

# 广地龙提取物的制备、成分及其活性检测

杨 煊<sup>1</sup>, 马铭宇<sup>1</sup>, 杨得坡<sup>1,2\*</sup>, 史振策<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中山大学药学院; <sup>2</sup>广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广州 510006;

<sup>3</sup>海南振家农业科技发展有限公司, 海口 571126

**摘要:**本研究旨在建立一种新的广地龙提取方法, 并对其抗氧化和抗炎活性进行检测。利用无水乙醇对鲜地龙进行提取, 采用无水乙醇浸渍粗提、MCI 柱初步纯化、葡聚糖凝胶 LH-20 纯化、以及索氏提取法脱色除臭等方法, 得到地龙醇提取物 13.6 g, 产率较高, 为 63.3%。同时, 薄层色谱法检测结果显示地龙乙醇提取物含有丰富的具有荧光特性的小分子化合物, 且具有 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子清除活性, 有较高的 A375 人黑色素瘤细胞抑制活性, 对巨噬细胞没有显著的细胞毒, 但对 NO 有较强抑制活性。因此, 该制备方法分离效果佳、操作方便、得到的地龙提取物在抗氧化、抗黑色素瘤细胞以及抗炎等方面具有较强活性且质量稳定。

**关键词:**广地龙; 提取液; 抗氧化活性; 抗炎活性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020) Suppl-0152-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.S.022

## Preparation, composition and activity of *Pheretima aspergillum* extract

YANG Huan<sup>1</sup>, MA Ming-yu<sup>1</sup>, YANG De-po<sup>1,2\*</sup>, SHI Zhen-ce<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Sun Yat-Sen University;

<sup>2</sup>Modern Chinese Medicine Engineering Technology Research and Development Center, Guangzhou 510006, China;

<sup>3</sup>Hainan Zhenjia Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Haikou 571126, China

**Abstract:** The aim of this study is to establish a new extraction method from *Pheretima aspergillum*, and to investigate its antioxidant and anti-inflammatory activities. The crude was extracted from fresh *Pheretima aspergillum* by absolute ethanol, purified by MCI column and Sephadex gel LH-20, and Soxhlet extraction was used to decolorization and deodorization. The results showed that the ethanol extract of *Pheretima aspergillum* obtained in our study was 13.6 g, and the yield was 63.3%, which was the highest yield obtained. TLC results showed that the ethanol extract of *Pheretima aspergillum* was rich in small molecular compounds with fluorescent properties, and had DPPH free radical, hydroxyl free radical and superoxide anion scavenging activity. It also had higher inhibitory activity on A375 human melanoma cells, and had no significant cytotoxicity on macrophages, but had stronger inhibitory activity on nitric oxide (NO) production. The new extracting method has better separation effect, more convenient operation and higher yield, and the ethanol extract has significant antioxidant, anti-melanoma cells and anti-inflammatory activities.

**Key words:** *Pheretima aspergillum*; extract; antioxidant activity; anti-inflammatory activity

参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*) 隶属于钜蚓科 (Megascolecidae) 环毛蚓属 (*Pheretima*)<sup>[1]</sup>, 主要分布在海南、广东、广西、福建等地, 俗称“广地龙”。该药材是常用传统中药, 始载于《神农本草经》, 历代本草皆有记载, 也是 2010 版《中国药典》地龙项下

四个原动物之一<sup>[2]</sup>。地龙性寒, 味咸, 归肝、脾和膀胱经, 主治高热惊痫、气虚血滞、肢体麻木、肺热哮喘、小便不利及热痹等症。现代药理学研究表明, 地龙有降压、抗血栓、抗凝血、抗心律失常、抗癌、增强免疫、抗溃疡、解热镇痛、镇静、平喘、抗菌等作用<sup>[1-4]</sup>。其中广地龙因其品质疗效俱佳而成为目前国内外药材市场上的主流产品。

目前, 地龙的临床应用主要以地龙水提取物、地龙粉末以及地龙蛋白粗提取物等为主<sup>[5-7]</sup>, 而地龙小

收稿日期: 2019-10-10 接受日期: 2020-04-01

基金项目: 广东省科技厅计划 (2011B010700098); 中山大学项目 (36000-71010217)

