

臺灣產三葉五加鎮靜及抗血小板活性成分之研究

謝明村 張永勳 陳慧儀 陳忠川 闕甫仔 陳介甫*

中國醫藥學院 中國藥學研究所
國立中國醫藥研究所*

摘 要

三葉五加〔*Acanthopanax trifoliatum*(L_{INN.})M_{ERR.}〕係台灣產五加科(*Araliaceae*)五加屬(*Acanthopanax*)之植物。民間以其根治跌打損傷，且有清熱解毒，祛風利濕、舒筋活血之功，亦為中藥五加皮之代用品。

本研究探討其成分對鎮靜及抗血小板凝集作用之影響，結果顯示(1)甲醇層及氯仿層均具明顯之抗血小板凝集作用並能延長hexobarbital之睡眠時間。(2)由氯仿層分出之六個部份(B-I ~ B-VI)：其中B-III、B-IV、B-V及B-VI能延長由hexobarbital誘發之睡眠時間，而B-II、B-III、B-IV則具明顯之抗血小板凝集作用。(3)由B-II分離出之taraxerol acetate及由B-III分離出之taraxerol二純物質均不具抗血小板凝集之作用。綜合研究結果，顯示三葉五加確實具有鎮靜及抗血小板凝集之作用，至於其有效成分則仍在探討中。

關鍵詞：三葉五加，鎮靜，抗血小板

前 言

三葉五加〔*Acanthopanax trifoliatum*(L_{INN.})M_{ERR.}〕係台灣產五加科(*Araliaceae*)五加屬(*Acanthopanax*)之植物。民間以其根治跌打損傷，且有清熱解毒、祛風利濕、舒筋活血之功⁽¹⁾，亦是中藥五加皮之代用品。

1972年，陳發清博士等研究三葉五加之莖，發現含fatty acid, n-pentadecanoic acid, palmitic acid, margaric acid, stearic acid, arachidonic acid，以及在第29個碳和第31個碳之間含有nonacosane做為主要結構之n-alkane的混合物，此外尚含有stigmasterol, β -sitosterol及含有此二固醇之配醣體^(2,3)。1984年，Lishchewski.M.等由三葉五加之葉分離得到

3 α , 11 α -dihydroxylup-20(29)-en-28-oic acid, 3 α , 11 α , 23-trihydroxylup-20(29)-en-28-oic acid和3 α , 11 α -dihydroxy-23-oxo-lup-20(29)-en-28-oic acid三個新的triterpenes⁽⁴⁻⁶⁾。可知三葉五加其植物化學成分分析已有許多報告提出，唯有關於鎮靜及抗凝血作用方面之成分與藥理研究尚付諸闕如。故本研究試就其成分對鎮靜及抗血小板凝集作用之影響加以探討。

材料及方法

實驗材料

一、三葉五加之採集

本實驗所使用三葉五加之根莖採集自苗栗山區為五加科(*Araliaceae*)植物三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum*(L.)M_{ERR.}簡稱A.T.)之

根莖。

二、抽取與分離

(一)粗抽出物之製備

將三葉五加之根、莖乾品 5.25kg，經粉碎後，用甲醇以冷浸法在室溫下靜置約十天，經過濾，合併減壓濃縮得粗抽出物 349 公克，約為約乾品重之 6.65%。

此甲醇粗提取物(Fr.A)，加入少量的水使之完全溶解，先以氯仿萃取三次，合併萃取液減壓濃縮至乾得氯仿層(Fr.B, ca. 82.8 g)，水層再依序以乙酸乙脂，水飽和過之正丁醇萃取三次，各別合併萃取液減壓濃縮至乾得乙酸乙脂層(Fr.C, ca. 12.2 g)，正丁醇層(Fr.D, ca. 6 8.25 g)，餘者為水層(Fr.E, ca. 185.75 g)。如 Figure 1 所示。

