

罗汉果醇在大鼠血浆中代谢产物鉴定及药代动力学研究

刘善桂^{1,2}, 戴晓健², 钟大放², 张朝凤^{1*}, 陈笑艳^{2*}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 罗汉果醇是七种罗汉果皂苷和赛门苷 I 的苷元, 因其具有抗白血病和糖尿病的活性, 日益受到关注。本文采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UHPLC-Q-TOF/MS) 法鉴定了大鼠灌胃给予 100 mg·kg⁻¹ 罗汉果醇后血浆主要代谢产物, 并建立液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法测定血浆中主要成分浓度, 以评价其药代动力学。大鼠灌胃给予罗汉果醇后, 血浆以原形药物为主, 检测到 13 种代谢产物, 主要为单氧化和脱氢代谢产物。定量分析时, 为提高灵敏度, 采用锂加合离子作为前体离子。测定大鼠血浆中罗汉果醇线性范围为 5.00~1 000 ng·mL⁻¹。质控样品的日内、日间精密性 (RSD) 小于 9.3%, 准确度 (RE) 在 -4.5%~2.9% 之间。大鼠灌胃给予罗汉果醇后, 吸收迅速, 达峰时间大约为 1.67 h, 血浆清除半衰期约 2.34 h, 绝对生物利用度仅为 3.5%。

关键词: 罗汉果醇; UHPLC-Q-TOF/MS; 代谢产物; LC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1452-06

Identification of metabolites and pharmacokinetics of mogrol in rat plasma

LIU Shan-gui^{1,2}, DAI Xiao-jian², ZHONG Da-fang², ZHANG Chao-feng^{1*}, CHEN Xiao-yan^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Mogrol is the aglycone of seven kinds of mogrosides and siamenoside I. Mogrol has drawn more attention in recent years for its anti-leukemia and anti-diabetes activities. An ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS) method was applied to identify the main metabolites of mogrol in rat plasma. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for determination of the main components in rat plasma. After an oral administration of 100 mg·kg⁻¹ mogrol in rats, 13 metabolites were detected along the main component of parent drug in the plasma. The major metabolites were oxidated and dehydrogenated products. In this study, mogrol was quantitative analyzed using lithium carbonate reagent with high sensitivity. The assay was linear in concentration range 5.00-1 000 ng·mL⁻¹ with intra- and inter- day precision within 9.3% and accuracy in range of -4.5% to 2.9%. Mogrol was absorbed into the blood very fast after oral administration, and the time to reach maximum concentration (t_{max}) was 1.67 h. The half-life ($t_{1/2}$) of mogrol in rats was 2.34 h, and the oral absolute bioavailability was 3.5%.

Key words: mogrol; UHPLC-Q-TOF/MS; metabolite; LC-MS/MS; pharmacokinetics

罗汉果为葫芦科植物罗汉果的干燥果实, 具有

清热润肺、利咽开音、滑肠通便的功效^[1]。现代的药理学研究表明罗汉果具有抗糖尿病、抗癌、抗氧化等作用^[2-4]。

罗汉果皂苷类成分是罗汉果的主要化学成分。体内、外实验结果均表明罗汉果皂苷 IA₁、IE₁、II E、III、

收稿日期: 2017-04-09; 修回日期: 2017-06-20.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-86185140, E-mail: njchaofeng@126.com

Tel / Fax: 86-21-50800738, E-mail: xychen@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0341

IV、IVE、V 和赛门昔 I 可脱掉糖基变为相应苷元——罗汉果醇 (结构见图 1A)^[5-7]。近年来, 一些体外实验研究显示, 罗汉果醇具有抗白血病^[8]和糖尿病^[9, 10]的作用。然而, 当前仅有少数文献^[10, 11]报道有关罗汉果醇体内药代动力学过程, 可能与罗汉果醇属于四环三萜类化合物、缺少共轭以及易于电离的基团、体内分析的方法较难建立有关。

