

## 三七蒸制前后主要活性成分体内药动学及其抗血小板聚集活性比较研究

狄亚维, 康 安, 狄留庆\*, 钱 静, 李俊松, 单进军, 赵晓莉, 毕肖林

南京中医药大学药学院, 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏 南京 210046

**摘要:** **目的** 研究不同蒸制时间(0、2、4、8 h)三七主要活性成分变化、体内药动学和抗血小板聚集活性之间的关系。**方法** 采用高效液相色谱(HPLC-UV)法分析三七蒸制前后主要活性成分变化;大鼠 ig 500 mg/kg 不同蒸制时间的三七样品液后于不同时间点眼眶取血,超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定三七蒸制前后主要皂苷的血药浓度,运用 DAS 3.2.6 软件计算各成分的药动学参数;采用 PAPE-I 型血小板聚集/血凝测定仪检测抗血小板聚集活性。**结果** 蒸制过程降低了生物活性物质三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>d</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub> 的水平,并产生了新的成分人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>2</sub>、R<sub>g</sub><sub>3</sub>、R<sub>h</sub><sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、R<sub>k</sub><sub>3</sub>、R<sub>h</sub><sub>4</sub>。人参皂苷 R<sub>b</sub><sub>1</sub>、R<sub>d</sub> 的脱糖基代谢产物人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>3</sub> 与原型皂苷人参皂苷 R<sub>b</sub><sub>1</sub> 比较,  $t_{\max}$  略有降低,表明脱糖基之后吸收速度加快。蒸三七比生三七有更明显的抗血小板聚集活性,且随着蒸制过程的延长,抗血小板聚集活性更强。**结论** 三七蒸制后,皂苷类成分脱糖基后可能产生活性更强的成分,某些脱糖基代谢产物更易吸收入血,可能导致抗凝血活性增强。**关键词:** 三七; 蒸制; 人参皂苷; 药动学; 血小板聚集; 脱糖基

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)01-0095-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.014

## Comparative study on contents and pharmacokinetics of raw and steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* and its anti-platelet aggregation activity

DI Ya-wei, KANG An, DI Liu-qing, QIAN Jing, LI Jun-song, SHAN Jin-jun, ZHAO Xiao-li, BI Xiao-lin

Nanjing Engineering and Technological Research Center of TCM Pellets, Jiangsu Province (TCM) Key Laboratory of Children's Respiratory Disease, Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology, Research Center of High Efficient Drug Delivery System, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

**Abstract: Objective** To compare the relationship of ingredients and pharmacokinetics of steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* (the roots of *Panax notoginseng*) with different time (0, 2, 4, and 8 h), and accompany with its anti-platelet aggregation activity. **Methods** The components with different steaming duration were determined by HPLC method. Concentration of saponins in *Notoginseng Radix et Rhizoma* before and after steaming at different time points were detected by UPLC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters of each compound were calculated using DAS 3.2.6 software. The anti-platelet aggregation activity was measured by platelet aggregation/clotting analyzer. **Results** The results showed that the steaming process reduced the contents of certain bioactive substances (NG-R<sub>1</sub>, R<sub>g</sub><sub>1</sub>, R<sub>d</sub>, R<sub>b</sub><sub>1</sub>, and R<sub>e</sub>) and produced some new components (R<sub>h</sub><sub>1</sub>, R<sub>g</sub><sub>3</sub>, R<sub>k</sub><sub>3</sub>, and R<sub>h</sub><sub>4</sub>). Ginsenoside R<sub>g</sub><sub>3</sub>, deglycosylated metabolites of ginsenoside R<sub>b</sub><sub>1</sub> possessed lower  $t_{\max}$  than ginsenoside R<sub>b</sub><sub>1</sub> that indicated the course of deglycosylation made faster absorption. Steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* had stronger antiplatelet activity, following higher antiplatelet and anticoagulant activities with increasing steaming durations. **Conclusion** The results inspire us that saponins may become more active ingredients after deglycosylation, saponins with deglycosylated *in vitro* become more and more active ingredients into the blood, which could make stronger anticoagulant activity.

