

• 研究论文 •

16-O-去甲基乌头碱的生物转化及电喷雾质谱研究

赵宇峰^{a,b} 宋凤瑞^a 王曦烨^{a,b} 国新华^a 刘志强^a 刘淑莹^{*,a}

(^a中国科学院长春应用化学研究所 长春 130022)

(^b中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 采用乌头碱和人肠内细菌体外温孵的方法, 探讨乌头碱在肠内的生物转化规律. 乌头类生物碱在 ESI 正离子模式条件下形成质子化分子 $[M+H]^+$, 利用离子阱电喷雾串联质谱和傅立叶离子回旋共振电喷雾串联质谱方法可以直接分析乌头碱的转化产物. 本文首次报道了乌头碱在人肠内菌群环境中产生 16-O-去甲基乌头碱, 16-O-去甲基乌头碱可进一步被肠内细菌转化, 通过脱乙酰基、脱苯甲酰基、脱甲基、脱羟基以及酯化反应, 产生新型的单酯型、双酯型和 20 余种脂类生物碱等转化产物.

关键词 16-O-去甲基乌头碱; 肠内细菌; 生物转化; 电喷雾质谱

Studies on the Biotransformation of 16-O-Demethylnaconitine and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

ZHAO, Yu-Feng^{a,b} SONG, Feng-Rui^a WANG, Xi-Ye^{a,b} GUO, Xin-Hua^a
LIU, Zhi-Qiang^a LIU, Shu-Ying^{*,a}

(^a Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(^b Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract To study the biotransformation of 16-O-demethylnaconitine in human intestine, aconitine was incubated with human intestinal bacteria *in vitro*. The metabolites of 16-O-demethylnaconitine were investigated using ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance electrospray ionization tandem mass spectrometry directly. Aconitum alkaloids formed protonated molecule $[M+H]^+$ in the positive ion mode. It was found that 16-O-demethylnaconitine from biotransformation of aconitine could be further transformed by human intestinal bacteria. There are new metabolites such as mono-ester alkaloids, diester alkaloids and lipo-alkaloids produced by deacetylation, debenzoylation, dehydroxylation, demethylation and more than twenty kinds of esterification in the further transformation process of the 16-O-demethylnaconitine. The 16-O-lipodemethylnaconitines have been first reported as a metabolite of aconitine by human intestinal bacteria.

Keywords 16-O-demethylnaconitine; human intestinal bacteria; biotransformation; electrospray ionization mass spectrometry

乌头碱(aconitine, AC)具有很强的抗炎和镇痛活性, 在临床上被用于抗肿瘤药物. 构效关系研究表明乌头碱类化合物的主要有效成分和毒性成分与 C₈, C₁₄ 的侧链有关, 其活化或阻碍 Na⁺通道与 C₁₄ 苯甲酰基侧链有

关^[1]. 乌头碱在体内的代谢已有报道, Mizugaki 等^[2~4]利用气相色谱-质谱方法分析检测人的血清和尿中的乌头碱及其代谢产物, 乌头碱的主要代谢产物为苯甲酰乌头胺(benzoylnaconine, BA)和乌头胺(aconine). 张宏桂等^[5,6]

* E-mail: syliu19@yahoo.com.cn

Received April 3, 2007; revised October 29, 2007; accepted November 27, 2007.

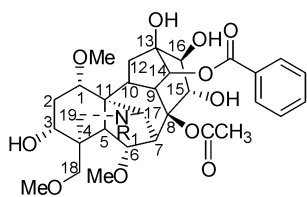
国家自然科学基金(Nos. 30472134, 30672600)和 973 中医理论专项(No. 2006CB5047060)资助项目.

利用液相色谱-质谱联用方法分析和检测了人的尿液和兔的尿液、血液中的乌头碱及其代谢产物,首次报道了乌头碱的代谢产物 16-*O*-去甲基乌头碱、16-*O*-苯甲酰去甲基乌头碱。

Kawata 等^[7]报道了人肠内细菌中的脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)可将乌头碱转化为苯甲酰乌头胺和脂类生物碱(Lipo-alkaloids)。应用 LC-MS 和 GC-MS 方法分析证明,组成脂类乌头碱的脂肪酸与脆弱拟杆菌中含有的脂肪酸相同。其它肠内细菌肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)以及混合肠内细菌也能将乌头碱转化为苯甲酰乌头胺和相应的脂类生物碱。脂类生物碱的毒性低于乌头碱。

