

川芎药材、饮片及其中成药抗血小板聚集活性的生物检定方法学研究

姚艺新, 华芳, 洪远林, 谢晓芳, 蒋豪风, 李莞, 邓晶晶, 吕光华*

成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 建立以抗血小板聚集活性为指标的生物检定法, 评价川芎药材、饮片及含川芎中成药的质量。 **方法** 川芎加水回流定量提取, 以提取物为供试品体外测定抗血小板聚集活性。家兔心脏取血, 制备富血小板血浆 (PRP), 用腺苷-5'-二磷酸钠盐诱导血小板聚集, 以血小板抑制率为抗血小板聚集活性指标, 用阿魏酸钠标定川芎提取物的抗血小板聚集活性。根据量反应平行线法 (2.2) 法计算川芎提取物的抗血小板聚集活性; 结合川芎水提物的提取率, 计算川芎样品抗血小板聚集活性。并测定了 8 份川芎药材、饮片及中成药样品的抗血小板聚集活性, 验证方法的可行性。 **结果** 阿魏酸钠和川芎提取物均具有显著抗血小板聚集活性 ($P < 0.01$), 并且可靠性检验结果成立。阿魏酸钠在给药质量浓度 15~60 mg/mL 内与其血小板聚集抑制率呈良好的线性关系 ($r = 0.993\ 4$, $n = 4$)。供试品重复测定抗血小板聚集活性的 RSD 值为 3.43% ($n = 6$), 可信限率为 23.90% ($n = 6$)。不同川芎样品抗血小板聚集活性不同, 4 份川芎药材抗血小板聚集活性的生物效价分别为 3.183、2.068、1.957 和 1.931 U/g, 川芎饮片及川芎酒炙饮片抗血小板聚集活性的生物效价分别为 1.304、1.021 U/g, 速效救心丸和乐脉颗粒抗血小板聚集活性的生物效价分别为 0.506、0.919 U/g。 **结论** 建立的方法可准确测定川芎药材、饮片及含川芎中成药的抗血小板聚集活性, 可用来评价川芎产品的质量。

关键词: 川芎; 抗血小板聚集; 生物效价; 质量评价; 阿魏酸钠; 速效救心丸; 乐脉颗粒

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)11-2249-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.016

Bioassay of antiplatelet aggregation bioactivity in *Chuanxiong Rhizoma* with related Chinese patent drugs

YAO Yi-xin, HUA Fang, HONG Yuan-lin, XIE Xiao-fang, JIANG Hao-feng, LI Wan, DENG Jing-jing, LV Guang-hua
State key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine in Ministry of Education, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To develop a bioassay method to quantify the antiplatelet aggregation bioactivity (AAB) of crude *Chuanxiong Rhizoma*, decoction pieces, and its Chinese patent medicine for quality assessment. **Methods** *Chuanxiong Rhizoma* sample was extracted in water by reflux. The level of AAB in extract was quantified *in vitro*. The blood was taken from the heart of rabbit. The platelet aggregating in platelet-rich plasma was induced by adenosine-5'-diphosphate disodium salt. The ratio of platelet inhibition was chosen as AAB marker. Sodium ferulate was a reference. The amount of AAB in aqueous extract was quantified by the *Amount reaction of parallel line analysis (2.2) method*. The AAB data of herbal sample was calculated by combining the AAB of extract with its extraction rate. Moreover, AAB amounts were quantified in the eight samples including crude *Chuanxiong Rhizoma*, decoction pieces, and Chinese patent medicines to verify this developed method. **Results** Both sodium ferulate and *Chuanxiong* extract showed significant AAB ($P < 0.01$). The reliability test for quantifying AAB in solidum ferulate and *Chuanxiong Rhizoma* extract was passed through, and the measured value was valid. The correlation coefficient was 0.993 4 ($n = 4$) between the amounts of solidum ferulate in the concentration range of 15—60 mg/mL and their ratios of platelet inhibition. The RSD for the amounts of AAB was 3.43% ($n = 6$) by six replicated tests with the confidence limit rate of 23.90% ($n = 6$). The AAB amounts were significantly different among tested samples, i.e. 3.183, 2.068, 1.957, and 1.931 U/g for four *Chuanxiong Rhizoma* crude samples, 1.304 and 1.021 U/g for

