

黄刺玫果实化学成分及其体外延长凝血酶原时间研究

孙崇峰¹, 李石飞¹, 赵 邑², 张立伟^{1*}

¹山西大学分子科学研究所; ²山西省生物研究所, 太原 030006

摘要:对黄刺玫(*Rosa xanthina* Lindl)果实的化学成分及其体外延长凝血酶原时间(PT)进行研究。采用硅胶、Sephadex LH-20、MDS 柱色谱以及半制备高效液相色谱等方法进行分离纯化,并运用 NMR、MS 等波谱方法对所分离的化合物进行结构鉴定。结果从黄刺玫果实 75% 乙醇提取物中分离鉴定 6 个化合物,分别为槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李吡喃糖苷(1)、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-反式香豆酰基)- β -D-葡萄糖苷(2)、山奈酚-4'-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(3)、槲皮素-4'-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(4)、1,2-二(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,3-丙二醇(5)、2,3-二羟基-1-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-1-丙酮(6)。其中化合物 6 是首次从本属植物中分离得到,化合物 1~5 为首次从黄刺玫中分离得到。体外血浆 PT 测定结果表明,化合物 1~4 与空白对照相比($P < 0.05$) 均显示具有延长凝血酶原时间作用,进一步对化合物 1 的延长凝血酶原时间(PT)进行量效关系研究,结果显示在浓度不小于 27 mM 时,化合物 1 显示明显延长凝血酶原时间作用。

关键词:蔷薇属;黄刺玫;化学成分;凝血酶原时间

中图分类号:R284

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.2.010

Chemical Constituents from the Fruits of *Rosa xanthina* Lindl and Their Effects on Prothrombin Time *in vitro*

SUN Chong-feng¹, LI Shi-fei¹, ZHAO Yi², ZHANG Li-wei^{1*}

¹The Institute of Molecular Science, Shanxi University; ²Biology Institute of Shanxi, Taiyuan 030006, China

Abstract: The present study aimed to investigate chemical constituents from *Rosa xanthina* Lindl and their effects on prothrombin time *in vitro*. Six compounds were obtained from the 75% ethanol extract of the fruits of *R. xanthina* by silica gel, Sephadex LH-20, MDS and semi-preparative HPLC technology. Based on MS, NMR spectroscopic methods, their structures were elucidated as quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (1), quercetin-3-*O*-(6''-*O*-trans-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (2), kaempferol-4'-*O*- β -D-glycopyranoside (3), quercetin-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (4), 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol (5), 2,3-dihydroxy-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-propanone (6). Compounds 1-5 were isolated from the plant for the first time, and compound 6 was isolated from this genus for the first time. Compounds (1-4) showed significant prolongation of prothrombin time comparing with control. In addition, when the concentration was higher than 27 mM, compound 1 showed significant prolongation of prothrombin time.

Key words: *Rosa*; *Rosa xanthina* Lindl; chemical constituents; prothrombin time

由血栓引起的疾病是人类的常见多发病,溶栓疗法是治疗血栓性疾病的重要方法之一。因此通过血栓形成机制来研究新的抗血栓药物显得极为重要,临床上用于血栓治疗的药物主要分为 3 类:抗凝血药物、溶血栓药和抗血小板类药物。凝血酶在凝血过程中起着至关重要的作用,使纤维蛋白原变成纤维蛋白,最终使凝块形成,凝血酶也是引起血小板聚集的最主要的激活剂之一。而血浆凝血酶原时间

(Prothrombin Time, PT)是指在抗凝血中加入足量组织因子(Tissue Factor, TF)和适量钙离子,满足外源性凝血条件,从加入钙离子到血浆凝固所需的时间,反映了外源性凝血是否正常。通过对凝血酶原时间的影响来筛选抗凝血药物是目前抗凝血药物发现一个重要途径。

