

冬凌草对血浆复钙作用的凝血活性成分

李高申*, 郭梅珍, 张伟, 单远
(黄河科技学院, 郑州 450063)

[摘要] 目的:从冬凌草中寻找具有血浆复钙作用的活性成分。方法:对冬凌草乙酸乙酯部位和甲醇部位采用各种柱色谱进行分离纯化,以对体外血浆复钙时间的影响为活性指标,对冬凌草中活性成分进行筛选。结果:从乙酸乙酯部位和甲醇部位共分离鉴定了6个化合物,其中,与维生素K₁组相比,冬凌草甲素(1)和迷迭香酸(2)对血浆复钙时间的影响无显著性差异;与空白组相比,咖啡酸(3)对血浆复钙时间的影响无显著性差异;水杨酸(4)(214.77±5.8)s和阿魏酸(5)(233.43±6.88)s对血浆复钙时间小于空白组(252.23±2.6)s,大于维生素K₁组(158.2±2.33)s;香草酸(6)(286.2±4.53)s对血浆复钙时间大于空白组,小于灯盏花素组(309.87±2.34)s。结论:冬凌草甲素、迷迭香酸、水杨酸和阿魏酸具有促凝血作用;香草酸具有抗凝血作用。

[关键词] 冬凌草; 血浆复钙时间; 活性成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0059-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130059

Effect of Coagulant Active Constituents of Rabdosiae Rubescentis Herba on Plasma Recalcification Time

LI Gao-shen*, GUO Mei-Zhen, ZHANG Wei, SHAN Yuan (Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450063, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the active compounds of Rabdosiae Rubescentis Herba on plasma recalcification time. **Method:** EtOAC and methanol extracts were separated and purified by several kinds of chromatography, observed the plasma recalcification time *in vitro* to screen the active compounds of Rabdosiae Rubescentis Herba. **Result:** Six compounds were isolated and identified from the two extracts above. Compared with vitamin K₁ group, oridonin (1) and rosmarinic acid (2) had no significant difference on plasma recalcification time ($P > 0.05$). Compared with control group (200.87 ± 2.45) s, caffeic acid (3) had no significant difference ($P > 0.05$). The plasma recalcification times of salicylic acid (4) (214.77 ± 5.8) s and ferulic acid (5) (233.43 ± 6.88) s were higher than that of the control group (252.23 ± 2.6) s, and lower than that of vitamin K₁ group (158.2 ± 2.33) s. The plasma recalcification time of vanillic acid (6) (286.2 ± 4.53) s was longer than that of the control group (252.23 ± 2.6) s, and lower than that of breviscapine group (309.87 ± 2.34) s. **Conclusion:** Oridonin, rosmarinic acid, salicylic acid and ferulic acid had procoagulant activity, vanillic acid had anticoagulant effect.

[Key words] Rabdosiae Rubescentis Herba; plasma recalcification time; active constituents control control

冬凌草具有清热解毒、活血止痛之功效,用于咽喉肿痛、蛇虫咬伤等^[1]。现代研究表明,冬凌草中含有挥发油、生物碱、有机酸、萜类、甾体和黄酮等多种化学成分,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、增强免疫、抗氧化、抗突变和降压等药理活性^[2-3],其中研究报道较多的是其抗肿瘤作用,毒性不明显,被誉为“紫杉醇第二”,主要抗癌活性成分为冬凌草甲素^[4-5]和冬

凌草乙素^[6]。

血浆复钙时间是在去钙离子的血浆中,重新加入适量的钙,内源性凝血过程得以恢复所需要的时间,是内源性凝血系统的筛选指标之一,但是关于冬凌草对血浆复钙时间的影响未见报道,本文旨在考察从冬凌草中分离得到的化合物对家兔血浆复钙时间的影响,以便更深入地研究其体外

[收稿日期] 20141103(001)

[基金项目] 河南省科技攻关重点项目(122102310647)

