

新疆鼠尾草根中 6,7-去氢罗列酮的 抗血小板聚集作用考察及其提取工艺优选

派日黛姆·乌布勒,王新玲,热娜·卡斯木*,阿迪拉木·阿比利米提,王晓梅,胡君萍
(新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:评价新疆鼠尾草根中 6,7-去氢罗列酮的体外抗血小板聚集作用并优选其提取工艺。方法:应用比浊法测定 6,7-去氢罗列酮体外抗血小板聚集作用。在单因素试验基础上,以 6,7-去氢罗列酮提取率为指标,通过正交设计法考察提取次数、料液比和提取时间对 6,7-去氢罗列酮提取工艺的影响。采用 HPLC 测定 6,7-去氢罗列酮含量,色谱条件为依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.02% 甲酸(83:17),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 330 nm,柱温 40℃。结果:6,7-去氢罗列酮高、中剂量组抑制凝血酶诱导的血小板聚集作用与生理盐水组比较均具有极显著性差异,高剂量组在 15,30,45,60 min 内由凝血酶诱导的血小板抑制聚集率分别为 90%,75%,66%,64%。最佳提取工艺为加 10 倍量 95% 于 85℃ 提取 3 次,每次 3 h,新疆鼠尾草根中 6,7-去氢罗列酮质量分数 0.01%。结论:新疆鼠尾草根中 6,7-去氢罗列酮表现出较强的抗血小板聚集作用,在此活性基础上优选的提取条件稳定可行。

[关键词] 新疆鼠尾草; 6,7-去氢罗列酮; 正交试验; 提取工艺; 凝血酶; 抗血小板聚集; 单因素试验

[中图分类号] R284.2; R284.1; R285; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0015-04

[doi] 10.11653/syfj2013220015

Inhibition of Platelet Aggregation Investigation and Optimization of Extracting Technology of 6, 7-Dehydroroyleanone in Roots of *Salvia deserta* Schang

PAIRIDAIMU Wubuli, WANG Xin-ling, RENA Kasimu*, ADILAMU Abilimiti, WANG Xiao-mei, HU Jun-ping
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[收稿日期] 20130424(020)

[基金项目] 国家科技部“十一五”支撑计划项目(2007BAI30B02-2);新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2012123)

[第一作者] 派日黛姆·乌布勒,在读硕士,从事新疆特色中药资源的开发与利用研究,Tel:0991-4363345,E-mail:Parizat122@163.com

[通讯作者] *热娜·卡斯木,博士,教授,从事新疆特色中药资源的开发与利用,Tel:0991-4362473,E-mail:renakasimu@vip.sina.com

- [3] 赵丽芸,陈宁.清燥救肺汤加减方治疗鼻后滴流综合征疗效观察[J].中国民族民间医药,2011,20(7):73.
- [4] 夏德洪,奚蕾,沈伟生,等.清燥救肺汤加黄芪对放射性肺损伤干预作用及对 TGF-β₁, IL-1 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):240.
- [5] 傅饶,孔令苓.清燥救肺汤预防和治疗放射性肺炎的临床观察[J].中国医药指南,2011,9(11):29.
- [6] 卢红蓉.清燥救肺汤对流感病毒 FMI 感染小鼠肺组织匀浆液中 TNF-α、MCP-1 和 NO 含量的影响[J].世界中医药,2007,2(4):238.
- [7] 张慧玲,樵书宏.清燥救肺汤化痰治疗转化酶抑制剂致咳嗽体会[J].光明中医,2011,26(12):2454.
- [8] 陈娟娟,方建国,万进,等.绿原酸体外抗人巨细胞病毒的实验研究[J].医药导报,2009,28(9):1138.
- [9] 李贵海,董其宁,孙付军,等.不同炮制对苦杏仁毒性及止咳平喘作用的影响[J].中国中药杂志,2007,32(12):1247.
- [10] 杨春花.不同产地甘草的质量评价研究[J].吉林农业大学,2006.
- [11] 时维静,王海侠,卜先峰,等.综合评分法优化白头翁汤提取工艺[J].中国中医药科技,2009,16(1):44.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To evaluate anti-platelet aggregation of 6, 7-dehydroroyleanone in roots of *Salvia deserta* and optimize its extraction process. **Method:** *In vitro* anti-platelet aggregation of 6, 7-dehydroroyleanone was determined by turbidimetry. Based on single factor tests, orthogonal test was adopted to effects of extracting times, solid-liquid ratio, extracting time on extraction technology of 6, 7-dehydroroyleanone with yield of 6, 7-dehydroroyleanone as index. The content of 6, 7-dehydroroyleanone was determined by HPLC with mobile phase of methanol-0.02% formic acid (83:17), detection wavelength of 272 nm, column temperature at 40 °C. **Result:** By comparing with the saline group, the high and middle dose group of 6, 7-dehydroroyleanone could effectively inhibit platelet aggregation induced by thrombin, platelet aggregation inhibition rates of the high dose group of 6, 7-dehydroroyleanone within 15, 30, 45, 60 min were 90%, 75%, 66%, 64%, respectively. Optimum extraction process was as following: extracted 3 times with ten-fold the amount of 95% ethanol at 85 °C for 3 h each time; The content of 6, 7-dehydroroyleanone in roots of *S. deserta* was 0.01%. **Conclusion:** 6, 7-Dehydroroyleanone in roots of *S. deserta* showed better anti-platelet aggregation effect, optimized extraction technology was stable, reasonable and feasible which based on the activity.

