

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.014

陈兵,羊学荣,卢凤来,等. 罗汉果醇的制备及大鼠体内代谢研究[J]. 广西植物,2014,34(2):198-202

Chen B, Yang XR, Lu FL, et al. Study on the preparation and metabolism of mogrol in rats[J]. *Guihaia*, 2014, 34(2):198-202

## 罗汉果醇的制备及大鼠体内代谢研究

陈兵<sup>1,2</sup>, 羊学荣<sup>1,2</sup>, 卢凤来<sup>1</sup>, 徐风<sup>3</sup>, 李典鹏<sup>1\*</sup>

(1. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 广西中医药大学, 南宁 530001; 3. 北京大学 药学院, 北京 100191)

**摘要:** 为了制备得到高纯度的罗汉果醇以及阐明罗汉果醇的代谢特点, 采用酸水解法从粗罗汉果皂苷 V (含量 50%) 制备得到高纯度的罗汉果醇, 用大鼠灌胃给药 (100 mg · kg<sup>-1</sup>) 方法以及通过 HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup> 研究罗汉果醇的代谢特点。结果表明: 在粪便中能发现较多氧化产物, 在血浆中也能检测到代谢产物。说明罗汉果醇灌胃给药后, 能经过吸收和代谢进入血液从而发生作用。

**关键词:** 罗汉果醇; 制备; 代谢研究; 液质联用; 氧化反应

**中图分类号:** R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)02-0198-05

## Study on the preparation and metabolism of mogrol in rats

CHEN Bing<sup>1,2</sup>, YANG Xue-Rong<sup>1,2</sup>, LU Feng-Lai<sup>1</sup>, XU Feng<sup>3</sup>, LI Dian-Peng<sup>1\*</sup>(1. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany,**Guilin 541006, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 3. School of**Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)*

**Abstract:** Mogrosides are main active ingredients in *Siraitia grosvenorii*, and the mogrol is the mogrosides' common aglycon, but few research on metabolism of mogrosides. So in order to prepare and get much high purity mogrol, 50% mogroside V by acid hydrolysis were prepared, and its in vivo metabolism in rats was studied by HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup> after oral administration at the dose of 100 mg · kg<sup>-1</sup>. we collected the blank and drug feces and plasma, the results implied that mogrol could be absorbed into the blood of rats. A lot of oxidation metabolites of mogrol were detected in feces samples, and some were also detected in plasma samples. So, we will do the study continuously, and provided the scientific basis for its application and development in future.

**Key words:** mogrol; preparation; metabolism; HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup>; oxidation

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 为葫芦科植物的干燥果实。从 1977 年以来, 罗汉果一直被《中华人民共和国药典》收录, 是卫生部、国家中医药管理局批准的首批药食两用中药。药理研究表明, 罗汉果有止咳祛痰、泻下、保肝、增强免疫等作用 (王勤等, 1999)。罗汉果的主要有效成分为罗汉果皂苷类化

合物, 其苷元为葫芦烷型的四环三萜罗汉果醇 (mogrol) (Kasai *et al.*, 1989)。根据苷元连接糖基的数目及连接位置的不同现已鉴定出罗汉果一糖苷、二糖苷、三糖苷、四糖苷、五糖苷、六糖苷等 20 多种皂苷 (Matsumoto *et al.* 1990; 斯建勇等, 1996; 李典鹏等, 2000, 2006, 2007)。国内外关于罗汉果皂苷

收稿日期: 2013-11-13 修回日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金 (81160392, 81160518)

