

ICP-MS法结合化学计量学分析不同批次地龙多肽中无机元素的含量

杨洪柳^{1#}, 仲伟婷^{2#}, 郭雨师³, 李姝琪¹, 亓金钗¹, 刘永刚^{1*}, 马涛^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102401; 2. 北京泰德制药股份有限公司, 北京 100176;
3. 包头市昆都仑区医院, 内蒙古 包头 014010)

摘要: 为建立测定地龙多肽中26种无机元素的方法, 测定不同批次地龙多肽中的元素含量, 本研究采用微波消解法对样品进行前处理, 以ICP-MS法对不同批次地龙多肽中26种元素进行含量测定。26种元素在0~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好, R^2 大于0.999, 精密度RSD为0.21%~2.71%, 重复性RSD为0.19%~4.69%, 稳定性RSD为0.11%~4.24%, 加样回收率为82.41%~116.16%。数据采用Origin 2022软件绘制元素含量分布特征图, 利用SPSS 27.0进行主成分分析, 采用SIMCA 14.1软件进行OPLS-DA分析。结果表明, 26种元素中, 地龙多肽含量较高的常量元素是K、Na和Ca, 其次主要含有Zn、Fe、Al、B等微量元素, In、Sc、Co、Pb和Bi等元素含量极少甚至未能检出, 且不同批次地龙多肽元素含量存在差异。本研究通过对地龙多肽元素种类和含量进行测定分析, 为地龙多肽的生产质量控制及质量评价、药效应用提供一定的理论基础和依据。

关键词: 电感耦合等离子体-质谱法; 微波消解; 地龙; 地龙多肽; 无机元素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-1040-08

Analysis of inorganic elements in different batches of earthworm polypeptides by ICP-MS combined with chemometrics technology

YANG Hong-liu^{1#}, ZHONG Wei-ting^{2#}, GUO Yu-shi³, LI Shu-qi¹, QI Jin-chai¹,
LIU Yong-gang^{1*}, MA Tao^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China; 2. Beijing Tide Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100176, China; 3. Baotou Kundulun District Hospital, Baotou 014010, China)

Abstract: To establish a method for determining 26 inorganic elements in earthworm polypeptide and determine the elemental content in different batches of earthworm polypeptide, microwave digestion method was used to pre-treat the samples, and ICP-MS method was used to determine the content of 26 elements in different batches of earthworm polypeptide. The linear relationships of 26 elements were good in the range of 0–1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, with R^2 greater than 0.999, precision RSD 0.21%–2.71%, repeatability RSD 0.19%–4.69%, stability RSD 0.11%–4.24%, and recovery rates of 82.41%–116.16%. The data was plotted using Origin 2022 software to characterize the distribution of elements content. SPSS 27.0 was used for principal component analysis, and SIMCA 14.1 software was used for OPLS-DA analysis. The results showed that among the 26 elements, the higher content of earthworm polypeptide was K, Na, and Ca, followed by Zn, Fe, Al, B and other trace elements, In, Sc, Co, Pb, Bi and other elements had little or no detectable content, and there were differences in the content of polypeptide in different

收稿日期: 2023-10-20; 修回日期: 2023-12-20.

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1706505).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: liuyg0228@163.com; 201701033@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1187

batches. This study provides a theoretical basis for the production quality control, quality evaluation and drug efficacy application of earthworm polypeptide through the determination and analysis of the elements and content of earthworm polypeptide.

Key words: ICP-MS; microwave digestion; earthworm; earthworm polypeptide; inorganic element

地龙作为中医临床常用动物类中药,药用历史悠久,中国药典(2020版)记载的地龙来源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* (Michaelson) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelson 的干燥体,主要品种为“广地龙”和“沪地龙”^[1-3]。地龙性味寒咸,能够清热定惊、通经活络、平喘利尿,主治高热神昏、关节痹痛、肢体麻木、高血压等症^[4]。现代研究表明地龙有降压、平喘、抗凝血、抗血栓、抗炎、抗菌、抗肿瘤、免疫调节等多种药理作用^[5,6]。

