

果表明:提取方法及提取溶媒对样品图谱无明显影响。因此选取简单易行的 50% 甲醇超声的样品处理方法。

4.2 试验中对甘草苷(276 nm)、甘草素(276 nm)、异甘草苷(372 nm)、异甘草素(372 nm)进行了质量分数检查,质量分数分别为 99.40%、99.82%、85.45%、99.76%。

致谢:在甘草药材的采集过程中,得到了内蒙古药品检验所王伟所长、周凯主任和鄂尔多斯市药品检验所高永厚所长、杜子平所长的大力支持。

References:

[1] CA P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
 [2] Ba G N. Production of genuine Mongolian crude drugs and construction of GAP demonstration bases in Inner Mongolia Autonomous Region [J]. *J Inner Mongolia Univ Nat* (内蒙古民族大学学报), 2003, 18(1): 72-76.
 [3] Hang T J, Zhang Z X, Xiang B R. Cluster analysis of essential oils of root of *Herba Artemisiae Scopariae* by CGC fingerprints [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(9): 796-798.
 [4] Zhang Q Y, Qin L P, Yu Y N. The cluster analysis of trace elements *Fructus Cnidii* from different region [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(4): 245-247.

不同时间采集壮药土垠大白蚁菌圃指纹图谱的研究

黄瑞松¹, 梁启成¹, 莫建光², 劳燕文², 孔桂豪¹, 苏青¹

(1. 中国中医研究院广西民族医药研究所, 广西南宁 530001; 2. 广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

壮药土垠大白蚁菌圃系昆虫纲等翅目白蚁科动物土垠大白蚁 *Macrotermes annandalei* (Slivestri) 的菌圃, 亦称白蚁巢、白蚁窝。本品分布于广西巴马、南宁、大新、武鸣、扶绥、百色、龙州等地^[1]。有关白蚁巢的药用,《本草纲目》有蚁蛭土“主治狐刺疮, …死胎在腹, 及胞衣不下……”, 白蚁泥“主治恶疮肿毒……”的记载。广西壮族民间认为本品补肺温肾可治“本虚”, 止咳平喘可祛“标实”, 对虚咳、虚喘是一味标本兼治的药物。现代研究证明, 本品具有镇咳、祛痰、平喘及抗炎的作用^[2], 其含有丰富的氨基酸类成分^[3,4]。因此对土垠大白蚁菌圃的氨基酸成分进行指纹图谱研究, 对于鉴别土垠大白蚁菌圃药材真伪和评价其质量均有重要的意义。笔者在已对不同产地土垠大白蚁菌圃的氨基酸成分进行指纹图谱研究^[5]的基础上, 继续对同一蚁窝不同时间采集的土垠大白蚁菌圃的氨基酸成分进行研究。

1 仪器与材料

日立 L-8800 型全自动氨基酸分析仪; 1 号样品, 采于广西南宁市郊广西亚热带作物研究所科技园, 作为土垠大白蚁菌圃基准药材; 其余 6 批样品均采于广西南宁市郊广西水牛研究所的同一蚁窝, 采集时间 6 号为 2003 年 6 月, 13 号为 2003 年 8 月, 14 号为 2003 年 10 月, 15 号为 2003 年 12 月, 16 号为

2004 年 2 月, 17 号为 2004 年 4 月。全部样品的工蚁经广西大学动物科技学院潘红平副教授鉴定均为土垠大白蚁 *M. annandalei* (Slivestri)。甘氨酸对照品为 Sigma 公司提供, 质量分数 99%。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备: 精密称取土垠大白蚁菌圃粉末(过 60 目筛) 300 mg 置长颈安瓿管中, 精密加入 6 mol/L HCl 溶液 15 mL (内含草酸 0.15 g、巯基乙醇 0.3 mL), 抽真空状态下封管, 置 110 °C 烘箱中水解 24 h, 取出, 冷却, 滤过, 精密量取滤液 2 mL 蒸干, 残留物用水溶解, 再蒸干, 反复进行 2 次, 最后残留物用水溶解定容至 25 mL, 用 0.45 μm 的膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备: 取甘氨酸对照品 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 精密吸取 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 测定条件: 分离柱(40 mm×4.6 mm), 离子交换树脂 2622 # SC 型, 柱温 57 °C; 缓冲液体积流量 0.4 mL/min, 缓冲液泵压力 8~11.5 kPa, 缓冲液改变 5 次; 茚三酮体积流量 0.3 mL/min, 茚三酮泵压力 0.9~1.2 kPa; 氮气压力 20 kPa; 供试品和对照

