[文章编号] 1003－4684(2025)02-0062-06

淡豆豉水煎液对体外凝血酶活性抑制作用

牟彦竹，肖文惠，张莉雯，王 锦，张迎庆
（湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 建立一种显色底物法结合高效液相色谱法测定淡豆豉体外凝血酶活性的抑制作用的方法，并探究淡豆豉水煎液对体外凝血酶活性的抑制作用，以期为临床应用与开发提供参考。对显色底物反应中发色底物浓度、孵育时间和孵育温度进行研究，确定最佳反应条件，结合 HPLC 测定条件，进行方法学考察，并用此方法测定了 13 种不同产地来源的淡豆豉水煎液对体外凝血酶活性的抑制作用。当反应体系中 S-2238 凝血酶发色底物浓度为 4.0 mg/mL，孵育温度为 37℃，孵育时间为 20 min 时，体系展现出最大凝血酶抑制活性，该方法稳定可靠。通过该方法进一步测定了淡豆豉水煎液的体外凝血酶抑制作用。结果显示淡豆豉水煎液对体外凝血酶活性具有抑制作用，且不同产地来源的淡豆豉水煎液在体外凝血酶抑制率上差异较大，最高抑制率达到了(89.43±2.05) %，其中五批淡豆豉的凝血酶抑制率超过了 50%，其产地来源分别是安徽(四批)和四川(一批)。本实验建立的显色底物法结合 HPLC 法可用于测定淡豆豉水煎液对体外凝血酶活性抑制作用，淡豆豉水煎液对凝血酶活性具有抑制作用，为后续淡豆豉资源的开发利用提供依据与参考。

[关键词] 淡豆豉；水煎液；凝血酶活性抑制；显色底物法；高效液相色谱
[中图分类号] R285 [文献标识码] A

心血管疾病是 21 世纪发病率和死亡率均较高的疾病之一，其主要发病原因是血栓形成[1]。血栓形成是指在心血管内血液发生凝固，或血液中某些成分凝集成固块的过程[2]。在凝血级联反应中，凝血酶通过催化纤维蛋白原转化为纤维蛋白单体，进而交联形成稳定血栓的网状结构，成为血栓形成的核心调控靶点[3]。但临床上许多抗凝血药物常伴有出血并发症和其他不良反应。因此，从天然产物中开发具有抗凝血作用的活性物质，以提供一种安全有效的血栓形成干预方式，已成为当前心脑血管疾病防治研究的热点之一。

淡豆豉为豆科植物大豆(*Glycine max* (*L.*) *Merr.*)的干燥成熟种子(黑豆)的发酵加工品[4]。淡豆豉入药应用历史悠久，可见于《伤寒论》中的栀子豉汤，《温病条辩》中的银翘散以及《肘后备急方》中的葱豉汤等。现代研究发现淡豆豉中的活性成分在降糖、降脂、心血管保护、抗肿瘤、防治骨质疏松、神经保护、改善脱发等方面均表现出显著生物活性[5-6]。截至目前，国内外尚未对关于淡豆豉的体外凝血酶活性抑制作用的研究报道。因此本试验选取淡豆豉水煎液为研究对象，建立了一种显色底物法结合高效液相色谱法的方法来测定凝血酶活性的抑制作用，旨在为其后续的抗凝血作用应用开发提供参考。

1 材料与仪器

1.1 仪器

P230 型依利特高效液相色谱仪，大连依利特分析仪器有限公司；SCIENTZ-18N 冷冻干燥机，宁波新芝生物科技有限公司；TGL-16C 高速离心机，上海安亭科学仪器厂；UPT-1-5/10/20T 纯水仪，四川优普超纯科技有限公司；ZHWY-200B 恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；WH-2 涡旋混合器，上海沪西分析仪器有限公司；DS-5510 超声波清洗机，武汉鼎盛恒泰有限公司；AR3130 电子分析天平，上海梅特勒－托利多仪器有限公司；EP-OCH 型全波长酶标仪，美国伯腾仪器有限公司。

