墨旱莲叶水提取物止血活性初探

刘世旺, 徐艳霞, 徐霞玲, 王二杏　(黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北黄州 438000)

摘要　[目的] 探讨墨旱莲叶水提取物的止血和促凝血活性,为中草药在止血方面的应用提供依据。[方法] 将不同剂量的墨旱莲提取物溶液与抗凝兔血混合,测定凝血时间。[结果] 墨旱莲叶提取物为0.5%的最适浓度时具有最强促凝血活性,凝血时间为16 s,凝血时间缩短率为99.6%。[结论] 墨旱莲叶水提取物有显著的止血和促凝血活性,具有较高的开发利用价值。

关键词　墨旱莲叶; 水提取物; 止血活性; 兔血
中图分类号　S567.9　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517-6611(2008)31-13673-02

Primary Discussion on the Hemostatic Activity of Aqueous Extracts from the Leaves of *Eclipta prostrata* **L.**

LIU Shi-wang et al　(College of Life Science and Engineering, Huanggang Normal University, Huangzhou, Hubei 438000)

Abstract　[Objective] The aim of the research was to discuss the hemostatic and procoagulant activities of aqueous extracts from the leaves of *Eclipta prostrata* L. and provide the basis for the application of Chinese herbal medicine in the hemostasis. [Method] Different dosages of aqueous extract solution from *E. prostrata* were blended with the rabbit blood with adding anticoagulant to determine the coagulation time. [Result] The extracts from the leaves of *E. prostrata* with the optimal concentration of 0.5% had the strongest procoagulant activity. The coagulation time was 16 s and the shortening rate of coagulation time was 99.6%. [Conclusion] The aqueous extracts from the leaves of *E. prostrata* had significant hemostatic and procoagulant activities and had higher exploitation and utilization values.

Key words　Leaves of *Eclipta prostrata* L; Aqueous extract; Hemostatic activity; Rabbit blood

墨旱莲(*Eclipta prostrata* L.)又名旱莲草、黑墨草,系菊科鳢肠属植物,因其茎折断后流出的汁液数分钟后即呈蓝黑色而得名。其干燥地上部分是二至丸、参鹿补膏、凉血安神片等的原料之一。该品始载于《唐本草》,具有滋肝补血、凉血止血之功能[1-2]。墨旱莲主产于江苏、浙江、江西、湖北、广东等省[3],多见于鄂东大别山地区的路边地头。民间常取该植物鲜叶揉汁敷于外伤口,既止血又消炎。目前,有关该植物止血机制的研究报道很少[4-5],为了深层开发利用该植物丰富的自然资源,从中挖掘低毒副作用的促凝止血药物,笔者对墨旱莲叶的水提取物进行了体外促凝血实验研究,同时对墨旱莲叶中天然促凝血活性成分的种类及促凝血机制进行了探讨。

1　材料与方法

1.1　仪器和试剂　仪器:高速冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge 5415R,德国);真空干燥箱(ZKD-6265,上海智城分析仪器制造公司);分析天平(AB204-N,梅特勒托利多仪器公司);数显恒温水浴锅(HH-6,常州国华电器有限公司)以及一次性凝血板、秒表计时器等。

试剂:氯化钙(无水氯化钙1.1 g溶入400 mL去离子水制成浓度为0.0248 mol/L氯化钙溶液);柠檬酸钠(3.8%的柠檬酸钠溶液用作血液抗凝剂)。

1.2　试验材料　墨旱莲于2007年8月采自校园外沟边湿地。材料采回后洗净、晾干,将叶与其他部分分离,单独粉碎并置冰箱中保存备用。实验用家兔购自集贸市场,平时用青草等天然食物饲养,实验前从兔耳缘静脉取血,对同一只家兔每次取血间隔时间至少2 d。

1.3　提取物制备

1.3.1　中温水提取物制备。称取墨旱莲叶粗粉25 g,加250 mL去离子水,于室温下浸泡6～8 h,在55 ℃的水浴上加热1 h,粗过滤,5 000 r/min离心后取上清液,置入60 ℃烤箱内烘干,得膏状提取物0.8 g。取膏状提取物0.5 g,溶于100 mL去离子水中,配成浓度为0.5%的中温水提取物溶液,溶液用滤纸过滤后取滤液冷藏备用。

