

## 抗凝血酶滴定法优化水蛭煮散提取工艺

邓国彤<sup>1,2</sup>, 梁少瑜<sup>2</sup>, 吴燕梅<sup>1</sup>, 宋国强<sup>1</sup>, 沈志滨<sup>1\*</sup>

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广东康美药物研究院有限公司, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选水蛭煮散的提取工艺。方法: 利用抗凝血酶滴定法测定水蛭中抗凝血酶活性物质含量。以粉碎度为指标, 筛选粉碎设备, 考察水分对水蛭煮散粉体的影响; 以浸膏得率和抗凝血酶活性物质转移率为评价指标, 通过单因素试验考察粉碎度、浸泡时间、加水量、煎煮次数、煎煮温度及时间对提取工艺的影响, 并与传统饮片进行比较。结果: 水蛭煮散的最佳提取工艺为取水蛭最粗粉, 加20倍量水浸泡10 min, 于100℃煎煮提取3次, 每次20 min; 抗凝血酶活性物质转移率达93.31%, 高于传统饮片的52.44%。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 水蛭煮散具有效率高、时间短、能耗低、环保等优点, 为水蛭煮散的工业化生产和新药开发提供参考。

**[关键词]** 水蛭煮散; 抗凝血酶滴定法; 水蛭素; 浸膏得率

**[中图分类号]** R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0010-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170010

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1333.010.html>

**[网络出版时间]** 2014-07-15 13:33

## Optimization of Extraction Process of Hirudo Zhusan by Anti-thrombin Titration

DENG Guo-tong<sup>1,2</sup>, LIANG Shao-yu<sup>2</sup>, WU Yan-mei<sup>1</sup>, SONG Guo-qiang<sup>1</sup>, SHEN Zhi-bin<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Kangmei Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of Hirudo Zhusan. **Method:** The content of antithrombin activity substance was determined by anti-thrombin titration. Taking grinding degree as index to screen smash equipment, then effect of water content on powder of Hirudo Zhusan was investigated; with extract yield and transfer rate of antithrombin activity substance as indexes, single factor tests were adopted to optimize extraction process by taking soaking time, the amount of water, decoction time and so on as factors, then compared with traditional pieces of Hirudo. **Result:** Optimum extraction parameters was as follows: soaked 10 min with 20 times the amount of water, decocted thrice at 100℃ for 20 min each time; transfer rate of antithrombin activity substance could reach as highly as 93.31%, which was significantly higher than traditional pieces of 52.44%. **Conclusion:** This optimized process was stable and feasible, Hirudo Zhusan had advantages of high efficiency, short time, low energy consumption, environmental protection and so on, it could provide an insight for industrial production and new drug development of Hirudo Zhusan.

**[Key words]** Hirudo Zhusan; anti-thrombin titration; hirudin; extract yield

**[收稿日期]** 20140109(010)

**[基金项目]** 北京市科学技术委员会“十病十药”研发项目(Z121102001112010)

**[第一作者]** 邓国彤, 在读硕士, 从事中药活性成分分析与新药开发研究, Tel: 15017560610, E-mail: 752862564@qq.com

**[通讯作者]** \* 沈志滨, 教授, 硕士生导师, 从事天然活性物质的开发与评价, E-mail: szb8113@126.com

中药煮散是指将中药饮片粉碎成颗粒与水共同煎煮后,去渣取汁制成的液体剂型。根据扩散定律可知,物质的颗粒越小,表面积越大,与浸出溶媒的接触面越大,扩散物质的量越多。研究显示在相同条件下,煮散较传统饮片汤剂可有效节省药材和煎煮时间<sup>[1]</sup>。

水蛭性平,味咸、苦,有小毒,功效破血通经、逐瘀消癥<sup>[2]</sup>,具有抗高血糖、抗血栓、抗炎等药理活性,可用于治疗中风偏瘫、跌扑损伤<sup>[3-6]</sup>。欧洲学者从水蛭的唾液中分离得到了水蛭素,并发现该成分对凝血酶具有极强的抑制作用,可作为凝血酶的天然特异抑制剂。国内广泛的使用2个水蛭品种(宽体金钱蛭和柳叶蚂蟥)中活性成分均尚不明确,作用机制更是未知<sup>[7]</sup>。研究认为干燥后的水蛭药材不可能含有唾液中水蛭素成分,而且抗凝血的活性成分不一定只存在于新鲜唾液中,应该是动物体内本身含有的,推测可能是一些游离氨基酸<sup>[8]</sup>。

