

14 位羟基进行修饰,并对衍生物进行了体外细胞毒性测试,其中 1 位羟基氧化后的衍生物在 MCF-7 中显示出较高的活性,提示 1 位羟基对冬凌草甲素的抗肿瘤活性起到一定作用。具体的构效关系研究正在进行中。

#### 参考文献:

- [1] 张瑞典,任天池. 冬凌草甲素的药学研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(11): 817-820.
- [2] Ikezoe T, Chen S S, Tong X J, *et al.* Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(4): 1187-1193.
- [3] 王瑞林. 冬凌草治疗食管癌、贲门癌 95 例临床的疗效结果 [J]. 肿瘤防治研究, 1984, 11(2): 86-87.
- [4] Fujita E, Nagao Y, Kohno T, *et al.* Antitumor activity of acylated oridonin [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(11): 3208-3213.
- [5] 阎学斌. 贝壳杉烷型二萜类的结构、衍生物设计合成及生物活性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2002.
- [6] 尹锋,梁敬钰,刘净. 冬凌草化学成分的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(4): 302-304.
- [7] Ding L S, Peng S L, Sun H D, *et al.* Cytotoxic ent-kauranoid derivatives from *Isodon rubescens* [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(20): 4941-4947.

## 龙血竭小鼠灌胃给药后血中移行成分的分析

陈旭<sup>1</sup>, 雍克岚<sup>1</sup>, 吕敬慈<sup>2</sup>, 张天宝<sup>1\*</sup>

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2. 上海大学理学院, 上海 200444)

**摘要:**目的 对龙血竭进行中药血清药物化学研究,为确定龙血竭的药效成分奠定基础。方法 在建立龙血竭高效液相色谱指纹图谱的基础上,通过比较龙血竭提取物、含药血清和空白血清的 HPLC 指纹图谱,结合 LC-MS/MS 检测技术确定龙血竭给药后的血中移行成分。结果 在龙血竭含药血清中发现 6 个入血成分,其中 5 个都属原型成分,分别为 3,4-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯、剑叶龙血素 B、4-羟基-4,2-二甲氧基-二氢查耳酮(新化合物)、剑叶龙血素 A 和龙血素 B;1 个可能为原型成分或代谢产物。结论 6 个入血成分是龙血竭在体内主要直接作用物质,有助于阐明龙血竭的药效物质基础。

**关键词:**龙血竭;血清药物化学;HPLC;LC-MS/MS

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)03-0352-04

### Analysis on migrating constituents absorbed into blood of mice after ig administration of *Resina Draconis*

CHEN Xu<sup>1</sup>, YONG Ke-lan<sup>1</sup>, LÜ Jing-ci<sup>2</sup>, ZHANG Tian-bao<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. College of Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**Abstract:** **Objective** Serum pharmacology was performed to screen the bioactive constituents of *Resina Draconis*. **Methods** Based on HPLC fingerprints of *Resina Draconis*, the migrating constituents absorbed into blood were determined by comparing the HPLC fingerprints of extraction of *Resina Draconis* (ERB), herb serum sample, and control serum sample, and with the help of LC-MS/MS. **Results** Six compounds absorbed into blood were detected, five of them were original in form which were 3,4-dihydroxy-5-methoxystilbene, cochinchinenin B, 4-hydroxy-4,2-dimethoxy-dihydrochalcone (a new compound), cochinchinenin A, and loureirin B, respectively. The other might be the original constituent or the metabolite. **Conclusion** The six constituents absorbed into blood are possible bioactive components of *Resina Draconis in vivo*. Further research will help clarify the bioactive constituents and mechanisms of *Resina Draconis*.

