

达到饱和效果要好,因这样在工业大生产时可以平行的控制每批产量。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [2] 广东省吴川县卫生局中草药研究小组, 广东省吴川县人民医院内科. 地稔止血水治疗消化道出血 70 例 [J]. 新医学, 1973(1): 20.
- [3] 周添浓. 地稔注射液对家兔血液的影响 [J]. 广州中医学院

学报, 1995(12): 40-41.

- [4] 刘峰群, 曹红, 靳守东, 等. 比色法测定消癌平注射液中总酚酸的含量 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(3): 220-222.
- [5] 许腊英, 毛维伦, 黎莉. 酒制丹参水溶性总酚的含量测定 [J]. 湖北中医学院学报, 2004, 6(1): 34-35.
- [6] 刘永刚, 金向群, 叶瑾, 等. 大孔树脂纯化赤芍总苷的研究 [J]. 中药材, 2005, 28(3): 195-196.
- [7] 傅博强, 刘勃, 王小红, 等. XDA-1 大孔吸附树脂对甘草酸及甘草总黄酮的吸附分离 [J]. 现代中药研究与实践, 2004 (B12): 45-50.

均匀设计法优选金匱肾气丸中苷类成分的提取工艺¹

李文兰, 任晓蕾, 赵 稷, 季宇彬*, 徐 栋

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 优选金匱肾气丸中苷类成分的提取工艺。方法 采用 HPLC 法测定马钱苷、芍药苷的量, 紫外分光光度法测定总苷和总皂苷的量。以浸膏率、马钱苷、芍药苷、总苷和总皂苷的量为指标, 按 $U_9(9^5)$ 均匀设计表设计试验, 分别考察乙醇体积分数、液固比、煎煮时间和煎煮次数 4 个因素的影响。结果 通过 DPS 软件分析, 得出苷类成分的最佳提取工艺为用 14 倍量 58% 乙醇煎煮 3 次, 每次 3 h, 在此工艺提取得马钱苷和芍药苷的量分别为 2.477 0、0.768 4 mg/g, 以马钱苷计总苷的量为 34.178 2 mg/g, 以人参皂苷 Re 计总皂苷的量为 4.910 8 mg/g。结论 均匀设计法优选出的金匱肾气丸中苷类成分的提取工艺合理可行, 为金匱肾气丸的进一步研究提供参考。

关键词: 金匱肾气丸; 苷类; 均匀设计; 提取工艺

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0199-04

Optimization of extracting technique for glycosides in Jinkui Shenqi Pills by uniform design

LI Wen-lan, REN Xiao-lei, ZHAO Ji, JI Yu-bin, XU Dong

(Center of Research on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract Objective To optimize the extracting process of glycosides in Jinkui Shenqi Pills. **Methods**

The extracting process of Jinkui Shenqi Pills was optimized by $U_9(9^5)$ uniform design with extract rate, loganin, paecniflorin, total glycosides, and total saponins, as indexes to observe the effect of ethanol concentration, amount of extraction solvent added, duration of decoctions, and times of decoction. HPLC and UV-spectrophotometer were used to determine the loganin, paecniflorin as well as the total glycosides and total saponins. **Results** Through the DPS software analysis, the most favorable conditions are: glycosides in Jinkui Shenqi Pills were extracted in 58% ethanol 14 times as much as it for 3 times, 3 h once. Using this extracting process, the obtained contents of loganin, paecniflorin, total glycosides, and total saponins were 2.477 0 mg/g, 0.768 4 mg/g, 34.178 2 mg/g, and 4.910 8 mg/g, respectively. **Conclusion** The extracting technique for glycosides in Jinkui Shenqi Pills by uniform design is suitable and feasible. The study could provide the references for determination and extraction of saponins in Jinkui Shenqi Pills and groundwork for its further investigation.

