

## 生物活性导向分离山楂炭中止血活性成分及其作用机制研究

田 瑞<sup>1,2</sup>, 王峥涛<sup>1</sup>, 谢 燕<sup>2\*</sup>

1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

2. 上海中医药大学公共健康学院, 上海 201203

**摘要:** **目的** 研究山楂炭中发挥止血作用的活性成分及其作用机制。**方法** 采用 HPLC 图谱对山楂及山楂炭中的化学成分进行比较研究; 采用剪尾法、毛细管法对山楂炭体内止血及凝血效果进行考察; 分离山楂炭不同极性部位, 结合药效学考察, 确定山楂炭药效部位; 再进一步采用柱色谱分离技术结合体外凝血实验, 从药效部位中分离得到发挥止血作用的化学成分, 并通过体外凝血四项及血小板聚集率对其机制进行初步探究。**结果** 山楂炮制成山楂炭的过程中化学成分发生较大变化, 有新成分生成; 山楂炭具有止血作用, 且其醇提液药效作用比水煎液更强; 从山楂炭醇提液中分离得到的醋酸乙酯部位能够显著缩短小鼠的止血及凝血时间, 为山楂炭发挥止血作用的药效部位, 从中分离获得药效成分松柏醛, 该成分能够显著降低凝血酶时间, 增加纤维蛋白原含量, 提高血小板聚集率。**结论** 首次从山楂炭中发现并分离得到具有止血作用的化学成分松柏醛, 为山楂炭的临床应用提供理论依据, 并为其他炭药的研究提供了参考。

**关键词:** 山楂; 山楂炭; 松柏醛; 止血作用; 生物活性导向分离

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)03 - 0817 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.015

## Bioactivity-guided isolation of hemostatic active component in hawthorn charcoal and its mechanism

TIAN Rui<sup>1,2</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1</sup>, XIE Yan<sup>2</sup>

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To study the active components in hawthorn charcoal that exert the hemostatic effect and its mechanism. **Methods** The chemical constituents in Shanzha (*Crataegi Fructus*) and hawthorn charcoal were compared by HPLC chromatogram. The *in vivo* hemostatic and coagulation effects of hawthorn charcoal were investigated by mouse tail cutting method and capillary method. The different polar extracts of hawthorn charcoal were separated, and the effective parts of hawthorn charcoal were ensured through pharmacodynamics investigation. The chemical components with hemostatic effect in hawthorn charcoal were separated from the ethyl acetate part by column chromatography combined with *in vitro* coagulation experiments, and the mechanism was explored through the four items of coagulation and platelet aggregation rate *in vitro*. **Results** The chemical composition of hawthorn charcoal changed greatly during the process of hawthorn charcoal, and new components were found. Hawthorn charcoal showed hemostatic effect, and its alcohol extract had stronger hemostatic effect compared with the aqueous extract; Furthermore, the ethyl acetate part separated from the alcoholic extract of hawthorn charcoal can significantly shorten the bleeding time and coagulation time in mice, which is the effective part of hawthorn charcoal. The pharmacodynamic component coniferaldehyde was separated from the ethyl acetate part, which can significantly reduce thrombin time, increase the content of fibrinogen, and enhance the platelet aggregation rate. **Conclusion** The chemical component coniferaldehyde with hemostatic effect is discovered and obtained from hawthorn charcoal for the first time. The present study provided a theoretical basis for the clinical application of hawthorn charcoal, and offered a reference for the research of other charcoal medicines.

**Key words:** *Crataegi Fructus*; hawthorn charcoal; coniferaldehyde; hemostasis effects; bioactivity-guided isolation

收稿日期: 2022-10-26

基金项目: 上海市卫生健康学科带头人项目 (2022XD026)

作者简介: 田 瑞 (1997—), 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: tianrui199706@163.com

\*通信作者: 谢 燕 (1978—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药制剂新技术的研究与应用。E-mail: rosexie\_2004@163.com

山楂为蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge.或山里红 *C. pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>, 含有丰富的黄酮类、有机酸类、萜类、多糖类等化学成分<sup>[2]</sup>, 味酸性温, 具有健脾胃、助消化、通畅血脉、行气散瘀的功效<sup>[3-4]</sup>, 可用于肉食积滞、心血管疾病、疝气、胸痹, 妇女产后瘀阻腹痛、痛经等疾病的治疗<sup>[5]</sup>。山楂炭为临床常用的山楂炮制品, 是将山楂饮片经武火炮制成表面焦黑色、内部焦褐色而得。山楂在炮制成山楂炭后, 其性味转为苦涩, 收敛能力增强, 由山楂通畅血脉、消散瘀滞的活血作用转变为偏于收涩的止血作用, 常被用于肠风下血等症状。现代研究发现, 山楂炭能够较好地治疗慢性结肠炎、溃疡性结肠炎、结直肠癌便血等疾病<sup>[6]</sup>。目前, 采用 HPLC、紫外分光光度法等对山楂炮制前后的化学成分分析发现, 山楂制炭后其黄酮类、有机酸类、鞣质类成分均大幅降低, 钙离子含量有所增加, 这可能与山楂炭产生止血作用有关<sup>[7-9]</sup>, 但其发挥止血作用的活性成分仍不明确, 还需进一步探究。

