

## 柱前衍生 RP-HPLC 法测定青稞和蛹虫草中 16 种氨基酸含量

于瑞涛<sup>1</sup>, 张玉佩<sup>1,2</sup>, 吴楠<sup>1,2</sup>, 王秀<sup>1,2</sup>, 吴小可<sup>1,2</sup>, 梅丽娟<sup>1</sup>, 杨小兵<sup>3</sup>, 陶燕铎<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院藏药研究重点实验室 青海省藏药研究重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008;<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049; <sup>3</sup> 东莞金美济药业有限公司, 东莞 523000

**摘要:**为建立青稞和蛹虫草中 16 种氨基酸的分析方法, 采用柱前衍生 RP-HPLC 法, 以 2,4-二硝基氟苯为衍生试剂, 色谱柱为 Phenomenex Gemini-NX C<sub>18</sub>, 流动相 A:0.05 mol/L 的乙酸钠溶液 (pH = 6.4, 含有 1% *N,N*-二甲基甲酰胺), 流动相 B:乙腈-水溶液 (1:1, V/V), 梯度洗脱, 检测波长 360 nm, 流速 1 mL/min。结果表明, 青稞中谷氨酸含量最高为 2.58%, 其次为脯氨酸 1.08%; 甲硫氨酸和半胱氨酸含量较少, 含量小于 0.05%, 16 种氨基酸总量均值为 8.68%。蛹虫草中氨基酸含量高于青稞中的氨基酸含量, 其谷氨酸含量最高为 3.23%, 其次为天门冬氨酸 2.42% 和丝氨酸 1.60%; 甲硫氨酸和半胱氨酸含量较少, 含量小于 0.05%, 16 种氨基酸总量为 17.65%。该方法简便, 稳定, 可靠, 可为青稞和蛹虫草的质量控制提供参考。

**关键词:**青稞; 蛹虫草; 高效液相色谱法; 柱前衍生; 氨基酸

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020) Suppl-0073-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.011

Determination of 16 amino acids in *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f and *Cordyceps militaris* by RP-HPLC with pre-column derivatizationYU Rui-tao<sup>1</sup>, ZHANG Yu-pei<sup>1,2</sup>, WU Nan<sup>1,2</sup>,WANG Xiu<sup>1,2</sup>, WU Xiao-ke<sup>1,2</sup>, MEI Li-juan<sup>1</sup>, YANG Xiao-bing<sup>3</sup>, TAO Yan-duo<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;<sup>3</sup>Dongguan Jinmeiji Pharmaceutical Co., Ltd., Dongguan 523000, China

**Abstract:** In order to establish a method to determine 16 amino acids in *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f and *Cordyceps militaris*, pre-column derivatization RP-HPLC was used with 2,4-dinitrofluorobenzene as derivative reagent, Phenomenex Gemini-NX C<sub>18</sub> as chromatographic column, mobile phase is A:0.05 mol/L sodium acetate solution (pH = 6.4, containing 1% *N,N*-dimethylformamide) and B: acetonitrile-water. Solution (1:1, V/V), gradient elution, wavelength 360 nm, flow rate 1 mL/min. The results showed that the content of glutamic acid in *H. vulgare* L. var. *nudum* was 2.58%, proline 1.08%, methionine and cysteine less than 0.05%, and the average value of 16 amino acids was 8.68%. The amino acid content of *C. militaris* is higher than *H. vulgare* L. var. *nudum*, which the content of glutamic acid was 3.23%, aspartic acid 2.42% and serine 1.60%, methionine and cysteine less than 0.05%, the total amount of 16 amino acids was 17.65%. The method is simple, stable and reliable, which can provide reference for the quality control of *H. vulgare* L. var. *nudum* and *C. militaris*.

