

## · 质量分析研究 ·

## 基于氨基酸类成分定量结合化学计量学评价不同产地的地龙质量

陈雪婷<sup>1</sup>, 张婷<sup>2</sup>, 王思丰<sup>2</sup>, 张建军<sup>1</sup>, 麦炳明<sup>1</sup>, 李绍林<sup>3</sup> [1. 广东省第二中医院/广东省中医药工程技术研究院, 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东广州 510095; 2. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东广州 510095; 3. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520]

**摘要:** **目的** 建立地龙氨基酸类成分含量测定方法, 评价不同产地的地龙质量。**方法** 采用高效液相色谱法测定 24 批不同产地地龙中氨基酸类成分含量, 并采用主成分分析(PCA)及偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)对地龙质量进行评价。**结果** 地龙中天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、酪氨酸在各自范围内线性关系良好( $r > 0.999$ ), 平均加样回收率为 98.73%~102.56%, RSD 在 1.93%~3.18% 范围内, 方法学验证符合《中国药典》含量测定的要求。PCA 分析提取到 3 个主成分, 累积方差贡献率为 82.493%, 其中两广地区产地龙综合得分较高, 排名靠前。PLS-DA 分析提示, 脯氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和色氨酸是影响地龙质量的主要差异性标志物。**结论** 基于氨基酸类成分定量结合化学计量学的评价方法, 可以用于不同产地的地龙质量差异研究。

**关键词:** 地龙; 氨基酸; 产地; 质量评价

**中图分类号:** R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2025)05-0791-07

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2025.05.014

## Quality Evaluation of Pheretima from Different Origins Based on Quantitative Analysis of Amino Acid Components Combined with Chemometrics

CHEN Xueting<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>2</sup>, WANG Sifeng<sup>2</sup>, ZHANG Jianjun<sup>1</sup>, MAI Bingming<sup>1</sup>, LI Shaolin<sup>3</sup> (1. Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital/Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 2. The Fifth Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 3. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To establish a method for determining the content of amino acid components in Pheretima and to evaluate the quality of pheretima from different origins. **Methods** The contents of amino acid components in 24 batches of Pheretima from different origins were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to evaluate the quality of Pheretima. **Results** Aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, arginine, proline, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tryptophan, phenylalanine, lysine, and tyrosine showed good linear relationships within their respective ranges ( $r > 0.999$ ). The average recovery rates ranged from 98.73% to 102.56%,

收稿日期: 2024-12-10

作者简介: 陈雪婷, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 中药质量评价与中药制剂研究开发。Email: 397095007@qq.com。通信作者: 张建军, 男, 博士, 主任中药师。研究方向: 中药制剂研究开发。Email: tiening1111@163.com。

基金项目: 广州中医药大学学院联合科技创新基金项目(GZYSE2024G06); 2023 年全国中药特色技术传承人才培养项目(T20234832005); 国家中医药管理局 2023 年中医药部门中央补助资金(中药创新能力提升项目)(粤中医办函[2023]26 号); 广东省中医药局科研项目(20231038)。

with RSD values ranging from 1.93% to 3.18%, meeting the requirements of the Chinese Pharmacopoeia for content determination. PCA extracted three principal components with a cumulative variance contribution rate of 82.493%. Pheretima samples from the Guangdong and Guangxi regions had higher comprehensive scores and ranked at the top. PLS-DA indicated that proline, methionine, histidine, alanine, phenylalanine, and tryptophan were the main differential markers affecting the quality of Pheretima. **Conclusion** The evaluation method based on quantitative analysis of amino acid components combined with chemometrics can be used to study the quality differences of Pheretima from different origins.

**Keywords:** Pheretima; amino acids; origin; quality evaluation

地龙药用历史悠久,始载于《神农本草经》,具有清热定惊、通络、平喘、利尿的功效<sup>[1-2]</sup>,广泛应用于治疗高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肢体麻木、半身不遂、肺热喘咳、水肿尿少等病症<sup>[3-5]</sup>。《中国药典》2020年版中规定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”,后三种习称“沪地龙”。

目前在2020年版《中国药典》对于地龙的评价中仅收录了性状、鉴别、检查等项目,暂无定量评价指标。研究<sup>[6-9]</sup>显示,地龙的醇、水提取物均具有明确的抗凝血活性。地龙本身富含蛋白质类成分,以干体计高达56%~66%<sup>[5]</sup>。氨基酸是蛋白质的基本组成单元,同时又是地龙发挥抗凝血作用的主要活性成分<sup>[10]</sup>,因此对地龙中氨基酸类成分展开研究具有重要的价值。本研究拟采用柱前衍生法结合高效液相色谱技术测定不同产地24批地龙中氨基酸类成分的含量,并利用主成分分析(PCA)及偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等化学模式识别法分析不同产地地龙的质量差异,以期对地龙的质量评价以及药效物质基础研究提供更多实验数据支持。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** Waters Arc HPLC 高效液相色谱仪,美国沃特世公司;HH-8型电热数显恒温水浴锅,上海力辰仪器科技有限公司;TLE204型电子天平、S210 pH计,梅特勒-托利多仪器有限公司;KQ-300DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