黄刺玫(*Rosa xanthina* Lindl),又名黄刺梅,为蔷薇科蔷薇属落叶灌木,主产于山西、陕西、河北等地,自古以来,民间就有鲜食黄刺玫果实和用其酿酒的习惯^[1,2]。黄刺玫的花、果、叶和根皮等均可入药,味酸甘性平,功用为健脾养血、理气调经,可治疗

顽固淋病、消化不良、腹痛腹胀、胃痛或妇女月经不调^[3]。现代药理研究发现,黄刺玫果汁可降低高切变率下的全血粘度,促进微循环灌注,提高红细胞变形能力^[4]。而黄刺玫果实的化学成分研究目前尚未见报道,因此,为了探寻其药效物质基础,本工作对黄刺玫果实的化学成分进行了研究,从黄刺玫果实 75% 乙醇提取物中分离鉴定了 6 个化合物,分别为槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李吡喃糖苷(1)、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-反式香豆酰基)- β -D-葡萄糖苷(2)、山奈酚-4'-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(3)、槲皮素-4'-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(4)、1,2-二(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,3-丙二醇(5)、2,3-二羟基-1-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-1-丙酮(6)。其中化合物 6 是首次从本属植物中分离得到,化合物 1~5 为从黄刺玫中首次分离得到。此外,对所分离得到的化合物进行了延长凝血酶原时间(PT)的测定,结果显示化合物 1~4 与空白对照相比($P < 0.05$)均显示具有延长凝血酶原时间作用,并且化合物 1 凝血酶原时间(PT)有较好的量效关系,当其浓度不小于 27 mM 时,化合物 1 显示明显延长凝血酶原时间作用。

1 仪器与材料

CHEETAH™中压快速制备色谱(天津博纳艾杰尔科技有限公司);Bruker 600-MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);Bruker 300-MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);岛津 LC-6AD 型制备液相(日本岛津公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Venusil XBP C₁₈ 制备柱(250 mm × 21.2 mm, 5 μ m);Venusil XBP C₁₈ 半制备柱(250 mm × 10 mm, 5 μ m);Venusil XBP C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);MDS-5-3 反相填料(200~300 目,北京麦迪生心技术开发中心);柱层析硅胶以及薄层色谱硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂);TLC 暗斑在紫外灯 254 nm 下观察,通过喷洒 5% 硫酸乙醇溶液后加热显色检测;Sephadex LH-20(美国 GE Healthcare 公司);制备液相和分析液相所用试剂为色谱纯(美国 Fisher Scientific),其余为分析纯(天津市北辰方正试剂厂)。

Sysmex CA-50 半自动凝血分析仪(日本 Sysmex 公司);人正常血浆以及 PT 试剂(山西生物技术研究所提供);华法林钠(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