收稿日期: 2017-02-03

基金项目: 四川省重点研发项目 (2017SZ0156); 四川省教育厅资助科研项目 (17za0148)

作者简介: 姚艺新, 男, 在读硕士, 研究方向为中药品种、质量及资源利用。Tel: 18302801140 E-mail: 14759155387@163.com

*通信作者 吕光华, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药品种、质量及资源利用。Tel: (028)61800232 E-mail: lughcd@aliyun.com

Chuanxiong Rhizoma decoction pieces and processed slice with yellow wine, 0.506 and 0.919 U/g for Suxiao Jiuxin Pills and Lemai Granule. **Conclusion** The developed method can accurately quantify the level of AAB in *Chuanxiong Rhizoma* crude, decoction pieces, and Chinese patent medicines, which can be used to assess the product quality of *Chuanxiong Rhizoma*.

Key words: *Chuanxiong Rhizoma*; antiplatelet aggregation; biological value; quality assessment; sodium ferulate; Suxiao Jiuxin Pills; Lemai Granule

川芎为常用的活血化瘀药, 来源于伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。其具有活血行气、祛风止痛之功效, 主要通过活血祛瘀达到止痛的效果, 广泛应用于各种血瘀诸痛证^[1-2]。川芎主要含苯酚类、酚酸类、多糖等生物活性成分。目前, 主要通过测定阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 A 等药效成分的量评价川芎的质量^[3-5]。由于藁本内酯、洋川芎内酯 A 等苯酚类成分为挥发性油状物, 不稳定, 难标化; 在《中国药典》2015 年版中以川芎的醇溶性浸出物(>12%)和阿魏酸的量(≥0.1%)为指标, 评价川芎的质量^[2]。但仅用这 2 项指标评价川芎的质量是不全面的。

现代研究表明, 血瘀证与血栓性疾病息息相关。血小板聚集是血栓形成的直接原因之一^[6], 抗血小板聚集能够反映川芎活血化瘀的功效。血小板的聚集是血小板在二磷酸腺苷(ADP)、纤维蛋白原、Ca²⁺及血小板膜上的 GPIIb/IIIa 受体等参与下形成的。其中, ADP 是连接血小板的强有力物质^[7], 因此通过测定抗 ADP 诱导的血小板聚集率, 可反映药物的抗血小板聚集活性。

目前, 临床上测定血小板活性的方法主要有透光率比浊法、全血血小板功能检测法、Verify NOW、血栓弹力图、在体检测血栓烷 A₂ (TXA₂) 途径的终产物、流式细胞法检测血小板血管扩张剂刺激磷蛋白(VASP)磷酸化水平等方法。其中, 在临床检验中, 透光率比浊法被视为监测血小板功能的“金标准”^[8]。可用于测定川芎的抗血小板聚集活性。已有研究针对于川芎对血小板聚集的影响^[9], 但只对血小板活性进

行定性研究, 没有定量测定。为此, 本研究以血小板抑制率为抗血小板聚集活性的评价指标, 以阿魏酸钠为阳性药标定川芎抗血小板聚集活性; 将药物分析方法的定量提取与药理作用的定量测定相结合, 通过优化川芎的定量提取方法和抗血小板聚集率的测定条件, 建立了定量测定川芎抗血小板聚集活性的生物检测方法。并测定了 8 份川芎药材、饮片及含川芎中成药的抗血小板聚集活性, 验证方法的可行性。以期对川芎的质量评价提供有效的检测方法。

1 材料

1.1 动物

日本大耳白兔, 雄性, 体质量约 2.5 kg, 由成都达硕生物科技有限公司提供。

1.2 试剂与药品

腺苷-5'-二磷酸钠盐(质量分数≥95%, 批号 SLBB1854V, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 阿魏酸钠(批号 S31124, 上海源叶生物科技有限公司); 0.9% 氯化钠注射液(生理盐水, 四川科伦药业股份有限公司); 二甲基亚砜(DMSO)、枸橼酸三钠(二水)、甲苯和无水乙醇均为分析纯, 由成都市科龙化工试剂厂生产。

6 份川芎药材和饮片样品来源于伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎, 由成都中医药大学药学院中药鉴定教研室吕光华教授鉴定。2 份含川芎的中成药从药店购买。样品信息见表 1。

