

磁力搅拌辅助超临界 CO₂ 萃取 五味子中的木脂素类化合物

毕金龙¹, 梁正基¹, 张险峰², 杨青¹, 王鹤菲¹, 潘鑫悦¹, 秦美琼¹, 王志兵¹

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130012) (2. 吉林省产品质量监督检验院, 吉林长春 130012)

摘要: 本研究建立了一种磁力搅拌辅助的超临界 CO₂ 萃取法, 用于提取五味子中的 8 种木脂素类化合物, 采用高效液相色谱对目标分析物进行分离和测定。本研究以超临界 CO₂ 作为萃取溶剂, 采用乙醇溶液预先浸渍样品, 通过磁力搅拌促进样品与超临界 CO₂ 的充分接触, 以提高传质效率。本研究对影响木脂素类化合物提取率的各个因素进行了优化, 并与传统方法进行了比较。实验结果表明, 各目标分析物在线性范围内具有良好的线性关系($r>0.9998$), 检出限和定量限为 21.30~990.20 ng/mL 和 60.80~2992.80 ng/mL, 加标样品回收率在 75.00%~97.78% 之间, 分析结果令人满意。与其他方法相比, 虽然本法在提取时间和实验成本上并不占优势, 但本法所获得的提取率明显高于微波提取法和热回流提取法, 并与药典方法相似, 尽管本法在萃取过程中使用了少量的有机溶剂, 但料液比仅为 1:2, 是其他方法的 1/25~1/50。本法具有样品处理量大、操作简单、绿色环保、萃取效率高等优点, 在工业化生产应用方面具有一定潜质, 可用于中药中木脂素类化合物的提取分离。

关键词: 超临界 CO₂ 萃取; 磁力搅拌; 五味子; 木脂素类化合物; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2021)02-221-230

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0717

Extraction of Lignans from *Schisandra chinensis* by Magnetic Agitation Assisted Supercritical CO₂

BI Jin-long¹, LIANG Zheng-ji¹, ZHANG Xian-feng², YANG Qing¹, WANG He-fei¹, PAN Xin-yue¹, QIN Mei-qiong¹,
WANG Zhi-bing¹

(1. College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

(2. Jilin Province Product Quality Supervision and Inspection Institute, Changchun 130012, China)

Abstract: In this study, a magnetic stirring assisted supercritical CO₂ extraction method was established and applied to the extraction of eight lignans from the fruit of *Schisandra chinensis*. The target analytes were separated and determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Specifically, supercritical CO₂ was used as extraction solvent, the sample was pre-impregnated with ethanol solution, and the contact between samples and supercritical CO₂ was promoted by magnetic stirring to improve mass transfer efficiency. Then, various factors affecting the extraction efficiency of lignans were optimized, and compared with the traditional methods. The experimental results showed that the good linear relationship for analytes was obtained in the linear range ($r>0.9998$). The limit of detection and limit of quantification were 21.30~990.20 ng/mL and 60.80~2992.80 ng/mL, respectively. The spiked recoveries were between 75.00% and 97.78%. The analysis results were satisfactory. Compared with other methods, the extraction yield obtained by this method was significantly higher than that obtained by microwave extraction and thermal reflux extraction, and comparable to that obtained by the pharmacopoeia method. Although a small amount of organic solvent was used in the extraction process, the ratio of solid to liquid was only 1:2, which is 1/25~1/50 of other

引文格式:

毕金龙, 梁正基, 张险峰, 等. 磁力搅拌辅助超临界 CO₂ 萃取五味子中的木脂素类化合物[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 221-230

BI Jin-long, LIANG Zheng-ji, ZHANG Xian-feng, et al. Extraction of lignans from *Schisandra chinensis* by magnetic agitation assisted supercritical CO₂ [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 221-230

收稿日期: 2020-07-30

基金项目: 吉林省科技厅发展计划项目 (20190304011YY)

作者简介: 毕金龙 (1994-), 男, 硕士, 研究方向: 食品分析

通讯作者: 王志兵 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品分析

methods. This method has the advantages of large sample handling capacity, simple operation, environmental protection and high extraction efficiency, and certain potential in industrial production and application. It can be used for the extraction and separation of lignans in traditional Chinese medicine.

