

不同基原水蛭特征多肽鉴别研究

邱韵静,何嘉莹,胡绮萍,陈向东,罗宇琴,童培珍,孙冬梅,李国卫*

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,佛山 528244

摘要:本研究通过建立一种水蛭特征肽质谱测定方法,对不同基原水蛭进行鉴别,为水蛭的鉴别与质量评价提供依据。将供试品进行提取及胰蛋白酶酶解,选择质荷比(m/z)601(双电荷) \rightarrow 630.35和 m/z 601(双电荷) \rightarrow 743.44, m/z 475(三电荷) \rightarrow 588.76和 m/z 475(三电荷) \rightarrow 662.30作为检测离子对,采用UPLC-MS/MS液质联用仪、Agilent ZORBAX SB C₁₈色谱柱(100 mm \times 2.1 mm,1.8 μ m),以乙腈为流动相A,以0.1%甲酸水溶液为流动相B,梯度洗脱,流速为0.3 mL/min,柱温为30 $^{\circ}$ C,进样量为2 μ L。结果显示蚂蟥能检出水蛭多肽I和水蛭多肽II,柳叶蚂蟥只能检出水蛭多肽II,水蛭只能检出水蛭多肽I,故通过该质谱鉴别方法能区分蚂蟥、柳叶蚂蟥与水蛭三种不同基原。采用SIMCA-P 14.0软件对22批样品进行偏最小二乘法分析,可将不同基原水蛭归为三类。本研究所建立的方法专属性强、灵敏度高、重复性好,可用于区分不同基原的水蛭,提高其质量控制水平,为相关药品临床用药的安全性和有效性提供了参考依据。

关键词:水蛭;特征多肽;基原;偏最小二乘法判别分析

中图分类号:R282

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)5-0847-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.5.014

Study on the identification of characteristic peptides of Hirudo from different origins

QIU Yun-jing, HE Jia-ying, HU Qi-ping, CHEN Xiang-dong, LUO Yu-qin,
TONG Pei-zhen, SUN Dong-mei, LI Guo-wei*

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

Abstract: To establish a mass spectrometry method for the determination of characteristic peptides of Hirudo from different origins, and to provide a basis for the identification and quality evaluation. The Agilent ZORBAX SB C₁₈ column (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) was used and eluted with acetonitrile (A) and 0.1% formic acid solution (B) in gradient mode at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The injection volume was 2 μ L. The samples were extracted and enzymolysis treatment used trypsin. The characteristic molecular peaks of Hirudo m/z 601 (double-charge) \rightarrow 630.35 and m/z 601 (double-charge) \rightarrow 743.44, m/z 475 (triple-charge) \rightarrow 588.76 and m/z 475 (triple-charge) \rightarrow 662.30 were detected by UPLC-MS/MS. The results showed that *Whitmania pigra* Whitman can detect Hirudo polypeptide I and Hirudo polypeptide II, *Whitmania acranulata* Whitman can only detect Hirudo polypeptide II, *Hirudo nipponica* Whitman can only detect Hirudo polypeptide I, so the method can distinguish Hirudo from different origins. The SIMCA-p 14.0 software were used to analyze 22 batches of samples, the partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) divided *Whitmania pigra* Whitman, *Whitmania acranulata* Whitman and *Hirudo nipponica* Whitman into three groups. The method established in this study was specific, precise and reproducible, which can be used to distinguish Hirudo from different origins, improve the quality control standard, and provide a reference for the safety and effectiveness of Hirudo in clinical medicine.

Key words: Hirudo; characteristic polypeptide; origin; partial least squares discriminant analysis

收稿日期:2023-08-02

接受日期:2023-11-28

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2020B1515120033)

* 通信作者 E-mail: guowade_li@163.com

《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版中规定中药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^[1],其味咸、苦,平;有小毒,归肝经。具有破血通经,逐瘀消痼之功,常用于血瘀经闭、癥瘕痞块、中风偏瘫、跌扑损伤等。近年来,心脑血管疾病患者的数量显著增多,因此水蛭药材需求量逐年递增,但市场上的水蛭药材品种较多且复杂、质量不一^[2],除水蛭科动物外,市场上存在混伪品菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* Lesson,现水蛭及菲牛蛭的市场商品均为吊干货,两者性状外表差异较大,非常容易区分,故本研究仅针对不同基原水蛭进行研究。查阅文献发现,目前对水蛭的研究集中于抗凝血机理^[3-5]、氨基酸测定^[6,7]方面,而较少研究对不同基原水蛭及其混淆品之间的质量进行综合研究^[8],不同基原水蛭之间的鉴别研究多以《中国药典》2020年版项下的性状鉴别为依据,有研究通过 DNA 分子鉴定和蛋白质分析技术发现,可通过 PCR 建立水蛭的 DNA 分子鉴定技术,利用 SDS-PAGE 和 2-DE 对不同基原水蛭的蛋白质进行区分^[9],另外有研究基于 HPLC 特征图谱方法^[10]或高通量测序方法也能够对其进行区分^[11],但此类方法存在检测时间长、检测仪器普及率低的问题。本研究采用 LC-MS 方法,检测水蛭多肽 I 和水蛭多肽 II,所建立的方法专属性强、灵敏度高、分析时间短,并可用于区分不同基原的水蛭,提高其质量控制水平,为相关药品临床用药的安全性和有效性提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Infinity II-6470LC/TQ 三重四极杆液质联用仪(安捷伦公司);沃特世三重四极杆液质联用仪(Waters UPLC-Xevo TQ-S Micro 型,沃特世公司);数控超声波清洗器(KQ-500DE 型,昆山市超声仪器有限公司);药品稳定性试验箱(SHH-250SD 型,重庆市永生实验仪器厂);万分之一天平(ME204E 型,瑞士梅特勒-托利多公司);百万分之一天平(XP26 型,瑞士梅特勒-托利多公司);超纯水系统(Milli-Q Direct 型,默克股份有限公司)。

