

地龙（参环毛蚓）配方颗粒

Dilong (Shenhuanmaoyin) Peifangkeli

【来源】 本品为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E.Perrier) 的干燥体经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒。

【制法】 取地龙（参环毛蚓）饮片 4000g，加水煎煮，滤过，滤液浓缩成清膏（干浸膏出膏率为 17%~22%），加入辅料适量，干燥（或干燥，粉碎），再加入辅料适量，混匀，制粒，制成 1000g，即得。

【性状】 本品为浅棕黄色至黄棕色的颗粒；气腥，味微咸。

【鉴别】 (1) 取本品 1g，研细，加乙醇 30ml，超声处理 30 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加乙醇 2ml 使溶解，作为供试品溶液。另取地龙（参环毛蚓）对照药材 0.3g，加水 50ml，加热煮沸 30 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加乙醇 30ml，同法制成对照药材溶液。再取缬氨酸对照品、丙氨酸对照品，加水制成每 1ml 各含 0.5mg 的混合溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（中国药典 2020 年版通则 0502）试验，吸取供试品溶液和对照品溶液各 1 μ l、对照药材溶液 2 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以水饱和正丁醇-冰醋酸（4:1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茚三酮试液，在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照药材和对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

(2) 聚合酶链式反应法

模板 DNA 提取 取本品 0.5g，充分研磨使成粉末。取粉末 0.03g，置 2ml 离心管中；使用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA：加入消化液 275 μ l[细胞核裂解液 200 μ l，0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 50 μ l，蛋白酶 K(20mg/ml) 20 μ l，RNA 酶 A 溶液 5 μ l]，在 55 $^{\circ}$ C 水浴保温 1 小时，离心(转速为每分钟 5000 转)1 分钟，取上清 200 μ l 转移至一个新的 2ml 离心管；加入裂解缓冲液 250 μ l，混匀加到 DNA 纯化柱中，离心(转速为每分钟 10000 转)3 分钟；弃去过滤液，加入洗脱液 600 μ l[5mol/L 醋酸钾溶液 26 μ l，1mol/L Tris-盐酸溶液(pH 7.5) 18 μ l，0.5mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液(pH 8.0) 3 μ l，无水乙醇 480 μ l，灭菌双蒸水 273 μ l]，离心(转速为每分钟 10000 转)1 分钟；弃去过滤液，用上述洗脱液反复洗脱 3 次，每次离心(转速为每分钟 10000 转)1 分钟；弃去过滤液，再离心 2 分钟，将 DNA 纯化柱转移入另一离心管中，加入无菌双蒸水 100 μ l，室温放置 2 分钟后，离心(转速为每分钟 10000 转)2 分钟，取上清液，作为供试品溶液，置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。另取地龙（参环毛蚓）对照药材 0.5g，同法制成对照药材模板 DNA 溶液。

PCR 反应

鉴别引物：5'-GTGCCATGTTTCTTGCTGAA-3'和 5'-GACTGCTCCCACTTATACTAAGA-3'

PCR 反应体系：在 200 μ l 离心管中进行，反应总体积为 25 μ l，反应体系包括 2 \times PCR 反应缓冲液，Taq DNA 聚合酶、dNTP、氯化镁 12.5 μ l，鉴别引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ l，供试品溶液(DNA 模板)1 μ l，无菌双蒸水 10.7 μ l。将离心管置 PCR 仪，PCR 反应参数：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟，循环反应 36 次(94 $^{\circ}$ C 30 秒，62 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 30 秒)，延伸(72 $^{\circ}$ C) 5 分钟。

电泳检测 照琼脂糖凝胶电泳法(中国药典 2020 年版通则 0541 第三法)，胶浓度为 1.5%，每 100ml 胶中加入 10000 \times 核酸凝胶染色剂 GelRed 5 μ l；供试品与对照药材 PCR 反应溶液的上样量分别为 5 μ l，进行凝胶电泳检测。电泳结束后，取凝胶片在凝胶成像仪上或紫外透射仪上检视。供试品凝胶电泳图谱中，在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上，在 100~250 bp 之间应有单一 DNA 条带，空白对照无条带。

【特征图谱】 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版通则 0512）测定。

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（柱长为 150mm，内径为 4.6mm，粒径为 3 μ m）；以乙腈为流动相 A，以 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；流速为每分钟 0.5ml；柱温 25 $^{\circ}$ C；检测波长为 210nm。理论板数按肌苷峰计算应不低于 5000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B(%)
0~7	0	100
7~16	0 \rightarrow 1	100 \rightarrow 99
16~28	1 \rightarrow 2	99 \rightarrow 98
28~29	2 \rightarrow 4	98 \rightarrow 96
29~40	4 \rightarrow 5	96 \rightarrow 95
40~50	5	95
50~55	5 \rightarrow 10	95 \rightarrow 90