\* 通信作者 Tel: 86-20-39943004; E-mail: lssydp@mail.sysu.edu.cn

分子活性物质的提取方法较少涉及。1983年, Mi-hara 等<sup>[7]</sup>应用现代分离手段从蚯蚓蛋白粗提物中分离到多组具有纤溶酶活性的蛋白质, 并首次命名为“蚓激酶(lumbrokinase)”。地龙水提物的传统提取方法多样: 可参考《中国药典》中的制备方法<sup>[2]</sup>; 或取地龙适量, 加入一定量的 Tris-HCl 缓冲液, 冰浴匀浆, 离心, 取上清液即可<sup>[6]</sup>; 或将广地龙加 20 倍量水浸泡 12 h, 煎煮 2 次, 减压浓缩, 浓缩液加石油醚萃取 3 次, 水相经离心(4 000 rpm) 20 min 后浓缩至浸膏, 浸膏加 95% 乙醇加热回流提取, 滤过, 回收乙醇得醇溶部分<sup>[5]</sup>。上述传统提取方法存在以下问题: 提取过程中地龙长时间在水中浸泡而容易滋生细菌; 容易产生次级代谢产物; 有效成分低等。因此, 本研究对多种地龙提取方法进行了改进和比较, 最终得到一种分离效果佳、工艺简单、操作方便且产率高的提取方法。同时, 对地龙提取物在抗氧化、抗黑色素瘤细胞以及抗炎等方面的作用, 进行了深入探讨, 以期地为地龙提取物在医学美容等领域的应用奠定坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜地龙取自海南省海口市, 经中山大学药学院杨得坡教授鉴定为钜蚓科环毛蚓属参环毛蚓(*Pheretima aspergillum*), 也就是俗称的广地龙。

### 1.2 主要试剂与仪器

试剂: 无水乙醇、95% 乙醇、90% 乙醇、70% 乙醇、50% 的甲醇、正己烷、茚三酮试液、DPPH 无水乙醇溶液、FeSO<sub>4</sub> 溶液、水杨酸乙醇溶液、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2, 0.05 M)、焦性没食子酸溶液(25 mM)、HCl 溶液(8 mM)、A375 人黑色素瘤细胞、10% 胎牛血清、PBS 缓冲液、DMEM 培养基、MIT 溶液、小鼠 RAW264.7 巨噬细胞、LPS 溶液。

仪器: 离心机(Thermo, 美国); MIC 柱; 交联葡聚糖凝胶 LH-20(Thermo, 美国); 培养箱; 分光光度计(上海, 谱元, Alpha-1900)。

### 1.3 地龙提取物的不同制备方法的比较

#### 1.3.1 传统水提取法制备地龙提取物

取干净鲜地龙 1 000 g, 于-20℃中冻干后在液氮环境中快速研磨, 加水 3 000 g, 加热煮沸、冷却、离心取上清(参考《中国药典》中地龙水提物的制备方法), 并将一部分水提取物经超滤膜超滤( $M_w < 100$  kDa、10 ~ 100 kDa、 $\leq 10$  kDa), 制得 3 种超滤

液。将剩余的上清液及 3 种超滤液冷冻干燥, 得到地龙水提取物, 分别为对照品 1、2、3、4。

#### 1.3.2 无水乙醇提取法制备地龙提取物

取干净鲜地龙 1 000 g, 于-20℃中冻干后在液氮环境中快速研磨, 加 3 000 g 无水乙醇室温浸渍提取 24 h, 随后超声(40 kHz)处理 3 h, 过滤, 取滤液, 重复 3 次。将 3 次的滤液合并, 减压浓缩, 干燥。将得到的地龙粗提物溶于水, 然后载于 MCI 柱, 以体积浓度 90% 的甲醇水溶液洗脱, 收集洗脱液; 将洗脱液浓缩, 载于交联葡聚糖凝胶 LH-20, 以体积浓度 90% 的甲醇水溶液洗脱, 收集洗脱液, 浓缩, 干燥, 得到固体地龙提取物; 索氏提取法(药典方法)进一步脱色除臭, 加入其质量 2 倍的正己烷, 回流 2 h, 干燥样品, 得到地龙醇提取物。

#### 1.3.3 80% 乙醇提取法制备地龙提取物的对照品

具体步骤同上, 不同处在于: 加入 3 000 g 80% 乙醇室温浸渍, 之后, 分别以浓度 70%、90% 和 50% 的甲醇水溶液洗脱, 分别制得地龙提取物对照品 5、6 和 7。

### 1.4 地龙提取物薄层色谱法检测

取地龙的无水乙醇提取物和地龙水提取物(对照品 1、2、3、4)各 1 g, 分别溶于 10 g 水中, 另外配制 1 mg/mL 的赖氨酸对照品、1 mg/mL 的亮氨酸对照品和 0.5 mg/mL 的缬氨酸对照品。按照薄层色谱法(通则 0502)试验, 以正丁醇-冰醋酸-水(4:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以茚三酮试液, 在 105℃加热至斑点显色清晰。