本文旨在采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UHPLC-Q-TOF/MS) 法鉴定大鼠血浆中罗汉果醇主要代谢产物, 并建立一种简单、快速、准确的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 方法来测定主要成分血浆浓度, 以评价其药代动力学, 从而为罗汉果醇进一步药用开发奠定基础。

材料与方 法

药品和试剂 罗汉果醇 (纯度 99.0%) 购自成都普瑞法生物科技有限公司; 内标紫杉醇 (图 1B) (纯度 99.6%, 批号: 100382) 购自中国食品药品检定研究院。甲醇 (德国 Merck 公司)、乙腈 (德国 Merck 公司)、醋酸铵 (美国 ROE 公司)、甲酸 (德国 Fluka 公司) 均为色谱纯。碳酸锂 (纯度 99%, 批号: F20090310) 购自国药集团化学试剂公司。去离子水由法国 Millipore 纯水仪制得。

代谢产物鉴定

仪器 美国 Waters 公司的 Acquity UPLC[®]液相色谱系统, 配备 TUV 紫外检测器; 美国 AB SCIEX 公司的 Triple TOF 5600⁺型四极杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF/MS), 配有电喷雾电离源 (ESI 源) 和 CDS 自动校正系统; 控制软件为美国 AB Sciex 公司的 Analyst[®]TFV1.6 和 Waters 公司的 Masslynx V4.1 软件; 数据分析软件为美国 AB Sciex 公司的 MetabolitePilotV1.5 软件。

色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司); 流动相: A 相为含 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇; 梯度

洗脱: 0~1.0 min, 10% B; 1.0~7.0 min, 10%~35% B; 7.0~10.0 min, 35%~65% B; 10.0~16.0 min, 65%~99% B; 16.0~17.0 min, 99%~10% B; 17.0~20.0 min, 10% B。柱温: 40℃; 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 进样量 7.0 μL。

质谱条件 离子源为电喷雾电离源 (ESI 源); 负离子扫描方式检测; 离子源气体 1 (N₂) 压力为 55 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 离子源气体 2 (N₂) 压力为 50 psi; 气帘气体 (N₂) 压力为 40 psi; 源温度为 500℃; 离子喷雾电压 (ISVF) 为 -4.5 kV; 去簇电压为 -80 V; 一级全扫描时碰撞能量为 -10 eV; 产物离子扫描时碰撞能量为 -50 ± 20 eV; 扫描范围为 *m/z* 100~800, 采用自动校正系统 (CDS) 外标法校正质量数。

血浆浓度测定

仪器 美国 Waters 公司的 Acquity UPLC[®]I-Class 液相色谱系统, 配备 ACQUITYFTN 自动进样器; 美国 AB Sciex 公司的 Triple Quad 5500 型三重四极杆串联质谱仪, 配备电喷雾电离源 (ESI 源) 和 Analyst 1.6.2 定量处理软件。

色谱条件 分析柱: XDB C₁₈ 色谱柱 (50 mm×4.6 mm, 1.8 μm, 美国 Agilent 公司); 预柱: C₁₈ 保护柱 (4.0 mm×3.0 mm, 美国 Phenomenex 公司); 流动相: A 相为含 0.25% 甲酸的 0.2 mmol·L⁻¹ 碳酸锂水溶液, B 相为甲醇; 梯度洗脱: 0~0.2 min, 50% B; 0.2~1.2 min, 50%~90% B; 1.2~2.5 min, 90% B; 2.5~2.6 min, 90%~50% B; 2.6~5 min, 50% B。柱温: 40℃; 流速为 0.7 mL·min⁻¹; 进样量 2.0 μL。

质谱条件 离子源为电喷雾电离源 (ESI 源); 正离子多反应监测模式; 源喷射电压为 5 kV; 离子源温度为 550℃; 离子源气体 1 (N₂) 压力为 50 psi; 离子源气体 2 (N₂) 压力为 50 psi; 气帘气体 (N₂) 压力为 15 psi; 去簇电压均为 60 V; 罗汉果醇碰撞能量 (CE) 为 55 eV; 紫杉醇碰撞能量 (CE) 为 32 eV。用于定量分析离子反应对分别为 *m/z* 483.4→447.4 (罗汉果醇) 和 *m/z* 860.3→292.2 (紫杉醇)。