1.3 仪器

SC-2000 型血小板聚集测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司), MEK-6318K 型全自动血细胞

表 1 川芎药材、饮片及含川芎中成药样品来源

Table 1 Sources of *Chuanxiong Rhizoma* and related Chinese patent medicines

编号	样品	产地/来源	收集时间
1	川芎药材	四川省彭州市敖平镇	2015-05
2	川芎药材	四川省都江堰市石羊镇	2015-05
3	川芎药材	四川省彭山县谢家镇	2015-04
4	川芎药材	四川省眉山市东坡区	2015-04
5	川芎饮片(批号 D1511018)	四川新荷花中药饮片股份有限公司	2016-03
6	川芎酒炙饮片(批号 1608065)	四川新荷花中药饮片股份有限公司	2016-03
7	乐脉颗粒(批号 150526)	四川川大华西药业股份有限公司	2016-06
8	速效救心丸(批号 615352)	天津中新药业集团股份有限公司	2016-06

分析仪(日本光电仪器公司), Allegra X-30R 型超
速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司),
RE-2000B 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),
SPSS 统计分析软件(19.0 版, IBM), BS2000 生物
统计软件。

2 方法

2.1 抗凝剂、腺苷-5'-二磷酸钠盐溶液和阳性药的 配制

2.1.1 枸橼酸三钠抗凝剂的配制 称取 3.2 g 枸橼
酸三钠, 加生理盐水溶解, 转移至 100 mL 量瓶中,
再加生理盐水定容至刻度, 摇匀, 即得 3.2%枸橼酸
三钠溶液。

2.1.2 腺苷-5'-二磷酸钠盐溶液的配制 精密称取
6.40 mg 腺苷-5'-二磷酸钠盐于 50 mL 量瓶中, 加入生
理盐水定容至刻度, 摇匀, 即得 300 $\mu\text{mol/L}$ 腺苷-5'-
二磷酸钠盐溶液。

2.1.3 阳性药(阿魏酸钠)溶液的配制 精确称取
0.6 g 阿魏酸钠于 50 mL 量瓶中, 加入生理盐水定容
至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 60 mg/mL 阿魏酸
钠高剂量溶液。取 200 μL 高剂量溶液, 加入等体积
的生理盐水稀释, 得质量浓度为 30 mg/mL 阿魏酸
钠低剂量溶液。

2.2 川芎供试液的制备

2.2.1 川芎样品的提取 称取 60 g 川芎药材或饮
片粉末(24 目), 加入 600 mL 水回流提取 1 h; 提
取 4 次。提取液先用纱布滤过, 离心, 再用滤纸抽
滤, 合并滤液; 减压浓缩至约 60 mL, 转移至锥形
瓶中, 混合均匀, 称质量, 得到川芎提取物。

2.2.2 川芎提取物水分的测定 取 3.0 g 川芎提取
物, 根据《中国药典》2015 年版(四部)水分测定
法中甲苯法^[2], 测定川芎提取物的水分。每份川芎
提取物平行测定 2 次, 计算平均含水量。

2.2.3 川芎供试液的配制 取 0.25 g 川芎提取物或
含川芎中成药粉末于 10 mL 量瓶中, 加入 1.5 mL
DMSO 溶液溶解, 再加生理盐水定容至刻度。转移
至离心管中, 于 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液,
得到质量浓度为 25 mg/mL 川芎提取物的高剂量溶
液; 取 500 μL 高剂量溶液, 加入等体积的生理盐水
稀释, 得到质量浓度为 12.5 mg/mL 川芎提取物的
低剂量溶液。

2.3 富血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP) 的制备

正常家兔心脏取血, 加枸橼酸三钠溶液与血液

以 1:9 比例抗凝, 上下轻轻颠倒摇晃, 使抗凝剂
和血液混合均匀。血液第 1 次以 800 r/min 离心 10
min, 分离上层血浆; 再以相同的离心转速和时间
进行第 2 次离心, 取出上层血浆, 即得 PRP。取第
1 次离心的下层血液, 以 3 500 r/min 离心 10 min,
上层血浆即为 PPP。

