

- [14] 徐蓓蕾, 韩晓宇, 刘晶晶, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化葛根芩连汤煎煮工艺 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7070-7081.
- [15] 王志刚, 樊红波, 刘惠娟, 等. 星点设计-效应面法优化宣肺解毒胶囊水提取工艺 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(21): 142-145.
- [16] 孙立伟, 陈博年, 姜 镜, 等. HPLC-DAD 变波长法同时测 定博尔宁胶囊中 12 种指标成分 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3098-3103.
- [17] 李素丽, 曹岚岚, 周 泉, 等. 鹿红方颗粒提取工艺的优化 [J]. 中成药, 2022, 44(11): 3619-3622.
- [18] 柳 兰, 李 雅, 郭志华, 等. Box-Behnken 响应面法结合 G1-熵权法的理气活血复方浸膏喷雾干燥工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2560-2566.

血蛭康胶囊提取工艺优化及其体外抗凝、溶栓活性研究

龚 铃, 刘贵金属, 张 鑫, 邓世明*

(海南大学药学院, 海南海口 570228)

摘要: 目的 优化血蛭康胶囊提取工艺, 并评价其体外抗凝、溶栓活性。方法 在单因素试验基础上, 以渗漉体积流量、乙醇体积分数、浸泡时间、乙醇用量为影响因素, 阿魏酸提取率、干膏得率的综合评分为评价指标, 正交试验优化提取工艺。采用凝血酶滴定法考察体外抗凝活性, 血凝块溶解法考察体外溶栓活性。结果 最佳条件为 4 倍量 70% 乙醇浸泡 24 h, 渗漉体积流量 2 mL/min, 综合评分为 108.49 分。胶囊体外抗凝活性值为 240 U/g。与阴性组比较, 血蛭康胶囊中、高剂量组小鼠血凝块溶解率升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 该方法稳定可行, 可用于提取体外抗凝、溶栓活性良好的血蛭康胶囊。

关键词: 血蛭康胶囊; 提取工艺; 正交试验; 体外抗凝活性; 体外溶栓活性; 凝血酶滴定法; 血凝块溶解法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-1969-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.036

血蛭康胶囊源于补阳还五汤, 由菲牛蛭、黄芪、川芎、当归、丹参组成, 共奏益气活血、祛瘀通络之功效^[1-3], 其中菲牛蛭为广西、云南地方药材标准收载品种^[4-5], 其抗凝、溶栓作用高于柳叶蚂蟥、宽体金线蛭等非吸血类水蛭^[6-7]。水蛭类药材常以干燥全体入药^[8], 而菲牛蛭经高温炮制后抗凝活性降低, 其冻干品较其他炮制品抗凝活性更强^[9], 并且具有抗血栓、溶血栓作用^[10], 故将其鲜品冷冻干燥后单独提取, 其余药味按比例混合提取, 再与菲牛蛭提取物混合均匀, 即得血蛭康胶囊。

阿魏酸为川芎、当归主要活性成分, 具有抗动脉粥样硬化、抗血小板凝集、抗血栓形成等作用^[11]。血蛭康胶囊中阿魏酸、皂苷等活性成分经高温处理后, 会导致其含量降低^[12-13], 故采用渗漉法进行提取^[14]。本实验以阿魏酸提取率、干膏得率综合评分为评价指标, 优化血蛭康胶囊提取工艺, 采用单因素试验考察渗漉体积流量、乙醇体积分数、浸泡时间、乙醇用量对提取工艺的影响, 在通过凝血酶滴定法^[8]测定抗凝活性, 血凝块溶解法^[15]测定体外溶栓

活性, 以期为该制剂质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-100 液相色谱仪 (上海伍丰科学仪器有限公司); SB-1100 旋转蒸发仪、EYELA 水浴锅 (上海爱朗仪器有限公司); ML204 型电子天平 [万分之一, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。

