

防风超临界提取物的止血作用

高英¹, 李卫民¹, 荣向路¹, 吴清和¹, 冯毅凡², 郭晓玲², 孟青²

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广东药学院, 广东 广州 510224)

防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 为辛温解表药, 功能解表祛风、胜湿、止痉; 用于治疗感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风。文献记载防风炒炭, 尚可用于治肠风下血^[1]。《圣济总录》载“防风散”取防风单味去叉生用, 治妇人经血不止、肝经受风, 留伏不散, 以致血得风而溢泄、倒经; 《张氏医通》载“防风散”注明防风(勿见火)主治风入胞门, 崩漏下血, 色清淡者; 《校注妇人良方》载“防风散”防风上为末, 每服一钱, 白汤调下, 主治肝经有风, 以致血得风而流散不归经, 妊娠卒然下血者。《卫生宝鉴》之防风汤、《景岳全书》之防风黄芩丸均以防风研末生用治疗血症。说明防风生用能治疗血症, 但未见现代医学关于防风止血的药理研究。近年来发展的超临界流体萃取技术, 其接近室温的提取条件与防风止血生用的要求相吻合。本实验将超临界(supercritical fluid extraction, SFE)提取的防风油进行成分分析, 并对其止血作用及作用机制进行研究。

1 材料

1.1 药品与试剂: 防风水提液为自制, 相当于生药 1 g/mL; 维生素 K₄片, 太原卫星制药厂出品, 批号 20010416; 氨甲苯酸注射液, 扬州制药有限公司出品, 批号 0110203; 安络血(肾上腺素腺片), 江苏林海药业有限公司出品, 批号 0108211; 止血敏(酚磺乙胺注射液), 江苏江阴制药厂出品, 批号 011107; 凝血酶原时间(PT)试剂盒、活化部分凝血激酶时间(APTT)试剂盒, 均为 Pacific Hemostasis 公司产品; 二磷酸腺苷(ADP): 由 Sigma 公司提供。乙腈为色谱纯。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器: 5 L—SFE 超临界 CO₂ 萃取装置(广州市轻工研究所制造); HP5890 I GC/HP5972MS 气相色谱/质谱联用仪(美国惠普公司); QX—200 全血血小板聚集仪(上海医科大学仪器厂出品)。

1.3 实验动物: NIH 小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g, SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 200~250 g, 均由广东

省医学实验动物中心提供, 合格证号分别为: 2000A025、2000A026。

2 方法与结果

2.1 SFE 提取物的成分分析及含量测定: SFE 提取方法: 将药材粉碎成粗粉, 装入超临界萃取罐中, 以压力为 22 MPa、温度为 35 ℃、流量为 22 L/h 的条件萃取 4 h; 以压力为 6.5 MPa、温度为 36 ℃ 进行解析, 萃取出浅棕红色半透明的油状物即得, 萃取得率 4%~4.5%^[2]。GC/MS 分析检索, 防风 SFE 提取物中分离出 17 个色谱峰, 鉴定出 11 个化合物, 占气化产物总量的 73.00%; 其中主要成分人参醇占 51.97%。样品的含量测定: 气相色谱测得防风 SFE 提取物中含人参醇 14.38%。

2.2 防风 SFE 提取物的止血实验及结果

2.2.1 小鼠出血时间的测定(断尾取血法)^[3]: 取 NIH 小鼠, 雌雄各半, 随机分为空白对照组、防风水提液(3.6 g/kg)组、安络血(3.65 mg/kg)、防风 SFE 提取物(0.4、1.2、3.6 g/kg)组, 均 ig 给药, 空白对照组 ig 等体积蒸馏水。药后 1 h 用小鼠固定架将小鼠固定, 以毫米尺测量鼠尾长度并标记, 然后分别用利剪将鼠尾尾尖 3 mm 处横断, 待血液自行溢出时开始计时, 每隔 30 s, 用滤纸吸去血液一次, 直至血溢自行停止(滤纸吸时无血为止), 即为出血时间。结果见表 1。防风 SFE 提取物高剂量组与空白对照组比较, 在缩短出血时间方面差异极显著($P < 0.001$); 与水提液组及安络血组比较, 差异非常显著($P < 0.01$)。说明防风 SFE 提取物对缩短出血时间的作用优于同剂量的防风水提液组及安络血组。

2.2.2 大鼠 PT 测定^[3]: 取 SD 大鼠, 分组及给药方式同 2.2.1 项各组剂量, 见表 2。每天 ig 1 次, 连续 6 d, 末次给药 1 h 后, 大鼠用 10% 乌拉坦 ip 20 mL/kg 麻醉, 用内置有 0.2 mL 枸橼酸钠溶液(109 mmol/L)的塑料注射器穿刺心脏取血 1.8 mL, 置离心管内, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层澄清血浆备用。取试管 3 支, 每管分别加入 PT 试剂和

