

## 多指标综合加权评分法优选五味子与丹参混合醇提工艺研究

王雪<sup>1</sup>, 焦连庆<sup>1,2</sup>, 于敏<sup>2</sup>, 尹春梅<sup>1\*</sup>

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林省中医药科学院植物化学所, 吉林 长春 130012

**摘要:** **目的** 通过多指标综合加权评分法优选五味子与丹参混合醇提工艺, 确定最佳提取工艺参数; 通过 DAD 检测器优选最佳测定波长。**方法** 单独和混合提取采用 90%、70%、50%乙醇回流提取。优化工艺采用正交试验法, 以乙醇体积分数、溶剂倍数、提取时间和提取次数为考察因素, 以五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 及丹酚酸 B 的量为考察指标, 采用 HPLC 法, DAD 检测器进行检测, 综合加权评分法进行数据分析。**结果** 混合提取五味子和丹参药材有效成分的提取率比单独提取更高; 最佳工艺参数为 90%乙醇回流提取 3 次, 溶剂倍数为 8 倍量, 每次 1.5 h。**结论** 五味子与丹参混合提取工艺简单、可行, 有效成分提取率更高。不同物质同时测定时采用不同波长可有效消除干扰, 准确性更高。**关键词:** 五味子; 丹参; 综合加权评分法; 正交试验; 五味子醇甲; 五味子酯甲; 五味子甲素; 五味子乙素; 丹参酮 II<sub>A</sub>; 丹酚酸 B

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)07-0998-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.011

## Optimization of ethanol extraction technique for *Schisandrae Fructus* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* by multi index comprehensive weighted score evaluation

WANG Xue<sup>1</sup>, JIAO Lian-qing<sup>1,2</sup>, YU Min<sup>2</sup>, YIN Chun-mei<sup>1</sup>

1. College of Chinese Material Medicines, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Institute of Plant Chemistry, Jilin Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China

**Abstract: Objective** To optimize the ethanol extraction technique for *Schisandrae Fructus* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* and confirm the optimum extraction process parameters by multi index comprehensive weighted score evaluation. **Methods** Alone and mixed extraction was carried out by using 90%, 70%, and 50% ethanol reflux extraction. Orthogonal test method was used to optimize the process with ethanol concentration, solvent ratio, extraction time, and extraction times as detecting factors and schisandrin, schisantherin A, deoxyschisandrin, schisandrin B, Tanshinone II<sub>A</sub>, and salvianolic acid B as examining indexes, the detection was carried out by HPLC and DAD detector. The data were analyzed by multi index comprehensive weighted score evaluation. **Results** The effective composition contents of mixed extract from *Schisandrae Fructus* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* were more than alone extracting. The best extraction conditions were solvent ratio of 1 : 8 with 90% ethanol reflux extraction for three times, and 1.5 h each time. **Conclusion** The mixed extracting is simple and appropriate, the extraction yield of active ingredients by mixed extracting is more than alone extracting. Different materials with different wavelength can effectively eliminate the interference at the same time, the accuracy is higher.

**Key words:** *Schisandrae Fructus*; *Salviae Miltiorrhizae Radix*; comprehensive weighted scoring method; orthogonal test; schisandrin; schisantherin A; deoxyschisandrin; schisandrin B; tanshinone II<sub>A</sub>; salvianolic acid B

五味子 *Schisandrae Fructus* 为木兰科 (Magnoliaceae) 五味子属 *Schisandra* Michx. 植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成

熟果实。主要含有多糖、挥发油和木脂素类成分, 国内外已从五味子中分离出约 200 个成分, 其中 150 多个为木脂素类化合物<sup>[1]</sup>, 其为主要活性成分<sup>[2]</sup>。丹

收稿日期: 2014-12-13

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20130727084YY)

作者简介: 王雪 (1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为天然产物化学。Tel: 15143014536 E-mail: 15143014536@163.com

\*通信作者 尹春梅, 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物栽培育种及质量评价。Tel: 18943009604 E-mail: 18943009604@163.com

参 *Salvia Miltiorrhizae Radix* 为唇形科 (Labiatae) 植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。主要有效成分可分为脂溶性和水溶性两部分,前者主要为丹参酮类化合物,后者主要为丹酚酸类化合物<sup>[3]</sup>。目前,关于五味子、丹参配伍研究已有报道,王胜春等<sup>[4-6]</sup>对这两者配伍的药动学影响及慢性肝损伤进行了研究,证明两者配伍可提高生物利用度;宋九华等<sup>[7]</sup>对安神补心丸中主要成分五味子醇甲、丹参酮 II<sub>A</sub> 等的量进行了检测。五味子和丹参提取工艺的研究大多以五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 等为指标进行评价<sup>[8-11]</sup>,均为分别单独提取,未见有混合提取及与单独提取进行比较的研究报道。对五味子和丹参的提取物进行定量测定时,大多采用紫外检测器进行检测,本实验采用 DAD 检测器,对样品中不同成分采用不同波长进行测定,能更为准确地测定其量,为五味子和丹参配伍使用的质量控制提供依据。