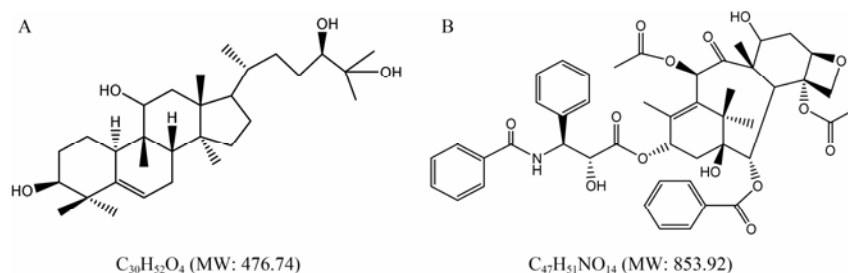


Figure 1 Chemical structures of mogrol (A) and internal standard (IS) paclitaxel (B)

标准系列样品、质控样品的制备 精密称取罗汉果醇两份，一份用于标准系列样品的制备，一份用于质控样品的制备。分别以甲醇溶解并定容，获得浓度约为 $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右的储备液。以大鼠空白血浆稀释储备液，获得标准系列样品和质量控制 (QC) 样品。罗汉果醇标准系列样品血浆浓度分别为 5.00 、 10.0 、 25.0 、 50.0 、 100 、 250 、 500 和 $1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。罗汉果醇 QC 样品的血浆浓度分别为 $5.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (定量下限)、 $15.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低浓度)、 $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (中浓度) 和 $800 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高浓度)。精密称取紫杉醇一份，以甲醇溶解并定容，获得浓度约为 $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右的内标储备液。用甲醇-水 (50:50) 稀释，得到内标工作液 ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

血浆样品预处理 取血浆样品 $50.0 \mu\text{L}$ ，置 1.5 mL 离心管中。分别加入 $25.0 \mu\text{L}$ 内标工作溶液和 $150 \mu\text{L}$ 乙腈，涡流混合 1 min ，离心 5 min ($14000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)。取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

方法学考察

标准曲线和定量下限 罗汉果醇标准系列样品按“血浆样品预处理”项下操作，以每个待测物浓度为横坐标，待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标，用加权 ($W=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算，求得标准曲线。取 LLOQ 样品 (罗汉果醇血浆浓度为 $5.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)，每一天进行 6 样本分析，连续测定 3 天，并根据当日标准曲线计算每一样本测得浓度，求得罗汉果醇的定量下限。

精密度与准确度 取低、中、高 3 个浓度 (罗汉果醇血浆浓度分别为 15.0 、 200 和 $800 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的质控样品，按“血浆样品预处理”项下操作，每一浓度进行 6 样本分析，连续测定 3 天。根据当日的标准曲线，计算 QC 样品的测得浓度，根据 QC 样品结果计算本方法的准确度与精密度。

回收率 取低、中、高 3 个浓度质控样品按“血浆样品预处理”项下操作，每一浓度进行 6 样本分析。同时另取大鼠空白血浆 $50.0 \mu\text{L}$ ，除不加内标溶液外，按“血浆样品预处理”项下操作，取全部上清液，加入相应浓度对照质控溶液和内标溶液，涡流混匀后进样分析。以每一浓度两种处理方法的峰面积比计算处理回收率。

基质效应 取 6 个大鼠空白血浆及 1 份溶血空白血浆各 $50.0 \mu\text{L}$ ，除不加内标溶液外，按“血浆样品预处理”项下操作，取全部上清液，加入相应浓度对照质控溶液和内标溶液，涡流混匀后进样分析。同时另取 $50.0 \mu\text{L}$ 水代替空白血浆，按上述处理，每一