**Key words:** *Notoginseng Radix et Rhizoma*; steaming; ginsenoside; pharmacokinetics; platelet aggregation; deglycosylation

三七 *Notoginseng Radix et Rhizoma* 系五加科 (Araliaceae) 植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根, 生三七粉和熟三七粉是三七最

常用的 2 种饮片形式, 传统认为三七具有生消熟补的作用。三七经加工炮制为熟三七粉后, 具有补血强身作用, 多用于治疗贫血<sup>[1]</sup>。蒸三七滋养血液,

收稿日期: 2015-06-23

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 狄亚维 (1991—), 女, 硕士研究生。E-mail: 1611286761@qq.com

\*通信作者 狄留庆, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为中药高效给药系统设计与评价。E-mail: diliuqing@126.com

能增加贫血状态下血细胞数量<sup>[2]</sup>。三七含有一系列活性物质,包括三萜皂苷(人参皂苷、三七皂苷)、多糖、黄酮类和氨基酸等,其中皂苷类是其主要活性物质<sup>[3-4]</sup>。文献研究表明,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rg<sub>2</sub> 均具有抗凝血活性,人参皂苷 Rg<sub>2</sub> 活性高于 Rg<sub>1</sub><sup>[5]</sup>。三七蒸制过程中原人参二醇型(PPD)皂苷官能团(如人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rd)易选择性消除 C-20 位的糖链生成人参皂苷 Rg<sub>3</sub>,三七中原人参三醇型(PPT)皂苷官能团(三七皂苷 R<sub>1</sub> 和人参皂苷 Rf、Rg<sub>1</sub>、Re),先在 C-20 位脱糖基,随后在 C-6 位脱糖基,生成人参皂苷 Rg<sub>2</sub> 或 Rh<sub>1</sub>。人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在 C-20 位进一步脱水转化为人参皂苷 Rk<sub>3</sub> 和 Rh<sub>4</sub><sup>[6-7]</sup>。上述研究表明三七蒸制过程中皂苷类成分会发生明显变化,因此本实验研究三七蒸制前后皂苷类成分变化以及主要活性成分药动学和抗凝血活性的差异,以探索三七蒸制的科学性。

## 1 材料

### 1.1 仪器

AcquityTM 超高效液相色谱系统、Acquity Xevo TQD 质谱系统、Masslynx 4.1 色谱工作站、Waters e 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);Sartorius Bp211D 电子天平(德国 Sartorius 公司);Vortex-Genie 2 漩涡混合器(美国 Scientific Industries 公司);高速冷冻离心机、SpeedVac 离心浓缩仪(美国 Thermo Scientific 公司);高压灭菌器(Sanyo);减压干燥器(上海博讯实业有限公司);PAPE-I 型血小板聚集/血凝测定仪(北京世帝科学仪器有限公司)。

### 1.2 药品及主要试剂

三七药材购于云南文山,经南京中医药大学药学院刘圣金鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根;三七皂苷 R<sub>1</sub> 对照品(批号 110745-200617,质量分数>98%)、地高辛对照品(批号 130609,质量分数>98%),均购于中国食品药品检定研究院;人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Re、Rd、Rf、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub> 对照品(吉林大学有机化学教研室,质量分数>98%);人参皂苷 Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub> 对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号 130529、131128,质量分数>98%);阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司,每片含 100 mg 阿司匹林,批号 J20130078);胶原(5 mg,来源于大鼠, Sigma 公司)。

醋酸乙酯、正丁醇、无水乙醇(南京化学试剂

有限公司);乙腈、甲醇(德国 Merck 公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司);柠檬酸钠(上海久亿化学试剂有限公司);超纯水(Milli-Q 超纯水机制备)。

### 1.3 动物

SD 大鼠,雄性,体质量 180~220 g,扬州大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(沪)2013-0006,给药前 12 h 禁食不禁水。

## 2 方法与结果

### 2.1 三七蒸制样品的制备

取三七(产地云南,60 头,批号 130901,质量标准符合《中国药典》2010 年版一部)适量,破碎,分别于 120 °C 高压蒸制 0、2、4、8 h。称取不同蒸制时间的三七样品,加入 70%乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,滤液减压回收乙醇并浓缩,减压干燥成粉末。

### 2.2 蒸制前后主要活性成分变化

#### 2.2.1 溶液的制备

(1) 混合对照品溶液的制备:精密称取三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub>、Rd、Rg<sub>2</sub>、Rk<sub>3</sub>、F<sub>2</sub>、Rh<sub>4</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、Re、Rf 对照品适量,甲醇配成质量浓度分别为 0.45、0.295、0.477、0.234 67、0.273 5、1.163 5、0.305 3、0.227 4、0.148、0.231 5、0.476、1.042 mg/mL 的混合对照品贮备液。