电喷雾电离是一种软电离质谱技术,特别适合于复杂体系样品的快速分析及鉴定。郭寅龙等^[8]利用离子阱质谱研究了小分子有机化合物在离子阱里的分子离子反应,采用 FTMS 对反应产物离子进行准确质量测定,验证了它们的反应结果。本研究组近年来利用电喷雾串联质谱技术对含乌头类植物的化学成分及相关复方中药的配伍进行了系统的研究^[9~11]。为进一步阐明乌头碱在肠内的转化过程,我们利用体外厌氧培养的方法对乌头碱在人肠内细菌中的生物转化进行了系统研究^[12,13]。乌头碱在肠内细菌中发生脱甲基反应,产生了 16-*O*-去甲基乌头碱(16-*O*-demethylnaconitine)(图式 1)。

本文利用离子阱电喷雾质谱仪的高灵敏度和多级串联的优势,结合傅立叶离子回旋共振质谱的高分辨率优势,直接分析乌头碱的转化产物,并根据串联质谱的特征离子,进一步寻找 16-*O*-去甲基乌头碱的转化产物,对其进行化学结构表征。从而深化了对乌头碱和 16-*O*-去甲基乌头碱生物转化的认识。



图式 1 16-*O*-去甲基乌头碱结构式

Scheme 1 The structure of 16-*O*-demethylnaconitine

1 实验部分

1.1 试剂

甲醇、二氯甲烷(分析纯,北京化工厂); GAM 培养基(日本,日水公司);乌头碱、中乌头碱购自中国药品生物制品检定所。

1.2 16-*O*-去甲基乌头碱的生物转化

肠内细菌的生物转化在 SCHVITZ 手套式厌氧培养箱中进行:将 3.23 mg 乌头碱用乙腈溶解,加入到 10 mL GAM 培养基中。然后加入 0.2 g 健康成人的新鲜粪便,37 °C 厌氧培养。在 96 h 后提取样品,用二氯甲烷萃取,3500 r/min 离心,提取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。

1.3 转化产物的质谱测定

样品用 Finigan LCQ 质谱仪和 7.0 T 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪进行分析。

LCQ MSⁿ 条件:毛细管温度 180 °C;喷雾电压 5 kV;正离子模式;离子透镜补偿电压 15 V;碰撞能 30%~35%;氮气为鞘气;流动注射泵流速 5 μL/min。

7.0 T FTICR MSⁿ 条件:电喷雾离子源,源温度 80 °C,探针温度 100 °C,质量范围 m/z 100~1000 Da,质量误差经过校正;鞘气:氮气,碰撞气:氮气。流动注射泵流速 3 μL/min。

2 结果与讨论

2.1 16-*O*-去甲基乌头碱的结构确定

乌头类生物碱在电喷雾质谱正离子模式下形成质子化分子 $[M+H]^+$,通过质荷比和相关文献数据可初步确定各离子峰的归属,通过串联质谱可进一步确定其结构^[7]。乌头碱在肠内细菌中转化前后的质谱图如图 1 所示。

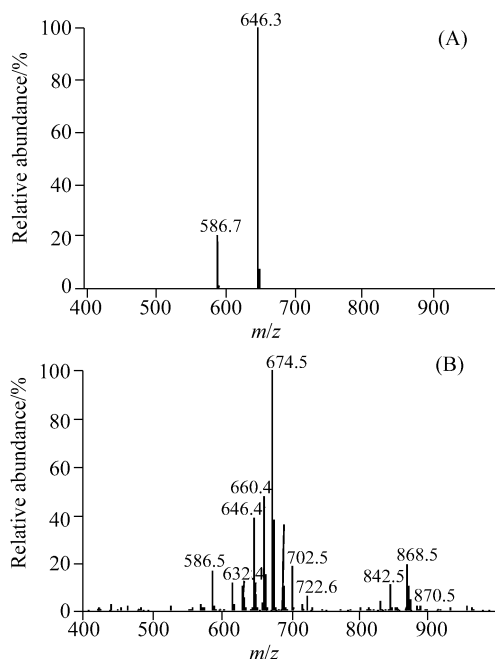


图 1 乌头碱生物转化前(A)、后(B)的电喷雾全扫描质谱
Figure 1 ESI-MS spectra of aconitine before (A) and after (B) transformation

我们在乌头碱的转化产物中检测到了准分子离子 m/z 632, 精确质荷比为 m/z 632.3059 ($C_{33}H_{46}NO_{11}$, 误差 2.12×10^{-6}). 它与乌头碱 m/z 646 离子相差 14 Da, 推测为乌头碱失去一个甲基的转化产物. 它与中乌头碱的质荷比相同, 是中乌头碱的同分异构体. 根据电子效应、空间位阻影响, 并参考乌头碱的甲氧基结合能的计算结果^[14], 以 C-16 位氧化去甲基反应最易发生, 故命名为 16-*O*-去甲基乌头碱. 这与乌头碱在人体内代谢为 16-*O*-去甲基乌头碱($[M+H]^+$ m/z 632)的报道一致^[5]. 由此推断, 乌头碱的脱甲基反应可能发生在肠内.

