

桃仁中抗血栓活性成分的筛选与鉴定

贺 宇 徐德平*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】研究桃仁的抗血栓功效与成分,为桃仁预防血栓形成提供理论依据。【方法】分别用体积分数 70% 的乙醇和去离子水进行提取,不同色谱柱进行分离,利用大鼠的动静脉旁路血栓模型和体外抗血小板聚集试验并结合分子对接分析,筛选出桃仁抗血栓活性成分,并利用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术鉴定其结构。【结果】桃仁水提物经 MCI 柱层析得到的体积分数 10% 乙醇洗脱物可显著降低大鼠的血栓质量($P<0.05$),再经 ODS 柱层析分离,纯化得到 5 个单体化合物,分别为扁桃酸- β -D-吡喃葡萄糖苷(化合物 1)、1- β -D-葡萄糖苷亚苯基-2- β -D-葡萄糖苷酸(化合物 2)、3-(3-吲哚基)丁酸(化合物 3)、 α -羟基丙酸(化合物 4)和 *dl*-扁桃酸(化合物 5)。体外测试结果表明,化合物 1、2、5 均可显著抑制因二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导引起的血小板聚集($P<0.05$),其中化合物 5 的作用最强,抑制率达到 48.67%。【结论】该研究证实了 *dl*-扁桃酸为桃仁抗血栓功效的主要活性成分。

关键词:桃仁;抗血栓;结构鉴定;扁桃酸葡萄糖苷;*dl*-扁桃酸

Screening and Identification of Antithrombotic Active Components from Peach Kernels

HE Yu XU Deping*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to study the antithrombotic effect and composition of peach kernels and provide a theoretical basis for preventing thrombogenesis by peach kernels. [Method] The active components of peach kernels were extracted by ethanol at a volume fraction of 70% and deionized water and separated by multiple chromatography techniques. The antithrombotic components were screened by a rat model of arteriovenous bypass thrombosis and *in vitro* anti-platelet aggregation test combined with molecular docking. The chemical structures were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. [Result] The 10% ethanol elute of peach kernel water extract separated by MCI column chromatography significantly reduced the thrombus mass in rats ($P<0.05$). The subsequent separation with ODS column chromatography led to the isolation of five monomer compounds, including mandelate- β -D-glucopyranoside (compound 1), 1- β -D-glucoside phenylidene-2- β -D-glucoside (compound 2), 3-(3-indolyl) butyric acid (compound 3), α -hydroxypropionic acid (compound 4), and *dl*-mandelic acid (compound 5). Compounds 1, 2, and 5 exhibited inhibitory effects on adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation *in vitro* ($P<0.05$). Among them, compound 5 showed the strongest inhibitory effect, with the inhibitory rate reaching 48.67%. [Conclusion] It is proven that *dl*-mandelic acid is the main active component for the antithrombotic effect of peach kernels.

Keywords: peach kernel; antithrombotic; structural identification; glucoside mandelate; *dl*-mandelic acid

桃仁为桃(*Prunus persica* (L.) Batsch)的成熟 干燥种子^[1],为药食同源食物。桃仁入药历史悠

基金项目:中央高校基本科研业务费专项项目(JUSRP21127)。

通信作者:徐德平(1965—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事天然产物化学研究。E-mail:xdp1219@sina.com

收稿日期:2023-10-18 修回日期:2023-12-27

久,常用于活血化瘀。现代药理研究表明,桃仁提取物抗凝活性显著,可明显延长凝血酶时间^[2]、出血时间和凝血时间^[3],促进神经代谢及恢复^[4],并具有抗炎^[5]、抗肿瘤^[6]活性。在临床上,桃仁常用于治疗血瘀经闭和跌打损伤等血瘀证^[7-8]。桃仁主要的化学成分有脂质、蛋白质、黄酮、甾体和萜类、酚酸类、糖^[9]等,但桃仁中具有抗血栓活性的成分尚不清楚。

