

· 药物代谢 ·

## 白术、茯苓多糖的体外胃肠道代谢研究

钟熊, 王梦月, 彭颖, 李晓波\*  
(上海交通大学药学院, 上海 200240)

[摘要] 目的: 考察白术、茯苓多糖在胃肠道环境中的代谢情况。方法: 白术、茯苓多糖分别与人工胃液、肠液和肠道菌共孵育, 采用 3, 5-二硝基水杨酸法(DNS 法)测定多糖的含量变化, 考察白术、茯苓多糖在人工胃肠道环境中的代谢以及与肠道菌共孵育的变化。结果: 白术、茯苓多糖在人工胃肠道环境中没有明显代谢, 而与肠道菌的共孵育过程中则产生显著代谢。结论: 白术、茯苓多糖在胃肠道中的代谢主要是在肠道中进行, 肠道菌在此过程中发挥着重要作用。

[关键词] 白术多糖; 茯苓多糖; 胃肠道; 代谢

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)12-0132-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120411.0913.017 [网络出版时间] 2012-04-11 9:18

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120411.0918.017.html>

## Metabolism of Atractylodes Rhizome Polysaccharides and Pachyman in Gastrointestinal Tract

ZHONG Xiong, WANG Meng-yue, PENG Ying, LI Xiao-bo\*  
(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To study the metabolism of Atractylodes Rhizome polysaccharides and pachyman in gastrointestinal environments. **Method:** Atractylodes Rhizome polysaccharides and pachyman were incubated with artificial gastric, intestinal juice and gut flora respectively; the method of 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) was applied to determine the variation of reducing sugar content, which suggested the metabolism of Atractylodes Rhizome polysaccharides and pachyman in gastrointestinal environments. **Result:** There was no significant metabolism found in artificial gastric juice and intestinal juice, while most of the polysaccharides were greatly reduced in the process of incubating with gut flora. **Conclusion:** The intestinal tract is the mainly metabolic place for Atractylodes Rhizome polysaccharides and pachyman, and the gut flora plays an important role in the process.

[Key words] Atractylodes Rhizome polysaccharides; pachyman; gastrointestinal tract; metabolism

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎功效、主治脾虚食少、腹胀泄泻、痰饮眩悸、水肿、自汗、胎动不安等症; 茯苓为多孔菌科真菌茯

苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 具有利水渗湿、健脾、宁心的功能, 主治水腫尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、便溏泄泻、心神不安、惊悸失眠等症。白术的主要成分为挥发油, 含量约 1.4%, 包括白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 等<sup>[1]</sup>; 茯苓的主要成分是茯苓聚糖、茯苓三萜等<sup>[2]</sup>。白术和茯苓作为治疗脾虚证的常用药对, 已有对它们的益气健脾类组方化学成分的变化、对脾气虚大鼠肠道局部免疫功能的影响等研究<sup>[3-4]</sup>。现代药理研究表明, 白术多糖、茯苓多糖具有抗肿瘤、增强免疫、抗炎、抗衰老等作用<sup>[5-6]</sup>。同时, 白术多糖能够促进益生菌的生

[收稿日期] 20120116(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973962)

[第一作者] 钟熊, 硕士, 从事中药肠道代谢研究, Tel: 021-34204805, E-mail: sczx123456789@163.com

[通讯作者] \* 李晓波, 教授, 博士生导师, 从事中药活性物质、质量标准及新技术应用, Tel: 021-34204806, E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

长<sup>[7]</sup>。然而关于它们在胃肠道的代谢未见报道。本研究使用 DNS 法考察白术、茯苓多糖在胃肠道环境中的代谢情况。

## 1 材料

**1.1 仪器** UV1102 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),DK-8D 型电热恒温水槽(巩义市予华仪器有限公司),G-560E 型涡旋振荡器(美国 Scientific Industries),CT15RT 型高速离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司),YQX-II 型厌氧培养箱(上海博泰实验设备有限公司),BS124S 型电子分析天平(德国 Sartorius)等。

