 | 82.1 ↓ |
| 13 | 22.84 | C ₁₅ H ₂₄ | 205.195 1 | 205.195 5 | 1.949 4 | 177, 163, 149 | 愈创木烯 | 2 169 966 550 | 2 976 452 911 | 37.2 ↑ |
| 14 | 23.51 | C ₁₅ H ₁₈ O ₂ | 231.138 0 | 231.138 1 | 0.432 6 | 213, 203, 189, 185, 175, 157, 105 | 白术内酯 I | 237 405 703 | 186 185 426 | 21.6 ↓ |
| 15 | 24.27 | C ₁₅ H ₂₄ | 205.195 1 | 205.195 5 | 1.949 4 | 163, 149, 135, 123, 109 | β-石竹烯 | 29 836 332 | 2 697 970 | 90.9 ↓ |
| 16 | 25.08 | C ₁₅ H ₂₂ O | 219.174 3 | 219.174 7 | 1.825 0 | 201, 191, 175, 159, 145, 123, 95 | 芹烷二烯酮 | 319 419 673 | 419 583 697 | 31.4 ↑ |
| 17 | 26.84 | C ₁₇ H ₂₂ O ₃ | 275.164 2 | 275.164 7 | 1.817 1 | 215, 197, 145, 119 | 3β-乙酰氧基苍术酮 | 115 068 990 | 9 831 518 | 91.5 ↓ |
| 18 | 33.67 | C ₁₅ H ₂₀ O | 217.158 7 | 217.158 4 | 1.381 5 | 199, 189, 171, 161, 143 | 苍术酮 | 1 760 579 | 0 | 100.0 ↓ |

表 3 生苍术醇提物和焦苍术醇提物与肠道菌群共孵育的峰面积变化率比较

Table 3 Comparison of change rate of peak area between ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma* and ethanol extract of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* co-incubated with intestinal flora

| 峰号 | <i>t_R</i> /min | 化合物归属 | 峰面积变化率/% | | 成分变化趋势 | Δ 变化率/% |
|----|---------------------------|----------------|----------|--------|--------|---------|
| | | | 生苍术醇提物 | 焦苍术醇提物 | | |
| 1 | 1.39 | 苍术苷 A | 54.7 | 56.4 | ↓ | +1.7 |
| 2 | 1.60 | 5-羟甲基糠醛 | — | 12.9 | ↓ | +12.9 |
| 3 | 9.58 | 3β-乙酰氧基-白术内酯 I | 36.4 | 55.3 | ↑ | +18.9 |
| 4 | 12.15 | β-香根草烯 | 3.9 | 0.2 | ↑ | -3.7 |
| 5 | 15.86 | 白术内酯 III | 37.9 | 13.3 | ↑ | -24.6 |
| 6 | 16.05 | 苍术素 | 27.2 | 60.8 | ↓ | +33.6 |
| 7 | 16.84 | 白术内酰胺 | 11.8 | 29.3 | ↓ | +17.5 |
| 8 | 17.32 | 2-(联苯基-4-基)乙醛 | 53.2 | 81.2 | ↓ | +28.0 |
| 9 | 17.52 | 二乙酰苍术素醇 | 29.7 | 56.9 | ↓ | +27.2 |
| 10 | 19.79 | 白术内酯 II | 19.4 | 19.2 | ↓ | -0.2 |
| 11 | 20.83 | 羟甲香豆素 | 52.6 | 82.4 | ↓ | +29.8 |
| 12 | 21.65 | 乙酰苍术素醇 | 60.3 | 82.1 | ↓ | +21.8 |
| 13 | 22.84 | 愈创木烯 | 14.9 | 37.2 | ↑ | +22.3 |
| 14 | 23.51 | 白术内酯 I | 18.3 | 21.6 | ↓ | +3.3 |
| 15 | 24.27 | β-石竹烯 | 79.9 | 90.9 | ↓ | +11.0 |
| 16 | 25.08 | 芹烷二烯酮 | 6.4 | 31.4 | ↑ | +25.0 |
| 17 | 26.84 | 3β-乙酰氧基苍术酮 | 92.8 | 91.5 | ↓ | -1.3 |
| 18 | 33.67 | 苍术酮 | 82.4 | 100.0 | ↓ | +17.6 |

“↑”表示共孵育后该成分增加，“↓”表示共孵育后该成分降低；“+”表示焦苍术变化率高于生苍术，“-”表示焦苍术变化率低于生苍术。
 “↑” indicates that the component increases after co-incubation, and “↓” indicates that the component decreases after co-incubation; “+” means that the change rate of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* is higher than that of *Atractylodis Rhizoma*, and “-” means that the change rate of deep-fried *Atractylodis Rhizoma* is lower than that of *Atractylodis Rhizoma*.

