



# 不同产地野生和人工养殖蚂蟥内在质量比较研究

刘飞<sup>1,2</sup>, 史红专<sup>1</sup>, 郭巧生<sup>1\*</sup>, 王恬<sup>2</sup>, 陆树松<sup>3</sup>

- (1. 南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095;
2. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095;
3. 桐乡欣龙特种水蛭养殖中心, 浙江 桐乡 314512)

**[摘要]** 目的:探讨不同产地蚂蟥的内在质量差异性,为新品种筛选提供理论依据。方法:参考《中国药典》(2005年版)一部测定不同产地水蛭药材的水分、醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分、抗凝血酶活性,采用高效液相色谱法测定其黄嘌呤、次黄嘌呤含量。结果:江宁试验基地人工养殖品种在醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分、抗凝血酶活性、黄嘌呤、次黄嘌呤等含量上均相对高于其他种群,浙江桐乡基地大面积养殖品种多项指标高于野生品种。结论:经过人工育苗、养殖的蚂蟥品质优良,建议大面积推广养殖。

**[关键词]** 水蛭;蚂蟥;种群;内在质量

蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman, 其干燥全体为药材水蛭,具有破血,逐瘀,通经之功效<sup>[1]</sup>。其来源复杂,在我国河北、安徽、江苏、江西、湖南、湖北等地均有分布<sup>[2]</sup>。国外学者在水蛭 *Hirudo nipponia* 方面作了大量的研究<sup>[3-7]</sup>,国内学者对蚂蟥 *W. pigra* 的研究则多注重于药理和生理等方面<sup>[8-16]</sup>,对水蛭的内在质量尚缺乏系统的分析和评价。随着水蛭的广泛开发利用,其野生资源逐渐减少且濒临灭绝。黄嘌呤和次黄嘌呤通常用作温和的兴奋剂和支气管扩张剂,特别用于治疗哮喘症状,能对抗组胺及毛果芸香碱引起的支气管收缩<sup>[17]</sup>。本研究通过对不同种群药材水蛭中的水分、醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分、抗凝血酶活性、黄嘌呤、次黄嘌呤等含量的研究,比较不同产地水蛭内在质量之间的差异,为蚂蟥人工养殖和优良品种筛选提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药材

蚂蟥样品于2007年4月分别采自河北衡水、江苏溧阳、江苏射阳3个野生种群和浙江桐乡欣龙特

种水蛭养殖中心、南京农业大学江宁水蛭试验基地两个人工养殖品种,经南京农业大学中药研究所郭巧生教授鉴定为蚂蟥 *W. pigra*。采集的蚂蟥活体样品,放于通风干燥箱中,50℃干燥24h,至全体干燥成药材水蛭,放入打粉机中粉碎,过40目筛,放入试剂瓶中干燥闭光保存。

### 1.2 试剂和仪器

岛津 LC-20A 高效液相色谱系统(岛津 LC-20AT, 7725i 手动进样阀门, N 2000 色谱工作站), 756CRT 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), TGL-16G 离心机(飞鸽), FA1104 分析天平(上海精科天平), FW100 小型高速粉碎机(天津华鑫仪器厂), KQ250B 超声仪(昆山市超声仪器有限公司), DELTA320 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

黄嘌呤(国药集团化学试剂有限公司,批号 WL 20061210, 99%), 次黄嘌呤(amresco, 批号 YY 0110B1007Y, 99%), 磷酸氢二铵。

### 1.3 方法

**1.3.1 水分、醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分的测定** 参照《中国药典》(2005年版)一部测定药材水蛭的水分、醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分测定方法<sup>[1]</sup>。

**1.3.2 抗凝血酶活性测定** 按2005年版《中国药典》方法测定。取本品粉末(过3号筛)约1g,精密称定,精密加入0.9%氯化钠溶液5mL充分搅拌,

**[稿件编号]** 20090928008

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2006BAI06A15-9);浙江省重点科研社会发展项目(2007C23029)

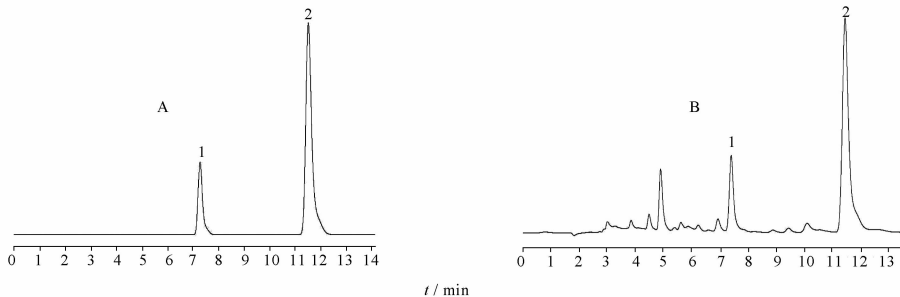
**[通信作者]** \*郭巧生,教授,博导,主要从事中药资源学研究, Tel: (025)84396591, E-mail: gqs@njau.edu.cn