[通讯作者] *李高申,硕士,副教授,从事中医学教学与研究;Tel:13939069901,E-mail:hghaoshen@163.com

凝血活性,为更好地开发和利用冬凌草植物资源提供理论依据。

1 材料

Avance-400M型核磁共振谱仪(德国 Bruker), LC3000型高效液相色谱(北京创新通恒科技有限公司),柱色谱填料硅胶200~300目,硅胶H(青岛海洋化工),LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(瑞典 Pharmacia),LRH-150型生化培养箱(上海一恒科技有限公司),秒表计时器。

注射生理盐水(批号2012053107,山东齐都药业有限公司),维生素K₁注射液(批号1109051,天津药业集团新郑股份有限公司),注射用灯盏花素(批号20110202,湖南恒生制药有限公司),自制枸橼酸钠溶液,自制氯化钙溶液。

冬凌草为唇形科植物碎米桠 *Rabdosia bescens* 的干燥地上部分,于2012年9月采集于河南济源,由河南大学中药研究所李昌勤教授鉴定,标本存于黄河科技学院天然药物研究所。

獭兔,体重2.0~2.5 kg,雄性,由河南大学药学院提供(动物许可证号为医动字09-1-2号)。

2 方法

2.1 提取分离 冬凌草叶干燥、粉碎,用70%乙醇浸泡2次,每次3 d,合并提取液,回收溶剂,得乙醇总浸膏。将总浸膏用硅胶拌样,依次用石油醚、乙酸乙酯和甲醇洗脱,回收溶剂后得石油醚部位、乙酸乙酯部位和甲醇部位。利用反复硅胶柱色谱、高效液相制备色谱、凝胶柱色谱和重结晶等手段对乙酸乙酯部位和甲醇部位进行分离纯化,分离得到化合物1~6。

2.2 对体外血浆复钙时间的影响 参考文献[7]的方法,取獭兔耳缘静脉取血3.6 mL,加至含38 g·L⁻¹枸橼酸钠400 L,混匀,1 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液备用。样品组加入血浆0.1 mL及样品溶液各0.1 mL,阳性对照组加入血浆0.1 mL及药品溶液0.1 mL,空白组加入血浆0.1 mL及空白溶剂0.1 mL于37℃温育1 min后分别向每管加入2.775 g·L⁻¹CaCl₂溶液0.1 mL,计时,直到检测到纤维蛋白丝时停止计时。以维生素K₁和灯盏花素对照,测定各样品体外血浆复钙时间,采用SPSS17.0软件单因素方差分析,进行数据统计。

3 结果

3.1 结构鉴定 化合物1 无色针状结晶,mp 245.5~247℃。IR(KBr, cm⁻¹): 3 433, 3 382, 3 304, 1 711, 1 647, 1 095, 1 080, 1 068,其IR图

谱数据与文献[8]一致,故鉴定化合物1为冬凌草甲素。

化合物2 浅黄色粉末, mp197~198℃。ESI-MS *m/z* 359 [M-H]⁻, 223, 197, 179, 161。¹H-NMR(CD₃OD, 500 MHz, δ): 6.67(1H, s, H-2'), 6.76(1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-5'), 6.63(1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-6'), 7.44(1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7'), 6.22(1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8'), 6.49(1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-6), 6.68(1H, brs, H-2), 6.65(1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5), 2.78(1H, t, *J* = 14.0, 10.0 Hz, H-7a), 3.01(1H, m, H-7b), 6.26(1H, d, *J* = 16 Hz, H-8)。¹³C-NMR(CD₃OD, 125 MHz) δ : 127.9(C-1), 116.5(C-2), 144.3(C-3), 145.8(C-4), 115.8(C-5), 121.4(C-6), 147.6(C-7), 116.1(C-8), 179.2(C-9), 128.8(C-1'), 114.5(C-2'), 149.1(C-3'), 146.2(C-4'), 117.3(C-5'), 122.8(C-6'), 37.4(C-7'), 74.3(C-8'), 173.5(C-9')。以上数据与文献[9]对照,故鉴定化合物2为迷迭香酸。

化合物3 黄白色结晶(MeOH), mp 223~225℃,与文献[10]对照,鉴定化合物3为咖啡酸。

化合物4 白色结晶粉末, mp 158~159℃。EI-MS *m/z* 138(M⁺, 60), 120(M⁺-H₂O, 100), 92(120-CO, 85), 64(30), 53(15)。以上数据与文献[11]对照,鉴定为化合物4为水杨酸。

