DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.019
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1841-04

论著

一种促凝血草药有效部位的初步确定及其凝血试验的研究

王秀琴,伍素华,苏踊跃,罗向东 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 本研究介绍了一种促凝血草药萃取物成分的提取、分离、薄层分析及紫外光谱含量测定,并进行了体外、创面凝血试验的研究,以确定其止血有效部位。方法 采用水提法得到初提物,经丙酮-水(1∶1)冷浸去掉部分杂质;氯仿萃取、硅胶G柱层析得到更纯的提取物。应用薄层层析(thin layer chromatography, TLC)法对萃取物所含成分进行鞣质类、黄酮类、生物碱、有机酸、氨基酸、挥发油进行初步分离、鉴定和分析。以日本纯系大耳白兔、Wistar大鼠为研究对象,进行体外及创面(皮肤、肝脏、股动脉)止血试验。结果 草药萃取物以鞣质类成分为主,并含有少量有机酸及微量生物碱成分;鞣质含量(70.43%)较高;其使兔体外凝血时间显著短于阳性对照组及空白对照组($P<0.001$);使大鼠创面止血时间显著短于阳性对照组(云南白药组)及阴性对照组(生理盐水组)$P<0.001$。结论 TLC法初步分离、鉴定出该草药萃取物,含有丰富的鞣质类成分、极少量有机酸及微量生物碱成分;氯仿萃取物有良好的体外促凝血及创面止血作用,是草药的止血有效部位。

关键词:促凝血草药;萃取物;TLC法;有效部位;成分;凝血试验
中图法分类号:R282.71;R284.2;R973.1 文献标识码:A

Preliminary definition of the effective fraction of a herb and its procoagulant activity

WANG Xiu-qin, WU Su-hua, SU Yong-yue, LUO Xiang-dong (State Key laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective The purpose of this study was to report the isolation, extraction, analysis of its effective fraction and the investigation of its blood coagulant activity *in vitro* and in local wound surface. Methods Part of the impurities were removed from the initial water extract by infusion extraction method in acetone-water (1∶1) solution. The advanced purification was achieved by chloroform extraction and silicagel column chromatography. Thin layer chromatography (TLC) was employed to determine the constituents of tannins, chromocors, alkaloids, organic acids, amino acids, and volatile oils in the extract. The study on the hemostatic property of the extract was conducted in wound surfaces (skin, liver, and femoral artery) in Wistar rats and in the blood of rabbits *in vitro*. Results The extract was mainly composed of tannins (70.34%) as well as a small quantity of organic acids and trace alkaloids. The clotting time was obviously shortened as compared with that of the positive control (*Yunnan Baiyao* group) and saline group ($P<0.001$). Conclusion The extract, determined by TLC, contained mainly tannins (70.43%), a little organic acid and trace alkaloid. Chloroform extract may have procoagulant effect *in vitro* and roles in wound hemostasis in our experiments. In addition, the chloroform extract is the effective fraction of this herb.

Key words: procoagulant herb; extract; TLC technique; effective fraction; component; coagulation test

能促进血液凝固而使出血停止的药物,称为止血药。是临床应用范围广泛的药物之一,在(战)创伤中也有重要的应用价值。它主要通过增强体内凝血因素或抑制抗凝血因素,促使凝血,以达到止血目的。止血中药具有收敛、凝固、凉血等作用,用以治疗咯血、衄血、咳血、便血、尿血及崩漏等出血症,并用于创伤性出血[1,2]。目前用中草药生药进行实验研究的比较多,用有效部位进行的实验研究比较少见。本研究对一种促凝血草药进行提取、分离及成分薄层分析、用UV进行含量测定,结合凝血试验确定其止血有效部位。

薄层层析是一种简便、快速、准确、灵敏度高、微量的定性定量分析方法[3]。广泛应用于有机化合物的分

作者简介:王秀琴(1970-),女,河北承德市人,硕士研究生,主管护师,主要从事生物敷料止血方面的研究。电话:(023)68754149-8082
通信作者:罗向东,E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-07-05;修回日期:2004-09-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

