

三七止血和活血活性部位的筛选^{*}

黄加文^{1,2,3}, 李 倩^{1,2,3}, 杨和金^{1,2,3}, 袁名睿^{1,2,3}, 肖茹月^{1,2,3},
李晋玉^{1,2,3}, 苏 钛^{1,2,3}, 王自梁^{1,2,3△}

(1. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111; 2. 云南白药集团创新研发中心, 云南 昆明 650111;
3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: **目的** 对三七不同洗脱部位成分进行分析, 并筛选止血与活血活性部位。**方法** 采用 70%乙醇回流提取, 大孔树脂柱划段制备样品; 紫外分光光度法测定总皂苷含量, HPLC 法测定三七素和 5 种主要皂苷的含量; 小鼠断尾止血和玻片凝血实验观察样品的止血作用; 肾上腺素-胶原蛋白诱导小鼠体内血栓形成实验观察样品的抗血栓作用; 高分子右旋糖酐致大鼠急性血瘀实验观察样品的活血散瘀作用。**结果** 制备得到总提物、水洗脱部位、30%乙醇洗脱部位、70%乙醇洗脱部位的三七总皂苷的含量分别为: 32.51%、0%、52.39%、83.61%; 三七素集中在水洗脱部位(2.78%); 总提物、三个洗脱部位均能明显缩短出血时间与凝血时间, 但水洗脱部位缩短凝血时间的作用最显著; 总提物和 30%乙醇洗脱部位能明显提高小鼠偏瘫恢复率; 总提物、30%和 70%乙醇洗脱部位能明显降低大鼠血液在不同切变率下的黏度。**结论** 在本实验设计与条件下, 三七素仅存在于水洗脱部位中, 三七皂苷在 30%和 70%乙醇洗脱部位中均有分布, 但种类与含量存在较大差异; 水洗脱部位为三七止血主要活性部位; 30%乙醇洗脱部位为三七抗血栓主要活性部位; 30%和 70%乙醇洗脱部位为三七活血散瘀主要活性部位。

关键词: 三七; 大孔树脂; 分析检测; 活性部位

中图分类号: R284.1; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2018)06-0012-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.06.003

Screening of Active Fractions of Hemostatic Effect and Activating Blood Circulation Effect of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen.

HUANG Jiawen^{1,2,3}, LI Qian^{1,2,3}, YANG Hejin^{1,2,3}, YUAN Minrui^{1,2,3},
XIAO Ruyue^{1,2,3}, LI Jinyu^{1,2,3}, SU Tai^{1,2,3}, WANG Ziliang^{1,2,3}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China;

2. Yunnan Baiyao Group Innovation and R&D Center, Kunming, 650111, China;

3. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming, 650111, China)

ABSTRACT: Objective To analyse on the components of eluted fractions of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen. Screening the active fractions by observing the hemostatic effect, antithrombotic effect, activating blood circulation and resolving stasis effect. **Methods** The medicinal materials were extracted by 70% ethanol, and fractions prepared by macroporous resin. The content of total saponins was determined by UV spectrophotometry, the content of dencichine and five major saponins were determined by HPLC. Bleeding time was measured by tail-cutting method, coagulation time was measured by the slide method. Collagen-adrenalin was used to induce thrombus in mice. Rats with acute blood stasis model were established by intravenous injection of high molecular dextran. **Results** The samples were prepared, included: the extract, water eluted fraction, 30% and 70% ethanol eluted fraction. The content of notoginseng total saponins were 32.51%, 0%, 52.39%, 83.61%. The dencichine exists in water eluted fraction only (2.78%). The extract and fractions could shorten

收稿日期: 2018-11-13

* 基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-YN-44)

第一作者简介: 黄加文(1990-),男,助理工程师,研究方向:中药药理。

△通信作者: 王自梁, E-mail: zlwang3075@163.com

the bleeding and coagulation time significantly. However, the water eluted could shorten coagulation time more significantly. The extract and 30% ethanol elution fraction could improve the recovery rates of hemiplegic mice significantly. Extract, 30% and 70% water eluted fractions could decrease the blood viscosities at all shear rates, significantly. **Conclusion** The dencichine only exists in water eluted fraction, saponins exist in 30% and 70% ethanol eluted fractions, but their contents and types were different. Water eluted fraction is main active fraction on hemostasis. The 30% ethanol eluted fraction show the obvious antithrombotic effect, and it's main active fraction. The 30% and 70% ethanol eluted fractions show the obvious activating blood circulation and resolving stasis effect, and they are the main active fraction.