作者简介: 陈兵 (1989-), 男, 云南禄劝人, 硕士研究生, 药物化学专业, (E-mail) cbdxh135535@163.com。

\* 通讯作者: 李典鹏, 研究员, 硕士研究生导师, 从事天然药物化学成分研究, (E-mail) ldp@gxib.cn。

类成分的代谢研究十分少见,一篇对罗汉果皂苷 III 的人肠内细菌转化进行了研究(杨秀伟等,2007);另一篇对罗汉果总皂苷(皂苷 V 含量为 72%)的消化和吸收进行了初步研究(Murata *et al.*,2010),但仍存在一些问题,如无法得知代谢产物是罗汉果皂苷 V 在大鼠体内代谢后得来还是总皂苷中本身就有的;除去 72%皂苷 V 后剩下的 28%部分是什么等问题没有明确的答案。另外一篇是对罗汉果皂苷降血糖机制的研究(Chen *et al.*,2011)。本文通过对 50%罗汉果皂苷 V 进行分离纯化得到足量和高纯度的罗汉果醇,进而对其体内的代谢情况进行研究,应用 HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup> 技术鉴定其可能的代谢产物,推测罗汉果醇的体内代谢途径和裂解规律,有助于揭示葫芦烷型四环三萜皂苷的代谢途径,而阐明药物的体内过程对创新药物的研究具有重要意义,有助于揭示药物的作用机理;同时国内外创新药物申请注册时也要求提供关于该药物体内过程方面的研究资料;也为新药的研制和开发提供合理的科学依据,促进罗汉果产业的进一步发展。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

实验动物及饲料:SD 雄性大鼠,210~220 g,购于北京大学医学部实验动物科学部。普通大鼠饲料,购于北京大学医学部实验动物科学部。

原料与试剂:50%罗汉果皂苷 V 由桂林莱茵生物有限公司生产且由广西植物研究所卢凤来助理研究员检测合格。罗汉果醇对照品为实验室自制(纯度 $\geq 98\%$ )。羧甲基纤维素钠购自国药集团化学试剂有限公司。甲醇、乙腈(GR)购自天津市西华特种试剂厂。乙腈(HPLC 级)购自 Fisher 公司,甲酸(HPLC 级)购自 Mreda Technologic。柱色谱用硅胶(200~300 目)、硅胶 G 薄层板由青岛海洋化工厂生产。正己烷、氯仿、甲醇、丙酮、浓硫酸(AR)均购自北京化工厂。

### 1.2 仪器

液质联用仪:HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup>(岛津公司),液相系统由 LC-20A 二元泵,SIL-20AC 自动进样器,CTO-20A 柱温箱,SPD-M20A PDA 检测器构成。采用 LCMSsolution Software version 3.60 工作站进行数据采集和分析。代谢笼(苏州冯氏实验动物设备有限公司),R-3000 旋转蒸发器(瑞士

Buchi 公司),超低温冰箱(Thermo scientific 公司),真空采血管(2 mL)(河北鑫乐科技有限公司),十分之一电子天平(BP211D 型,Sartorius AG)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil<sup>®</sup> ODS-3 (4.6×250 mm,5  $\mu\text{m}$ ,SHIMADZU,Japan),Phenomenex C<sub>18</sub> 保护柱(4.6 mm×2.0 mm,USA),流动相为 A(0.1%甲酸水)和 B(乙腈),进样量 10  $\mu\text{L}$ ,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ 。采用梯度洗脱:0~30 min,5%~50% B;30~75 min,50%~100% B;75~90 min,100%~100% B。

### 2.2 质谱条件

色谱柱后分流 0.2 mL·min<sup>-1</sup> 流出液进入质谱。离子源为 ESI 源,负离子模式检测;碰撞气:极高纯度氩气(Ar);雾化气:高纯度氮气(N<sub>2</sub>);接口电压:-3.5 kV;雾化气流速:1.5 L·min<sup>-1</sup>;加热块和曲形脱溶剂管(CDL)温度:250  $^{\circ}\text{C}$ ,质量扫描范围:MS<sup>1</sup>,  $m/z$  200~2000;MS<sup>2</sup>-MS<sup>3</sup>,  $m/z$  50~2000。