收稿日期: 2005-08-10

基金项目: 国家科技部资助项目(2002BA901A14)

作者简介: 黄瑞松(1958-), 男, 广西贵港市人, 副主任药师, 主要从事中草药化学分析和中药新药研究开发工作。

Tel: (0771) 3130064 E-mail: hrs. 3130064@163.com

品溶液进样量均为 20 μ L;分析时间 73 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验:精密吸取同一样品(15 号样品)供试品溶液各 20 μ L,分别连续 5 次进样测定。结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.045%~0.148%,相对峰面积的 RSD 为 0.335%~4.565%。表明精密度高,符合色谱指纹图谱的技术要求。

2.3.2 重现性试验:精密吸取同一样品(15 号样品)的 5 份平行供试品溶液各 20 μ L,分别进样测定。结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.075%~0.183%,相对峰面积的 RSD 为 0.433%~3.686%。表明方法重现性好,符合色谱指纹图谱的技术要求。

2.3.3 稳定性试验:精密吸取同一样品(15 号样品)供试品溶液各 20 μ L,分别于 0、2、4、8、24 h 进样测定。结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.080%~0.183%,相对峰面积的 RSD 为 0.155%~4.134%。表明样品供试品溶液在 24 h 内测定的指纹图谱是稳定的,符合色谱指纹图谱的技术要求。

2.4 指纹图谱及各项技术参数

2.4.1 指纹图谱的建立及共有指纹峰的确定:按上述供试品溶液的制备方法制备各批土壤大白蚁菌圃的供试品溶液,并按 2.2 条件进行测定。根据测定结果,制定以甘氨酸为参照物的土壤大白蚁菌圃药材总氨基酸类成分的标准指纹图谱,见图 1。

各批样品指纹图谱色谱峰均在 30 min 内全部出完,其中 18 个峰是各批样品所共有的,因此确定这 18 个峰为共有指纹峰。(在 24.7 min 处另有一个 NH₃ 峰,因其为非蛋白氮物质峰,其峰面积受外部因素的影响变化较大,故不列为共有峰)。

2.4.2 共有指纹峰保留时间及面积比值:根据《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究的技术指南》,以甘氨酸参照物为自身内标,指定甘氨酸参照峰(S)的相对保留时间 α 值和相对峰面积值均为 1,计算 6

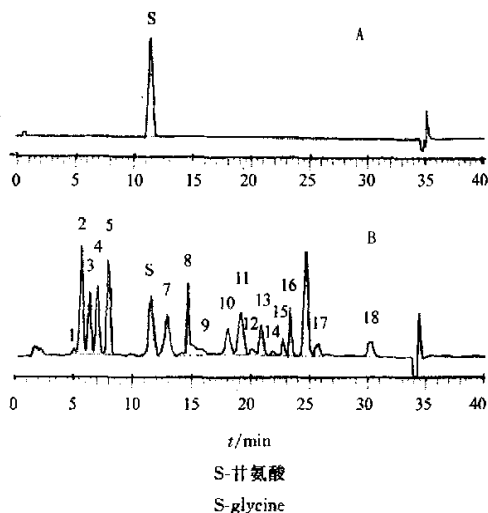


图 1 甘氨酸参照物(A)、土壤大白蚁菌圃(B)指纹图谱
Fig.1 Fingerprint of glycine reference substance (A) and *M. annadalei* fungus gardens (B)

批样品色谱指纹图谱中 18 个共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积,结果见表 1、2。其中 1 号峰和 2 号峰未能达到基线分离,8 号峰后有一肩峰(9 号峰),亦未达到基线分离,故分别以该组峰的总峰面积作为峰面积。且所有样品的 2+1 号组峰,峰面积占总峰面积均 $\geq 10\%$ 且 $< 20\%$,其比值差异均 $< \pm 25\%$;其余各峰面积均 $< 10\%$,故不对它们的峰面积比值差值进行计算。各样品非共有峰面积占总峰面积在 1.20%~2.97% $< 10\%$ 。上述参数均符合色谱指纹图谱的技术要求。

