

• 制剂工艺 •

肾康微丸中水蛭提取工艺的研究

刘莉, 刘强, 刘怒云*

(南方医科大学 中医药学院, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 对肾康微丸中水蛭的提取工艺进行考察。方法: 以水蛭醇提物的抗凝血活性为主要指标, 醇溶性浸出物得率为辅助指标, 首先考察了水蛭乙醇提取的温度; 并采用正交实验对水蛭的乙醇提取条件进行了研究; 亦确定了提取次数。结果: 影响提取效果的因素顺序为: 乙醇浓度 > 提取时间 > 乙醇用量, 乙醇浓度对提取有显著性影响。结论: 确定乙醇提取水蛭的最佳工艺为: 加6倍量60%乙醇, 60℃提取2次, 每次1h。

[关键词] 水蛭; 正交实验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0019-03

Study on Extracting Technology for Leech in Shenkang Micro-pellet

LIU Li, LIU Qiang, LIU Nu-yun*

(College of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To inspect the extracting technology for leech in Shenkang Micro-pellet. **Methods:** With anticoagulation bioactivity as main Index and extraction rate as secondary one, optimum extracting conditions for leech in Shenkang Micro-pellet were studied by the orthogonal design. **Results:** The order of the factors which affected extraction was: ethanol concentration > extraction time > solvent amount. And the ethanol concentration had significant influence. **Conclusions:** The optimum extracting conditions were six times quantity of 60% ethanol for 2 times at 60℃, and one hour for each time.

[Key words] Leech; orthogonal design; extracting technology

肾康微丸由益母草、水蛭等药组成。功能活血化瘀, 利尿消肿。方中水蛭功擅破血逐瘀, 主逐恶血, 瘀血, 是常用的破血药^[1]。现代研究表明, 水蛭有很强的抗凝血活性。其主要成分是以水蛭素(hirudin)为主要代表的肽类化合物^[2]。目前, 水蛭在制剂中常用水单煎或与其他药材共煎, 杂质煎出较多, 且有效成分损失较严重, 其他对乙醇提取的研究中, 在评价指标上多不能结合其生理活性进行筛选。为合理考察水蛭的提取工艺, 现以水蛭醇提物的抗

凝血活性为主要指标, 醇溶性浸出物得率为辅助指标, 对其提取工艺进行研究。

1 药材、仪器和试剂

药材: 水蛭, 购于广州健和药材公司; 经南方医科大学药用植物与中药鉴定教研室陈兴兴讲师鉴定为水蛭科动物水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥全体。

旋转蒸发器(南通市华安超临界萃取有限公司); 减压干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); FA1104 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

牛纤维蛋白原(Fibrinogen, 中国药品生物制品检定所, 批号: 140607-200535), 凝血酶(Thrombin, 中国药品生物制品检定所, 批号: 140605-200424)。试剂均为分析纯。

[收稿日期] 2007-08-13

[通讯作者] * 刘怒云, Tel: (020) 31725957; E-mail: sysll@fimmu.com

2 实验方法及结果

2.1 抗凝血酶活性测定 水蛭醇提液, 回收乙醇得浸膏, 浸膏减压干燥, 粉碎, 取相当于原药材 1 g 的粉末, 精密称定, 精密加入 0.9% 氯化钠溶液 5 mL, 充分搅拌, 超声提取 30 min, 离心, 取上清液, 即得供试品溶液。

取(牛)纤维蛋白原, 溶解于三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(pH= 7.4)中, 制成含 0.5% 的(牛)纤维蛋白原溶液。精密量取供试品溶液 100 μL, 置试管(10×100) mm 中, 加入 0.5% 的(牛)纤维蛋白原溶液 200 μL, 摇匀, 置水浴(37±0.5) °C 中缓缓滴加每 1 mL 含 40 单位的凝血酶溶液(每 min 5 μL, 边滴边加轻轻摇匀)至凝固, 记录消耗凝血酶溶液的体积, 按下式计算:

$$U = \frac{C_1 V_1}{C_2 V_2 W}$$

式中 U ——每 1 g 含凝血酶活性单位, $U \cdot g^{-1}$;
 C_1 ——凝血酶溶液的浓度, $\mu \cdot m^{-1}$;
 C_2 ——供试品溶液的浓度, $g \cdot mL^{-1}$;
 V_1 ——消耗凝血酶溶液的体积, μL ;
 V_2 ——供试品溶液的加入量, μL ;
 W ——取样量。