1.3.2　高温水提取物制备。称取墨旱莲叶粗粉10 g于锥形瓶中,加入300 mL去离子水,记好水位刻度,在90 ℃的水浴上加热2.5 h,加热过程中不断补充去离子水,使其水位保持在原刻度。加热后过滤,用去离子水洗涤滤渣,合并滤液并定容至500 mL得浓度为2%的高温水提取物溶液,该溶液冷藏备用。

1.4　止血活性测定　在新鲜兔血中按1∶9比例混入3.8%的柠檬酸钠溶液可得抗凝血液,该抗凝血液能在较长时间内不凝血,若向抗凝血液中加入促凝血物质则会很快发生凝血。凝血所用时间越短说明促凝血物质的活性越高,否则,促凝血活性越低。凝血时间的测定采用以下两种方法[6-7]。

1.4.1　凝血板法。测定中温水提取物促凝血活性时,选择凝血板9个凹坑,依次向内加入冷藏备用的0.5%提取物溶液0(CK)、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mL,再分别向每个凹坑内加入浓度为0.0248 mol/L的氯化钙溶液0.05 mL,用大头针将药液与氯化钙溶液搅拌混匀,最后快速向每个凹坑内再加入抗凝血液0.25 mL,再混匀并立即开始计时;测定高温水提取物促凝血活性时,先将冷藏备用的2%提取物溶液对半稀释成1%、0.5%、0.25%、0.125%等系列浓度溶液,再选择凝血板的6个凹坑,依次向内加入浓度分别为2%、1%、0.5%、0.25%、0.125%和0(CK)的提取液0.5 mL,然后分别向每个凹坑内再加入浓度为0.0248 mol/L的氯化钙溶液0.05 mL,用大头针将药液与氯化钙溶液混匀,最后快速向每个凹坑内再加入抗凝血液0.25 mL,混匀并立即开始计时。无论测定哪种提取物的促凝血活性,当用大头针搅拌混合时搅拌次数均应保持一致。凝血计时开始以后,最多间隔30 s就要用大头针穿过血液轻挑1次,当出现血丝时为开始凝血,当出现血块且推动血块能露出凝血板底部时即为血液完全凝固。从加入抗凝血液到血液完全凝固之间的时间为

基金项目　湖北省教育厅重点科研项目(D200727001);黄冈师范学院重点项目(07CA062,08CA006)。
作者简介　刘世旺(1965-),男,湖北武汉人,硕士,副教授,从事生物化学和植物资源学方面的教学与科研工作。
收稿日期　2008-08-18

凝血时间。重复实验3 次,取其平均值。

1.4.2 试管法。将上述凝血板法加到每个凹坑中的提取物及试剂分别改加到内径为8 mm 的洁净玻璃试管中,盖紧试管口并倒转3 次使反应物混匀,立即开始计时。与凝血板法不同,试管法是在37 ℃的水浴箱中进行测定,最多间隔30 s 即轻轻倾斜试管来观察有无凝血。从加入抗凝血液开始,到倾斜试管后血块凝固于管底而不流动时为止,即为凝血时间,重复实验3 次,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 墨旱莲叶中温水提取物的促凝血活性 由表1 可知,当每凹坑或试管中提取液的剂量在0.01 ~0.08 ml 时,兔血凝血时间均显著短于CK;当剂量为0.03 ml 时,两种方法的凝血时间均最短,促凝血活性最高,可见,每坑或每管0.03 ml 剂量为促凝血活性的最适浓度。

表1 不同剂量的中温水提取物对兔血凝血时间的影响($\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 1 Effects of different dosage of water extracts at medium temperature on the coagulation time of rabbit blood

提取液的量 Dosage of extracts //ml	凝血板法 Coagulation plate method		试管法 Test tube method	
	凝血时间 Coagulation time //s	缩短率 Shortening rate // %	凝血时间 Coagulation time //s	缩短率 Shortening rate // %
0(CK)	8 620 ±13.79	-	8 412 ±12.73	-
0.01	80 ±5.57	99.07	108 ±3.00	98.72
0.02	40 ±4.00	99.54	50 ±4.04	99.41
0.03	26 ±2.21	99.70	33 ±2.15	99.61
0.04	163 ±2.08	98.11	168 ±3.00	98.01
0.05	140 ±4.58	98.38	156 ±2.64	98.15
0.06	125 ±4.72	98.55	138 ±3.00	98.36
0.07	135 ±3.06	98.43	147 ±5.02	98.25
0.08	250 ±6.16	97.10	248 ±2.51	97.05

