

# 骨疏丹闪式提取工艺优化

刘彦杉, 信长颖, 熊志立, 郭兴杰, 李发美\*  
(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 优化骨疏丹闪式提取工艺。方法: 以骨疏丹中总黄酮、总香豆素含量, 柚皮苷、朝藿定 B、淫羊藿苷、蛇床子素和丹参酮 II<sub>A</sub> 含量之和及浸膏率为评价指标, 对骨疏丹的闪式提取工艺进行考察。结果: 最佳提取工艺为 12 倍量 75% 乙醇, 闪式提取 3 次, 每次 2 min。按最佳工艺所得总黄酮质量分数 26.27 mg·g<sup>-1</sup>, 总香豆素 17.93 mg·g<sup>-1</sup>, 柚皮苷、朝藿定 B 等 5 个成分含量之和 9.213 mg·g<sup>-1</sup>, 浸膏率 23.50%。结论: 优选出的闪式提取方法稳定性好、简便可行。

**[关键词]** 骨疏丹; 正交设计; 闪式提取; 回流提取

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0020-05

## Optimization of Extraction Technology of Gushudan by Smashing Extraction Method

LIU Yan-shan, XIN Chang-ying, XIONG Zhi-li, GUO Xin-jie, LI Fa-mei\*  
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of Gushudan by smashing extraction method. **Method:** Smashing extraction technology of Gushudan was studied by the content of total flavonoids and total coumarins, the total contents of naringin, epimedin B, icariin, osthole and tanshinone II<sub>A</sub>, and extract ratio from Gushudan as indexes. **Result:** Optimum extraction technology was as follows: smashing extracted 3 times with 12 times the amount of 75% ethanol as dissolvent, 2 minutes every time. The content of total flavonoids, total coumarins, total contents of naringin, epimedin B, icariin, osthole and tanshinone II<sub>A</sub>, and extract ratio were 26.27, 17.93, 9.213 mg·g<sup>-1</sup>, and 23.50% respectively. **Conclusion:** Optimum smashing extraction technology was stable and easy.

**[Key words]** Gushudan; orthogonal design; smashing extraction; reflux extraction

骨疏丹是本课题组研发的一种治疗骨质疏松症的中药小复方, 由淫羊藿、蛇床子、骨碎补和丹参 4 味中药组成<sup>[1]</sup>。骨疏丹可提高强的松龙所致实验性骨质疏松大鼠骨钙、骨磷、血骨钙素的含量, 增加骨密度, 提高骨生物力学, 有明显的防治骨质疏松作用<sup>[2]</sup>。本课题组在骨疏丹促成骨细胞活性增殖试

验<sup>[3]</sup>中发现, 骨疏丹中主要有效成分为淫羊藿苷、朝藿定 A、B、C、柚皮苷和北美圣草苷蛇床子素和欧前胡素, 故以总黄酮、总香豆素含量, 柚皮苷、朝藿定 B、淫羊藿苷、蛇床子素和丹参酮 II<sub>A</sub> 含量之和及浸膏率为考察指标, 对骨疏丹的提取工艺进行研究。闪式提取法集粉碎、浸泡、搅拌、振动等技术优势于一体, 提取时间很短, 不但避免了不耐热成分的破坏, 且收率高, 操作简便, 有利环保<sup>[4]</sup>。本实验在前期对骨疏丹乙醇加热回流提取研究的基础上, 引入闪式提取法, 对骨疏丹的提取工艺进行进一步研究。

### 1 材料

JHBE-50S 型闪式提取器 (河南金鼎科技发展有限公司), AL104 型精密电子天平 (上海实干电子衡器有限公司), 752 型紫外-可见分光光度计 (上海

**[收稿日期]** 20110527(013)

**[基金项目]** 辽宁省国家创新药物孵化(本溪)基地建设项目 (2010ZX09401-304)

**[第一作者]** 刘彦杉, 硕士, 从事药物分析学研究, Tel: 13842067091, E-mail: liuyansha7750@yahoo.cn

**[通讯作者]** \*李发美, 教授, 博士生导师, 从事药物分析与中药现代化研究, Tel: 024-23986289, E-mail: lifameili@syphu.com.cn

光谱仪器有限公司),Jasco PU-980 型高效液相色谱仪(Jasco UV-975 型检测器,Ic2001 Plus 型柱温箱,ANASTAR 色谱工作站,天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