为进一步验证 m/z 632 离子的结构, 我们对它和中乌头碱进行了比较研究, 在二级串联质谱中它们子离子 m/z 572 均为基峰, m/z 632 离子的失水峰明显高于中乌头碱, 表明它在结构上要比中乌头碱多一个羟基. 证明了乌头碱在肠内细菌中的去甲基反应发生在乌头碱骨架的 $-OCH_3$ 上, 而不是 $N-CH_2CH_3$ 上. 在三级串联质谱中, 中乌头碱的子离子 m/z 512 $[M+H-CH_3OH-CO]^+$ 为基峰, 而 m/z 632 离子的子离子 m/z 540 $[M+H-CH_3OH]^+$ 为基峰, 无 m/z 512 离子产生, 表明当 C-16 位上的取代基为羟基时, 无 C-15 位的羰基碎片丢失, 即不能产生 $[M+H-CH_3OH-CO]^+$ 离子(见图 2). 证明了 m/z 632 离子就是 16-*O*-去甲基乌头碱.

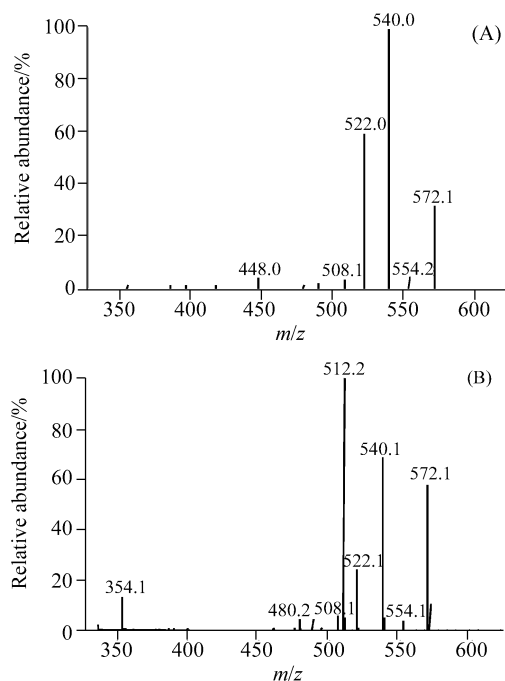


图 2 16-*O*-去甲基乌头碱(A)和中乌头碱(B)的三级串联质谱
Figure 2 ESI-MS³ spectra of 16-*O*-demethylnaconitine (A) and mesaconitine (B)

2.2 16-*O*-去甲基乌头碱的转化产物分析

对乌头碱转化产物的分析发现, 与 16-*O*-去甲基乌

头碱的转化有关的准分子离子为 m/z 590, 486, 616, 618, 666, 696, 700, 702, 710, 716, 722, 730, 736, 746, 762, 764, 766, 778, 786, 800, 814, 828, 856, 870, 884, 898 和 926 等.

从质荷比分析, 准分子离子 m/z 590 与 m/z 632 之间相差 42 Da, 推测为 16-*O*-去甲基乌头碱的脱乙酰基产物, 对应质子化的 16-*O*-苯甲酰去甲基乌头胺(16-*O*-benzoyldemethylnaconitine). m/z 486 离子与 m/z 590 离子之间相差 104 Da, 推测为 16-*O*-去甲基乌头胺(16-*O*-demethylnaconitine). 表明在肠内细菌中的酯酶作用下, 16-*O*-去甲基乌头碱发生了脱乙酰基和脱苯甲酰基的响应.

