

• 研究论文 •

牛蒡苷元的生物转化及电喷雾质谱研究

赵宇峰^{a,b} 宋凤瑞^b 赵立平^a 刘淑莹^{*,b}

(^a上海交通大学系统生物医学研究院 上海 200240)

(^b中国科学院长春应用化学研究所长春质谱中心 长春 130022)

摘要 采用牛蒡苷元和人肠内细菌真杆菌 *sp.* ARC-2 (*Eubacterium sp.* ARC-2)体外温孵的方法, 探讨牛蒡苷元的生物转化机理. 木脂素类化合物在 ESI 负离子模式条件下形成准分子离子[M-H]⁻, 利用离子阱和傅立叶变换离子回旋共振电喷雾串联质谱方法直接分析牛蒡苷元的转化产物. 研究表明, 在真杆菌 *sp.* ARC-2 的作用下, 牛蒡苷元经过 3 次脱甲基反应最终生成 4',4''-二羟基肠内酯.

关键词 牛蒡苷元; 真杆菌 *sp.* ARC-2; 生物转化; 电喷雾质谱; 4',4''-二羟基肠内酯

Studies on the Biotransformation of Arctigenin Using Electro spray Ionization Mass Spectrometry

Zhao, Yufeng^{a,b} Song, Fengrui^b Zhao, Liping^a Liu, Shuying^{*,b}

(^a Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

(^b Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract To study the biotransformation of arctigenin, arctigenin was anaerobically incubated with *Eubacterium sp.* ARC-2 of human intestinal bacteria *in vitro*. Arctigenin formed a molecular ion [M-H]⁻ in negative ion mode. The arctigenin and its metabolites were investigated directly by the electrospray ionization tandem mass spectrometry ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance. Arctigenin was transformed to 4',4''-dihydroxylenterolactone by *E. sp.* ARC-2 through 3 types of demethylation products.

Keywords arctigenin; *Eubacterium sp.* ARC-2; biotransformation; electrospray ionization mass spectrometry; 4',4''-dihydroxylenterolactone

牛蒡苷元是一种 2,3-二苄基丁内酯木脂素, 具有抗肺癌、皮肤癌、肝癌、白血病等活性^[1~3], 还具有免疫调节作用、促进小鼠 M₁ 细胞分化和抗 HIV-1 活性, 其中, 牛蒡苷元 C₃ 位去甲基代谢产物在抗 HIV-1 中表现出明显的活性^[4,5]. 就某种活性而言, 苷元的去甲基代谢产物的作用比苷元更强^[6,7].

近年来, 我们^[8~13]利用肠内细菌对多种中药成分进行了生物转化研究. 然而, 很多人的肠内细菌不能发生去甲基反应, 即使能够转化, 其转化率也很低^[13]. 如果将牛蒡苷元直接用药, 很可能会影响疗效. 因此, 我们

选择具有转化活性的肠内细菌对牛蒡苷元进行生物转化, 并且分离到了具有去甲基转化活性的新种细菌 *Eubacterium sp.* ARC-2, 得到了多种去甲基代谢产物^[8]. 利用已分离到的活性细菌对牛蒡苷元进行生物转化, 能够直接合成转化产物, 寻找其有效成分, 这样就可以提高牛蒡苷元的生物利用度, 达到治疗的目的. 在合成过程中, 需要建立一种快速、高效、灵敏的分析方法, 以便及时掌握目标产物的最佳转化时机. 因此, 本文利用电喷雾质谱的高灵敏度及多级串联的优势, 研究了牛蒡苷元及其转化产物在电喷雾质谱中的裂解规律, 建立了

* E-mail: syliu19@yahoo.com.cn; Tel.: 0431-85682237; Fax: 0431-85682236.

Received April 1, 2008; revised December 8, 2008; accepted January 20, 2009.

直接快速、准确地分析牛蒡苷元及转化产物的质谱学方法.