**Key words:** *Resina Draconis*; serum pharmacology; HPLC; LC-MS/MS

\* 收稿日期:2008-08-08

基金项目:上海市科委基础研究重点项目(08JC1409500);上海大学优秀青年教师基金项目(A. 07-0112-07-002)

作者简介:陈旭(1978→),女,江西人,工程师,主要从事生物活性物质的研究。Tel:(021)66134592 Fax:(021)66132177

E-mail:xuchen@staff.shu.edu.cn

血竭为百合科植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材经提取得到的树脂,1999 年国家药品监督管理局标准 WS<sub>3</sub>-082(Z-016)99(Z) 将其正式定名为“龙血竭”。国内外研究血竭的重点主要体现在植化成分的分离,以及在活血化瘀、抗炎止痛、抑菌、抗肿瘤等方面的生物功能,而在治疗糖尿病方面仅少量报道,且停留在初步动物实验和临床经验性医疗使用方面<sup>[1,2]</sup>。本研究组通过现代药理学实验证明龙血竭及其提取物具有显著的降血糖作用<sup>[3]</sup>。研究龙血竭活血化瘀和降血糖作用的药效物质,进行中药血清移行成分研究,是开发多靶点治疗糖尿病及其并发症的新药的快速、准确的捷径。

中药血清药物化学的方法是通过分析口服给药后血清中的移行成分,从血清中分离确定靶向效应成分群,进而确定中药体内直接作用物质<sup>[4-6]</sup>。鉴于此,本研究在龙血竭 HPLC 指纹图谱的基础上,通过比较龙血竭提取物、含药血清和空白血清的 HPLC 指纹图谱,以及采用 LC-MS/MS 检测技术,对小鼠灌服龙血竭提取物后的血中移行成分进行分析,为最终筛选出确切的龙血竭药效成分奠定基础。

## 1 仪器与材料

1.1 仪器:高效液相色谱 Agilent 1100 系列(美国 Agilent 公司),四极杆飞行时间质谱(Q-TOFMS)仪 Qultima 系列(美国 Micromass 公司),TGL-16G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),N-EVAP 恒温氮气吹干仪(Organomation Associates 公司),N-1001 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),DZF-6020 真空干燥箱(上海益恒实验仪器有限公司)。

1.2 药品和试剂:龙血竭(购于广西中医学院制药厂,批号:20050307);剑叶龙血素 B、剑叶龙血素 A、龙血素 B 对照品均购于中国药品生物制品检定所(批号:111660-200301)。甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),冰醋酸(优级纯)。

1.3 动物:动物为昆明小鼠,6 周龄,体质量(25 ± 2) g,雌雄各半,上海第二军医大学动物中心提供,生产许可证号:SCXK(沪)2002-2006。

## 2 实验方法

2.1 龙血竭提取物的制备:采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取,萃取条件:压力为 15 MPa,温度为 40 ℃,时间为 2 h,CO<sub>2</sub> 流量 30 kg/h,收集萃取残留物,并将其放入回流装置中,用适量的丙酮,在 80 ℃ 下抽提,抽提液浓缩后真空干燥,所得物即为龙血竭提取物。

2.2 供试品溶液的制备:提取物用蒸馏水配成质量浓度为 50 mg/mL 的混悬液,供小鼠灌胃用。提取物用甲醇配成质量浓度为 0.1 mg/mL 溶液,过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱分析或液质联用分析用。剑叶龙血素 B、剑叶龙血素 A、龙血素 B 对照品用甲醇配制成质量浓度分别为 20.0、20.0、5.0 μg/mL 的混合对照品溶液,过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱分析或液质联用分析。

2.3 含药血清的制备<sup>[7]</sup>:20 只小鼠分成空白组与给药组,每组 10 只,给药组每天以 500 mg/kg 的剂量,按 0.1 mL/10 g 灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d,末次给药前禁食 12 h,末次给药 1.5 h 后眼眶静脉窦取血,分别滴置于离心管中,空白组不给药其余同上处理。离心管于 3 000 r/min 离心 10 min 后取其上清液。取 1 mL 上清液于离心管中,加适量的乙腈,快速混匀,超声后,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,加入等量的醋酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液后,在氮气下吹干后,残渣用 1 mL 甲醇溶解,过 0.45 μm 滤膜备用。

2.4 液相色谱条件:色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温 40 ℃;流动相:乙腈-水(含体积分数为 0.1% 冰醋酸) (33:67);检测波长:280 nm;体积流量:1 mL/min。