化合物5 白色结晶粉末,经TLC检识与对照品一致,且波谱数据与文献[12]一致,故化合物5鉴定为阿魏酸。

化合物6 黄白色结晶粉末, mp 210.5~212℃。EI-MS *m/z* 168[M]⁺,与文献[13]对照,鉴定化合物6为香草酸。

3.2 活性成分筛选 考察延长血浆复钙时间,总浸膏组与空白组相比有显著性的差异(*P* < 0.001);与灯盏花素组相比无显著性的差异(*P* > 0.05)。可见,总浸膏具有抗凝血作用,且作用与灯盏花素相当。对总浸膏进一步提取,得到乙酸乙酯部位和甲醇部位,对两部位进行活性筛选,考察延长血浆复钙时间。结果显示,乙酸乙酯部位和甲醇部位与空白组相比,均有显著差异(*P* < 0.01);乙酸乙酯部位与灯盏花素组相比无显著差异(*P* > 0.05),甲醇部位有显著性的差异(*P* < 0.05)。可见,乙酸乙酯部位具有抗凝血作用,且作用于灯盏花素相当,甲醇部位虽具有一定的抗凝血作用,但是与灯盏花素作用具有显著性差异。

对乙酸乙酯和甲醇部位进一步分离纯化,得到 6 个化合物,考察延长血浆复钙时间。结果显示,冬凌草甲素和迷迭香酸与维生素 K₁ 组相比无显著性差异,可见,冬凌草甲素和迷迭香酸具有促凝血作用,且作用与维生素 K₁ 相当;咖啡酸与空白组相比无显著性差异,说明咖啡酸对凝血无作用;水杨酸、阿魏酸和香草酸与空白组、维生素 K₁ 组和灯盏花素组相比,均有显著性差异 ($P < 0.001$),但水杨酸

(214.77 ± 5.8) s 和阿魏酸 (233.43 ± 6.88) s 对血浆复钙时间小于空白组 (252.23 ± 2.6) s,大于维生素 K₁ 组 (158.2 ± 2.33) s;香草酸 (286.2 ± 4.53) s 对血浆复钙时间大于空白组,小于灯盏花素组 (309.87 ± 2.34) s。可见,水杨酸和阿魏酸具有一定的促凝血作用,但其作用弱于维生素 K₁,香草酸显示出一定的抗凝血作用,但是作用弱于灯盏花素。见表 1。

表 1 冬凌草对体外血浆血钙时间的凝血活性成分筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 总浸膏 | 乙酸乙酯部位 | 甲醇部位 | 冬凌草甲素 | 迷迭香酸 | 咖啡酸 | 水杨酸 | 阿魏酸 | 香草酸 |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 样品 | 250.42 ± 1.97 | 248.92 ± 5.69 | 249.98 ± 2.74 | 166.32 ± 2 | 158.35 ± 6.08 | 208.1 ± 7.07 | 214.77 ± 5.8 | 233.43 ± 6.88 | 286.2 ± 4.53 |
| 空白 | 164.8 ± 3.83 ²⁾ | 164.8 ± 3.83 ²⁾ | 200.93 ± 7.02 ²⁾ | 200.93 ± 7.03 ¹⁾ | 200.87 ± 2.45 ²⁾ | 200.87 ± 2.45 | 252.23 ± 2.6 ³⁾ | 252.23 ± 2.6 ²⁾ | 252.23 ± 2.6 ³⁾ |
| 维生素 K ₁ | 90.97 ± 2.76 ⁴⁾ | 90.97 ± 2.77 ⁴⁾ | 164.97 ± 2.51 ⁴⁾ | 164.97 ± 2.5 | 134.83 ± 3.81 | 134.83 ± 3.81 ⁴⁾ | 158.2 ± 2.33 ⁴⁾ | 158.2 ± 2.33 ⁴⁾ | 158.2 ± 2.33 ⁴⁾ |
| 灯盏花素 | 250.05 ± 5.35 | 250.05 ± 5.35 | 259.83 ± 2.97 ⁹⁾ | 259.83 ± 2.97 ⁷⁾ | 282.13 ± 4.86 ⁷⁾ | 282.13 ± 4.8 ⁷⁾ | 309.87 ± 2.34 ⁷⁾ | 309.87 ± 2.34 ⁷⁾ | 309.87 ± 2.34 ⁷⁾ |

