

广地龙饮片的 HPLC 特征图谱及 5 个核苷类成分的测定^{*}

孙洁^{1,2}, 田芳^{1,2}, 毛润乾³, 吴孟华^{1,2}, 张英^{1,2}, 曹晖^{1,2}, 马志国^{1,2**}

(1. 暨南大学药学院, 广州 510632; 2. 暨南大学岭南传统中药研究中心, 广州 510632;

3. 广东省生物资源应用研究所, 广州 510260)

摘要 目的: 建立广地龙饮片及其 2 种常见伪品的 HPLC 特征图谱并测定其中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷、肌苷的含量, 为广地龙饮片的真伪鉴别和质量控制提供参考。**方法:** 采用 Thermo TSK-GEL C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇 (99:1) 为流动相, 等度洗脱 40 min, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”建立指纹图谱并进行相似度评价, 并对尿嘧啶, 次黄嘌呤, 黄嘌呤, 腺苷和肌苷的含量测定进行方法学考察。**结果:** 建立了广地龙饮片及其伪品的特征图谱, 正品 (参环毛蚓) 中标定了 7 个共有峰, 伪品大腔蚓和暗孔远盲蚓中均标定了 8 个共有峰。对不同来源的广地龙饮片及其伪品中 5 个核苷成分进行含量测定。尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷、肌苷线性范围分别为 3.40~170、4.40~220、5.00~250、3.40~170、4.20~210 μg · mL⁻¹, 线性关系良好 ($r \geq 0.9999$); 重复性和稳定性的 RSD 均 < 3.0%, 平均加样回收率在 95.5%~107.0% 之间。18 批广地龙饮片中均未检测到腺苷, 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷含量分别为 0.021~0.408、0.309~6.133、0.825~4.714 和 1.413~23.382 mg · g⁻¹。**结论:** 所建立特征图谱专属性强, 结合 5 个主要成分含量测定, 能够为广地龙饮片的真伪鉴别和质量控制提供科学依据。

关键词: 广地龙饮片; 特征图谱; 尿嘧啶; 次黄嘌呤; 黄嘌呤; 腺苷; 肌苷; 含量测定

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2019) 11-2010-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.12

Study on characteristic chromatogram and quantitation method of five nucleoside components of Guang Dilong decoction pieces^{*}

SUN Jie^{1,2}, TIAN Fang^{1,2}, MAO Run-qian³, WU Meng-hua^{1,2},
ZHANG Ying^{1,2}, CAO Hui^{1,2}, MA Zhi-guo^{1,2**}

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Research Center for TCM of Lingnan (Southern China), Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Guangdong Province Institutes of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC characteristic chromatogram and to determine the contents of uracil,

* 国家发展和改革委员会、国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-Y-GD-13); 广东省科学院技术转移专项中山市产业扶持发展专项 (2016G1FC0011)

** 通信作者 Tel: (020) 85223784; E-mail: mzg79@hotmail.com
第一作者 Tel: 13250718572; E-mail: 1491295760@qq.com



hypoxanthine, xanthine, adenosine and inosine in Guang Dilong decoction pieces simultaneously, and provide the reference for authentication and quality control of Guang Dilong decoction pieces. **Methods:** HPLC analysis was performed on Thermo TSK-GEL C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-methanol (99 : 1) with isocratic elution for 40 minutes. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 30 °C and the injection volume was 10 μL. Similarity evaluation was performed by Similarity Evaluation System for Fingerprint of Traditional Chinese Medicine. Assay method for uracil, hypoxanthine, xanthine, adenosine and inosine was validated. **Results:** HPLC characteristic chromatogram of Guang Dilong decoction pieces and its adulterants from different sources were established and five characteristic peaks were marked. Seven characteristic peaks were simultaneously determined in *Pheretima aspergillum*, and 8 characteristic peaks were simultaneously determined in *Metaphire magna* and *Amyntas obscuritoporus*. The linear relationships for uracil, hypoxanthine, xanthine, adenosine and inosine were observed in the ranges of 3.40–170 μg · mL⁻¹, 4.40–220 μg · mL⁻¹, 5.00–250 μg · mL⁻¹, 3.40–170 μg · mL⁻¹ and 4.20–210 μg · mL⁻¹, respectively, with $r \geq 0.9999$. The RSDs of repeatability and stability tests were <3.0% and the average recoveries varied from 95.5%–107.0%. Adenosine in 18 batches of Guang Dilong decoction pieces was not detected. The contents of uracil, hypoxanthine, xanthine, adenosine and inosine were 0.021–0.408 mg · g⁻¹, 0.309–6.133 mg · g⁻¹, 0.825–4.714 mg · g⁻¹ and 1.413–23.382 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The characteristic chromatogram and the assay method of five nucleoside components in Guang Dilong decoction pieces and its adulterants can provide scientific basis for the authentication and quality control of Guang Dilong decoction pieces and its adulterants.