### 2.3 罗汉果醇的制备

水解:称取 40.05 g 粗罗汉果皂苷 V(含量 50%),加入 5%硫酸甲醇溶液 1 600 mL 水解 10 h,水解完毕后加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠溶液中和,共用 500 mL 氢氧化钠溶液,用旋转蒸发器旋干甲醇。萃取:将水溶液倒入分液漏斗中,加入氯仿(1:1)萃取 3 次,每次 500 mL,合并氯仿液用旋转蒸发器浓缩至干。拌样:用甲醇溶出氯仿萃取物至蒸发皿,水浴烘至浸膏,浸膏重 17.2 g,再用硅胶拌样(200~300 目),样品拌至细沙状,等待上样。装柱:向玻璃柱(3 cm×60 cm)加入 500 g 硅胶,用吸耳球将硅胶敲实,并使硅胶面水平,倒入样品,敲平,再加入一定量的硅胶,保持水平,用棉花覆盖,最后放入玻璃珠压住棉花。洗脱:用 7:1~2:1(正己烷:丙酮)梯度洗脱,收集流份。制备纯化:将流份与对照品比较,合并并旋干含有罗汉果醇的流份,进制备液相纯化即得单体罗汉果醇。

### 2.4 罗汉果醇体内代谢实验

将 12 只 SD 雄性大鼠分别放入代谢笼中饲养,其中 1~6 号鼠为空白组,7~12 号鼠为给药组。饲养两天后清洗代谢笼并开始收集空白样品,共收集两天的空白尿液及粪便,收集空白完成当天开始灌

胃给药,给药剂量为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (由于罗汉果醇不溶于水,故制成混悬液,称取  $321 \text{ mg}$  罗汉果醇,加入  $16 \text{ mg}$  羧甲基纤维素钠,加水至  $32 \text{ mL}$  并摇匀制成  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混悬液),每天给药 1 次,共给药 3 d,第 3 天灌胃给药 1 h 后取血。

**2.4.1 空白、给药尿液的处理** 分别将收集两天的尿液进行过滤,旋至浸膏,取  $10 \text{ g}$  浸膏转移至离心管中,加 10 倍量甲醇,超声提取  $30 \text{ min}$ ,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $30 \text{ min}$ ,取上清液,旋干,加甲醇转移至离心管中,再离心,再取上清液旋干,用  $4 \text{ mL}$  色谱纯甲醇溶解,过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜至液相小瓶中即得空白及给药尿液的供试品。

**2.4.2 空白、给药粪便的处理** 分别将收集 2 d 的粪便在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中烘干,用研钵研细,取  $15 \text{ g}$  研磨好的粪便加 10 倍量甲醇超声提取  $30 \text{ min}$ ,超声后静置,倒出上清液,依次进行 3 次,最后合并上清液并旋干,再加 10 倍量甲醇  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $30 \text{ min}$ ,取上清液,旋干,用  $10 \text{ mL}$  色谱纯甲醇溶解,过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜至液相小瓶中即得空白及给药粪便的供试品。

**2.4.3 大鼠心脏取血及处理** 第 3 次灌胃给药 1 h 后取血,取血前腹腔注射水合氯醛 ( $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉,真空采血管 (内置肝素钠) 取血  $2 \text{ mL}$ ,取完后上下缓慢摇匀避免其凝血。将得到的血液  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $30 \text{ min}$ ,取  $4 \text{ mL}$  血清加入  $40 \text{ mL}$  甲醇沉淀蛋白,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $30 \text{ min}$ ,取上清液旋干,加  $5 \text{ mL}$  色谱甲醇复溶,过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜至液相小瓶中即得空白及给药粪便的供试品。

## 3 结果与分析

### 3.1 罗汉果醇制备结果

经高效液相检测 ( $203 \text{ nm}$ ) 罗汉果醇单体百分含量为  $98.98\%$  (面积归一化法,图 1),重量为  $1.16 \text{ g}$ ,收率为  $2.43\%$ 。

### 3.2 罗汉果醇体内代谢实验结果

罗汉果醇的负离子一级质谱图中,主要检测到罗汉果醇的准分子离子  $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$  ( $m/z$  521),二级质谱图中可见裂解产生的特征碎片离子 ( $m/z$  457、429、407、385、377 等)。这些碎片离子为罗汉果醇代谢产物的结构分析提供了重要信息,图 2 为罗汉果醇的结构式。

