

凌霄花提取物抗凝血活性部位研究

田璐璐, 方 昱, 祝德秋*

上海市同济医院, 上海 200065

摘要: 目的 研究凌霄花提取物抗凝血作用, 确定凌霄花抗凝血活性部位。方法 通过血浆复钙实验测定小鼠血浆复钙时间(PRT)和断尾法测定小鼠出血时间(BT)实验, 比较凌霄花不同提取物的药效活性。结果 凌霄花水提物、醇提物及水提醇沉上清液均具有抗凝血活性; 醇提物萃取后正丁醇层药效最显著; 水提醇沉上清液过大孔树脂后 10%乙醇部位药效最显著。结论 凌霄花抗凝血活性主要存在于极性较大部位。

关键词: 凌霄花; 有效部位; 血浆复钙时间; 出血时间; 黄酮

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)01-0017-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.01.004

Anti-coagulation of active fraction in extracts from flowers of *Campsis gradiflora*

TIAN Lu-lu, FANG Yu, ZHU De-qiu

Shanghai Tongji Hospital, Shanghai 200065, China

Abstract: Objective To investigate the anti-coagulation of the extracts from the flowers of *Campsis gradiflora* (CG) and to determine the active fraction. **Methods** Plasma recalcification time (PRT) of mice was evaluated in plasma recalcification experiment and bleeding time (BT) was determined by cutting-tail method. The anti-coagulation activities of different fractions in the extracts from CG were compared. **Results** The water extract, 80% ethanol extract, and the extract by water-extraction and alcohol-precipitation from the flowers of CG all have the anti-coagulation activities. The butanol layer from 80% ethanol extract and the macroporous resin eluate of 10% ethanol from the extract by water-extraction and alcohol-precipitation showed the significant anti-coagulation. **Conclusion** The more polar fractions of the extracts from the flowers of CG are the main effective fractions

Key words: *Campsis gradiflora* (Thunb.) K. Schum.; active fraction; plasma recalcification time; bleeding time; flavone

凌霄花, 原名“紫葳”, 正品为紫葳科(Bignoniaceae)植物凌霄 *Campsis gradiflora* (Thunb.) K. Schum. 的干燥花^[1], 具有行血祛瘀、凉血祛风之功效, 临床常用于治疗月经不调、椎基动脉供血不足、脑溢血、失眠、痤疮等^[2-4]。现代药理实验证明凌霄花能抑制大鼠血栓形成^[5], 其水提醇沉上清液提取物能改善老龄大鼠微循环^[6], 其甲醇提取物能显著改善致敏小鼠血流量的降低^[7], 这些均佐证凌霄花具有行血祛瘀作用。近年, Jing等^[8-9]分别从凌霄叶中分离出五环三萜成分和两种新的环烯醚萜, 均具有抗血小板凝集作用。目前, 文献研究^[8-9]多侧重于对凌霄叶中抗凝血作用活性部位的研究, 而对凌霄花中抗凝血活性部位研究较少。本

文通过采用多种提取分离手段获得凌霄花不同部位, 并考察各部位对小鼠出血、凝血时间的影响, 从而确定凌霄花中抗凝血活性部位。

1 材料

1.1 动物

ICR 雄性小鼠, 体质量 18~22 g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(沪)2008-0016。适应性饲养一周后使用。

1.2 试药

凌霄花药材, 产地江苏省, 中国药科大学中药学院秦民坚教授鉴定。阿司匹林肠溶片(批号 bj08343, 拜耳医药保健有限公司)。蒸馏水, 实验室自制。生理盐水(批号 C13041102, 山东华鲁

收稿日期: 2013-09-26

基金项目: 上海市卫生局中医药科研基金资助项目(WSJ1219)

作者简介: 田璐璐(1987—), 女, 江西瑞昌人, 药师, 硕士研究生, 研究方向为中药药效及药物动力学。

Tel: (021)66111220 E-mail: lulongtime@126.com

*通信作者 祝德秋 Tel: (021)66111216 E-mail: zdq_0726@163.com

制药有限公司)。无水氯化钙(批号 20121029, 上海凌峰化学试剂有限公司)。枸橼酸钠(批号 20120731, 上海凌峰化学试剂有限公司)。

1.3 仪器

N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司), DK-S22 型电热恒温水浴锅(上海精密实验设备有限公司), 超纯水系统(美国 Millipore 公司), 台式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司), BSA224S—CW 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司), S-520006 粉碎机(上海禾汽化工科技有限公司)。

2 方法及结果

2.1 凌霄花浸膏的制备

醇提取物 I, 凌霄花粗粉 100 g(过 20 目筛), 用 80% 的乙醇提取得醇提取物 23.6 g; 另取 100 g 粗粉, 按照 I 的制备方法, 得到醇提取物, 醇提取物经水分散后再依次萃取, 得到各部位石油醚层 0.9 g(I-a)、醋酸乙酯层 1.9 g(I-b)、正丁醇层 7.3 g(I-c)、水层 19.1 g(I-d)。