Keywords: Guang Dilong decoction pieces; characteristic chromatogram; uracil; hypoxanthine; xanthine; adenosine; inosine; content determination

地龙是常用动物类药材,来源于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]。地龙具有清热定惊、通络、平喘、利尿的功效,用于高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肢体麻木、半身不遂、肺热喘咳、水肿尿少^[1-2],主要含有蛋白质和多肽、酶类、氨基酸、核苷酸、微量元素等成分^[3-8]。

广地龙因个大,质佳,是地龙药材市场的主流品种,而我国蚯蚓品种多,形态相似,因此广地龙药材品种来源复杂,真伪鉴别难度大,在其真伪鉴别方面现多采用DNA分子鉴定技术,鉴定结果准确可靠^[9-11]。研究表明,市售广地龙药材中大腔蚓 (*Metaphire magna*) 和暗孔远盲蚓 (*Amyntas obscuritoporus*) 为广地龙药材最常见的2种伪品^[12],而广地龙饮片及其伪品中所含核苷类成分的特征图谱及含量差异研究未见报道。本文收集不同地区的广地龙

饮片,建立核苷类成分HPLC特征图谱并比较不同品种特征图谱的差异,以尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷为指标成分,建立了同时测定5个指标成分的高效液相色谱法,并比较了5个核苷类成分在广地龙(参环毛蚓)及其伪品中的含量差异,为广地龙饮片的真伪鉴别和质量监控提供实验依据。

1 仪器、试药及样品

1.1 仪器

东胜龙 ETC811 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司); Julabo TW20 恒温水浴箱(德国 Julabo 公司); 76S/06983 凝胶成像仪(BioRad 中国公司); KQ5200DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); AX223ZH 分析天平(美国奥豪斯公司); DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂); H1650W 小型台式离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); DS-11 超微量紫外/可见分光光度计(美国丹诺尔公司); SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); Thermo Ultimate 3000 液相色谱仪(赛默飞公

司),包括 DAD 检测器、四元低压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱。

1.2 试剂

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、100 bp DNA Buffer、DNA Loading Buffer,宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;动物基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 DNA Marker,北京擎科新业生物技术有限公司;GelRed[™],美国 Biotium 公司;尿嘧啶(批号 N-024-121228)、次黄嘌呤(批号 C-069-160412)、黄嘌呤(批号 N-024-121228)、腺苷(批号 N-024-121228)、肌苷(批号 N-024-121228)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均达到 98% 以上;流动相所用甲醇、甲酸为色谱纯,实验用水为纯净水(华润怡宝食品饮料有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 样品

广地龙饮片于 2018 年 4~7 月份购自广东、广西、浙江、河南、北京、山西、陕西、江西、湖北等地药店,共收集 41 批,采用聚合酶链式反应法^[9-11],利用 16S rRNA 基因序列^[13]对各批地龙饮片进行分子鉴定,经暨南大学药学院马志国副教授鉴定,分别为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E.Perrier)、大腔蚓 *Metaphire magna* (Chen) 和暗孔远盲蚓 *Amyntas obscuritoporus* (Chen) 的干燥体^[12],具体鉴定结果见表 1。

2 溶液的制备

2.1 混合对照品溶液

精密称取尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤的对照品适量,分别置 10 mL 量瓶中,用 0.1% 氨水溶解并稀释至刻度,混匀,配制成质量浓度分别为 170、220、250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤 3 种单一成分对照品储备液;精密称取腺苷、肌苷的对照品适量,分别置 10 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,配制成质量浓度分别为 170、210 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得腺苷、肌苷 2 种单一成分对照品储备液。依次取上述 5 个成分的对照品储备液各 1 mL,置同一个 10 mL 量瓶中,加水配制成上述 5 个成分质量浓度分别为 17、22、25、17、21 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液

称取广地龙饮片粉末(过 24 目筛)1.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入生理盐水

20 mL,称量,室温浸泡 20 min,超声提取(250 W, 40 kHz)40 min,放冷,用生理盐水补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

3 色谱条件

采用 TDSOH 公司 TSK-GEL C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(99:1)为流动相,等度洗脱 40 min,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL 。

4 特征图谱

4.1 方法学考察

4.1.1 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液(31 号样品)10 μL ,按上述色谱条件连续进样测定 6 次,记录色谱图。以次黄嘌呤峰(峰 4)为参照峰,计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间的 RSD < 1%,相对峰面积的 RSD < 3%,相似度均在 0.998 以上,表明仪器精密度良好。