2.4 血小板最大聚集率的测定及抑制率的计算

2.4.1 空白溶液的制备 取 5 个比浊管, 加入 280 μL
PPP, 分别加入 10 μL 生理盐水、阿魏酸钠高剂量溶
液、阿魏酸钠低剂量溶液、川芎提取物高剂量溶液、
川芎提取物低剂量溶液, 作为相应的空白溶液。

2.4.2 待测溶液的制备 另取 5 个比浊管, 加入 280
 μL PRP, 再分别加入生理盐水(对照组)、阿魏酸
钠高剂量溶液、阿魏酸钠低剂量溶液、川芎提取
物高剂量溶液、川芎提取物低剂量溶液各 10 μL , 作
为相应的待测溶液。

2.4.3 最大聚集率的测定 将血小板聚集仪预热
至 37 $^{\circ}\text{C}$ 后, 先在各自的空白溶液中加入 10 μL 生
理盐水, 放入测试孔中调零。然后换成相对应的待
测溶液, 预热 60 s, 加入 10 μL 腺苷-5'-二磷酸钠盐
溶液, 测定各待测溶液组血小板的最大聚集率。按
公式计算提取物或阳性药血小板聚集的抑制率。

聚集抑制率 = (对照组血小板最大聚集率 - 给药组血
小板最大聚集率) / 对照组血小板最大聚集率

2.5 川芎样品抗血小板聚集活性的生物效价的标定

按照《中国药典》2015 年版(四部)生物检定
统计法中量反应平行线(2.2)法^[2], 选择相邻低、
高剂量之间的比值为 0.5, 采用随机设计实验, 并
进行可靠性检验结果的判断。定义每毫克阿魏酸钠
的效价为 1 个活性单位(U); 估计效价为 1 U/g,
标定川芎提取物的抗血小板聚集活性。将提取物和
阿魏酸钠血小板聚集的抑制率代入 BS2000 生物统
计软件, 计算提取物的生物效价。再结合川芎提取
物的提取率和含水量, 计算川芎药材、饮片和中成
药抗血小板聚集活性的生物效价。

3 结果与分析

3.1 抗血小板聚集活性定量测定方法的优化

3.1.1 血液离心转速对血小板聚集的影响 由于
红细胞会影响 PRP 的透过率^[10-11], 并且红细胞、白
细胞的存在会减慢血小板的相对运动速度, 从而影
响血小板的聚集^[12]。虽然离心可将血液中的血小板
与红细胞、白细胞分开, 得到 PRP。但是在不同离
心转速下, PRP 与血液中其他组分的分离效果不同,

并且离心力对血小板活性有一定的影响^[10,13]。为此,本研究比较了不同转速(600、800、1 000 r/min)离心制备的 PRP 中血小板的聚集率,重复测定 4 次。结果表明,在这 3 种离心转速制备的 PRP 中,血小板与其他组分的分离效果不同。在 600 r/min 制备的 PRP 中有红细胞($0.05 \times 10^{12}/L$)和白细胞($0.3 \times 10^9/L$);在 800 r/min 和 1 000 r/min 制备的 PRP 中均无红细胞和白细胞。这 3 种 PRP 血小板的最大聚集率也不同,分别为(33.18 ± 7.55)%、(64.40 ± 6.95)%和(54.35 ± 10.15)%;经单因素 ANVON 方差分析,600、800、1 000 r/min 离心制备 PRP 的血小板聚集率之间存在极显著性差异($P < 0.01$),800 r/min 与 1 000 r/min 离心的 PRP 之间无显著性差异($P > 0.05$),而 800 r/min 离心 PRP 的血小板聚集率比 1 000 r/min 组略高。故本研究选择 800 r/min 离心,制备 PRP。

3.1.2 血浆中的血小板数对其聚集率的影响 对血小板数是否影响其聚集的观点不一致。一种观点认为血小板数会影响其聚集,故用 PPP 稀释 PRP 中的血小板,使血小板数相近或在某一个范围内,再测定其聚集率^[11]。另一种观点认为血小板数对其聚集的影响较小,没必要调整 PRP 中的血小板数^[14]。为此,本研究比较了血小板数分别为 80×10^9 、 131×10^9 、 $205 \times 10^9/L$ 的 PRP 中血小板的聚集率,重复测定 5 次。其平均值分别为(62.18 ± 3.82)%、(67.48 ± 8.51)%和(66.00 ± 2.81)%;经单因素 ANVON 方差分析, $P > 0.05$ 。表明血小板数目的多少对血小板聚集无显著影响。故本研究制备的 PRP,不调整血小板数,直接测定其聚集率,计算抗血小板聚集活性。