朝藿定 B 对照品(批号 A0229,纯度 $\geq 98\%$ ,成都曼斯特生物科技有限公司),淫羊藿苷、柚皮苷、蛇床子素、丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品(均购于中国药品生物制品检定所,批号 110727-200415,110722-200610,110822-200305,110766-200518),乙腈、甲醇、冰乙酸为色谱纯,乙醇为分析纯,水为重蒸水,淫羊藿药材购自亳州,骨碎补药材购自河北,丹参药材购自山东,蛇床子药材购自江苏,分别经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim 的干燥地上部分,水龙骨科植物榭蕨 *Drynaria fortunei* (Kunae) J. Sm. 的干燥根茎,唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实。

## 2 方法与结果

### 2.1 骨疏丹中总黄酮含量测定

**2.1.1 对照品贮备液的制备** 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇配成  $234 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品贮备液。

**2.1.2 空白溶液的制备** 精密量取  $1\% \text{ AlCl}_3$  甲醇溶液  $1.0 \text{ mL}$  于  $10 \text{ mL}$  棕色量瓶中,甲醇定容,摇匀,室温放置  $15 \text{ min}$ 。

**2.1.3 标准曲线的绘制** 精密量取淫羊藿苷对照品贮备液  $0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 \text{ mL}$  于  $10 \text{ mL}$  棕色量瓶中,加入  $1\% \text{ AlCl}_3$  甲醇溶液  $1.0 \text{ mL}$ ,摇匀,甲醇定容,摇匀,室温放置  $15 \text{ min}$ 。于  $414 \text{ nm}$  处进行测定。以淫羊藿苷质量浓度为横坐标,吸光度  $A$  为纵坐标,求得回归方程  $Y = 0.016 2X + 0.014 9$  ( $r = 0.999 3$ ),结果表明淫羊藿苷在  $9.36 \sim 46.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与吸光度呈良好线性关系。

**2.1.4 样品测定** 精密量取供试品溶液  $1 \text{ mL}$  于  $10 \text{ mL}$  棕色量瓶中,加入  $1\% \text{ AlCl}_3$  甲醇溶液  $1.0 \text{ mL}$ ,摇匀,甲醇定容,摇匀,室温放置  $15 \text{ min}$ ,于  $414 \text{ nm}$  处进行测定吸光度。

### 2.2 骨疏丹中总香豆素含量测定

**2.2.1 对照品贮备液的制备** 精密称取蛇床子素对照品适量,加甲醇配成  $114 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品贮备液。

**2.2.2 标准曲线的绘制** 精密量取蛇床子素对照品贮备液  $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 \text{ mL}$  于  $10 \text{ mL}$

棕色量瓶中,甲醇定容,摇匀,于  $320 \text{ nm}$  处进行测定。以蛇床子素质量浓度为横坐标,以吸光度  $A$  为纵坐标,得回归方程  $Y = 0.071 8X - 0.009 2$  ( $r = 0.999 8$ ),结果表明蛇床子素在  $2.28 \sim 13.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与吸光度呈良好线性关系。

**2.2.3 样品制备** 精密量取供试品溶液  $0.4 \text{ mL}$  于  $10 \text{ mL}$  棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀。

### 2.3 HPLC 测定骨疏丹中 5 种有效成分的含量

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ),流动相乙腈(A)- $1.5\%$  冰乙酸水溶液(B),梯度洗脱( $0 \sim 19 \text{ min}, 18\% \sim 19\% \text{ A}; 20 \sim 35 \text{ min}; 28\% \sim 28\% \text{ A}; 37 \sim 50 \text{ min}, 50\% \sim 70\% \text{ A}; 54 \sim 55 \text{ min}, 70\% \sim 80\% \text{ A}; 55 \sim 65 \text{ min}, 80\% \sim 80\% \text{ A}$ ),检测波长  $270 \text{ nm}$ ,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $20 \mu\text{L}$ 。

**2.3.2 混合对照品储备液的制备** 精密称取柚皮苷、朝藿定 B、淫羊藿苷、蛇床子素、丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品适量,置于  $10 \text{ mL}$  棕色量瓶中,甲醇定容,柚皮苷、朝藿定 B、淫羊藿苷、蛇床子素、丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品质量浓度分别为  $0.160, 0.306, 0.234, 0.228, 0.102 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,摇匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  避光保存。