4.1.2 稳定性考察 精密吸取同一份供试品溶液(31 号样品)10 μL ,分别于 0、1、2、4、6 h 按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以次黄嘌呤峰(峰 4)为参照峰,计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间的 RSD < 1%,相对峰面积的 RSD < 5%,相似度均在 0.997 以上,表明供试品溶液于 6 h 内测定结果稳定。

4.1.3 重复性试验 称取 31 号样品粉末 1.0 g 共 6 份,精密称定,按“2.2”项下方法分别制备供试品溶液;精密吸取供试品溶液 10 μL ,分别进样测定,记录色谱图。以次黄嘌呤峰(峰 4)为参照峰,计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间的 RSD < 1%,相对峰面积的 RSD < 3%,相似度均在 0.999 以上,表明本方法重复性良好。

4.2 广地龙特征图谱的建立

取不同批次的广地龙及其伪品饮片粉末,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL ,分别进样测定,记录 40 min 的 HPLC 色谱图(见图 1)。根据结果,将 18 批参环毛蚓、12 批大腔蚓、11 批暗孔远盲蚓的图谱分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版)》,生成广地龙及 2 种伪品饮片的特征图谱(见图 2)。

表 1 广地龙饮片样品来源

Tab. 1 Source of Guang Dilong decoction pieces

序号 (No.)	购买地 (place of purchase)	品种鉴定结果 (variety identification results)
1	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
2	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
3	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
4	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
5	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
6	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
7	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
8	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
9	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
10	河南洛阳 (Luoyang, Henan)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
11	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
12	北京 (Beijing)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
13	北京 (Beijing)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
14	浙江杭州 (Hangzhou, Zhejiang)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
15	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
16	广西北海 (Beihai, Guangxi)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
17	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
18	湖北荆门 (Jingmen, Hubei)	参环毛蚓 (<i>Pheretima aspergillum</i>)
19	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
20	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
21	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
22	江苏常州 (Changzhou, Jiangsu)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
23	北京 (Beijing)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
24	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
25	山西太原 (Taiyuan, Shanxi)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
26	浙江杭州 (Hangzhou, Zhejiang)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
27	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
28	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
29	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
30	江西南昌 (Nanchang, Jiangxi)	大腔蚓 (<i>Metaphire magna</i>)
31	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
32	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
33	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
34	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
35	河南洛阳 (Luoyang, Henan)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
36	河南商丘 (Shangqiu, Henan)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
37	北京 (Beijing)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
38	辽宁沈阳 (Shenyang, Liaoning)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
39	山西太原 (Taiyuan, Shanxi)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
40	山西太原 (Taiyuan, Shanxi)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)
41	广西北海 (Beihai, Guangxi)	暗孔远盲蚓 (<i>Amyntas obscuritoporus</i>)