作者通过层析分离法^[10]和大鼠的动静脉旁路血栓模型^[11]筛选出桃仁水提取物中具有抗血栓功效的化合物,结合体外抗血栓试验与分子对接方法进一步验证桃仁中抗血栓功效的化学成分,为桃仁的研究与开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桃仁:安徽亿源药业股份有限公司,经鉴定为蔷薇科植物——桃的种仁;硅胶板:烟台市芝罘化工厂;MCI-GEL凝胶柱填料:日本三菱化学公司;ODS硅胶柱填料:日本TOSOH公司;阿司匹林肠溶片:拜耳医药保健有限公司;肝素氯化钠、ADP:上海源叶生物技术有限公司;血栓素B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)试剂盒、6-酮-前列腺素F_{1 α} (6-keto prostaglandin F_{1 α} , 6-keto-PGF_{1 α})试剂盒:南京建成生物工程研究所;SPF级雄性SD大鼠:北京维通利华实验动物技术有限公司;其他试剂:国药集团化学试剂有限公司。

1.2 设备与仪器

隔膜泵:MP-201型,郑州长城科工贸有限公司;双层玻璃萃取罐:RAT-100型,无锡申科仪器有限公司;普利生聚集仪:LBY-NJ4A型,上海寰熙医疗器械有限公司;NMR:Avance 500 MHz型,德国Bruker公司。

1.3 方法

1.3.1 桃仁的提取与粗分离

参照刘铄菲等^[12]的方法,用粉碎机粉碎干桃仁,将10 kg桃仁粉料和体积分数70%乙醇按料液比1 kg:10 L加到双层玻璃萃取罐中,70℃水浴搅拌提取3 h,静置2 h,吸取上清液。滤渣按该提取方法再次提取,合并2次滤液减压浓缩至浸膏后得到桃仁醇提取物(267 g),于-20℃贮藏备用。桃仁经体积分数70%乙醇提取,滤渣按该方法加去离

子水再次进行提取,重复提取1次,过滤,将滤液减压浓缩至干燥,得到桃仁水提取物(519 g),于-20℃贮藏备用。

用去离子水将适量桃仁水提取物稀释至合适质量浓度后,通过MCI柱进行色谱分离,依次用水和体积分数为10%、30%、60%、90%的乙醇分别进行梯度洗脱,用薄层层析硅胶板展开并显色^[13],合并成分相同的洗脱液,分别获得水洗脱液、体积分数10%乙醇洗脱液、体积分数30%乙醇洗脱液、体积分数60%乙醇洗脱液4个组分,在减压条件下,将其干燥至干粉状态,-20℃冷冻保存。

1.3.2 桃仁粗组分抗血栓活性检测

将56只6周龄SPF级健康雄性SD大鼠(体质量200~220 g)适应性饲养7 d,随机分为7组,试验组分别为体积分数90%乙醇洗脱物经MCI水洗脱物组(A组)、体积分数10%乙醇洗脱物组(B组)、体积分数30%乙醇洗脱物组(C组)、体积分数60%乙醇洗脱物组(D组)以及桃仁醇提取物组(E组),按1.0 g/(kg·d)剂量灌胃,50 mg/(kg·d)阿司匹林作为阳性对照组,空白对照组则灌胃生理盐水,所有组别按1 mL/100 g(以大鼠体质量计)灌胃给药,连续灌胃1周。

1.3.3 桃仁粗组分对大鼠尾部出血时间的影响

在第6天给药30 min后,将大鼠放入固定器,用无菌手术剪在距尾尖约5 mm处剪断尾部尖端,用滤纸擦干第1滴血,将鼠尾放入37℃生理盐水中,开始计时,当尾部停止流血后,持续观察30 s,停止出血则记为出血时间,若再次出血则继续观察,超过15 min的以15 min记^[14]。

1.3.4 桃仁粗组分对右颈总动脉-左颈外静脉旁路血栓质量的影响

动静脉旁路血栓模型是有效模拟病态混合血栓的动物模型,通过手术干预动静脉,血小板被激活后聚集,并在手术丝线上形成血栓^[15]。最后一次给药前禁食12 h,给药30 min后采用腹腔注射将大鼠麻醉,固定于解剖板上,颈部脱毛后分别将颈部右侧总动脉和左侧外静脉分离。将2段10 cm的PE20聚乙烯导管和1段8 cm的PE50聚乙烯导管(内置1根5 cm的2-0型非吸收性外科缝线)组成1个套管。使用前先在套管腔内注入50 U/mL肝素氯化钠溶液,将其两端分别插入左颈外静脉和右颈总动脉^[11]。手术完成后,松开动脉止血夹,开放流

