

裸花紫珠提取物凝血有效部位的研究

张利 黄胜 颜小捷 杨子明 谷陟欣 李典鹏

【摘要】 目的 研究裸花紫珠提取物凝血作用及其有效部位。**方法** 以质控血浆为研究对象,通过测定裸花紫珠粗提物及各分离部位和单体对凝血酶原时间(prothrombin time,PT)、凝血酶时间(thrombin time,TT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time,APTT)、血浆纤维蛋白原(fibrinogen,FIB)四项指标观察其对凝血系统的影响。**结果** 与溶媒对照比较,裸花紫珠粗提物能明显缩短 PT、APTT、TT 的时间,能明显提高 FIB 含量;裸花紫珠 40% 甲醇洗脱部位能明显缩短 APTT、TT 的时间,能明显提高 FIB 含量;与粗提物比较,40% 甲醇洗脱部位效果最接近于粗提物。**结论** 裸花紫珠有较好的凝血效果,其有效部位可能在 40% 甲醇洗脱部位。

【关键词】 裸花紫珠; 有效部位; 凝血; 凝血酶原时间

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.021

Effects of active fraction from *Callicarpa nudiflora* on blood coagulation system ZHANG Li, HUANG Sheng, YAN Xiao-jie, et al. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

Corresponding author: LI Dian-peng, E-mail: ldp@gxib.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of active fraction from *Callicarpa nudiflora* on blood coagulation system. **Methods** The effect of active fraction from *Callicarpa nudiflora* on blood coagulation system were observed with prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), thrombin time(TT) and fibrinogen(FIB) of the constituents blood samples were tested. **Results** Compared with the blank control, *Callicarpa nudiflora* extract could significantly lessen PT, TT, APTT, and could obviously increased the content of FIB; 40% Methanol elution par could significantly lessen TT, APTT, and could obviously increased the content of FIB. **Conclusion** The hemostatic effect of active fraction from *Callicarpa nudiflora* may be 40% Methanol elution par of *Callicarpa nudiflora*.

【Key words】 *Callicarpa nudiflora*; Hemostatic; Mice; Prothrombin time

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 为马鞭草科紫珠属植物,又名紫珠,主产于中国海南,是海南的一种道地药材,在广东、广西也有分布^[1]。国外主要分布于越南、印度和马来西亚。其味苦、微辛,性平,根、茎、叶皆可入药,有解毒、抗菌消炎、收敛止血、

散瘀消肿之功效,主治急性传染性肝炎、化脓性炎症、呼吸道及消化道出血、血小板减少性紫癜等症,外用主要用于治疗烧伤、烫伤、风湿肿痛、跌打肿痛、外伤出血、肺结核咳血、胃肠出血等症,是海南黎族医生常用药材之一^[2-5]。目前对裸花紫珠凝血有效部位、凝血机制研究均较少,有学者报道裸花紫珠总黄酮是其凝血的主要有效成分^[6]。为了探讨裸花紫珠凝血活性的有效部位及凝血机理,本实验对裸花紫珠凝血作用的主要活性部位进行了筛选研究,并初步探讨了其凝血作用机理。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

裸花紫珠粗提干浸膏粉末(由九芝堂药业海南分公司提供);质控血浆(北京世帝,生产批号:

基金项目: 国家科技支撑计划(SQ2010BAJY1411-07-05);海南省中药现代化专项(2012ZY020);广西植物研究所与九芝堂股份有限公司横向合作项目;广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金项目(ZRJ2014-7)

作者单位: 541006 桂林,广西植物功能物质研究与利用重点实验室 广西植物研究所(张利、颜小捷、杨子明、李典鹏);九芝堂股份有限公司(黄胜、谷陟欣);海南九芝堂药业有限公司(黄胜)