[Key words] *Salvia deserta*; 6, 7-dehydroroyleanone; orthogonal test; extraction technology; thrombin; anti-platelet aggregation; single factor test

新疆鼠尾草又称新疆丹参,主产于新疆北部,生长在荒地、草地及林下,海拔 270 ~ 1 850 m^[1]。民间多以全草入药,具有清热解毒、祛痰止咳、消肿利尿等功效^[2]。为探索和寻找丹参在新疆的替代品,前期研究已从新疆鼠尾草中分离得到了 6,7-去氢罗列酮^[3-5],并证实其具有抗心肌缺血等作用^[6]。由于新疆鼠尾草根较细小,有效利用率低,故通过 HPLC 比较药材叶、茎、花中 6,7-去氢罗列酮含量,结果显示根中含量最高^[7]。为充分开发新疆鼠尾草资源,本实验在考察 6,7-去氢罗列酮抗血小板聚集作用基础上,采用正交试验优选 6,7-去氢罗列酮的提取工艺,为新疆鼠尾草临床用于治疗心血管疾病的推广提供研究基础。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),HH-S4 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器),N-1001 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),PL6001-S 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),BC-2300 型全自动三分群血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),490-4D 型血小板凝聚仪(美国 Chrono-log 公司),TDL-5A 型离心机(上海菲哈尔分析仪器有限公司)。

新疆鼠尾草(由新疆医科大学天然药物化学教研室提供,经新疆医科大学生药教研室帕丽达教授鉴定为唇形科植物鼠尾草 *Salvia deserta* Schang 的根),6,7-去氢罗列酮对照品(新疆医科大学天然药物化学教研室,批号 20121123),凝血酶(美国 Chrono-log 公司,批号 3427),生理盐水(山东齐都药

业有限公司),血液细胞仪用稀释液、E-Z 清洗液、三分类探头清洗液(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

SPF 级新西兰种兔,由新疆医科大学实验动物中心提供,雄性,体重(1.8 ± 0.5) kg,饲养环境为光照 12 h·d⁻¹,温度(21 ± 2) °C,湿度 40% ~ 45%,许可证号 2011-0004。

2 方法与结果

2.1 体外抗血小板聚集试验^[8,9] 从家兔耳缘静脉取血,按 1:9 加 3.8% 枸橼酸钠抗凝,以 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取上层富集血小板血浆(PRP);剩余血浆部分以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,即得贫血小板血浆(PPP);以 PPP 调 PRP 使透光度约 30(血小板数 2 × 10⁹ L⁻¹)。分别取调过的 PRP 240 μL 与不同质量浓度的 6,7-去氢罗列酮溶液或生理盐水 30 μL 置于比浊管中,于 37 °C 温育,在电磁棒搅拌下分别加入致聚剂凝血酶 30 μL(10 U·mL⁻¹),使终质量浓度 1 U·mL⁻¹,诱导血小板聚集,分别考察不同质量浓度 6,7-去氢罗列酮溶液对凝血酶诱导的血小板聚集作用的影响。采取低(10 mg·L⁻¹)、中(100 mg·L⁻¹)、高(1 000 mg·L⁻¹) 3 个质量浓度进行测定并比较对照 PRP 与样品 PRP 在 5 min 内最大聚集程度,计算聚集率($\bar{x} \pm s, n = 7$)分别为(94.4 ± 6.08)%, (73 ± 5.9)%, (50.6 ± 10.2)%, 对照组聚集率(97.1 ± 1.86)%, 试样抑制聚集率分别为(1.2 ± 5.31)%, (24.7 ± 6.07)%, (47.8 ± 10.5)%, 表明与对照组相比,6,7-去氢罗列