3.1.3 供试液中 DMSO 的体积分数对血小板聚集的影响 在供试品的制备过程中,需加入助溶剂 DMSO 促进样品溶解,而 DMSO 具有抗血小板聚集的作用^[15]。为此,本研究比较了加入 0% (空白组)、15%、30%、60% DMSO 供试液的血小板聚集率,重复测定 3 次。其聚集率分别为(82.27 ± 3.41)%、(83.93 ± 2.32)%、(74.13 ± 1.25)%、(51.23 ± 3.77)%。对组间聚集率进行单因素 ANVON 方差分析,空白组与 15% DMSO 组之间无显著性差异($P > 0.05$),空白组与 30% DMSO 组、60% DMSO 组之间存在极显著性差异($P < 0.01$)。表明 DMSO 的体积分数影响血小板聚集。故本研究制备的供试品溶液,加入 DMSO 的体积分数为 15%。

3.1.4 腺苷-5'-二磷酸钠盐溶液的浓度对血小板聚集的影响 由于 ADP 不稳定;为此,测定血小板聚集率时选择腺苷-5'-二磷酸钠盐作为诱导剂诱导血小板聚集。加入腺苷-5'-二磷酸钠盐的浓度不同,诱导血小板聚集的程度不同^[16]。本研究比较了加入 150、300、600 $\mu\text{mol/L}$ 腺苷-5'-二磷酸钠盐诱导的血小板聚集率,重复测定 4 次,分别为(54.90 ± 7.52)%、(79.30 ± 7.76)%和(77.20 ± 8.15)%。对组间聚集率进行单因素 ANVON 方差分析,150 $\mu\text{mol/L}$ 组与 300 $\mu\text{mol/L}$ 组、600 $\mu\text{mol/L}$ 组之间存在极显著性差异($P < 0.01$);300 $\mu\text{mol/L}$ 组与 600 $\mu\text{mol/L}$ 组之间无显著性差异($P > 0.05$)。表明腺苷-5'-二磷酸钠盐浓度达到 300 $\mu\text{mol/L}$ 后,血小板聚集率不增加。故本研究加入腺苷-5'-二磷酸钠盐的浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 抗血小板聚集活性阳性药的选择及其线性范围

临床上抗 ADP 诱导血小板聚集的药物主要有噻氯匹定、氯吡格雷和普拉格雷;但是这 3 种都是前药,在体外没有抗 ADP 诱导血小板聚集的活性^[17]。阿魏酸是川芎的有效成分之一,在体内、外均具有抗 ADP 诱导血小板聚集的作用^[18]。由于阿魏酸在水中的溶解度低,其相应的盐阿魏酸钠也具有体内、外抗 ADP 诱导血小板聚集的作用^[19],且在水中的溶解度较好。故选择阿魏酸钠为抗 ADP 诱导血小板聚集的阳性药,标定川芎受试样品的抗血小板聚集活性。

将阿魏酸钠配制成 15、30、45、60 mg/mL 质量浓度梯度,测定其血小板聚集率,计算血小板抑制率。以阿魏酸钠的质量浓度(X , mg/mL)为横坐标,血小板聚集抑制率(Y , %)为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.441 X - 0.098$ ($r = 0.993 4$, $n = 4$)。结果表明,阿魏酸钠在 15~60 mg/mL 与血小板聚集抑制率呈良好的线性关系。

3.3 川芎提取方法的选择

3.3.1 川芎不同化学部位抗血小板聚集活性的比较 川芎含挥发油、多糖、酚酸类等化学成分^[20]。为了比较不同化学部位的抗血小板聚集活性,本研究将川芎粉末用水蒸气蒸馏法提取挥发油(A);加水回流提取,得到的水溶液,经浓缩后,调节至乙醇体积分数 80%,静置、离心,得到粗多糖(沉淀,B)和其他水溶性成分(上清液,C)。再分别测定各化学部位的抗血小板聚集活性,分别为 2.774 U/g (A)、1.897 U/g (B) 和 4.581 U/g (C)。表明川芎