收稿日期: 2004-05-18

作者简介: 高英(1956—), 女, 河北省石家庄人, 主任中药师, 学士学位, 已发表论文 40 余篇, 副主编专著两部, 研究方向为中药新药研究与开发及中药有效部位的研究。Tel: (020) 36585824 E-mail: liwimi@pub.guangzhou.gd.cn

CaCl₂溶液 (25 mmol/L) 各 0.1 mL,再加入大鼠血浆 0.1 mL,混匀后放入 37 ℃ 的水浴箱中,同时开始计时,轻摇试管,记录纤维蛋白凝固,液面不动时所需时间,求 3 管平均值为每只大鼠 PT 值。结果见表 2。防风水提液组,防风 SFE 提取物中、高剂量组及安络血组分别与空白对照组比较,在缩短 PT 方面均有显著差异 ($P<0.001$),而防风 SFE 提取液低剂量组与空白对照组比较亦有显著差异 ($P<0.01$),说明防风 SFE 提取物在缩短 PT 这一止血阶段有较强的作用。

表 1 防风 SFE 提取物对小鼠出血时间的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of SFE from *S. divaricata* on bleeding time in mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	出血时间/s
对照	12	—	236.60±65.11
防风水提液	11	3 600	212.60±88.95
安络血	10	3.65	184.00±63.67
防风 SFE 提取物	8	400	226.50±133.35
	9	200	173.74±86.28
	9	3 600	110.88±39.24***△*

与对照组比较:*** $P<0.001$; 与水提液组比较:△ $P<0.01$; 与安络血组比较:* $P<0.01$

*** $P<0.001$ vs control group; △ $P<0.01$ vs aqueous extract group; * $P<0.01$ vs Carbazochrome group

表 2 防风 SFE 提取物对大鼠 PT 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of SFE from *S. divaricata* on PT in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PT/s
对照	—	21.78±2.70
防风水提液	1 600	18.34±1.46***
安络血	0.134	16.16±1.66***
防风 SFE 提取物	400	18.24±1.24**
	800	17.48±2.90***
	1 600	13.85±2.51***

与对照组比较:** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

2.2.3 大鼠 APTT 的测定^[3]:SD 大鼠分组及给药方法、剂量同 2.2.2 项[以维生素 K₄(0.112 mg/kg)代替安络血为阳性对照]。末次给药 1 h 后,按 2.2.2 组方法制备血浆,取试管 1 支,加入经过充分混合的 APTT 试剂和受检血浆各 0.1 mL,置 37 ℃ 水浴箱中预温 3 min,然后加入已预温至 37 ℃ 的 CaCl₂溶液 (25 mmol/L) 0.1 mL,立即计时,不停倾斜试管,使其混合均匀,每隔 15 s 即从水浴箱中取出试管,缓慢倾斜,至纤维蛋白丝刚出现时,准确记录 APTT。结果见表 3。维生素 K₄组,防风 SFE 提取液低、中、高剂量组分别与空白对照组比较,缩短 APTT 差异极显著 ($P<0.001$),防风水提液组与

空白对照组比较差异非常显著 ($P<0.01$),而防风 SFE 提取液组与水提液组比较,同样存在显著差异 ($P<0.01$),说明防风 SFE 提取液在缩短 APTT 方面有较强的作用。

表 3 防风 SFE 提取物对大鼠 APTT 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Effect of SFE from *S. divaricata* on APTT in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	APTT/s
对照	—	22.99±2.12
防风水提液	1 600	18.98±2.73**
维生素 K ₄	0.112	17.41±2.96***
防风 SFE 提取物	400	18.76±1.73***
	800	17.84±1.79***
	1 600	16.09±2.27***△

与对照组比较:** $P<0.01$ *** $P<0.001$

与水提液组比较:△ $P<0.05$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

△ $P<0.05$ vs aqueous extract group

2.2.4 大鼠优球蛋白溶解时间 (ELT) 的测定^[3]:取 SD 大鼠,分组及给药方法、剂量同 2.2.2 项(以氨甲苯酸为阳性对照),氨甲苯酸组第 1~5 天 ig 等体积蒸馏水,第 6 天 ip 氨甲苯酸溶液 0.112 mg/kg。给药 1 h 后,制备血浆,方法同 2.2.2 项。取血浆 0.5 mL 加蒸馏水至 9 mL,加 0.1 mL 10% 醋酸,调 pH 为 4.5,充分混合后置 4 ℃ 冰箱,使优球蛋白充分析出,10 min 后取出,3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,将试管倒立在滤纸上,使管内水流干。加硼酸 (pH=9) 0.5 mL 于试管中,用玻棒轻搅拌 1 min。将试管放入 37 ℃ 水浴 2 min 后,加入 CaCl₂溶液 (25 mmol/L) 0.5 mL,待其凝固时开始计时。每隔 10 min 观察 1 次,直至凝块完全溶解为止,记录其溶解所需时间。ELT 测定须在 30 min 内完成。结果见表 4。除了氨甲苯酸组与空白对照组 ELT 差异显著外 ($P<0.05$),其余各组均无明显差异,但从结果来看,防风 SFE 组间呈现明显的剂量依赖关系,随着剂量的增加,ELT 亦随之延长。