质转化趋势一致，较多成分表现出在焦苍术中更有利于被转化或被生成。

2.2 肠道菌群对苍术苷 A 的体外代谢转化研究

2.2.1 厌氧培养基和肠道细菌混悬液的制备 按“2.1.2”和“2.1.3”项的方法制备厌氧培养基及小鼠肠道细菌混悬液。

2.2.2 样品制备 精密称取苍术苷 A 适量，溶解在纯水中，制备成质量浓度为 1 mg/mL 的苍术苷 A 溶液^[14]。将 1 mL 苍术苷 A 溶液接种到 1 mL 厌氧培养基中作为对照组，再将 1 mL 苍术苷 A 溶液接种到含有 0.2 mL 小鼠肠道菌群混悬液和 0.8 mL 厌氧培养基中作为实验组。将对照组和实验组样品于厌氧环境下 37 °C 培养 72 h。经过孵育后，向培养的溶液中加入 1 : 1 乙腈以终止反应。12 000 r/min 离心（离心半径 10 cm）10 min，上清液氮吹至干，残渣用 0.3 mL 甲醇溶解，进样分析。

2.2.3 色谱与质谱条件 同“2.1.5”项。

2.2.4 代谢产物的鉴定 采用所建立的 UPLC-LTQ-Orbitrap 方法对苍术苷 A 及其代谢产物进行检

测分析，苍术苷 A 与肠道菌群共孵育对照及实验组 TIC 图见图 2。由苍术苷 A 与肠道菌群共孵育前后 TIC 图可见，苍术苷 A 经肠道菌群代谢转化产生了新的成分，从峰面积看，与对照组比较，菌群共孵育组苍术苷 A 转化率为 99.5%，同时出现许多新增峰。苍术苷 A 为愈创木烷型倍半萜糖苷类化合物，倍半萜糖苷类化合物生物转化途径主要为脱葡萄糖、

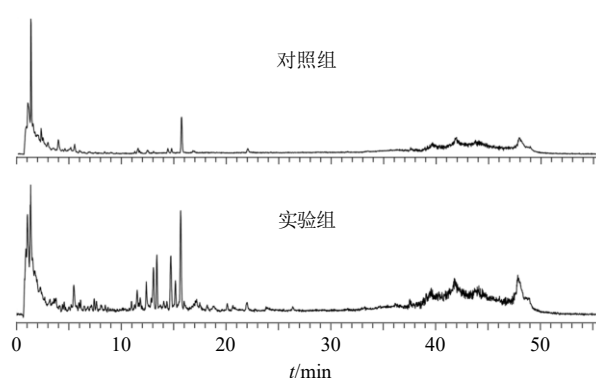


图 2 苍术苷 A 与菌共孵育前后 TIC 图

Fig. 2 TIC of atractylodide A before and after incubation with bacterial co-culture

氧化, 倍半萜的生物转化主要有羟化、羰基化、乙酰化等^[15-16], 经提取离子流图, 结合倍半萜主要转化途径, 推测出 4 种苍术苷 A (a) 可能的代谢产物 (b~e), 苍术苷 A 与代谢产物转化关系见图 3, 苍术苷 A 及其代谢产物鉴定结果见表 4, 苍术苷 A 与代谢产物的提取离子流图见图 4~8, 根据峰面积计算在菌群条件下苍术苷 A 成分变化率, 计算公式为峰面积变化率=(对照组苍术苷 A 峰面积-实验组苍术苷 A 峰面积)/对照组苍术苷 A 峰面积。

