

地龙酒制工艺优化及炮制前后成分比较

熊颂强¹, 谭玲龙¹, 钟凌云^{1*}, 宋 嫵^{2*}, 张玉莲², 瞿光航², 王艳春³
(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 上海上药华宇药业有限公司, 上海 200002; 3. 上海康桥中药饮片有限公司, 上海 201315)

摘要: **目的** 优化地龙酒制工艺及炮制前后成分比较。**方法** 以黄嘌呤和肌苷含量为评价指标, 加酒量、闷润时间、炒制温度、炒制时间为影响因素, 正交试验优化炮制工艺。**结果** 最佳炮制工艺为每 100 kg 地龙, 加入黄酒 12.5 kg, 闷润 30 min, 倒入预热的铁锅中, 在 80 ℃下炒制 3 min。加酒量、闷润时间、炒制温度、炒制时间对酒地龙炮制均具有显著影响。地龙酒炙后, 次黄嘌呤含量增加了 30.9%, 肌苷含量下降了 29.7%, 蛋白质含量下降了 33.6%。**结论** 该方法简便、快速、准确, 可用于地龙的酒制。

关键词: 地龙; 酒制; 正交试验; 化学成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)12-2953-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.025

Processing with wine technology optimization for lumbricus and comparison of the constituents before and after processing

XIONG Song-qiang¹, TAN Ling-long¹, ZHONG Ling-yun^{1*}, SONG Yan^{2*}, ZHANG Yu-lian²,
QU Guang-hang², WANG Yan-chun³

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Shanghai Pharmaceutical Huayu Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200002, China; 3. Shanghai Kangqiao Chinese Medicine Pieces Co., Ltd., Shanghai 201315, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the processing with wine technology optimization for lumbricus and comparison of the constituents before and after processing. **METHODS** With hypoxanthine and inosine as evaluation indices, the amount of alcohol added, the moistening time, the stir-frying temperature and the stir-frying time as influencing factors, the processing technology was optimized by orthogonal test. **RESULTS** The optimum processing with wine technology optimization for lumbricus was adding 12.5 kg of yellow wine to every 100 kg of lumbricus, moistening for 30 minutes, pouring it into a preheated iron pot, stir-frying for 3 minutes at 80 ℃. The amount of alcohol added, moistening time, stir-frying temperature and stir-frying time had significant effects on the processing with wine technology for lumbricus. After the processing of the lumbricus, the content of hypoxanthine increased 30.9%, with the inosine content decreasing 29.7%, and the protein content decreased 33.6%. **CONCLUSION** This stable and feasible method can be used for preparing wine-fried lumbricus. **KEY WORDS:** lumbricus; processing with wine; orthogonal test; chemical constituents

地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体, 前 1 种习称广地龙, 后 3 种习称沪地龙^[1]。酒地龙为地龙通过加入辅料黄酒

收稿日期: 2018-12-13
基金项目: 国家发展改革委、中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-Y-SH-38); 2017 年度研究生创新专项资金项目 (YC2017-S357)
作者简介: 熊颂强 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为中药炮制学。Tel: 18720913156, E-mail: 625954298@qq.com
* 通信作者: 钟凌云 (1971—), 教授, 博士生导师, 从事中药炮制研究。Tel: (0791) 87118939, E-mail: ly1638163@163.com
宋 嫵 (1970—), 女, 高级工程师, 从事中药材资源和质量研究。E-mail: hysongyan@126.com

进行炮制所得。通过查阅相关的资料获得酒地龙的传统炮制方法为“取净地龙段，加入黄酒拌匀，置锅内，稍闷润，用文火加热，炒至表面呈棕色时，取出，放凉(地龙每 100 kg 用黄酒 12.5 kg)”^[2]。

本研究基于炮制过程中对酒地龙饮片质量影响较大的因素加酒量、闷润时间、炒制温度、炒制时间进行考察，采用正交试验，以次黄嘌呤和肌苷含有量作为指标，通过综合加权评分的方法对酒地龙炮制工艺参数进行优选，以期为其质量研究提供参考。同时对地龙酒炙后的次黄嘌呤、肌苷及蛋白质的含有量进行对比分析，以期获得地龙炮制前后成分变化规律。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Ultimate 3000 型高效液相色谱仪（配置 PDA-3000 型二极管阵列紫外检测器和 Chromeleon 工作站，美国赛默飞世尔科技公司）；AE240 型电子天平（十万分之一，瑞士 Mettler-Toledo 上海有限公司）；CP214 型电子天平（万分之一，美国 Ohaus 仪器上海有限公司）；SHZ-D（Ⅲ）循环水式真空泵（巩义市予华仪器有限责任公司）；Raytek Raynger ST20 红外测温仪（美国 Raytek 公司）；YF-111B 型高速中药粉碎机（瑞安市永厉制药机械有限公司）；UV-8000s 紫外分光光度计（上海元析仪器有限公司）；微量移液器（上海脱莫斯科学仪器有限公司）；TDL50B 离心机（上