血 15 min 后终止流血,迅速抽出手术线,称取丝线质量即为血栓湿质量,再将其于 70 °C 烘干 2 h,称取丝线质量即为血栓干质量,按式(1)~(2)分别计算血栓湿质量抑制率和血栓干质量抑制率。

$$I_{RW}=[(M_{WC}-M_{WT})/M_{WT}]\times 100\% \quad (1)$$

式中:

I_{RW} ——血栓湿质量抑制率,%;

M_{WC} ——空白对照组血栓湿质量,g;

M_{WT} ——试验组血栓湿质量,g。

$$I_{RD}=[(M_{DC}-M_{DT})/M_{DT}]\times 100\% \quad (2)$$

式中:

I_{RD} ——血栓干质量抑制率,%;

M_{DC} ——空白对照组血栓干质量,g;

M_{DT} ——试验组血栓干质量,g。

1.3.5 桃仁粗组分对血清中血栓素 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 和前列环素 (prostacyclin, PGI_2) 水平的影响

TXA_2 是机体内一种较强的血管收缩因子,能诱导血小板活化和聚集,而 PGI_2 的释放会使血管扩张,阻碍血小板的活化和聚集作用,进而抑制血栓的形成。 TXA_2/PGI_2 的动态平衡对调控机体内血栓的形成具有十分重要的作用。血栓造模手术结束后,腹主动脉采血,于 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液得到血浆,于 -20 °C 保存备测。采血后血浆中的 TXA_2 和 PGI_2 极不稳定,会迅速产生稳定代谢物 TXB_2 和 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ [16]。因此通过测定血浆中 TXB_2 和 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ 的质量浓度来推断 TXA_2 和 PGI_2 的水平 [17-18],具体方法参照试剂盒的说明书进行。

1.3.6 桃仁粗组分的进一步分离与鉴定

根据试验结果,从 5 种桃仁粗组分中筛选出具有抗血栓活性的组分。将该组分溶解于适量去离子水,上样至 ODS-A 层析柱,以水-乙醇为流动相进行梯度洗脱,使用全自动收集器收集洗脱液。每隔 10 根试管点样 1 次,经过薄层板层析分离后,根据显色结果,合并成分相同的部分,得到 3 个不同的组分,记为 Sp-1(水洗脱物)、Sp-2(体积分数 15% 乙醇洗脱物)、Sp-3(体积分数 25% 乙醇洗脱物)。

将 Sp-1、Sp-2、Sp-3 分别反复上样至 ODS-A、ODS-D 层析柱进一步纯化,至薄层板无其他条带,得到单体化合物,分别用重水 (D_2O) 溶解,进行 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 测定。

1.3.7 单体化合物的体外抗血栓活性测定

用体积分数 10% 水合氯醛对雄性 SD 大鼠进行腹腔注射麻醉,用含体积分数 3.8% 柠檬酸钠(柠檬酸盐、血液体积比 1:9)的抗凝采血管于腹主动脉采血,轻轻颠倒混匀。800 r/min 离心 10 min,吸取上清液获得富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP),其余部分以 3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液获得贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。按比浊法 [19] 测定各单体化合物对 ADP 诱导的血小板聚集的抑制活性。每管加入 300 μ L PPP 作为标定,再加入 280 μ L PRP,样品组加入 10 μ L 样品配制液(50 μ mol/L),阳性对照组加入 10 μ L 阿司匹林溶液(50 μ mol/L) [20],空白对照组加入 10 μ L 生理盐水,37 °C 水浴 3 min,每管加入 10 μ L ADP 溶液,测定 300 s 内的聚集率变化。记录血小板聚集曲线,观察最大聚集率,按式(3)计算各组血小板聚集抑制率(aggregation inhibition rate, AIR)。

$$AIR=[(A_0-A_t)/A_0]\times 100\% \quad (3)$$

式中:

A_{IR} ——聚集抑制率,%;

A_0 ——空白对照组最大聚集率,%;

