

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201405028

卢凤来, 黄振聪, 颜小捷, 等. 罗汉果皂苷 V 在人工胃液中的稳定性和体外代谢研究[J]. 广西植物, 2015, 35(6):792—795

Lu FL, Huang ZC, Yan XJ, et al. Stability of mogroside V in artificial gastric juice and its metabolism *in vitro*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(6):792—795

罗汉果皂苷 V 在人工胃液中的稳定性和体外代谢研究

卢凤来¹, 黄振聪², 颜小捷¹, 陈月圆¹, 徐 风³, 蔡少青³, 李典鹏^{1*}

(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. 贺州市人民医院药剂科, 广西 贺州 542800; 3. 北京大学 药学院, 北京 100191)

摘 要: 为了研究罗汉果皂苷 V 在胃肠道中的稳定性及体外代谢特征, 该研究首先考察罗汉果皂苷 V 在人工胃液中的稳定性, 然后在体外模拟人肠内环境, 研究人肠内细菌对该成分的代谢作用, 并采用 LCMS/IT-TOF 液质联用仪分析了培养液中的化学成分, 考察了罗汉果皂苷 V 在人工胃液和人肠道菌群培养液中的变化。结果表明: 罗汉果皂苷 V 在人工胃液条件下, 迅速发生酸水解反应, 分别脱去 3 个糖苷、4 个糖苷、5 个糖苷及 2 个氢转化为二糖苷、一糖苷与脱氢苷元, 其脱糖反应随着时间的延长而反应越完全, 反应 4 h 后就只剩下苷元; 该化合物在人的肠道菌群作用下经过脱糖反应转化为四糖苷、三糖苷、二糖苷、一糖苷, 经过糖苷化反应转化成六糖苷。通过体外实验, 初步了解罗汉果皂苷 V 在胃液和肠道环境中的降解规律, 该研究结果为今后探讨罗汉果皂苷在人体内的代谢与生物转化规律提供了物质和技术基础。

关键词: 罗汉果皂苷 V; 人肠道菌群; 人工胃液; 液相色谱—质谱联用

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0792-04

Stability of mogroside V in artificial gastric juice and its metabolism *in vitro*

LU Feng-Lai¹, HUANG Zhen-Cong², YAN Xiao-Jie¹, CHEN Yue-Yuan¹,
XU Feng³, CAI Shao-Qing³, LI Dian-Peng^{1*}(1. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany,**Guilin 541006, China; 2. Pharmacy Department of Hezhou People's Hospital, Hezhou 542800, China;**3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)*

Abstract: In order to evaluate the stability of mogroside V in gastrointestinal tract and study its *in vitro* metabolism, mogroside V was incubated with artificial gastric juice and human intestinal bacteria, and a liquid chromatography/mass spectrometry method by LCMS/IT-TOF was applied to analyze the products of mogroside V in artificial gastric juice and human intestinal bacteria culture medium. The results indicated that mogroside V was degraded quickly in artificial gastric juice to be secondary glycosides with two glycosyls or one glycosyl and mogrol without glycosyl. And the longer time it was incubated, the more completely it was degraded, its product was mogrol while the incubation time was 4 h. While in culture medium of human intestinal bacteria, mogroside V was transformed to mogroside IV(isomer) mogroside III(isomer), mogroside II(isomer) and mogroside I(isomer) by deglycosylation reaction, as well as to glycoside with six glycosyls, by glucosylation reaction. Therefore, a general knowledge on the degradation of mogroside V was obtained after this experiment, which would shed light on the further exploitation of mogroside V and *Siraitia grosvenorii*.

收稿日期: 2014-08-12 修回日期: 2014-10-26

基金项目: 国家自然科学基金(81160392, 81160518); 国家科技支撑计划项目(2011BAI01B03); 桂林市科学研究与技术开发项目(20120118-6, 20110112-16)。

作者简介: 卢凤来(1979-), 女(壮族), 广西来宾人, 博士研究生, 副研究员, 主要从事植物资源开发与利用研究, (E-mail) lufenglai@gxib.cn。

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

Key words: mogroside V; human intestinal bacteria; artificial gastric juice; liquid chromatography/mass spectrometry