通过分析苍术苷 A 对照品的实验数据, 首先对供试品苍术苷 A (a) 进行了鉴定。苍术苷 A 在 m/z

447.223 9 ($C_{21}H_{36}O_{10}$, 质量偏差= 3.13×10^{-6}) 具有 $[M-H]^-$ 离子, 保留时间为 1.30 min, 主要碎片离子为 m/z 285.173 7、267.163 2、101.025 8、89.025 7、59.014 9, 苍术苷 A 提取离子流图及二级质谱图见图 4。

代谢产物 b, 保留时间和母离子分别为 1.98 min 和 m/z 285.173 7。通过从苍术苷 A 脱去 1 分子葡萄糖 (m/z 162) 得到 m/z 285.173 7, 进一步分子内脱水产生 m/z 267.163 5 的碎片离子, 代谢产物 b 提取离子流图及二级质谱图见图 5。

代谢产物 c 的保留时间和母离子分别为 4.95 min

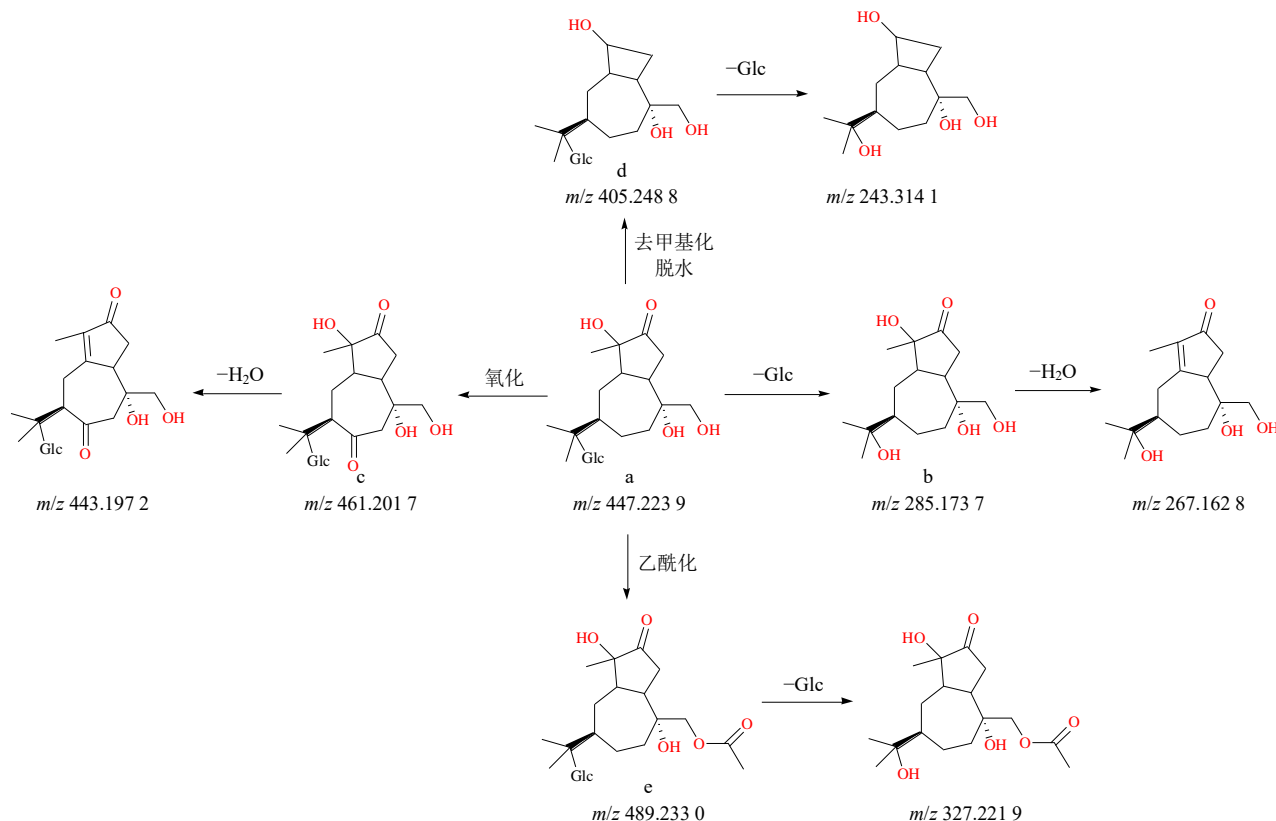


图 3 苍术苷 A 与代谢产物转化关系推导

Fig. 3 Derivation of relationship between atractyloside A and metabolite conversion

