

不同基原水蛭及其混淆品质量研究

李国卫,邱韵静,童培珍,胡绮萍,邓立萍,杨丽,孙冬梅*

广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室,佛山 528244

摘要:采用高效液相色谱法建立水蛭药材特征图谱并同时测定 5 种有效成分的含量,为不同基原水蛭及其混淆品的质量评价提供依据。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)软件对特征图谱结果进行分析,结果显示,27 批蚂蟥 HPLC 特征图谱具有 8 个共有峰,并通过对照品对比确认其中 5 个成分,分别为:尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B;采用 SIMCA-P 14.0 软件进行聚类及偏最小二乘法分析,均可将不同基原水蛭及其混淆品归为不同的四类;另外,含量测定结果显示,不同基原水蛭及其混淆品之间的含量存在一定差异,尿嘧啶、次黄嘌呤的含量均值依次为:蚂蟥 > 水蛭 > 柳叶蚂蟥 > 菲牛蛭;黄嘌呤的含量均值依次为:蚂蟥 > 水蛭 > 菲牛蛭 > 柳叶蚂蟥;水蛭胺 C 羧基衍生物的含量均值依次为:柳叶蚂蟥 > 蚂蟥 > 水蛭 > 菲牛蛭;水蛭胺 B 的含量均值依次为:柳叶蚂蟥 > 蚂蟥 > 水蛭 > 菲牛蛭。本研究所建立的方法可作为不同基原水蛭及其混淆品的质量评价方法,为水蛭药材的质量评价提供参考依据。

关键词:水蛭;基原;聚类分析;含量测定;特征图谱

中图分类号:R282

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)6-0997-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.6.009

Quality analysis of *Hirudo* with different origins and its adulterants

LI Guo-wei, QIU Yun-jing, TONG Pei-zhen,
HU Qi-ping, DENG Li-ping, YANG Li, SUN Dong-mei*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong
Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

Abstract: HPLC method was used to establish the characteristic chromatogram of *Hirudo* and the contents of 5 components were determined, which provides a basis for quality evaluation of different origins *Hirudo* and its adulterants. The Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2012 version) was used to analyze the results of the characteristic chromatogram. The results showed that there were eight common peaks in 27 batches of *Whitmania pigra* Whitman and five peaks were identified by comparison with reference substances, respectively, which were uracil, hypoxanthine, xanthine, hirudine C carboxyl derivatives and hirudine B. The SIMCA-P 14.0 software were used for cluster analysis and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) that both of them can distinguish *Hirudo* of different origins and its adulterants into four different classes. In addition, the content determination results showed that there were some differences in the content of *Hirudo* with different origins and its adulterants. The average content of uracil and hypoxanthine was in the order of *Whitmania pigra* Whitman > *Hirudo nipponica* Whitman > *Whitmania acranulata* Whitman > *Poecilobdella manillensis* Lesson; the average content of xanthine was in the order of *Whitmania pigra* Whitman > *Hirudo nipponica* Whitman > *Poecilobdella manillensis* Lesson > *Whitmania acranulata* Whitman; the average content of hirudine C carboxyl derivatives was in the order of *Whitmania acranulata* Whitman > *Whitmania pigra* Whitman > *Hirudo nipponica* Whitman > *Poecilobdella manillensis* Lesson; the average content of hirudine B was in order of *Whitmania acranulata* Whitman > *Whitmania pigra* Whitman > *Hirudo nipponica* Whitman > *Poecilobdella manillensis* Lesson. The method established in this study can be used as a quality evaluation method for *Hirudo* with different origins and its adulterants, and provide a reference for the quality evaluation of *Whitmania pigra* Whitman.

Key words: *Hirudo*; origin; cluster analysis; content determination; HPLC characteristic chromatogram

收稿日期:2022-11-02

接受日期:2023-04-03

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2020B1515120033)

* 通信作者 E-mail: vling_m2@163.com

《中华人民共和国药典》2020年版,后简称为中国药典,中规定水蛭为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体^[1]。其味咸、苦,平;有小毒,归肝经。具有破血通经,逐瘀消瘕之功,常用于血瘀经闭、癥瘕痞块、中风偏瘫、跌扑损伤等。研究表明水蛭药理作用主要包括抗凝血作用、抗血栓作用、抗肿瘤作用、降血脂作用及抗炎作用等^[2],在临床上有非常广泛的应用,包括治疗血栓、高脂血症、高血压、糖尿病、前列腺炎、癌症、静脉曲张、不孕以及肝硬化等病症^[3]。其中水蛭的主要成分为大分子类化合物,主含蛋白质,含有17种氨基酸,其中8种为人体必需氨基酸,水解氨基酸含量高达49.4%;另外还含有如水蛭素、肝素、组织胺、吻蛭素、糖脂类、蝶啶类、甾体类和羧酸酯类等多种物质^[4]。