准分子离子 m/z 616 和 m/z 618 与 16-*O*-去甲基乌头碱 m/z 632 离子分别相差 16, 14 Da, 推测为 16-*O*-去甲基乌头碱失去一个羟基和一个甲基的转化产物. 在二级串联质谱中子离子 m/z 556, 558 $[M+H-AcOH]^+$ 均为基峰, 表明它们的 C-8 都是一分子乙酸, 为双酯型生物碱. 根据电子效应、空间位阻影响, 推断 16-*O*-去甲基乌头碱的 4 个羟基中以 C-3 位上的羟基较容易失去. 故命名 m/z 616 离子为 16-*O*-去甲基去氧乌头碱(16-*O*-demethyldeoxyaconitine). 参考乌头碱的甲氧基结合能的计算结果^[14], 推断在 16-*O*-去甲基乌头碱结构上以 C-1 位氧化去甲基反应最易发生, 命名 m/z 618 离子为 1,16-*O*-二去甲基乌头碱(1,16-*O*-didemethylnaconitine). 16-*O*-去甲基乌头碱和它的单酯型、双酯型转化产物的串联质谱裂解规律见表 1.

16-*O*-去甲基乌头碱在肠内细菌作用下还产生了一系列的脂类生物碱, 这些脂类生物碱均为新发现. 在二级串联质谱中, 双酯型生物碱以丢失一分子乙酸为基峰 $[M+H-AcOH]^+$, 表明 C-8 位结合的是一分子乙酸^[10], 16-*O*-去甲基乌头碱的特征离子为 m/z 572. 如果一个脂类生物碱的子离子 m/z 572 为基峰, 在三级串联质谱中产生的碎片离子与 16-*O*-去甲基乌头碱的子离子 m/z 572 的碎裂规律相同, 表明该脂类生物碱为 16-*O*-脂类去甲基乌头碱. 例如: 准分子离子 m/z 730 的子离子 m/z 572 为基峰, 有 158 Da 的中性丢失, 且它的裂解规律与 16-*O*-去甲基乌头碱的子离子相同, 表明该转化产物为 8-壬酰-16-*O*-苯甲酰去甲基乌头胺.

另外, 脂类生物碱存在着同分异构现象, 一些母离子具有多个对应不同脂肪酸丢失的子离子. 如准分子离子 m/z 746 的二级串联质谱中存在子离子 m/z 586 和 572, 分别对应丢失 160 和 174 Da, 为 3-羟基辛酸^[15]和十一碳六烯酸, 表明 m/z 746 离子由两种脂类生物碱组成, 分别对应 8-(3-羟基)-辛酸-苯甲酰乌头胺和 8-十一碳六烯酰-16-*O*-苯甲酰去甲基乌头胺. 16-*O*-去甲基乌头碱在人

肠内细菌中的可能转化过程见图 3. 由 16-*O*-去甲基乌头碱转化的脂类生物碱见表 2.

表 1 16-*O*-去甲基乌头碱及其转化产物的串联质谱^a

Table 1 ESI-MSⁿ spectra of [M+H]⁺ ions for 16-*O*-demethylnaconitine and its metabolites

Aconitine	16- <i>O</i> -demethylnaconitine		M1	M2	M3	M4	M5
	MS ²	MS ³	MS ²	MS ²	MS ²	MS ²	MS ²
[M+H] ⁺	632		618	616	602	590	486
[MH-18] ⁺	614		600	598	584	572	468
[MH-32] ⁺	600		586	584	570	558	454
[MH-32-18] ⁺	582		568	566	552	540	436
[MH-60] ⁺	572	572	558	556	542		
[MH-60-18] ⁺	554	554					
[MH-60-32] ⁺		540	526	524	510		
[MH-60-32-18] ⁺	522	522					
[MH-32-32] ⁺		508	554		538	526	422
[MH-32-32-18] ⁺		490				508	404

^a M1, M2, M3, M4 and M5 represent metabolites of 16-*O*-demethylnaconitine.

表 2 16-*O*-去甲基乌头碱在人肠内细菌中转化为 16-*O*-脂类去甲基乌头碱的表征

Table 2 Characterized transformation of 16-*O*-demethylnaconitine to 16-*O*-lipodemethylnaconitines in human intestinal bacteria