Key words: supercritical CO₂ extraction; magnetic stirring; *Schisandra chinensis*; lignans; HPLC

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.或华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.的干燥成熟果实^[1],最早记于《神农本草经》,是一种著名的传统中药,具有保护中枢神经系统、保护肝脏肾脏^[2,3]、清除体内自由基^[4]、镇咳^[5]、祛痰、抗肿瘤^[6]、抗 HIV^[7]等作用,常用于治疗慢性肝炎^[2,3]、无黄疸型传染性肝炎、心脑血管疾病^[8]、肺纤维化^[9]以及小儿肺炎^[10]等症。五味子果实中含有丰富挥发油、木脂素、有机酸、维生素 C、树脂、鞣质及少量糖类等。其中,木脂素类化合物是五味子中的主要药理活性成分,在植物体内多数呈游离状态,少数与糖结合成苷而存在于植物的根部和树脂中。随着现代分离手段、结构鉴定方法及高通量筛选技术的广泛应用,越来越多的木脂素类化合物及其生物活性被相继报道^[11]。

目前,常用的五味子中木脂素类化合物的检测方法有紫外分光光度法^[12]、液相色谱法^[13-15]、液相色谱-质谱联用法^[16,17]和毛细管电泳法^[18]等。高效液相色谱法具有分离效率高,选择性好,检测灵敏度高,操作自动化等优点,现已被广泛应用。因此,本实验选择高效液相色谱法对目标分析物进行分离检测。目前,较常用的五味子木脂素类成分的提取方法有溶剂浸渍法、渗漉法、煎煮法^[19]、热回流提取法^[20]、双水相萃取法^[21,22]、超声波提取法^[19]和微波提取法^[23,24]等。传统的热回流法、浸渍法、煎煮法及渗漉法是常用的工业化提取方法,吴艳玲等^[20]采用乙醇回流法对五味子中的木脂素类化合物进行提取,使用 6 倍量的 95%乙醇,加热回流提取 2 次,每次 2 h,总木脂素得率为 7.23 mg/g,同时,又采用渗漉法对五味子中木脂素类化合物进行提取,以 95%乙醇浸泡 24 h 后,以 10 mL/min 的流速,共接收 10 倍量体积的渗漉液,最后总木脂素得率为 10.95 mg/g。虽然这些方法操作简单,提取率高,但是有机溶剂用量大,且提取时间较长,提取效率低。超声波提取法、双水相萃取法和微波提取法是近二十年来开发应用的新方法。赵大伟等^[23]采用微波辅助提取法对五味子中木脂素类化合物进行提取,通过四因素、三水平的 Box-Behnken 设计优化得到最佳微波提取工艺为乙醇浓度 84%,料液比为 1:15,提取次数为 2 次,提取功率为 800 W,总木脂素得率为 7.88 mg/g。胡佳等^[22]采用硫酸铵—乙醇双水

相法提取南五味子木脂素,最优条件为:醇浓度 26.07%、盐浓度 24.81%、超声时间 10.28 min,在最佳条件下,五味子甲素的萃取率可达到 98.48%。虽然上述方法操作简单快速,提取时间短,但是有些方法需要使用大量有机溶剂,且样品处理量小,只适用于实验室分析。双水相萃取法虽具有易操作、成本低、产量大等优点,近年来备受关注并广泛使用,但受溶剂种类、溶剂用量和目标物性质等因素影响,部分木脂素类化合物的萃取率并不理想。

超临界流体萃取法是近年来发展起来的中药活性成分提取的常用方法^[25-27],它是利用超临界状态的 CO₂ 作为萃取溶剂,通过改变萃取条件来获得较高的提取效率。目前,超临界流体萃取法已在挥发油、多酚、香豆素、鞣质以及木脂素等物质的萃取方面有着广泛的应用。崔敬爱等^[28]利用超临界萃取法对北五味子中木脂素类化合物进行提取,萃取条件为原料粒度 0.18~0.25 mm,投料量每罐 300 g,萃取压力 30 MPa,萃取温度 45 °C,萃取时间 120 min,CO₂ 流量 15 L/h,最终获得五味子木脂素的得率为 1.024%;程敏等^[29]利用超临界萃取法对南五味子中木脂素类化合物进行提取,萃取条件为原料粒度 0.425 mm,投料量每罐 100 g,萃取压力 20 MPa,萃取温度 35 °C,萃取时间 120 min,CO₂ 流量 20 mL/min,最终五味子木脂素的得率为 2.929%。然而,CO₂ 用量大、操作压力高、提取时间长是超临界流体萃取中常见的问题。