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 醇溶性浸出物得率测定 水蛭醇提液, 精密吸取适量, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 5 h, 置干燥器中冷却 1 h, 迅速称量。计算醇溶性浸出物得率。

2.3 提取温度的优选 水蛭抗凝血活性的有效成分以水蛭素为主, 水蛭素在高温下不稳定, 因此首先对其提取温度进行了考察。称取水蛭粗粉 3 份, 每份 50 g, 分别在 50 °C, 60 °C, 70 °C 下, 加 7 倍量 60% 的乙醇回流提取 2 次, 一次 1.5 h, 一次 1.0 h, 合并 2 次提取液的滤液, 减压浓缩得浸膏, 分别采用 2.1, 2.2 项下方法测定抗凝血酶活性和醇溶性浸出物得率, 并计算综合评分, 结果见表 1。

由表可以看出, 提取温度以 60 °C 为最佳。温度过高, 水蛭素不稳定。

2.4 乙醇提取条件的正交实验

2.4.1 因素水平表 根据预试验结果, 选择乙醇浓度、乙醇用量、提取时间为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验, 所选因素水平安排见表 2。

表 1 不同温度的提取结果

| 提取温度 (°C) | 抗凝血酶活性 ($U \cdot g^{-1}$) | 醇溶性浸出物得率 (%) | 综合评分 |
|--------------|--------------------------------|-----------------|-------|
| 50 | 16.8 | 14.52 | 26.96 |
| 60 | 18.6 | 15.62 | 29.53 |
| 70 | 14.5 | 16.65 | 26.16 |

注: 根据本实验研究目的, 抗凝血酶活性为主要指标, 醇溶性浸出物得率为辅助指标, 二者在综合评分中的比例宜为 10:7, 如提取温度 50 °C 时综合评分为 $16.8 \times 100\% + 14.52 \times 70\% = 26.96$ 。

表 2 因素水平表

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----------|-----------|-----------|------|
| | A/乙醇浓度(%) | B/乙醇用量(倍) | C/提取时间(h) | D/空白 |
| 1 | 70 | 8 | 2.0 | |
| 2 | 60 | 7 | 1.5 | |
| 3 | 50 | 6 | 1.0 | |

2.4.2 正交实验方法 取干燥的水蛭, 粉碎成粗粉, 称取 50 g, 按正交表安排实验, 加热回流提取, 合并多次提取液的滤液, 减压浓缩得浸膏, 然后分别按照 2.1 2.2 项下方法测定抗凝血酶活性和醇溶性浸出物得率, 并计算综合评分, 结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 3 水蛭乙醇提取正交试验表

| 实验号 | 因素 | | | | 抗凝血酶活性 ($U \cdot g^{-1}$) | 醇溶性浸出物得率(%) | 综合评分 |
|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|-------------|-------|
| | A | B | C | D | | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 13.12 | 10.84 | 11.48 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 15.64 | 12.56 | 13.54 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 16.08 | 15.11 | 14.79 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 18.01 | 15.26 | 15.90 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 18.06 | 16.23 | 16.32 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 17.17 | 16.98 | 16.13 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 18.37 | 16.58 | 16.63 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 15.24 | 15.28 | 14.40 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 17.23 | 17.51 | 16.38 |
| K_1 | 39.80 | 44.01 | 42.01 | 44.17 | | | |
| K_2 | 48.36 | 44.26 | 45.81 | 46.30 | | | |
| K_3 | 47.41 | 47.31 | 47.74 | 45.10 | | | |
| R | 2.85 | 1.10 | 1.91 | 0.71 | | | |