**Key words:** *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f; *Cordyceps militaris*; HPLC; pre-column derivatization; amino acids青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.),又称裸大麦, 是比较耐寒性强的作物, 在西藏、甘肃、四川、云南、青海等地区都有普遍种植<sup>[1]</sup>, 为产区的主要特色农作物, 含有丰富的营养物质, 具有降低胆固醇和心血管疾病的功能、能降低血清胆固醇和餐后血清葡萄糖水平, 还能有效降低低密度脂蛋白的

收稿日期: 2020-03-13 接受日期: 2020-04-15

基金项目: 青海省科技项目 (2017-HZ-811); 西宁市科技项目 (2018-Y-23); 青海省藏药研究重点实验室创新平台发展建设专项 (2017-ZJ-Y11)

\* 通信作者 E-mail: tyd@nwipb.cas.cn

水平<sup>[2]</sup>,对于开始降糖产品具有广阔的开发前景。蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又名北冬虫夏草或北虫草,属于子囊菌亚门、麦角菌科、虫草属真菌<sup>[3]</sup>,是一种重要的食药两用真菌,它具有和冬虫夏草相似的活性成分和药用价值<sup>[4]</sup>,蛹虫草含有虫草素、腺苷、虫草酸、虫草多糖及类胡萝卜素等生物活性成分<sup>[5,6]</sup>,具有抗菌、免疫调节、抗疲劳和抗氧化活性<sup>[7-8]</sup>。2009年3月16日,卫生部根据《中华人民共和国食品卫生法》和《新资源食品管理办法》的规定,批准蛹虫草为新资源食品,2014年5月30日国家卫生计生委公布,批准蛹虫草为新食品原料,去掉了用量的限制。目前对于蛹虫草的研究有对蛹虫草菌丝体及发酵液中虫草素的提取分离方法<sup>[9,10]</sup>,蛹虫草多糖的提取及抗氧化活性研究<sup>[10]</sup>及药理学研究等。氨基酸是青稞和蛹虫草中重要的营养物质,是评价食品营养价值的重要指标<sup>[12]</sup>,本研究采用柱前衍生 RP-HPLC 法,测定青稞和蛹虫草中 16 种氨基酸的含量,为其进一步研究开发和利用奠定理论基础。

## 1 材料、试剂与仪器

青稞、蛹虫草于 2016 年 8 月购自西宁市药材市场。样品经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟研究员鉴定确认为禾本科大麦属植物青稞(*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f.)和麦角菌科虫草属蛹虫草(*Cordyceps militaris*)。

16 种氨基酸混合溶液标准物质(批号:GBW(E)100062,中国计量科学院);2,4-二硝基氟苯(DNFB,上海源叶生物科技有限公司);*N,N*-二甲基甲酰胺(天津百世化工有限公司);乙腈(色谱纯)(山东禹王试剂有限公司);盐酸、碳酸氢钠、磷酸氢二钾、乙酸钠均为分析纯(天津百世化工有限公司);超纯水实验室自制。Waters2489 高效液相色谱仪(包括:Waters 515 泵,Waters 2489 紫外检测器、柱温箱、自动进样器)Waters 公司;101-1 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司);AG135 型精密电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);优普 UPE-II-40L 型超纯水机(上海优普实业有限公司);SL-500A 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市松青五金厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品及供试品溶液的制备

#### 2.1.1 对照品溶液的制备

精密移取 16 种氨基酸混合标准溶液 1.0 mL 于

10 mL 容量瓶中,加入 20 mmol/L 的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为 16 种氨基酸混合标准溶液。色谱图如图 1 所示:

