

# 飞龙掌血根皮的生药学鉴别与止血活性考察

赵美雪, 张晓燕, 刘绍欢, 何茂秋, 梁妍, 郝小燕, 周威\*  
(贵州医科大学药学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** **目的:**开展飞龙掌血根皮的组织切片、粉末显微方面的生药学鉴别研究,以及其止血活性与样品制备方法研究。**方法:**通过制作飞龙掌血全根横切片,飞龙掌血根皮与根心各自粉末的水装片、透化片、染色片,运用生药学传统鉴别手段完善飞龙掌血全根的组织切片特征,寻找飞龙掌血根皮与根心之间的粉末显微特征。采用小鼠断尾法、毛细玻管法,以出血时间、出血量、凝血时间为指标,考察不同提取方法、不同极性部位对飞龙掌血根皮止血活性的影响。**结果:**飞龙掌血根皮含有大量石细胞、草酸钙方晶、木栓细胞、油细胞等,飞龙掌血根心含木纤维、草酸钙方晶、网纹纹孔导管等。95%乙醇冷浸提取与50%乙醇回流提取都适合于飞龙掌血根皮提取;冷浸浸膏乙酸乙酯部位止血活性优于石油醚部位和正丁醇部位,冷浸浸膏乙酸乙酯部位按剂量 $1.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药,平均出血时间、出血量、凝血时间依次为 $(59.67\pm 12.31)\text{ s}$ , $(4.42\pm 1.67)\text{ mg}$ , $(79.67\pm 5.57)\text{ s}$ 。**结论:**石细胞、木栓细胞、油细胞是飞龙掌血根皮的显微鉴别项目,木纤维是飞龙掌血根心的专有鉴别项目。飞龙掌血根皮的提取应结合乙醇冷浸法和回流法,飞龙掌血根皮具有良好的止血凝血效果,以冷浸提取乙酸乙酯部位止血效果最好。

**[关键词]** 飞龙掌血; 根皮; 生药学鉴别; 止血活性; 凝血时间

**[中图分类号]** R282.5;R284.2;R931.5;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0032-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240032

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160705.1425.002.html>

**[网络出版时间]** 2016-07-05 14:25

## Pharmacognostic Identification and Hemostatic Activity of *Toddalia asiatica* Root Bark

ZHAO Mei-xue, ZHANG Xiao-yan, LIU Shao-huan, HE Mao-qi, LIANG Yan, HAO Xiao-yan, ZHOU Wei\*  
(School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To carry out the pharmacognostic identification of *Toddalia asiatica* root bark including plant tissue cross section and fine powder microscopic identification, its hemostatic activity and sample preparation method. **Method:** Through making horizontal slices of full root of *T. asiatica*, water loading slides, permeabilizing slides and staining slides of the root bark and the root cores respectively, the tissue section characteristics of full root of *T. asiatica* were improved in traditional means of pharmacognostic identification, fine powder microscopic characteristics between the root bark and the root cores of *T. asiatica* were also investigated. For hemostatic activity of *T. asiatica* root bark, bleeding time (BT), amount of bleeding (BA) and clotting time (CT) were chosen as indexes, different extraction methods and polarity fractions were studied by typical mouse tail-cutting method and glass capillary tube method. **Result:** *T. asiatica* root bark contained a lot of stone cells, calcium oxalate crystals, cork cells, oil cells, et al. Meanwhile, the root cores had wood fibers, calcium oxalate crystals, textured pit catheters, et al. Both 95% ethanol cold maceration method and 50% ethanol reflux method were suitable for extraction of *T. asiatica* root bark. The ethyl acetate fraction of cold maceration extract showed the

**[收稿日期]** 20160222(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360681);国家级大学生创新创业训练项目(201410660004);中组部“西部之光”访问学者基金项目(2014~2015)

