

多指标综合评价南五味子木脂素提取工艺

邓翀*, 颜永刚, 梁婷, 陈丽丽
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 筛选出提取南五味子总木脂素的最佳工艺。方法: 采用紫外分光光度法和 HPLC 法相结合对南五味子总木脂素进行检测, 以回流提取方法, 采用正交试验设计, 以提取时间、乙醇体积分数、溶媒用量、提取次数为因素, 分别以总木脂素、五味子甲素、五味子酯甲为评价指标, 确定最佳提取条件; 结果: 用 55% 乙醇, 溶媒用量为 16 倍, 提取时间为 60 min, 提取次数为 2 次效果最好。结论: 采用多指标综合评价法能够更客观优化南五味子总木脂素工艺条件的提取工艺, 为南五味子总木脂素分离纯化研究提供参考。

[关键词] 正交试验; 南五味子; 总木脂素; 综合评价

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0004-03

Multi-index Evaluation of Extraction Process of Total Lignans from *Schisandra sphenanthera*

DENG Chong*, YAN Yong-gang, LIANG Ting, CHEN Li-li
(Shaanxi Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extract process of total lignans from *Schisandra sphenanthera*. **Method:** The best extraction conditions were determined by ultraviolet spectrophotometry method and HPLC method based on the test of total lignans from *S. sphenanthera*; and the orthogonal experiment design was used with a total lignans, fructus schisandrae chinensis and schizandrol A as evaluation indexes, using reflux extraction method with extraction time, ethanol concentration, solvent dosage, extraction times as factors. **Result:** The optimal extracting process was as follows: 16 times of 55% ethanol solvent consumption, extracted for 60min with 2 times. **Conclusion:** The extraction process of *Schisandra sphenanthera* objectively optimized by multi-index synthetic evaluation method can provide the reference for the purification research of total lignans from *S. sphenanthera*.

[Key words] orthogonal experiment; *Schisandra sphenanthera*; total lignan; comprehensive evaluation

南五味子为木兰科植物华中五味子 (*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.) 的干燥成熟果实。具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效, 用于久嗽虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止、自汗、盗汗、津伤口渴、气短脉虚、内热、消渴、心悸失眠等证^[1]。由于传统上南五味子同北五味子均以五味子用药, 且认为北五味子的质量优于南五味子, 因此南五味子的

应用受到限制, 对其开发与应用研究亦很少。据文献报道, 南五味子在抗肝损伤、抗氧化等方面具有显著药理作用^[2], 为了促进南五味子研究应用开发, 本文考察不同提取条件对其木脂素类成分提取的影响, 采用正交试验方案, 以总木脂素及五味子酯甲、五味子甲素为指标, 以分光光度法及高效液相色谱法为测定手段, 对其提取工艺进行了实验研究, 为南五味子木脂素类化学成分提取分离提供依据。

1 材料

UV-1102 紫外分光光度仪 (上海天美科学仪器有限公司), 高效色谱仪 (L-2130 二元泵, L-2400 检测器, 日本日立公司), GV-1102 电子天平 (武汉红旗光学仪器厂)。

[收稿日期] 20101224(002)

[基金项目] 国家自然科学基金 (30902002); 陕西省中医药管理局项目 (jc65)

[通讯作者] * 邓翀, 博士, 讲师, 研究方向: 中药质量标准及中药体内分析, Tel: 029-38185165, E-mail: fmmudz217@126.com

南五味子药材(市售,经陕西中医学院生药教研室王继涛高级实验师鉴定),五味子酯甲(批号 11529-200503)、五味子甲素(批号 110764-200609),均由中国药品生物制品检定所提供,甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取五味子甲素、五味子酯甲各约 5.0 mg,分别置于 10 mL 的量瓶中,用 95% 乙醇溶解,定容至刻度,于 4 ℃ 冷藏待用。五味子甲素对照品溶液的质量浓度 $0.564 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,五味子酯甲对照品溶液为 $0.482 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取南五味子药材粉末(60 目筛)约 5 g,以适当的溶剂为提取溶媒,按照试验设计的方法进行提取,滤过,提取液在 80 ℃ 水浴浓缩,挥干溶媒,以 95% 溶解,定容于 50 mL 量瓶中。储存于 4 ℃,冷藏待用。