### 1.5 地龙提取物体外抗氧化活性实验

取地龙无水乙醇提取物和地龙水提取物对照品 1、2、3、4, 用 PBS 缓冲液(经微孔滤膜过滤, 下同)配制浓度为 5、10、15 mg/mL 的溶液。取地龙醇提取物对照品 5、6、7, 用 PBS 缓冲液配制浓度为 15 mg/mL 的溶液, 进行体外抗氧化活性实验。

DPPH 自由基清除率活性: 参考 He 等<sup>[8]</sup>的方法。

羟基自由基清除活性: 参照 Xu 等<sup>[9]</sup>的方法。

超氧阴离子清除活性: 参照 Lin 等<sup>[10]</sup>的方法。

### 1.6 地龙提取物对抑制黑色素瘤的实验

取地龙无水乙醇提取物和地龙水提取物对照品 1、2、3、4, 用 PBS 缓冲液配制浓度为 25、50、100 μg/mL 的溶液。取对照品 5、6、7, 用 PBS 缓冲液配制浓度为 25 μg/mL 的溶液。

细胞培养: A375 人黑色素瘤细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养, 并按照常规程序传代维持。

细胞给药: 将 A375 人黑色素瘤细胞按  $5 \times 10^4$  / 孔的密度接种于 96 孔板中, 用含有不同样品的培养基(每孔 100 μL) 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 48 h, 用不含样品的培养基培养的细胞作为空白对照。

细胞活力测定: 向 A375 人黑色素瘤细胞中加入 MTT 溶液, 于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 4 h 后弃掉培养液, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 室温振摇 20 min, 于 570 nm 下测定吸光值。

$$\text{细胞存活率} = \text{OD}_{\text{样品}} / \text{OD}_{\text{空白}} \times 100\%$$

### 1.7 地龙提取物的抗炎实验

取地龙无水乙醇提取物和地龙水提取物对照品 1、2、3、4, 用 PBS 缓冲液配制浓度为 25、50、100 μg/mL 的溶液。取对照品 5、6、7, 用 PBS 缓冲液配制浓度为 100 μg/mL 的溶液。

小鼠 Raw264.7 巨噬细胞的培养和给药参照“1.6”中的 A375 人黑色素瘤细胞, 利用试剂盒测定 NO 含量。

$$\text{NO 抑制率} = (\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{空白}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 地龙提取物的不同制备方法的比较

在使用无水乙醇提取法制备地龙提取物时, 利用浓度为 90% 的甲醇溶液进行洗脱, 因其具有较强洗脱能力, 可将大部分成分洗脱, 但不能洗脱吸附在 MCI 柱子上的低级性脂肪酸类及色素。在使用 80% 乙醇提取法制备地龙提取物时, 分别比较了不同洗脱浓度(70%、90%、50% 的甲醇溶液) 对提取效率的影响。

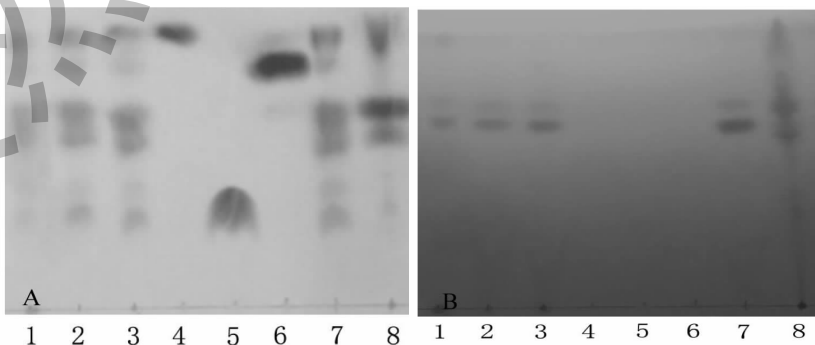


图2 薄层色谱法检测结果

Fig. 2 The result of thin layer chromatography

注: A 和 B 中样品顺序相同。1~8 依次为地龙水提取物(对照品 1)、地龙水提取物(对照品 2)、地龙水提取物(对照品 3)、亮氨酸对照品、赖氨酸对照品、缬氨酸对照品、地龙水提取物(对照品 4)、地龙乙醇提取物。Note: The order of samples in A and B is the same. 1-8 are water extract (control 1), water extract (control 2), water extract (control 3), leucine, lysine, valine, water extract (control 4), ethanol extract, respectively.