2.4.3 重叠率:以氨基酸总量较高的 1 号样品作为基准,计算各样品与 1 号样品间的重叠率。结果见表 3。

2.4.4 指纹谱中的八强峰:从表 2 每个样品中均选出峰面积最大 8 个峰由大到小排列,其峰号顺序分别为:6 号样品——2+1、5、8+9、6、7、4、11、3;13 号样品——2+1、5、6、8+9、7、11、4、3;14 号样品——2+1、8+9、5、6、11、7、4、3;15 号样品——2+1、8+9、5、6、11、7、4、3;16 号样品——2+1、5、6、8+9、

表 1 6 批样品共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention times of common peaks for six batches of samples

样品	相对保留时间																	
	1	2	3	4	5	S	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
6	0.445	0.493	0.551	0.611	0.688	1.000	1.123	1.269	1.360	1.564	1.660	1.739	1.807	1.894	1.970	2.024	2.235	2.620
13	0.449	0.495	0.558	0.617	0.688	1.000	1.115	1.270	1.345	1.565	1.661	1.743	1.812	1.906	1.980	2.035	2.239	2.614
14	0.447	0.493	0.557	0.617	0.688	1.000	1.115	1.272	1.348	1.566	1.664	1.746	1.816	1.908	1.983	2.038	2.243	2.619
15	0.447	0.493	0.556	0.616	0.687	1.000	1.115	1.272	1.370	1.567	1.664	1.746	1.817	1.911	1.987	2.041	2.245	2.621
16	0.446	0.493	0.556	0.615	0.688	1.000	1.115	1.271	1.349	1.566	1.663	1.747	1.817	1.910	1.987	2.040	2.244	2.620
17	0.448	0.494	0.557	0.616	0.688	1.000	1.116	1.269	1.344	1.563	1.660	1.741	1.812	1.903	1.980	2.034	2.237	2.613
均数	0.447	0.494	0.556	0.615	0.688	1.000	1.117	1.271	1.353	1.565	1.662	1.744	1.814	1.905	1.981	2.035	2.241	2.618
RSD/%	0.316	0.170	0.447	0.366	0.059	0	0.287	0.108	0.756	0.094	0.114	0.184	0.217	0.328	0.318	0.304	0.182	0.131

表2 6批样品共有峰相对峰面积
Table 2 Relative areas of common peaks for six batches of samples

样品	相对峰面积比值																		非共有峰/%
	1	2	3	4	5	S	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
6	1.334	0.748	0.807	1.172	1.000	0.962	1.546	0.485	0.807	0.092	0.437	0.059	0.166	0.549	0.187	0.342	2.97		
13	1.206	0.685	0.759	1.157	1.000	0.880	1.000	0.501	0.862	0.171	0.560	0.102	0.375	0.525	0.176	0.391	2.14		
14	1.230	0.685	0.701	1.000	1.000	0.856	1.193	0.496	0.862	0.176	0.588	0.069	0.199	0.526	0.217	0.341	2.36		
15	1.182	0.947	0.705	1.019	1.000	0.871	1.026	0.497	0.871	0.169	0.589	0.067	0.119	0.470	0.192	0.318	2.85		
16	1.171	0.641	0.686	1.028	1.000	0.857	0.959	0.488	0.869	0.159	0.566	0.070	0.114	0.488	0.179	0.327	1.20		
17	1.196	0.660	0.697	1.098	1.000	0.880	0.924	0.502	0.890	0.171	0.578	0.078	0.139	0.499	0.185	0.373	2.02		

表3 6批样品的重叠率

Table 3 Overlap rate of six batches of samples

样品	重叠率/%	样品	重叠率/%
6	98.0	15	93.6
13	89.8	16	93.6
14	91.7	17	89.8

11、7、4、3；17号样品——2+1、5、6、8+9、11、7、4、3。

3 讨论

3.1 曾对样品供试液的制备方法进行摸索,考察药材的不同破碎度(过20、40、60目筛的粉末)、不同的酸浓度(3、6、9 mol/L HCl溶液)及不同的水解时间(12、24、36 h)对色谱图形及氨基酸得率的影响。结果:上述各种条件制备的供试液色谱图形均相同,但氨基酸得率有差异,其中氨基酸得率与破碎度的关系是60目>40目>20目,HCl浓度是6>9>3 mol/L,水解时间是24、36 h均大于12 h,且水解24 h与水解36 h相差不大。故样品供试液的制备方法采用上述2.1的方法。