水提取物 II, 凌霄花粗粉 100 g(过 20 目筛), 用热水(60 °C)浸提得提取物 43.2 g; 水提取物 80% 醇沉得到沉淀 2.6 g(II-a), 上清液 II-b(蒸干得 37.0 g); II-b 再经大孔吸附树脂得水洗物 44.2 g(II-b-1)、10% 醇洗物 2.0 g(II-b-2)、50% 醇洗物 3.4 g(II-b-3)。

上述凌霄花提取物使用时以生理盐水为溶剂, 配制成所需质量浓度。

2.2 凌霄花醇提取物 I、水提取物 II 及水提醇沉上清液 II-b、沉淀 II-a 的抗凝血活性测定

2.2.1 血浆复钙时间(PRT)测定 取雄性 ICR 小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只。正常对照组

按 100 mL/kg ig 生理盐水, 其余各组均按等体积 ig 相应的药液, 分别给凌霄花醇提取物 I 200 mg/kg、水提取物 II 350 mg/kg 及水提醇沉上清液 II-b 300 mg/kg、沉淀 II-a 20 mg/kg 和阿司匹林 50 mg/kg。每天给药 1 次, 连续给药 7 d。于末次给药 1 h 后摘眼球取血, 加入含有 3.8% 枸橼酸钠溶液的试管中, 充分混合(血液量与枸橼酸钠的体积比为 9:1), 1 000 r/min 离心 10 min, 得富血小板血浆, 置 4 °C 冰箱备用。参照文献方法^[10], 取 2 mL 离心管若干支, 分为 6 组, 每组 10 支。每管分别依次加入上述血浆和生理盐水各 0.1 mL, 混匀后, 置 37 °C 水浴锅中预热 30 s。加入 0.2 mL 预热至 37 °C 的 0.28% 氯化钙溶液(约 25 mol/L), 立即启动秒表计时, 并不停地在水浴锅中倾斜试管混合, 观察凝血情况, 记录自加入 Ca^{2+} 到纤维蛋白形成(液面不动)所需的时间。空白对照组为生理盐水组; 阳性对照组为阿司匹林组。

结果采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析并结合 Dunnett's test 检验各组与对照组的差异, 见表 1。

2.2.2 小鼠出血时间(BT)测定 参照文献, 采用断尾法观察小鼠出血时间^[10]。给药方法及剂量同“2.2.1”, 于末次给药后 57~59 min, 将小鼠置于固定器中, 使其尾部垂直, 给药后 60 min, 在距尾尖 1.5 mm 处剪断, 并将其尾尖浸入 37 °C 生理盐水液面 1.5 cm 深处, 记录剪断尾尖至停止出血的时间间隔为出血时间。分析方法同“2.2.1”, 结果见表 1。

由表 1 可见, 与空白组比较, 凌霄花醇提取物、水提取物能显著延长 PRT 及 BT ($P < 0.05$); 水提醇沉上清液能极显著延长 PRT ($P < 0.001$) 及 BT ($P < 0.01$); 水提醇沉沉淀虽然能延长 PRT 和 BT,

表 1 凌霄花醇提取物、水提取物及水提醇沉上清液、沉淀的抗凝血活性测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Anti-coagulation activities of ethanol extract, water extract, and extract by water-extraction and alcohol-precipitation from flowers of CG ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PRT/s	BT/s
空白	—	189.00 ± 17.41	156.30 ± 9.44
I	200	216.60 ± 16.02*	175.40 ± 14.74*
II	350	220.70 ± 17.39**	175.70 ± 21.58*
II-b	300	251.20 ± 40.01***	179.40 ± 18.93**
II-a	20	191.90 ± 15.77	160.00 ± 11.55
阿司匹林	50	220.90 ± 12.11**	183.50 ± 13.15***

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group, same as below

但不具有统计学意义。凌霄花水提物、醇提物及水提醇沉上清液均具有抗凝血活性。

2.3 凌霄花醇提后各萃取层抗凝血活性测定

取雄性 ICR 小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只。给药方法同“2.2.1”, 提取物给药剂量石油醚层 I-a 10 mg/kg、醋酸乙酯层 I-b 15 mg/kg、正丁醇层 I-c 60 mg/kg、水层 I-d 150 mg/kg, 空白对

照组及阳性对照组同“2.2.1”。药效测定及数据分析方法同“2.2.1”、“2.2.2”。结果见表 2。

由表 2 可见, 与空白组比较, 正丁醇层能显著延长 PRT ($P<0.01$) 及 BT ($P<0.05$); 醋酸乙酯层能显著延长 PRT ($P<0.05$); 石油醚层及水层与空白组差异无统计学意义。正丁醇层及醋酸乙酯层具有抗凝血活性, 其中正丁醇层抗凝血药效显著。