析鉴定、中草药有效部位的分离提纯、有机合成、结构分析、生物测定等，尤其在研究开发中草药有效部位和中成药质量控制中，是用于定性、定量分析的最简便的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Wistar 大鼠 30 只，体质量 300～350 g，雌雄兼用；日本纯系大耳白兔，体质量 2.5～3 kg。由本校实验动物中心提供。

1.1.2 药物 促凝草药采自云贵高原民间草药；云南白药，云南省大理制药厂生产，批号 960510；鞣质标准对照品均购自中国药品生物制品检定所。

1.1.3 主要试剂与仪器 旋转蒸发仪（日本进口），紫外荧光灯（上海光学仪器厂），UV-754 紫外-可见分光光度计（日本岛津），硅胶 G（由青岛海洋化工厂出品）；正丁醇、醋酸、甲酸已酯、甲酸、丙酮、氯仿均为分析纯，由本院试剂中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 草药初提物的制备[4,5] 100 g 粗粉用 1 500 ml 去离子水于室温下浸泡 4～6 h，煎煮 3 次，每次为 1.5 h，过滤，取上清；残渣弃掉；合并 3 次滤液，离心（8 000 r/min，30 min，25 ℃），取上清；旋转蒸发浓缩至糊状约 100 ml，测其 pH 值为 5.78；加 4 倍量体积 95% 乙醇搅拌均匀，密闭静置过夜；离心弃掉沉淀，取上清，滴加 40% NaOH 溶液调至 pH 值为 8，搅拌均匀，0 ℃～4 ℃ 冷藏 4 h，旋转蒸发仪浓缩成 200 ml，蒸发去掉乙醇至无醇味，水溶液置 0 ℃～4 ℃冷藏 24 h；经 Sigma 低温离心机离心（3 000 r/min，20 min，4 ℃），得沉淀，冷冻抽干得棕褐色片状物，用研钵研碎即得草药粗提物。

1.2.2 萃取物的制备[6] 取粗提物，分别用丙酮-水（1∶1）200、150、150 ml 冷浸 24、24、24 h 过滤，合并滤液，滤液减压回收丙酮后，放置过滤，沉淀弃去。滤液用氯仿少量多次萃取，水相静置、过滤、离心，得沉淀，硅胶柱层析，10% 的醋酸洗脱，取结晶物，即得更纯的萃取物。

1.2.3 萃取物成分的薄层分析[6,7]

1.2.3.1 层析条件 ①薄层板的制备：吸附剂用硅胶 G-羧甲基纤维素钠铺板，105 ℃活化 120 min。②点样：用毛细玻管吸取样品液在薄层板上点样，距板下端底边不得少于 2.5 cm 或 3.0 cm 处点样，间距不少于 1 cm，板两边空出的距离最好不少于 1.5 cm。③展开方式及展距：直立上行，展开 10 cm。④点样浓度为 0.5%。

1.2.3.2 样品处理及对照液的配制 样品液的制备：称取萃取物 10 mg 加 50% 丙酮 2 ml 溶解，摇匀，即得。鞣质对照品液的制备：取鞣质对照品 10 mg 加 50% 丙酮 2 ml 溶解，摇匀，即得。

1.2.3.3 萃取物中鞣质成分 TLC 比较[10,11] 照薄层色谱法[9] 试验，用内径为 2 mm 毛细玻管取样品液、鞣质对照品液点于同一硅胶 G 薄层板上，以甲酸已酯：甲酸：水（8∶1∶1）为展开剂展开，取出，晾干，用氯化铁-铁氰化钾显色剂喷雾，待挥干后，样品液及鞣质对照品液显示蓝黑色斑点；有效部位显示 Rf 值分别为 0.18 和 0.32 两个主要斑点，说明鞣质含量很高，鞣质对照品显示一个斑点，*Rf* 值为 0.32。