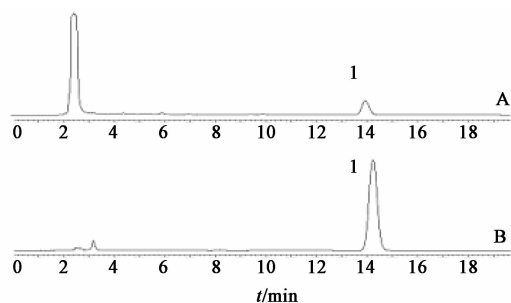
酮高、中质量浓度组具有较强的抗血小板聚集作用,但低质量浓度组的抗血小板聚集作用不明显,血小板聚集率与6,7-去氢罗列酮质量浓度存在明显的剂量依赖性。

血小板抑制聚集率 = (对照管血小板聚集率 - 样品管血小板聚集率) / 对照管血小板聚集率 × 100%

测定6,7-去氢罗列酮高质量浓度组在15,30,45,60 min内由凝血酶诱导的血小板抑制聚集率分别为90%,75%,66%,64%,说明6,7-去氢罗列酮高质量浓度组随时间延长,血小板聚集率变低,抑制率变高,存在一定的时间依赖性。

2.2 6,7-去氢罗列酮的含量测定

2.2.1 色谱条件 依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.02% 甲酸(83:17), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 330 nm, 柱温 40 °C, 见图 1。



A. 供试品; B. 对照品; 1. 6,7-去氢罗列酮

图 1 新疆鼠尾草 HPLC

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取6,7-去氢罗列酮对照品10.5 mg, 置10 mL量瓶里, 加甲醇定容到刻度, 摇匀, 取该溶液1 mL置10 mL量瓶里, 用甲醇定容到刻度, 即得。

2.2.3 标准曲线的绘制 分别取6,7-去氢罗列酮对照品溶液10,20,30,40,50,60,70,80 μL进样, 按2.2.1项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 1.4 \times 10^5 X - 5.14 \times 10^4$ ($r = 0.9998$), 表明6,7-去氢罗列酮进样量在1.05 ~ 8.4 μg呈良好线性关系。

2.3 单因素试验考察 将干燥的新疆鼠尾草根砸碎, 粉碎, 过40目筛, 备用。

2.3.1 乙醇体积分数 称取新疆鼠尾草根粉末5份, 每份3 g, 置250 mL圆底烧瓶中, 固定提取温度85 °C, 料液比1:20, 提取时间1 h条件下, 分别用体积分数为65%,75%,85%,95%,100%的乙醇溶液回流提取1次, 趁热过滤并收集滤液, 将滤液转移至

250 mL浓缩瓶中, 浓缩干燥, 用甲醇转溶至10 mL量瓶中^[10], 离心(3500 r·min⁻¹, 10 min), 取上清液, 按2.2.1项下色谱条件测定, 进样量30 μL, 结果6,7-去氢罗列酮提取峰面积平均评分值 $A_i/A_{max} \times 100\%$, 分别为50.74%,51.44%,78.95%,100%,93.60%,故选取95%乙醇。

2.3.2 提取温度 用95%乙醇分别在65,75,85,95 °C下进行回流提取, 其余条件同2.3.1项下, 结果6,7-去氢罗列酮提取峰面积平均评分值分别为30.87%,69.19%,100%,74.31%。表明随着温度的升高, 溶剂分子和溶质分子的运动加剧, 促进了扩散作用, 从而有利于提取率的提高; 但当温度提高至95 °C左右, 提取率明显下降, 可能是因为过高的温度会破坏6,7-去氢罗列酮的化学结构, 导致提取率下降, 故选取提取温度85 °C。

2.3.3 提取时间 用95%乙醇分别回流提取1,2,3,4 h, 其余条件同2.3.1项下, 结果6,7-去氢罗列酮提取峰面积平均评分值分别为4.6%,6.5%,55.85%,100%,表明提取时间对6,7-去氢罗列酮提取率的影响较明显。

2.3.4 提取次数 用95%乙醇分别回流提取1,2,3,4次, 其余条件同2.3.1项下, 结果6,7-去氢罗列酮提取峰面积平均评分值分别为81.1%,90.97%,95.09%,100%。