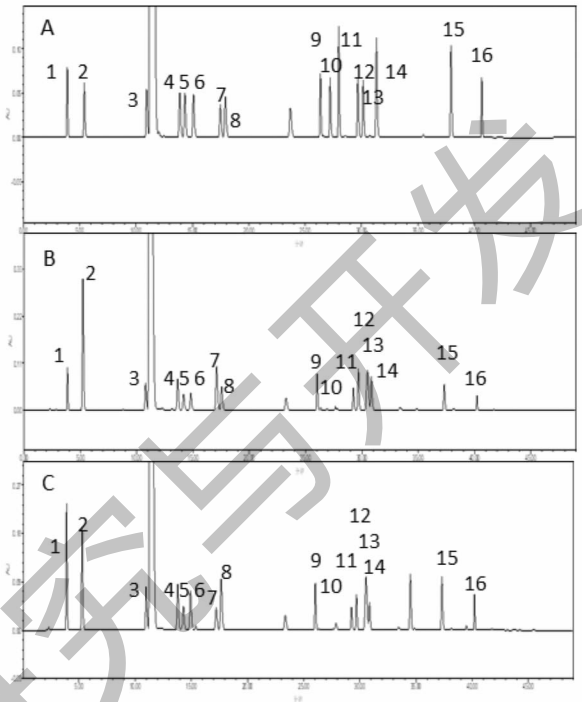


图 1 16 种氨基酸标准品(A)和青稞样品,(B)蛹虫草样品(C)HPLC 图谱

Fig. 1 Chromatogram of standard of 16 amino acids(A), the sample of *Hordeum vulgare* L. var. nudum

Hook. f. (B), the sample of *Cordyceps militaris* (C)

注:1. 天冬氨酸;2. 谷氨酸;3. 丝氨酸;4. 甘氨酸;5. 精氨酸;6. 苏氨酸;7. 脯氨酸;8. 丙氨酸;9. 缬氨酸;10. 甲硫氨酸;11. 半胱氨酸;12. 异亮氨酸;13. 亮氨酸;14. 组氨酸;15. 赖氨酸;16. 酪氨酸。  
Note: 1. Asp; 2. Glu; 3. Ser; 4. Gly; 5. Arg; 6. Thr; 7. Pro; 8. Ala; 9.

Val; 10. Met; 11. Cys; 12. Ile; 13. Leu; 14. His; 15. Lys; 16. Tyr.

#### 2.1.2 样品溶液的制备

称取 4 种青稞粉末、蛹虫草粉末过 60 目筛,分别取 40 mg 置于安瓿瓶中,精密称定,加入 6 mol/L 盐酸溶液 6 mL,充入氮气,置于酒精喷灯上封口,轻轻震荡,使粉末溶解于盐酸溶液中。将封口的安瓿瓶置于 110 °C 的烘箱中水解 22 h,取出冷却至室温,过滤至 50 mL 烧杯中,用超纯水润洗安瓿瓶 2 ~ 3 次,洗涤液并入上述烧杯中,于 80 °C 水浴蒸干,残渣加入 20 mmol/L 的盐酸溶液溶解并定容至 2 mL,即得供试品溶液<sup>[13]</sup>。

### 2.2 DNFB 衍生法

#### 2.2.1 衍生试剂的配制

精密称取 2,4-二硝基氟苯适量,用乙腈配制为

1% 的 DNFB 衍生试剂,于 4 ℃ 条件下避光保存。

### 2.2.2 衍生程序<sup>[13]</sup>

分别精密移取“2.1”项下的对照品和供试品溶液各 0.6 mL 于 2 个 10 mL 容量瓶中,均加入 0.5

mol/L 的碳酸氢钠溶液 0.8 mL 和 1% 的 DNFB 衍生试剂 0.8 mL,混匀后于 60 ℃ 水浴衍生 1 h。冷却后用 0.1 mol/L 磷酸氢二钾(pH = 7.0)溶液稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,备用。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

序号 No.	时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
1	0	85	15
2	3	80	20
3	8	70	30
4	10	70	30
5	20	64	36
6	30	64	36
7	32	50	50
8	37	50	50
9	42	40	60
10	44	5	95
11	49	5	95

### 2.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini-NX C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。检测波长:360 nm,柱温 37 ℃,进样量 10 μL。流动相 A:0.05 mol/L 的乙酸钠溶液(pH = 6.4)(含有 1% 的 *N,N*-二甲基甲酰胺);流动相 B:乙腈-水溶液(1:1, V/V)。梯度洗脱,洗脱程序见表 2 所示。

### 2.4 标准曲线的绘制

分别准确吸取 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL 16 种对照品溶液,分别置于 5 mL 容量瓶中,分别加甲醇制成 16 种系列质量浓度的溶液,取 10 μL,按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积与保留时间,以浓度  $x$ (mg/mL)为横坐标,峰面积  $y$  为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性关系考察,结果见表 2。