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)为有名的药食两用植物,其干燥果实对呼吸系统和消化系统具有多种药理作用,能保肝降酶、治疗糖尿病和预防其并发症,具有调节免疫功能、活血化瘀、抑制变形链球菌、抗癌、清除自由基及抗氧化等作用(王勤等,1999;张宏等,2011)。罗汉果主要含有皂苷类成分,该类成分具有镇咳、祛痰、平喘、调节免疫功能(刘婷等,2007)、降低血糖(白玉鹏等,2009;何超文等,2012a;张俐勤等,2006)、抗病毒、抗肿瘤、抗疲劳(何超文等,2012b;夏星等,2012)等药理作用(廖长秀等,2010;农毅清等,2008;宋阳成等,2005)。多种天然产物口服后在消化道内可以被降解,也可以被肠道菌群代谢,部分天然产物经肠道细菌代谢后转化为具有药理或毒理活性的新化合物。因此许多天然药物以前药形式存在,肠道细菌在其代谢过程中发挥了至关重要的作用。

目前,有关罗汉果皂苷 V 的代谢实验还鲜有报道。Murata *et al.*(2010)初步研究了罗汉果总皂苷(皂苷 V 含量为 72%)在大鼠肠道内的消化和吸收;杨秀伟等(2007)研究了罗汉果皂苷 III 的人肠内细菌生物转化。罗汉果皂苷 III 是未成熟果中的主要皂苷成分,具有苦味,目前尚未开发利用。罗汉果皂苷 V 是成熟果中的主要有效成分和甜味成分,已广泛应用于甜味剂等。为了更好地开发利用罗汉果皂苷,探讨其体内药效物质,本研究首先考察罗汉果皂苷 V 在人工胃液中的稳定性,然后在体外模拟人肠内环境,研究人肠内细菌对该成分的代谢作用,旨在通过体外代谢实验为今后探讨罗汉果皂苷在人体内的代谢与生物转化规律提供物质和技术基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

罗汉果皂苷 V(本实验室从罗汉果药材中分离纯化得到,纯度 $\geq 98\%$)。胃蛋白酶(生化试剂,国药集团北京试剂有限公司);盐酸、正丁醇(分析纯,北京化工厂);甲醇(色谱纯、分析纯,均由天津市西华特种试剂厂提供);超纯水(实验室 Milli-Q 制备)。胰蛋白胍、大豆蛋白胍、胰酪、酵母浸膏、消化血清粉、牛肉膏、可溶性淀粉、L-半胱氨酸盐酸盐均为生化试剂,购自北京奥博星生物技术有限责任公司;牛

肝浸出粉(生化试剂,北京双旋微生物培养基制品);葡萄糖、 KH_2PO_4 、NaCl、NaOH 均为分析纯,购自北京化工厂。

1.2 仪器

液质联用仪 LCMS/IT-TOF(岛津公司),ESI 离子源。LC-20A 液相系统:二元泵,LC-20AD;自动进样器,SIL-20AC;柱温箱,CTO-20A;PDA 检测器,SPD-M20A。LCMS Solution Software Version 3.60 工作站。Heidolph Laborota 4001 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);R-200 旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司);KQ-500DE 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);超低温冰箱(Thermo scientific 公司);低速离心机 Anke TDL-5-A Centrifuge(上海安亭);百分之一电子天平(上海良平);十万分之一电子天平(BP211D 型,Sartorius AG)。

2 方法

2.1 罗汉果皂苷 V 溶液的制备

16 mg 罗汉果皂苷 V 纯品,用 4 mL 水溶解,配得 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 罗汉果皂苷 V 水溶液。

2.2 罗汉果皂苷 V 在人工胃液中的稳定性研究

人工胃液制备:取稀盐酸 16.4 mL,加水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀后,加水稀释成 1 000 mL 即得。稀盐酸浓度为 9.5%~10.5%(取 234 mL 浓盐酸加水稀释成 1 000 mL 即可)。

取 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 罗汉果皂苷 V 水溶液 2 mL,与 23 mL 温度为 37 °C 人工胃液充分混合,用移液管分装于编号为 1~5 号的 5 支试管中(预先置于 37 °C 恒温水浴中),每管 4 mL,37 °C 恒温水浴中反应。然后分别用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液在 0、1、2、3、4 h 时终止反应,并调节 pH 值至 7,加 6 倍量甲醇沉淀蛋白,超声 20 min,离心,取上清液,浓缩至干,甲醇溶解,0.45 μm 滤膜滤过,进行液质分析。