2.3.5 料液比 用95%乙醇分别考察不同物料比1:10,1:20,1:30,1:40对6,7-去氢罗列酮提取率的影响, 其余条件同2.3.1项下, 结果6,7-去氢罗列酮提取峰面积平均评分值分别为100%,78.24%,80.74%,53.68%。

2.4 正交试验优选 精密称取新疆鼠尾草根粉末9份, 每份3 g, 按L₉(3⁴)正交表进行试验, 以6,7-去氢罗列酮提取率为指标, 选择提取次数、料液比和提取时间为考察因素, 优选新疆鼠尾草根中6,7-去氢罗列酮的最佳提取条件^[11], 每个因素设置3个水平, 因素水平见表1, 试验安排及结果见表2, 方差分析见表3。

表 1 新疆鼠尾草根中6,7-去氢罗列酮提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取时间/h	B 提取次数/次	C 加醇量/倍
1	1	1	1:5
2	2	2	1:10
3	3	3	1:15

表 2 新疆鼠尾草根中 6,7-去氢罗列酮提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	6,7-去氢罗列酮 提取峰面积 平均评分值/%
1	1	1	1	1	4.34
2	1	2	2	2	11.78
3	1	3	3	3	9.28
4	2	1	2	3	39.55
5	2	2	3	1	35.91
6	2	3	1	2	61.27
7	3	1	3	2	61.44
8	3	2	1	3	81.39
9	3	3	2	1	100
K_1	8.47	35.11	49.0	46.75	
K_2	45.58	43.03	50.44	44.83	
K_3	80.94	56.85	35.54	43.41	
R	72.47	21.74	13.46	3.34	

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $A > B > C$ 。方差分析表明 A 因素对提取工艺的影响具有极显著差异, B, C 因素则有显著性差异, 确定最佳组合 $A_3B_3C_2$, 即乙醇体积分数 95%, 提取温度 85 ℃, 提取时间 3 h, 提取数 3 次, 料液比 1:10。

表 3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	788.8	2	394.4	466.6	<0.01
B	726.4	2	363.2	43.01	<0.05
C	405.2	2	202.6	23.99	<0.05
D(误差)	16.9	2	8.4		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

2.5 验证试验 称取新疆鼠尾草根粉末 3 份, 按优选的提工艺条件进行验证试验, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算 6,7-去氢罗列酮在新疆鼠尾草根中平均质量分数 0.01%, RSD 3.4%。

3 讨论

前期研究发现新疆鼠尾草根部的三氯甲烷提取物有较好的由 ADP 诱导的体外抗血小板聚集作用, 经提取、分离得到了 6,7-去氢罗列酮^[5]。由于在前

期试验中未能将凝血酶作为诱导剂的机制展开研究, 根据 2 种诱导剂的机制不同, 本实验选择了凝血酶为诱导剂对 6,7-去氢罗列酮的抗血小板聚集作用进行探讨, 发现 6,7-去氢罗列酮高、中质量浓度组与空白组比较, 具有较强抗血小板聚集作用, 且 6,7-去氢罗列酮质量浓度与血小板聚集率存在明显的剂量依赖性和时间依赖性^[8-9]。

分别选择甲醇和三氯甲烷对新疆鼠尾草根进行提取, 结果后者的 6,7-去氢罗列酮提取率比前者高^[7]。但考虑到三氯甲烷毒性和成本问题, 最终选择了不同体积分数乙醇提取新疆鼠尾草根中 6,7-去氢罗列酮。

[参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第 3 册 [M]. 北京: 科学出版社, 1974: 672.
- [2] 周荣汉. 中药资源学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 441.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 62.
- [4] Tezuka Y, Kasimu R, LI J X, et al. Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46 (1): 107.
- [5] 常军民, 热娜·卡斯木, 堵年生. 新疆鼠尾草的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 27.
- [6] 何新, 常军民, 迪丽拜尔, 等. 6,7-去氢罗列酮对实验性心肌缺血的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(5): 596.
- [7] 热娜·卡斯木, 张焯, 堵年生, 等. HPLC 法测定新疆鼠尾草各部位 6,7-去氢罗列酮的含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2002, 25(3): 231.
- [8] Verma S K, Singh J, Khamesra R, et al. Effect of ginger on platelet aggregation in man [J]. Ind J Med Res, 1993, 98: 240.
- [9] Kawakishi S, Morimitsu Y, Osawa T. Chemistry of ginger components and inhibitory factors of the arachidonic acid cascade [J]. ACS Symp Ser, 1994, 547: 244.

[责任编辑 全燕]