引用：谢谊，沈冰冰，李湘，等．动物药水蛭超微饮片的质量标准研究［J］．湖南中医杂志，2026，42（8）：103-109.

动物药水蛭超微饮片的质量标准研究

谢 谊，沈冰冰，李 湘，张水寒，葛金文
（湖南省中医药研究院，湖南 长沙，410013）

［**摘要**］ 目的：建立水蛭超微饮片的质量标准。方法：以水蛭对照药材为对照，建立薄层色谱方法；以次黄嘌呤和水蛭胺 C 为指标，建立高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）的含量测定方法。结果：水蛭超微饮片在薄层色谱中，与对照药材相应位置上显相同颜色的主斑点，且分离度较好；建立的次黄嘌呤和水蛭胺 C 的 HPLC 含量测定方法通过方法学验证；次黄嘌呤在 1.00 ~ 100.04 μg/mL 范围内，水蛭胺 C 在 1.28 ~ 79.89 μg/mL 范围内，线性关系良好，平均回收率分别为 104.04%、102.12%，相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）分别为 0.84%、2.66%。不同柱温、不同流速、不同色谱柱条件下，检测的含量 *RSD* 均小于 3%，方法耐用性良好；15 批次水蛭超微饮片中，次黄嘌呤的含量为 0.33 ~ 2.01 mg/g，水蛭胺 C 的含量为 0.048 ~ 0.200 mg/g。结论：通过薄层色谱和 HPLC 法建立的方法操作简单，专属性强、准确度高，可作为水蛭超微饮片的质量控制。

［**关键词**］ 水蛭；超微饮片；次黄嘌呤；水蛭胺 C；质量标准
［**中图分类号**］R284.1 ［**文献标识码**］A DOI：10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2026.08.018

Quality standard for ultrafine decoction pieces of the animal medicine leech

XIE Yi, SHEN Bingbing, LI Xiang, ZHANG Shuihan, GE Jinwen
（Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China）

［**Abstract**］Objective: To establish the quality standard for leech ultrafine decoction pieces. Methods: A thin-layer chromatography（TLC）method was established using the reference medicinal material of leech as a reference, and a high-performance liquid chromatography（HPLC）method was established to determine the content of hypoxanthine and hirudonucleodisulfide C. Results: On TLC, the leech ultrafine decoction pieces showed main spots of the same color at the corresponding positions to the reference medicinal material, with good separation. Methodological validation was performed for the HPLC method established for determining the content of hypoxanthine and hirudonucleodisulfide C; hypoxanthine showed a good linear relationship within the range of 1.00-100.04 μg/mL, and hirudonucleodisulfide C showed a good linear relationship within the range of 1.28-79.89 μg/mL, with an average recovery of 104.04% and 102.12%, respectively, and a relative standard deviation（RSD）of 0.84% and 2.66%, respectively. The RSDs of the contents measured were <3% under different column temperatures, flow rates, and chromatographic columns, suggesting good method ruggedness; in the 15 batches of leech ultrafine decoction pieces, the content of hypoxanthine ranged from 0.33 to 2.01 mg/g, and

基金项目：湖南省药品监督管理局《湖南省中药材标准》制修订项目（湘财采计〔2024〕000653）
第一作者：谢谊，女，副研究员，研究方向：制剂分析与新药研发
通信作者：葛金文，男，二级教授，博士研究生导师，研究方向：中西医结合防治脑血管病，E-mail：40831556@qq.com

that of hirudonucleodisulfide C ranged from 0.048 to 0.200 mg/g. Conclusion: The methods established using TLC and HPLC are simple, specific, and accurate and can be used for the quality control of leech ultrafine decoction pieces.