作者简介: 张利(1983-),本科,助理实验师。研究方向:植物活性物开发与利用研究。E-mail: 345576619@qq.com

通讯作者: 李典鹏(1968-),博士,研究员。研究方向:植物活性物开发与利用研究。E-mail: ldp@gxib.cn

20130508)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)试剂盒、凝血酶时间(thrombin time, TT)试剂盒、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)试剂盒、血浆纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)凝血酶原时间(prothrombin time, PT)试剂盒、均为北京世帝科学仪器公司生产;甲醇(西陇化工, 生产批号:121013)、二甲基亚砷(国药试剂, 生产批号:110506)等试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

AT-200 型电子天平(德国 METTLER 公司), LG-PABER 凝血因子分析仪(北京世帝), QD 型高速离心机(珠海黑马), R-200 型旋转蒸发仪(Buchi Labortechnik AG CH-9230), Agilent1100 分析型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.3 有效部位和成分的提取分离

称取 500 g 裸花紫珠粗提干浸膏粉末, 按质量体积比为 1:20 用适量去离子水完全溶解后先经布袋过滤, 后经棉花塞过滤; 所得滤液上 HP-20 大孔树脂, 依次采用去离子水、5% 甲醇、40% 甲醇、60% 甲醇、80% 甲醇洗脱, 各梯度均洗脱至无色为止, 得大孔树脂未吸附部分、水洗脱部位、5% 甲醇洗脱部位、40% 甲醇洗脱部位、60% 甲醇洗脱部位、80% 甲醇洗脱部位; 将上述各部分分别于旋转蒸发仪 50℃ 下减压浓缩得水洗脱部分浸膏、5% 甲醇洗脱部分浸膏、40% 甲醇洗脱部分浸膏、60% 甲醇洗脱部分浸膏、80% 甲醇洗脱部分浸膏。经 HPLC 分析, 大孔树脂未吸附部位和 5% 甲醇洗脱部位均包含于水洗脱部位中, 故将此三部分合并统称为水洗部位。其中水洗脱部位回收率为 66.02%, 40% 甲醇洗脱部位回收率为 19.22%, 60% 甲醇洗脱部位回收率为 8.50%, 80% 甲醇洗脱部位回收率为 3.50%。从裸花紫珠粗提干浸膏粉末分离得到连翘酯苷 B、原儿茶酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 4 个单体, 其中连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷主要从 40% 甲醇洗脱部分得到。

1.4 裸花紫珠提取物对凝血系统的影响

将水洗部位、40% 甲醇洗脱部位、60% 甲醇洗脱部位、80% 甲醇洗脱部位 4 个活性部位; 连翘酯苷 B、原儿茶酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 4 个单体化合物分别溶于 20% 的二甲基亚砷溶液中, 以 20% 的 DMSO 溶液为空白对照组, 取质控血浆量与试验药物溶液体积比为 9:1, 混匀。每种药物重复实验 3 次, 求其平均值。严格按 LG-PABER 半自动血小

板聚集凝血因子分析仪操作规程, 依次测定各试验药物 PT、TT、APTT、FIB 这 4 项血凝指标。血浆 PT 缩短率(%)=(溶媒对照平均 PT-给药平均 PT)/溶媒对照平均 PT×100%; TT 缩短率(%)=(溶媒对照平均 TT-给药平均 TT)/溶媒对照平均 TT×100%; APTT 缩短率(%)=(溶媒对照平均 APTT-给药平均 APTT)/溶媒对照平均 APTT×100%; FIB 提高率(%)=(给药平均 FIB 含量-溶媒对照平均 FIB 含量)/溶媒对照平均 FIB 含量×100%。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析, 实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 两个独立样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本之间的比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD, *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 裸花紫珠提取物对 PT 的影响

与溶媒对照比较, 粗提物组, 水洗脱部位、80% 甲醇洗脱部位 2 个部位, 原儿茶酸、连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 4 个单体的凝血酶原时间(PT)均明显缩短, 有统计学意义; 与粗提物(裸花紫珠粗提干浸膏粉末)比较, 40% 甲醇洗脱部位的 PT 明显延长, 有统计学意义。结果见表 1。