1.2 试剂

S-2238 凝血酶发色底物，意大利 Chromogenix 公司，批号 82032439；对硝基苯胺，pNA，分析标准品，上海麦克林生化科技有限公司，批号 C11715885；牛凝血酶，1000 U/支，索莱宝生物科技有限公司，批号 3230925005；阿加曲班，上海麦克林生化科技有限公司，纯度 99%，批号 C14889900；二

[收稿日期] 2023－11－22
[第一作者] 牟彦竹(2000－)，女，湖北潜江人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为天然产物。
[通信作者] 张迎庆(1969－)，女，湖北黄石人，湖北工业大学教授，研究方向天然产物。

甲基亚砜，DMSO，阿拉丁试剂（上海）有限公司，色谱纯；甲醇、乙腈，默克生命科学技术有限公司，色谱纯，其余试剂均为分析纯。13 批不同来源的淡豆豉信息见表 1。

表 1　13 批产地的淡豆豉药材来源

批次	产地	厂家	批号
S1	河北	河北康博药业有限公司	223000901
S2	河北	河北安国振宇药业有限公司	230201
S3	河北	安国市远光药业有限公司	444211101
S4	四川	四川盛世锦荣药业有限公司	220701
S5	河南	天诚鹤元堂饮片有限公司	221201
S6	安徽	安徽桐花堂中药饮片科技有限公司	20201101
S7	安徽	江苏传承中药有限公司	22100801
S8	安徽	康美（亳州）世纪国药有限公司	221100329
S9	安徽	安徽惠丰国药有限公司	230301
S10	广东	广东汇群中药饮片股份有限公司	20230201
S11	河北	河北康盛华药业有限公司	202211001
S12	四川	四川麒源药业有限责任公司	230201
S13	山西	安徽汉盛药业有限公司	210716

2　方法

2.1　样品的制备

2.1.1　淡豆豉水煎液的制备　称取 100 g 淡豆豉药材，加入 500 mL 水煎煮 1 h，过滤，滤渣再次加入 500 mL 水煎煮 1 h，过滤，合并滤液，加热浓缩，真空冷冻干燥，得到淡豆豉水煎液冻干粉约 15.3 g，备用。精密称取淡豆豉水煎液冻干粉适量，加超纯水溶解配制成 0.2 g/mL 的淡豆豉水煎液冻干粉溶液。

2.1.2　牛凝血酶溶液的制备　取 1 支牛凝血酶（1000 U/支），用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液（pH 7.4）溶解制备成 500 U/mL 的牛凝血酶溶液，−20℃保存备用，临用前用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液（pH 7.4）稀释成 10 U/mL 的牛凝血酶溶液。

2.1.3　S-2238 底物溶液的制备　精密称取 S-2238 底物粉末适量，加超纯水配制成 10.0 mg/mL 的 S-2238 底物溶液，−20℃保存备用。

2.1.4　阿加曲班溶液的制备　精密称取阿加曲班适量，加适量 DMSO 溶液配制成 640 μg/mL 母液，再用 DMSO 溶液稀释成浓度为 0.25，0.5，1.0，2.0，4.0，8.0，16.0 μg/mL 的阿加曲班溶液，现配现用。

2.1.5　对硝基苯胺溶液的制备　精密称取对硝基苯胺对照品适量，加超纯水配制成 20 μg/mL 的对硝基苯胺溶液，常温保存。

2.2　体外凝血酶活性抑制测定方法

为评估淡豆豉水煎液对体外凝血酶活性的抑制作用，根据文献[7]建立了显色底物法与高效液相法相结合的测定方法。设 4 个组，每组 3 个复孔，分别以超纯水（空白对照）、DMSO（阴性对照）、阿加曲班溶液（阳性对照）和淡豆豉水煎液溶液（供试品溶液）进行测定。