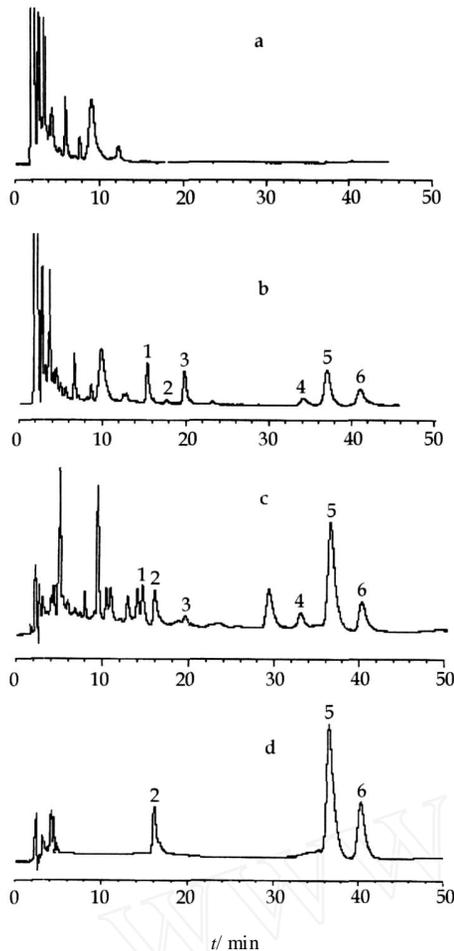
2.5 液质联用条件:色谱条件为 Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm),柱温 40 ℃;流动相:乙腈-水(含体积分数为 0.1% 冰醋酸) (33:67);检测波长:280 nm;体积流量:0.2 mL/min。

质谱条件为电喷雾正离子模式检测,毛细管电压和锥电压分别为 3.2 kV、50 V,源温度为 105 ℃,喷雾温度为 250 ℃,雾化气 45 L/h,喷雾气 480 L/h,Q-TOFMS 检测过程碰撞电压为 6 V 和 9 V。

## 3 结果与讨论

3.1 HPLC 分析结果:通过龙血竭提取物、含药血清和空白血清的 HPLC 指纹图谱比较(图 1-a~c),可以发现检测到的含药血清样品中与提取物的色谱保留时间相对应的为 1~6 号峰,初步肯定上述的 6 个峰为提取物入血的原型成分。2、5、6 号峰与混合对照品的保留时间相对应,初步判定 2、5、6 号峰分别为剑叶龙血素 B、剑叶龙血素 A 和龙血素 B(图 1-b~d)。

3.2 液质联用分析结果:从含药血清中分析检测到 6 个成分,其中 5 个成分与龙血竭中相应成分的保留时间的比较见表 1。根据文献报道<sup>[8,9]</sup>,如果所



a-空白血清 b-含药血清 c-提取物(0.1 mg/mL) d-混合对照品  
 2-剑叶龙血素 B 5-剑叶龙血素 A 6-龙血素 B  
 a-control serum b-herb serum c-ERB (0.1 mg/mL) d-mixture reference substances  
 2-cochininenin B 5-cochininenin A 6-loureirin B

图 1 给药后血清样品及对照品的高效液相色谱图  
 Fig 1 HPLC Chromatograms of serum after ig administration of ERB and reference substances

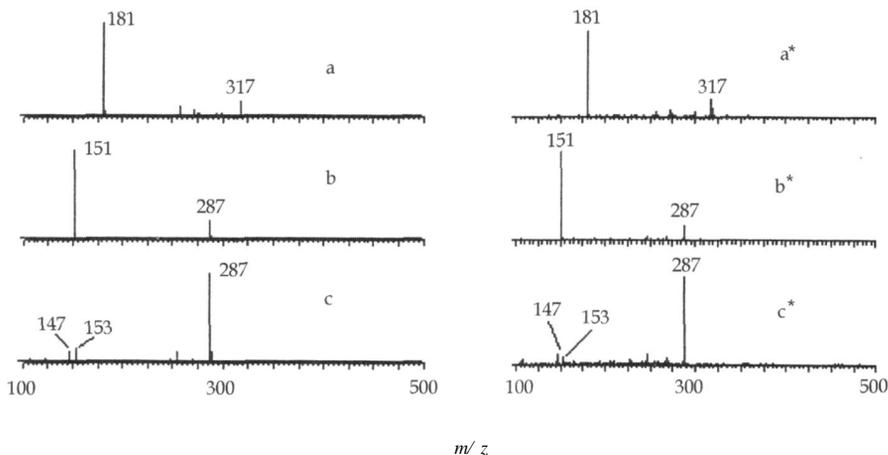


图 2 龙血素 B(a)、剑叶龙血素 A(b)和剑叶龙血素 B(c)对照品以及血清样品中 3 个目标化合物(a\*, b\*, c\*)的子离子质谱图

Fig 2 Product ion mass spectra of loureirin B (a), cochininenin A (b), and cochininenin B (c), and three target compounds (a\*, b\*, c\*) in serum sample