地龙中主要含有蛋白质、肽类、酶类、氨基酸、二肽类、核苷类、脂类及无机元素。其中蛋白多肽类成分含量较高,是地龙的主要成分,也是其主要药效成分之一^[7]。对于地龙蛋白的提取, Wu 等^[8]比较了直接浸提、匀浆浸提、超声提取三种不同提取方法对于地龙可溶性蛋白的影响,其中匀浆提取效率高且简单易行。Peng 等^[9]比较了水提醇沉法和盐析法对可溶性蛋白的提取率及活性影响,实验表明水提醇沉法对可溶性蛋白的提取率及活性优于盐析法。Dong 等^[10]采用 SDS-PAGE 法对新鲜广地龙进行总蛋白分离,利用纳升高效率液相色谱-四极杆-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱技术检索鉴定出 386 个蛋白质。目前,已从地龙中提取得到抗菌肽、纤维蛋白溶酶、催产素相关肽等具有生物活性的肽类^[11,12]。现代药理研究表明,地龙蛋白多肽类成分具有抗凝血、抗血栓、抗肿瘤、抗纤维化、降血脂、抗氧化、增强免疫等药理作用^[13]。例如, Li 等^[14]从蚯蚓的腔液中纯化出两种新型镇痛肽和抗炎肽 VQ-5 和 AQ-5。Wang 等^[15]通过体外酶解方法对地龙药材进行体外酶解,采用电渗析法、超滤法、DA201-C 树脂法等方法对地龙酶解液进行分离,得到抗血栓肽。He 等^[16]采用体外消化模型研究了蚯蚓蛋白在胃肠道消化降解后产生的抗氧化肽的氨基酸序列,表明蚯蚓蛋白胃肠消化产物具有良好的抗氧化活性。Chen 等^[17]通过观察地龙多肽对高血脂大鼠的防治作用,初步探讨了地龙多肽的降脂作用机制。Tian 等^[18]研究表明从广地龙中纯化的蛋白组分具有促进创伤修复的作用。地龙中的蛋白多肽类成分含量高且具有多种药理活性,已开发出多肽地龙蛋白、地龙蛋白溶血栓胶囊、蚓激酶肠溶胶囊等蛋白多肽类产品^[19]。Qi 等^[20]通过对

小鼠的凝血及出血时间,血栓造模实验以及对大鼠凝血三项的检测实验表明,地龙胶囊具有抑制血栓生成的作用。Liu 等^[21]研究表明蚓激酶肠溶胶囊可以提高急性脑梗死患者的治疗效果,可以有效改善凝血指标和血液流变学指标,提升患者神经功能和生活活动能力。目前,地龙蛋白多肽的研究逐渐增多,地龙蛋白多肽类成分的研究也逐渐深入和广泛。

无机元素与人体健康密切相关,尤其具有重要生理功能的微量元素在机体内发挥着重要作用^[22]。动植物等中药材中,含有多种无机元素,无机元素与中药功效之间关系紧密,无机元素与中药性味、归经、中药的质量研究、炮制等方面也有一定的关系^[23,24]。目前,微量元素分析技术有原子吸收光谱法、原子荧光光谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法和电感耦合等离子体质谱法等,其中电感耦合等离子体质谱法 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 具有多元素同时测定、干扰较少、分析简便快速、精密度较高、检测限低等多种优势。中药含有的无机元素种类丰富且含量差异大,该技术可以更好地应用于中药无机元素的分析^[25-27]。地龙多肽具有多种药理活性,其药理活性可能与所含无机元素种类和含量相关,因此本研究采用电感耦合等离子体质谱法检测地龙多肽中的无机元素,探究地龙多肽中无机元素的种类、含量与临床疗效和质量研究等关系,为地龙多肽的质量控制和应用提供一定的理论基础和依据。

材料与方法

仪器 十万分之一电子天平 (BT125D 型,德国 Satorious 公司); MARS Xpress 微波消解仪 (美国 CEM 公司); 电热赶酸仪 (EHD-24 型,北京东航科仪仪器有限公司); 电感耦合等离子体质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

试剂 65.0%~68.0% HNO₃、30% 过氧化氢 (优级纯 GR, 北京化工厂有限公司); 纯净水 (屈臣氏饮用水,广州屈臣氏食品饮料有限公司); 高纯氩气 (北京氩普北分气体工业有限公司); 高纯氮气 (北京北氧利来科技发展有限公司); Re、Rh 单元素标准溶液 (1 000 μg·mL⁻¹, 国家有色金属及电子材料分析测试中心); B、Na、Mg、Al、K、Ca、Sc、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、As、Se、Zr、

Mo、Cd、In、Te、Ba、Pb、Bi 混合标准溶液 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 上海麦克林生化科技有限公司); 地龙多肽 (北京艾克赛德生物工程有限公司, 批号: 20230324, 20230325, 20230326, 20230327, 20230328, 20230329)。

ICP-MS测定条件 氩气压力: 0.60~0.65 MPa, 氦气压力: 0.1~0.2 MPa, 冷却气流速: 14.000 0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 辅助气流速: 0.800 0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 雾化气流速: 0.981 6 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 射频功率: 1 550 W, 雾化室温度: 2.5 $^{\circ}\text{C}$, 采样深度: 5 mm, 扫描次数 30 次, 数据采集模式: KED, 重复 3 次。

微波消解程序 微波消解程序总共分为三步: 第一步为 20 min 内从室温升至 100 $^{\circ}\text{C}$, 维持 5 min, 输出功率为 1 600 W; 第二步为 10 min 内从 100 $^{\circ}\text{C}$ 升至 150 $^{\circ}\text{C}$, 维持 5 min, 输出功率为 1 600 W; 第三步为 10 min 内从 150 $^{\circ}\text{C}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 维持 30 min, 输出功率为 1 600 W。

内标溶液的制备 精密移取 Rh、Re 元素标准溶液适量, 用 2% 硝酸溶液稀释成浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 作为内标溶液。