1.2 试剂与药物 菲牛蛭为实验室自养, 经海南大学药学院邓世明教授鉴定为正品, 标本保存于海南大学药学院, 冷冻干燥备用。黄芪 (批号 2103101)、川芎 (批号 2105101)、当归 (批号 2105101)、丹参 (批号 2105103) 均购自海南寿南山参业有限公司, 经海南大学邓世明教授鉴定为正品。凝血酶 (批号 21074855)、(牛) 纤维蛋白原 (批号 A21GS158492)、阿魏酸对照品 (批号 G27A11L112005)、尿激酶 (批号 100404) 均购自上海源叶生物科技有限公司。乙腈、甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠雄性 20 只, 体质量 18~

收稿日期: 2021-11-22

基金项目: “十三五”海洋经济创新发展示范城市项目 (HHCF20180103)

作者简介: 龚 铃 (1997—), 女, 硕士生, 从事天然产物研究与开发工作。E-mail: 775871829@qq.com

* 通信作者: 邓世明 (1969—), 男, 教授, 从事天然产物研究与开发工作。E-mail: dsm701@126.com

网络首发日期: 2022-04-27

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220427.0810.002.html>

22 g, 购于海南药物研究所有限责任公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (琼) 2020-0007, 每天换水1次, 在25℃下适应性饲养1周。实验经海南大学动物伦理学委员会批准(批准文号 HNUAUCC-2021-00020)。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸含量测定

2.1.1 色谱条件 Silica C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相乙腈-0.085%磷酸(17:83);体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;检测波长320 nm;进样量20 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取阿魏酸对照品0.0046 g, 置于25 mL棕色量瓶中, 甲醇定容, 得184 μg/mL贮备液,

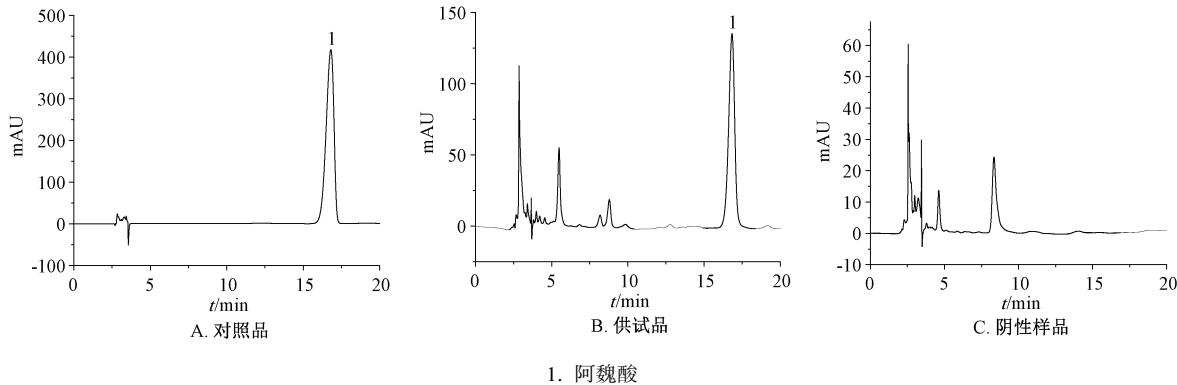


图1 阿魏酸HPLC色谱图

2.1.6 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液0.25、0.5、1、2、4、8 mL, 甲醇稀释并定容至10 mL棕色量瓶中, 摆匀, 0.22 μm微孔滤膜过滤, 在“2.1.1”色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y)进行回归, 得方程为 $Y=106.97X+108.32$ ($r=0.9998$), 在4.6~147.6 μg/mL范围内线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 精密吸取9 μg/mL对照品溶液适量, 同一天内在“2.1.1”项色谱条件下进样测定6次, 测得阿魏酸峰面积RSD为1.37%, 表明该方法日内精密度良好; 精密吸取90 μg/mL对照品溶液适量, 每天在“2.1.1”项色谱条件下进样测定3次, 连续6 d, 测得阿魏酸峰面积RSD为0.49%, 表明该方法日间精密度良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取同一批阿魏酸含量已知