显色底物反应步骤：向 96 孔板中加入 50 μL 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液（pH 7.4）、20 μL 的 10 U/mL凝血酶溶液和 100 μL 待测溶液，混匀振摇 1 min，于 37℃孵育 5 min。随后加入 20 μL 的 4.0 mg/mL S-2238 发色底物溶液，引发凝血酶催化水解 S-2238 反应，振摇 1 min，37℃孵育 20 min。反应结束后立即加入 100 μL 乙腈终止反应，振摇 1 min，取上清液约 100 μL 待测。

HPLC 测定条件：对文献[7]中的 HPLC 色谱条件进行了改进：采用依利特 Supersil ODS2 色谱柱（4.6 mm×200 mm，5 μm），柱温为 30℃，流速为 0.8 mL/min，进样量为 20 μL，检测波长405 nm，以 V（乙腈）：V（超纯水）＝20：80 为流动相进行等度洗脱，理论塔板数按对硝基苯胺峰计算应不低于 1000，以满足测定反应产物对硝基苯胺的峰面积的需求。

凝血酶抑制率

$$Y=(A_1-A_2)/A_1\times 100\%$$

式中：A_1为空白对照/阴性对照的产物峰面积；A_2为样品/阳性对照的产物峰面积。

2.3　不同 S-2238 发色底物浓度对体外凝血酶活性测定的影响

取 10 mg/mLS-2238 发色底物母液，加超纯水稀释，配制成浓度分别为 1.0，2.0，3.0，4.0，5.0 mg/mL的 S-2238 发色底物溶液。向 96 孔板中加入 20 μL 的 10 U/mL 凝血酶溶液、50 μL 的 0.01 mol/LPBS 缓冲液（pH 7.4）以及 100 μL 的 8.0 μg/mL阿加曲班溶液，混匀振摇 1 min，置 37℃孵育 5 min。再分别加入 20 μL 不同浓度的 S-2238 发色底物溶液，振摇 1 min，37℃孵育 20 min。记录酶标仪在 405 nm 处的吸光值。平行测定 3 次，以平均值计算对凝血酶的抑制率。

2.4　不同孵育时间和温度对体外凝血酶活性测定的影响

因为该方法是显色底物法结合 HPLC 法来测定抗凝血酶活性，所以在后续考察条件中选择用 HPLC 测定产物对硝基苯胺的峰面积，并计算其凝血酶抑制率。

不同孵育时间的影响测定方法：配制 4.0 mg/mL 的 S-2238 底物浓度，10 U/mL 的凝血酶溶液，8.0 μg/mL 的阿加曲班溶液。向 96 孔板中加入

20 μL的凝血酶溶液，50 μL 的 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)和 100 μL 的阿加曲班溶液，混匀振摇 1 min，37℃ 孵育 5 min。再加入 20 μL 的 4.0 mg/mL的 S-2238 发色底物，振摇 1 min，分别在 37℃下孵育 10、20、30、40、50 min。孵育结束后立即加入 100 μL 乙腈终止反应，振摇 1 min，取上清液 100 μL 用 HPLC 测定对硝基苯胺的峰面积，计算各孵育时间下的凝血酶抑制率。

不同孵育温度的影响测定方法：孵育时间设置 30℃、37℃、40℃ 3 个平行，其他条件同上。计算各孵育温度下的凝血酶抑制率。

2.5 HPLC 测定方法的可靠性检验

绘制传统显色底物法(酶标仪测定法)测定不同浓度下阿加曲班的凝血酶活性抑制曲线，与新建 HPLC 方法进行比较，用 IBM SPSS 软件对两种方法进行独立样本 t 检验，分析两者之间有无显著性差异，以检测新建 HPLC 测定方法的可靠性。

