

中药水蛭生药学与化学成分的研究进展与展望

刘晓帆 杨瑶璐 吴丽洁 徐佳

【摘要】 本文系统总结了近年来水蛭的原动物品种、鉴定与质量评价、化学成分等研究,并对水蛭药材的未来的发展前景做了初步展望。通过查阅大量文献,发现《中华人民共和国药典》2010 版在水蛭的来源的描述与实际情况有较大的偏差,主要体现在分类和命名方面。对于水蛭的药材质量和化学成分的研究,近年来的研究均集中在性状鉴别和指纹图谱等定性鉴别和对水蛭中的大分子物质的研究,对水蛭的定量理化鉴定和小分子物质研究较少。

【关键词】 水蛭; 生药学; 质量评价; 成分

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.08.025

Research progress and prospect on pharmacognosy and chemical composition of Hirudo LIU Xiao-fan, YANG Yao-jun, WU Li-jie, et al. Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

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

【Abstract】 These passage summaries recent years of research of Hirudo, including species identification and quality, chemical composition, pharmacological effect etc. This passage also preliminary prospects the development in the future. Through research the literature, the author found that there is a huge different between the description of China Pharmacopoeia and the actual situation, particularly the classification and nomenclature. To Hirudo medicine quality and chemical composition studies, recent research are focused on the morphological identification and fingerprinting identification and the macromolecules, lack of the quantitative physico-chemical identification and small molecular substances research.

【Key words】 Hirudo; Pharmacological; Quality evaluation; Component

水蛭是一味传统药材,始载于《神农本草经》,历代本草对它均有记录。近年来,由于人们发现其对心脑血管疾病具有很好的治疗作用,在临床上,也越来越多的用于脑血栓、冠状动脉粥样硬化性心脏病及脑水肿的治疗^[1]。另据报道,水蛭亦可以用于糖尿病肾病的治疗^[2]。因此,水蛭的临床研究及药学研究也越来越广泛,现就生药学近年来的研究

概况综述如下。

1 原动物品种的研究

《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2010 年版收载 3 种水蛭,分别为蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman,水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥体^[3]。

需要指出的是,《中国药典》和《中国动物志》所记载的这三种水蛭在名称及归属上面有很大的不同,《中国动物志》将蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 分别称作宽体金线蛭与尖细金线蛭,属于黄蛭科。而水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 称为日本医蛭,属于医蛭科^[4]。它们的习性也完全不同,前两者以田螺、蚌

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院中药鉴定系[刘晓帆(硕士研究生)、杨瑶璐、吴丽洁(硕士研究生)、徐佳(硕士研究生)]

作者简介:刘晓帆(1987-),2010 级在读硕士研究生。研究方向:中药动物药品种和质量研究。E-mail:tonylium@126.com

通讯作者:杨瑶璐(1969-),女,副教授。研究方向:中药品种及质量鉴定。E-mail:yangyaoj002@sina.com.cn

文献标引:

刘晓帆,杨瑶璐,吴丽洁,等.中药水蛭生药学与化学成分的研究进展与展望[J].环球中医药,2012,5(8):637-640.

类等软体动物为生,后者则以吸食血液为生。有报道称后者具有抗凝血作用,而前两者未见有这种作用的报道。

综合历代本草及近年来水蛭的动物研究进展,笔者认为,《中国药典》的来源欠妥。根据历代文献对水蛭的性状、生存环境、食性等方面的描述,历代本草所记载的水蛭应为吸血的日本医蛭或丽医蛭(属于医蛭科),而不应该是不吸血的宽体金线蛭和尖细金线蛭^[5]。另外,《中国药典》将宽体金线蛭称之为“蚂蟥”亦不太恰当,“蚂蟥”一名始出于《图经本草》,原意是指吸血的水蛭,直到今天,人们也将吸血的蛭类称作蚂蟥。同理,柳叶蚂蟥也应改称为尖细金线蛭为妥。

2 水蛭药材鉴定研究

目前报道了一系列关于水蛭药材鉴定方面的研究,主要包括:性状鉴定、理化鉴定等方面,显微鉴定、DNA 条形码部分未见报道。

2.1 性状鉴别

在药材市场上,水蛭有三种规格,分别为:清水晒干、清水烫死、矾水杀死。在价格上呈现递减趋势,至于三种规格的质量如何,未见有文献报道。但大部分学者认为,质量较好的水蛭在性状上应有以下特征:外观背部有自然的黑色光泽,折断时有韧性感,断面有胶质样光泽,味淡且有鱼腥气,手摸肉质有弹性^[6-7]。笔者在进行市场调查时发现,宽体金线蛭为主要品种,清水晒干和清水烫死这两种规格占主导地位。

