

# 地龙药材的质量标准提升研究<sup>Δ</sup>

王莎莎<sup>1\*</sup>, 曲悦<sup>1</sup>, 薛大权<sup>1</sup>, 李兰清<sup>1</sup>, 向阳<sup>2</sup>, 张宝徽<sup>1#</sup> (1.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2.健民药业集团股份有限公司, 武汉 430050)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)17-2379-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.17.15

**摘要** 目的:为完善和提高地龙药材的质量标准提供参考。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法测定药材样品中次黄嘌呤、肌苷的含量,同时按“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)软件建立地龙药材的HPLC指纹图谱并进行相似度评价。色谱柱为Purospher STAR RP-18 endcapped;流动相为甲醇-水(梯度洗脱);流速为1 mL/min;检测波长为248 nm;柱温为30 ℃;进样量为20 μL。结果:含量测定方法学考察结果显示,次黄嘌呤、肌苷的检测质量浓度线性范围分别为1.58~31.6 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、5.52~110.4 μg/mL( $r=0.999\ 8$ );定量限分别为0.316、0.552 μg/mL;检测限分别为0.158、0.110 μg/mL;精密度、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于2.0%( $n=6$ );平均回收率分别为103.0%(RSD=1.7%, $n=6$ )、101.2%(RSD=1.2%, $n=6$ )。成功建立了15批样品的HPLC指纹图谱,共确定了8个共有色谱峰。其中有14批样品的HPLC指纹图谱与对照图谱R的相似度>0.900。结论:建立的次黄嘌呤、肌苷含量测定及地龙药材HPLC指纹图谱方法简便、准确、重复性好,可用于地龙药材的质量控制。

**关键词** 地龙;次黄嘌呤;肌苷;高效液相色谱法;指纹图谱;质量标准

## Study on Quality Standard Improvement of Pheretima

WANG Shasha<sup>1</sup>, QU Yue<sup>1</sup>, XUE Daquan<sup>1</sup>, LI Lanqing<sup>1</sup>, XIANG Yang<sup>2</sup>, ZHANG Baohui<sup>1</sup> (1.School of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China; 2.Jianmin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Wuhan 430050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for improving the quality standard of Pheretima. METHODS: The contents of hypoxanthine and inosine in medicinal material samples were determined by HPLC. HPLC fingerprint of Pheretima was established according to “Similarity evaluation system for TCM chromatogramtic fingerprint” (2012 edition) software, and similarity evaluation was conducted. The determination was performed on Purospher STAR RP-18 endcapped with mobile phase consisted of methanol-water (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was 248 nm, and the column temperature was set at 30 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The results of methodological investigation of content determination showed that the linear range of hypoxanthine and inosine were 1.58-31.6 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 5.52-110.4 μg/mL ( $r=0.999\ 8$ ), respectively. limits of quantify were 0.316, 0.552 μg/mL, respectively; limits of detection were 0.158, 0.110 μg/mL, respectively; RSDs of precision, stability (24 h) and repeatability tests were all less than 2.0% ( $n=6$ ). Average recovery rates were 103.0% (RSD=1.7%,  $n=6$ ) and 101.2% (RSD=1.2%,  $n=6$ ), respectively. HPLC fingerprint for 15 batches of samples were established, and 8 common peaks were identified. The similarity of HPLC fingerprint of 14 batches of sample with control fingerprint R was higher than 0.900. CONCLUSIONS: The established method for content determination of hypoxanthine and inosine and HPLC fingerprint of Pheretima are simple, accurate and reproducible, and can be used for quality control of Pheretima.