查阅文献发现,目前对水蛭的研究集中于抗凝血机理^[5-7]、氨基酸测定^[8,9]方面,而较少研究对不同基原水蛭及其混淆品之间的质量进行综合研究,不同基原水蛭及其混淆品之间的鉴别研究多以《中国药典》2020年版项下的性状鉴别为依据,市场上水蛭价格高昂,市场混乱,仅用传统外观鉴别已不能快速有效地对其质量进行评价,且外观鉴别不能应用到水蛭的提取物及其制剂上,具有一定的局限性,因此,建立一种快速、科学、有效的评价手段具有十

分重要的意义。本研究采用HPLC法建立水蛭的特征图谱及含量测定方法,该方法对水蛭及其混淆品进行综合评价,为水蛭及其混淆品的质量评价提供了科学依据。

1 试剂与材料

1.1 试剂

尿嘧啶(批号:100469-201302,含量:99.6%)、次黄嘌呤(批号:140661-202005,含量:99.4%)对照品均购自中国药品食品检定研究院;黄嘌呤(批号:X0626,含量:≥99.5%)对照品购自Sigma,水蛭胺B(批号:PIMHA-B-20200901-01,含量:89.54%)、水蛭胺C羧基衍生物(批号:PIMHA-C-20200901-01,含量:87.46%)对照品均为实验室自制。甲醇(西陇科学股份有限公司)为分析纯;甲酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)、乙腈(默克股份有限公司)均为色谱纯;水为超纯水(实验室自制)。

1.2 材料

本研究27批样品中15批为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman,2批为柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman,5批为水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥全体;常见混淆品为5批医蛭科菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* Lesson 的干燥全体,以上样品均经孙冬梅主任药师鉴定,所收集样品详细信息见表1。

表1 样品信息表

Table 1 Sample information

编号 No.	基原 Origin	产地 Source	编号 No.	基原 Origin	产地 Source
MH1	蚂蟥 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	江苏省宿迁市	LYMH1	柳叶蚂蟥	江苏省苏州市
MH2		江苏省宿迁市	LYMH2	<i>Whitmania acranulata</i> Whitman	江苏省苏州市
MH3		江苏省宿迁市	SZ1	水蛭	安徽省亳州市
MH4		江苏省连云港市	SZ2	<i>Hirudo nipponica</i> Whitman	安徽省亳州市
MH5		江苏省连云港市	SZ3		安徽省亳州市
MH6		江苏省连云港市	SZ4		安徽省亳州市
MH7		安徽省宿州市	SZ5		安徽省亳州市
MH8		安徽省宿州市	FNZ1	菲牛蛭	广西玉林市
MH9		安徽省宿州市	FNZ2	<i>Poecilobdella manillensis</i> Lesson	广东省阳江市
MH10		湖北省襄阳市	FNZ3		广东省阳江市
MH11		湖北省襄阳市	FNZ4		广西玉林市
MH12		湖北省襄阳市	FNZ5		广东省阳江市
MH13		江苏省宿迁市	-	-	-
MH14		江苏省宿迁市	-	-	-
MH15		江苏省如皋市	-	-	-

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相 A, 以 0.01% 甲酸为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 12 min, 0% A; 12 ~ 15 min, 0% → 1% A; 15 ~ 27 min, 1% → 8% A; 27 ~ 35 min, 8% → 11% A; 35 ~ 45 min, 11% → 12% A; 45 ~ 55 min, 12% → 21% A; 55 ~ 65 min, 21% → 30% A); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 254 nm; 进样量为 5 μL。

2.2 对照品溶液制备

取尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B 对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇溶解并定容, 制成浓度分别为 135.33、160.20、92.96、61.45、63.41 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取本品粉末 (过三号筛) 2 g, 精密称定, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定重量, 回流提取 30 min, 放冷, 再称定重量, 补重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 特征图谱的建立

2.4.1 方法学考察

2.4.1.1 精密度试验

取同一批蚂蟥 (编号: MH3), 分别按“2.3”项下

方法制备供试品溶液和“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

2.4.1.2 重复性试验

取同一批蚂蟥 (编号: MH3) 样品粉末 6 份, 按“2.3”项下方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明该方法重复性良好。

2.4.1.3 稳定性试验

取同一批蚂蟥 (编号: MH3), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.2 特征图谱的建立

分别取表 1 中的样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将所得数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》进行分析, 分别以编号为 MH1、SZ1、LYMH1、FNZ1 的图谱为参照, 采用平均数法进行色谱峰匹配, 分别生成不同基原水蛭及混淆品相应的对照特征图谱, 如图 1 所示。因为峰 2