浓度进行三样本分析，获得相应的平均峰面积。以两种处理方法的峰面积比值计算基质效应。

稀释实验 取罗汉果醇的稀释质控样品 (血浆浓度为 $8000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)，用大鼠空白血浆稀释 10 倍后，按“血浆样品预处理”项下操作，进行 6 样本分析，根据当日标准曲线计算每一样本测得浓度。

实验动物及给药方案 6 只健康的雄性 SD 大鼠随机分为两组，每组 3 只。静脉组给药剂量为 $5.00 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，分别于给药前和给药后 0.033 、 0.083 、 0.167 、 0.418 、 1 、 2 、 4 、 6 和 10 h 采集静脉血 $150 \mu\text{L}$ 于 EDTA 抗凝管中。灌胃组给药剂量为 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，分别于给药前和给药后 0.167 、 0.418 、 1 、 2 、 4 、 6 、 10 、 12 和 24 h 采集静脉血 $150 \mu\text{L}$ 于 EDTA 抗凝管中。全血样品采集后立即于 $10000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min ，分离血浆， -20°C 保存。采用 Phoenix WinNonlin[®]6.3 (美国 Pharsight 公司) 软件以非房室模型对测得的药代动力学数据进行处理和统计分析。

结果

1 大鼠血浆中代谢产物鉴定

1.1 罗汉果醇对照品质谱分析 罗汉果醇主要生成 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 离子 (m/z 521.3862) (图 2A)。高碰撞能量质谱图中 (图 2B)，主要碎片离子为 m/z 112.9821、180.9725、248.9599 和 475.2698 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) 等。

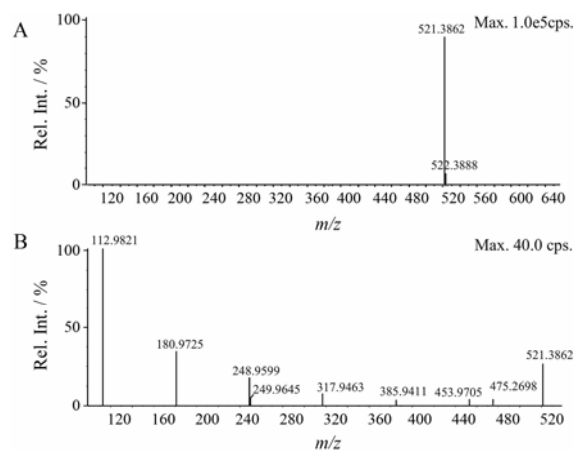


Figure 2 Q-TOF full scan MS spectrum of mogrol (A) and product ion MS spectrum of $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ (B)

与空白血浆样品相比，在给药后大鼠血浆中除原形药 (M0) $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 离子 m/z 521.3862 外，还检测到 m/z 分别为 519.3703 、 535.3651 、 537.3810 、 551.3604 和 553.3776 的代谢产物 (图 3)。其中峰面积相对较高的为 m/z 537.3810 和 m/z 551.3604，分别

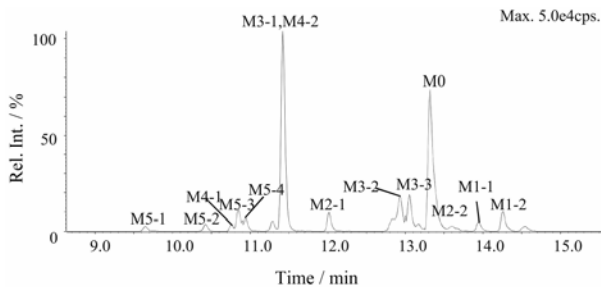


Figure 3 The metabolite (listed in Table 1) profiles of mogrol in plasma sample collected at 4.0 h after an oral administration of 100 mg·kg⁻¹ mogrol to rats