**[第一作者]** 赵美雪,在读硕士,从事中药物物质基础与成分分析研究,Tel:0851-88416165,E-mail:1258959283@qq.com

**[通讯作者]** \*周威,博士,副教授,从事药物分析与新药开发研究,Tel:0851-88416166,E-mail:drwzhou@126.com

best hemostatic activity by comparing with petroleum ether fraction and *n*-butanol fraction. Under administration of 1.50 g·kg<sup>-1</sup> ethyl acetate fraction of cold maceration extract, average values of BT, BA and CT were (59.67 ± 12.31) s, (4.42 ± 1.67) mg and (79.67 ± 5.57) s. **Conclusion:** Stone cells, cork cells and oil cells are characteristic items of *T. asiatica* root bark, wood fibers only exist in *T. asiatica* root cores relatively. Combination of cold maceration method and ethanol reflux method is reasonable for extraction of *T. asiatica* root bark. *T. asiatica* root bark has excellent hemostatic and coagulation effects, and hemostatic effect of ethyl acetate fraction of cold maceration extract is the best.

[ **Key words** ] *Toddalia asiatica*; root bark; pharmacognostic identification; hemostatic activity; clotting time

飞龙掌血始载于《植物名实图考》，在我国主要分布于贵州、广西、湖南、四川等地，具有散瘀止血、祛风除湿、消肿解毒等功效<sup>[1-3]</sup>。因其止血作用比较显著，故又名见血飞、血见愁、见血散等。截至目前，涉及飞龙掌血的研究已有一些文献报道<sup>[4-10]</sup>，但针对其主要活性用药部位根皮的生药学鉴别、止血活性研究尚无系统研究。本实验旨在通过开展飞龙掌血根皮的药学基础研究，为后续科学、合理、全面地开发利用贵州道地苗药飞龙掌血药材资源提供依据。

### 1 材料

DS-Fi2 型显微镜数码相机(日本尼康),AY-120 型 1/1 万电子天平(日本岛津),TGL-16G 型高速台式离心机(上海安亭),DFT-200 型手提式高速粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。飞龙掌血药材采自贵州贵阳、都匀,经贵阳中医学院陈德媛教授和黔南民族师范学院郭治友教授鉴定为芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* 的干燥根皮,标本存放于贵州医科大学中药民族药标本馆;云南白药(云南白药集团股份有限公司,4 g 装,保险子 1 粒,批号 ZDA1507),试剂均为分析纯。

KM 小鼠,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半,购自贵州医科大学实验动物中心,许可证号 SYXK(黔)2012-0001。

### 2 方法与结果

**2.1 飞龙掌血根皮 95% 乙醇冷浸浸膏的制备** 取飞龙掌血根皮药材 35 kg,稍微破碎,加 3 倍量 95% 乙醇冷浸提取 9 次,每次 1 周,合并冷浸提取液,减压回收溶媒,浓缩至无醇味,4 ℃ 保存备用。临用前以 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为溶媒,将冷浸浸膏配成质量浓度 0.2,0.1,0.05 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液,灌胃给药体积 10 mL·kg<sup>-1</sup>。

**2.2 飞龙掌血根皮 50% 乙醇回流浸膏的制备** 取飞龙掌血根皮经冷浸提取后剩下的药渣,采用 50%

乙醇回流提取。加 3 倍量 50% 乙醇提取 3 次,每次 3 h,合并提取液。减压回收溶媒,浓缩至无醇味,4 ℃ 保存备用。临用前用 0.5% CMC-Na 将回流浸膏配成质量浓度 0.1,0.05,0.025 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液,灌胃给药体积 10 mL·kg<sup>-1</sup>。

**2.3 生药学鉴别** 飞龙掌血根呈圆柱形,表面灰棕色至灰黄色,粗糙,有细纵纹及花斑纹<sup>[4-5]</sup>,有的具有多数疣状突起,味辛、苦,性微温,见图 1。飞龙掌血全株都可入药,但药用价值最大的是其根皮,根皮与根心之间存在明显的外观差异。徒手制作根横切面,制作水装片及间苯三酚染色,药材粉末的水装片、水合氯醛加热透化及间苯三酚染色。