2.3 罗汉果皂苷 V 的肠道菌群代谢实验

人肠内混合菌群的制备见杨秀伟等(2004)。普通厌氧培养基(GAM)的配制见杨秀伟等(2005)。取 9.14 mL 菌液作为菌液对照组,9.1 mL 培养液中加入 40 μL 罗汉果皂苷 V 溶液,制得对照组培养液;9 mL 已灭菌培养基加入 100 μL 菌液以及 40

μL 罗汉果皂苷 V 溶液为肠菌实验组。将以上各组在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养 48 h。取出,用等体积的水饱和正丁醇萃取 6 次,合并萃取液, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下浓缩至干,少量甲醇溶解, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜滤过,进行液质分析。

2.4 LC-MS 分析条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 ($250 \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);柱温为 $35\text{ }^\circ\text{C}$,流速为 $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分流为 $0.2\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进质谱,进样体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$,检测波长为 210 nm ;流动相(A: 0.1% 甲酸水溶液,B:乙腈),梯度洗脱程序见表 1。质谱参数见表 2。

表 1 液相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure of HPLC

时间 Time (min)	0	10	20	35	60	70	80
B 浓度 Concentration of B (%)	10	18	28	45	90	100	100

表 2 质谱参数

Table 2 Parameters of mass spectrometer

参数 Parameter	设定值 Set value
离子源 Ion source	ESI
MS 检测范围 Detection range of MS (m/z)	300~2000
二级质谱 MS^2 (m/z)	50~2000
三级质谱 MS^3 (m/z)	50~2000
雾化气(氮气)流速 Nebulizing gas flow rate (N_2)	$1.5\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$
检测器电压 Detector voltage	1.70 kV
CID 能量 CID Energy	50%
检测模式 Detection pattern	正/负离子 Positive/ Negative ion
典型脱溶剂管温度 Temperature of curved desolvation tube	$200\text{ }^\circ\text{C}$
加热块温度 Temperature of heat block	$200\text{ }^\circ\text{C}$
泵最大压力 Maximum pressure of pump	20 MPa
PDA 扫描波长 Wavelength of PDA scanning	195~400 nm
接口电压 Interface voltage (+)	4.5 kV
接口电压 Interface voltage (-)	-3.5 kV

表 3 罗汉果皂苷 V 在人工胃液中产生的降解产物的液质信息

Table 3 LC-MS data of the degradation products of mogroside V in artificial gastric juice

编号 No.	保留时间 t_R (min)	测量值 MV (Da) (m/z)	预测值 PV (D) (m/z)	误差 Error (ppm)	不饱和度 DBE	分子式 Formula	结构鉴定 Identification	生物转化 Biotrans- formation	A	B	C	D	E
G1	28.66	845.4904	845.4904	0	7	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	mogroside II isomer	-3Glc	▲	▲	▲		
G2	28.91	845.4898	845.4904	-0.71	7	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	mogroside II isomer	-3Glc		▲	▲	▲	
G3	29.22	799.4876	799.4849	3.38	7	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	mogroside II isomer	-3Glc		▲	▲	▲	
G4	33.20	845.4882	845.4904	-2.60	7	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	mogroside II isomer	-3Glc					▲
G5	37.35	683.4357	683.4376	-2.78	6	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	mogroside I	-4Glc					▲
G6	53.31	519.3665	519.3691	-5.01	6	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4$	mogrol-2H	-5Glc,-2H					▲

注: A. 人工胃液(0 h); B. 人工胃液(1 h); C. 人工胃液(2 h); D. 人工胃液(3 h); E. 人工胃液(4 h); t_R . 保留时间; MV. 测量值; PV. 预测值。下同。

Note: A. Artificial gastric juice(0 h); B. Artificial gastric juice(1 h); C. Artificial gastric juice(2 h); D. Artificial gastric juice(3 h); E. Artificial gastric juice(4 h); t_R . Retention time; MV. Measurement value; PV. Predictive value. The same below.