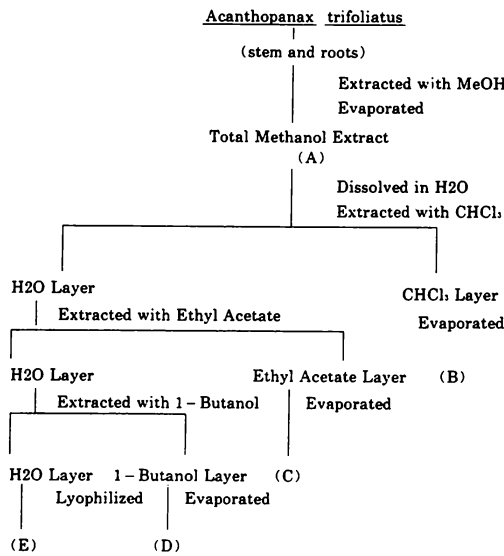


Figure 1. Fractionation Scheme of *Acanthopanax trifoliatum*.

(二)活性成分之分離

將氯仿層以矽膠管柱層析分離，以 n-hexane 與 CHCl₃ 之混合溶媒當沖提液，將收集液劃分為 B-I、B-II、B-III、B-IV、B-V、B-VI 六部分，如 Figure 2 所示。

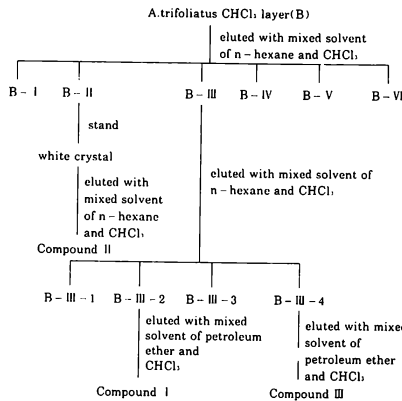


Figure 2. Fractionation Scheme of *A. trifoliatum* CHCl₃ Layer.

另將 B-III 同樣以矽膠管柱層析分離，以 n-hexane 與 CHCl₃ 之混合溶媒當沖提液進行分離，將 B-III 分為 B-III-1、B-III-2、B-III-3、B-III-4。再將 B-III-2 及 B-III-4，同樣以矽膠管柱層析方法，以 petroleum ether 與 CHCl₃ 不同比例之混合溶媒當沖提液進行分離，而分別得到化合物 I 及化合物 III。

另外 B-II 在外置一段時間後，產生白色片狀透明針狀結晶，將此結晶取出，再經矽膠管柱層析，以 n-hexane 與 chloroform 的混合溶媒當沖提液，進行純化，而得化合物 II (Figure 2,3)。

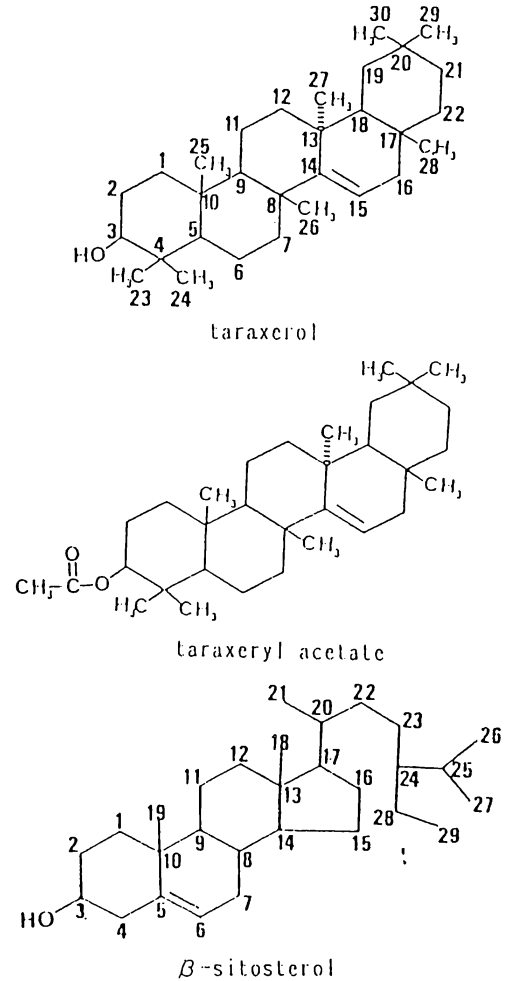


Figure 3. Structure of taraxerol, taraxeryl acetate and β -sitosterol.