的地龙提取物的产率不同。利用无水乙醇对地龙进行提取, 得到地龙粗提取物 21.5 g, 得到地龙醇提取物 13.6 g, 产率为 63.3%, 产率最高; 利用 80% 乙醇对地龙进行提取, 得到对照品 5 的地龙粗提取物为 20.8 g, 地龙醇提取物为 11.2 g, 产率为 53.8%; 对照品 6 的地龙粗提取物为 20.3 g, 地龙醇提取物为 12.2 g, 产率为 60.1%; 对照品 7 的地龙粗提取物为 17.6 g, 地龙醇提取物为 9.3 g, 产率为 52.8%。

此外, 本研究采用 MCI 柱初步纯化, 可以较好地去除色素等基质的影响, 再经甲醇洗脱浓缩后, 利用交联葡聚糖凝胶 LH-20 进行富集纯化, 通过凝胶过滤作用保留纯化小分子物质。之后, 利用索氏提取法进行脱色除臭, 因索氏提取过程中需要回流加热, 可使蛋白质变性, 从而有效脱色除臭。对索氏提取法脱色处理前后的地龙提取物颜色进行比对(图 1), 结果显示: 地龙醇提取物溶于水呈微黄色, 且无腥臭味。

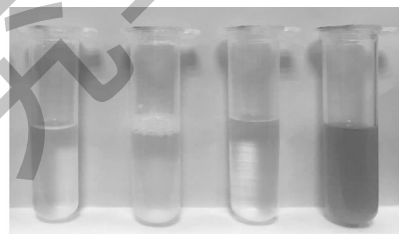


图1 索氏提取法脱色处理前后的地龙提取物的颜色对比

Fig. 1 Color comparison of earthworm extract before and after decolorization by Soxhlet extraction

注: 从左到右分别为: 回流时间 1、2、3 h、回流前地龙提取物水溶液。Note: From left to right, the reflux time was 1, 2, 3 h and the extract before reflux.

### 2.2 地龙提取物薄层色谱法检测

结果如图 2A 所示, 表明地龙提取物中含有亮

氨酸、赖氨酸、缬氨酸以及其他氨基酸,在紫外灯 254 nm 波长条件下的结果如图 2B 所示,结果显示地龙乙醇提取物含有丰富的具有荧光特性的化合物,表明地龙提取物中还含有许多其他小分子物质。

### 2.3 地龙提取物体外抗氧化活性实验

乙醇提取物和对照品 1、2、3、4 的体外抗氧化活性实验结果如图 3~5 所示。地龙提取物及对照品 1、2、3、4 均具有 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子清除活性。不同样品浓度(5、10、15mg/mL)的抗氧化

活性呈显著性差异,且随样品溶液浓度升高而增强;其中,相比对照品 1,地龙乙醇提取物和对照品 4 的 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子清除活性显著增加,说明地龙乙醇提取物中小分子活性物质较多。当样品浓度为 15 mg/mL 时,地龙乙醇提取物的 DPPH 自由基清除率、羟基自由基和超氧阴离子清除活性分别为 61.4%、40.8% 和 25.6%,明显高于对照品 1(DPPH 自由基清除率、羟基自由基和超氧阴离子清除活性分别为 21.3%、18.1% 和 7.8%)。

