

基于指纹图谱和化学计量学研究沪地龙基原间质量差异

李 雷^{1,2}, 史建伍³, 刘兰玉⁴, 李奇璋⁵, 吴 宇¹, 于海征¹, 张汉明¹, 张 磊^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)药学院, 上海 200433

2. 中国人民解放军 65655 部队, 内蒙古 赤峰 024000

3. 南通大学医学院 交叉医学研究所, 江苏 南通 226001

4. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

5. 淮北师范大学生命科学院创新药物研发中心, 安徽 淮北 235000

摘要: 目的 应用指纹图谱和化学计量学分析方法, 比较沪地龙药材基原(通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris*、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera*) 间质量差异, 筛选差异性标志物, 为建立沪地龙质量标准提供参考。方法 应用高效液相色谱法建立沪地龙水溶性成分指纹图谱, 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 软件比较相似度; 应用聚类分析、正交偏最小二乘判别分析和主成分分析法对 3 个基原间所测得的 6 种水溶性成分含量进行比较分析, 并依据主成分得分对各批次样本进行综合性评价。结果 相似度评价结果, 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓的相似度为 0.987; 栉盲环毛蚓与通俗环毛蚓的相似度为 0.697, 与威廉环毛蚓的相似度为 0.717。聚类分析方法不能区分 3 个基原。正交偏最小二乘判别分析结果显示, 通俗环毛蚓和威廉环毛蚓不能区分, 但二者能与栉盲环毛蚓区分, 差异性成分为尿苷和鸟苷。主成分分析综合评分共有 19 批样本大于平均分, 其中栉盲环毛蚓 11 批、通俗环毛蚓 6 批、威廉环毛蚓 2 批; 产地为上海市 13 批, 江苏省 2 批, 浙江省 1 批, 安徽省 2 批。结论 沪地龙 3 个基原间存在差异, 其中通俗环毛蚓与威廉环毛蚓在水溶性成分种类和含量方面相似度高, 但二者均与栉盲环毛蚓存在差异。

关键词: 沪地龙; HPLC 指纹图谱; 通俗环毛蚓; 威廉环毛蚓; 栉盲环毛蚓; 化学计量学; 质量评价; 尿苷; 鸟苷

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253 - 2670(2024)21 - 7462 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.024

Quality differences among Hudilong origins based on fingerprint and chemometrics

LI Lei^{1,2}, SHI Jianwu³, LIU Lanyu⁴, LI Qizhang⁵, WU Yu¹, YU Haizheng¹, ZHANG Hanming¹, ZHANG Lei¹

1. School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Unit 65655 of the People's Liberation Army of China, Chifeng 024000, China

3. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Medical School, Nantong University, Nantong 226001, China

4. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

5. Innovative Drug R&D Center, College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China

Abstract: Objective In order to compare the quality differences between the basal elements of Hudilong herbs (*Pheretima vulgaris*, *Pheretima guillelmi*, *Pheretima pectinifera*), fingerprint and chemometrics analysis methods were applied, and differential markers were screened, so as to provide reference for the establishment of quality standard of Hudilong. **Methods** The fingerprints of three origins were constructed by High Performance Liquid Chromatography and the similarities among the Hudilong origins were evaluated by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprints* (2012). A total of six aqueous extract components were determined, and the results were analyzed by cluster analysis (CA), orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) and principal component analysis (PCA). The samples in each batch were comprehensively evaluated according to the principal component scores. **Results** The similarity between the *P. vulgaris* and *P. guillelmi* was 0.987, *P. vulgaris* and *P. pectinifera* was 0.697, *P. pectinifera* and *P. guillelmi* was 0.717. The results of CA showed that three origins

收稿日期: 2024-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82225047); 科技部“中医药现代化”重点研发计划(2022YFC3501703)

作者简介: 李 雷, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量评价。E-mail: 2101202810@qq.com

*通信作者: 张 磊, 教授, 博士生导师, 从事中药资源与生物技术研究。E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

could not be well distinguished. OPLS-DA results revealed that the *P. vulgaris* and *P. guillelmi* were indistinguishable from each other, and the *P. pectinifera* was able to distinguish with the two origins. The recurring differentiating components were Uridine and Guanosine. The PCA comprehensive evaluation score of 19 batches of samples were greater than the average score, among which 11 batches of *P. pectinifera*, six batches of *P. vulgaris*, and two batches of *P. guillelmi*. The regions were Shanghai (13 batches), Jiangsu (two batches), Zhejiang (one batch), Anhui (two batches). **Conclusion** There are differences among three origins of Hudilong. The *P. vulgaris* and *P. guillelmi* have high similarity in terms of aqueous extract components kinds and content, but both are distinctly different from the *P. pectinifera*.

Key words: Hudilong; HPLC fingerprint; *Pheretima vulgaris* Chen; *Pheretima guillelmi* (Michaelsen); *Pheretima pectinifera* Michaelsen; chemometrics analysis; quality evaluation; uridine; guanosine

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, 前一种习称广地龙, 后 3 种习称沪地龙^[1]。现代研究表明, 地龙其含有丰富的蛋白质类、氨基酸类、多肽类、核苷类成分, 具有广泛的药理活性^[2]。入药形式为整体入药, 使用方法以水煎服或成方制剂多见。质量评价以指纹(特征)图谱和核苷类成分的含量测定居多^[3-5]。其中沪地龙有 3 个基原, 相当于多基原药材, 但对其质量研究不作基原区分的问题较为突出^[6-7]。多基原药材的不同基原存在药效上的差异, 混用不利于临床功效和制剂产品质量的均一性和稳定性^[8]。沪地龙混用使其基原间化学成分的差异性被模糊, 易造成质量不稳定的假象, 将对沪地龙的临床使用和制剂开发产生重大影响。而且, 国家食品药品监督管理局药品审评中心发布的《中药新药药材质量控制研究技术指导原则(试行)》(2020 年第 31 号)中明确指出使用多基原药材应固定使用其中之一或固定使用比例; 还在《中药新药研究各阶段药学研究技术指导原则(试行)》(2020 年第 37 号)中也提出中药新药要明确药材使用基原。因此, 有必要对沪地龙基原间质量差异进行研究, 为临床合理化用药提供理论依据, 从而提高临床用药的合理性、有效性和稳定性, 也为含地龙药物研发与质量评价提供参考。

指纹图谱是以某一类或几类成分的色谱图为基础, 可直接或间接反映药物及其制剂内在成分的一致性与差异性, 具有整体性和模糊性的特点, 常用于中药质量评价与控制, 是国内外中药或天然药物质量控制的重要手段^[9]。高效液相色谱(HPLC)具有适用范围广、分辨能力强、重现性好等特点, 为现阶段获得中药指纹图谱的主要技术手段。《中国药典》2010 年版开始收录指纹(特征)图谱方法用于中药的质量控制, 至《中国药典》2020 年版已收载

了中药材、饮片及其他制剂的 HPLC 指纹(特征)图谱评价方法共计 73 个^[10], 而沪地龙 3 个基原指纹图谱研究未见报道。指纹图谱的评价方法是以样品指纹图谱与对照图谱的相似度大小作为评价指标, 主要体现的是共有峰的多少或共同成分种类的多少, 对结果的深层次分析和差异成分的表现仍存在不足。