测定的目标化合物与相比较的样品中相应化合物的保留时间之间的 RSD 小于 2%, 可以认定这两者为同一物质。表 1 可知, 含药血清与提取物相应成分 1、2、4、5、6 号峰的保留时间的 RSD 均小于 2%, 因此进一步判定 2、5 和 6 号峰分别为剑叶龙血素 B、剑叶龙血素 A 和龙血素 B。

表 1 含药血清与 ERB 中相应成分保留时间( $t_R$ )的比较  
 Table 1 Comparison of retention time of corresponding peak in serum containing drug and ERB

峰号	混合对照品 $t_R$ /min	含药血清中 相应成分 $t_R$ /min	提取物中 相应成分 $t_R$ /min	含药血清与提 取物相应成分 $t_R$ 的 RSD/ %
1		12.92	13.09	1.30
2	14.41	14.19	14.33	1.52
4		34.27	34.53	0.75
5	37.21	37.10	37.15	0.29
6	41.09	41.01	41.05	0.19

3.3 给药后血中原型成分的确定: 在得到待测物的  $[M + H]^+$  准分子离子峰后, 再对产生的准分子离子进行碰撞诱导解离 (collision induced dissociation, CID) 分析, 获得相应的子离子质谱图, 从而获取有关化合物的信息。由图 2 可知, 混合对照品溶液中 2 号峰  $[M + H]^+$  的准分子离子峰  $m/z$  为 287, 产生  $m/z$  为 147、153 的子离子 (图 2-c); 5 号峰  $[M + H]^+$  的准分子离子峰  $m/z$  为 287, 产生  $m/z$  为 151 的子离子 (图 2-b); 6 号峰  $[M + H]^+$  的准分子离子峰  $m/z$  为 317, 产生  $m/z$  为 181 的子离子 (图 2-a)。含药血清中 2、5、6 号峰的准分子离子峰以及子离子的  $m/z$  与对照品的基本一致 (图 2), 3 种物质的质谱断裂方式见图 3, 因此可以认为小鼠服用提取物后, 剑叶龙血素 B、剑叶龙血素 A、龙血素 B 以原型成分吸收入

血;进而确定了含药血清中 2、5、6 号峰分别为剑叶龙血素 B、剑叶龙血素 A 和龙血素 B。

4 结论

通过比较龙血竭提取物、含药血清和空白血清的 HPLC 指纹图谱,并结合 LC-MS/MS 检测技术确定龙血竭给药后的血中移行成分。在龙血竭含药血清中发现 6 个入血成分,5 个属原型成分(1 号、2 号、4 号、5 号和 6 号峰),分别为 3,4-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯、剑叶龙血素 B、4-羟基-4,2-二甲氧基-二氢查耳酮、剑叶龙血素 A 和龙血素 B。2 号、5 号和 6 号峰通过对照品定性,1 号峰与 4 号峰是龙血竭原粉经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱

分离、制备色谱的分离纯化,并通过 IR、MS(EI)、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 以及二维核磁(HMQC, HMBC 和 DEPT)波谱分析及结构鉴定而确定的,其中 1 号峰已有人从龙血竭中分离得到鉴定为 3,4-二羟基-5-甲氧基二苯乙烯<sup>[10]</sup>;4 号峰是一新化合物,鉴定为 4-羟基-4,2-二甲氧基-二氢查耳酮<sup>[11,12]</sup>,经 SciFinder 检索,在天然资源提取物与化学合成中都未见报道,结构式见图 4。3 号峰可能是原型成分也可能是原型成分的代谢产物,还有待进一步考证。在含药血清中发现的 6 个入血成分可能是龙血竭在体内主要直接作用物质,对其进行深入研究,有助于阐明龙血竭的药效物质基础及药效机制。