代谢产物通常与原形成分具有极其相似的母核

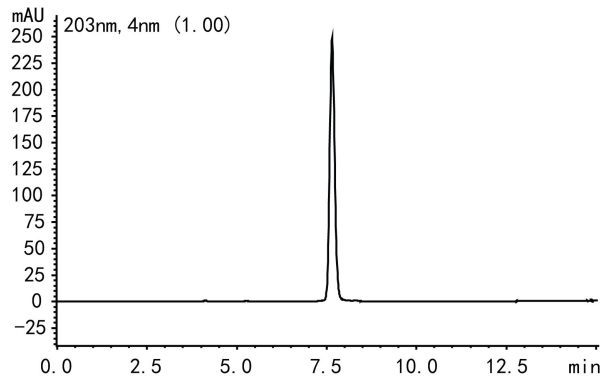


图 1 罗汉果醇纯度检查液相色谱图 ( $203 \text{ nm}$ )

Fig. 1 Purity test of mogrol by HPLC ( $203 \text{ nm}$ )

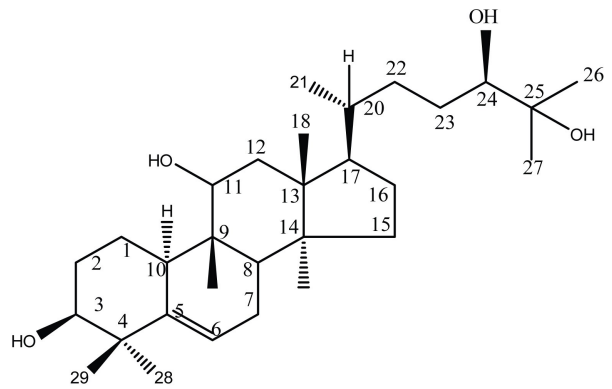


图 2 罗汉果醇  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_4$  (分子量 476.3866) 的结构式

Fig. 2 Chemical structure of mogrol  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_4$  (formula weight of 476.3866)

结构。通过对比分析给药后生物样品及空白生物样品的一级质谱色谱图,可发现给药后生物样品中存在的代谢产物。进一步比较代谢产物与原形成分的色谱保留时间及多级质谱裂解规律,并参考已知的体内代谢过程,可初步推测代谢产物的结构。

与空白生物样品相比,灌胃给药罗汉果醇后,在给药后生物样品中除检测到原形成分外,还可检测到多个代谢产物。具有代表性的一些代谢产物的特征提取离子流图见图 3、图 4 和图 5。

从图 3:B 中的提取离子流图可知,含药粪便和空白粪便相比,含有 10 多个罗汉果醇的三羟基化代谢产物,它们是一组同分异构体。罗汉果醇结构中已有 4 个羟基,再上 3 个羟基,总共有 7 个羟基,在一级质谱中均可见准分子离子峰  $m/z$  569.36 ( $[\text{M} + \text{HCOOH} - \text{H}]^-$ ),在二级质谱中可见碎片离子  $m/z$  523.36,中性丢失  $46 \text{ Da}$  ( $\text{HCOOH}$ )。这些代谢产物的具体结构仅靠液质尚无法鉴定,但对于进一步