命名为代谢物产物 M3 和 M4, 并以此为例, 介绍代谢产物鉴定过程。

1.2 M3 的鉴定 在 m/z 537.381 0 ($[M+HCOO]^-$) 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 3 个色谱峰, 保留时间分别为 11.42、12.94 和 13.05 min, 命名为 M3-1~M3-3。根据准确分子质量, 推测它们的分子式组成为 C₃₀H₅₂O₅, 比原形多了 1 个 O。在高碰撞能量下, M3-1~M3-3 均可产生 m/z 491.339 1 ($[M-H]^-$)、343.992 6、265.950 1、129.979 2 的碎片离子, 其中 m/z 491.251 6、265.950 1 的碎片离子比原形药物的碎片离子 m/z 475.269 8、249.964 5 多了 15.98 Da。因此, 推测 M3 为罗汉果醇的羟基化代谢产物, 但仅根据质谱碎片, 尚不能确定代谢位点。

1.3 M4 的鉴定 在 m/z 551.360 4 ($[M+HCOO]^-$) 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 2 个色谱峰, 保留时间为 10.76 和 11.44 min, 命名为 M4-1 和 M4-2。根据准确分子质量, 推测它们的分子式组成为 C₃₀H₅₀O₆, 比原形多了 2 个 O, 少了 2 个 H。在高碰撞能量下, M4-1 和 M4-2 均可产生 m/z 505.325 9 ($[M-H]^-$)、

462.031 8、347.982 3、343.996 8 的碎片离子。其中 m/z 505.325 9、347.982 3 的碎片离子比 M0 的碎片离子 m/z 475.269 8、317.946 3 多了 30.05 Da。推测 M4 为罗汉果醇的脱氢并二羟基化代谢产物。

比较各时间点代谢产物和原形药物的 $[M+HCOO]^-$ 的提取离子色谱图峰面积, 确定大鼠灌胃给药后, 血浆中以原形药物为主。因此, 本文建立 LC-MS/MS 法测定血浆中罗汉果醇, 并进行药代动力学研究。罗汉果醇代谢产物的准确分子质量、可能元素组成和代谢途径等列于表 1。

2 血浆中分析方法建立和验证

2.1 选择性 6 个不同来源的大鼠空白血浆样品以及相应空白血浆配制的 LLOQ 样品进行 LC-MS/MS 分析。与空白对照对比, 空白血浆中的内源性物质不干扰罗汉果醇及内标紫杉醇的测定。典型色谱图见图 4。

2.2 标准曲线和定量下限 测定大鼠血浆中罗汉果醇线性范围为 5.00~1000 ng·mL⁻¹, 典型标准曲线回归方程为: $y=0.0204x-0.0061$ ($r=0.9987$)。

罗汉果醇 LLOQ 血浆样品的日内精密度的为 6.5%, 日间精密度的为 3.4%, 准确度在 -5.7%~0.1% 之间。结果表明 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆样品中罗汉果醇的定量下限可达 5.00 ng·mL⁻¹。

2.3 精密度与准确度 准确度和精密度数据见表 2。罗汉果醇每一浓度水平 QC 样品的日内精密度 (RSD) 均小于 9.3%, 日间精密度 (RSD) 均小于 3.9%, 准确度 (RE) 在 -4.5%~2.9% 之间, 符合生物样品测定相关要求^[1, 12]。

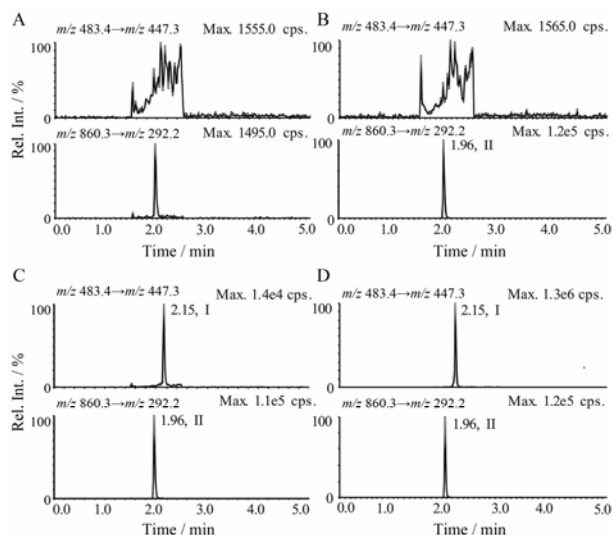
2.4 回收率 罗汉果醇在低、中、高三种浓度下样

Table 1 Identification of metabolites in rat plasma after a single oral administration of 100 mg·kg⁻¹ mogrol using UHPLC-Q-TOF/MS