Key words: Jinkui Shenqi Pills; glycosides; uniform design; extracting technique

金匱肾气丸出自张仲景《金匱要略》, 为温补肾阳的代表方, 也是最早的补肾方剂, 能有效改善性激素分泌状况和精子质量, 预防骨质疏松, 具有显著的

抗突变、抗衰老和抗自由基等作用^[1~4], 临床主要用于治疗男性不育症、慢性功能性腹泻、糖尿病肾病、慢性肾炎水肿、前列腺肥大、心肾阳虚型高血压

¹ 收稿日期: 2007-05-19

基金项目: 黑龙江省科技厅攻关项目(GC05C31601); 黑龙江省教育厅振兴老工业基地项目(1151gzd25)

作者简介: 李文兰(1967—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药化学及药动学。

Tel: (0451) 84800297 E-mail: lwlzd@163.com

* 通讯作者 季宇彬

等更年期综合征症状^[5-7]。金匱肾气丸处方由附子(制)、肉桂、熟地黄、山药、山茱萸(制)、泽泻、茯苓、牡丹皮 8 味中药组成, 含有有效成分多糖类、苷类和三萜类等。本实验采用均匀设计法对金匱肾气丸中的苷类成分进行提取, 为优化制剂工艺, 揭示配伍的规律和作用机制提供参考。

1 材料、试剂与仪器

马钱苷、芍药苷、人参皂苷 Re 对照品(供定量测定用, 批号分别为 111640-200502、110736-200320、110754-200320)均由中国药品生物制品检定所提供; 所用药材均购于安国市京兴药品有限责任公司, 经笔者鉴定; 乙腈为色谱纯, 水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

Waters 高效液相色谱仪, 包括 W2695 Separations Module、W2996 Photodiode Array Detector; 751 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 电子天平(美国奥好斯科技有限公司); DPS 统计软件(北京中农博思科技发展有限公司)。

2 方法与结果

2.1 实验设计: 选择对提取率影响较大的 4 个因素: 乙醇体积分数(X_1)、液固比(X_2)、提取时间(X_3)和提取次数(X_4)进行了 9 次均匀设计试验, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

序号	乙醇体积分数 (X_1) / %	液固比 (X_2)	提取时间 (X_3) / min	提取次数 (X_4)	
1	0	6	1	60	1
2	15	7	1	75	1
3	25	8	1	90	1
4	35	9	1	105	2
5	45	10	1	120	2
6	55	11	1	135	2
7	65	12	1	150	3
8	75	13	1	175	3
9	85	14	1	180	3

2.2 提取方法: 熟地黄、山药、山茱萸(制)、泽泻、茯苓、牡丹皮、附子(制)、肉桂粗粉质量比例为 8 4 4 3 3 3 1 1。精密称定 27 g, 置圆底烧瓶中, 按均匀设计安排各试验, 加入一定体积、不同体积分数的乙醇溶液, 回流提取规定的时间和次数, 滤过, 合并滤液, 用旋转蒸发仪减压回收乙醇, 使滤液成膏, 计算得膏率。采用 HPLC 测定马钱苷、芍药苷的量, 紫外-可见分光光度法测定总苷和总皂苷的量。

2.3 马钱苷和芍药苷的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件^[8,9]: 色谱柱: Symmetry C₁₈柱(250

mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1% 冰醋酸溶液(14 86); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 ℃。

2.3.2 标准曲线的制备: 精密称取马钱苷、芍药苷对照品适量, 分别加甲醇制成 0.16、0.18 mg/mL 对照品溶液。将二者等体积混合后, 精密吸取混合对照品溶液 2、4、6、8、10、20 μL, 进样, 测定峰面积值。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 线性回归, 得回归方程。马钱苷: $Y = 798\,944 X + 56\,445$, $r = 0.999\,7$, 芍药苷: $Y = 681\,818 X + 9716.1$, $r = 0.999\,9$ 。结果表明, 马钱苷在 0.16 ~ 1.6 μg, 芍药苷在 0.18 ~ 1.8 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 样品测定: 取浸膏适量, 精密称定, 用乙腈-水(14 86)溶解, 转移置 10 mL 量瓶中, 并加至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取 10 μL 进样测定, 计算马钱苷、芍药苷的质量分数。色谱图见图 1。

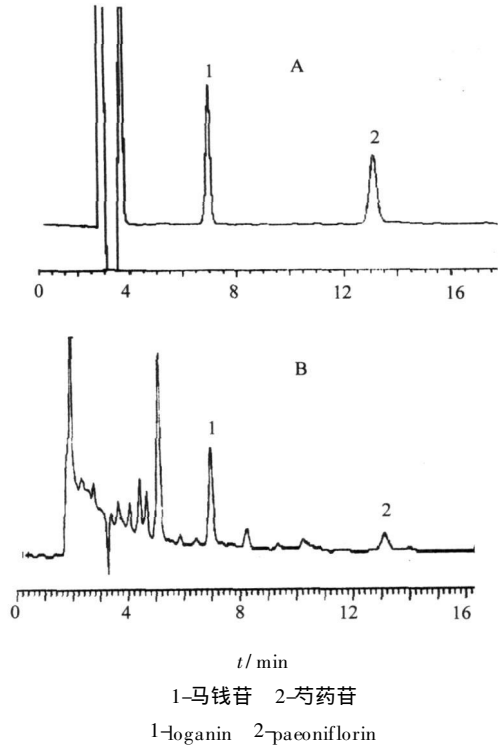


图 1 对照品(A)和样品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

2.4 总苷的紫外-可见分光光度法测定^[10]