二、實驗試藥

hexobarbital sodium (日本東京化成工業), collagen (Col)(Sigma), bovine thrombin (Sigma), platelet-activating factor (PAF) (Sigma), adenosine diphosphate (ADP) (Sigma), sodium arachidonate(AA)(Sigma), sodium citrate (Sigma), EDTA (E.Merck).

四、實驗動物

- 1、ICR系雄性小鼠、體重18~25公克。
- 2、大白兔。

實驗方法

一、對Hexobarbital誘發的睡眠時間之影響：

小白鼠口服各種三葉五加之抽出物(Fr.A.B.C.D.E)及由其分離出之部份(B-I, B-II, B-III, B-IV, B-V, B-VI)各0.1g/kg P.O., 於給藥50分鐘後, 由腹腔注射hexobarbital 100 mg/kg誘發睡眠, 觀察記錄其正向反轉(right reflex)消失的時間(onset), 及正向反轉消失到恢復的時間(duration)⁽⁶⁾, 與對照組比較。

二、抗血小板凝集作用

1. 血小板凝集引發劑之配製

- (1)collagen (bovine tendon): 溶於15mM 醋酸水溶液中, 於4°C 研磨成均勻的懸浮液後, 1mg/ml的濃度分裝, 存於-70°C 冰箱中, 使用時再解凍研磨均勻。
- (2)bovine thrombin: 溶於50%(v/v)之甘油中, 配製成100 NIH Units/ml 儲存於-20°C, 使用前再以saline稀釋。
- (3)PAF: 溶於CCl₄中, 儲存於-20°C, 使用前以去離子水稀釋。
- (4)ADP(adenosine diphosphate)及sodium arachidonate (AA): 以去離子水溶解備用。

2. 血小板之配製與凝集反應

- (1)富含血小板血漿之配製(platelet-rich plasma, PRP): 以3.8% sodium citrate 為抗凝血劑, 與全血(兔耳緣靜脈抽血)以1:14(v/v)之比例混合, 在室溫下立即120g 離心10分鐘, 所得上層液即為富含血小板之血漿。

- (2)血小板懸浮液之配製(platelet suspension, P.S):

根據Mustard⁽⁷⁾等及Ardlie⁽⁸⁾等使用的方法, 用100mM之EDTA與兔子耳緣靜脈抽出血以1:14(v/v)混合, 在室溫下立即120g離心10分鐘, 除去血漿後, 將下層血小板以含EDTA(2mM)及bovine serum albumin (3.5mg/ml)的Tyrode溶液懸浮之, 再於相同轉速下離心10分鐘, 所得血小板以不含EDTA的Tyrode溶液懸浮之並離心後, 再以Tyrode溶液使其懸浮, 並以Particle Counter (Coulter)調

節血小板計數約為 4.5×10^8 個/ml, 最後加1mM Ca⁺⁺, 放置30鐘後, 進行實驗。Tyrode溶液除了含有bovine serum albumin外, 其他組成如下(mM): NaCl(136.9), KCl(2.7), MgCl₂(2.1), NaH₂PO₄(0.4), NaHCO₃(11.9), glucose(11.1)。

3. 血小板凝集與ATP釋放反應的測定:

根據Born and Cross等⁽⁹⁾之混濁度測定法, 以Lumi-aggreometer(Madel 1020, Payton, Canada)測定, 將血小板懸浮液0.4ml加入經silicone包衣的小玻璃管中, 並以小磁棒900轉/分的攪拌, 若未經特別說明, 均在加入凝集引發劑前1分鐘添加拮抗劑, 全部凝集反應過程皆在37°C下進行, 凝集程度的表示方法如下:

$$\text{凝集(\%)} = \frac{\text{加凝集引發劑前的吸光度} - \text{加引發劑後的吸光度}}{\text{加引發劑前的吸光度} - \text{Tyrode溶液的吸光度}} \times 100\%$$