(2) 供试品溶液的制备:取不同蒸制时间的三七粉末 20 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇,摇匀,超声 3 min(频率 100 Hz、功率 60 W)溶解,放冷至室温,精密加入甲醇至刻度,密塞,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 Thermo C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 35 °C;流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱程序:0~25 min, 20% A; 25~30 min, 20%~24% A; 30~42 min, 24%~46% A; 42~52 min, 46%~55% A; 52~61 min, 55%~68% A; 61~68 min, 68%~80% A; 检测波长 203 nm;进样量 10 μL;体积流量 1 mL/min。

2.2.3 线性关系考察 采用外标一点法定量,将对照品与供试品溶液多次在相同条件下进样,测得峰面积平均值。*i* 组分水平的计算公式如下:

$$W_i = A_i \cdot W_{is} / A_{is}$$

$W_i$ 、 $A_i$  分别是供试品溶液中所含 *i* 组分的质量及峰面积,  $W_{is}$ 、 $A_{is}$  分别是混合对照品溶液中所含 *i* 组分的质量及峰面积;使供试品与对照品峰面积接近,以避免工作曲线线性不好或截距不为 0 造成的误差

**2.2.4 精密度试验** 精密吸取“2.2.1”项下的同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，连续进样 5 次，各成分的 RSD 均小于 2.00%，表明仪器精密度良好。

**2.2.5 稳定性试验** 精密吸取“2.2.1”项下同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，测定峰面积。各成分 RSD 均小于 1.90%，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.2.6 重复性试验** 取同一蒸制时间（2 h）样品，按“2.2.1”项方法平行制备供试品溶液 5 份，测定峰面积。各成分 RSD 均小于 2.00%，表明本法重复性良好。

**2.2.7 加样回收率试验** 精密称取已知质量浓度的

样品 5 份（蒸制 2 h），分别精密加入三七皂苷  $R_1$  及人参皂苷  $R_{b1}$ 、 $R_{g1}$ 、 $R_d$ 、 $R_{g2}$ 、 $R_{k3}$ 、 $F_2$ 、 $R_{h4}$ 、 $R_{g3}$ 、 $R_{h1}$ 、 $R_e$ 、 $R_f$  对照品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液后，在“2.2.2”项色谱条件下进样，计算回收率，各组平均回收率均为 95.00%~105.00%，RSD 均小于 2.00%，表明回收率良好。

### 2.2.8 样品测定

取蒸制不同时间的三七样品，按“2.2.1”项方法制成供试品溶液，按“2.2.2”项色谱条件进行测定，平行测定 3 份。分别计算三七蒸制前后各成分水平变化，结果见表 1。

表 1 三七蒸制前后各成分水平变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Changes of components between raw and steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 成分            | 保留时间/min | 三七蒸制不同时间各成分质量分数/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) |                  |                  |                   |
|---------------|----------|-----------------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
|               |          | 0 h                                                 | 2 h              | 4 h              | 8 h               |
| 三七皂苷 $R_1$    | 16.70    | $6.49 \pm 0.12$                                     | $4.12 \pm 0.08$  | 未检出              | 未检出               |
| 人参皂苷 $R_{g1}$ | 23.60    | $39.84 \pm 0.75$                                    | $26.19 \pm 0.48$ | $2.67 \pm 0.05$  | 未检出               |
| 人参皂苷 $R_e$    | 24.80    | $2.61 \pm 0.05$                                     | $1.63 \pm 0.02$  | 未检出              | 未检出               |
| 人参皂苷 $R_f$    | 39.70    | $0.74 \pm 0.01$                                     | $0.59 \pm 0.01$  | $0.12 \pm 0.00$  | 未检出               |
| 人参皂苷 $R_{b1}$ | 40.70    | $14.73 \pm 0.28$                                    | $12.05 \pm 0.24$ | $4.25 \pm 0.08$  | $2.61 \pm 0.04$   |
| 人参皂苷 $R_{g2}$ | 41.60    | $0.72 \pm 0.01$                                     | $3.47 \pm 0.06$  | $5.60 \pm 0.11$  | $9.27 \pm 0.16$   |
| 人参皂苷 $R_{h1}$ | 42.10    | 未检出                                                 | $1.11 \pm 0.02$  | $2.37 \pm 0.04$  | $4.58 \pm 0.08$   |
| 人参皂苷 $R_d$    | 43.20    | $2.55 \pm 0.05$                                     | $2.04 \pm 0.04$  | $0.79 \pm 0.01$  | 未检出               |
| 人参皂苷 $F_2$    | 48.00    | 未检出                                                 | $1.53 \pm 0.02$  | $2.94 \pm 0.04$  | $4.94 \pm 0.09$   |
| 人参皂苷 $R_{k3}$ | 48.50    | 未检出                                                 | $7.76 \pm 0.11$  | $14.57 \pm 0.25$ | $33.57 \pm 0.54$  |
| 人参皂苷 $R_{h4}$ | 49.40    | 未检出                                                 | $24.53 \pm 0.45$ | $40.25 \pm 0.75$ | $127.26 \pm 1.85$ |
| 人参皂苷 $R_{g3}$ | 50.90    | $0.77 \pm 0.02$                                     | $1.38 \pm 0.01$  | $3.47 \pm 0.06$  | $7.15 \pm 0.14$   |
| 总量            | —        | $68.45 \pm 1.29$                                    | $86.40 \pm 1.55$ | $77.03 \pm 1.40$ | $189.38 \pm 2.91$ |

