

国产巴西人参药材质量标准研究

王硕, 蓝鸣生, 陈路, 袁经权, 凌征柱

摘要: [目的] 建立国产巴西人参药材的质量标准。[方法] 采用 TLC 法对国产巴西人参药材进行定性鉴别; 用 HPLC 法对齐墩果酸进行定量研究。Kromasil C-18 250 × 4.6 mm, 5 μm 100A 色谱柱, 甲醇-水-乙酸 (80:20:0.6) 为流动相, 流速 1.0 ml·min⁻¹, 检测波长 220 nm; 柱温 30℃; 进样量 20 μl。[结果] 在 TLC 色谱中能检出国产巴西人参。齐墩果酸在 0.60~4.80 μg 范围内线性关系良好 ($r = 0.999\ 5$), 平均回收率为 99.70%, RSD 为 1.61% ($n = 6$)。测得国产巴西人参药材 1.0 g 水解后的齐墩果酸含量范围为 3.448 4~3.515 7 mg。[结论] 该方法简便、准确、快速、灵敏度高、重现性好, 适用于巴西人参药材的质量控制。

关键词: 国产巴西人参; 齐墩果酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

STUDY ON QUALITY STANDARD OF THE DOMESTIC PFAFFIA PANICULATA WANG Shuo, LAN Ming-sheng, CHEN Lu, et al. (The Key Laboratory of Academician Pei-gen Xiao, Institute of Guangxi Medicinal Plant, Nanning 530023 China)

Abstract: [Objective] To establish the quality standard of the domestic *Pfaffia paniculata*. [Methods] The domestic *Pfaffia paniculata* were indentified by TLC. The oleanolic acid was determined by HPLC. A chromatographic column (Kromasil C-18 250×4.6mm 5μm 100A) was used with a mobile phase of the methanol- water - acetic acid (80:20:0.6), flow rate: 1.0ml/min, UV detection wave length at 220nm; Column temperature 30℃; injection volume 20μl. [Results] The domestic *Pfaffia paniculata* could be detected by TLC. The oleanolic acid showed a good liner at a range of 0.60-4.80μg ($r = 0.999\ 5$), the average rate of recovery was 99.70%, RSD was 1.61% ($n=6$). The content of oleanolic acid in 1.0g hydrolysis domestic *Pfaffia paniculata* was 3.448 4-3.515 7mg. [Conclusion] This method is simple, accurate, fast, good in sensitivity and precision and can be used for the quality control of the domestic *Pfaffia paniculata*.

Key words: Domestic *Pfaffia paniculata*; Oleanolic acid; TLC; HPLC; Quality standard

珙菲亚 *Pfaffia*, 俗称巴西人参 *Pfaffia paniculata*, 为苋科 *Amaranthaceae* 植物巴西人参 *Pfaffia paniculata* 的根。原产于南美洲, 在当地作为药用已有 300 多年的历史, 主要用于治疗心血管系统、中枢系统、生殖系统、消化系统等多种疾病, 具有重要的药用和保健价值^[1-3], 在国外已被开发成成药和保健品投入市场。巴西人参在中国没有分布, 但我国已有企业从事巴西人参的功能食品和药品研究, 并已开发出商品, 但其原料完全依靠进口野生资源。近年来, 我国学者首次在广西、成都、北京等地成功引种栽培, 并对其引种栽培与原产地的主要化学成分进行了比较研究^[4,5]。本课题采用 HPLC 方法, 对药材中的齐墩果酸有效成分进行了测试研究, 摸索出的 HPLC 测定方法可以测定其有效成分, 而且简便、准确、快速、灵敏度高、重现性好, 可作为国产巴西人参药材的含量控制方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-10ATvp 高效色谱仪及威玛龙色谱工作站

作者简介: 王硕 (1973-), 男, 助理研究员, 研究方向: 中药药理和新药开发

通讯作者: 蓝鸣生, 副主任药师, 研究方向: 新药开发、药学和植物化学研究, E-mail: lanmingsheng@126.com

作者单位: 广西药用植物研究所肖培根院士重点实验室, 南宁, 530023

(广西南宁), 1/10 万电子天平 (GR-202, A&D 日本), WZUV-2102 型分光光度计 (上海优尼柯仪器有限公司), 薄层板 (青岛海洋化工分厂)。