**KEYWORDS** Pheretima; Hypoxanthine; Inosine; HPLC; Fingerprint; Quality standard

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。前一种习称“广地龙”,后3种习称“沪地龙”,其性寒,味咸,具有清热定惊、通经活络、平喘利尿的功效<sup>[1]</sup>。地龙药用始载

于《神农本草经》<sup>[2]</sup>,称“白颈蚯蚓”,被列为下品。而地龙的名称始记载于《图经本草》<sup>[3]</sup>,曰:“白颈蚯蚓生平土,今处处平泽膏壤土中皆有之,……方家谓之地龙”。现代药理学研究表明,地龙具有溶栓、抗凝血、抗心律失常、降压、镇静、抗惊厥、解热、镇痛、抗炎、抗肿瘤和止咳平喘等多种药理作用<sup>[4-7]</sup>。研究表明,核苷类成分是地龙舒张支气管、抗组胺、平喘的重要药用物质基础,也对人体的代谢和免疫有着重要作用<sup>[8-9]</sup>,其中次黄嘌呤的含量与地龙药材止咳化痰、平喘的药效作用成正相关<sup>[5]</sup>,而肌苷有免疫调节和神经保护作用<sup>[10-11]</sup>。

2015年版《中国药典》(一部)中地龙项下有性状、鉴

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家中医药管理局中药重点产品行业标准制定计划(No.ZYY-2017-018)

\* 硕士研究生。研究方向:药物新制剂、新剂型及新技术。E-mail: wangshasha123wh@163.com

# 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药及其制剂的物质基础。E-mail:24662873@qq.com

别、检查(杂质、水分、总灰分、酸不溶性灰分、重金属、黄曲霉毒素)、水溶性浸出物等质控项目,尚未收载地龙含量测定及指纹图谱检测方法,不能全面地控制其质量。虽然也有学者对地龙中的多种成分同时进行了定量分析<sup>[12-13]</sup>,但仍无法从整体角度评价地龙的质量。中药指纹图谱具有整体性、相似性的特点,能突出中药的完整面貌,可依据相似度的特点实现对中药内在化学成分的综合评价和整体质量的全面控制。基于此,本研究在2015年版《中国药典》(一部)现有质量标准基础上,增加以核苷类成分次黄嘌呤、肌苷为定量指标,建立高效液相色谱(HPLC)定量法,并建立地龙药材的HPLC指纹图谱,旨在为提高地龙药材的质量标准提供一定参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1311B型四元梯度泵、G1316A型柱温箱、G1315D型二极管阵列检测器、G1328A型手动进样器(美国Agilent公司);MS105DU型电子分析天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];XB320M型电子天平(上海双旭电子有限公司);FW-80型高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司);SMART型超纯水机(力康生物医疗科技控股有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

本研究收集了广西、广东、海南等不同产地的共15批地龙药材,经湖北中医药大学陈科力教授鉴定为蛭蚓科动物*P. aspergillum*(E. Perrier)的干燥体;次黄嘌呤对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:TM0313-XC13,纯度:98%);肌苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140669-201606,纯度:98.6%);甲醇(美国Tedia公司,色谱纯);0.9%氯化钠注射液(江西科伦药业有限公司,批号:D18102302-2);其他试剂均为分析纯,水为超纯水。15批地龙药材收集情况见表1。

表1 15批地龙药材的收集情况

Tab 1 Collection of 15 batches of *Pheretima*

编号	批号	产地	来源
1	170704	广西	蕲春药材市场
2	170801	广西	亳州药材市场
3	170802	广西	亳州药材市场
4	170803	海南	亳州药材市场
5	170804	海南	亳州药材市场
6	170805	广西	亳州药材市场
7	170806	海南	亳州药材市场
8	170810	广西	蕲春药材市场
9	170811	广西	蕲春药材市场
10	170812	海南	蕲春药材市场
11	171102	广西	健民药业集团股份有限公司
12	171103	广西	健民药业集团股份有限公司
13	171201	广西	健民药业集团股份有限公司
14	180101	广西	健民药业集团股份有限公司
15	180401	广东	健民药业集团股份有限公司

## 2 方法与结果

### 2.1 地龙药材中次黄嘌呤、肌苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Purospher STAR RP-18 end-capped(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-水(B)(*V/V*),梯度洗脱;流速为1 mL/min;检测波长为248 nm;柱温为30 ℃;进样量为20 μL。梯度洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

