

地龙的HPLC特征图谱研究^Δ

黄 帅^{1*}, 徐 风¹, 杨 平¹, 杨雪雁¹, 刘广学¹, 尚明英¹, 王 璇², 蔡少青^{1#} (1. 北京大学药学院/天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 2. 北京大学药学院化学生物学系, 北京 100191)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2971-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.33

摘 要 目的: 建立地龙的高效液相色谱(HPLC)特征图谱, 比较广地龙与沪地龙的主要成分含量差异以及地龙与3种其他动物药的图谱差异。方法: 采用地龙HPLC特征图谱法, 测定了16份广地龙、8份沪地龙、3份土鳖虫、3份水蛭与3份蛭蟥虫的特征图谱, 采用相似度评价与 t 检验对这5种动物药的图谱数据进行差异分析。结果: 本研究建立了地龙药材的HPLC特征图谱法, 首次指认了11个共有特征峰, 包括6个核苷、4个核碱基与1个氨基酸; 建立的HPLC特征图谱法可以将地龙与土鳖虫、水蛭及蛭蟥虫区分开来; 首次对广地龙与沪地龙HPLC特征图谱中主要成分的含量差异进行了研究, 其中广地龙中黄嘌呤及腺苷含量高于沪地龙, 沪地龙中尿苷、鸟苷及2'-脱氧鸟苷含量高于广地龙, 并据此计算出5种成分的峰面积比值新指标S, S值可用于区分2种地龙。结论: 该特征图谱可用于地龙药材的鉴别, 且可为广地龙与沪地龙的药理学差异研究提供参考。

关键词 地龙; 广地龙; 沪地龙; 高效液相色谱法; 特征图谱

Study on the HPLC Characteristic Chromatogram of Pheretima

HUANG Shuai¹, XU Feng¹, YANG Ping¹, YANG Xue-yan¹, LIU Guang-xue¹, SHANG Ming-ying¹, WANG Xuan², CAI Shao-qing¹ (1. Pharmacy School of Peking University/State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing 100191, China; 2. Dept. of Chemical Biology, Pharmacy School of Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC characteristic chromatogram of pheretima, and compare the differences of the main ingredient contents of Guangdong pheretima and Shanghai pheretima and the chromatogram differences among pheretima and 3 other animal drugs. METHODS: Pheretima HPLC characteristic chromatogram method was adopted to determine the characteristic chromatograms of 16 Guangdong pheretima, 8 Shanghai pheretima, 3 eupolyphaga, 3 hirudo and 3 catharsius. Similarity evaluation and t test were used to analyze the differences of chromatogram data of 5 animal drugs. RESULTS: The established HPLC characteristic chromatogram method firstly identified 11 common characteristic peaks, including 6 nucleosides, 4 nucleobase and 1 amino acid; and it could be used for the identification of pheretima from eupolyphaga, hirudo and catharsius; the differences of main ingredient contents in the characteristic chromatogram of Guangdong pheretima and Shanghai pheretima were firstly studied. The contents of xanthine and adenosine in Guangdong pheretima were higher than Shanghai pheretima, while the contents of uridine, guanosine and 2'-deoxy guanosine in Shanghai pheretima were higher than Guangdong pheretima. A new index S, calculated by these 5 constituents, was successfully applied to distinguish the 2 kinds of pheretima. CONCLUSIONS: The characteristic chromatogram can be used for the identification of pheretima, and can provide reference for the pharmacodynamic differences study of Guangdong pheretima and Shanghai pheretima.

KEYWORDS Pheretima; Guangdong pheretima; Shanghai pheretima; HPLC; Characteristic chromatogram

地龙为常用动物类中药。2010年版《中国药典》(一部)收载地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 的干燥体, 第1种习称广地龙, 后3种称沪地龙^[1]。市场上流通的地龙药材主