**[作者简介]** 刘飞,博士,从事药用动物遗传多样性及规范化养殖研究, E-mail: flyliu\_cn@163.com

浸提 30 min, 振摇, 离心, 精密量取上清液 100  $\mu\text{L}$ , 置试管(10 mm  $\times$  100 mm)中, 加入含 0.5% (牛) 纤维蛋白原(以凝固物计)的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(取 0.2 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 三羟甲基氨基甲烷 25 mL 与 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 盐酸溶液约 40 mL, 加水至 100 mL, 调节 pH 7.4) 200  $\mu\text{L}$  摇匀, 置水溶液(37  $\pm$  0.5)  $^{\circ}\text{C}$  中缓缓滴加每 1 mL 中含 40 单位的凝血酶溶液(每分钟 5  $\mu\text{L}$ , 边滴加边轻轻摇匀)至凝固, 记录消耗凝血酶溶液的体积, 按下式计算  $U = C_1 V_1 / C_2 V_2 W$ 。U 为每 1 g 含凝血酶活性单位, U  $\cdot$  g<sup>-1</sup>; C<sub>1</sub> 为凝血酶

溶液的质量浓度, U  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; C<sub>2</sub> 为供试品溶液的质量浓度, g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>; V<sub>1</sub> 为消耗凝血酶的体积,  $\mu\text{L}$ ; V<sub>2</sub> 为供试品加入量,  $\mu\text{L}$ ; W 为取样量, g; 中和 1 个单位的凝血酶的量, 为 1 个抗凝血酶活性单位。

**1.3.3 黄嘌呤和次黄嘌呤的测定** VP-ODS 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.4; 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm; 色谱柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 20  $\mu\text{L}$ <sup>[18]</sup>。由图 1 可知, 药材水蛭中黄嘌呤和次黄嘌呤得到了较好的分离。



A. 标准品; B. 样品; 1. 黄嘌呤; 2. 次黄嘌呤。

图 1 黄嘌呤、次黄嘌呤的 HPLC 图

黄嘌呤、次黄嘌呤供试品、对照品溶液的制备参照刘丽芳等测定方法<sup>[19]</sup>。色谱流动相选择 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.4, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

## 2 结果与分析

### 2.1 药材水蛭水分、醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分、抗凝血酶活性比较

由表 1 可知: ①水分含量: 江苏江宁 > 浙江桐乡 > 河北衡水 > 江苏溧阳 > 江苏射阳; 均低于药典(2005 年)一部水分标准 18.0%; ②醇溶性浸出物

含量: 江苏江宁 > 浙江桐乡 > 江苏溧阳 > 河北衡水 > 江苏射阳; 均高于 2005 年《中国药典》标准 15.0%; ③总灰分含量: 浙江桐乡 > 江苏江宁 > 江苏射阳 > 河北衡水 > 江苏溧阳; 均低于药典标准 10.0%; ④酸不溶性灰分含量: 江苏江宁 > 浙江桐乡 > 江苏射阳 > 江苏溧阳 > 河北衡水; 江苏江宁的高于药典标准 2.0%, 其余产地的均低于药典标准 2.0%, 但与达标的浙江桐乡差异不显著; ⑤抗凝血酶活性江宁人工养殖 > 溧阳 > 桐乡 > 射阳 > 河北衡水, 且均高于药典标准(16.0 U)。

表 1 不同产地药材水蛭中水分、灰分、浸出物、抗凝血酶活性比较结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

种群	水分/%	醇溶性浸出物/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%	抗凝血酶活性/U $\cdot$ g <sup>-1</sup>
浙江桐乡	11.13 $\pm$ 0.19 ab	24.23 $\pm$ 0.29 b	5.42 $\pm$ 0.06 a	1.95 $\pm$ 0.02 ab	24.0 $\pm$ 2.2 b
河北衡水	11.00 $\pm$ 0.13 ab	21.78 $\pm$ 0.26 c	4.47 $\pm$ 0.06 c	1.00 $\pm$ 0.01 c	20.0 $\pm$ 0.0 b
江苏射阳	9.80 $\pm$ 0.16 c	19.76 $\pm$ 0.38 d	5.08 $\pm$ 0.06 b	1.85 $\pm$ 0.03 b	21.3 $\pm$ 1.8 b
江苏溧阳	10.69 $\pm$ 0.30 b	23.41 $\pm$ 0.46 b	3.00 $\pm$ 0.01 d	1.23 $\pm$ 0.08 c	37.4 $\pm$ 1.8 a
江苏江宁	11.25 $\pm$ 0.13 a	29.45 $\pm$ 0.32 a	5.16 $\pm$ 0.02 b	2.21 $\pm$ 0.01 a	38.6 $\pm$ 1.8 a