时间,min	A(甲醇),%	B(水),%
0	1	99
10	1	99
25	10	90
30	10	90
35	75	25

2.1.2 对照品贮备液的制备 称取次黄嘌呤、肌苷对照品适量,精密称定,加0.9%氯化钠注射液分别制成每1 mL含次黄嘌呤31.6 μg、肌苷110.4 μg的单一溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取样品粉末(过24号筛)约1.0 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,精密加入0.9%氯化钠注射液50 mL,称定质量,加热回流90 min,放冷,再次称定质量,用0.9%氯化钠注射液补足减失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 系统适用性试验 分别取上述对照品贮备液、供试品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,理论板数以次黄嘌呤峰计>6 000,基线分离良好,待测成分与相邻峰间的分离度>1.5。色谱图见图1。

2.1.5 线性关系考察 精密量取“2.1.2”项下两种对照品贮备液各0.5、1、2、4、6、8、10 mL,分别置于不同10 mL量瓶中,用0.9%氯化钠注射液定容至刻度,摇匀,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(*y*)、对照品质量浓度为横坐标(*x*)绘制标准曲线。结果,次黄嘌呤的回归方程为 $y=87.562x+5.1327$ ( $r=0.9999$ ),肌苷的回归方程为 $y=54.066x-59.291$ ( $r=0.9998$ )。结果表明,次黄嘌呤、肌苷分别在检测质量浓度为1.58~31.6、5.52~110.4 μg/mL范围内与其各自峰面积线性关系良好。

2.1.6 定量限与检测限考察 取“2.1.2”项下两种对照品贮备液适量,倍比稀释,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比为10:1和3:1分别计算定量限和检测限。结果,次黄嘌呤、肌苷的定量限分别为0.316、0.552 μg/mL,检测限分别为0.158、0.110 μg/mL。

2.1.7 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下次黄嘌呤、肌苷对照品贮备液2、4 mL,置于不同10 mL量瓶中,分别用0.9%氯化钠注射液稀释至刻度,即得次黄嘌呤、肌苷