表 4 小鼠肠道菌群对苍术苷 A 代谢产物鉴定结果

Table 4 Identification of metabolites of atractyloside A by intestinal flora of mice

| 序号 | t_R / min | 分子式 | $[M-H]^-$ | | MS ² 碎片 (m/z) | 峰面积 | | 峰面积变 化率/% |
|----|----------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------------------|------------|------------|--------------|
| | | | 理论值 | 实测值 | | 对照组 | 实验组 | |
| a | 1.30 | $C_{21}H_{36}O_{10}$ | 447.222 4 | 447.223 9 | 285, 267 | 26 791 428 | 133 480 | 99.5 ↓ |
| b | 1.98 | $C_{15}H_{26}O_5$ | 285.169 7 | 285.173 7 | 267 | — | 3 515 524 | ∞ ↑ |
| c | 4.95 | $C_{21}H_{34}O_{11}$ | 461.208 8 | 461.201 7 | 443 | 502 292 | 521 293 | 3.7 ↑ |
| d | 13.08 | $C_{19}H_{34}O_9$ | 405.211 9 | 405.248 8 | 243 | 124 689 | 1 441 919 | 1 056.0 ↑ |
| e | 14.74 | $C_{23}H_{38}O_{11}$ | 489.233 0 | 489.328 0 | 327 | — | 28 211 483 | ∞ ↑ |

“—”表示未检出, “↑”表示共孵育后该成分增加, “↓”表示共孵育后该成分降低。

“—” indicates that the component is not detected, “↑” indicates that the component is increased after co-incubation, and “↓” indicates that the component is decreased after co-incubation.

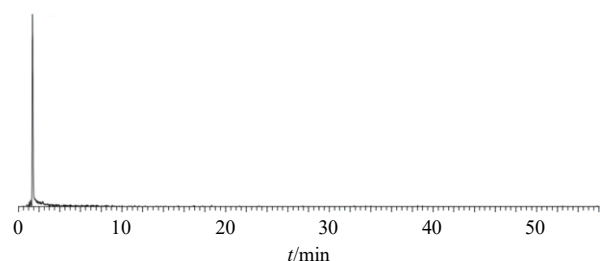


图 4 苍术苷 A 提取离子流图及二级质谱图

Fig. 4 Extracted ion flow diagram and secondary mass spectra of atractyloside A

和 m/z 461.2017。通过从苍术苷 A 羧基化产生 m/z 461.2017，进一步分子内脱水产生 m/z 443.1620 的碎片离子，代谢产物 c 提取离子流图及二级质谱图见图 6。

代谢产物 d，保留时间和母离子分别为 13.08 min 和 m/z 405.2488。通过从苍术苷 A 脱甲基化和脱羧基产生 m/z 405.2488，进一步脱葡萄糖产生 m/z 243.3141 的碎片离子，代谢产物 d 提取离子流图及二级质谱图见图 7。

代谢产物 e，保留时间和母离子分别为 14.74 min 和 m/z 489.3280。通过苍术苷 A 乙酰化产生 m/z 489.3280，进一步脱葡萄糖产生 m/z 327.2219 的碎片离子，代谢产物 e 提取离子流图及二级质谱图见图 8。

根据精确相对分子质量和多级质谱碎片等相关信息，初步分析并鉴定了苍术苷 A 经肠道菌群代谢的 4 种产物。结果显示，苍术苷 A 的可能的代谢途径包括脱葡萄糖、氧化、去甲基化、脱水和乙酰化。比较苍术苷 A 与肠道菌群共孵育前后各成分峰面积，苍术苷 A 与肠道菌群共孵育后实验组峰面积较对照组降低 99.5%，说明转化较完全。在实验组中检测到苍术苷 A 的代谢产物 b~e 的峰面积较高，而这些成分在对照组中极低甚至未检测到，表明苍术苷

