

中药水蛭提取及精制工艺的研究

姚琳, 王伟明*, 张妍妍, 孙妍
(黑龙江省中医研究, 哈尔滨 150036)

[摘要] 目的: 研究中药水蛭的提取及精制工艺, 为水蛭提取物入制剂工艺提供技术依据。方法: 依正交试验法, 逆流循环提取技术, 以效价法检测抗凝血酶活性为指标, 对水蛭提取工艺进行优化, 并运用膜分离技术对提取液进行精制。结果: 最佳工艺为以 12 倍量 0.9% 氯化钠溶液提取 5 h, 循环 3 次最好, 选择相对分子质量为 30×10^3 和 0.5×10^3 的膜即可达到精制的目的。结论: 该提取、精制工艺稳定、合理、可行。

[关键词] 水蛭; 逆流循环提取; 膜分离技术; 精制; 效价法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0031-03

Studies on Extraction and Purification Technology of Chinese Medicine Leeches

YAO Lin, WANG Wei-ming*, ZHANG Yan-yan, SUN Yan
(Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150036, China)

[Abstract] Objective: Studies on extraction and purification technology of the Chinese medicine leeches, preparing process of extracting leeches to provide technical basis. **Method:** The extraction of leeches was optimized by orthogonal experiment and countercurrent circuit extractive technique, with titer detected by anti-thrombin activity as an index, and using of membrane separation technology to refine extract. **Result:** The best technology was to extract five hours with 12 times the amount of 0.9% sodium chloride solution, and extract three times. Selected membrane with 30×10^3 and 0.5×10^3 could achieve the purpose of the purification. **Conclusion:** The extraction and purification technology was stable, reasonable and practicable.

[Key words] leech; countercurrent circuit extractive technique; membrane separation technique; purification; determination of tobramycin by turbidimetric method

水蛭作为常用活血化瘀药, 具有破血, 逐瘀, 通经之功能, 在中药临床广泛用于脑血栓、冠心病、脑水肿等病的治疗。其活性成分水蛭素(Hirudin)是一种抗凝血蛋白质, 由 65 个或 66 个氨基酸残基组成的单链多肽, 相对分子质量约 7 000。在干燥状态下活性稳定; 在水中室温可稳定保存 6 个月; 80 加热 15 min 不被破坏, 被认为是目前已知的最强效的凝血酶抑制剂之一^[1]。因其主要活性成分为多肽

蛋白质, 其活性对热及化学试剂极为敏感, 故选用 0.9% 氯化钠溶液为提取溶媒, 采用逆流循环提取技术^[2]及膜分离技术^[3]对其进行提取、精制。

1 材料

1.1 仪器 HL-28 数显恒流泵(上海沪西分析仪器厂有限公司), BJ-ZN 崩解时限仪(天津市富兰斯电子科贸有限公司), BP211D 电子分析天平(赛多利斯), JM1812-1 型卷式膜小型实验机(大连屹东膜工程设备有限公司)。

1.2 试剂与试药 氯化钠(天津市四通化工厂 20070510), 三羟甲基氨基甲烷(北京化工厂 050914), 盐酸(西陇化工股份有限公司 060714), (牛)纤维蛋白原(中检所 140607-200736), 凝血酶(中检所 140605-200424), 水蛭药材购自江苏宿迁。

[收稿日期] 20100913(004)

[第一作者] 姚琳, 主管药师, 硕士, 从事中药制剂及新药研究工作, Tel/Fax: 0451-55665478, E-mail: yaoyao198003@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 王伟明, 研究员, 博士, 从事新药开发工作, Tel/Fax: 0451-55665478, E-mail: zyjy@163.com

2 方法与结果

2.1 水蛭提取工艺的优化

2.1.1 正交试验因素水平的确定 根据预试验结果, 温度为非主要因素, 而影响逆流循环提取的主要因素有溶媒用量、提取时间和循环次数, 故拟定 3 因素 3 水平(表 1), 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验(表 2), 每组取水蛭药材 30 g, 提取完后低温减压回收并定容至 150 mL 量瓶中。

表 1 水蛭提取工艺因素水平

水平	A 溶媒用量 /BV	B 提取时间 /h	C 循环次数 /次
1	8	1	1
2	10	3	2
3	12	5	3

表 2 水蛭提取工艺正交试验及直观分析

No	A	B	C	D	每 1 mL 水蛭提取液抗凝活性 /IU·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	3.44
2	1	2	2	2	3.74
3	1	3	3	3	4.73
4	2	1	2	3	3.59
5	2	2	3	1	4.04
6	2	3	1	2	4.68
7	3	1	3	2	4.03
8	3	2	1	3	3.86
9	3	3	2	1	4.51
\bar{j}	3.97	3.69	3.99	4.00	
\bar{j}	4.10	3.88	3.95	4.15	
\bar{j}	4.13	4.64	4.27	4.06	
R_j	0.16	0.95	0.32	0.15	

2.1.2 水蛭提取液抗凝活性的测定^[4] 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液的配制取 0.2 mol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷溶液 25 mL 与 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液约 40 mL, 加水至 100 mL, 调节 pH 4。

凝血酶溶液的配制取凝血酶试剂适量, 加生理盐水配制成每 1 mL 含凝血酶 40 个单位(临用配制)。

精密量取提取液 100 μ L, 置试管(8 mm \times 38 mm) 中, 加入含 0.5% (牛) 纤维蛋白原(以凝固物计)的 Tris-HCl 缓冲液 200 μ L, 摇匀, 置水浴(37 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 中缓缓滴加凝血酶溶液至凝固, 记录消耗凝血酶溶液的体积, 按下式计算。

$$U = \frac{C_1 V_1}{V_2}$$

U ——每 1 mL 水蛭提取液抗凝活性, IU·mL⁻¹;

