

中图分类号: R917; R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)18-0065-07  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.18.014



## 蚂蟥药材炮制前后质量研究\*

邱韵静, 胡绮萍, 童培珍, 杨丽, 邓立萍, 李国卫<sup>△</sup>, 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, 广东 佛山 528244)

**摘要:**目的 为蚂蟥药材及饮片(烫蚂蟥)的鉴别与质量评价提供依据。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法建立蚂蟥药材、饮片各15批的特征图谱。色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.01% 甲酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL; 质谱条件, 加热电喷雾正离子模式(HESI<sup>+</sup>), 鞘气流速为 60 L/min, 辅助气流速为 18 L/min, 喷雾电压为 2.50 kV, 毛细管温度为 288 ℃, 辅助气温度为 475 ℃, 扫描模式为全扫描二级质谱。指认共有峰, 并采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.0版)进行相似度评价。将样品的11个特征峰导入SIMCA 14.1软件进行聚类分析、主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA), 探讨蚂蟥药材及饮片的区分度。采用HPLC法测定指认出的5种成分的含量。结果 蚂蟥药材及饮片的HPLC特征图谱分别确定8个和10个共有峰(7个相同, 指认出其中5个)。药材和饮片样品的相似度均大于0.990。聚类分析、PCA、PLS-DA分析均能将药材和饮片分别聚为一类; PLS-DA分析结果显示, 色谱峰4, 7, 9-11为区分蚂蟥药材与饮片的主要差异化合物。尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺C羧基衍生物、水蛭胺B质量浓度分别在0.12~12.41 μg/mL, 1.20~119.62 μg/mL, 0.92~92.08 μg/mL, 1.23~122.90 μg/mL, 1.27~126.83 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好( $r > 0.999$ ,  $n = 5$ ); 精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于3.0%; 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% ( $n = 6$ )。结论 该研究中建立的方法操作简便、快捷、结果可靠, 可为蚂蟥药材及其炮制品的区分及质量评价提供参考。

**关键词:** 蚂蟥; 烫蚂蟥; 高效液相色谱法; 特征图谱; 质量评价

### Quality Study of *Whitmania Pigra* Whitman Before and After Processing

QIU Yunjing, HU Qiping, TONG Peizhen, YANG Li, DENG Liping, LI Guowei, SUN Dongmei

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

**Abstract: Objective** To provide a basis for the identification and quality evaluation of *Whitmania pigra* Whitman and its decoction

\*基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金[2020B1515120033]。

第一作者: 邱韵静, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为中药配方颗粒质量控制及标准, (电子信箱)365485924@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 李国卫, 男, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为中药配方颗粒质量控制及标准, (电子信箱)452048107@qq.com。

6911-6922.

- [6] 廖远生, 廖吉连, 张胜, 等. 基于网络药理学探讨红景天治疗脑出血的作用机制[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(25): 18-24.
- [7] SUGANTHY N, DEVI KP, NABAVI SF, et al. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 892-908.
- [8] 李畅, 王浩, 贺千羽, 等. 槲皮素通过诱导铁死亡抑制A549细胞增殖的作用及机制研究[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7112-7120.
- [9] ZHU L, XUE L. Kaempferol Suppresses Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Breast Cancer Cells [J]. Oncol Res, 2019, 27(6): 629-634.
- [10] 张琴. 山奈酚对人肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的影响及其机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.
- [11] 乔燕, 刘学波. 草质素体外清除自由基及抑制蛋白质氧化的作用[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 106-110.
- [12] 史才兴, 梁水菁, 李建璋, 等. 红景天苷药理作用及其机制研究进展[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2021, 33(4): 67-70.
- [13] 沈从乐, 李韦杰, 马建和, 等. 管家基因 GAPDH 与肝癌患者诊断及预后的生物信息学分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2023, 30(1): 112-119.
- [14] LIU J, GUO B, CHEN Z, et al. miR-125b promotes MLL- AF9 - driven murine acute myeloid leukemia involving a VEGFA - mediated non - cell - intrinsic mechanism [J]. Blood, 2017, 129(11): 1491-1502.
- [15] BARBOSA K, LI S, ADAMS PD, et al. The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2019, 58(12): 875-888.
- [16] ALZHRANI AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125-132.
- [17] SU YS, KUO MZ, KUO YT, et al. Diterpenoid anthraquinones as chemopreventive agents altered microRNA and transcriptome expressions in cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 136: 111260.