Lipo-alkaloid	Parent ion (<i>m/z</i>)	Neutral loss/Da	Daughter ion (<i>m/z</i>)
16- <i>O</i> -去甲基乌头碱 ^[5]	632	60 ^[15]	572
8-丙酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	646	74 ^[15]	
8-丁酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	660	88 ^[15]	
8-五碳四烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	666	94	
8-戊酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	674	102	
8-甲基丁酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	696	124	
8-七碳三烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	698	126	
8-七碳二烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	700	128	
8-庚酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	702	130	
8-八碳三烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	710	138	
8-辛酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	716	144 ^[15]	
8-壬酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	730	158	
8-十碳四烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	736	164	
8-十一碳六烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	746	174	
8-十二碳五烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	762	190	
8-十二碳四烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	764	192	
8-十二碳三烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	766	194	
8-十三碳四烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	778	206	
8-甲基十二烷酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	786	214 ^[15]	
8-豆蔻酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	800	228 ^[15]	
8-油酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	854	282 ^[15]	
8-硬脂酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	856	284 ^[15]	
8-甲基硬脂酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	870	298 ^[15]	
8-花生酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	884	312 ^[15]	
8-二十一烷酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	898	326	
8-二十三碳烯酰-16- <i>O</i> -苯甲酰去甲基乌头胺	926	354	

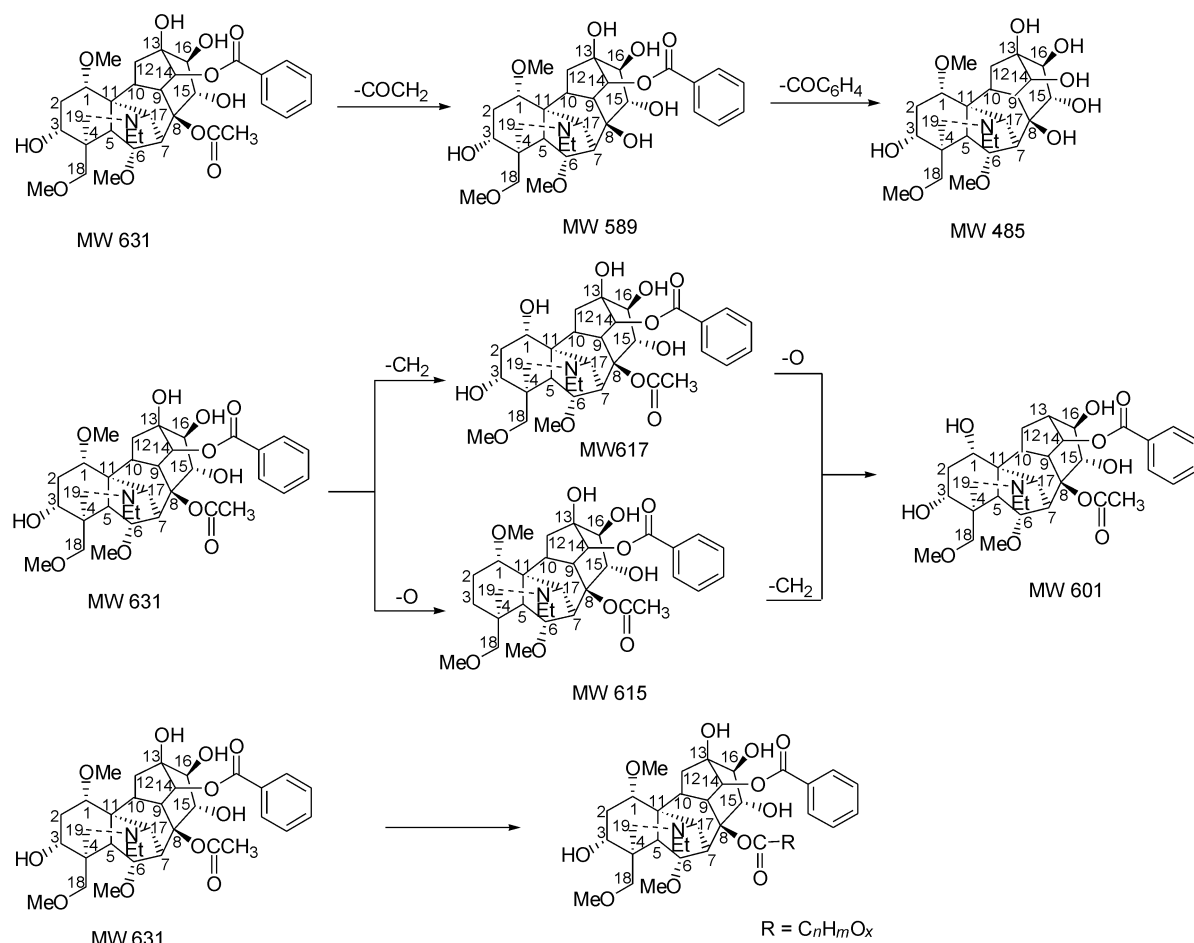


图3 16-O-去甲基乌头碱在人肠内细菌中的可能转化过程

Figure 3 Proposed metabolic processes of 16-O-demethylaconitine by human intestinal bacteria