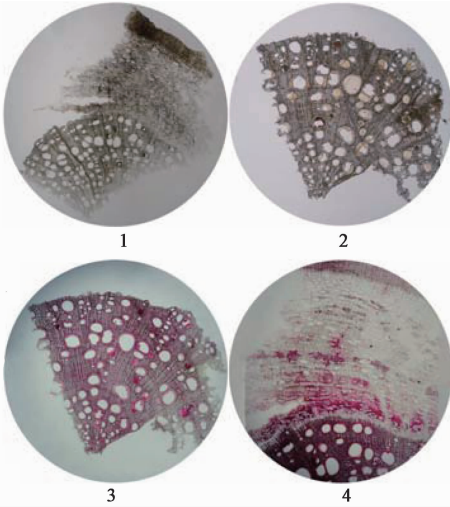


1. 原植物藤茎;2. 原植物枝叶;3. 新鲜根;4. 干燥根皮  
图 1 飞龙掌血原植物与药材

Fig. 1 Original plant and crude drug of *Toddalia asiatica*

**2.3.1 根横切面** 木栓层为数十列木栓细胞。皮层宽,外侧有晶鞘纤维和石细胞群,石细胞呈椭圆形、圆形或不规则长圆形,壁厚,胞腔明显。韧皮部散有较小的油室和晶鞘纤维束。木质部导管呈类圆形,多单列断续放射状排列;木纤维发达围绕于导管;木射线宽 1 ~ 4 个细胞;薄壁细胞中散有草酸钙

棱晶或方晶见图2。



1. 根横切面(水装片);2. 木质部横切面(水装片);3. 木质部横切面(间苯三酚染色);4. 韧皮部横切面(间苯三酚染色)

图2 飞龙掌血根的横切面特征(10×10)

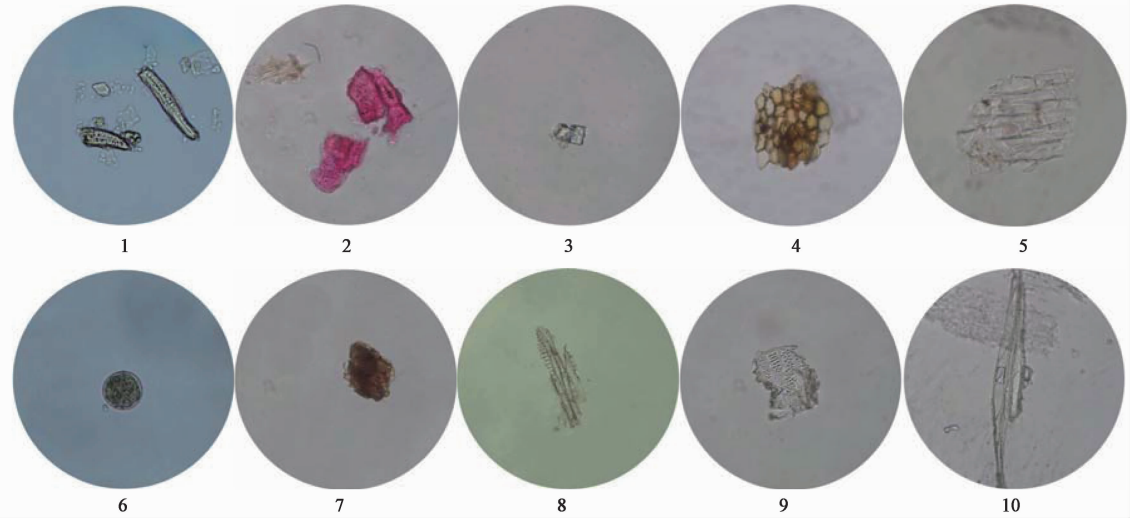
Fig. 2 Cross section characteristics of *Toddalia asiatica* root bark (10×10)