(收稿日期: 2023-05-21; 修回日期: 2023-06-07)

pieces (scalded *Whitmania pigra* Whitman). **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to establish the characteristic chromatograms of 15 batches of *Whitmania pigra* Whitman and 15 batches of its decoction pieces. The chromatographic column was Agilent Zorbax SB-Aq column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.01% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 5 μL. In the mass spectrum, the heated electrospray positive ionization mode (HESI<sup>+</sup>) was adopted, the flow rate of sheath gas was 60 L/min, the flow rate of auxiliary gas was 18 L/min, the spray voltage was 2.50 kV, the capillary temperature was 288 °C, the auxiliary gas temperature was 475 °C, the scanning mode was full-scan secondary mass spectrometry. The common peaks were identified, and the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012.0 Version) was used for similarity evaluation. Eleven characteristic peaks were imported into the SIMCA 14.1 software to perform the cluster analysis, principal component analysis (PCA) and partial least squares - discrimination analysis (PLS-DA), on this basis, the differentiation of *Whitmania pigra* Whitman and its decoction pieces was explored. The content of five identified components was determined by the HPLC method. **Results** Eight and ten common peaks in the HPLC characteristic chromatograms of *Whitmania pigra* Whitman and its decoction pieces were obtained respectively, including seven identical common peaks, five of which were identified. The similarity between the medicinal herbs and decoction pieces was greater than 0.990. The medicinal herbs and decoction pieces could be clustered into one group separately by the cluster analysis, PCA and PLS-DA. The PLS-DA showed that the chromatographic peak 4, peak 7 and peaks 9-11 were the main differential compounds of *Whitmania pigra* Whitman and decoction pieces. The linear ranges of uracil, hypoxanthine, xanthine, carboxy derivatives of hirudonucleodisulfide C and hirudonucleodisulfide B were 0.12 - 12.41 μg/mL, 1.20 - 119.62 μg/mL, 0.92 - 92.08 μg/mL, 1.23 - 122.90 μg/mL, 1.27 - 126.83 μg/mL ( $r > 0.999$ ,  $n = 5$ ), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rates of above five components were 100.03%, 98.37%, 92.06%, 93.40%, 99.93%, with the RSDs of 2.03%, 1.94%, 2.61%, 1.86%, 1.66% ( $n = 6$ ), respectively. **Conclusion** The established method is simple, fast and reliable, which can provide a reference for the differentiation and quality evaluation of *Whitmania pigra* Whitman and its decoction pieces.

**Key words:** *Whitmania pigra* Whitman; scalded *Whitmania pigra* Whitman; HPLC; characteristic chromatogram; quality evaluation

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<sup>[1]</sup>, 味咸、苦, 性平, 有小毒, 归肝经, 有破血通经、逐瘀消癥功效, 常用于治疗血瘀经闭、癥瘕痞块、中风偏瘫、跌扑损伤等症。水蛭主要有抗凝血、抗血栓、抗肿瘤、调血脂、抗炎等药理作用<sup>[2]</sup>, 临床广泛用于治疗血栓、高脂血症、高血压、糖尿病、前列腺炎、癌症、静脉曲张、不孕、肝硬化等病症<sup>[3]</sup>。主要成分为大分子类(蛋白质)化合物, 并含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%; 还含水蛭素、肝素、组织胺、吻蛭素、糖脂类、蝶啶类、甾体类、羧酸酯类等物质<sup>[4]</sup>。目前, 对水蛭的研究集中于抗凝血机理<sup>[5-7]</sup>及氨基酸测定<sup>[8-9]</sup>方面, 为此, 本研究中建立了动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 及其炮制品烫蚂蟥的特征图谱, 并测定其成分尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺C羧基衍生物、水蛭胺B的含量, 以为区分两者及行整体质量评价提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Thermo UltiMate 3000型高效液相色谱仪, Thermo Fisher QE型高分辨液质联用仪(赛默飞世尔科技有限公司); KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ME204E型电子分析天平、XP26型电子分

析天平、FE28型pH计(瑞士Mettler Toledo公司, 前两者精度分别为0.1 mg, 0.001 mg); CHA-SA型气浴恒温振荡器(常州菲普实验仪器厂); HH-M8型双列八孔水浴锅(江苏新春兰科学仪器有限公司); Milli-Q Direct超纯水系统(德国Merck公司)。

### 1.2 试药

尿嘧啶对照品(批号为100469-201302, 含量99.6%), 次黄嘌呤对照品(批号为140661-202005, 含量99.4%), 均购于中国食品药品检定研究院; 黄嘌呤对照品(美国Sigma公司, 批号为X0626, 含量≥99.5%); 水蛭胺B对照品(批号为PIMHA-B-20200901-01, 含量89.54%), 水蛭胺C羧基衍生物对照品(批号为PIMHA-C-20200901-01, 含量87.46%), 均为实验室自制; 甲酸、乙腈均为色谱纯, 甲醇为分析纯; 水为超纯水。15批蚂蟥药材样品(相关信息见表1, 均经广东一方制药有限公司孙冬梅教授鉴定为正品)。

## 2 方法与结果

### 2.1 烫蚂蟥饮片制备

按2020年版《中国药典(一部)》<sup>[1]</sup>“水蛭”项下“烫水蛭”饮片炮制方法, 分别取15批蚂蟥药材样品约100 g, 洗净, 切段, 干燥, 照2020年版《中国药典(四部)》通则0213炮制通则<sup>[10]</sup>用滑石粉烫至微鼓起, 得对应烫蚂蟥饮片(相关信息见表1)。