**1.2 试剂** 胃蛋白酶(上海生工生物工程有限公司,批号 CH0630B409C),胰酶(上海生工生物工程有限公司,批号 3499B504),厌氧菌肉汤(上海楷洋生物技术有限公司,批号 20100925),维生素 K<sub>1</sub>,氯化血红素均购自上海楷洋生物技术有限公司,蒸馏水,DNS 试剂<sup>[8]</sup>自制。其余化学试剂均为分析纯。

**1.3 饮片** 生白术(批号 HX20081102),白茯苓(批号 YT2009033015)购于上海华宇药业有限公司,均经上海交通大学药学院李晓波教授鉴定。

**1.4 动物** SD 大鼠,6 只,雌雄各半,体重 200 ~ 230 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。健康志愿者 4 名,男、女各 2 名,22 ~ 25 周岁。试验方案经上海交通大学药学院伦理委员会批准。

## 2 方法

### 2.1 白术、茯苓多糖的提取及精制

**2.1.1 多糖的提取** 取白术、茯苓饮片各 200 g,分别加入 10 倍量蒸馏水,超声处理 30 min,加热煎煮 3 次,时间分别为 3,2,1 h,合并水煎液,浓缩至 200 mL,静置,离心。取上清液,搅拌下加入无水乙醇至 80% 3 次,置于 4 ℃ 冰箱醇沉过夜。抽滤,沉淀用 100 mL 蒸馏水溶解,加入 20 g 活性炭,置于 65 ℃ 恒温水浴锅中,反复搅拌 3 h,除去色素等杂质。滤过,滤液浓缩、干燥,即得白术、茯苓粗多糖。

**2.1.2 多糖的精制<sup>[9]</sup>** 白术、茯苓粗多糖溶于水,将 Sevage 试剂(氯仿与正丁醇体积比 4:1)与多糖溶液按 1:3 体积比混合搅拌 25 min 后,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,重复 8 次。除去氯仿和正丁醇,浓缩,得精制白术多糖 8.47 g、茯苓多糖 0.594 g。

### 2.2 多糖的含量测定

**2.2.1 多糖样品水解<sup>[10]</sup>** 准确称取白术多糖、茯苓多糖样品各 12.50 mg,分别置于 25 mL 量瓶中,加水至刻度。精密量取样品溶液各 20 mL,置锥形

瓶中,加入 10 mL 6 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液,封口,于沸水浴上加热 30 min,取出冷却至室温,用 6 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液调 pH 至 8.0,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,残渣用水洗涤,上清液与水洗液一并置 50 mL 量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀即得白术多糖、茯苓多糖水解液样品。

**2.2.2 标准曲线的制备<sup>[8]</sup>** 准确称取 12.50 mg 葡萄糖,用蒸馏水溶解并定容至 25 mL。分别吸取 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,各以蒸馏水补至 0.5 mL,然后加入 DNS 试剂 1.5 mL,充分混匀后于沸水浴中煮沸 5 min。流水冷却后再分别向各试管中加入蒸馏水 4 mL,充分混匀后,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。于 550 nm 波长下测定吸光度值,以 0.5 mL 蒸馏水按同样显色操作为空白对照。

**2.2.3 多糖的含量测定** 吸取白术多糖、茯苓多糖水解样品液各 0.4 mL,按 2.2.2 项操作,重复 3 次,测定吸光度值。按下式计算,得到总多糖含量。

$$\text{总多糖含量} = C_1 V_1 / M_1 \times 0.9 \times 100\%$$

其中, $C_1$  为从标准曲线中查出的总多糖的糖质量分数、 $V_1$  为多糖水解样品稀释后的体积、 $M_1$  为多糖水解时样品的质量,0.9 为葡萄糖制得的标准曲线的换算因子。