**1.2 材料** 谷氨酸(Glu,批号:23040403,纯度:99.89%)、丝氨酸(Ser,批号:23110306,纯度:99.56%)、甘氨酸(Gly,批号:23040409,纯度:

99.49%)、精氨酸(Arg,批号:22122207,纯度:99.46%)、脯氨酸(Pro,批号:20070201,纯度:99.12%)、丙氨酸(Ala,批号:23011104,纯度:99.82%)、亮氨酸(Leu,批号:23040410,纯度:99.92%)、缬氨酸(Val,批号:22021710,纯度:99.66%)、异亮氨酸(Ile,批号:20071003,纯度:98.98%)、色氨酸(Trp,批号:24013104,纯度:99.98%)、组氨酸(His,批号:24013108,纯度:99.96%)、苯丙氨酸(Phe,批号:20111608,纯度:99.93%)、赖氨酸(Lys,批号:210812,纯度:98.21%)、酪氨酸(Tyr,批号:24020107,纯度:99.68%)、天冬氨酸(Asp,批号:23012101,纯度:99.38%)、甲硫氨酸(Met,批号:23050728,纯度:99.45%),成都格利普生物科技有限公司;N,N-二甲基甲酰胺、2,4-二硝基氟苯、磷酸二氢钾、氢氧化钠、醋酸钠、醋酸、碳酸氢钠均为分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;乙腈为色谱纯,美国赛默飞公司;超纯水。

24批地龙样品采集于多个地区,经广东省第二中医院张建军主任中药师鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen 的干燥体,按采集顺序依次编号,样品详细来源信息见表1。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取地龙粉末约1g,精密称定,置具塞锥形瓶中;加水50mL静置60min后,称定质量;超声(功率250W,频率40kHz)处理60min,放冷称质量,加水补足减失质量,滤过,取续滤液备用。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别取16种氨基酸对照品适量,精密称定,加水制成1mL含谷氨酸0.872mg、丝氨酸1.398mg、甘氨酸0.161mg、精氨酸1.104mg、

表 1 24批地龙样品来源信息

Table 1 Source information of 24 batches of Pheretima samples

编号	产地	编号	产地
S1	越南边和市	S13	中国广东省高州市
S2	中国海南省琼中县	S14	中国广东省梅州市
S3	中国广西壮族自治区玉林市	S15	中国广西壮族自治区梧州市
S4	中国海南省琼中县	S16	中国广东省梅州市
S5	中国海南省昌江县	S17	中国广西壮族自治区玉林市
S6	中国广西壮族自治区北海市	S18	中国广东省湛江市
S7	中国上海市	S19	中国广东省湛江市
S8	越南边和市	S20	中国广西壮族自治区百色市
S9	中国上海市	S21	中国广西壮族自治区钦州市
S10	泰国华欣市	S22	中国广西壮族自治区玉林市
S11	中国广东省湛江市	S23	中国广东省普宁市
S12	中国上海市	S24	中国广西壮族自治区柳州市