A_t ——样品组最大聚集率,%。

1.3.8 单体化合物的分子对接

用 ChemDraw 软件绘制单体化合物 1~5 的结构式,经 ChemDraw 3D 软件优化后得到配体 3D 结构。以血小板膜 $P2Y_1$ 受体和 $P2Y_{12}$ 受体为作用靶点 [21-22],利用 RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 检索并下载靶蛋白对应的蛋白质晶体结构。用 PyMOL 软件对关键作用靶点及蛋白质晶体进行前处理,用 AutoDock Tools 软件对单体化合物和作用蛋白质的 3D 结构进行加氢和加电荷,生成 pdbqt 文件作为配体及受体文件。用 AutoDock Vina 4.2.6 软件进行分子对接,根据 Genetic Algorithm 遗传算法寻找最优的结合构象,并得到配体和受体结合所需的最小结合能。分子对接中采用 AutoDock Tools 调整 $P2Y_1$ 受体和 $P2Y_{12}$ 受体的 Grid Box 的中心及尺寸大小,使受体分子的活性中心能完全包含在 Grid Box 中, $P2Y_1$ (4xnw) 中心坐标 $x=-10.27$ 、 $y=18.156$ 、 $z=-12.903$,Grid Box 的大小为 $x=104$ 、 $y=112$ 、 $z=78$; $P2Y_{12}$ (4py0) 中心坐标 $x=-17.366$ 、 $y=-9.33$ 、 $z=9.855$,Grid Box 的大小为 $x=98$ 、 $y=96$ 、 $z=94$ 。其他参数均

为默认值,计算5种化合物分别与P2Y₁受体和P2Y₁₂受体结合的最小结合能。

1.4 数据处理

采用SPSS 26.0对数据进行处理,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表达,用ANOVA进行组间比较, $P < 0.05$ 即表示有显著的统计学差别。

2 结果与讨论

2.1 桃仁粗组分的抗血栓活性

桃仁水提物经MCI柱层析得到的各组分对大鼠出血时间、血栓湿质量和干质量的影响见表1。与空白对照组相比,阳性对照组大鼠的出血时间显著延长,且在造模后形成的血栓质量显著降低($P < 0.01$),说明颈动脉旁路血栓大鼠

模型建立成功。B组能够显著延长出血时间,并且在造模后形成的血栓质量与空白对照组相比极显著降低($P < 0.01$)。

TXA₂和PGI₂在体内具有相互拮抗的作用^[23],桃仁粗组分对大鼠血清中TXB₂及6-keto-PGF_{1 α} 质量浓度的影响见表2。与空白对照组相比,阳性对照组能够极显著抑制TXB₂的合成($P < 0.01$),而B组能够极显著促进6-keto-PGF_{1 α} 的产生($P < 0.01$),从而降低TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} ,说明B组可以有效抑制血小板聚集,改善血管内皮细胞的损伤程度。其他组的TXB₂和6-keto-PGF_{1 α} 质量浓度与空白对照组相比并没有显著差异,说明桃仁中抑制血栓形成的活性成分存在于B组中。

表1 桃仁粗组分对大鼠出血时间及血栓质量的影响

Table 1 Effects of crude components of peach kernels on bleeding time and thrombus mass in rats

组别	出血时间/min	血栓湿质量/mg	血栓湿质量抑制率/%	血栓干质量/mg	血栓干质量抑制率/%
空白对照组	10.79±0.27	22.27±0.37		11.97±0.54	
阳性对照组	14.22±0.36**	14.44±0.65**	35.17	6.77±0.28**	43.40
A组	10.94±0.43	21.91±0.68	1.61	11.12±0.38	7.13
B组	13.69±0.60**	15.69±0.27**	29.56	7.38±0.28**	38.35
C组	10.00±0.73	21.46±0.63	3.63	11.93±0.38	0.30
D组	10.75±0.45	22.01±0.39	1.18	11.17±0.51	6.67
E组	9.90±0.54	21.60±0.81	3.00	10.77±0.36	10.00

注:“**”代表与空白对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

表2 桃仁粗组分对血浆中TXB₂及6-keto-PGF_{1 α} 质量浓度的影响

Table 2 Effects of crude components of peach kernels on mass concentrations of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1 α} in plasma

组别	TXB ₂ 质量浓度/(ng/L)	6-keto-PGF _{1α} 质量浓度/(ng/L)	TXB ₂ /6-keto-PGF _{1α}
空白对照组	250.74±2.16	125.84±0.99	1.99±0.02
阳性对照组	212.35±2.09**	121.60±2.03	1.75±0.04**
A组	253.09±1.85	124.72±1.90	2.03±0.04
B组	248.38±2.64	151.18±2.66**	1.65±0.03**
C组	252.73±3.09	122.69±1.73	2.06±0.04
D组	251.30±2.75	121.39±1.44	2.07±0.04
E组	254.43±2.92	127.07±1.81	2.01±0.04