2.4.1 标准曲线的制备: 精密称取马钱苷对照品适量, 加乙腈-水(14 86)配制成 0.18 mg/mL 对照品溶液, 再分别配制 0.09、0.045、0.034、0.022 5、0.011 mg/mL 系列对照品溶液。以溶剂为空白对照, 测定系列对照品溶液的吸光度。以马钱苷的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 其标准曲线方程为 $Y = 17.64 X - 0.019\,6$, $r =$

0.999 8。结果表明, 马钱苷在 0.011 ~ 0.09 mg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

2.4.2 样品测定: 取浸膏适量, 精密称定, 10 mL 水溶解, 用 10 mL 石油醚萃取 1 次, 再分别用 15、10、10 mL 水饱和正丁醇萃取, 合并正丁醇萃取液, 减压浓缩至干, 用乙腈-水(14 : 86)溶解, 转移置 10 mL 量瓶中, 并加至刻度, 摇匀, 测定其吸光度值, 数值带入标准曲线方程, 以马钱苷计算其总苷的质量分数。

2.5 总皂苷的紫外-可见分光光度法测定^[11]

2.5.1 标准曲线的制备: 精密称取人参皂苷 Re 加乙腈-水(14 : 86)溶解, 配制成 0.14 mg/mL 对照品溶液, 并稀释。分别吸取 0.014、0.028、0.056、0.112、0.14、0.28 mg/mL 对照品溶液 1 mL 于具塞试管中, 水浴蒸干, 精密加入 0.2 mL 50 mg/mL 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸, 振摇混匀后于

65 °C 水浴加热 20 min, 冰水冷却 5 min, 加冰醋酸 5 mL, 摇匀。以相同显色剂为空白对照, 于 554 nm 测定其吸光度值。以人参皂苷 Re 的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y = 1.4348X - 0.0196$, $r = 0.9996$ 。结果表明人参皂苷 Re 在 0.014 ~ 0.28 mg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

2.5.2 样品测定: 取浸膏适量, 精密称定, 10 mL 水溶解, 用 10 mL 石油醚萃取, 再分别用 15、10、10 mL 水饱和正丁醇萃取, 合并正丁醇萃取液, 减压浓缩至干, 用乙腈-水(14 : 86)溶解, 转移置 10 mL 量瓶中, 并加至刻度, 摇匀, 测定其吸光度值, 数值带入回归方程, 以人参皂苷 Re 计算总皂苷的质量分数。

2.6 均匀设计试验结果及数据处理与分析: 结果见表 2。

表 2 $U_9(9^5)$ 均匀设计试验结果($n = 5$)

Table 2 Results of $U_9(9^5)$ uniform design test ($n = 5$)

序号	乙醇体积 分数 X_1	固液比 X_2	提取时间 X_3	提取次数 X_4	得膏率 (a) / %	马钱苷/ (mg · g ⁻¹)	芍药苷/ (mg · g ⁻¹)	总苷(b) / (mg · g ⁻¹)	总皂苷(c) / (mg · g ⁻¹)	综合得分 (Z)
1	0	7 : 1	105	3	34.04	1.318 9	0.535 4	20.359 4	0.600 2	10.43
2	15	9 : 1	165	3	35.07	1.987 5	0.512 1	19.977 0	2.200 5	10.72
3	25	11 : 1	90	2	31.74	2.098 6	0.650 2	27.791 0	1.295 9	14.35
4	35	13 : 1	150	2	34.26	2.264 7	0.762 1	29.667 7	1.785 9	15.44
5	45	6 : 1	75	2	27.31	1.788 3	0.827 6	33.878 4	2.053 5	17.80
6	55	8 : 1	135	1	27.56	1.917 2	0.592 2	27.027 8	1.938 9	14.15
7	65	10 : 1	60	1	26.80	1.722 4	0.708 1	19.896 4	1.586 5	10.48
8	75	12 : 1	120	1	26.74	1.810 9	0.629 9	22.245 0	2.223 8	11.84
9	85	14 : 1	180	3	29.24	2.167 8	0.778 5	30.925 5	1.652 3	16.02