2.5.1 传统显色底物法 设阴性对照组和阳性对照组，每组 3 个复孔。配制浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μg/mL 的阿加曲班阳性药物溶液。向 96 孔板中加入 20 uL 的 10 U/mL 凝血酶溶液、50 μL 的 0.01 mol/LPBS 缓冲液(pH 7.4)和不同浓度的阿加曲班溶液 100 μL，混匀振摇 1 min，37℃孵育 5 min。再加入 20 μL 的 4.0 mg/mL S-2238 发色底物，振摇 1 min，37℃孵育 20 min。孵育结束后立即加入 100 μL 乙腈终止反应，振摇1 min，取上清液 100 μL，记录酶标仪上 405 nm 处显示的吸光值。阴性对照组中用等量 DMSO 溶液代替阿加曲班阳性药物溶液。绘制该方法下对凝血酶活性抑制曲线。

2.5.2 新建 HPLC 测定方法 按 2.2 项下方法进行显色底物反应，采用 HPLC 测定不同浓度下阿加曲班的凝血酶抑制率，绘制本方法下的凝血酶活性抑制曲线。与传统显色底物法进行对比，观察测定结果是否一致。

2.6 专属性考察

按 2.2 项下方法观察对照品组、空白组、阴性组、阳性组、淡豆豉组中对硝基苯胺的出峰位置是否存在干扰。

2.7 精密度考察

精密吸取 6 份 100 μL 的 8.0 μg/mL 阿加曲班溶液于 96 孔板中，随后向每孔中加入 20 μL 的 10 U/mL凝血酶溶液和 50 μL 的 0.01mol/LPBS 缓冲液(pH 7.4)，混匀后 37℃避光孵育 5 min。接着向每孔继续加入 20 μL 的 4.0 mg/mLS-2238 发色底物，立即充分混匀，37℃避光孵育 20 min。孵育结束后立即加入 100 μL 乙腈终止反应，振摇1 min，取上清液 100 μL 进行 HPLC 分析，记录对硝基苯胺的峰面积，并计算凝血酶抑制率。

2.8 重复性考察

配制 6 份浓度为 8.0 μg/mL 的阿加曲班溶液，每份精密吸取阿加曲班溶液 100 μL 于 96 孔板中，其余步骤同 2.7，取上清液 100 μL 进行 HPLC 分析，记录对硝基苯胺的峰面积，并计算凝血酶抑制率。

2.9 不同产地来源的淡豆豉水煎液体外凝血酶活性研究

取 13 批不同产地来源的淡豆豉药材，按照 2.1.1 项下方法制备淡豆豉水煎液，按照 2.2 项方法测定 13 批淡豆豉水煎液的体外凝血酶活性抑制能力。

3 结果与分析

3.1 不同 S-2238 发色底物浓度对抗凝血酶活性测定的影响

由图 1 可知，随着 S-2238 发色底物的浓度增加，测得的吸光值也随之增大，表明反应体系中对硝基苯胺产物的含量逐渐增多。当 S-2238 发色底物浓度达到 4.0 mg/mL 和 5.0 mg/mL 时，吸光值趋近一致，说明此时 S-2238 发色底物浓度已接近饱和状态。因此在该反应体系中选择 4.0 mg/mL 的 S-2238 发色底物为最佳浓度。

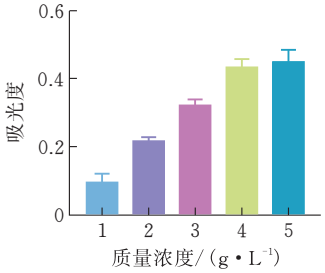
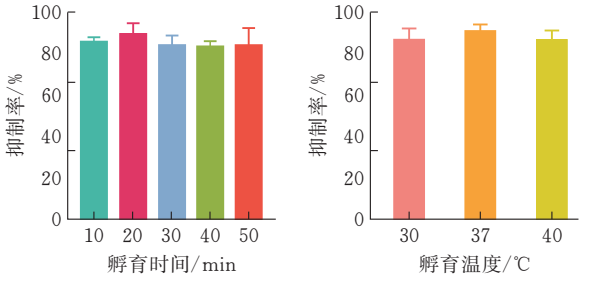