2.3.2 根皮粉末显微特征 ①根皮粉末呈棕褐色，

皮部粉末显微特征为木栓细胞黄棕色，扁平形或多角形，细胞壁较薄。筛管端壁斜置，多具复筛板，壁薄，筛域呈网状排列，筛孔明显，可见颓废的薄壁组织。石细胞长多角形和长圆形，壁厚，纹孔及层纹明显。网纹导管可见，草酸钙方晶众多。②根心粉末呈黄绿色或淡黄绿色。木部粉末显微特征为木纤维细长，末端常锐尖，细胞壁较薄，木化，一边呈波状弯曲。木薄壁细胞多成不规则矩形。石细胞长多角形和长圆形，壁厚，纹孔及层纹明显，网纹导管可见，见图3。飞龙掌血根皮含有石细胞、草酸钙方晶、木栓细胞、薄壁细胞、油细胞、色素块、筛管、网纹具缘纹孔导管。而飞龙掌血根心只含有木纤维、草酸钙方晶、网纹纹孔导管。

2.4 飞龙掌血根皮对小鼠出血时间、出血量的测定

取KM小鼠随机分组，即空白组(0.5 g·kg<sup>-1</sup>生理盐水)，云南白药组(0.5 g·kg<sup>-1</sup>)，飞龙掌血根皮待测浸膏的高、中、低剂量组，每组6只。灌胃给药，每天1次，连续7d。末次给药60 min后，沿小鼠尾尖5 mm处横向剪断，当血液自动流出时开始计时，每



1. 石细胞;2. 石细胞(间苯三酚染色);3. 方晶;4. 木栓细胞;5. 薄壁细胞;6. 油细胞(水装片);7. 色素块;8. 筛管;9. 网纹导管;10. 木纤维

图3 飞龙掌血根皮的粉末显微特征(10×40)

Fig. 3 Fine powder microscopic characteristics of *Toddalia asiatica* root bark(10×40)

隔10 s用滤纸吸去血滴1次，直到血液不再流出为止(滤纸吸时无血)。以人工形成创面到出血停止所经时间作为出血时间；将人工形成创面到出血停止后的滤纸称重，计算出血量。采用SPSS 17.0软件进行组间方差分析，组间均数比较采用t检验，见表1。

2.5 飞龙掌血根皮对小鼠凝血时间的测定 取KM小鼠，随机分组，按2.4项下方法分组和给药，末次给药60 min后用毛细管插入小鼠眼球内眦后

静脉丛取血，以5 cm的血柱为宜。计时，每隔20 s折断两端毛细玻璃管(5 mm)并缓慢向左右拉开，观察折断处有无血凝丝出现，以血凝丝出现时的时间计算凝血时间，见表1。结果发现与云南白药组比较，95%乙醇冷浸浸膏和50%乙醇回流浸膏的各剂量组止血活性无统计学差异。说明飞龙掌血根皮的95%乙醇冷浸浸膏和50%乙醇回流浸膏均具有良好的抑制生物机体创面出血的功效，彼此之间止血

表 1 不同提取方法对飞龙掌血根皮止血活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of different extraction methods on hemostatic activity of *Toddalia asiatica* root bark ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	出血时间 /s	出血量 /mg	凝血时间 /s
空白	0.50	115.33 ± 18.13	9.25 ± 3.21	128.06 ± 17.46
云南白药	0.50	54.50 ± 8.76 <sup>2)</sup>	1.72 ± 0.57 <sup>2)</sup>	79.10 ± 15.15 <sup>2)</sup>
95% 乙醇冷浸浸膏	2.00	50.69 ± 10.05 <sup>2)</sup>	0.87 ± 0.68 <sup>2)</sup>	60.18 ± 5.82 <sup>2)</sup>
	1.00	65.47 ± 15.43 <sup>2)</sup>	1.53 ± 1.21 <sup>2)</sup>	66.42 ± 12.10 <sup>2)</sup>
	0.50	73.13 ± 19.38 <sup>2)</sup>	2.43 ± 1.15 <sup>2)</sup>	72.04 ± 12.59 <sup>2)</sup>
50% 乙醇回流浸膏	1.00	58.50 ± 9.97 <sup>2)</sup>	0.95 ± 0.73 <sup>2)</sup>	64.60 ± 11.67 <sup>2)</sup>
	0.50	69.33 ± 16.52 <sup>2)</sup>	1.67 ± 1.24 <sup>2)</sup>	68.51 ± 10.63 <sup>2)</sup>
	0.25	76.01 ± 23.11 <sup>1)</sup>	2.69 ± 1.97 <sup>2)</sup>	81.17 ± 12.73 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