目前国内外尚无专门考察水蛭煮散工艺的文献,故本实验对水蛭进行抗凝血酶滴定法试验,测定其抗凝血酶活性物质的总含量,通过单因素试验优选水蛭煮散的提取工艺,为该药味中活性成分的开发提供参考。

## 1 材料

30 B 型万能研磨粉碎机(常州市和正干燥设备有限公司),701 型小型剪切粉碎机(广州市旭朗机

械设备有限公司),FA 2104 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

水蛭药材(批号 130605871)购自广东康美药物研究院有限公司,经广东药学院中药学院刘基柱教授鉴定为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 的干燥全体;牛纤维蛋白原对照品、凝血酶(中国食品药品检定研究院,批号分别为 140607-201338, 140605-201125),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 粉碎设备的选择** 分别使用2台粉碎机打粉,参考2010年版《中国药典》一部附录 XI B 中双筛分法,即精密称定水蛭各粉体 30 g,置规定的药筛中,保持水平状态过筛,左右往返,边筛动边轻叩 3 min。取不能通过小号筛和能通过大号筛的颗粒及粉末,称定质量,计算最粗粉、粗粉和中粉的质量分数,见表1。结果表明小型粉碎机粉碎的3种粉体均能达到2010年版《中国药典》规定,而万能粉碎机粉碎的最粗粉中细粉过多,通过3号筛的粉末达21.95%,超过《中国药典》2010年版规定的20%,即粉体制备不及格;可能是由于万能粉碎机功率高,其粉碎的作用力由撞击伴以撕裂、研磨等力组成<sup>[9]</sup>,致使药材粉碎过细,而小型剪切粉碎机的主要作用力为剪切力,不致粉末过细,故选择小型剪切粉碎机制备水蛭煮散粉末。

表1 不同粉碎机对水蛭煮散粉碎度的影响

| 粉碎机  | 粉体  | 过1号筛不过 | 过2号筛不过 | 过3号筛不过 | 过4号筛不过 | 过5号筛不过 | 过6号筛 |
|------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|------|
|      |     | 2号筛    | 3号筛    | 4号筛    | 5号筛    | 6号筛    |      |
| 小型剪切 | 最粗粉 | 62.17  | 21.63  | 12.84  | 1.56   | 0.42   | 1.38 |
|      | 粗粉  | 0      | 66.36  | 18.05  | 15.12  | 0.03   | 0.44 |
|      | 中粉  | 0      | 0      | 0      | 92.54  | 4.34   | 3.11 |
| 万能研磨 | 最粗粉 | 56.65  | 21.40  | 16.59  | 1.71   | 1.60   | 2.05 |
|      | 粗粉  | 0      | 64.20  | 16.43  | 17.42  | 1.01   | 0.94 |
|      | 中粉  | 0      | 0      | 0      | 90.14  | 5.73   | 4.13 |

**2.2 水分对水蛭煮散颗粒粉碎度的影响** 称取水蛭药材4份,每份30g,置于烘箱中分别烘4,8,12,16h,使用小型粉碎机打粉成最粗粉,按2010年版《中国药典》一部附录 XI B 中双筛分法处理,取不能通过小号筛和能通过大号筛的颗粒及粉末,称定质量,计算质量分数,见表2。结果显示干燥4h和8h的水蛭最粗粉通过3号筛的粉末质量分数分别为18.74%和18.33%,不超过20%,粉末及格;而干

燥12h和16h的水蛭最粗粉则分别为20.63%和23.6%,粉末不及格。说明干燥时间越长,水蛭药材越干,流动性越好,更容易粉碎成细粉,致使制备的粉体不及格,故决定水蛭粉碎前不对药材进行烘干处理。