要为广地龙, 沪地龙则主要在上海、浙江、江苏等地区使用^[2]。地龙具有清热定惊、通络、平喘、利尿、降压的功能^[3], 现代临床研究发现其具有显著的活血化瘀功效^[4-7]。姜文红等^[8]对13批广地龙药材的室温生理盐水浸提液进行了高效液相色谱(HPLC)分析, 建立了其HPLC指纹图谱, 确定了9个共有特征峰, 指认了3个成分, 即次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶。李峰等^[9]采用高效毛细管电泳法, 对10批广地龙与11批沪地龙的超声水提液进行研究, 建立了地龙药材的高效毛细管电泳特征图谱, 确定了8个共有峰, 指认了1个成分。地龙的传统用药方式为水煎煮, 但地龙水煎液的特征图谱研究未见文献报道, 且未明确广地龙与沪地龙的差异。为此, 本研究采用回流提取法模

Δ 基金项目: 国家科技重大专项课题——重大新药创制 (No.2009ZX09502-023)

* 博士。研究方向: 中药质量的化学与活性评价。电话: 0773-3568834。E-mail: huangshuai007@126.com

通信作者: 教授。研究方向: 中药质量评价及药效物质基础。电话: 010-82801693。E-mail: sqcai@bjmu.edu.cn

拟水煎煮,测定16批广地龙、8批沪地龙药材水煎液的HPLC特征图谱,建立地龙水煎液的HPLC特征图谱法,并通过将地龙与土鳖虫、水蛭、虻螂虫这3类动物药进行HPLC图谱比较,确定地龙HPLC特征图谱的专属性。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G1379在线真空脱气机、G1312A二元梯度泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1315B二极管阵列检测器(美国Agilent公司);BP211D型十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯集团);AR124CN型万分之一电子分析天平(美国奥豪斯公司);Milli-Q A10型超纯水机(美国密理博公司);TDL-5-A离心机(上海安亭科学仪器厂);FD8-10冷冻干燥机(美国赛默飞世尔公司);98-1-B系列电子调温电热套(天津泰斯特仪器有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

黄嘌呤(批号:10121906,纯度≥99%)、鸟苷(批号:10155650,纯度≥98%)均购于美国Alfa Aesar公司;尿苷(批号:073K1181,纯度≥99%)购自美国Sigma公司;次黄嘌呤(批号:20121017,纯度≥98%)、尿嘧啶(批号:LV70N39,纯度≥98%)、胸腺嘧啶(批号:LO10O18,纯度≥99%)、2'-脱氧肌苷(批号:532038,纯度≥98%)、2'-脱氧鸟苷(批号:LIAON37,纯度≥98%)、腺苷(批号:LK60M12,纯度≥99%)、肌苷(批号:LJ50M12,纯度≥99%)、色氨酸(批号:LCA0M26,纯度≥98%)均购于北京百灵威科技有限公司;乙腈(色谱纯,美国Fisher公司);氯化钠(分析纯,北京化工厂);水为超纯水。

1.3 药材

本试验共检测33份药材,详见表1、表2、表3。全部药材经北京大学药学院生药学研究室蔡少青教授分别鉴定为广地龙(*P. aspergillum*)(16份)、沪地龙(含通俗环毛蚓*P. vulgaris*、威廉环毛蚓*P. guillelmi*、栉盲环毛蚓*P. pectinifera* 3种)(8份)、地鳖(*Eupolyphaga sinensis* Walker)(3份)、水蛭(*Hirudo nipponica* Whitman)(3份)、虻螂(*Catharsius molossus* Linnaeus)(3份)的干燥虫体。凭证标本存放于北京大学药学院生药标本室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Purospher STAR RP-18(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水,梯度洗脱,程序详见表4;流速:0.6 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别称取对照品适量,精密称定,用超纯水溶解并稀释,配制尿嘧啶0.251 g/L、次黄嘌呤0.245 g/L、黄嘌呤0.248 g/L、尿苷1.010 g/L、胸腺嘧啶0.251 g/L、肌苷0.244 g/L、鸟苷0.249 g/L、2'-脱氧肌苷0.985 g/L、2'-脱氧鸟苷1.005 g/L、腺苷0.245 g/L、色氨酸0.248 g/L的对照品溶液。对照品溶液于4 ℃下保存,即得。

2.2.2 供试品溶液 精确称取各动物药材样品粉末(过40目筛)10.0 g,精密加入10倍量生理盐水,浸泡45 min,回流提取75 min,药液连同药渣以半径为3 cm、5 000 r/min离心10 min;取上清液,冷冻干燥,冻干粉密封于4 ℃下储存并保持干燥。