混合标准溶液的制备 精密移取含有 26 种元素的多元素混合标准溶液适量, 用 2% 硝酸溶液进行逐级稀释, 配制各元素含量浓度依次为 0、1、10、100、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液。

样品制备 精密称量约 0.1 g 地龙多肽样品, 置于聚四氟乙烯消解罐中消解, 移取 5 mL 浓硝酸和 1 mL 30% 过氧化氢至消解罐中, 旋紧罐盖, 室温下放置

20 min 进行预消解后, 将消解罐放入微波消解仪, 按照微波消解程序进行消解, 消解程序结束后运行冷却程序 15 min。待温度降至室温后取出, 将消解罐置于电热赶酸仪中, 设置 110 $^{\circ}\text{C}$, 赶酸约 3 h, 结束后冷却至室温, 将消解罐内剩余少量液体过 0.45 μm 滤膜转移至 25 mL 量瓶中, 用纯净水洗涤消解罐数次, 同时将洗涤液合并于量瓶中, 并用纯净水定容至刻度, 即得供试品溶液。

空白溶液的制备 配制空白溶液即除不加地龙多肽样品之外, 其余所有配制步骤与供试品溶液的配制方法相同。标准溶液配制所用的器具均用 2% 硝酸溶液浸泡 24 h 以上, 用水洗净晾干备用。

结果

1 线性方程、检出限和定量限

在 ICP-MS 测定条件下, 将配制的标准溶液依次进行测定, 以标准溶液的浓度作为横坐标, 分析信号与内标信号的比值作为纵坐标, 绘制标准曲线, 将配制的空白溶液连续测定 11 次, 并对测定结果进行分析处理, 得到该方法的检出限和定量限, 结果见表 1。

2 精密度试验

在 ICP-MS 工作条件下, 将配制的 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准溶液测定 6 次, 根据测定值计算 26 种无机元素的精密度 RSD 为 0.21%~2.71%, 结果见表 2。

Table 1 Linear equation, detection limit, and quantification limit (linear range, 0-1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Element	Linear equation	R^2	Detection limit/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Quantification limit/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
B	$Y = 205.769 5x + 571.570 7$	1.000 0	0.218 1	0.727 0
Na	$Y = 20 636.768 8x + 412 987.158 4$	1.000 0	0.195 0	0.650 0
Mg	$Y = 1 891.490 8x + 9 702.217 2$	1.000 0	0.136 6	0.455 3
Al	$Y = 439.215 7x + 1 711.007 9$	1.000 0	0.256 0	0.853 3
K	$Y = 1 566.145 9x + 2 356.477 1$	1.000 0	0.149 0	0.496 7
Ca	$Y = 151.837 5x + 2 604.939 6$	1.000 0	0.110 3	0.367 7
Sc	$Y = 3 207.444 8x + 54 727.035 5$	0.999 2	0.002 7	0.009 0
V	$Y = 16 845.352 6x + 12 330.536 7$	1.000 0	0.003 4	0.011 3
Cr	$Y = 28 532.697 6x + 71 492.580 2$	1.000 0	0.017 8	0.059 3
Mn	$Y = 9 183.859 4x + 149 058.681 2$	0.999 4	0.162 8	0.542 7
Fe	$Y = 931.471 3x + 2 345.333 1$	0.999 6	0.172 0	0.573 3
Co	$Y = 56 666.774 0x + 73 388.274 9$	0.999 9	0.043 4	0.144 7
Ni	$Y = 16 614.544 5x + 20 118.446 5$	1.000 0	0.086 4	0.288 0
Cu	$Y = 46 343.764 6x + 31 158.402 5$	0.999 8	0.009 5	0.031 7
Zn	$Y = 5 373.501 2x + 92 958.053 0$	1.000 0	0.090 3	0.301 0
Ga	$Y = 4 464.326 9x + 436.896 9$	1.000 0	0.010 5	0.035 0
As	$Y = 2 303.449 0x + 7 192.516 2$	0.999 8	0.018 8	0.062 7
Se	$Y = 28.867 5x + 1 306.069 4$	1.000 0	0.021 6	0.072 0
Zr	$Y = 34 025.723 5x + 4 056.447 5$	1.000 0	0.002 7	0.009 0
Mo	$Y = 23 509.309 1x + 3 917.508 9$	1.000 0	0.001 3	0.004 3
Cd	$Y = 11 460.457 8x + 780.469 5$	1.000 0	0.001 0	0.003 3
In	$Y = 44 574.342 2x + 209.335 3$	1.000 0	0.000 3	0.001 0
Te	$Y = 301.609 0x + 48.444 6$	1.000 0	0.003 6	0.012 0
Ba	$Y = 5 875.419 7x + 20 510.415 9$	0.999 9	0.026 8	0.089 3
Pb	$Y = 206 723.543 2x + 1 215 523.538 2$	0.999 9	0.005 5	0.018 3
Bi	$Y = 268 061.272 8x + 474.676 1$	1.000 0	0.000 3	0.001 0