**2.3 粉体流动性参数的测定** 取适量水蛭药材,使用小型粉碎机粉碎制备水蛭煮散的3种粉体,分别对水蛭煮散的最粗粉、粗粉和中粉进行颗粒流动性

表 2 水分对水蛭最粗粉粉碎度的影响

| 干燥时间<br>/h | 水分含量<br>/% | 过 1 号筛不过<br>2 号筛/% | 过 2 号筛不过<br>3 号筛/% | 过 3 号筛不过<br>4 号筛/% | 过 4 号筛不过<br>5 号筛/% | 过 5 号筛不过<br>6 号筛/% | 过 6 号筛/% |
|------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
| 4          | 10.3       | 52.85              | 28.42              | 11.59              | 4.09               | 1.08               | 1.98     |
| 8          | 8.2        | 52.15              | 29.51              | 11.90              | 3.92               | 0.72               | 1.79     |
| 12         | 6.2        | 49.57              | 29.80              | 12.77              | 5.70               | 0.83               | 1.33     |
| 16         | 6.1        | 45.32              | 31.08              | 13.58              | 8.29               | 1.16               | 0.57     |

参数考察,采用注入法计算粉体的休止角( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )分别为(45.60 ± 1.03), (47.76 ± 1.20), (48.69 ± 0.37)度。

**2.4 抗凝血活性成分含量及浸膏得率的测定** 参考 2010 年版《中国药典》中水蛭【含量测定】项下的抗凝血酶滴定法对各份水蛭煮散进行测定。

**2.4.1 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配制** 取 0.2 mol·mL<sup>-1</sup> 三羟甲基氨基甲烷溶液 25 mL 与 0.1 mol·mL<sup>-1</sup> 盐酸溶液约 40 mL,加水至 100 mL,用精密 pH 计调节 pH 7.4。精密称取纤维蛋白原(牛血)0.25 g,溶于三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液 50 mL 中,即得。

**2.4.2 凝血酶溶液配制** 量取生理盐水 15 mL 溶解固态的凝血酶(150 单位/支),得每 1 mL 含凝血酶 10 单位的溶液。

**2.4.3 抗凝血酶滴定法** 取 0.5% 牛纤维蛋白原(以凝固物计)的三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液 200 μL,加入水蛭提取液 100 μL,摇匀,置水浴锅中温浸 5 min,滴加凝血酶溶液,每 4 min 滴加 1 次,每次 2 μL,当试管底部变成胶冻状凝固时即为滴定终点,记录消耗凝血酶用量,计算水蛭煮散液中抗凝血酶的活性单位。

**2.4.4 浸膏得率的测定** 利用回流法提取得到水蛭煮散水煎液,精密量取滤液 20 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率。

**2.5 单因素试验考察**

**2.5.1 粉体** 将水蛭煮散最粗粉、粗粉和中粉分别进行包封,各加 20 倍量水浸泡 20 min,回流煎煮 20 min,煎煮 1 次,得 3 种粉体的煎液,平行操作 3 份,计算抗凝血酶活性物质转移率分别为 88.89%, 44.44%, 44.72%, 浸膏得率依次为 18.32%, 17.13%, 13.63%, 故选取最粗粉。

**2.5.2 浸泡时间** 称取水蛭最粗粉 18 份,每份

5 g,等为 6 组,分别进行包封。向 6 个烧杯中各加入水 100 mL,用铁架台固定 6 个漏斗,置于 6 个烧杯上,把包封后的 6 包水蛭最粗粉同时分别放进 6 个烧杯中,于 5,10,15,20,25,30 min 时依次取出,置于漏斗中,待漏斗下口不再出现水滴后,用量筒量取烧杯中剩余水量,计算平均剩余水量分别为 87, 83,83,84,83,83 mL,故确定浸泡时间 10 min。

**2.5.3 煎煮时间** 称取水蛭最粗粉 18 份,每份 5 g,等分为 6 组,分别进行包封,各加入水 100 mL 浸泡 10 min,分别煎煮 5,10,15,20,25,30 min,计算抗凝血酶活性物质转移率分别为 22.22%, 22.48%, 44.46%, 88.90%, 88.88%, 44.89%, 浸膏得率分别为 12.87%, 16.49%, 17.20%, 18.32%, 18.51%, 18.38%, 故确定煎煮时间 10 min。

**2.5.4 加水量** 称取水蛭最粗粉 24 份,每份 5 g,等分为 8 组,分别进行包封,依次加入 10,12,14,16,18,20,22,24 倍量水浸泡 10 min,煎煮 20 min,计算抗凝血酶活性物质转移率分别为 11.11%, 13.33%, 15.56%, 35.65%, 40%, 88.89%, 88.92%, 88.94%, 浸膏得率分别为 15.34%, 16.98%, 17.49%, 17.53%, 17.79%, 18.32%, 18.35%, 18.46%, 故确定加水量 20 倍。