以活性评价为导向进行化学成分分离是发现并确定中药中化学活性成分的一种有效方法, 即在化学成分的分离纯化过程中, 通过药效实验定位中药活性成分所在部位或流分, 并有针对性地对所确定的活性部位或流分进行分离纯化, 最终获得中药化学活性成分<sup>[10]</sup>。这极大地提高了活性成分的分离效率, 许多结构明确的中药药效成分都是通过该方法获得<sup>[11-12]</sup>, 如临床应用广泛的抗疟药物青蒿素、具有广谱抗肿瘤作用的喜树碱等<sup>[13]</sup>。因此, 本研究以止血活性为导向, 采用体内外止血药效实验与化学成分分离技术相结合的方法, 从山楂炭中分离纯化得到发挥止血作用的活性成分, 并对其结构鉴定, 初步探讨其作用机制, 为山楂炭的临床合理用药、质量控制等提供理论参考和依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 (体质量 300~350 g, 合格证号 20180006030200)、雌性及雄性 ICR 小鼠 (体质量 18~22 g, 合格证号 20180006021172) 均购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (沪) 2018-0006。动物在上海中医药大学动物实验中心标准条件下饲养, 自由进食饮水。动物实验经上海中医药大学伦理委员会批准 (批准号 PZSHUTCM200522002)。

### 1.2 药材

山楂购自上海康桥中药饮片有限公司, 经上海中医药大学吴立宏教授鉴定为蔷薇科植物山楂 *C. pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 按《上海市中药饮片炮制规范》2018 年版炮制成山楂炭。

### 1.3 药品与试剂

云南白药胶囊 (批号 ZFA2116) 购自云南白药集团股份有限公司; 芦丁对照品 (批号 20160527, 质量分数为 95%) 购自陕西绿清生物工程有限公司; 金丝桃苷对照品 (批号 C5-1007, 质量分数为 98%) 购自上海中药标准化研究中心; 绿原酸 (批号 110753-201716, 质量分数为 99.3%)、槲皮素对照品 (批号 100081-200907, 质量分数为 97.40%) 购自中国食品药品检定研究院; 柱层析硅胶购自青岛海洋化工有限公司; Sephadex LH-20 购自美国 GE 公司; 活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 试剂盒 (批号 562633)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 试剂盒 (批号 565764)、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 试剂盒 (批号 50728)、纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB) 试剂盒 (批号 565087) 购自日本希森美康株式会社; 二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP, 批号 S30GR162961) 购自上海源叶生物科技有限公司; 羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)、乙醇、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇等购自国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯; 磷酸 (HPLC 级) 购自 CNW 公司; 甲醇、乙腈 (HPLC 级) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.4 仪器

1260II 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Ultrashield™ 400 Plus 400M 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); CS-5100 型全自动凝血仪 (日本希森美康株式会社); AggRAM 型血小板聚集仪 (美国 Helena 公司); LC-3000 型半制备高效液相色谱仪 (北京创新通恒科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 HPLC 分析

**2.1.1 对照品溶液的制备** 称取绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用少量甲醇溶解后, 稀释至刻度, 混匀, 即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密称取生山楂及山楂炭细粉各 1 g, 分别置于具塞量瓶中, 加入 70% 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 补足质

量, 取上清液, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。

**2.1.3 色谱条件** Kromasil 100-5  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 0.2%磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~20 min, 9% B; 20~30 min, 9%~17% B; 30~45 min, 17% B; 45~55 min, 17%~30% B; 55~60 min, 30%~42% B; 60~80 min, 42% B。检测波长 350 nm; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 体积流量 1 mL/min。

## 2.2 小鼠体内止血时间及凝血时间测定

### 2.2.1 样品溶液的制备

(1) 生山楂、山楂炭、活性炭水煎液的制备: 分别称取生山楂、山楂炭、活性炭粗粉各 30 g, 加水 300 mL, 浸泡 30 min 后, 煎煮 1 h, 滤过; 第 2 次加水 200 mL, 煎煮 30 min, 滤过, 将 2 次所得滤液合并, 减压浓缩至每毫升相当于原药材 60 mg, 即得。

(2) 山楂炭醇提液的制备: 称取山楂炭粗粉 30 g, 加入 75%乙醇 300 mL 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 合并 3 次所得滤液, 减压浓缩至每毫升相当于原药材 60 mg, 无醇味。

