

# 水蛭的高效液相指纹图谱研究

徐佳 杨瑶琨 刘晓帆 吴立洁 刘杰 戴待

**【摘要】** 目的 以黄嘌呤和次黄嘌呤为对照品,系统的完成水蛭指纹图谱的建立。方法 采用 Agilent TC-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相 0.01 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇梯度洗脱,检测波长 254 nm,流速 0.8 ml/min,柱温 25 ℃,进样量 20 μl。结果 10 批水蛭药材的色谱指纹图谱得到 10 个共有峰,其中两个为黄嘌呤和次黄嘌呤的色谱峰。利用药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A》进行评价,高效液相指纹图谱的相似度在 0.669~0.994 之间。结论 所建立的高效液相指纹图谱可有效地鉴定水蛭,该方法为水蛭药材的质量评价提供了实验数据基础。

**【关键词】** 水蛭; 黄嘌呤; 次黄嘌呤; 高效液相; 指纹图谱

**【中图分类号】** R 284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.08.010

**HPLC fingerprint study of Hirudo** XU Jia, YANG Yao-jun, LIU Xiao-fan, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: YANG Yao-jun, E-mail: yangyaoj002@sina.com

**【Abstract】 Objective** To establish the fingerprinting of Hirudo systematically, using xanthine and hypoxanthine as reference substances. **Method** Using Agilent TC-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm); mobile phase A 0.01 mol/L Potassium dihydrogen phosphate, B Methanol, the detection wavelength was set at 254 nm, the flow rate was 0.8 ml/min the column temperature was 25 ℃, the injection volume was 20 μl. **Result** 10 characteristic peaks were identified with the analysis of 10 batches of Hirudo from different habitats, and two of them were Xanthine and Hypoxanthine. According to the similarity evaluation system for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2004A), the similarity of the chromatographic fingerprints was between 0.669-0.994. **Conclusion** HPLC fingerprint can effectively identify Hirudo. The method could provide basis of the experimental data for the quality assessment of Hirudo.

**【Key words】** Hirudo; Xanthine; Hypoxanthine; HPLC; Fingerprint

2010 版《中华人民共和国药典(一部)》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,具有破血通经、逐瘀消癥的功效,用于治疗癥瘕痞块、中风偏瘫、跌扑损伤等症<sup>[1]</sup>。近年来,水蛭市场需求量增大,药材

质量良莠不齐,严重影响其制剂的临床疗效,因此笔者采用主流品种蚂蟥药材进行指纹图谱研究。

中药成分复杂,单纯测定少数几种有效成分或指标成分难以控制其质量,因此指纹图谱的建立能全面反映整体成分的特征,更好的评价药材质量<sup>[2]</sup>。近年来,指纹图谱技术有了飞速的发展,逐渐成为建立中药材质量标准的的主流手段,在中药鉴定领域广泛应用。例如,在鉴定进口药物与国产药物上面的应用<sup>[3]</sup>,在研究相同类别化合物在不同中药的成分表达的异同<sup>[4]</sup>,在药材真伪鉴定方面<sup>[5]</sup>等。

但在动物类中药的指纹图谱方面,文献报道较少,本实验将指纹图谱技术引入到动物类中药材鉴定中,一方面可以解决水蛭药材常规鉴定客观数据缺失的弊端,另一方面由于水蛭等动物药材的有效

基金项目:国家科技重大专项“重大新药创制”(2009ZX09301-005-03)

作者单位:100102 北京,北京中医药大学中药学院[徐佳(硕士研究生)、杨瑶琨、刘晓帆(硕士研究生)、吴立洁(硕士研究生)、刘杰(硕士研究生)、戴待(硕士研究生)]