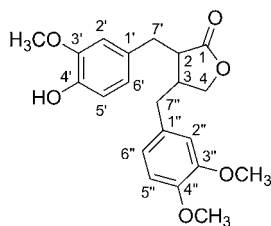


图1 牛蒡苷元
Figure 1 Arctigenin

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

甲醇、乙酸乙酯(分析纯, 北京化工厂); GAM 培养基(日本, 日水公司); 牛蒡苷元、4',4''-二羟基肠内脂对照品为实验室自制; 转化细菌: *E sp. ARC-2* 为实验室分离; EAN-140 手套式厌氧培养箱(日本, Takabe 公司); Finnigan LCQTM 离子阱质谱仪(美国, Thermo 公司); IonSpec 7.0 T 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FTICR MS)(美国, IonSpec 公司).

1.2 肠内细菌 *E sp. ARC-2* 的分离

参考文献[9]的方法, 将 0.4 mg 牛蒡苷元加入到 2.0 mL 普通厌氧培养基(GAM 培养基)中, 再加入 10 mg 健康人的新鲜粪便, 37 °C 厌氧培养 48 h, 取少量转化液, 用乙酸乙酯提取, 离心、取上清液进行分析. 若发生转化反应, 可将此转化液作为菌种, 按一定比例稀释, 涂布在平板培养基上, 37 °C 厌氧培养 48 h. 用划线法将菌落接种到已加入牛蒡苷元的 GAM 培养液中, 这样多次反复诱导, 直到分离出具有去甲基活性的、单一纯种细菌. 经鉴定, 该细菌为新种细菌 *E sp. ARC-2*.

1.3 牛蒡苷元的生物转化和 4',4''-二羟基肠内脂的制备

将 0.5 g 牛蒡苷元和 *E sp. ARC-2* 分别加入到 1.0 L GAM 培养基中, 37 °C 厌氧培养, 每隔一定时间取少量培养液, 用乙酸乙酯提取, 提取液直接进行电喷雾质谱分析.

按照文献[8]的方法, 待反应全部完成之后, 培养液用乙酸乙酯提取 3 次, 真空减压浓缩, 用硅胶柱进行分离纯化, 即可得到 4',4''-二羟基肠内脂.

1.4 质谱条件

Finnigan LCQTM 质谱仪: 电喷雾离子源, 金属加热毛细管温度 180 °C; 喷雾电压 4.5 kV; 负离子电离模式; 离子透镜补偿电压 15 V; 源内 CID 10%, 相对碰撞能量

25%~29%; 氮气流速 40 mL/min; 流动注射泵流速 3 μ L/min.

IonSpec 7.0 T FTICR 质谱仪, 电喷雾离子源, 源温度 80 °C, 探针温度 100 °C, 质量误差经过校正; 氮气为鞘气及碰撞气. 流动注射泵流速 3 μ L/min.

2 结果

2.1 牛蒡苷元及其转化产物的电喷雾质谱分析

在肠道细菌 *E sp. ARC-2* 的作用下, 牛蒡苷元的生物转化是个动态转化过程. 随着牛蒡苷元的逐渐减少, 转化产物逐渐增多, 最终全部转化成 4',4''-二羟基肠内脂^[9]. 在转化过程中, 转化产物多以混合物形式存在. 图2是 0 h(图2a)和第 28 h(图2b)的电喷雾全扫描质谱图.

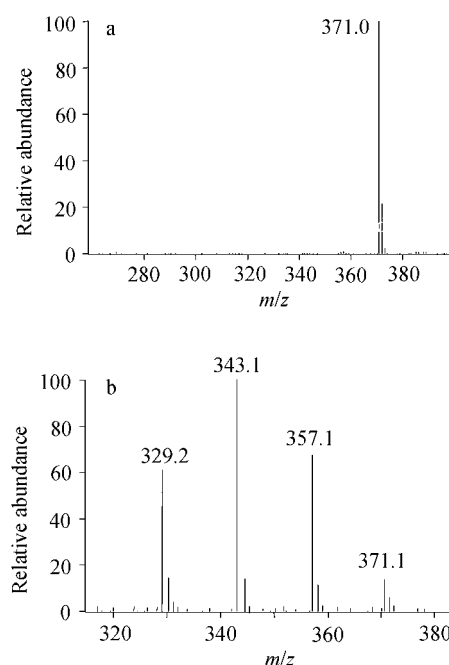


图2 牛蒡苷元生物转化前后的电喷雾全扫描质谱
Figure 2 ESI-MS spectra of arctigenin before (a) and after (b) biotransformation