另外, 某些實驗中, 加入luciferase-luciferin混合液25 μ l, 利用與ATP反應所產生的螢光, 來測定血小板釋放反應的大小, 其程度以相對值表示之^(10,11)。

結 果

一、對Hexobarbital所誘發睡眠時間之影響

結果如表一所示, 對於hexobarbital所誘發睡眠之時間, 其甲醇層及氯仿層均可明顯的延長其睡眠時間, 而除氯仿層外其餘各層均明顯縮短其誘發睡眠之onset。

Table 1. Effects of various extracts of *Acanthopanax trifoliatum* on the hexobarbital (100 mg/kg) induced sleeping time of mice.

Drugs	Dose (g/kg, p.o.)	No. of mice	Onset Time (min)	Sleeping Time (min)
Control	---	6	8.3 \pm 0.5	33.0 \pm 2.3
A	1.0	6	12.5 \pm 0.5***	77.8 \pm 9.1***
B	1.0	6	9.4 \pm 0.6	117.5 \pm 4.1***
C	1.0	6	12.1 \pm 0.8**	51.3 \pm 0.5*
E	1.0	6	14.9 \pm 1.7**	37.5 \pm 3.0
D	1.0	6	11.2 \pm 0.7**	35.7 \pm 4.4

A: Methanol extract, B: Chloroform extract, C: Ethyl acetate extract, D: n-butanol extract, E: Water residue (see Figure 1.)

Each value represents the Mean \pm S.D. obtained from 6 mice. Onset: time for drug injection to disappearance of righting reflex. Sleeping Time: time from onset to appearance of righting reflex. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

另由氯仿層所分出之B-I, B-II, B-III, B-IV, B-V, B-VI, 六部份中, B-III, B-IV, B-V, B-VI均可明顯的延長小鼠睡眠時間, 結果如表二所示。

Table 2. Effects of chloroform layer's fraction of *Acanthopanax trifoliatum* on the hexobarbital (100 mg/kg) induced hypnotics in mice.

Drug	Dose (g/kg, p.o.)	Onset Time (min)	Sleep Time (min)
Control	- - -	8.4±0.7	31.5±1.6
B-I	1.0	9.9±0.7	28.1±1.7
B-II	1.0	9.2±0.3	37.8±4.0
B-III	1.0	8.7±0.5	67.5±2.1***
B-IV	1.0	8.1±0.0	66.6±4.8***
B-V	1.0	7.7±0.3	55.8±4.3***
B-VI	1.0	7.4±0.4	48.5±2.8***

B: Chloroform extracts of *Acanthopanax trifoliatum*.

Each value represents the mean ± S.D. obtained from 6 mice. Onset: time for drug injection to disappearance of righting reflex. Sleeping Time: time from onset to appearance righting reflex. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

二、抗血小板凝集作用

結果如表三所示, 其甲醇層、氯仿層、乙酸乙酯層、正丁醇層對 sodium arachidonate (AA)及 collagen (Col)有抑制作用。另由氯仿層所分出之六個分層(B-I ~ B-VI), 其中B-II, B-III及B-IV對 adenosine diphosphate (ADP)所誘發之血小板凝集作用均有很強之抑制作用, 如表四所示。而由氯仿層所得到之純物質 Compound I (taraxerol)與 Compound II (taraxeryl acetate)則未具抗凝血活性。

Table 3. Preliminary antiplatelet effect of *Acanthopanax trifoliatum*.

Test extracts	ADP	AA	Col	PAF
Control	92.0±0.9	91.3±2.1	90.6±1.6	95.7±3.5
A	82.1±9.3	4.9±4***	28.8±4.6***	49.0±10.6**
B	42.4±15.7*	17.1±2.4***	26.2±8.0***	0.0±0***
C	25.5±14.6**	8.9±2.6***	13.4±1.0***	0.0±0***
D	34.1±13.9**	0.0±0***	13.2±4.2***	49.3±16.3**
E	81.7±7.2	80.6±5.1*	83.5±2.3*	91.9±2.8

Percentage of aggregation is expressed as mean ± S.D. A: Methanol extract, B: Chloroform extract, C: Ethyl acetate, D: n-butanol extract, E: Water residue (see Figure 1). Statistical significance is shown as: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Table 4. Antiplatelet effects of Chloroform layer's fraction of *Acanthopanax trifoliatum* in vitro in rabbits.