注:“**”代表与空白对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 活性组分的进一步分离结果

根据2.1的动物试验结果,从5种桃仁粗组分中筛选出具有抗血栓活性的部分,将该部分进一步分离后得到Sp-1、Sp-2、Sp-3,将这3个组分经

ODS-A层析柱和ODS-D层析柱进一步纯化,从Sp-1中得到单体化合物1,Sp-2中得到单体化合物2、3,Sp-3中得到单体化合物4、5。

2.3 抗血栓化合物的结构鉴定

化合物1为淡黄色粉末,溶于水,易溶于甲醇、乙醇。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.41~7.46共有5个H信号,表明化合物为单取代苯; δ 5.35(1H, d, $J=2.0$ Hz),这个H为糖的端基H; δ 3.31~3.88主要为糖上H信号,推测有1个糖基存在。¹³C-NMR谱显示14个碳信号, δ 178.50为羧基碳, δ 137.69、 δ 132.32、 δ 131.80、 δ 131.72、 δ 130.95、 δ 130.42为苯环碳信号, δ 101.45为葡萄糖端基碳信号, δ 78.68、 δ 78.10、 δ 75.57、 δ 72.26、 δ 63.27为葡萄糖的其余碳信号, δ 81.14为一个连氧的CH碳信号。端基碳信号和氢信号的耦合常数表明葡萄糖为 α 构型。根据以上分析并结合文献[24],鉴定该化合物为扁桃酸- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物2为淡黄色无定形粉末,溶于水,易溶于甲醇、乙醇。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.34~7.43 共有4个H信号,表明化合物为单取代苯; δ 5.21(1H, d, $J=6.0$ Hz)、 δ 4.59(1H, d, $J=8.0$ Hz),这2个H应为糖的端基H, δ 3.20~4.23主要为糖上H信号,根据氢信号积分推测可能存在2个糖基。¹³C-NMR谱显示18个碳信号, δ 180.28为羧基信号, δ 140.68、 δ 139.24、 δ 131.65、 δ 131.52、 δ 130.84、 δ 130.35为苯环碳信号,对比135DEPT谱,可以识别出 δ 140.68、 δ 139.24为季碳,表明苯环为双取代。 δ 104.57和 δ 101.19为2个糖端基碳信号,但只有一个 δ 63.27的C-6信号,因此判断另一个糖的C-6位形成葡萄糖酸。根据以上分析并结合文献[25],鉴定该化合物为1- β -D-葡萄糖苷亚苯基-2- β -D-葡萄糖苷酸。

化合物3为白色无定形粉末,溶于水,易溶于甲醇、乙醇。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆)显示 δ 7.60(1H, d, $J=8.0$ Hz)、 δ 7.39(1H, d, $J=8.0$ Hz)、 δ 7.16(1H, s)、 δ 7.13(1H, t, $J=7.5$ Hz)、 δ 7.05(1H, t, $J=7.5$ Hz)、 δ 3.85(1H, s)、 δ 3.32(1H, dd, $J=10.0$ 、1.5 Hz)、 δ 3.12(1H, dd, $J=10.0$ 、1.5 Hz)。¹³C-NMR谱显示有12个碳信号, δ 184.29为羧基碳, δ 139.02、 δ 129.40、 δ 127.66、 δ 124.80、 δ 122.13、 δ 121.19、 δ 114.64、 δ 110.49为吡啶基上的碳信号, δ 57.86为一个叔碳信号, δ 25.99为一个甲基碳信号。结合文献[26],鉴定该化合物为3-(3-吡啶基)丁酸。

化合物4为白色无定形粉末,溶于水,易溶于甲醇、乙醇。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆)显示 δ 3.03(1H, m, $J=6.0$ Hz)、 δ 1.19(1H, d, $J=6.0$ Hz),¹³C-NMR谱共显示3个碳信号, δ 184.90为羧基碳, δ 71.14连氧叔碳信号, δ 22.70为伯碳信号。按照碳的化学位移可以得出为 α -羟基丙酸。