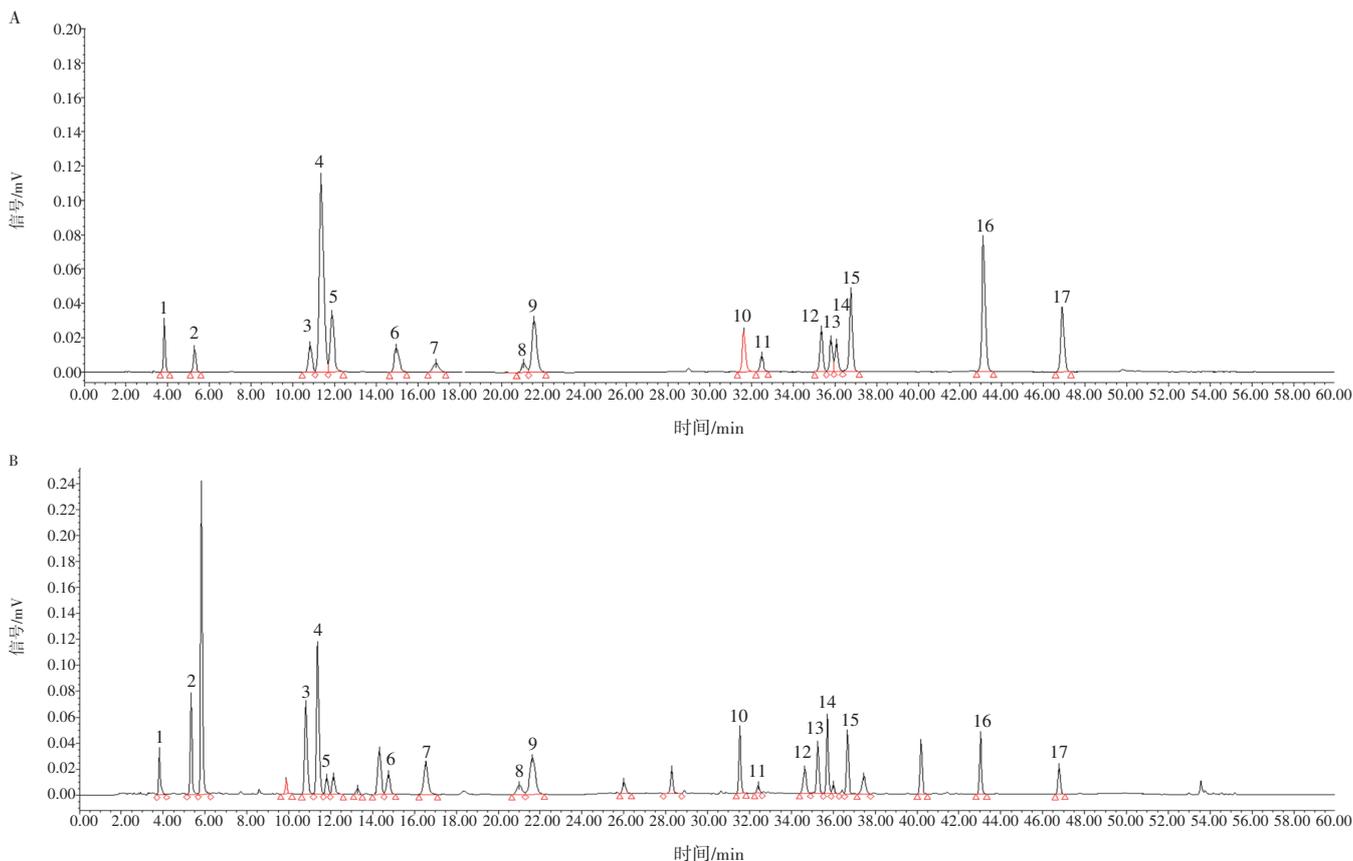
脯氨酸0.288 mg、丙氨酸0.187 mg、亮氨酸1.384 mg、缬氨酸0.736 mg、异亮氨酸0.782 mg、色氨酸1.198 mg、组氨酸0.289 mg、苯丙氨酸0.674 mg、赖氨酸2.076 mg、酪氨酸7.784 mg、天冬氨酸0.934 mg、甲硫氨酸0.146 mg的混合对照品溶液。

**2.3 衍生化反应** 参考前人研究方法<sup>[11-13]</sup>进行衍生化反应。精密量取供试品溶液、混合对照品溶液各1 mL置10 mL量瓶中，依次加入0.5 mol·L<sup>-1</sup>的碳酸氢钠溶液1 mL、1% 2,4-二硝基氟苯的乙腈溶液0.5 mL，60 °C水浴恒温1 h。放冷后加入pH7.0磷酸盐缓冲液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液即得。

**2.4 色谱条件** 色谱柱：Venusil AA(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相：乙腈(A)-N，N-二甲基甲酰胺-0.025 mol·L<sup>-1</sup>醋酸钠(1：100，乙酸调pH6.0)(B)，梯度洗脱(0~6 min，10%~15%A；6~20 min，15%A；20~21 min，15%~20%A；21~45 min，20%~45%A；45~50 min，45%~80%A；50~60 min，80%A)。进样体积5 μL，流速1 mL·min<sup>-1</sup>，柱温40 °C，检测波长360 nm。混合对照品溶液、供试品溶液色谱图见图1。

**2.5 方法学考察**

**2.5.1 线性关系试验** 将“2.2”项下的混合对照品溶液加水逐级稀释后，按“2.4”项下色谱条件进样测定。以各成分峰面积(Y)为纵坐标，进样浓度(X，



注：1. 天冬氨酸；2. 谷氨酸；3. 丝氨酸；4. 衍生剂；5. 组氨酸；6. 甘氨酸；7. 精氨酸；8. 脯氨酸；9. 丙氨酸；10. 缬氨酸；11. 甲硫氨酸；12. 异亮氨酸；13. 亮氨酸；14. 色氨酸；15. 苯丙氨酸；16. 赖氨酸；17. 酪氨酸。