实验所用黄刺玫由山西省医药与生命科学研究提供,经山西大学郝建平副教授鉴定为 *Rosa xan-*

thina Lindl,标本存放于山西省医药与生命科学研究,标本编号:HCM201211。

2 实验方法

2.1 提取与分离

干燥黄刺玫果实 6 kg,适当粉碎,用 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h;合并提取液,减压浓缩至 3 L 水溶液,用乙酸乙酯萃取 4 次,减压浓缩得 135 g 乙酸乙酯提取物。乙酸乙酯提取物经中压 MDS 柱层析分离,乙醇-水梯度洗脱(100:0~0:100),TLC 检测合并 6 个部分(E1~E6)。E1 部分(10.0 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,以甲醇作为流动相洗脱,得到 E1-1~E1-6 共 6 个流分。E1-3 经硅胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇(30:1)作为流动相洗脱,得到 E1-3-1~E1-3-5 共 5 个流分。E1-3-3 经半制备型 HPLC 分离,以乙腈-水(4:1)等度洗脱,得到化合物 5(12.0 mg, $t_R = 8.3$ min)和 6(4.0 mg, $t_R = 17.5$ min)。E2 部分(13.0 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,以甲醇作为流动相洗脱,得 M0~M6 共 6 个流分。M1 部分(465.8 mg)经制备型 HPLC 分离,以甲醇-水(1:1)等度洗脱,得到 M1-1~M1-3 共 3 个流分。M1-3 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇(1:1)作为流动相洗脱,得到化合物 3(5.0 mg)。M2 部分(150.0 mg)经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇(1:1)作为流动相洗脱,得到化合物 1(87.3 mg)。M3 部分(300.0 mg)经制备型 HPLC 分离,以甲醇-水(1:1~9:1)梯度洗脱,得到化合物 2(76.6 mg, $t_R = 11.5$ min)。M4 部分(377.2 mg)经制备型 HPLC 分离,以甲醇-水(1:9~9:1)梯度洗脱,得到 M4-1~M4-3 共 3 个流分。M4-3 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇(1:1)作为流动相洗脱,得到化合物 4(27.0 mg)。

2.2 活性实验

2.2.1 血浆凝血酶原时间测定

取人正常血浆,加入 3.8% 的枸橼酸钠溶液,按 9:1 比例混匀,2500 rpm 离心 10 min 后,上清液即为乏血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。分别取 48 μ L PPP 置血凝杯中,加入已配好的二甲基亚砜样品溶液 2 μ L,混匀后放入血凝分析仪(Sysmex CA-50)中预热 3 min,同时将 PT 试剂放入 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中孵育 3 min,取 100 μ L PT 试剂加入待测样品中,测定 PT。阳性对照华法林钠配制终浓度 30

mM 的样品,每个样品平行测定 3 次,记录结果。

2.2.2 量效关系试验

样品配制及 PT 测定:化合物 1 采用 DMSO 配制浓度为 9、18、27、36、54、72、108 mM,分别测定 PT,实验步骤和阳性对照同上。

2.3 统计学处理

用 SPSS16.0 软件进行统计分析,采用独立样本 T 检验 (Independent-Samples T Test) 进行比较, $P < 0.05$ 表示为差异,具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 化合物结构鉴定

化合物 1 淡黄色粉末;UV₂₅₄ 下显暗斑,5% 硫酸乙醇溶液显黄色;ESI-MS m/z 447 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ_{H} : 7.33 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.30 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-1''), 4.24-3.35 (4H, 糖基质子), 0.94 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'')。 ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ_{C} : 159.4 (C-2), 136.3 (C-3), 179.7 (C-4), 163.2 (C-5), 100.0 (C-6), 166.0 (C-7), 94.9 (C-8), 158.6 (C-9), 106.0 (C-10), 123.1 (C-1'), 117.1 (C-2'), 146.5 (C-3'), 149.9 (C-4'), 116.6 (C-5'), 123.0 (C-6'), 103.6 (C-1''), 72.1 (C-2''), 72.2 (C-3''), 73.4 (C-4''), 72.0 (C-5''), 17.8 (C-6'')。以上数据与文献^[5]报道一致,故鉴定化合物 1 为槲皮素-3-O- α -L-鼠李吡喃糖苷。

化合物 2 黄色粉末;UV₂₅₄ 下显暗斑,5% 硫酸乙醇溶液显黄色;ESI-MS m/z 609 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ_{H} : 12.59 (1H, s, OH-5), 8.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 7.36 (2H, $J = 8.0$ Hz, H-2''', H-6'''), 7.28 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-7'''), 6.87 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.80 (2H, $J = 8.0$ Hz, H-3''', H-5'''), 6.40 (1H, brs, H-8), 6.16 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.13 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-8'''), 5.46 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.18-4.31 (6H, m, 糖基质子); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ_{C} : 159.0 (C-2), 130.4 (C-3), 177.0 (C-4), 160.7 (C-5), 98.4 (C-6), 164.0 (C-7), 93.3 (C-8), 159.0 (C-9), 103.4 (C-10), 120.3 (C-1'), 114.7 (C-2'), 144.2 (C-3'), 156.0 (C-4'), 114.7 (C-5'), 120.4 (C-6'), 100.6 (C-1''),