因此,本研究在传统超临界流体萃取法基础上,改进了实验装置,采用自制萃取釜取代原始萃取室,通过磁力搅拌促进样品与超临界 CO₂ 的充分接触,并采用乙醇溶液预先浸渍样品的方法进一步增强萃取过程中超临界流体 CO₂ 的溶解力和选择性。本法结合了磁力搅拌和超临界流体萃取的优势,既节约了 CO₂ 的用量,又降低了萃取成本,且整个萃取过程在密闭条件下进行,溶剂用量少,对环境无污染。为了考察本法的萃取性能,本研究进行了方法学评价,并将本法与传统超声提取法、微波提取法和回流提取法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

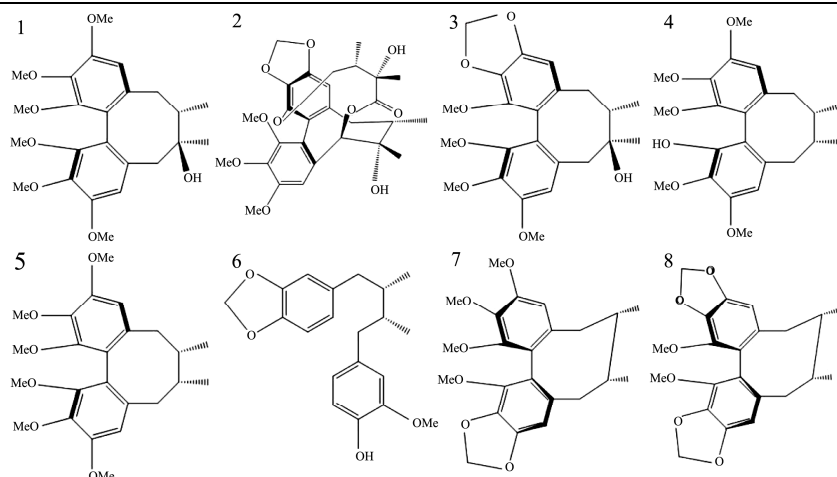


图 1 五味子木脂素类化合物的结构

Fig.1 The structure of lignans

注: 1.五味子醇甲; 2.戈米辛 D; 3.五味子醇乙; 4.五味子酚; 5.五味子甲素; 6.安五脂素; 7.五味子乙素; 8.五味子丙素。

五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素标准品(纯度均大于 99%), 购买于上海阿拉丁试剂公司; 安五脂素、五味子酚、戈米辛 D 和五味子丙素标准品(纯度均大于 99%), 购买于成都曼斯特试剂有限公司, 各化合物结构如图 1 所示。高纯空气、高纯二氧化碳(纯度>0.99999), 购买于长春巨洋氮气有限公司。甲醇(色谱纯), 购买于美国 Fisher 公司。其它试剂均为分析纯, 购买于北京化工厂。

1100 型液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司; Agilent TC-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国安捷伦公司; KQ3200E 超声波发生器, 昆山市超声仪器有限公司; RE-52AA 真空旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Centrifuge 5430R 高速离心机, 德国艾本德股份公司; DF-101S 集热式磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; Spe-ed SFE 超临界萃取设备, 美国 ASI 应用分离技术公司; SDC-6 低温恒温槽, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 样品制备

本研究对来自不同产地的 5 个北五味子样品(样品 1~5)进行了分析。所有样品经粉碎后过 40 目筛, 在 50 °C 下干燥至恒重, 并储存在玻璃干燥器中, 备用。