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.001$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.05$;与维生素 K₁ 比较⁴⁾ $P < 0.001$; ⁵⁾ $P < 0.01$; ⁶⁾ $P < 0.05$;与灯盏花素比较⁷⁾ $P < 0.001$; ⁸⁾ $P < 0.01$; ⁹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

天然抗凝血物质具有不同的化学类别和结构特征,常见的有黄酮类、生物碱类和多糖类^[14-16]。研究表明,冬凌草中含有多糖、萜类、生物碱、黄酮和有机酸等化学成分,这些类型的化合物启发我们去研究冬凌草是否具有此活性。

本实验对冬凌草采用各种柱色谱进行分离纯化,以对体外血浆复钙时间的影响为活性指标,对其活性成分进行筛选。研究发现冬凌草的乙醇总浸膏有抗凝血活性,进一步对其总浸膏进行提取为 3 个极性不同的石油醚部位、乙酸乙酯部位和甲醇部位,其活性大小为乙酸乙酯部位 > 甲醇部位,可以推测,抗凝血活性成分主要在乙酸乙酯部位。但是对具有抗凝血的乙酸乙酯和甲醇活性部位进行分离纯化,活性筛选,只分离到的一个具有抗凝血活性的化合物香草酸,4 个具有促凝血作用的化合物,如冬凌草甲素、迷迭香酸、水杨酸和阿魏酸,可以推测冬凌草中还存在其他抗凝血活性成分,由于分离方式和仪器等原因,未能分离得到,需要利用先进的分离方式对其进一步分离纯化。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:106-107.

[2] 刘净,梁敬钰,谢韬. 冬凌草研究进展[J]. 海峡药学, 2004, 16(2):1-7.

[3] 郭萍,李玉山,郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 144-147.

[4] 刘家云,魏敏,顾琴龙. 冬凌草甲素抗肿瘤的研究进

展[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(2):81-84.

[5] 王天晓,刘迎滑,时小燕. 冬凌草甲素下调 STAT3-HK 通路诱导 HepG2 细胞凋亡的研究[J] 中国药理学通报, 2014, 30(3):101-106.

[6] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Antiproliferation effects of ponocidin on human myeloid leukemia cells *in vitro*[J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(4):653-657.

[7] 顾海鹏,周大鹏,顾雪竹,等. 玉蜀黍轴及苞叶对凝血作用的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(5):681-683.

[8] 闫学斌,雷萌,可钰,等. 冬凌草的化学成分研究[J]. 化学研究, 2006, 17(3):80-82.

[9] 高俊峰,丁玲,张鹏,等. 石见穿化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10):1556-1559.

[10] 陶婷婷,濂井康雄,王志志,等. 窄叶鲜卑花的化学成分[J]. 中国天然药物, 2006, 4(4):257-259.

[11] 郑晓珂,李钦,冯卫生. 冬凌草中酚酸类化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(5):335-336.

[12] 裴秋燕,斯建勇,沈连刚,等. 兴安升麻根茎的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(6):1075-1078.

[13] 陈林. 四种苦苣苔科植物的生物活性研究[D]. 郑州:河南大学, 2010.

[14] 林莉莉,邹浩军,常静. 灯盏乙素和灯盏花素对急性心肌梗死的保护作用[J]. 药物研究, 2010, 19(13): 12-13.

[15] 崔恩贤,龙丽辉,杨小梅,等. 漆黄素、槲皮素的体外抗凝血和溶血栓作用[J]. 中药材, 2009, 32(7): 1111-1113.

[16] Ye L B, Xu L, Li J R. Preparation and anticoagulant activity of afucosylated polysaccharide sulfate from a sea cucumber *Acaudinamolpadioidea* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(3):2052-2057.

[责任编辑 顾雪竹]