73.8 (C-2''), 75.7 (C-3''), 69.5 (C-4''), 73.9 (C-5''), 62.6 (C-6''), 124.5 (C-1'''), 129.8 (C-2'''), 115.3 (C-3'''), 156.0 (C-4'''), 115.3 (C-5'''), 129.8 (C-6'''), 144.2 (C-7'''), 113.2 (C-8'''), 165.8 (C-9''')。以上数据与文献^[6]报道一致,故鉴定化合物 2 为槲皮素-3-O-(6''-O-反式香豆酰基)- β -D-葡萄糖苷。

化合物 3 淡黄色粉末;UV₂₅₄ 下显暗斑,5% 硫酸乙醇溶液显黄色;ESI-MS m/z 471 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ_{H} : 8.04 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, s, H-6), 5.23 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 3.72 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-6''a), 3.68 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-6''b), 3.52 (2H, m, H-3'', H-4''), 3.42 (1H, m, H-2''), 3.29 (1H, m, H-5''); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ_{C} : 146.9 (C-2), 135.6 (C-3), 179.7 (C-4), 161.7 (C-5), 100.1 (C-6), 166.3 (C-7), 94.9 (C-8), 158.7 (C-9), 105.8 (C-10), 122.9 (C-1'), 132.4 (C-2'), 116.2 (C-3'), 163.2 (C-4'), 116.2 (C-5'), 132.4 (C-6'), 104.2 (C-1''), 75.9 (C-2''), 78.5 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.1 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献^[7]报道一致,故鉴定化合物 3 为山奈酚-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 4 黄色粉末;UV₂₅₄ 下显暗斑,5% 硫酸乙醇溶液显黄色;ESI-MS m/z 463 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ_{H} : 7.65 (1H, s, H-2'), 7.58 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 7.24 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, s, H-8), 6.09 (1H, s, H-6), 4.85 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-1''), 3.26-4.06 (6H, m, 糖基质子); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ_{C} : 148.8 (C-2), 138.6 (C-3), 178.1 (C-4), 163.2 (C-5), 100.1 (C-6), 166.4 (C-7), 95.2 (C-8), 158.9 (C-9), 105.8 (C-10), 128.3 (C-1'), 117.2 (C-2'), 148.5 (C-3'), 147.4 (C-4'), 116.2 (C-5'), 118.3 (C-6'), 104.2 (C-1''), 75.6 (C-2''), 78.3 (C-3''), 72.1 (C-4''), 79.1 (C-5''), 63.2 (C-6'')。以上数据与文献^[8]报道一致,故鉴定化合物 4 为槲皮素-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 5 白色无定型粉末;UV₂₅₄ 下显暗斑,5% 硫酸乙醇溶液显红色;ESI-MS m/z 343 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ_{H} : 6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.62 (1H, s, H-2''), 6.60

(1H, s, H-2'), 6.58 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.56 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5''), 6.53 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6''), 4.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1), 3.80 (1H, m, H-3a), 3.68 (3H, s, MeO-3''), 3.63 (1H, m, H-3b), 3.62 (3H, s, MeO-3'), 3.28 (1H, m, H-2); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ_{C} : 75.5 (C-1), 56.7 (C-2), 64.4 (C-3), 136.4 (C-1'), 111.5 (C-2'), 148.4 (C-3'), 146.5 (C-4'), 115.6 (C-5'), 120.3 (C-6'), 132.2 (C-1''), 114.5 (C-2''), 148.4 (C-3''), 146.5 (C-4''), 115.4 (C-5''), 123.1 (C-6''), 56.2 (MeO-3'), 56.2 (MeO-3''). 以上数据与文献^[9]报道一致,故鉴定化合物**5**为1,2-二(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,3-丙二醇。