[**Keywords**] leech; ultrafine decoction pieces; hypoxanthine; hirudonucleodisulfide C; quality standard

水蛭来源于黄蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、医蛭科动物水蛭 *Hirudo nipponia* Whitman 或黄蛭科动物柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体，作为临床常用的动物药，其用药历史悠久，最早记载于《神农本草经》，具有破血通经，逐瘀消癥的功效，主治血瘀经闭，癥瘕痞块，中风偏瘫，跌仆损伤[1-2]。现代药理研究表明，水蛭具有抗凝血、抑制血栓形成、抗肿瘤、抗痛风、抗炎等作用[3-6]，其化学成分主要包括多肽、蛋白质等大分子化合物，以及氨基酸、蝶啶、甾体等小分子化合物[7-10]。

《中华人民共和国药典·一部(2025年版)》中，水蛭质量标准仅收载抗凝血酶活性含量测定，尚未建立单一化学成分的含量测定指标。因此，筛选适宜的指标成分并建立定量分析方法，对提升水蛭质量控制水平具有重要意义。现有水蛭含量测定的文献报道多集中在氨基酸、核苷类(次黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷等)及蝶啶类(水蛭胺A ~ C等)。刘武占等[11]采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法，同时建立了尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、水蛭胺A、水蛭胺B、水蛭胺C共7种成分的含量测定方法；周绪云[12]建立一测多评法，实现了尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤和尿苷的同步含量测定；姜俊等[13]通过LC-MS/MS技术，构建了水蛭配方颗粒中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺苷、腺嘌呤、肌苷、尿苷的多成分分析方法。本研究以水蛭超微饮片为研究对象，以水蛭对照药材为参照建立薄层鉴别方法，并以次黄嘌呤和水蛭胺C为指标成分建立HPLC含量测定方法，为水蛭质量标准的完善与提升提供科学依据。

1 材 料

1.1 试剂与药材 水蛭对照药材(批号：121061-202107，中国食品药品检定研究院)、次黄嘌呤(中国食品药品检定研究院，纯度99.4%，批号：140661-202005)、水蛭胺C(成都麦德生科技有限公司，纯度：99.86%，批号：RP230814)、甲醇为色谱纯(美国天地有限公司，批号：22065114)，其余试剂为分析纯，水为纯化水。15批次水蛭样品均来源于湖南春光九汇现代中药有限公司，经湖南省中医药研究院中药资源研究所刘浩副研究员鉴定为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 的干燥全体。(见表1)

表1 15批次水蛭的信息表

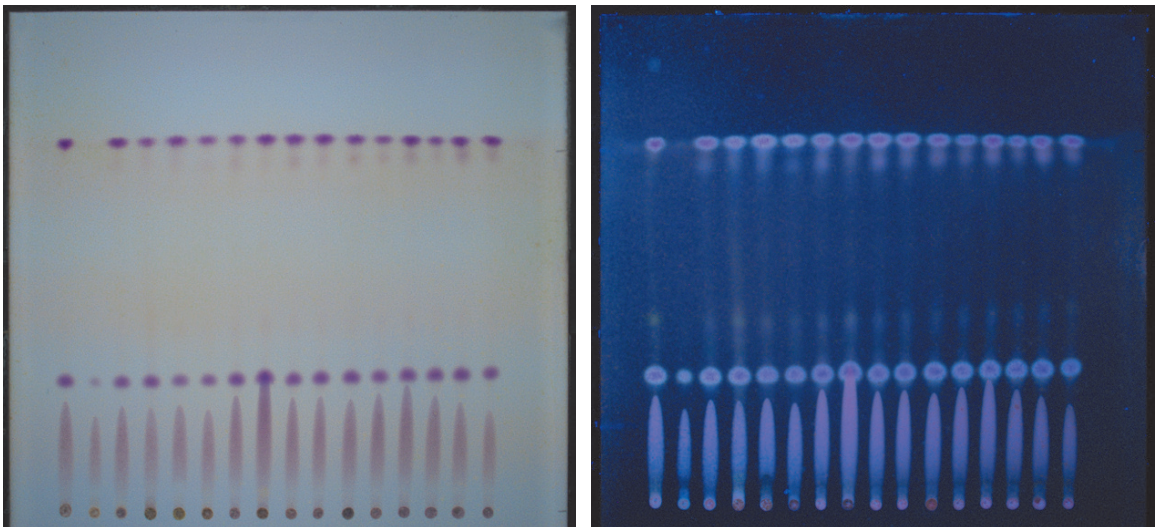
序号	批号	产地
1	20231009SZ001	湖北天门
2	20231009SZ002	湖北天门
3	20231009SZ003	湖北潜江
4	20231009SZ004	山东潍坊
5	20231009SZ005	山东潍坊
6	20231009SZ006	山东临沂
7	20231009SZ007	山东济宁
8	20231009SZ008	江苏苏州
9	20231009SZ009	江苏苏州
10	20231009SZ010	江苏苏州
11	20231009SZ011	江苏苏州
12	20231009SZ012	江苏苏州
13	20231009SZ013	江苏苏州
14	20231009SZ014	江苏苏州
15	20231009SZ015	上海青浦区