**2.3.3 阴性样品溶液的制备** 按处方配比,分别制备缺淫羊藿、缺骨碎补、缺蛇床子、缺丹参阴性样品,按 2.2.1 项下方法制备,即得。

**2.3.4 系统适用性试验** 分别吸取混合对照品溶液,供试品溶液和阴性样品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件进样分析,结果见图 1。

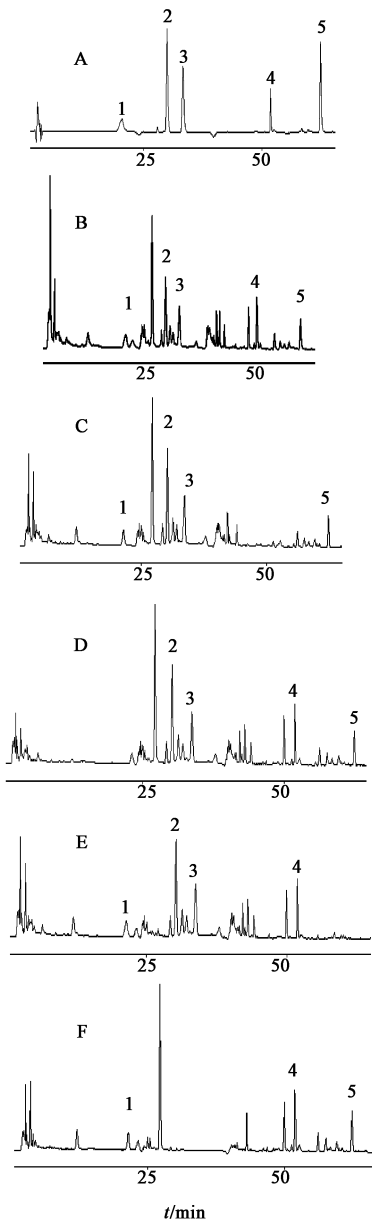
**2.3.5 线性关系考察** 精密吸取混合对照品储备液  $0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 \text{ mL}$  于  $10 \text{ mL}$  棕色量瓶中,用甲醇定容。按照 2.3.1 项下的色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得各对照品的回归方程及线性范围,结果如表 1,表明 5 种成分在各自线性范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

**2.3.6 样品测定** 精密吸取各供试品溶液  $20 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪,按 2.3.1 项下色谱条件进行测定,外标一点法计算含量。

**2.4 骨疏丹浸膏率测定** 精密量取供试品溶液  $25 \text{ mL}$ ,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴挥干,于烘箱中  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  烘  $3 \text{ h}$ ,移置干燥器中,冷却  $30 \text{ min}$ ,称重,计算浸膏率。

### 2.5 提取方法的考察

**2.5.1 回流提取法** 精密称取全方样品约  $5 \text{ g}$ ,加 12 倍量  $75\%$  乙醇水浴回流 3 次,每次  $90 \text{ min}$ ,合并 3



A. 对照品; B. 供试品; C. 缺蛇床子阴性样品;  
D. 缺骨碎补阴性样品; E. 缺丹参阳性样品; F. 缺淫羊  
藿阴性样品; 1. 柚皮苷; 2. 朝藿定 B;  
3. 淫羊藿苷; 4. 蛇床子素; 5. 丹参酮 II<sub>A</sub>

图 1 骨疏丹 HPLC

表 1 骨疏丹中 5 种有效成分的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围 /mg · L <sup>-1</sup>
柚皮苷	$Y = 1.626X \times 10^4 - 2.042 \times 10^4$	0.999 4	3.20 ~ 48.0
朝藿定 B	$Y = 2.329X \times 10^4 - 3.974 \times 10^4$	0.999 4	6.12 ~ 91.8
淫羊藿苷	$Y = 2.627X \times 10^4 - 3.501 \times 10^4$	0.999 4	4.68 ~ 70.2
蛇床子素	$Y = 9.639X \times 10^3 - 1.435 \times 10^4$	0.999 2	4.56 ~ 68.4
丹参酮 II <sub>A</sub>	$Y = 5.751X \times 10^4 - 2.617 \times 10^4$	0.999 5	2.04 ~ 30.6

精密量取定容好的供试品溶液 4 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 75% 乙醇定容, 供分析所用。

**2.5.2 闪式提取法** 精密称取全方样品约 5 g, 加入 12 倍量 75% 乙醇闪式提取 3 次, 每次 2 min, 合并 3 次的提取液于 200 mL 棕色量瓶中, 75% 乙醇定容。精密量取定容好的供试品溶液 4 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 75% 乙醇定容, 供分析所用。