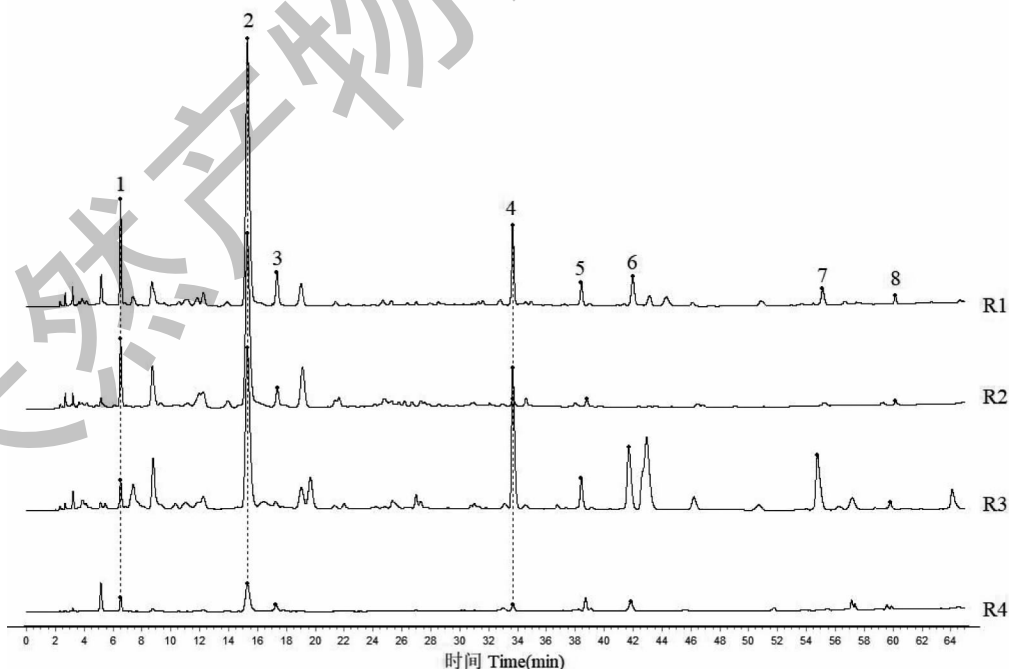


图 1 不同基原水蛭及其混淆品特征图谱

Fig. 1 Characteristic chromatogram of *Hirudo* with different origins and its adulterants

注: R1: 蚂蟥; R2: 水蛭; R3: 柳叶蚂蟥; R4: 菲牛蛭。Note: R1: *W. pigra*; R2: *H. nipponica*; R3: *W. acranulata*; R4: *P. manillensis*.

(次黄嘌呤)的分离度较好、峰形对称、峰面积较大,故以峰 2 为参照峰(S)。计算各共有峰相对峰面积的 RSD 分别为 38.77% ~ 169.48%,具体数据如表 2。由图 1 可见,基原为蚂蟥的样品具有 8 个特征峰,基原为水蛭的样品具有 6 个特征峰,基原为柳叶蚂蟥的样品具有 7 个特征峰,基原为菲牛蛭的样品

具有 6 个特征峰,因此,可通过色谱峰的数目鉴别蚂蟥与其他样品,同时也可通过峰 6、峰 7 鉴别蚂蟥与水蛭;通过峰 3 鉴别蚂蟥与柳叶蚂蟥;可通过峰 5、峰 7、峰 8 鉴别蚂蟥与菲牛蛭,说明本研究所建立的方法可以作为不同基原水蛭及其混淆品的化学特征图谱表征。

表 2 不同基原水蛭特征图谱相对峰面积

Table 2 Relative peak area of Hirudo with different origins and its adulterants

编号 No.	峰号 Peak No.							
	1	2(S)	3	4	5	6	7	8
MH1	0.144	1.000	0.082	0.141	0.048	0.113	0.048	0.018
MH2	0.178	1.000	0.083	0.157	0.052	0.077	0.038	0.020
MH3	0.123	1.000	0.076	0.122	0.032	0.096	0.040	0.013
MH4	0.174	1.000	0.056	0.209	0.066	0.118	0.062	0.021
MH5	0.160	1.000	0.065	0.203	0.024	0.095	0.048	0.016
MH6	0.131	1.000	0.049	0.188	0.063	0.114	0.058	0.020
MH7	0.118	1.000	0.060	0.097	0.072	0.059	0.029	0.008
MH8	0.108	1.000	0.058	0.080	0.028	0.068	0.024	0.011
MH9	0.139	1.000	0.080	0.152	0.055	0.087	0.047	0.017
MH10	0.197	1.000	0.129	0.217	0.033	0.112	0.053	0.014
MH11	0.165	1.000	0.079	0.115	0.027	0.075	0.033	0.012
MH12	0.184	1.000	0.102	0.235	0.030	0.079	0.057	0.017
MH13	0.254	1.000	0.105	0.206	0.094	0.048	0.047	0.025
MH14	0.254	1.000	0.104	0.206	0.095	0.048	0.048	0.025
MH15	0.274	1.000	0.076	0.314	0.052	0.101	0.072	0.024
SZ1	0.222	1.000	0.066	0.072	0.046	-	-	0.019
SZ2	0.154	1.000	0.082	0.029	0.023	-	-	0.016
SZ3	0.225	1.000	0.071	0.022	0.041	-	-	0.015
SZ4	0.162	1.000	0.074	0.038	0.015	-	-	0.012
SZ5	0.101	1.000	0.054	0.006	0.003	-	-	0.003
LYMH1	0.078	1.000	-	0.611	0.109	0.312	0.318	0.025
LYMH2	0.078	1.000	-	0.592	0.099	0.348	0.361	0.032
FNZ1	0.187	1.000	0.356	0.335	-	0.396	-	-
FNZ2	0.377	1.000	0.284	0.035	-	0.337	-	-
FNZ3	0.304	1.000	0.195	0.045	-	0.465	-	-
FNZ4	0.159	1.000	0.062	0.115	-	0.214	-	-
FNZ5	0.177	1.000	0.304	0.342	-	0.409	-	-
均值 Mean	0.18	1.00	0.10	0.18	0.04	0.14	0.05	0.01
RSD(%)	38.77	-	83.79	84.81	80.25	100.25	169.48	64.16