KEY WORDS: *Panax notoginseng*(Burk.) F. H. Chen; macroporous resin; determination; active fraction

三七(*Panax notoginseng*(Burk.)F. H. Chen)是一种十分古老的药用植物,起源于25万年前的第三纪古亚热带区域,又名闹特金身、诺特参(音译)^[1]。三七为云南道地药材,具有止血散瘀、消肿定痛的作用^[2],是许多知名中成药的主要原料,如:痛舒胶囊、痛舒片、复方丹参滴丸、丹参片等。《本草纲目》记载:“凡杖扑伤损,癖血淋漓者,随即嚼烂罨之即止,青肿者即消散^[3]”。这表明三七不仅有止血作用还有活血散瘀的神奇功效,具有双重调节作用。大孔吸附树脂柱色谱为常用的划段方法,各段洗脱物中化学成分的种类、含量、药效强弱均不一致。目前,从大孔树脂划段,主要成分种类和含量分析,药效等方面对三七进行系统性研究的报道较少。本文对三七水洗脱部位,30%和70%乙醇洗脱部位进行研究,旨在筛选活性部位,探讨各部位主要成分的种类与含量,止血与活血作用强弱,为三七标准化建设提供物质基础研究依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 三七主根,灰褐色圆锥形,具清香味,由云南白药集团股份有限公司创新研发中心天然药物资源研究室提供,经资源研究室鉴定为五加科人参属植物三七(*Panax notoginseng*(Burk.)F. H. Chen)的干燥根;HPD-100型大孔吸附树脂,沧州宝恩吸附材料科技有限公司;三七素、三七总皂苷、人参皂苷Rg₁对照品,中国药品生物制品检定研究院;色谱级乙腈、甲醇,德国默克,批号:20180331;无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司生产,批号:20170530。云南白药,云南白药集团股份有限公司,批号:ZLA1614;阿司匹林肠溶片,Bayer HealthCare Manufacturing S.r.l,批号:BJ19198.;胶原蛋白,Sigma,批号:BPo2o1;盐酸肾上腺素注射液,上海禾丰制药有限公司,批号:10170102;银杏叶提取物,德国威玛舒培博士药厂,批号:0320417;高分子右旋糖酐,玛雅试剂有限公司,批号:MAYA-CR-6536;水合氯醛,国药

集团化学试剂有限公司,批号:2015050。

1.2 主要实验仪器 旋转蒸发仪,德国 Heidolph; DZF-6051型真空干燥箱,上海精宏仪器厂;Practum224-1CN电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;JJ-2000型电子天平,江苏常熟市双杰测试仪器厂;UV2501分光光度计,日本 Shimadzu; Waters e2695型高效液相色谱仪,美国 Waters;ELGA reservoir 75 L纯水机,英国 ELGA;全自动全血血液流变仪 MVIS-2015,重庆天海医疗设备有限公司。

1.3 实验动物 SPF级昆明小鼠,体质量20~22 g。SPF级SD大鼠,体质量180~220 g。来源于广东医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002]。动物饲养于云南白药集团创新研发中心药理研究室[SYXK(滇)K2017-0004]。

1.4 药材提取与大孔树脂柱层析 三七干燥根6 kg,粉碎,以70%乙醇为提取溶剂(料液比为1:5),采用连续回流提取法提取3次,回流温度为80℃,每次2 h。所得提取液趁热过200目滤布,使用旋转蒸发仪减压浓缩(温度:60℃,真空度:0.07 MPa),稠膏减压真空干燥。