**2.2.2 动物分组及给药** ICR 小鼠 60 只随机分为空白组、云南白药 (0.375 g/kg) 组、活性炭水煎液 (3.0 g/kg) 组、生山楂水煎液 (3.0 g/kg) 组、山楂炭水煎液 (3.0 g/kg) 组和山楂炭醇提液 (3.0 g/kg) 组, 每组 10 只, 雌雄各半。动物适应性饲养 3 d 后, 空白组 ig 纯水, 各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 7 d。

**2.2.3 小鼠止血时间测定** 末次给药后 1 h, 采用剪尾法测定各组小鼠止血时间。小鼠麻醉后, 于距鼠尾 5 mm 处剪断, 观察小鼠尾部出血情况, 待血液自行溢出时开始计时, 每隔 15 s 用滤纸吸附 1 次, 直至没有血液流出 (滤纸吸附时无血迹), 停止计时, 即为止血时间。

**2.2.4 小鼠凝血时间测定** 末次给药后 1 h, 采用毛细管法测定小鼠凝血时间。小鼠麻醉后, 用毛细管 (长 10 cm, 内径 1 mm) 在小鼠眼球后静脉丛取血, 自血液进入毛细管时开始计时, 每隔 15 s 折断毛细管约 0.5 cm, 缓慢向左右拉开, 观察折断处是否出现血凝丝, 当出现血凝丝时, 立即在另一端折断验证, 至两端均出现血凝丝时停止计时, 即为凝血时间。

## 2.3 山楂炭不同极性部位的分离

称取山楂炭粗粉 1 kg, 加入 75%乙醇 10 L 加

热回流提取 3 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 合并 3 次所得滤液, 减压浓缩至 500 mL, 取 50 mL 水浴蒸干后, 减压干燥, 得山楂炭醇提物 (21.15 g), 保存在干燥器内备用。取剩余 450 mL 山楂炭醇提液, 依次用等量的石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取 5 次。将得到的石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取液及水溶液减压浓缩, 水浴蒸干后, 真空干燥至恒定质量, 得石油醚部位 (9.72 g)、醋酸乙酯部位 (31.14 g)、正丁醇部位 (26.73 g)、水部位 (130.14 g)。

## 2.4 山楂炭不同极性部位对小鼠体内止血时间及凝血时间的影响

**2.4.1 动物分组及给药** ICR 小鼠 70 只随机分为空白组、云南白药 (0.375 g/kg) 组、山楂炭醇提物 (3.0 g/kg, 以生药量计) 组、石油醚部位 (3.0 g/kg, 以生药量计) 组、醋酸乙酯部位 (3.0 g/kg, 以生药量计) 组、正丁醇部位 (3.0 g/kg, 以生药量计) 组和水部位组 (3.0 g/kg, 以生药量计), 每组 10 只, 雌雄各半。动物适应性饲养 3 d 后, 空白组 ig 0.5% CMC-Na 溶液, 各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 7 d。

**2.4.2 小鼠止血时间及凝血时间测定** 按照“2.2.3”及“2.2.4”项下方法进行小鼠止血时间及凝血时间的测定。

## 2.5 山楂炭止血作用化学物质的分离及鉴定

取“2.3”项下所得醋酸乙酯部位进行硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯为洗脱剂进行梯度洗脱 (4:1、2:1、1:1、1:2、1:4), 将所得流分进行薄层鉴别, 合并相同流分, 得到 21 个流分 (Fr. 1~21)。

将 Fr. 1~21 减压干燥后取适量, 用含 50%乙醇生理盐水溶解, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 配制成每毫升相当于生药 0.3 g 的供试药液。以含 50%乙醇生理盐水为空白对照, 采用试管法<sup>[14]</sup>考察各流分对大鼠体外全血凝固时间的影响。取雄性 SD 大鼠, 麻醉后, 采用一次性真空采血管 (0.109 mol/L 枸橼酸钠) 进行腹主动脉取血, 得抗凝全血。取 0.1 mL 供试药物和 0.5 mL 抗凝全血加入至洁净玻璃试管中, 平行 6 份, 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 1 min, 再向试管内加入 0.1 mL 相同温度的 0.025 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液, 混匀, 立即计时, 每隔 15 s 倾斜试管 1 次。当倾斜试管时血液凝固在底部无法流动, 停止计时, 即为体外全血凝固时间。

将上述所得具有止血活性的流分采用

Sephadex LH-20 及半制备 HPLC 进行分离纯化, 得到山楂炭中发挥止血作用的化合物, 并结合核磁共振波谱的结果对其进行结构鉴定。

## 2.6 体外凝血四项及血小板聚集率测定方法

称取松柏醛 20 mg, 加 2 mL 甲醇使溶解, 得松柏醛的甲醇溶液 (10 mg/mL), 分别吸取 50、100、200  $\mu$ L, 除去甲醇后, 加入 2 mL 生理盐水, 超声溶解, 将松柏醛配制成质量浓度为 0.25、0.5、1.0 mg/mL 的溶液, 即为松柏醛低、中、高质量浓度组。