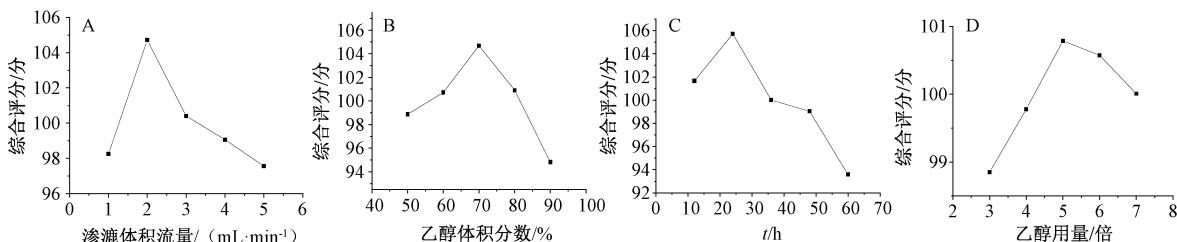


图2 单因素试验结果

(A)、乙醇体积分数(B)、浸泡时间(C)、乙醇用量(D)作为影响因素, 各取3个水平, 干膏得率、阿魏酸提取率

精密吸取7.5 mL, 甲醇稀释定容至10 mL量瓶中, 即得(该成分质量浓度为138 μg/mL)。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取提取干膏0.3 g(按正交试验表中的1号方案制备), 置于10 mL棕色量瓶中, 甲醇定容后超声处理30 min, 冷却至室温, 甲醇补足减失的质量, 0.22 μm微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.4 阴性样品溶液制备 按照处方工艺, 制成缺川芎、当归的阴性样品, 按“2.1.3”项下方法制备, 即得。

2.1.5 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图1。由此可知, 各成分色谱峰分离度均大于1.5, 附近无其他杂质峰干扰, 表明该方法专属性良好。

的干膏0.3 g, 分别加入105 μg/mL对照品溶液0.6、0.8、1 mL, 按“2.1.3”项下方法分别平行制备3份供试品溶液, 共9份, 在“2.1.1”色谱条件下进样测定, 测得阿魏酸平均加样回收率为99.9%, RSD为2.25%。

2.2 单因素试验 将黄芪、丹参、当归、川芎按比例混合, 粉碎成粗粉, 过10目筛, 称取50 g粉末, 乙醇渗漉提取, 以阿魏酸提取率、干膏得率的综合评分为评价指标, 公式为综合评分=[(干膏得率/平均值)×0.6+(阿魏酸提取率/平均值)×0.4]×100, 其中干膏得率=(干膏质量/生药材质量)×100%, 阿魏酸提取率=阿魏酸浓度×定容体积/1 000×样品质量。考察渗漉体积流量(图2A)、乙醇体积分数(图2B)、浸泡时间(图2C)、乙醇用量(图2D)对提取工艺的影响, 结果见图2。

2.3 正交试验 根据单因素试验结果, 选择渗漉体积流量

的综合评分作为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化提取工艺, 因素水平表见表1, 结果见表2, 方差分析见表3。

表1 因素水平

水平	因素			
	A 渗漉体积流量/ B 乙醇体积 (mL·min ⁻¹)	C 浸泡时间/h	D 乙醇用量/倍 分数/%	
1	1	60	12	4
2	2	70	24	5
3	3	80	36	6

表2 试验设计与结果

试验号	因素				阿魏酸提取率/ (mg·g ⁻¹)	干膏得率/%	综合评分/分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	1.16	26.41	96.32
2	1	2	2	2	0.95	33.29	104.25
3	1	3	3	3	1.07	25.77	91.91
4	2	1	2	3	1.02	33.75	107.60
5	2	2	3	1	1.18	26.95	98.16
6	2	3	1	2	1.52	22.71	100.33
7	3	1	3	2	0.92	30.94	98.13
8	3	2	1	3	1.20	27.66	100.38
9	3	3	2	1	1.72	20.72	102.70
K_1	97.49	100.68	99.01	99.06	—	—	—
K_2	102.03	100.93	104.85	100.90	—	—	—
K_3	100.40	98.31	96.07	99.96	—	—	—
R	4.54	2.62	8.78	1.84	—	—	—