三七干燥药材4 kg(60头),依上述方法制得浓缩液500 mL。称取4 kg的HPD-100大孔吸附树脂预处理,装入16 cm×140 cm的玻璃色谱柱中,用蒸馏水替换。取浓缩液均匀上样,流速10 mL/min。依次用5倍柱体积的蒸馏水、30%和70%的乙醇-水梯度洗脱,流速200 mL/min。将各部分洗脱液使用旋转蒸发仪减压浓缩(温度:60℃,真空度:0.07 MPa)。水洗脱部位浓缩液经水浴(70℃)蒸发至稠状,减压真空干燥(温度:70℃,真空度:0.07 MPa)。30%和70%乙醇洗脱部位浓缩后冷冻干燥。

1.5 HPLC法测定三七素的含量 对照品制备:称取三七素对照品10.01 mg,配置时加70%甲醇,溶解定容到25 mL。

供试品制备:称取适量三七总提物和各划段样品,用纯水定容置至 25 mL,超声溶解,有机系滤头过滤,取续滤液进样 10 μ L。

测定方法:Waters e2695 型高效液相色谱, Thermo Scientific Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流动相为 0.3%四丁基氢氧化铵(A)—甲醇(B)(磷酸调 pH 4.0);梯度洗脱 0~15 min, 15%~20%A; 15~25 min, 20%~15% A; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 220 nm^[4]。

1.6 紫外分光光度法测定总皂苷的含量 对照品溶液的制备:精密称取人参皂苷 Rg₁ 对照品适量,用甲醇配制成浓度为 0.2 422 mg/mL 的对照品溶液。

供试品溶液的制备:取三七提取物 20 mg,精密称定,加入甲醇 25 mL,超声混匀,滤过,取续滤液。

紫外分光光度法标准曲线制备:分别精密吸取对照品溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置具塞磨口试管中,挥干甲醇后,加入新鲜配制的 5% 香兰素-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,于 60 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min,冰水浴冷却后,加冰醋酸 5 mL 摇匀,于紫外分光光度计 545 nm 处进行测定,以吸光度值 Y 为纵坐标,以人参皂苷 Rg₁ 含量 X(mg)为横坐标绘制标准曲线。供试品反应与测定:精密吸取供试品溶液 0.2 mL,置具塞磨口试管中,挥干甲醇后,加入新鲜配制的 5% 香兰素-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,于 60 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min,冰水浴冷却后,加冰醋酸 5 mL 摇匀,以不加供试品的试剂做空白对照,于紫外分光光度计 545 nm 处进行测定^[5-6]。

1.7 HPLC 法测定 5 种主要皂苷的含量 对照品的制备:称取三七总皂苷对照品 63.01 mg,配置时加 70% 甲醇,溶解定容到 25 mL。配置浓度:2.5 204 mg/mL。标示含量:R₁:7.4%、Rg₁:26.3%、Re:3.7%、Rb₁:27.7%、Rd:7.6%。

供试品溶液的制备:称取 30%乙醇洗脱部位冻干粉末 50.7 mg,30% 甲醇定容置至 25 mL,超声溶解,有机系滤头过滤,取续滤液进样 10 μ L;称取 70%乙醇洗脱部位 50.3 mg,甲醇定容置至 25 mL,超声溶解,滤头过滤,取续滤液进样 10 μ L。

HPLC 色谱条件:色谱柱:Ecosil-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L;检测波长:203 nm;流动相:乙腈-水溶液,按表 1 进行梯度洗脱^[7]。

表 1 流动相梯度洗脱表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~30	80	20
30~31	80→69	20→31
31~46	69	31
46~70	69→63	31→37

1.8 对小鼠断尾出血时间和玻片凝血时间的影响 取体质量 18~22 g 昆明小鼠若干,按体重随机分组,每组 12 只,雌雄各半。除溶媒对照组小鼠给予纯水外,其余各组小鼠每天按剂量灌胃给予相应药物 1 次,连续 4d,给药容积为 20 mL/kg。末次给药 60 min 后,将小鼠固定。用眼科剪在小鼠尾尖 1~2 mm 处横断,待血液自动溢出开始计时,每隔 30 s 用滤纸轻吸血液,直至血液自然停止,记录出血时间。所有实验小鼠继续饲养 1 d,给药 1 h 后,摘眼球取血。于清洁载玻片上滴血两滴,秒表计时。每隔 30 s 用清洁针头自血滴边缘向中心轻轻挑动 1 次,直至有血丝挑起,记录凝血时间,另一滴血做复验。实验过程中控制实验室温度(15±1) $^{\circ}$ C^[8]。