准确称取白术多糖、茯苓多糖样品各 12.50 mg,分别用蒸馏水溶解并定容至 25 mL。吸取 0.4 mL,按 2.2.2 项操作,重复 3 次,测定吸光度值。按下式计算,得到白术多糖、茯苓多糖中夹杂的还原糖含量。

$$\text{还原糖含量} = C_2 V_2 / M_2 \times 0.9 \times 100\%$$

其中, $C_2$  为从标准曲线中查出的还原糖的糖质量分数、 $V_2$  为多糖样品稀释后的体积、 $M_2$  为多糖样品的质量。所以,多糖的含量按照下式计算,即得。

$$\text{多糖含量} = \text{总多糖含量} - \text{还原糖含量}$$

### 2.3 多糖在人工胃液和肠液中的代谢

**2.3.1 人工胃、肠液的配制** 参照文献[11]方法分别配制人工胃液(pH 2)、人工肠液(pH 6.8),备用。

**2.3.2 标准曲线的制备** 同 2.2.2 项。

**2.3.3 多糖在人工胃液、肠液中的代谢** 取白术、茯苓多糖样品各 50 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,用蒸馏水定容至刻度。准确量取 40 mL 多糖溶液,加入到含有 40 mL 人工胃液的烧杯中,搅匀,置 37 ℃ 水浴恒温箱,于 0,1,2,3,4,5,6,12,24 h 各取 0.8 mL 孵育液。吸取 0.4 mL,加入试管中,按 2.2.1,2.2.3 项操作,测定孵育液中总多糖含量;余

下的 0.4 mL 孵育液,按 2.2.2 项操作,测定孵育液中还原糖含量。以多糖代谢率标示多糖在人工胃液、肠液中的代谢情况,其计算公式为:

$$\text{多糖代谢率} = [\text{初始多糖含量} - (\text{总多糖含量} - \text{还原糖含量})] / \text{初始的多糖含量} \times 100\%$$

多糖在人工肠液中代谢情况,考察方法同人工胃液。

### 2.4 多糖在肠道菌孵育液中代谢

#### 2.4.1 肠道菌液的配制

2.4.1.1 粪便采集 使用无菌棉签挑取人新鲜粪便 3.0~4.0 g,置于干燥灭菌的 10 mL EP 管中。从大鼠肛门处收集新鲜粪便 2.0~3.0 g,置于干燥灭菌的 5 mL EP 管中。人、大鼠粪便均置于 -20 °C 保存备用。

2.4.1.2 多糖与粪便比例的确定 依据药典规定药材用量为  $M_3$ ,多糖得率为  $a\%$  计算,个体的正常粪便量记为  $M_4$ ,则多糖与粪便比例为  $M_3 \times a\% : M_4$ 。对于大鼠,根据人体重(70 kg)对大鼠体重(200 g)的等效剂量比值是 0.018,雄性 SD 大鼠的正常粪便量记为  $M_5$ ,则多糖与粪便比例为  $M_3 \times 0.018 : M_5$ 。

2.4.1.3 肠道菌液的配制 称取厌氧培养肉汤 7.5 g,加入 250 mL 蒸馏水,趁热过滤。滤液经 120 °C 高温灭菌 20 min 后在 50 °C 左右加入 0.25  $\mu\text{L}$  维生素  $\text{K}_1$  和 1.5 mg 氯化血红素,即得厌氧培养基。新鲜粪便直接加入厌氧培养基中,比例为 1 g : 25 mL,涡旋混合,三层纱布过滤,即得。

2.4.2 标准曲线的制备 准确称取葡萄糖 25.0 mg,以蒸馏水溶解并定容至 25 mL。按 1:1 的体积比与肠道菌培养液混匀,取 2 mL 混合液,加入 6 倍量蒸馏水,其余操作同 2.2.2 项。分别制备多糖在人、大鼠肠道菌的代谢标准曲线。