海安亭科学仪器厂）；KQ-500E 超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 药材 药材地龙是由上海康桥中药饮片有限公司地龙 GAP 基地提供，经江西中医药大学中药资源学科组的葛菲教授鉴定为通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelson) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelson 的干燥体。

1.3 试剂 次黄嘌呤（批号 wkq17112308）、肌苷（批号 wkq17111309）、牛血清白蛋白（批号 wkq17102703）对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司，质量分数均 ≥ 98%。考马斯亮蓝 G250（批号 63N101100，北京鼎国昌盛生物技术有限公司）；水为娃哈哈纯净水（娃哈哈集团有限公司）；黄酒（批号 20160613，会稽山绍兴酒股份有限公司）；甲醇、乙醇（色谱级，西陇科学股份有限公司）；磷酸（西陇化工股份有限公司）。

2 工艺优化

2.1 方法与结果

2.1.1 正交试验 通过查阅相关文献，参考各版《中国药典》以及全国各省市中药材的炮制规范，最终选择加酒量、闷润时间、炒制温度和炒制时间作为考察因素，以地龙有效成分次黄嘌呤和肌苷含有量为检测指标，采用 L₉(3⁴) 正交设计对酒地龙炮制工艺进行优选，因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 加酒量/g(每 100 g 药材)	B 闷润时间/min	C 炒制温度/℃	D 炒制时间/min
1	10	30	80	1
2	12.5	60	110	2
3	15	90	140	3

2.1.2 炮制品制备 取净地龙 9 份，每份 25 g。按上述正交试验表进行炮制，分别得到各酒地龙炮制品。

2.1.3 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相甲醇(A)-含 0.1% 磷酸的磷酸二氢钾溶液(B)，梯度洗脱程序见表 2；柱温 30℃；波长 254 nm；进样量 20 μL。色谱图见图 1。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution programs

时间/min	A 甲醇/%	B 含 0.1% 磷酸的磷酸二氢钾溶液/%
0~12	0	100
12~30	0~12	100~88
30~35.1	12	88

2.1.4 供试品溶液制备 精密称定酒地龙饮片粉末(过 2 号筛) 0.2 g，置具塞锥形瓶中，加入 10 mL 生理盐水，超声 1 h，于 5 000 r/min 离心 10 min，取上清液，以生理盐水定容至 10 mL 量瓶中，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.5 对照品溶液制备 精密称定次黄嘌呤、肌苷对照品 5、10 mg 于 50 mL 量瓶中，加适量生理盐水溶解，并定容至刻度，摇匀，得混合对照品溶液。

2.1.6 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 1、3、5、7、9 mL 置 10 mL 量瓶中，加生理盐水分别定容至刻度，混匀。取上述溶液各 20 μL，在

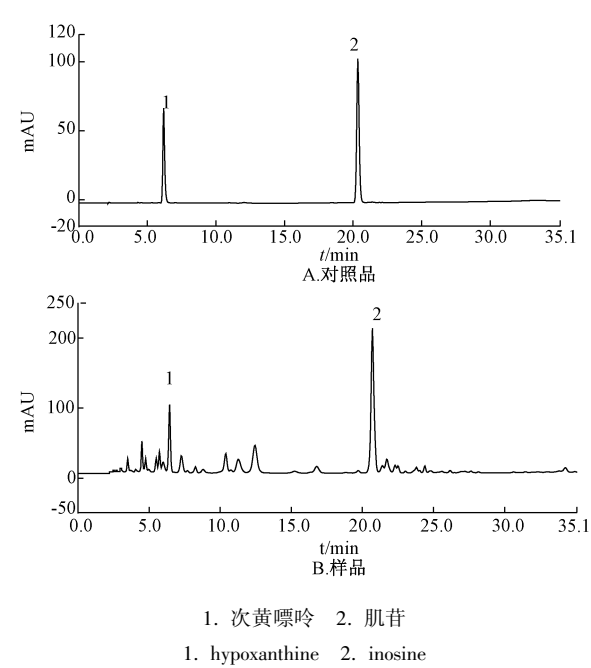


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

“2. 1. 3”项条件下进样，以次黄嘌呤和肌苷质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行回归。分别得回归方程次黄嘌呤为 $Y=1\,216.3X-0.291$ ($R^2=0.999\,3$)，在 $0.010\,0\sim0.090\,0\text{ mg/mL}$