1.9 对胶原蛋白-肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成的影响 取体质量 18~22 g 雄性昆明小鼠若干,按体重随机分组,每组 12 只。除溶媒对照组小鼠给予纯水外,其余各组小鼠每日按剂量灌胃给予相应药物 1 次,连续 20 d,给药容积为 20 mL/kg。末次给药 1 h 后,所有小鼠尾静脉注射胶原蛋白-肾上腺素混合诱导剂 0.1 mL,胶原蛋白与肾上腺素浓度分别为 0.6 mg/mL、0.05 mg/mL。立即观察并记录小鼠偏瘫情况,5 min 内死亡情况,15 min 内偏瘫恢复情况。计算偏瘫恢复率^[9-10]。

1.10 对高分子右旋糖酐致急性血瘀模型大鼠血液流变性的影响 取体质量 180~220 g 雄性 SD 大鼠若干,按体重随机分组,每组 12 只,除溶媒对照组和模型对照组大鼠给予纯水外,其余各组大鼠每日按剂量灌胃给予相应药物 1 次,连续 22 d,给药容积为 10 mL/kg。末次给药 30 min 后,除空白组外,其余各组大鼠尾静脉注射 8% 右旋糖酐生理盐水溶液(5 mL/kg),制造急性血瘀模型。30 min 后,腹腔注射 3.5% 水合氯醛溶液麻醉,使用肝素抗凝血管从腹主动脉采血,立即使用 MVIS-2015 全自动血液流变分析仪检测血液流变学各项指标^[11-14]。

1.11 统计方法 抗血栓实验:统计各组实验动物某一

状态下的数目及相应百分比。试验数据采用 χ^2 检验。

止血与活血散瘀实验:结果以 $\bar{x}\pm S.D(n)$ 表示, n 代表每组动物数目。组间数据比较方差分析进行检验,以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 药材提取与大孔树脂柱层析 提取得到干燥的总提物 1.38 kg,得率 23%。水洗脱部位 370 g,30%乙醇洗脱部位 82 g,70%乙醇洗脱部位 330 g,得率分别为:9.25%、2.05%、8.25%。

2.2 HPLC 法测定三七素的含量 对三七总提物和各划段样品进行了三七素含量检测。结果显示,总提物和水洗脱部位中含有三七素,含量分别为 1.13%和 2.78%。30%和 70%乙醇洗脱部位均未检测到三七素。

如表 2 所示。

2.3 紫外分光光度法测定总皂苷的含量 三七总皂苷测定结果显示,总提物中含量为 32.51%。70%乙醇洗脱部位中含量最高,达 83.61%。30%乙醇洗脱部位中含量为 52.39%,水洗脱部位中含量为 0%。如表 2 所示。

2.4 HPLC 法测定 5 种主要皂苷的含量 与三七总皂苷对照品比较,对 30%和 70%乙醇洗脱部位中的 5 种主要皂苷(三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 R_{g1} ,人参皂苷 R_e ,人参皂苷 R_{b1} ,人参皂苷 R_d)进行了测定。5 种皂苷在 70%乙醇洗脱部位中均有检出,而 30%乙醇洗脱部位中仅检出三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 R_{g1} ,人参皂苷 R_e 。如图 1 所示。含量计算如表 2 所示。