2.2 显微鉴定

目前没有关于显微鉴定的专门文献报道,不过张贵君^[8]在《常用中药显微鉴定》一书中指出水蛭的粉末鉴别特征为纤维、表皮细胞与纵肌纤维细胞。但是根据笔者的验证发现,水蛭正品与伪品在这些方面几乎一模一样,无法进行鉴别。该方法只能用于水蛭类药材与其他药材的鉴别。

2.3 理化鉴别

《中国药典》2010 版的检测方法为薄层色谱和浸出物含量的检测。笔者经验证发现,正品和混伪品均可以与标准药材在相同位置形成相同的紫红色的点,很难鉴别。浸出物的含量表明,在正品的范围中,清水晒干的浸出物含量最高,清水烫死次之,矾制最低。与伪品的横向比较未找出明显差别。所以,很多学者就报道了其他的一些理化检测

方法,主要为毛细管电泳法。

江佩芬等^[9]利用电泳技术,测定宽体金线蛭、日本医蛭、尖细金线蛭、光润金线蛭的电泳谱带,发现宽体金线蛭和日本医蛭的电泳谱带相似,尖细金线蛭的电泳谱带略有区别,光润金线蛭的电泳谱带与它们 3 种有些不同,但是这 4 种水蛭均有两条主要电泳谱带 A3 和 B1。因为水蛭的主要成分是蛋白质,所以从化学成分的角度说,这 4 种水蛭可能存在有相同的蛋白质,但是以《中国药典》收录的 3 个品种宽体金线蛭、日本医蛭、尖细金线蛭的蛋白类成分较为相似。

另外,刘兴国等^[10]采用高效毛细管电泳法对宽体金线蛭和混淆品菲牛蛭进行蛋白多肽的分析,发现宽体金线蛭与菲牛蛭的高效毛细管电泳图谱之间有明显差异,重复性良好。

2.4 DNA 条形码验证

DNA 条形码技术是近来发展起来的物种鉴定新方法,通过对基因组中一段短的、标准的 DNA 片段进行分析从而对物种进行准确鉴定,成为生物分类和鉴定的研究热点和方向。尤其适用于来源于生物体部分组织或器官的中药材的真伪鉴定^[11-12]。运用 DNA 条形码,可以很好的对水蛭的品种进行快速、有效的鉴定。但是现在这方面还未见报道。

3 含量测定和指纹图谱

《中国药典》的水蛭的含量测定的方法是进行凝血酶效价的评价,通过这种评价方法可以大致了解水蛭凝血作用的强弱,这种整体评价方法符合中药普遍存在的多成分、多靶点的特点。但是,经过笔者的验证,发现这种方法存在无法判别何时开始凝结的问题,有着较大的误差。

文献报道方面,大多采用高效液相色谱和紫外光谱法来测定水蛭内各种有效成分的含量,其中包括:氨基酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、总磷脂、总多糖、生物活性物质等等。

通过柱前衍生化法测定水蛭内氨基酸含量发现,水蛭内游离氨基酸含量和总氨基酸含量大多维持在 2.9 mg/ml 和 4.1 mg/ml 左右^[13-14]。

丁冠华^[15-16]采用 Folch 试剂超声提取,钼蓝试剂显色和乙醚回流提取,苯酚-硫酸显色的方法,分光光度法分别测定两种药材不同商品中总磷脂和总多糖的含量。得出水蛭中总磷脂含量以磷含量计算,在 2.38 ~ 71.4 μg 范围内具有良好的线性关

系,其回归方程 $Y=0.0238X-0.01$ ($r=0.9994$)。总多糖含量以葡萄糖计,在 18.54 ~ 92.68 μg 范围内有良好线性关系,回归方程 $Y=0.0045X+0.0012$ ($r=0.9998$)。

次黄嘌呤为最常见的水蛭含量测定的标准物质,但是次黄嘌呤的药理作用为阵痛、止咳等,与水蛭主要的药理作用差别很大,笔者认为,次黄嘌呤可能不能作为水蛭质量鉴别的标准品。

王艳^[17]、张永太^[18]等运用仿生酶水解、乙醇提取等提取方法,运用高效液相测定,均取得了良好的效果。但是含量较低,是否有鉴定依据,需要进一步的考察。

部分学者还对不同产地、不同品种的水蛭进行了指纹图谱的研究,但是所运用的标准品只有次黄嘌呤,其他峰的归属还需要进一步的研究^[19-20]。

4 化学成分研究

水蛭的化学成分以大分子蛋白质、多肽等物质为主。也是现在研究的主流范围,而微量元素等小分子物质则研究较少。

4.1 蛋白质及多肽等大分子物质

目前文献报道了一系列水蛭具有抗凝作用的多肽类成分,包括水蛭素、肝素、组织胺、氨基酸和其他多肽类物质等。并通过化学和药理研究,基本否定了水蛭素为中药水蛭(药材)的有效成分,但是对于其有效成分的确定,还需要进一步的研究。