范围内线性关系良好；肌苷为 $Y=706.2X+0.528$ ($R^2=0.999\,5$)，在 $0.020\,0\sim0.180\,0\text{ mg/mL}$ 范围内线性关系良好。

2. 1. 7 精密度试验 取同一混合对照品溶液，在“2. 1. 3”项条件下，重复进样 6 次，测得次黄嘌呤、肌苷含有量 RSD 分别为 0.64%、0.83%，表明仪器精密度良好。

2. 1. 8 稳定性试验 取同一酒地龙供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12 h，在“2. 1. 3”项条件下进样，测得次黄嘌呤、肌苷含有量 RSD 分别为 3.23%、2.74%，表明该方法稳定性良好。

2. 1. 9 重复性试验 精密称定同一酒地龙饮片样品粉末 0.2 g，平行 6 份，按“2. 1. 4”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1. 3”项条件下进样，测得次黄嘌呤、肌苷含有量 RSD 分别为 4.05%、2.67%，表明该方法重复性良好。

2. 1. 10 加样回收率试验 精密称定已知含有量的酒地龙粉末 0.2 g，平行 6 份，分别精密加入次黄嘌呤、肌苷对照品溶液适量，按“2. 1. 4”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1. 3”项条件下测定，并计算次黄嘌呤、肌苷含有量及 RSD。结果见表 3。

表 3 各成分加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents ($n=6$)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
次黄嘌呤	0.200 0	0.110 4	0.100 0	0.210 1	99.70	99.72	1.45
	0.200 4	0.109 3	0.100 0	0.210 3	101.00		
	0.200 4	0.107 3	0.100 0	0.208 4	101.10		
	0.200 1	0.111 5	0.100 0	0.208 7	97.20		
	0.200 1	0.113 2	0.100 0	0.212 3	99.10		
	0.200 1	0.108 7	0.100 0	0.208 9	100.20		
肌苷	0.200 0	0.452 0	0.500 0	0.950 3	99.66	99.30	1.26
	0.200 4	0.447 7	0.500 0	0.946 5	99.76		
	0.200 4	0.446 5	0.500 0	0.951 2	100.94		
	0.200 1	0.450 3	0.500 0	0.947 9	99.52		
	0.200 1	0.449 7	0.500 0	0.943 5	98.76		
	0.200 1	0.453 0	0.500 0	0.938 9	97.18		

2. 1. 11 数据处理对次黄嘌呤、肌苷含有量分别进行加权综合评分，给予 2 指标 50% 的权重。各评价指标加权处理如下，

次黄嘌呤含有量评分 = 各样品次黄嘌呤含有量 $\times$ 50/9 个样品中次黄嘌呤最高含有量；

肌苷含有量评分 = 各样品肌苷含有量 $\times$ 50/9 个样品中肌苷最高含有量；

综合评分 = 次黄嘌呤含有量评分 + 肌苷含有量

评分^[3]。使用 SPSS 21.0 对数据进行分析。

2. 2 分析 通过直观分析表可知，各个因素对地龙饮片炮制工艺的影响顺序为 $A>D>B>C$ ；通过方差分析可知 4 个因素的 P 值均小于 0.05，表明 4 个因素均具有显著性影响。将酒地龙最佳炮制工艺定为 $A_2B_1C_1D_3$ ，即取适量地龙（每 100 kg 地龙用黄酒 12.5 kg），加入黄酒闷润 30 min，倒入预热好的铁锅中，在 80℃ 下炒制 3 min，取出，晾凉。见表 4~5。

表 4 试验设计与结果
Tab. 4 Design and results of tests

编号	A	B	C	D	次黄嘌呤/%	肌苷/%	综合评分
1	1	1	1	1	0.051	0.216	86.61
2	1	2	2	2	0.053	0.199	84.80
3	1	3	3	3	0.053	0.210	86.98
4	2	1	2	3	0.058	0.210	91.13
5	2	2	3	1	0.057	0.190	86.39
6	2	3	1	2	0.042	0.255	86.73
7	3	1	3	2	0.054	0.184	82.81
8	3	2	1	3	0.057	0.195	87.99
9	3	3	2	1	0.027	0.255	73.21
K ₁	86.13	86.85	87.11	82.07	—	—	—
K ₂	88.08	86.39	83.04	84.78	—	—	—
K ₃	81.34	82.30	85.39	88.70	—	—	—
R	6.75	4.55	4.07	6.63	—	—	—