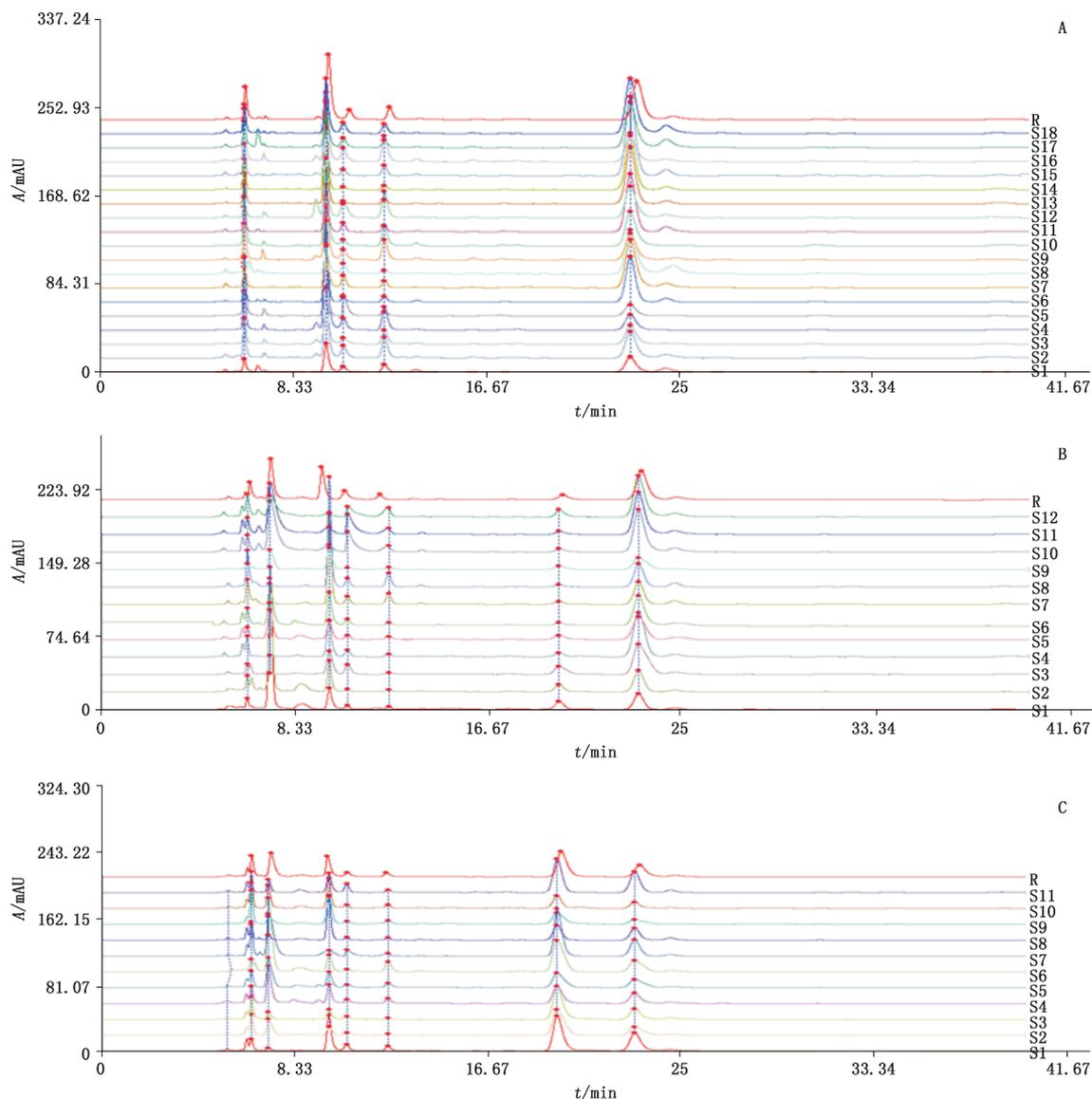


图 1 18 批参环毛蚓 (A)、12 批大腔蚓 (B)、11 批暗孔远盲蚓 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of 18 batches of *Pheretima aspergillum* (A), 12 batches of *Metaphire magna* (B) and 11 batches of *Amyntas obscuritoporus* (C)

4.3 特征图谱结果分析

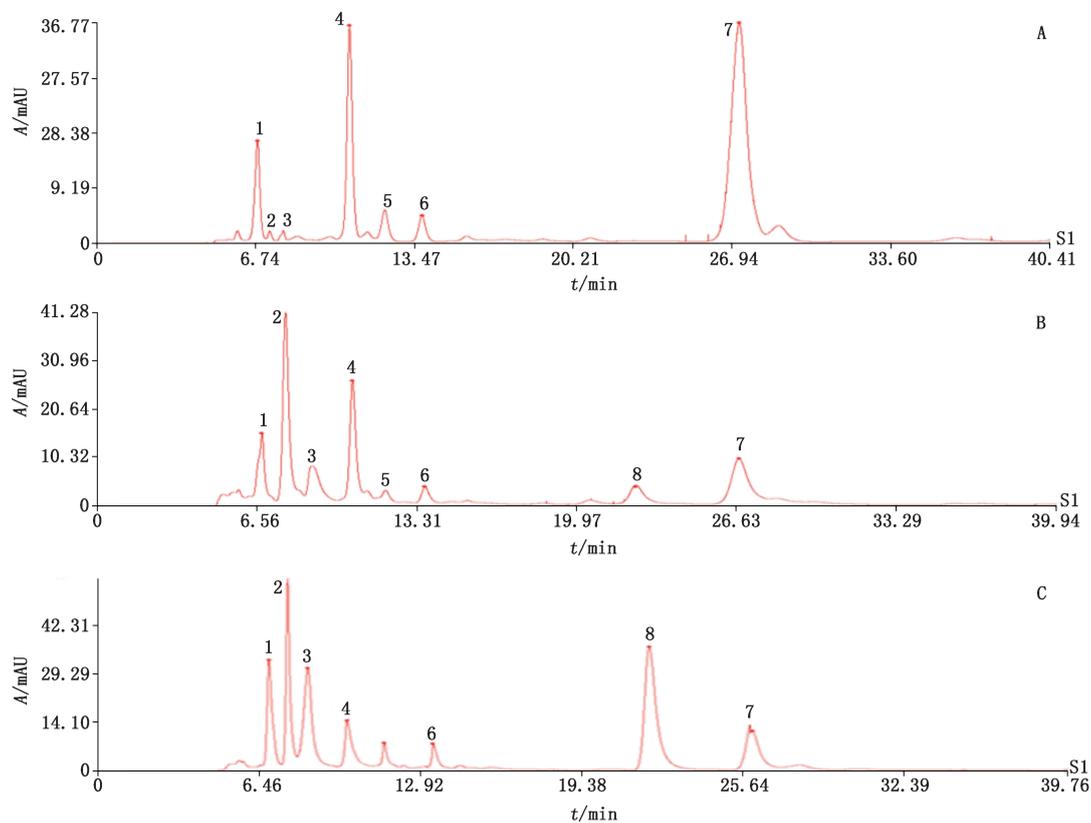
根据 18 批不同来源广地龙饮片的特征图谱分析,主要有 7 个特征共有峰;经过与对照品比对,标定了 4 个特征峰,其中 1 号峰为尿嘧啶,4 号峰为次黄嘌呤,6 号峰为黄嘌呤,7 号峰为肌苷,其他峰为未知成分峰。2 种伪品均有 8 个特征共有峰;经过与对照品比对,共标定 5 个特征峰,其中 1 号峰为尿嘧啶,4 号峰为次黄嘌呤,6 号峰为黄嘌呤,7 号峰为肌苷,8 号为腺苷,其他峰为未知成分峰。18 批广地龙正品饮片图谱与特征图谱的相似度分别为 0.966、0.988、0.989、0.963、0.961、0.912、0.971、0.962、0.976、