2.4.3 共有峰归属

取“2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项

下色谱条件进行测定分析,记录色谱图如图 2 所示。通过光谱比对,指出其中峰 1 为尿嘧啶、峰 2 为次

黄嘌呤、峰 3 为黄嘌呤、峰 4 为水蛭胺 C 羧基衍生物、峰 5 为水蛭胺 B。

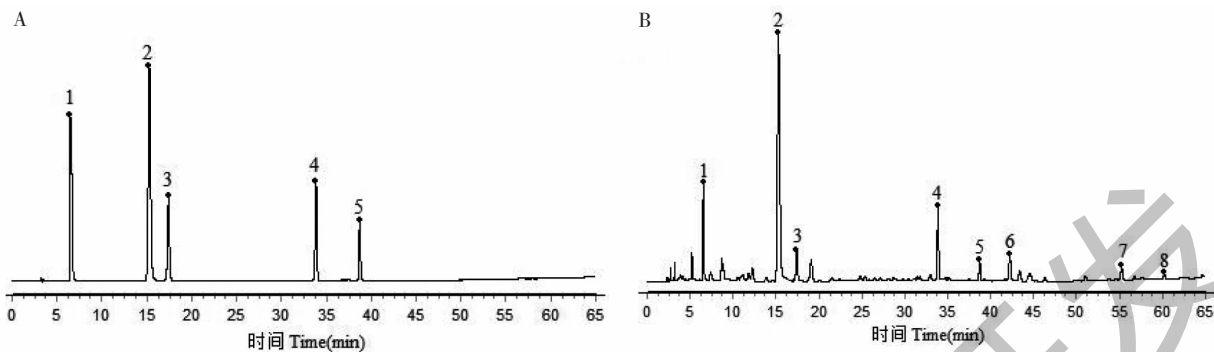


图 2 共有峰指认图

Fig. 2 Identification of common peaks

注: A:混合对照品; B:供试品。1:尿嘧啶; 2:次黄嘌呤; 3:黄嘌呤; 4:水蛭胺 C 羧基衍生物; 5:水蛭胺 B。Note: A: Mixed reference substance, B: Sample. 1: Uracil; 2: Hypoxanthine; 3: Xanthine; 4: Hirudine C carboxyl derivatives; 5: Hirudine B.

2.4.4 聚类分析

通过 SIMCA 14.1 软件,以 27 批样品中 11 个特征峰的峰面积导入软件,进行聚类分析,结果见图 3。由聚类结果可见,当分类距离为 20 时,可以分为 4 类,其中 MH1 ~ MH15 为第 I 类,为蚂蟥; LYMH1,

LYMH2 为第 II 类,为柳叶蚂蟥; SZ1 ~ SZ3 为第 III 类,为水蛭; FNZ1 ~ FNZ5 为第 IV 类,为菲牛蛭。聚类结果与特征图谱分析结果基本一致,不同分类下基本实现不同基原水蛭及其混淆品的差异性分析。

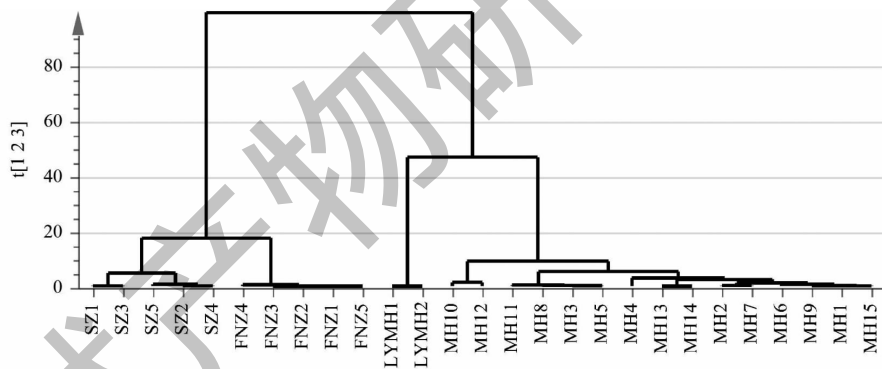


图 3 不同基原样品聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis results of different origin samples

2.4.5 偏最小二乘法分析(PLS-DA)