1.2 仪器设备 LC-20AT高效液相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司]；Agilent 1200高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)；GoodLook-1000型薄层色谱成像系统；AL204型万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)；XPE105型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)；KM-500DB型超声波清洗器(昆山美美超声仪器有限公司)；101-2AB电热恒温鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)；DK-98-Ⅱ型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)；硅胶G薄层色谱板(青岛海浪硅胶干燥剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 超微饮片的工艺 取水蛭原药材，于50～60 ℃干燥至水分5%以下，粗碎后，121 ℃湿热灭菌20 min后，低温超微粉碎(-6～-16 ℃)5～7 min，过筛，即得。

2.2 薄层鉴别 取不同批次水蛭超微饮片1 g，加乙醇5 mL，超声处理15 min滤过，取滤液作为供试品溶液。另取水蛭对照药材1 g，同法制成对照药材溶液。按照《中华人民共和国药典》第四部通则0502试验，吸取供试品溶液和对照药材溶液各5 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷-乙酸乙酯(4∶1)为展开剂，展开，取出，晾干，喷10%硫酸乙醇溶液，在105 ℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同的紫红色斑点；紫外光灯(365 nm)下显相同的橙红色荧光斑点。(见图1)



1—对照药材；2～16—样品(批号：20231009SZ001～20231009SZ015)。

图1 水蛭超微饮片的薄层色谱图

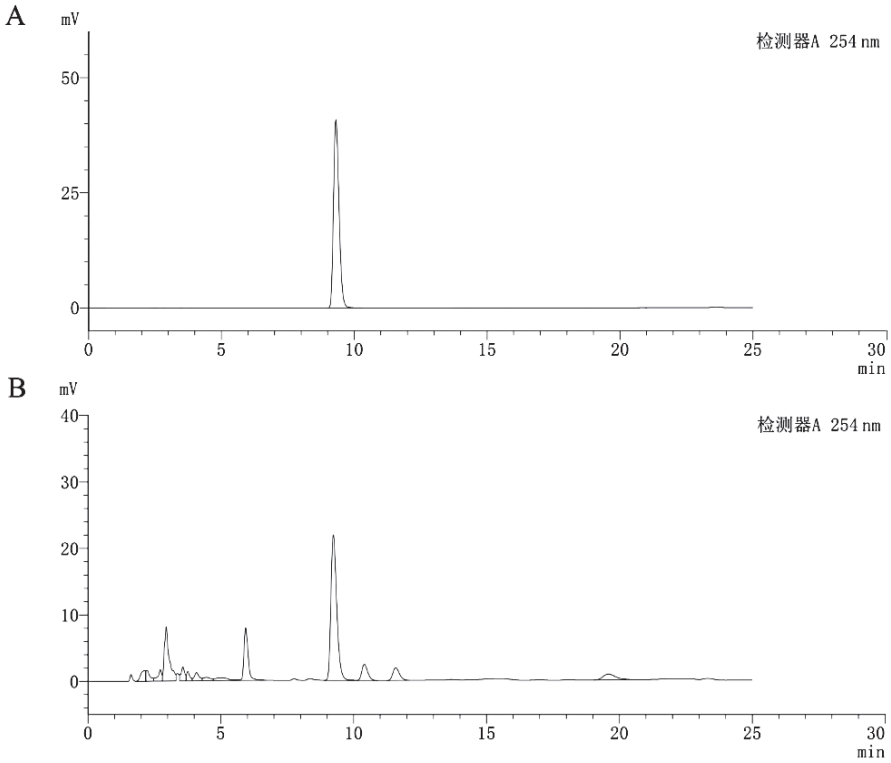