0.918、0.948、0.925、0.968、0.932、0.874、0.972、0.967、0.907,显示除 15 号样品图谱与特征图谱之间相似度为 0.874 外,其余各批次广地龙饮片相似度均大于 0.90,表明相似度较好。

5 不同品种广地龙饮片中 5 个核苷类成分的含量测定

5.1 系统适用性试验

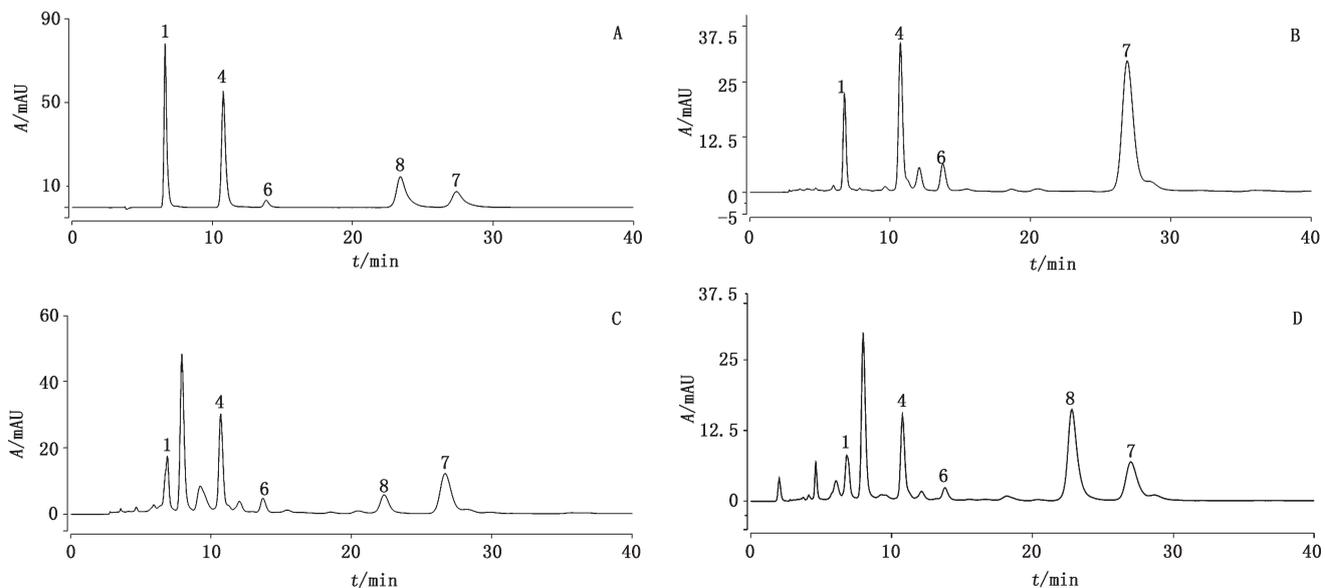
取混合对照品溶液、供试品溶液,按“3”项下色谱条件进样检测,尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷、肌苷与其相邻色谱峰的分度均 >1.0 ,理论塔板数以各色谱峰计均在 1 万以上。混合对照品及样品的色谱图见图 3。



A. 参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*) B. 大腔蚓 (*Metaphire magna*) C. 暗孔远盲蚓 (*Amynthes obscuritoporus*)

图2 3种地龙饮片的对照特征图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference characteristic of three kinds of Dilong decoction pieces