表1 16份广地龙药材来源及与广地龙对照特征图谱的相似度

Tab 1 Sources of 16 batches of Guangdong pheretima and the similarity to the comparative characteristic chromatogram of Guangdong pheretima

序号	生药名	编号	购入省市	产地	购入日期	相似度
1	广地龙	4404	广东广州荔湾区	广东	2004.2.15	0.986
2	广地龙	6319	广东广州荔湾区	广东	2009.10.15	0.864
3	广地龙	6612	广东深圳罗湖区	广东	2010.9.18	0.992
4	广地龙	7038	北京海淀区	广东	2012.11.10	0.983
5	广地龙	7039	北京海淀区	广东	2012.11.10	0.989
6	广地龙	7040	北京海淀区	广东	2012.11.10	0.977
7	广地龙	7041	北京海淀区	广东	2012.11.16	0.987
8	广地龙	7050	北京海淀区	广东	2012.12.8	0.988
9	广地龙	7051	北京海淀区	广东	2012.12.8	0.926
10	广地龙	7053	北京海淀区	广东	2012.12.8	0.871
11	广地龙	7054	北京海淀区	广东	2012.12.8	0.904
12	广地龙	7055	河北安国	广东	2012.12.8	0.965
13	广地龙	7211	广西	广西	2013.2.17	0.947
14	广地龙	7212	广西	广西	2013.2.17	0.973
15	广地龙	7276	广西	广东	2013.8.5	0.986
16	广地龙	7420	广西	广东	2013.9.2	0.957

表2 8份沪地龙药材来源及与沪地龙对照特征图谱的相似度

Tab 2 Source of 8 batches of Shanghai pheretima and the similarity to the comparative characteristic chromatogram of Shanghai pheretima

序号	生药名	编号	购入省市	产地	购入日期	相似度
1	沪地龙	7406	上海杨浦区	上海	2014.3.14	0.966
2	沪地龙	7407	上海嘉定区	上海	2014.3.14	0.968
3	沪地龙	7408	上海闸北区	上海	2014.3.14	0.989
4	沪地龙	7417	安徽亳州	上海	2014.3.31	0.971
5	沪地龙	7418	安徽亳州	上海	2014.3.31	0.859
6	沪地龙	7424	上海虹口区	上海	2014.4.8	0.980
7	沪地龙	7425	上海普陀区	上海	2014.4.8	0.982
8	沪地龙	7426	上海杨浦区	上海	2014.4.8	0.987

表3 土鳖虫、水蛭、虻螂虫各3批药材来源情况

Tab 3 Information of 3 batches of eupolyphaga, hirudo and catharsius

序号	生药名	编号	购入省市	产地	购入日期
1	土鳖虫	7032	北京海淀区	河南	2012.7.3
2	土鳖虫	7410	北京海淀区	河北	2014.3.31
3	土鳖虫	7411	北京海淀区	湖南	2014.3.31
4	水蛭	6895	北京海淀区	山东	2012.1.30
5	水蛭	7412	北京海淀区	江苏	2014.4.2
6	水蛭	7413	北京海淀区	江苏	2014.4.2
7	虻螂虫	6897	安徽亳州	河北	2011.3.10
8	虻螂虫	7421	安徽亳州	河北	2014.4.4
9	虻螂虫	7423	安徽亳州	河北	2014.4.4

按生药量0.15 g/ml,精确称取各样品冻干粉,用超纯水超声(功率:250 W,频率:35 kHz)处理5 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取次黄嘌呤、肌苷对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,次黄嘌呤、肌苷峰面积的RSD分别为0.16%、0.10%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取地龙(编号:7276)供试品溶液,按“2.1”

表4 梯度洗脱程序

Tab 4 Gradient elution procedure

时间,min	乙腈,%	水,%
0	1	99
10	1	99
20	3	97
25	8	92
32	20	80
45	20	80
50	50	50
60	100	0

项下色谱条件分别于配制0、3、9、12、18、24 h时进样检测,记录峰面积。结果,次黄嘌呤、肌苷峰面积的RSD分别为0.63%、0.26%,表明供试品溶液在24 h之内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取地龙(编号:7276)药材6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积。结果,次黄嘌呤、肌苷峰面积的RSD分别为2.77%、1.50%,表明本方法重复性良好。