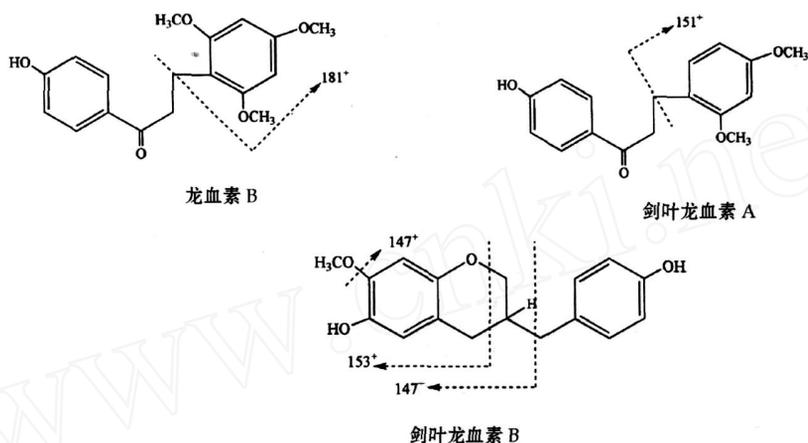


图 3 3 个目标化合物的质谱断裂方式图

Fig 3 Fragmentation patterns in mass spectrum of three target compounds

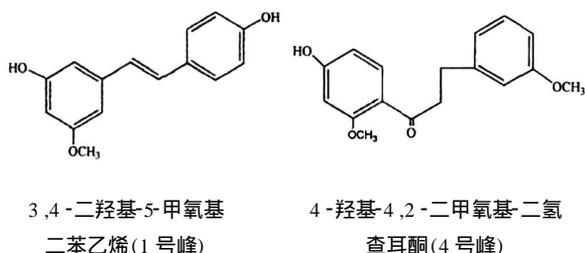


图 4 1 号峰和 4 号峰化合物的结构式

Fig 4 Chemical structures of compounds (1# and 4# peaks)

致谢:上海出入境检验检疫局方晓明研究员在实验方面的大力支持。

参考文献:

[1] Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115: 361-380.  
 [2] 张庆云, 朱 辉, 陈红英, 等. 龙血竭研究进展 [J]. *武警医学院学报*, 2004, 13(1): 69-71.  
 [3] 刘培培, 雍克岚, 吕敬慈, 等. 龙血竭提取物对正常及四氧嘧啶糖尿病模型小鼠的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(10): 1886-1888.  
 [4] 王喜军. 中药血清药物化学研究动态及发展趋势 [J]. *中国*

*中药杂志*, 2006, 31(10): 789-792.  
 [5] 张 梅, 邱 丰, 谢学军, 等. 葛根血中移行成分高效液相色谱分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(3): 215-217.  
 [6] 曹 艺, 朱丹妮, 林志宏, 等. 归苓片血清药物化学研究 ( ) [J]. *中国药科大学学报*, 2007, 38(6): 519-522.  
 [7] 周 晔, 金描真, 易 军, 等. 含中药龙血竭的血清处理方法研究 [J]. *广东药学院学报*, 2007, 23(2): 151-153.  
 [8] Li Y T, Campbell D A, Bennett P K, et al. Acceptance criteria for ultratrace HPLC: Tandem mass spectrometry: Quantitative and qualitative determination of sulfonylurea herbicides in soil [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(19): 3397-3404.  
 [9] Li X L, Xiao H B, Liang X M, et al. LC-MS/MS Determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in rat serum after orally administrating the decoction of *Bupleurum falcatum* L. and *Fractus aurantii* [J]. *J Pharm Biomed*, 2004, 34: 159-166.  
 [10] 何 兰, 王竹红, 李华民, 等. 广西血竭化学成分的研究 ( ) [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(12): 1195.  
 [11] 雍克岚, 吕敬慈, 张天宝, 等. 从龙血竭中分离纯化的新二氢查耳酮化合物及其制备 [P]. 中国专利: CN101024604, 2007-08-29.  
 [12] Yong KL, L Ü C, Zhang T B, et al. A new dihydrochalcone from dragon's blood of red resin *Dracaena cochinchinensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(18): 1624-1626.