图 1 混合对照品溶液(A)及供试品溶液(B)色谱图

Figure 1 Chromatogram of the mixed reference solution(A) and test solution(B)

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标进行线性回归,得到标准曲线方程、相关系数及线性范围。结果(见表2)显示,16种氨基酸类成分在相应浓度范围内呈良好的线性关系。

表2 线性关系考察结果

Table 2 Results of linear relationship examination

成分	标准曲线	相关系数	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
谷氨酸	$Y=26\ 135X-267\ 322$	0.999 2	1.74 ~ 87.20
丝氨酸	$Y=39\ 086X-1\ 124\ 055$	0.999 5	2.80 ~ 139.80
甘氨酸	$Y=29\ 605X-1\ 062\ 840$	0.999 6	0.32 ~ 16.14
精氨酸	$Y=12\ 377X+93\ 494$	0.999 1	2.21 ~ 110.40
脯氨酸	$Y=20\ 586X-1\ 320\ 527$	0.999 0	0.58 ~ 28.80
丙氨酸	$Y=32\ 691X-2\ 028\ 874$	0.999 3	3.74 ~ 186.80
亮氨酸	$Y=26\ 329X-543\ 394$	0.999 5	2.77 ~ 138.40
缬氨酸	$Y=18\ 391X-104\ 561$	0.999 4	1.47 ~ 73.60
异亮氨酸	$Y=14\ 372X+26\ 749$	0.999 7	1.56 ~ 78.20
色氨酸	$Y=11\ 641X-298\ 887$	0.999 5	2.40 ~ 119.80
组氨酸	$Y=17\ 710X-693\ 211$	0.999 1	0.58 ~ 28.87
苯丙氨酸	$Y=17\ 576X-884\ 764$	0.999 4	1.35 ~ 67.40
赖氨酸	$Y=18\ 919X-2\ 207\ 754$	0.999 3	4.15 ~ 207.60
酪氨酸	$Y=2\ 419.5X-214\ 329$	0.999 2	15.57 ~ 778.40
天冬氨酸	$Y=20\ 850X-432\ 627$	0.999 2	1.87 ~ 93.40
甲硫氨酸	$Y=17\ 426X-224\ 202$	0.999 2	0.29 ~ 14.55

**2.5.2 精密度试验** 吸取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.4”项下色谱条件连续进样6次测定。结果显示,16种氨基酸峰面积的RSD范围为0.59%~1.02%,表明仪器精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一地龙供试品溶液(S2),分别于衍生化反应后0、2、4、8、12、24 h,按“2.4”项下色谱条件进样测定。结果显示,16种氨基酸峰面积的RSD范围为1.32%~2.58%,表明供试品溶液衍生化反应后的产物在24 h内稳定性良好。

**2.5.4 重复性试验** 取同一批地龙粉末(S2)6份,分别制备供试品溶液及进行衍生化反应后,按“2.4”项下色谱条件进样测定。16种氨基酸峰面积的RSD范围为1.05%~1.89%,表明方法重复性良好。

**2.5.5 加样回收率试验** 取已知氨基酸含量的地龙(S2)粉末9份置于具塞锥形瓶中,按样品中各成分含量的50%、100%、150%加入对照品,分别制备供试品溶液及进行衍生化反应。按“2.4”项下色谱条件进样测定,计算得到16种氨基酸的平均加样回收率为98.73%~102.56%,RSD范围为1.93%~3.18%,表明方法准确度良好。

**2.6 样品含量测定** 分别取24批地龙粉末约1 g,精密称定,制备供试品溶液及进行衍生化反应后,按“2.4”项下色谱条件进样测定。16种氨基酸平均含量

结果见表3。

**2.7 主成分分析** 参考前人方法<sup>[14-15]</sup>进行主成分分析。将24批不同产地地龙药材中16种氨基酸含量数据进行标准化处理后导入SPSS 27.0.1软件进行主成分分析。结果(见表4)显示,得到主成分特征值及方差贡献率,系统自动提取到3个主成分,特征根值均大于1,3个主成分的方差贡献率分别是60.077%、12.106%、10.310%,累积方差贡献率为82.493%。表明3个主成分可以代表绝大部分变量信息。

因子载荷矩阵见表5。结果显示,天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸对主成分1贡献度高,甘氨酸、脯氨酸对主成分2贡献度高,组氨酸、酪氨酸对主成分3贡献度高。