1.2 试剂与试药

水蛭(蚂蟥)对照药材(批号:121061-201806,中国食品药品检定研究院);水蛭多肽 I 对照品(批号:849068,纯度:98.79%,吉尔生化(上海)有限公司)、水蛭多肽 II 对照品(批号:817585,纯度:99.27%,吉尔生化(上海)有限公司);胰蛋白酶(批号:SLCC9020, Sigma 公司);乙腈、碳酸氢铵、甲酸均

为色谱级;水为超纯水(实验室自制)。

本研究 22 批样品中 15 批为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman, 2 批为柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman, 5 批为水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥全体,以上样品均经孙冬梅主任药师鉴定。根据《中国药典》中记载,水蛭于夏、秋二季捕捉,用沸水烫死,晒干或低温干燥,另外据市场调研,水蛭一年可采收两次,第一次在 6 月中、下旬,第二次在 9 至 10 月,故本次研究所采用的 22 批样品均集中在 7 至 9 月于市场购买,详细信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	基原 Origin	来源 Source
MH1	蚂蟥 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	江苏省宿迁市
MH2		江苏省宿迁市
MH3		江苏省宿迁市
MH4		江苏省连云港市
MH5		江苏省连云港市
MH6		江苏省连云港市
MH7		安徽省宿州市
MH8		安徽省宿州市
MH9		安徽省宿州市
MH10		湖北省襄阳市
MH11		湖北省襄阳市
MH12		湖北省襄阳市
MH13		江苏省宿迁市
MH14		江苏省宿迁市
MH15		江苏省如皋市
LYMH1	柳叶蚂蟥 <i>Whitmania acranulata</i> Whitman	江苏省苏州市
LYMH2		江苏省苏州市
SZ1	水蛭 <i>Hirudo nipponica</i> Whitman	安徽省亳州市
SZ2		安徽省亳州市
SZ3		安徽省亳州市
SZ4		安徽省亳州市
SZ5		安徽省亳州市

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 甲酸为流动相 B, 梯度洗脱(0 ~ 2 min, 10% A → 12% A; 2 ~ 5 min, 12% A; 5 ~ 10 min, 12% → 18% A; 10 ~ 11 min, 18% → 90% A; 11 ~ 13 min, 90% A); 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 2 μL。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子化(ESI)正离子模式,毛细管电压:1.5 kV;离子源温度:450 ℃;去溶剂气流速:900 L/Hr;进行多反应监测(MRM)模式扫描,检测离子对和优化的质谱参数见表2。

1.3.3 对照品溶液的制备

取水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 对照品适量,精密称定,加 1% 碳酸氢铵溶液制成每 1 mL 含水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 分别为 2.208、2.316 μg 的混合溶液,即得。

表 2 质谱参数

Table 2 Mass spectrum parameters

名称 Name	母离子 Precursor ion(m/z)	锥孔电压 Cone voltage(V)	子离子 Daughter ion(m/z)	碰撞能量 Collision energy(V)
水蛭多肽 I Hirudo polypeptide I	601(双电荷)	30	630.35	25
		30	743.44	25
水蛭多肽 II Hirudo polypeptide II	475(三电荷)	20	588.76	30
		20	662.30	30