取雄性 SD 大鼠, 麻醉后, 用一次性真空采血管 (0.109 mol/L 枸橼酸钠) 进行腹主动脉取血, 得抗凝全血, 3000 r/min 离心 10 min, 取上层抗凝血浆。将供试药液与抗凝血浆按 1:4 的比例混匀, 37  $^{\circ}$ C 孵育 3 min 后, 置于一次性样品杯中, 用全自动凝血分析仪对其 APTT、PT、TT、FIB 进行测定, 以生理盐水为空白对照, 每组平行 6 份。

取雄性 SD 大鼠, 麻醉后, 用一次性真空采血管 (0.109 mol/L 枸橼酸钠) 进行腹主动脉取血, 将所得抗凝全血 1000 r/min 离心 10 min, 取上层富血小板血浆 (PRP); 将剩余全血 3000 r/min 离心 10 min, 取上层贫血小板血浆 (PPP); 用 PPP 稀释调整 PRP 中血小板浓度为  $1.5 \times 10^8$  个/mL, 备用。吸取供试品 10  $\mu$ L 与稀释后的 PRP 215  $\mu$ L 混合, 37  $^{\circ}$ C 孵育 3 min 后, 加入 25  $\mu$ L 浓度为 10  $\mu$ mol/L 的 ADP 激动剂, 立即放入血小板聚集仪测试, 记录聚集曲线, 得血小板聚集率。每组平行 6 份。

## 2.7 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 各组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 山楂及山楂炭 HPLC 图谱对比

如图 1 所示, 山楂在炮制成山楂炭后, 极性较大成分的含量降低, 而小极性成分的含量有所增加。山楂中原本含量较高的成分如绿原酸、金丝桃苷等显著降低或消失, 这可能与炮制过程中的高温使山楂中一些极性大的成分破坏或降解, 生成小极性成分有关。此外, 山楂炭的 HPLC 图谱在  $t_R=48.5$ 、49.7 min 处出现 2 个新的特征峰, 表明在炮制过程中山楂中的一些成分可能在高温下发生降解或转化而生成新的成分。

### 3.2 山楂与山楂炭体内止血及凝血作用比较

如表 1 所示, 与空白组比较, 各给药组的止血时间和凝血时间均有所降低, 表明各组均具有一定

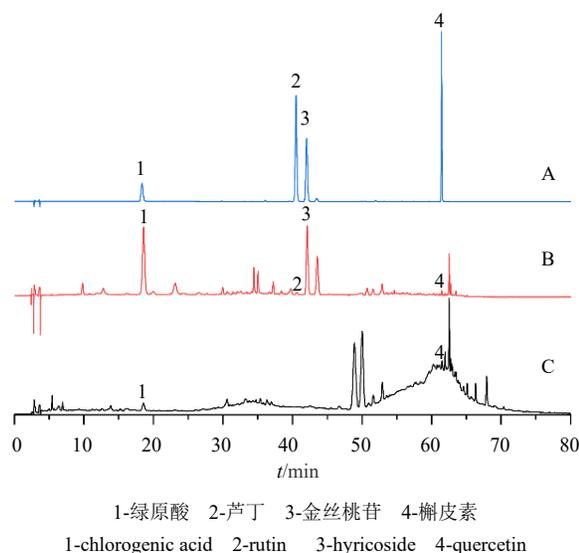


图 1 混合对照品 (A)、生山楂 (B) 及山楂炭 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A), *Crataegi Fructus* (B) and hawthorn charcoal (C)

表 1 山楂炭对小鼠止血时间及凝血时间的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Effect of hawthorn charcoal on bleeding time and coagulation time in mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1}$ )	止血时间/min	凝血时间/s
空白	—	30.46 $\pm$ 8.66 <sup>##</sup>	151.00 $\pm$ 17.72 <sup>##</sup>
云南白药	0.375	13.24 $\pm$ 4.04 <sup>**</sup>	88.29 $\pm$ 12.81 <sup>**</sup>
活性炭水煎液	3.0	23.45 $\pm$ 6.50 <sup>##</sup>	148.71 $\pm$ 16.95 <sup>##</sup>
生山楂水煎液	3.0	23.58 $\pm$ 8.31 <sup>##</sup>	130.38 $\pm$ 11.11 <sup>*##</sup>
山楂炭水煎液	3.0	12.29 $\pm$ 4.24 <sup>**</sup>	76.09 $\pm$ 9.39 <sup>**#</sup>
山楂炭醇提液	3.0	7.47 $\pm$ 3.53 <sup>**##</sup>	73.60 $\pm$ 12.85 <sup>**#</sup>

