

基于UPLC-Q-Exactive-MS及多种技术研究威廉环毛蚓提取物化学成分组成

宇泉霖¹, 宋嘉佳¹, 李寒冰¹, 李敏枫¹, 檀世祖¹, 蒋巧萍¹, 王天舒¹, 蔡程科^{1*}, 王洪飞^{2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102400

2. 北京量子高科制药有限公司, 北京 102200

摘要: 目的 对威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* 提取物中化学成分和蛋白质、游离氨基酸、脂质、总糖、多种元素、水分、灰分及硫酸铵等成分进行质量分数测定。方法 采用UPLC-Q-Exactive-MS技术探究威廉环毛蚓提取物化学组成; 采用仲裁法——凯氏定氮法对蛋白质质量分数进行测定; 采用索氏抽提法测定脂质的质量分数, 采用皂化及甲基化法测定各脂肪酸的质量分数; 采用ICP-MS及ICP-OES技术测定23种元素的质量分数; 采用《中国药典》2020年版中烘干法和总灰分测定法测定水分和总灰分的质量分数; 采用离子色谱法测定硫酸铵的质量分数。结果 共鉴定出54种化学物质, 主要为氨基酸类、核苷类及有机酸类等成分; 蛋白质的质量分数为53.01%, 游离氨基酸为4.18%; 脂质为5.62%, 其中总脂肪酸质量分数为1.23%; Mo、Se、As、V、Mn、Co、Ni、Pb、Sn、Cd、Cr、Cu、Li、B、Fe、Zn、Al、K、Ca、Mg、Na、Hg、Si等元素质量分数分别为2.65、4.88、2.31、1.12、25.2、8.32、2.39、1.59、0.0572、9.27、43.7、27.7、0.642、1.33、759、185、245、614、 3.28×10^3 、970、 1.32×10^3 、0.191、433 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 总糖质量分数为11.42%; 水分4.05%、总灰分2.36%; 硫酸铵9.89%。结论 基本确定威廉环毛蚓提取物中大部分成分组成。

关键词: 威廉环毛蚓; 蛋白质; 脂质; 脂肪酸; 元素; 水分; 总灰分; 硫酸铵; 成分分析

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 06-1285-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.013

Probing chemical composition of *Pheretima guillelmi* extracts based on UPLC-Q-Exactive-MS and various techniques

YU Quanlin¹, SONG Jiajia¹, LI Hanbing¹, LI Minfeng¹, TAN Shizu¹, JIANG Qiaoping¹, WANG Tianshu¹, CAI Chengke¹, WANG Hongfei²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

2. Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Technical Co., Ltd., Beijing 102200, China

Abstract: Objective To explore and study the chemical composition and the content of protein, free amino acid, lipid, total sugar, many elements, moisture, ash and ammonium sulphate in the extract of *Pheretima guillelmi*. Clarify its main material composition and promote the development and application of its preparations. **Methods** UPLC-Q-Exactive-MS technique was used to investigate the chemical composition of the extract of *P. guillelmi*; Kjeldahl nitrogen determination was used as an arbitration method for the determination of proteins, Soxhlet extraction was used to determine the content of lipids, and saponification and methylation were used to determine the content of each fatty acid; ICP MS and ICP-OES techniques for the determination of 23 elements; Moisture and total ash content were determined using the drying method and total ash determination method of the Chinese Pharmacopoeia (2020 edition); And ion chromatography for the determination of ammonium sulfate. **Results** A total of 54 chemical substances were identified, which were categorized into amino acid, nucleoside and organic acid components, of which the content of protein was 53.01%, the content of lipids was 5.62%, the content of free amino acid was 4.18%, the total fatty acid content was 1.23%. Mo, Se, As, V, Mn, Co, Ni, Pb, Sn, Cd, Cr, Cu, Li, B, Fe, Zn, Al, K, Ca, Mg, Na, Hg, and Si were 2.65, 4.88, 2.31, 1.12, 25.2, 8.32, 2.39, 1.59, 0.057 2, 9.27, 43.7, 27.7, 0.642, 1.33, 759, 185, 245, 614, 3.28×10^3 , 970, 1.32×10^3 , 0.191, and 433 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Total sugar content was 11.42%, moisture was 4.05%, total ash was 2.36%, and ammonium sulfate content was 9.89%. **Conclusion** The contents

收稿日期: 2024-03-13

基金项目: 国家科技重大专项研发项目(2011ZX09201-201); 北京市科技计划专项研发项目(Z16010101390)

第一作者: 宇泉霖(2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究。E-mail: ddyuquanlin@163.com

*通信作者: 蔡程科(1971—), 男, 博士, 教授, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。E-mail: cck98@126.com

王洪飞(1963—), 男, 博士, 主要从事药物速释制剂的研发和产业化研究。E-mail: bjwhf@vip.sina.com

of most of the components in the extract of William's ring worm were basically determined.

Key words: *Pheretima guillelmi* (Michaelsen); proteins; lipids; fatty acids; elements; moisture; ash; ammonium sulfate; compositional analysis

地龙是常用的动物药,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。前一种习称为“广地龙”,后3种习称为“沪地龙”^[1]。本实验所用地龙为沪地龙中的威廉环毛蚓。现代研究表明,地龙中含有丰富的蛋白和多肽类成分,在地龙总重占比为45%~68%^[2-3]。1983年Mihara等^[4]首次从地龙提取物中发现了具有纤溶酶活性的蛋白质,从而开启了地龙蛋白多肽类成分研究的篇章,并发现了其具有抗凝血和抗血栓的双重活性。地龙内含有丰富的游离氨基酸,含有20种游离氨基酸,其中有8种人体必需的氨基酸,是合成蛋白质及肽类成分的原料^[5]。地龙中含有对人体代谢起重要作用的核苷类成分,现代研究表明,核苷类成分等含氮物质是地龙平喘的主要活性成分^[6]。地龙主要生存于土壤中,其独特的生活习性,以及富含金属硫蛋白,可对土壤中的元素起到富集作用^[7]。程能能等^[8]从地龙脂质中分离出一种类血小板活性因子(PAF)的成分,认为是地龙发挥降压作用的重要活性成分。现代研究中,对地龙中糖类成分药理作用研究较少。