作者简介:徐佳(1988-),女,2011 级在读硕士研究生。研究方向:中药品种鉴定与质量研究。E-mail:xujia010662@163.com

通讯作者:杨瑶琨(1969-),女,博士,教授。研究方向:中药品种与质量。E-mail:yangyaoj002@sina.com

成分研究并不全面且成果并未得到广泛的认可,而指纹图谱则可以宏观判别水蛭的质量,因此可以作为评价水蛭质量数据之一。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Sigma 3K15 离心机(希格玛公司), Sartorius BP110S 分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司), DFT-100 手提式高速中药粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司), 高效液相色谱仪 Agilent 1100(美国安捷伦公司), DAD 二极管阵列检测器(美国安捷伦公司)。

### 1.2 试剂

色谱甲醇( Fisher LOT126273) 氯化钠(批号:20090706, 北京化工厂), 磷酸二氢钾(批号:20111221, 国药集团化学试剂有限公司), 次黄嘌呤(批号:069-110811, 上海宝莱生物制品公司), 黄嘌呤对照品(批号:140662-200802, 中国食品药品检定研究院)。

### 1.3 样品

经北京中医药大学中药学院杨瑶珺教授鉴定为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman, 10 批水蛭药材见表 1。

表 1 水蛭样品收集表

样品号	产地/采集/购买地	规格
1	山东省济宁市微山湖	原动物/晒干
2	江苏(亳州购买)	矾水杀死
3	山东(亳州购买)	清水晒干
4	湖北(安国购买)	清水烫死
5	江苏(亳州购买)	清水晒干
6	湖北(亳州购买)	清水烫死
7	杭州购买	饮片/晒干
8	北京购买	饮片/晒干
9	北京购买	饮片/晒干
10	北京购买	饮片/晒干

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

Agilent TC-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 0.01 mol/L 磷酸二氢钾(A)-甲醇(B), 梯度洗脱:0~40 分钟, A-B(95:5~90:10); 40~70 分钟, A-B(90:10~50:50); 检测波长 254 nm, 流速 0.8 ml/min, 柱温 25 °C, 进样量 20 μl。

### 2.2 色谱条件的选择

提取方法考察:对比 70% 乙醇提取, 超声提取,

采用生理盐水浸提的方式, 可以保留水蛭中的多种化学成分, 使得指纹图谱更加全面、有效。

流动相的确定:(1) 甲醇-水梯度洗脱;(2) 甲醇-冰醋酸水溶液梯度洗脱;(3) 乙腈-冰醋酸水溶液梯度洗脱;(4) 甲醇-磷酸二氢钾梯度洗脱。通过选择多种流动相系统比较试验, 以甲醇-磷酸二氢钾盐溶液为流动相, 分离效果较好、各峰分离度较大、基线平稳、保留时间适中。

检测波长的选择:采用二极管阵列检测器, 考察 230 nm、240 nm、254 nm、280 nm 等波长下的检测情况, 结果表明提取液在 254 nm 下指纹图谱色谱峰数目适中, 且色谱峰的信噪比大, 基线平稳, 故检测波长定为 254 nm<sup>[6]</sup>。

参照物的选择:次黄嘌呤是水蛭含量测定的对照品, 具有舒张支气管、平喘、扩张血管、降压等作用<sup>[7]</sup>, 广泛存在于动物体内, 和水蛭的药理作用有一定的关联性。本实验的对照品在文献中次黄嘌呤的基础上, 引入黄嘌呤, 在指认方面, 完善水蛭的指纹图谱。

### 2.3 供试品溶液制备

取水蛭粗粉约 1.25 g, 置于 10 ml 离心管中, 加生理盐水 5 ml, 摇匀, 浸提 24 小时后离心 10 分钟(转速 3500 r/min)。上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

### 2.4 对照品溶液配制

精密称取次黄嘌呤 2.52 mg, 黄嘌呤 2.56 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 以甲醇(色谱纯)溶液溶解并稀释, 摇匀, 制成每 1 ml 含次黄嘌呤 0.252 mg, 黄嘌呤 0.256 mg 的混标溶液。

### 2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察 精密吸取 5 号供试品溶液, 进样量 20 μl, 连续进样 5 次, 测定指纹图谱。以峰面积的大小选取十强峰(十强峰总面积大于总峰面积的 65%), 经计算, 十强峰的相对保留时间的 RSD 值为 0.05%~0.17%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.3%~2.77%, RSD 均小于 3.0%, 仪器的精密度良好。