化合物5为白色无定形粉末,溶于水,易溶于甲醇、乙醇。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.38~7.47 共有5个H信号表明化合物为单取代苯。¹³C-NMR谱显示有8个碳信号, δ 179.50为羧基碳, δ 139.81、 δ 131.11、 δ 130.09、 δ 129.43、 δ 128.95、 δ 127.52为苯环碳信号。对比DEPT-135谱,可以识别出 δ 139.81、 δ 73.95为季碳,判断苯环为单取代。根据以上分析并结合文献[27],鉴定该化合物为dl-扁桃酸。化合物1~5的结构见图1。

2.4 体外抗血小板聚集活性

如表3所示,与空白对照组相比,阳性对照组

对ADP诱导的血小板聚集有极显著的抑制作用($P<0.01$),最大聚集率达到 $(16.36\pm 0.48)\%$,AIR达到58.49%,说明该试验方法可行。化合物1、2均能显著抑制因ADP诱导所引起的血小板聚集($P<0.05$),其最大聚集率分别为 $(28.11\pm 0.90)\%$ 、 $(26.22\pm 1.15)\%$,AIR分别为28.67%、33.48%。化合物5有极显著的抑制作用($P<0.01$),最大聚集率为 $(20.23\pm 0.55)\%$,聚集抑制率达到48.67%。结果表明,化合物1、2、5为桃仁水提物中主要的具有抗血栓功效的活性成分。

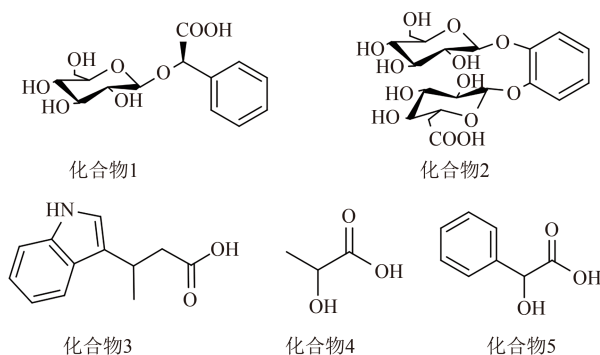


图1 1~5单体化合物的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of monomer compounds 1~5

表3 单体化合物对ADP诱导的血小板聚集的影响

Table 3 Effects of monomer compounds on platelet aggregation induced by ADP

组别	最大聚集率/%	AIR/%
空白对照组	39.41±0.79	
阳性对照组	16.36±0.48**	58.49
化合物1	28.11±0.90*	28.67
化合物2	26.22±1.15*	33.48
化合物3	38.01±0.49	3.56
化合物4	35.39±0.61	10.20
化合物5	20.23±0.55**	48.67

注:“*”代表与空白对照组相比差异显著($P<0.05$);“**”代表与空白对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

2.5 单体化合物的对接结果

在分子对接试验中,以5种化合物为配体,以2种血小板膜上的P2Y₁和P2Y₁₂为受体,结合所需的最低结合能,Autodock模拟对接后的最低结合能见表6。5种单体化合物与P2Y₁受体进行分子对接时,化合物1、5结合能较低,分别为-15.52、-17.57 kJ/mol,且对接位点与受体蛋白自带配体重合,存在竞争性抑制。5种单体化合物与P2Y₁₂受

体进行分子对接时,化合物1、2、5所需结合能较低,分别为-18.49、-19.41、-20.25 kJ/mol,且对接位点处于结合位点外围,能有效阻止其他配体进入活性中心,抑制了P2Y₁₂受体的血小板活性。这些

结果表明,化合物1、5在通过抑制P2Y₁受体的活性来阻碍血小板活化聚集方面有较大潜力;化合物1、2、5在通过抑制P2Y₁₂受体的活性来抑制血小板活化聚集方面有较大潜力。

表6 分子对接结果

Table 6 Molecular docking results

靶点	蛋白质结构数据库检索号	结合能(kJ/mol)				
		化合物1	化合物2	化合物3	化合物4	化合物5
P2Y ₁ 受体	4XNW	-15.52	-12.34	-8.83	-6.90	-17.57
P2Y ₁₂ 受体	4PY0	-18.49	-19.41	-11.51	-7.74	-20.25