1. 尿嘧啶 (uracil) 4. 次黄嘌呤 (hypoxanthine) 6. 黄嘌呤 (xanthine) 7. 肌苷 (adenosine) 8. 腺苷 (inosine)

图3 混合对照品 (A) 及参环毛蚓 (B)、大腔蚓 (C)、暗孔远盲蚓 (D) HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), *Pheretima aspergillum* (B), *Metaphire magna* (C) and *Amynthes obscuritoporus* (D)

5.2 线性关系考察

精密吸取“2.1”项下的混合对照品溶液 0.2、1.0、2.0、5.0 mL, 分别置于 4 个 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得各系列浓度的混合对照品溶液。精密吸取各系列浓度混合对照品溶液及对照品储备液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 以各对照品质量浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 2, 表明各成分在相应线性范围内线性关系良好。

表 2 各被测成分的线性范围、回归方程和相关系数

Tab. 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients of the investigated components

化合物 (compound)	线性范围 (linear range)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程 (regression equation)	r
尿嘧啶(uracil)	3.40~170	$Y=3.6058X-0.2506$	0.9999
次黄嘌呤(hypoxanthine)	4.40~220	$Y=4.672X-0.2009$	1.000
黄嘌呤(xanthine)	5.00~250	$Y=5.6012X+0.3504$	1.000
腺苷(adenosine)	3.40~170	$Y=3.2294X-0.3113$	1.000
肌苷(inosine)	4.20~210	$Y=5.7961X-0.3679$	1.000

5.3 检测下限与定量下限测定

取“2.1”项下混合对照品溶液, 用水逐级稀释后进样测定, 测得尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷的检测下限 ($S/N=3$) 分别为 0.13、0.18、1.12、0.12 和 0.72 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量下限 ($S/N=10$) 分别为 0.44、0.58、3.71、0.40 和 2.38 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.4 精密度试验

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录峰面积。结果尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.10%、0.11%、0.67%、0.20%、0.42%, 表明仪器精密度良好。

5.5 重复性考察

取 31 号样品粉末 6 份, 分别按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“3”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算含量及 RSD。结果各样品中的尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷的平均含量分别为 201.35、260.86、1396.84、409.66、791.91 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD

分别为 2.3%、0.99%、1.3%、1.0%、2.1%, 表明重复性良好。

5.6 溶液稳定性试验

取同一份供试品溶液 (31 号样品), 分别于 0、1、2、4、6 h 进样测定。结果尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.3%、3.0%、3.1%、1.7%、3.0%, 结果表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

5.7 加样回收率试验

取已知含量的 31 号样品粉末 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 5 种单一成分对照品储备液 (尿嘧啶 100.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、次黄嘌呤 130.43 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄嘌呤 698.42 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、腺苷 204.83 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、肌苷 395.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL, 分别按照“2.2”项下方法制备供试溶液, 按“3”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算回收率, 结果尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷平均加样回收率 ($n=6$) 分别为 103.3%、97.3%、96.7%、95.5% 和 107.0%, RSD 分别为 1.5%、1.9%、1.3%、2.0%、和 2.3%。表明本方法的回收率良好。

5.8 样品含量测定

分别取不同批次的广地龙饮片粉末 (过 24 目筛), 每批样品取 2 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液 10 μL , 按“3”项下色谱条件进行测定, 用外标法计算出含量, 结果见表 3。

6 讨论

6.1 提取方法的优选

为了获得较高的提取效率, 对样品的提取方法进行了比较, 同时优化了提取溶剂、提取时间等相关参数。供试品溶液制备方式考察了超声提取和回流提取^[14-16], 对比回流提取法, 超声提取不仅效率高, 而且对待测物的干扰程度小; 为选择最佳提取溶剂, 对 5% 甲醇、10% 甲醇、水、生理盐水的提取效率进行了考察, 最终选定生理盐水作为提取溶剂; 取 1.0 g 样品粉末共 3 份, 用 20 mL 生理盐水浸泡 20 min 后, 分别超声提取 30、40、50 min, 结果表明, 40 min 提取核苷类成分效果最优。故本实验选用生理盐水浸泡 20 min, 然后超声提取 40 min 作为制备供试品溶液的方法。

