

中图分类号:R943 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)04-0063-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.04.014



基于蛋白酶活力的地龙酒制工艺优选*

周广涛¹, 黄蒙蒙², 解盈盈¹, 汪冰¹, 林永强^{1△}

(1. 山东省食品药品检验研究院·国家药品监督管理局胶类产品质量评价重点实验室·山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 山东 济南 250101; 2. 山东宏济堂制药集团股份有限公司, 山东 济南 250000)

摘要:目的 优化地龙酒制工艺。方法 采用纤维蛋白平板法检测酶活力;以炮制温度、炮制时间、加酒量和焖润时间为考察因素,以蚯蚓纤溶酶活力为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选地龙酒制工艺参数。结果 每100 kg地龙,加黄酒12.5 kg拌匀,焖润30 min,70℃翻炒2 min时,其酶活力最高(每克31.8万单位)。结论 该炮制工艺稳定、可行,可用于地龙的酒制。

关键词:地龙;酒制;炮制工艺;酶活力;正交试验法;纤维蛋白平板法

Optimization of Wine - Processing Technology of Pheretima Based on Protease Activity

ZHOU Guangtao¹, HUANG Mengmeng², XIE Yingying¹, WANG Bing¹, LIN Yongqiang¹

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory of Rubber Product Quality Evaluation · Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Jinan, Shandong, China 250101; 2. Shandong Hongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan, Shandong, China 250000)

Abstract: Objective To optimize the wine - processing technology of Pheretima. **Methods** The activity of the enzyme was monitored by the fibrin plate method. With the processing temperature, processing time, alcohol addition and soaking time as the factors, and the activity of earthworm fibrinolytic enzyme as the index, the wine - processing parameters of Pheretima were optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Results** For every 100 kg of Pheretima, its protease activity was the highest (318 000 units per gram) when it was mixed evenly with 12.5 kg of yellow rice wine, moistened for 30 min, and stir - fried at 70℃ for 2 min. **Conclusion** The processing technology is stable and feasible, which can be used for the wine preparation of Pheretima.

Key words: Pheretima; wine - processing technology; enzyme activity; orthogonal test method; fibrin plate method

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 *Pheretimapectinifera* Michaelsen 的干燥体(前1种习称“广地龙”,后3种习称“沪地龙”)[¹]。地龙广泛应用于各类溶栓制剂,但因腥味较浓,常通过炮制(最常使用酒制)祛臭矫味[²]。目前,酒地龙多收载于各省(区、市)地方标准中,但其标准较简单,无法有效控制饮片的质

量。有研究表明,地龙中抗栓主要活性成分为蚯蚓纤溶酶[³⁻¹⁰],过度受热和加入过量乙醇可能影响酶活力,进而影响饮片的药效。因此,可通过测定酶活力,对炮制条件、工艺参数加以控制,以祛臭矫味且保证药效。本研究中采用水提法[¹¹]提取蚯蚓纤溶酶, $L_9(3^4)$ 正交试验法对加酒量、炮制温度、炮制时间和焖润时间4个影响因素进行考察,并采用纤维蛋白平板法[¹²⁻¹³]测定酒制品的酶活力,确定最优炮制工艺。现报道如下。

*基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)[2021CXGC010511];2021年度山东省人文社会科学课题[2021-YYGL-44]。

第一作者:周广涛,男,硕士,主管中药师,研究方向为药品质量标准与评价,(电子信箱)zgt880528@163.com。

△通信作者:林永强,男,博士,主任药师,研究方向为药品质量标准与评价,(电子信箱)946596315@qq.com。

- [7] 张秀明,郑松,柏孙蕾,等. 应用 Westgard 方法评价决定图判断生化检测系统性能的可接受性[J]. 中华检验医学杂志, 2007,30(1):86-89.
- [8] 傅光祥,郭富饶,隆维东,等. 应用 Westgard 方法评价决定图判断测定方法的可接受性[J]. 国际医学检验杂志,2013, 34(16):2152-2155.
- [9] 程明刚,郝艳华,程静,等. Westgard 方法决定图在生化检测系统性能评价中的应用研究[J]. 医疗卫生装备,2012,33(3): 109-112.
- [10] 王伦善,贾建安,金玉亮,等. 6σ 标准在临床生化质量管理中的应用[J]. 临床输血与检验,2014,16(3):269-272.

- [11] WESTGARD JO, WESTGARD SA. The quality of laboratory testing today: an assessment of sigma metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance [J]. Am J Clin Pathol, 2006, 125(3): 343-354.
- [12] NEVALAINEN D, BERTE L, KRAFT C, et al. Evaluating laboratory performance on quality indicators with the six sigma scale[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(4): 516-519.
- [13] 王治国. 6σ 质量标准在临床实验室质量控制的应用[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(2): 125-127.