3 结论

分别用体积分数70%乙醇和去离子水提取桃仁,提取物经MCI柱层析分离,并经大鼠右颈总动脉-左颈外静脉旁路血栓模型检测,发现体积分数10%的乙醇洗脱组分具有抗血栓活性,用ODS柱从该洗脱组分分离得到5个单体化合物,分别为扁桃酸- β -D-吡喃葡萄糖苷、1- β -D-葡萄糖苷亚苯基-2- β -D-葡萄糖苷酸、3-(3-吡啶基)丁酸、 α -羟基丙酸、*dl*-扁桃酸。经体外抑制血小板聚集试验,得出扁桃酸- β -D-吡喃葡萄糖苷、1- β -D-葡萄糖苷亚苯基-2- β -D-葡萄糖苷酸、*dl*-扁桃酸对ADP诱导的血小板聚集均有显著抑制作用($P<0.05$),具有较好的抑制血栓形成的作用,其中*dl*-扁桃酸的抑制作用最强($P<0.01$),抑制率达到48.67%。桃仁水提取物、乙酸乙酯提取物有较强的抗血栓作用,但具体是何种化合物在起作用还未明确。该研究确认了*dl*-扁桃酸是桃仁中具有抑制血栓形成活性的主要成分。

参考文献

- [1] 杨丽,陈建强. 中药桃仁的研究综述[J]. 中国药物经济学,2020,15(5):118-121.
YANG L, CHEN J Q. A review on traditional Chinese medicine of *Semen persicae* [J]. China Journal of Pharmaceutical Economics,2020,15(5):118-121.(in Chinese)
- [2] YANG N Y, LIU L, TAO W W, et al. Antithrombotic lipids from *Semen persicae*[J]. Natural Product Research, 2011,25(17):1650-1656.
- [3] 金松今,张红英,朴惠顺,等. 桃仁乙醇提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 延边大学医学学报, 2010,33(2):98-99.
JIN S J, ZHANG H Y, PIAO H S, et al. Effects of ethanol extract of the *Semen persicae* for bleeding time and coagulation time in mice[J]. Journal of Medical Science Yanbian University,2010,33(2):98-99.(in Chinese)

- [4] 王敬静,任明. 基于中医传承辅助系统的糖尿病周围神经病变用药规律分析[J]. 湖南中医杂志,2018,34(8):153-155.
WANG J J, REN M. Analysis of medication regularity of diabetic peripheral neuropathy based on traditional Chinese medicine inheritance and auxiliary system [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine,2018,34(8):153-155.(in Chinese)
- [5] 刘庆增. 桃仁水溶性成分的药理作用[J]. 中成药研究, 1987,9(8):47.
LIU Q Z. Pharmacological action of water-soluble components of peach kernel [J]. Chinese Traditional Patent Medicine,1987,9(8):47.(in Chinese)
- [6] CASSIEM W, KOCK M. The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells *in vitro* [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine,2019,19(1):32.
- [7] HAO E W, PANG G F, DU Z C, et al. Peach kernel oil downregulates expression of tissue factor and reduces atherosclerosis in *ApoE* knockout mice[J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20(2):405.
- [8] XI S Y, QIAN L C, TONG H Y, et al. Toxicity and clinical reasonable application of Taoren (*Semen persicae*) based on ancient and modern literature research [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine,2013,33(2):272-279.
- [9] 张妍妍,韦建华,卢澄生,等. 桃仁化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊,2022,40(1):234-241.
ZHANG Y Y, WEI J H, LU C S, et al. Chemical components and pharmacological action for Taoren(*Semen persicae*) and predictive analysis on Q-marker [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2022,40(1):234-241.(in Chinese)
- [10] 达热卓玛,饶剑,徐德平. 油菜蜂花粉中抗前列腺增生的活性成分[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(1):38-43.
DARE Z M, RAO J, XU D P. Anti-prostatic hyperplasia activity and ingredient of rape bee pollen[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2018,37(1):38-43.(in

