

凝血酶滴定法测定云南菲牛蛭中水蛭素含量的改进研究*

张 利¹, 李志远¹, 风云昉²

(1. 云南省食品药品监督检验研究院, 云南 昆明 650011; 2. 昆明医科大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 改进原云南省菲牛蛭质量标准中水蛭素的含量测定方法。**方法** 考察白瓷板法代替原试管方法、两种浓度的凝血酶溶液、几种滴定体积对含量测定的影响;用原方法和改进后的方法分别对五批样品进行滴定比较。**结果** 改进后,用白瓷板法测定,配制两种浓度的凝血酶溶液($40\text{NIH}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 $20\text{NIH}\cdot\text{mL}^{-1}$),采用几种滴定体积($1\sim 5\mu\text{L}$),每 1min 滴加 1 次,先滴加高浓度凝血酶溶液初测消耗的凝血酶溶液体积后,再用两种浓度的凝血酶溶液重新进行精确测定;增加空白对照实验,限定反应时间为 10min;菲牛蛭样品浓度在 $0.00678\sim 0.0597\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9983$)内与消耗的凝血酶单位量呈线性相关;五批样品的含量为 $156.68\sim 234.25\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 均小于 5%;含量供试品溶液在 4°C 下 24h 内稳定。**结论** 改进后的方法简便、快速,重复性和准确度较原方法好,可作为一种新的云南菲牛蛭水蛭素含量测定方法。

关键词: 云南菲牛蛭;凝血酶滴定法;水蛭素

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)01-0070-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.018

菲牛蛭为医蛭科动物(*Pocillobdeella manillensis*),俗称金边蚂蟥,别名马尼拟医蛭,我国其资源较丰富的地区主要集中在广西、广东、海南和福建等地^[1]。属吸血类水蛭,其抗凝活性、抗血栓作用明显高于目前广泛应用的宽体金线蛭,在治疗人类的心血管疾病,尤其是治疗血栓性疾病方面具有巨大的优越性^[2]。云南自 2007 年开始有规模化养殖,研究表明,人工养殖对菲牛蛭的抗凝活性未产生不利影响^[3]。《中国药典》2015 年版^[4]继承了《中国药典》2010 版^[5]对水蛭的记载,即为水蛭科动物蚂蟥(*Whitmania pigra* Whitman),水蛭(*Hirudo nipponica* Whitman)或柳叶蚂蟥(*Whitmania acranulata* Whitman)的干燥体,与菲牛蛭动物品种来源不完全一致^[6]。云南省于 2013 年将菲牛蛭收录到《云南省中药材标准》^[7]中,推动了菲牛蛭药材的标准化进程。水蛭中所含有的水蛭素是迄今发现的最强的凝血酶特异性抑制剂^[8],是水蛭中具有代表性的抗凝药理活性物质。目前水蛭素含量测定方法主要有:生色底物的比色法^[9]、光散射法^[10]、纤维蛋白原平板法^[11]、APTT(活化的部分凝血活酶时间)试剂盒法、PT(凝血酶原时间)试剂盒法及凝血酶滴定法等^[12-14]。考虑

到分析仪器或分析试剂的昂贵或方法的繁琐,中国药典 2015 版水蛭质量标准及云南省的菲牛蛭质量标准中水蛭素的含量测定均参照 1970 年 Markwardt 报道的凝血酶滴定法^[14]的制定,其原理是根据水蛭素与凝血酶结合比例为 1:1,而凝血酶已有国际单位 NIH,水蛭素的活性以抗凝血酶活力单位 ATU 表示,一个 ATU 等于中和一个 NIH 凝血酶的水蛭素量。该方法简单经济,应用广泛,但是准确度和重复性不够理想^[15]。曾有报道^[16]通过配制不同浓度梯度的凝血酶溶液,多次换试管重滴的浓度梯度法,重复性及准确度较好,但操作繁琐。万明等^[17]提出了用白瓷点滴板代替试管进行宽体金线蛭活性滴定的方法(简称白瓷板法)。刘义梅等^[18]通过相关研究,证明在同样条件下,白瓷板法测定抗凝血活性的精确度和稳定性较试管法高。本试验参考文献[17-18]采用白瓷板法,尝试用两种凝血酶浓度及几种滴定体积的方式研究改进原菲牛蛭含量测定方法^[7](以下简称原方法),效果很好,现报道如下。