以 27 批不同基原样品中 8 个特征峰的峰面积作为变量,通过 SIMCA 14.1 软件进行判别分析,共得到 3 个主成分,各主成分因子载荷图见图 5,其模型解释率参数 R^2X 为 0.924, R^2Y 为 0.737, Q^2 为 0.561,均大于 0.5,说明模型的预测能力较好^[16](见图 4),并通过 20 折置换检验,得到 R^2 拟合 Y 坐标的截距为 0.065,小于 0.3,说明模型拟合较好, Q^2 拟合 Y 坐标的截距为 -0.276,小于 0.05,说明模型未过度拟合。得到 27 批样品的得分图见图 6,可见

27 批样品共聚为 4 类,其中 MH1 ~ MH15 为一类, LYMH1、LYMH2 为一类, SZ1 ~ SZ5 为一类, FNZ1 ~ FNZ5 为一类,实现不同基原水蛭的区分,与聚类分析结果一致。对主要影响的变量 VIP 值进行分析(见图 7),以 VIP 值大于 1 限度,得到 4 个贡献度高的差异性化合物,分别为峰 2、峰 3、峰 6、峰 7,说明包括已指认成分次黄嘌呤(峰 2)、黄嘌呤(峰 3)在内的上述 2 个化合物,可作为区分不同基原水蛭及其混淆品的主要差异化合物。

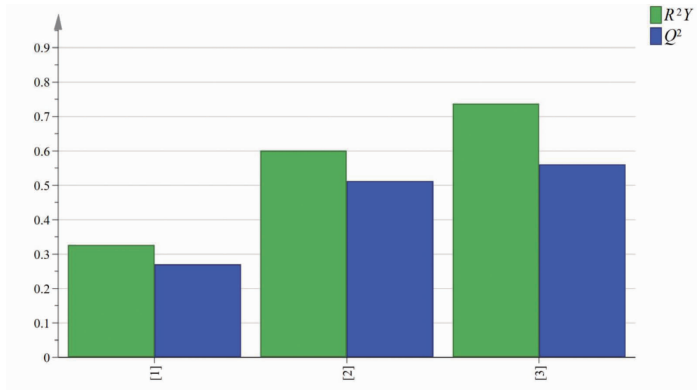


图4 3个主成分累计贡献率

Fig. 4 Cumulative contribution rate of three principal components

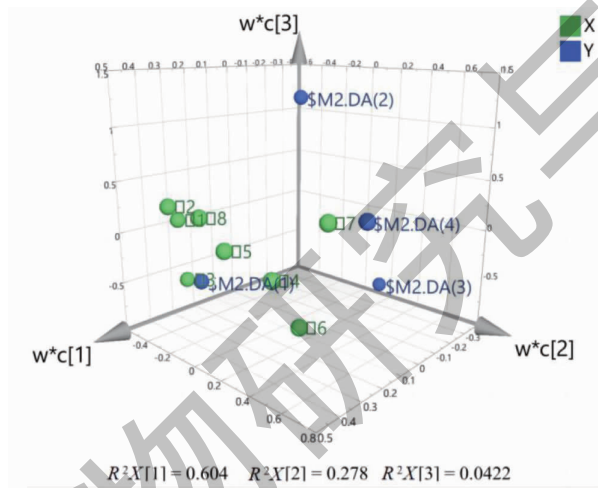


图5 因子载荷图

Fig. 5 Loading scatter plot

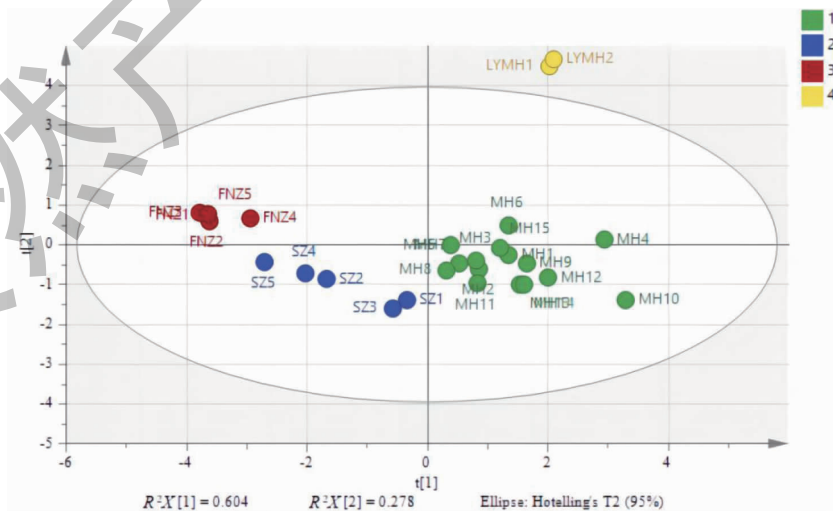


图6 不同基原 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA score of different origin samples