再根据下列主成分得分公式计算 $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 及综合得分 $Y$ ,具体公式如下:

$$Y_1=0.285X_1+0.277X_2+0.184X_3+0.194X_4-0.224X_5+0.286X_6+0.137X_7+0.211X_8+0.297X_9+0.229X_{10}+0.308X_{11}+0.314X_{12}+0.242X_{13}+0.289X_{14}+0.291X_{15}+0.118X_{16} \quad (1)$$

$$Y_2=-0.201X_1-0.069X_2-0.272X_3+0.232X_4+0.440X_5-0.126X_6+0.618X_7+0.085X_8+0.147X_9-0.090X_{10}+0.066X_{11}+0.018X_{12}+0.293X_{13}+0.175X_{14}-0.248X_{15}+0.129X_{16} \quad (2)$$

$$Y_3=0.187X_1-0.123X_2-0.376X_3-0.469X_4+0.157X_5-0.086X_6-0.085X_7-0.405X_8+0.011X_9+0.478X_{10}+0.039X_{11}+0.075X_{12}+0.135X_{13}+0.170X_{14}+0.111X_{15}+0.301X_{16} \quad (3)$$

$$Y=0.728Y_1+0.147Y_2+0.125Y_3 \quad (4)$$

公式(1)、(2)、(3)中的 $X_1\sim X_{16}$ 分别是天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、酪氨酸含量的标准化数据。结果见表6。综合得分排名靠前的为广西、广东地区地龙,两广地区气候、地理环境相似,地龙的品质相对接近,而越南产药材则质量相对较差。

**2.8 偏最小二乘法判别分析** 参考前人研究<sup>[16-21]</sup>进一步探索不同产地地龙药材间差异性氨基酸类成分。将地龙含量数据导入SIMCA 14.1统计软件进行偏最小二乘法判别分析,得到样品得分图,见图2。可以较为明显地区分不同产地的地龙样品。以变量重要性投影(VIP)>1为筛选标准,得到6个主要差异成分,分别是脯氨酸(VIP=1.565)、甲硫氨酸(VIP=1.424)、组氨酸(VIP=1.312)、丙氨酸(VIP=1.207)、苯丙氨酸(VIP=1.100)、色氨酸(VIP=1.089),提示以上成分可能为地龙的潜在质量标志物,见图3。

表 3 24 批地龙药材中 16 种氨基酸平均含量测定结果 (mg·g<sup>-1</sup>, n=3)

Table 3 Results of average content determination of 16 amino acids in 24 batches of Pheretima medicinal materials (mg·g<sup>-1</sup>, n=3)

编号	天冬氨酸	谷氨酸	丝氨酸	组氨酸	甘氨酸	精氨酸	脯氨酸	丙氨酸	缬氨酸	甲硫氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	色氨酸	苯丙氨酸	赖氨酸	酪氨酸	总量
S1	1.164	0.824	1.637	1.759	1.744	0.687	2.513	2.970	0.657	0.933	0.375	1.498	1.598	2.589	5.406	6.171	32.525
S2	1.494	1.417	1.893	1.860	1.950	1.532	3.011	4.509	1.637	0.812	1.159	2.275	1.673	2.978	5.543	5.791	39.534
S3	1.399	1.343	2.038	1.960	1.956	1.786	2.952	4.205	1.641	0.872	1.106	2.382	1.763	3.054	6.084	7.060	41.601
S4	1.451	1.368	2.877	2.115	1.942	2.953	2.997	4.258	1.457	0.771	0.999	2.240	1.763	3.012	5.768	6.634	42.605
S5	1.471	1.587	1.792	2.111	1.826	1.952	2.987	4.605	1.296	0.774	0.865	2.063	1.709	2.946	5.514	6.378	39.874
S6	1.580	0.716	2.184	2.175	2.005	1.316	3.324	4.742	1.838	0.757	1.344	2.359	1.676	2.889	5.945	6.201	41.052
S7	1.414	1.461	2.264	2.044	1.820	1.469	2.896	4.661	1.261	0.757	0.822	1.960	1.632	2.735	5.744	5.408	38.347
S8	1.178	0.645	1.643	1.702	1.695	0.672	2.437	2.875	0.660	0.828	0.369	1.487	1.582	2.717	5.411	6.604	32.506
S9	1.372	1.238	2.245	1.924	1.968	2.672	3.050	4.198	1.219	0.769	0.770	1.978	1.770	2.976	5.579	6.213	39.941
S10	1.388	1.173	3.506	1.863	1.648	2.029	2.552	3.762	0.978	0.728	0.587	1.819	1.473	2.496	5.409	5.673	37.082
S11	1.422	1.477	2.073	2.046	2.098	1.878	3.233	4.164	1.723	0.990	1.250	2.362	1.859	3.236	5.731	6.983	42.525
S12	1.483	1.421	1.909	1.955	1.907	1.275	2.744	3.508	1.124	0.878	0.848	1.885	1.718	2.956	5.656	7.413	38.679
S13	1.426	1.270	2.427	2.060	2.201	3.838	3.105	4.103	1.439	0.970	0.935	2.401	1.989	3.399	6.081	10.638	48.281
S14	1.471	1.454	2.184	2.134	2.095	2.244	3.277	4.228	1.754	0.879	1.308	2.443	1.794	3.191	5.578	6.194	42.228
S15	1.496	1.494	2.311	2.079	2.048	2.202	3.196	4.270	1.548	0.831	1.116	2.251	1.814	3.071	5.734	27.529	62.992
S16	1.500	1.603	2.617	2.141	1.993	2.652	3.175	4.448	1.590	0.902	1.193	2.476	1.901	3.221	5.857	7.805	45.074
S17	1.521	1.664	2.218	2.115	2.127	2.140	3.373	4.466	1.856	0.868	1.385	2.463	1.823	3.144	5.846	7.503	44.513
S18	1.449	1.473	2.122	2.003	1.961	2.184	3.153	4.468	1.763	0.887	1.223	2.462	1.772	3.110	5.768	7.139	42.937
S19	3.680	2.608	3.269	2.094	/	5.822	3.022	4.910	2.918	1.399	2.642	4.201	2.027	3.868	10.871	15.288	68.619
S20	1.844	2.520	4.785	2.444	/	5.302	2.839	5.283	1.846	0.828	1.599	2.767	1.909	3.336	7.637	6.560	51.499
S21	2.068	1.620	2.300	2.160	/	3.100	3.087	6.850	2.103	0.924	1.527	2.946	1.688	3.064	7.917	8.536	49.889
S22	1.321	1.245	2.310	2.216	1.901	1.295	3.045	4.465	1.232	0.873	0.827	1.924	1.766	2.921	5.622	7.115	40.079
S23	1.232	1.592	1.910	2.219	1.930	1.331	2.929	4.338	1.227	0.854	0.848	2.036	1.801	2.950	5.970	7.793	40.961
S24	1.285	1.457	2.040	1.965	1.979	1.453	3.119	4.238	1.359	0.878	0.950	2.099	1.779	2.910	5.688	6.443	39.643