**2.5.3 提取方法的比较** 按 2.5.1 和 2.5.2 项下方法制备供试液, 按照 2.1.4, 2.2.3, 2.3.6 和 2.4 项下的方法测定回流提取法与闪式提取法中总黄酮分别为 27.12, 26.02 mg · g<sup>-1</sup>; 总香豆素分别为 14.91, 17.21 mg · g<sup>-1</sup>; 5 个有效成分含量之和分别为 10.09, 9.02 mg · g<sup>-1</sup>; 浸膏率分别为 24.29%, 23.50%。从结果可知回流提取所得总黄酮含量高于闪式提取法 4.23%, 5 个成分含量之和高于闪式提取 11.9%, 浸膏率高于闪式提取法 3.36%, 而闪式提取法总香豆素含量高于回流提取法 15.4%, 且闪式提取法提取时间短。综合比较, 闪式提取法提取效率高、省时、节能, 故对骨疏丹的闪式提取法进行进一步优化。

## 2.6 闪式提取法的优化试验

**2.6.1 正交试验设计** 以总黄酮含量、总香豆素含量、5 个成分含量之和、浸膏率为考察指标, 对闪式提取法进行优化试验, 选择提取次数, 提取时间, 溶剂倍量为考察因素, 每个因素考察 3 个水平, 选择 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验, 因素及水平见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4 ~ 7。

表 2 骨疏丹闪式提取法正交试验因素水平

水平	A 提取次数/次	B 提取时间/min	C 溶剂倍量/倍
1	1	1	10
2	2	2	12
3	3	3	14

通过直观分析可知, 各因素对总黄酮含量, 总香豆素含量, 5 个成分含量之和及浸膏率的影响次序均为 A > B > C。对于总黄酮含量最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 总香豆素含量最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, 5 个成分含量之和的最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, 浸膏率的最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>。结合方差分析结果, 可知 A 和 B 因素对总香豆素含量有显著性影响, 而 A, B, C 3 个因素对总黄酮含量、5 个成分含量之和及浸膏率均无显著性影响, 结合节约成本综合分析确定最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, 即 12 倍量的 75% 乙醇提取 3 次, 每次提取 2 min。

次的提取液于 200 mL 棕色量瓶中, 75% 乙醇定容。

表3 骨疏丹闪式提取法正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮 /mg·g <sup>-1</sup>	总香豆素 /mg·g <sup>-1</sup>	5个成分之 和/mg·g <sup>-1</sup>	浸膏率 /%
1	1	1	10	1	17.76	14.24	8.180	18.39
2	1	2	12	2	20.45	15.77	8.240	20.80
3	1	3	14	3	19.28	15.75	8.124	20.17
4	2	1	12	3	17.54	15.42	8.272	19.98
5	2	2	14	1	22.45	16.97	9.012	23.13
6	2	3	10	2	22.22	16.47	8.578	21.81
7	3	1	14	2	21.87	16.73	8.558	22.81
8	3	2	10	3	22.42	17.21	8.719	22.59
9	3	3	12	1	25.74	17.73	8.803	24.00
总黄酮	K <sub>1</sub>	19.16	19.06	20.80	21.98			
	K <sub>2</sub>	20.73	21.77	21.24	21.51			
	K <sub>3</sub>	23.34	22.41	21.20	19.75			
	R	4.180	3.356	0.443	2.236			
总香豆素	K <sub>1</sub>	15.25	15.46	15.97	16.31			
	K <sub>2</sub>	16.29	16.65	16.31	16.32			
	K <sub>3</sub>	17.22	16.65	16.48	16.13			
	R	1.970	1.187	0.570	0.196			
5个成分之和	K <sub>1</sub>	8.180	8.337	8.493	8.663			
	K <sub>2</sub>	8.620	8.657	8.437	8.460			
	K <sub>3</sub>	8.693	8.500	8.563	8.370			
	R	0.513	0.320	0.126	0.293			
浸膏率	K <sub>1</sub>	19.79	20.39	20.93	21.84			
	K <sub>2</sub>	21.64	22.18	21.59	21.81			
	K <sub>3</sub>	23.14	21.99	22.04	20.91			
	R	3.346	1.781	1.104	0.930			

表4 总黄酮含量方差分析

方差来源	SS	f	F
A	26.742	2	3.205
B	19.057	2	2.284
C	0.358	2	0.043
误差	8.345	2	1.000

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$  (表5~7同)。

表5 5个成分含量之和方差分析

方差来源	SS	f	F
A	0.462	2	3.422
B	0.154	2	1.141
C	0.024	2	0.178
误差	0.14	2	

表6 总香豆素含量方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	5.826	2	78.730	<0.05
B	2.816	2	38.054	<0.05
C	0.402	2	5.432	
误差	0.07	2		