注: 不同小写字母表示邓肯检验 5% 水平差异显著(表 2 同)。

### 2.2 黄嘌呤、次黄嘌呤含量的测定

**2.2.1 黄嘌呤、次黄嘌呤线性范围考察** 标准曲线的制备: 精密称取黄嘌呤、次黄嘌呤混合对照溶液

0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀; 分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 按色谱条件测定其峰面积, 以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标, 峰面积为纵坐



标,计算 2 种成分的回归方程( $n = 3$ )分别为黄嘌呤  $Y = 34\ 659X - 2\ 587.5$ ,  $r = 0.998\ 6$ ; 次黄嘌呤  $Y = 70\ 293X - 10\ 467$ ,  $r = 0.998\ 9$

**2.2.2 精密密度实验** 按上述色谱条件,分别精密吸取黄嘌呤、次黄嘌呤混合对照品溶液,连续进样 5 次,每次进样 20  $\mu\text{L}$ ,测定各对照品的峰面积,计算得黄嘌呤,次黄嘌呤的 RSD 分别为 3.2%, 3.6%。结果表明,精密密度良好。

**2.2.3 黄嘌呤、次黄嘌呤含量的测定** 由表 2 可知,研究结果表明,不同产地药材水蛭黄嘌呤和次黄嘌呤含量差异显著( $P < 0.05$ ),总蛋白含量差异比较明显。黄嘌呤含量从高到低为江苏江宁 > 江苏射阳 > 河北衡水 > 浙江桐乡 > 江苏溧阳;次黄嘌呤含量从高到低为浙江桐乡 > 江苏江宁 > 江苏射阳 > 河北衡水 > 江苏溧阳。

表 2 不同产地药材水蛭中黄嘌呤、次黄嘌呤含量( $n = 6$ )%

种群	黄嘌呤	次黄嘌呤
浙江桐乡	0.381 c	0.753 c
河北衡水	0.333 d	1.543 a
江苏射阳	0.225 e	0.644 d
江苏溧阳	0.461 b	0.790 c
江苏江宁	0.495 a	1.128 b

### 3 讨论

#### 3.1 醇溶性浸出物、总灰分、酸不溶性灰分含量

其灰分结果显示 5 个种群蚂蟥的总灰分含量均符合药典要求;酸不溶性灰分江苏江宁人工养殖的比药典标准偏高,浙江桐乡人工养殖品种接近限量标准,其他都符合药典标准( $< 2.0\%$ )。江宁人工养殖的蚂蟥酸不溶性灰分含量略高于药典标准,但与浙江桐乡的差异不显著,说明人工养殖的品种含有的硅酸盐类化合物偏多,这可能与人工养殖蚂蟥生长的环境有关,人工养殖的蚂蟥活动范围及活动量相对野生环境中的小,饲料投喂量多,因此可能导致蚂蟥体内无机物含量偏高,根据郭巧生<sup>[10]</sup>、史红专<sup>[15]</sup>的研究结果表明,水蛭体内含有丰富的重金属元素和无机元素,但重金属元素与其内在成分之间的关系还有待今后进一步研究。

#### 3.2 抗凝血酶活性分析

抗凝血酶活性是《中国药典》2005 年版新增加的含量测定指标,可以很直接的反应蚂蟥内在质量,结果显示 5 个种群均高于药典标准,蚂蟥道地产区江苏、浙江明显高于非道地药材主产区河北衡水,且

江宁人工养殖最高,其结果与史红专<sup>[15]</sup>等对野生和人工养殖蚂蟥不同炮制品内在质量的比较研究结果一致,人工养殖其抗凝血酶活性显著高于野生养殖品种。因此可以认为人工集约化养殖有利于提高药材质量,可进一步推广养殖,而其他几个种群也明显高于药典标准,说明该地区适合蚂蟥生长,可为下一步的人工选育提供丰富的物质材料。根据史红专<sup>[15]</sup>等研究结果表明生晒品高于酒制,高于滑石粉烫,分析其原因可能为酒精、滑石粉烫引起蚂蟥蛋白质变性,特别是滑石粉烫高温引起蛋白变性较为严重,而蚂蟥其抗凝血酶活性的成分主要是一些复合抗凝蛋白,部分蛋白质的变形必然引起抗凝血酶活性的降低,因此在生产中建议尽量采用吊干、阴干、冻干的低温干燥方法,尽可能减小高温引起蛋白变性而导致品质下降。

#### [参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2005;57.

[2] 肖培根.新编中药志.第4卷[M].北京:化学工业出版社, 2006;40.