表1 样品来源信息

Tab. 1 Information of sample sources

药材编号	饮片编号	药材产地	药材编号	饮片编号	药材产地
MH1-MH3	TMH1-TMH3	江苏宿迁	MH10-MH12	TMH10-TMH12	湖北襄阳
MH4-MH6	TMH4-TMH6	江苏连云港	MH13-MH14	TMH13-TMH14	江苏宿迁
MH7-MH9	TMH7-TMH9	安徽宿州	MH15	TMH15	江苏如皋

## 2.2 特征图谱的建立

### 2.2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax SB-Aq柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A) - 0.01% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~12 min时0%A, 12~15 min时0%A→1%A, 15~27 min时1%A→8%A, 27~35 min时8%A→11%A, 35~45 min时11%A→12%A, 45~55 min时12%A→21%A, 55~65 min时21%A→30%A);流速为1.0 mL/min;检测波长为254 nm;柱温为30 ℃;进样量为5 μL。

质谱条件:加热电喷雾正离子模式(HESI<sup>+</sup>),鞘气流速为60 L/min;辅助气流速为18 L/min;喷雾电压为2.50 kV;毛细管温度为288 ℃;辅助气温度为475 ℃;扫描模式为全扫描二级质谱。

### 2.2.2 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对照品各适量,精密称定,加50%甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为135.33, 160.20, 92.96, 34.58, 61.82 μg/mL的混合对照品溶液。取药材/饮片样品粉末(过3号筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率300 W、频率40 kHz,下同)处理30 min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

### 2.2.3 方法学考察

精密度试验:取同一批药材(编号MH3)和饮片(编号TMH3)样品各适量,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下试验条件连续进样测定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2.0%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一批药材(编号MH3)和饮片(编号TMH3)样品各适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,室温下分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 18, 26 h时按2.2.1项下试验条件进样测定,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3.0%(n=8),表明供试品溶液室温下放置26 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批药材(编号MH3)和饮片(编号TMH3)样品各适量,平行6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下试验条件进样测定,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3.0%(n=6),表明方法重复性良好。

### 2.2.4 特征图谱建立及相似度评价

特征图谱建立:取药材、饮片样品各15批,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下试验条件进样测定。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)对色谱图进行分析,分别以编号为MH1、TMH1的图谱为参照(因峰形较明显,峰信号强度适中;下同),设置时间窗宽度为0.1 min,采用平均数法进行色谱峰匹配,得药材、饮片样品的HPLC叠加指纹图谱,详见图1、图2;对照指纹图谱见图3、图4。

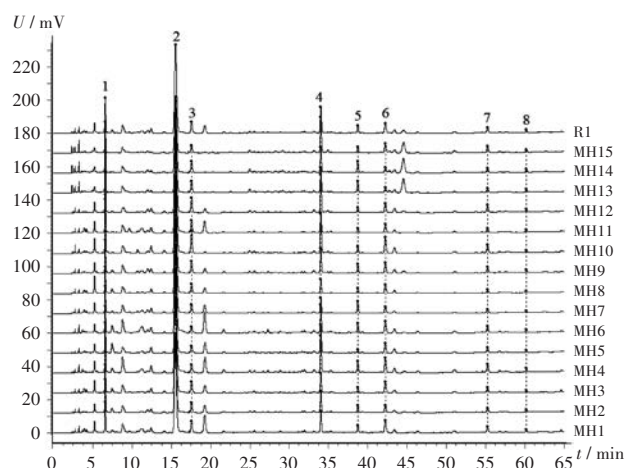


图1 15批药材样品的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms superimposed fingerprint of 15 batches of medicinal herbs

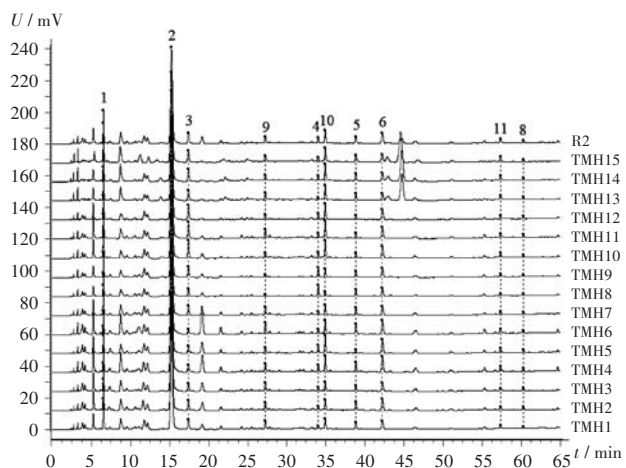


图2 15批饮片样品的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms superimposed fingerprint of 15 batches of decoction pieces

共有峰指认:取2.2.2项下混合对照品溶液适量,按2.2.1项下试验条件进样测定,质谱分析结果见图5、表2。取2.2.2项下供试品溶液,按2.2.1项下试验条件进样分析,通过比对2种溶液的保留时间( $t_R$ ),最终指认出其中峰1-峰5具体成分,色谱图见图6。