在 ESI 负离子模式下, 牛蒡苷元及其转化产物形成了 $[M-H]^-$ 离子, 我们利用离子阱电喷雾串联质谱对其进行了结构表征, 并利用高分辨质谱的精确质量测量功能确认了牛蒡苷元、转化产物和中性碎片的组成. 在全扫描质谱中, 对于同系物而言, 各分子离子峰的丰度与其相对含量成正比. 牛蒡苷元在真杆菌 *sp. ARC-2* 作用下, 分别产生了质核比为 m/z 357, m/z 343 和 m/z 329 的 3 种类型的转化产物(图 3).

在高分辨质谱中, m/z 371 离子的精确质量测量结果为 m/z 371.1504 ($[M-H]^-$ $C_{21}H_{23}O_6$, 误差 2.59), 与牛蒡苷元对照品的元素组成一致. m/z 357.1345 ($[M_1-H]^-$

$C_{20}H_{23}O_6$, 误差 1.96)与牛蒡苷元相差 15 Da, 为 1 个 CH_3 , 表明 m/z 357 是牛蒡苷元脱去 1 个甲基产生的转化产物. m/z 343.1187 ($[M_2-H]^-$ $C_{19}H_{19}O_6$, 误差 1.75)与牛蒡苷元相差 30 Da, 为 $2CH_3$, 表明 m/z 343 是牛蒡苷元脱去 2 个甲基产生的转化产物. m/z 329.1028 ($[M_3-H]^-$ $C_{18}H_{17}O_6$, 误差 0.91)与牛蒡苷元 m/z 371 相差 45 Da, 为 $3CH_3$, m/z 329 是牛蒡苷元脱去 3 个甲基产生的转化产物, 鉴定为转化终产物 4',4''-二羟基肠内脂.

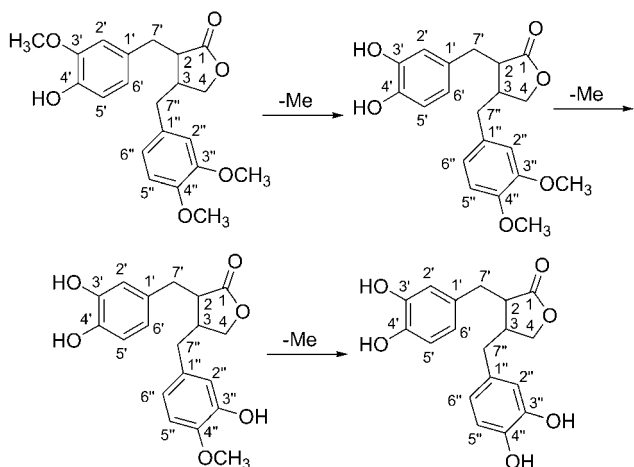


图3 牛蒡苷元在 *E. sp.* ARC-2 作用下的主要代谢途径
Figure 3 Major metabolic processes of arctigenin by *E. sp.* ARC-2