1.3.4 供试品溶液的制备

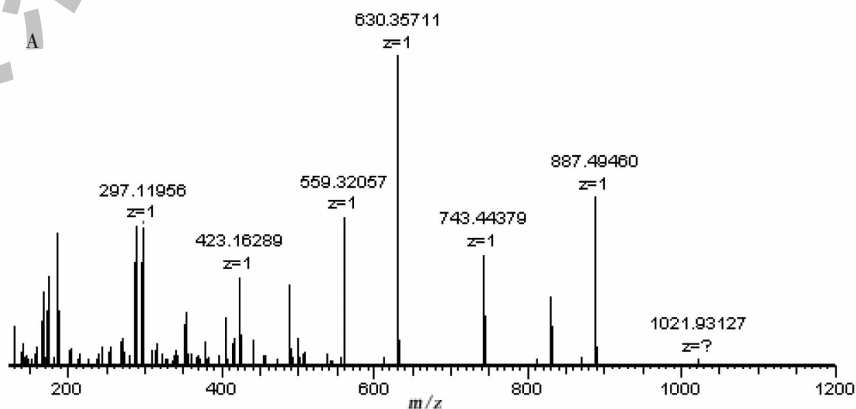
取本品粉末(过三号筛)约 0.2 g,加 1% 碳酸氢铵溶液 25 mL,称定重量,加热回流 90 min,放冷,用 1% 碳酸氢铵溶液补足减失重量,摇匀,离心,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,精密移取续滤液 1 mL,加胰蛋白酶溶液 100 μL(取序列分析用胰蛋白酶,加 1% 碳酸氢铵溶液制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液,临用时配制),摇匀,37 ℃ 恒温酶解 12 h,作为供试品溶液。

2 结果

2.1 水蛭肽段的筛选

通过使用 Thermo Q-Exactive Focus 高分辨液质联用仪采集经胰蛋白酶酶解后水蛭(蚂蟥)对照药材溶液与供试品溶液,进行数据采集,经与数据库进行搜库处理,匹配了两段水蛭多肽。并对鉴定得到的水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 进行人工合成,2 个肽段

的二级质谱图见图 1,在选择二级特征离子碎片时,选择质量数较大的碎片离子,以此来避免所选的特征离子碎片与其他小分子物质在鉴定过程中混淆,从而确保方法的准确性,同时选择质谱中响应较高的碎片离子,从而检测方法的灵敏度。由图 1 可见,水蛭多肽 I 中质量数较大且响应较高的碎片离子有 m/z 为 559.32、630.35、743.44、887.49;水蛭多肽 II 中质量数较大且响应较高的碎片离子有 m/z 为 474.89、588.76、662.30;再通过多批次样品测定、供试品稳定性考察,另外测定其药材对应的水煎液,选择能从药材到水煎液稳定传递的碎片离子作为检测离子对,最终确定选取质荷比(m/z)601(双电荷)→630.35 和 m/z 601(双电荷)→743.44 作为水蛭多肽 I 的检测离子对,质荷比(m/z)475(双电荷)→588.76 和 m/z 475(双电荷)→662.30 作为水蛭多肽 II 的检测离子对。



续图 1(Continued Fig.1)

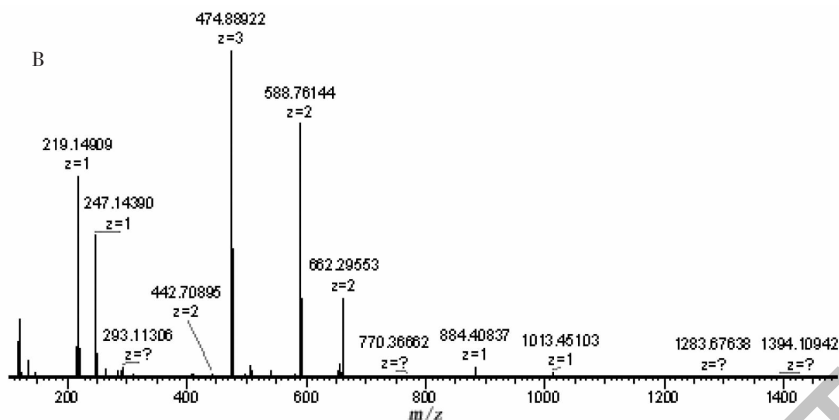


图1 水蛭多肽 I (A) 和水蛭多肽 II (B) 的二级质谱图

Fig. 1 Secondary mass spectrum of hirudo polypeptide I (A) and hirudo polypeptide II (B)

2.2 质谱分析

取“2.3”项下对照品溶液,按“2.4”项下规定制备供试品溶液(MH1),注入液质联用仪,经过质谱

分析,其总离子流图(total ion chromatogram, TIC)见图2,可见在对照品与供试品中,2个肽段的分离度好、峰形对称,保留时间分别为4.45、5.76 min。

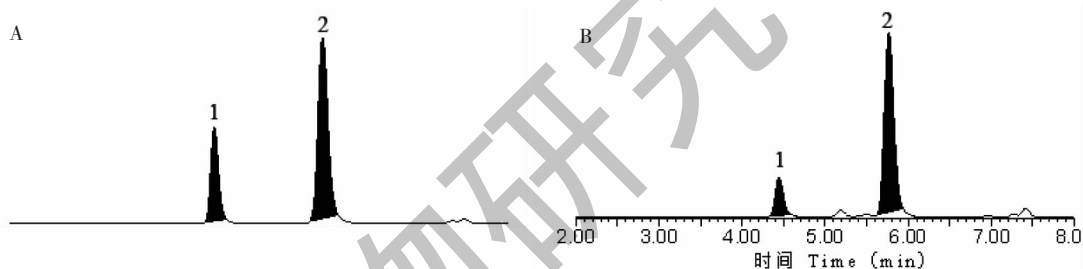


图2 对照品(A)和供试品(B)总离子流图

Fig. 2 TIC of reference substance (A) and sample (B)

注:1. 水蛭多肽 I; 2. 水蛭多肽 II。Note: 1. Hirudo polypeptide I; 2. Hirudo polypeptide II.