2.2 南五味子总木脂素分析定方法建立

2.2.1 标准曲线 精密吸取五味子酯甲对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,80 ℃ 水浴挥干,分别加入 0.5 mL 10% 变色酸溶液,3 mL 浓硫酸,1.5 mL 蒸馏水,置沸水浴中加热 30 min;以第一管为空白,在 570 nm 处测定吸光度^[3]。得到标准曲线 $Y = 0.1561X + 0.026$ ($r = 0.9997$),五味子酯甲在 9.641 ~ 77.122 μg 线性关系良好。

2.2.2 精密度试验 精密吸取五味子酯甲对照品溶液 0.4 mL 置于 10 mL 的量瓶中,按 2.2.1 项下测定方法测定,连续 5 次重复测定。结果表明精密度良好,RSD 0.666%。

2.2.3 稳定性试验 精密吸取五味子酯甲对照品溶液 0.4 mL 置于 10 mL 的量瓶中,按 2.2.1 项下测定方法在(10, 20, 30, 40, 50, 60 min)不同时间内测定吸光度。计算,RSD 0.355%。结果表明五味子酯甲稳定性较好。

2.2.4 回收率试验 取已知含量的样品 6 份,每份 2.5 g,精密加入一定量五味子酯甲对照品溶液,以正交试验设计 5 号样品制备方法,照 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下测定方法测定平行测定 6 份样本。回收率试验表明,五味子酯甲回收率为 $(102.438 \pm 3.687)\%$,RSD 3.490%。

2.2.5 总木脂素含量测定方法 每批样品分别精

密称取 2 份,按 2.1.2 项下方法制备样品溶液,并按 2.2.1 项下测定方法测定,按标准曲线法以吸光度计算各组分含量。

2.3 HPLC 测定木脂素方法的建立

2.3.1 色谱条件 依利特 ODS C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(0.2% 磷酸),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 30% ~ 42% A; 10 ~ 20 min, 42% ~ 52% A; 20 ~ 40 min, 52% ~ 50% A; 40 ~ 50 min, 50% ~ 50% A; 50 ~ 60 min, 50% ~ 55% A; 60 ~ 70 min, 55% ~ 70% A; 70 ~ 75 min, 70% ~ 85% A; 75 ~ 85 min, 85% ~ 100% A),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 230 nm,进样量 10 μL 。

2.3.2 标准曲线 吸取混合对照品溶液 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μL 分别进样,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品的进样量为横坐标进行线性回归,得五味子甲素回归方程 $Y = 3 \times 10^6 X - 3.4 \times 10^4$ ($r = 0.9999$);五味子酯甲回归方程 $Y = 2 \times 10^6 X + 8.5 \times 10^3$ ($r = 0.9998$),线性范围分别为 0.511 ~ 4.0913 μg , 0.533 ~ 4.262 μg 。

2.3.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 5 次,记录峰面积,结果五味子酯甲、五味子甲素 RSD 分别为 2.153%, 1.468%。

2.3.4 回收率试验 取已知含量的样品 6 份,每份 2.5 g,精密加入一定量混合对照品溶液,以正交试验设计 5 号样品制备方法,照 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下测定方法测定平行测定 6 份样本。回收率试验表明,五味子酯甲、甲素回收率分别为 $(101.23 \pm 4.288)\%$, $(98.586 \pm 3.455)\%$,RSD 分别为 4.599%, 3.911%。

2.3.5 HPLC 含量测定方法 每批样品分别精密称取 2 份,按 2.1.2 项下方法制备样品溶液,并按 2.3.1 项下色谱条件,进样,按外标法以峰面积计算各组分含量。

2.4 正交试验设计 选取提取时间,乙醇体积分数,溶媒用量,提取次数 4 个因素,以木脂素含量作为评价指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。水平因素见表 1。

2.4.1 综合评分方法 权重分配五味子酯甲占 0.1,五味子甲素占 0.1,总木脂素占 0.8。具体计算方法是首先由 9 个样本对每一化学成分的提取率除以该化学成分 9 个样本内最大的提取率,然后乘以权重系数,得到该化学成分在该样本综合评分的贡

表 1 南五味子乙醇提取工艺因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 提取时间 /min	C 提取次数 /次	D 溶媒用量 /倍量
1	95	30	3	16
2	75	60	2	12
3	55	90	1	8