4.1.1 水蛭素 目前,人们对水蛭素的研究最为透彻。一百多年前,人们就发现了在水蛭提取物中有抗凝血的成分,上世纪 50 年代,Markwardt 成功分离出这种物质,定名为水蛭素。顾银良等^[21]对它的组成进行了分析,发现它是含有 66 个氨基酸的单链多肽。长期以来,人们一直认为水蛭素是水蛭的有效成分,但是最近的研究表明,水蛭素只存在于新鲜水蛭的唾液中,且胃蛋白酶会破坏它的活性^[22]。所以,在干燥药材中水蛭素含量微乎其微,经过煎煮和人口服后,在水解作用和胃蛋白酶作用下,会损失殆尽。但是长期的临床实践表明,水蛭的常用方法的确为煎煮和口服,而且亦具有很好的抗凝血作用。因此,对于水蛭素是水蛭的有效成分的论调,笔者认为没有科学依据。现在,研究人员已成功合成人造的重组水蛭素,用于科学研究,低浓度的重组水蛭素还用于心脑血管疾病的治疗和预防。

4.1.2 氨基酸 水蛭含有 17 种氨基酸,包括人体

必需的 8 种氨基酸,瞿新艳^[23]通过观察干燥的宽体金线蛭提取物对小鼠凝血、出血时间和家兔离体血浆复钙时间的影响,发现水蛭低极性(石油醚提取)提取物可以延长小鼠凝血、出血时间和家兔的血浆复钙时间。通过对水蛭低极性提取物的测定,发现提取物中游离氨基酸的含量丰富,因此推测游离氨基酸可能是水蛭抗凝血作用的主要有效成分。

4.1.3 其他大分子类成分 近年来,有文献报道表明可从水蛭中分离得到具有较好抗凝活性的多肽类成分。比如,贵艳丽等^[24]利用仿生亲和介质库进行配体筛选和 1 步纯化的方法,从日本医蛭中纯化出了 1 种具有抗凝血活性的新型低丰度蛋白质,命名为 NLP-1 (new leech protein-1)。通过进一步分析,其相对分子质量为 13800,蛋白回收率可达到 69.2%,在血浆中含量为 0.02 mg/ml 时即可产生明显的抗凝血现象。钟山等应用 Sephadex DEAE A-50 阴离子交换树脂色谱、Sephadex G-25 和 Sephadex LH-20 凝胶过滤色谱以及反相高效液相色谱对宽体金线蛭干体进行了分离纯化,得到了一个抗凝血多肽,命名为“蚂蟥多肽 (whitmann)”,其相对分子量为 8608,推测其结构为 63 个氨基酸残基形成的肽链上连接一个分子量为 1898 的糖链^[25-26]。

4.2 小分子成分

近年来,针对水蛭中的大分子成分进行了很详尽的研究,下面讨论一下近些年从水蛭中提取分离的小分子活性成分。

4.2.1 微量元素 实验研究表明,水蛭中含有 Zn、Mn、Fe、Co、Cr、Se、Mo、Ni 等 14 种元素^[27]。闫继东等^[28]经过研究,认为水蛭可能通过调节病人体内微量元素变化引起的紊乱,从而达到治疗疾病的作用。

4.2.2 其他小分子物质 目前,从水蛭中分离得到的小分子成分主要为嘌呤类、糖脂类、不饱和脂肪酸和甾体类化合物等。郑云枫等对宽体金线蛭的小分子成分进行研究,发现 3 种具有抗缺氧活性的嘌呤类杂环新化合物,分别命名为水蛭甲素、水蛭乙素和水蛭丙素。李友宾等^[29]从日本医蛭中也得到 3 个嘌呤类化合物:hirudinoidine A-C。这是首次从日本医蛭中得到噻吩并嘌呤结构的化合物。黄荣清等^[30]运用气质联用技术,分析得出水蛭中有很强的抗凝血活性提取物中的 15 个化合物,主要为不饱和脂肪酸甲酯、甾体等。其中含有:己醛、4-甲基十四烷酸甲酯、12-甲基十四烷酸甲酯、11-十六碳烯酸甲酯、14-甲基十五烷酸甲酯、11-甲基十六烷

文献标引:

刘晓帆,杨瑶璐,吴丽洁,等.中药水蛭生药学与化学成分的研究进展与展望[J].环球中医药,2012,5(8):637-640.