与空白组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与云南白药组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ , 下表同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs blank group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs Yunnan Baiyao group, same as below tables

的促进止血及凝血效果, 其中云南白药组、山楂炭水煎液组、山楂炭醇提液组的效果较好, 具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 山楂炭醇提液组止血作用最强; 活性炭水煎液组及生山楂水煎液组的止血作用较弱。山楂炭水煎液组的止血时间及凝血时间较生山楂水煎液组分别缩短了 47.88% 和 41.64%, 表明山楂在炮制成山楂炭后, 止血作用大幅增加。活性炭组的止血时间及凝血时间均较各山楂炭组长, 说明山楂炭的促凝作用可能还与山楂炭中炭素以外的物质有关。山楂炭醇提液组的止血时间及凝血时间均较山楂炭水煎液组进一步降低, 表明山楂炭醇提液中的止血活性成分含量较其水煎液中更多。

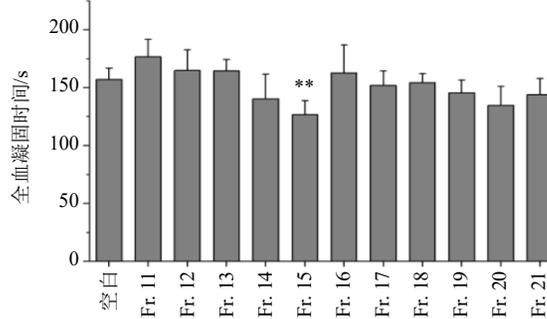
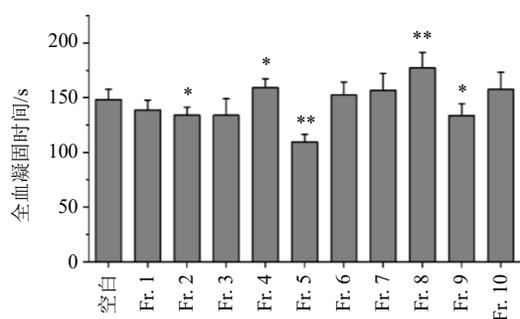
### 3.3 山楂炭不同极性部位体内止血及凝血作用评价

如表 2 所示, 与空白组比较, 各实验组止血时间均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表现出明显的止血作用, 其中山楂炭醋酸乙酯部位止血时间最短, 其止血作用最好。与止血时间结果相似, 与空白组比较, 云南白药组、山楂炭醇提物组、山楂炭石油醚组、

表 2 山楂炭不同极性部位对小鼠止血时间和凝血时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of different polar parts of hawthorn charcoal on bleeding time and coagulation time in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	止血时间/min	凝血时间/s
空白	—	23.78 ± 2.55 <sup>#</sup>	161.30 ± 17.47 <sup>#</sup>
云南白药	0.375	12.37 ± 1.72 <sup>**</sup>	88.50 ± 9.12 <sup>**</sup>
醇提物	3.0	9.30 ± 2.89 <sup>***</sup>	70.10 ± 7.02 <sup>***</sup>
石油醚部位	3.0	16.92 ± 2.35 <sup>***</sup>	134.10 ± 24.60 <sup>***</sup>
醋酸乙酯部位	3.0	8.70 ± 1.16 <sup>***</sup>	84.40 ± 11.05 <sup>**</sup>
正丁醇部位	3.0	12.79 ± 1.74 <sup>**</sup>	163.11 ± 17.47 <sup>#</sup>
水部位	3.0	20.95 ± 1.84 <sup>***</sup>	159.90 ± 15.18 <sup>#</sup>



与空白组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs blank group

图 2 山楂炭醋酸乙酯部位各流分对体外全血凝固时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of different fractions from ethyl acetate parts of hawthorn charcoal on *in vitro* whole blood coagulation time ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.5 山楂炭醋酸乙酯部位分离流分的 HPLC 图谱

如图 3 所示, 山楂炒炭后新生成的成分 ( $t_R = 48.5$ 、 $49.7$  min) 分别主要存在于 Fr. 5 和 Fr. 8 中, 而在 Fr. 15 中未发现明显的特征峰, 结合 Fr. 5 显著的促进止血作用, 推测  $t_R = 48.5$  min 处的新生成成分可能与山楂炭止血作用有关; 而 Fr. 8 并未表现出止血作用, 推测  $t_R = 49.7$  min 处的新生成成分不具有止血活性, 因此, 对  $t_R = 48.5$  min 处的成分进行进一步分离纯化。

### 3.6 山楂炭止血药效成分的分离及鉴定

对有明显止血作用的 Fr. 5 进行一系列分离后, 得到山楂炭中发挥止血作用的化学物质, 即  $t_R = 48.5$  min 的化学成分, 并对其结构进行鉴定。该化合物为淡黄色油状物;  $m/z$  177 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为