## 2.3 三七蒸制前后主要活性成分药动学比较

### 2.3.1 对照品溶液和内标溶液的制备

(1) 混合对照品溶液的制备：精密称定三七皂苷  $R_1$  及人参皂苷  $R_{g1}$ 、 $R_e$ 、 $R_{b1}$ 、 $R_{g3}$ 、 $R_{g2}$  对照品适量，甲醇配成质量浓度分别为 6.639、6.360、6.347、7.867、8.200、7.893  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合对照品贮备液。

(2) 内标溶液的制备：精密称取地高辛对照品，配制成 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标储备液，临用前甲醇稀释到 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**2.3.2 分组给药及血样采集** 20 只大鼠，随机分为 4 组，分别 ig 不同蒸制时间（0、2、4、8 h）的三七样品液（蒸制不同时间的三七粉末溶于 0.5% 的 CMC-Na 中配成 25  $\text{mg}/\text{mL}$  的溶液）500  $\text{mg}/\text{kg}$ ，给药前禁食 12 h，每只大鼠眼眶取 0.25 mL 空白血浆，给药后分别于 0.08、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、

12、24、48 h 眼眶取血 0.25 mL，5 000 r/min 离心 5 min，分离血浆， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.3.3 血浆样品处理** 精密量取 100  $\mu\text{L}$  大鼠含药血浆样品，加入 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标地高辛溶液 10  $\mu\text{L}$ ，涡旋 30 s，加入 1 mL 的萃取试剂水饱和正丁醇-醋酸乙酯（3：1），涡旋 3 min，6 000 r/min 离心 5 min，取 800  $\mu\text{L}$  上清液，45  $^{\circ}\text{C}$  离心浓缩仪挥干，进样前加入 80  $\mu\text{L}$  流动相复溶，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液，备用。

### 2.3.4 色谱与质谱条件

(1) 色谱条件：Acquity<sup>TM</sup> UPLC BEH  $C_{18}$  色谱柱（50 mm $\times$ 2.1 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ），柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ；流动相为 1 mmol/L 甲酸铵水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱程序：0~4 min，10%~35% B；4~8 min，35%~70% B；8~9 min，70%~10% B；9~10 min，

10% B; 体积流量 0.25 mL/min; 进样量 5  $\mu$ L。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子化 (ESI) 负离子方式检测, 多重反应监测 (MRM) 模式扫描; 毛细管电压 3.0 kV; 离子源温度 150  $^{\circ}$ C; 锥孔气体体积流量 50 L/h; 脱溶剂温度 450  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气体体积流量 1 000 L/h; 各待测成分及内标检测参数见表 2; 采用 DAS 3.2.6 软件进行数据处理。

表 2 三七中主要皂苷、代谢产物和地高辛的 MRM 检测模式参数

Table 2 MRM parameters of main saponins, metabolites, and digoxin in *Notoginseng Radix et Rhizoma*

| 成分          | 母离子 $\rightarrow$ 子离子<br>( $m/z$ ) | 锥孔电压/<br>V | 碰撞能量/<br>V |
|-------------|------------------------------------|------------|------------|
| 三七皂苷 $R_1$  | 1 107.44 $\rightarrow$ 179.01      | 94         | 64         |
| 人参皂苷 $Rb_1$ | 931.25 $\rightarrow$ 637.29        | 100        | 46         |
| 人参皂苷 $Rg_3$ | 783.34 $\rightarrow$ 621.24        | 52         | 28         |
| 人参皂苷 $Rg_1$ | 799.20 $\rightarrow$ 637.16        | 79         | 34         |
| 人参皂苷 $Re$   | 945.33 $\rightarrow$ 160.95        | 90         | 60         |
| 人参皂苷 $Rg_2$ | 783.15 $\rightarrow$ 637.16        | 76         | 33         |
| 地高辛         | 779.18 $\rightarrow$ 649.11        | 72         | 34         |