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

取供试品溶液(MH1)按“1.3.1”“1.3.2”项下色谱条件及质谱条件进行检测,连续进样6次,计算水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 的保留时间及峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

取供试品溶液(MH1)按“1.3.1”“1.3.2”项下色谱条件及质谱条件进行检测,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定,计算水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 的保留时间及峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验

取供试品粉末(MH1)约 0.2g,平行称定 6 份,按“1.3.4”项下供试品溶液制备方法制备,按“1.3.1”“1.3.2”项下色谱条件及质谱条件进行检测,计算

水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 的保留时间及峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明方法重复性良好。

2.4 样品测定及定性鉴别

分别取表 1 中的样品,按“1.3.4”项下供试品溶液制备方法制备,按“1.3.1”色谱条件和“1.3.2”质谱条件进行测定,峰面积及信噪比(signal to noise ratio, S/N)结果见表 3。结果显示,15 批蚂蟥均能检出水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 色谱峰,2 批柳叶蚂蟥仅能检出水蛭多肽 II,5 批水蛭仅能检出水蛭多肽 I,具体见图 3~图 5。

2.5 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)

以 22 批不同基原样品的特征多肽的 4 个峰面积作为变量,通过 SIMCA 14.1 软件进行判别分析^[12],共得到 3 个主成分,其模型解释率参数 R^2Y 为 0.708, Q^2 为 0.633,均大于 0.5,说明模型的预测能力较好(见图 6),并通过 20 折置换检验,得到 R^2

表3 不同基原水蛭样品测定结果

Table 3 Determination result of *Hirudo* from different origins

批号 No.	t_R (min)	m/z 601→630.35		m/z 601→743.44		t_R (min)	m/z 475→588.76		m/z 475→662.30	
		峰面积 Peak area	信噪比 S/N	峰面积 Peak area	信噪比 S/N		峰面积 Peak area	信噪比 S/N	峰面积 Peak area	信噪比 S/N
MH1	4.43	2 572	53	966	39	5.72	5 100	33	3 966	13
MH2	4.43	3 301	87	1 172	54	5.70	13 744	29	10 230	17
MH3	4.43	4 524	92	1 570	60	5.70	15 862	30	11 921	19
MH4	4.42	5 644	70	2 005	42	5.67	21 297	43	15 631	22
MH5	4.53	1 289	50	501	36	5.58	1 620	58	1 388	23
MH6	4.55	2 538	29	957	21	5.62	6 411	83	5 184	25
MH7	4.41	2 508	86	927	51	5.66	5 959	27	4 708	14
MH8	4.43	3 202	128	1 068	131	5.68	8 323	28	6 565	10
MH9	4.50	3 133	40	1 145	44	5.57	8 123	50	6 272	19
MH10	4.49	3 159	53	1 139	39	5.58	53 539	48	9 805	27
MH11	4.40	3 592	94	1 201	34	5.68	55 370	41	10 266	11
MH12	4.43	3 665	48	1 251	59	5.70	10 328	39	7 849	14
MH13	4.46	1 813	72	652	126	5.76	4 455	162	3 639	7
MH14	4.45	1 616	80	530	517	5.76	3 962	73	3 177	24
MH15	4.46	1 397	121	504	111	5.76	3 771	44	2 938	33
LYMH1	-	-	-	-	-	5.76	16 891	967	7 343	37
LYMH2	-	-	-	-	-	5.76	18 567	1061	7 647	444
SZ1	4.42	349	644	147	264	-	-	-	-	-
SZ2	4.45	618	721	174	365	-	-	-	-	-
SZ3	4.44	395	25	28	5	-	-	-	-	-
SZ4	4.42	770	94	130	12	-	-	-	-	-
SZ5	4.46	343	32	42	10	-	-	-	-	-