No.	Metabolic pathway	Measured $[M+HCOO]^-$ (m/z)	Formula	Deviation/ppm	t_R /min
M0	Parent	521.386 1	C ₃₁ H ₅₄ O ₆	2.5	13.32
M1-1	Dehydrogenation	519.370 3	C ₃₁ H ₅₂ O ₆	2.3	13.94
M1-2	Dehydrogenation	519.370 5	C ₃₁ H ₅₂ O ₆	2.6	14.26
M2-1	Dehydrogenation and hydroxylation	535.365 1	C ₃₁ H ₅₂ O ₇	2.0	12.02
M2-2	Dehydrogenation and hydroxylation	535.363 6	C ₃₁ H ₅₂ O ₇	-0.8	13.60
M3-1	Hydroxylation	537.381 0	C ₃₁ H ₅₄ O ₇	2.4	11.42
M3-2	Hydroxylation	537.381 5	C ₃₁ H ₅₄ O ₇	3.4	12.94
M3-3	Hydroxylation	537.380 7	C ₃₁ H ₅₄ O ₇	1.8	13.05
M4-1	Dehydrogenation and dihydroxylation	551.360 4	C ₃₁ H ₅₂ O ₈	2.6	10.76
M4-2	Dehydrogenation and dihydroxylation	551.360 3	C ₃₁ H ₅₂ O ₈	2.5	11.44
M5-1	Dihydroxylation	553.377 6	C ₃₁ H ₅₄ O ₈	5.4	9.64
M5-2	Dihydroxylation	553.376 2	C ₃₁ H ₅₄ O ₈	2.8	10.43
M5-3	Dihydroxylation	553.376 0	C ₃₁ H ₅₄ O ₈	2.5	10.85
M5-4	Dihydroxylation	553.375 6	C ₃₁ H ₅₄ O ₈	1.8	10.94

Table 2 The intra- and inter-day precision and accuracy data of the LLOQ and QC samples of mogrol

Nominal conc. /ng·mL ⁻¹	Intra-day			Inter-day		
	Measured conc. /ng·mL ⁻¹	Accuracy (RE/%)	Precision (RSD/%)	Measured conc. /ng·mL ⁻¹	Accuracy (RE/%)	Precision (RSD/%)
5.00	5.01 ± 0.33	0.1	6.5	4.71 ± 0.16	-5.7	3.4
15.0	15.4 ± 1.4	2.9	9.3	14.6 ± 0.3	-2.5	2.3
200	196 ± 11	-1.9	5.8	204 ± 8	1.9	3.9
800	764 ± 43	-4.5	5.7	795 ± 26	-0.6	3.3

**Figure 4** Typical MRM chromatograms of mogrol (I), paclitaxel (II) in rat plasma. A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with 100 ng·mL⁻¹ paclitaxel; C: Blank plasma spiked with 5.00 ng·mL⁻¹ mogrol and 100 ng·mL⁻¹ paclitaxel; D: A plasma sample collected at 1.0 h after an intravenous administration of 5.00 mg·kg⁻¹ mogrol to rats

品的提取回收率分别为 97.1%、92.8%、91.2%。内标紫杉醇同样经提取处理，其提取回收率为 89.6%。

2.5 基质效应 罗汉果醇低、高两浓度经内标校正的基质效应分别为 90.4% 和 104%，相对标准差均小于 2.9%。因此，在本实验选择的色谱和质谱条件下，可忽略基质效应对罗汉果醇测定的影响。