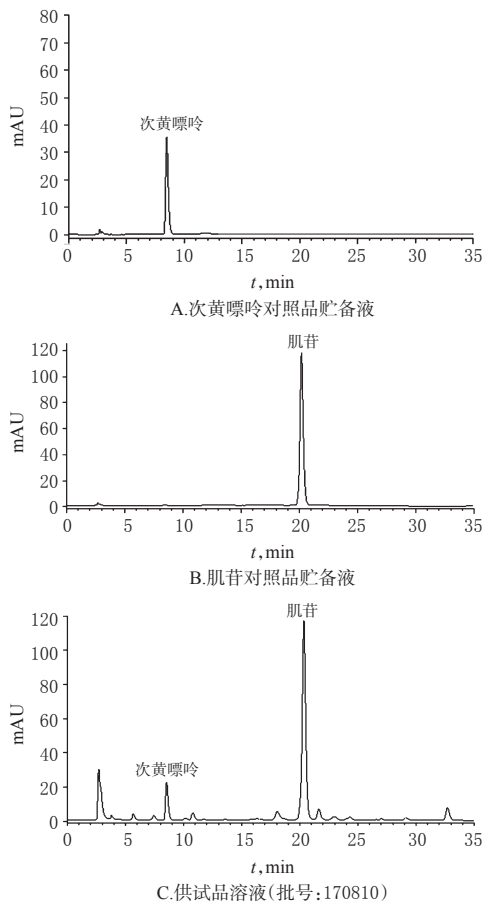


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

质量浓度分别为6.32、44.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的相应对照品溶液。吸取上述对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,每个样品连续进样分析6次,记录峰面积。结果,次黄嘌呤峰面积的 $\text{RSD}=0.4\%$  ( $n=6$ ),肌苷峰面积的 $\text{RSD}=0.7\%$  ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验 取同一批药材样品(批号:170810)6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算次黄嘌呤、肌苷含量。结果,样品中次黄嘌呤的平均含量为0.193 6  $\text{mg}/\text{g}$ , $\text{RSD}=1.6\%$  ( $n=6$ );肌苷的平均含量为2.345 8  $\text{mg}/\text{g}$ , $\text{RSD}=0.5\%$  ( $n=6$ )。结果表明本方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 称取同一批药材样品(批号:170810)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别在放置0、2、4、6、8、10、12、24 h后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,次黄嘌呤峰面积的 $\text{RSD}=0.4\%$  ( $n=8$ ),肌苷峰面积的 $\text{RSD}=0.2\%$  ( $n=8$ )。结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的药材样品(批号:170810)0.5 g,共6份,分别加入约与样品中次黄嘌呤、肌苷含量相同的对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算次黄嘌呤、肌苷含量及其加样回收

率。结果,次黄嘌呤平均回收率为103.0%, $\text{RSD}=1.7\%$  ( $n=6$ );肌苷的平均回收率为101.2%, $\text{RSD}=1.2\%$  ( $n=6$ )。结果表明该方法准确度较好。加样回收率试验结果见表3。

表3 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 3 Results of recovery tests ( $n=6$ )

成分	样品质量, g	样品中含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
次黄嘌呤	0.500 0	0.096 8	0.097	0.198 2	104.5	103.0	1.7
	0.500 0	0.096 8	0.097	0.199 8	106.2		
	0.500 1	0.096 8	0.097	0.196 0	102.3		
	0.499 7	0.096 7	0.097	0.195 8	102.1		
	0.500 1	0.096 8	0.097	0.199 4	105.8		
	0.499 1	0.096 6	0.097	0.198 4	104.9		
肌苷	0.500 0	1.172 9	1.180	2.380 6	102.3	101.2	1.2
	0.500 0	1.172 9	1.180	2.366 6	101.2		
	0.500 1	1.173 1	1.180	2.382 9	102.5		
	0.499 7	1.172 2	1.180	2.380 0	102.4		
	0.500 1	1.173 1	1.180	2.346 6	99.4		
	0.499 1	1.170 8	1.180	2.359 6	100.7		

2.1.11 地龙样品中次黄嘌呤、肌苷的含量测定 将15批地龙样品分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,每个样品测定3次,记录峰面积,并计算次黄嘌呤、肌苷含量。结果,15批地龙样品中次黄嘌呤、肌苷的平均含量分别为0.558 7、2.042 3  $\text{mg}/\text{g}$ 。样品含量测定结果见表4。

表4 样品含量测定结果( $n=3, \text{mg}/\text{g}$ )

Tab 4 Results of content determination of samples ( $n=3, \text{mg}/\text{g}$ )

编号	批号	次黄嘌呤	肌苷
1	170704	1.250 7	2.016 8
2	170801	0.985 3	2.050 3
3	170802	0.166 3	1.512 6
4	170803	0.318 7	1.792 6
5	170804	0.661 4	1.017 8
6	170805	0.302 1	3.405 6
7	170806	0.380 1	1.863 3
8	170810	0.208 7	2.403 7
9	170811	0.186 7	1.375 7
10	170812	0.807 0	2.284 0
11	171102	0.667 0	1.461 2
12	171103	0.437 0	2.385 1
13	171201	0.354 2	2.304 7
14	180101	0.308 1	2.209 6
15	180401	1.347 8	2.551 2

## 2.2 地龙药材 HPLC 指纹图谱的构建

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项下色谱条件。

2.2.2 供试品溶液的制备 同“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法。

2.2.3 精密度试验 取地龙药材(批号:170810)按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,连续进样6次,记录色谱。以肌苷峰(峰5)的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,8个共有峰相对保留时间