**2.5.5 煎煮次数** 称取水蛭最粗粉 9 份,每份 5 g,等分为 3 组,分别进行包封,各加水 100 mL 浸泡 10 min,分别煎煮 1,2,3 次,每次 20 min,计算抗凝血酶活性物质转移率分别为 88.89%, 89.01%, 93.33%, 浸膏得率分别为 18.32%, 19.63%, 19.67%, 说明煎煮 3 次时效果最好。

**2.5.6 煎煮温度** 称取水蛭最粗粉 15 份,每份 5 g,等分为 5 组,分别进行包封,各加水 100 mL 浸泡 10 min,分别 20,40,60,80,100 °C 于煎煮 20 min,煎煮数 1 次,计算抗凝血酶活性物质转移率分别为 44.44%, 44.56%, 66.72%, 66.73%, 88.89%, 浸膏得率分别为 1.23%, 5.18%, 11.84%, 15.82%, 18.32%, 说明煎煮温度 100 °C 时提取效率最高,推

测水蛭药材中起抗凝血作用的不是一些蛋白质成分,因为蛋白质在 100 ℃ 时已经变性,可能是一些小分子肽类。

**2.6 验证试验** 单因素试验确定水蛭煮散的最佳提取工艺为水蛭最粗粉加 20 倍量水浸泡 10 min,于 100 ℃ 煎煮提取 3 次,每次 20 min。称取水蛭煮散和水蛭原药材各 5 g,按最佳提取工艺进行验证试验,平行操作 3 分,计算抗凝血酶活性物质平均转移率分别为 93.31% (RSD 0.08%), 52.44% (RSD 0.93%), 平均浸膏得率依次为 19.61% (RSD 0.15%), 16.17% (RSD 1.08%), 说明优选的提取工艺稳定可行,水蛭煮散较原药材煎煮效率更佳,能节省约 40% 的原药材。

### 3 讨论

服用水蛭的病者主要为患高血压的心血管患者,若以生理盐水为提取溶媒,会使干膏中含盐量明显增多,不利于疾病的治疗<sup>[10]</sup>,故本文选择水为提取溶剂。早有学者提出干燥的水蛭药材不可能含有新鲜唾液中水蛭素,抗凝血的活性物质有可能是游离氨基酸或胆固醇,与本文的推测结果有相同之处。按最佳工艺提取的水蛭中抗凝血酶物质的转移率达 93.33%,与传统水蛭饮片相比,水蛭煮散的提取时间更短、转移率更高,可降低生产成本、提高提取效率且环保,为该药材的资源开发提供参考。

### [参考文献]

- [1] 王力宁,冯春辉,陈金月,等. 麻杏二陈汤煮散治疗小儿特禀质咳嗽的临床研究[J]. 中医儿科杂志,2012,8(5):32.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:77.
- [3] Mohammed A A, Mohammad G A, Ahmed M, et al. *In vivo* anti-hyperglycemic activity of saliva extract from the tropical leech *Hirudinaria manillensis* [J]. Chin J Nat Med,2013,11(5):488.
- [4] Kashiwagi K, Hashimoto I, Abe Y, et al. Quantitative analysis of hemodynamics of congested island flaps under leech therapy[J]. J Med Invest,2013,60(3/4):213.
- [5] Koeppe D, Aurich M, Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review[J]. Wien Med Wochenschr,2014,164(5/6):95.
- [6] Medcalf R L. Desmoteplase: discovery, insights and opportunities for ischaemic stroke[J]. Br J Pharmacol, 2012,165(1):75.
- [7] 翟新艳. 水蛭的抗凝血作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(13):1582.
- [8] 钟山,杨得彼,崔征. 水蛭抗凝血活性成分的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2781.
- [9] 张兆旺. 中药药剂学[M]. 2版. 北京:中国中医药出版社,2011:1.
- [10] 张岚. 水蛭的提取工艺研究[J]. 黑龙江医药,2012,25(1):80.

[责任编辑 刘德文]

## 《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www. cjcmm. com. cn