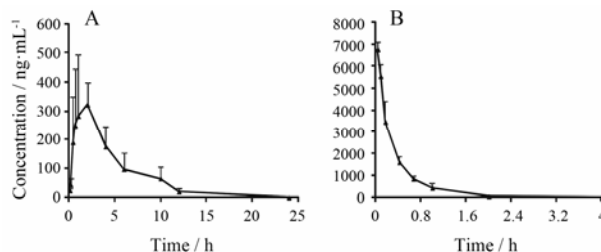
2.6 稳定性 本实验考察了罗汉果醇低、高两浓度分别为 15.0 和 800 ng·mL⁻¹ 的血浆样品在不同储存条件下的稳定性。结果表明，大鼠血浆样品室温放置 4 h，准确度在 -8.4%~ -7.8% 之间；预处理后的血浆样品室温放置 24 h，准确度在 -5.0%~ -4.9% 之间；血浆样品经历 3 次冷冻解冻循环，准确度在 -1.3%~ -1.2% 之间；血浆样品 -20 °C 放置 59 天，准确度在 -4.5%~ -0.9% 之间。在上述条件下，罗汉果醇血浆样品均稳定。

2.7 稀释实验 测得罗汉果醇稀释质控样品的精密度和准确度分别为 6.5% 和 4.3%。表明，血浆样品经空白血浆稀释 10 倍后测定不影响结果的准确度。

2.8 残留考察 方法验证期间在标准曲线定量上限浓度测定后，立即分析空白样品以评价残留。空白样品中待测物罗汉果醇残留率小于定量下限峰面积的 0.1%，内标残留率在 2.0% 以内，可忽略残留对待测物测定的影响。

3 大鼠药代动力学和生物利用度研究

将经过完整方法学验证的方法应用于罗汉果醇的大鼠药代动力学研究。灌胃组和静脉组给予罗汉果醇后的平均药时曲线见图 5，相关的药代动力学参数见表 3。

**Figure 5** Plasma concentration-time profiles of mogrol after an oral administration of 100 mg·kg⁻¹ mogrol (A) and intravenous administration of 5.00 mg·kg⁻¹ mogrol (B) to rats ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)**Table 3** Non-compartmental pharmacokinetics parameters of mogrol after a single oral or intravenous administration of mogrol in rat plasma ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Intravenous	Oral
Dose /mg·kg ⁻¹	5.00	100
AUC _{0-t} /h·ng·mL ⁻¹	2325 ± 290	1632 ± 210
AUC _{0-∞} /h·ng·mL ⁻¹	2348 ± 301	1704 ± 261
MRT _{0-t} /h	0.34 ± 0.06	3.90 ± 0.96
MRT _{0-∞} /h	0.36 ± 0.07	4.38 ± 0.69
t _{1/2} /h	0.30 ± 0.05	2.34 ± 0.38
t _{max} /h	-	1.67 ± 0.58
CL /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	2.15 ± 0.29	-
V /L·kg ⁻¹	0.93 ± 0.18	-
C _{max} /ng·mL ⁻¹	6763 ± 315	363 ± 144
Bioavailability /%	-	3.5

大鼠静脉给予 5.00 mg·kg⁻¹ 罗汉果醇时，其表观分布容积约为 0.93 L·kg⁻¹，高于总体液体积，提示其具有中等程度组织分布。大鼠灌胃给予 100 mg·kg⁻¹

罗汉果醇, 达峰迅速, t_{\max} 约 1.67 h 时, 达峰浓度为 $363 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 消除半衰期为 2.34 h。以剂量归一化后的罗汉果醇在大鼠体内的绝对生物利用度仅为 3.5%。

讨论

罗汉果醇分子结构中仅含有醇羟基基团, 在 ESI 电离源下, 易形成加合离子。在正离子检测模式下, 可形成 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Li}]^+$ 等加合离子。原形药物和检测到的代谢物间各加合离子的生成比例不一致, 不易判断原形药物和各代谢物间血浆浓度的相对比例关系。在 (-)ESI 电离模式下, 罗汉果醇和代谢产物都主要生成 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 前体离子, 有利于判断体内的相对含量。