《中国药典》2020年版尚未对地龙建立质控标准,存在欠缺,因此对地龙的质量控制研究具有一定意义。本研究对象为威廉环毛蚓提取物,为专利——威廉腔环蚓的蚯蚓纤溶酶制备方法及其冻干粉针剂(专利号:ZL 2008 1 0182567.X)的中间体,具有一定的质量可控性,现已公开,已知前处理过程中采用硫酸铵进行富集^[9]。此外,本课题组前期研究发现,威廉环毛蚓提取物中地龙蛋白溶栓活性能力优于市售的蚓激酶活性,并已完成威廉环毛蚓提取物冻干口崩片的制剂工艺的研究^[10],深具开发价值。本研究对威廉环毛蚓提取物进行化学成分的分析 and 主要物质成分含量测定,阐明其具体的物质组成,为其质量控制和药品开发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Q-Exactive Plus 超高分辨率液质联用系统(赛默飞世尔科技);氨基酸自动分析仪(青岛海泰亿诺科技有限公司);ICPMS-2030 series 电感耦合等离

子体质谱仪(Shimadzu 公司);电感耦合等离子体发射光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);离子色谱仪(ICS 5000 赛默飞世尔科技);BT125D 型电子分析天平(北京赛多利斯有限公司);KQ-400DB 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);H1750 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 药物与主要试剂

威廉环毛蚓提取物[批号 20191011, 哈尔滨九信医药科技有限公司,威廉环毛蚓的蚯蚓纤溶酶冻干粉针剂(专利号 ZL 2008 1 0182567.X)的中间体,依据 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》所述方法,含有16种氨基酸,且总计占比不少于45%];甲醇、乙腈、甲酸(质谱级, Thermo Fisher 公司);氨基酸混合标准物质[批号: GBW(E)00062/23001,北京北方伟业计量技术研究院]。

2 方法

2.1 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术探究威廉环毛蚓提取物化学成分组成

2.1.1 供试品溶液的制备 取威廉环毛蚓提取物 200 mg,精密称定,置于 50 mL 离心管中,精密加入甲醇 40 mL,涡旋 1 min,称量;超声处理 30 min(功率 400 W、频率 40 kHz),放冷,再次称量,用甲醇补足减少的质量,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 滤膜滤过,即得供试品。

2.1.2 色谱和质谱条件^[11] 色谱条件: Shim-pack Velox C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm), 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱,洗脱程序: 0~6 min, 100%~70% B; 6~10 min, 70%~50% B; 10~14 min, 50%~30% B; 14~15 min, 30% B; 15~20 min, 30%~2% B; 20~22 min, 2% B; 22~25 min, 2%~100% B; 25~27 min, 100% B。柱温 35 °C, 体积流量 0.25 mL·min⁻¹, 进样量 3 μL。

质谱条件: 采用 Q Exactive Plus Orbitrap 高分辨质谱进行质谱数据采集,检测模式为 Full MS-ddMS²; 正、负离子同时扫描,ESI 离子源;离子源温度为 350 °C、离子传输管温度为 300 °C;正、负离子模式电压均为 3.0 kV、毛细管电压为 -35 V、管透镜电压为 -110 V;鞘气和辅助气均为高纯氮气(纯度 > 99.99%)、鞘气流速为 40 arb、辅助气流速

为 10 arb; 一级全扫描范围为 m/z 75~1125; TopN 设置为 10, 触发 MS² 扫描的碰撞能为 20、40、60 eV。

2.1.3 数据预处理与分析 得到 RAW 格式的原始数据, 借助 Compound Discoverer 3.0、Xcalibur 2.2 软件进行一级和二级质谱数据处理和分析。Compound Discoverer 3.0 通过精准的质荷比 (m/z) 和二级质谱 (MS/MS) 信息, 与数据库信息进行比对, 从而鉴定化学物质。

采用 Compound Discoverer 3.0 软件进行原始数据特征峰提取, 特征峰元素匹配、分子式预测的质量偏差均设置为 5×10^{-6} 以内。阳性结果筛选标准为质量偏差 $< 5 \times 10^{-6}$, 最大峰面积不小于 10^5 及 mz Vault best match 数据库匹配得分 > 80 分。

将筛选得到的化合物, 对其一级质谱和二级质谱信息与已有文献和 massbank 网站中的质谱数据库进行再次验证, 增加可信度。

2.2 威廉环毛蚓提取物主要物质成分含量测定

蛋白质含量参照《中国药典》(2020年版)三部中 0731 蛋白质含量测定法 第一法 凯氏定氮法^[12]; 游离氨基酸含量参照《NY/T 1975-2010 水溶肥料 游离氨基酸含量的测定》^[13]; 脂质含量测定参照《GB5009.6—2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》^[14]; 脂肪酸含量测定参照《GB 5009.168-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》^[15]; 元素含量测定参照《GB 5009.268-2016 食品安全国家标准 食品中多元素的测定》^[16]; 总糖含量测定参照《GB/T 9695.31-2008 肉制品 总糖含量测定》^[17], 并进行方法学考察。水分、灰分分别参照《中国药典》(2020年版)通则中 0832 水分测定法 第二法(烘干法)、2302 灰分测定法进行水分测定、总灰分测定^[12, 18]。

2.3 硫酸铵含量测定^[19]

采用离子色谱法测定 NH_4^+ 含量, 色谱条件: KOH/甲磺酸为淋洗液, 浓度 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 等度洗脱 15 min; 体积流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $25 \text{ } \mu\text{L}$; 阳离子分离柱: Dionex Ion Pac CS16 ($250 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, Thermo); 保护柱: Dionex Ion Pac CG16 ($50 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, Thermo); 检测方式: 电导池。

3 结果

3.1 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术探究威廉环毛蚓提取物化学组成

采用 UPLC-Q-Exactive-MS 技术, 以及

Compound Discover 软件, 对威廉环毛蚓提取物中小分子成分进行探索研究, 结果共得到 54 种化合物。其中氨基酸类成分共有 10 种、二肽类成分有 1 种、核苷类成分 5 种、有机酸类成分 14 种、生物碱类 3 种、酚类 2 种、酰胺类 3 种、脂类 4 种、聚乙二醇类 5 种、其他含氮化合物 4 种及其他化合物 3 种。正、负离子模式下的总离子流扫描图见图 1。具体成分信息见表 1。