表 2 16 种氨基酸的线性方程

Table 2 Linear equations of 16 amino acids

序号 No.	名称 Amino acid name	线性方程 Linear equation	R <sup>2</sup>
1	天冬氨酸 Asp	$y = 64.986x + 0.896$	0.999 5
2	谷氨酸 Glu	$y = 57.268x - 1.265$	0.999 6
3	丝氨酸 Ser	$y = 81.479x + 0.676$	0.999 6
4	甘氨酸 Gly	$y = 122.792x + 26.678$	0.999 4
5	精氨酸 Arg	$y = 50.214x + 25.182$	0.999 2
6	苏氨酸 Thr	$y = 73.851x - 2.383$	0.999 7
7	脯氨酸 Pro	$y = 51.257x - 0.982$	0.999 6
8	丙氨酸 Ala	$y = 97.233x - 1.989$	0.999 8
9	缬氨酸 Val	$y = 73.464x - 1.617$	0.999 5
10	甲硫氨酸 Met	$y = 57.652x - 1.340$	0.999 4
11	半胱氨酸 Cys	$y = 121.208x - 3.983$	0.999 5

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	名称 Amino acid name	线性方程 Linear equation	$R^2$
12	异亮氨酸 Ile	$y = 93.856x - 26.332$	0.999 0
13	亮氨酸 Leu	$y = 55.076x + 20.320$	0.999 2
14	组氨酸 His	$y = 42.557x + 1.543$	0.999 6
15	赖氨酸 Lys	$y = 86.583x - 11.997$	0.999 0
16	酪氨酸 Tyr	$y = 18.567x + 1.640$	0.999 8

## 2.5 精密度试验

取“2.1.1”项下的谷氨酸对照品溶液连续进样 5 次,每次 10  $\mu\text{L}$ ,按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算 5 次进样峰面积的 RSD 值为 0.87%,表明仪器的精密度良好。

## 2.6 重复性实验

取青稞样品(QK-white)、蛹虫草样品各 3 份,每份 40 mg,分别按照按“2.1.2”和“2.2.2”项下方法制备,再按“2.3”项下色谱条件测定,记录样品中峰面积,青稞样品(QK-white) RSD 为 0.97%,蛹虫草样品 RSD 为 1.28%,表明实验方法的重复性良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.1.2”项下青稞样品(QK-white)、蛹虫草样品供试品溶液,每 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算 RSD 值,结果显示,青稞样品(QK-white) RSD 为 1.08%,蛹虫草样品 RSD 为 1.46%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.8 样品的测定

4 种青稞样品测定结果见表 3,蛹虫草样品测定结果见表 4。结果表明,青稞中谷氨酸含量最高为 2.58%,其次为脯氨酸 1.08%;甲硫氨酸和半胱

表 3 青稞中 16 种氨基酸的含量

Table 3 The content of 16 amino acids of *Hordeum vulgare* L. var. *nudum*

名称 Amino acid name	QK <sup>a</sup>	QK-Blue <sup>b</sup>	QK-White <sup>b</sup>	QK-Black <sup>b</sup>	含量均值 Average content (%)
天门冬氨酸 Asp	0.52	0.50	0.49	0.56	0.52
谷氨酸 Glu	2.35	2.47	2.80	2.69	2.58
丝氨酸 Ser	0.57	0.57	0.58	0.60	0.58
甘氨酸 Gly	0.30	0.30	0.28	0.32	0.30
精氨酸 Arg	0.47	0.45	0.43	0.50	0.46
苏氨酸 Thr	0.30	0.31	0.30	0.33	0.31
脯氨酸 Pro	0.98	1.02	1.20	1.11	1.08
丙氨酸 Ala	0.31	0.29	0.29	0.32	0.30
缬氨酸 Val	0.39	0.40	0.40	0.43	0.41
甲硫氨酸 Met	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02
半胱氨酸 Cys	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04
异亮氨酸 Ile	0.32	0.33	0.35	0.37	0.34
亮氨酸 Leu	0.60	0.62	0.63	0.67	0.63
组氨酸 His	0.40	0.41	0.44	0.44	0.42
赖氨酸 Lys	0.35	0.33	0.32	0.37	0.34
酪氨酸 Tyr	0.32	0.34	0.34	0.39	0.35
16 种氨基酸总量 Total amino acid	8.23	8.39	8.91	9.18	8.68

注:<sup>a</sup> 未去麸皮;<sup>b</sup> 去麸皮。

Note:<sup>a</sup> With bran;<sup>b</sup> Without bran.