表 2 凌霄花醇提后各萃取层抗凝血药效测定 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Anti-coagulation activities of each extracting layer of ethanol extracts from flowers of CG ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PRT/s	BT/s
空白	—	152.30±12.30	159.80±9.68
I-a	10	152.10±12.00	159.70±10.20
I-b	15	173.90±18.90*	160.10±9.34
I-c	60	178.20±17.18**	178.20±12.21*
I-d	150	160.10±20.07	160.30±10.46
阿司匹林	50	187.80±23.81***	181.90±21.90**

2.4 凌霄花水提醇沉后过大孔树脂各洗脱部分抗凝血活性测定

取雄性 ICR 小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只。给药方法同“2.2.1”, 提取物给药剂量水洗物 II-b-1 350 mg/kg、10%醇洗物 II-b-2 20 mg/kg、50%醇洗物 II-b-3 30 mg/kg, 空白组及阳性对照组同“2.2.1”。活性测定及数据分析方法同“2.2.1”、

“2.2.2”。结果见表 3。

由表 3 可见, 与空白组比较, 10%醇洗物和 50%醇洗物 ($P<0.05$ 、 0.01) 均能显著延长小鼠 PRT, 而只有 10%醇洗物能显著延长小鼠的 BT ($P<0.01$)。水洗物延长 PRT 和 BT, 但不具有统计学意义。50%醇洗物及 10%醇洗物具有抗凝血活性, 其中 10%醇洗物抗凝血活性显著。

表 3 凌霄花水提醇沉后过大孔树脂各洗脱部分抗凝血活性测定 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Anti-coagulation activities of each elution by water-extraction and alcohol-precipitation over macroporous resin from flowers of CG ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PRT/s	BT/s
空白	—	159.90±12.92	155.20±10.71
II-b-1	350	166.40±11.79	159.70±10.72
II-b-2	20	184.10±10.32***	176.00±17.22**
II-b-3	30	172.80±10.70*	167.00±14.94
阿司匹林	50	176.30±9.75**	170.80±12.37*

3 讨论

凌霄花的水提物、醇提物及水提醇沉上清液均具有抗凝血活性, 其活性大小为水提醇沉上清液>水提物>醇提物。文献报道^[11]水提醇沉法常用于植物多糖的提取, 在醇含量达 80%时基本可沉淀全部多糖, 而本次试验发现水提醇沉沉淀与空白组比较无统计学意义, 这表明多糖不是其抗凝血活性成分。在醇提物的各萃取部位中, 正丁醇层和醋酸乙酯层

具有抗凝血活性, 且正丁醇层效果优于醋酸乙酯层, 正丁醇极性大于醋酸乙酯, 这表明凌霄花有效部位主要是极性较大的物质。对水提醇沉上清液进行进一步分离, 经大孔树脂洗脱后, 10%醇洗物及 50%醇洗物均有抗凝血活性, 且 10%醇洗物优于 50%醇洗物, 而水洗物与空白组比较无统计学意义, 这也进一步证明其有效成分主要为极性较大的物质。有文献报道凌霄花中主要化学成分有三萜类、苯乙醇

苷类、黄酮类、环烯醚萜等^[12-14]，本文研究结果提示凌霄花中抗凝血有效成分很可能是黄酮、苯乙醇苷类等成分。这有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社. 第69卷. 1990.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 常 晓, 常杰先. 活血化瘀治疗脑溢血方药介绍 [J]. 国医论坛, 2004, 19(6): 8-9.
- [4] 杨 阳, 汪 念, 张 慰, 等. 凌霄花及其复方制剂的临床应用 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(1): 132-133.
- [5] 沈 琴, 郭济贤, 邵以德. 中药凌霄花的药理学考察 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(2): 6-11.
- [6] 李建平, 侯安继. 凌霄花粗提物对老龄大鼠微循环的影响 [J]. 医药导报, 2007, 26(2): 136-138.
- [7] 岩冈惠实子. 凌霄花改善致敏小鼠血液循环的作用 [J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(6): 364.
- [8] Jing L J, Yong Y L, Jung E H, *et al.* Anti-platelet pentacyclic triterpenoids from leaves of *Campsis grandiflora* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(4): 376-380.
- [9] Jing L J, Yong Y L, Jung E H, *et al.* Two new non-glycosidic iridoids from the leaves of *Campsis grandiflora* [J]. *Planta Med*. 2005, 71: 578-580.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [11] 佟 茵, 吴红娟. 植物多糖的提取方法研究进展 [J]. 中医药信息, 2012, 29(5): 108-110.
- [12] 张 桥, 沈 娟, 赵祎武, 等. 凌霄花中洋丁香苷的制备 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2465-2467.
- [13] Zhao Q, Liao M C, Guo J X. Studies on the chemical constituents of the flower of *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum. and its contraceptive effect [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2002, 14(3): 1-6.
- [14] Xiang H H, Ji-Hoon O, Seong S H, *et al.* Novel iridoids from the flowers of *Campsis grandiflora* [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(2): 327-332.