注: 根据指标的重要性, 将抗凝血酶活性和醇溶性浸出物得率按权重比例 10:7 进行综合评分。即以 9 个实验中抗凝血酶活性最大值 18.37 计为 10 分, 则 1 号实验抗凝血酶活性折算为 $(13.12/18.37) \times 10 = 7.14$ 分; 同理, 以醇溶性浸出物得率最高值 16.98 计为 7 分, 则 1 号实验醇溶性浸出物得率折算为 $(10.84/16.98) \times 7 = 4.34$ 分, 两者折算分之和 11.48 计为 1 号实验综合得分, 余类推。

表 4 方差分析表

| | 离差平方和 | 自由度 | 方差 | F 值 | P 值 |
|----|-------|-----|------|-------|--------|
| A | 14.66 | 2 | 7.33 | 19.41 | < 0.05 |
| B | 2.25 | 2 | 1.12 | 2.98 | > 0.05 |
| C | 5.66 | 2 | 2.83 | 7.49 | > 0.05 |
| 误差 | 0.756 | 2 | 0.38 | 1.00 | |

由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为:乙醇浓度>回流时间>乙醇用量,经方差分析,乙醇浓度对提取有显著性影响,选择最佳水平 A₂;加醇量及回流时间对提取无显著性影响,根据直观分析结果选择 B₃、C₃,因此选择最佳工艺 A₂B₃C₃。

2.4.3 验证实验 取水蛭粗粉,称取 50 g,分别按选择最佳工艺 A₂B₃C₃ 和直观最佳工艺 A₃B₁C₃ 进行提取,结果见表 5。

表 5 验证实验结果

| 实验 | 抗凝血酶活性 (U·g ⁻¹) | 醇溶性浸出物得率 (%) | 综合评分 |
|--|--------------------------------|-----------------|-------|
| A ₂ B ₃ C ₃ | 17.74 | 17.02 | 29.65 |
| A ₃ B ₁ C ₃ | 17.97 | 16.02 | 29.18 |

由表可以看出,二者提取效果相当,从节约角度,选择 A₂B₃C₃ 为最佳提取条件。

2.4.4 提取次数的选择 取经 A₂B₃C₃ 验证实验后的水蛭药渣,加入 6 倍量的 60% 乙醇,再提取 1.0 h,得第 3 次提取液,滤过,减压浓缩得浸膏,然后按照 2.1 2.2 项下方法分别测定抗凝血酶活性和醇溶性浸出物得率,与第 1,2 次醇提液的合并液进行比较,结果见表 6。

表 6 提取次数的选择

| 组别 | 抗凝血酶活性(U·g ⁻¹) | 醇溶性浸出物得率(%) |
|-----------|----------------------------|-------------|
| 第 1,2 次提取 | 17.74 | 17.02 |
| 第 3 次提取 | 0.84 | 1.25 |

结果表明,第 3 次提取的醇溶性浸出物得率占总浸提物的 6.84%,抗凝血酶活性基本已没有,说明两次乙醇提取已经基本完全,再从生产节约成本的角度出发,故提取两次即可。

综上所述,确定水蛭的提取工艺为:水蛭,干燥,粉碎成粗粉,加入 6 倍量 60% 乙醇,60℃ 提取 2 次,每次 1 h。

3 讨论

文献有报道使用乙醇渗漉法提取水蛭^[3],但该方法浪费时间且消耗溶剂,我们曾比较了渗漉法和回流法,二者提取效果相当,从经济的角度,选择回流提取法更好。

中药提取工艺条件的筛选,其评价指标的选择十分关键,本实验结合了浸膏得率和与药效相关的抗凝血酶活性作为评价指标,能够比较全面系统的对提取工艺进行评价。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005. 57.
- [2] 吕明远. 近年来中药水蛭的研究概况[J]. 天津药学, 2005, 17(6): 62.
- [3] 罗梓河. 水蛭注射液的制备[J]. 广东药学, 2001, 11(3): 19.