1.2 试剂

甲醇、乙酸均为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂为分析纯; 齐墩果酸对照品由中国药品生物制品检定所提供 (批号: 110709-200505); 国产巴西人参药材由广西药用植物园提供; 进口巴西人参药材由中国医学科学院药用植物研究所马小军博士提供。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取已用五氧化二磷干燥处理好的齐墩果酸对照品适量, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀, 滤纸滤过即得。

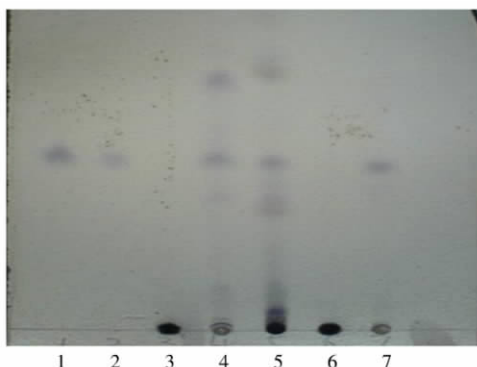
2.1.2 供试品样液的配制 国产巴西人参药材溶液和进口巴西人参药材溶液的配制: 取药材粗粉约 10.0 g, 精密称定, 加甲醇回流提取 3 次, 每次 30 ml, 1 h, 提取液抽滤, 滤液合并入 250 ml 容量瓶中, 用甲醇洗涤器械滤纸 3 次以上, 洗涤液滤入 250 ml 容量瓶中, 加甲醇到刻度, 摇匀, 滤纸过滤即得。

国产巴西人参药材水解样液和进口巴西人参药材水解样液的配制: 取药材粗粉约 10.0 g, 精密称定, 加甲醇回流提取 3 次, 每次 30 ml, 1 h, 提取液抽滤, 滤液合并, 水浴蒸发到约

50 ml, 加水配成含 2% H_2SO_4 (g/v) 的溶液 100 ml, 直火回流 3 h 后, 水浴蒸去甲醇, 放冷, 滤纸自然过滤, 滤纸及不溶物用纯化水洗到中性, 80℃烘干后用甲醇回流提取 3 次, 每次 50 min, 提取液合并滤纸过滤, 水浴蒸浓缩到体积小于 100 ml, 趁热倒入 250 ml 容量瓶中, 用甲醇洗涤蒸发皿 4 次以上 (每次 20 ml), 洗涤液一起并入上容量瓶中, 放冷, 加甲醇到刻度摇匀, 滤纸过滤即得。

药园巴西人参水提醇沉浸膏水解样液的配制: 取巴西人参水提醇沉浸膏约 15.0 g, 精密称定, 加纯化水 100 ml 煮沸 10 min, 放冷, 滤纸过滤, 滤渣弃去, 滤液加浓硫酸配成含 2% H_2SO_4 (g/v) 的溶液, 直火回流 3 h, 放冷, 滤纸自然过滤, 滤纸及不溶物用纯化水洗到中性, 80℃烘干后用甲醇回流提取 3 次, 每次 50 ml, 提取液合并, 滤液用乙酸乙酯萃取 4 次, 每次 30 ml, 萃取液合并, 水浴蒸干, 用甲醇洗涤蒸发皿 3 次, 每次 20 ml, 洗涤液一起并入 250 ml 容量瓶中, 放冷, 加甲醇到刻度摇匀, 滤纸过滤即得。

2.1.3 薄层层析及结果 吸取上述 6 样品溶液各 10 μl , 分别点于硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-环己烷-甲醇 (13:4:1) 为展开剂。展开, 取出, 晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 于 105℃中加热显色, 结果水解样液供试品色谱中, 在与齐墩果酸对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的蓝紫色斑点, 而不水解供试品无此斑点。结果见图 1。



注: 1、2.齐墩果酸对照; 3.药园产巴西人参药材溶液; 4.药园产巴西人参药材水解液; 5.药园巴西人参水提醇沉浸膏水解液; 6.进口巴西人参药材水解液; 7.进口巴西人参药材水解液