化学计量学是应用统计学与数学方法根据测量值与样本之间的关系对结果进行客观分析, 从而获得样本之间的内在联系, 在中药鉴定、定性表征、质量控制、组效关系等研究中广泛应用, 在中药的质量控制与评价研究中具有重要作用^[11]。化学模式识别方法与指纹图谱分析相结合, 在现代中药的研究中如基原间、不同产地、不同炮制方法的药材质量控制方面应用广泛^[12-16], 其结果具有重要的参考价值。

本研究通过 HPLC 建立沪地龙药材 3 个基原的指纹图谱, 对其一致性和差异性进行比较分析, 再采用化学模式识别法比较分析沪地龙基原间水溶性成分差异, 并对各产地沪地龙进行质量评价。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030 型岛津高效液相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司]; ZORBAX SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。EX125DZH 型十万分之一电子分析天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司]; ME204E/02 型万分之一电子分析天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司]; SB-5200DTD 型超声波清洗机(上海般诺生物科技有限公司); 数显恒温水浴锅 HH-6 [邦西仪器科技(上海)有限公司]。

1.2 试药

尿苷(批号 N10M11W109430), 次黄嘌呤(批号 TM0313XC13), 鸟苷(批号 J25D10Y106730), 肌苷(批号 TJ0623XA13), 以上样品均购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数≥98%; 黄嘌呤(批

号 C12004027, 质量分数 $\geq 99\%$, 麦克林公司); 色氨酸 (批号 P1777118, 质量分数 $\geq 99\%$, Adamas 公司); 甲酸 (批号 G2122206, 色谱纯); 甲醇 (批号 P1777118, 色谱纯, 上海泰坦科技股份有限公司); 蒸馏水 (屈臣氏)。

1.3 样品

本实验所用沪地龙样品共计 40 批, 其中通俗环毛蚓 16 批, 威廉环毛蚓 12 批, 栉盲环毛蚓 12 批。样品经海军军医大学张汉明教授鉴定并进行 DNA 条形码验证, 药材批次信息见表 1。

表 1 沪地龙样品信息

Table 1 Information of Hudilong samples

编号	名称	拉丁名称	收集地	批号
S1	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i> Chen	安徽灵璧	MV-AHLB
S2	通俗环毛蚓		安徽亳州	MV-AHBZ
S3	通俗环毛蚓		河北美康药业有限公司	MV-HBMK
S4	通俗环毛蚓		虹桥药业有限公司	MV-HQYY-1
S5	通俗环毛蚓		虹桥药业有限公司	MV-HQYY-2
S6	通俗环毛蚓		虹桥药业有限公司	MV-HQYY-3
S7	通俗环毛蚓		江苏淮安	MV-JSHA
S8	通俗环毛蚓		江苏如东	MV-JSRD
S9	通俗环毛蚓		江苏徐州	MV-JSXZ
S10	通俗环毛蚓		江苏镇江	MV-JSZJ
S11	通俗环毛蚓		康桥药业有限公司	MV-KQYY-1
S12	通俗环毛蚓		康桥药业有限公司	MV-KQYY-2
S13	通俗环毛蚓		雷允上药业有限公司	MV-LYSYY
S14	通俗环毛蚓		上海浦东	MV-SHPD
S15	通俗环毛蚓		上海崇明	MV-SHCM
S16	通俗环毛蚓		上海横沙岛	MV-SHHS
V1	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i> (Michaelsen)	河南沈丘付井镇	MG-HNSQFJZ
V2	威廉环毛蚓		安徽灵璧	MG-AHLB
V3	威廉环毛蚓		安徽亳州	MG-AHBZ-1
V4	威廉环毛蚓		安徽亳州	MG-AHBZ-2
V5	威廉环毛蚓		虹桥药业有限公司	MG-HQYY-1
V6	威廉环毛蚓		虹桥药业有限公司	MG-HQYY-2
V7	威廉环毛蚓		虹桥药业有限公司	MG-HQYY-3
V8	威廉环毛蚓		江苏镇江	MG-JSZJ
V9	威廉环毛蚓		康桥药业有限公司	MG-KQYY-1
V10	威廉环毛蚓		康桥药业有限公司	MG-KQYY-2
V11	威廉环毛蚓		康桥药业有限公司	MG-KQYY-3
V12	威廉环毛蚓		上海横沙岛	MG-SHHS
J1	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i> Michaelsen	上海奉贤	AP-SHFX-1
J2	栉盲环毛蚓		上海浦东	AP-SHPD-1
J3	栉盲环毛蚓		益大本草园	AP-YDBCY-1
J4	栉盲环毛蚓		上海奉贤	AP-SHFX-2
J5	栉盲环毛蚓		上海奉贤	AP-SHFX-3
J6	栉盲环毛蚓		上海奉贤	AP-SHFX-4
J7	栉盲环毛蚓		上海浦东	AP-SHPD-2
J8	栉盲环毛蚓		浙江天目山	AP-ZJTMS
J9	栉盲环毛蚓		上海奉贤	AP-SHFX-5
J10	栉盲环毛蚓		益大本草园	AP-YDBCY-2
J11	栉盲环毛蚓		上海浦东	AP-SHPD-3
J12	栉盲环毛蚓		康桥药业有限公司	AP-KQYY

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 ZORBAX SB-Aq 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A)-0.05%甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 0.5%~1% A; 10~13 min, 1%~2.5% A; 13~25 min, 2.5%~3% A; 25~29 min, 3%~6% A; 29~35 min, 6%~8% A; 35~40 min, 8%~6% A; 40~42 min, 6%~2% A; 42~43 min, 2%~0.5% A; 43~45 min, 0.5% A), 体积流量 0.85 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。理论板数按肌苷峰计算应不低于 5 000。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别取对照品适量, 加水溶解, 制成一定浓度的对照品贮备液。精密吸取上述储备液适量, 加水制成含尿嘧啶 20 μg/mL、次黄嘌呤 40 μg/mL、黄嘌呤 20 μg/mL、尿苷 20 μg/mL、肌苷 50 μg/mL、鸟苷 30 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取地龙药材粗粉 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水 50 mL, 称定质量, 浸泡 30 min, 超声处理 (功率 300 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用水补足质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度考察 取沪地龙样品 (批号 MV-AHBZ) 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.09%~0.23% 内, 相对峰面积 RSD 在 0.97%~2.36%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 取沪地龙样品 (批号 MV-AHBZ) 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于配制后 0、6、8、12、18、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样分析。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.08%~0.44%, 相对峰面积 RSD 在 0.50%~2.97%, 表明供试品溶液的稳定性良好。

2.3.3 重复性考察 取沪地龙样品 (批号 MV-AHBZ) 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的

相对保留时间 RSD 在 0.03%~0.11%, 相对峰面积 RSD 在 0.75%~2.91%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 色谱峰指认 从现有文献报道^[3-6]中可知, 地龙水溶性成分以小分子核苷类成分的指认居多, 本研究主要采用核苷类对照品对色谱峰进行指认, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 得到对照品 HPLC 色谱图 (图 1)。指认了 6 个特征峰分别为尿苷、色氨酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷和鸟苷。