2.4.3 多糖在肠道菌液中代谢的考察 分别取白术、茯苓多糖与人肠道菌液混匀,厌氧条件下 37 °C 孵育。在 0,2,4,6,8,10,12,24 h 分别取 4 mL 孵育液,其余操作同 2.3.3 项。以多糖代谢率标示多糖在肠道菌孵育液中代谢情况,计算公式同 2.3.3。多糖在大鼠肠道菌孵育液中代谢的考察方法同人肠道菌。

## 3 结果

### 3.1 多糖的含量测定

3.1.1 标准曲线 DNS 法测得标准曲线的回归方程  $A = 2.026 C - 0.069 7 (r = 0.999 9)$ 。A 为吸光度,C 为葡萄糖质量浓度 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。实验表明标准葡萄糖在 0.050~0.250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好的线性关系。

3.1.2 多糖含量 按照上述方法测定精制白术、茯苓多糖(以葡萄糖计)的含量分别为 30.32%,11.38%。

3.2 多糖在人工胃液、肠液中的代谢 白术、茯苓多糖在人工胃液、肠液中 24 h 的代谢情况如图 1。白术、茯苓多糖在人工胃液、肠液中代谢缓慢,24 h 内白术多糖在人工胃液、肠液中代谢率分别为 9.3%,6.0%;茯苓多糖在人工胃液、肠液中代谢率分别为 9.4%,8.5%。

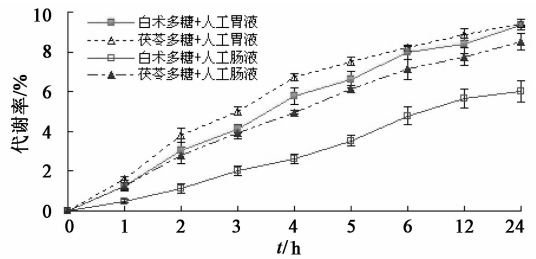


图 1 多糖在人工胃液、肠液中的代谢情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 多糖在肠道菌孵育液中代谢

3.3.1 标准曲线的测定结果 运用 DNS 法测得的标准曲线回归方程分别为:人肠道菌  $A = 2.180 C - 0.036 (r = 0.999 8)$ ;大鼠肠道菌  $A = 2.528 C - 0.050 (r = 0.999 9)$ 。A 为吸光度,C 为葡萄糖质量浓度 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。实验表明标准葡萄糖在 0.050~0.250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好的线性关系。

3.3.2 多糖与肠道菌共孵育结果 白术、茯苓多糖在人、大鼠肠道菌孵育液中 24 h 的代谢情况如图 2。白术和茯苓多糖在与肠道菌共孵育的过程中,代谢情况相似,多糖代谢率的变化经历了 3 个时期:缓慢增加(0~2 h)、急速增加(2~6 h)、平稳(6~24 h)。多糖与人肠道菌共孵育的 24 h 内,白术多糖和茯苓多糖分别代谢了 76.1%,75.5%;与大鼠共孵育的 24 h 内白术多糖和茯苓多糖分别代谢了 77.9%,76.9%。大鼠肠道菌比人肠道菌对多糖具有更强的代谢。

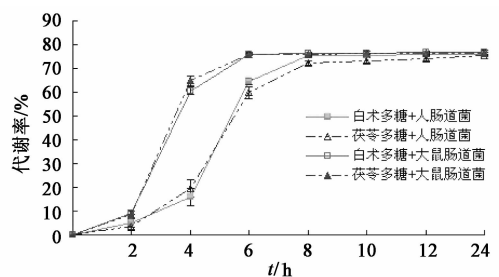


图 2 多糖在人、大鼠肠道菌孵育液中的代谢情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

胃肠道是口服药物的必经通道,包括胃、小肠和

大肠三部分。虽然大多数药物的主要吸收部位在小肠,但胃内含有0.4%~0.5%的胃酸和以胃蛋白酶为主的酶类,大肠内含有丰富的肠道菌群和糖苷酶、多糖酶等酶类,它们在药物的代谢过程中也起着重要的作用。然而,作者并未发现白术和茯苓及其多糖在体外胃肠道代谢研究的相关报道。