3 重复性试验

准确称量6份约0.1 g的地龙多肽样品,按照前述样品制备方法配制供试品溶液,在ICP-MS工作条件下,对配制的6份供试品溶液进行测定,根据测定值计算26种无机元素的重复性RSD为0.19%~4.69%,结果见表2。

4 稳定性试验

准确称量1份约0.1 g的地龙多肽样品,按照前述样品制备方法配制供试品溶液,在ICP-MS工作条件下,分别于0、2、4、8、12、24 h时取样进行测定,根据测定值计算26种无机元素的稳定性RSD为0.11%~4.24%。结果见表2。

5 加样回收率试验

准确称量6份约0.05 g的地龙多肽样品,加入与上述地龙多肽样品中各无机元素含量相当的标准溶液,按照前述样品制备方法配制供试品溶液,在ICP-MS工作条件下,对配制的6份供试品溶液进行测定,根据测定值计算26种无机元素的回收率,加样回收率为82.41%~116.16%。结果见表2。

6 不同批次地龙多肽中无机元素含量

取6批不同批次的地龙多肽样品,分别编号为Y1~Y6,每批样品各3份,每份约0.1 g,按照前述样品制备方法配制供试品溶液,在ICP-MS工作条件下,依次对配制的供试品溶液进行测定,根据测定值计算6批地龙多肽样品中26种无机元素的含量,结果见表3。由表可知,在26种元素中,地龙多肽主要含有K、Ca、Na、Mg等常量元素;微量元素含量较多的为Fe、Zn、Al和B元素,平均含量分别为53.65、20.64、17.78和4.54 mg·kg⁻¹;In、Sc、Co、Pb和Bi等元素含量极低,甚至在部分批次未能检出。

7 元素含量分布

为了更直观地分析各元素的含量,将26种元素数据导入Origin 2022软件绘制元素含量分布特征图,整体分析地龙多肽中26种无机元素含量,结果见图1。不同批次地龙多肽间部分元素含量差异明显,其中

Table 2 Precision, repeatability, stability, and sample recovery of each element

Element	Repeatability /%	Precision /%	Stability /%	Sample recovery	
				Rate of recovery/%	RSD /%
B	2.16	1.42	0.72	115.64	1.87
Na	0.70	2.40	0.26	116.16	2.14
Mg	0.60	1.23	0.19	103.53	0.54
Al	1.11	1.16	0.51	103.33	2.06
K	0.36	1.34	0.21	111.06	0.41
Ca	0.39	2.71	0.82	107.99	0.19
Sc	2.72	1.67	0.56	102.65	1.46
V	1.05	1.32	0.78	87.75	2.99
Cr	0.54	0.64	0.12	90.53	1.07
Mn	0.19	1.19	1.39	93.22	0.82
Fe	0.50	1.61	4.24	108.85	0.41
Co	1.60	1.22	0.81	113.22	1.02
Ni	0.22	1.11	0.18	83.04	0.19
Cu	0.53	0.84	0.11	115.74	0.76
Zn	0.79	0.95	0.25	96.66	0.74
Ga	1.84	1.29	0.23	106.88	1.03
As	3.65	0.97	0.82	114.87	0.32
Se	3.60	0.80	0.98	91.62	1.83
Zr	0.24	0.67	2.33	100.03	1.08
Mo	3.08	0.32	0.87	82.41	0.97
Cd	2.78	0.47	0.46	114.04	0.66
In	4.09	1.17	0.72	93.13	0.81
Te	2.20	0.21	0.50	86.27	0.77
Ba	1.24	0.62	0.20	82.96	2.11
Pb	1.10	0.89	1.99	91.21	0.66
Bi	4.69	0.59	1.37	101.95	2.03

Cu、As、Zr、B、Mg和Ca元素在不同批次中含量有较大差异。因此,不同批次地龙多肽中的元素含量存在差异,能够为地龙多肽的质量控制及质量评价提供一定的理论依据。

8 主成分分析

主成分分析(principal component analysis, PCA)是采用降维的方法,将多个变量转换为能够反映原始变量的大部分信息的少数变量^[28]。在检测的26种不同元素中,除去含量极少以及未能检出的In、Sc、Co、Pb和Bi元素,剩余21种元素数据通过SPSS 27.0软件进行主成分分析,得到主成分特征值、方差贡献率和累积方差贡献率及旋转后的载荷矩阵图,结果如表4、5

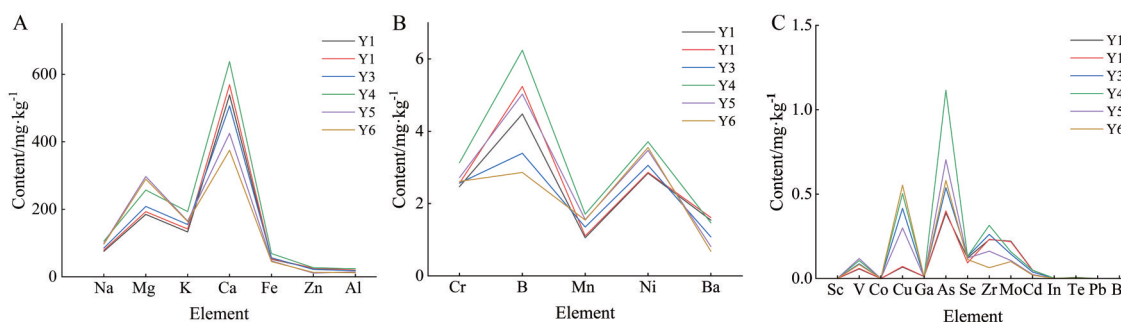


Figure 1 Distribution characteristics of element content (A, B and C)

