

文章编号: 1000-5862(2017)01-0089-04

薄层层析法分析旱莲草的凝血活性成分

过七根 徐常龙* 董 雯 张炳火*

(九江学院药学与生命科学学院 江西 九江 332000)

摘要: 旱莲草是一种具有多种生理活性的中草药, 含有多凝血物质. 利用制备型薄层层析的方法, 分别对旱莲草的乙醇和乙酸乙酯提取物的凝血活性成分进行了分析, 发现旱莲草至少含有6个凝血活性组分, 其中3个组分凝血活性较强.

关键词: 旱莲草; 凝血活性; 薄层层析

中图分类号: R 286 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2017.01.17

0 引言

旱莲草是一种重要的药用植物^[1-2], 最早用于止血^[3], 常用来治疗阴虚血热、吐血、血衄、尿血、血痢、崩漏下血以及外伤出血等出血性病症. 其止血功能在临床中药复方制剂方面已得到了一些应用, 它是宁环片、功血宁冲剂和明目止血片等临床常用止血中药制剂的主要成分之一^[4]. 但是, 迄今为止, 旱莲草凝血或止血活性的研究基本集中在水、乙醇和甲醇等溶剂浸泡的粗提物上^[3, 5-7], 虽然从旱莲草中分离到了包括香豆草醚类、三萜皂苷类、甾体类、噻吩类和黄酮类等各种化合物^[8-16], 但其中只有蟛蜞菊内酯、去甲蟛蜞菊内酯和异去甲蟛蜞菊内酯等极少数化合物^[17-18]被证实具有凝血活性, 因此旱莲草有多少种凝血活性成分依然是未知数.

本文利用薄层层析(thin layer chromatography, TLC)方法, 对旱莲草全草的乙醇提取物和乙酸乙酯提取物的凝血活性成分进行了初步分析, 发现旱莲草至少含有6个以上的凝血活性成分, 其中3个组分凝血活性较强.

1 材料与方法

1.1 材料

供试旱莲草: 从江西省九江市鄱阳湖边采集旱

莲草全草, 用自来水洗干净, 去除枯枝, 50℃烘箱中干燥后切成0.5 cm左右, 再用粉碎机进行粉碎备用.

供试血液: 采用真空采血器采集人血(血型为A型, 加入抗凝剂), 并用0.9%的生理盐水(含抗凝剂肝素钠)稀释20倍备用.

制备型薄层层析(TLC)硅胶板, 自制. 硅胶GF254每3 g加质量分数为0.6%的羧甲基纤维素钠溶液10 mL, 充分碾磨后铺在洁净的玻璃片上, 晾干, 再置于65℃烘箱中活化24 h备用.

1.2 方法

1.2.1 旱莲草的粗提物制备 在室温(25℃左右)条件下, 将旱莲草干粉末分别用乙酸乙酯和乙醇浸泡24 h后过滤, 滤液经减压蒸馏, 得到乙酸乙酯和乙醇浸泡的粗提物.

1.2.2 利用制备型薄层层析硅胶板初步分离 各取乙酸乙酯和乙醇粗提物100 mg, 分别用乙酸乙酯和丙酮溶解, 在制备型薄层层析硅胶板上进行划线点样. 乙酸乙酯粗提物用溶剂系统 $v(\text{石油醚}):v(\text{乙酸乙酯})=4:1$ 展层, 乙醇粗提物用溶剂系统 $v(\text{丙酮}):v(\text{石油醚})=4:1$ 展层. 展层结束后分别在可见光、紫外线254 nm和365 nm下观察, 拍照, 并将各吸收条带仔细刮下. 如果两相邻条带相隔距离较远, 则将两相邻条带之间的部分作为单独的一个样品. 乙醇粗提物所得的各样品用1 mL丙酮浸泡, 而乙酸乙酯粗提物所刮下的条带分为2份, 1份用0.5 mL乙酸乙酯浸泡, 另1份用0.5 mL丙酮浸

收稿日期: 2015-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(31660096), 江西省自然科学基金(20122BAB204022), 江西省教育厅青年科学基金(GJJ11238)和九江学院重点校级课题(09KJ3)资助项目.

通信作者: 徐常龙(1974-), 男, 江西九江人, 副教授, 主要从事多酸材料马绿色催化研究. E-mail: xchl39@163.com

泡,浸泡液用于凝血活性检测.

1.2.3 样品及组分的凝血活性检测 取 $60\ \mu\text{L}$ 血样于载玻片上,再加 $20\ \mu\text{L}$ 样品和血样混匀,肉眼或显微镜下观察血细胞是否出现凝聚成团的现象.以丙酮、乙酸乙酯和蒸馏水为对照组.

