川芎及其中成药抗凝胶活性的定量测定

赵玉玲[1]，华 芳[1]，李 莞[1]，龚 圣[1]，邓晶晶[1*]，王德建[1]，赵 璐[2]，吕光华[1, 3*]

1. 成都中医药大学药学院，四川 成都 611137
2. 四川省食品药品检验检测院，四川 成都 611731
3. 成都中医药大学民族医药学院，四川 成都 611137

摘 要：目的 以纤维蛋白原用量为指标，建立体外定量测定川芎抗凝胶活性的方法，评价川芎及其中成药的抗血栓作用。**方法** 将川芎先后用乙醇和水定量提取，以总提取物为供试品，测定形成稳定纤维蛋白凝胶时的纤维蛋白原用量。以纤维蛋白原用量为抗凝胶活性的评价指标，用阿魏酸钠标定川芎的抗凝胶活性。根据《中国药典》2015 年版（四部）生物检定统计法中的直接测定法，计算川芎的抗凝胶活性。测定了 9 份川芎药材、饮片及中成药的抗凝胶活性，评价方法的适用性。**结果** 阿魏酸钠和川芎提取物均具有显著的抗凝胶活性。川芎供试品重复测定抗凝胶活性的 RSD 值为 4.00%（n=6），可信限率为 7.82%。不同川芎样品的抗凝胶活性不同，5 份川芎药材抗凝胶活性的效价分别为 0.72～1.14 U/g，川芎饮片及川芎酒炙饮片分别为 0.68、1.32 U/g，通脉颗粒和血府逐瘀片分别为 2.56、2.51 U/g。**结论** 建立的方法能准确测定川芎药材、饮片及相关中成药的抗凝胶活性，评价其杭血栓作用。

关键词：川芎；抗凝胶活性；质量评价；生物检定；纤维蛋白原

中图分类号：R286.2 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2020)02 - 0469 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.025

Bioassay of anti-gel bioactivity of *Chuanxiong Rhizoma* and related Chinese patent medicines

ZHAO Yu-ling[1], HUA Fang[1], LI Wan[1], GONG Sheng[1], DENG Jing-jing[1], WANG De-jian[1], ZHAO Lu[2], LV Guang-hua[1, 3]

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China
3. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective Owing to fibrinogen dosage, this study is to develop a method for the bioassay of anti-gel bioactivity of *Chuanxiong Rhizoma in vitro*, and evaluate the antithrombotic effect of *Chuanxiong Rhizoma* and its related Chinese patent medicines. **Methods** *Chuanxiong Rhizoma* powder was extracted in ethanol and water, respectively. The mixed extract was used as sample to quantify the level of fibrinogen when the stable fibrin gel was formed *in vitro*. The fibrinogen dosage was chosen as biomarker for anti-gel bioactivity. Sodium ferulate was chosen as reference. The anti-gel bioactivity of *Chuanxiong Rhizoma* was calculated according to the direct measurement belong to the bioassay statistical method in the Chinese Pharmacopoeia 2015 (Vol. 4). Moreover, the amounts of anti-gel bioactivity were quantified in nine *Chuanxiong Rhizoma* samples including *Chuanxiong Rhizoma* raw materials, decoction pieces, and related Chinese patent medicines to evaluate the applicability for this developed method. **Results** Both sodium ferulate and the extract of *Chuanxiong Rhizoma* showed significant anti-gel bioactivity (P < 0.01). The RSD for the amounts of anti-gel bioactivity was 4.00% (n = 6) in six replicated tests with the confidence limit rate of 7.82% (n = 6). The amounts of anti-gel bioactivity were significant difference among the various types of *Chuanxiong Rhizoma* samples, i.e. 0.72—1.14 U/g for five *Chuanxiong Rhizoma* raw materials, 0.68 and 1.32 U/g for *Chuanxiong Rhizoma* decoction pieces and processed slice with yellow wine, 2.56 and 2.51 U/g for Tongmai Granules and Xuefu Zhuyu Tablets. **Conclusion** The developed method can accurately quantify the level of anti-gel

收稿日期：2019-09-09

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81773896）；四川省重点研发项目（2017SZ0156）；四川省教育厅创新团队建设计划（18TD0017）

作者简介：赵玉玲（1995—），女，在读硕士，从事中药品种、品质及资源研究。Tel: 18408257804 E-mail: 1054551405@qq.com

*通信作者 吕光华，教授，博士生导师，从事中药/民族药鉴定和资源研究。Tel: (028)61800066 E-mail: lughcd@aliyun.com

邓晶晶，实验师，从事中药资源研究。Tel: (028)61800231 E-mail: dengjingjing-82@126.com

bioactivity in *Chuanxiong Rhizoma* raw materials, decoction pieces and related Chinese patent medicines to assess their antithrombotic effect.