1.2.3.4 萃取物中生物碱类成分 TLC 比较[9～11] 以鞣质对照液作为参考，毛细玻管吸取点板，以正丁醇∶醋酸∶水（4∶1∶5）为展开剂，展开，取出，晾干，喷碘—碘化钾试剂，待挥干后，于紫外灯下（365 nm）观察。结果显示，样品液及鞣质对照品液无斑点及颜色变化，样品液仅隐约出现大约 1 cm 淡黄色条带，Rf 值为 0.05 说明样品液含有微量的生物碱成分。

1.2.3.5 萃取物中黄酮类成分 TLC 比较[9,10] 以甲酸已酯∶甲酸∶水（8∶1∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷 1% 三氯化铝乙醇试剂，待挥干后，于紫外灯下（365 nm）观察。结果显示，样品液及鞣质对照品液无出现条带、斑点及颜色变化，说明二者均不含黄酮类成分。

1.2.3.6 萃取物中有机酸类成分 TLC 比较[9,10] 以甲酸已酯∶甲酸∶水（8∶1∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷溴酚蓝试剂，待挥干后，于紫外灯下（365 nm）观察。结果显示，样品液及鞣质对照液均含有相同的有机酸，且斑点极小，说明含量较少。

1.2.3.7 萃取物中氨基酸类成分 TLC 比较[9,10] 以甲酸已酯∶甲酸∶水（8∶1∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷茚三酮试剂，高温下烘干后，于紫外灯下（365 nm）观察。结果显示，样品液及鞣质对照液均无条带、斑点及颜色的变化，说明二者均不含有氨基酸。

1.2.3.8 萃取物中挥发油类成分 TLC 比较[9,10] 分别以氯仿∶乙酸乙酯（2∶1）、氯仿∶乙酸乙酯（7∶2）、氯仿为展开剂，展开，取出，晾干，喷茴香醛-浓硫酸试剂，烘干后，于紫外灯下（365 nm）观察。结果显示，样品液及鞣质对照液均无条带、斑点及颜色的变化，说明二者均不含有挥发油。

1.2.4 紫外分光度法测定鞣质含量 以上试验结果表明：草药氯仿萃取物的主要成分为鞣质，为此对其进行鞣质含量测定。

1.2.4.1 标准曲线的绘制：鞣质标准品溶液用型 UV-754 紫外分光光度计在于 200～1 000 nm 进行扫描，在于 267 nm 处有最大吸收峰，即 $\lambda max = 267$ nm，见图 1。

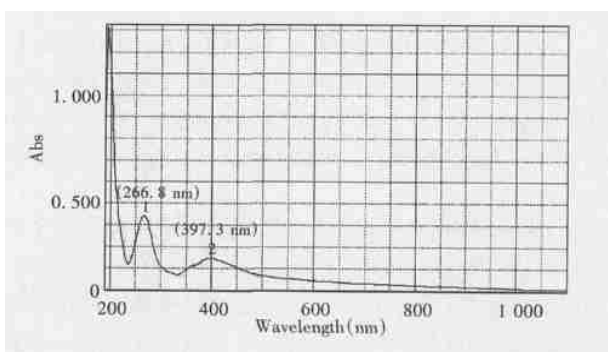


图 1 标准品的吸收峰

Fig 1 Absorption cusp of the standard

1.2.4.2 线性方程 精取对照品溶液（5 mg/ml）0、20、40、60、80、100 μl 分别置于 6 个 10 ml 容量瓶中，再加 0.1% $FeCl_3$

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 ml, 在 λ＝267 nm 测定吸光度分别为 0、0.131、0.256、0.414、0.533、0.642, 以吸光度为横坐标, 浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 其线性方程为 Y＝763.39X－1.411, R^2＝0.9976, 其线性关系良好, 见图 2。