3 结论

采用乌头碱和人肠内细菌体外厌氧培养的方法,探讨了乌头碱在肠内的生物转化规律. 由于人肠内细菌中含有种类繁多的酶,对乌头碱的结构修饰也多种多样. 本文利用离子阱电喷雾串联质谱和傅立叶变换离子回旋共振电喷雾串联质谱方法,首次证明乌头碱能在人肠内细菌作用下生成 16-O-去甲基乌头碱,并且证明了 16-O-去甲基乌头碱可以进一步被肠内细菌修饰,脱乙酰基生成 16-O-苯甲酰去甲基乌头胺,脱苯甲酰基生成 16-O-去甲基乌头胺,脱甲基生成 1,16-O-二去甲基乌头胺,脱羟基生成 16-O-去甲基去羟基乌头胺,还可以发生酯化反应,产生 20 余种新的脂类生物碱转化产物.

References

- Gutser, U.-T.; Friese, J.; Heubach, J.-F.; Matthiesen, T.; Selve, N.; Wiffert, B.; Gleitz, J. *J. Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, 357, 39
- Yoshioka, N.; Gonmori, K.; Tagashira, A.; Boonhooi, O.; Hayashi, M.; Saito, Y.; Mizugaki, M. *J. Forensic Sci. Int.* **1996**, 81, 117
- Ito, K.; Ohya, Y.; Konishi, Y.; Tanaka, S.; Mizugaki, M. *Plata Med.* **1997**, 63, 75
- Mizugaki, M.; Ito, K.; Ohya, Y.; Konishi, Y.; Tanaka, S.; Kurasawa, K. *J. Anal. Toxicol.* **1998**, 22, 336
- Zhang, H.-G.; Shi, X.-G.; Sun, Y.; Duan, M.-Y.; Zhong, D.-F. *Chin. Chem. Lett.* **2002**, 13, 758
- Sun, Y.; Zhang, H.-G.; Zhong, D.-F.; Zhang, H.-Q. *J. Chin. Pharm. Sci.* **2003**, 12, 54.
- Kawata, Y.; Ma, C.-M.; Mesellhy, R. M.-R.; Nakamura, N.; Wang, H.; Hattori, M.; Nanba, T.; Satoh, K.; Kuraishi, Y. *J. Trad. Med.* **1999**, 16, 15
- Guo, Y.-L.; Chen, G.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2003**, 61, 1112 (in Chinese). (郭寅龙, 陈国强, 化学学报, **2003**, 61, 1112.)
- Sun, W. X.; Song, F. R.; Cui, M.; Liu, S. Y. *Plata Med.* **1999**, 65, 432.
- Wang, Y.; Liu, Z.-Q.; Song, F.-R.; Liu, S.-Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, 2075
- Xu, Q.-X.; Wang, Y.; Cui, M.; Liu, Z.-Q.; Liu, S.-Y. *J. Anal. Sci.* **2003**, 19, 1599
- Zhao, Y.-F. *Ph.D. Dissertation*, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun,

- 2007** (in Chinese).
(赵宇峰, 博士论文, 中国科学院长春应用化学研究所, 长春, **2007**.)
- 13 Zhao, Y.-F.; Song, F.-R.; Wang, X. Y.; Guo, X. H.; Li, H. L.; Liu, Z.-Q.; Liu, S.-Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **2007**, *35*, 1711 (in Chinese).
(赵宇峰, 宋凤瑞, 王曦烨, 国新华, 李慧琳, 刘志强, 刘淑莹, 分析化学, **2007**, *35*, 1711.)
- 14 Chen, L.-H.; Jin, L.-J.; Su, Z.-M.; Qiu, Y.-Q.; Wang, Y.; Liu, S.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **2005**, *26*, 2340 (in Chinese).
(陈兰慧, 金莲姬, 苏忠民, 仇永清, 王勇, 刘淑莹, 高等学校化学学报, **2005**, *26*, 2340.)
- 15 Kwapinski, J. B. G. *Molecular Microbiology*, Translated by Zhao, D. J., Science Press, Beijing, **1986**, pp. 171~185.
(Kwapinski J. B. G., 分子微生物学, 赵大健等译, 科学出版社, 北京, **1986**, pp. 171~185.)
- 14 Chen, L.-H.; Jin, L.-J.; Su, Z.-M.; Qiu, Y.-Q.; Wang, Y.;

(A0704033 LU, Y. J.; LING, J.)