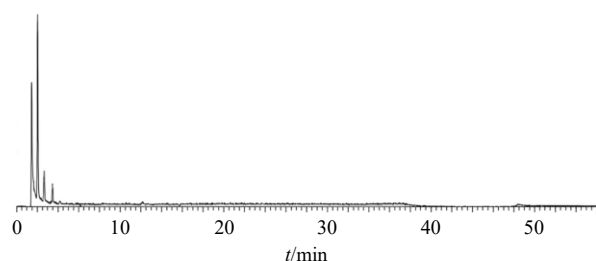


图 5 代谢产物 b 提取离子流图及二级质谱图

Fig. 5 Metabolite b extracted ion flow diagram and secondary mass spectra

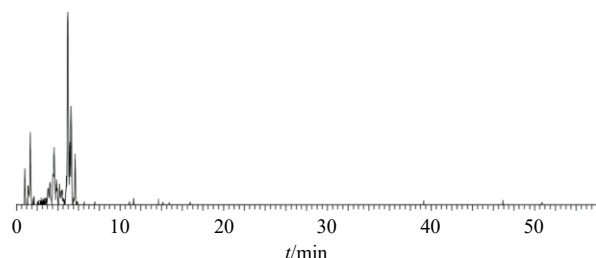


图 6 代谢产物 c 提取离子流图及二级质谱图

Fig. 6 Metabolite c extracted ion flow diagram and secondary mass spectra

A 能够被肠道菌群几乎完全转化代谢。

3 讨论

本实验采用的 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术是

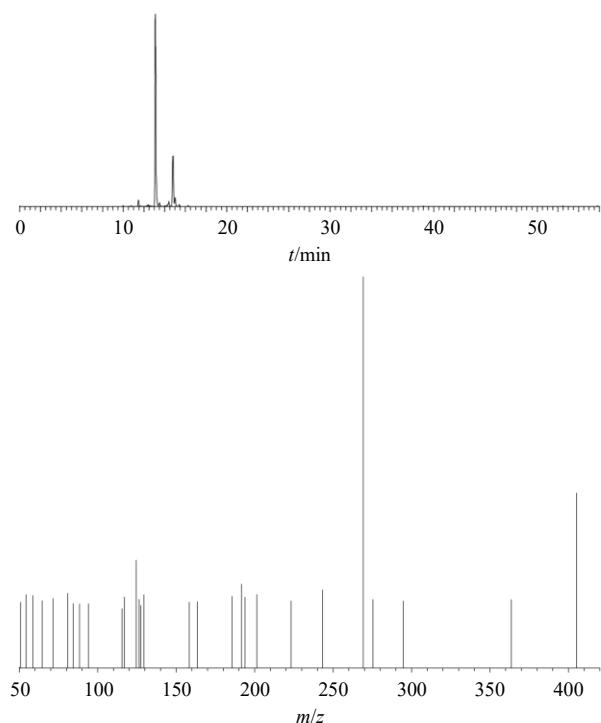


图 7 代谢产物 d 提取离子流图及二级质谱图
Fig. 7 Metabolite d extracted ion flow diagram and secondary mass spectra

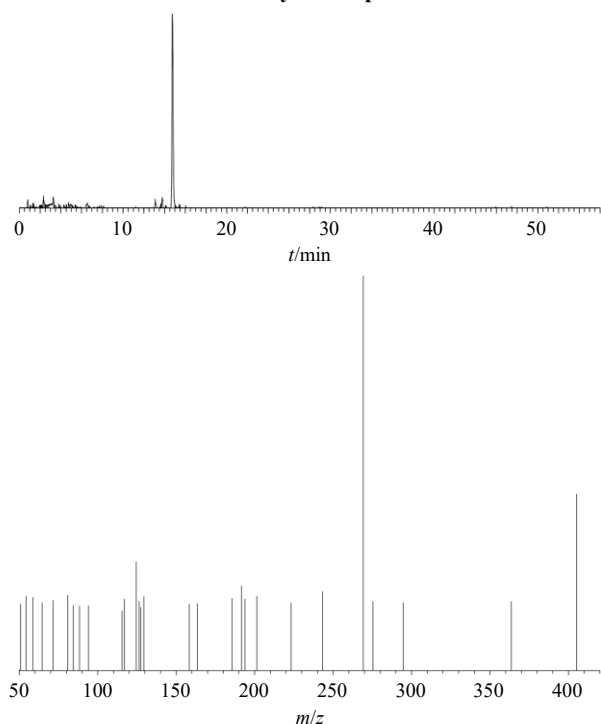


图 8 代谢产物 e 提取离子流图及二级质谱图
Fig. 8 Metabolite e extracted ion flow diagram and secondary mass spectra