[3] Nikonov G I, Titova E A, Seleznev K G. Biological activity of pharmacological properties of the anticoagulant complex (hirudin, plasma kallikrein inhibitor, prostaglandin) from the leech *Hirudo medicinalis*[J]. Biull Eksp Biol Med, 1999,128(12): 673.

[4] Nikonov G I, Titova E A, Seleznev K G. A stable prostacyclin like substance produced by the medicinal leech *Hirudo medicinalis*[J]. Prostag Other Lipid Mediat, 1999,58(1):1.

[5] Nagahama T, Ukena K, Oumi T, et al. Localization of leech excitatory peptide, a member of the GGNG peptides, in the central nervous system of a leech (*Whitmania pigra*) by immunohistochemistry and in situ hybridization[J]. Cell Tissue Res, 1999, 297(1):155.

[6] Nikonov G I, E B Romanenko, B F Vaniushin, et al. The effect of preparations of *Hirudo medicinalis* leeches on DNA methylation in the rat liver[J]. Nauchnye Doki Vyssh Shkoly Biol Nauki, 1990(4):21.

[7] Kim D R, Kang K W. Amino acid sequence of piguamerin, an antistatin type protease inhibitor from the blood sucking leech *Hirudo nipponia*[J]. European J Biochem, 1998, 254(3):692.

[8] 史红专,刘飞,郭巧生.宽体金钱蛭耗氧率与窒息点的初步研究[J].中国中药杂志,2005,30(23):1817.

[9] 史红专,刘飞,郭巧生.温度对蚂蟥生长及摄食规律影响的初步研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1944.

[10] 郭巧生,刘飞,史红专.水蛭及其养殖基地农药与重金属残留分析[J].中国中药杂志,2006,31(21):1763.

[11] 刘飞,史红专,郭巧生,等.蚂蟥内脏器官和皮肤的组织结构观察[J].中国中药杂志,2006,31(22):1849.



- [12] 刘丽芳,曾群,金蓉莺,等. 中药水蛭各部位提取物对高分子葡聚糖所致大鼠血瘀模型的影响[J],中成药,2003,25(7):589.
- [13] 谭毓治,徐彭,张孝友,等. 去头水蛭醇提物抗血栓作用的研究[J],中国中药杂志,1999,24(10):622.
- [14] 史红专,刘飞,郭巧生. 温度和体重对蚂蟥人工繁殖影响的研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(24):2030.
- [15] 史红专,郭巧生,刘飞,等. 野生和人工养殖蚂蟥不同炮制品内在质量的比较研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(24):2657.
- [16] 万竹青,郭巧生,刘飞,等. 采收期内水蛭活性成分动态变化的研究[J],中成药,2007,29(12):1836.
- [17] 王筠默,王恒芬. 神农本草经校证[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1988:410.

## Comparison study on quality of different population of wild and breeding *Whitmania pigra*

LIU Fei<sup>1,2</sup>, SHI Hongzhan<sup>1</sup>, GUO Qiaosheng<sup>1\*</sup>, WANG Tian<sup>2</sup>, LU Shusong<sup>3</sup>

(1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technolgy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. Tongxiang Xinlong Special Leech Breeding Center, Tongxiang 314512, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the quality of *Whitmania pigra* from the different populations to provide the basis for new species selection. **Method:** The contents of the moisture, alcohol extractive, total ash, acid-insoluble ash, and the activity of antiplatelet aggregation enzyme of wild and the breeding *W. pigra* were determined by the methods were determined in Chinese Pharmacopoeia (2005 edition). The contents xanthine and hypoxanthine by HPLC. **Result:** It showed that the contents of the alcohol extractive, total ash, acid-insoluble ash, antiplatelet aggregation enzyme, and xanthine and hypoxanthine content of the breeding population in Nanjing are lations. Many quality indexes of the breeding in Zhejiang Tongxiang base were better than the wild. **Conclusion:** The breeding *W. pigra* are good in quality, It suggested large-scale promotion of aquaculture.

[Key words] *Whitmania pigra*; leech; hirudo; populations; quality; breeding

doi: 10.4268/cjcm20101013

[责任编辑 王亚君]