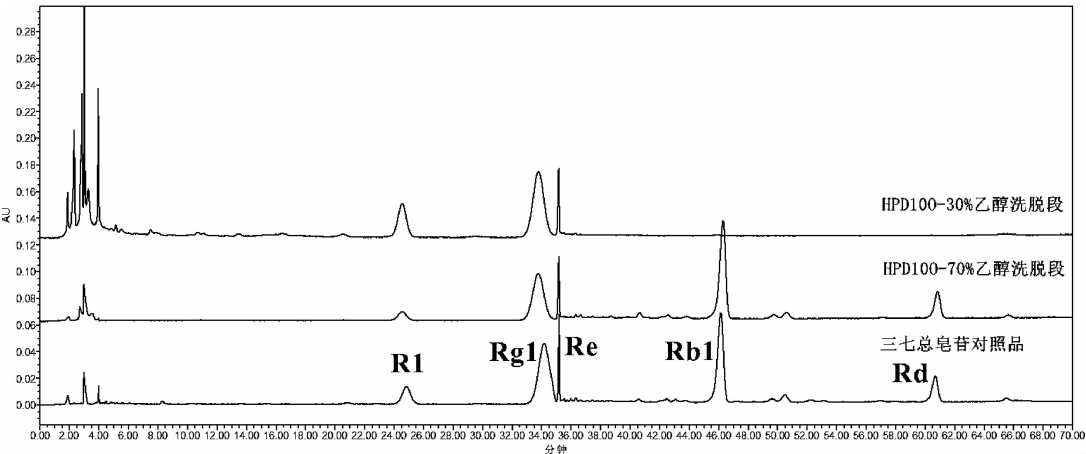


图 1 三七划段样品及三七总皂苷液相色谱图

表 2 各样品中三七素、总皂苷及 5 种主要皂苷的含量

样品	三七素	总皂苷	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g1}	人参皂苷 R_e	人参皂苷 R_{b1}	人参皂苷 R_d
总皂苷对照品	—	—	7.4%	26.3%	3.7%	27.7%	7.6%
总提物	1.13%	32.51%	—	—	—	—	—
水洗脱部位	2.78%	0%	—	—	—	—	—
30%乙醇洗脱部位	0%	52.39%	18.5%	35.0%	4.4%	0%	0%
70%乙醇洗脱部位	0%	83.61%	4.6%	25.1%	4.1%	38.5%	10.1%

注:“—”表示未检测

2.5 对小鼠断尾出血时间与玻片凝血时间的影响 与溶媒对照组比较,总提物的低、中、高剂量组出血时间与凝血时间均显著缩短($P<0.05$),如表 3 所示。与溶媒对照组比较,3 个洗脱部位样品的低、中、高剂量组出血时间均显著缩短($P<0.05$);水洗脱部位的低、高剂量组凝血时间均显著缩短($P<0.05$),30%乙醇洗脱部位和 70%乙醇洗脱部位的高剂量组凝血时间显著缩短($P<0.05$),如表 4 所示。

表 3 总提物对小鼠出血时间与凝血时间的影响

($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量(g/kg)	出血时间(min)	凝血时间(min)
溶媒对照	—	41.79±9.55	2.92±0.82
云南白药	3.0	28.63±8.43*	2.00±0.67*
总提物低剂量	0.5	27.25±11.49*	2.17±0.72*
总提物中剂量	1.0	32.79±9.92*	2.17±0.78*
总提物高剂量	2.0	31.75±9.97*	2.17±0.91*

注:与溶媒对照组比,* $P<0.05$

表 4 3 个洗脱部位对小鼠出血时间和凝血时间的影响
($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	出血时间 (min)	凝血时间 (min)
溶媒对照		24.08±5.69	2.54±0.89
云南白药	3.0	12.46±5.48*	1.75±0.75*
水洗脱部位低剂量	0.5	16.21±4.93*	1.79±0.78*
水洗脱部位高剂量	1.0	18.58±3.34*	1.58±0.63*
30%乙醇洗脱部位低剂量	0.5	19.38±4.96*	1.92±0.73
30%乙醇洗脱部位高剂量	1.0	17.25±5.75*	1.46±1.01*
70%乙醇洗脱部位低剂量	0.5	19.46±5.35*	1.96±0.69
70%乙醇洗脱部位高剂量	1.0	16.92±6.53*	1.71±0.66*