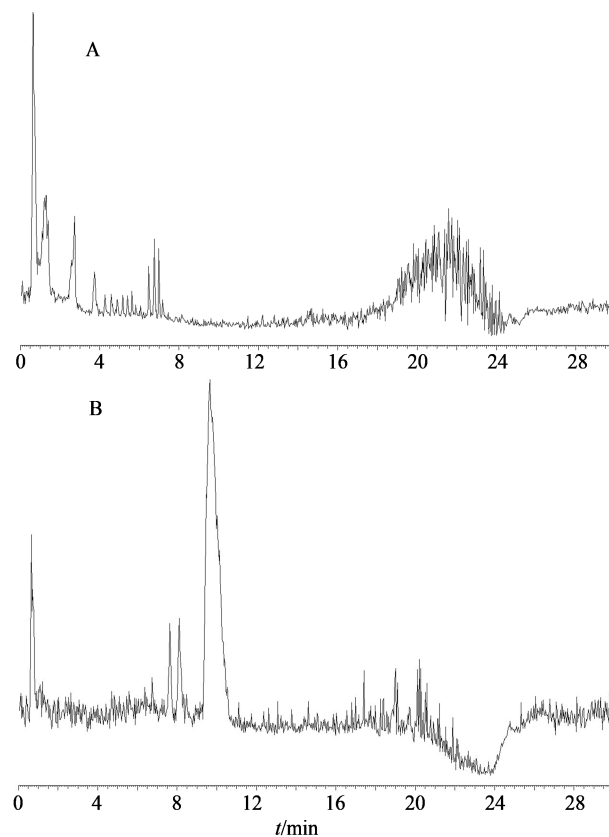


图 1 正(A)、负(B)离子模式下威廉环毛蚓提取物总离子流图
Fig. 1 Total ion flow diagram of *Pheretima guillelmi* under positive (A) and negative (B) ion modes

3.2 各类化合物质谱裂解规律

3.2.1 氨基酸类 氨基酸是一类既含氨基又含羧基的物质, 在裂解时, 氨基酸类化合物一般会丢失 NH_3 (17)、 H_2O (18)、 HCOOH (46)^[20]。

以化合物 5 为例, 在正离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 m/z 175.118 81 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$, 二级碎片丢失氨基生成 m/z 158.092 12 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$ 碎片离子, 继续丢失羧基生成 m/z 130.097 34 $[\text{M}+\text{H}-\text{CHNO}_2]^+$ 碎片离子; 丢失 3 个氨基生成 m/z 116.070 66 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_5\text{N}_3]^+$ 碎片离子。推测其为精氨酸^[21], 质谱裂解规律见图 2。以化合物 27 为例, 在正离子模式下的一级质谱

表 1 威廉环毛蚓提取物成分分析结果

Table 1 Results of compositional analysis of *P. guillelmi* extracts

峰号	t_R /min	分子式	相对分子质量	误差/ ($\times 10^{-6}$)	离子模式	碎片离子(m/z)	化合物
1	0.110	$C_6H_5NO_2$	124.039 38	0.63	$[M+H]^+$	112.039 45、96.044 69	2-吡啶甲酸
2	0.275	C_6H_7NO	110.060 31	2.48	$[M+H]^+$	83.049 63、82.065 60、55.055 02	4-氨基苯酚
3	0.617	$C_6H_{14}N_2O_2$	147.112 70	-0.54	$[M+H]^+$	130.049 71、102.055 17、84.044 82	赖氨酸
4	0.628	$C_6H_9N_3O_2$	156.076 69	-0.42	$[M+H]^+$	110.071 43、95.060 68、93.045 02、83.060 81	组氨酸
5	0.639	$C_6H_{14}N_4O_2$	175.118 81	-0.80	$[M+H]^+$	158.092 12、130.097 34、116.070 66、70.065 73、 60.056 32	精氨酸
6	0.643	$C_3H_7NO_3$	106.050 12	1.45	$[M+H]^+$	88.039 73、60.045 12	丝氨酸
7	0.643	$C_5H_{13}NO$	104.107 29	2.87	$[M+H]^+$	88.039 72、60.045 10、58.065 85	choline
8	0.658	$C_5H_7NO_3$	130.049 87	-0.17	$[M+H]^+$	84.044 84、70.065 73	焦谷氨酸
9	0.690	$C_3H_6O_4$	105.019 23	-0.93	$[M-H]^-$	75.008 69、72.993 03、59.013 82	甘油酸
10	0.701	$C_5H_9NO_2$	116.070 80	1.66	$[M+H]^+$	98.060 17、70.065 70、68.050 10	脯氨酸
11	0.745	$C_5H_{11}NO_2$	118.086 43	1.46	$[M+H]^+$	72.081 36、55.054 95	缬氨酸
12	0.761	$C_5H_4N_4O$	137.045 72	-0.50	$[M+H]^+$	120.052 47、119.035 45、110.034 93、94.040 48、 92.058 01、91.054 63	次黄嘌呤
13	0.769	$C_4H_6O_5$	133.014 13	-0.79	$[M-H]^-$	115.003 59、89.024 46、87.008 80、72.993 06、 71.013 79	苹果酸
14	0.769	$C_5H_7NO_3$	130.049 86	-0.39	$[M+H]^+$	128.035 31、84.045 28、82.029 75	4-氧代脯氨酸
15	0.778	$C_6H_{13}NO_2$	132.101 93	0.17	$[M+H]^+$	87.100 17、86.096 86、69.070 37	异亮氨酸
16	0.799	$C_4H_4N_2O_2$	111.019 95	-0.44	$[M-H]^-$	83.014 82、68.014 12、67.030 09、66.034 88	尿嘧啶
17	0.800	C_5H_9NO	100.076 00	3.09	$[M+H]^+$	98.060 20、82.065 47、69.034 04、58.029 45	<i>N</i> -甲基吡咯烷酮
18	0.927	$C_6H_6O_4$	143.033 80	-0.61	$[M+H]^+$	125.023 20、97.028 69、69.034 19	曲酸
19	0.945	$C_6H_6O_3$	127.039 01	0.26	$[M+H]^+$	109.028 50、81.033 92、53.039 26	邻苯三酚
20	1.041	$C_9H_{11}NO_3$	182.081 07	-0.55	$[M+H]^+$	165.054 62、147.044 06、136.075 49、123.043 99、 119.049 14、95.049 37、91.054 59	酪氨酸
21	1.315	$C_4H_6O_4$	117.019 28	-0.45	$[M-H]^-$	99.008 65、73.029 41	琥珀酸
22	2.541	$C_5H_4N_4O$	137.045 74	-0.37	$[M+H]^+$	128.045 97、119.035 28、110.035 30、94.040 17	别嘌呤
23	2.548	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	269.073 31	-0.98	$[M-H]^+$	137.045 64、110.034 97	肌昔
24	2.673	$C_3H_5N_5O$	152.056 59	-0.61	$[M+H]^+$	135.029 92、128.045 32、110.035 06	鸟嘌呤
25	2.727	$C_5H_{11}NO_2$	164.071 62	-0.57	$[M-H]^-$	147.045 07、103.055 18、91.055 38、72.009 06	苯丙氨酸
26	2.934	$C_8H_{16}N_2O_3$	189.123 25	-0.60	$[M+H]^+$	171.112 88、143.117 65、132.101 73、86.096 84	甘氨酸-亮氨酸
27	3.760	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	205.097 02	-0.70	$[M+H]^+$	188.070 33、170.059 69、159.091 45、 146.059 81、144.080 58、132.080 61、118.065 16	色氨酸
28	3.763	$C_{11}H_9NO_2$	188.070 54	-0.41	$[M+H]^+$	146.059 81、118.065 18	反式-3-吡啶丙烯酸
29	3.793	C_9H_7N	130.065 09	-0.28	$[M+H]^+$	103.054 34、84.081 17	异喹啉
30	3.890	$C_{10}H_{22}O_6$	239.148 66	-1.17	$[M+H]^+$	195.122 71、177.111 86、151.096 18、 133.085 75、107.070 41、89.060 12	PEG n5
31	3.945	$C_6H_{11}NO$	114.091 58	2.15	$[M+H]^+$	96.081 06、86.060 50、79.054 69、68.050 07	己内酰胺
32	4.159	$C_{10}H_7NO_3$	190.049 69	-0.93	$[M+H]^+$	162.054 72、144.043 84、116.049 47、89.039 19	犬尿喹啉酸
33	4.282	$C_{12}H_{26}O_7$	300.201 29	-1.41	$[M+NH_4]^+$	239.148 47、195.122 71、177.111 82、 133.085 78、89.060 11	PEG n6
34	4.455	$C_{12}H_{12}N_2O_2$	217.097 03	-0.57	$[M+H]^+$	171.091 46、144.080 63、130.065 34、74.024 22	2,3,4,9-tetrahydro-1 <i>H</i> - β -carboline-3-carboxylic acid