表3 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
A	47.53	2	6.21	>0.05
B	18.81	2	2.46	>0.05
C	179.77	2	23.47	<0.05
D	7.66	2	1.00	>0.05
误差	7.66	2	—	—

表4 验证试验结果 (n=3)

试验号	阿魏酸提取率/(mg·g ⁻¹)	干膏得率/%	综合评分/分	平均综合评分/分	RSD/%
1	1.20	31.4	108.69		
2	1.20	31.3	108.30	108.49	0.18
3	1.23	30.8	108.48		

的凝血酶滴定法。精密称取本品内容物 1 g, 加入 5 mL 生理盐水充分搅拌, 浸泡提取 30 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 100 μ L, 加到 200 μ L 含 0.5% (牛) 纤维蛋白原的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液中, (37 ± 0.5) °C 水浴中浸泡提取 5 min, 滴加 40 U/mL 凝血酶溶液 120 μ L, 可观察到絮丝状凝固物终点出现, 换算出对应的抗凝活性为 240 U/g。

2.5.2 体外溶栓活性 小鼠摘眼球取血, 注射器移取血液至直径 5 mm 玻璃管中, 封闭两头, 待其自然凝固后用吸水纸吸取表面液体, 手术刀切割成大小质量均一的血块, 置于离心管中, 分为阴性组 (1 mL 生理盐水)、阳性组 (100 U/mL 尿激酶) 及血蛭康胶囊低、中、高剂量组 (22.5、45、90 mg/mL), 保鲜膜封住离心管口, 牙签扎适量气孔, 37 °C 恒温摇床上 80 r/min 孵育 24 h, 测定血凝块溶解率, 公式为溶解率 = [(溶解前血凝块湿质量 - 溶解后血凝块湿质量) / 溶解前血凝块湿质量] $\times 100\%$ 。通

由表 2 可知, 各因素影响程度依次为 $C > A > B > D$, 最优工艺是 $A_2B_2C_2D_2$ 。由表 3 可知, 浸泡时间为显著影响因素 ($P < 0.05$), 与表 2 结果一致。由于乙醇用量对提取工艺影响不大, 综合考虑提取效率和最大成本效益比, 最终确定为 $A_2B_2C_2D_1$, 即 4 倍量 70% 乙醇浸泡 24 h, 渗漉体积流量 2 mL/min。

表2 试验设计与结果

2.4 验证试验 将黄芪、丹参、当归、川芎按比例混合粉碎, 过 10 目筛, 称取 500 g 粉末, 按“2.3”项下优化工艺进行 3 批验证试验, 结果见表 4, 可知该提取工艺稳定可行。

2.5 体外抗凝、溶栓活性研究

2.5.1 体外抗凝活性 采用 2020 年版《中国药典》^[8] 中

过 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, 结果见表 5。由此可知, 与阴性组比较, 阳性组小鼠血凝块溶解率升高 ($P < 0.01$), 表明方法可行; 与阴性组比较, 血蛭康胶囊中、高剂量组小鼠血凝块溶解率升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表5 血蛭康胶囊对小鼠血凝块的溶解作用 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	剂量	血凝块溶解率/%
阴性组	—	20.43±4.94
阳性组	100 U/mL	37.98±1.44 ^{**}
血蛭康胶囊低剂量组	22.5 mg/mL	27.40±2.34
血蛭康胶囊中剂量组	45 mg/mL	30.69±1.14 [*]
血蛭康胶囊高剂量组	90 mg/mL	40.23±4.38 ^{**}