- Chinese)
- [11] 杜玉波,郝立娟,刘秀丽,等. 天麻熄风口服液对大鼠右颈总动脉-左颈外静脉旁路血栓形成的影响[J]. 河北中医,2012,34(8):1224-1225.
- DU Y B, HAO L J, LIU X L, et al. Research of Tianmaxifeng oral liquid on thrombosis formation of the rat carotid artery-the left carotid vein bypass[J]. Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 34(8): 1224-1225. (in Chinese)
- [12] 刘钰菲,唐年初,徐德平. 牛膝多糖降血糖活性成分的分离鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(7):104-111.
- LIU S F, TANG N C, XU D P. Isolation and identification of hypoglycemic polysaccharide from *Achyranthes bidentata* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(7): 104-111. (in Chinese)
- [13] 冯蒙蒙,王海鸣,杨惠成,等. 灵芝孢子粉多糖的分离纯化、结构表征及免疫活性初探[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(5):502-508.
- FENG M M, WANG H M, YANG H C, et al. Purification, structural characterigation and immunological activity of polysaccharides from the spores of *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(5): 502-508. (in Chinese)
- [14] 林晓坚,袁兆伟,潘彩燕,等. 红景天苷对小鼠抗血小板活性和抗血栓作用[J]. 贵州医科大学学报,2019,44(9):1039-1043,1048.
- LIN X J, YUAN Z W, PAN C Y, et al. Experimental study on antithrombotic effect of salidroside [J]. Journal of Guizhou Medical University, 2019, 44(9): 1039-1043, 1048. (in Chinese)
- [15] PRANDONI P, BILORA F, MARCHIORI A, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis [J]. New England Journal of Medicine, 2003, 348(15): 1435-1441.
- [16] 曹红翠,杨云梅,陈晓明,等. 短暂性脑缺血发作患者血小板活化因子与血栓烷B₂检测及临床意义[J]. 中华急诊医学杂志,2004,13(1):39-40,76.
- CAO H C, YANG Y M, CHEN X M, et al. The changes and clinical significance of plasma PAF and TXB₂ in patients with TIA [J]. Journal of Emergency Medicine, 2004, 13(1): 39-40, 76. (in Chinese)
- [17] DOGNÉ J M, LEVAL X, HANSON J, et al. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part I: thromboxane modulators [J]. Current Medicinal Chemistry, 2004, 11(10): 1223-1241.
- [18] SON E, KIM S H, YANG W K, et al. Antiplatelet mechanism of an herbal mixture prepared from the extracts of *Phyllostachys pubescens* leaves and *Prunus mume* fruits [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 541
- [19] 黄伟军,胡敏华,李家明,等. 基于抗血小板聚集的新型吡考他胺类似物的合成及其活性研究[J]. 化学试剂,2014,36(7):599-602.
- HUANG W J, HU M H, LI J M, et al. Synthesis of picotamide analogues and the inhibitory effect on platelet aggregation [J]. Chemical Reagents, 2014, 36(7): 599-602. (in Chinese)
- [20] 崔恩静,王宏伟,李家明,等. 黄嘌呤衍生物的设计、合成及抗血小板聚集与神经保护活性研究[J]. 化学试剂,2023,45(8):57-64.
- CUI E J, WANG H W, LI J M, et al. Design, synthesis and anti-platelet aggregation and neuroprotection activities study of xanthine derivatives [J]. Chemical Reagents, 2023, 45(8): 57-64. (in Chinese)
- [21] GREMMEL T, YANACHKOV I B, YANACHKOVA M I, et al. Synergistic inhibition of both P2Y₁ and P2Y₁₂ adenosine diphosphate receptors as novel approach to rapidly attenuate platelet-mediated thrombosis [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2016, 36(3): 501-509.
- [22] VADUGANATHAN M, BHATT D L. Simultaneous platelet P2Y₁₂ and P2Y₁ ADP receptor blockade: are two better than one? [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2016, 36(3): 427-428.
- [23] QIU H H, ZHANG L, ZHU M M, et al. Capture of anticoagulant active ingredients from *Moutan* cortex by platelet immobilized chromatography and evaluation of anticoagulant activity in rats [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95: 235-244.
- [24] FUKUDA T, ITO H, YOSHIDA T. Glycosides and their quantitative HPLC analysis of commercial *Semen persicae* [J], Natural Medicines, 2003, 57(1): 18-22.
- [25] HAKK H, LARSEN G, FEIL V. Tissue distribution, excretion, and metabolism of 1, 2, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat [J]. Chemosphere, 2001, 42(8): 975-983.
- [26] MATSUDA K, TOYODA H, NISHIO H, et al. Control of the bacterial wilt of tomato plants by a derivative of 3-indolepropionic acid based on selective actions on *Ralstonia solanacearum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 4416-4419.
- [27] 陈晓燕. 桃仁、桑叶化学成分及生物活性研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.

(责任编辑:闫林红)