表1 (续)

峰号	t_R/min	分子式	相对分子质量	误差/ ($\times 10^{-6}$)	离子模式	碎片离子(m/z)	化合物
35	4.528	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$	165.019 12	-1.28	$[\text{M}-\text{H}]^-$	137.024 46、121.029 39、77.039 55	对苯二甲酸
36	4.588	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_8$	344.227 45	-1.39	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	283.174 47、239.148 33、177.111 82、 133.085 80、89.060 09	PEG n7
37	4.799	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$	243.133 69	-0.84	$[\text{M}+\text{H}]^+$	197.128 11、132.101 76、129.065 70、 86.096 85、84.044 83	NP-016455
38	4.882	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_9$	388.253 66	-1.22	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	177.111 80、133.085 77、89.060 07	PEG n8
39	5.048	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_3$	158.082 16	-0.68	$[\text{M}-\text{H}]^-$	114.092 35、74.024 71	<i>N</i> -isovalerylglycine
40	5.234	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$	279.170 04	-0.99	$[\text{M}+\text{H}]^+$	149.023 13、86.096 43	托利卡因
41	5.614	$\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{O}_{12}$	520.332 52	-0.48	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	221.138 05、177.111 83、133.085 78、89.060 11	PEG n11
42	9.262	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5$	329.233 39	0.13	$[\text{M}-\text{H}]^-$	229.144 27、171.102 49、139.112 61、 27.112 65	(15Z)-9,12,13-trihydroxy-15-octadecenoic acid
43	9.594	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}$	192.138 08	-1.12	$[\text{M}+\text{H}]^+$	119.049 20、109.064 89、100.075 90、91.054 57、72.044 98	避蚊胺
44	10.566	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_5$	357.264 77	0.35	$[\text{M}-\text{H}]^-$	257.175 81、239.165 18、139.112 70、99.081 50	13,14-二氢前列腺素 F1 α
45	15.065	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$	295.226 43	-1.39	$[\text{M}+\text{H}]^+$	151.111 62、95.049 49、93.070 23、81.033 98、 67.054 86	9-oxo-10(<i>E</i>),12(<i>E</i>)-octadecadienoic acid
46	16.403	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$	323.257 62	-1.39	$[\text{M}+\text{H}]^+$	305.246 83、207.173 92、93.070 18、81.070 34、 67.054 81	15-oxoEDE
47	18.467	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2$	87.092 19	4.12	$[\text{M}+\text{H}]^+$	70.065 74、59.061 07	3-氨基吡咯烷
48	20.168	$\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$	703.574 40	-0.64	$[\text{M}+\text{H}]^+$	184.073 10、124.999 78、86.096 86	鞘磷脂
49	20.657	$\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}$	284.294 25	-1.91	$[\text{M}+\text{H}]^+$	130.122 41、116.107 01、102.091 60、 72.044 94、57.070 63	硬脂酰胺
50	21.09	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$	385.345 72	-1.61	$[\text{M}+\text{H}]^+$	367.335 02、199.147 89、173.131 99、159.116 52、105.069 98、95.085 83、81.070 33	维生素 D3
51	21.579	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	391.283 63	-1.68	$[\text{M}+\text{H}]^+$	167.033 65、149.023 12、71.086 11、57.070 59	邻苯二甲酸二辛酯
52	22.09	$\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{NO}$	338.341 22	-1.55	$[\text{M}+\text{H}]^+$	321.314 61、303.303 56、135.116 62、114.091 39、 97.101 42、83.085 94、69.070 47、57.070 61	芥酸酰胺
53	23.478	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$	385.345 89	-1.33	$[\text{M}+\text{H}]^+$	367.336 70、109.064 93、97.065 03、81.070 08	4-胆甾烯-3-酮
54	24.253	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	118.086 46	1.67	$[\text{M}+\text{H}]^+$	60.076 88、59.073 65、58.065 84	甜菜碱