**2.3.5 线性关系考察** 取混合对照品储备液, 按倍数稀释成一系列不同质量浓度的混合对照品溶液。取大鼠空白血浆 100  $\mu$ L, 加入不同质量浓度的混合对照品溶液 10  $\mu$ L, 按“2.3.3”项方法处理, 取 20  $\mu$ L 上清按照“2.3.4”项条件进样, 记录各对照品和内标的峰面积, 以对照品质量浓度 ( $X$ ) 与对照品和内标峰面积比值 ( $Y$ ) 作线性回归。三七皂苷  $R_1$  及人参皂苷  $Re$ 、 $Rg_1$ 、 $Rb_1$ 、 $Rg_3$ 、 $Rg_2$  回归方程分别为:  $Y=2.2176X-0.0269$ ,  $r=0.9989$ ;  $Y=1.4473X+0.0571$ ,  $r=0.9970$ ;  $Y=1.1378X+0.0402$ ,  $r=0.9976$ ;  $Y=1.3068X+0.0166$ ,  $r=0.9978$ ;  $Y=1.3858X+0.0293$ ,  $r=0.9962$ ;  $Y=0.8762X-0.0048$ ,  $r=0.9946$ 。线性范围分别为 0.036~6.639、0.050~6.347、0.050~6.360、0.031~7.867、0.032~8.200、0.031~7.893  $\mu$ g/mL。

**2.3.6 精密性与准确度试验** 取大鼠空白血浆 100  $\mu$ L, 加入不同质量浓度的混合对照品溶液 10  $\mu$ L, 配制成低、中、高 3 个质量浓度的质控样品 (根据线性范围设置, 高浓度为线性范围最高点的 80%, 低浓度为线性范围最低点的 3 倍以内, 中浓度选取中间浓度), 按“2.3.3”项下血样处理方法处理, 每个浓度制备 6 份为 1 批, 平行处理 3 批, 按照“2.3.4”项条件进样, 记录各质控样品和内标的峰面积, 带入标准

曲线的回归方程, 计算质控样品的质量浓度, 考察批内、批间精密性。结果显示, 低、中、高 3 个质量浓度的质控样品批内 RSD 小于 10%, 批间 RSD 小于 15%。批内、批间准确度分别为 88.12%~110.13%、86.13%~114.11%。均符合生物样品分析的要求。

**2.3.7 稳定性试验** 取大鼠空白血浆 100  $\mu$ L, 加入不同质量浓度的混合对照品溶液 10  $\mu$ L, 配制成低、中、高 3 个质量浓度的质控样品, 按“2.3.3”项血样处理方法处理。进行室温、冰冻 ( $-80^{\circ}$ C)、反复冻融 3 次的稳定性考察。结果显示, 各待测成分在室温下至少能稳定 12 h, 在冷冻条件下至少能稳定 4 周, 在冻融 3 次的条件下能够保持稳定。

**2.3.8 提取回收率** 取大鼠空白血浆 100  $\mu$ L, 加入不同质量浓度的混合对照品溶液 10  $\mu$ L, 配制成低、中、高 3 个质量浓度的质控样品, 按“2.3.3”项血样处理方法处理, 进样检测, 以测得的峰面积与未经处理的相应质量浓度的对照品溶液峰面积的比值, 计算提取回收率, 每个质量浓度平行处理 5 份。结果测得回收率为 51.22%~95.11%, RSD 为 3.14%~13.81%。回收率大于 50%, 符合生物样品定量要求。

**2.3.9 基质效应** 取大鼠空白血浆 100  $\mu$ L, 按“2.3.3”项下血样处理方法处理, 挥干样品后, 用流动相配制的含低、中、高质量浓度对照品的溶液复溶, 进样检测, 记录峰面积 ( $A_1$ )。用流动相配制的含低、中、高浓度的对照品溶液直接进样分析, 记录峰面积 ( $A_2$ )。2 次峰面积的比值 ( $A_2/A_1$ ) 计算基质效应。结果表明, 测得成分的基质效应为 92.03%~114.21%, RSD 为 1.92%~13.26%。