表7 浸膏率方差分析

方差来源	SS	f	F
A	16.855	2	10.099
B	5.766	2	3.455
C	1.851	2	1.109
误差	1.67	2	

**2.7 最佳提取工艺验证** 根据筛选得到的最佳工艺  $A_3B_2C_2$ , 进行3批验证试验, 得总黄酮含量为  $26.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD 0.6%), 总香豆素含量为  $17.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD 1.4%), 5个成分含量之和为  $9.213 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD 0.9%), 浸膏率为 23.50% (RSD 2.4%)。由于最佳提取工艺提取次数选择提取3次, 为边界值, 所以又以12倍量的75%乙醇提取4次, 每次提取2min进行试验, 结果为总黄酮质量分数  $26.91 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 总香豆素质量分数  $18.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 5个成分含量之和为  $9.358 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 浸膏率为 23.85%。提取4次与提取3次相比, 各考察指标略有提高, 但无显著性差异, 从缩短工时、提高效率、节

# 均匀设计法优选党参茯苓水溶性多糖的微波提取工艺

王秀文, 王颖莉\*, 裴晓丽, 高宏  
(山西中医学院, 太原 030024)

**[摘要]** 目的: 优选微波法提取党参、茯苓混合水溶性多糖的适宜条件。方法: 采用均匀设计法考察微波功率、提取时间、料液比和提取次数4个因素对混合多糖含量的影响。结果: 最佳微波提取工艺条件为微波功率130 W, 提取时间6 min, 料液比1:40 ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 提取3次。微波混合多糖的提取率15.79%; 传统混合多糖的提取率为15.11%。红外光谱图分析表明微波提取基本没有破坏多糖的结构。结论: 微波提取的混合多糖含量和传统提取的混合多糖含量无显著性差异, 但微波提取迅速、方法简便, 适合工业化生产。

**[关键词]** 党参; 茯苓; 混合多糖; 均匀设计法; 微波; FTIR

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0024-04

## Optimization of Microwave Extraction Technology for Water Soluble Polysaccharides from *Codonopsis pilosula* and *Poria Cocos* by Uniform Design Method

WANG Xiu-wen, WANG Ying-li\*, PEI Xiao-li, GAO Hong  
(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize microwave extraction conditions of mixed water-soluble from *Codonopsis pilosula* and *Poria cocos*. **Method:** Uniform design method was used to investigate effects of microwave power, extraction time, ratio of solid-solvent and extraction times on the content of mixed polysaccharide. **Result:** Optimum microwave extraction technology conditions were as follows: microwave power was 130 W, extraction time was 6 min, ratio of solid-solvent was 1:40 ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), extraction times was 3 times, yield of mixed water-soluble

**[收稿日期]** 20110722(012)

**[基金项目]** 山西省科技厅科技攻关项目(20100311090); 太原市科技局项目(110148092)

**[第一作者]** 王秀文, 硕士, 讲师, 从事中药分析方面的教学和研究, Tel: 13753109982, E-mail: wangxw81@126.com

**[通讯作者]** \* 王颖莉, 硕士, 副教授, 从事中药剂型、中药药效物质基础研究, Tel: 13934161264, E-mail: wyltyut@163.com

约成本考虑, 提取次数选用3次。

### 3 讨论

实验首次应用闪式提取法对骨疏丹的提取工艺进行探讨, 结果表明该方法优于传统的回流提取法, 为骨疏丹的提取提供了一种高效、简便易操作的新方法。闪式提取法大大缩短了提取时间, 同时最大程度避免了对有效成分的破坏, 是一种对有效成分快速、强化提取的方法, 具有提取效率高, 常温操作、环保等优点, 在中药和天然药物的提取工艺中越来越受到人们的关注<sup>[5]</sup>。

### [参考文献]

[1] 李发美, 孟繁浩, 梁茂新, 等. 治疗骨质疏松症的中药

小复方及其制法: 中国, 200410021121.0 [P]. 2004-12-29.

[2] 张丹, 刘铮, 李发美, 等. 骨疏丹抗骨质疏松的药理作用[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1205.

[3] 孟繁浩. 中药精选小复方骨疏丹促成骨细胞骨形成作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.

[4] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 401.

[5] 汤芳玲, 袁波, 蔡光明, 等. 小叶黑柴胡中柴胡皂苷的闪式提取工艺的研究[J]. 中草药, 2009, 40(S1): 160.

[责任编辑 全燕]