

中药蟋蟀的高效液相指纹图谱研究

郭澄¹, 魏道智², 郑汉臣³ (1. 上海交通大学附属第六人民医院药剂科, 上海 200233; 2. 福建农林大学生命科学院, 福州 350002; 3. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 建立中药蟋蟀及其伪品的 HPLC 指纹图谱鉴别方法。方法: 两种蟋蟀(东方蟋蟀 *Gryllotalpa orientalis* Burmeister 和 华北蟋蟀 *G. unipina* Saussure) 及其伪品(蟋蟀 *Teleogryllus emus*) 的水溶液采用高效液相色谱法分析, 流动相 甲醇-水 = 10:90, 检测波长 260 nm。结果: HPLC 图谱显示 2 个蟋蟀品种和混乱品种蟋蟀具有 7 个共有峰, 并且具有各自的指纹特征。结论: 可利用指纹图谱的差异进行中药蟋蟀品种以及混乱品种间的鉴定。

关键词 蟋蟀; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2005)06-0366-04

Studies on HPLC fingerprint spectrum of *Gryllotalpa*

GUO Cheng¹, WEI Dao-zhi², ZHENG Han-chen³ (1. Department of Pharmacy, Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China; 2. School of life science, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, China; 3. School of Pharmacy, Second Military Medical University Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish HPLC fingerprint spectrum of commercial species of *Gryllotalpa* (*Gryllotalpa orientalis* Burmeister, *G. unipina* Saussure) and their false species (*Teleogryllus emus*). **Methods:** Samples extracted with water by heating and reflux were analyzed by HPLC. HPLC mobile phase consisted of methanol-water (10:90) and detect wavelength was set at 260nm. **Results:** Two species of *Gryllotalpa* and false variety had 7 common peaks, and every species had its own characteristic peaks. **Conclusion:** Varieties and confusion variety could be identified with differences in fingerprint by HPLC.

KEY WORDS *Gryllotalpa*; HPLC; Fingerprint spectrum

蟋蟀为昆虫纲 *Insecta*, 直翅目 *Orthoptera*, 蟋蟀科 *Gryllotalpidae* 蟋蟀属 *Gryllotalpa*, 动物。蟋蟀属有 30 余种, 我国产 6 个种, 其中东方蟋蟀 *Gryllotalpa orientalis* Burmeister 和 华北蟋蟀 *G. unipina* Saussure 为药用品种。蟋蟀性寒, 味咸, 入大、小肠, 膀胱经^[1], 主治各种水肿, 大、小便不通, 尿潴留, 泌尿系统结石等杂症^[2,4]。蟋蟀的药用历史悠久, 但并不属于常用中药, 对蟋蟀的化学成分、品种鉴定和质量分析评价的报道甚少, 目前尚无系统的研究资料^[5]。采用高效液相色谱分析法, 研究不同种间以及混乱品种的指纹图谱, 以期今后品种鉴定、质量分析评价和进一步的开发应用提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相系统 (600E 泵, 996 PAD、Millennium 32 色谱分析软件), 电子天平 (Mettler AE240), 微孔滤膜 (0.45 μm, Dikma 公司), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水; 供试药材东方蟋蟀、华北蟋蟀

和混乱品种蟋蟀 (*Teleogryllus emus*, 黄脸油葫芦) 购自安徽亳州药材市场, 由作者鉴定。

2 方法

2.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm); 检测波长 260 nm; 柱温 25 °C; 流动相 甲醇-水 = 10:90; 流速 0.8 mL/min; 进样量 20 μL。

2.2 供试液制备 称取 3 份干燥后的东方蟋蟀药材 2.0 g, 置于圆底烧瓶中, 分别加入蒸馏水、70% 乙醇、95% 乙醇 10 mL 于水浴上加热回流提取 1h, 提取 3 次, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 分别用相应的原提取溶剂定容至 50 mL, 再用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液待测。

不同蟋蟀种及混乱品种水提供试液的制备同上。

2.3 色谱检测时间 各个试样检测 1h, 在本色谱条件下, 20 min 以后均不出峰, 因而记录时间定为 20 min。

2.4 参照峰和共有指纹峰的确证 参照峰的确证: 选定 3 种动物 (华北蟋蟀、东方蟋蟀、混乱品种蟋

蟀)的 HPLC 样品峰中,保留时间分别为 6.583、6.538 和 6.554 min 的峰, *RSD* 为 2.281%。3 个组分紫外光谱显示它们最大紫外吸收波长均为 256 nm, 峰形一致, 初步可以认定在该吸收条件下的物质为 3 种动物中所共有的一类物质。为方便动物间的比较, 将保留时间分别为 6.583、6.538 和 6.554 min 的峰, 定为 3 种动物各自的参照峰, 同时也是它们的共有指纹峰。