2 结果与分析

2.1 利用制备型薄层层析方法所得到的化合物组分

经 TLC 展层后刮板,乙酸乙酯粗提物得到了 18 个组分,乙醇粗提物得到了 8 个组分(见图 1).

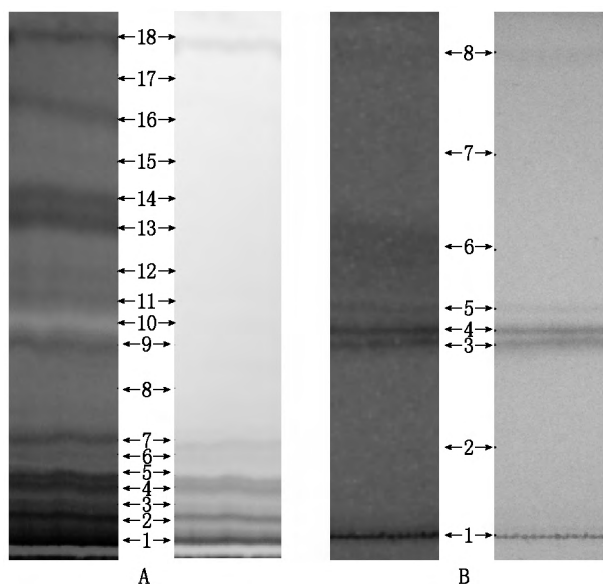


图 1 粗提物薄层层析检测结果
A, 乙酸乙酯提取物; B, 乙醇提取物; A(左)、B(左), 紫外线 254 nm 下; A(右)、B(右), 可见光下.

图 1 粗提物薄层层析检测结果

2.2 凝血活性检测

2.2.1 对照溶剂的凝血活性 试验结果显示,乙酸乙酯和无菌蒸馏水滴到血液稀释液中,血细胞未出现凝聚成团的现象(见图 2(A)和图 2(B)),这说明乙酸乙酯和无菌蒸馏水在试验条件下没有凝血活性;在 $v(\text{血样}):v(\text{丙酮})=3:1$ 的剂量下,血细胞也无凝聚成团的现象,但在 $v(\text{血样}):v(\text{丙酮})\leq 1:1$ 的剂量下,血细胞出现明显凝聚成团的现象(见图 2(C)和图 2(D)),这说明在本试验条件下,低剂量丙酮没有凝聚血细胞的作用,但高剂量丙酮具有明显凝聚血细胞的活性.

2.2.2 粗提物的凝血活性 试验结果显示,乙醇粗提液具有较弱的凝血活性,乙酸乙酯粗提液未检测出凝血活性,但如果乙酸乙酯完全挥发后,再用丙酮溶解,样品的丙酮溶液则具有较强的凝血活性.这可

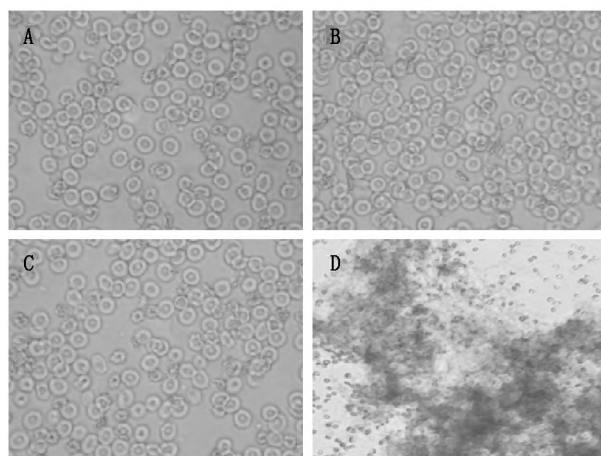


图 2 对照溶剂凝血活性
A: 蒸馏水(10×40); B: 乙酸乙酯(10×40);
C: $v(\text{血样}):v(\text{丙酮})=3:1$ (10×40);
D: $v(\text{血样}):v(\text{丙酮})\leq 1:1$ (10×10).

图 2 对照溶剂凝血活性

能是因为乙酸乙酯和血液不能互溶,其溶解的活性成分不能充分接触血液各成分,因此难以发挥凝血活性;而丙酮和血液能够互溶,导致其溶解的活性成分能够与血液充分接触而发挥凝血活性.