Table 3 Content of 26 inorganic elements in different batches of earthworm polypeptides (mg·kg⁻¹). Y1–Y6 represent six batches of earthworm polypeptide samples respectively. –: Not detected

Element	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Mean value	RSD/%
B	4.48	5.24	3.39	6.24	5.03	2.86	4.54	25.06
Na	756.27	791.92	851.12	1 055.44	988.13	968.89	901.97	12.09
Mg	184.82	192.82	208.50	257.03	297.03	289.26	238.24	18.94
Al	18.30	19.83	18.02	23.92	14.48	12.14	17.78	21.15
K	13 284.09	14 149.11	1 592.53	19 322.25	16 506.80	16 381.06	13 539.31	41.94
Ca	538.61	568.93	506.36	637.26	424.95	374.73	508.47	17.22
Sc	–	–	0.001 9	0.002 7	0.001 4	–	0.001 0	106.93
V	0.06	0.06	0.09	0.17	0.12	0.08	0.09	26.08
Cr	2.47	2.56	2.57	3.13	2.72	2.61	2.68	8.03
Mn	1.06	1.11	1.35	1.71	1.56	1.55	1.39	17.31
Fe	51.99	53.07	56.14	68.84	46.82	45.05	53.65	14.45
Co	–	–	–	–	–	–	–	–
Ni	2.84	2.86	3.06	3.71	3.47	3.55	3.25	10.55
Cu	0.07	0.07	0.42	0.50	0.30	0.55	0.32	60.53
Zn	25.13	25.80	21.86	27.00	11.00	13.02	20.64	30.64
Ga	0.011 7	0.012 3	0.008 3	0.010 3	0.006 6	0.006 5	0.009 3	24.83
As	0.39	0.40	0.54	1.16	0.70	0.58	0.62	39.58
Se	0.12	0.09	0.13	0.13	0.12	0.11	0.12	11.05
Zr	0.23	0.23	0.26	0.32	0.16	0.06	0.21	37.84
Mo	0.22	0.22	0.14	0.16	0.11	0.10	0.16	30.31
Cd	0.05	0.05	0.04	0.05	0.02	0.02	0.04	32.08
In	0.000 8	0.000 9	0.001 2	0.001 6	0.000 9	0.001 0	0.001 1	25.19
Te	0.006 7	0.003 2	0.004 5	0.005 4	0.002 7	0.002 5	0.004 2	36.55
Ba	1.54	1.61	1.08	1.47	0.81	0.68	1.20	30.36
Pb	–	–	–	–	–	–	–	–
Bi	–	–	–	–	–	–	–	–

所示。将数据导入 SIMCA 14.1 软件, 得到 PCA 得分图, 结果见图 2。其中有三个主成分的特征值大于 1, 主成分 1 的方差贡献率为 51.720%, 主成分 2 的方差贡献率为 36.289%, 主成分 3 的方差贡献率为 6.923%。前 3 个主成分累计方差贡献率达 94.937%, 能够反映不同批次地龙多肽中不同元素的大部分信息。从表 5 可以看出, Ca、Al 和 Cd 元素在第一主成分上有较高的载荷, Na、K 和 Mn 元素在第二主成分上有较高的载荷, Se、Cu 和 Te 元素有较高的载荷。说明第一主成分主要反映 Ca、Al 和 Cd 元素的信息, 第二主成分主要反映 Na、K 和 Mn 元素的信息, 第三主成分主要反映 Se、Cu 和 Te 元素的信息。

Table 4 Principal component eigenvalues, contribution rates, and cumulative variance contribution rates

Principal component	Eigenvalue	Variance contribution rate/%	Cumulative variance contribution rate/%
1	10.861	51.720	51.720
2	7.621	36.289	88.009
3	1.454	6.923	94.932

9 正交偏小二乘法判别 (OPLS-DA) 分析

在不同批次地龙多肽检测的 26 种元素中, 除去含量极少以及未能检出的 In、Sc、Co、Pb 和 Bi 元素, 将剩

Table 5 Component matrix

Element	Rotated factor loading matrix		
	1	2	3
B	0.763	0.361	-0.388
Na	-0.149	0.985	-0.014
Mg	-0.580	0.783	-0.141
Al	0.982	0.143	0.049
K	0.109	0.982	0.083
Ca	0.997	0.025	0.012
V	-0.200	0.881	0.095
Cr	0.426	0.901	-0.020
Mn	-0.194	0.973	0.106
Fe	0.857	0.406	0.255
Ni	-0.210	0.954	0.022
Cu	-0.329	0.762	0.364
Zn	0.927	-0.269	0.103
Ga	0.834	-0.495	-0.207
As	0.306	0.942	0.112
Se	0.102	0.444	0.850
Zr	0.915	0.054	0.249
Mo	0.727	-0.659	-0.151
Cd	0.952	-0.296	0.054
Te	0.687	-0.247	0.573
Ba	0.916	-0.367	-0.142