2.3 HPLC含量测定方法

2.3.1 色谱条件 次黄嘌呤：色谱柱为Eclipse plus C_{18}(5 μm，4.6 mm×250 mm)，以甲醇为流动相A，以水为流动相B，梯度洗脱(0～25 min，2% A→5% A)，流速为0.8 mL/min；检测波长为254 nm；柱温为30 ℃；进样量5 μL。水蛭胺C：色谱柱为Ultimate AQ-C_{18}(5 μm，4.6 mm×250 mm)；以甲醇为流动相A，以0.1%甲酸水为流动相B，梯度洗脱(0～10 min，5% A→20% A；10～20 min，20% A→30% A；20～25 min，30% A→40% A；25～35 min，40% A→60% A)；流速为1.0 mL/min；检测波长为245 nm；柱温为30 ℃；进样量5 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备 1)次黄嘌呤供试品溶液：取0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇-水(5∶95)混合溶液50 mL，密塞，称定重量，超声处理30 min，放冷，再称定重量，用甲醇-水(5∶95)混合溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。2)水蛭胺C供试品溶液：取1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入50%甲醇25 mL，密塞，称定重量，超声处理(功率300 W，频率40kHz)40 min，放冷，再称定重量，用50%甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

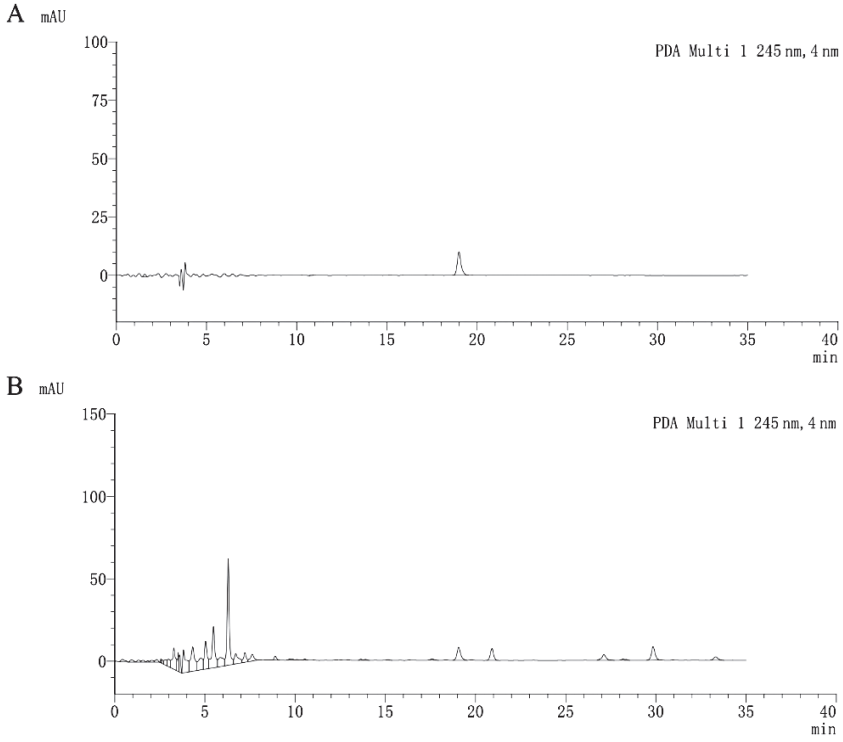
2.3.3 对照品溶液的制备 取次黄嘌呤对照品适量，精密称定，加甲醇-水(5∶95)混合溶液制成每1 mL含20 μg的溶液，即得。取水蛭胺C对照品适量，精密称定，加50%甲醇制成每1 mL含水蛭胺C 6.4 μg的溶液，即得。

2.3.4 测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μL，注入液相色谱仪，按“2.3.1”项下色谱方法测定，结果见图2～图3。