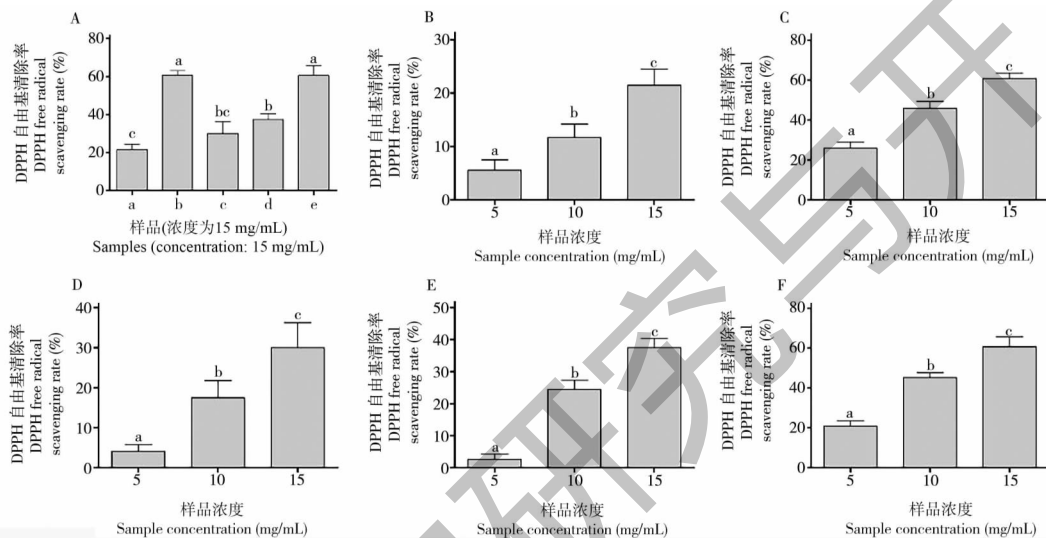


图 3 DPPH 自由基清除率活性检测结果

Fig. 3 The result of DPPH free radical scavenging activity

注: A: 浓度均为 15 mg/mL 的不同样品(a: 对照品 1; b: 乙醇提取物; c: 对照品 2; d: 对照品 3; e: 对照品 4); B: 对照品 1; C: 乙醇提取物; D: 对照品 2; E: 对照品 3; F: 对照品 4; 图 4 同。Note: A: Samples of 15 mg/mL (a: Control 1; b: Ethanol extract; c: Control 2; d: Control 3; e: Control 4); B: Control 1; C: Ethanol extract; D: Control 2; E: Control 3; F: Control 4, Fig. 4 is the same.

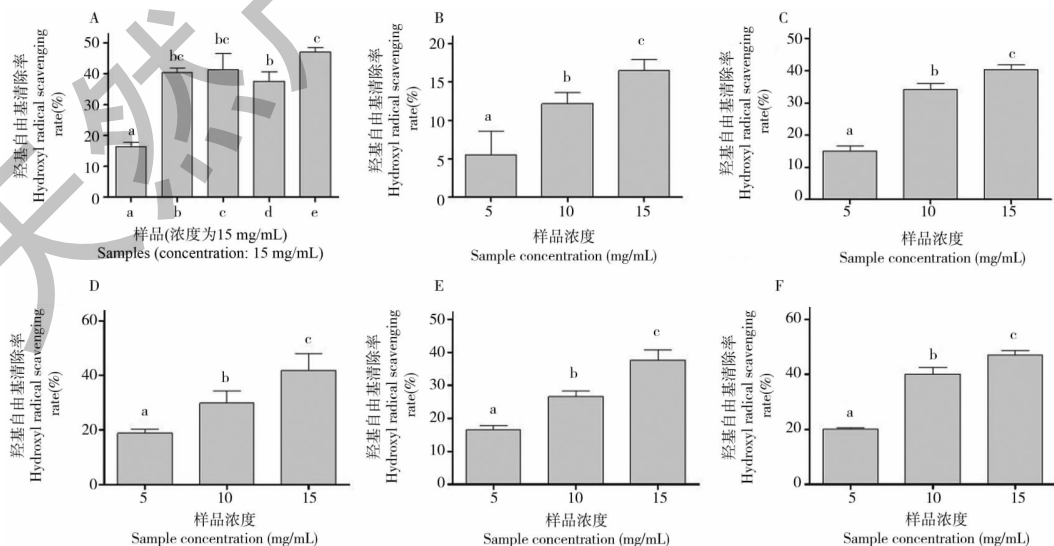


图 4 羟基自由基清除率活性检测结果

Fig. 4 The result of hydroxyl radical scavenging rate

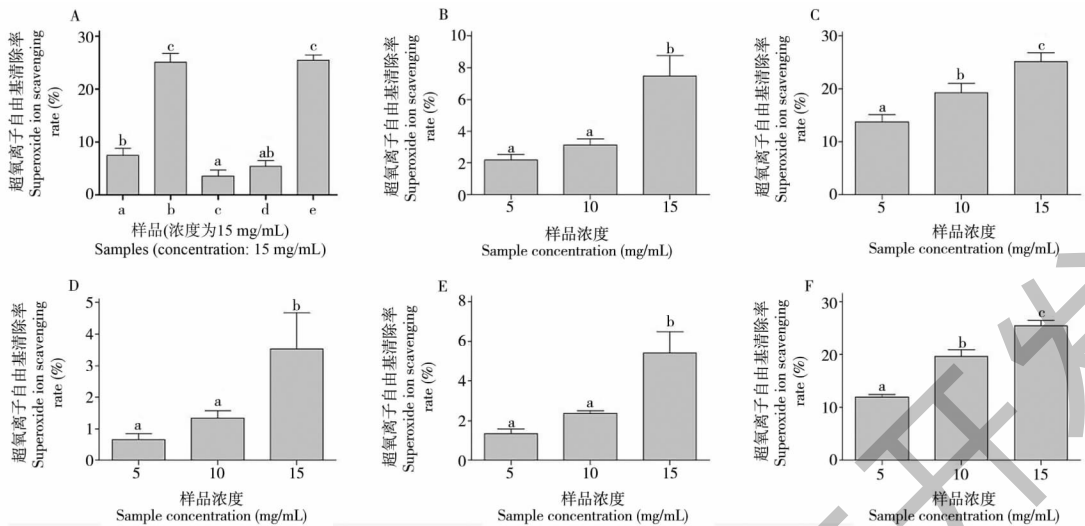


图5 超氧离子清除率活性检测结果

Fig. 5 The result of superoxide ion clearance activity

注:A:浓度均为15 mg/mL的不同样品(a:药典法水提取物;b:乙醇提取物;c:<100 kDa;d:10~100 kDa;e:>100 kDa);B:对照品1;C:乙醇提取物;D:对照品2;E:对照品3;F:对照品4。Note:A:Samples of 15 mg/mL (a:Water extract;b:Ethanol extract;c:<100 kDa;d:10~100 kDa;e:>100 kDa);B:Water extract;C:Ethanol extract;D:<100 kDa;E:10~100 kDa;F:>100 kDa.