表 3 广地龙饮片中 5 个成分含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

Tab. 3 Contents of five components in Guang Dilong Pieces

序号 (No.)	尿嘧啶 (uracil)	次黄嘌呤 (hypoxanthine)	黄嘌呤 (xanthine)	腺苷 (adenosine)	肌苷 (inosine)
1	0.147	6.133	1.743	未测得 (not found)	3.953
2	0.043	0.464	1.395	未测得 (not found)	18.822
3	0.082	4.067	2.421	未测得 (not found)	2.479
4	0.122	3.254	1.335	未测得 (not found)	5.090
5	0.109	0.661	1.519	未测得 (not found)	18.689
6	0.056	0.830	1.305	未测得 (not found)	20.123
7	0.055	0.449	0.951	未测得 (not found)	23.115
8	0.046	0.309	1.020	未测得 (not found)	23.382
9	0.099	3.606	2.398	未测得 (not found)	2.475
10	0.039	2.605	1.146	未测得 (not found)	3.692
11	0.105	3.032	0.902	未测得 (not found)	5.675
12	0.408	4.501	4.714	未测得 (not found)	3.572
13	0.104	3.765	1.311	未测得 (not found)	2.084
14	0.143	4.296	1.754	未测得 (not found)	3.958
15	0.056	3.891	0.825	未测得 (not found)	1.413
16	0.069	3.904	1.402	未测得 (not found)	4.657
17	0.021	0.500	4.001	未测得 (not found)	12.777
18	0.109	3.250	2.205	未测得 (not found)	6.507
19	0.235	0.725	0.595	0.147	1.973
20	0.129	0.261	1.329	0.399	1.517
21	0.171	0.548	1.815	0.251	1.683
22	0.176	0.599	1.585	0.132	1.913
23	0.224	0.912	2.039	0.196	3.256
24	0.397	0.181	0.703	0.145	3.640
25	0.181	0.620	2.265	0.271	1.742
26	0.081	0.536	1.613	0.269	1.775
27	0.080	0.507	1.411	0.297	1.771
28	0.090	0.571	1.993	0.283	1.761
29	0.226	0.923	2.239	0.132	3.467
30	0.198	0.599	2.309	0.276	1.619
31	0.086	0.238	1.472	0.598	1.317
32	0.307	0.135	0.528	1.196	1.367
33	0.111	0.282	0.977	0.849	0.985
34	0.211	0.629	0.395	1.664	1.932
35	0.086	0.238	1.472	1.598	1.317
36	0.081	0.536	1.613	1.269	1.775
37	0.176	0.599	1.585	1.132	1.913
38	0.238	0.856	1.905	2.268	3.049
39	0.198	0.599	2.309	1.276	1.619
40	0.181	0.620	2.265	1.271	1.742
41	0.150	0.287	0.931	3.093	4.654

6.2 色谱条件优化

为比较流动相对峰形的影响,考察了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水3种流动相,其中采用甲醇-水的结果优于乙腈-水,加入甲酸可以改善峰形,故采用甲醇-0.1%甲酸水作为流动相。本实验在流动相为甲醇-0.1%甲酸条件下选用 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Thermo TSK-GEL C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分析柱进行条件优化,结果表明,后者的分离效果和成分的峰形更好,最终确定了本文所述色谱条件。此外,利用二极管阵列检测器(DAD)对混合对照品溶液进行全波长扫描,在260 nm波长下各检测成分在本文色谱条件下有最优吸收,峰形较好,基线平稳,故最终选取260 nm作为检测波长。

6.3 特征图谱的比较

在收集到的41批广地龙饮片中,经鉴定有18批饮片来源为正品参环毛蚓,另有12批饮片来源为大腔蚓,11批饮片来源为暗孔远盲蚓。从3种饮片的特征图谱中可以看出,参环毛蚓与2种伪品差异明显,参环毛蚓特征图谱中未检测到腺苷,而2种伪品的特征图谱中均含有腺苷,表明腺苷是区分参环毛蚓及其常见伪品(大腔蚓和暗孔远盲蚓)的特征成分。

6.4 含量测定结果比较

由表3可见,12批大腔蚓和11批暗孔远盲蚓中均含有尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷,18批正品广地龙(参环毛蚓)中未检测到腺苷。正品广地龙饮片中肌苷的含量范围为1.413~23.382 mg·g⁻¹,平均值为(9.03 ± 7.76) mg·g⁻¹,明显高于2种伪品[含量范围为0.985~4.654 mg·g⁻¹,平均值为(2.07 ± 0.88) mg·g⁻¹];正品中次黄嘌呤的含量范围为0.309~6.133 mg·g⁻¹,平均值为(2.75 ± 1.71) mg·g⁻¹,明显高于2种伪品(含量范围为0.135~0.923 mg·g⁻¹,平均值为(0.52 ± 0.22) mg·g⁻¹)。3种地龙饮片中不同批次之间尿嘧啶和黄嘌呤的含量范围分别为0.021~0.408 mg·g⁻¹和0.395~4.714 mg·g⁻¹,平均值为(0.14 ± 0.09) mg·g⁻¹和(1.65 ± 0.82) mg·g⁻¹,不同品种之间差异不明显。