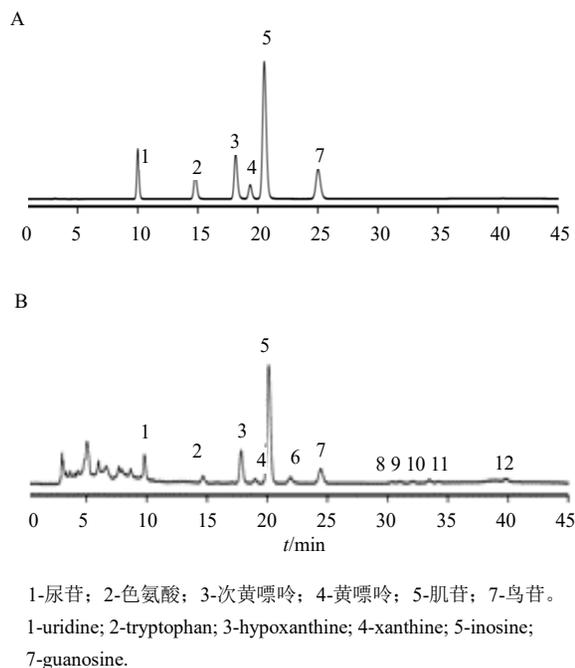


图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance (A) and test substance (B)

2.3.5 指纹图谱建立与相似度评价 将 3 个基原测得的色谱数据分别导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 设置参照图谱, 采用中位数法, 时间窗格为 0.1 min, 多点校正后全谱峰匹配分别生成沪地龙 3 个基原的对照指纹图谱 (图 2)。16 批通俗环毛蚓与对照图谱的相似度在 0.921~0.988; 12 批威廉环毛蚓与对照图谱的相似度在 0.718~0.970; 12 批栉盲环毛蚓与对照图谱的相似度在 0.910~0.995 (表 1)。对沪地龙 3 个基原间进行指纹图谱相似度评价, 结果显示, 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓的相似度为 0.987; 栉盲环毛蚓与通俗环毛蚓的相似度为 0.697, 与威廉环毛蚓的相似度为 0.717, 3 个基原与共同对照指纹图谱的相似度为 0.910~0.939 (表 2)。

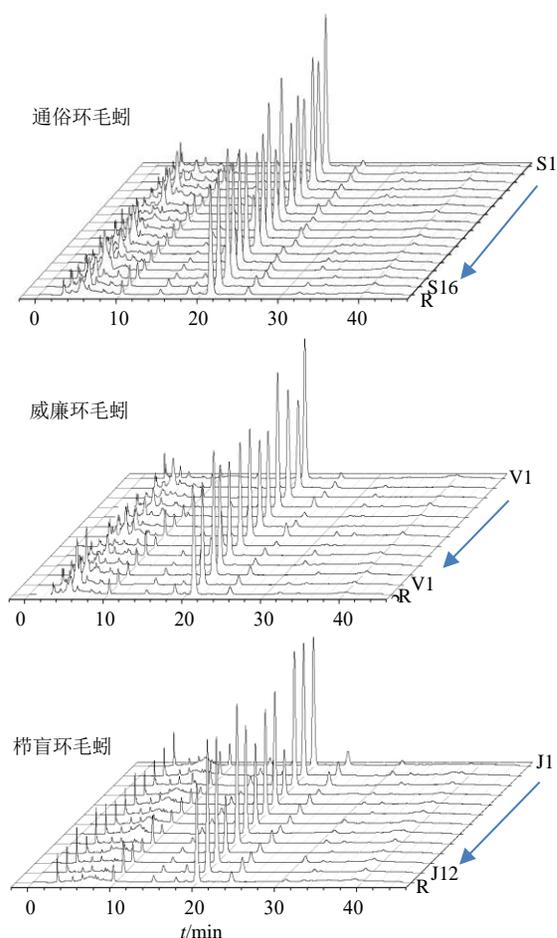


图2 沪地龙指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of Hudilong

表1 沪地龙各基原与对照图谱相似度评价结果

Table 1 Results of similarity evaluation between Hudilong origins and comparative chromatogram

批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度
MV-AHLB	0.961	MV-SHCM	0.983	MG-SHHS	0.912
MV-AHBZ	0.939	MV-SHHS	0.975	AP-SHFX-1	0.969
MV-HBMK	0.988	MG-HNSQFJZ	0.718	AP-SHPD-1	0.981
MV-HQYY-1	0.961	MG-AHLB	0.950	AP-YDBCY-1	0.978
MV-HQYY-2	0.984	MG-AHBZ-1	0.942	AP-SHFX-2	0.960
MV-HQYY-3	0.962	MG-AHBZ-2	0.839	AP-SHFX-3	0.910
MV-JSHA	0.938	MG-HQYY-1	0.970	AP-SHFX-4	0.968
MV-JSRD	0.921	MG-HQYY-2	0.958	AP-SHPD-2	0.991
MV-JSXZ	0.967	MG-HQYY-3	0.943	AP-ZJTMS	0.963
MV-JSZJ	0.965	MG-JSZJ	0.829	AP-SHFX-5	0.979
MV-KQYY-1	0.961	MG-KQYY-1	0.943	AP-YDBCY-2	0.982
MV-KQYY-2	0.979	MG-KQYY-2	0.925	AP-SHPD-3	0.978
MV-LYSY	0.980	MG-KQYY-3	0.968	AP-KQYY	0.995
MV-SHPD	0.968				

组,分别精密加入低、中、高剂量的尿苷、色氨酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷和鸟苷的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进行测定,用外标法计算各成分的含量并计算加样回收率。结果表明,6种成分的加样回收率在

2.4 含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密吸取对照品混合溶液0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL置于10 mL量瓶中,加水定容。按“2.1”项下色谱条件测定不同浓度对照品混合溶液。以溶液浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得线性回归方程。6种成分线性关系的相关系数均在0.995以上(表3),线性范围满足实验需求。

2.4.2 精密度试验 取“2.2.1”项下6种成分混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录各成分色谱峰面积。结果各成分峰面积RSD在1.67%~2.03%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取沪地龙样品(批号MV-AHBZ)按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于配制后0、6、8、12、18、24 h按“2.1”项下色谱条件进样分析。记录6种成分色谱峰面积。结果各成分峰面积RSD在0.71%~2.62%,表明供试品溶液的稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取沪地龙样品(批号MV-AHBZ)按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录6种成分色谱峰面积。按标准曲线法计算各成分含量;结果各成分质量分数RSD在0.56%~2.14%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定含量的沪地龙样品MV-AHLB 9份,每份0.25 g,分为3

96.36%~101.39%,表明该方法具有良好的准确度。

2.4.6 含量测定 取40批沪地龙样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录各成分色谱峰面积,用外标法计算样品中6种成分的含量(表4)。

表2 沪地龙基原间相似度评价结果

Table 2 Results of similarity evaluation among Hudilong origins

基原	相似度			
	通俗环毛蚓	威廉环毛蚓	栉盲环毛蚓	对照指纹图谱
通俗环毛蚓	1.000	0.987	0.697	0.930
威廉环毛蚓	0.987	1.000	0.717	0.939
栉盲环毛蚓	0.697	0.717	1.000	0.910
对照指纹图谱	0.930	0.939	0.910	1.000