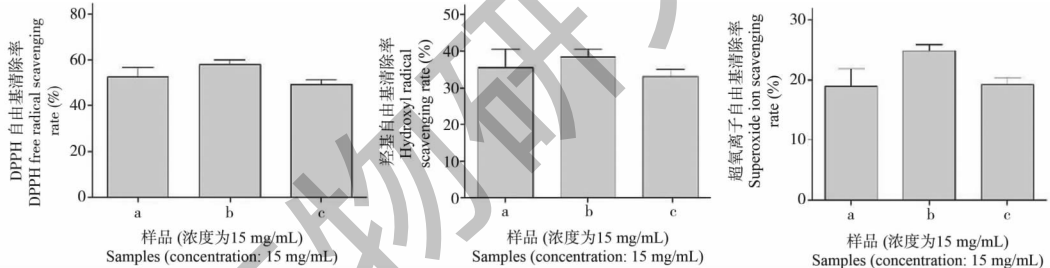


图6 不同醇提取物的抗氧化活性能力测定

Fig. 6 Determination of antioxidant ability of different ethanol extract

注:浓度均为15 mg/mL的不同样品(a:对照品5;b:对照品6;c:对照品7)。Note:Samples of 15 mg/mL (a:Control 5;b:Control 6;c:Control 7).

对照品5、6、7的体外抗氧化活性实验结果如图6所示,表明在选择浓度不同的浸渍液和洗脱液时,得到的地龙提取物成分有差异,但差异并不显著。在浓度均为15 mg/mL时,利用浓度70%、90%和50%的甲醇溶液分别洗脱后得到的地龙醇提取物的DPPH自由基清除率分别是55.3%、59.0%和48.6%,羟基自由基清除率分别是35.1%、38.7%和33.8%,超氧阴离子清除活性分别为18.7%、24.5%和19.1%。

## 2.4 地龙提取物对抑制黑色素瘤的实验

乙醇提取物和对照品1、2、3、4的抗黑色素瘤细胞实验结果如图7所示,五种提取物均能够抑制A375人黑色素瘤细胞增长;其中,乙醇提取物和对照品4的活性与阳性对照 $\beta$ 熊果酸活性没有显著差

异,均有较高的A375人黑色素瘤细胞抑制活性。当样品浓度为100  $\mu$ g/mL时,地龙乙醇提取物对A375人黑色素瘤细胞的存活率为72.3%。随着样品浓度降低,其抑制率未呈现显著相关性。

对照品5、6、7的抗黑色素瘤细胞实验结果如图8所示,表明在选择浓度不同的浸渍液和洗脱液时,得到的地龙提取物成分有差异,导致其对A375人黑色素瘤细胞抑制活性也是不同的,但差异并不显著。在样品浓度均为25  $\mu$ g/mL时,利用浓度70%、90%和50%的甲醇溶液分别洗脱后得到的地龙醇提取物对A375人黑色素瘤细胞的存活率分别是82.8%、73.6%和86.4%。

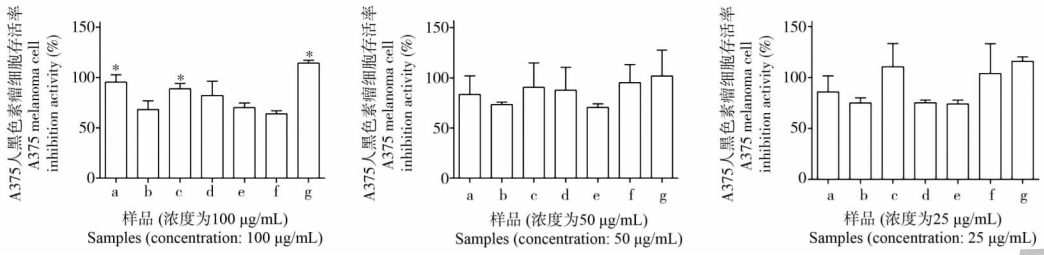


图7 黑色素瘤细胞抑制活性检测结果

Fig. 7 The result of melanoma cell inhibition activity test

注: a: 对照品 1; b: 乙醇提取物; c: 对照品 2; d: 对照品 3; e: 对照品 4; f:  $\beta$ -熊果酸; g: Vc. Note: a: Control 1; b: Ethanol extract; c: Control 2; d: Control 3; e: Control 4; f:  $\beta$ -Ursolic acid; g: Vc.