2.4 样品测定及色谱峰的指认

取各动物药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件依次进样检测,记录色谱图,得到33批药材的HPLC图谱,所有样品平行测定2次,得到4张图谱数据。根据对照品的保留时间与UV图谱特征,指认了地龙HPLC图谱中11个主要色谱峰,分别为尿嘧啶(峰1)、次黄嘌呤(峰2)、黄嘌呤(峰3)、尿苷(峰4)、胸腺嘧啶(峰5)、肌苷(峰6)、鸟苷(峰7)、2'-脱氧肌苷(峰8)、2'-脱氧鸟苷(峰9)、腺苷(峰10)和色氨酸(峰11);其中,黄嘌呤(峰3)、腺苷(峰10)、尿苷(峰4)、鸟苷(峰7)和2'-脱氧鸟苷(峰9)是广地龙与沪地龙在峰面积大小上差异明确的峰。所有药材样品的测定均于2014年3—6月期间完成。

2.5 色谱峰的标定

2.5.1 相对保留时间的标定 以肌苷为参比峰,将各色谱峰保留时间与同一图谱中肌苷保留时间的比值作为各色谱峰的相对保留时间。

2.5.2 相对峰面积的标定 取肌苷对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进行测定,所得的峰面积作为1,计算24批地龙样品色谱图中各色谱峰的峰面积与对照品峰面积的比值,作为相对峰面积。

2.6 地龙HPLC特征图谱的建立与应用

2.6.1 地龙与其余3种动物药的HPLC特征图谱差异 将所得16批广地龙、8批沪地龙、3批土鳖虫、3批水蛭、3批蛭蟥虫药材的HPLC特征图谱(共33张图谱)以AIA格式分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004 A版》软件,采用多点校正进行色谱峰匹配,时间窗宽度设定为0.20 min,采用平均数法生成对照特征图谱。24批地龙样品的HPLC特征图谱详见图1,地龙与其余3种动物药的HPLC对照特征图谱详见图2。以峰高>2 mAU、峰面积>40的所有色谱峰(共58个峰)进行相似度计算,地龙各样品HPLC特征图谱与地龙对照特征图谱的相似度均大于0.85,结果详见表1、表2。地龙的对照特征图谱与土鳖虫、水蛭、蛭蟥虫的对照特征图谱差异极大,其相似度值依次仅为0.095、0.228、0.335。

2.6.2 广地龙与沪地龙HPLC对照特征图谱的相似性 将所

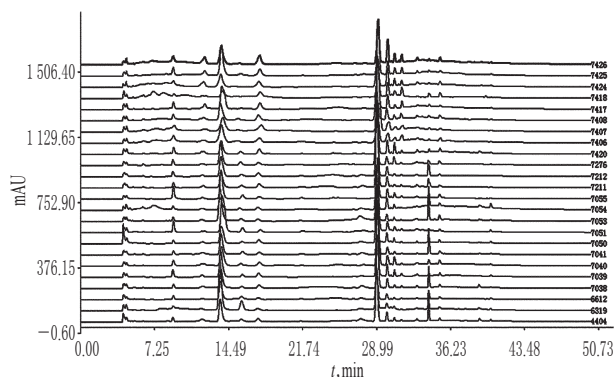


图1 24批地龙的HPLC特征图谱

Fig 1 HPLC specific chromatograms of 24 batches of pheretima

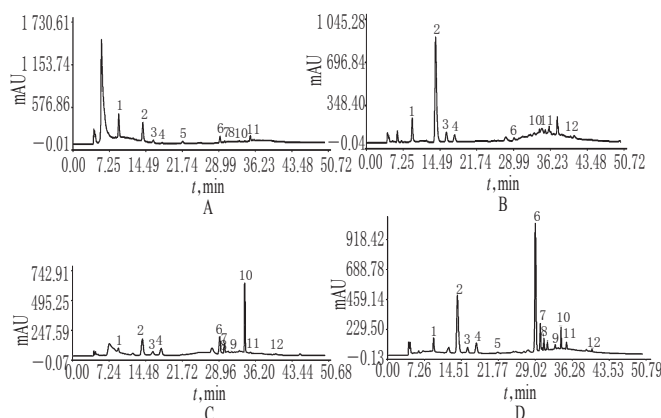


图2 地龙与其余3种动物药的HPLC对照特征图谱

A.土鳖虫;B.水蛭;C.蛭蟥虫;D.地龙

Fig 2 HPLC comparative characteristic chromatograms among pheretima and other 3 animal drugs