信息得到准分子离子峰为 m/z 205.097 02 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, 二级碎片丢失氨基生成 m/z 188.070 33 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$ 、170.059 69 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$, 二级碎片丢失羧基生成 m/z 159.091 45 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$ 、146.059 81 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{CONH}_2]^+$ 、144.080 58 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3-\text{CO}_2]^+$ 、132.080 61 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_2]^+$ 、118.065 16 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-2\text{CH}_2]^+$ 。推测其为色氨酸^[22], 质谱裂解规律见图3。

3.2.2 核苷类成分 核苷类成分由1分子碱和1分

子核糖组成, 在正离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 然后失去1分子的呋喃核糖碎片(132)。然后失去 H_2O (18)、 NH_3 (17)、 HCN (27)等分子。

以化合物 **23** 为例, 在正离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 m/z 269.073 31 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, 二级碎片丢失1分子的呋喃核糖碎片(132)生成 m/z 137.045 64 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4]^+$ 碎片离子。然后继续丢失 HCN (27), 产生碎片离子 m/z 110.034 97。推测其为肌苷^[23], 质谱裂解规律见图4。

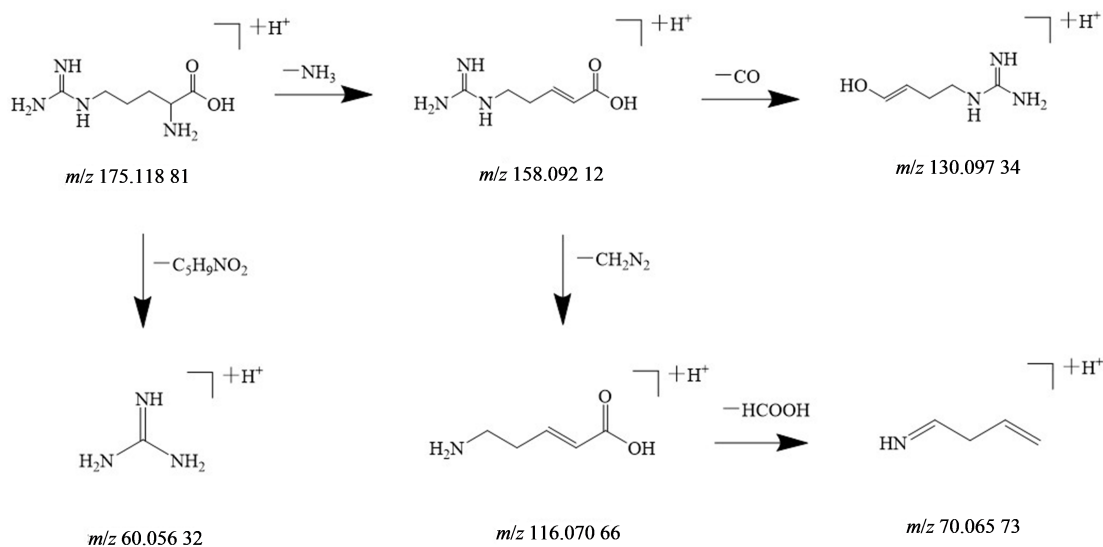


图 2 精氨酸可能的质谱裂解途径

Fig. 2 Possible mass spectrometric cleavage pathways of arginine

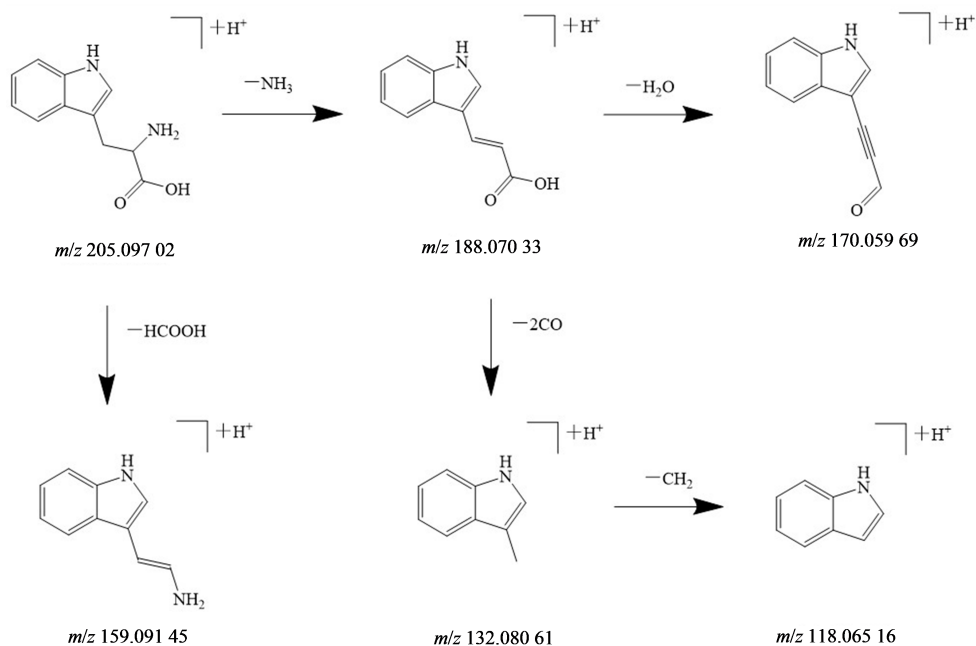


图 3 色氨酸可能的质谱裂解规律

Fig. 3 Possible mass spectrometric cleavage patterns of tryptophan

以化合物 12 为例,在正离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 m/z 137.045 72 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{10}H_{12}N_4O_5$, 失去 1 个 H_2O 形成 119.035 45 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子, 准分子也可发生开环失去 CHN 并发生重排反应形成 110.034 93 $[M+H-CHN]^+$ 碎片离子。推测其为次黄嘌呤^[11], 质谱裂解规律见图 5。

3.2.3 有机酸类 有机酸类成分在质谱裂解时常出现丢失 H_2O (18)、 CO_2 (44) 的特征性碎片离子^[24]。以化合物 21 为例,在负离子模式下的一级质谱信息