2.2 墨旱莲叶高温水提取物的促凝血活性 由表2 可见,当每凹坑或试管中加入的提取液浓度在0.125 % ~2 % 时,兔血凝血时间均明显短于CK,说明在此范围内,高温水提取物也具有明显的促凝血活性。

表2 不同浓度的高温水提取物对兔血凝血时间的影响($\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 2 Effects of different dosage of water extracts at high temperature on the coagulation time of rabbit blood

提取液浓度 Concentration of extracts // %	凝血板法 Coagulation plate method		试管法 Test tube method	
	凝血时间 Coagulation time //s	缩短率 Shortening rate // %	凝血时间 Coagulation time //s	缩短率 Shortening rate // %
2	418 ±8.50	>94.19	423 ±6.24	>94.13
1	323 ±3.00	>95.51	279 ±1.21	>96.13
0.5	329 ±3.21	>95.43	316 ±2.08	>95.61
0.25	325 ±3.00	>95.49	333 ±5.23	>95.38
0.125	364 ±9.64	>94.94	399 ±5.10	>94.46
0(CK)	>7 200	-	>7 200	-

3 讨论

根据相关资料[8-9],中温水提取是最常见最一般的提取方法,得到的提取物中成分复杂且没有针对性,而高温水提取则是较常用的针对可溶性天然黄酮类物质的提取方法,得到的提取物中尽管也有多种成分,但以天然黄酮类成分为主。两种方法得到的提取物进行平行对比试验,可以进一步探索墨旱莲不同成分的促凝血活性。

测定凝血时间所用的凝血板法和试管法各具特色。凝血板法不要求昂贵的仪器设备,经济快捷;试管法则操作方便,且容易观察凝血过程进而测得更精确的凝血时间值。两种方法除实验温度不一样之外,其他条件和实验原理完全一样,因此,两种方法测定的结果可以相互印证。该实验表明,凝血板法(室温,约20 ℃)与试管法(37 ℃)实际测定的凝血时间基本一致,说明该实验结果可信、可靠,同时也说明温度对墨旱莲促凝血活性的影响不大。止血药物主要通过增强体内凝血因素或抑制抗凝血因素而促进凝血,笔者推测墨旱莲提取物很可能是通过抑制抗凝血液中柠檬酸钠对钙的沉淀吸附作用而发挥促凝血活性。

一般认为凝血时间缩短率大于30 % 的药物即具有促凝血活性[10]。由表1、2 可见,中温和高温水提取物在两种测定方法中的凝血时间缩短率均达90 % 以上,说明墨旱莲叶的水提取物具有显著的促凝血活性,这与墨旱莲在实际药用过程中表现出的良好止血效果相一致。另外,两种提取物在表现促凝血活性时均有最适浓度特征,即高于或低于最适浓度时,促凝血活性均呈下降趋势。如中温水提取物在提取液用量为0.03 ml/ 坑时凝血时间最短,促凝血活性最强;高温水提取物在提取液浓度为1 % 时凝血时间最短,促凝血活性最强。中温和高温水提取物在表现促凝血活性方面的一致性显示:天然黄酮类物质可能是墨旱莲最主要的天然止血活性成分。墨旱莲天然黄酮作为止血活性成分值得进一步研究和开发。

参考文献

[1] 郑汉臣. 药用植物学[M]. 北京: 人民卫生出版社,2001:271

[2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所,中国医学科学院药物研究所等. 中药志(第4 册)[M]. 北京: 人民卫生出版社,1988:412.

[3] 全国中草药汇编委员会. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社,1983:432.

[4] 汤海峰,赵越平. 中药墨旱莲的研究概况[J]. 西北药学杂志,1999,14(1):33.

[5] 王建,白秀珍. 墨旱莲对热胃出血止血作用的研究[J]. 数理医药学杂志,2005,18(4):375.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社,1991:1016-1018.

[7] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社,1994:484-485.

[8] 杨云,张晶,陈玉婷. 天然药物化学成分提取与分离[M]. 北京: 中国中医药出版社,2003.

[9] 孙鹏,刘文文. 生物类黄酮研究概况[J]. 中兽医医药杂志,2007,28(4):73.

[10] 董鹏,唐万斌,郭连芳. 地锦草止血作用研究[J]. 武警医学,1997,8(2):117-119.