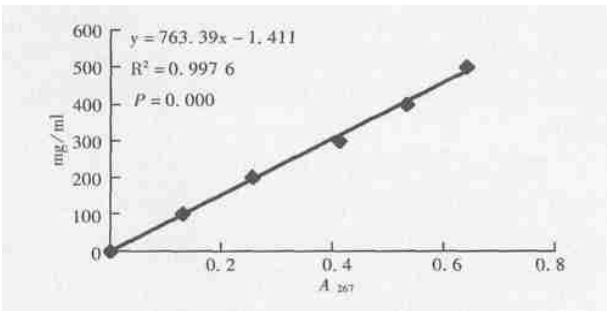


图 2　标准品标准曲线

Fig 2　Standard curve of the standard

1.2.4.3　稳定性实验　　溶液放置 24 h 后进行 754 μV 扫描, 其峰形、峰位和吸光度与第 1 次曲线完全吻合。表明浓度无变化, 稳定性良好。

1.2.4.4　萃取物的吸光度　　精取 40 μl 样品液＋0.1% $FeCl_3$ 4 ml, $FeCl_3$显色后, 经 UV-754 紫外分光光度计扫描, 在 λ＝267 nm 可作为检测之用。λ＝267 nm, 比色 10 次, 取其平均值, 样品的吸光度为 0.189±0.011。

1.2.4.5　鞣质含量为　　吸光度代入上面线性方程:

Y＝763.39X－1.411＝763.39×0.189－1.411＝142.8697/200＝70.43%。

1.2.5　体外凝血实验的观察

1.2.5.1　抗凝血液的制备　　用一次性真空枸橼酸钠(9∶1)抗凝管(血与抗凝剂按 9∶1)自兔子耳缘静脉抽血, 轻轻混匀即成。

1.2.5.2　抗凝血浆的制备　　抗凝血液经离心机离心制备, 分离血浆时要求相对离心力 3 000 r/min, 15 ℃, 离心 30 min。

1.2.5.3　将萃取物、云南白药粉剂溶于生理盐水, 配制成 0.5%浓度, 经一次性进口滤器抽滤成不同色泽, 清亮的提取液, 用此溶液进行凝血时间(凝血板法, 试管法、凝血酶原时间、血浆复钙时间)的测定。以云南白药为阳性对照, 并设空白对照。

1.2.6　局部创面止血试验　　健康 Wistar 大鼠 30 只, 体质量为 300~350 g, 雌雄各半, 用 1%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。待试药设萃取物用药组、云南白药阳性对照组、生理盐水阴性对照组。药液的配制: 将氯仿萃取物、云南白药用生理盐水溶解配成 2%浓度; 敷料的制备: 体表创面止血用 2 cm×2 cm 浸有药液纱布两层; 肝脏创面止血用 1.5 cm×1.5 cm 浸有药液纱布两层; 股动脉切开止血用 2 cm×2 cm 浸有药液纱布四层。

1.2.6.1　体表创面止血　　大鼠 10 只, 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg腹腔注射麻醉后, 备皮在无菌条件下, 在大鼠背部左右两侧制造 1.5 cm×1.5 cm 大小的出血创面, 分别在出血创面平铺萃取物纱布、云南白药纱布、生理盐水纱布, 约 30 s 左右揭开纱布观察出血情况, 以后每隔 30 s 观察 1 次, 观察指标以不出血为止, 记录止血时间, 观察止血效果, 计算其平均止血时间。

1.2.6.2　肝脏创面止血　　大鼠 10 只, 备皮、麻醉后, 无菌下开腹, 暴露肝脏, 并在肝表面切开长 1 cm×0.5 cm, 深 3 mm 大小肝组织, 造成出血创面, 擦去喷出的血液后, 分别平放 1.5 cm×1.5 cm 萃取物纱布、云南白药纱布、生理盐水纱布, 约 30 s 揭开纱布观察出血情况, 以后每隔 30 s 观察 1 次, 观察指标以不出血为止, 记录止血时间, 观察止血效果, 计算其平均止血时间。