注: 与阴性组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

3 讨论

菲牛蛭含有多种氨基酸、多肽、蛋白质等动物药特效成分^[16], 以及能抑制血栓形成的脂肪酸类物质^[17], 而黄

芪、丹参、川芎、当归作为水蛭相关中成药中常出现的配伍药材^[18]，可用于治疗血液瘀滞造成的心脑血管疾病，上述报道与血蛭康胶囊功效一致。本实验发现，浸泡时间有显著影响，可能是因为其过短时易导致药材有效成分未完全溶出，干膏得率低，而过长虽能提高干膏得率，但有效成分阿魏酸占比降低，同时也可能会导致某些成分不稳定，故以浸泡24 h为佳。

体外活性实验表明，血蛭康胶囊有抗凝、溶栓活性，主要是因为菲牛蛭中菲牛蛭素、水蛭素等活性多肽与凝血酶特异性结合形成非共价键紧密结合的稳定化合物，阻止了凝血酶催化导致的可溶性纤维蛋白原变成不溶性纤维蛋白^[19]，直至活性成分被耗尽，出现絮丝状凝固物，并且所含有的纤溶酶可溶解纤维蛋白^[20]，同时川芎、当归中阿魏酸可抑制血小板聚集^[11]，黄芪总提取物^[21]、丹参酮ⅡA^[22]等成分也能激活纤溶酶原，产生纤溶作用，最终使血凝块溶解，但具体是否还有其他机制仍需进一步研究。

参考文献：

- [1] 向祥龙, 王琦琦, 李俊琦, 等. 2009—2019年中国心脑血管疾病死亡率趋势分析[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(11): 811-818.
- [2] 何松, 苏悦, 常永龙, 等. 王清任《医林改错》活血化瘀思想探骊[J]. 福建中医药, 2019, 50(4): 46-47.
- [3] 单晓晓, 洪帮振, 刘洁, 等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5496-5511.
- [4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011.
- [5] 云YNZYC-0357-2013, 菲牛蛭药材标准[S].
- [6] 关世侠, 袁中文, 周郁斌, 等. 不同品种水蛭抗凝抗血栓作用的比较[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(14): 1093-1096.
- [7] 吴志军, 张灵霞, 于立华. 四种不同品种水蛭生物活性的研究与比较[J]. 中成药, 2006, 28(2): 232-234.
- [8] 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.
- [9] 钟苗, 雷艳, 谭赫, 等. 水提取法和仿生提取法研究菲牛蛭不同炮制品的体外抗凝活性[J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 379-383; 397.
- [10] 韦桂丽, 王硕, 周小雷, 等. 菲牛蛭的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(10): 1496-1498.
- [11] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 138-147.
- [12] 李博, 徐莉, 尹雷, 等. 中药川芎不同提取工艺研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(7): 1481-1482.
- [13] 郭晓宇, 陈建平, 汤化琪, 等. 中药材皂苷提取方法与工艺研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(S1): 116-119.
- [14] 王婉莹, 瞿海斌, 龚行楚. 中药渗漉提取工艺研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1039-1046.
- [15] 廖敏, 王维民, 谌素华, 等. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯组成分析及抗血栓活性评价[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 189-194.
- [16] 陈银芳, 章常华, 魏学鑫, 等. 动物药中蛋白质、氨基酸检测分析研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 186-189.
- [17] Ibeas C, Cejas J, Gómez T, et al. Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition[J]. *Aquaculture*, 1996, 142(3): 221-235.
- [18] 张玥, 侯光敏, 王雁南, 等. 含虫类药物处方治疗深静脉血栓形成的组方配伍规律研究[J]. 中医药学报, 2021, 49(7): 45-50.
- [19] Electricwala A, Sawyer R T, Jones C P, et al. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillae*[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1991, 2(1): 83-89.
- [20] 钟小斌, 黎渊弘, 周维海, 等. 广西菲牛蛭中一种纤溶酶的分离纯化[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(4): 225-227.
- [21] 朱虹, 吴强, 徐明, 等. 黄芪总提物体内外抗血栓作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(8): 917-920.
- [22] Francesco M, Vincenza C, Maria G C, et al. Molecular mechanism of tanshinone II A and cryptotanshinone in platelet anti-aggregating effects: an integrated study of pharmacology and computational analysis [J]. *Fitoterapia*, 2015, 100: 174-178.