2.5.2 重复性考察 取 5 号供试品溶液, 进样量为 20 μl, 测定指纹图谱。经计算, 十强峰的相对保留时间的 RSD 值为 0.88%~2.57%, 峰面积 RSD 为 0.34%~2.84%, RSD 值均小于 3.0%, 该方法的重复性良好。

2.5.3 稳定性考察 取 5 号供试品溶液, 进样量为 20 μl, 分别在 2、4、6、8、12、24 小时测定指纹图谱, 经计算, 十强峰的相对保留时间的 RSD 为 0.37%~

1.67%, 相对保留面积的 RSD 为 0.24% ~ 1.33%, RSD 值均小于 3.0%, 该方法的稳定性良好。

### 3 实验结果

#### 3.1 指纹图谱及共有峰的标定

用建立的色谱条件, 对 10 批样品进行测定, 得

到水蛭高效液相指纹图谱, 见图 2。水蛭所含成分的色谱峰在 70 分钟之内洗脱完全, 有 10 个共有峰, 对次黄嘌呤、黄嘌呤进行归属, 并生成对照指纹图谱, 见图 3。

比较分析 10 批样品的色谱图, 并计算各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积, 结果见表 2。

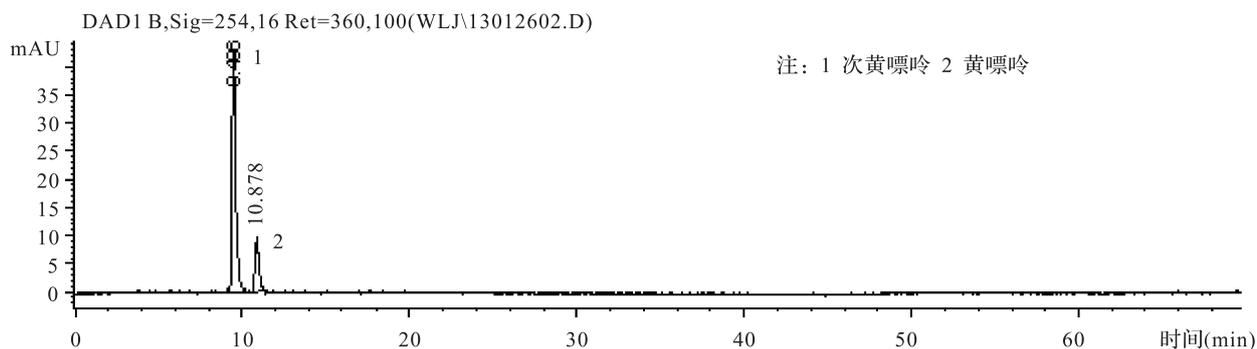


图 1 次黄嘌呤、黄嘌呤对照品色谱图

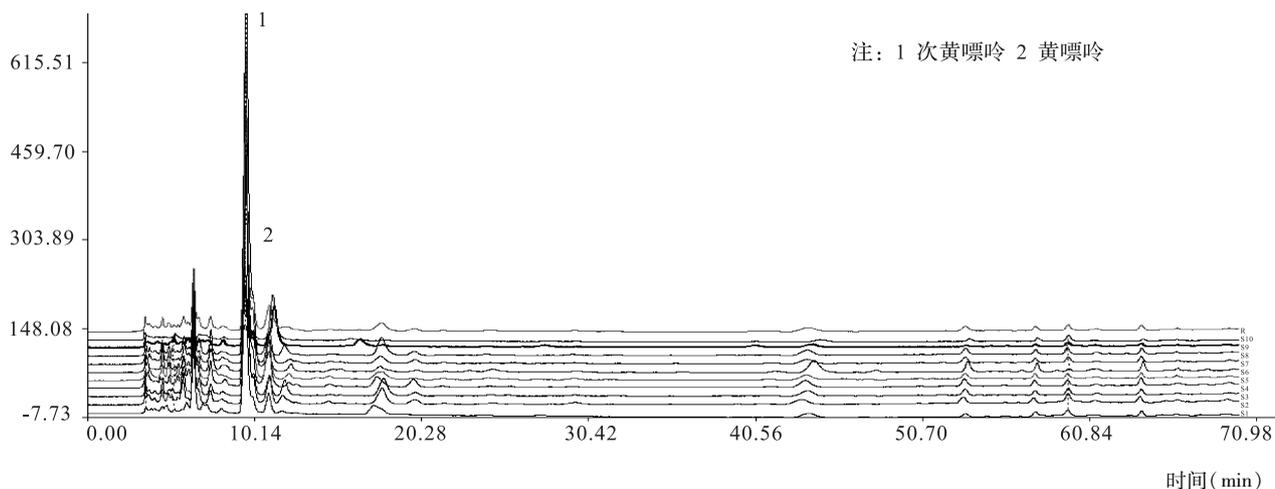


图 2 10 批水蛭指纹图谱

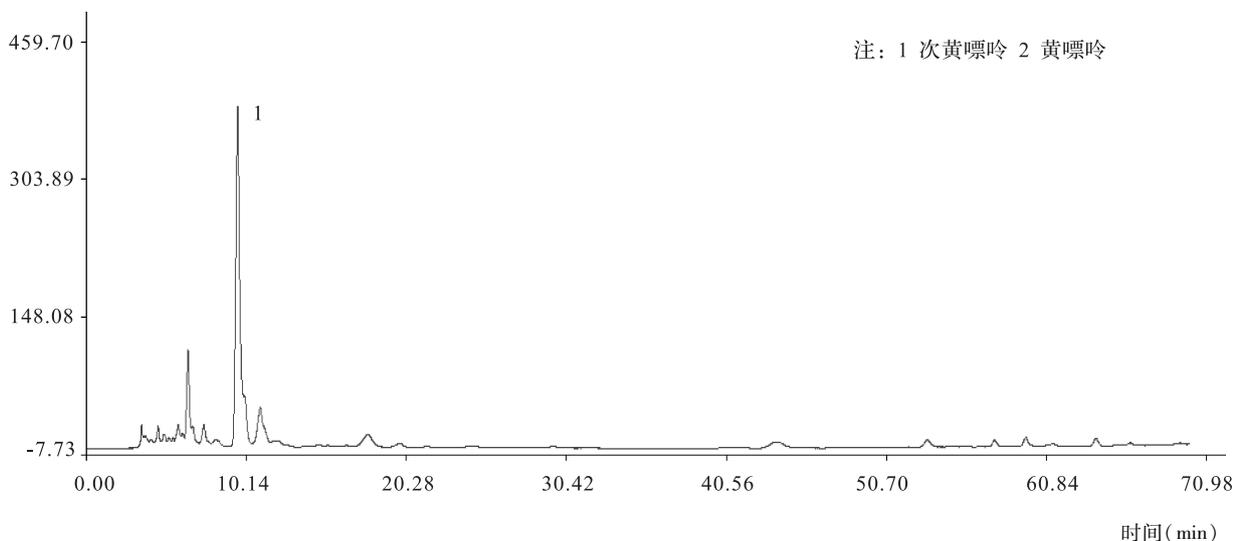


图 3 水蛭对照指纹图谱

表 3 水蛭相似度计算结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1	0.952	0.936	0.954	0.950	0.923	0.954	0.940	0.650	0.945	0.960
S2	0.952	1	0.961	0.967	0.977	0.957	0.986	0.985	0.650	0.985	0.987
S3	0.936	0.961	1	0.962	0.971	0.965	0.972	0.975	0.635	0.976	0.982
S4	0.954	0.967	0.962	1	0.973	0.963	0.981	0.964	0.632	0.967	0.984
S5	0.950	0.977	0.971	0.973	1	0.971	0.990	0.981	0.646	0.983	0.992
S6	0.923	0.957	0.965	0.963	0.971	1	0.968	0.972	0.627	0.974	0.983
S7	0.954	0.986	0.972	0.981	0.990	0.968	1	0.985	0.649	0.987	0.994
S8	0.940	0.985	0.975	0.964	0.981	0.972	0.985	1	0.642	0.999	0.991
S9	0.650	0.650	0.635	0.632	0.646	0.627	0.649	0.642	1	0.643	0.669
S10	0.945	0.985	0.976	0.967	0.983	0.974	0.987	0.999	0.643	1	0.993
对照	0.960	0.987	0.982	0.984	0.992	0.983	0.994	0.991	0.669	0.993	1