图 1 巴西人参中齐墩果酸的 TLC 图

2.2 齐墩果酸含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C-18 250 $\times$ 4.6 mm 5 μm 100 A; 流动相: 甲醇-水-乙酸 (80:20:0.6); 流速: 1.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μl 。

2.2.2 检测波长的选择 精密称取齐墩果酸对照品 0.002 4 g, 置 25.0 ml 棕色容量瓶中, 加甲醇溶解并添加到刻度、摇匀后在 200~600 nm 处连续扫描溶液的吸收度。齐墩果酸在 220 nm 处有平滑的最大吸收峰, 并参考相关资料^[6], 确定紫外检测波长为 220 nm, 扫描结果见图 2。

2.2.3 空白干扰试验 按 2.1.1 项下方法配置对照品溶液。按 2.1.2 项下方法分别配置国产巴西人参药材水解液; 国产巴西人参药材溶液; 进口巴西人参药材水解液和进口巴西人参药材溶液等 5 种供试品样液。

分别取上述 5 种溶液注入液相色谱仪中, 记录图谱。水解样液在与对照品色谱峰相同保留时间处无色谱峰干扰 (见图

3~7)。

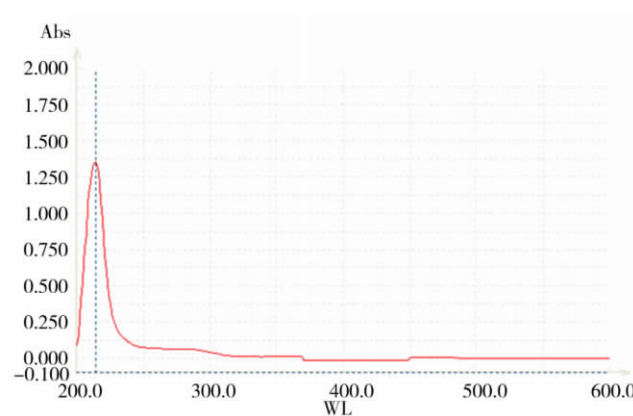


图 2 齐墩果酸的紫外吸收光谱图

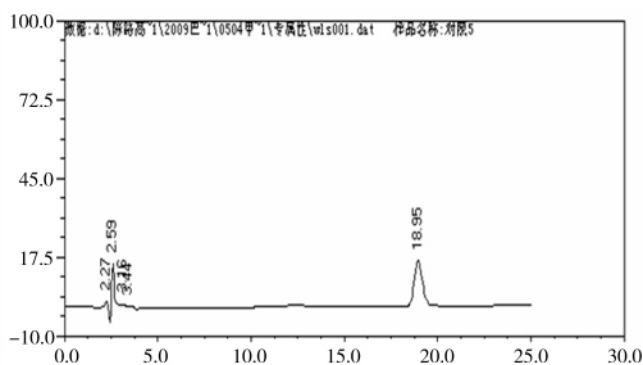


图 3 齐墩果酸对照 HPLC 图

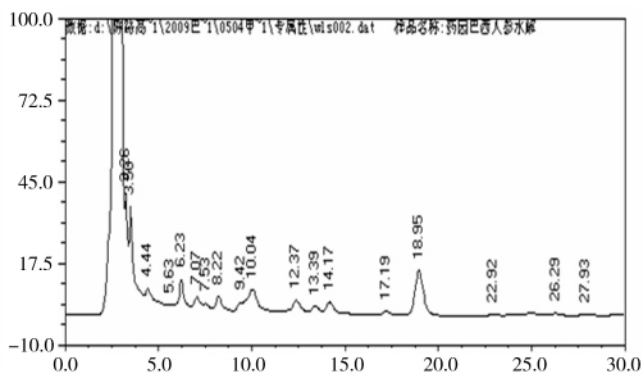


图 4 国产巴西人参药材水解 HPLC 图

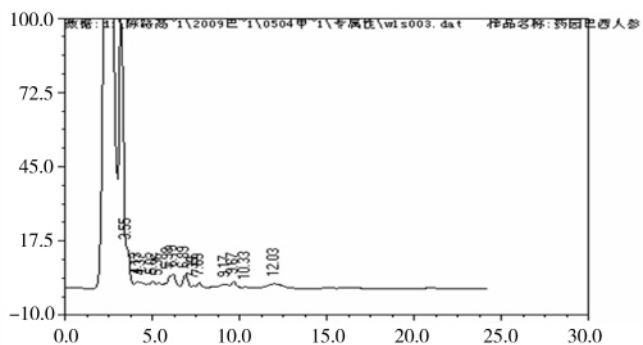


图 5 国产巴西人参药材不水解 HPLC 图

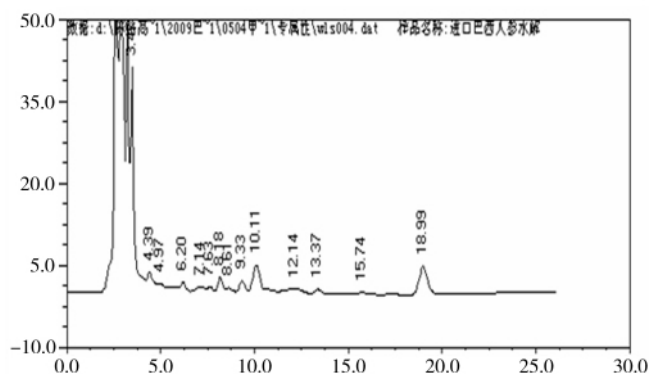


图 6 进口巴西人参药材水解 HPLC 图

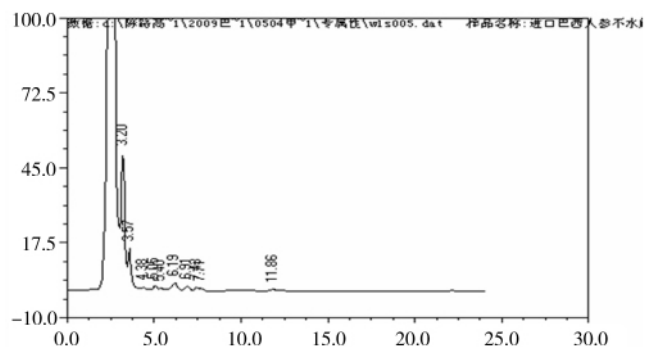


图 7 进口巴西人参药材不水解 HPLC 图

2.2.4 线性关系的考察 分别精密吸取对照储备液 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1、2、3、4、5、6、7、8 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加流动相到刻度, 摇匀后分别用微量注射器满环 (20 μl , 下同) 进样, 以流动相按以下条件层析: 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速: 1.