表 4 防风 SFE 提取物对大鼠 ELT 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of SFE from *S. divaricata* on ELT in rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	出血时间/s
对照	8	—	53.43±74.65
防风水提液	10	1 600	62.00±35.03
氨甲苯酸	8	0.112	104.43±52.26*
防风 SFE 提取物	9	400	65.63±43.53
	8	800	85.43±43.67
	7	1 600	94.33±56.35

与对照组比较:* $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

2.2.5 大鼠血小板聚集实验(电阻法)^[3]:取 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200~250 g,分组及给药方法、剂量同 2.2.2 项(以止血敏为阳性对照),每天给药 1 次,连续 3 d,止血敏组第 1、2 天 ig 等体积蒸馏水,末次给药时则 ip 止血敏 0.08 mL/100 g (100 mg/kg)。实验前禁食 12 h,然后以 10% 乌拉坦 20 mL/kg ip 麻醉,用内置有 0.1 mL 的枸橼酸钠溶液 (3.4%) 的塑料注射器穿刺心脏取血 0.9 mL,混合均匀后,用 0.5 mL 定量移液器分装于两只试管内,置于试管架中,试管内的血液应无气泡,按 QX—200 全血血小板聚集仪说明书操作部分进行电阻测定。结果见表 5。防风 SFE 提取液低、中、高剂量组与空白对照组比较,虽然差异无显著性,但存在着剂量依赖关系,随着剂量的增加,血小板聚集趋势亦逐渐增强(电阻法测定是以两片电极插入抗凝血中,以两电极间电阻的变化反映血小板聚集程度)。

3 讨论

出血时间是指血液冲破毛细血管,自出血到自然止血所需的时间。其长短与毛细血管功能、组织收缩力、组织因子、血小板的数量和功能、纤溶等因素有关。其中影响最大的是血小板和毛细血管功能,凝血因子次之。PT 是监测口服抗凝剂治疗最常用的方法,它可以综合地反映凝血因子 II、VII 和 X 的血浆水平。它和 APTT 测定是临床工作中诊断机体止血过程凝血系统病理变化的重要指标。本实验显示防风 SFE 提取物可以明显缩短小鼠出血时间和大鼠

表 5 防风 SFE 提取物对大鼠血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of SFE from *S. divaricata* on platelet

aggregation in rats ($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物/只	剂量/(mg · kg ⁻¹)	电阻值/Ω
对照	11	—	0.98 ± 1.06
防风水提液	9	1 600	0.60 ± 0.44
止血敏	9	100	0.59 ± 0.92
防风 SFE 提取物	9	400	0.78 ± 1.10
	9	800	1.03 ± 0.66
	9	1 600	1.22 ± 0.71

PT 及 APTT,提示其可能具有促凝血作用。本实验还显示防风 SFE 提取物有延长大鼠 ELT 的趋势,且有剂量依赖性,提示其可能具有降低纤溶活性的作用。血小板聚集实验也显示防风 SFE 提取物有促血小板聚集的趋势。防风常用的提取方法为水煎煮,因此本实验以防风水提液作为对照。与水提液相比,防风 SFE 提取物是在较高压力、低温 (36 ℃ 以下) 条件下得到的,能更有效地保护防风所提成分不受破坏。综合以上实验可以初步得出结论,防风 SFE 提取物具有一定的止血作用,与古文献记载相吻合。

References:

- [1] Lei Z Q. *Chinese Materia Medica* (中药学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1995.
- [2] Li W M. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Technology of Supercritical Fluid Extraction* (中药现代化与超临界流体萃取技术) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2002.
- [3] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.

欢迎订阅《中草药》杂志 2000 年~2002 年增刊

2000 年第 31 卷增刊以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容,收载论文 112 篇,共 210 页(约 40 万字),特邀国内中药化学、药理、制剂、分析方面的知名专家和学科带头人撰写专论文章 14 篇。

2001 年第 32 卷增刊为“第三届中药新药研究与开发信息交流会”会议论文集,特邀了中国工程院院士、国内十多名专家和中青年学科带头人就加快中药现代化的进程、我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章 20 多篇,另有反映近年来中药化学、药理分析、制剂、药材及临床等方面的科研论文和综述文章 140 多篇。

2002 年第 33 卷增刊以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容,收载论文 107 篇,共 218 页(约 40 万字)。国内研究的热点“中药指纹图谱”为专论重点,刊登相关综述及实验论文 10 余篇。另有中药化学成分、制剂分析、药理实验和临床,以及中药材方面的科研论文和综述文章。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高,科学性强,欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅。

地址:天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编:300193

电话:(022)27474913 23006821(传真)

E-mail:zcyzjb@tjpr.com