的RSD为0.3%~0.9% ( $n=6$ ), 相对峰面积的RSD为0.8%~2.3% ( $n=6$ )。结果表明该仪器的精密度良好。

**2.2.4 稳定性试验** 取地龙药材(批号:170810)按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在0、2、4、8、12、24 h后, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱。以肌苷峰(峰5)的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 8个共有峰相对保留时间的RSD为0.08%~0.70% ( $n=6$ ), 相对峰面积的RSD为0.5%~2.6% ( $n=6$ )。结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.2.5 重复性试验** 取同一批地龙药材样品(批号:170810)6份, 分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱。以肌苷峰(峰5)的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 6份样品中8个共有峰相对保留时间的RSD为0.1%~1.0% ( $n=6$ ), 相对峰面积的RSD为1.6%~3.3% ( $n=6$ )。结果表明本方法重复性良好。

**2.2.6 地龙药材HPLC指纹图谱的生成** 将15批地龙样品分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 将得到的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)中, 以8号图谱为参考图谱, 设置时间窗宽度为0.2 min, 采用多点校正法进行色谱峰匹配, 采用中位数法生成对照图谱(R)。样品的对照指纹图谱R见图2, 15批样品的HPLC叠加指纹图谱见图3。

**2.2.7 相似度分析** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)软件, 以生成的对照图谱R为参照, 进行整体相似度评价。结果显示, 15批样品中仅有1批样品(批号:170804)的相似度小于0.900, 其余14批样品的相似度均大于0.900, 且与对照指纹图谱R具有较好的一致性。结果表明地龙药材样品间差异较小, 质量稳定性

良好, 相似度评价结果见表5。

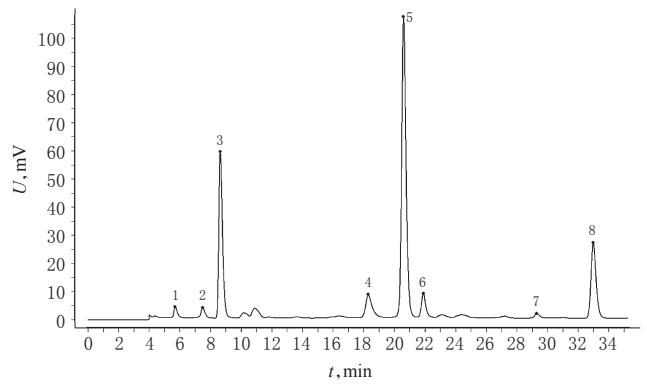


图2 样品的对照指纹图谱R

Fig 2 Control fingerprint R of samples

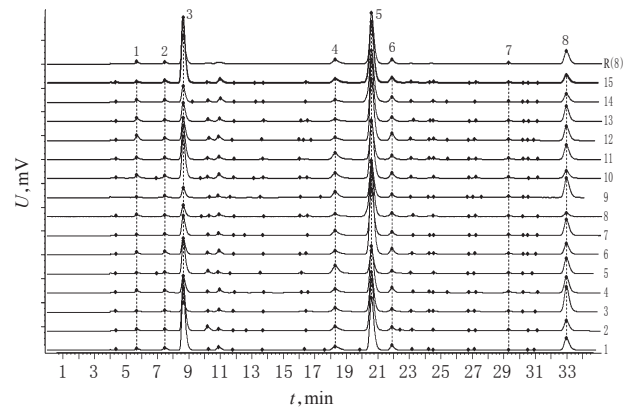


图3 15批样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 3 HPLC superposed fingerprints of 15 batches of samples

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的优化

在前期研究中, 笔者曾采用Agilent公司的ZORB-AX SB-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、赛分公司的Sapphire-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)以及默克公