相似度评价:分别将30批药材/饮片样品HPLC特征图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统

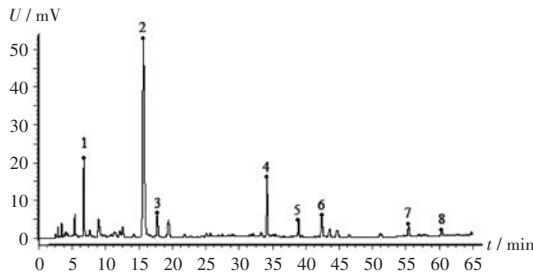


图3 药材样品的高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms reference fingerprint of medicinal herbs

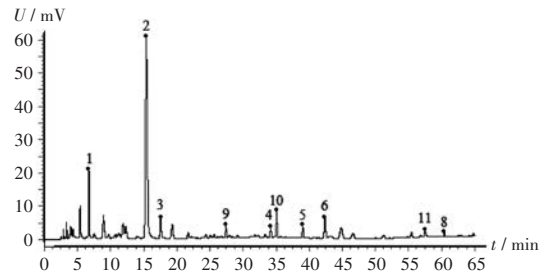


图4 饮片样品的高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 4 HPLC chromatograms reference fingerprint of decoction pieces

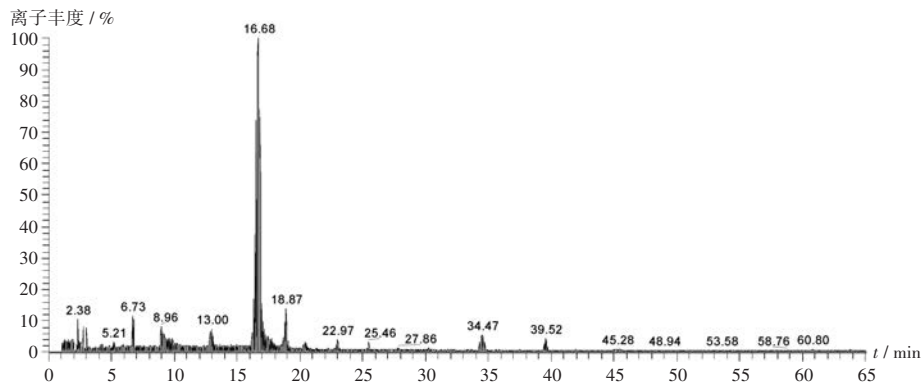


图5 总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatograms

表2 质谱分析结果

Tab. 2 Results of mass spectrometry analysis

峰号	$t_R$ (min)	分子式	偏差 (Da)	理论值 ( $m/z$ )	实测值 ( $m/z$ )	二级碎片离子	化学成分
1	6.73	$C_4H_4N_2O_2$	0.94	112.09	113.03	96.01, 70.03	尿嘧啶
2	16.68	$C_5H_4N_2O$	0.94	136.11	137.05	110.04, 94.04	次黄嘌呤
3	18.87	$C_5H_4N_2O_2$	0.93	152.11	153.04	110.04, 128.05, 82.04	黄嘌呤
4	34.47	$C_{10}H_{16}N_4O_5S_2$	0.69	326.30	326.99	308.97, 278.96, 193.98	水蛭胺C羧基衍生物
5	39.52	$C_{11}H_{16}N_4O_5S_2$	0.68	326.34	327.02	309.01, 261.01, 233.01, 162.01	水蛭胺B

(2012.0版),分别以编号为MH1和TMH1的图谱为参照,设置时间窗宽度为0.1s,采用平均数法进行色谱峰匹配,结果见表3。所有样品的相似度均大于0.990,说明不同来源的蚂蟥药材及其对应炮制品的一致性较好。

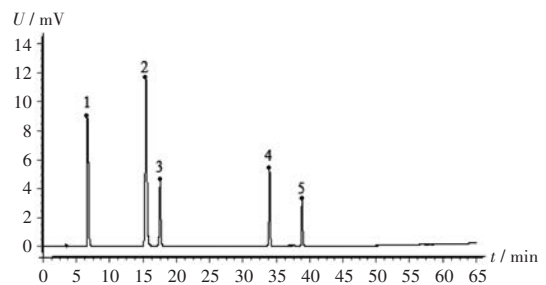
特征图谱样品测定结果:由图1、图2可知,15批药材、饮片样品分别有8,10个共有峰,对比后发现,后者缺失峰7,新增峰9-峰11。峰面积测定结果见表4。

### 2.3 聚类分析

将30批样品中11个特征峰的峰面积导入SIMCA 14.1软件进行聚类分析。结果分类距离为40时,样品可聚为两大类,MH1-MH15为一类,均为药材;TMH1-TMH15为一类,均为饮片;详见图7。聚类结果与特征图谱分析结果一致,均能区分药材与饮片。