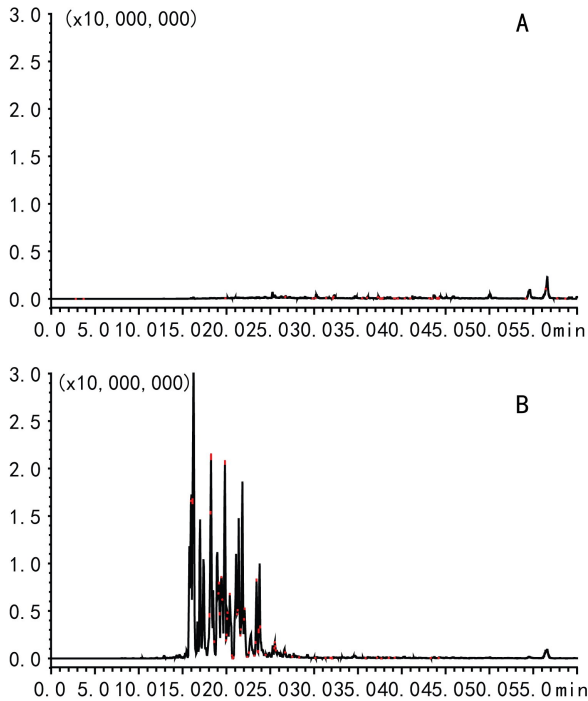


图 3 三羟基化罗汉果醇的提取离子流图 ( $m/z$  569.3695,  $[M+HCOOH-H]^-$ ) A: 空白粪便; B: 给药粪便。

Fig. 3 MIC ( $m/z$  569.3695) of dihydroxylation of mogrol  
A: Blank feces; B: Drug feces.

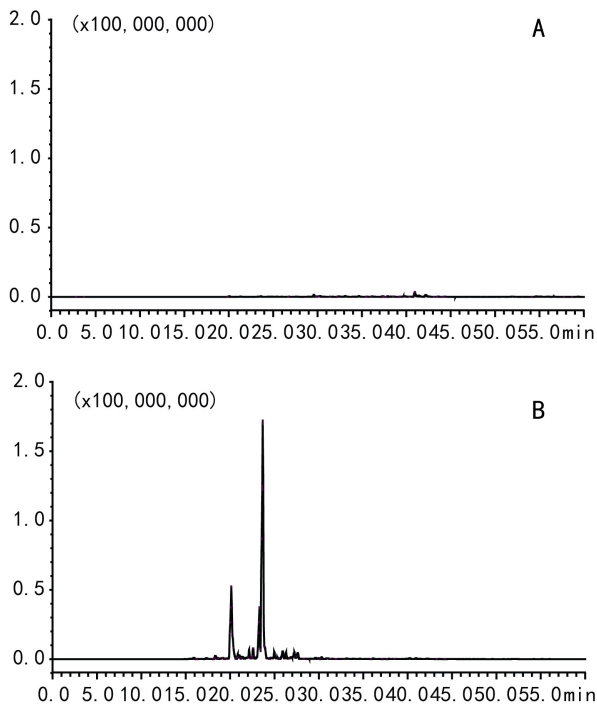


图 4 二羟基化罗汉果醇的提取离子流图 ( $m/z$  553.3741,  $[M+HCOOH-H]^-$ ) A: 空白粪便; B: 给药粪便。

Fig. 4 MIC ( $m/z$  553.3741) of dihydroxylation of mogrol  
A: Blank feces; B: Drug feces.

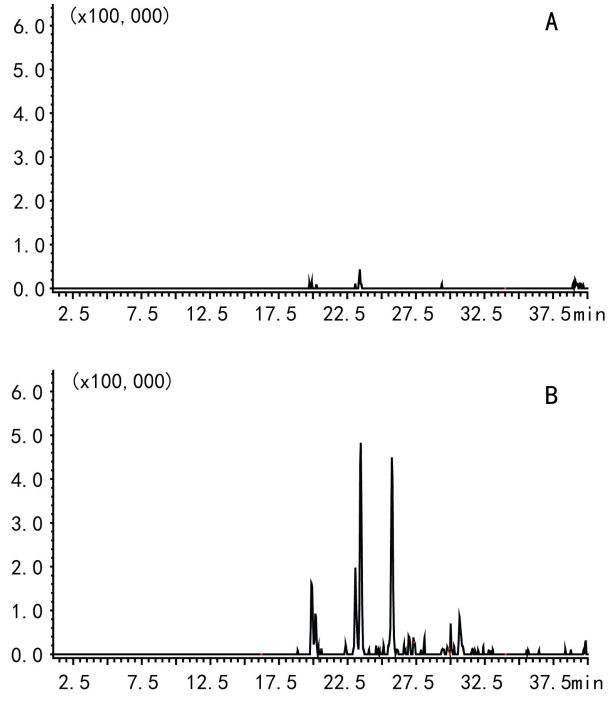


图 5 二羟基化罗汉果醇的提取离子流图 ( $m/z$  553.3741,  $[M+HCOOH-H]^-$ ) A: 空白血液; B: 给药血液。

Fig. 5 MIC ( $m/z$  553.3741) of dihydroxylation of mogrol  
A: Blank serum; B: Drug serum.