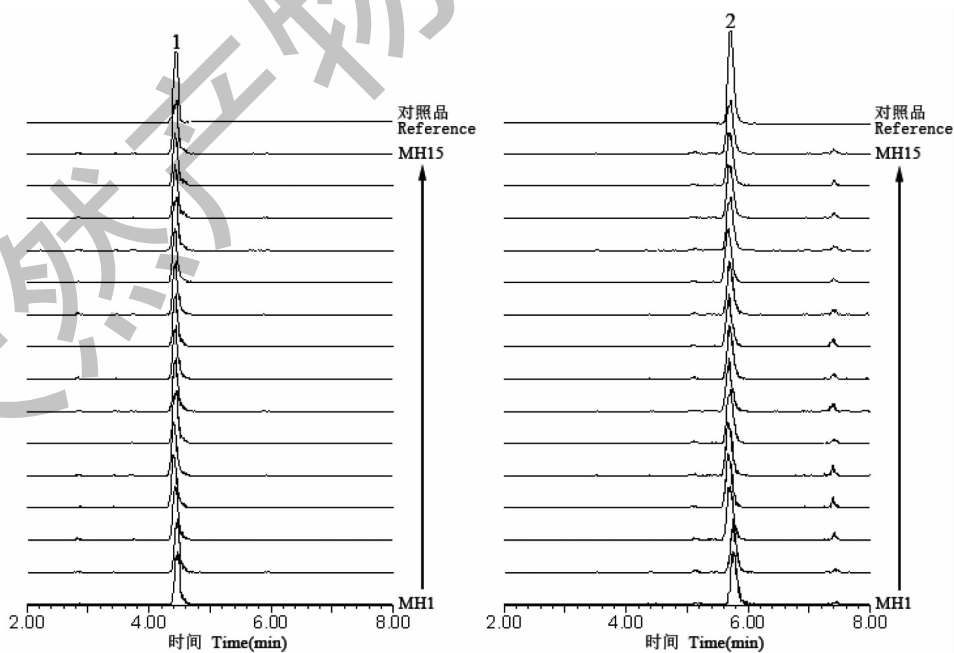


图3 15批蚂蟥总离子流图

Fig. 3 TIC of 15 batches of *Whitmania pigra* Whitman

注:1. 水蛭多肽 I ;2. 水蛭多肽 II。Note:1. Hirudo polypeptide I ;2. Hirudo polypeptide II。

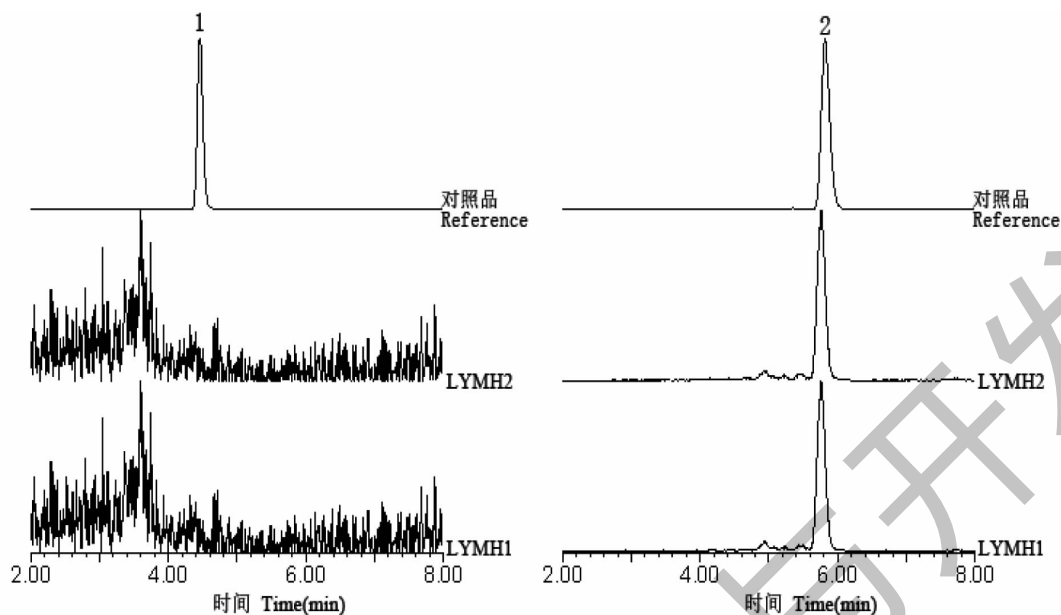


图4 2批柳叶蚂蟥总离子流图

Fig. 4 TIC of two batches of *Whitmania acranulata* Whitman

注:1. 水蛭多肽 I; 2. 水蛭多肽 II。Note: 1. Hirudo polypeptide I; 2. Hirudo polypeptide II.