A—次黄嘌呤标准品色谱图；B—水蛭供试品溶液色谱图。

图2 次黄嘌呤标准品及水蛭供试品溶液色谱图



A—水蛭胺C标准品色谱图；B—水蛭供试品溶液色谱图。

图3 水蛭胺C标准品及水蛭供试品溶液色谱图

2.3.5 方法学验证

2.3.5.1 线性与范围 称取次黄嘌呤对照品12.58 mg，加甲醇-水(5∶95)混合溶液置25 mL容量瓶中，为标准品母液，依次稀释5、10、25、50、100、250、500倍，按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分。另称取水蛭胺C对照品8.00 mg，加50%甲醇置100 mL容量瓶中为标准品母液，依次稀释0、2.5、5、12.5、31.25、62.5倍，按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，作标准曲线。次黄嘌呤的线性方程为Y=26.672X+6.358 6(R^2=1)，结果表明，次黄嘌呤在1.00～100.04 μg/mL范围内线性关系良好。水蛭胺C的线性方程为Y=23 610X-7 522.3(R^2=0.999 9)，结果表明，水蛭胺C在1.28～79.89 μg/mL范围内线性关系良好。

2.3.5.2 检出限与定量限 取浓度为20.01 μg/mL的次黄嘌呤标准品溶液，逐步稀释，依次测定，记录色谱图并积分，计算次黄嘌呤的检出限为0.04 ng，定量限为0.32 ng；取浓度为6.39 μg/mL的水蛭胺C标准品溶液，逐步稀释，依次测定，记录色谱图并积分，计算水蛭胺C的检出限为0.64 ng，定量限为3.20 ng。

2.3.5.3 精密度试验 精密称取同一批样品(批号：20231009SZ009)1份，制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次，记录色谱图并积分，结果次黄嘌呤、水蛭胺C的相对标准偏差(relative standard deviation，RSD)分别为0.37%、2.60%，表明仪器精密度良好。

2.3.5.4 稳定性试验 精密称取同一批样品(批号：20231009SZ009)1份，制备供试品溶液，每隔2 h按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分，结果次黄嘌呤的RSD为0.66%，表明供试品溶液在24 h内稳定；水蛭胺C的RSD为2.87%，表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.3.5.5 重复性试验 精密称取同一批样品(批号：20231009SZ009)6份，分别制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分，结果显示，次黄嘌呤、水蛭胺C的RSD分别为1.35%、4.04%，表明本方法重复性良好。

2.3.5.6 加样回收率试验 称取已知含量的水蛭样品9份(批号：20231009SZ009)，每份0.25 g，精密称定，分别加入次黄嘌呤适量，按供试品溶液制备方法处理，按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分，结果见表2。称取已知含量的水蛭样品6份(批号：20231009SZ011)，每份0.5 g，精密称定，分别加入水蛭胺C溶液(0.049 9 mg/mL)1 mL，按供试品溶液制备方法处理，按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分，结果见表3。结果显示，次黄嘌呤、水蛭胺C回收率的RSD分别为0.84%和2.66%，表明本方法加标回收率较好。

表2 水蛭中次黄嘌呤加样回收率数据

样品	称样量/g	样品中次黄嘌呤的量/mg	对照品加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
1	0.250 5	0.292 1	0.429	0.732	102.53	104.04	0.84
2	0.250 1	0.291 6	0.429	0.739	104.34		
3	0.250 0	0.291 5	0.429	0.737	103.88		
4	0.250 0	0.291 5	0.286	0.588	103.57		
5	0.250 0	0.291 5	0.286	0.589	104.13		
6	0.250 2	0.291 7	0.286	0.587	103.19		
7	0.250 1	0.291 6	0.143	0.441	104.41		
8	0.250 0	0.291 5	0.143	0.441	104.55		
9	0.250 1	0.291 6	0.143	0.443	105.78		

表3 水蛭中水蛭胺C加样回收率数据

样品	称样量/g	样品中水蛭胺C的量/mg	对照品加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
1	0.500 2	0.043 7	0.044 9	0.088 4	99.59	102.12	2.66
2	0.500 2	0.043 7	0.044 9	0.088 5	99.67		