表 4 蛹虫草中 16 种氨基酸的含量

Table 4 The content of 16 amino acids of *Cordyceps militaris*

序号 No.	名称 Amino acid name	含量 Content(%)
1	天门冬氨酸 Asp	2.42
2	谷氨酸 Glu	3.23
3	丝氨酸 Ser	1.60
4	甘氨酸 Gly	0.71
5	精氨酸 Arg	1.15
6	苏氨酸 Thr	1.19
7	脯氨酸 Pro	0.89
8	丙氨酸 Ala	1.07
9	缬氨酸 Val	0.85
10	甲硫氨酸 Met	0.02
11	半胱氨酸 Cys	0.04
12	异亮氨酸 Ile	0.57
13	亮氨酸 Leu	0.88
14	组氨酸 His	0.57
15	赖氨酸 Lys	1.14
16	酪氨酸 Tyr	1.32
17	16 种氨基酸总量 Total amino acid	17.65

氨酸含量较少,含量小于 0.05%,16 种氨基酸总量均值为 8.68%。蛹虫草中氨基酸含量高于青稞中的氨基含量,其谷氨酸含量最高为 3.23%,其次为天门冬氨酸 2.42% 和丝氨酸 1.60%;甲硫氨酸和半胱氨酸含量较少,含量小于 0.05%,16 种氨基酸总量为 17.65%。

### 3 讨论与结论

氨基酸是构成生物体蛋白质并同生命活动有关的最基本物质,是生物体不可或缺的营养成分,在机体内具有特殊的功能,与人体健康有着十分密切的关系<sup>[14-15]</sup>,因此积极开发氨基酸含量丰富的食品及新食品原料,已成为当前研究关注的热点。本研究利用食品青稞和新食品原料蛹虫草为研究对象,采用柱前衍生 RP-HPLC 法,以 2,4-二硝基氟苯为衍生试剂,对青稞和蛹虫草中 16 种氨基酸含量进行了测定,在 4 种青稞的氨基酸含量检测中发现,未去麸皮的青稞含量最少为与其他 3 种青稞氨基酸含量为 8.23%,黑青稞氨基酸含量最高为 9.18%,其次为白青稞和蓝青稞分别为 8.91% 和 8.39%,4 种青稞氨基酸含量均值为 8.68%。在 3 种不同色泽的青稞中,青稞 QK-White 中谷氨酸和脯氨酸含量最高为 2.80%、1.20%,青稞 QK-Black 中天门冬氨酸、丝氨

酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、组氨酸、赖氨酸和酪氨酸含量均为最高。蛹虫草(菌类)中 16 种氨基酸含量为 17.65%,为 4 种青稞中 16 种氨基酸均值总量的 2 倍。青稞和蛹虫草中均包含人体必需氨基酸赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸。本研究进一步证实了青稞和蛹虫草中含有丰富的营养成分氨基酸,具有宝贵的营养价值和应用前景。

该方法简便,稳定,可靠,可为青稞和蛹虫草的质量控制提供参考,为其进一步研究开发利用奠定理论基础。

### 参考文献

- 1 Gan YW,Zhaxi LB. Nutritional components and comprehensive utilization prospects of highland barley[J]. Tibet J Agr Sci(西藏农业科技),2019,41(2):50-52.
- 2 Luo J,Li YF,Xu X. Research progress of bioactive components in hullless barley[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业),2018,44(9):300-304.
- 3 Wei JC. Handbook of Fungal Identification(真菌鉴定手册)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press,