表 4 罗汉果皂苷 V 在人工肠道菌群培养液中产生的代谢产物的质谱信息

Table 4 LC-MS data of the metabolites of mogroside V in human intestinal bacteria culture medium

峰编号 Peak No.	保留时间 t_R (min)	测量值 MV(Da) (m/z)	预测值 PV(Da) (m/z)	误差 Error (ppm)	不饱和度 DBE	分子式 Formula	结构鉴定 Identification	生物转化 Biotransformation
M1	22.80	1447.6929	1147.6962	-2.28	11	$\text{C}_{66}\text{H}_{112}\text{O}_{34}$	mogroside VI isomer	+1Glc
M2	25.67	1123.5892	1123.5906	-1.25	9	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$	mogroside IV isomer	-1Glc
M3	26.08	1123.5862	1123.5909	-3.92	9	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$	mogroside IV isomer	-1Glc
M4	26.31	1123.5852	1123.5906	-4.81	9	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$	mogroside IV isomer	-1Glc
M5	27.21	961.5390	961.5378	1.25	8	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{19}$	mogroside III isomer	-2Glc
M6	33.20	845.4882	845.4904	-2.60	7	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	mogroside II isomer	-3Glc
M7	34.80	683.4361	683.4376	-2.19	6	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	mogroside I isomer	-4Glc
M8	37.35	683.4357	683.4376	-2.78	6	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	mogroside I isomer	-4Glc

3 结果与分析

3.1 罗汉果皂苷 V 在人工胃液中的稳定性分析

通过各生物样品的 BPC、EIC 图,得到各降解

产物的精确分子量及分子式等(表 3)。表 3 显示,罗汉果皂苷 V 在人工胃液条件下,迅速发生酸水解反应,转化为次生皂苷,且随着时间延长,降解越完全,直至苷元,苷元可以脱去 2 个氢原子,生成脱氢罗汉果醇。本研究通过罗汉果皂苷 V 在体外人工

胃液中的降解情况, 推测其以口服方式给药后在体内胃中的降解规律, 为今后进行体内研究奠定基础。

3.2 罗汉果皂苷 V 在人肠道菌群中的转化产物分析

将各样品按 2.3 步骤处理后, 用 HPLC-ESI-IT-TOF-MSⁿ 检测分析, 得到各样品的液相色谱图、负离子模式的 BPC、EIC 图。通过对照罗汉果皂苷 V 肠菌实验组与对照组、空白组的图谱, 从实验组中找到多出的化学成分, 各成分的分子式及精确分子量等(表 4)。表 4 显示, 罗汉果皂苷 V 在人的肠道菌群作用下发生糖苷化和脱糖反应, 转化为次生皂苷和六糖苷。推测罗汉果皂苷 V 在人肠道中主要是在肠道菌群的作用下发生降解反应, 从而影响原形药物的吸收。

4 讨论与结论

通过体外实验, 我们对罗汉果皂苷 V 在胃液和肠道环境中的降解规律有了大致了解。罗汉果皂苷 V 在胃液和肠道细菌液中, 主要被降解为相应的次生皂苷, 这与 Murata *et al.* (2010) 在大鼠体内的研究结果较一致。由此可知, 该化合物在体内会转化为多种化合物, 那么其药理作用究竟是它本身的作用, 还是其代谢产物的作用, 有待深入研究。

在本研究中, 由于通过质谱技术只能得知与苷元连接的糖基数, 连接的具体位置尚无法准确得知, 可以同分异构体的具体结构还无法鉴定。而将这些化合物分离出来, 采用波谱技术进行鉴定, 或者采用液相色谱—核磁共振联用的方法进行结构鉴定, 将是本课题今后的研究方向之一。

参考文献:

Bai YP(白玉鹏), Li N(李娜), Gu H(顾晔), *et al.* 2009. Protective effects of *Momordica grosvenorii* extracts on blood vessels of diabetic rats and related mechanism(罗汉果皂苷提取物对实验性糖尿病大鼠的血管保护作用及机制)[J]. *Shanghai Med J* (上海医学), **32**(5): 400—405

Esther. 2003. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons[J]. *Toxicol Appl Pharmac.* **189**: 233—246