表3 6种成分的线性关系考察

Table 3 Linear investigation results of six components

成分	线性关系	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
尿苷	$Y=27\ 231 X-2\ 656.3$	0.999 4	0.30~30.00
色氨酸	$Y=10\ 922 X-744.35$	0.999 5	0.20~20.00
次黄嘌呤	$Y=53\ 978 X-7\ 463.2$	0.999 3	0.40~40.00
黄嘌呤	$Y=25\ 567 X-8\ 533.8$	0.995 1	0.20~20.00
肌苷	$Y=29\ 020 X-4\ 720.3$	0.999 2	0.50~50.00
鸟苷	$Y=33\ 528 X-4\ 293.4$	0.999 3	0.40~40.00

表4 沪地龙6种成分含量测定结果

Table 4 Determination results of six components in Hudilong samples

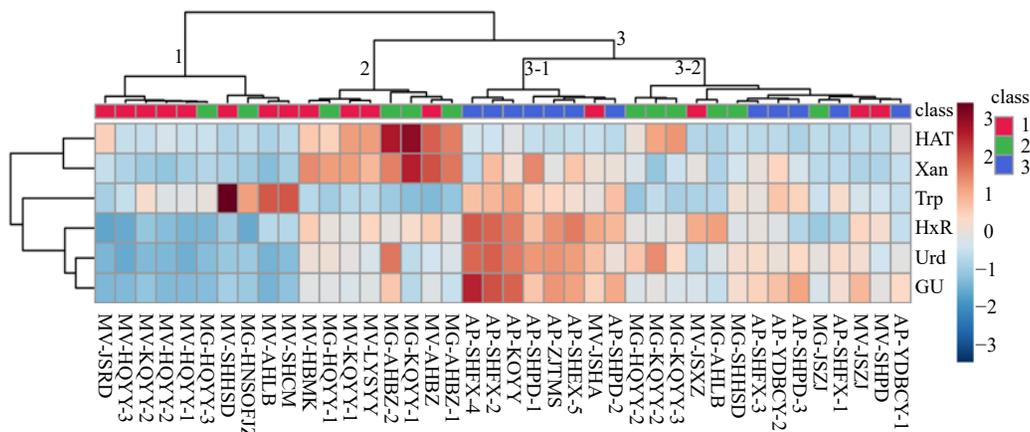
批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)						总含量	排名
	尿苷	色氨酸	次黄嘌呤	黄嘌呤	肌苷	鸟苷		
MV-AHLB	0.066 4	0.996 2	0.031 0	0.040 3	1.966 7	0.059 8	3.160 4	30
MV-AHBZ	0.204 7	0.092 0	0.342 2	0.148 3	3.145 0	0.212 2	4.144 4	12
MV-HBMK	0.262 2	0.259 4	0.197 2	0.127 8	3.129 7	0.218 2	4.194 4	11
MV-HQYY-1	0.057 3	0.415 9	0.070 0	0.051 5	1.325 3	0.073 4	1.993 4	38
MV-HQYY-2	0.076 1	0.401 4	0.091 1	0.043 4	1.428 4	0.074 2	2.114 5	36
MV-HQYY-3	0.048 9	0.303 1	0.064 5	0.054 7	1.163 7	0.073 1	1.708 0	39
MV-JSHA	0.347 6	0.449 7	0.067 7	0.084 8	3.623 0	0.295 0	4.867 9	6
MV-JSRD	0.071 5	0.200 5	0.184 6	0.063 5	1.093 4	0.068 3	1.681 8	40
MV-JSXZ	0.167 9	0.227 1	0.040 5	0.079 8	3.560 6	0.200 4	4.276 3	10
MV-JSZJ	0.273 5	0.374 1	0.055 6	0.055 4	3.011 8	0.338 3	4.108 8	13
MV-KQYY-1	0.243 4	0.253 0	0.265 5	0.120 6	2.511 7	0.200 5	3.594 7	24
MV-KQYY-2	0.078 2	0.521 3	0.065 9	0.048 0	1.564 0	0.093 7	2.371 0	34
MV-LYSYY	0.218 6	0.264 9	0.263 9	0.110 0	3.019 7	0.210 9	4.088 0	14
MV-SHPD	0.202 1	0.353 6	0.051 5	0.055 1	2.818 5	0.225 7	3.706 5	20
MV-SHCM	0.085 1	1.004 8	0.049 5	0.051 8	1.937 7	0.090 2	3.219 2	29
MV-SHHS	0.111 6	1.399 8	0.036 3	0.054 2	1.673 8	0.118 9	3.394 6	27
MG-HNSQFJZ	0.113 0	0.782 0	0.054 8	0.049 3	1.163 7	0.104 8	2.267 6	35
MG-AHLB	0.226 2	0.243 9	0.030 9	0.055 3	3.704 9	0.167 2	4.428 4	9
MG-AHBZ-1	0.225 8	0.145 5	0.304 0	0.135 1	2.601 4	0.170 5	3.582 4	25
MG-AHBZ-2	0.469 4	0.175 9	0.434 7	0.131 4	2.550 7	0.312 6	4.074 7	15
MG-HQYY-1	0.267 8	0.185 5	0.180 8	0.121 4	2.625 0	0.217 2	3.597 8	22
MG-HQYY-2	0.342 4	0.150 9	0.131 2	0.073 4	2.575 1	0.203 9	3.477 0	26
MG-HQYY-3	0.084 7	0.453 2	0.069 8	0.056 6	1.329 1	0.079 0	2.072 4	37
MG-JSZJ	0.248 6	0.330 4	0.056 0	0.059 4	1.632 1	0.201 3	2.527 9	33
MG-KQYY-1	0.171 0	0.111 3	0.470 5	0.165 5	2.859 5	0.148 8	3.926 5	16
MG-KQYY-2	0.438 4	0.294 7	0.254 5	0.044 7	2.519 7	0.225 1	3.776 9	19
MG-KQYY-3	0.302 3	0.199 8	0.274 3	0.066 6	2.629 6	0.202 6	3.675 2	21
MG-SHHS	0.279 9	0.489 0	0.061 0	0.070 0	2.437 2	0.259 8	3.596 8	23
AP-SHFX-1	0.292 7	0.521 3	0.044 8	0.060 2	1.839 1	0.254 1	3.012 2	32
AP-SHPD-1	0.418 9	0.590 2	0.063 9	0.129 3	3.280 9	0.317 3	4.800 4	8
AP-YDBCY-1	0.237 0	0.296 8	0.103 8	0.063 4	2.123 1	0.276 2	3.100 3	31
AP-SHFX-2	0.498 9	0.699 5	0.076 4	0.106 7	4.304 0	0.485 3	6.170 7	2
AP-SHFX-3	0.287 4	0.455 4	0.050 0	0.082 1	2.622 5	0.294 0	3.791 4	18
AP-SHFX-4	0.489 9	0.655 0	0.086 4	0.060 3	4.434 4	0.547 9	6.273 9	1
AP-SHPD-2	0.262 0	0.661 4	0.050 4	0.083 4	3.419 7	0.361 8	4.838 8	7
AP-ZJTMS	0.426 1	0.574 3	0.056 7	0.078 2	3.859 3	0.392 0	5.386 7	5
AP-SHFX-5	0.413 6	0.505 0	0.064 7	0.103 0	4.075 4	0.375 0	5.536 8	4
AP-YDBCY-2	0.259 4	0.638 3	0.049 2	0.095 1	2.463 1	0.325 0	3.830 1	17
AP-SHPD-3	0.298 5	0.577 6	0.032 0	0.071 6	1.912 1	0.373 3	3.265 1	28
AP-KQYY	0.462 2	0.773 0	0.111 9	0.088 0	4.080 8	0.461 4	5.977 2	3
RSD/%	52.58	61.26	91.94	40.39	35.72	52.77	31.12	