表5 15批地龙样品的相似度评价结果

Tab 5 Results of similarity evaluation for 15 batches of samples

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	对照图谱R
1	1.000	0.991	0.760	0.867	0.940	0.801	0.885	0.788	0.792	0.962	0.972	0.878	0.857	0.846	0.994	0.933
2	0.991	1.000	0.808	0.914	0.924	0.868	0.928	0.857	0.838	0.986	0.981	0.927	0.912	0.904	0.995	0.967
3	0.760	0.808	1.000	0.961	0.810	0.884	0.956	0.847	0.996	0.830	0.876	0.925	0.933	0.894	0.760	0.911
4	0.867	0.914	0.961	1.000	0.845	0.964	0.998	0.943	0.974	0.945	0.940	0.992	0.992	0.977	0.884	0.986
5	0.940	0.924	0.810	0.845	1.000	0.707	0.864	0.673	0.841	0.878	0.968	0.817	0.797	0.758	0.907	0.881
6	0.801	0.868	0.884	0.964	0.707	1.000	0.960	0.997	0.899	0.928	0.858	0.981	0.987	0.996	0.846	0.955
7	0.885	0.928	0.956	0.998	0.864	0.960	1.000	0.939	0.971	0.954	0.953	0.990	0.990	0.974	0.900	0.990
8	0.788	0.857	0.847	0.943	0.673	0.997	0.939	1.000	0.864	0.923	0.835	0.968	0.974	0.990	0.839	0.941
9	0.792	0.838	0.996	0.974	0.841	0.899	0.971	0.864	1.000	0.862	0.904	0.940	0.945	0.910	0.794	0.932
10	0.962	0.986	0.830	0.945	0.878	0.928	0.954	0.923	0.862	1.000	0.967	0.963	0.951	0.954	0.981	0.986
11	0.972	0.981	0.876	0.940	0.968	0.858	0.953	0.835	0.904	0.967	1.000	0.931	0.917	0.895	0.965	0.971
12	0.878	0.927	0.925	0.992	0.817	0.981	0.990	0.968	0.940	0.963	0.931	1.000	0.998	0.993	0.904	0.990
13	0.857	0.912	0.933	0.992	0.797	0.987	0.990	0.974	0.945	0.951	0.917	0.998	1.000	0.994	0.886	0.984
14	0.846	0.904	0.894	0.977	0.758	0.996	0.974	0.990	0.910	0.954	0.895	0.993	0.994	1.000	0.884	0.975
15	0.994	0.995	0.760	0.884	0.907	0.846	0.900	0.839	0.794	0.981	0.965	0.904	0.886	0.884	1.000	0.949
对照图谱R	0.933	0.967	0.911	0.986	0.881	0.955	0.990	0.941	0.932	0.986	0.971	0.990	0.984	0.975	0.949	1.000

司的Purospher STAR RP-18 endcapped色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对本品进行分析。结果采用ZORBAX SB-C<sub>18</sub>色谱柱时,次黄嘌呤、肌苷色谱峰都存在拖尾现象;采用Sapphire-C<sub>18</sub>色谱柱和Purospher STAR RP-18 endcapped色谱柱时,对供试品溶液各色谱峰的分离效果相对良好,但Sapphire-C<sub>18</sub>色谱柱不适合长时间用纯水相洗脱,故最终采用Purospher STAR RP-18 endcapped色谱柱进行试验。在考察不同流动相的组成时,笔者选用乙腈-水、甲醇-水、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液、甲醇-10 mmol/L 乙酸铵溶液等4种流动相系统进行梯度洗脱。分析图谱发现,有机相选择甲醇更适合分离,当水相为5 mmol/L 乙酸铵溶液或10 mmol/L 乙酸铵溶液时,对色谱峰峰形、分离度并没有显著的改善,因此最终选择甲醇-水流动相系统。此外,笔者还考察了不同柱温(25、30、35 ℃)对分离度、峰形等的影响,结果当柱温为30 ℃时,各峰分离度最好,因此选择柱温为30 ℃。本研究与现有报道<sup>[14-15]</sup>相比,选用甲醇和水为流动相,不仅可达到较好的分离效果,在35 min内全部出峰,还可避免缓冲盐使用不当对色谱柱的影响。