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; anti-gel bioactivity; quality evaluation; bioassay; fibrinogen

中药川芎来源于伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎，为常用的活血化瘀药，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作用，广泛应用于各种血瘀诸痛证[1-3]。现代研究主要通过测定阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 A 等药效成分的含量评价川芎的质量[4-7]。由于藁本内酯、洋川芎内酯 A 等苯酞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 项指标与其活血化瘀功效的相关性不强。

现代研究表明[8-9]，血瘀证与血栓性疾病息息相关。其中，纤维蛋白原和纤维蛋白结合物的黏附作用是血栓形成的主要原因[10]。血液凝固是血浆中的可溶性纤维蛋白原变成不可溶的纤维蛋白的过程[11]。纤维蛋白原是血液的组成成分，分子大、浓度高且具有聚合作用，是除红细胞外决定血液黏度的重要因素。血浆纤维蛋白原浓度增高，血浆黏度和全血黏度也会相应的升高，从而导致血栓形成。可见，通过测定川芎抑制纤维蛋白原在凝血酶的催化作用下形成纤维蛋白的作用（简称抗凝胶作用/活性），可以指示川芎的活血化瘀功效中的抗血栓作用。当川芎样品（或阳性药）剂量一定时，形成稳定凝胶所需纤维蛋白原的剂量越大，则说明川芎样品（或阳性药）的抗凝胶活性越强。即样品抗凝胶活性的强弱与其所需的纤维蛋白原的剂量呈正相关。故样品所需纤维蛋白原剂量的倒数可表示当纤维蛋白原质量浓度固定时，形成稳定凝胶所需要的样品的剂量。

为此，本研究收集了 9 份川芎药材、饮片及其中成药样品。首先以川芎药材为对象，结合生物检定法，以纤维蛋白原的用量为抗凝胶活性的评价指标，以阿魏酸钠为阳性药标定川芎抗凝胶活性，通过优化抗凝胶活性的测定条件，建立了定量测定川芎抗凝胶活性的方法。再测定不同川芎药材、饮片及其中成药的抗凝胶活性，考察方法的适用范围，以期为川芎的质量评价提供新的生物检测方法。

1 材料

1.1 试剂与药品

牛血纤维蛋白原（批号 1103E062）、凝血酶（批号 1103E062），北京索莱宝科技有限公司；阿魏酸钠（批号 S31124，上海源叶生物科技有限公司）质量分数≥98%；0.9%氯化钠注射液（四川科伦药业股份有限公司）；磷酸二氢钾、氢氧化钠、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。

7 份川芎药材及饮片由成都中医药大学吕光华教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。2 份含川芎的中成药通脉颗粒、血府逐瘀片从万华大药房购买。样品信息见表 1。

1.2 仪器

DZKW-4 型电子恒温水浴锅（北京中兴伟业仪器有限公司）；PHS-3C+型酸度计（成都世纪方舟科技有限公司）；ULUP-IV-10T 型优普系列超纯水器（成都超纯科技有限公司）；电子天平（BSA224S 型，max＝220 g，d＝0.1 mg；BP211D 型，max＝41 g，d＝0.01 mg；北京赛多利斯科学仪器有限公司）。

表 1 川芎及其中成药样品的来源

Table 1 Source of *Chuanxiong Rhizome* and related Chinese patent medicines

样品编号	名称	来源	收集时间
1	川芎药材	四川省彭州市敖平镇友谊村	2018-05
2	川芎药材	四川省什邡市隐峰镇寿增村	2018-05
3	川芎药材	四川省都江堰市柳街镇水月村	2018-05
4	川芎药材	四川省崇州市梓潼镇城白村	2018-05
5	川芎药材	四川省眉山市彭山县马庙村	2018-05
6	川芎饮片（批号 171101）	四川国强中药饮片有限公司	2018-08
7	川芎酒炙饮片（批号 180800751）	成都康美药业生产有限公司	2018-12
8	通脉颗粒（批号 20170509）	贵州百灵正鑫药业有限公司	2018-08
9	血府逐瘀片（批号 171201）	潍坊中狮制药有限公司	2017-12