2.5 化学计量学统计分析

2.5.1 聚类分析 用在线分析工具 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>)以 6 种成分含量为变量,采用组间联接法和平方欧氏距离作为度量进行聚类分析,并绘制聚类分析热图(图 3)。

从聚为 3 类的情况来看,第 1 类以通俗环毛蚓为主,占比 80%,占通俗环毛蚓总批次 50%;

第 2 类为通俗环毛蚓和威廉环毛蚓各占比 50%,其中通俗环毛蚓占总批次 25%,威廉环毛蚓占总批次 33%;第 3 类为 3 个基原混合,并可再分为 2 支,第 1 支栉盲环毛蚓占比 87.5%,占总批次 58.3%;第 2 支为 3 者混合,通俗环毛蚓占比 21.5%,威廉环毛蚓占比 42.8%,栉盲环毛蚓占比 35.7%。



Trp-色氨酸; GU-鸟苷; Urd-尿苷; HAT-次黄嘌呤; Xan-黄嘌呤; HxR-肌苷。
Trp-tryptophan; GU-guanosine; Urd-uridine; HAT-hypoxanthine; Xan-xanthine; HxR-inosine.

图 3 沪地龙成分含量聚类分析热图

Fig. 3 Cluster analysis heatmap of Hudilong component content

2.5.2 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA) 是一种由多因变量到多自变量的回归建模方法,特点是可以去除自变量 X 中与分类变量 Y 无关的数据变化,能更加有效地滤除与分类信息无关的噪音。应用 Metaboanalyst 在线分析工具进行比较分析。

(1) 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓 OPLS-DA: 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓各自样本均在 95%置信区间内,重叠数据较多,不能有效区分(图 4-A)。与威廉环毛蚓相比,通俗环毛蚓和威廉环毛蚓差异成分为尿苷和鸟苷(图 4-B、C)。模型验证结果 Q^2 值为负数,说明模型不具有预测能力(图 4-D)。

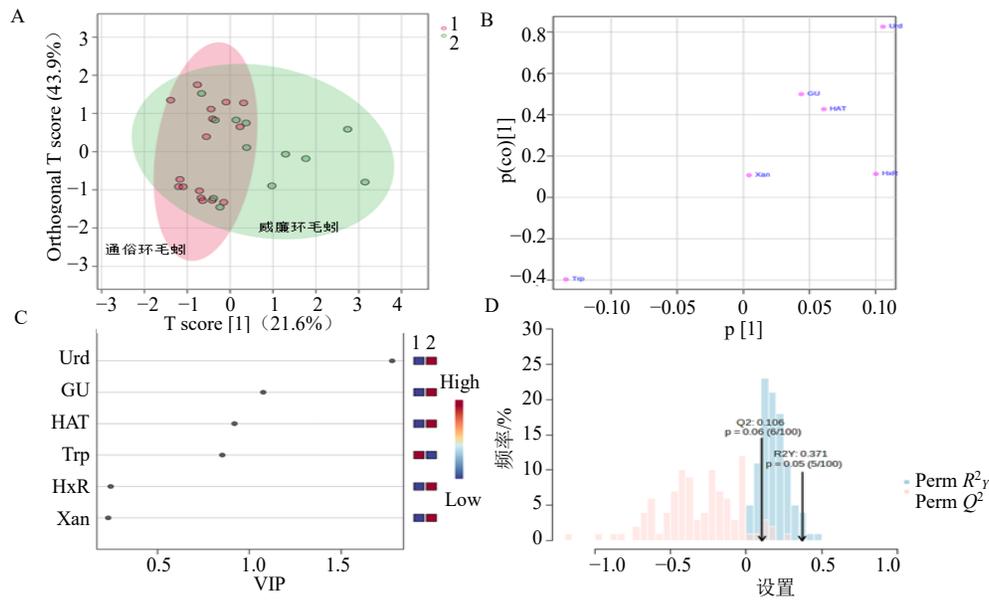
(2) 通俗环毛蚓与栉盲环毛蚓 OPLS-DA: 通俗环毛蚓与栉盲环毛蚓各自样本均在 95%置信区间内,交集部分少,组别区分明显(图 5-A)。差异成分为尿苷、鸟苷和肌苷(图 5-B、5-C)。模型验证结果 $R^2_Y=0.812$, $Q^2=0.751$,均大于 0.5,且 $P<0.01$,模型有效可行(图 5-D)。说明通俗环毛蚓与栉盲环毛蚓在 6 种成分上存在差异。

(3) 威廉环毛蚓与栉盲环毛蚓 OPLS-DA: 威廉

环毛蚓与栉盲环毛蚓各自样本均在 95%置信区间内,交集部分少,组别区分明显(图 6-A)。差异成分为尿苷、鸟苷和次黄嘌呤(图 6-B、C)。模型验证 $R^2_Y=0.816$, $Q^2=0.737$,均大于 0.5,且 $P<0.01$,模型预测能力较好(图 6-D)。说明威廉环毛蚓与栉盲环毛蚓在 6 种成分上存在差异。

(4) 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓合组后与栉盲环毛蚓 OPLS-DA: 为进一步探索通俗环毛蚓与威廉环毛蚓的相似性及二者与栉盲环毛蚓的差异性,将通俗环毛蚓与威廉环毛蚓合并为一组再与栉盲环毛蚓进行 OPLS-DA。结果二者合为一组的样本均可落在 95%置信区间内,与栉盲环毛蚓区分明显(图 7-A)。差异成分为鸟苷和尿苷(图 7-B,图 7-C)。模型验证结果 $R^2_Y=0.759$, $Q^2=0.643$,且 $P<0.01$,说明模型具有良好的解释能力(图 7-D)。该结果说明通俗环毛蚓与威廉环毛蚓二者测得的 6 种成分具有较高的相似度,但与栉盲环毛蚓存在差异。

2.5.3 主成分分析 主成分分析方法能减少计算量,避免原始数据丢失和主观因素的干扰,使评价结果更合理、客观^[17]。运用 SPSS26.0 和 Metaboanalyst



A-S-plot 图; B-荷载图; C-VIP 得分图; D-模型验证图, 下同。

A-scores plot; B-feature Importance; C-VIP scores; D-permutation, same as below.