山楂炭醋酸乙酯组均能缩短小鼠体内凝血时间 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 具有显著的促凝效果; 而山楂炭正丁醇部位组及水部位组的凝血时间与空白组接近, 未表现出明显的促凝效果。此外, 山楂炭醋酸乙酯部位组的小鼠体内止血时间及凝血时间均较云南白药组更短, 在 4 个极性部位中表现出最好的体内止血作用, 说明其为山楂炭发挥体内止血作用的有效部位。

### 3.4 山楂炭醋酸乙酯部位各流分体外凝血作用评价

将收集所得 Fr. 1~21 进行体外凝血效果考察, 如图 2 所示。与空白组比较, Fr. 2、5、9、15 可降低体外全血凝固时间 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表现出促进凝血的效果, Fr. 4、8 可显著延长体外全血凝固时间 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表现出抑制凝血的效果, 其余流分对凝血效果影响不明显。其中, Fr. 5、15 显示出显著的促进凝血的效果, 推测其为山楂炭止血作用的药效流分。

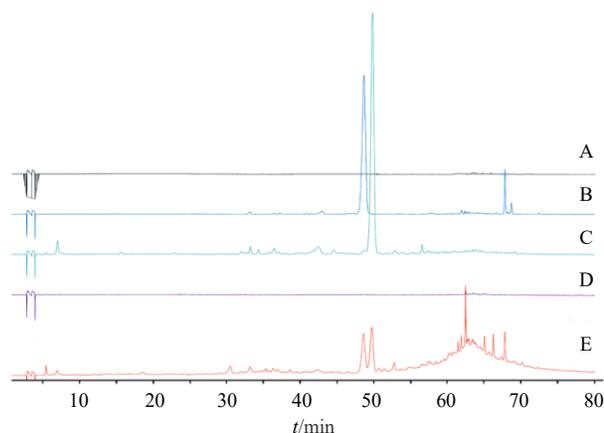


图 3 Fr. 2 (A)、Fr. 5 (B)、Fr. 8 (C)、Fr. 15 (D) 及山楂炭醋酸乙酯部位 (E) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of Fr. 2 (A), Fr. 5 (B), Fr. 8 (C), Fr. 15 (D) and ethyl acetate extract of hawthorn charcoal (E)

$C_{10}H_{10}O_3$ 。 $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 400 MHz)  $\delta$ : 9.58 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-9), 7.56 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-7), 7.16 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-6), 6.87 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-5), 6.69 (1H, dd,  $J=16.0, 7.8$  Hz, H-8), 3.91 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ , 100 MHz)  $\delta$ : 126.2 (C-1), 110.7 (C-2), 150.3 (C-3), 148.1 (C-4), 115.2 (C-5), 123.8 (C-6), 154.9 (C-7), 125.3 (C-8), 194.8 (C-9), 55.1 (3-OCH<sub>3</sub>)。根据上述波谱数据, 通过与文献报道<sup>[15]</sup>对比, 确定该化合物为松柏醛(图4)。

### 3.7 松柏醛对体外凝血四项及血小板聚集率的影响

如表3所示, 不同质量浓度的松柏醛作用于血浆后, 所测得的APTT及PT与对照组比较无明显

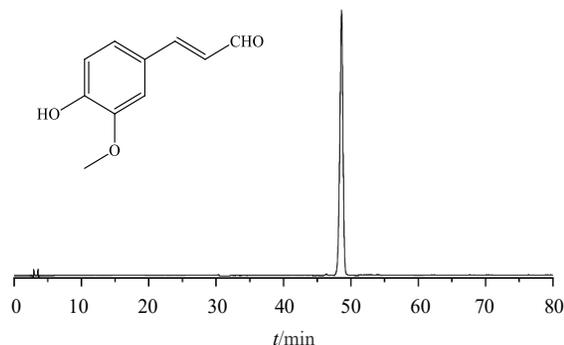


图4 松柏醛的化学结构式及HPLC图谱

Fig. 4 Chemical structure and HPLC chromatogram of coniferaldehyde

表3 松柏醛对APTT、PT、TT、FIB及血小板聚集率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of coniferaldehyde on APTT, PT, TT, FIB and platelet aggregation rate ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/(g·L <sup>-1</sup> )	血小板聚集率/%
空白	—	15.73±0.54	10.63±0.10	39.22±0.80	1.38±0.02	60.98±2.41
松柏醛	0.25	15.75±0.52	10.58±0.12	38.78±0.48	1.40±0.01*	63.93±1.39*
	0.50	15.77±0.50	10.73±0.26	38.18±0.53*	1.44±0.01***	67.95±3.24**
	1.00	15.70±0.52	10.78±0.12*	37.32±0.29***	1.46±0.03***	70.27±2.88**