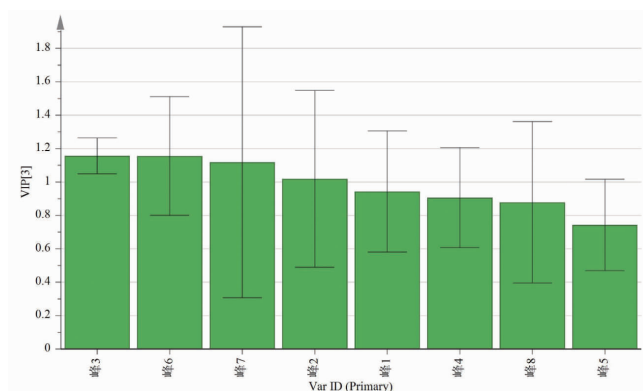


图7 PLS-DA VIP 值图

Fig. 7 VIP value of PLS-DA

2.5 含量测定方法的建立

本研究在特征图谱研究中,通过对照品比对,确认了其中的5个成分,分别为尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B,分别为核苷类化合物与蝶啶类化合物,为科学全面地评价药材的质量,本研究对以上5个成分进行含量测定研究。

2.5.1 方法学考察

2.5.1.1 线性考察

精密称定尿嘧啶适量,置于10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,制成尿嘧啶浓度为310.154 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的尿嘧啶贮备液。精密量取尿嘧啶贮备液1 mL,再精密称定次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B 对照品适量,分别置25 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,制成尿嘧啶浓度为12.406 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、次黄嘌呤浓度为119.618 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄嘌呤浓度为

为92.080 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、水蛭胺 C 羧基衍生物浓度为122.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、水蛭胺 B 浓度为126.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品贮备液。分别精密量取上述对照品贮备液0.1、0.5、1、2、5 mL,置10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀,制成含尿嘧啶浓度为0.124、0.620、1.241、2.481和6.203 μg 、含次黄嘌呤浓度为1.196、5.981、11.962、23.924和59.809 μg 、含黄嘌呤浓度为0.921、4.604、9.208、18.416和46.040 μg 、含水蛭胺 C 羧基衍生物1.23、6.15、12.29、24.58和61.45 μg 、含水蛭胺 B 1.27、6.34、12.68、25.37、63.41 μg 的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液和贮备液,按照“2.1”项下色谱条件依次进样,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(y),对照品浓度为横坐标(x),并绘制标准曲线及回归方程,结果见表3。

表3 线性考察结果

Table 3 Results of linear investigation

序号 No.	成分 Component	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 Correlation coefficient
1	尿嘧啶 Uracil	$y = 0.3306x - 0.0046$	0.12 ~ 12.41	1.0000
2	次黄嘌呤 Hypoxanthine	$y = 0.3677x - 0.1857$	1.20 ~ 119.62	0.9999
3	黄嘌呤 Xanthine	$y = 0.0424x + 0.0675$	0.92 ~ 92.08	0.9994
4	水蛭胺 C 羧基衍生物 Hirudine C carboxyl derivative	$y = 0.1978x - 0.0213$	1.23 ~ 122.90	1.0000
5	水蛭胺 B Hirudine B	$y = 0.0940x - 0.0269$	1.27 ~ 126.83	1.0000

2.5.1.2 精密度考察

取同一混合对照品溶液,在“2.2”项色谱条件下连续进样6次,测定峰面积,计算得上述5个成分的峰面积RSD均小于3%,表明仪器精密度良好。

2.5.1.3 稳定性考察

取同一供试品溶液,于室温放置0、2、4、8、12、24 h进行测定,计算得上述5个成分峰面积的RSD均小于3%。表明供试品溶液室温放置24 h稳定。

2.5.1.4 重复性考察

取同一批样品(编号:MH3),按“2.3”项下方法

平行制备 6 份供试品溶液,进样分析,计算得上述 5 个成分的平均含量 RSD 依次为 1.09%、0.33%、2.63%、0.30%、0.41%,表明该方法重复性良好。

2.5.1.5 加样回收率考察

精密称取已知含量的样品 0.1g(编号:MH3),共称取 6 份,分别加入一定量对照品溶液,按“2.3”项方法制备,进样分析并计算回收率,结果上述 5 个成分的平均加样回收率分别为 100.03%、98.37%、92.06%、93.40%、99.93%。RSD 分别为 2.03%、1.94%、2.61%、1.86%、1.66%。表明方法准确性良好。

2.5.2 含量测定结果

将 27 批样品按“2.3”项下方法制备,“2.1”项下方法进行检测,结果见表 4。尿嘧啶、次黄嘌呤、水蛭胺 C 羧基衍生物在 27 批样品中均有检出;黄嘌呤在蚂蟥、水蛭、菲牛蛭三个基原中有检出,在柳叶蚂蟥中未检出;水蛭胺 B 在蚂蟥、水蛭、柳叶蚂蟥三