(收稿日期:2022-05-18;修回日期:2022-08-27)

1 材料

1.1 仪器与试剂

仪器:Sartorius CP225D型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);Climacell222型恒温恒湿箱(德国MMM集团);玻璃培养皿(定制,10 cm × 10 cm);KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);V14r pro型台式高速离心机(生命动力亚洲Dynamica有限公司)。

试剂:纤维蛋白原、纤维蛋白溶酶原、凝血酶(均来自牛血,中国食品药品检定研究院,批号分别为140607-202042,140606-201826,140605-201927);磷酸二氢钠、氯化钠、盐酸(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为20190415,20180111,20190729);黄酒(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司,批号为20211006);水为纯化水。地龙(市场购买),经我院汪冰副主任药师鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体。

2 方法与结果

2.1 纤维蛋白板制备

取琼脂糖100 mg,加磷酸盐缓冲液(PBS;取磷酸氢二钠21.4 g,氯化钠5.26 g,加水900 mL,用1 mol/L盐酸调pH至7.8,再加水至1 000 mL,即得;下同)8 mL,加热使溶解,制成琼脂糖溶液,置55℃水浴中恒温待用。分别取纤维蛋白原、纤维蛋白溶酶原、凝血酶加PBS制成每毫升分别含3.5,1,10个单位的溶液,分别精密量取6,1,1 mL,依次加入上述琼脂糖溶液中,混匀,迅速倒入水平放置的培养皿中,待其凝固后,盖上盖,于4℃保存1 h,取出,在纤维蛋白凝固层上打若干个直径约3 mm小孔,即得纤维蛋白板。

2.2 酶活力计算

以单位质量样品溶圈面积计算蚯蚓纤溶酶活力^[14]。公式如下:总活力 = $(\pi \times r^2) / (G \times V) \times \text{定容体积}$,式中, r 为溶圈半径(mm), G 为取样量(g), V 为点样量(mL)。

2.3 水提条件考察

提取方式:取药材样品粉末(过3号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加水25 mL,称定质量。分别以超声(功率250 W,频率50 kHz)处理3 h、静置提取16 h、振荡(频率120 r/min,下同)提取16 h。取出,放冷,再次称定质量,用水补足减失的质量,6 000 r/min离心10 min,取上清液,即得供试品溶液。各精密量取10 μL,注入纤维蛋白板孔中,37℃恒温保持18 h后,测量溶圈半径。结果,超声法提取时无溶圈;恒温振荡和静置提取时的溶圈半径分别为4 mm和2.5 mm。故确定

以振荡提取。

提取温度:同“提取方式”项下方法处理药材样品,加水,称定质量。分别置30℃、40℃、50℃恒温振荡提取16 h。取出,放冷,再次称定质量,用水补足减失的质量,6 000 r/min离心10 min,取上清液,即得供试品溶液。各精密量取10 μL,注入纤维蛋白板孔中,37℃恒温保持18 h后,测量溶圈半径。结果,30℃、40℃、50℃提取时的溶圈半径分别为2.5 mm、4 mm和3 mm。故确定提取温度为40℃。

提取时间:同“提取方式”项下方法处理药材样品,加水,称定质量。分别置40℃恒温振荡提取14 h、16 h、18 h。取出,放冷,再次称定质量,用水补足减失的质量。6 000 r/min离心10 min,取上清液,即得供试品溶液。各精密量取10 μL,注入纤维蛋白板孔中,37℃恒温保持18 h后,测量溶圈半径。结果,14 h(2.5 mm)时最小,16 h(3.5 mm)和18 h(3.25 mm)时结果基本无差异。故确定提取16 h。

2.4 正交试验

以炮制温度(因素A)、炮制时间(因素B)、加酒量(药材量以100 g计,因素C)和焖润时间(因素D)为考察因素(因素与水平见表1),各炮制品的酶活力为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法(试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3)优选地龙酒制工艺。结果显示,各因素对测定结果影响顺序为A>B>D>C,最佳酒制工艺为 $A_1B_2C_2D_2$ 。以极值最小的因素C为误差项进行方差分析,结果因素A对提取工艺有极显著影响($P<0.01$),因素B有显著影响($P<0.05$)。综合考虑成本并参考《安徽省中药饮片炮制规范》(2019年版)、《四川省中药饮片炮制规范》(2015年版)、《贵州省中药饮片炮制规范》(2005年版),确定最佳酒制工艺为 $A_1B_2C_2D_2$,即每100 kg地龙,加黄酒12.5 kg拌匀,焖润30 min,70℃翻炒2 min。

表1 因素与水平

Tab.1 Factors and their levels

水平	因素A(℃)	因素B(min)	因素C(g)	因素D(min)
1	70	1	10.0	20
2	90	2	12.5	30
3	110	3	15.0	40

2.5 验证试验

取炮制药材(每100 kg地龙、加黄酒12.5 kg拌匀,焖润30 min,70℃翻炒2 min)样品粉末(过3号筛)约0.5 g,共6份,精密称定,按振荡法提取,40℃提取16 h,精密量取供试品溶液10 μL,注入纤维蛋白板孔中,37℃恒温保持18 h后,测量溶圈半径,计算酶活力。结果见表4及图1。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	酶活力(万单位/g)
1	1	1	1	1	24.40
2	1	2	2	2	31.80
3	1	3	3	3	22.80
4	2	1	2	3	14.80
5	2	2	3	1	20.60
6	2	3	1	2	15.70
7	3	1	3	2	14.20
8	3	2	1	3	19.80
9	3	3	2	1	13.40
K_1	26.33	17.80	19.97	19.47	
K_2	17.03	24.07	20.00	20.57	
K_3	15.80	17.30	19.20	19.13	
R	27.92	18.81	0.10	3.30	