注:与溶媒对照组比,* $P<0.05$

2.6 对胶原蛋白—肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成的影响 与溶媒对照组比较,总提物的低、中、高剂量组小鼠偏瘫恢复率显著升高 ($P<0.05$),如表 5 所示。与溶媒对照组比较,30%乙醇洗脱部位的高剂量组小鼠偏瘫恢复率显著提高($P<0.05$)。如表 6 所示。

表 5 总提物对胶原蛋白—肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成的影响

组别	剂量 (g/kg)	样本数	偏瘫数	5 min 内死 亡数	15 min 内偏瘫 恢复数	15 min 内偏瘫 恢复率
溶媒对照组		12	11	11	0	0
阿司匹林	0.16	12	12	8	4	33.33%*
总提物低剂量	0.25	12	12	8	4	33.33%*
总提物中剂量	1.0	12	12	8	4	33.33%*
总提物高剂量	2.0	12	12	6	6	50.00%*

注:与溶媒对照组比,* $P<0.05$

表 7 总提物对血瘀大鼠血液流变性的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量(g/kg)	血黏度(mPa/s)			
		200(s ⁻¹)	100(s ⁻¹)	30(s ⁻¹)	3(s ⁻¹)
溶媒对照	--	6.38±0.37	7.20±0.43	8.88±0.56	13.28±0.91
模型对照	--	12.01±1.40 [#]	13.73±1.63 [#]	17.34±2.11 [#]	27.69±3.55 [#]
金纳多	0.15	10.56±0.92*	12.05±1.07*	15.16±1.40*	23.52±2.35*
总提物低剂量	0.5	10.81±1.23*	12.34±1.40*	15.52±1.76*	24.07±2.75*
总提物中剂量	1.0	10.32±1.19*	11.75±1.38*	14.74±1.80*	22.71±2.95*
总提物高剂量	2.0	10.70±0.91*	12.22±1.02*	15.39±1.32*	23.76±2.18*

注:与溶媒对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比,* $P<0.05$

3 讨论

提取与大孔树脂柱划段研究中,采用 70%乙醇提取,能较大范围地提取三七化学成分。根据大孔树脂柱特性,水洗脱部位富集了较多强极性化合物,如:三

表 6 3 个洗脱部位对胶原蛋白—肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成的影响

组别	剂量 (g/kg)	样本数	偏瘫数	5 min 内死 亡数	15 min 内偏瘫 恢复数	15 min 内偏瘫 恢复率
溶媒对照		12	12	12	0	0
阿司匹林	0.2	12	12	7	5	41.67%*
水洗脱部位低剂量	0.45	12	12	10	2	16.67%
水洗脱部位高剂量	0.9	12	12	10	2	16.67%
30%乙醇洗脱部位低剂量	0.45	12	12	9	3	25.00%
30%乙醇洗脱部位高剂量	0.9	12	12	8	4	33.33%*
70%乙醇洗脱部位低剂量	0.45	12	12	11	1	8.33%
70%乙醇洗脱部位高剂量	0.9	12	12	11	1	8.33%

注:与溶媒对照组比,* $P<0.05$

2.7 对高分子右旋糖酐致急性血瘀模型大鼠血液流变性的影响 与溶媒对照组比较,造模后所有大鼠均出现口唇紫绀、舌质暗红、足趾肿大等现象,模型组大鼠的血液黏度在不同切变率下均升高,且具有显著性差异($P<0.05$),表明造模成功。与模型对照组比较,总提物的低、中、高剂量组血瘀大鼠的血液黏度在不同切变率下均显著降低($P<0.05$),如表 7 所示。与模型对照组比较,30%乙醇洗脱物和 70%乙醇洗脱物的低、高剂量组血瘀大鼠的血液黏度在不同切变率下均显著降低($P<0.05$)。如表 8 所示。

七素、多糖、强极性苷类等。随着洗脱剂中乙醇含量增加,所得洗脱物极性减小,30%和 70%乙醇洗脱部位能较多地富集核苷、黄酮苷、三萜苷及其苷元等化合物^[15-16]。成分分析表明,三七素仅存在与水洗脱部位