个基原中有检出,在菲牛蛭中未检出。15 批蚂蟥样品(MH1~MH15)的尿嘧啶平均含量为 0.206 mg/g,次黄嘌呤平均含量为 1.107 mg/g,黄嘌呤平均含量为 0.721 mg/g,水蛭胺 C 羧基衍生物平均含量为 0.225 mg/g,水蛭胺 B 平均含量为 0.098 mg/g;5 批水蛭样品(SZ1~SZ5)的尿嘧啶平均含量为 0.151 mg/g,次黄嘌呤平均含量为 0.772 mg/g,黄嘌呤平均含量为 0.416 mg/g,水蛭胺 C 羧基衍生物平均含量为 0.035 mg/g,水蛭胺 B 平均含量为 0.053 mg/g;2 批柳叶蚂蟥样品(LYMH1、LYMH2)的尿嘧啶平均含量为 0.061 mg/g,次黄嘌呤平均含量为 0.715 mg/g,水蛭胺 C 羧基衍生物平均含量为 0.240 mg/g,水蛭胺 B 平均含量为 0.208 mg/g;5 批菲牛蛭样品(FNZ1~FNZ5)的尿嘧啶平均含量为 0.030 mg/g,次黄嘌呤平均含量为 0.140 mg/g,黄嘌呤平均含量为 0.144 mg/g,水蛭胺 C 羧基衍生物平均含量为 0.027 mg/g。

表 4 含量测定结果表
Table 4 Results of content determination

编号 No.	含量 Content(mg/g)				
	尿嘧啶 Uracil	次黄嘌呤 Hypoxanthine	黄嘌呤 Xanthine	水蛭胺 C 羧基衍生物 Hirudine C carboxyl derivative	水蛭胺 B Hirudine B
MH1	0.175	1.100	0.732	0.179	0.094
MH2	0.192	0.981	0.661	0.181	0.097
MH3	0.161	1.187	0.738	0.171	0.070
MH4	0.244	1.275	0.571	0.245	0.102
MH5	0.176	0.999	0.513	0.255	0.050
MH6	0.155	1.070	0.407	0.251	0.135
MH7	0.151	1.155	0.553	0.128	0.061
MH8	0.151	1.266	0.592	0.220	0.068
MH9	0.181	1.185	0.772	0.189	0.114
MH10	0.297	1.371	1.486	0.241	0.074
MH11	0.217	1.195	0.773	0.161	0.062
MH12	0.242	1.195	1.007	0.337	0.080
MH13	0.246	0.882	0.752	0.224	0.153
MH14	0.249	0.894	0.757	0.246	0.197
MH15	0.255	0.847	0.508	0.345	0.112
SZ1	0.217	0.888	0.464	0.084	0.103
SZ2	0.119	0.702	0.450	0.027	0.041
SZ3	0.223	0.903	0.507	0.026	0.093
SZ4	0.118	0.666	0.379	0.032	0.025

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	含量 Content(mg/g)				
	尿嘧啶 Uracil	次黄嘌呤 Hypoxanthine	黄嘌呤 Xanthine	水蛭胺 C 羧基衍生物 Hirudine C carboxyl derivative	水蛭胺 B Hirudine B
SZ5	0.077	0.700	0.282	0.005	0.005
LVMH1	0.062	0.731	-	0.250	0.223
LVMH2	0.060	0.700	-	0.231	0.194
FNZ1	0.015	0.083	0.177	0.026	-
FNZ2	0.035	0.096	0.166	0.003	-
FNZ3	0.023	0.079	0.073	0.003	-
FNZ4	0.061	0.354	0.143	0.061	-
FNZ5	0.015	0.089	0.163	0.040	-

3 讨论与结论

3.1 色谱条件优化

本研究在建立特征图谱的基础上,采用同法对水蛭的两个特征成分水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B 进行含量测定,采用二极管阵列检测器,对供试品溶液在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行全波长扫描,结果显示各主要成分色谱峰在 254 nm 波长处均有较强的紫外吸收,故最终采用同一条件对水蛭样品进行特征图谱及含量测定分析。

3.2 特征图谱结果分析

蚂蟥为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 的干燥全体,其药材性状呈扁平纺锤形,《中国药典》2020 年版对其质量控制仅通过水分、总灰分、酸碱度等检查及抗凝血酶活性进行控制,暂未做出不同基原间的差异化表征。本研究建立了不同基原水蛭及其混淆品的 HPLC 特征图谱,通过对照品比对确认水蛭中含有尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B 共 5 种成分,据文献报道,以上蝶啶类化合物与氯吡格雷等抗血小板聚集药有相似结构,认为该类成分可能是水蛭发挥抗血小板聚集的活性成分^[10,11],而水蛭报道较多的药理作用主要为抗凝血、抗血栓、抗动脉粥样硬化作用,另外还有抗肿瘤、抗炎、抗纤维化、降血脂等多种药理活性,说明本研究所选特征峰对于阐明水蛭发挥药理活性的功效物质、促进药物的二次研发具有重要意义。同时,建立的方法可对不同基原水蛭及其混淆品进行鉴别,下一步将继续开展该方法在提取物及其制剂上的应用研究,为水蛭药材的开发利用提供参考。