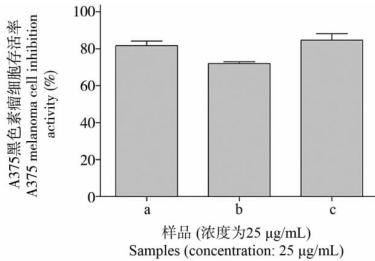


图8 黑色素瘤细胞抑制活性检测结果

Fig. 8 The result of melanoma cell inhibition activity test

注: 浓度均为 25 µg/mL 的不同样品 (a: 对照品 5; b: 对照品 6; c: 对照品 7)。Note: Samples of 15 mg/mL (a: Control 5; b: Control 6; c: Control 7).

中, 乙醇提取物和对照品 4 的 NO 抑制活性比阳性对照  $\beta$ -熊果酸活性略高, 对照品 3 和  $\beta$ -熊果酸的 NO 抑制活性相当。

对照品 5、6、7 的抗炎活性实验结果如图 11 和

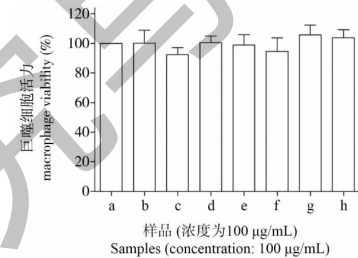


图9 样品对巨噬细胞活力影响

Fig. 9 Effect on macrophage viability

注: a: 空白对照; b: 对照品 1; c: 乙醇提取物; d: 对照品 2; e: 对照品 3; f: 对照品 4; g:  $\beta$ -熊果酸; h: Vc. Note: a: Blank Control; b: Control 1; c: Ethanol extract; d: Control 2; e: Control 3; f: Control 4; g:  $\beta$ -Ursolic acid; h: Vc.

## 2.5 地龙提取物的抗炎活性实验

乙醇提取物和对照品 1、2、3、4 的抗炎活性实验结果如图 9 和 10 所示, 五种提取物对巨噬细胞没有显著的细胞毒, 五种提取物均具有 NO 抑制活性, 其

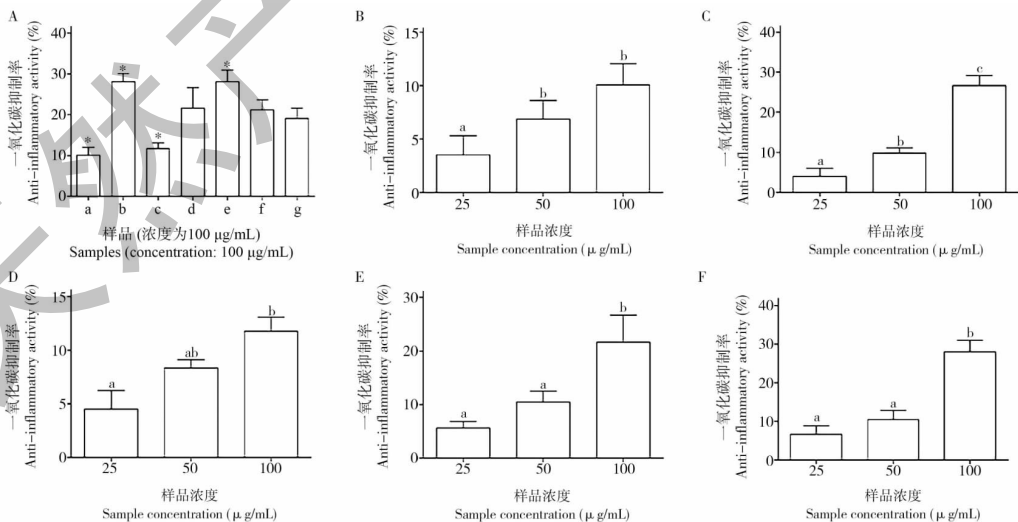


图10 抗炎活性检测结果

Fig. 10 The result of anti-inflammatory activity test

A: a ~ g 同图 7; B: 对照品 1; C: 乙醇提取物; D: 对照品 2; E: 对照品 3; F: 对照品 4. Note: A: a-g are the same as Fig. 7; B: Control 1; C: Ethanol extract; D: Control 2; E: Control 3; F: Control 4.