图 4 通俗环毛蚓和威廉环毛蚓 OPLS-DA 结果

Fig. 4 Results of OPLS-DA between *P. vulgaris* and *P. guillelmi*

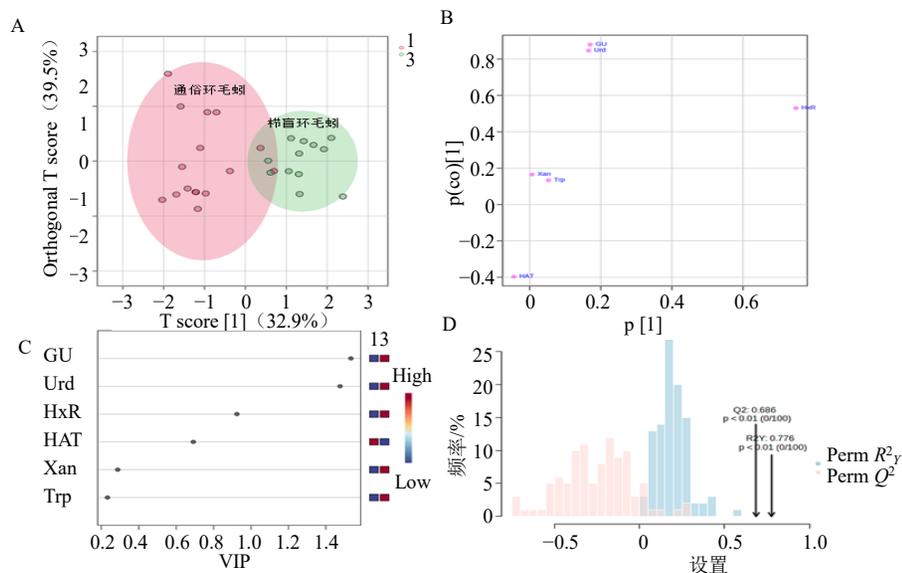


图 5 通俗环毛蚓和栉盲环毛蚓 OPLS-DA 结果

Fig. 5 Results of OPLS-DA between *P. vulgaris* and *P. pectinifera*

在线分析工具以 6 个成分测量值为变量进行分析, 首先进行 KMO 和 Bartlett 球形检验, 检验数据是否适合进行主成分分析。结果 KMO 值为 0.638, 满足主成分分析要求, 而且 Bartlett 球形检验值为 150.742, $P < 0.001$, 表明实验数据适合主成分分析。以特征值 > 1 为提取标准, 得到前 2 个主成分

的累积方差贡献率为 80.81% (表 5), 具代表性, 可用以评价沪地龙药材的品质。

将主成分得分系数与标准化后的数据相乘后求和, 得到 2 个主成分的表达式 Y_1 、 Y_2 和综合评价表达式 Y 。其中尿苷、黄嘌呤、鸟苷和肌苷对第 1 主成分有较高贡献率; 色氨酸和鸟苷对第 2 主成分有

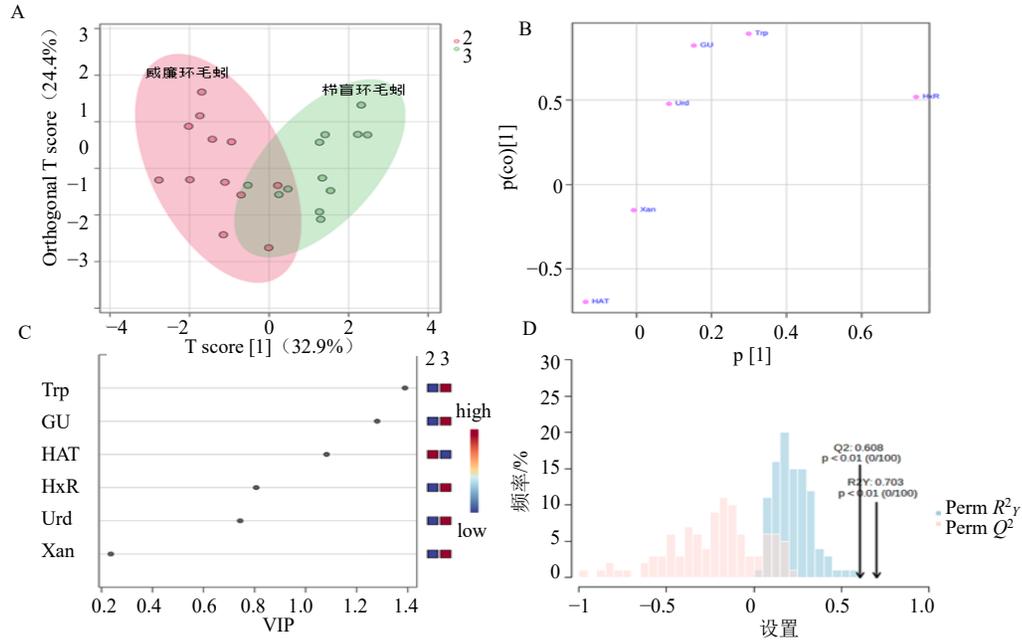


图 6 威廉环毛蚓和栉盲环毛蚓 OPLS-DA 结果

Fig. 6 Results of OPLS-DA between *P. guillelmi* and *P. pectinifera*

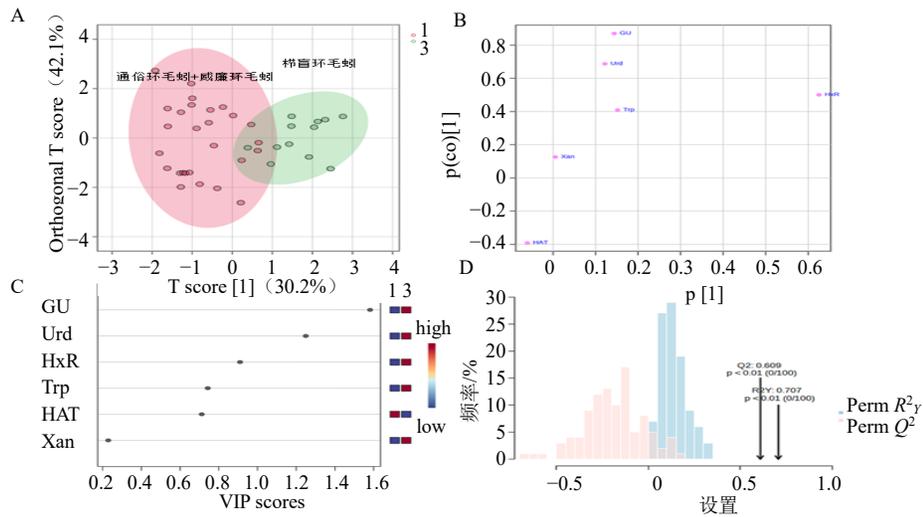


图 7 通俗环毛蚓和威廉环毛蚓并组后与栉盲环毛蚓 OPLS-DA 结果

Fig. 7 OPLS-DA results of combination of *P. vulgaris* and *P. guillelmi* with *P. pectinifera*

表 5 特征值和方差贡献率

Table 5 Eigenvalue and variance contribution rate

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比/%	累积贡献率/%	总计	方差百分比/%	累积贡献率/%
1	2.891	48.192	48.192	2.891	48.192	48.192
2	1.957	32.616	80.808	1.957	32.616	80.808
3	0.552	9.194				
4	0.328	5.468				
5	0.194	3.230				
6	0.078	1.300				

较高贡献率 (表 6)。2 个主成分的表达式分别为 $Y_1=0.521 F_1 \times 0.512 F_2 - 0.347 F_3 \times 0.157 F_4 \times 0.377 F_5 \times 0.515 F_6$, $Y_2=0.209 F_1 \times 0.537 F_2 \times 0.595 F_3 \times 0.395 F_4 \times 0.192 F_5 \times 0.348 F_6$ (F1~F6 为 6 种成分含量经标准化后的数据)。以每个主成分所对应的特