### 3.2 供试品溶液制备方法的考察

在前期研究中,笔者分别对供试品溶液制备过程中的提取溶剂、提取方法以及溶剂用量等进行了考察。(1)提取溶剂的考察:根据文献报道,不同溶剂用于核苷类成分提取效果依次为甲醇<80% 甲醇<40% 甲醇<30% 甲醇<20% 甲醇<10% 甲醇<纯水,以0.9%氯化钠注射液为提取溶剂时的色谱峰比以95%、75%、50%及25% 甲醇为提取溶剂时更多<sup>[16-17]</sup>。在此研究背景下,本研究在供试品溶液制备中分别考察了以0.9%氯化钠注射液和水为溶剂的提取效果。结果显示,与以水为提取溶剂时比较,以0.9%氯化钠注射液为提取溶剂时测得的地龙药材中次黄嘌呤和肌苷含量均更高,故最终以0.9%氯化钠注射液为提取溶剂进行供试品溶液的制备。(2)提取方法的考察:笔者考察了超声提取法和加热回流提取法<sup>[18]</sup>的提取效果。结果,与超声提取法相比,加热回流提取法提取得到的次黄嘌呤和肌苷含量相对较高;改变回流提取时间(30、60、90、120 min),发现在提取90 min时待测物提取含量达到最高,故最终选择采用加热回流提取90 min。(3)溶剂用量的考察:笔者还考察了不同溶剂用量(25、50、100 mL)的提取效果。结果,当溶剂用量为50、100 mL时,待测物提取含量无明显差异,从经济角度出发,选择溶剂用量为50 mL。故最终采用0.9%氯化钠注射液50 mL加热回流提取90 min的方法作为供试品溶液的制备方法。

本研究结果显示,15批地龙药材中肌苷的含量均高于次黄嘌呤,各地、各批次地龙药材中次黄嘌呤和肌苷的含量差异较大,且未见明显规律,这可能与其生存环境、产地、采收时间有关,具体原因有待后期采集更多产

地、批次样品设计相关试验进一步研究。本研究基于2015年版《中国药典》(一部)现有的地龙药材质量标准,增加了对地龙中次黄嘌呤、肌苷含量测定和HPLC指纹图谱鉴别方法,且建立的方法操作简便、重复性好,提升了地龙药材质量标准,对提高地龙药材的质量具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:122-123.
- [2] 吴普. 神功本草经:第三卷[M]. 北京:人民卫生出版社, 1963:123.
- [3] 苏颂. 图经本草(辑复本)[M]. 福州:福建科技出版社, 1988:463.
- [4] 杨新, 刘欣, 万明, 等. 地龙抗凝血活性物质研究进展[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2017, 45(1):83-88.
- [5] 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.
- [6] 唐鼎, 涂乾, 李娟, 等. 药用地的药理作用和临床研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(6):1016-1019.
- [7] 孙姘, 张长林. 地龙的药理与临床研究概况[J]. 食品与药品, 2011, 13(11):444-446.
- [8] 张晓晨. 地龙药理与临床研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(9):1574-1578.
- [9] 杜航, 孙佳明, 郭晓庆, 等. 地龙的化学成分及药理作用[J]. 吉林中医药, 2014, 34(7):707-709.
- [10] HASKO G, SITKOVSKY MV, SZABO C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(3):152-157.
- [11] FUKUMORI Y, MAEDA N, TAKEDA H, et al. Serum glucose and insulin response in rats administered with sucrose or starch containing adenosine, inosine or cytosine[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2000, 64(2):237-243.
- [12] 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):97-103.
- [13] 张彬, 李倩, 党爱华. HPLC法同时测定赤子爱胜蚓药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(12):1692-1694.
- [14] 姜文红, 张清波. 地龙 HPLC 指纹图谱分析方法的研究[J]. 中医药学报, 2006, 34(6):13-14.
- [15] 吴文如, 李薇, 赖小平. HPLC法测定不同产地地龙中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(7):914-917.
- [16] 明凯利, 向阳, 杨艳霞, 等. 小金胶囊的HPLC指纹图谱建立及主成分分析[J]. 中国药房, 2019, 30(2):188-192.
- [17] 曹文杰. HPLC法测定复方地龙胶囊中尿嘧啶、次黄嘌呤和肌苷的含量[J]. 北方药学, 2015, 12(9):5-6.
- [18] 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):2971-2974.

(收稿日期:2019-03-19 修回日期:2019-07-24)

(编辑:林静)