续表

样品	称样量/g	样品中水蛭胺C的量/mg	对照品加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
3	0.500 2	0.043 7	0.044 9	0.088 5	99.77		
4	0.500 1	0.043 7	0.044 9	0.089 7	102.49		
5	0.500 0	0.043 7	0.044 9	0.091 6	106.66		
6	0.500 3	0.043 7	0.044 9	0.090 7	104.52		

2.3.5.7 耐用性试验 精密称取同一批样品(批号：20231009SZ009)1份，分别制备供试品溶液，在不同的色谱条件下，按照“2.3.1”项下色谱条件进样，记录色谱图并积分，结果见表4～表5。在不同的色谱条件下，次黄嘌呤和水蛭胺C含量的*RSD*值均小于3%，表明本方法耐用性良好。

表4 水蛭中次黄嘌呤含量测定的耐用性数据

条件		含量/(mg·g^{-1})	平均含量/(mg·g^{-1})	*RSD*/%
柱温	25 ℃	1.200	1.181	1.14
	30 ℃	1.172		
	35 ℃	1.170		
流速	0.6 /(mL·min^{-1})	1.156	1.172	1.06
	0.8 /(mL·min^{-1})	1.172		
	1.0 /(mL·min^{-1})	1.186		
色谱柱	Eclipse plus C_{18}	1.185	1.195	1.51
	Ultimate AQ-C_{18}	1.221		
	InertSustain AQ C_{18}	1.181		

表5 水蛭中水蛭胺C含量测定的耐用性数据

条件		含量/(mg·g^{-1})	平均含量/(mg·g^{-1})	*RSD*/%
柱温	25 ℃	0.105 1	0.106 5	2.76
	30 ℃	0.103 8		
	35 ℃	0.110 6		
流速	0.9 /(mL·min^{-1})	0.105 9	0.105 8	1.58
	1.0 /(mL·min^{-1})	0.103 8		
	1.1 /(mL·min^{-1})	0.107 9		
色谱柱	Ultimate AQ-C_{18}	0.103 8	0.106 0	2.07
	Agilent Zorbax SB-aq	0.108 2		

2.3.5.8 样品测定 取15批水蛭样品，制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件连续进样，记录色谱图并积分，结果见表6，15批水蛭次黄嘌呤平均含量为1.05 mg/g，水蛭胺C平均含量为0.107 mg/g。

表6 15批水蛭中次黄嘌呤和水蛭胺C含量数据

序号	批号	次黄嘌呤含量/(mg·g^{-1})	水蛭胺C含量/(mg·g^{-1})	序号	批号	次黄嘌呤含量/(mg·g^{-1})	水蛭胺C含量/(mg·g^{-1})
1	20231009SZ001	2.01	0.106	9	20231009SZ009	1.34	0.118
2	20231009SZ002	0.89	0.173	10	20231009SZ010	1.21	0.099
3	20231009SZ003	0.52	0.200	11	20231009SZ011	1.27	0.106
4	20231009SZ004	0.49	0.097	12	20231009SZ012	1.27	0.078
5	20231009SZ005	0.33	0.048	13	20231009SZ013	1.32	0.103
6	20231009SZ006	1.18	0.082	14	20231009SZ014	1.09	0.127
7	20231009SZ007	0.51	0.062	15	20231009SZ015	0.93	0.127
8	20231009SZ008	1.38	0.075	均值		1.05	0.107

3 讨 论

水蛭在临床应用中，入汤剂腥味较重、口感较差，易引发恶心反胃。且活性多肽类成分热稳定性差，而水蛭大多用于汤剂，且炮制品多为烫水蛭[14-16]。因此，采用超微粉碎技术将水蛭粉碎至微米甚至纳米级粉体，可促进有效成分更充分溶出，显著提升生物利用度和改善服用体验。研究显示，水蛭超微粉的药效亦明显优于其他传统剂型[17]。次黄嘌呤性质稳定，且在水蛭中含量较高；水蛭胺C为从水蛭分离得到的蝶啶类杂环新化合物，具有抗血栓的作用[18]。本研究建立了次黄嘌呤和水蛭胺C的HPLC含量测定方法，完善了水蛭的质量标准。