2 方法与结果

2.1 工作缓冲液的配制

取 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液 10 mL，0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 7 mL，置于 100 mL 量筒中，加超纯水 40 mL，搅拌均匀，用酸度计测定 pH 值，得到 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液。再取本磷酸盐缓冲液与生理盐水以 1∶17 混合均匀，即为工作缓冲液。

2.2 阳性药的配制

精密称取 0.4 g 阿魏酸钠于 10 mL 量瓶中，加入工作缓冲液溶解，定容至刻度，摇匀，得到质量浓度为 40 mg/mL 的阿魏酸钠阳性药溶液。

2.3 川芎供试液的制备

2.3.1 川芎样品的提取 称取 60 g 川芎或饮片粉末（24 目），加入 600 mL 乙醇回流提取 1 h，滤过，提取 3 次；药渣再加入 600 mL 水提取 1 h，滤过，提取 3 次；合并醇提物和水提物，减压浓缩至约 60 mL，称质量，得到川芎提取物。

2.3.2 川芎供试液的配制 取 0.4 g 川芎提取物或含川芎中成药粉末于 10 mL 量瓶中，加入工作缓冲液溶解，定容至刻度，得到质量浓度为 40 mg/mL 川芎供试液。

2.4 纤维蛋白原溶液和凝血酶溶液的制备

2.4.1 纤维蛋白原溶液的制备 精密称取 0.25 g 牛血纤维蛋白原，置于 50 mL 量瓶中，加入生理盐水溶解，定容至刻度，得到 5 mg/mL 的纤维蛋白原溶液。

2.4.2 凝血酶溶液的制备 取规格为 1 000 U 的凝血酶粉末 1 瓶，加入生理盐水溶解，转移至 50 mL 量瓶中，定容至刻度，得到 20 U/mL 的凝血酶溶液。分别吸取 1 mL 上述凝血酶溶液至 50 个 5 mL 离心管中，置于−20 ℃低温保存，备用。临用前，取装有 1 mL 凝血酶溶液的离心管，加入 3 mL 生理盐水，稀释成 5 U/mL 的凝血酶溶液。

2.5 川芎药材或饮片提取物含水量的测定

取川芎药材或饮片的提取物 3.0 g，根据《中国药典》2015 年版（四部）水分测定法中甲苯法[1]，测定该提取物的水分。每份川芎提取物平行测定 2 次，计算平均含水量（表 2）。

2.6 提取物的提取率的测定

取 60 g 川芎药材或饮片粉末（24 目），按“2.3.1”项提取、浓缩、称定质量，得到总提取物的质量。再称取该提取物 3.0 g，按“2.5”项测定含水量。根据以下公式计算总提取物的干质量提取率。

药材（或饮片）提取物的提取率＝提取物质量×(1－含水量)/药材（或饮片）的质量

2.7 纤维蛋白原剂量的测定

取 20 μL 川芎供试液（或阳性药溶液）于 2 mL 离心管中，依次加入 75 μL 纤维蛋白原溶液及 20 μL 凝血酶溶液，充分混匀，立即放入 37 ℃水浴锅中，10 min 后取出离心管，观察凝胶状态。若形成稳定的凝胶，则记录所用的纤维蛋白原剂量和成胶状态。若没有形成稳定的凝胶，则每次增加 25 μL 纤维蛋白原溶液，自“取 20 μL 川芎供试液（或阳性药溶液）”开始，重复以上步骤，直到形成稳定凝胶为止，记录所用纤维蛋白原的剂量。重复测定 6 次。9 份川芎药材、饮片及其中成药按“2.3”项方法制备成供试溶液，测定纤维蛋白原的剂量，结果见表 2。

川芎样品（或阳性药）的纤维蛋白原剂量＝1/形成稳定凝胶时纤维蛋白原剂量

表 2 川芎及其中成药的抗凝胶活性 (n = 2)

Table 2 Anti-gel bioactivity of *Chuanxiong Rhizome* and related Chinese patent medicine (n = 2)

编号	样品类型	提取物提取率/%	提取物含水量/%	纤维蛋白原剂量/μL	提取物的抗凝胶活性/(U·g^{-1})	可信限率/%	样品抗凝胶活性/(U·g^{-1})	样品抗凝胶活性 MAD 值/%
1	川芎药材	62.57	53.47	295.8	1.83	13.43	1.14**	0.07
2	川芎药材	44.21	67.84	262.5	1.62	13.16	0.72**	0.18
3	川芎药材	44.41	70.35	279.2	1.72	13.84	0.77**	0.23
4	川芎药材	52.91	63.32	262.5	1.62	14.42	0.86**	0.16
5	川芎药材	51.91	50.11	237.5	1.47	13.97	0.76**	0.68
6	川芎饮片	41.34	74.01	262.5	1.64	14.88	0.68**	0.57
7	川芎酒炙饮片	68.50	53.03	237.5	1.93	14.53	1.32*	0.37
8	通脉颗粒	—	—	295.8	2.56	10.78	2.56	0.04
9	血府逐瘀片	—	—	262.5	2.51	10.45	2.51	0.02