### 2.4 主成分分析(PCA)

以30批样品中11个共有峰的峰面积为变量,采用



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

图6 混合对照品溶液的高效液相色谱图

1. Uracil 2. Hypoxanthine 3. Xanthine 4. Carboxy derivatives of hiridonucleodisulfide C 5. Hiridonucleodisulfide B

Fig. 6 HPLC chromatograms of mixed reference solution

表3 30批样品相似度评价结果

Tab. 3 Results of similarity evaluation of 30 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
MH1	1.000	MH11	0.999	TMH6	0.999
MH2	0.999	MH12	0.996	TMH7	0.998
MH3	0.999	MH13	0.999	TMH8	0.999
MH4	0.998	MH14	1.000	TMH9	0.994
MH5	0.999	MH15	1.000	TMH10	0.998
MH6	0.998	TMH1	0.999	TMH11	0.999
MH7	0.997	TMH2	0.999	TMH12	0.999
MH8	0.996	TMH3	0.999	TMH13	0.999
MH9	1.000	TMH4	0.998	TMH14	0.999
MH10	0.996	TMH5	0.997	TMH15	1.000

表4 15批药材及饮片样品图谱共有峰的相对峰面积

Tab. 4 Relative peak area of common peaks in the chromatograms of 15 batches of medicinal herbs and decoction pieces

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11
MH1	2.325	16.148	1.320	2.283	0.782	1.830	0.780	0.289				TMH1	2.181	18.544	1.253	0.497	1.306	1.947		0.299	0.716	1.003	0.306
MH2	2.538	14.265	1.190	2.235	0.744	1.095	0.538	0.291				TMH2	2.481	19.544	1.203	0.437	1.006	1.747		0.269	0.776	1.103	0.366
MH3	2.124	17.275	1.320	2.111	0.557	1.664	0.685	0.222				TMH3	2.306	18.986	1.017	0.394	0.573	1.353		0.330	0.874	0.885	0.271
MH4	3.226	18.570	1.036	3.875	1.224	2.186	1.154	0.398				TMH4	2.995	21.570	0.882	0.736	1.064	2.433		0.346	0.821	1.644	0.554
MH5	2.328	14.538	0.940	2.947	0.343	1.385	0.704	0.229				TMH5	2.213	18.131	0.844	0.856	0.352	2.136		0.309	0.592	1.822	0.496
MH6	2.049	15.616	0.761	2.943	0.976	1.786	0.903	0.315				TMH6	1.917	18.231	0.460	0.494	1.064	2.161		0.279	1.193	1.376	0.454
MH7	2.007	16.939	1.013	1.635	1.220	1.000	0.493	0.133				TMH7	2.422	19.872	1.231	0.356	0.782	1.326		0.190	0.813	1.033	0.306
MH8	2.002	18.530	1.077	1.483	0.524	1.260	0.437	0.200				TMH8	3.178	20.027	2.008	0.406	0.648	1.354		0.208	0.575	1.481	0.456
MH9	2.413	17.383	1.387	2.640	0.959	1.512	0.820	0.297				TMH9	3.057	17.585	1.480	0.534	0.546	1.413		0.238	0.454	1.325	0.320
MH10	3.945	20.074	2.599	4.366	0.663	2.248	1.064	0.284				TMH10	3.530	18.515	2.212	0.663	0.544	1.844		0.217	0.522	1.703	0.479
MH11	2.878	17.453	1.384	2.004	0.468	1.309	0.576	0.212				TMH11	3.478	21.027	2.118	0.506	0.548	1.754		0.308	0.875	1.781	0.406
MH12	3.212	17.491	1.786	4.104	0.522	1.375	0.997	0.293				TMH12	3.157	18.585	1.780	0.634	0.446	1.613		0.228	0.484	1.625	0.362
MH13	3.260	12.815	1.346	2.636	1.210	0.612	0.605	0.323				TMH13	2.707	15.761	1.379	0.235	0.737	0.925		0.219	0.688	1.491	0.413
MH14	3.304	13.005	1.355	2.683	1.235	0.630	0.624	0.320				TMH14	3.164	17.151	1.642	0.538	0.829	1.203		0.263	0.541	1.683	0.500
MH15	3.364	12.278	0.929	3.850	0.644	1.243	0.884	0.293				TMH15	3.006	17.914	1.867	0.959	1.186	1.522		0.225	0.349	1.240	0.361

SIMCA 14.1 软件进行 PCA, 共得到 5 个主成分, 其累计 X 轴方向模型的累积解释率 [ $R^2X(cum)$ ] 为 0.95 ( $> 0.90$ ), 模型累积预测率 [ $Q^2(cum)$ ] 为 0.532 ( $> 0.50$ ), 说明模型拟合及预测能力均较好 (见图 8)。基于已得到的 5 个主成分, 对 30 批样品分类 (见图 9), 主成分分析结果与聚类分析及特征图谱分析结果一致。