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	198.96	2	99.48	161.89	< 0.01
B	85.31	2	42.65	69.41	< 0.05
C(误差)	1.23	2	0.61	1.00	
D	3.38	2	1.69	2.75	> 0.05

表4 验证试验结果($n=6$)

Tab. 4 Results of the validation test ($n=6$)

序号	样品量(g)	溶圈半径(mm)	活力(万单位/g)	RSD(%)
1	0.5174	4.8	35.0	0.57
2	0.5021	4.7	34.5	
3	0.5030	4.7	34.5	
4	0.5201	4.8	34.8	
5	0.5007	4.7	34.6	
6	0.5011	4.7	34.6	

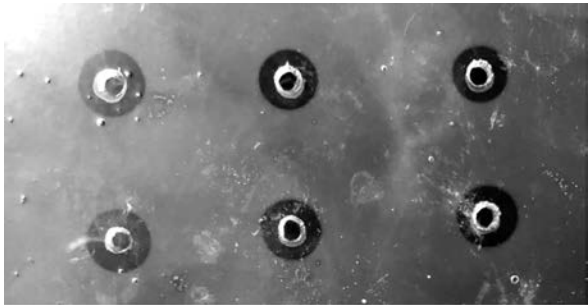


图1 验证试验结果

Fig. 1 Results of the verification test

3 讨论

地龙作为临床活血通络常用药,其质量控制多集中在性状鉴别及氨基酸鉴别方面,但对其活血通络的主要有效成分蚯蚓纤溶酶、蚓激酶等蛋白酶的报道较

少^[15]。本研究中发现,不同的工艺参数对蛋白酶活性影响较大,这可能与酶受热易变性失活有关,提示炮制过程中应注意炮制温度和翻炒时间,避免对其中的活性成分造成过度破坏,从而影响药效。另有报道显示,酒制地龙较生品地龙在止咳、平喘方面疗效有增强,与其中的次黄嘌呤受热含量增加有关^[16],提示在地龙酒制过程中,除保证蛋白酶活性外,还应考虑炮制品的具体用药方向。

总之,地龙的炮制在注意除臭矫味的同时,还需注意有效成分的保护、转化。本研究中采用水提法、正交试验法、纤维蛋白平板法,对炮制品的酶活力进行测定,可对地龙的酒制工艺进行优化,有助于保留其有效成分。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 127.

[2] 吴皓, 李飞. 中药炮制学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 38.

[3] 赵永刚, 李华, 许威廉, 等. 蚯蚓纤溶酶研究概述(英文)[J]. 中国天然药物, 2010, 8(4): 301-308.

[4] 于小钧, 张兵, 薛晴, 等. 2种地龙饮片不同提取法体外抗凝活性对比研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2955-2960.

[5] 彭洪兵, 袁仕君, 尹聪, 等. 地龙蛋白两种提取方法的活性比较[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1860-1862.

[6] 商烨, 齐丽娜, 金华, 等. 地龙化学成分及药理活性研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 989-996.

[7] 刘巧, 毕启瑞, 谭宁华. 地龙蛋白多肽类成分的研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(1): 252-261.

[8] 吴娅丽, 马榭楠, 杜守颖. 中药地龙抗血栓活性研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 3015-3018.

[9] 葛勤, 张恩娟, 刘同华, 等. 地龙的化学成分及制剂质量研究概况[J]. 中国药业, 2004, 13(3): 69-71.

[10] 木海鸥, 苏孝共. 地龙的药理研究概要[J]. 中国药业, 2007, 16(1): 61-62.

[11] 毕燕芳, 马书林. 中药地龙中溶栓成分研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(8): 60-62.

[12] 梁美美, 朴晋华, 王婷婷, 等. 基于生物活性方法对地龙药材质量评价研究[J]. 中国药品标准, 2019, 20(4): 319-324.

[13] 张东方. 参环毛蚓中抗栓活性蛋白酶的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2004.

[14] 刘洁, 李宪臻, 高培基. 纤维素酶活力测定方法评述[J]. 工业微生物, 1994, 24(4): 27-32.

[15] 何琳, 龙晓英. 广地龙配方颗粒质量标准规范化研究及地龙凝胶剂的研制[D]. 广州: 广东药科大学, 2007.

[16] 李钟, 黄艳玲, 李文珊. 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.

(收稿日期: 2022-07-27; 修回日期: 2022-10-11)