在 (-)ESI 电离模式下, 以罗汉果醇的 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 作为前体离子, 进行产物离子扫描分析时, 获得较多的碎片离子, 采用 MRM 方式进行定量分析, 响应明显降低。在 (+)ESI 电离模式下, 对前体离子 $[\text{M}+\text{Li}]^+$ 进行产物离子扫描分析时, 可形成稳定的脱水碎片离子, 以 MRM 扫描方式进行定量分析, 不影响检测灵敏度。

因此, 本研究采用 (-)ESI 电离模式鉴定罗汉果醇的代谢产物; 而 (+)ESI 正离子模式用于血浆样品中罗汉果醇的定量分析。

本文利用 UHPLC/(-)ESI Q-TOF MS, 在大鼠血浆中共鉴定出 13 种代谢产物。初步判断代谢产物类型主要为脱氢和羟基化。罗汉果醇及体内代谢产物在高能量碰撞下主要发生碳-碳键断裂, 碎片离子信息有限, 目前还不确定代谢位点。

LC-MS/MS 法定量测定大鼠血浆中罗汉果醇时, 为提高检测灵敏度, 在流动相中添加了少量的 Li_2CO_3 , 以形成稳定的 $[\text{M}+\text{Li}]^+$ (m/z 483.4) 前体离子, 对其进行产物离子全扫描分析, 主要形成脱两分子水的碎片离子 m/z 447.4。选择 m/z 483.4 \rightarrow 447.4 作为 MRM 监测的离子对, 获得质谱响应高且稳定。

结论

本文采用 UHPLC/Q-TOF MS 鉴定大鼠灌胃罗汉果醇后血浆中代谢产物。结果表明, 罗汉果醇在大鼠血浆中以脱氢和羟基化代谢途径为主, 共鉴定出 13 种代谢产物。建立了以碳酸锂为流动相添加剂的

LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中罗汉果醇。锂加合离子在质谱分析中稳定性好, 灵敏度高, 最低定量下限可达 $5.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 满足于罗汉果醇药代动力学研究。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] Suzuki YA, Tomoda M, Murata Y, et al. Antidiabetic effect of long-term supplementation with *Siraitia grosvenori* on the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat [J]. Br J Nutr, 2007, 97: 770-775.
- [3] Takasaki M, Konoshima T, Murata Y, et al. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori* [J]. Cancer Lett, 2003, 198: 37-42.
- [4] Chen WJ, Wang J, Qi XY, et al. The antioxidant activities of natural sweeteners, mogrosides, from fruits of *Siraitia grosvenori* [J]. Int J Food Sci Nutr, 2007, 58: 548-556.
- [5] Xu F, Li DP, Zhen CH, et al. Exploring *in vitro*, *in vivo* metabolism of mogroside V and distribution of its metabolites in rats by HPLC-ESI-IT-TOF-MSⁿ [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 115: 418-430.
- [6] Murata Y, Ogawa T, Suzuki YA, et al. Digestion and absorption of *Siraitia grosvenori* triterpenoids in the rat [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74: 673-676.
- [7] Yang XR, Xu F, Li DP, et al. Metabolites of siamenoside I and their distributions in rats [J]. Molecules, 2016, 21: 176.
- [8] Liu C, Zeng Y, Dai LH, et al. Mogrol represents a novel leukemia therapeutic, *via* ERK and STAT3 inhibition [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5: 1308-1318.
- [9] Chen XB, Zhuang JJ, Liu JH, et al. Potential AMPK activators of cucurbitane triterpenoids from *Siraitia grosvenorii* Swingle [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19: 5776-5781.
- [10] Luo Z, Qiu F, Zhang K, et al. *In vitro* AMPK activating effect and *in vivo* pharmacokinetics of mogroside V, a cucurbitane-type triterpenoid from *Siraitia grosvenorii* fruits [J]. RSC Adv, 2016, 6: 7034-7041.
- [11] Chen B, Yang XR, Lu FL, et al. Study on the preparation and metabolism of mogrol in rats [J]. Guangxi Zhiwu (广西植物), 2014, 34: 198-202.
- [12] US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (draft) [S/OL]. 2013 [2017-04-09]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107>.