余 21 种元素数据导入 SIMCA 14.1 软件, 进行正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。建立的模型 R^2X (cum) 为 0.909, 稳定性 R^2Y (cum) 为 0.675, 预测率 Q^2 (cum) 为 0.924, 均大于 0.5, 说明所建模型稳定、可靠。地龙多肽 OPLS-DA 模型得分图及 VIP 图如图 3 所示, 以 VIP > 1

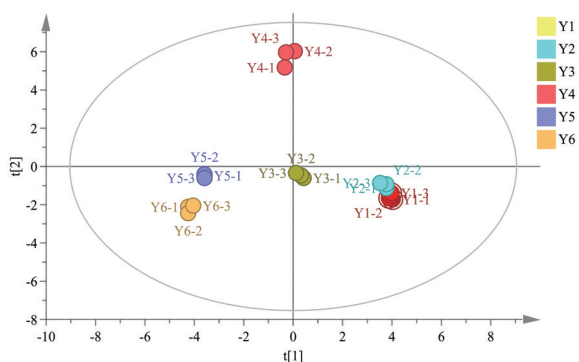


Figure 2 PCA scores plot

为筛选标准, 得出B、Cu、Fe、Cr四种微量元素为不同批次地龙多肽的质量差异性成分。

讨论

本文通过电感耦合等离子体质谱法对不同批次的地龙多肽样品中26种元素进行了检测, 结果显示地龙多肽中含量较丰富的常量元素是K、Na和Ca; 其次, 微量元素主要含有Zn、Fe、Al、B等, Ga、Te和In元素含量极少, Co、Pb和Bi元素并未检出, Sc元素在部分批次中检出。研究表明, K元素具有促进组织细胞再生修复、促进血液凝固等作用; Ca可以降低神经兴奋性, 还具有止血消肿的作用; Zn具有促进人体生长发育, 促进创口愈合, 提高机体免疫力, 杀菌等作用; Mg具有调节神经肌肉的兴奋性, 扩张血管等作用; Fe是人体内含量最高的必需微量元素, 参与人体氧的运输和储存, 参与体内过氧化物酶、过氧化氢酶等多种酶的合成, 同时有助于伤口愈合^[29,30]。这可能与地龙中的蛋白质和肽类成分所具有的促进生长发育、抗凝血、促进伤口愈合、增强免疫、抗肿瘤、抗肝纤维化及抗菌等作用有关^[31]。

中药资源丰富, 产地众多, 微量元素在地壳表面分布不均, 不同地区的微量元素分布存在差异, 动植物所

处的环境对其所含微量元素也有一定影响, 因此中药中微量元素的含量可作为药材质量控制的依据之一^[32]。地龙独特的生活习性, 使其容易受到土壤环境的影响。地龙种类繁多, 产地不同, 品种不同都会对地龙的质量和药效产生影响。地龙的品种主要为产于广西、广东、福建等地的广地龙以及产于浙江、湖北、上海等地的沪地龙两种^[33]。Wu等^[34]采用电感耦合等离子体发射光谱和电感耦合等离子体质谱对不同产地的广地龙中的25种元素含量进行了测定, 并运用主成分分析和判别分析进行分析, 结果表明, 该方法可以溯源广地龙的生产产地。地龙中含有多种无机元素, 例如钙、钾、镁、铁、锌、锶、硒、铬、钴、锰、铜、铅、镉、镍等^[35,36]。地龙多肽中所含元素更多源于地龙药材, 因此, 不同品种、不同产地所产的地龙多肽中所含的无机元素也会存在一定的差异。

地龙蛋白多肽类的提取主要包括酶解法、匀浆浸提法、超声提取以及水提醇沉等方法, 所使用的溶剂主要有有机溶剂, 酸碱溶液和水等, 不同的提取方法和提取溶剂对地龙多肽类成分的提取和保留有一定的影响, 对其所含的无机元素含量也有一定的影响^[37]。化学计量学运用数学、统计学、计算机科学等相关学科的理论与方法, 来优化化学量测过程, 从而在所获数据中能够最大程度地获取有用的信息^[38]。本研究测定了不同批次地龙多肽中的无机元素, 并通过元素含量分布分析、主成分分析以及正交偏最小二乘法判别分析对测定结果进行分析。根据元素含量分布特征图来看, 不同批次的地龙多肽之间元素含量存在较大差异, 主要差异元素为Cu、As、Zr、B、Mg和Ca元素。元素含量分布特征图可方便直观地看出元素含量差异等方面信息, 可以作为样品质量评价的依据之一。通过降维的方法进行主成分分析, 特征值大于1的3个主成分累计方差贡献率达94.937%, 可反映地龙多肽不同批次中不同元素的大部分信息。经正交偏最小二乘法判别分析, 不