**2.3.10 蒸制前后主要活性成分大鼠体内药动学变化** 三七皂苷  $R_1$  及人参皂苷  $Rg_1$ 、 $Rb_1$ 、 $Re$ 、 $Rg_3$ 、 $Rg_2$  平均药时曲线见图 1, 药动学参数见表 3~6。结果表明三七中主要皂苷经脱糖基生成新的成分 (人参皂苷  $Rb_1$  脱糖基产物人参皂苷  $Rg_3$ ) 后, 其  $t_{max}$  较原皂苷减小,  $C_{max}$  较原皂苷增大, 表明其更易吸收入血。随着蒸制时间延长, 原型皂苷  $AUC_{(0-\infty)}$  逐渐减小, 可能与蒸制过程中三七中成分水平改变有关。

## 2.4 抗血小板聚集作用

大鼠 36 只, 随机分为 6 组: 对照 (0.5% CMC-Na) 组、阿司匹林 (25 mg/kg, 阿司匹林肠溶片 2 片去薄膜衣研成粉末溶于 0.5% CMC-Na 中, 配成 5 mg/mL 的溶液) 组、不同蒸制时间三七样品液 (500 mg/kg) 组, 各组 ig 给药。给药 110 min 后眼眶取 4 mL 血液, 置于含有 0.44 mL 3.8% 柠檬酸

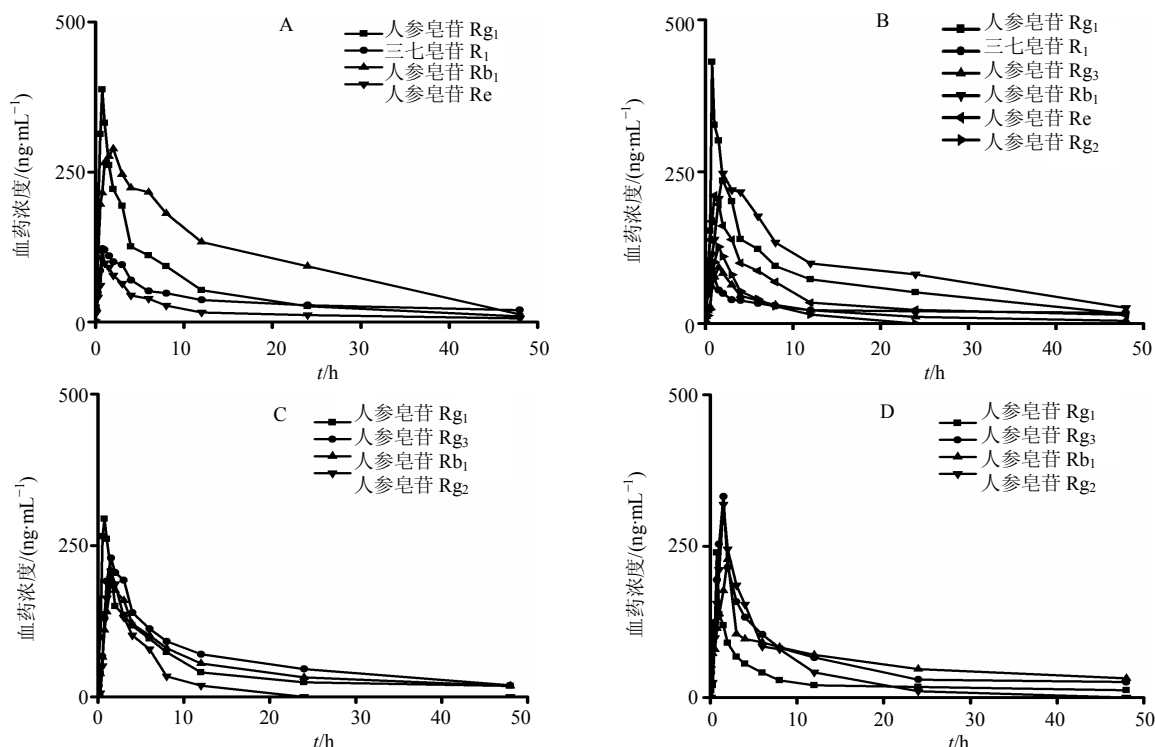


图 1 蒸制 0 (A)、2 (B)、4 (C)、8 (D) h 的三七中主要活性成分的药时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Plasma concentration-time curves of steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* at time points of 0 (A), 2 (B), 4 (C), 8 (D) h ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

表 3 生三七 ig 给药后主要活性成分药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Pharmacokinetic parameters of raw *Notoginseng Radix et Rhizoma* after ig administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 参数                   | 单位                   | 三七皂苷 R <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 人参皂苷 Re        | 人参皂苷 Rg <sub>3</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>2</sub> |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| AUC <sub>(0-∞)</sub> | μg·h·L <sup>-1</sup> | 2 892.90±338.62     | 3 294.28±1 551.97    | 5 226.60±285.87      | 945.71±904.80  | —                    | —                    |
| t <sub>max</sub>     | h                    | 1.000±0.306         | 0.850±0.137          | 1.900±0.224          | 0.800±0.447    | —                    | —                    |
| C <sub>max</sub>     | μg·L <sup>-1</sup>   | 122.985±8.424       | 387.045±104.509      | 289.040±8.930        | 116.621±23.638 | —                    | —                    |