活性无统计学差异。但飞龙掌血根皮的止血活性成分极性差异大,飞龙掌血根皮 95% 乙醇冷浸浸膏主要富集中、低极性有效成分,包括香豆素类、生物碱类<sup>[6-8]</sup>;50% 乙醇回流浸膏偏向于中、高极性天然产物,主要为三萜类、多糖类。

## 2.6 不同极性部位对飞龙掌血根皮的止血活性影响

按 2.4 和 2.5 项下方法开展飞龙掌血根皮

95% 乙醇冷浸浸膏的不同极性部位,即石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位对小鼠体内止血活性指标影响的研究。取 KM 小鼠 110 只,随机等分为 11 组,即空白组(0.5 g·kg<sup>-1</sup> 生理盐水),云南白药组(0.5 g·kg<sup>-1</sup>),飞龙掌血根皮 95% 乙醇冷浸浸膏的石油醚部位高、中、低剂量组,乙酸乙酯部位高、中、低剂量组和正丁醇部位高、中、低剂量组,灌胃给药,见表 2。

表 2 飞龙掌血根皮 95% 乙醇冷浸浸膏的不同极性部位的止血效果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of different polarity fractions of 95% ethanol extract on hemostatic activity of *Toddalia asiatica* root bark ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	出血时间/s	出血量/mg	凝血时间/s
空白	0.50	119.50 ± 8.17	12.85 ± 1.60	134.50 ± 8.19
云南白药	0.50	65.17 ± 5.12 <sup>2)</sup>	5.78 ± 1.04 <sup>2)</sup>	83.76 ± 17.08 <sup>2)</sup>
石油醚部位	1.50	71.35 ± 7.17 <sup>2)</sup>	7.95 ± 1.30 <sup>1)</sup>	97.62 ± 15.84 <sup>1)</sup>
	0.75	75.50 ± 12.80 <sup>1)</sup>	8.10 ± 1.00 <sup>1)</sup>	103.50 ± 13.58 <sup>1)</sup>
	0.38	89.79 ± 4.79	8.85 ± 1.93	108.83 ± 15.10
乙酸乙酯部位	1.50	59.67 ± 12.31 <sup>2)</sup>	4.42 ± 1.67 <sup>2)</sup>	79.67 ± 5.57 <sup>2)</sup>
	0.75	62.33 ± 6.70 <sup>2)</sup>	5.68 ± 0.91 <sup>2)</sup>	86.17 ± 15.35 <sup>2)</sup>
	0.38	68.70 ± 3.61 <sup>2)</sup>	6.93 ± 0.69 <sup>2)</sup>	93.83 ± 10.61 <sup>2)</sup>
正丁醇部位	1.50	69.82 ± 7.70 <sup>2)</sup>	6.31 ± 0.86 <sup>2)</sup>	100.91 ± 14.48 <sup>1)</sup>
	0.75	75.05 ± 3.79 <sup>1)</sup>	6.63 ± 0.78 <sup>2)</sup>	107.32 ± 7.27 <sup>1)</sup>
	0.38	87.12 ± 5.33	7.56 ± 1.56 <sup>1)</sup>	113.75 ± 8.06

由表 2 可知,云南白药组、飞龙掌血根皮 95% 乙醇冷浸浸膏的乙酸乙酯部位各剂量组均能显著缩短小鼠出血时间、凝血时间,减少出血量,与空白组之间存在显著性差异。石油醚部位、正丁醇部位的高、中剂量组也能显著改善小鼠止血效果,这 2 个部位的低剂量组的止血作用与空白组之间却大多无统计学差异。实验过程中没有出现非人为实验操作因素导致