表 2 水蛭共有峰相对保留时间及相对峰面积

编号	相对保留 时间平均	保留时间 RSD%	相对峰 面积平均	峰面积 RSD%
1	0.365	0.96	0.031	36.13
2	0.545	1.31	0.022	37.63
3	0.672	0.22	0.190	48.63
4(次黄嘌呤)	1.000	0.29	1.000	60.97
5(黄嘌呤)	1.147	0.30	0.183	40.64
6	1.597	0.23	0.007	77.70
7	4.554	0.15	0.065	17.32
8	5.996	0.08	0.023	22.63
9	6.206	0.06	0.033	48.45
10	6.668	0.06	0.024	24.47

由上表得知,水蛭药材 10 个共有峰的的相对保留时间的 RSD 值在 0.06% ~ 1.31%,符合指纹图谱研究技术要求。但各自的相对峰面积差别很大,说明不同样品的相同成分含量相差悬殊。

### 3.2 相似度评价

利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A》,对 10 样本指纹图谱进行匹配,相似度在 0.669 ~ 0.994 之间(见表 3)。9 号样品与对照指纹图谱的相似度为 0.669,明显低于其他饮片的相似度。由 1 号至 6 号样品可以看出,水蛭在原药材阶段相似度差异不大,但是将其切段炮制成饮片后,相似度差异较大,因此不同的炮制方法会直接影响水蛭饮片的化学成分的种类与含量<sup>[8]</sup>。

### 4 总结与讨论

从水蛭的指纹图谱可以看出,该方法的重复性较好,不同水蛭药材的指纹图谱相似性较高,说明不同产地水蛭含有的化学成分大致相当。但是 10 个

共有峰的相对峰面积 RSD 值很大,说明水蛭的共有成分含量差异很大,这可能与养殖方法、养殖环境、炮制有关。

由对照色谱可以看出,次黄嘌呤的峰面积很大,其对相似度的影响也较大,因此后续应继续改进提取方法与色谱条件,以平衡各色谱峰的峰面积,使数据更加具说服力。经过对 10 批不同产地的水蛭药材进行指纹图谱试验,表明所建立的检测方法操作简便、重现性好,为控制水蛭药材的质量提供了实验数据基础。

### 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:77.
- [2] 王喜军,曹玲,孙晖. 人工规范化种植防风药材的指纹图谱研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2004,6(3):33-36.
- [3] 黄茂华,雍克岚. 棕榈科麒麟血竭与百合科剑叶血竭 HPLC 指纹图谱分析与比较[J]. 上海大学学报(自然科学版),2001,7(4):326-330.
- [4] Gulnur Toker, Mustafa Aslan, Erdem Yesilada et al. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal Tiliae flos and Turkish lime species for quality assessment[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001,26:111-121.
- [5] 翟为民,袁永生,周玉新,等. 人参、西洋参及三七参指纹图谱鉴别[J]. 中国中药杂志,2001,26(7):481-482.
- [6] 袁晓环,杨旭东,崔荣军,等. 水蛭注射液的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国医药工业杂志,2008,39(7):530-532.
- [7] 崔小兵,李伟,张科卫,等. HPLC 测定海龙中次黄嘌呤及黄嘌呤含量[J]. 中国海洋药物,2006,25(2):58-60.
- [8] 张永太. 水蛭饮片次黄嘌呤含量测定[J]. 中成药,2008,30(8):1175-1177.

(收稿日期:2013-07-26)

(本文编辑:董历华)