得到准分子离子峰为 m/z 117.019 28 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_4H_6O_4$, 二级碎片丢失 1 分子的 H_2O (18) 生成 m/z 99.008 65 $[M-H-H_2O]^-$ 碎片离子; 二级碎片丢失 1 分子的 CO_2 (44) 生成 m/z 73.029 41 $[M-H-CO_2]^-$ 碎片离子, 推测其为琥珀酸^[11], 质谱裂解规律见图 6。

3.3 主要成分含量测定结果

威廉环毛蚓提取物中各物质质量分数分别为蛋白质 53.01%、游离氨基酸 4.18%、脂质 5.62%、总糖 11.42%、硫酸铵 9.89%、水分 4.05%、灰分 2.36%, 合计结果为 86.35%, 基本确定威廉环毛蚓提取物中

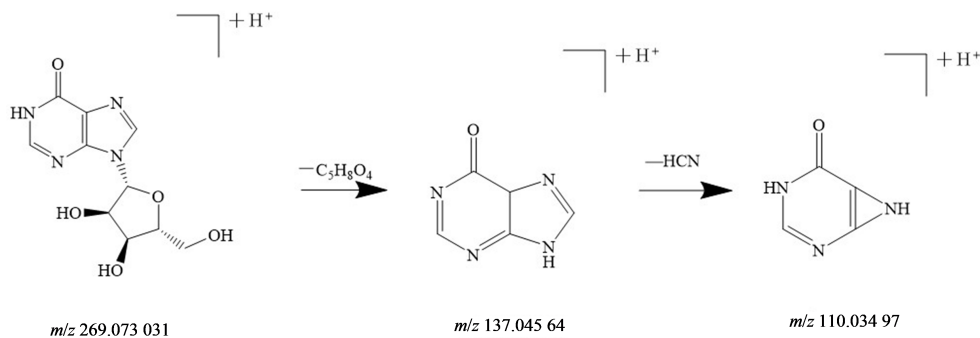


图4 肌苷可能的质谱裂解规律
Fig. 4 Possible mass spectrometry cleavage patterns of inosine

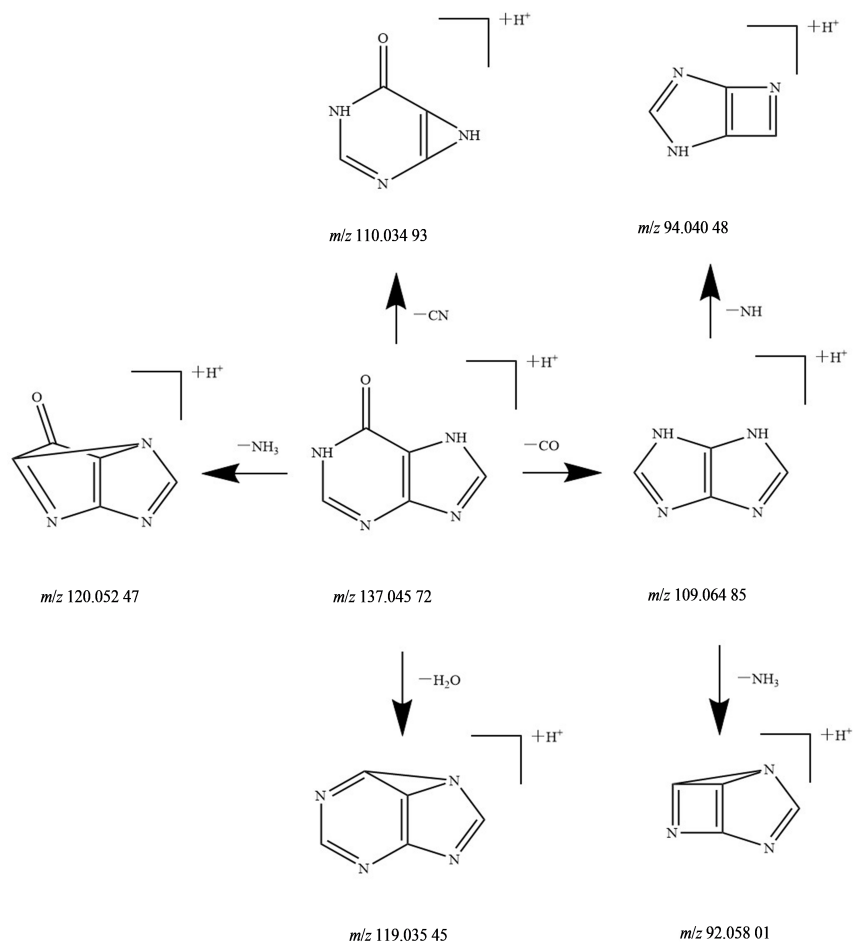


图5 次黄嘌呤可能的质谱裂解途径
Fig. 5 Possible mass spectrometric cleavage pathways for hypoxanthine

主要物质成分组成,结果见表2。对威廉环毛蚓提取物进行37种脂肪酸含量检测,得到其中含有24种脂肪酸,总质量分数为1.233%,饱和脂肪酸占比为65.38%,脂肪酸具体含量测定结果见表3。23种元素含量测定结果见表4。

4 讨论

4.1 化学成分

鉴定出的氨基酸类成分有10种,占比较多,鉴

定出1种二肽类成分,以及犬尿喹啉酸、4-氧代脯氨酸等氨基酸代谢产物,表明威廉环毛蚓提取物中含有较多的氨基酸成分。以次黄嘌呤为代表的核苷类成分和琥珀酸是地龙中平喘、舒张支气管平滑肌的主要活性成分;除琥珀酸和氨基酸外,也鉴定得到威廉环毛蚓提取物中含有大量的有机酸成分,如油酸、苹果酸、甘油酸等;部分有机酸以酯类形式存在,如:托利卡因,邻苯二甲酸二辛酯。鉴定得到鞘