图 1 不同浓度下 S-2238 发色底物的吸光值 ($n=3$)

3.2 不同孵育时间和温度对抗凝血酶活性测定的影响

在该反应体系中，孵育温度和孵育时间均会影响凝血酶和 S-2238 发色底物的结合能力，以及凝血酶与凝血酶抑制剂的结合能力，因此需要为该反应体系选择合适的孵育温度和孵育时间。由图 2 可知，随着孵育时间的延长，凝血酶活性抑制率先上升后下降，在 20 min 时达到最大值；同样，随着孵育温度的升高，凝血酶活性抑制率也呈现先上升后下降的趋势，为 37℃时反应体系有最大凝血酶活性抑制率。因此确定该反应体系的最佳孵育时间为 20 min，最佳孵育温度为 37℃。



(a)不同孵育时间　(b)不同孵育温度

图 2　不同孵育时间和孵育温度的凝血酶活性抑制率（$n=3$）

3.3　HPLC 测定方法的可靠性检验

绘制了传统显色底物法和新建 HPLC 测定法下，不同浓度阿加曲班的凝血酶活性抑制曲线（图 3）。对两种方法的结果进行独立样本 t 检验。统计结果显示两者之间无显著性差异（$P>0.05$），表明在测定同一药物相同浓度下的抑制率时，两种方法所得结果基本一致。提示该反应体系可靠性良好。

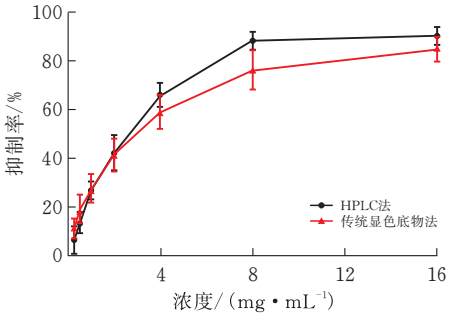
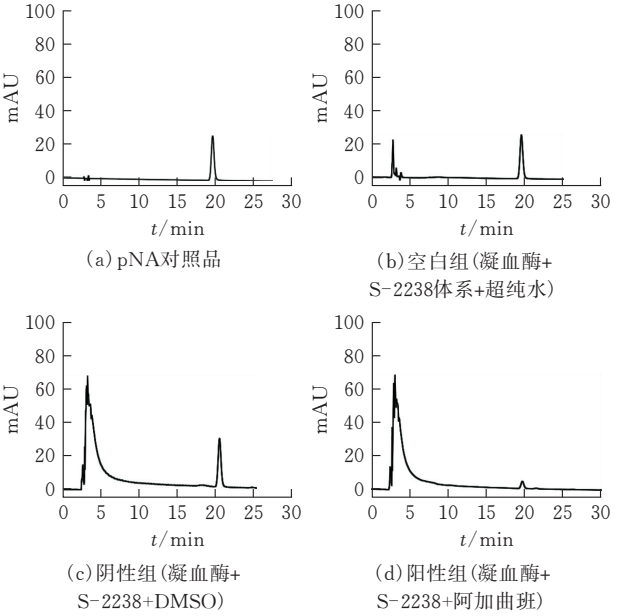


图 3　两种方法不同浓度阿加曲班对凝血酶的抑制曲线（$n=3$）

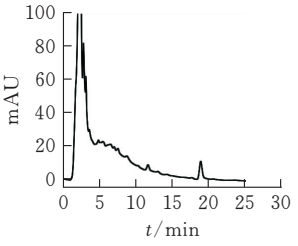
3.4　专属性考察结果

依据 2.5.1 项所述方法，得到图 4 所示结果。图 4 显示，对硝基苯胺（pNA）保留时间为19.577 min，在此出峰时间下，空白组、阴性组、阳性组、淡豆豉组