2.6.1 马钱苷的工艺筛选: 由 DPS 统计软件处理数据, 求得 10 余个逐步回归方程, 根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验, 结合试验原理和经验, 选出优化方程 $Y = 0.985 + 0.943 X_4 - 0.451 X_4 X_4 - 0.0003 X_2 X_3 + 0.024 X_2 X_4 + 0.004 X_3 X_4$ 。最高指标时各个因素组合: $X_1 = 0.58$; $X_2 = 6.00$; $X_3 = 179.99$; $X_4 = 2.04$; 显著水平 $P = 0.0107$, 统计量值 $F = 26.95$, 相关系数 $R = 0.9891$, 调整后的相关系数 $R_a = 0.9705$, 表明方程拟合度良好, 因素显著。因此以马钱苷提取率为指标, 最佳醇提工艺为: 58% 乙醇、液固比为 6 倍量、提取时间 180 min, 提取 2 次。

2.6.2 芍药苷的工艺筛选: 由 DPS 统计软件处理数据, 求得 10 余个逐步回归方程, 根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验, 结合试验原理和经验, 选出优化方程为: $Y = 1.644 + 0.665 X_1 - 0.0968 X_2 - 0.011 X_3 - 0.738 X_1 X_1 + 3 \times 10^{-5} X_3 X_3 + 9 \times 10^{-3} X_2 X_3$; 最高指标时各个因素组合: $X_1 =$

0.46; $X_2 = 6.00$; $X_3 = 60.00$; $X_4 = 1.1402$; 显著水平 $P = 0.0015$, 统计量值 $F = 679.2845$, 相关系数 $R = 0.9998$, 调整后的相关系数 $R_a = 0.9990$, 表明方程拟合度良好, 因素显著。因此以芍药苷提取率为指标最佳提取工艺为: 46% 乙醇、液固比为 6 倍量、提取时间 60 min, 提取 1 次。

2.6.3 总苷的工艺筛选: 由 DPS 统计软件处理数据, 求得 10 余个逐步回归方程, 根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验, 结合试验原理和经验, 选出优化方程为: $Y = 29.554 - 44.916 X_1 X_1 + 0.118 X_1 X_3 + 13.422 X_1 X_4 - 0.0339 X_3 X_4$; 最高指标时各个因素组合: $X_1 = 0.57$; $X_2 = 6.07$; $X_3 = 69.55$; $X_4 = 3.00$; 显著水平 $P = 0.025$, 统计量值 $F = 9.6117$, $R = 0.9517$, 调整后的相关系数 $R_a = 0.9008$, 表明方程拟合度良好, 因素显著。因此以马钱苷计总苷提取率为指标最佳提取工艺为: 57% 乙醇、液固比为 6 倍量、提取时间 70 min, 提取 3 次。

2.6.4 总皂苷的工艺筛选: 由 DPS 统计软件处理

数据,求得 10 余个逐步回归方程,根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验,结合试验原理和经验,选出优化方程为: $Y = -1.496 + 0.088 X_3 - 45.103 X_1 X_1 - 0.098 X_2 X_2 - 3 \times 10^{-3} X_3 X_3 + 4.453 X_1 X_2 - 0.035 X_1 X_3 + 0.004 X_3 X_4$; 最高指标时各个因素组合: $X_1 = 0.63$; $X_2 = 13.90$; $X_3 = 112.73$; $X_4 = 3.00$; $P = 0.021 0$, 统计量值 $F = 1348.79$, $R = 0.999 9$, 调整后的相关系数 $R_a = 0.999 6$, 表明方程拟和度良好,因素显著。因此以人参皂苷 Re 计总皂苷提取率为指标最佳提取工艺为: 63% 乙醇、液固比为 14 倍量、提取时间 113 min, 提取 3 次。