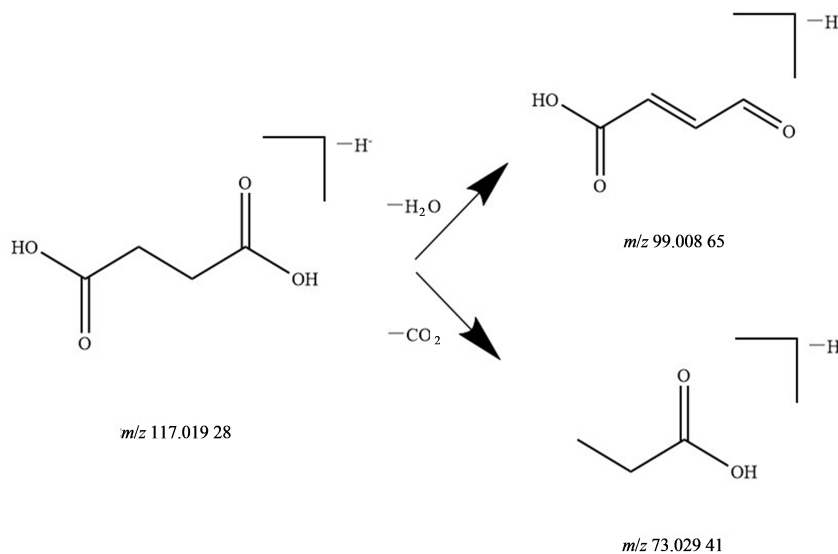


图 6 琥珀酸可能的质谱裂解规律

Fig. 6 Possible mass spectrometry cleavage patterns of succinic acid

表 2 主要成分含量表

Table 2 Content of main ingredients

成分	质量分数/%
蛋白质(游离氨基酸)	53.01(4.18)
脂质	5.62
总糖	11.42
硫酸铵	9.89
水分	4.05
灰分	2.36
合计	86.35

磷脂、维生素 D₃ 等脂类成分。4-氨基苯酚、邻苯三酚等酚类物质推测与威廉环毛蚓提取物呈腥臭味有关联^[25]。在鉴定结果中,得到威廉环毛蚓中含有较多的聚乙二醇类成分,在其他文献中,并未发现,可能为提取富集过程的残留物。

4.2 主要成分

威廉环毛蚓提取物为蛋白质富集体,经含量测定,蛋白质占比为 53.01%,是主要的药效成分。脂质含量为 5.62%,测得含有 24 种脂肪酸,脂肪酸种类较为丰富,且饱和脂肪酸占比约为 35%,在总

表 3 24 种脂肪酸含量

Table 3 Content of 24 fatty acids

类别	脂肪酸种类	质量分数/ (g·kg ⁻¹)	占总脂肪 酸比例/%	类别	脂肪酸种类	质量分数/ (g·kg ⁻¹)	占总脂肪 酸比例/%	
饱和脂肪 酸	己酸	0.003 64	0.03	单不饱和 脂肪酸	棕榈油酸	0.203	1.65	
	辛酸	0.007 20	0.06		顺-10-十七碳一烯酸	0.011 6	0.09	
	癸酸	0.009 10	0.07		油酸	0.623	5.05	
	月桂酸	0.150	1.22		巨头鲸鱼酸	1.90	15.41	
	十三烷酸	0.081 9	0.66		总含量	—	2.74	22.21
	肉豆蔻酸	0.511	4.14		多不饱和 脂肪酸	亚麻醇	0.328	2.66
	十五烷酸	0.401	3.25		γ-亚麻酸	0.001	0.02	
	棕榈酸	1.87	15.17		97	亚麻酸	0.073 9	0.60
十七烷酸	1.13	9.17	顺,顺-11,14-二十碳二烯酸甲酯	0.104	0.84			
硬脂酸	2.92	23.69	顺,顺,顺-8,11,14-二十碳三烯酸甲酯	0.706	5.73			
花生酸	0.318	2.58	花生五烯酸	0.316	2.56			
二十一烷酸	0.134	1.09	总含量	—	1.53	12.41		
二十三烷酸	0.256	2.08	脂肪酸总含量	—	12.33	—		
二十四烷酸	0.269	2.18						
总含量	—	8.06	65.38					

表4 23种元素含量
Table 4 Contents of 23 elements

元素	质量分数/(mg·kg ⁻¹)	元素	质量分数/(mg·kg ⁻¹)
Mo	2.65	Li	0.642
Se	4.88	B	1.33
As	2.31	Fe	759
V	1.12	Zn	185
Mn	25.2	Al	245
Co	8.32	K	614
Ni	2.39	Ca	3.28×10 ³
Pb	1.59	Mg	970
Sn	0.057 2	Na	1.32×10 ³
Cd	9.27	Hg	0.191
Cr	43.7	Si	433
Cu	27.7		

脂肪酸含量中占比较高,花生五烯酸的含量占比约为2.56%,具有一定的医疗营养价值^[26]。将测定的总糖含量与文献中地龙干燥品中总糖的含量(0.699%)^[27]比较,发现威廉环毛蚓提取物中总糖含量是沪地龙干燥品中的16倍,表明前处理对地龙中糖类成分起到了富集效果,推测原因可能是硫酸铵能够对多糖起到沉淀的作用。硫酸铵为富集蛋白质产生的残留,且占比为9.89%,后续可考虑通过超滤技术除去。本提取物中元素种类丰富,可对人体微量元素起到补充的作用,但同时采用本实验的方法测得重金属铅、镉、砷、汞、铜总含量为4.1×10⁻⁵,超过《中国药典》采用炽灼残渣检查法对地龙重金属的限定要求30×10⁻⁶,因此在重金属方面要加强监测,防止其造成不利影响。