## 1 仪器与材料

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪; BT25S 电子天平,塞多利斯科学仪器北京有限公司; UV1801 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司; ZK-82A 真空干燥箱,上海市实验仪器总厂; HH-6 数显恒温水浴锅,常州中捷实验仪器制造有限公司。

五味子、丹参药材于 2014 年 7 月 8 日购于吉林大药房,产地分别为吉林省和河北省,经吉林省中医药科学院牛志多研究员鉴定为五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实和丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹酚酸 B 均购于中国食品药物检定研究院,批号分别为 110857-201309、111529-201306、110764-201108、110765-201005、110766-201012、111652-201311,质量分数均大于 98%;其余试剂均为色谱纯或分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 的流动相为乙腈-水-冰醋酸 (60:40:0.1) 进行等浓度洗脱<sup>[7,12]</sup>;丹酚酸 B<sup>[13-14]</sup>的流动相为乙腈-0.05%磷酸,梯度洗脱程序:0~35 min, 19%~50%乙腈;35~36 min, 50%~100%乙腈;36~40 min, 100%~19%乙腈;体积流量均为 1

mL/min,柱温均为 35 °C,检测波长:五味子醇甲为 250 nm;五味子酯甲、五味子甲素及五味子乙素为 220 nm;丹参酮 II<sub>A</sub> 为 270 nm;丹酚酸 B 为 286 nm;进样量 20 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品适量置同一棕色量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为 58.0、51.2、86.0、130.0、66.4 μg/mL 的混合对照品溶液。精密称取丹酚酸 B 对照品适量,加甲醇使溶解,置 5 mL 量瓶中,制成质量浓度为 0.148 mg/mL 对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

**2.3.1 五味子、丹参单独提取液的制备** 分别精密称取丹参 0.30 g 3 份,五味子 0.15 g 3 份,分别置于 250 mL 圆底烧瓶中,每份丹参样品分别加入 90%、70%、50%乙醇 50 mL,每份五味子样品分别加入 90%、70%、50%乙醇 25 mL,加热回流提取 1 h,滤过,滤液分别转移至 50 mL 量瓶中,加相应试剂定容,摇匀。

**2.3.2 五味子、丹参混合提取液的制备** 分别精密称取丹参 0.30 g 3 份,五味子 0.15 g 3 份,混合均匀后,分别置于 250 mL 圆底烧瓶中,每份样品分别加入 90%、70%、50%乙醇 75 mL,加热回流提取 1 h,滤过,滤液转移至 100 mL 量瓶中,加相应试剂定容,摇匀。

吸取“2.3.1”和“2.3.2”项样品溶液,经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,备用。

### 2.4 不同体积分数乙醇对五味子、丹参药材单独提取以及混合提取的定量测定结果

结果见表 1。90%乙醇单独和混合提取五味子、丹参药材中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 的量均高于 70%和 50%乙醇提取;而丹酚酸 B 在 50%乙醇单独和混合提取时其量均高于 90%和 70%乙醇提取,并且其量的顺序为 50%乙醇>70%乙醇>90%乙醇,这是因为丹酚酸 B 为水溶性成分,所以在乙醇体积分数高时其量较低。90%乙醇混合提取五味子、丹参药材中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 的量均比 90%乙醇单独提取的量高;50%乙醇混合提取五味子、丹参药材中丹酚酸 B 的量也高于单独提取。综合上述实验结果说明五味子、丹参药材混合提取时各指标成分的量更高,因此正交试验中选择 2 种药材混合提取。

表1 单独提取和混合提取五味子、丹参药材的定量测定结果 (n = 3)

Table 1 Quantitative determination of alone and mixed extraction of *Schisandrae Fructus* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* (n = 3)

提取方法	乙醇体积分数/%	五味子醇甲/%	五味子酯甲/%	五味子甲素/%	五味子乙素/%	丹参酮 II <sub>A</sub> /%	丹酚酸 B/%
单独提取	90	0.40	0.12	0.10	0.38	0.36	1.26
	70	0.39	0.10	0.10	0.35	0.26	1.84
	50	0.35	0.09	0.09	0.34	0.13	1.90
混合提取	90	0.45	0.12	0.12	0.41	0.35	1.87
	70	0.33	0.09	0.11	0.38	0.33	1.98
	50	0.35	0.10	0.09	0.37	0.28	1.99