A.eupolyphaga;B.hirudo;C.catharsius;D. pheretima

得16批广地龙与8批沪地龙的HPLC特征图谱按“2.6.1”项下方法生成对照特征图谱,结果见图3。由图3可见,二者相似度为0.942,易见12个特征峰。

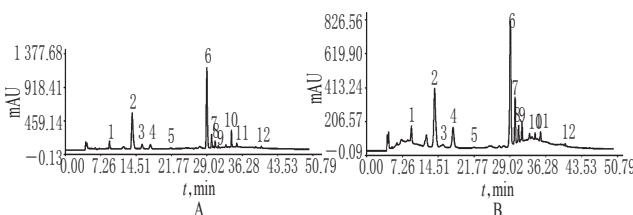


图3 广地龙与沪地龙的HPLC对照特征图谱

A.广地龙;B.沪地龙

Fig 3 HPLC comparative characteristic chromatograms between Guangdong pheretima and Shanghai pheretima

A.Guangdong pheretima;B.Shanghai pheretima

2.6.3 广地龙与沪地龙HPLC特征图谱的差异 选取广地龙与沪地龙特征图谱中12个特征峰,比较其在24批地龙样品中的相对保留时间与相对峰面积。

结果,广地龙中12个特征峰的相对保留时间范围为:峰1(0.31 min),峰2(0.47~0.48 min),峰3(0.54~0.55 min),峰4(0.60~0.61 min),峰5(0.74~0.75 min),峰6(1.00 min),峰7(1.03~1.04 min),峰8(1.06 min),峰9(1.08 min),峰10

(1.17~1.18 min),峰11(1.21 min),峰12(1.37~1.38 min)。沪地龙中12个特征峰的相对保留时间范围为:峰1(0.31 min),峰2(0.47~0.48 min),峰3(0.53~0.55 min),峰4(0.60~0.61 min),峰5(0.74~0.75 min),峰6(1.00 min),峰7(1.03 min),峰8(1.04~1.05 min),峰9(1.08 min),峰10(1.17 min),峰11(1.20~1.21 min),峰12(1.37~1.39 min)。

对16批广地龙与8批沪地龙的HPLC特征图谱中的12个特征峰的相对峰面积(按“2.5.2”中方法计算)进行 t 检验分析,结果广地龙中黄嘌呤(峰3)和腺苷(峰10)的峰面积值显著高于沪地龙;而沪地龙中尿苷(峰4)、鸟苷(峰7)和2'-脱氧鸟苷(峰9)的峰面积值显著高于广地龙。为了快速鉴别广地龙和沪地龙,笔者将地龙样品中尿苷、鸟苷及2'-脱氧鸟苷的相对峰面积值之和除以黄嘌呤及腺苷的相对峰面积值之和,构建出新指标 $S[S=(P4+P7+P9)/(P3+P10)]$, S 值可用于广地龙与沪地龙的鉴别。结果沪地龙样品中的 S 值范围为4.75~14.77,显著高于广地龙中的 S 值范围0.53~3.80。16份广地龙与8份沪地龙HPLC特征图谱中12个特征峰的相对峰面积及 S 指标散点图详见图4。