本研究采用UPLC-Q-Exactive-MS技术,全面探究了威廉环毛蚓提取物中的小分子化学成分。综合多种现代技术,首次全面测定了威廉环毛蚓提取物中的主要成分的含量,为地龙品种全成分分析和质量控制阐明了方向,并对后续药效物质的深入研究和开发应用提供实验支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 王光忠, 胡迪, 陈敬炳, 等. 地龙类药材化学成分分析[J]. 中药材, 1998, 21(3): 133-135. Wang G Z, Hu D, Chen J B, et al. Analysis of chemical components from pheretuna [J]. J Chin Med Mater, 1998, 21(3): 133-135.
- [3] 张莅峡, 韩薇, 刘泓. 八种动物药的氨基酸分析及薄层扫描鉴定[J]. 中药材, 1990, 13(1): 11-14. Zhang L X, Han W, Liu H. Amino acid analysis and TLC scanning identification of eight animal medicines [J]. J Chin Med Mater, 1990, 13(1): 11-14.
- [4] Mihara H, Sumi H, Akazawa T, et al. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm [J]. Thromb Haemost, 1983, 50: 258-263.
- [5] 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): 220-226. Huang Q, Li Z W, Ma Z G, et al. Research progress of Pheretima [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(13): 220-226.
- [6] 于鸿, 计忠宇, 赵辉, 等. 基于T淋巴细胞PPAR-γ-核因子-κB通路探讨平喘固本膏对支气管哮喘缓解期患者的作用机制[J]. 西部中医药, 2022, 35(5): 111-115. Yu H, Ji Z Y, Zhao H, et al. On the mechanism of asthma-relieving foundation-consolidating ointment in the treatment of bronchial asthma at remission stage based on T lymphocyte PPAR-γ-nuclear factor-κB pathway [J]. West J Tradit Chin Med, 2022, 35(5): 111-115.
- [7] 李晓东. 不同品种地龙中微量元素及重金属元素含量分析[J]. 黑龙江科技信息, 2016(28): 94. Li X D. Analysis of trace elements and heavy metals in different varieties of Lumbricus [J]. Heilongjiang Sci Technol Inf, 2016(28): 94.
- [8] 程能能, 马越鸣. 地龙中降压的类血小板活化因子物质[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(12): 747-749, 764. Cheng N N, Ma Y M. A hypotensive analog of platelet-activating factor (PAF) in Pheretima [J]. China J Chin Mater Med, 1993, 18(12): 747-749, 764.
- [9] 陈运聪, 王旺新, 余冬林, 等. 来自威廉环毛蚓的蚯蚓纤溶酶制备方法及其冻干粉针剂: CN101407801A [P]. 2009-04-15. Chen Y C, Wang W X, Yu D L, et al. Preparation method of earthworm fibrinolytic enzyme from William earthworm and lyophilized powder injection preparation: CN101470801A [P]. 2009-04-15.
- [10] 吴茜, 李红鑫, 李聘, 等. 地龙提取物冻干口崩片的制备工艺研究[J]. 中南药学, 2021, 19(3): 426-430. Wu Q, Li H X, Li P, et al. Preparation of lyophilized oral disintegrating tablets of earthworm extract [J]. Cent South Pharm, 2021, 19(3): 426-430.
- [11] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的广地龙化学成分分析[J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262. Zhang Y, Dong W T, Huo J H, et al. Analysis on chemical constituents of Pheretima aspergillum by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(2): 252-262.
- [12] 中国药典[S]. 三部. 2020.

- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume III. 2020.
- [13] 中华人民共和国农业部. 水溶肥料 游离氨基酸含量的测定: NY/T 1975—2010 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2011. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of free amino acids in water-soluble fertilizers: NY/T 1975-2010 [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定: GB 5009.6—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. Determination of fat in food under National Standard of Food Safety: GB 5009.6-2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定: GB 5009.168—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. Determination of fatty acids in food of National Standard for Food Safety: GB 5009.168-2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [16] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中多元素的测定: GB 5009.268—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. Determination of multi-element in food of National Standard for Food safety: GB 5009.268-2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 肉制品 总糖含量测定: GB/T 9695.31—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008. State Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Standardization Administration of China. Determination of total sugar content in meat products: GB/T 9695.31 — 2008 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [18] 中国药典[S]. 四部. 2020: 234. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020: 234
- [19] 何云馨, 许爱华, 陈朝阳, 等. 离子色谱法测定硫酸铵试剂纯度的研究 [J]. 分析仪器, 2023, (5): 62-64. He Y X, Xu A H, Chen C Y, et al. Study on determination of purity of ammonium sulfate reagent by ion chromatography [J]. Anal Instrum, 2023(5): 62-64.
- [20] 李焕茹, 冯素香, 冯志毅, 等. UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定墨旱莲中的化学成分 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 103-109. Li H R, Feng S X, Feng Z Y, et al. Chemical constituents identification of ecliptae herba by UHPLC-Q-orbitrap HRMS [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(1): 103-109.
- [21] 杨福燕, 许如玲, 钮炜, 等. 经典名方一贯煎标准煎液 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2134-2147. Yang F Y, Xu R L, Niu W, et al. UPLC-Q-TOF-MS analysis of chemical constituents of classical prescription Yiguanjian standard decoction [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(8): 2134-2147.
- [22] 郑鹏, 黄敏, 张金莲, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的江西特产中药茶芎化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(1): 52-62. Zheng P, Huang M, Zhang J L, et al. Study on the chemical composition of Jiangxi specialty Chinese medicine Chaxiong based on UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev, 2024, 36(1): 52-62.
- [23] 成小红, 刘惠君, 蒋丽, 等. 黑布药膏的化学成分表征研究 [J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(1): 77-88. Cheng X H, Liu H J, Jiang L, et al. Characterization of chemical constituents of Heibu Yaogao(ointment) [J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1): 77-88.
- [24] 杨琳, 宋海英, 刘剑刚, 等. 基于 LC-MS 技术快速鉴定冠心丹参滴丸的主要成分和入血成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(22): 2484-2490. Yang L, Song H Y, Liu J G, et al. Chemical components and absorbed components analysis of Guanxin Danshen Dripping Pills by LC-MS [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(22): 2484-2490.
- [25] 叶慧, 张定堃, 韩丽, 等. HS-SPME-GC-MS 结合主观嗅觉评价研究不同批次地龙腥臭气特征性物质基础 [J]. 中成药, 2023, 45(12): 4150-4155. Ye H, Zhang D K, Han L, et al. Study on the characteristic material basis of foul smell of different batches of earthworm by HS-SPME-GC-MS combined with subjective olfactory evaluation [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(12): 4150-4155.
- [26] Tan J, McKenzie C, Potamitis M, et al. The role of short-chain fatty acids in health and disease [J]. Adv Immunol, 2014, 121: 91-119.
- [27] 丁冠华, 李峰, 康廷国. 水蛭 地龙药材商品中总多糖含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(5): 986-987. Ding G H, Li F, Kang T G, et al. Determining beterming the content of total polysaccharide in Hirudo and Pheretima [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2010, 28(5): 986-987.

[责任编辑 兰新新]