1 仪器与试药

BIOFUGE SORVALL 离心机(美国 Thermo 公

* 基金项目: 云南省高新技术企业创新能力建设专项补助

收稿日期: 2016-10-25

作者简介: 张利(1966-),女,云南曲靖人,副主任药师,主要从事生化药品检验。E-mail: hzl510@yeah.net

司);超级恒温水浴槽(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);超声仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

(牛)纤维蛋白原(批号:140626-201310),(牛)凝血酶(批号:140625-201009),中国食品药品检定研究院;菲牛蛭干燥体(批号:y04-150704、y04-150710、y04-150719、y04-150723、y04-150706)由云南海瑞迪生物药业有限公司提供,云南濒科委司法鉴定中心鉴定;水为纯化水;其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 云南省中药材标准含量测定方法

2.1.1 供试液的制备

取菲牛蛭干燥体的粉末(过三号筛)0.5g,精密称定,精密加入0.9%氯化钠溶液15mL,充分搅拌,浸提30min,并时时振摇,过滤取续滤液为供试品溶液。

2.1.2 含量测定

精密量取供试品液100 μ L置试管(8mm $\times$ 38mm)中,加入含0.5%(牛)纤维蛋白原(以凝固物计)的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(pH7.4)(临用配制)200 μ L。摇匀,置水浴中(37 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C)保温5min,滴加40NIH $\cdot$ mL $^{-1}$ 的凝血酶溶液(用0.9%氯化钠溶液临用新配,每1min滴加1次,每次2 μ L),边滴加边轻轻摇匀至凝固,记录消耗的体积,进行计算,中和一个单位的凝血酶的量,为一个抗凝血酶活性单位。

2.2 含量测定方法改进

2.2.1 试管法与白瓷板法的对比

滴定反应以出现凝固物为滴定终点,菲牛蛭的供试品溶液呈棕褐色,在试管中的反应不易观察到凝固现象。试管过细,清洗不净及粗糙的管壁也会造成凝固终点的误判。本研究在参考文献[17]的基础上改为用表面积稍大的白瓷点滴板代替试管作为反应载体,采用搅拌针轻轻搅动,使反应溶液更易混合均匀。以搅拌针挑到块状或丝状凝固物为计时终点,反应过程能及时发现凝固现象,对终点判断时间较为准确。5批样品使用两种不同载体滴定反应测定对比结果(见表1),表明白瓷板法测定抗凝血活性的精确度及重复性较试管法高,与文献[18]报道一致。

2.2.2 凝血酶浓度的选择

原方法只有一种滴定浓度一种滴定体积,在实际操作中误差较大,尤其对活性高的菲牛蛭需多次滴定,纤维蛋白原液变稀,不利于凝固。参考文献[18]在考察凝血酶滴定方法的影响因素时指出,对于水蛭素

含量较高的菲牛蛭,凝血酶浓度过低(10NIH $\cdot$ mL $^{-1}$),滴定间隔时间过长(间隔时间4min),其所测得的凝血活性值偏低,远小于间隔时间1min的值。本试验采用40NIH $\cdot$ mL $^{-1}$ 与20NIH $\cdot$ mL $^{-1}$ 的凝血酶浓度,滴定间隔时间为每1min滴定1次。文献[18]的测定方法是针对不含水蛭素的宽体金线蛭,所使用的菲牛蛭仅作为对照物,其测定菲牛蛭活性方法只使用了一种滴定浓度(40NIH $\cdot$ mL $^{-1}$ 或20NIH $\cdot$ mL $^{-1}$),一种滴定体积(5 μ L),进行一次性测定,且未规定滴定时间。根据计算公式,如用20NIH $\cdot$ mL $^{-1}$ 的凝血酶滴定,每次滴加体积5 μ L,方法的最小滴定单位量 $\pm$ 0.1ATU。有时样品可能低于5 μ L即可发生凝固,故来源一致的样品,批次之间结果差别不大(见表1)。本试验采用几种滴定体积(1~5 μ L),重滴的方式,即先滴加高浓度的凝血酶溶液初步确定供试液所消耗的凝血酶溶液体积后,再重新进行精确测定,临近终点时使用低浓度的凝血酶滴定液滴定。以获得最少滴定次数为目标确定滴加的凝血酶浓度及体积的组合,重复测定3次。待测/供试液活性= Σ 凝血酶浓度 $\times$ 滴加量,并由此折算出样品水蛭素含量,此方法的最小滴定单位量可达到 $\pm$ 0.02ATU,提高了方法的准确度。实验过程中,若多次滴定摇动,会使前面的凝固物易被搅散,不利于终点判断,凝血酶滴定时间过长,也会影响终点判断;且白瓷板表面积稍大,反应15min后因溶液的挥发容器壁边会附着一圈深棕色胶状物,影响终点判断。时间限定在10min内完成,结果精密度好。5批样品使用白瓷板为载体按改进后方法测定结果(见表1)。