(a) pNA对照品　(b)空白组（凝血酶+S-2238体系+超纯水）

(c)阴性组（凝血酶+S-2238+DMSO）　(d)阳性组（凝血酶+S-2238+阿加曲班）



(e)淡豆豉组（凝血酶+S-2238+淡豆豉水煎液）

图 4　不同体系中产物对硝基苯胺 HPLC 色谱

各组溶液均未产生任何干扰。这一结果充分表明本方法专属性良好。

3.5　精密度考察结果

按照 2.7 项方法，得到 6 个组的凝血酶抑制率（表 2）。经计算，相对标准偏差（RSD）为 0.77%（$n=6$）。这一结果表明本方法的精密度良好。

表 2　HPLC 方法的精密度（$n=6$）

实验号	凝血酶抑制率/%	平均值/%	RSD/%
1	90.48	90.93	0.77
2	91.54		
3	90.46		
4	90.49		
5	90.55		
6	92.08		

3.6　重复性考察结果

按照 2.8 项方法得到 6 个组的凝血酶抑制率（表 3）。经计算，相对标准偏差（(RSD）的结果为 4.13%（$n=6$）。这一结果表明本方法的重复性良好。

表 3　HPLC 方法的重复性（$n=6$）

实验号	凝血酶抑制率/%	平均值/%	RSD/%
1	90.50	88.92	4.13
2	83.27		
3	91.30		
4	91.56		
5	91.63		
6	85.29		

3.7　不同产地来源的淡豆豉水煎液的体外凝血酶活性抑制作用

由图 5 可见，13 批来自不同产地的淡豆豉水煎液均表现出体外凝血酶活性的抑制能力，其凝血酶抑制率分布在 23.75%～89.43%范围内。其中，有 5 批淡豆豉样品（S6、S8、S9、S11、S12）的凝血酶抑制率超过 50%，具体包括安徽产地的 4 批和四川产地的 1 批。另有 3 批淡豆豉样品（S2、S3、S4）的凝血酶抑制率未超过 30%，分别是河北 2 批和四川 1 批。

值得注意的是，产地为安徽的 S9 样品凝血酶抑制率最高，达到（89.43±2.05）%（$n=3$）。这一结果

表明，安徽产地的淡豆豉水煎液具有显著的体外凝血酶抑制活性。相比之下，河北产地的淡豆豉水煎液体外凝血酶抑制活性较低。而四川产地的两批淡豆豉间差异较大，这可能与采集、炮制过程及贮存条件等因素有关。

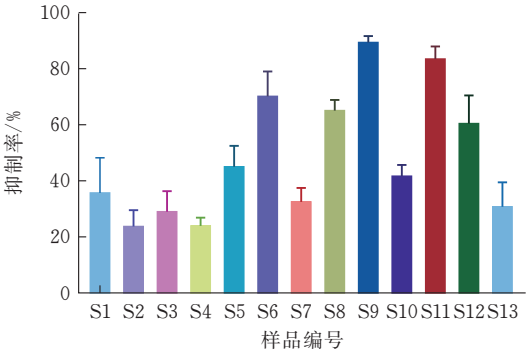


图 5 不同产地的淡豆豉水煎液抑制凝血酶活性能力($n=3$)

4 讨论

在凝血酶活性的抑制作用测定中，传统的显色底物法通过酶标仪测定体系吸光度来评估凝血酶活性抑制作用，但中药提取物常自带的颜色会影响吸光度测定。因此，结合高效液相色谱仪，优化色谱条件以分离对硝基苯胺，并通过对硝基苯胺的峰面积来测定凝血酶活性的抑制作用，能提高方法的准确性。王佳宇等[8]利用该方法测定了丹参中的丹酚酸 A 对凝血酶有直接抑制作用。王晓燕等[9]则测定了中药蒲黄的凝血酶抑制能力，结果显示蒲黄具有良好的体外凝血酶抑制能力。鉴于淡豆豉水煎液自身具有颜色，本实验同样选择了该方法测定其凝血酶抑制能力，并摸索了显色底物法和 HPLC 分离条件，结果表明该方法专属性强，测定结果可靠，适用于淡豆豉体外凝血酶活性抑制能力的测定。