## 2.5 偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)

以 30 批样品中 11 个特征峰的峰面积为变量, 采用 SIMCA 14.1 软件进行判别分析, 共得到 2 个主成分, 其 Y 轴方向模型的累积解释率 [ $R^2Y(cum)$ ] 为 0.965,  $Q^2(cum)$  为 0.94, 说明模型的预测能力较好 (见图 10)。通过 20 折置换检验, 得到  $R^2$ 、 $Q^2$  拟合 Y 轴的截距分别为

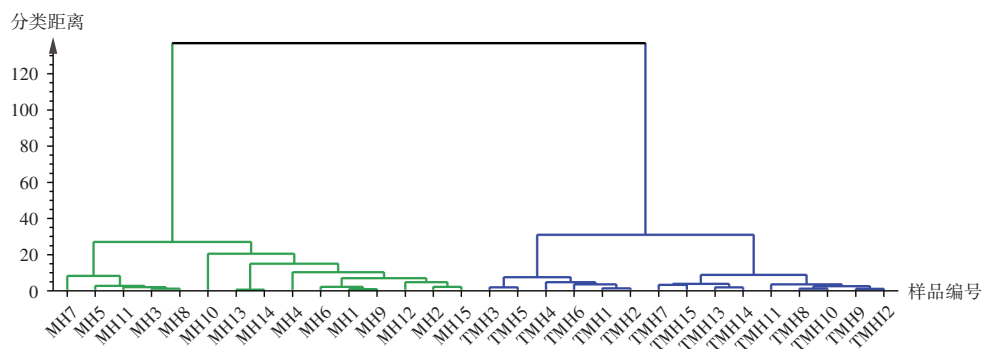


图7 药材及饮片样品聚类分析结果

Fig. 7 Cluster analysis of medicinal herbs and decoction pieces

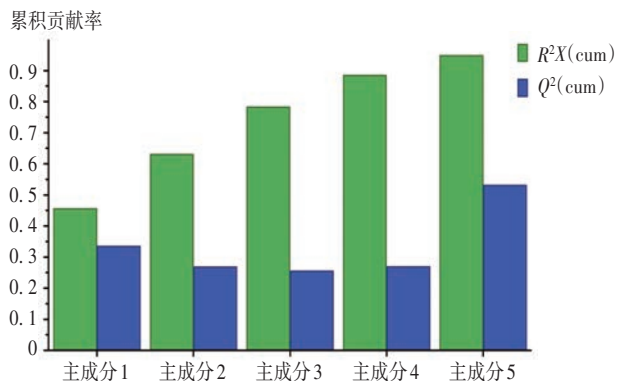


图8 5个主成分累积贡献率

Fig. 8 Cumulative contribution rate of five principal components

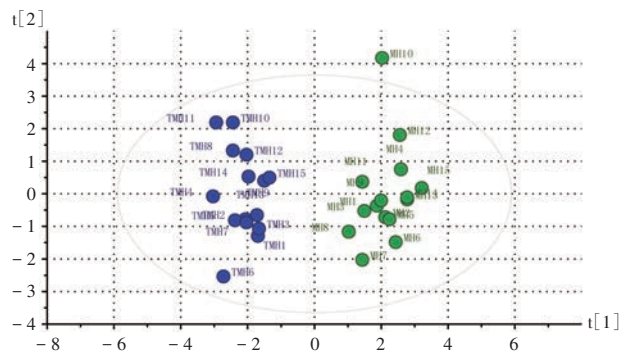


图9 药材及饮片样品主成分分析得分图

Fig. 9 Scoring plot of principal component analysis of medicinal herbs and decoction pieces

0.069 4 ( $< 0.3$ )和  $-0.343$  ( $< 0.05$ ),说明模型拟合较好且拟合Y轴的截距为未过度拟合 [ $R^2=(0, 0.069 4)$ ,  $Q^2=(0, -0.343)$ ;见图11]。得30批样品的得分图(见图12),聚类结果与PCA分析结果一致。对以上变量在预测模型中的重要性(VIP)值进行分析(见图13),以VIP值  $> 1$  为限度,得到5个贡献度高的差异性化合物,分别为峰11、峰10、峰7、峰9、峰4(已指认),可作为区分蚂蟥药材与饮片的主要差异成分。