12 所示,三种提取物对巨噬细胞没有显著的细胞毒,但其对 NO 抑制活性有差异,表明在选择浓度不同的浸渍液和洗脱液时,得到的地龙提取物成分是有差异的。

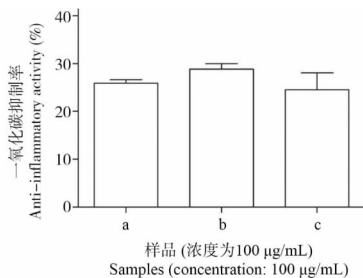


图 11 抗炎活性检测结果

Fig. 11 The result of anti-inflammatory activity test

注:浓度均为 100 µg/mL 的不同样品(a:对照品 5;b:对照品 6;c:对照品 7)。Note:Samples of 100 µg/mL (a:Control 5;b:Control 6;c:Control 7)。

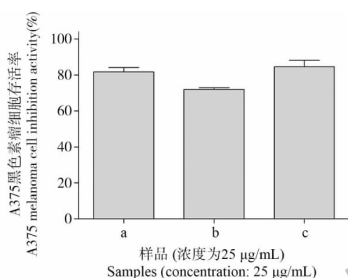


图 12 抗炎活性检测结果

Fig. 12 The result of anti-inflammatory activity test

注:浓度均为 25 µg/mL 的不同样品(a:对照品 5;b:对照品 6;c:对照品 7)。Note:Samples of 25 µg/mL (a:Control 5;b:Control 6;c:Control 7)。

### 3 结论

本研究提出了一种新的地龙提取物的制备方法,该制备方法包括使用无水乙醇浸渍粗提、MCI 柱初步纯化、葡聚糖凝胶 LH-20 纯化、索氏提取法脱色除臭等步骤;同时,比较了不同提取溶剂(水、乙醇、80%乙醇),不同超滤膜大小( $M_w < 100$  kDa、 $10 \sim 100$  kDa、 $\leq 10$  kDa),不同洗脱浓度(70%、90%、50%的甲醇溶液)对提取效率的影响,最终选择无水乙醇为提取溶剂,体积浓度 90% 的甲醇为洗脱液,作为最佳提取条件,得到的地龙醇提物产量最高。同时,TCL 检测结果显示其含有丰富的具有荧光特性的小分子化合物,可用于医学美容等领域。

通过建立的该方法分别考察了地龙醇提取物和水提取物对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子的清除活性,结果显示其活性随着浓度升高而增

强。同时,比较了在不同浓度的浸渍液和洗脱液条件下,得到的地龙提取物的抗氧化活性、对 A375 人黑色素瘤细胞抑制活性,以及对 NO 抑制活性,结果显示其活性有差异,但差异并不显著<sup>[11,12]</sup>。

国外对地龙提取物的研究,主要集中在地龙粉末或其水提取物方面。常规的提取方法为:将蚯蚓保存在 0.65% NaCl 溶液 1~2 h,之后放入三氯甲烷,4 °C 过夜,加入无菌水进行匀浆离心后,去上清,得乳白色液体经冷冻干燥后成地龙粉末<sup>[11,12]</sup>。同时,有研究者对其抗氧化活性、保肝性、抗菌性等方面进行了研究<sup>[11-16]</sup>。但未涉及对地龙小分子活性物质的研究,尤其对其在抗氧化活性、抗黑色素瘤细胞以及抗炎方面的作用很少涉及。本研究所提出的新的地龙提取物的制备方法,与传统水提法相比,避免了长时间在水中浸泡而容易滋生细菌,产生次级代谢产物的问题。更重要的是该制备方法提取的有效成分更多;分离效果佳,工艺简单,操作方便;得到的地龙提取物溶于水呈微黄色且无腥臭味,在抗氧化、抗黑色素瘤细胞以及抗炎等方面具有较强活性且质量稳定。

### 参考文献

- 1 Li W, Shen K, Yang JY, et al. A preliminary study on the enrichment of heavy metals in *Pheretima aspergillum* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2007, 30: 519-521.
- 2 National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 113.
- 3 Gong L. Study of effects of MTs on regulating heavy metal enrichment mechanism and its antiasthma [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2015.
- 4 Wu WR, Li W. Comparative identification of medicinal animal lumbricus [J]. Prog Mod Biom (现代生物医学进展), 2007, 7: 1754-1757.
- 5 He H, Che QM, Sun QS. Anticoagulant effects of *Pheretima* extracts [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38: 733-735.
- 6 Duan XJ, Luo SL, Wang WQ, et al. Stability of protein in earthworm extract [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2017, 34(2): 31-33.
- 7 Mihara H, Sumi H, Akazawa T, et al. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm [J]. Thromb Haemostas, 1983, 50: 258-263.