本研究对供试品制备方法进行了考察，比较了不同提取溶剂（纯水、甲醇、乙醇、95%水、50%水和5%水），结果表明以95%水为溶剂时次黄嘌呤峰面积最大，以50%水为溶剂时水蛭胺C的峰面积最大，因此分别选用95%水和50%水作为提取溶剂；进一步考察了回流提取和超声提取两种方式，发现峰面积差别不大，但超声提取操作简便，故选用超声提取法。采用DAD检测器测定次黄嘌呤和水蛭胺C的最大吸收波长分别为254 nm和245 nm。在日光和紫外光（365 nm）下观察薄层色谱，15批次水蛭超微饮片的主斑点均清晰可见，分离度较好。HPLC含量测定结果显示，次黄嘌呤、水蛭胺C的平均含量分别为1.05 mg/g和0.107 mg/g。本文以水蛭对照药材为参照建立薄层色谱方法，并以次黄嘌呤和水蛭胺C为指标成分建立HPLC含量测定方法，实验方法简单、准确度高，可为水蛭超微饮片质量标准的完善与提升提供科学依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M].2025年版.北京：中国医药科技出版社，2025.

[2] 焦春红，谭丽平，陈彦琳，等.水蛭的本草考证及其鉴别要点研究[J].中国现代中药，2023，25(5)：1100-1104.

[3] 钟宛凌，马韫楠，叶津宏，等. 3种水蛭单方制剂的蛋白多肽类成分及体外抗血栓活性比较[J].中国实验方剂学杂志，2025，31(20)：184-194.

[4] Wu S H，Zhou Y Y，Wang Y，et al. Therapeutic potentials of medicinal leech in Chinese medicine[J]. Am J Chin Med，2024，52(4)：1027-1051.

[5] 梁红，赵应学，吴林秀，等. 基于TGF-β1/Smads信号通路探讨水蛭素治疗痛风性关节炎的机制研究[J].中药材，2023，46(7)：1783-1787.

[6] 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.

[7] Liao J M，Gao M，Ding Y L，et al. Characterization of the natural peptidome of four leeches by integrated proteogenomics and pseudotargeted peptidomics[J]. Anal Bioanal Chem，2023，415(14)：2795-2807.

[8] Huang Q Y，Gao Q，Chai X X，et al. A novel thrombin inhibitory peptide discovered from leech using affinity chromatography combined with ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectroscopy[J]. J Chromatogr B，2020，1151：122153.

[9] 林晓洋.天然水蛭素分离纯化研究[D].南宁：广西大学，2007.

[10] 顾念念.中药水蛭的质量标准及抗血栓物质基础的初步研究[D].北京：北京中医药大学，2020.

[11] 刘武占，范建伟，李艳芳，等.HPLC法同时测定水蛭(蚂蟥)中7个成分的含量[J].药物分析杂志，2014，34(8)：1417-1421.

[12] 周绪云.一测多评法测定水蛭中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤和尿苷的含量[J].中国药品标准，2019，20(4)：339-345.

[13] 姜俊，程春雷，杨昊. 基于LC-MS/MS技术的水蛭配方颗粒中7种碱基和核苷成分分析方法的建立[J]. 环境化学，2024，43(1)：359-362.

[14] 顾成娟，何莉莎，王涵.仝小林教授运用水蛭经验[J].环球中医药，2017，10(5)：579-580.

[15] 杨春淼，李媛，张永清，等. 中药水蛭的本草考证[J]. 中国现代应用药学，2024，41(19)：2648-2657.

[16] 丁钊，陈科力，佘瑶瑶，等.药用水蛭种类及水蛭多肽研究现状[J].中国现代中药，2022，24(8)：1588-1594.

[17] 吕文海，邱福军，王作明.炮制与超微粉碎对水蛭药效影响的初步实验研究[J].中国中药杂志，2001，26(4)：241-244.

[18] 李国卫，邱韵静，童培珍，等.不同基原水蛭及其混淆品质量研究[J].天然产物研究与开发，2023，35(6)：997-1006.

（收稿日期：2026-04-17）
［编辑：徐琦］