的小鼠不良反应、死亡等情况的发生。综合分析,95% 乙醇冷浸浸膏的乙酸乙酯部位止血活性最强,活性随给药剂量增加而提高,且药物毒副作用小。

## 3 讨论

人体、生物体都具有止血功能,缓慢少量出血,多可自行止血,这种自然止血作用主要是局部受损血管发生反射性收缩,或血管受损处血小板凝集经

凝血过程形成血凝块,纤溶系统激活,最终阻止继续出血;而存在于局部组织或体腔内的血液,可通过吸收或机化消除,较大的血肿吸收不完全则可机化或纤维包裹。一旦机体这种止血机制发生异常,可引发系列严重出血性疾病,比如血友病、紫癜。药物疗法是目前临床治疗出血性顽疾的主流手段。而评价一种药物的止血活性,出血时间、凝血时间和出血量是最宏观的考察项目。出血时间反映了止血功能的状态,其长短与毛细血管功能、血小板的数量、组织因子数量及组织收缩力等因素有关。凝血时间是血液从离体至凝固所需时间,血液离体后接触带负电荷的表面(玻璃器材)时,Ⅻ因子被激活,其后一系列的凝血因子相继活化,使纤维蛋白原转变为纤维蛋白而凝血,凝血时间的长短主要与各种凝血因子的含量和功能有关。出血量直接反映出生物机体止血系统的综合功能。通过这 3 指标,本研究证明飞龙掌血根皮的止血活性成分极性差异大,其止血机制不会是目前大多数化学类止血药物通过加速血液凝固过程或阻止纤维蛋白溶解,通过某一环节或靶点而收到止血效果;而是其多组分通过多个环节、靶点共同发生作用,达到最终显著的止血作用。

云南白药已被广泛用于治疗临床各种出血病症,故选择为阳性药。预试验考察了二甲基亚砜、植物食用油和 CMC-Na。二甲基亚砜对该药物表现出较好的溶解性,但具有一定细胞毒性且对止血作用有一定程度上的干扰;植物食用油对于飞龙掌血根皮 50% 乙醇回流浸膏的溶解分散效果不好;而 CMC-Na 对相关考察项目无影响,故选择其作为样品溶媒。

黄江红等<sup>[9]</sup>证明该药材全根的水煎提取物及萃取部位的止血活性,石磊等<sup>[10]</sup>报道了飞龙掌血全根的甲醇冷浸提取物及其各极性萃取部位的止血作用。结合该药材传统的鲜根皮外敷止血的用药习惯,本文采用先乙醇冷浸后回流提取的方法,乙醇冷

浸偏向极性较小、热不稳定的止血活性化合物的提取,回流则倾向于极性较大、热稳定的活性成分的提取,以最大化地提取飞龙掌血根皮的有效活性成分。前期研究发现飞龙掌血根皮 95% 乙醇冷浸提取不能充分彻底分离根皮里极性较大的成分,同时也考虑到该药材采摘十分不易,故进一步采取 50% 乙醇水浴回流法提取。本研究验证了飞龙掌血根皮的乙酸乙酯部位止血活性最强,活性强度与给药剂量正相关,实验过程中未发现严重不良反应。

#### [参考文献]

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:903.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:63.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 《中华本草》. 第 4 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:965-967.
- [4] 张立群. 三百棒的生药学研究[J]. 中国中药杂志, 1982,7(4):7-9.
- [5] 夏清,刘圆. 民族药飞龙掌血的生药学鉴定[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2007,33(5):1101-1103.
- [6] Huang P, Karagianis G, Wei S X, et al. Triterpene acids from *Toddalia asiatica* [J]. Nat Prod Res Dev, 2005, 17(4):404-408.
- [7] 石磊,李东,康文艺. 飞龙掌血化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药房,2011,22(7):666-668.
- [8] 许颖,郭婧玉,刘学,等. 飞龙掌血乙醇提取物对白色念珠菌抑菌作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(10):270-274.
- [9] 黄江红,谢楷标,邓永福,等. 飞龙掌血提取物止血作用初步研究[J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(10):773-774.
- [10] 石磊,李昌勤,廉婷婷,等. 见血飞对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(47):4424-4425.

[责任编辑 刘德文]