共有指纹峰的确证: 将每种动物各个样品峰的保留时间分别与其参照峰的保留时间相比, 得到各个峰的相对保留时间。比较 3 种动物相应的各个峰的相对保留时间, *RSD* < 5% 的峰即为共有指纹峰。

2.5 精密度和稳定性试验 选东方蝾螈的水提供试液, 连续进样 6 次。计算各个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 共有峰 1~7 相对保留时间的 *RSD*(%) 分别为 1.5、0.8、1.1、0.7、1.4、1.0、1.2; 相对峰面积的 *RSD*(%) 分别为 3.2、2.1、

3.4、1.9、2.3、4.1、3.6; 在测试时间内供试液稳定。
2.6 重复性试验 选东方蝾螈药材 5 份, 每份 2.0 g, 制备水提供试液, 各供试液 20 μ L 进行测定。结果, 共有指纹峰 1~7 相对保留时间的 *RSD*(%) 分别为 2.1、1.3、1.0、0.6、1.7、0.8; 相对峰面积的 *RSD*(%) 分别为 3.2、1.9、2.4、3.7、2.5、1.9、2.8。

3 结果

3.1 蝾螈不同溶剂提取液的指纹图谱 实验结果见图 1, 图 2, 图 3。在本检测条件下, 采用 3 种不同提取溶剂所得的 HPLC 指纹图谱, 有较明显的区别, 在紫外吸收范围内, 水提液出峰数较乙醇提取液的多, 故选择水提液作为指纹图谱鉴定的供试液。

3.2 蝾螈和混乱品种蟋蟀的水提取液的 HPLC 指纹图谱 蝾螈及混乱品种蟋蟀样品的 HPLC 图谱见图 4, 图 5, 图 6。

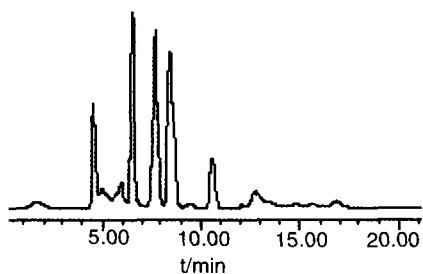


图 1 东方蝾螈药材水提取液的 HPLC 图谱

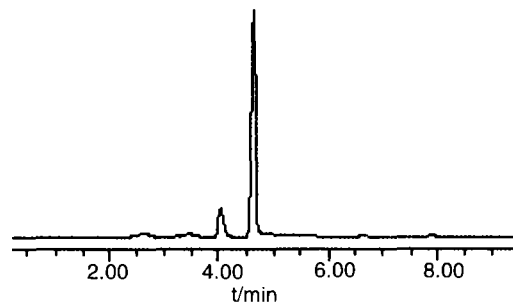


图 2 东方蝾螈药材 70% 乙醇提取液的 HPLC 图谱

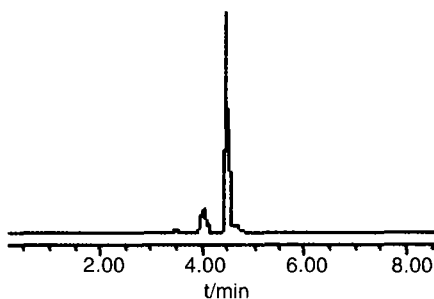


图 3 东方蝾螈药材 95% 乙醇提取液 HPLC 图谱

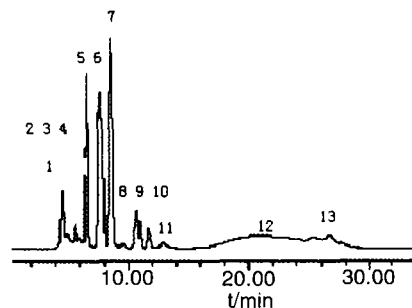


图 4 混乱品种蟋蟀 HPLC 图谱

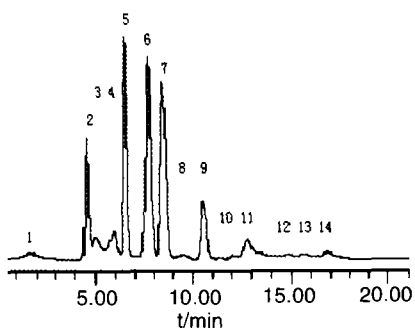


图 5 东方蝾螈药材 HPLC 图谱

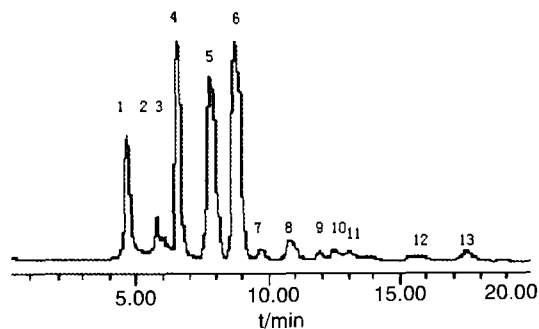


图 6 华北蝾螈药材 HPLC 图谱

以各自参照峰的保留时间和峰面积为1,则蜈蚣及混乱品种蟋蟀样品的 HPLC 峰相对保留时间及相对面积见表1;将3种动物 HPLC 样品峰的相对面积依从大到小的顺序进行排序,选取前6位而构成各自的6强峰。6强峰的保留时间和相对面积见表2。