1.2.6.3　股动脉切开试验　　动物麻醉后, 钝性分离暴露股动脉, 横剪血管周径 1/3 左右切口, 擦去喷出的血后, 立即在局部分别放置 2 cm×2 cm 萃取物纱布, 稍加压, 约 1 min 揭开纱布观察出血情况, 以后每隔 30 s 观察 1 次, 观察指标以不出血为止, 记录止血时间, 观察止血效果, 计算其平均止血时间。每次测试后, 用 37 ℃生理盐水洗去残留药物, 使切口重新出血, 再测下一种药物。

1.3　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行多因素方差分析, 相关分析。

2　结果

2.1　薄层分析

薄层分析表明: 该草药氯仿萃取物仍是多种成分的化合物, 初步确定主要成分为鞣质类、极少量有机酸及微量生物碱成分; 用紫外分光度法测其鞣质含量为 70.43%。

2.2　体外凝血实验的观察

萃取物、云南白药均有促凝血作用, 但该草药的萃取物的凝血时间明显短于空白对照组及云南白药阳性对照组($P<0.001$), 且凝血时间缩短率也明显低于空白对照组的 30%以上, 凝血时间缩短率: ＝对照组血凝时间-给药组血凝时间/对照组血凝时间×100%。一般以药物凝血时间比空白对照组缩短 30%以上者认为有效。可见该草药的萃取物有明显的体外促凝作用, 结果见表 1。

表 1　萃取物对兔体外凝血时间的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of chloroform extract on coagulation time in rabbits ($\bar{x}\pm s$)

Group	Coagulation method (s)	Tube method (s)	Prothrombin time (s)	Recalfication time (s)	Shortened time rate (%)
Blank	270.01±9.83	302.12±8.60	20.00±4.88	230.24±1.83	—
Yunnan Baiyao	278.14±12.13	290.32±8.68	—	—	3.97
Extraction	80.09±8.59**	88.23±8.62**	4.50±1.29**	50.06±4.08**	70.86

After the processing of data with Ln(X＋0.5): F_G＝907.649, P＝0.000; F_m＝9.514, P＝0.006; F_G＝410.928, P＝0.000; F_m＝1067.074, P＝0.000; **: $P<0.001$, *vs* blank

2.3　创面止血试验

萃取物组皮肤、肝脏创面及股动脉切开止血时间明显短于云南白药阳性对照组及生理盐水阴性对照组($P<0.001$)。萃取物有良好的创面止血作用, 结果见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 萃取物对大鼠局部创面的止血作用（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Hemostatic effect of the extract on local wound surface in rats（$\bar{x}\pm s$）

Incision	n	Hemostatic time(s)		
		Extraction	Yunnan Baiyao	Saline
Skin	10	41.20±6.21	74.80±4.73 **	84.10±5.32 **
Liver	10	50.20±3.39	74.50±5.19 **	87.60±6.24 **
Femora artery	10	62.60±4.50	98.20±6.07 **	103.6±4.35 **

F_t= 498.911, P= 0.000; F_l= 144.118 P= 0.000; **: P= 0.000 *vs* extraction

经兔体外凝血实验及大鼠创面止血试验表明氯仿萃取物是该草药止血有效部位。

3 讨论

“有效成分”：是指化学上的单体化合物能用分子式和结构式表示并具有一定的物理常数。“有效部位”：如果经纯度检查得到的是一个混合物，即使在药理和临床上有效能够代表或部分代表原来中草药的疗效，仍然称它为“有效部位”。只有在有效部位的基础上通过各种方法进一步分离纯化才能得到所需要的“有效成分”，即单体化合物[3]。

该草药水提物制备中，加高浓度乙醇可沉淀水提取物中的树脂、蛋白质等共存物质，调节 pH 值至 8 是为了增加酚类物质的溶解度；0 ℃~4 ℃冷藏可沉淀除去脂溶性物质。对其水提物采用丙酮溶解去掉部分杂质及（氯仿—水）液—液两相溶剂萃取，得到较纯的萃取物。又对其萃取物进行硅胶 G 柱层析，得到更纯的提取物。