1.3 标准溶液的配制

取五味子木脂素标准品 5 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用适量甲醇溶解, 并定容至刻度, 配制成浓度为 500 μg/mL 的单个标准储备液, 并于 4 °C 冰箱中冷藏保存, 备用。其它不同浓度的单标和混标溶液是由标准储备液经甲醇稀释后得到的。

1.4 磁力搅拌辅助超临界 CO₂ 萃取

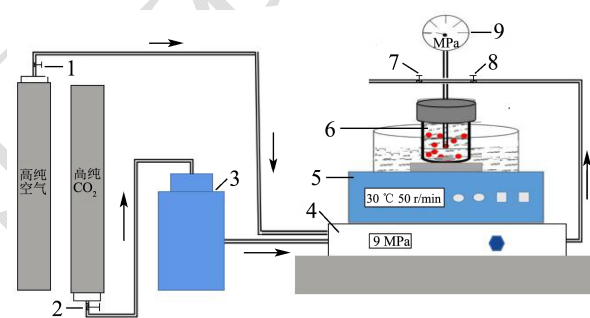


图 2 实验装置图

Fig.2 The diagram of experimental device

注: 1.高纯空气阀门; 2.高纯二氧化碳阀门; 3.低温恒温槽; 4.增压泵; 5.磁力搅拌器; 6.自制萃取釜; 7.萃取釜出口阀; 8.萃取釜进口阀; 9.压力表。

实验装置如图 2 所示。首先, 开启低温恒温槽 3, 设置温度为 5 °C, 当达到设定温度后, 开启阀门 1 和 2, 通入高纯空气和 CO₂, 使空气充满整个增压泵系统, 以便于驱动增压泵活塞进行加压, CO₂ 占据整个管路及萃取釜。同时, 准确称量 5 g 五味子样品粉末于自制的萃取釜 6 中, 并加入 10 mL 无水乙醇, 拧紧封口, 随后将萃取釜放入集热式恒温磁力搅拌器中预热 10 min, 打开进口阀 8 和出口阀 7, 通入 CO₂, 以排出萃取釜中的空气, 然后关闭出口阀 7, 检查装置气密性, 同时开启增压泵和磁力搅拌器(设定转速 50 r/min), 待萃取釜中压力达到 9 MPa 时, 停止加压, 萃取 30 min。萃取结束后, 依次关闭磁力搅拌器、钢瓶阀门 1 和 2 以及进口阀 8, 并手动旋转增压泵, 开始释压, 待萃取釜冷却至室温后, 开启阀门 7, 排出气体, 取出萃取釜中的固液混合物, 并用少量的乙醇反复冲洗

萃取釜,将得到的所有固液混合物全部转移到 50 mL 离心管中,在 5000 r/min 下离心 5 min,取出全部的上清液于 50 mL 容量瓶中,并用乙醇定容至刻度,取定容后的液体 2 mL,减压干燥,残渣用 2 mL 色谱级甲醇回溶,所得溶液过 0.22 μm 滤膜后进行色谱分析。

1.5 方法比较

1.5.1 药典方法

根据《中国药典》(2015 年版)^[1],取干燥后的五味子样品粉末约 0.25 g,精密称定,放入 25 mL 容量瓶中,加甲醇约 18 mL,瓶口密封后,超声提取 20 min,取出,冷却至室温,并加甲醇至刻度,混合摇匀后过滤,取滤液 2 mL,过 0.22 μm 滤膜,进行高效液相色谱分析。

1.5.2 热回流提取法

将 0.5 g 五味子样品粉末和 25 mL 50%乙醇溶液加入到圆底烧瓶中,加热回流提取 2 h,然后取出全部固液混合物至 50 mL 离心管中,在 5000 r/min 下离心 5 min,弃去残渣,取全部上清液于 50 mL 容量瓶中,并定容至刻度,准确量取溶液 2 mL,减压干燥,残渣用 2 mL 甲醇回溶,所得溶液过 0.22 μm 滤膜,进行高效液相色谱分析。

1.5.3 微波提取法

将 0.5 g 五味子样品粉末和 25 mL 50%乙醇溶液加入到 50 mL 离心管中,在 420 W 条件下微波提取 1 min,将离心管取出并冷却至室温,在 5000 r/min 下离心 5 min,取上清液定容至 50 mL,取溶液 2 mL,减压干燥,残渣用 2 mL 甲醇回溶,所得溶液过 0.22 μm 滤膜,进行高效液相色谱分析。