3种样品的共有指纹峰见表3。

相对保留时间0.709、0.876、1.187、1.812、1.977、2.395 min为华北蜈蚣的特征峰;0.254、0.698、0.762、1.949、2.268、2.388 min为东方蜈蚣的特征峰;0.707、0.764、0.920、1.961、3.166、4.082 min为混乱品种蟋蟀的特征峰。

表1 蜈蚣及其混乱品种蟋蟀样品 HPLC 峰的相对保留时间及相对面积

| 峰号 | 华北蜈蚣 | | 东方蜈蚣 | | 蜈蚣 | |
|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | 相对保留时间(min) | 相对面积 | 相对保留时间(min) | 相对面积 | 相对保留时间(min) | 相对面积 |
| 1 | 0.709 | 13.14 | 0.254 | 1.31 | 0.707 | 7.24 |
| 2 | 0.876 | 2.7 | 0.698 | 9.11 | 0.764 | 1.96 |
| 3 | 0.915 | 1.74 | 0.762 | 4.61 | 0.873 | 2 |
| 4 | 1.0 | 17.88 | 0.913 | 5.28 | 0.920 | 1.18 |
| 5 | 1.187 | 23.98 | 1.0 | 18.28 | 1.0 | 12.73 |
| 6 | 1.331 | 29.31 | 1.175 | 23.79 | 1.181 | 17.58 |
| 7 | 1.481 | 1.19 | 1.290 | 24.94 | 1.309 | 26.24 |
| 8 | 1.636 | 3.69 | 1.448 | 0.96 | 1.465 | 0.58 |
| 9 | 1.812 | 1.1 | 1.614 | 7.14 | 1.637 | 2.39 |
| 10 | 1.898 | 1.21 | 1.847 | 0.28 | 1.961 | 0.67 |
| 11 | 1.977 | 1.11 | 1.949 | 3.05 | 2.674 | 0.26 |
| 12 | 2.395 | 1.09 | 2.268 | 0.17 | 3.166 | 19.89 |
| 13 | 2.656 | 1.85 | 2.388 | 0.35 | 4.082 | 2.55 |
| 14 | | | 2.576 | 0.72 | | |
| 峰数 | 13 | | 14 | | 13 | |
| 总相对面积 | | 99.99 | | 99.99 | | 95.27 |

表2 蜈蚣及其混乱品种蟋蟀样品的 HPLC 6强峰

| 编号 | 华北蜈蚣 | | 东方蜈蚣 | | 蜈蚣 | |
|----|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | 保留时间(min) | 相对面积 | 保留时间(min) | 相对面积 | 保留时间(min) | 相对面积 |
| 1 | 8.763 | 29.312 | 8.432 | 24.940 | 8.581 | 26.246 |
| 2 | 7.812 | 23.984 | 7.681 | 23.791 | 20.747 | 19.893 |
| 3 | 6.583 | 17.885 | 6.538 | 18.285 | 7.741 | 17.587 |
| 4 | 4.670 | 13.146 | 4.554 | 9.113 | 6.554 | 12.732 |
| 5 | 10.771 | 3.692 | 10.557 | 7.141 | 4.633 | 7.244 |
| 6 | 5.768 | 2.742 | 5.972 | 5.284 | 26.751 | 2.551 |

表3 蜈蚣和混乱品种蟋蟀的共有指纹峰

| 编号 | 华北蜈蚣 | 东方蜈蚣 | 蟋蟀 |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 相对保留时间 (min) | 相对保留时间 (min) | 相对保留时间 (min) |
| 1 | 0.876 | 0.913 | 0.873 |
| 2 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 3 | 1.331 | 1.290 | 1.310 |
| 4 | 1.481 | 1.448 | 1.465 |
| 5 | 1.636 | 1.615 | 1.637 |
| 6 | 1.898 | 1.847 | 1.961 |
| 7 | 2.656 | 2.576 | 2.674 |

