

# 基于抗凝活性评价的 健脑益智胶囊中水蛭提取工艺优选

郭东艳<sup>1</sup>, 吕 杨<sup>1</sup>, 赵晓平<sup>2</sup>, 范小璇<sup>2</sup>, 侯 文<sup>2</sup>

(1. 陕西中医学院药学院 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医学院附属医院 陕西 咸阳 712000)

**摘要:**目的 优选健脑益智胶囊中水蛭的提取工艺。方法 采用正交试验设计法,以抗凝血酶活性作为评价指标,考察乙醇浓度、加醇量、提取时间、提取次数对水蛭提取工艺的影响。结果 正交试验优选确定的工艺条件为 8 倍量 60% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。结论 健脑益智胶囊中水蛭的提取工艺条件合理、稳定、可行。

**关键词:** 水蛭; 正交试验; 提取工艺

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.07.040

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2014)07-1636-02

## Optimization of extraction process of hirudo from JianNaoYiZhi Capsule based on anti-thrombin activity evaluation

GUO Dong-yan<sup>1</sup>, LÜ Yang<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-ping<sup>2</sup>, FAN Xiao-xuan<sup>2</sup>, HOU Wen<sup>2</sup>

(1. The Medicine College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, 712000, China)

**Abstract: Objective** To optimize the extraction process of hirudo from JianNaoYiZhi capsule. **Methods** The orthogonal experimental design was used to study the influence of extraction of hirudo with ethanol concentration, solvent usage, extracting time, extraction times as factors, the activity of anti-thrombin as the evaluation index to optimize the extraction process. **Results** The optimum extraction process conditions by the orthogonal experimental design were 60% ethanol, extracted for 1.5 hours, 8-fold solvent and 2 times of extraction. **Conclusion** This extraction process conditions of hirudo from JianNaoYiZhi capsule were reasonable, stable and feasible.

**Key words:** Hirudo; Orthogonal design; Extract technology

健脑益智胶囊为陕西中医学院附属医院院内制剂,主要由水蛭、白茅根、石菖蒲、郁金、葛根等药味组成,具有化痰利水、豁痰开窍的功效,临床上主要用于颅脑损伤后脑组织水肿和微循环障碍引起的各种症状。方中水蛭为君药,现代药理研究表明,水蛭具有抗凝<sup>[1]</sup>、抗肿瘤<sup>[2]</sup>、降血脂<sup>[3]</sup>、抗血栓<sup>[4]</sup>等活性。其中水蛭素在目前是公认的最强的凝血酶特效抑制剂<sup>[5]</sup>。结合水蛭素的性质,拟对其进行醇提,并对其工艺条件进行考察,为进一步生产提供参考依据。

### 1 材料与仪器

水蛭干燥品(购于西安盛兴中药饮片有限公司,产地:河北,批号:110901)经陕西中医学院王继涛老师鉴定为水蛭科动物蚂蝗 *Whitmania pigra* Whitman 的干燥全体。三羟甲基氨基甲烷(上海山浦化工有限公司,批号:20111012);凝血酶(中国药品生物制品检定所,批号:140625-201009,效价 560IU/支);纤维蛋白原(牛血)(中国药品生物制品检定所,批号:140626-201009,含凝固物 59%);盐酸(洛阳市化学试剂厂,批号:111101)。

### 2 方法与结果

2.1 正交试验优选工艺参数 在预实验的基础上结合文献资料报道<sup>[6]</sup>拟采用乙醇温浸的方法进行提取,并对影响提取效果的

主要因素乙醇浓度、乙醇用量、提取时间 3 个因素进行考察,每个因素设置 3 个水平(见表 1)按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,以抗凝血酶活性为评价指标筛选最佳提取工艺参数。正交实验结果及方差分析见表 2~3。

表 1 因素水平表

水平	A	B	C
	乙醇浓度(%)	乙醇用量/倍	提取时间/h
1	50	6	1.0
2	60	8	1.5
3	70	10	2.0

2.1.1 试验方法 称取水蛭 15 g,平行 9 份,按照正交试验因素水平表安排用  $L_9(3^4)$  正交表进行提取,滤过,滤液浓缩并定容至 250 ml 量瓶中,备用。

2.1.2 评价指标的确定 抗凝血酶活性测定:纤维蛋白原(牛血)溶液的配制:精密称取纤维蛋白原 0.169 4 g(含凝固物 59%)加入 20 ml 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液,即得 0.5% 的纤维蛋白原溶液。

凝血酶溶液的配制:取凝血酶 1 支,加入 56 ml 生理盐水稀释,即得 1 0U/ml 的凝血酶溶液。

供试品溶液的制备:精密称取各样品适量(约相当于原药材 1 g)置具塞试管中,精密加入 0.9% 氯化钠溶液 5 ml,充分搅拌,浸提 30min,并时时振摇,离心,取上清液作为供试品溶液。

测定:按照《中国药典》(2010 年版一部)水蛭项下的凝血酶滴定法,精密吸取供试品溶液 100 $\mu$ l,置试管中(8 mm $\times$ 38 mm),

收稿日期:2013-08-20; 修订日期:2014-02-10

基金项目:陕西省科技厅资助项目(No.2011KTCL03-02)