2.2 转化产物的结构表征

在图 4 的二级串联质谱中, 这 4 类化合物都有较高丰度的失去 CO_2 的峰, 根据它们的结构特点和三级串联质谱分析, 裂解反应应该发生在内酯环上. 在 4 类化合物中, 以牛蒡苷元 m/z 371 离子最易失去 CH_3 , 形成基峰. 它还独有 CH_3OH 的片段丢失, 表明它的 CH_3O 最为丰富. m/z 371, m/z 357, m/z 343 离子都有 CH_3 , $CO_2 + CH_3OH$ 和 $C_8H_9O_2$ 的中性丢失, 表明它们的结构中都有 CH_3O 存在. 而 m/z 329 离子没此中性丢失, 表明它的结构中无 CH_3 或 CH_3O 存在. m/z 371 和 m/z 357 离子有 $CO_2 + CH_3OH$ 的中性丢失, 而 m/z 343 和 m/z 329 离子没有, 说明 m/z 371 和 m/z 357 离子结构中的 CH_3O 要多于 m/z 343 和 m/z 329 离子, 在裂解中占优势. m/z 343 和 m/z 329 离子有 $CO_2 + H_2O$, $C_7H_7O_2$, $CO_2 + C_7H_7O_2$ 片段丢失, 表明它们的结构中有相邻的 OH 存在, 并且在裂解中占主导地位. 4 类化合物的二级串联质谱裂解规律见表 1.

3 讨论

肠道是人体的二代代谢器官之一, 在药物代谢的代谢中起着重要作用. 用人的肠道细菌对中药进行生物转

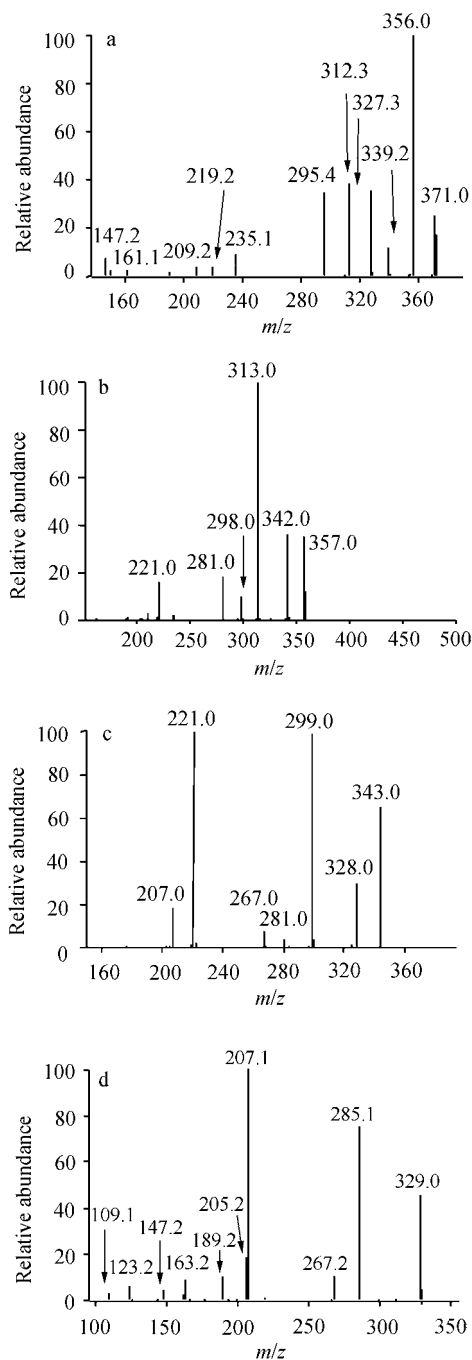


图4 牛蒡苷元和它的转化产物的二级串联质谱
Figure 4 ESI-MS² spectrum of arctigenin and its metabolites

化研究, 其转化过程更接近于人体的代谢过程, 而且不受代谢产物含量少, 无法进行药效学研究的限制. 因此, 肠道细菌可以作为研究药物代谢尤其是中药代谢的重要方法. 牛蒡苷元就在肠道细菌作用下产生去 3-O-去甲基代谢产物, 在抑制 HIV-1 卵裂分析和整合分析中表现出明显活性^[6]. 目前, 对牛蒡苷元抗 HIV-1 的作用机制还不清楚, 但可以肯定的是它在体内体外都有抗 HIV-1 的作用. 另外, 牛蒡苷元还有降糖和抗癌等多种药理活性. 因此, 利用生物转化方法将牛蒡苷元上的甲基不同