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 。以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归, 得回归方程: $Y = 3159.6X$, $r = 0.9995$, 范围为 0.60~4.80 μg 。

2.2.5 精密度与稳定性试验 精密吸取对照储备液 (齐墩果酸 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 4 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释到刻度, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 满环进样, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.78% ($n = 6$)。

精密吸取 2.1.2 项下国产巴西人参水解样供试液, 于 0、2、4、6、8、12 h 满环进样, 结果峰面积的 RSD 为 1.78% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 0~12 h 内稳定性较好。

2.2.6 重复性与回收率实验 取国产巴西人参药材粗粉约 10 g, 精密称定, 共 6 份, 配制方法见 2.3.2, 满环进样, 结果齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.77% ($n = 6$), 表明本法重复性良好。

从对照储备液中精密量取 5 ml 置 10 ml 量瓶中加甲醇稀释到刻度, 摇匀, 得对照品溶液 (齐墩果酸 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 微孔滤膜滤过, 满环进样, 测定峰面积; 取国产巴西人参药材粗粉约 10 g, 精密称定, 得 10.775 0 g, 配制方法见 2.3.2。精密量取国产巴西人参水解样液 1 ml, 加入以上 1 ml 对照储备液 (齐墩果酸 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 混合摇匀, 微孔滤膜滤过, 得加样回收液, 重复做 6 份, 满环进样, 测定峰面积, 计算得齐墩果酸平均回收率为 99.7%, RSD 为 1.61% ($n = 6$)。见表 1。

表1 加样回收率测定结果 ($\times 10^{-2}$)