各化学部位均具有抗血小板聚集活性。其中，水溶性成分抗血小板聚集活性最强。

3.3.2 提取物溶剂的选择 乙醇通常能提取中药的各种化学成分。为此，本研究进一步比较了不同体积分数乙醇的提取效果。川芎分别以 100%、70%、50%、30%乙醇和水为溶剂，回流提取，测定其抗血小板聚集活性，分别为 0.487、0.585、0.545、0.593、1.004 U/g。表明川芎水提物的抗血小板聚集活性最强，与中药通常以水为煎煮溶剂一致。故本研究选择水为川芎样品的提取溶剂。

3.3.3 提取次数的选择 为了完全提取川芎中的化学成分，以水为溶剂，对提取次数进行了考察。取 60 g 川芎粉末，加 600 mL 水，回流提取 60 min，滤过，浓缩。重复提取 5 次，比较每次提取物的质量。结果表明，第 5 次提取物的质量仅为总提取物的 3.28%。说明前 4 次已经将川芎的化学成分提取完全。故川芎提取的次数确定为 4 次。

3.4 川芎提取物的血小板聚集率测定次数的考察

为了获得既稳定、可靠的实验结果，又节省动物量，降低成本，本实验对供试品血小板聚集率的测定次数进行了考察。以川芎提取物为供试品，分别测定 2、3、4、5、6 次。根据《中国药典》2015 年版中量反应平行线 (2.2) 法进行可靠性检验 (回

归项 P 值 <0.01 ，偏离平行项 P 值 >0.05)，并计算供试品的抗血小板聚集活性。结果表明，当 $n=2$ 、3、4、5、6 时，回归项和偏离平行项的 P 值均通过可靠性检验，抗血小板聚集活性效价分别为 1.722、1.518、1.610、1.582、1.568 U/g，其可信限率分别为 75.13%、40.70%、29.76%、24.51%、17.07%。可信限率反映方法的精密度和稳定性；可信限率越小，表明精密度越好。参照肖小河等^[21]对中药生物检定法可信限率 (不超过 30%) 的建议，本研究抗血小板聚集活性的可信限率定为不超过 30%。故测定次数选择 4 次以上。

3.5 抗血小板聚集活性定量测定的方法学考察

3.5.1 可靠性的检验 根据量反应平行线测定法 (2.2) 法可靠性检验结果成立的判别要求，对定量测定川芎提取物抗血小板聚集活性的结果进行了可靠性检验 (表 2)。结果表明，回归项极显著 ($P<0.01$)，说明随着阿魏酸钠和供试品给药剂量的增加，血小板抑制率增加呈规律性增加，即量-效呈直线线性关系。偏离平行不显著 ($P>0.05$)，表明供试品高、低剂量组的血小板抑制率增加值构成的直线与阿魏酸钠高、低剂量组的血小板抑制率增加值构成的直线呈平行关系。说明本方法可靠性检验的结果成立，可用于定量测定川芎提取物的抗血小板聚集活性。

表 2 川芎提取物抗血小板聚集活性的可靠性检验

Table 2 Reliability test of antiplatelet aggregation activity for *Chuanxiong Rhizoma* extract

变异来源	自由度	差方和	方差	F 值	P 值
试品间	1	0.319	0.319	40.040	<0.01
回归	1	0.863	0.863	108.450	<0.01
偏离平行	1	0.015	0.015	1.832	>0.05
剂间	3	1.197	0.399	50.110	<0.01
误差	20	0.159	0.008		

3.5.2 重复性的测定 取同一份川芎样品，称取 6 份，加水提取、测定、计算抗血小板聚集活性和可信限率。结果表明，6 份样品的可靠性检验结果均成立，其抗血小板聚集活性分别为 1.622、1.518、1.515、1.497、1.500、1.614 U/g，可信限率分别为 21.42%、26.15%、24.02%、25.16%、24.58%、22.05%。其抗血小板聚集活性和可信限率的 RSD 值分别为 3.43%和 6.98% ($n=6$)，均小于 10%。表明方法的重复性良好。