表 4 主成分特征值及方差贡献率

Table 4 Principal component eigenvalues and variance contribution rate

主成分	特征根	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.612	60.077	60.077
2	1.937	12.106	72.183
3	1.650	10.310	82.493
4	1.021	6.381	88.874
5	0.757	4.730	93.604
6	0.379	2.371	95.975
7	0.224	1.399	97.374
8	0.201	1.257	98.631
9	0.079	0.493	99.124
10	0.065	0.405	99.529
11	0.034	0.210	99.738
12	0.024	0.149	99.887
13	0.013	0.079	99.966
14	0.003	0.019	99.985
15	0.002	0.012	99.997
16	0.000	0.003	100.000

表 5 因子载荷矩阵表

Table 5 Factor loading matrix table

指标	主成分 1	主成分 2	主成分 3
天冬氨酸	0.885	-0.279	0.241
谷氨酸	0.859	-0.096	-0.158
丝氨酸	0.571	-0.378	-0.483
组氨酸	0.602	0.323	-0.602
甘氨酸	-0.695	0.613	0.201
精氨酸	0.887	-0.176	-0.111
脯氨酸	0.425	0.860	-0.109
丙氨酸	0.655	0.119	-0.520
缬氨酸	0.921	0.204	0.014
甲硫氨酸	0.710	-0.126	0.614
异亮氨酸	0.954	0.092	0.051
亮氨酸	0.973	0.025	0.096
色氨酸	0.750	0.407	0.173
苯丙氨酸	0.895	0.244	0.218
赖氨酸	0.903	-0.345	0.143
酪氨酸	0.366	0.179	0.587

表 6 主成分得分、综合得分及排名结果

Table 6 Principal component scores, comprehensive scores, and ranking results

编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合得分	排名/位
S1	-4.844	-2.256	1.677	-3.401	23
S2	-4.538	-2.089	1.689	-0.675	16
S3	-3.157	-2.914	-1.106	-0.233	11
S4	-1.718	-0.525	-1.069	-0.300	13
S5	-1.865	-0.687	0.909	-0.800	18
S6	-1.391	0.176	-0.140	-0.294	12
S7	-1.034	0.290	-0.718	-1.462	21
S8	-1.093	0.614	-0.713	-3.649	24
S9	-0.996	0.119	0.265	-1.005	19
S10	-1.084	0.586	0.229	-2.865	22
S11	-0.888	0.533	-0.440	0.683	8
S12	-0.261	0.070	-0.962	-1.345	20
S13	-0.528	1.424	-0.950	1.035	4
S14	-0.451	0.188	0.546	0.548	9
S15	0.238	0.850	0.224	0.735	7
S16	0.467	1.506	-0.100	0.914	5
S17	0.508	1.433	0.818	0.906	6
S18	0.493	1.605	1.121	0.326	10
S19	0.914	1.783	-0.168	7.733	1
S20	1.058	1.141	-0.187	3.003	2
S21	1.005	1.200	1.018	2.236	3
S22	3.539	-1.042	-1.505	-0.795	17
S23	5.111	-2.010	-3.393	-0.623	14
S24	10.514	-1.997	2.955	-0.675	15