淡豆豉作为一种传统中药，具有多种功效，但其抗凝血活性报道较少。本实验结果显示，不同产地来源的淡豆豉水煎液均呈现凝血酶抑制作用，且最高凝血酶抑制率达到了(89.43±2.05)%，为其临床应用和开发提供了新依据。研究表明，淡豆豉中含有没食子酸、儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、绿原酸、原儿茶酸、阿魏酸、肉桂酸、水杨酸、山奈酚、大豆苷元、大豆苷、黄豆黄苷、香豆素、汉黄芩素、槲皮素、芹菜素、染料木苷、染料木素等多种黄酮类成分和酚酸类成分[10-12]，。虽然尚未有文献直接报道淡豆豉对凝血酶活性的抑制作用，但淡豆豉中的槲皮素、阿魏酸、香豆素及其衍生物等成分已被报道具有凝血酶活性抑制的作用[13]。例如：槲皮素具有很强的凝血酶抑制能力[14]；阿魏酸能显著抑制血栓形成[15]；CHOI 等[16]发现阿魏酸可通过抑制血栓素样物质来抑制血栓形成；BANG 等[17]研究发现在一系列香豆素衍生物中，部分化合物展现出良好的抗凝血活性。此外，冠心宁片的抗血栓功效与其存在阿魏酸、绿原酸、咖啡酸等活性物质有关联[18]。这些抗凝血作用活性成分均存在于淡豆豉中，可能是其抑制凝血酶活性作用的物质基础。

5 结论

本文建立了显色底物法结合高效液相色谱法，用于测定淡豆豉水煎液对凝血酶活性的抑制作用。研究结果显示，淡豆豉水煎液在体外对凝血酶活性具有不同程度的抑制作用，这表明不同来源的淡豆豉中抗凝血活性成分的含量可能有所不同，从而导致其体外凝血酶抑制活性存在差异。目前，淡豆豉抗凝血活性标志性成分尚需进一步深入研究。本研究为后续深入探索淡豆豉的活性物质、推动其临床应用和开发奠定了坚实基础，并将起到积极促进作用。

[参 考 文 献]

[1] ASADA Y, YAMASHITA A, SATO Y, et al. Thrombus formation and propagation in the onset of cardiovascular events[J]. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2018, 25(08): 653-664.

[2] LIAO J, REN X, YANG B, et al. Targeted thrombolysis by using c-RGD-modified N, N, N-trimethyl chitosan nanoparticles loaded with lumbrokinase[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2019, 45(01): 88-95.

[3] 绳康佳，高妍，包涛，等.抗凝血活性分子的研究进展[J].药学学报，2023，58(05)：1103-1116.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2020 年版(一部)[S].北京：中国医药科技出版社，2020：342.

[5] SHIRABE R, SAITO E, SAWADA N, et al. Fermented and nonfermented soy foods and the risk of breast cancer in a Japanese population-based cohort study[J]. Cancer Medicine, 2020, 10: 757-771.

[6] 张进召，刘松，潘双，等.淡豆豉提取物通过调控 LncRNA miR155HG/miR-409-3p 表达抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J].中国老年学杂志，2021，41(14)：3077-3082.

[7] 崔岩.中药旋覆花和南山楂质量评价方法研究[D].天津：天津中医药大学，2023.

[8] 王佳宇.柱后活性筛选丹参中直接抗凝血酶有效成分的研究[D].北京：北京中医药大学，2017.

[9] 王晓燕.中药蒲黄活性-化学组合质量标志物筛选及蔓荆子药代动力学研究[D].天津：天津中医药大学，2020.