张恩户等<sup>[12]</sup>通过研究分析国内外有关中药多糖类化合物现状,提出中药多糖类化合物肠内先代谢成小分子寡糖而发挥作用,并采用肠内总多糖含量和相对分子质量的变换判定多糖转运和代谢情况的设想。比色法作为多糖含量测定的常用方法之一,包括咔唑-硫酸法、蒽酮-硫酸法、苯酚-硫酸法、DNS法等,而只有其中的DNS法能够消除还原性杂质的干扰<sup>[13]</sup>。DNS法的原理是3,5-二硝基水杨酸在中性或偏碱性条件下与多糖水解的还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物,在一定的范围内,还原糖的量和反应液的颜色呈正比。相关报道<sup>[10]</sup>指出总糖由不具还原性的多糖和还原糖组成,并用DNS法测定了总多糖的含量。本文采用DNS法测定多糖与人工胃液、肠液以及肠道菌共孵育后孵育液中的还原糖含量,以及孵育液经水解后的总多糖含量,总多糖含量与还原糖含量的差值即是孵育液中还未被代谢的多糖含量。通过计算多糖代谢率,可以准确反映白术、茯苓多糖的体外胃肠道代谢情况。

白术、茯苓多糖在与肠道菌共孵育的过程中,多糖的代谢率在0~2 h内缓慢增加、在2~6 h内急速增加,而白术多糖对益生菌具有促生长作用<sup>[7]</sup>,因此推测:多糖的代谢与肠道菌的生长是一个相互促进的过程,此过程中肠道菌的生长进入对数期,多糖代谢较快。

本研究发现,肠道菌对白术、茯苓多糖的代谢远远大于人工胃液、肠液,表明肠道在多糖的整个胃肠道代谢过程中占据主要地位,且肠道菌在此过程中发挥着重要作用。大鼠肠道菌比人肠道菌对多糖具有更强的代谢作用,可能与大鼠和人肠道菌群的组

成和数量的差异有关。白术、茯苓多糖在胃肠道内的代谢产物及其药理作用,有待进一步深入研究。

## [参考文献]

- [1] 龙全江,徐雪琴,胡昀. 白术的化学、药理与炮制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(11):1033.
- [2] 杨树东,包海鹰. 茯苓中三萜类和多糖类成分的研究进展[J]. 菌物研究, 2005, 3(3):55.
- [3] 彭腾,贺钢民,李柏群,等. 白术、茯苓药对组方的益气健脾类方化学成分的比较研究[J]. 中药与临床, 2011, 2(2):47.
- [4] 贺晓芳,贾波,祝捷,等. 白术茯苓汤及提取组方对脾气虚大鼠肠道局部免疫功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(1):165.
- [5] 曹岗,张晓炎,丛晓东,等. 白术多糖的研究进展[J]. 北京联合大学学报:自然科学版, 2009, 23(3):14.
- [6] 张璐,刘强. 茯苓多糖制备工艺及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4):61.
- [7] 刘丽莎,王锐,旭日花,等. 白术多糖对益生菌的促生长作用及结构分析[J]. 食品科学, 2010, 31(19):124.
- [8] 赵凯,许鹏举,谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8):534.
- [9] 张晓莉,李玉婷,王亚贤,等. 红花多糖的提取与含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):19.
- [10] 熊艺花,李婧,黄松,等. DNS法对三七总多糖含量测定[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(7):7.
- [11] 陈新梅. 大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的代谢转化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):210.
- [12] 张恩户,王瑞县,岳明,等. 中药多糖类化合物肠内转运与代谢研究的思考[J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(5):6.
- [13] 杨跃辉,姜清华,丁平田. 植物中多糖分析方法的研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(6):1239.

[责任编辑 邹晓翠]