与中成药样品比较：*P<0.05 **P<0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 *vs* traditional Chinese medicine samples

2.8 川芎样品抗凝胶活性的生物效价的标定

按照《中国药典》2015 年版生物检定统计法中直接测定法[1]，进行可信限和可行限率检验结果的判断。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，标定川芎提取物或中成药的抗凝胶活性（表 2）。将川芎药材（或饮片）提取物的纤维蛋白原剂量代入 BS2000 生物统计软件，计算川芎药材和饮片提取物抗凝胶活性的生物效价，按照下列公式计算川芎药材或饮片抗凝胶活性的生物效价。

川芎药材（或饮片）抗凝胶活性的生物效价＝提取物的生物效价×药材（或饮片）提取物的提取率

2.9 抗凝胶活性定量测定的方法学验证

2.9.1 重复性的考察 取 1 号川芎样品，称取 6 份，先后经乙醇和水提取后，测定总提取物的抗凝胶活性，计算可信限率，再根据提取物的提取率和含水量，计算川芎样品的抗凝胶活性。结果表明，其抗凝胶活性和可信限率的 RSD 值分别为 4.00%和 7.82%，均小于 10%。

2.9.2 方法的适应性考察 为了考察建立的定量测定川芎抗凝胶活性方法的适用范围，分别测定了 5 份川芎药材、2 种川芎饮片和 2 种含川芎的中成药的抗凝胶活性，每份样品重复测定 2 次，计算 2 份平行样品抗凝胶活性的平均值。结果表明，9 份样品的纤维蛋白原剂量测定结果经 SPSS 统计软件分析，均符合正态分布；抗凝胶活性中位数绝对偏差（MAD）值为 0.02%～0.68%（表 2）。这 3 类样品均有抗凝胶活性，并且抗凝胶活性的差异较大。川芎药材与中成药的抗凝胶活性有极显著性差异（$P<0.01$），川芎饮片与中成药的抗凝胶活性有显著性差异（$P<0.05$）。表明本方法可以用于川芎药材、饮片及其中成药抗凝胶活性的定量检测。

2.10 抗凝胶活性定量测定方法的条件优化

由于溶液的 pH 值影响凝血酶的活性，偏离酶的最适 pH 值会影响酶与底物的电离状态以及酶与底物的构象，从而降低酶与底物的结合能力。故缓冲液的 pH 值应该控制在凝血酶活性最强的范围[12-13]。同时，由于水浴的时间影响纤维蛋白凝胶的形成及其稳定性。因此，本研究考察了工作缓冲液的 pH 值和水浴时间与形成凝胶的相关性。

2.10.1 缓冲液 pH 值的选择 在磷酸盐缓冲液配置时，分别比较了 pH 值 7.2、7.3、7.4、7.45 和 7.5 缓冲液形成凝胶的状态。重复测定 6 次。结果表明，当 pH 值为 7.2、7.3、7.45 和 7.5 时，实验组均未全部形成稳定凝胶；只有当 pH 值为 7.4 时，实验组全部形成了稳定凝胶。故为保证凝血酶的活性及实验的稳定性，配制工作缓冲液的 pH 值为 7.4。

2.10.2 水浴时间的考察 在 2 mL 离心管中，加入工作缓冲液 20 μL，随后加入 75 μL 纤维蛋白原溶液，再加入 20 μL 凝血酶溶液，充分混匀，立即放入 37 ℃水浴锅中；分别于 2、4、6、8、9、10 min 后取出离心管，观察凝胶情况。重复测定 6 次。结果表明，水浴 2、4、6、8 min 后，实验组均未全部形成稳定凝胶；当水浴时间 9、10 min 后，实验组能全部形成稳定凝胶。为避开 9 min 形成凝胶的临界点，故选择 10 min 为凝胶反应的水浴时间。