表 1 裸花紫珠提取物对 PT 的影响($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

组别	剂量(g/mL)	PT(s)	缩短率(%)
溶媒对照	—	16.6±0.6	—
粗提物	0.050	15.8±0.7 ^a	4.8
水洗脱部位	0.033	15.3±0.1 ^b	7.8
40% 甲醇洗脱部位	0.010	16.8±0.4 ^c	-1.2
60% 甲醇洗脱部位	0.004	16.5±0.2	0.6
80% 甲醇洗脱部位	0.002	15.8±0.3 ^a	4.8
原儿茶酸	0.002	15.8±0.1 ^a	4.8
连翘酯苷 B	0.002	15.8±0.2 ^a	4.8
异毛蕊花糖苷	0.002	15.9±0.2 ^a	4.2
毛蕊花糖苷	0.002	15.5±0.6 ^b	2.4

注: 与溶媒对照比较, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01; 与粗提物比较, ^c*P*<0.01。

2.2 裸花紫珠提取物对 TT 的影响

与溶媒对照比较, 粗提物, 水洗脱部位、40% 甲醇洗脱部位、60% 甲醇洗脱部位 3 个部位, 连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 3 个单体的凝血酶时间(TT)均明显缩短, 有统计学意义; 与粗提物比较, 4 个活性部位及 4 个单体的 TT 明显延长, 有统计学

意义,其中 40% 甲醇洗脱部位最接近于粗提物。结果见表 2。

表 2 裸花紫珠提取物对 TT 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量(g/mL)	TT(s)	缩短率(%)
溶媒对照	—	14.1±0.2	—
粗提物	0.050	11.8±0.3 ^a	16.3
水洗脱部位	0.033	13.4±0.5 ^{ac}	5.0
40% 甲醇洗脱部位	0.010	12.3±0.1 ^{ab}	12.8
60% 甲醇洗脱部位	0.004	13.3±0.3 ^{ac}	5.7
80% 甲醇洗脱部位	0.002	13.8±0.2 ^c	2.1
原儿茶酸	0.002	13.9±0.1 ^c	1.4
连翘酯苷 B	0.002	13.3±0.3 ^{ac}	5.7
异毛蕊花糖苷	0.002	13.2±0.4 ^{ac}	6.4
毛蕊花糖苷	0.002	13.4±0.1 ^{ac}	5.0

注:与溶媒对照比较,^a $P<0.01$;与粗提物比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$ 。

2.3 裸花紫珠提取物对 APTT 的影响

与溶媒对照比较,粗提物活化部分凝血活酶时间(APTT)明显缩短,有统计学意义,水洗脱部位 APTT 明显延长,有统计学意义;与粗提物比较,水洗脱部位、40% 甲醇洗脱部位、80% 甲醇洗脱部位 3 个部位,原儿茶酸、连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 4 个单体 APTT 明显延长,有统计学意义,其中 40% 甲醇洗脱部位、60% 甲醇洗脱部位最接近于粗提物。结果见表 3。

表 3 裸花紫珠提取物对 APTT 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量(g/mL)	APTT(s)	缩短率(%)
溶媒对照	—	39.4±1.6	—
粗提物	0.050	37.2±0.5 ^a	5.6
水洗脱部位	0.033	45.0±0.8 ^{ac}	-14.2
40% 甲醇洗脱部位	0.010	38.8±0.6 ^b	1.5
60% 甲醇洗脱部位	0.004	38.0±0.8	3.6
80% 甲醇洗脱部位	0.002	38.8±0.7 ^b	1.5
原儿茶酸	0.002	40.6±0.3 ^c	-3.0
连翘酯苷 B	0.002	40.2±0.4 ^c	-2.0
异毛蕊花糖苷	0.002	40.6±0.6 ^c	-3.0
毛蕊花糖苷	0.002	39.5±1.5 ^c	-0.3