复杂中药化学成分快速鉴定的最主要技术之一，可以在缺少对照品的情况下对中药化学成分进行快速筛查与确认。该技术较传统 LC-MS，可实现多级质

谱碎裂和母离子的高分辨采集，是复杂物质体系中化学成分快速分析的有效手段。

目前肠道代谢的研究方法主要包括体内法、在体法以及体外法^[17]。其中，体外法是研究药物在肠内代谢的主要方法，具有简单易行、重复性高的优点，能够排除体内的干扰因素，从而更好地控制代谢条件^[18]。在肠道菌群实验中，粪便温孵法是体外研究肠道菌群对药物代谢较认可并被普遍使用的方法，是指将含有细菌的人、小鼠或其他动物的新鲜粪便与药物混匀，37 °C 厌氧培养，应用 LC-MS、GC-MS 等现代仪器分析技术检测药物原型及其代谢产物的种类和数量^[19]。通过检索国内外文献，发现共孵育方法较常用，所用的肠道菌群多采自正常动物^[20-23]，因此，本实验采用正常小鼠的肠道菌群体外共孵育，粪便随时可取，方法操作方便，结果重复性强。

课题组前期对苍术、焦苍术的体外化学成分已进行比较研究，结果表明生、焦苍术醇提物二者成分种类相同，但含量相差较大^[2-4]，初步明确二者发挥药效的物质基础有所不同，其中苍术苷 A 为炮制后增量明显成分；实验已验证肠道菌群是焦苍术醇提物和苍术苷 A 发挥固肠止泻作用的关键因素^[5]，但是苍术、焦苍术醇提物进入体内后，在肠道微生态环境下，相关成分如何转化尚不清楚；有研究表明，苍术炒焦后增量成分苍术苷 A 具有促进胃肠动力和保护胃黏膜，对抗消化道炎症的作用，但其口服生物利用度较低^[11-12]，而目前尚未见关于苍术苷 A 的药效是否与肠道菌群的代谢有关报道。为此，作者为全面分析苍术、焦苍术醇提物在肠道菌群作用下的代谢情况，为获得丰富的成分转化信息，运用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术，采用体外共孵育法，较好模拟体内转化环境，且成分分析相对简单。由于中药成分复杂性以及体内代谢的复杂和未知性，研究苍术、焦苍术醇提物体内代谢难度较大，因此本实验首先选择体外共孵育法初步研究分析。将苍术、焦苍术醇提物与小鼠肠道菌液进行体外共孵育，考察肠道菌群对苍术、焦苍术醇提物化学成分以及增量成分苍术苷 A 的代谢转化作用。结果原型成分苍术苷 A、5-羟甲基糠醛、苍术素等 11 种成分在焦苍术醇提物与菌共孵育后的峰面积下降率高于生苍术共孵育，而 3β-乙酰氧基-白术内酯 I，愈创木烯和芹烷二烯酮在焦苍术醇提物与菌共孵育后的峰面积增加率高于生苍术共孵育。推测菌群共孵育