表1 牛蒡苷元及其转化产物的二级串联质谱

Table 1 ESI-MS² spectra of [M-H]⁻ ions for arctigenin and its metabolites

Product ion	m/z 371	m/z 357	m/z 343	m/z 329
[MH-15] ⁻	356	342	328	
[MH-32] ⁻	339			
[MH-44] ⁻	327	313	299	285
[MH-44-15] ⁻	312	298		
[MH-44-18] ⁻			281	267
[MH-44-32] ⁻	295	281	267	
[MH-122] ⁻			221	207
[MH-136] ⁻	235	221	207	
[MH-140] ⁻				189
[MH-122-44] ⁻				163
[MH-182] ⁻				147
[MH-206] ⁻				123
[MH-220] ⁻				109
[MH-224] ⁻	147			

程度地脱去, 得到一系列的转化产物, 通过药效学研究, 很有可能在这一系列转化产物中找到活性最强的化合物. 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, 是中药生物转化中的一种重要的分析手段.

References

- 1 Takasaki, M.; Konoshima, T.; Komatsu, K.; Tokuda, H.; Nishino, H. *Cancer Lett.* **2000**, *158*, 53.
- 2 Moritani, S.; Nomura, M.; Takeda, Y.; Miyamoto, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 1515.
- 3 Hirano, T.; Gotoh, M.; Oka, K. *Life Sci.* **1994**, *55*, 1061.
- 4 Cho, J.-Y.; Nam, K.-H.; Kim, A.-R.; Park, J.; Yoo, E.-S. *Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 1267.
- 5 Eich, E.; Pertz, H.; Kaloga, M.; Schulz, J.; Fesen, M.-R.; Mazumder, A.; Pommier, Y. *Med. Chem.* **1996**, *39*, 86.
- 6 Nose, M.; Fujimoto, T.; Takeda, T.; Nishibe, S.; Ogihara, Y. *Plata Med.* **1992**, *58*, 520.
- 7 Nose, M.; Fujimoto, T.; Takeda, T.; Nishibe, S.; Ogihara, Y. *Plata Med.* **1993**, *59*, 131.
- 8 Jin, J.-S.; Zhao, Y.-F.; Nakamura, N.; Akao, T.; Kakiuchi, N.; Hattori, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 910.
- 9 Jin, J.-S.; Zhao, Y.-F.; Nakamura, N.; Akao, T.; Kakiuchi, N.; Min, B. S.; Hattori, M. *Biol Pharm Bull.* **2007**, *30*, 2113.
- 10 Zhao, Y.-F.; Song, F.-R.; Yu, H.; Guo, X.-H.; Li, H.-L.; Liu, Z.-Q.; Liu, S.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **2007**, *28*, 2051 (in Chinese).
(赵宇峰, 宋风瑞, 越皓, 国新华, 李慧琳, 刘志强, 刘淑莹, 高等学校化学学报, **2007**, *28*, 2051.)
- 11 Zhao, Y.-F.; Song, F.-R.; Yu, H.; Guo, X.-H.; Li, H.-L.; Liu, Z.-Q.; Liu, S.-Y. *Chin. J. Analytical Chem.* **2007**, *35*, 1711 (in Chinese).
(赵宇峰, 宋风瑞, 越皓, 国新华, 李慧琳, 刘志强, 刘淑莹, 分析化学, **2007**, *35*, 1711.)
- 12 Zhao, Y.-F.; Song, F.-R.; Wang, X.-Y.; Guo, X.-H.; Liu, Z.-Q.; Liu, S.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 525 (in Chinese).
(赵宇峰, 宋风瑞, 王曦焱, 国新华, 刘志强, 刘淑莹, 化学学报, **2008**, *66*, 525.)
- 13 Heinonen, S.; Nurmi, T.; Liukkonen, K.; Poutanen, K.; Wähälä, K.; Deyama, T.; Nishibe, S.; Adlercreutz, H. *Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3178.

(A0804015 Qin, X.)