C_1 ——凝血酶溶液的浓度, IU·mL⁻¹;

V_1 ——消耗凝血酶溶液的体积, μ L;

V_2 ——供试品溶液的加入量, μ L;

2.1.3 结果 根据正交试验结果, 经直观分析(表 3) 可知, 各因素影响顺序为 $B > C > A$; 经方差分析(表 3) 可知, B 因素, 即提取时间具有显著性。因此, 最佳提取工艺为: 以 12 倍量 0.9% 氯化钠溶液为提取溶媒, 逆流循环提取 5 h, 循环 3 次。按以上工艺重复 3 次实验, 3 组提取液平均抗凝活性为 4.71 IU·mL⁻¹。

表 3 水蛭提取工艺抗凝活性方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.045	2	0.022 5	1.25	
B	1.524	2	0.762	42.33	< 0.05
C	0.179	2	0.089 5	4.97	
D(误差)	0.036	2	0.018		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ $F_{0.01}(2, 2) = 99$ 。

2.2 水蛭提取液的精制、脱盐 根据水蛭素的相对分子质量约为 7 000Dr, 选用不同分子量的膜进行精制、除杂, 使其制成固体制剂以减小服用剂量; 又由于水蛭中活性成分受热不稳定, 故无法运用常规工艺进行浓缩, 且提取时以 0.9% 氯化钠溶液为溶媒, 引入了盐的成分, 因此, 选用 0.5×10^3 相对分子质量的膜进行浓缩、除盐。

2.2.1 水蛭提取液的制备 取水蛭 1.2 kg, 平均分成 4 组, 根据最佳提取工艺提取, 收集提取液。

2.2.2 精制方法 分别选择 10×10^3 , 30×10^3 , 50×10^3 的膜进行精制、除杂。取 3 组提取液分别通过不同相对分子质量的膜元件, 取渗透液, 将渗透液低温减压回收至 1 500 mL。

2.2.3 精制液抗凝血酶活性测定 同 2.1.2 项下的方法。

2.2.4 精制液固形物得率的测定 为检验膜的精制效果, 对各组渗透液进行固形率的测定, 取上述 3 组渗透液各 100 mL, 浓缩至干, 称定质量, 计算固形物得率。

2.2.5 结果 从表 4 中可知, 选用 10×10^3 的膜总抗凝活性最小, 固形物得率也最小, 30×10^3 , 50×10^3 的膜总抗凝活性接近, 但 30×10^3 的膜固形物得

率比 50×10^3 少,故选择 30×10^3 的膜精制。

表 4 不同相对分子质量膜的精制结果

截留膜相对 分子质量	水蛭提取液抗 凝活性/ $U \cdot mL^{-1}$	固形物得率/%
10×10^3	3.42	5.52
30×10^3	4.36	7.27
50×10^3	4.38	9.35

2.2.6 浓缩、脱盐 将另 1 组提取液通过 30×10^3 膜,取渗透液,将渗透液通过 0.5×10^3 膜进行浓缩、除盐,取浓缩液,量取浓缩液体积 295 mL。

2.2.7 浓缩液抗凝活性测定 取适量浓缩液并将其稀释至每 mL 含生药 0.2 g,其他测定方法同 2.1.2 项下。

2.2.8 结果 浓缩液的抗凝活性为 $3.26 U \cdot mL^{-1}$ 。按以上工艺重复 3 次试验,平均抗凝活性为 $3.24 U \cdot mL^{-1}$,固形物得率为 7.22%。

3 讨论

水蛭活性成分水蛭素相对分子质量在 7 000 左右,理论上,膜滤精制时宜选用与其相对分子质量接近且大于 7000 的膜即可(如 10×10^3),但实际操作中,影响其相对分子质量有效截留的因素较多,如水蛭素自身的形态、提取液黏度、不同厂家膜的材质、制膜技术、截留精度、截留吸附等,这些因素可能导致在试验过程中部分活性成分被截留,使活性成分损失。因此,通过上述试验,我们在利用膜分离技术精制药液时,除要根据活性成分的相对分子质量来筛选适宜膜外,还应根据试验,及时检测膜内外药液的相关活性指标,以确定精制效果及工艺参数。

在预试验中,我们在不同零售地点购买了水蛭药材,参照 2005 年版《中国药典》一部水蛭项下抗凝活性检测,检测中,向提取液内滴加(牛)纤维蛋白原立即产生白色絮状沉淀,使检测无法继续,均不符合药典规定。经分析,可能是水蛭药材炮制过程中掺入某种蛋白原变性物质,干扰检测所致,为此,通过药源筛选,最终选择江苏宿迁水蛭养殖基地的水蛭作为试验药材,经检测,其符合药典规定。

由于水蛭活性成分不耐热,且对化学试剂敏感,长时间加热或化学提取均可导致抗凝活性下降,故选择室温膜分离技术对其进行浓缩、脱盐,经浓缩后的浓缩液可更加高效、方便各类剂型的制备。

经过浓缩后的水蛭提取液总抗凝活性有所下降,这可能是由于膜滤过程中,使部分活性物质粘附在膜元件上无法彻底洗出,导致部分损失。

为利于试验结果的观察,在效价测定过程中选用了四壁透明的崩解时限仪水浴(37 ± 0.5),使检测结果更稳定、准确。

[参考文献]

- [1] 刘欣,张文清,夏玮,等.水蛭提取有效成分初探[J].中成药,2002,24(11):897.
- [2] 杨义芳.中药有效成分提取分离新技术的研究进展[J].亚太传统医药,2008,4(7):29.
- [3] 陈燕军,冯青然.常用精制方法在纯化中药制剂的应用[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(3):56.
- [4] 中国药典.一部[S].2005:57.

[责任编辑 全燕]