取样量 (g)	样品齐墩果酸含量 (μg)	对照品加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率	平均回收率	RSD
0.0431	148.6778	150	297.2262	99.03	99.70	1.61
0.0431	148.6778	150	299.0625	100.26		
0.0431	148.6778	150	300.6962	101.35		
0.0431	148.6778	150	295.5510	97.92		
0.0431	148.6778	150	295.7686	98.06		
0.0431	148.6778	150	301.0506	101.58		

2.2.7 10 批国产药材及 1 批进口药材的含量测定 从对照储备液中精密量取 5 ml 置 10 ml 量瓶中加甲醇稀释到刻度, 摇匀, 得对照品溶液 (齐墩果酸 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 微孔滤膜滤过, 满环进样, 测定峰面积。

取在不同地点生产的国产巴西人参药材 10 批, 每批取粗粉约 10.0 g, 精密称定, 配制方法见 2.1.2。

取进口巴西人参药材 1 批, 粗粉约 10.0 g, 精密称定, 配制方法见 2.1.2。

取对照液、10 批国产样品供试液和进口药材样液分别满环进样, 按面积外标法计算含量, 结果见表 2。从 10 批药材的含测结果来看, 测得药国产巴西人参药材 10 g 水解后的齐墩果酸含量范围为 3.448 4~3.515 7 mg, 进口巴西 10 g 水解后的齐墩果酸含量为 3.468 9, 两者没有显著差别。

3 讨论

本文采用 TLC 法对国产巴西人参进行了定性鉴别; 以巴西人参水解后的齐墩果酸含量为控制指标, 建立了 HPLC 法测定引种国产巴西人参药材中齐墩果酸含量的方法, 初步制订了

巴西人参药材的质量控制标准。齐墩果酸含量测定的系统适用性试验表明, 选择甲醇-水-乙酸 (80:20:0.6) 流动相体系, 既能使齐墩果酸峰形对称, 又能与其他组分达到基线分离, 符合含量测定的要求, 可作为巴西人参药材中齐墩果酸含量测定的数据参考依据。通过 10 批次的巴西人参药材中齐墩果酸含量测定, 结果最低含量为 3.448 4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 最高含量为 3.515 7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 采用本法测定巴西人参中齐墩果酸的含量, 其回收率高, 呈良好的线性, 重现性好, 样品稳定, 且齐墩果酸与样品中其他峰的分度大, 测定条件易于操作, 因此, 本实验为今后该药材的推广和产品开发奠定了坚实的技术基础。

参考文献:

- [1] 卡庆亚, 罗崇念, 马小军. 国外对珙菲亚的研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33 (5): 附 1.
- [2] Harrington J F. Seed storage and longevity [J]. Seed Biology, 1972 (3): 145-245.
- [3] Ellis R H, Roberts E H. Improved equations for the prediction of seeds [J]. Annals of Botany, 1980a, 45: 13-30.

(下转第 938 页)

精液异常 692 例, 其中弱精子症 154 例, 占 21.60%; 少精子症 120 例, 占 16.83%; 精子活率异常 78 例, 占 10.93%; 精液延迟液化 54 例, 占 7.57%; 少精液症 32 例, 占 4.49%; 无精子症 28 例, 占 3.93%; 畸形精子症 25 例, 占 3.51%; pH < 7.215 例, 占 2.10%。具体检测结果见表 1。

表 1 713 例精液结果分析 (×10⁻²)

精液分类	例数	百分比
精液正常	228	31.98
弱精子症	154	21.60
少精子症	120	16.83
精子活率异常	78	10.93
精液延迟液化	54	7.57
少精液症	32	4.49
无精子症	28	3.93
畸形精子症	25	3.51
pH < 7.2	15	2.10
合计	713	100.00