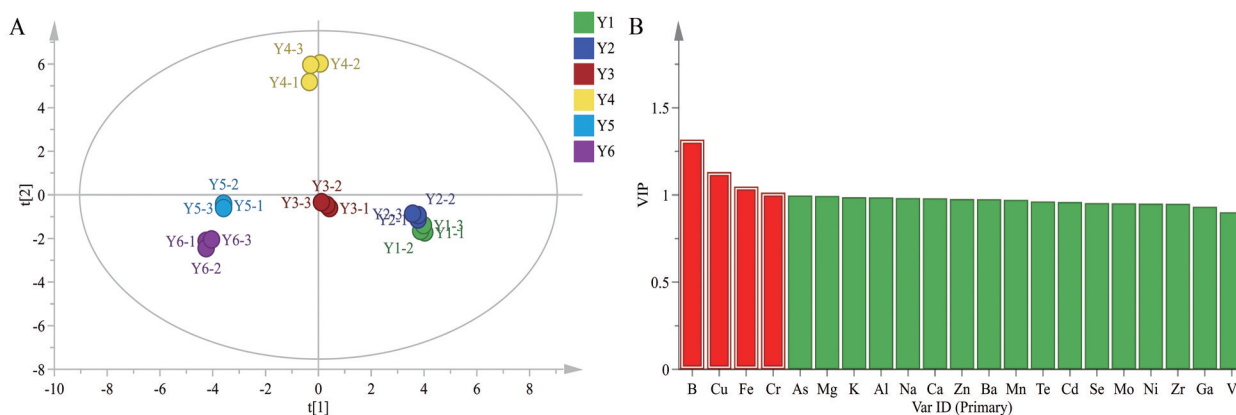


Figure 3 OPLS-DA model score map (A) and OPLS-DA VIP value map of earthworm peptides (B)

同批次地龙多肽的质量差异性成分为B、Cu、Fe和Cr四种微量元素。

中药中所含的微量元素对中药药效的发挥有一定的影响,对中药中的微量元素进行分析可为中药的药效、药性、质量评价及用药安全提供更多的参考^[39]。本研究基于ICP-MS建立了对地龙多肽中26种无机元素的测定方法,完成了对地龙多肽元素的种类和含量测定及分析,为其质量控制及进一步应用提供一定的理论基础。

作者贡献: 杨洪柳负责设计实验、样品检测、数据处理及文章撰写;仲伟婷负责数据处理及文章撰写;郭雨师和李姝琪负责文献查阅及整理;亓金钗负责文章修改;刘永刚和马涛负责实验设计及文章审阅。