征值占提取主成分的特征值之和的比例作为权重, 得到主成分综合模型: $Y=48.192 Y_1+32.616 Y_2$ 。根据综合模型计算 40 批沪地龙药材的主成分得分及综合得分, 综合得分越高, 表明药材质量越好^[16] (表 7)。

表 6 主成分得分、特征根值和相关系数矩阵

Table 6 Principal component score, eigenvalues, and correlation coefficient matrix

成分	主成分得分		特征根值		各成分相关系数	
	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
尿苷	0.886	0.292	1.700	1.399	0.521	0.209
色氨酸	-0.276	0.751	1.700	1.399	-0.162	0.537
次黄嘌呤	0.383	-0.833	1.700	1.399	0.225	-0.595
黄嘌呤	0.670	-0.552	1.700	1.399	0.394	-0.395
肌苷	0.864	0.269	1.700	1.399	0.508	0.192
鸟苷	0.830	0.487	1.700	1.399	0.488	0.348

表 7 沪地龙药材主成分得分和综合得分

Table 7 Principal component score and comprehensive score of Hudilong

批号	主成分 1	主成分 2	综合得分	排名
MV-AHLB	-0.221 1	1.124 7	0.260 3	17
MV-AHBZ	-1.693 3	-2.657 6	-1.682 9	38
MV-HBMK	-0.599 6	-1.226 6	-0.689 0	27
MV-HQYY-1	-1.707 3	-0.449 5	-0.969 4	34
MV-HQYY-2	-1.639 9	-0.436 1	-0.932 5	31
MV-HQYY-3	-2.015 4	-0.727 1	-1.208 4	36
MV-JSHA	1.211 0	0.789 5	0.841 1	10
MV-JSRD	-2.569 8	-1.647 5	-1.775 8	39
MV-JSXZ	-0.227 3	-0.006 9	-0.111 8	22
MV-JSZJ	0.889 5	0.939 1	0.735 0	11
MV-KQYY-1	-1.182 6	-1.714 8	-1.129 2	35
MV-KQYY-2	-1.218 3	-0.040 8	-0.600 4	26
MV-LYSYY	-0.952 9	-1.459 1	-0.935 1	32
MV-SHPD	0.032 2	0.451 5	0.162 8	19
MV-SHCM	-0.125 9	1.017 2	0.271 1	16
MV-SHSD	0.752 3	1.893 1	0.980 0	7
MG-HNSQFJZ	-0.685 6	0.511 7	-0.163 5	23
MG-AHLB	0.099 2	0.397 9	0.177 6	18
MG-AHBZ-1	-1.726 7	-2.392 8	-1.612 6	37
MG-AHBZ-2	-0.509 4	-2.188 5	-0.959 3	33
MG-HQYY-1	-0.842 5	-1.306 0	-0.832 0	29
MG-HQYY-2	-0.307 9	-0.467 3	-0.300 8	25
MG-HQYY-3	-1.528 6	-0.377 2	-0.859 7	30
MG-JSZJ	-0.444 8	0.089 7	-0.185 1	24
MG-KQYY-1	-2.642 0	-3.784 1	-2.507 4	40
MG-KQYY-2	0.169 1	-0.280 4	-0.010 0	20
MG-KQYY-3	-0.759 4	-1.088 7	-0.721 0	28
MG-SHSD	0.479 1	0.627 0	0.435 4	15
AP-SHFX-1	0.419 0	0.772 3	0.453 8	14
AP-SHPD-1	1.506 3	0.651 5	0.938 4	8
AP-YDBCY-1	-0.203 7	0.023 8	-0.090 4	21
AP-SHFX-2	3.215 1	1.886 6	2.164 8	2
AP-SHFX-3	0.640 0	0.619 5	0.510 5	13
AP-SHFX-4	3.603 9	2.496 9	2.551 2	1
AP-SHPD-2	1.522 1	1.320 1	1.164 1	6
AP-ZJTMS	2.319 7	1.616 9	1.645 3	4
AP-SHFX-5	2.015 1	1.117 7	1.335 7	5
AP-YDBCY-2	0.874 0	0.833 8	0.693 2	12
AP-SHPD-3	1.059 5	1.172 7	0.893 1	9
AP-KQYY	2.997 0	1.897 7	2.063 3	3

综合得分结果显示, 栉盲环毛蚓上海浦东 1~3、上海奉贤 1~5、康桥药业、浙江天目山和益大本草园等 11 个样品; 通俗环毛蚓的江苏淮安、安徽灵璧、上海崇明、上海浦东、上海横沙岛和江苏镇江等 6 个样品; 威廉环毛蚓的上海横沙岛和安徽灵璧 2 个样品的综合得分靠前且为正值。基原上栉盲环毛蚓总体综合评分较高, 通俗环毛蚓次之; 产地上海产地占 13 个, 江苏省 2 个, 浙江省 1 个, 安

徽省 2 个。将综合得分与药材含量信息进行对比可知, 综合得分高的沪地龙药材所测得的 6 种成分的含量总和相对较高。以 40 批沪地龙药材中 6 种成分总含量对样品打分, 并将其与各批次的综合得分对应关系以柱状图表示 (图 8), 从总含量与综合得分的趋势来看, 二者具有一定的相关性, 应用皮尔森相关检验 (Pearson Correlation) 得两者的相关系数为 0.663, $P < 0.01$, 呈显著相关。

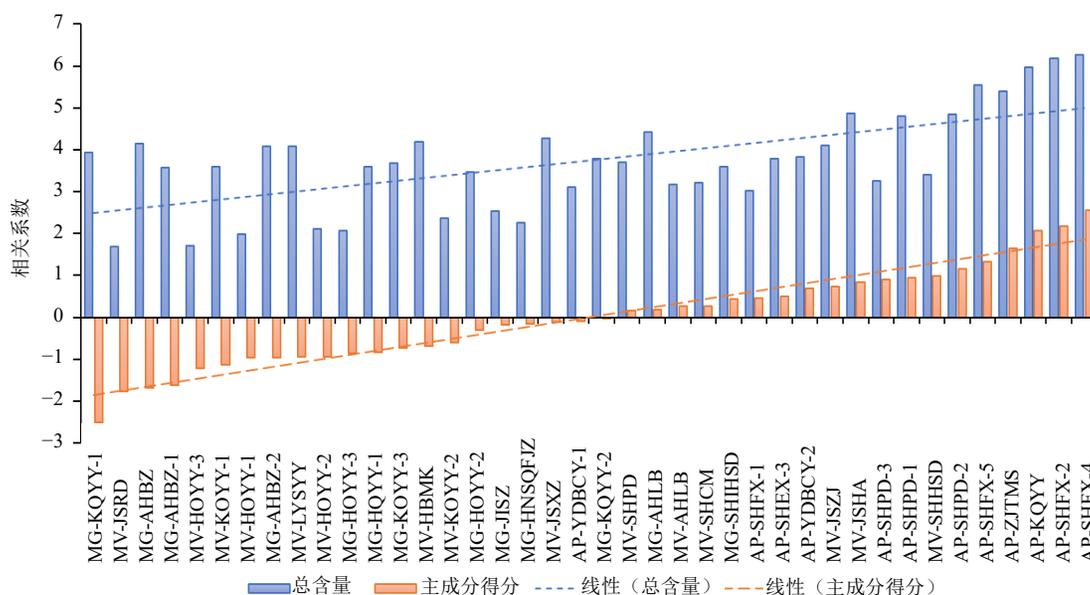


图 8 6 种成分总含量与样本主成分综合得分关系

Fig. 8 Relationship between total content of six components and comprehensive score