表 4 蒸制 2 h 三七 ig 给药后主要活性成分药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Pharmacokinetic parameters of steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* at 2 h after ig administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 参数                   | 单位                   | 三七皂苷 R <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 人参皂苷 Re         | 人参皂苷 Rg <sub>3</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>2</sub> |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| AUC <sub>(0-∞)</sub> | μg·h·L <sup>-1</sup> | 2 943.20±1 199.43   | 3 780.90±1 653.0     | 4 896.55±370.81      | 1 956.90±290.57 | 904.58±478.97        | 459.59±453.30        |
| t <sub>max</sub>     | h                    | 0.800±0.209         | 0.75±0.00            | 2.400±0.894          | 1.20±0.57       | 1.5±0.0              | 1.300±0.274          |
| C <sub>max</sub>     | μg·L <sup>-1</sup>   | 84.701±39.989       | 430.321±36.910       | 247.403±18.799       | 210.960±26.664  | 92.957±33.211        | 126.907±52.527       |

表 5 蒸制 4 h 三七 ig 给药后主要活性成分药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Pharmacokinetic parameters of steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* at 4 h after ig administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 参数                   | 单位                   | 三七皂苷 R <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 人参皂苷 Re | 人参皂苷 Rg <sub>3</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>2</sub> |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| AUC <sub>(0-∞)</sub> | μg·h·L <sup>-1</sup> | —                   | 2 348.44±2 094.79    | 2 954.86±1 212.80    | —       | 4 302.98±2 746.50    | 1 415.8±1 158.38     |
| t <sub>max</sub>     | h                    | —                   | 0.900±0.379          | 2.000±0.612          | —       | 1.500±0.354          | 1.350±0.335          |
| C <sub>max</sub>     | μg·L <sup>-1</sup>   | —                   | 294.050±13.644       | 189.989±19.592       | —       | 229.409±21.11        | 207.133±15.468       |

表 6 蒸制 8 h 三七 ig 给药后主要活性成分药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 6 Pharmacokinetic parameters of steamed *Notoginseng Radix et Rhizoma* at 8 h after ig administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 参数                   | 单位                   | 三七皂苷 R <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 人参皂苷 Re | 人参皂苷 Rg <sub>3</sub> | 人参皂苷 Rg <sub>2</sub> |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| AUC <sub>(0-∞)</sub> | μg·h·L <sup>-1</sup> | —                   | 1 074.02±888.95      | 3 766.60±815.56      | —       | 3 387.86±953.35      | 1 921.84±1 686.86    |
| t <sub>max</sub>     | h                    | —                   | 1.050±0.542          | 2.0±0.0              | —       | 1.250±0.354          | 1.600±0.224          |
| C <sub>max</sub>     | μg·L <sup>-1</sup>   | —                   | 239.26±212.43        | 227.82±21.04         | —       | 332.52±66.73         | 318.07±95.68         |

钠的试管中,混匀后分别按不同的离心速度制备富血小板血浆 (PRP) 和贫血小板血浆 (PPP)。800 r/min 离心 10 min 后吸取上层血浆得 PRP; 将剩余血液 2 500 r/min 离心 10 min 后吸取上层血浆得 PPP。取 250  $\mu$ L PPP 加入 PAPE-I 型血小板聚集/血凝测定仪测试杯中,放入测试孔中定标。取 250  $\mu$ L PRP 加入测试杯中,在 37  $^{\circ}$ C 预温槽中预热 1 min,立即加入 2  $\mu$ g/mL 诱导剂胶原 25  $\mu$ L 测定血小板最大聚集率。每次测定 3 个通道,计算平均最大聚集率。运用 SPSS 16.0 统计分析软件,  $t$  检验进行数据处理,结果表明,蒸三七比生三七有更明显的抗血小板聚集活性 ( $P < 0.05$ 、0.001),且随着蒸制过程的延长,抗血小板聚集活性更强。结果见表 7。