化合物6 黄色粉末;UV₂₅₄下显暗斑,5%硫酸乙醇溶液显淡灰色;ESI-MS m/z 211 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ_{H} : 7.59 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.57 (1H, s, H-2'), 6.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 5.13 (1H, brs, H-2), 3.91 (3H, s, MeO-4'), 3.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3a), 3.74 (1H, m, H-3b); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ_{C} : 193.3 (C-1), 69.2 (C-2), 60.0 (C-3), 121.8 (C-1'), 106.2 (C-2'), 147.5 (C-3'), 149.0 (C-4'), 109.7 (C-5'), 118.9 (C-6'), 50.2 (MeO-4'). 以上数据与文献^[10]报道一致,故鉴定化合物**6**为2,3-二羟基-1-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-1-丙酮。

3.2 活性实验结果

3.2.1 血浆凝血酶原时间(PT)测定

如图1所示,化合物**1~4**与空白对照相比($P < 0.05$)显示延长凝血酶原时间作用。

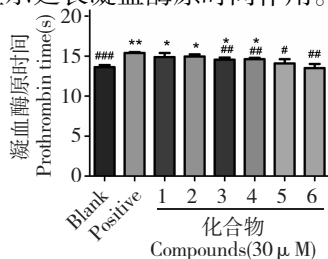


图1 化合物**1~6**的PT测试结果

Fig. 1 Results of the prothrombin time (PT) assay of compounds **1-6**

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$;与阳性对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, $n = 3$

Note: compared with blank control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; compared with positive control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, $n = 3$

3.2.2 量效关系试验

图2中显示,随着浓度增加,化合物**1**延长PT时间增加,当浓度不小于27 mM时,化合物**1**与显示明显延长凝血酶原时间作用(超过3 s)^[11,12]。

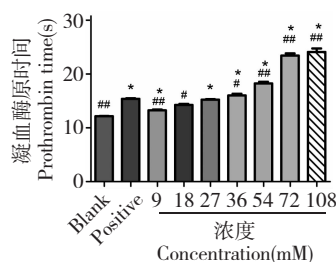


图2 化合物**1**的PT量效关系

Fig. 2 Dose-response relationship of compounds **1** on prothrombin time (PT)

注:与空白对照组比较, * $P < 0.001$;与阳性对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$, $n = 3$

Note: compared blank control, * $P < 0.001$; compared with positive control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$, $n = 3$

4 结论

本研究首次对黄刺玫果实的化学成分进行了研究,从中分离鉴定6个化合物,包括4个黄酮类化合物(**1~4**)和2个苯丙素类化合物(**5~6**),并对所有的化合物进行了延长凝血酶原时间(PT)的测定,结果显示化合物**1~4**与空白对照相比($P < 0.05$)均显示具有延长凝血酶原时间作用,并且化合物**1**凝血酶原时间(PT)有较好的量效关系,当其浓度不小于27 mM时,化合物**1**显示明显延长凝血酶原时间作用。通过本研究可以发现,黄刺玫果实主要的化学物质是黄酮类成分,与本属其它植物成分相类似。众所周知,黄酮类成分是一类具有诸如抗心脑血管疾病、抗肝脏毒、抗炎等广泛药理作用的次生代谢物,由此,本研究结果可为当地民间鲜食黄刺玫果实和用其酿酒用于防治疾病提供了科学依据。

参考文献

- 1 Wang YS (王育水), Quan YP (权玉萍), Xin ZH (辛泽华), et al. Investigation and exploitation of *Rosa xanthina* Lindl resources in South Taihang mountain area. *J Jiaozuo Teachers Coll* (焦作师范高等专科学校学报), 2014, 30: 77-79.
- 2 Wang CQ (王常青). Analysis of nutrients in the fruit of *Rosa xanthina* Lindl. *Acta Nutri Sin* (营养学报), 1997, 19: 484-486.