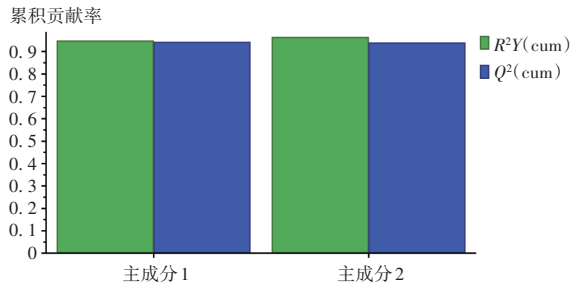


图10 2个主成分累积贡献率

Fig. 10 Cumulative contribution rate of two principal components

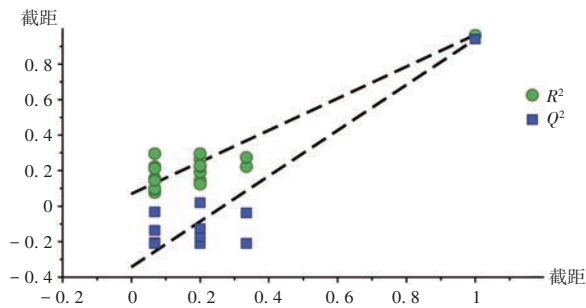


图11 置换验证图

Fig. 11 Permutation test

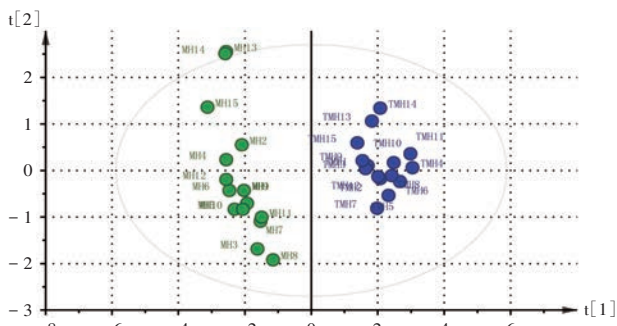


图12 药材及饮片样品得分图

Fig. 12 Scoring plot of medicinal herbs and decoction pieces

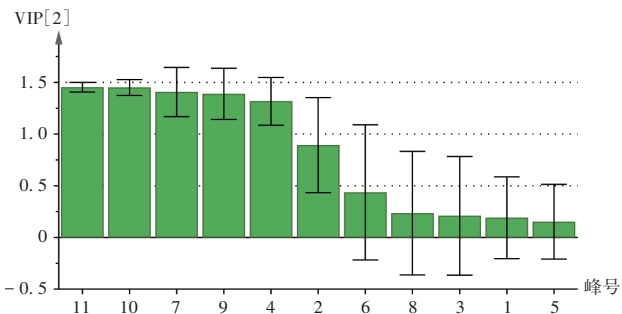


图13 变量在预测模型中的重要性值图

Fig. 13 Variable importance in the projection

## 2.6 含量测定

### 2.6.1 方法学考察

线性关系考察中,尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺C羧基衍生物、水蛭胺B质量浓度分别在0.12~12.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.20~119.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.92~92.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.23~122.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.27~126.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好( $r > 0.999 9$ ,  $n = 5$ );精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于3.0%;表明仪器精密性良好,供试品溶液室温放置24 h内基本稳定,方法重复性良好;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% ( $n = 6$ )。

### 2.6.2 含量测定结果

取30批样品各适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量,结果见表5。尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、水蛭胺C羧基衍生物、水蛭胺B的平均含量, MH1 - MH15样品分别为0.206, 1.098, 0.721, 0.235, 0.084  $\text{mg}/\text{g}$ , TMH1 - TMH15样品分别为0.201, 1.229, 0.747, 0.056, 0.074  $\text{mg}/\text{g}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件优化

预试验中分别考察了乙腈与不同体积分数磷酸二氢钾、乙酸、磷酸、甲酸溶液组合的流动相体系,发现乙腈-0.01%甲酸水溶液的梯度洗脱程序效果最佳且重复性好,故本研究中选其作为流动相。后采用二极管阵列检测器,对供试品溶液进行全波长扫描,结果各主要成分色谱峰在254 nm波长处均有较强的紫外吸收,故选择254 nm为检测波长。

### 3.2 特征图谱结果分析

本研究中所选蚂蟥为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman的干燥全体,其药材呈扁平纺锤形,2020年版《中国药典》对其仅通过水分、总灰分、酸碱度等检查及抗凝血酶活性进行质量控制,暂未做出不同基源及生品、炮制品间的差异化表征。

本研究建立了蚂蟥药材及饮片(烫蚂蟥)的HPLC特征图谱,利用质谱指出5种成分。其中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<sup>[11-12]</sup>,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,且有抗肿瘤、抗炎、抗纤维化、调血脂等多种药理活性,说明本研究中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。此外,该方法可用于蚂蟥药材及饮片的化学特征图谱表征,如本研究中,饮片虽比药

表5 样品中5个成分含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 5 Results of content determination of five components in samples (mg/g, n=3)