作者简介:郭东艳(1973-),女(汉族),陕西富平人,陕西中医学院药学院教授,博士学位,主要从事中药新制剂与新剂型的研究工作。

加入 200 $\mu$ l 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(含 0.5% (牛) 纤维蛋白原(以凝固物计)), 摇匀, 置水浴中(37 $^{\circ}$ C  $\pm$  0.5 $^{\circ}$ C) 温浸 5min, 然后向其滴加凝血酶溶液(每毫升中含 10u 单位), 每次 2 $\mu$ l, 每 4 min 滴加 1 次并轻轻摇匀, 记录至凝固时消耗凝血酶的体积, 代入下式中计算抗凝血酶活性。结果见表 2。

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

式中 U: 每 1g 含凝血酶活性单位(U/g);  $C_1$ : 凝血酶溶液的浓度(U/ml);  $C_2$ : 供试品溶液的浓度(g/ml);  $V_1$ : 消耗凝血酶溶液的体积( $\mu$ l);  $V_2$ : 供试品溶液的加入量( $\mu$ l)。

表 2 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	抗凝血酶活性 /u $\cdot$ g $^{-1}$
1	1	1	1	1	170.44
2	1	2	2	2	216.58
3	1	3	3	3	145.22
4	2	1	2	3	283.38
5	2	2	3	1	248.11
6	2	3	1	2	263.80
7	3	1	3	2	148.73
8	3	2	1	3	168.64
9	3	3	2	1	155.95
抗凝活性	$K_1$	532.24	602.55	602.88	574.50
	$K_2$	795.29	633.33	655.91	629.11
	$K_3$	473.32	564.97	542.06	597.24
	R	107.32	22.79	37.95	18.20

以抗凝血酶活性作为考察指标, 由表中极差 R 值可以看出, 各因素的影响顺序依次为 A > C > B > D, 其中 A 因素中  $K_2 > K_1 > K_3$ , B 因素中  $K_2 > K_1 > K_3$ , C 因素中  $K_2 > K_1 > K_3$ , 从表 3 中可以看出, A 因素各水平之间差异具有显著性( $P < 0.05$ ), B, C 因素的影响无显著性差异( $P > 0.05$ ), 综上所述确定最佳提取工艺为  $A_2 B_2 C_2$ , 即 8 倍量 60% 乙醇提取 1.5 h。

表 3 抗凝血活性方差分析结果

误差来源	离均差平方和	自由度	F 比	显著性
A	19592.39	2	39.05	*
B	781.42	2	1.56	
C	2163.68	2	4.31	
D(误差)	501.67	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19; F_{0.01}(2, 2) = 99$$

2.2 提取次数的考察 在上述正交试验优选的基础上, 对提取次数进行考察。

称取水蛭 50 g, 共 3 份, 按照优选的工艺条件分别进行提取 1 次 2 次 3 次, 测定抗凝血活性, 结果表明, 随着提取次数的增加,

抗凝血酶活性先增加后降低, 在提取 2 次时较高, 因此选择提取次数为 2 次。

2.3 验证实验 为了考察正交试验的结果是否具有重现性, 进行验证实验。称取水蛭 50 g, 共 3 份, 按照优选的工艺条件进行提取, 测定抗凝血活性。结果见表 4。

表 4 验证实验结果

次数	抗凝血活性/U $\cdot$ g $^{-1}$	平均值/U $\cdot$ g $^{-1}$	RSD(%)
1	283.44		
2	275.56	280.56	1.55
3	282.69		

验证实验结果表明, 说明该工艺条件合理可行, 具重现性。

### 3 讨论

水蛭素是目前已知作用最强的凝血酶特异性抑制剂<sup>[5]</sup>。但是水蛭素极不稳定, 易受水分及温度的影响, 80 $^{\circ}$ C 下加热 15 min 后即可被破坏<sup>[7]</sup>。因此关于水蛭素的提取应尽量避免与水的接触, 同时在提取过程中还应避免高温。

预实验中, 分别采用乙醇加热回流提取、乙醇温浸提取及水煎煮提取, 结果以乙醇温浸提取液抗凝血酶活性最强, 因此在正交试验设计中选择采用乙醇温浸提取方法, 并对温浸提取工艺中主要影响因素进行了考察, 确定了提取工艺参数。在提取次数的考察中, 发现随着提取次数的增加, 抗凝血酶活性先增加后降低, 分析其原因可能是随着提取次数的增加, 水蛭素的提取率增加, 但是由于水蛭素遇热不稳定, 提取次数较多时, 后期浓缩时间较长, 水蛭素有可能被破坏, 致使其抗凝血酶活性降低。

### 参考文献:

- [1] 王蒙萌, 杨永波. 水蛭的化学成分及药理作用[J]. 黑龙江中医药, 2008, 37(2): 47.
- [2] Hu L, Lee M, Campbell W, et al. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis[J]. Blood, 2004, 104(9): 2748.
- [3] 潘贺, 刚宏林, 苏云明. 中药水蛭的活性成分及药理作用研究概况[J]. 中医药信息, 2006, 23(11): 20.
- [4] 修霞, 聂海燕, 韩红霞, 等. 水蛭化学成分及其药理作用探讨综述[J]. 中国热带医学, 2005, 5(8): 1733.
- [5] 吴瑛, 任安乐. 大鼠脑出血急性期给予水蛭素后血肿周围组织胶质纤维酸性蛋白的表达[J]. 兰州大学学报, 2009, 35(1): 4.
- [6] 张岚. 水蛭的提取工艺研究[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(1): 80.
- [7] 刘欣, 张文清, 夏玮, 等. 提取水蛭有效成分初探[J]. 中成药, 2002, 24(11): 894.