### 3 讨论

本研究中，因大多数的氨基酸缺乏紫外吸收，故需要通过加入衍生化试剂对样品进行衍生化反应处理，再通过高效液相色谱进行分离测定。本试验同时对比了邻苯二甲醛(OPA)、异硫氰酸苯酯(PITC)、2,4-二硝基氟苯(FDNB)作为衍生剂的处理效果。结果显示，FDNB在NaHCO<sub>3</sub>形成的弱碱性环境中，能同时与一、二级氨基酸生成稳定的衍生物<sup>[22]</sup>，生成的物质在360 nm有强紫外吸收。该方法衍生条件最为温和，样品制备简便，耗时最短，色谱峰丰富。本试验还对不同流动相体系[乙腈-醋酸钠(A)-乙腈-水(B)、乙腈-磷酸二氢钾等]、色谱柱、不同洗脱程序及衍生剂用量分别进行了考察，最终确定采用Venusil AA(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱，乙腈-N,N-二甲基甲酰胺-0.025 mol·L<sup>-1</sup>醋酸钠(1:100, 乙酸调pH6.0)为流动相梯度洗脱，2,4-二硝基氟苯作为衍生试剂，用量为样品检测取样量的0.5%，所得色谱图基线平稳、色谱峰数量、峰型、分离度均比较理想。

本研究对24批不同产地地龙进行了氨基酸含量测定。结果显示，泰国、越南地区16种氨基酸的总含量为32.506~37.082 mg·g<sup>-1</sup>，海南、上海地区16种