薄层层析是一种简便、快速、微量的层析方法。薄层层析法在中草药化学成分的研究中，主要应用于化学成分的预试、化学成分的鉴定及探索柱层分离的条件。薄层层析对天然产物的分离、鉴定更有独到之处。用 TLC 分析萃取液，分别用鞣质、生物碱、有机酸、挥发油、氨基酸检测试剂显色，结果显示：用氯化铁-铁氰化钾显色，于 *Rf* 0.18 和 0.32 处，有蓝黑色斑出现，萃取物中可能存在鞣质；用碘—碘化钾试剂显色，增加 *Rf* 0.05 的荧光色带，可能存在生物碱；用 1%三氯化铝乙醇试剂显色，无荧光色斑出现，可能不含黄酮类；用喷溴酚蓝试剂显色，有与鞣质样品类似的小的荧光色斑点出现，可能含有微量有机酸；用茚三酮显色，无荧光色斑点出现，可能不含氨基酸；用茴香醛-浓硫酸试剂显色，无荧光斑点出现，可能不含挥发油。在初步确定主要成分为鞣质的基础上，用鞣质标准品作标准曲线，用 λmax= 267 nm 测定紫外吸光度，以同样条件测定样品的吸光度为 A= 0.189±0.011，计算其鞣质含量为 70.43%。

萃取物中主要成分与鞣质标准对照品 *Rf* 值（0.32）相同，颜色为蓝黑色，说明鞣质含量（70.43%）很高，说明萃取物有效部位中有 2/3 成分为鞣质，有不到 1/3 的成分为其它混合物，有待进一步分离提取及研究。

鞣质为广泛存在于植物界中的一种多元酚类化合物，它可使创伤组织表面蛋白凝固而形成痂膜，减少分泌与血浆渗出，可在血管破裂处形成硬块并收缩血管而阻止血液外流。该草药的萃取物主要成分为鞣质类，在实验中明显观察到收敛血管，减少渗血，形成凝块及缩短凝血、止血时间，使创面处于高凝状态。本实验通过兔体外凝血实验及大鼠创面止血实验证明了萃取物确实具有较好的体外促凝及创面止血作用。氯仿萃取物是其止血有效部位，在有效部位成分中，鞣质是主要成分，发挥强大止血促凝作用。因此可以认为：本药可以用于创伤止血及手术止血，本药由来源广泛，物美价廉，为本药进一步的开发利用奠定了基础。与云南白药比较，促凝止血效果显著，有一定的优越性，但有待今后进一步的实验及多种动物的验证。

参考文献：

[1] 罗来国，陶学仁. 止血中药作用机理的研究概况[J]. 中医药研究，1998，14(3)：58－60.

[2] 焦东海. 中草药研究概况[J]. 中成药研究，1983，(4)：30－31.

[3] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分的提取与分离[M]. 上海：上海科学技术出版社，1981. 2，135－136.

[4] 肖崇厚. 中药提取鉴定原理[M]. 上海：上海科学技术出版社，1981. 59－69，93－95.

[5] 李景荣，王明时，赵守训，等. 鞣质的研究(I) —初试、分离、提取方法[J]. 国外医药植物药分册，1990，5(5)：195.

[6] Stojakovic K. Gravimetric determination of tannins in salvia and Melissa [J]. Farmvestn(Ljubljana)，1989，40(2)：113－116.

[7] 程韶光，何新妹. 薄层层析在食品添加剂测定中的应用[J]. 安徽预防医学杂志，2000，6(3)：232－233.

[8] Sakar M K. Themono and ditannins matrix in the leaves of cherry bay[J]. Z Lebensm Unters Forsch，1985，180(6)：494－495.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京：化学工业出版社，2000. 231.

[10] 吕武清，龙新华. 中成药中的药材薄层色谱鉴别[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1997. 2.

[11] 雷其云，赵越平. 用薄层层析法检测鞣质[J]. 中国中药杂志，1997，22(5)：287－289.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net