2.2.3 阴性对照

考虑到每次测定所用试剂、检测环境及人员等条件不同,可能对测定结果产生影响,因样品稀释溶剂为0.9%氯化钠,故本研究认为应以0.9%氯化钠代替供试品溶液做空白对照,如消耗20NIH $\cdot$ mL $^{-1}$ 凝血酶滴定液大于或等于1 μ L(仅0.02ATU $\cdot$ mL $^{-1}$)可忽略不计。

2.2.4 稳定性试验

取储存于4 $^{\circ}$ C下同一供试品溶液,分别在制备后0h、12h、24h后按改进后方法进行测定,结果表明,供试品溶液在4 $^{\circ}$ C下24h稳定。

2.2.5 样品浓度与水蛭素活性关系

取同一批菲牛蛭样品用0.9%氯化钠分别依法制成0.00678g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、0.0218g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、0.0339g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、

表 1 3 种测定方法结果比较 (n=3)

批号	原方法		文献[18]方法		改进后方法	
	活性/(U·g ⁻¹)	RSD/%	活性/(U·g ⁻¹)	RSD/%	活性/(U·g ⁻¹)	RSD/%
y04-150704	258.42	9.09	210.70	6.05	234.25	1.46
y04-150710	188.79	12.50	204.54	5.34	176.64	3.33
y04-150719	190.51	12.50	203.89	5.09	176.80	1.95
y04-150723	158.33	9.12	205.61	5.49	156.68	4.33
y04-150706	206.34	11.11	197.13	9.84	185.33	3.23

0.0484g·mL⁻¹、0.0597g·mL⁻¹ 的溶液, 分别测定消耗凝血酶总单位量。以浓度(X)为横坐标, 消耗的凝血酶总单位量(Y)为纵坐标求得回归方程。回归方程为 $Y=18313X-0.7585$, $r=0.9983$, 线性关系良好。

3 结果与讨论

由表 1 可知, 5 批云南菲牛蛭测定结果在 156.68~234.25U·g⁻¹ 之间, 抗凝活性较高, 是文献[19]报道常用的非吸血类水蛭宽体金线蛭活性的约 20~30 倍, 因此, 应当加强对菲牛蛭多方面的深入研究, 充分发挥其较强的抗凝作用, 扩大其各种临床应用范围, 为未来人类的健康事业作出更大的贡献。

凝血酶滴定法测定水蛭素含量过程中, 当凝血酶未被水蛭素结合而稍有过量时, 会使纤维蛋白原转化成纤维蛋白而出现凝固现象即为滴定终点。使用试管为载体进行滴定反应终点不明显, 容易引起误判。以固定凝血酶浓度或固定滴定体积进行滴定, 可能在出现凝固现象时凝血酶体积已经过量, 很难反映出真实的滴定终点。本试验以终点明显的白瓷点滴板为载体, 提高了精确度。又采用高低两种浓度的凝血酶溶液, 几种灵活变化的滴定体积, 先初测预估供试液的活性, 再重新进行精确测定, 在临近终点使用低浓度的凝血酶溶液, 并为阻止反应溶液过稀而影响滴定终点判断限定了反应的时间, 这样使终点的判断更接近真实的凝固终点, 故从测定结果可见, 经研究改进后的滴定方法较原方法精确度与精密度得到了很大提高。

改进后的方法限定了反应时间, 如样品水蛭素含量过高, 滴定时间需延长, 可对样品稀释后再测定。每次滴加凝血酶滴定液后过多的搅动会造成原来凝固物分散, 故搅动不易太多, 本试验以每次混匀搅拌滑动四五圈, 反应终点较容易观察。为了防止参与反应的试剂浑浊而影响终点的观察, 所有供试品溶液、纤维蛋白原及凝血酶溶液均应澄清。

参考文献:

- [1] 杨潼. 中国动物志 (环节动物门·蛭纲)[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 120.
- [2] 潘雪, 严亚萍, 林亚明. 菲牛蛭近 20 年的研究进展[J]. 中西医结合研究, 2015, 7(4): 216-218.
- [3] 张彬, 汪波, 龚元, 等. 几种水蛭抗凝血物质提取及活性分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 51(4): 92-96.
- [4] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 (2015 年版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 83-84.
- [5] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 (2010 年版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 77-78.
- [6] 张卫, 张瑞贤, 李健, 等. 中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 914-918.
- [7] 云南省食品药品监督管理局. 云 YNZYC-0357-2013, 菲牛蛭[S]. 昆明: 云南科技出版社, 2013.
- [8] Fritz M. The development of hirudin as antithrombotic drug[J]. Thromb Res, 1994, 74(1): 1-23.
- [9] Chang JY. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor [J]. FEBS Lett, 1983, 164(2): 307-313.
- [10] 周靓, 姜葵, 赫荣乔, 等. 光散射法测凝血酶、水蛭素及蚓激酶活性[J]. 生物物理学报, 1997, 13(4): 531-535.
- [11] 班建东, 廖共山, 黄爱民, 等. 纤维蛋白原平板法测定水蛭素活性 [J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(6): 827-828.
- [12] 肖凌, 徐小玲, 何开勇, 等. 生物检定技术应用于水蛭抗凝血活性测定的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(3): 258-262.
- [13] Greinacher A, Völkel H, Janssens U, et al. Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation

- tion in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study[J]. Circulation, 1999, 99(1):73-80.
- [14] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of thrombin[J]. Methods Enzymol, 1970, 19:924-932.
- [15] 李冰宁,欧阳杰,武彦文,等. 水蛭素检测方法研究进展[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4):755-760.
- [16] 陈华友,邢自力,李媛媛,等. 凝血酶滴定法测定水蛭素活性的改进[J]. 生物技术, 2002, 12(6):24-25.
- [17] 万明,汪蜜,刘义梅,等. 宽体金线蛭抗凝血活性物质的提取方法[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(6):414-417.
- [18] 刘义梅,喻珊,崔瑞勤,等. 凝血酶滴定法测定宽体金线蛭抗凝血活性的影响因素[J]. 中国药师, 2014, 17(5):789-793.
- [19] 李军,于翔,张健,等. 4种水蛭粗提物抗凝活性及冻存时间对菲牛蛭抗凝活性影响[J]. 水产科学, 2014, 33(9):591-593.
- (编辑:徐建平)

Improvement Research on Thrombin Titration of Hirudin Content of Yunnan Poecilobdella Manillensis

ZHANG Li¹, LI Zhiyuan¹, FENG Yunfang²

(1. Yunnan Institute for Food and Drug Supervision and Control, Kunming 650011, China;

2. Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To improve the Hirudin content determination method of Poecilobdella manillensis. **Methods** The effect of using white porcelain plates method, two kinds of thrombin solution concentration, several kinds of titration volume on the results of content of Hirudin was studied; The results of 5 batches of samples were compared by two different methods. **Results** The white porcelain method was used, using two kinds of thrombin solution ($40 \text{ NIH} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $20 \text{ NIH} \cdot \text{mL}^{-1}$) and several kinds of titration volume ($1 \sim 5 \mu\text{L}$), once every minute, the accurate consumption volume of the test sample was determined with two different concentration of thrombin solution, after preliminary tested with the higher one. The blank test was increased, response time was limited for 10 minutes; The linear range of Poecilobdella manillensis was $0.00678 \sim 0.0597$ ($r=0.9983$) $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, The content rang of Hirudin in 5 batches of samples was $156.68 \sim 234.25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, the RSD of repetitiveness tests was not more than 5%; The sample solution was stable under 4°C in 24 hours. **Conclusion** The improved method was simple and quick, more repeatability and accuracy than the original method, it can be used as a new content determination method of Yunnan Poecilobdella manillensis.

KEY WORDS: Yunnan Poecilobdella manillensis; thrombin titration; hirudin

(原文见第66页)

Evaluation on Quality Control and Stability of TCM Unguent

CHEN Jinfeng, JIANG Lei, WANG Kun, GUO Huaiyu, JIANG Jialong

(Traditional Chinese Hospital of Luan, Luan 237000, China)

ABSTRACT: TCM unguent refers to semi-solid topical formulations, constituted by medicine, medicine powder, herbal extract and suitable matrix. In the present, it is the focus of research at home. The quality and stability of TCM unguent have important influence on its performance. This article summarizes the research progress and development of TCM unguent in recent years, including the selection of matrix, quality standard and its stability. Problems related to quality and stability of TCM unguent are discussed in this overview, So as to provide reference for the quality and stability of TCM unguent.

KEY WORDS: TCM unguent; quality control; stability evaluation