- 1979;131.
- 4 Xia Y, Luo F, Shang Y, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin[J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24:1479-1489.
  - 5 Lou HW, Yu YH, Ye ZW, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids from *Cordyceps militaris* [J]. *China Food Addit (中国食品添加剂)*, 2018, 12:51-59.
  - 6 Li HY, Yu YH, Zhang DX, et al. Quantitative analysis of five nucleosides in *Cordyceps* by HPLC and quality control of *Cordyceps militaris* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2018, 49:5410-5415.
  - 7 Das SK, Masuda M, Sakurai A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81:961-968.
  - 8 Khan MA, Tania M, Zhang DZ, et al. *Cordyceps* mushroom: a potent anticancer nutraceutical [J]. *Open Nutraceuticals J*, 2010, 3(3):179-183.
  - 9 Zhang LL, Liang GQ, Chen W. Macroporous resin combined silicagel column in preparation of cordycepin in the made-up *Cordyceps militaris* [J]. *J Mod Med Health (现代医药卫生)*, 2015, 31:343-345.
  - 10 Zhang HC, Fan HT, Wang XJ et al. Purification of cordycepin from fermentation broth of *Cordyceps militaris* by use of macroporous resin AB-8 and octadecyl bonded silica chromatography [J]. *Mycosystema (菌物学报)*, 2015, 34:490-498.
  - 11 Chen AH, Fan W, Zhang LR, et al. Optimization of extraction of *Cordyceps militaris* polysaccharides and the antioxidant activity [J]. *J Anhui Agr Sci (安徽农业科学)*, 2018, 46(19):175-178.
  - 12 Wang XY, Wang YB, Chen YQ, et al. Amino acid composition and nutritional value evaluation of 6 species of *Dendrobium* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31:601-607.
  - 13 Wu YF, Tan L, Shen JW, et al. Determination and analysis of 17 amino acids in Qaidam Chinese wolfberry [J]. *Food Ind Sci Tech (食品工业科技)*, 2017, 38(1):281-286.
  - 14 Ni ZY, Zhu MY, Wang HD. Study on amino acids in edible fungi (preliminary report) [J]. *J Amino Acids (氨基酸杂志)*, 1983, 3:14-17.
  - 15 Yu CL. Present situation and suggestions of amino acid production [J]. *J Amino Acids (氨基酸杂志)*, 1983, 3:18-26.
- 
- (上接第 158 页)
- 8 He XH, Xu L, Tan MJ, et al. DPPH radical scavenging effect of *Penthorum chinense* Pursh extract [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2009, 20:221-224.
  - 9 Xu XR, Wang WH, Li HB. Determination of hydroxyl radical produced by Fenton reaction by colorimetry and its application [J]. *Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展)*, 1999(1):67-69.
  - 10 Lin XC, Huang XD. Determination the removing rate of superoxide anion radical by traditional Chinese medicine [J]. *Guangzhou Chem (广州化学)*, 2012, 37(1):32-36.
  - 11 Balamurugan M, Parthasarathi K, Ranganathan L, et al. Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008 9(2):141-147.
  - 12 Hrzenjak T, Hrzenjak M, Kasuba V, et al. A new source of biologically active compounds-earthworm tissue (*Eisenia foetida*, *Lumbricus rubellus*) [J]. *Comp Bio Phy Part A: Physiol*, 1992, 102:441-447.
  - 13 Geislinger A, Goessler W, Kuehnelt D, et al. Determination of arsenic compounds in earthworms [J]. *Environ Sci Technol*, 1998, 32:2238-2243.
  - 14 Mathur A, Verma K, Bhat R, et al. Antimicrobial activity of earthworm extracts [J]. *J Chem Pharm Res*, 2010, 2:364-370.
  - 15 Yang J, Wang T, Li Y, et al. Earthworm extract attenuates silica-induced pulmonary fibrosis through Nrf2-dependent mechanisms [J]. *Lab Invest*, 2016, 96:1279-1300.
  - 16 Popoviæ M, Enjak H, Babiaè T, et al. Effect of earthworm (G-90) extract on formation and lysis of clots originated from venous blood of dogs with cardiopathies and with malignant tumors [J]. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7(3):197-202.