变化, 表明其对外源性及内源性凝血途径无影响; 但中、高质量浓度的松柏醛可以显著降低TT ( $P<0.05, 0.001$ ), 且与其质量浓度呈正相关, 表明松柏醛的凝血作用与其影响共同凝血途径相关; 并且松柏醛还能够显著增加FIB含量 ( $P<0.05, 0.001$ ), 且呈剂量相关性, 表明松柏醛的促凝作用可能与激活纤维蛋白原有关; 此外, 松柏醛能够显著提高血小板聚集率 ( $P<0.05, 0.01$ ), 呈剂量相关性, 表明松柏醛可以促进血液中血小板的聚集, 从而发挥止血作用。

## 4 讨论

中药在炮制过程中其化学成分发生较大的改变, 这可能是其炮制前后药效发生改变的主要原因。中药在炒炭过程中, 其化学成分会发生较大的改变, 大量化合物发生裂解、脱水、美拉德等反应, 转化为具有止血活性的新成分, 从而使炭药具有更好的止血作用, 如侧柏<sup>[6]</sup>、荷叶<sup>[7]</sup>在炮制成炭药后, 其所含黄酮苷受热大部分分解为槲皮素等黄酮苷元类成分, 可以显著降低APTT或PT, 发挥止血作用。此外, 一些中药在制炭过程中, 某些成分在高温下发生改变, 转化为新的化学成分, 如蒲黄<sup>[8]</sup>中槲皮素和鼠李糖在炮制过程中转化为新成分 huaicarbon A/B, 且具有良好的止血活性。生山楂的活性成分主要为黄酮类及有机酸类成分<sup>[9]</sup>, 本研究选择黄酮类

成分金丝桃苷、芦丁、槲皮素, 有机酸类成分绿原酸进行HPLC图谱考察, 结果发现山楂在炮制成山楂炭后其黄酮及有机酸类成分大幅下降, 说明山楂炭的止血作用与黄酮及有机酸类成分的相关性不大。但同时发现, 与生山楂相比, 山楂炭中有新成分生成, 且这些成分主要为小极性化合物, 可能是生山楂由活血作用转变为止血作用的一大原因。

炭药在炮制过程中产生的炭素(活性炭)具有良好的吸附作用, 有助于激活凝血因子及血小板因子, 被认为是炭药止血作用的物质基础之一<sup>[20]</sup>。本研究考察活性炭对小鼠的体内止血作用发现, 其能降低小鼠体内止血及凝血时间, 但并不具有显著性。而山楂炭及其醋酸乙酯部位均表现出较云南白药组更强的止血作用, 因此推测山楂炭中发挥止血作用的物质包括但不限于活性炭(炭素)。并且发现山楂炭醇提液具有更好的止血作用, 这可能是由于乙醇回流与常规的水煎煮相比能够有效地提取出山楂炭中的黄酮类、三萜类等小极性化合物<sup>[21-22]</sup>, 表明山楂炭中的小极性成分可能与山楂炭止血作用有关。

本研究以生物活性为导向分离药效成分: 采用柱色谱分离与药效实验相结合, 筛选得到山楂炭的药效部位——醋酸乙酯部位, 并对其进一步分离, 筛选得到山楂炭止血化学成分所在流分, 再根据HPLC图谱对其中可能的化学成分进行分离纯化,

并通过波谱技术进行鉴定,最终得到具有止血活性的苯丙素类化合物松柏醛。结合 HPLC 图谱分析,认为松柏醛即为山楂炭 HPLC 图谱中  $t_R=48.5$  min 的新生成成分;松柏醛几乎不存在于生山楂中,但在山楂炭中的含量明显提升,可能是生山楂中的木质素类成分在高温炮制过程中  $\beta$ -O-4 化学键发生断裂而生成<sup>[23-24]</sup>;且松柏醛表现出良好的止血作用。因此,推测松柏醛是山楂炭止血作用的物质基础之一。

凝血四项是目前评价出血性疾病的重要指标,不同的检测项目所反映的凝血作用途径也不同,PT 反映血浆中凝血因子 II、V、VII 和 X 的水平,是临床上反映外源性凝血系统的常用检测方法;APTT 能反映血浆凝血因子 VIII、IX、XI 和 XII 的水平,是内源性凝血系统最常用的筛选试验;TT 主要反映凝血共同途径纤维蛋白原转变为纤维蛋白的过程中,是否存在纤维蛋白原异常、以及是否发生纤溶、存在抗凝物的情况;FIB 是血凝块的重要结构组成,它能反映血液中的纤维蛋白原含量<sup>[25]</sup>。血小板具有黏附、聚集等生理特性,也是影响凝血的关键因素,当出现血管损伤时,血小板会黏附在受损的血管壁上,使血小板聚集以抑制血液的流出<sup>[26]</sup>。凝血四项及血小板聚集率的结果显示,松柏醛能够促进血小板的聚集,主要通过激活纤维蛋白原与共同凝血途径发挥凝血作用,而与外源性及内源性凝血途径相关性不大。