3 讨论

沪地龙是对通俗环毛蚓、威廉环毛蚓和栉盲环毛蚓 3 个基原的统称, 相当于多基原药材。对多基原药材的研究发现, 基原方面差异一般存在药效方面差异^[8]。现阶段临床和科研对沪地龙少作基原区分, 混用现象较多, 这也将造成其质量不稳的假象。指纹图谱在一定程度上反映了药材的基原特性、生长环境、采收加工和存储条件等多种因素共同作用的结果^[10]。相似度评价是比较总体成分的相似度大小, 主要体现的是共有特征的大小, 不是体现差异成分的种类与数量, 具有整体性和模糊性的特点, 这与中医药的“整体观”思想具有较大契合度。①与对照指纹图谱的相似度评价结果: 沪地龙 3 个基原与对照指纹图谱的相似度均大于 0.910, 表明 3 个基原整体成分种类较为接近, 也说明沪地龙各基原间具有较好的一致性。②基原间的相似度评价结果: 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓的相似度为 0.987; 栉盲环毛蚓与通俗环毛蚓

的相似度为 0.697, 与威廉表明通俗环毛蚓与威廉环毛蚓总体成分种类基本一致, 但二者均与栉盲环毛蚓具有较大差异。各基原间的相似度差异较大, 这与黄帅等^[3]建立的 HPLC 特征性图谱、李峰等^[7]建立的 HPLC 指纹图谱发现沪地龙药材间存在较大差异具有相近的结果。

40 批次 6 种水溶性成分含量, 以肌苷含量 RSD 值最低, 为 35.72%, 说明沪地龙各批次间肌苷含量差异不大, 较为稳定, 而次黄嘌呤含量 RSD 值为 91.94%, 差异最大, 是各批间的主要差异成分。尿苷、色氨酸、黄嘌呤和鸟苷的含量 RSD 值分别为 52.58%、61.26%、40.39%和 52.57%, 相对变异性较为接近, 且相对稳定。上述结果表明不同产地样品的共有成分含量存在较大差异, 本研究结果与周恒等^[6]对沪地龙含量测定发现各批次间含量结果差异较大相一致。6 种成分总含量的 RSD 值为 31.12%, 变异性不高, 说明样品总含量的相似度较高。总含

量以栝盲环毛蚓（共 12 批次）排名最为靠前，前 10 名中占比 80%，前 15 名中占比 73.3%，这与季倩等^[18]测得的沪地龙 3 个品种中栝盲环毛蚓总成分高于其他两个品种的结果相同，而威廉环毛蚓和通俗环毛蚓在总含量方面较为接近。

聚类分析结果显示，不能依据成分的含量和种类对 3 个基原进行区分，说明沪地龙药材 6 种成分含量和种类较为相似。但从聚为 3 类的情况来看，第 1 类以通俗环毛蚓为主，第 2 类为通俗环毛蚓和威廉环毛蚓各占 50%，第 3 类可分为 2 支，第 1 支以栝盲环毛蚓为主，第 2 支为 3 者混合。虽然 3 者混合较多，但小分支的聚类亦多以种内为主，说明 3 个基原间各成分含量有较大交叉。应用 OPLS-DA 对各基原间的差异性进行分析，结果通俗环毛蚓和威廉环毛蚓也不能区分，但均与栝盲环毛蚓可区分；又进一步将通俗环毛蚓和威廉环毛蚓合为一组再与栝盲环毛蚓进行判别分析，结果仍可与栝盲环毛蚓较好区分。这表明通俗环毛蚓与威廉环毛蚓 6 种成分含量相似度高，而与栝盲环毛蚓差异大，也表明，6 种成分含量差异应主要来自基原间，与产地差异相关性不强。

主成分分析结果显示，得分为正值样品共计 19 批，其中栝盲环毛蚓 11 批，占 57.9%；通俗环毛蚓 6 批，占 31.6%；威廉环毛蚓 2 批，占 10.5%，可以看出栝盲环毛蚓总体综合评分较高，通俗环毛蚓次之；从产地来看，上海市 13 批，江苏省 2 批，浙江省 1 批，安徽省 2 批，康桥药业 1 批。应用皮尔森相关性检验对主成分综合得分与总含量进行相关性分析，二者的相关系数为 0.663 ($P < 0.01$)，表明各样本总含量与主成分综合得分显著相关。

本研究应用 HPLC 建立了沪地龙 3 个基原水溶性成分指纹图谱，通过相似度评价比较了各基原间异同，再对多组分进行测定并应用化学模式识别法对基原间进行差异分析，对沪地龙基原间质量差异进行表征。研究结果表明，通俗环毛蚓与威廉环毛蚓相似度较高，但二者均与栝盲环毛蚓具有差异性。从主成分综合得分来看，栝盲环毛蚓综合得分较高且占比例较大。

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: 127.
[2] 商焯, 齐丽娜, 金华, 等. 地龙化学成分及药理活性研

究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 989-996.

- [3] 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.
[4] 关水清, 周改莲, 董婧婧, 等. HPLC 同时测定广地龙中 5 种核苷类成分含量 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2020, 38(3): 85-91.
[5] 孙洁, 田芳, 毛润乾, 等. 广地龙饮片的 HPLC 特征图谱及 5 个核苷类成分的测定 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 2010-2019.
[6] 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.
[7] 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): 1916-1919.
[8] 孙雪倩, 杨彬, 李遇伯. 多基原中药质量评价研究进展 [J/OL]. 中草药: 1-11[2024-03-25].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20231102.1432.002.html>.
[9] 王振恒, 马定财, 邵晶, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价红芪质量 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7832-7840.
[10] 鄢海燕, 邹纯才. 《中国药典》(2010 年版~2020 年版) 中药指纹 (特征) 图谱应用进展与展望 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(1): 150-155.
[11] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
[12] 孙梦梅, 王瑞生, 张振凌, 等. 基于指纹图谱及化学计量学研究不同发酵程度建曲中成分变化 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4340-4349.
[13] 何子骥, 伍斌玺, 李雨昕, 等. 基于指纹图谱和化学模式识别分析的车前子与炒车前子质量评价 [J]. 中国药房, 2022, 33(14): 1700-1705.
[14] 张勇, 李传峰, 高桂花, 等. 半夏野生品和栽培品中 8 种核苷类成分的含量测定方法建立及差异分析 [J]. 中国药房, 2021, 32(13): 1583-1588.
[15] 梁苍宇, 刘小康, 葛威, 等. 基于指纹图谱与化学计量法的淡竹叶药材质量评价研究 [J]. 中药材, 2021, 44(2): 383-386.
[16] 蒋祥亮, 刘聪燕, 陈彦, 等. 不同产地浮萍中 5 种黄酮成分量及抗氧化活性的化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 985-990.
[17] 陈丽华, 肖发林, 黄诗雨, 等. 中药质量评价研究思路及创新发展趋势 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2541-2547.
[18] 季倩, 高守红, 张汉明, 等. HPLC 法测定各沪产地龙和广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的含量 [J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(4): 443-446.

[责任编辑 时圣明]