表 5 方差分析
Tab. 5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	140.766	2	69.535	52.397	0
B	72.675	2	34.903	26.301	0
C	48.628	2	23.943	18.042	0.001
D	129.408	2	63.390	47.766	0

2.3 验证试验 按确定的酒地龙最佳工艺进行 3 次验证,测得次黄嘌呤的含有量分别为 0.057 1、0.056 4、0.056 7 mg/g,肌苷含有量分别为 2.314、2.350、2.323 mg/g,次黄嘌呤、肌苷 RSD 分别为 0.62%、0.80%。结果表明,所选酒地龙炮制工艺条件稳定可行。

3 酒地龙炮制前后成分变化

3.1 蛋白质含有量变化

3.1.1 蛋白质对照品溶液制备 精密称定牛血清白蛋白对照品 5.410 mg 于 10 mL 量瓶中,以去离子水定容至刻度,得牛血清白蛋白贮备液,置于 4 ℃冰箱中保存,备用。

3.1.2 考马斯亮蓝溶液制备 精密称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg,加入 95%乙醇 50 mL 使之溶解,再加入 85%磷酸 100 mL,最后用纯化水定容至 1 000 mL,4 ℃冰箱保存,备用^[4]。

3.1.3 供试品溶液制备 取地龙与对应炮制成的酒地龙各 3 份,每份约 2.5 g,加入 10 倍量水静置 30 min,超声 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液定容至 25 mL 量瓶中,备用。

3.1.4 线性关系考察 精密吸取牛血清白蛋白溶液适量,用去离子水稀释成质量浓度为 0.108 2、0.216 4、0.324 6、0.432 8、0.541 0 mg/mL 的对照品溶液 5 份,分别加入精密量取的稀释对照品

500 μL;以 500 μL 去离子水作为空白液,并将此空白测定的吸光度作为零点;分别加入 4 mL 考马斯亮蓝溶液,混合均匀,静置 5 min,置于紫外分光光度计,595 nm 波长、1 cm 光径测定吸光度^[5]。以质量浓度为横坐标 (X),吸光度为纵坐标 (Y),进行回归,得回归方程为 Y=1.108 1X+0.090 1 (R²=0.999 4),牛血清白蛋白溶液在 0.108 2~0.541 0 mg/mL 范围内线性关系良好。

3.1.5 精密度试验 取质量浓度为 0.108 2、0.324 6、0.541 0 mg/mL 的对照品溶液各 500 μL,分别加入 4 mL 考马斯亮蓝溶液;混合均匀,静置 5 min,置于紫外分光光度计,595 nm 波长、1 cm 光径下测定吸光度,测得各吸光度 RSD 分别为 0.35%、1.43%、2.16%,表明仪器精密度良好。

3.1.6 重复性试验 取地龙粉末约 2.5 g,平行 5 份,按“3.1.3”项下方法制备供试品溶液。并将供试品溶液稀释 5 倍,分别精密加入稀释的供试品 500 μL,加入 4 mL 考马斯亮蓝溶液,混合均匀,静置 5 min,置于紫外分光光度计中,595 nm 波长、1 cm 光径测定吸光度。测得吸光度 RSD 为 3.51%,表明该方法重复性良好。

3.1.7 稳定性试验 取质量浓度为 0.108 2 mg/mL 的对照品溶液 500 μL,加入 4 mL 考马斯亮蓝溶液,混合均匀,静置 5 min,置于紫外分光光度计中,595 nm 波长、1 cm 光径测定吸光度,每隔 30 min 测定 1 次。测得吸光度 RSD 为 2.11%,表明显色反应发生后 4 h 内稳定性良好。

3.1.8 加样回收率试验 取已知蛋白质含有量的地龙粉末 6 份,分别精密加入牛血清白蛋白对照品适量,按“3.1.3”“3.1.4”项下方法操作。得牛血清白蛋白的平均加样回收率为 98.3%。

3.2 次黄嘌呤、肌苷含有量变化 取地龙及酒地龙粉末各 3 份，每份 0.2 g，精密称定，按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.3”项条件下测定，计算含有量。结果见表 6。

表 6 炮制前后次黄嘌呤、肌苷、蛋白含有量变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Content changes of hypoxanthine, inosine and protein before and after processing ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

样品	次黄嘌呤/%	肌苷/%	蛋白质/%
地龙	0.042 4±0.000 9	0.332 6±0.011 2	1.140 0±0.036 1
酒地龙	0.055 5±0.001 2	0.233 8±0.005 8	0.756 7±0.035 1
含有量变化	30.9(+)	29.7(-)	33.6(-)