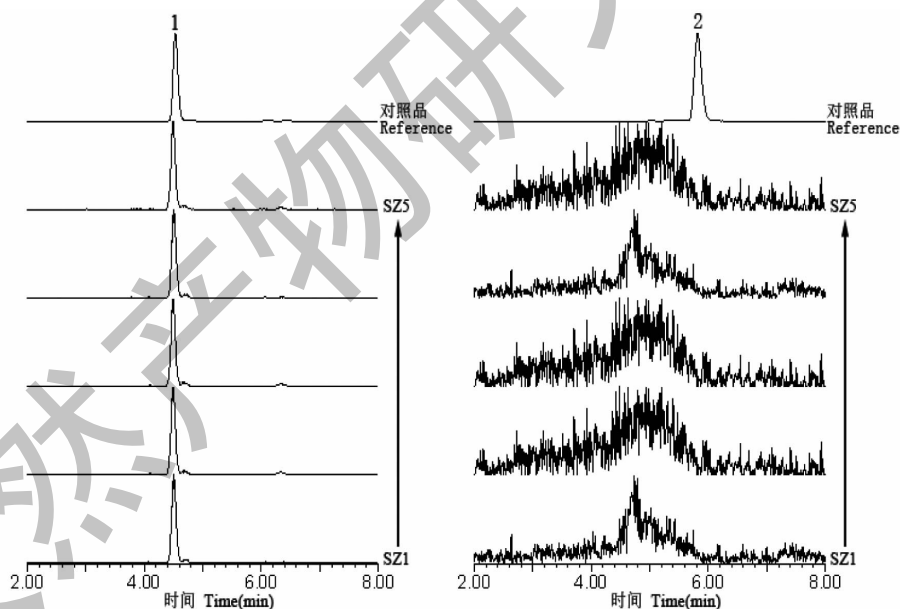


图5 5批水蛭总离子流图

Fig. 5 TIC of five batches of *Hirudo nipponica* Whitman

注:1. 水蛭多肽 I; 2. 水蛭多肽 II。Note: 1. Hirudo polypeptide I; 2. Hirudo polypeptide II.

拟合 Y 坐标的截距为 0.055 1, 小于 0.3, 说明模型拟合较好, Q^2 拟合 Y 坐标的截距为 -0.3, 小于 0.05, 说明模型未过度拟合 (见图 7)。得到 22 批样品的得分图 (见图 8), 可见 22 批样品共聚为 3 类, 其中 MH1 ~ MH15 为一类, LYMH1 ~ LYMH2 为一类, SZ1

~ SZ5 为一类, 实现不同基原水蛭的区分。对主要影响的变量 VIP 值进行分析 (见图 9), 以 VIP 值大于 1 限度, 得到 2 个贡献度高的差异性化合物, 分别为 m/z 475 → 662.30 和 m/z 475 → 588.76, 说明水蛭多肽 II 可作为区分不同基原水蛭的主要差异性化合物。