2.5 正交试验设计

将五味子药材粉成粗粉，过3号筛，精密称取9份，每份50g；丹参药材精密称取9份，每份100g，按照4因素3水平正交试验表中设计的方案进行回流提取，分别将提取液蒸干并进行减压干燥。精密称定各干燥物50mg，70%乙醇溶解，置5mL量瓶中，摇匀备用。醇提工艺条件采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验法优化选择。以五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub>及丹酚酸 B 的量为指标，考察了乙醇体积分数(A)、溶剂用量(B)、提取时间(h)及提取次数(D)4个因素，每个因素3个水平进行试验设计，见表2。

五味子、丹参药材中均含有大量的脂溶性(五味子中木脂素类，丹参中丹参酮类)和水溶性(五味子多糖，丹酚酸类)成分，本实验主要研究醇提取工艺，侧重脂溶性成分的提取，故五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub>

5种脂溶性成分的权重系数均为0.18。丹酚酸 B 为水溶性成分，不同体积分数乙醇亦能提取出来，故也作为评判指标之一，其权重系数相对上述5种脂溶性成分降低为0.10，关于五味子、丹参水提优化工艺另文发表。因此五味子醇甲(w<sub>1</sub>)、五味子酯甲(w<sub>2</sub>)、五味子甲素(w<sub>3</sub>)、五味子乙素(w<sub>4</sub>)、丹参酮 II<sub>A</sub>(w<sub>5</sub>)的权重系数为0.18，丹酚酸 B (w<sub>6</sub>)的权重系数为0.10。综合评分=0.18 w<sub>1</sub>/w<sub>1max</sub>+0.18 w<sub>2</sub>/w<sub>2max</sub>+0.18 w<sub>3</sub>/w<sub>3max</sub>+0.18 w<sub>4</sub>/w<sub>4max</sub>+0.18 w<sub>5</sub>/w<sub>5max</sub>+0.10 w<sub>6</sub>/w<sub>6max</sub>。综合加权评分法评价结果见表2和3。

从表3方差分析表中得出因素A和D有显著性差异，各因素对醇提效果的影响大小顺序为A>D>C>B，综上所述最佳工艺为A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>，即90%乙醇回流提取3次，料液比1:8，每次1.5h。

2.6 验证试验

称取同一批五味子药材粗粉3份，各50g，同

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验设计及实验结果 (n = 3)

Table 2 Design and results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test (n = 3)

试验号	A/%	B/倍	C/h	D/次	w <sub>1</sub> /mg	w <sub>2</sub> /mg	w <sub>3</sub> /mg	w <sub>4</sub> /mg	w <sub>5</sub> /mg	w <sub>6</sub> /mg	综合评分
1	90(1)	8(1)	2.0(1)	3(1)	1.78	0.66	0.46	1.52	0.40	21.98	0.96
2	90(1)	6(2)	1.5(2)	2(2)	1.64	0.68	0.45	1.41	0.28	16.75	0.87
3	90(1)	4(3)	1.0(3)	1(3)	1.04	0.51	0.37	1.20	0.10	4.10	0.58
4	70(2)	8(1)	1.5(2)	1(3)	1.12	0.43	0.30	0.82	0.17	12.28	0.56
5	70(2)	6(2)	1.0(3)	3(1)	1.16	0.36	0.29	0.80	0.29	17.62	0.61
6	70(2)	4(3)	2.0(1)	2(2)	1.25	0.49	0.33	0.93	0.49	14.12	0.73
7	50(3)	8(1)	1.0(3)	2(2)	0.86	0.25	0.18	0.49	0.18	14.80	0.42
8	50(3)	6(2)	2.0(1)	1(3)	0.71	0.22	0.13	0.40	0.13	13.26	0.34
9	50(3)	4(3)	1.5(2)	3(1)	1.23	0.37	0.25	0.68	0.25	9.89	0.54
K <sub>1</sub>	2.41	1.94	2.03	2.11							
K <sub>2</sub>	1.90	1.82	1.97	2.02							
K <sub>3</sub>	1.30	1.85	1.61	1.48							
R	1.11	0.12	0.42	0.63							

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

误差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.206	2	68.667	$P < 0.05$
C	0.034	2	11.333	
D	0.077	2	25.667	$P < 0.05$
B(误差)	0.003	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$   $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

一批丹参药材 3 份, 各 100 g, 按综合加权评分法最终确定的最佳工艺条件  $A_1B_1C_2D_1$  进行试验, 提取液分别减压干燥, 得浸膏, 研成细粉, 过 100 目筛, 测定五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丹参酮 II<sub>A</sub> 及丹酚酸 B 的量, 见表 4。