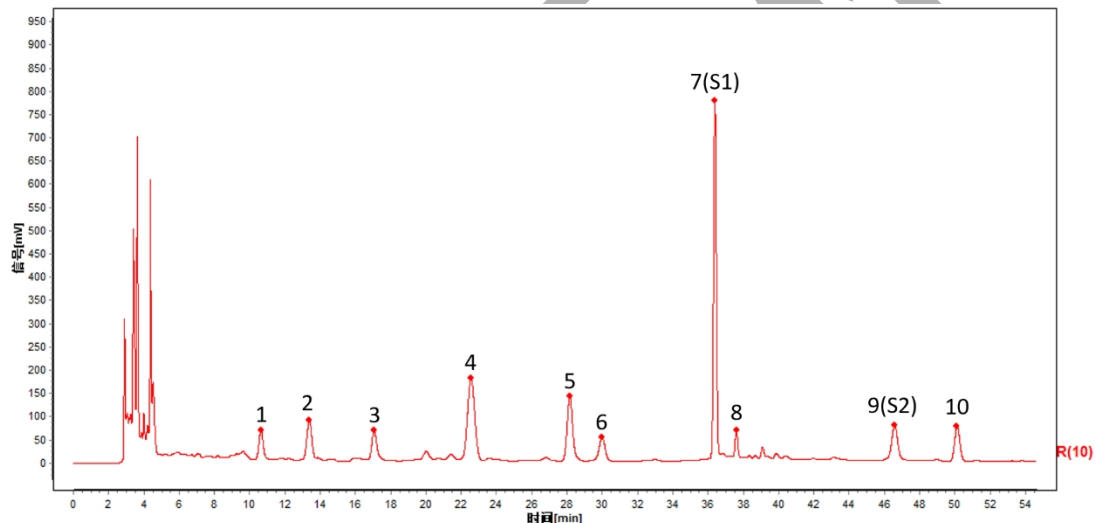
参照物溶液的制备 取地龙（参环毛蚓）对照药材 2g，加水 100ml，加热回流 30 分钟，取出，滤过，滤液蒸干，残渣加 30%甲醇 25ml，超声处理（功率 250W，频率 40kHz）45 分钟，放冷，摇匀，滤过，超滤离心（转速为每分钟 15000 转）30 分钟，取下层溶液，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。另取（含量测定）项下的对照品溶液，作为对照品参照物溶液。

供试品溶液制备 取本品适量，研细，取 0.5g，置具塞锥形瓶中，加 30%甲醇 25ml，

密塞，超声处理（功率 250W，频率 40kHz）45 分钟，放冷，摇匀，滤过，超滤离心（转速每分钟 15000 转）30 分钟，取下层溶液，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取参照物溶液与供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

供试品色谱中应呈现 10 个特征峰，并应与对照药材参照物色谱中的 10 个特征峰的保留时间相对应，其中峰 7、峰 9 应分别与相应的对照品参照物峰的保留时间相对应。与肌苷对照品参照物峰相对应的峰为 S1 峰，计算峰 1~6、峰 8、峰 10 与 S1 峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 \pm 10%范围之内，规定值为：0.292（峰 1）、0.368（峰 2）、0.475（峰 3）、0.618（峰 4）、0.774（峰 5）、0.827（峰 6）、1.033（峰 8）、1.380（峰 10）；与色氨酸对照品参照物峰相对应的峰为 S2 峰，计算峰 2、峰 4、峰 5 与 S2 峰的相对峰面积，其相对峰面积应在规定值的范围内，规定值为：不得小于 0.60（峰 2）、0.90（峰 4）、1.10（峰 5）。



对照特征图谱

峰 2：酪氨酸；峰 3：次黄嘌呤；峰 4：腺苷酸；峰 5：苯丙氨酸；峰 7（S1）：肌苷；峰 8：鸟苷；
峰 9（S2）：色氨酸；峰 10：腺苷

色谱柱：Shim-pack GIST C18-AQ 4.6mm \times 150mm，3 μ m

【检查】 重金属及有害元素 照铅、镉、砷、汞、铜测定法（中国药典 2020 年版通则 2321 原子吸收分光光度法或电感耦合等离子体质谱法）测定，铅不得过 5mg/kg；镉不得过 1mg/kg；砷不得过 2mg/kg；汞不得过 0.2mg/kg；铜不得过 20mg/kg。

黄曲霉毒素 照真菌毒素测定法（中国药典 2020 年版通则 2351）测定。

本品每 1000g 含黄曲霉毒素 B₁ 不得过 5 μ g，黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒

素 B₂ 和黄曲霉毒素 B₁ 的总量不得过 10 μ g。

其他 应符合颗粒剂项下有关的各项规定（中国药典 2020 年版通则 0104）。

【浸出物】 取本品适量，研细，取约 2g，精密称定，精密加入乙醇 100ml，照醇溶性浸出物测定法（中国药典 2020 年版通则 2201）项下的热浸法测定，不得少于 13.0%。

【含量测定】 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版通则 0502）测定。

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（柱长为 250mm，内径为 4.6mm，粒径为 5 μ m）；以乙腈为流动相 A，10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；流速为每分钟 0.5ml，柱温为 35 $^{\circ}$ C；检测波长为 210nm。理论板数按肌苷峰计算应不低于 5000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0~5	2	98
5~15	2→3	98→97
15~35	3→10	97→90
35~37	10→45	90→55
37~42	45	45
42~44	45→2	55→98
44~52	2	98

对照品溶液的制备 取肌苷对照品、色氨酸对照品适量，精密称定，加 30% 甲醇制成每 1ml 含肌苷 100 μ g、色氨酸 10 μ g 的混合溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品适量，研细，取约 0.2g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 30% 甲醇 25ml，密塞，称定重量，超声处理（功率 250W，频率 40kHz）30 分钟，取出，放冷，再称定重量，用 30% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，超滤离心（转速每分钟 15000 转，30 分钟），取下层溶液，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每 1g 含肌苷（C₁₀H₁₂N₄O₅）应为 3.5mg~15.0mg，色氨酸（C₁₁H₁₂N₂O₂）应为 0.45mg~1.5mg。

【规格】 每 1g 配方颗粒相当于饮片 4g

【贮藏】 密封。