表 8 3 个洗脱部位对血瘀大鼠血液流变性的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量(g/kg)	给药途径	血黏度(mPa/s)			
			200(s ⁻¹)	100(s ⁻¹)	30(s ⁻¹)	3(s ⁻¹)
溶媒对照		ig	6.57±0.45	7.48±0.66	9.40±1.37	14.71±4.40
模型对照		ig	12.22±0.84 [#]	13.92±0.94 [#]	17.46±1.15 [#]	26.94±1.74 [#]
金纳多	0.15	ig	11.28±1.01 [*]	12.83±1.18 [*]	16.04±1.54 [*]	24.59±2.57 [*]
水洗脱部位低剂量	0.3	ig	11.68±1.11	13.30±1.27	16.68±1.62	25.71±2.58
水洗脱部位高剂量	0.6	ig	11.73±1.14	13.35±1.31	16.73±1.66	25.76±2.64
30%乙醇洗脱部位低剂量	0.3	ig	11.10±1.20 [*]	12.63±1.40 [*]	15.79±1.82 [*]	24.23±3.02 [*]
30%乙醇洗脱部位高剂量	0.6	ig	11.23±0.54 [*]	12.78±0.62 [*]	15.99±0.82 [*]	24.54±1.38 [*]
70%乙醇洗脱部位低剂量	0.3	ig	10.73±1.87 [*]	12.17±2.12 [*]	15.18±2.67 [*]	23.16±4.16 [*]
70%乙醇洗脱部位高剂量	0.6	ig	10.60±1.20 [*]	12.03±1.38 [*]	15.00±1.76 [*]	22.85±2.82 [*]

注:与溶媒对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型对照组比,^{*} $P<0.05$

中。三七皂苷仅存在于 30%和 70%乙醇洗脱部位中,且两个洗脱部位中的 5 种主要皂苷在含量与种类上存在较大差异,这与提取原理相符。三七素和部分黄酮类化合物为三七的止血活性成分^[17],活血化瘀及抗血栓的活性成分则是三七皂苷^[18],这也与药效研究结果相符。

止血实验中,小鼠断尾出血时间的长短主要与血小板与毛细血管功能有关;凝血实验中,离体血液与带阴离子电荷的玻璃片接触时,XII因子被激活,其后一系列凝血因子相继活化,纤维蛋白原转化变为纤维蛋白^[19]。出血时间与凝血时间的测定结果表明各部位具有止血作用,其中水洗脱部位活性较好,为止血的主要活性部位。推测止血作用可能与改善毛细血管及血小板功能,活化凝血因子XII,促使纤维蛋白原转变为纤维蛋白有关^[8],这有待后期进一步验证。血瘀患者血液黏稠,血流缓慢,血小板易在血管内膜黏着,容易引起血栓形成。此外,血栓与血瘀症在发病机制与基础上有许多共通之处。活血散瘀药可通过改善血液流变学特性,减少血小板黏着和聚集,改善血瘀症高凝状态,从而达到抗血栓和活血散瘀的作用^[20-21]。因此,我们从血栓与血瘀两种模型同时考察样品的活血作用。肾上腺素和胶原蛋白均为血小板聚集诱导剂,二者合用产生协同作用,诱导血小板聚集、释放、黏附,诱发血栓的形成^[22]。实验结果表明,30%乙醇洗脱部位能提高偏瘫小鼠的恢复率,是抗血栓的主要活性部位。红细胞聚集是血液黏度增加的主要原因。高分子右旋糖酐的架桥作用可引起红细胞高度聚集,从而引起血液黏度增加,血液流变性改变,使血液呈黏、

浓、聚状态^[23]。实验结果表明,30%和 70%乙醇洗脱部位具有明显的活血散瘀作用,为三七活血散瘀的主要活性部位。由此推断三七的活血机制可能与抑制血小板反应和红细胞聚集,降低血黏度,改善微循环有关^[24],这有待后期深入研究。给药 4 d 可缩短出血时间与凝血时间,给药 22 d 可抑制血栓形成,降低血液黏度。这可能与用药时间和活性成分相关。