编号	尿嘧啶	次黄嘌呤	黄嘌呤	水蛭胺C羧基衍生物	水蛭胺B
MH1	0.175	1.100	0.732	0.192	0.079
MH2	0.192	0.981	0.661	0.189	0.076
MH3	0.161	1.187	0.738	0.179	0.057
MH4	0.244	1.275	0.571	0.327	0.124
MH5	0.176	0.999	0.513	0.249	0.036
MH6	0.155	1.070	0.407	0.248	0.099
MH7	0.151	1.155	0.553	0.138	0.122
MH8	0.151	1.266	0.592	0.126	0.054
MH9	0.181	1.185	0.772	0.222	0.097
MH10	0.297	1.371	1.486	0.367	0.068
MH11	0.217	1.195	0.773	0.170	0.048
MH12	0.242	1.195	1.007	0.344	0.054
MH13	0.246	0.882	0.752	0.223	0.122
MH14	0.249	0.894	0.757	0.227	0.124
MH15	0.255	0.711	0.508	0.325	0.096
TMH1	0.197	0.795	0.669	0.049	0.047
TMH2	0.188	1.340	0.669	0.039	0.102
TMH3	0.174	1.296	0.557	0.035	0.059
TMH4	0.225	1.468	0.477	0.063	0.107
TMH5	0.168	1.245	0.458	0.074	0.037
TMH6	0.144	1.241	0.229	0.043	0.107
TMH7	0.183	1.362	0.685	0.032	0.080
TMH8	0.137	1.113	0.506	0.103	0.073
TMH9	0.153	1.116	0.727	0.090	0.068
TMH10	0.267	1.269	1.262	0.058	0.056
TMH11	0.263	1.438	1.206	0.044	0.056
TMH12	0.238	1.271	1.006	0.055	0.046
TMH13	0.204	1.076	0.768	0.022	0.075
TMH14	0.239	1.176	0.926	0.047	0.084
TMH15	0.228	1.230	1.061	0.083	0.120

材缺少1个特征峰,但新增3个色谱峰。聚类分析、PCA、PLS-DA分析均能将两者分别聚类并有效区分。PLS-DA分析找到5个区分两者的差异标志物。

### 3.3 含量测定结果分析

炮制研究认为,滑石粉烫处理的炮制方法在降低其抗凝血酶活性的同时也减小了毒性<sup>[13-14]</sup>。李艳玲等<sup>[15]</sup>通过测定小鼠的凝血时间、出血和抗血栓作用发现,抗凝血效果从强到弱依次为生水蛭的甲醇提取液>烫水蛭的甲醇提取液>生水蛭的水煎液>烫水蛭的水煎液;马琳等<sup>[16]</sup>通过采用SDS-PAGE技术测定不同水蛭炮制品中水溶性蛋白含量,发现蛋白含量由多到少依次为冻干水蛭>生水蛭>酒制水蛭>滑石粉烫制水蛭,说明高温炮制可导致水蛭中蛋白含量降低。

本研究中通过测定蚂蟥药材及饮片各15批中5个成分含量,发现炮制前后蚂蟥的3个核苷类化合物含量并无较大差异,而水蛭胺C羧基衍生物含量明显降低,水蛭胺B含量无明显变化。

### 3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、快捷,结果可靠,可为蚂蟥药材及其炮制品的区分及质量评价提供参考。同时,特征图谱与含量测定结果均显示,与蚂蟥药材比较,饮片中有新成分产生或炮制过程发生成分转化,蚂蟥药材的炮制及临床应用还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 85-86.
- [2] 谢艳华, 王四旺, 崔翰明. 水蛭对正常及血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 第四军医大学学报, 1996, 17(2): 101-103.
- [3] 刘轶华, 穆晓燕, 陈保红. 水蛭活血成分研究及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(11): 198-199.
- [4] 李桃. 宽体金钱蛭的化学成分研究[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [5] 王常麟, 丛竹凤, 刘国飞, 等. 水蛭不同炮制品对急性血瘀模型大鼠血液流变学及凝血指标的影响[J]. 中国药房, 2020, 31(16): 1984-1988.
- [6] 陈珂丞. 基于数据挖掘的中医治疗卒中后凝血功能异常的用药规律及药物用量的评估[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021.
- [7] 蒋倩倩. 水蛭冻干粉质量标准及对急性血瘀证大鼠治疗作用研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- [8] 顾念念, 索亚然, 乔艺涵, 等. 柱前衍生-HPLC法对水蛭的特征图谱及其16种氨基酸含量测定研究[J]. 环球中医药, 2020, 13(4): 592-599.
- [9] 杨秀娟, 曹志勇, 黄伟, 等. 不同体重菲牛蛭氨基酸及水蛭素含量的差异性研究[J]. 饲料工业, 2020, 41(8): 40-47.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 31.
- [11] 姜秋, 王玲娜, 刘谦, 等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5806-5816.
- [12] JIANG Q, WANG LN, HU JH, et al. Oral administration of leeches (Shuizhi): A review of the mechanisms of action on antiplatelet aggregation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 232: 103-109.
- [13] 汤晓, 杜中惠, 李强. 水蛭炮制工艺的实验研究[J]. 中国药业, 2004, 13(8): 50.
- [14] 文洪宇, 龙顺伯, 罗怡. 水蛭炮制方法演变[J]. 中国药业, 2009, 18(20): 71-73.
- [15] 李艳玲, 赵丽. 水蛭及其炮制品的体内抗凝血活性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(34): 16894.
- [16] 马琳, 马莉, 欧阳罗丹, 等. 基于SDS-PAGE技术的不同水蛭炮制品中水溶性蛋白的差异性研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(6): 1379-1381.

(收稿日期: 2023-03-02; 修回日期: 2023-05-06)