3.2 曾采用同一供试品溶液试验比较日立835-50型和L-8800型氨基酸分析仪分离柱的分离效果,前者采用的柱子为150 mm×26 mm,树脂型号2619#,后者柱子为40 mm×4.6 mm,树脂型号2622# SC。结果两者的分离效果均较好,但L-8800型的分离柱分离得到的色谱峰更尖锐平滑,且出峰时间快(全部出峰约30 min),省时。故本试验采用L-8800型的分离柱。另外,还比较了3种不同洗脱程序(缓冲液不同更换时间)对分离效果的影响。结果分别于3.1、7.1、14.9、29.1、33.1 min更换缓冲液得到的色谱图分离效果较好,故本试验在上述时间更换5次缓冲液洗脱。

3.3 前文报道^[4],广西不同产地来源的土壤大白蚁菌圃的氨基酸指纹谱重叠率较高,达到89.4%~100.0%,说明广西不同产地来源的土壤大白蚁菌圃氨基酸组分是极为相似的。本实验表3的结果则表明,不同时间采集的土壤大白蚁菌圃样品与1号基准样品比较,各样品指纹谱的重叠率均较高,为

89.8%~98.0%。这一结果提示:不同时间采集的土壤大白蚁菌圃与基准药材很相似,它们所含的氨基酸组分89%以上与基准药材相同,各样品的氨基酸组分亦极为相似。另一方面,各样品共有峰中的单峰(组峰)面积占总峰面积≥10%且<20%者,其峰面积比值差异均<25%,且其余各共有峰的峰面积比值差异亦较小,说明不同时间采集的土壤大白蚁菌圃药材氨基酸指纹谱中的共有峰的特征是稳定的。

3.4 由表2及2.4.4可知,6批不同时间采集的样品进入八强峰的峰号均相同,峰号分别为:2+1、3、4、5、6、7、8+9、11。从八强峰的排列顺序看,2+1号组峰、8+9号组峰、5号峰、6号峰在所有样品中均以较高的峰面积进入八强峰,其中2+1号组峰峰面积在6批样品中均排列第1位;5号峰有4批样品为第2位,2批样品为第3位;8+9号组峰有2批样品排列第2位,1批为第3位,3批为第4位;6号峰各有3批分别排列第3位和第4位。说明不同时间采集的土壤大白蚁菌圃药材中上述量较高的氨基酸组分是基本一致的。从各样品八强峰的峰面积之和与1号样品的总峰面积的相对比值来看,在59.64%~65.75%,各样品的相对总面积值相差不大,且相对总面积值较高,说明试验所用不同时间采集的土壤大白蚁菌圃药材的品质较为接近且质量较优。提示土壤大白蚁菌圃全年均可采集。

References:

- [1] Lin R Z, Jiang J W, Huang S. The varieties, hosts and distribution of insects of *Isoptera* in Guangxi [J]. *Sci Technol Termites* (白蚁科技), 1994, 11(2): 1-8.
- [2] Li A Y, Huang R S, Xie P S, et al. Pharmacodynamic study on nest macrotermes annadalei [J]. *J Guangxi Coll Tradit Chin Med* (广西中医学院学报), 1999, 2(2): 66-70.
- [3] Wu L Z, Chen Y, Zhang J. Determination on total amino acid and content of iron of *Macrotermes annadalei* and *Fungus Gardens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(1): 27.
- [4] Huang R S, Pang S H, Mo J G, et al. Analysis on amino acid of Zhuang Materia Medica *Macrotermes annadalei* fungus gardens from different growing areas [J]. *J Chin Med Pharm* (中医药学报), 2005, 33(1): 5-7.
- [5] Huang R S, Kong G H, Mo J G, et al. Studies on fingerprints of ant nest of *Macrotermes annadalei* from different areas [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(22): 1738-1742.