[10] 柴川，崔小兵，单晨啸，等.基于 UFLC/Q-TOF-MS 对不同产区淡豆豉药材的差异研究[J].中华中医药杂志，2015，30(02)：590-593.

[11] PAO L，HUI T，CONG S，et al.Untargeted metabolomics analysis of Mucor racemosus douchi fermentation process by gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry[J]. Food Science Nutrition，2019，7(05)：1865-1874.

[12] DALIRI E，TYAGI A，OFOSU F K，et al. A discovery-based metabolomic approach using UHPLC Q-TOF MS/MS unveils a plethora of prospective antihypertensive compounds in Korean fermented soybeans [J]. LWT-Food Science and Technology，2021，137(01)：110399-110418.

[13] WANG X，YANG Z，SU F，et al. Study on structure activity relationship of natural flavonoids against thrombin by molecular docking virtual screening combined with activity evaluation *in vitro*[J]. Molecules，2020，25：422-435.

[14] 毛雅君，邵香敏，李阳杰，等.槲皮素衍生物的合成研究进展[J].有机化学，2022，42(11)：3588- 3605.

[15] 刘海云，林倩霞，纪玉龙，等.中药活性成分阿魏酸抗血小板活性和抗血栓作用的研究[J]. 江西中医药，2020，51(11)：63-66.

[16] CHOI J H，PARK J K，KIM K M，et al. *In vitro* and *in vivo* antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology，2018，32(01)：10-14.

[17] BANG C N，ABYSHEV Z A，IVKIN Y D. Synthesis and *in vivo* evaluation of new coumarin conjugates as potential indirect-action anticoagulants[J].Pharmaceutical Chemistry Journal，2019，53(05)：419-422.

[18] WANG M，YANG Q，YING X，et al. Network pharmacology-based approach uncovers the mechanism of guanxinning tablet for treating thrombus by MAPKs signal pathway[J].Front Pharmacol，2020，11：652-669.

Study on the Inhibitory Effect of Water Decoction from Dandouchi on Thrombin Activity *in Vitro*

MOU Yanzhu，XIAO Wenhui，ZHANG Liwen，WANG Jin，ZHANG Yingqing

(*School of Biological Engineering and Food，Hubei Univ. of Tech.，Wuhan* 430068，*China*)

Abstract：To develop a novel method that utilizes a chromogenic substrate assay along with high performance liquid chromatography to assess the inhibitory effect of Dandouchi on thrombin activity *in vitro*，the inhibitory effect of Dandouchi on thrombin activitin vitro was investigated to provide a reference for its clinical applications and further development. The study investigated the concentration of chromogenic substrate，incubation time，and temperature during the substrate chromogenic reaction. The optimum reaction conditions were determined. The methodology was investigated in conjunction with the HPLC determination condition. The inhibitory effects of Dandouchi water decoctions from 13 different sources on thrombin activity *in vitro* were determined using this method. The maximum thrombin inhibitory activity was observed when the concentration of S-2238 thrombin chromogenic substrate was 4.0 mg/mL，the incubation temperature was 37℃，and the incubation time was 20 min. This method was verified to be reliable and stable for measuring the thrombin inhibitory effect of Dandouchi *in vitro*. The results indicated that Dandouchi has an inhibitory effect on thrombin activity *in vitro*. The thrombin inhibition rate varied significantly with the source of the Dandouchi，with the highest inhibition rate at (89.43±2.05) %. Five of the tested batches had thrombin inhibition rates greater than 50%. Among them，four batches are from Anhui province and one is from Sichuan province. A method that combines the chromogenic substrate and HPLC techniques was established to evaluate the inhibitory effect of Dandouchi on thrombin activity *in vitro*. The results showed that Dandouchi can inhibit thrombin activity，which provides a strong foundation for the future development and utilization of Dandouchi resources.

Keywords：Dandouchi；water decoction；thrombin activity inhibition；chromogenic substrate method；high-performance liquid chromatography

[责任编校：张　众]