献值。同一样本中各化学成分贡献值相加,即为该样本的综合评分。如第 2 份样品综合评分 = $(0.469/0.472) \times 0.1 + (0.253/0.253) \times 0.1 + (4.793/8.179) \times 0.8 = 0.668$

2.4.2 正交试验结果 由表 2 中极差分析结果可知,各因素对木脂素的得率影响主次顺序为 $D > A > C > B$ 即溶媒用量 > 乙醇体积分数 > 次数 > 回流时间。应选 $A_3B_2C_2D_1$ 为总木脂素提取的最佳方案。以 B 因素为误差性进行方差估算,见表 3,表明乙醇体积分数和溶媒用量对提取结果的影响具有极显著性意义。

表 2 南五味子乙醇提取工艺正交试验及结果

No.	A	B	C	D	酯甲 /%	甲素 /%	总木 脂素 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	0.472	0.244	5.979	0.781
2	1	2	2	2	0.469	0.253	4.793	0.668
3	1	3	3	3	0.384	0.191	5.838	0.727
4	2	1	2	3	0.458	0.228	7.683	0.938
5	2	2	3	1	0.405	0.240	7.870	0.950
6	2	3	1	2	0.419	0.222	5.994	0.762
7	3	1	3	2	0.428	0.242	5.776	0.751
8	3	2	1	3	0.447	0.243	7.758	0.949
9	3	3	2	1	0.440	0.205	8.179	0.974
K_1	0.725	0.823	0.831	0.902				
K_2	0.884	0.856	0.860	0.727				
K_3	0.892	0.822	0.810	0.872				
R	0.166	0.034	0.050	0.175				

2.5 验证试验 根据正交试验结果对 $A_3B_2C_2D_1$ 工艺条件重复 3 次试验,以验证该工艺的合理性和稳定性,结果无显著性差异, RSD 1.21%,测得总木脂素的平均质量分数为 8.014%。最后确定的最佳提取工艺为用 16 倍 55% 乙醇提取 60 min, 2 次。

表 3 综合评分方差分析

因素	SS	f	F	P
A	17.54×10^{-3}	2	23.545	<0.05
B(误差)	0.745×10^{-3}	2	1.000	
C	1.285×10^{-3}	2	1.726	>0.05
D	17.427×10^{-3}	2	23.393	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

3 讨论

查阅文献发现,对南五味子木脂素提取工艺报道中提取条件差异较大。文献报道有采用 4 倍量 80% 乙醇,回流提取 3 次,每次 1.5 h^[4],采用 50% 乙醇 8 倍量回流提取 1 次^[5],及采用加 11.2 倍量 62% 乙醇溶液回流提取 2 次,每次 3.00 h^[6],提取南五味子木脂素类化学成分。

本研究根据五味子的有效成分及所含油类物质的理化性质,经过摸索比较,采用正交试验,考察五味子乙醇回流提取木脂素的工艺条件,结果表明按工艺 $A_3B_2C_2D_1$ 即就是加 16 倍 55% 乙醇提取 60 min, 2 次的提取工艺提取出药材的转移率较高提取工艺较好。

本实验采用分光光度法和 HPLC 法对五味子中木脂素进行测定,并结合多指标综合加权评分的方法对木脂素的提取因素进行考察,该方法较准确,重现性较好。所以,以多指标综合加权评分为评价指标,用正交设计法为实验设计方法来优选五味子中木脂素的提取工艺,其结果较单一指标的评价更为科学合理。

【参考文献】

- [1] 魏景文. 五味子药理研究新进展[J]. 天津药学, 2009, 21(5):55.
- [2] 肖培根. 新编中药志. 第 2 卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 435.
- [3] 陆兔林, 毛春芹, 路长珍, 等. 不同产地五味子药材中木脂素类成分比较[J]. 医药导报, 2009, 28(5):547.
- [4] 宋小妹, 曹林林, 董彬彬. 南五味子有效成分的提取工艺研究[J]. 现代中医药, 2003(5):74.
- [5] 季金美, 姜秋风. 正交试验法优化五味子中总木脂素的提取工艺[J]. 青海师范大学学报, 2008(1):43.
- [6] 肖莉, 张韵慧. 星点设计-效应面法优选南五味子的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):22.

[责任编辑 全燕]