前后化学成分的变化是焦苍术药效优势的关键所在, 代谢差异的原因可能与2种提取物的整体化学环境、生物环境有关。

进一步分析了肠道菌群对苍术苷 A 的转化规律, 根据精确分子量和多级质谱碎片等相关信息, 初步分析并鉴定了苍术苷 A 的4个肠道菌群代谢产物。结果显示, 苍术苷 A 的可能代谢途径包括脱葡萄糖、氧化、去甲基化、脱水和乙酰化。比较苍术苷 A 与菌共培养前后各成分峰面积, 苍术苷 A 与肠道菌群共培养后实验组峰面积较对照组降低99.5%, 在实验组中检测到苍术苷 A 的代谢产物 b~e 的峰面积较高, 而这些成分在对照组中极低甚至未检测到。表明苍术苷 A 能够被肠道菌群几乎完全转化代谢。关于代谢产物 b~e 4 种成分的进一步鉴定, 课题组试图购买对照品比对验证, 但均未如愿买到对照品, 故本结果主要以数据库比对和分析推导确定; 也由于本实验仪器所限无法对更多的代谢物进行鉴定, 这些问题将是后期需要进一步研究的内容。本研究结果为初步明确焦苍术及苍术苷 A 发挥药效的物质基础提供实验依据。由于体外共孵育与体内环境相比, 会存在温度、pH 值、养分供应、宿主因素、菌群动态变化等方面的不同可能会影响肠道菌群与药物之间的相互作用, 需要进一步的体内验证。本研究通过体外共孵育研究获得的结果为复杂的体内代谢研究提供参考。

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: 168.
- [2] 孙雄杰. 苍术炒焦工艺及炒焦前后药效学与化学成分对比研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [3] 陈祥胜, 刘艳菊, 陈海霞, 等. 苍术炒焦前后 GC 指纹图谱的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 24-28.
- [4] 陈海霞, 陈祥胜, 谢颖, 等. 苍术炒焦前后苍术苷 A 的含量比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1346-1348.
- [5] Liu C L, Song C C, Wang Y, *et al.* Deep-fried *Atractylodes lancea* rhizome alleviates spleen deficiency diarrhea-induced short-chain fatty acid metabolic disorder in mice by remodeling the intestinal flora [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115967.
- [6] 许静. 基于肠道菌群与 TLR4/NF- κ B 通路研究苍术苷 A 对脾虚泄泻小鼠的药效机制 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [7] 袁榛. 肝气乘脾证泄泻小鼠的肠道菌群特征研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [8] 田学梅, 王慧, 梁浩, 等. 肠道菌群与中医体质相关性研究 [J]. 世界中医药, 2023, 18(3): 395-400.
- [9] 於李龙, 陈文华, 秦路平, 等. 中药与肠道菌群相互作用的研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2022, 32(9): 881-884.
- [10] 张亦瑶, 王俊豪, 郝海红. 肠道微生物群与药物相互作用的研究进展 [J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4536-4554.
- [11] 涂济源. 苍术炮制前后关键变化成分药效学及体内代谢规律研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [12] 于艳, 袁媛, 贾天柱, 等. 苍术炮制前后化学成分及药理作用研究近况 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 189-191.
- [13] 张意涵. 苍术的化学物质基础与代谢组学研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [14] Xu J, Liu C L, Shi K, *et al.* Atractylolide-A ameliorates spleen deficiency diarrhea by interfering with TLR4/MyD88/NF- κ B signaling activation and regulating intestinal flora homeostasis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107: 108679.
- [15] 王佳, 游松, 周丽娜. 倍半萜生物转化的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(2): 156-164.
- [16] 邓爱平, 李颖, 吴志涛, 等. 苍术化学成分和药理的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3904-3913.
- [17] 高佳雪, 丁晶鑫, 王靖雅, 等. 中药化学成分肠道代谢的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2018, 34(1): 20-23.
- [18] 周慧慧, 环诚, 薛志鹏, 等. HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析丹参-红花药对在离体肠道菌群中的代谢产物 [J]. 药学学报, 2022, 57(11): 3371-3377.
- [19] 李丽萍, 蒋惠娣. 肠道菌群对菊花提取物的代谢作用 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1001-1004.
- [20] 杨宝, 范真, 周联, 等. 大鼠肠道菌群对紫丁香苷体外代谢转化研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1333-1337.
- [21] 韩冰, 李静娜, 吕西雨, 等. 肠道菌群代谢转化中药皂苷类成分研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6922-6932.
- [22] Dong G M, Yu H, Pan L B, *et al.* Biotransformation of timosaponin BII into seven characteristic metabolites by the gut microbiota [J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3861.
- [23] Mi Y G, Xu X Y, Hong L L, *et al.* Comparative characterization of the ginsenosides from six *Panax* herbal extracts and their *in vitro* rat gut microbial metabolites by advanced liquid chromatography-mass spectrometry approaches [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(24): 9391-9403.

[责任编辑 郑礼胜]