表7 生三七与蒸三七对大鼠体外血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 7 Effects of raw and steamed *Notoginseng Radix* et *Rhizoma* on platelet aggregation in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别     | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 血小板最大聚集抑制率/%        |
|--------|---------------------------|---------------------|
| 对照     | —                         | —                   |
| 阿司匹林   | 25                        | 33.45 $\pm$ 2.14    |
| 生三七    | 500                       | 15.86 $\pm$ 1.43    |
| 蒸制 2 h | 500                       | 36.40 $\pm$ 3.57*   |
| 蒸制 4 h | 500                       | 41.08 $\pm$ 3.56*   |
| 蒸制 8 h | 500                       | 44.68 $\pm$ 2.21*** |

与生三七组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs raw notoginseng group

### 3 讨论

HPLC-UV 测定三七蒸制前后成分变化,随着蒸制过程的延长,皂苷脱糖基更彻底,生成脱糖基代谢物的量越多。蒸制过程中,三七中原型皂苷(三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rd、Rb<sub>1</sub>、Re) 随着时间延长,水平逐渐降低。蒸制 4 h 后,三七皂苷 R<sub>1</sub> 水平明显降低。而原型皂苷脱糖基产生的代谢产物(人参皂苷 Rg<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>) 随着时间的延长,水平逐渐增加。蒸制 8 h 后, Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub> 急剧增加。以上结果表明,随着蒸制时间延长,三七中原型皂苷水平降低,而 PPD、PPT 型皂苷官能团脱糖基产物水平增加。

三七蒸制过程降低了某些生物活性物质(三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rd、Rb<sub>1</sub>、Re) 的水平,并产生了新的皂苷类成分(人参皂苷 Rg<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>),且其水平随着蒸制时间的延长不断增加,上述变化可能是蒸三七抗凝血活性增强的主要原因。体内药动力学实验结果表明,随着蒸制时间延长,人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 的脱糖基代谢产物人参

皂苷 Rg<sub>3</sub> 的 AUC<sub>(0-∞)</sub> 增加,且人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 与 Rb<sub>1</sub> 比较  $t_{\max}$  略有降低。抗血小板聚集实验表明,蒸三七比生三七抗血小板聚集活性更强,且蒸制时间越长,抗血小板聚集活性越强。文献研究表明,人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、Rf 等对钙通道有抑制作用,三七对血小板聚集的抑制作用可能与此有关。三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub> 均有抗血小板聚集活性<sup>[8-9]</sup>,三七中原型皂苷与脱糖基代谢产物的抗血小板聚集活性的比较有待进一步研究。综合分析表明,三七蒸制后,皂苷类成分脱糖基后可能产生活性更强的成分(PPT 型皂苷脱糖基生成 Rg<sub>2</sub> 或 Rh<sub>1</sub>),某些脱糖基代谢产物更易吸收入血<sup>[10]</sup>,可能导致抗凝血活性增强。

由于检测条件限制,PPT 型皂苷(三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rf、Re) 脱糖基代谢产物 Rh<sub>1</sub>, 及其进一步代谢产物人参皂苷 RK<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub> 未能测定。蒸三七抗凝活性与其成分的量效关系有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 周新惠,龙丽莉,李春梅,等. 生三七与蒸制熟三七部分药理作用的比较研究 [J]. 环球中医药, 2014, 7(6): 420-426.
- [2] 中华人民共和国国家中医药管理局. 中华本草精选本 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [3] 赵国强,王秀训. 三七止血成分 dencichine [J]. 中草药, 1986, 17(6): 34-35.
- [4] 王莹,褚扬,李伟,等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [5] 王海波. 人参、西洋参和三七抗凝血活性及与药性关系的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [6] Wang C Z, Aung H H, Ni M, et al. Red American ginseng: ginsenoside constituents and antiproliferative activities of heat-processed *Panax quinquefolius* roots [J]. *Planta Med*, 2007, 73(7): 669-674.
- [7] Sun S, Qi L W, Du G J, et al. Red notoginseng: higher ginsenoside content and stronger anticancer potential than Asian and American ginseng [J]. *Food Chem*, 2011, 125(4): 1299-1305.
- [8] 田建明,宋丽晶,李浩,等. 人参皂苷 Rg<sub>2</sub> 对大鼠体内血栓形成及血小板聚集的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(11): 79-80.
- [9] 王永. 三七总皂苷对内毒素休克大鼠心肌保护作用机制的研究 [D]. 福建: 福建中医学院, 2008.
- [10] Hu Z Y, Yang J L, Li C, et al. Combinatorial metabolism notably affects human systemic exposure to ginsenosides from orally administered extract of *Panax notoginseng* roots (Sanqi) [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(7): 1457-1469.