2.10.3 抗凝胶活性对照品的选择 阿魏酸是川芎的有效成分之一，是常用的抗凝药物。但是阿魏酸在水中的溶解度低；而其相应的盐类化合物阿魏酸钠也具有较强的抗凝胶作用[14]，并且在水中的溶解性较好。故选择阿魏酸钠作为抗凝胶反应的阳性药，标定川芎的抗凝胶活性。

2.10.4 纤维蛋白原-凝血酶凝胶反应初始剂量的选择 分别取纤维蛋白原溶液 20、25、30、40、50、60、75、100 μL 于 2 mL 离心管中，分别加入 20 μL 凝血酶溶液，充分混匀后，立即放入 37 ℃水浴锅中，10 min 后取出离心管，观察成胶情况。以倒置离心管时胶块边缘无液体滑下为形成稳定凝胶的判断依据。重复实验 6 次。结果表明，当纤维蛋白原溶液加入量大于 25 μL 时，各实验组均形成了一定量的胶块；当各实验组加入量大于 75 μL 时，形成的胶块稳定。因此，选择纤维蛋白原溶液初始加入量为 75 μL，每次增加 25 μL 进行实验。

2.10.5 川芎提取物或中成药抗凝胶活性测定次数的考察 由于生物评价的准确性与测定次数相关，为了既获得川芎提取物稳定、可靠的抗凝胶活性结果（生物效价），又节省纤维蛋白原用量，降低成本，本研究对川芎提取物抗凝胶活性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。并计算供试品的抗凝胶活性。结果表明，当测定次数为 2～6 次时，川芎提取物抗凝胶活性的效价分别为 1.84、1.90、1.92、1.94、1.97 U/g，其可信限率分别为 51.08%、19.78%、12.69%、9.42%和 8.09%。由于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。一般规定生

物检定的相对误差范围（称可信限率）为±15%[15]。本研究测定 4 次以上的可信限率均小于 15%。故川芎提取物（中成药）抗凝胶活性的测定次数选择 4 次以上即可满足条件。

3 讨论

川芎为活血化瘀药，其拮抗纤维蛋白原形成纤维蛋白凝胶反应的活性可以反映活血化瘀功效中的抗血栓作用。本研究以凝血酶-纤维蛋白原凝胶反应中的纤维蛋白原的剂量为抗凝胶活性的评价指标，用阿魏酸钠标定川芎的抗凝胶活性，通过优化抗凝胶活性的测定条件，建立了定量测定川芎抗凝胶活性的方法。该方法操作简单方便，测定结果的精密度高，重现性好，可准确测定川芎的抗凝胶活性。

通过对 5 份川芎药材、2 种川芎饮片、2 种含川芎的中成药样品的抗凝胶活性的定量测定，不同样品的抗凝胶活性不同，说明本方法可用于川芎药材、饮片及含川芎中成药的抗凝胶活性的定量测定，评价抗血栓作用，指示活血化瘀功效的强弱及其质量。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 张廷模. 临床中药学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2014.

[3] Chen Z J, Zhang C, Gao F, *et al*. A systematic review on the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Chuanxiong) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119: 309-325.

[4] 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.

[5] 田 璐, 闫海霞, 傅欣彤, 等. 一测多评法同时测定川芎、当归饮片中多种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 848-854.

[6] 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, 88(4): 391-400.

[7] He Y F, Li Q, Bi K S. Simultaneous determination of six active components by a single standard to determine multi-components combined with fingerprint analysis for the quality control of *Rhizoma Chuanxiong* [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(7): 1090-1099.

[8] Lei W, Li L Z, Wang H S, *et al*. Study on the influence of oxidative stress on the fibrillization of fibrinogen [J]. *Biochem J*, 2016, 473: 4373-4384.

[9] Fraser L, Macrae M M. Domingues A C, *et al*. The (Patho) physiology of Fibrinogen γ' [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2016, 42: 344-355.

[10] 王加瑞. 血流变常测指标间关系及应用价值 [J]. 中华血液学杂志, 2005, 15(2): 304-318.

[11] Medved L, Weisel J W. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(2): 355-359.

[12] 谢万如, 左 勇. 凝血酶活力影响因素的初步研究 [J]. 四川理工学院学报, 2004, 17(3): 147-150.

[13] 李霞莲, 郭献荣, 尹莉莉, 等. 缓冲液 pH 值影响凝血酶时间测定的分析 [J]. 实用医技杂志, 2014, 21(3): 292-298.

[14] 高毅滨. 阿魏酸哌嗪片和阿魏酸钠对小鼠凝血时间的影响 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(19): 485-486.

[15] 肖小河. 中药质量生物评价 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.