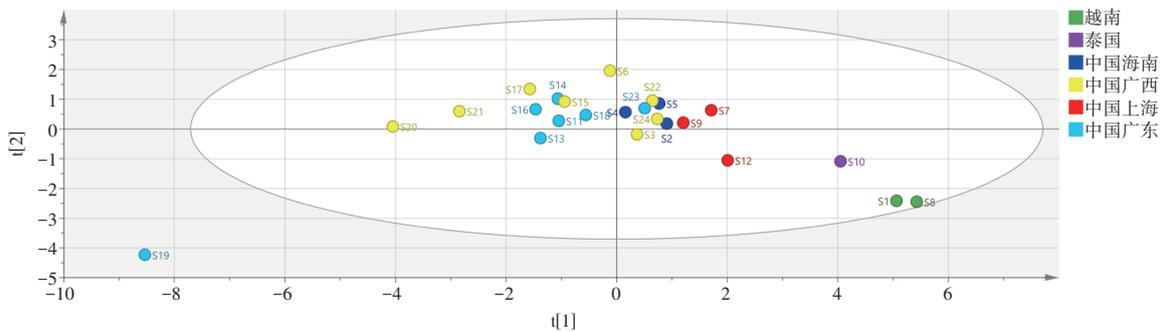


图 2 PLS-DA 得分图

Figure 2 PLS-DA score plot

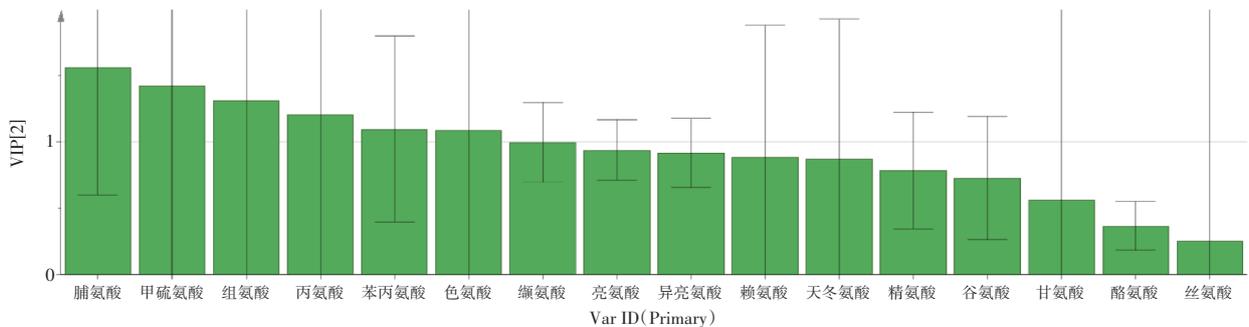


图 3 PLS-DA VIP 图

Figur 3 PLS-DA VIP diagram

氨基酸的总含量为 38.347~42.605 mg·g<sup>-1</sup>, 广西、广东地区 16 种氨基酸的总含量为 39.643~68.619 mg·g<sup>-1</sup>, 不同产地地龙氨基酸含量差异较大, 同一产地不同批次间也存在区别, 其中以广西、广东地区产地龙含量较高。PCA 分析提取到 3 个主成分, 累积方差贡献率达到 82.493%, 对地龙质量评价具有很好的代表性, 主成分综合得分排名靠前的是广西、广东地区, 海南、上海地区居中, 泰国、越南得分最低, 与地龙氨基酸含量测定结果基本一致。认为地理环境、气候及养殖方式可能是造成地龙氨基酸类成分含量差异的主要原因。PLS-DA 分析提示脯氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸可能为地龙的潜在质量标志物, 建议将上述成分作为评价指标纳入地龙质量控制标准。

综上所述, 本试验建立了地龙氨基酸类成分的含量测定方法, 并对不同产地地龙进行了质量评价, 其不仅可以作为现有质量标准的补充, 更是为地龙药效物质基础的进一步挖掘提供了实验数据支持, 可为地龙资源的进一步合理开发和利用提供更多借鉴。

### 参考文献:

- [1] 关水清, 周改莲, 文建军, 等. 地龙本草考证及炮制方法历史沿革[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(7): 167-175.
- [2] 张湘苑, 张伟, 方晓蕾, 等. 重构本草——地龙[J]. 吉林中医药, 2024, 44(2): 211-213.
- [3] 黄敬文, 高宏伟, 段剑飞. 地龙的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2018, 24(12): 104-107.
- [4] 王艳丽, 宁宇, 丁莹. 地龙的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2022, 39(12): 86-89.
- [5] 刘亚明, 郭继龙, 刘必旺, 等. 中药地龙的活性成分及药理作用研究进展[J]. 山西中医, 2011, 27(3): 44-45.
- [6] MIHARA H, SUMI H, AKAZAWA T. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm[J]. Thromb Haemostas, 1983, 50: 258-263.
- [7] 杨新. 地龙抗凝血活性物质研究进展[D]. 武汉: 江汉大学, 2017.
- [8] 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.
- [9] 万明, 杨新, 张涛, 等. 沪地龙抗凝血活性部位分离研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 49-53.
- [10] 王辙远, 张璠璠, 于晓涛, 等. 地龙提取物制备工艺优化对其抗凝血作用及氨基酸含量的影响[J]. 新中医, 2022, 54(14): 1-6.
- [11] 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): 1350-1353.
- [12] 刘潇潇, 周颖仪, 杨立伟, 等. 清开灵系列制剂的氨基酸色谱指纹图谱[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2537-2542.
- [13] 田连起, 乐智勇, 曹晖, 等. 中药蕲蛇不同部位及不同饮片规格中氨基酸分析[J]. 中医学报, 2019, 34(6): 1265-1270.
- [14] 魏伟, 鲁露杰, 钱怡洁, 等. 不同产地苘麻子质量评价[J]. 中成药, 2024, 46(6): 1977-1981.
- [15] 刘哲, 刘孟奇, 黄艳梅, 等. 基于多指标成分定量结合化学计量学评价不同产地和不同采收期桔梗质量[J]. 中草药, 2024, 55(13): 4516-4525.
- [16] 梅春梅, 陈富贵, 赵雨薇, 等. 不同产地太白贝母中 11 种核苷与碱基类成分分析及产地差异研究[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(3): 411-418.
- [17] 武琴园, 王琴, 董梅, 等. 基于 HPLC 多成分定量结合化学模式识别分析不同产地蒺藜质量差异[J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 792-799.
- [18] 李国卫, 胡绮萍, 童培珍, 等. 基于氨基酸及特征肽测定的不同产地鸡内金质量研究[J]. 世界中医药, 2024, 19(15): 2230-2236.
- [19] 赵建军, 雍婧姣, 路宗志, 等. 基于氨基酸类成分的不同产地甘草质量差异分析[J]. 中药材, 2024, 47(3): 661-664.
- [20] 陈巍, 杨海峰, 陈毓, 等. 基于多指标成分定量联合多元统计分析评价不同产地鹅不食草药材质量[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(9): 1573-1583.
- [21] 闫倩倩, 王建成, 张文艳. 基于多指标成分定量联合化学计量学、加权 TOPSIS 与灰色关联度融合模型评价不同产地缬草药材质量[J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1305-1315.
- [22] 尚颖颖, 杨玲娟. 2, 4-二硝基氟苯柱前衍生测定植物样中的甲硫氨酸[J]. 福建分析测试, 2023, 32(2): 5-10.

(编辑: 沈崇坤)