在本实验设计与条件下,水洗脱部位的三七素含量最高,止血作用最强,30%和 70%乙醇洗脱部位中主要皂苷的种类与含量存在着较大差异,药效研究显示,30%乙醇洗脱部位为抗血栓的主要活性部位,30%和 70%乙醇洗脱部位均为活血散瘀作用的主要活性部位。本文从大孔树脂划段,成分比较分析,药效对三七进行了系统地实验,在一定程度上丰富了三七的研究成果。后期我们将对活性部位展开进一步研究,为三七标准化的建立提供理论依据。

参考文献:

[1] 黄天卫. 浅谈文山三七产业发展的现状及对策[J]. 云南科技管理,2003,16(5):60-63.
[2] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:12.
[3] 冯陆冰,潘西芬,孙泽玲. 三七的药理作用研究进展[J]. 中国药师,2008(10):1185-1187.
[4] 李琳,王承潇,曲媛,等. 反相离子对色谱法测定三七中三七素含量[J]. 中国中药杂志,2015,40(20):4026-4030.
[5] 赵昶灵,杨生超,陈中坚,等. 紫、绿三七的总花色苷和总皂苷含量及皂苷单体组成 [J]. 中药材,2014,37(10):1749-1753.
[6] 万晓青,夏伯侯,楼招欢,等. 三七不同炮制品中皂苷类成

- 分的含量比较[J]. 中华中医药杂志, 2011(4):841-843.
- [7] 周新惠, 赵荣华, 张荣平, 等. 三七不同加热炮制品中 5 种皂苷类成分的含量测定 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6):11-14.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011:518.
- [9] Myers A, Papadopoulos A, O'Day D, et al. Sexual differentiation of arachidonate toxicity in mice [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1982, 222(2):315-318.
- [10] HECHLER B, NONNE C, ROH E J, et al. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(2):556-563.
- [11] 杨涛, 胡昌江, 李文兵, 等. 生、熟大黄对高分子右旋糖酐所致血瘀大鼠血液流变性的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(21):248-250.
- [12] YAN T H, DU B S, YANG W, et al. Effects of salidroside on hemorheology and myocardial ischemic reperfusion injury in isolated heart of rats[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2008, 6(3):219-222.
- [13] 黄静, 蒋伟哲, 谭建宁, 等. 姜精油对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响 [J]. 中国药房, 2012, 23(11):969-971.
- [14] 汪素娟, 康安, 狄留庆, 等. 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(5):626-631.
- [15] 林伟鑫, 姚曦, 李勇, 等. 三七总皂苷提取、大孔树脂纯化工艺研究[J]. 食品与药品, 2015(3):156-161.
- [16] 乔丽菲, 孙承韬, 王宏运, 等. 复方栝楼桂枝汤的大孔树脂纯化工艺研究[J]. 江西中医药, 2017, 48(7):55-59.
- [17] 徐冬英, 潘会君. 三七止血作用的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(2):224-225.
- [18] 周新惠, 赵荣华, 张荣平, 等. 三七不同加热炮制品中 5 种皂苷类成分的含量测定 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6):11-14.
- [19] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:684-687.
- [20] 武双, 郭从亮, 崔秀明, 等. 炮制前处理对三七中三七皂苷含量的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 37(24):2208-2212.
- [21] 孙思, 陈亮, 王鑫, 等. 三七不同炮制品中抑制血管紧张素转化酶活性差异及人参皂苷 Rg1 和 Rb1 的含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 31(2):127-130.
- [22] 轻曼古丽·阿吉, 马虎, 美合热阿依·伊萨克, 等. 槲寄生黄酮对血栓形成和血小板聚集作用的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(7):1589-1592.
- [23] WOLDHUIS B, TANGELDER G J, SLAAF D W, et al. Influence of dextrans on platelet distribution in arterioles and venules [J]. Pflügers Archiv, 1993, 425(3-4):191-198.
- [24] 谢茵, 邢桂琴, 刘秀芬. 三七提取液中三七总皂苷的分离纯化工艺研究 [J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(6):613-615.