酸甲酯、14-甲基十六烷酸甲酯、十七烷酸甲酯、13-十八碳烯酸甲酯、十八烷酸甲酯、10-十九烯酸甲酯、13-二十二烯酸甲酯、2-乙酰氧基-7,9-十九烯酸甲酯、胆固醇、胆甾-5,7-二烯-3-酮。

5 总结与展望

通过对水蛭生药学和化学成分研究的文献调研,发现《中国药典》关于水蛭品种存在描述不清,分类错误等问题。在药材鉴定方面,传统的鉴定方法仅仅可以在正品范围内大致评价水蛭的质量,文献报道也大多为此,但是无法鉴别正品与伪品。DNA 条形码可以很好的解决这个问题,但目前没有相关报道。含量测定和指纹图谱方面,由于标准品的缺乏和对水蛭有效成分研究的欠缺,现只能用次黄嘌呤和氨基酸来部分的判断水蛭质量,缺乏依据。所以笔者初步认为,今后水蛭的研究重点应放在药理方面,研究出究竟是什么成分在发挥抗凝血作用,只有这样才能科学、有效的评价水蛭的质量。

参 考 文 献

[1] 谭毓治,徐彭,张孝友,等. 去头水蛙醇提物抗血栓作用的研究[J]. 中国中药杂志,1999,24(10):622-623.

[2] 梁文艳. 水蛭临床应用概况[J]. 吉林中医药,2005,25(10):58-59.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:77-78.

[4] 中国科学院中国动物志编辑委员会. 中国动物志[M]. 北京:科学出版社,1996:110-115,136-139,141-143.

[5] 来复根,金永昌. 水蛭的本草学研究[J]. 现代应用药学,1988,5(1):14-16.

[6] 解学超. 掺伪水蛭的经验鉴别[J]. 齐鲁药事,2011,30(10):588.

[7] 张存龙. 正品水蛭与伪劣品的鉴别[N]. 中国中医药报,2001-07-12.

[8] 张贵君. 常用中药的显微鉴定[S]. 化学工业出版社,2005:358.

[9] 江佩芬,卢建秋,王宝华. 水蛭蛋白电泳鉴别研究[J]. 中国医药学报,1994,9(6):54.

[10] 刘兴国,贾靛,田青存,等. 蚂蝗及其混淆品非牛蛭的高效毛细管电泳法鉴别[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):1871-1872.

[11] 陈士林,姚辉,宋经元,等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2007,9(3):7-12.

[12] 陈士林,宋经元,姚辉,等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物,2009,7(5):322-327.

[13] 袁晓环,杨旭东,王春涛,等. 水蛭提取液中的氨基酸的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志,2007,38(8):590-591.

[14] 刘相辉,裴福成,任桂萍,等. 柱前衍生 HPLC 法测定水蛭提取物中氨基酸的含量[J]. 中医药信息,2010,27(4):38-39.

[15] 丁冠华,李峰,康廷国. 水蛭地龙药材商品中总多糖含量测定[J]. 中华中医药学刊,2010,28(5):986-987.

[16] 丁冠华,李峰,康廷国. 水蛭地龙商品药材中总磷脂含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(4):37-38.

[17] 王艳,杨培民,代龙,等. HPLC 测定水蛭仿生酶解有效部位中次黄嘌呤及尿苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):74-76.

[18] 张永太. 水蛭饮片次黄嘌呤含量测定[J]. 中成药,2008,30(8):1176-1177.

[19] 邱学伟,杨培民,代龙,等. 水蛭仿生酶解有效部位 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(12):2346-2347.

[20] 袁晓环,杨旭东,王春涛,等. 复方水蛭注射液 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1825-1827.

[21] 顾银良,罗春贞,李凌,等. 水蛭素衍生物基因的克隆及其在哺乳类细胞中的表达[J]. 上海医科大学学报,1996,23(3):185.

[22] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津:科学技术出版社,1994:926.

[23] Hong SJ, Kang KW. Purification of granilin-like PolyPeptide from the blood-sucking leech, *Hirudo nipponia* [J]. Protein Expr Purif,1999,16(2):34.

[24] 贵艳丽,董德贤,李荣秀. 日本医蛭中一种新抗凝血蛋白质的仿生亲和纯化及鉴定[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(3):145-146.

[25] 钟山,杨得坡,崔征,等. 水蛭抗凝血活性成分的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2781.

[26] Zhong S, Yang DB, Cui ZA. Rapid method for isolation and purification of an anticoagulant from *Whitmania pigra* [J]. Biomed Chromatogr,2007,21(5):439.

[27] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津:科学技术出版社,1994:926.

[28] 闫继东. 中药水蛭抗凝血活性部位的临床前研究[D]. 西安:西北大学硕士学位论文,2001:14.

[29] Li YB, Huang WH, Yu X. Three new pteridines hiruindinones A-C, from *Hirudo nipponica* Whitman [J]. Helvetica Chimica Acta,2008,91(2):305.

[30] 黄荣清,骆传环,彭江南,等. 水蛭中小分子活性成分的 GC-MS 研究[J]. 中草药,2003,34(9):788.

(收稿日期:2012-05-29)

(本文编辑:刘群)