的化学分离具有指导意义。

从图 4:B 和图 5:B 中的提取离子流图可知,含药样品和空白样品相比,也含有多个罗汉果醇的二羟基化代谢产物,它们也是一组同分异构体。在一级质谱中均可见准分子离子峰  $m/z$  553.3741 ( $[M+HCOOH-H]^-$ ),在二级质谱中可见碎片离子  $m/z$  507.37,中性丢失 46 Da ( $HCOOH$ )。在含药血液中也检测到了和含药粪便中同样的代谢产物,说明罗汉果醇灌胃给药后能经过吸收和代谢进入血液从而发生作用。

## 4 结论与讨论

本研究采用 HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup> 法检测了罗汉果醇在大鼠粪便、血浆、尿液中的可能的代谢产物,罗汉果醇在大鼠体内的代谢途径并不复杂,主要发生羟基化、异构化反应,但其同分异构体很多,由于缺少充分的碎片信息以及合理的裂解规律,目前鉴定代谢产物的具体结构较为困难。为了确定上述代谢产物的准确结构,我们正在从粪便中分离纯化这些代谢产物,并将采用波谱学技术对它们进行结

构鉴定。

本研究首次采用液质联用技术对高纯度的罗汉果醇( $\geq 98\%$ )在大鼠体内的代谢进行了研究,首次从含药粪便、血浆中检测到了高度氧化的罗汉果醇代谢产物。而在化学成分和药理活性方面,罗汉果已被研究的相对比较深入,但其皂苷类成分在体内的吸收和代谢方面的研究相对较少,故本文对罗汉果中主要皂苷类成分的苷元进行代谢方面的研究,推测其吸收代谢途径,为进一步阐明罗汉果醇在体内的代谢途径以及罗汉果皂苷类成分在体内的显效形式奠定基础。

## 参考文献:

Chen XB, Zhuang JJ, Liu JH, et al. 2011. Potential AMPK activators of cucurbitane triterpenoids from *Siraitia grosvenorii* Swingle[J]. *Bioorg & Med Chem*, (19): 5 776—5 781

Dianpeng Li, Tsuyoshi Ikeda, Toshihiro Nohara, et al. 2007. Cucurbitane glycosides from unripe fruits of *siraitia grosvenorii* [J]. *Chem Pharm Bull*, **55**(7): 1 082—1 086

Kasai R, et al. 1989. Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* a Chinese folk medicine[J]. *Agri Biol Chem*,

**53**(12): 3 374

Li DP(李典鹏), Zhang HR(张厚瑞). 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo—a special local product of Guangxi(广西特产植物罗汉果的研究与应用)[J]. *Guihaia* (广西植物), **20**(3): 270—276

Li DP, Tsuyoshi I, Nanae M, et al. 2006. Cucurbitane glycosides from unripe fruits of *Lo Han Kuo* (*Siraitia grosvenorii*) [J]. *Chem Pharm Bull*, **54**(10): 1 425—1 428

Matsumoto K, Kasai R, Ohtani K, et al. 1990. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* (cucurbitaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, **38**(7): 2 030

Murata Y, Ogawa T, Suzuki YA, et al. 2010. Digestion and absorption of *Siraitia grosvenorii*; triterpenoids in the rat[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**(3): 673—676

Si JY(斯建勇), Chen DH(陈迪华), Chang Q(常琪), et al. 1996. Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of *Siraitia grosvenorii* (罗汉果中三萜苷的分离和结构测定)[J]. *Integr Plant Biol* (植物学报), **38**(6): 489—494

Wang Q(王勤), Li AY(李爱媛). 1999. Pharmacological research of *Momordica grosvenorii* (罗汉果的药理作研究)[J]. *J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **24**(7): 425—428

Yang XW(杨秀伟), Zhang JY(张建业), Xu W(徐崑). 2007. Bio-transformation of mogroside III by human intestinal bacteria(罗汉果皂苷Ⅲ的人肠内细菌生物转化)[J]. *J Peking Univ: Health Sci Edit* (北京大学学报·医学版), (6): 657—662