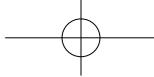
6.5 小结

本实验在同一色谱条件下,建立了广地龙饮片及其伪品的特征图谱,并同时测定不同批次饮片中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷和肌苷5个指标成

分的含量,方法简便、快速、准确,具备了定性和定量双重作用,为有效控制广地龙饮片的质量提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 122
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 122
- [2] 黄庆,李志武,马志国,等. 地龙的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 220
HUANG Q, LI ZW, MA ZG, et al. Research progress of Pheretima [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(13): 220
- [3] 张晓晨. 地龙药理与临床研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1574
ZHANG XC. Advances in pharmacology and clinical research of Dilong [J]. Chin Tradit Pat Med, 2011, 33(9): 1574
- [4] CHU XP, ZHAO T, JIA W, et al. Determination of 13 free fatty acids in Pheretima using UPLC-ESI-MS [J]. Chromatographia, 2009, 69(7-8): 645
- [5] OUMI T, UKERM K, MATSUSHIMA O. Annetoein: an oxytoein-related peptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 198(1): 393
- [6] 詹云丽,黄璐敏,黄丹莹,等. 广地龙药材氨基酸类成分指纹图谱研究[J]. 中药材, 2009, 32(9): 1350
ZHAN YL, HUANG LM, HUANG DY, et al. Study on fingerprint of amino acids in Guang Dilong [J]. J Chin Med Mater, 2009, 32(9): 1350
- [7] 肖寄平,张炜爆,杨雪,等. 地龙中脂肪酸成分研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2760
XIAO JP, ZHANG WB, YANG X, et al. Study on the composition of fatty acid in earthworm [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21(11): 2760
- [8] 张绍章,兆素臣. 蚯蚓提取物的物理性状和化学成分的检测[J]. 第四军医大学学报, 1994, 15(2): 134
ZHANG SZ, ZHAO SC. Determination of physical and chemical properties of earthworm extract [J]. J Fourth Mil Med Univ, 1994, 15(2): 134
- [9] 马梅,李薇,龚玲,等. 基于CO I和16S rRNA基因的地龙药材及其混淆品的DNA条形码鉴定[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 595
MA M, LI W, GONG L, et al. DNA barcode identification of Pheretima medicinal material and its adulterants based on CO I and 16S rRNA gene sequence [J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol, 2014, 25(5): 595
- [10] 韦健红,李薇,吴文如,等. 基于CO I与16S rRNA基因对广地龙的DNA分子鉴定研究[J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3274



- WEI JH, LI W, WU WR, *et al.* Identification of *Pheretima aspergillum* by CO I and 16S rRNA with DNA molecular marker methods [J]. *China Pharm*, 2012, 23(35): 3274
- [11] 马梅, 李薇, 龚玲, 等. 广地龙药材 DNA 提取方法的优选 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(6): 1404
- MA M, LI W, GONG L, *et al.* Extraction of total DNA from medicinal *Guang Dilong* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2014, 25(6): 1404
- [12] 孙洁, 魏劭恒, 毛润乾, 等. 广地龙古今入药品种对比研究 [J/OL]. *中药材*, 2018(6): 1312 [2018-08-23]. <https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2018.06.013>
- SUN J, WEI SH, MAO RQ, *et al.* Comparative study of ancient and modern medicinal varieties of *Guang Dilong* [J/OL]. *J Chin Med Mater*, 2018(6): 1312 [2018-08-23]. <https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2018.06.013>
- [13] ANDERSEN NM, CHENG L, DAMGAARD J, *et al.* Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of oceanic insects (Hemiptera: Gerridae: *Halobates* spp.) [J]. *Mar Biol*, 2000, 136(3): 421
- [14] 黄帅, 徐风, 杨平, 等. 地龙的 HPLC 特征图谱研究 [J]. *中国药房*, 2015, 26(21): 2971
- HUANG S, XU F, YANG P, *et al.* Study on the HPLC characteristic chromatogram of *Pheretima* [J]. *China Pharm*, 2015, 26(21): 2971
- [15] 刘丽芳, 金蓉鸾, 徐国钧. HPLC 法测定 10 种动物药中尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、腺苷的含量 [J]. *中国中药杂志*, 1999, 24(2): 73
- LIU LF, JIN RL, XU GJ. HPLC determination of uracil xanthine, hypoxanthine and uridine in ten species of animal drugs [J]. *China J Chin Mater Med*, 1999, 24(2): 73
- [16] 周恒, 曹依敏, 苗水, 等. HPLC 法测定沪地龙中 7 个核苷类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(1): 97
- ZHOU H, CAO YM, MIAO S, *et al.* Determination of 7 nucleosides in Shanghai *Pheretima* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(1): 97

(本文于 2018 年 10 月 12 日收到)