3.3 含量测定结果分析

本研究在特征图谱的研究基础上,对水蛭中三

个核苷类化合物尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤以及两个蝶啶类化合物水蛭胺 C 羧基衍生物、水蛭胺 B 共 5 个成分进行了定量测定研究,根据已有文献报道核苷类化合物与蝶啶类化合物可作为水蛭质量评价指标,实验结果显示,不同基原水蛭及其混淆品之间的含量存在一定差异,尿嘧啶、次黄嘌呤的含量均值依次为:蚂蟥 > 水蛭 > 柳叶蚂蟥 > 菲牛蛭;黄嘌呤的含量均值依次为:蚂蟥 > 水蛭 > 菲牛蛭 > 柳叶蚂蟥;水蛭胺 C 羧基衍生物的含量均值依次为:柳叶蚂蟥 > 蚂蟥 > 水蛭 > 菲牛蛭;水蛭胺 B 的含量均值依次为:柳叶蚂蟥 > 蚂蟥 > 水蛭 > 菲牛蛭。

菲牛蛭不含水蛭胺 B 且次黄嘌呤的含量明显低于其他三个基原,因此测定以上成分的含量可用于区分水蛭科动物(包括蚂蟥、水蛭、柳叶蚂蟥)与医蛭科动物(菲牛蛭);另外 PLS-DA 分析是以样品中 8 个特征峰的峰面积作为变量,特征峰的峰面积与其对应指标成分含量有密切联系,结合“2.4.5” PLS-DA 分析结果中次黄嘌呤与黄嘌呤对应特征峰的 VIP 值大于 1,且柳叶蚂蟥不含黄嘌呤,其他三个基原黄嘌呤的平均含量也有明显差异,进一步说明选择该五个成分作为含量测定指标具有一定的科学性。

本研究所建立的方法准确、灵敏、具有良好的专属性,可同时对水蛭药材进行特征图谱分析及含量测定评价,可作为不同基原水蛭及其混淆品的质量评价方法,为水蛭药材的质量评价提供参考依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 85-86.

- 2 Xie YH, Wang SW, Cui HM. The effects of *Hirudo* on normal and experimental hemostasis rats' blood rheology [J]. *J Air Force Med Univ* (第四军医大学学报), 1996, 17: 101-103.
- 3 Liu YH, Mu XY, Chen BH. Research and clinical application of *Hirudo* blood-activating components [J]. *Chin J Modern Drug Appl* (中国现代药物应用), 2013, 7: 192-193.
- 4 Li T. Chemical constituents from *Whitmania pigra* [D]. Guangzhou: Jinan University (暨南大学), 2013.
- 5 Wang CL, Cong ZF, Liu GF, et al. Effects of different processed products of *Whitmania pigra* on hemorheology and coagulation indexes in acute blood stasis model rats [J]. *China Pharm* (中国药房), 2020, 31: 1984-1988.
- 6 Chen KC. To evaluate the medication rules and dosage of traditional Chinese medicine in the treatment of coagulation dysfunction after stroke based on data mining [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (辽宁中医药大学), 2021.
- 7 Jiang QQ. Study on quality standard of *Hirudo* freeze-dried powder and its therapeutic effect on acute blood stasis rats [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University (西南交通大学), 2021.
- 8 Gu NN, Suo YR, Qiao YH, et al. Study on finger print and 16 amino acids' s content determination of *Hirudo* by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography method [J]. *Global Tradit Chin Med* (环球中医药), 2020, 13: 592-599.
- 9 Yang XJ, Cao ZY, Huang W, et al. Comparison on the amino acid and *Hirudo* content of different weight *Poecilobdella manillensis* Lesson [J]. *Feed Ind* (饲料工业), 2020, 41: 40-47.
- 10 Jiang Q, Wang LN, Liu Q, et al. Research progress on processing history evolution, chemical constituents, and pharmacological effects of *Hirudo* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47: 5806-5816.
- 11 Jiang Q, Wang LN, Hu JH, et al. Oral administration of leeches (*Shuizhi*): a review of the mechanisms of action on antiplatelet aggregation-ScienceDirect [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 232: 103-109.
- 12 Li YL, Zhao L. Study on anticoagulant activity of *Hirudo* and their processed products [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2009, 37: 16894.
- 13 Ma L, Ma L, Ouyang LD, et al. Study on the difference of water-soluble proteins in different *Hirudo* processed products based on SDS-PAGE [J]. *Lishizhen Med Mater Medi Res* (时珍国医国药), 2016, 27: 1379-1381.
- 14 Liu WZ, Fan JW, Li YF, et al. Simultaneous determination of seven components in dried *Whitmania pigra* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2014, 34: 1417-1421.
- 15 Zheng YF, Cheng JM, Peng GP. Content determination of three pteridine active ingredients in leech by RP-HPLC [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2011, 27: 573-574.
- 16 Li YF, Wang YH, Zhang CJ, et al. Study on the difference of five origins of *Meconopsis* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology and PLS-DA analysis [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 80-91.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		