2.2.3 薄层层析制备的各组分的凝血活性 利用乙醇粗提物得到的 8 个组分中,只有组分 3 具有较弱的凝血活性,其余 7 个组分均未检测到凝血活性.利用乙酸乙酯粗提物得到的 18 个组分,如果用乙酸乙酯作为溶剂,则均未检测到凝血活性,但是如果用丙酮作为溶剂,则检测到 6 个组分具有凝血活性(见表 1),其中 3 个组分活性较强,血液一接触样品溶液,立即引起凝聚现象,显微镜下可见大量红细胞凝聚成较大的团块,并且出现网状结构(见图 3).

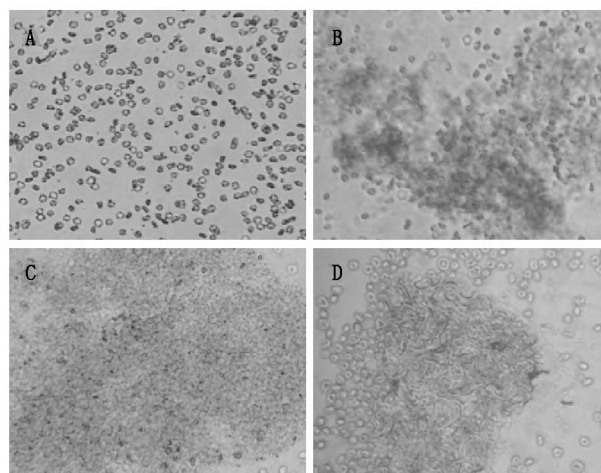


图 3 乙酸乙酯粗提物中的 3 组分的凝血活性
A: 对照组; B: 组分 1; C: 组分 3; D: 组分 8.

表 1 乙酸乙酯粗提物中的 14 个组分的凝血活性

| 样品号 | 乙酸乙酯溶解组分的凝血活性 | 丙酮溶解组分的凝血活性 |
|-----|---------------|-------------|
| 1 | - | ++ |
| 2 | - | - |
| 3 | - | ++ |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | - | - |
| 7 | - | - |
| 8 | - | ++ |
| 9 | - | + |
| 10 | - | - |
| 11 | - | - |
| 12 | - | - |
| 13 | - | - |
| 14 | - | - |
| 15 | - | - |
| 16 | - | + |
| 17 | - | - |
| 18 | - | + |

注: ++ 表示具有较强的凝血活性; + 表示有微弱的凝血活性; - 表示无凝血活性。

3 结论

旱莲草的水、乙醇和甲醇粗提物均有一定的止血和促凝血功能^[3,5-9], 本研究发现, 旱莲草的乙酸乙酯提取物中含有多种凝血活性成分, 这说明旱莲草中凝血活性成分种类丰富, 值得深入系统研究。

王建等^[3]认为, 旱莲草水煎剂的凝血功能是通过缩短凝血酶原时间和部分凝血活酶时间, 升高血小板数量和纤维蛋白原含量而实现的。陈锐等^[17]研究发现, 在体外, 蟛蜞菊内酯和异去甲蟛蜞菊内酯既可直接导致红细胞凝聚成团, 也能先导致纤维蛋白原转变为纤维蛋白, 再由纤维蛋白絮凝红细胞, 从而发挥双重凝血作用。本研究发现, 旱莲草的乙醇和乙酸乙酯提取物均能导致红细胞凝聚成团, 并出现网状结构, 这说明这些提取物中的凝血活性成分的凝血机理至少包括 2 种: (i) 直接凝聚红细胞导致凝血; (ii) 先将纤维蛋白原转变为纤维蛋白, 再由纤维蛋白凝聚红细胞。

4 参考文献

[1] Dhaka N, Kothari S L. Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) hassk: An important medicinal plant [J]. In Vitro Cell Dev Biol: Plant 2005 41(5): 658-661.

[2] Singh S K, Manoj K, Rai M K, et al. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis [J]. Ind Crop Prod 2012 37(1): 328-333.

[3] 王建, 白秀珍, 杨学东. 墨旱莲对热盛胃出血止血作用的研究 [J]. 数理医药学杂志 2005 18(4): 375-376.

[4] 何希瑞, 樊鹏程, 李茂星, 等. 常用止血中药及其止血机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志 2010 16(15): 217-221.

[5] Pithayanukul P, Laovachirasuwan S, Bavovada R, et al. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom [J]. J Ethnopharmacol 2004 90(2/3): 347-352.

[6] 陈建济, 施东捷, 李克华, 等. 墨旱莲对 4 种蝮蛇毒引起的炎症和出血的影响 [J]. 蛇志 2005 17(2): 65-68.

[7] 刘世旺, 徐艳霞, 徐霞玲, 等. 墨旱莲叶水提取物止血活性初探 [J]. 安徽农业科学 2008 36(31): 13673-13674.