由表 4 可知, 按照综合加权评分法所得最佳工艺, 6 种化学成分的平均值与正交试验结果中的较高数据接近, 且 RSD 值小于 3.0%, 说明该工艺稳定可靠。

表4 验证试验结果

Table 4 Results of varification

批次	w <sub>1</sub> /mg	w <sub>2</sub> /mg	w <sub>3</sub> /mg	w <sub>4</sub> /mg	w <sub>5</sub> /mg	w <sub>6</sub> /mg
1	1.70	0.65	0.45	1.48	0.46	21.73
2	1.75	0.62	0.45	1.53	0.47	21.26
3	1.72	0.63	0.46	1.50	0.46	20.98
平均值	1.72	0.63	0.45	1.50	0.46	21.32
RSD/%	1.46	2.42	1.28	1.68	1.26	1.78

### 3 讨论

丹参单独提取, 丹酚酸 B 提取率顺序为 50%乙醇 > 70%乙醇 > 90%乙醇; 与五味子混合提取相比, 90%乙醇单独提取丹酚酸 B 的提取率由 1.26% 升高至 1.87%; 50%乙醇混合提取也略有提升 (由 1.90% 升高至 1.99%), 结果表明, 丹参与五味子混合提取提高了丹酚酸 B 的提取率, 丹酚酸 B 的量与单独提取已经很接近, 这可能由于五味子的酸性环境有助于丹酚酸 B 的溶出, 其具体机制有待于进一步研究。

宋九华等<sup>[7]</sup>、秦建平等<sup>[15]</sup>在测定安神补心丸、益心舒片中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II<sub>A</sub> 5 种成分采用紫外检测器, 检测波长为 220 nm。本实验采用 DAD 检测器, 对五味子和丹参中被测成分的检测波长进行比较研究, 发现五味子醇甲在 220 nm 处检测基线较高, 对五味子醇甲峰面积准确积分有一定干扰, 而 250 nm 处为其最大吸收峰, 干扰小, 测定准确, 故五

味子醇甲采用 250 nm 进行检测。丹参酮 II<sub>A</sub> 紫外最大吸收波长为 270 nm, 在 270 nm 检测时, 丹参酮 II<sub>A</sub> 周围无干扰峰。而在 220 nm 检测, 丹参酮 II<sub>A</sub> 左侧有一干扰峰, 故丹参酮 II<sub>A</sub> 选择在 270 nm 处测定其量, 结果表明, DAD 检测器在同时测定不同成分的测定波长选择上具有紫外检测器不可比拟的优越性。

### 参考文献

- [1] 李霞, 贾晓斌, 陈彦, 等. 五味子提取工艺的优化研究 [J]. 中国药房, 2007, 18(6): 424-426.
- [2] 史琳, 王志成, 冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 208-212.
- [3] 王洋, 陈涛, 潘霖, 等. 液质联用技术在丹参成分分析中的应用 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3494-3502.
- [4] 王胜春, 赵惠萍, 皇甫孟军, 等. 五味子与丹参配伍对其成分五味子乙素、醇甲的药代动力学影响 [J]. 中成药, 2004, 26(12): 987-991.
- [5] 王胜春, 田卫斌, 李剑锋, 等. 五味子及其与丹参、灵芝、柴胡配伍对慢性肝损伤小鼠的影响 [J]. 解放军药学杂志, 2001, 17(1): 4-7.
- [6] 陈晓莉, 王胜春, 田卫斌, 等. 灵芝及其与丹参、五味子、柴胡配伍对小鼠实验性肝损伤的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 567-569.
- [7] 宋九华, 杨孝容, 张成志. HPLC 测定安神补心丸中的五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II<sub>A</sub> [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(1): 110-112.
- [8] 黄致君, 陈衡霞, 陆兔林, 等. HPLC 法测定不同产地醋五味子中 6 种木脂素类成分的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(3): 272-274.
- [9] 窦志华, 安莉萍, 陈敏, 等. 一测多评法同时测定五味子中 6 种木脂素类成分含量 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(2): 147-151.
- [10] 蓝天凤, 王晓, 王岱杰, 等. 一测多评法测定丹参中 4 种丹参酮类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2420-2423.
- [11] 刘旭, 林森, 赵余庆. 北五味子不同部位总木脂素的含量测定 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(5): 39.
- [12] 宋九华, 杨孝容. HPLC 测定安神补心丸中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子甲素的含量 [J]. 中成药, 2008, 30(3): 380-383.
- [13] 毕跃峰, 贾陆, 张小娟, 等. 不同提取方法对丹参中丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹酚酸 B 含量测定的影响 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1209-1212.
- [14] 尹华, 章建华, 董晓辉, 等. 骨健口服液黄芪甲苷及丹酚酸 B 的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1197-1200.
- [15] 秦建平, 吴建雄, 毕宇安, 等. HPLC 法同时测定益心舒片中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 77-80.