(上接第159页 Continue from page 159)

*West Chin J Pharm Sci* (华西药科学杂志), **25**(5): 559—560

Qiu YK(邱鹰昆), Tian F(田芳), Dou DQ(窦德强), et al. 2008. Studies on chemical constituents from leaves of *Smallanthus sonchifolius* (亚贡叶的化学成分研究)[J]. *Chin Trad & Herb Drug* (中草药), **39**(10): 1 146—1 148

Thuy TT, Lam TH, Huong NTT, et al. 2012. Natural phenoxazine alkaloids from *Peristrophe bivalvis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, **44**: 205—207

Thuy TT, Huong NTT, Nhung le TH, et al. 2013. Isolation, characterisation and biological evaluation of a phenoxazine, a natural dyestuff isolated from leaves of *Peristrophe bivalvis* [J]. *Nat Prod Res*, **27**(8): 771—774

Wiat C, Mogana S, Khalifah S, et al. 2004. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia [J]. *Fitoterapia*, **75**: 68—73

Wang LW(王丽薇). 2007. Studies on the chemical constituents in the fruit of *Schisandra Chinensis* (北五味子的化学成分)[J]. *J Hangzhou Teac Coll: Nat Sci Edit* (杭州师范学院学报·自然科学版), **6**(5): 462—463

Xie YC(谢运昌), Jiang XH(蒋小华), Zhang M(张冕). 2008. Chemical constituents of the volatile oil from *Peristrophe baphica* (红丝线挥发油的化学成分)[J]. *Guihaia* (广西植物), **28**(1): 136—138

Xu YL(徐玉琳), Lin Y(林颖), Zhou C(周诚), et al. 2008. Content Determination of Polysaccharides in *Dicliptera chinensis* (L.) Nees and *Peristrophe roxburghian* (Schult) Bremek by UV(UV法测定狗肝菜与红丝线草的多糖含量)[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临

床药理), **19**(5): 387—389

Yang Y(杨毅), Wang Z(王真), Li XM(李旭梅). 2008. The effects of *Peristrophe Baphica* on immunological function of mice(野靛青对小鼠免疫功能的影响)[J]. *Her Med* (医药导报), **27**(1): 26—27

Yang Y(杨毅), Wang Z(王真), Gu YL(顾艳玲), et al. 2013. Study on chemical constituents of *Peristrophe baphica* (野靛青化学成分研究)[J]. *Chin Arch Trad Chin Med* (中华中医药学刊), **31**(3): 665—666

Yao XQ(姚小青), Liu XM(刘晓明), Yang ZJ(杨朝竣), et al. 2012. Extraction and isolation of Peristrophine in *Peristrophe roxburghiana* Brem and its content determination(山蓝中红丝线素的分离纯化研究与含量测定)[J]. *Chin Pharm J* (中国药科学杂志), **47**(18): 1 535—1 538

Yu N(于宁). 2004. Preparation and Properties Analysis of Alkyl Polyglucosides(烷基糖苷的合成及物化性能分析)[D]. Dalian (大连): Dalian University of Technology (大连理工大学)

Zhang LH(张雷红), Zhang XQ(张晓琦), Jiang YN(江永南), et al. 2008. Studies on chemical constituents of the herb of *Euphorbia latifolia* (宽叶大戟全草化学成分研究)[J]. *Chin Med Mat* (中药材), **31**(24): 2 911—2 913

Zhen HSC(甄汉深), Zhu XY(朱雪妍), Lu RM(卢汝梅), et al. 2008. Research on chemical constituents from ctem of *Gymnema sylvestre* (匙羹藤茎化学成分研究)[J]. *Chin Med Mat* (中药材), **31**(8): 1 154—1 156

Zhou YC(周玉成), Chen DJ(陈东军), Zhu P(朱萍). 1998. The analysis of APG by NMR(烷基糖苷的核磁共振分析)[J]. *Spec Petrochem* (精细石油化工), **4**: 55—57