注:与溶媒对照比较,^a $P<0.01$;与粗提物比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

2.4 裸花紫珠提取物对 FIB 的影响

与溶媒对照比较,粗提物、40% 甲醇洗脱部位 1 个部位,连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 3 个单体的纤维蛋白原(FIB)均明显延长,有统计学意义;与粗提物比较,60% 甲醇洗脱部位、原儿茶酸明显缩短,有统计学意义;其中 40% 甲醇洗脱部位优于粗提物。结果见表 4。

表 4 裸花紫珠提取物对 FIB 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量(g/mL)	FIB(g/L)	提高率(%)
溶媒对照	—	3.76±0.30	—
粗提物	0.050	4.73±0.18 ^b	25.8
水洗脱部位	0.033	4.23±0.13	12.5
40% 甲醇洗脱部位	0.010	4.89±0.31 ^b	30.1
60% 甲醇洗脱部位	0.004	4.18±0.20 ^c	11.2
80% 甲醇洗脱部位	0.002	4.25±0.04	13.0
原儿茶酸	0.002	4.14±0.12 ^c	10.1
连翘酯苷 B	0.002	4.41±0.36 ^a	17.3
异毛蕊花糖苷	0.002	4.40±0.67 ^a	17.0
毛蕊花糖苷	0.002	4.56±0.13 ^b	21.3

注:与溶媒对照比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与粗提物比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨论

目前市场上由裸花紫珠提取制成的制剂有裸花紫珠胶囊、裸花紫珠颗粒、裸花紫珠片、灭滴消炎栓与复方木麻黄片等^[7-8],这些制剂的药用原料仅限于裸花紫珠浸膏或其水粗提物,颜色深,成分杂,对裸花紫珠凝血活性部位及其化学成分未有明确研究,也就是说迄今为止,尚不清楚裸花紫珠凝血作用的化学物质基础,阻碍了裸花紫珠药用产品的研制。凝血酶原时 PT 能准确、有效地反映外源性凝血系统,TT 能有效地反映内源性凝血系统,APTT 反映内、外源共同性凝血系统,FIB 是通过对纤溶系统的影响反映凝血效果^[9-10]。本实验通过测定其 PT、TT、APTT、FIB 四项指标观察裸花紫珠对凝血系统的影响,结果发现裸花紫珠 4 个分离部位中,以 40% 甲醇洗脱部位凝血效果最好,最接近于裸花紫珠粗提物,说明裸花紫珠凝血有效部位可能在 40% 甲醇洗脱部位。毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B,这 3 个单体都有较好的凝血效果,而它们又主要在 40% 甲醇洗脱部位,进一步确证裸花紫珠凝血有效部位可能在 40% 醇洗脱部位,具体确切的有效成分和作用机理还需深入研究。

参 考 文 献

[1] 徐国钧. 中国药材学(上册)[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:917.
[2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:人民卫生出版社,1977:621.
[3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1823.
[4] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所,中国医学科学院药物研究所,北京医科大学药学院,等. 中药志:第五册[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:147.

- [5] 刘明生. 黎药学概论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 165-197.
- [6] 梁纪军, 徐凯, 李留法, 等. 裸花紫珠总黄酮的抗炎、止血作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(26): 3161-3162.
- [7] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂, 1992, 20(6): 199.
- [8] 韦少成. 海南省药品标准[M]. 海口: 海南出版社, 1993: 53.
- [9] 何美霞, 贺石林. 凝血理论的修正及其意义[J]. 生物学通报, 2000, 35(11): 4-6.
- [10] 王剑, 徐丹洋, 陈佩东, 等. 黄芩炭对血热出血大鼠止血有效部位研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 153-156.

(收稿日期: 2015-06-15)

(本文编辑: 董历华)