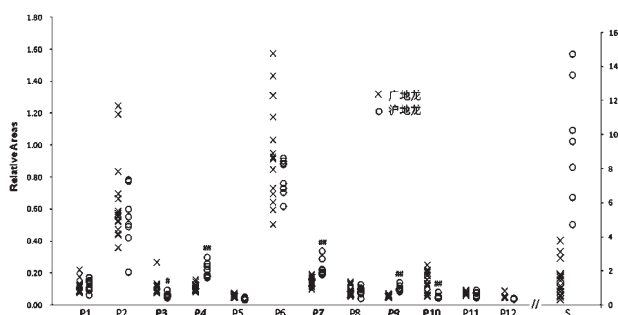


图4 16份广地龙与8份沪地龙HPLC特征图谱中12个特征峰的相对峰面积及 S 指标散点图

注:P1~P12,地龙样品色谱图中12个特征色谱峰的峰面积与对照品肌苷峰面积的比值; S 为 S 值峰4、峰7、峰9这3个相对峰面积之和与峰3、峰10这2个相对峰面积之和的比值; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$,广地龙与沪地龙成分峰面积具显著性差异;粗体色谱峰编号表示该峰面积广地龙显著高于沪地龙,粗斜体色谱峰编号表示该峰面积沪地龙显著高于广地龙

Fig 4 Scatter diagram of the relative peak areas of 12 special peaks in the HPLC characteristic chromatograms and the index S of 16 Guangdong pheretima and 8 Shanghai pheretima

Note: P1-P12, specific values of 12 special peaks to the peak values of reference inosine in the characteristic chromatograms; S , specific values of the sum areas of P4, P7 and P9 to the sum areas of P3 and P10; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, there were significant difference in the peak areas between Guangdong pheretima and Shanghai pheretima. The bold peak number indicates its peak area of Guangdong pheretima is significantly higher than Shanghai pheretima, whereas the bold italic peak number indicates its peak area of Shanghai pheretima is significantly higher than Guangdong pheretima.

3 讨论

3.1 地龙HPLC特征图谱可用于药材鉴别

2010年版《中国药典》(一部)仍采用性状、显微、薄层色谱的方法对地龙药材进行鉴别研究。为完善地龙药材真伪的鉴定方法,本研究建立了地龙药材的HPLC特征图谱法,指认了其中11个共有特征峰,为今后采用多成分含量测定的方法控制地龙质量提供了参考依据;同时,通过将地龙与土鳖虫、水蛭、虻螂虫3类动物药进行特征图谱比较,验证地龙特征图谱的专属性。结果表明,该特征图谱法可有效将地龙与同具活血化瘀功效的土鳖虫、水蛭、虻螂虫鉴别开来;根据特征图谱中特征峰峰面积值的差异,亦可将广地龙与沪地龙鉴别开来。

3.2 广地龙与沪地龙的成分差异

广地龙与沪地龙对照特征图谱的相似度为0.942,体现出二者化学成分的相似性,亦侧面验证了前人将这2类动物作为同一味中药使用的正确性。但是进一步的研究表明,这2类地龙在一些成分含量上存在着显著性差异。广地龙中黄嘌呤(峰3)和腺苷(峰10)的峰面积值显著高于沪地龙,而沪地龙中尿苷(峰4)、鸟苷(峰7)和2'-脱氧鸟苷(峰9)的峰面积值显著高于广地龙。

本研究建立了地龙的HPLC特征图谱,可用于鉴别相关的中药材,同时揭示了广地龙与沪地龙化学成分含量的差异,这为进一步开展2种地龙的化学和药效学差异研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:113.
- [2] 徐国钧,徐璐珊,王峰涛.常用中药材品种整理和质量研究:南方协作组:第3册[M].福州:福建科学技术出版社,1999:752.
- [3] 李承德,毛淑梅,康白,等.地龙降压蛋白对自发性高血压模型大鼠血管紧张素II及AT₁受体表达的影响研究[J].中国药房,2008,19(24):1850.
- [4] 郭丰涛,陈国根,赵可明,等.地龙液的临床应用及药理作用初步观察[J].中西医结合杂志,1988,8(7):400.
- [5] 李梅,李丽萍,张立国.中药地龙对血液流变学影响的临床研究[J].内蒙古中医药,2009,28(3):25.
- [6] 李娟,徐玉玲,王永香,等.地龙体外抗凝血部位的制备工艺研究[J].中国中药杂志,2011,36(7):850.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 李峰,王成芳,包永睿.地龙商品药材高效毛细管电泳特征图谱[J].中国医院药学杂志,2011,31(23):1916.

(收稿日期:2014-12-07 修回日期:2015-06-03)

(编辑:余庆华)