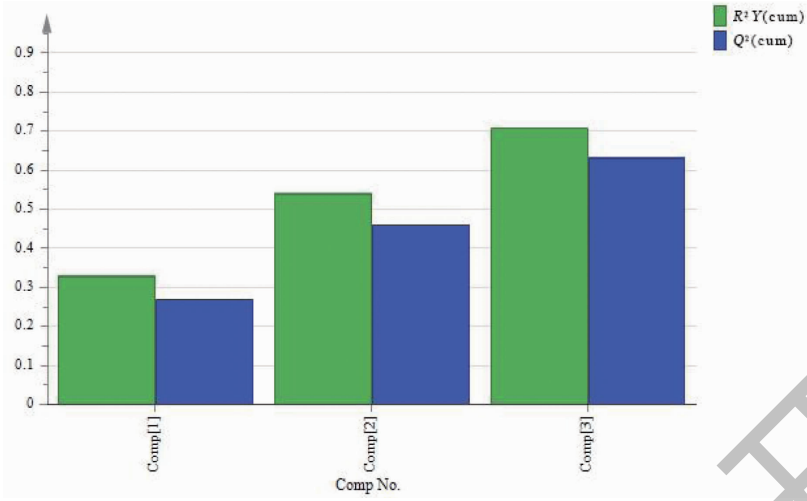


图 6 3 个主成分累计贡献率

Fig. 6 Cumulative contribution rate of three principal components

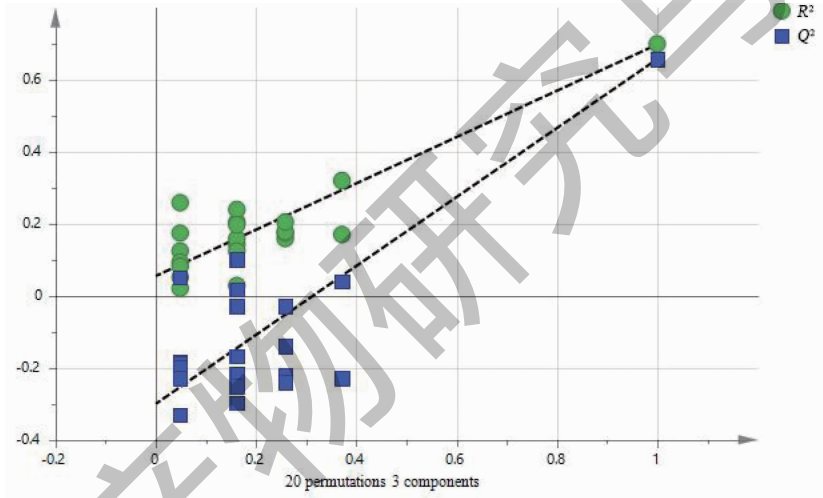


图 7 置换验证图

Fig. 7 Permutation validation

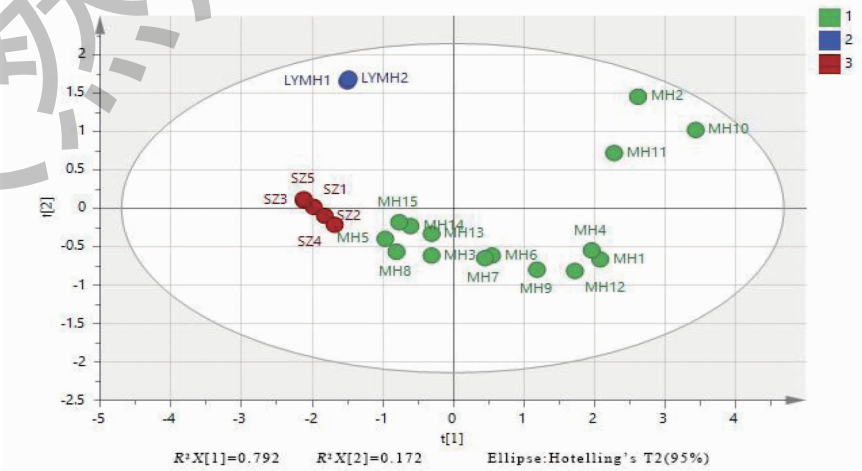


图 8 不同基原 PLS-DA 得分图

Fig. 8 PLS-DA score of different origin samples

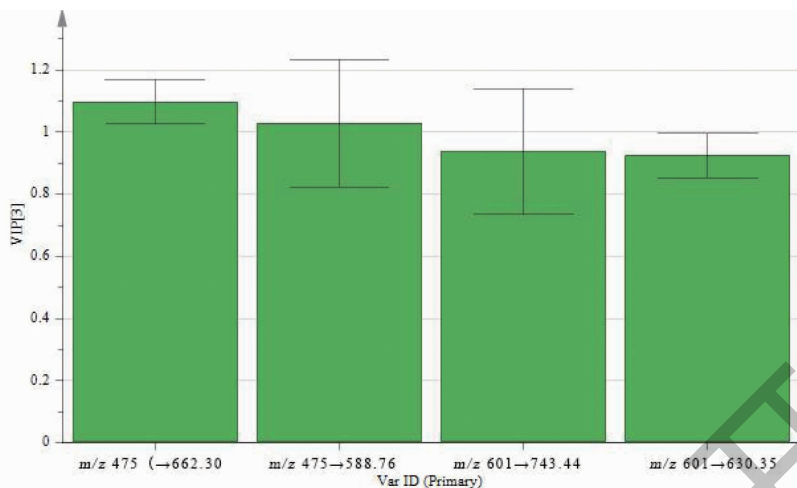


图9 PLS-DA VIP 值图

Fig. 9 VIP value of PLS-DA

3 讨论与结论

动物药材的基原鉴别一直是中药研究的重难点问题,但目前的鉴别方法多以传统鉴别手段为主^[13,14],存在主观性强、鉴别者需要拥有强大的专业知识与鉴别经验等问题,缺乏以现代检测手段为基础的、科学、有效且准确的鉴别方法。水蛭是一种珍贵的中药,具有很强的药用价值和研究价值。在世界范围内,水蛭的药用价值同样得到了认可,欧洲及埃及、印度都有水蛭治疗疾病的应用,《中国药典》2020年版中记载水蛭中包括三个基原,但《中国药典》中目前仅通过水分、总灰分、酸碱度等检查及抗凝血酶活性进行控制,暂未记载不同基原间的差异化表征,缺乏科学性,且无法对药材煎煮过后的水煎液或成方制剂进行鉴别。

本研究对 22 批不同基原的水蛭,其中包含 15 批蚂蟥、2 批柳叶蚂蟥、5 批水蛭进行检测,结果显示 15 批蚂蟥均能检出水蛭多肽 I、水蛭多肽 II 色谱峰,2 批柳叶蚂蟥仅能检出水蛭多肽 II,5 批水蛭仅能检出水蛭多肽 I。从检验结果可以看出,通过测定水蛭多肽 I 和水蛭多肽 II 可对不同基原的水蛭进行区分,通过 PLS-DA 分析,可见不同基原的水蛭可明显分为 3 类,其分析结果与基原鉴别结果一致。另有文献记载^[14-18],水蛭多肽活性主要以抗凝活性为主,另外还涉及蛋白酶抑制、抗炎、水解酶、抑制动脉粥样硬化中巨噬细胞迁移等药理活性,说明除氨基酸类和核苷类成分外,水蛭多肽也是其发挥药理作用的主要成分之一,但上述文献均集中于多肽的药理研究,并未建立多肽的检测方法,本文参考其他

品种的多肽提取与检查方法^[19,20],采用 LC-MS 方法对水蛭多肽进行测定,提供了一种质量控制的科学技术手段,可通过测定水蛭多肽峰面积大小,反映其药理药效的好坏;另外,《中国药典》水蛭含量测定项下规定,“每 1g 含抗凝血酶活性水蛭应不低于 16.0 U;蚂蟥、柳叶蚂蟥应不低于 3.0 U”,可见水蛭与蚂蟥、柳叶蚂蟥在抗凝血酶活性具有较大差异,即不同基原的水蛭具有较大的质量差异,故通过该手段快速、精确地区分不同基原的水蛭药材及其失去基本性状的水煎液、成方制剂等,对提高水蛭及其相关制品的质量具有重大意义。