3 讨论

我国育龄夫妇不育发生率为 12.5%^[3], 其中男性因素不育已达 55%^[4]。本文对 713 例精液进行常规检测中, 正常精液占 31.98%, 与李川海、陈和平等报道的 30.2% 相近^[5]。夫妇不育但男方精液正常可能与女方不孕有关。在精液异常的患者中弱精子症占 21.60%, 与李映红, 史健, 刘梅春报道的 22.2% 相符^[6]。成功的受精和受精潜在在很大程度上不仅依靠精子数目、存活率、形态, 更大程度依靠精子运动质量。直线运动速度快、前向运动能力强的精子 (a 级) 的比率在一定程度上决定了精子是否能够有效地穿过女性生殖道到达受精部位^[7]。弱精子因运动缓慢不能很快到达宫腔而被淘汰以致造成不育。精液延迟液化占 7.57%, 高于李映红, 史健, 刘梅春报道的

3.3%^[6]可能与梧州地处岭南, 环境炎热潮湿多瘴气, 湿症郁积有关。祖国医学认为湿热下注精室、阻滞阳道、精浊混淆而黏稠难化, 认为“精血同源”, “精凝”与“血淤”同理^[8]。无精子症占 3.93%, 与陈东红、江丽莉、武蓉珍等报道的 13.6% 不符^[9], 可能存在地区差异。畸形精子症占 3.51%, 畸形精子很难结合到卵透明带上, 当精液中正常形态精子百分率 < 14% 时, 精子体外受精率显著减少^[10]导致不育。综上所述, 精子活动力低下、精子活率低、少精子、精子形态畸形、精液延迟液化、无精子等精液异常是导致男性不育的重要原因, 其中精子活动力低下是导致不育的主要原因。

参考文献:

- [1] 邹晓平, 秦红, 杨丽, 等. 277 例正常育龄男性精液质量状况分析[J]. 现代预防医学, 2007, 34 (19): 3635-3636.
- [2] 世界卫生组织.WTO 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册[M]. 第 4 版.北京: 人民卫生出版社, 2001. 25-51.
- [3] 黄宇烽, 许瑞吉. 男科诊断学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1999. 1.
- [4] 陆仁康, 谢雁鸿. 应重视和加强男性生殖健康的研究 [J]. 中国男科学杂志, 2001, 15 (1): 3-6.
- [5] 李川海, 陈和平, 叶联顺, 等. 重庆地区 723 例男性不育主要病因分析 [J]. 中国男科学杂志, 2009, 23 (2): 49-51.
- [6] 李映红, 史健, 刘梅春. 180 例精液常规结果分析及临床意义 [J]. 实用医技杂志, 2005, 12 (4): 935-936.
- [7] 吴伟建, 索永善, 叶玲玲, 等. 128 例不育症海员精液常规数据分析 [J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31 (5): 577-578.
- [8] 傅岳武, 陈志强, 王树声, 等. 精液延缓液化症的论治现状与展望 [J]. 新中医, 2000, 32 (10): 58.
- [9] 陈东红, 江丽莉, 武蓉珍, 等. 139 例男性不育症患者的精液常规检查和染色体分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17 (6): 104, 133.
- [10] Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment-historical perspectives and current opinions [J]. J Androl, 2001, 22 (2): 192-205.

(收稿日期: 2010-03-03)

(上接第 936 页)

表 2 10 批药材中齐墩果酸含量

样品	国产巴西人参齐墩果酸含量 (mg · g ⁻¹)				进口巴西人参齐墩果酸含量 (mg · g ⁻¹)	
	取样量 (g)	含量	平均含量	RSD (%)	取样量 (g)	含量
1	10.1724	3.5037	3.4814	0.98	9.9144	3.4689
2	9.9206	3.4627				
3	10.0813	3.5157				
4	9.9702	3.4484				
5	10.0218	3.4697				
6	10.2549	3.5095				
7	10.0521	3.4605				
8	10.6817	3.5021				
9	10.8205	3.4561				
10	10.5712	3.4855				

- [4] 凌征柱, 刘园, 马小军, 等. 玳玳的组织培养快速繁殖研究 [J]. 种子, 2006, 10 (25): 20-26.
- [5] 凌征柱, 杨东爱, 马小军, 等. 引种栽培玳玳与原产地玳玳主要成分的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 1 (12):

2649-250.

- [6] 张克. 龙牙肝泰胶囊中齐墩果酸的鉴别方法 [J]. 陕西中医学院学报, 2007, 30 (4): 72-73.

(收稿日期: 2009-10-10)