Agent	ADP 20 μM	AA 100 μM	COL. 10 μg/ml	PAF 2 ng/ml
Control	79.4±2.1	88.7± 0.9***	90.0±1.2	91.5±0.5
B-I	49.5±6.2***	79.5± 1.9***	87.3±1.2	86.2±2.4*
B-II	0.0±0.0***	11.5± 4.7***	14.2±0.9***	35.9±18.0**
B-III	1.2±0.2**	39.6±15.2***	23.6±4.7***	52.2±8.9***
B-IV	28.0±8.0***	77.1± 2.2***	41.7±0.5***	52.5±9.8***
B-V	24.0±0.3***	4.0± 3.2***	24.1±1.9***	78.2±5.4
B-VI	64.5±3.3***	81.5± 1.4***	86.7±1.0	88.8±0.4***

Each value represents Mean ± SD.

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 compared with control group.

B: Chloroform layer's fraction of *Acanthopanax trifoliatum*.

Dosage of all agents: 400 μg/ml. (except B-VI: 200 μg/ml)

Control: 0.5% DMSO.

討 論

在對 hexobarbital 所誘發睡眠時間影響方面, 其甲醇粗抽出物及氯仿層均可明顯的延長 hexobarbital 所誘發之睡眠時間, 顯示此二抽出物具有極顯著之 barbiturates 增強作用, 與刺五加之作用相同⁽¹²⁾。

故本研究進一步將氯仿層以矽膠管柱層析分離, 得到 B-I、B-II、B-III、B-IV、B-V、B-VI 六部份, 再分別進行對 hexobarbital 所誘發睡眠時間影響之實驗, 其中 B-III, B-IV, B-V, B-VI 均可明顯延長小鼠睡眠時間, 值得繼續追蹤。

在抗血小板凝集作用方面, 將三葉五加之粗抽出物 (Fr.A.B.C.D.E) 各以 1mg/ml 之劑量測定其抗血小板凝集活性, 而分別以 ADP (20mg), AA (arachidonic acid 100 μM), collagen (10 μg/ml), PAF (2mg/ml) 作為凝集引發劑。其中甲醇粗抽出物 (Fr.A)、氯仿層 (Fr.B)、乙酸乙酯層 (Fr.C)、正丁醇層 (Fr.D) 對 AA 及 collagen, 有抑制作用, 氯仿層 (Fr.B)、乙酸乙酯層 (Fr.C) 亦對 PAF 有抑制作用, 顯見三葉五加具有很強之抗血小板凝集活性。

接著我們進一步將前述由氯仿層經矽膠管柱層析分離得到之 B-I、B-II、B-III、B-IV、B-V、B-VI 六部份, 除 B-VI 劑量為 200 μg/ml 外, 其他各部份劑量均為 400 μg/ml, 作抗血小板凝集的活性試驗, 其 B-III、B-IV 對 ADP、AA、Col、PAF 均有很強的抑制作用, B-V、B-VI 亦具有血小板凝集作用。

綜合上述兩項藥理實驗結果，我們得知由三葉五加之甲醇粗抽物所分出之氫仿層，同時具有巴比妥酸鹽增強作用及抗血小板凝集作用，而由其分出之 B-III、B-IV、B-V、B-VI 四部份亦同時具有此二項作用，因此我們擬將這些部份繼續進行化學分離，以期找出具有活性的成分。

於是我們以一系列矽膠管柱層析方法，將 B-III 進行分離，共分爲 B-III-1、B-III-2、B-III-3、B-III-4 四部份。再將 B-III-1、B-III-2 及 B-III-4 同樣以矽膠管柱層析方法分離，最後分別得到化合物 I、化合物 II 及化合物 III。經構造決定得知分別爲 taraxerol (I)、taraxerol acetate (II) 及 β -sitosterol (III)，三者皆爲已知成分。