利益冲突: 所有作者均声明无任何利益冲突。

References

- [1] Guan SQ, Zhou GL, Zhou WL, et al. Herbal textual research and modern analysis of *Pheretima* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 205-212.
- [2] Zheng J, Xie M, Liu W, et al. Bencaological study of *Pheretima* [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2020, 16: 76-80.
- [3] Wang L, Zhang XX, Zhang CL. Research progress on *Pheretima* and earthworms with related origin [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 3298-3302.
- [4] Li Y, Ding GH. Determination and analysis of heavy metals and harmful elements in *Pheretima* and *Hirudo* with microwave digestion by ICP-MS [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2018, 45: 2152-2155.
- [5] Sun YJ, Zhang N, Li JH, et al. Study on effect of tail-amputated earthworm on contents of inorganic elements in wound skin of rats by ICP-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2020, 37: 1438-1441.
- [6] Zuo TT, Luo FY, Jin HY, et al. Determination of the bioaccessibility of cadmium and arsenic in earthworms by PBET digestion *in vitro*/MDCK cell model with risk assessment [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1004-1009.
- [7] Liu Q, Bi QR, Tan NH. Research progress on proteins and peptides from earthworm [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 252-261.
- [8] Wu Q, Cao YE, Fang HT, et al. Comparison of different extraction methods for soluble protein from fresh earthworm [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40: 1878-1882.
- [9] Peng HB, Yuan SJ, Yin C, et al. Comparison of activity between two extraction methods for earthworm protein [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2021, 32: 1860-1862.
- [10] Dong HS, Zhang JX, Hu Q, et al. Study on proteins in Guangdong by nanoLC/orbitrap fusion lumos HR-MS [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 324-331.
- [11] Li SW, Hao EW, Du ZC, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of *Pheretima aspergillum* and predictive analysis on quality marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 2560-2571.
- [12] Tan LG, Zhong LY. Research progress in the processing of earthworm [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med (江西中医药), 2017, 48: 75-77, 80.
- [13] Yuan Q, Yin ML, Zhang T, et al. Progress in pharmacological research on the treatment of ischemic brain injury with traditional Chinese medicine earthworm [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志), 2022, 20: 3574-3577.
- [14] Li C, Chen M, Li X, et al. Purification and function of two analgesic and anti-inflammatory peptides from coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida* [J]. Peptides, 2017, 89: 71-81.
- [15] Wang JQ, Wang SP, Liu WH. Study on separation of antithrombotic peptide from lumbricus [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2019, 31: 1-4.
- [16] He P, Zhang Y, Zhang Y, et al. Isolation, identification of antioxidant peptides from earthworm proteins and analysis of the structure-activity relationship of the peptides based on quantum chemical calculations [J]. Food Chem, 2024, 431: 137137.
- [17] Chen P. Effect of the prevention of Lumbricus polypeptide on rats with hyperlipidemia in experiment [J]. Pharm Biotechnol (药物生物技术), 2015, 22: 509-511.
- [18] Tian LH, Yao L, Feng LN, et al. Mechanism of purified protein in *Pheretima aspergillum* in promoting wound repair [J]. World Chin Med (世界中医药), 2023, 18: 1236-1239.
- [19] He HO, Shi LY. Study on the efficacy evaluation of earthworm polypeptide in relieving and repairing [J]. Chem Eng Des Commun (化工设计通讯), 2022, 48: 94-95, 99.
- [20] Qi MM, Sun JB. Inhibitory effect of earthworm protein capsules on arteriovenous thrombosis in rats [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2021, 37: 17-22, 16.
- [21] Liu Q, Gong X. The effect of earthworm kinase enteric coated capsules on coagulation function indicators and neurological function in patients with acute cerebral infarction [J]. Heilongjiang Med J (黑龙江医药), 2023, 36: 610-612.
- [22] Zhou B, Li XM. Research advance of inorganic elements in traditional Chinese medicine [J]. Feed Rev (饲料博览), 2013, (1): 12-15.
- [23] Wei XC, Li CY, Zhou RJ, et al. Research progress in relationship between inorganic elements and Chinese materia medica [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2022, 29: 140-144.
- [24] Zuo TT, Liu JL, Li YL, et al. A novel perspective of health risk assessment of heavy metals in Chinese herbal medicine-probabilistic risk assessment, taking *Plantago asiatica* L. as an example [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 3365-3370.
- [25] Cheng XH, Zeng M, Lin SH. Determination of content of

- selenium in Laver by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [J]. *Vegetables (蔬菜)*, 2022, (08): 60-63.
- [26] Zhu YM, Liu J, Dong SQ, et al. Simultaneous determination of 25 elements in Yunnan Chinese medicinal materials by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chem Anal Meterage (化学分析计量)*, 2022, 31: 16-21.
- [27] Fang XQ, Hu WK, Zhang FG, et al. Determination of germanium in plant samples by microwave digestion-atmospheric pressure digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Resour Environ Eng (资源环境与工程)*, 2022, 36: 713-717.
- [28] Li YL, Zuo TT, Xu J, et al. Residues analysis and content variation of 16 trace elements in 4 animal medicines by ICP-MS [J]. *Drug Eval Res (药物评价研究)*, 2020, 43: 248-254.
- [29] Li L, Chang X, Cui HF, et al. Comparative analysis of inorganic elements in difference officinal parts of *Aster tataricus* by ICP-MS with statistical analysis [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2023, 46: 1447-1453.
- [30] Ou JM, Wang R, Cheng QB, et al. Simultaneous determination of inorganic elements in Mume Fructus from different regions by ICP-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 482-489.
- [31] Zhou N, Li GY, Zhang HH, et al. New research progress on application of Zinc in animal production [J]. *Chin Anim Husband Vet Med (中国畜牧兽医)*, 2014, 41: 106-110.
- [32] Zhang YL, Wang DQ, Yin XF. Research on relationship between trace element and effects of Chinese herb [J]. *Forum Tradit Chin Med (国医论坛)*, 2012, 27: 20-21.
- [33] Wang YT, Wang HJ, Ma RX, et al. Research progress of *Pheretima* [J]. *Acta Neuropharmacol (神经药理学报)*, 2022, 12: 48-56.
- [34] Wu HY, Xu ZL. Provenance traceability of earthworm based on the principal component analysis and discriminant analysis [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2022, 42: 387-393.
- [35] Chen LM, Lin XK, Wang ZM, et al. Quantitative variation of 22 inorganic elements in *pheretima* from Guangdong and Guangxi [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2021, 19: 2622-2627.
- [36] Huang Q, Li ZW, Ma GZ, et al. Research progress on *Pheretima* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2018, 24: 220-226.
- [37] Yu XJ, Zhang B, Xue Q, et al. Comparative study on anticoagulant activity *in vitro* of two kinds of *Pheretima* by different extraction methods [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2021, 38: 2955-2960.
- [38] Luan YF, Xie YY, Zhou GT, et al. Multi-component content determination and chemometrics analysis of Renshen Jianpi Pills [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2023, 54: 7044-7054.
- [39] Cha YJ, Guo HL, Yang LT. Analytical application of ICP-MS and its hyphenated techniques in inorganic elements of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药)*, 2019, 28: 67-73.