本研究所建立的方法具有快速、有效、可重复等特点,可提高其质量控制水平,为水蛭相关药品临床应用的安全性和有效性提供了参考依据,有效地解决了水蛭长期以来仅能通过传统鉴别手段来区分不同基原的问题。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 85-86.
- 2 Zhang XT, Zhuang YT, Li Z, et al. Comparative study on enzymatic hydrolysis processes of different radicals based on anticoagulant activity[J]. Contemp Chem Ind(当代化工), 2020, 49: 549-554.
- 3 Wang CL, Cong ZF, Liu GF, et al. Effects of different processed products of *Whitmania pigra* on hemorheology and coagulation indexes in acute blood stasis model rats[J]. Chin

- Pharm(中国药房),2020,31:1984-1988.
- 4 Chen KC. Evaluation of medication regularity and drug dosage in the treatment of post-stroke coagulation dysfunction by traditional Chinese medicine based on data mining[D]. Shenyang:Liaoning University of Traditional Chinese Medicine(辽宁中医药大学),2021.
 - 5 Jiang QQ. Study on quality standard of Hirudo freeze-dried powder and its therapeutic effect on acute blood stasis rats [D]. Chengdu;Southwest Jiaotong University(西南交通大学),2021.
 - 6 Gu NN,Suo YR,Qiao YH,et al. Study on finger print and 16 amino acids's content determination of Hirudo by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography method[J]. Global Tradit Chin Med(环球中医药),2020,13:592-599.
 - 7 Yang XJ,Cao ZY,Huang W,et al. Comparison on the amino acid and hirudin content of different weight *Hirudinaria manillensis*[J]. Feed Ind(饲料工业),2020,41:40-47.
 - 8 Ji SQ,Zhang HT,Wang MX,et al. Research progress on identification and quality evaluation of Hirudo[J]. J Pharm Res(药学研究),2023,42:340-344.
 - 9 Zheng Y. DNA molecular identification and protein analysis of Hirudo[D]. Zhenjiang Jiangsu University(江苏大学),2019.
 - 10 Li GW,Qiu YJ,Tong PZ,et al. Quality analysis of Hirudo from different origins and its adulterants[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:997-1006.
 - 11 Lu FH. Market investigation and DNA molecular identification of Chinese herbal medicine leech[D]. Beijing;Peking Union Med College(北京协和医学院),2022.
 - 12 Li YF,Wang YH,Zhang CJ,et al. Study on the difference of five origins of *Meconopsis* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology and PLS-DA analysis[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:80-94.
 - 13 He CH,Chen XY,Zhang XM,et al. A textual research on *Whitmania pigra* Whitman as the origin of Hirudo[J]. Chin Med Herald(中国医药导报),2021,18:112-115.
 - 14 Tu YT. Study on the source of Hirudo[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2001,12:348.
 - 15 Cheng S. Studies on the polypeptide compositions and anticoagulant mechanism of Hirudo[D]. Wuhan:Hubei University of Chinese Medicine(湖北中医药大学),2018.
 - 16 Ding Z,Chen KL,She YYet al. Research advances of medicinal leeches an leech polypeptides[J]. Modern Chin Med(中国现代中药),2022,24:1588-1594.
 - 17 Wang X,Wu JZ,Song SL,et al. Effects of low molecular weight hirudo peptides on focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats[J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志),2010,31:42-44.
 - 18 Xu LX. Study on pharmacological activity of Hirudo peptide with anti-macrophage migration activity[D]. Jinan;Shandong University(山东大学),2019.
 - 19 Fu WP,Yang YS,Xiao PY. Research progress on isolation and purification methods of animal-derived active proteins and polypeptides[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:916-921.
 - 20 Xiong YR,Fu H,Yang F. Identification and activity study of donken-hide gelatin polypeptide by high resolution mass spectrometry[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1348-1356.
-
- (上接第 899 页)
- 87 Zheng SY,et al. Protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide on *D*-galactose-induced aging rats model[J]. Sci Rep,2020,10:2246.
 - 88 Wang JZ,et al. Hepatoprotective effect of Rhizoma *Polygonatum* on oxidative stress in non-alcoholic fatty liver rats[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2020,36:2650-2653.
 - 89 Lu S,et al. Effect of *Polygonatum* polysaccharides on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells in osteoporosis mice[J]. J Oral Sci Res(口腔医学研究),2022,38:157-163.
 - 90 Qian YH,et al. Effect of compatibility of Huangjing and Dilong on learning and memory and hippocampal nerve apoptosis in natural aging mice[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药),2021,17:25-28.
 - 91 Ma W,et al. Mechanism of *Polygonatum* in the prevention and treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志),2023,32:372-378.