3.6 川芎样品抗血小板聚集活性的测定

对收集的 4 份川芎药材、2 份川芎饮片和 2 份含川芎的中成药样品进行了抗血小板聚集活性的

测定，结果见表 3。表明这 8 份样品均有抗血小板聚集活性，并且差异显著。

4 讨论

川芎为活血化瘀药，其抗血小板聚集作用可反映活血化瘀的功效。本研究以血小板聚集抑制率为抗血小板聚集活性的评价指标，用阿魏酸钠标定川芎抗血小板聚集活性，通过优化川芎的提取方法和抗血小板聚集率的测定条件，建立了定量测定川芎产品抗血小板聚集活性的方法。该方法测定结果的精密度高，重现性好，可准确测定川芎样品的抗血小板聚集活性。通过对 8 份川芎根茎药材、饮片及含川芎中成药样品抗血小板聚集活性的定量测定，

表3 川芎样品的抗血小板聚集活性

Table 3 Antiplatelet aggregation activity of *Chuanxiong Rhizoma* with related Chinese patent medicines

编号	提取物的提取率/%	可信限率/%	提取物抗血小板聚集活性/(U·g ⁻¹)	样品抗血小板聚集活性/(U·g ⁻¹)
1	40.87	10.62	2.068	0.845
2	43.48	11.57	3.183	1.384
3	36.59	11.83	1.957	0.716
4	38.71	11.24	1.931	0.748
5	53.19	28.88	1.304	0.694
6	58.60	29.13	1.021	0.598
7	—	28.72	0.919	0.919
8	—	29.68	0.506	0.506

发现不同样品的抗血小板聚集活性不同,表明其质量不同。故本方法可用于川芎药材、饮片及含川芎中成药的抗血小板聚集活性的定量测定,评价其质量。

参考文献

- [1] 张廷模. 临床中药学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2014.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 乔凤仙, 蔡 皓, 屠鹏飞, 等. 单标多组分 HPLC 定量分析法在川芎质量评价中的应用 [J]. 药学学报, 2015, 50(6): 749-754.
- [4] 田 璐, 闫海霞, 傅欣彤, 等. 一测多评法同时测定川芎、当归饮片多种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 848-854.
- [5] Zhang X L, Liu L F, Zhu L Y, *et al.* A high performance liquid chromatography fingerprinting and ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry chemical profiling approach to rapidly find characteristic chemical markers for quality evaluation of dispensing granules, a case study on *Chuanxiong Rhizoma* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88C(4): 391-400.
- [6] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [7] 陈 杰. 病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [8] 吕树铮, 许 锋. 血小板功能监测之我见 [J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(4): 451-456.
- [9] 梅超南, 曾 瑾, 张了云, 等. 不同产地川芎对家兔血小板聚集, 小鼠凝血功能及血瘀大鼠血液流变性的品质评价研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 110-112.
- [10] Arora S, Doda V, Kotwal U, *et al.* Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time [J]. *Transf Apher Sci*, 2016, 54(1): 103-110.
- [11] 尚 红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [12] 许 菁, 王骁龙, 刘筠乔, 等. 红细胞对血小板黏附行为的影响 [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2013, 52(5): 661-668.
- [13] 洪兴金, 徐月河, 张 起. 离心力对制备浓缩血小板聚集功能的影响 [J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(5): 49.
- [14] Linemann B, Schwonberg J, Mani H, *et al.* Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(4): 677-683.
- [15] Lehuu B, Curtis-Prior P B. Effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on aggregation of human blood platelets [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1987, 39(1): 62-63.
- [16] Gum P A, Kottke-Marchant K, Welsh P A, *et al.* A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease [J]. *J Amer Coll Cardiol*, 2003, 41(6): 961-965.
- [17] 杨宏艳, 王晓良. 抗血小板药物研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(4): 250-254.
- [18] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255.
- [19] 高树伟, 陈在嘉, 陶寿淇, 等. 阿魏酸钠对冠心病患者血小板聚集及血小板 TXA-2 的影响 [J]. 中西医结合杂志, 1988, 8(5): 263-265.
- [20] 孙晓春, 颜 军, 何 刚, 等. 川芎多糖的分离纯化及其单糖组成测定 [J]. 四川农业大学学报, 2011, 29(1): 56-60.
- [21] 肖小河, 鄢 丹, 王伽伯, 等. 关于中药质量生物检定的几点商榷 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 504-512.