2.6.5 综合指标的筛选: 为使结果分析更客观,采用加权评分法,根据浸膏率(a)、总苷的量(b)和总皂苷的量(c),确定三者的权重系数,对 3 项指标进行加权求和,可得到综合评分(Z) ($Z = 0.2a + 0.5b + 0.3c$)。综合评分的工艺筛选,通过 DPS 统计软件处理数据,求得 10 余个逐步回归方程,根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验,结合试验原理和经验,选出优化方程为: $Y = 16.958 - 0.219 X_2 - 22.884 9 X_1 X_1 + 0.072 9 X_1 X_3 + 6.599 X_1 X_4 - 0.016 7 X_3 X_4$; 最高指标时各个因素组合: $X_1 = 0.60$; $X_2 = 9.46$; $X_3 = 71.85$; $X_4 = 3.00$; $P = 0.026 8$, $F = 9.231 2$; $R = 0.949 9$; 调整后的相关系数 $R_a = 0.897 0$ 。因此综合得分的筛选结果是: 58% 乙醇,液固比为 9 倍量,提取时间 72 min,提取 3 次。综合考虑,选取 58% 乙醇,其他条件取最大值,即: 58% 乙醇,14 倍量提取 3 次,每次 180 min,作为均匀设计的优选工艺。

2.7 验证试验: 取金匱肾气丸处方粗粉,以 14 倍量的 58% 乙醇回流提取 3 次,每次 180 min。减压回收乙醇,干燥。结果得膏率为 33.22%, 马钱苷和芍药苷的量分别为 2.477 0、0.768 4 mg/g; 以马钱苷计总苷的量为 34.178 2 mg/g; 以人参皂苷 Re 计总皂苷的量为 4.910 8 mg/g。验证结果与均匀设计试验预测结果较接近。

3 讨论

由于苷类和皂苷均为中等极性物质,所以选择不同体积分数的乙醇提取。在金匱肾气丸组方中,选择苷类的代表药山茱萸、牡丹皮中的有效成分马钱苷和芍药苷为测定标准。马钱苷和芍药苷性质比较稳定,容易检测。选择得膏率、总苷的量及总皂苷的量为指标,由于本方中皂苷的量较少,所以设其权重系数为 0.3。马钱苷和芍药苷均属于总苷范围,所以加权时没有考虑它们。

用 DPS 软件处理后,马钱苷和总苷的最佳提取溶剂条件为分别为 57 % 和 58% 乙醇溶液,总皂苷的最佳条件为 63% 乙醇,芍药苷为 46% 乙醇,由综合得分筛选的最佳条件为 58% 乙醇,由于皂苷的量较少,最终选择 58% 乙醇提取; 其他的各条件均选择了软件处理后的最大值。验证试验的结果显示,马钱苷、总苷和总皂苷的量较均匀设计试验各结果都好,而芍药苷的量略低,提示芍药苷的提取条件中,乙醇体积分数占重要因素。

参考文献:

- [1] Che W J, He X Z, Jiang J P, *et al.* Preliminary study on treatment of partial androgen deficiency in aging males with Jingui Shenqi Pill [J]. *Chin J Integr Med*, 2005, 11(4): 300-302.
- [2] 虞孝萼. 金匱肾气丸新用[J]. 安徽中医学院学报, 1999, 18(6): 40.
- [3] 张家玮, 张爱林. 金匱肾气丸药理研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2001(9): 408-409.
- [4] 刘浙伟. 金匱肾气丸为主改善老年 SOD、LOP 等衰老指标的观察[J]. 新中医, 1996(11): 59-60.
- [5] 汪少林, 汪培玲, 于海燕, 等. 金匱肾气丸临床应用[J]. 甘肃中医学院学报, 2002, 19(3): 34-36.
- [6] 赵伟峰, 曲立文. 金匱肾气丸与硝基吡啶治疗老年尿频[J]. 中华医学全科杂志, 2003, 2(9): 63.
- [7] 李鑫辉, 杜建芳. 金匱肾气丸治疗老年病的研究摘要[J]. 中医药学刊, 2004, 22(3): 480-481.
- [8] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [9] 熊善丽, 赵毅民, 栾新慧, 等. RP-HPLC 测定六味地黄方中苷类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(8): 735-737.
- [10] 范玉奇. 复方天麻滴丸的工艺制备及质量标准的制定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2006.
- [11] 韩志慧, 张景伟, 赵玉丛, 等. 7 种山茱萸总皂苷提取分离方法效果比较[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(3): 467-468.

《中草药》重要启事

从 2008 年第 1 期开始本刊所刊用文章文后的参考文献使用原语种撰写,按照国家标准《参考文献著录规则》(GB/T 7714-2005)书写。具体参考文献书写示范例见本刊 2008 年第 39 卷第 1 期上刊登的“《中草药》杂志 2008 年投稿须知”。