4 讨论

试验结果表明采用高效液相色谱法,能够获取不同蜈蚣种以及混乱品种的指纹特征图谱,依照它

们的特征峰可以对种和混乱品种进行鉴定研究。如相对保留时间0.920、3.166、4.082 min为混乱品种蟋蟀的特征峰,依其可以区分蜈蚣种和混乱品种蟋蟀;0.254、0.698、0.762、2.268 min是东方蜈蚣有别于华北蜈蚣的特征峰;0.709、0.876、1.187、1.182 min为华北蜈蚣区别于东方蜈蚣的特征峰,据此可以鉴别这两个蜈蚣种。经过多次试验结果所得到的流动相系统,应用于蜈蚣水提供试液所含物质的检测,能达到较为理想的分离效果。

参考文献:

- [1] 李时珍.本草纲目.校点本下册.31卷[M].北京:人民出版社,1982;2315.
- [2] 吴维智.蜈蚣治疗17例水肿病的疗效观察[J].江苏中医,

- 1961,(1):19.
- [3] 翟锦芳. 蜈蚣治疗产后尿潴留36例[J]. 江苏中医,1977,18(7):13
- [4] 王敬璇. 以化石丸为主治疗泌尿系结石100例临床观察[J]. 湖北中医杂志,1986,(3):16
- [5] 魏道智,郭澄,刘皋林等. 蜈蚣的化学成分和临床应用研究[J]. 时珍国医国药,2002,13(7):427

收稿日期:2005-09-28

吸收系数法测定吡嗪酰胺片中溶出度的研究

刘海英,王秀琴,张波,杨宁(北京军区药检所,北京100071)

摘要 目的:建立吸收系数法测定吡嗪酰胺片中的溶出度。方法:采用紫外分光光度中的吸收系数法,吸收系数 $E_{1cm}^{1\%}$ 为652。结果:本法与对照品法无显著性差异。结论:本方法简便易行、快速、准确,可作为该制剂的质量控制方法。

关键词 吡嗪酰胺片;吸收系数法;溶出度测定

中图分类号:R927.11 文献标识码:B 文章编号:1006-0111(2005)06-0369-02

Determination of dissolution of pyrazinamide tablets by absorption coefficient method

LIU Hai-ying, WANG Xiu-qin, ZHANG Bo, YANG Ning (Institute for Drug and Instrument Control, United Logistics Department of Beijing Command, PLA, Beijing, 100071 china)

ABSTRACT Objective: To establish an absorption coefficient method for determination of the dissolution of Pyrazinamide tablets. **Methods:** The ultraviolet-spectrophotometry-absorptivity (652) was used. The absorption coefficient ($E_{1cm}^{1\%}$) was 652. **Results:** There is no significant difference between absorption coefficient method and standard method. **Conclusion:** The method is simple, quick and accurate. It can be accepted for the quality control of pyrazinamide tablets.

KEY WORDS pyrazinamide tablets; absorption coefficient; determination of dissolution

吡嗪酰胺片为抗结核药物,在溶出度检查一项时,中国药典采用对照品比较法,由于对照品价格比较昂贵且用前应须置五氧化二磷干燥器中减压干燥,除去水分,操作比较繁琐。为此,建立了吸收系数法测定吡嗪酰胺片溶出度的方法。本方法操作简便、快捷,测定结果准确、可靠。

1 仪器与试药

1.1 仪器 UV-260 紫外分光光度计、UV-240 紫外分光光度计、UV-2100 紫外分光光度计(均为岛津公司生产)、Lambda-6 紫外分光光度计、Lambda-16 紫外分光光度计(均为 Waters 公司生产)、精密天平(十万分之一,沙多利斯 2004MP6 型)、智能溶出试验仪(ZRS-4 型)。

1.2 试药 吡嗪酰胺对照品(中国药品生物制品检定所,批号:10178-9902)、吡嗪酰胺片两批(①批号:050310,规格:0.25g×100片,华北制药厂;②批

号:040801,规格:0.25g×100片,成都锦华制药厂;纯净水(自制)。

2 试验与结果

2.1 吡嗪酰胺对照品处理 取吡嗪酰胺对照品置五氧化二磷干燥器中减压干燥24h,备用。

2.2 波长的确定 中国药典2005年版规定吡嗪酰胺片在268nm处有最大吸收,因此在(268±2)nm处取吸收度测定项下第一份对照浓溶液测定其吸收度,结果表明吡嗪酰胺在268nm处吸收度最大,因此波长选定为268nm。

2.3 对溶剂的要求 测定供试品前,应先检查所用的溶剂在供试品所用的波长附近是否符合要求,即用1cm石英吸收池盛溶剂,以空气为空白测定其吸收度,溶剂和吸收池的吸收度在251~300nm范围内不得超过 $0.10^{[1]}$ 。本样品以水为溶剂,在(268±2)nm处检查其吸收度,结果见表1。结果表明溶剂吸收度符合要求,可以使用。