[8] 张金生, 郭倩明. 旱莲草化学成分的研究 [J]. 药学报 2001 36(1): 34-37.

[9] 赵越平, 汤海峰, 蒋永培, 等. 墨旱莲化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志 2002 37(1): 17-19.

[10] 吴疆, 侯文彬, 张铁军, 等. 墨旱莲的化学成分研究 [J]. 中草药 2008 39(16): 814-816.

[11] 余建清, 于怀东, 邹国林. 墨旱莲挥发油化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志 2005 40(12): 895-896.

[12] Liu Yanqiu, Zhan Libin, Liu Tiegang, et al. Inhibitory effect of *Ecliptae herba* extract and its component wedelolactone on pre-osteoclastic proliferation and differentiation [J]. Ethnopharmacol 2014 157(1): 206-211.

[13] Xi Fengmin, Li Chuntong, Han Jun, et al. Thiophenes, polyacetylenes and terpenes from the aerial parts of *Eclipta prostrata* [J]. Bioorgan Med Chem 2014 22(22): 6515-6522.

[14] Han Lifeng, Zhao Jing, Zhang Yi, et al. Chemical constituents from dried aerial parts of *Eclipta prostrata* [J]. Chin Herb Med 2013 5(4): 313-316.

[15] Xi Fengmin, Li Chuntong, Mi Junling, et al. Three new olean-type triterpenoid saponins from aerial parts of *Eclipta prostrata* (L.) [J]. Nat Prod Res 2014 28(1): 35-40.

[16] Tabata A, Taniguchi M, Shibano M. Ecliptamines A-D, four new guanidine alkaloids from *Eclipta prostrata* L. [J]. Phytochem Lett 2015 11: 224-228.

[17] 陈锐, 许群, 陈昱, 等. 旱莲草凝血和溶血活性成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发 2014 26(18): 1161-1164.

[18] Kosuge T, Ishida H, Satoh T. Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. IV. On antihemorrhagic principles in *Hypericum erectum* Thunb [J]. Chem Pharm Bull 1985 33(1): 202-205.

The Analysis of Procoagulant Constituents of *Eclipta alba* by Thin Layer Chromatography

GUO Qigen, XU Changlong*, Dong Wen, ZHANG Binghuo*

(College of Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332000, China)

Abstract: *Eclipta alba* a kind of herbal medicine with many physiological activities, has various procoagulant components. In this study, the procoagulant components of *E. alba* were extracted by using ethanol and ethyl acetate respectively and analyzed by using preparative thin layer chromatography (TLC). There were at least six procoagulant components in metabolites of *E. alba*, and three of them showed strong procoagulant activity.

Key words: *E. alba*; procoagulant activity; thin layer chromatography

(责任编辑: 刘显亮)

(上接第 55 页)

- [10] Stroustrup B. The C++ programming language [M]. New York: Pearson Education, 2013.
- [11] Gosling J, Joy B, Steele G, et al. The Java language specification [M]. New York: Pearson Education, 2014.
- [12] Meyer B. Eiffel: the language [M]. New York: Prentice Hall, 1992.
- [13] Hutton G. Programming in Haskell [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- [14] Xue Jinyun. Genericity in PAR platform [J]. Lecture Notes in Computer Science, 2015, 9559: 3-14.
- [15] Xue Jinyun. PAR method and its supporting platform [A]. Proceeding of International Workshop on Formal method for Developing Software [C]. Macao: UNU-IIST, 2006.
- [16] 薛锦云. PAR 方法抽象程序设计语言 Apla 技术报告 [R]. 江西师范大学省高性能计算技术重点实验室, 2010.
- [17] 朱小征, 薛锦云, 徐华珍. Transaction 在 PAR 平台中的实现方法及应用研究 [J]. 计算机与数字工程, 2015 (10): 1884-1890.

The Research on Implementation Method of Generic Mechanism in Apla \rightarrow Java Program Generation System

XU Huazhen^{1, 2}, XUE Jinyun^{2*}, ZHU Xiaozheng^{1, 2}

(1. College of Computer Information Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China;

2. The State Base of Networked Supporting Software of International S/T Cooperation, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: A new implementation method of new generic language mechanisms which were implemented in the Apla \rightarrow Java generation system was presented, and a typical algorithm example was illustrated. The method is simpler than the existing generic methods in Java, C++, C# and other languages. A large number of successful testing cases demonstrated reliability of the implementation method and correctness of these new generic language mechanisms.

Key words: generic language mechanism; software reliability; safety mechanism; Apla \rightarrow Java generation system

(责任编辑: 冉小晓)