3.3 结果 表 6 表明，地龙酒炙后，次黄嘌呤含有量增加了 30.9%，肌苷含有量下降了 29.7%，蛋白质含有量降低了 33.6%。

4 讨论

本实验采用正交试验，对地龙酒炙过程中的加酒量、闷润时间、炒制温度、炒制时间等参数进行量化研究，以较好的控制酒地龙的炮制工序和中间产品质量；地龙主要含脂类、氨基酸、蛋白质、琥珀酸、嘌呤等成分^[6]。其中起到降压平喘作用的主要活性物质是次黄嘌呤及含氮类，同时也具有抗组织胺、扩张支气管和平喘等药理作用^[7]，因此采用次黄嘌呤和肌苷含有量作为指标成分，对酒地龙炮制工艺进行优选。以期对酒地龙的规范化生产、饮片质量优化和酒地龙饮片质量标准的制定有一定的实际意义。

地龙性寒、味咸、气腥；黄酒味甘、辛，且性热。传统中医认为酒炙地龙不仅能去除地龙本身的腥味，还能引药上行，增强地龙平喘通络的功效。有研究表明，地龙经过酒炙后化痰、止咳、平喘的功效增强^[8]，这可能与次黄嘌呤含有量增加有关，地龙酒炙后，次黄嘌呤含有量增加，肌苷含有量下降。其原因可能是肌苷在化学结构上仅比次黄嘌呤多了 1 个呋喃糖，随着炮制温度的逐渐升高，较容易失去呋喃糖，从而转化为次黄嘌呤^[9]。

地龙富含多种蛋白质和多肽，如脂类蛋白、钙调素结合蛋白、抗微生物蛋白、抗菌肽等，以干体计高达 56%~66%^[10]，地龙蛋白具有改善微循环^[11]、溶解血栓^[12]、改善动脉粥样硬化及血管瘤^[13-14]、影响血脂及脂质过氧化^[15]、改善血液流

变学^[16]、调节血压^[17]等药理作用。地龙酒炙后，蛋白含有量下降，可能是炒制过程中蛋白变性导致的。因此究竟酒地龙的药效是否会减弱，还有待后续研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 122.

[2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京: 科学出版社, 2005.

[3] 别甜甜. 酒地龙、酒牡丹皮的炮制工艺及饮片质量标准研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.

[4] 房列涛, 兰 雪, 沈秀军, 等. 双波长 600 nm/460 nm 分光光度法测定蛋白质含量研究[J]. 生物学杂志, 2015, 32(4): 94-97.

[5] 李 婷, 杨 骏, 张 彤. 多指标综合评分法优选地龙水提纯化工艺[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(19): 2255-2261.

[6] 王丹彤, 王丹辉. 中药地龙的化学成分及药理作用研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(68): 254-255.

[7] 汪 珊, 梁 仁. 中药地龙药理与哮喘气道重建相关性研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(1): 60-62.

[8] 利红宇, 李 钟, 黄艳玲, 等. 不同炮制的广地龙平喘化痰止咳药效比较[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1464-1465.

[9] 李 钟, 黄艳玲, 李文姗. 炮制对广地龙次黄嘌呤和肌苷含量的影响[J]. 中药材, 2009, 32(1): 31-33.

[10] 吴文如, 李 薇, 赖小平, 等. 地龙药材蛋白质电泳鉴定的初步研究[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 267-270.

[11] 何 红, 车庆明, 孙启时. 地龙提取物的抗凝血作用[J]. 中草药, 2007, 38(5): 733-735.

[12] 吕中明, 石根勇, 胡启之, 等. 蚯蚓提取物对微循环障碍形成的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2): 61-64.

[13] 陈学东, 田道法, 孙 虹. 地龙蛋白组分Ⅲ对鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤血管密度和 MMP-9 表达的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2007, 15(5): 326-328.

[14] 陈学东, 王若光, 邓冰湘. 肿瘤微血管生成机制与抗肿瘤活血化瘀药物筛选[J]. 湖南中医药导报, 2001, 7(5): 235-236.

[15] 马艳春, 周 波, 宋立群, 等. 地龙有效成分对糖尿病肾脏疾病患者血脂、脂质过氧化反应的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2012, 15(1): 53-54.

[16] 陈军霞, 龚冬梅, 蔡本志, 等. 地龙冻干粉针对家兔血液流变学的作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 557-558.

[17] 李承德, 毛淑梅, 康 白, 等. 地龙降压蛋白对自发性高血压大鼠血压及血管紧张素Ⅱ含量的影响[J]. 中国实用医药, 2008, 3(22): 1-3.