最後我們擬將化合物 I，化合物 II 進行藥理活性試驗，但因量少，不足以進行對 hexobarbital 所誘發睡眠時間影響之實驗，因此僅進行抗血小板凝集試驗，結果得知化合物 I、化合物 II 未具藥理活性。

本研究因限於時間及其他因素，未能追蹤獲得三葉五加具藥理活性之純化合物，然由其藥理實驗結果，卻提供了三葉五加具有巴比妥酸鹽增強作用，及抗血小板凝集作用之訊息，可供後人繼續研究開發，並進而獲得其具藥理活性之純化合物。

謝 辭

本論文之完成，承蒙邱技正年永先生協助藥材之採集與鑑定，台灣大學鄧哲明教授在血小板實驗上之協助，以及國立中國醫藥研究所之經費補助，謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. 中藥大辭典，昭仁出版社，1981；2：83。
2. Chen FC, Lin YM, Lin S: *Phytochemistry* 1971;11:1496.
3. Chen FC, Lin YM, Yu PL: *Phytochemistry* 1973;12:467.
4. Lischewski M, Kuttschabsky L: *Phytochemistry* 1985;24:2355.
5. Ty PD, Lischewski M, Rhiet HV, Preiss A: *Phytochemistry* 1984;23:2889.
6. Fujimori H: *Psychopharmacol* 1965;7:74.
7. Mustard JF, Perry DW, Ardli NG, Pachtam MA: *Brit.J.Haemat* 1972;22:193.
8. Ardli NG, Perry DW, Mustard JF: *Proc.Sco. Exp. Biol.Med.* 1971;136:1031.
9. Born GVR, Cross MJ: *J.Physiol.(Lond.)* 1963; 168:178.
10. Deluca M, McElory WD: *Method Enzymol* 1978;57:3.
11. Teng CM, Chen WY, Ko CW, Ouyang C: *Biochemica et Biophysica ACTA* 1987;924:375.
12. Medon PJ, Ferguson PW: *J.Ethanopharmacol* 1984;10:235.

EFFECTS OF THE BIOACTIVE CONSTITUENTS OF *ACANTHOPANAX TRIFOLIATUS* ON SEDATION AND ANTIPLATELET AGGREGATION

Ming-Tsuen Hsieh Yuan-Shiun Chang Hui-I Chen
Chung-Chuan Chen Fu-Yu Chueh Chieh-Fu Chen*

*Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical College
National Research Institute of Chinese Medicine**

Acanthopanax trifoliatum (L.) Merr. is a commonly used analgesics in Chinese medicine. In this study, the sedative effect and platelet aggregation inhibition effects of the *Acanthopanax trifoliatum* were evaluated. Biological activity guided chemical fractionation was carried out in order to elucidate the active constituents. The following results were obtained :

1. Both methanol and chloroform extracts of *Acanthopanax trifoliatum* significantly inhibited the platelet aggregation effect induced by adenosine diphosphate (ADP), sodium arachidonate (AA), collagen (Col) and platelet-activating factor (PAF) and prolonged the duration of sleeping time induced by hexobarbital.
2. The chloroform extract was further separated into 6 fractions (B-I -B-VI) and evaluated for their pharmacological effects. It was found that fractions B-III, B-IV, B-V and B-VI significantly prolonged the duration of sleeping time induced by hexobarbital. Fractions B-II, B-III and B-IV potentiated the platelet aggregation inhibition effect induced by adenosine diphosphate (ADP), sodium arachidonate (AA), collagen (Col) and platelet-activating factor (PAF).
3. Taraxerol acetate was purified from fraction B-II and taraxerol was isolated from fraction B-III by silica gel column chromatography. Neither taraxerol acetate nor taraxerol showed any effect on the inhibition of platelet aggregation.

From these results, it was found that *Acanthopanax trifoliatum* had sedation and platelet aggregation inhibition effects. The constituents which were responsible for the activity still yet to be determined.