Chen WP(陈万平), Sun X(孙翔), Chen PY(程鹏远). 2008. Investigation of the *in vitro* metabolism of drugs in rats liver(体外药物肝代谢研究进展)[J]. *J Fourth Mil Med Univ*(第四军医大学学报), **29**(9): 861—863

He CW(何超文), Yao MC(姚美村), Xia X(夏星), *et al.* 2012a. Regulation effect of fresh mangosteen saponins on blood sugar (鲜罗汉果皂苷对小鼠血糖的调节作用研究)[J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), **28**(4): 382—386

He CW(何超文), Xia X(夏星), Zhu XY(朱晓韵), *et al.* 2012b. The anti-fatigue activity of fresh tissue culture seedling *Grosvenor* *Momordica* fruit(组培苗鲜罗汉果抗疲劳活性研究)[J]. *Food Sci Technol* (食品科技), **37**(8): 75—78

Liao CX(廖长秀), Li SB(李曙波), Xue Q(薛强), *et al.* . 2010. Antagonism of *Siraitia grosvenorii* to liver injury by ethonal (罗汉果皂苷对乙醇所致肝损伤的拮抗作用)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), **21**(12): 3 116—3 117

Liu T(刘婷), Wang XH(王旭华), Li C(李春), *et al.* Study on the antitussive, expectorant and antispasmodic effects of saponin V from *Momordica grosvenorii* (罗汉果皂苷 V 的镇咳、祛痰及解痉作用研究)[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2007, **42**(20): 1 534—1 537

Lu AM(路安民), Zhang ZG(张志耕). 1984. The genus *Siraitia* Merr in China(中国罗汉果植物属)[J]. *Guihaia* (广西植物), **4** (1): 27—33

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

Song YC(宋阳成). 2005. The study on the mogrosides extraction and application of *Siraitia grosvenorii* (罗汉果甜甙的提取、提纯及应用的研究)[D]. Changchun(长春): Northeast Normal University(东北师范大学)

Nong YQ(农毅清), Jiang L(蒋林). 2008. The study on the mogrosides extraction and pharmacologic action of *Siraitia grosvenorii* (罗汉果甜甙的提取与药理作用研究概况)[J]. *Guangxi J Trad Chin Med* (广西中医药), **31**(1): 6

Wang Q(王勤), Li AY(李爱媛), Li XP(李献萍), *et al.* 1999. Pharmacologic action of *Siraitia grosvenorii* (罗汉果的药理作用研究)[J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **24**(7): 425—428

Xia X(夏星), Zhong ZG(钟振国), Lin CY(林彩云), *et al.* 2012. Anti-fatigue and hypoxia tolerance effect of mogrosides in mice (罗汉果皂苷抗疲劳及耐缺氧作用)[J]. *Chin J Experim Trad Med Form* (中国实验方剂学杂志), **18**(17): 198—201

Zhang H(张宏), Li XH(李啸红). 2011. Research advance of Pharmacological effects and toxicity of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey(罗汉果的药理作用和毒性研究进展)[J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **27**(05): 430—433

Zhang LQ(张俐勤), Qi XY(戚向阳), Chen WJ(陈维军), *et al.* 2006. Effect of mogroside extracts on blood glucose, blood lipid and antioxidation of hyperglycemia induced by Alloxan(罗汉果皂苷提取物对糖尿病小鼠血糖血脂及抗氧化作用的影响)[J]. *Chin Pharmac Bull* (中国药理学通报), **22**(2): 237—40

Yang XW(杨秀伟), Zhao J(赵静), Cui JR(崔景荣), *et al.* 2004. Studies on the biotransformation of escin Ia by human intestinal bacteria and the anti-tumor activities of desacylescinn I(七叶树皂苷-Ia 的人肠内细菌生物转化产物活性研究及其抗肿瘤活性研究)[J]. *J Peking Univ: Health Sci Ed* (北京大学学报·医学版), **31**(1): 31—35

Yang XW(杨秀伟), Zhang JY(张建业), Xu Z(徐嵬), *et al.* 2005. The biotransformation of kaempferitrin by human intestinal flora(山柰苷的人肠内细菌生物转化研究)[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), **40**: 717—721

Yang XW(杨秀伟), Zhang JY(张建业), Xu Z(徐嵬). 2007. Biotransformation of mogrosin 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 Ed* (北京大学学报·医学版), **39**(6): 657—662