综上,本研究确定山楂炭不同极性部位中,醋酸乙酯部位为山楂炭发挥止血作用的药效部位;并以止血活性为导向从山楂炭醋酸乙酯部位中分离得到松柏醛,其可以通过共同凝血途径、激活纤维蛋白原系统及促进血小板聚集而发挥止血作用。初步明确了山楂炭中发挥止血作用的物质基础及山楂炭止血机制,为山楂炭的临床应用提供理论依据,同时为丰富中药炭药物物质基础及其作用机制的研究提供一定借鉴。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 33.
- [2] 董嘉琪, 陈金鹏, 龚苏晓, 等. 山楂的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2801-2818.
- [3] 封若雨, 朱新宇, 张苗苗. 近五年山楂药理作用研

- 究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(5): 715-718.
- [4] 刘荣华, 邵峰, 邓雅琼, 等. 山楂化学成分研究进展 [J]. 中药材, 2008, 31(7): 1100-1103.
- [5] 张倩茹, 尹蓉, 梁志宏, 等. 山楂功能性成分及其开发利用研究进展 [J]. 农产品加工, 2020(21): 94-97.
- [6] 孙云龙, 董金香, 尚坤. 山楂炭炮制工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1634-1637.
- [7] 张洪坤, 郭长达, 黄玉瑶, 等. 山楂炮制过程中中药效物质成分的变化规律研究 [J]. 中药材, 2017, 40(4): 811-815.
- [8] 李诗佳, 贾舒杰, 杨柳, 等. 山楂炒炭前后微结构及凝血成分的变化研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1352-1354.
- [9] 刘童, 陈雪, 张强, 等. 四种不同炮制方法对山楂中 7 种成分变化的影响 [J]. 中国药师, 2022, 25(5): 922-926.
- [10] 史清文, 李力更, 霍长虹, 等. 天然药物化学研究与新药开发 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1583-1589.
- [11] Nguyen T D, Nguyen T H, Do T H, et al. Anti-inflammatory effect of a triterpenoid from *Balanophora laxiflora*: Results of bioactivity-guided isolation [J]. *Heliyon*, 2022, 8(3): e09070.
- [12] Abdallah H M, El-Halawany A M, Darwish K M, et al. Bio-guided isolation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors from medicinal plants: *In vitro* assay and molecular dynamics [J]. *Plants*, 2022, 11(15): 1914.
- [13] 史清文, 李力更, 霍长虹, 等. 天然药物化学研究与新药开发 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1583-1589.
- [14] 曹勇, 黎演明, 冼学权, 等. 木薯淀粉微球的止血性能初步研究 [J]. 广西科学, 2019, 26(2): 233-237.
- [15] 丁林芬, 王海垠, 王扣, 等. 香果树化学成分的研究 [J]. 中成药, 2016, 38(12): 2610-2614.
- [16] 石典花, 戴衍朋, 苏本正, 等. 侧柏叶“炒炭存性”科学内涵初探 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 5963-5971.
- [17] Chen Y H, Chen Q W, Wang X Z, et al. Hemostatic action of *Lotus* leaf charcoal is probably due to transformation of flavonol aglycons from flavonol glycosides in traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112364.
- [18] Gao M L, Ge Z P, Deng R, et al. Evaluation of VEGF mediated pro-angiogenic and hemostatic effects and

- chemical marker investigation for *Typhae Pollen* and its processed product [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113591.
- [19] 何雅君, 苏娟, 杨茜, 等. HPLC 同时测定山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 829-831.
- [20] 赵玉升, 李伟洋, 曹天佑, 等. 中药炭药止血物质基础概述 [J]. 中医药导报, 2021, 27(8): 56-60.
- [21] 高樱, 李俊婕, 王小兵, 等. 山楂总黄酮提取工艺研究进展 [J]. 山东化工, 2021, 50(22): 90-92.
- [22] 王逸萍, 陈爱萍, 徐智勇. 山楂中总三萜酸提取工艺的优选 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 774-775.
- [23] Kotake T, Kawamoto H, Saka S. Mechanisms for the formation of monomers and oligomers during the pyrolysis of a softwood lignin [J]. *J Anal Appl Pyrolysis*, 2014, 105: 309-316.
- [24] 王磊. 愈创木基型木质素的热裂解及产物生成机理研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- [25] 王珊珊, 成绍武, 宋祯彦, 等. 艾叶提取物激活凝血因子XII发挥止血活血功能 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(10): 2488-2492.
- [26] Broos K, Feys H B, De Meyer S F, *et al*. Platelets at work in primary hemostasis [J]. *Blood Rev*, 2011, 25(4): 155-167.

[责任编辑 李亚楠]