1.6 色谱条件

流动相由甲醇(A)和水(B)组成,洗脱梯度条件为:0~10 min, 68% A; 10~15 min, 68%~80% A; 15~40 min, 80% A; 40~42 min, 80%~68% A; 42~45 min, 68% A,流动相流速:0.5 mL/min;进样体积:10 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:254 nm。

1.7 提取率及回收率的计算

$$E = \frac{C \times V}{M}$$

其中, E 为提取率, mg/g; C 为提取物的浓度, mg/mL; V 为提取物的总体积, mL; M 为样品总质量, g。

$$R = \frac{C_2 - C_0}{C_1} \times 100\%$$

其中, R 为回收率, %; C_0 为初始量, mg/g; C_1 为加标量,

mg/g; C_2 为检出量, mg/g。

1.8 数据统计分析

萃取条件优化与方法学评价的数据均通过 Excel 软件进行统计计算,并通过 Origin 8.0.6 软件作图,使用 SPSS 16.0 进行统计分析和显著性检验。除特殊说明外,所有实验均平行操作三次。

2 结果与讨论

2.1 提取条件优化

2.1.1 萃取压力

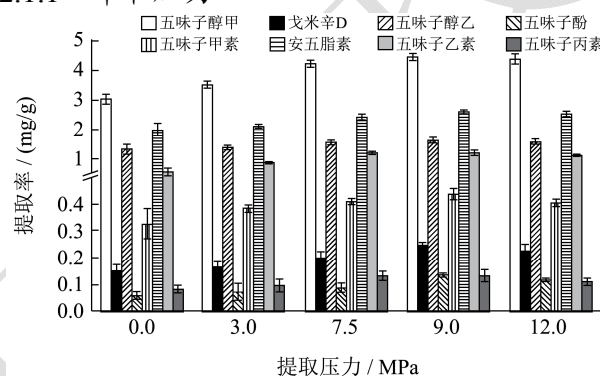


图3 提取压力对提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction pressure on extraction yield

注:提取条件为:乙醇浓度 100%,乙醇体积 10 mL,搅拌转速 50 r/min,提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 30 min。

在本研究中,超临界 CO_2 作为萃取溶剂,其用量大小将对目标物提取率产生至关重要的影响^[28-30]。由于整个萃取体系在密闭条件下进行,随着超临界 CO_2 用量的增加,萃取釜中的压力不断增大,因此,本研究考察了萃取压力分别为 0、3、7.5、9 和 12 MPa 时对木脂素类化合物提取率的影响。实验结果如图 3 所示,在不通入 CO_2 的情况下,即萃取压力为 0 时,目标物质的萃取率较低,在提取压力为 3 MPa 时, CO_2 为气体状态,目标化合物的提取率与 0 MPa 时的提取率相似,仅为 8.20 mg/g,但随着提取压力的升高,超临界 CO_2 不断进入样品内部,大大提高了传质效率,当提取压力为 9 MPa 时,目标分析物的提取率达到最大值。因此,本实验选择提取压力为 9 MPa。

2.1.2 乙醇浓度

为了增强萃取过程中超临界 CO_2 的溶解力和选择性,提高萃取效率,降低操作压力,本研究采用少量乙醇溶液预先浸渍样品,考察了乙醇浓度(40%、60%、80%和 100%)对目标分析物提取率的影响。实验结果如图 4 所示,乙醇的浓度越高,目标化合物的提取率越高,当使用无水乙醇时,五味子醇甲的提取率达 4.62

mg/g, 木脂素类化合物总量为 11.80 mg/g。一方面, 由于乙醇分子具有较大的极性, 这大大增加了木脂素类化合物在超临界 CO_2 中的溶解度^[31]; 另一方面, 乙醇作为一种有机溶剂, 易与木脂素类化合物形成氢键, 能显著提高萃取效率^[32]。因此, 本实验选择无水乙醇作为浸渍溶剂。

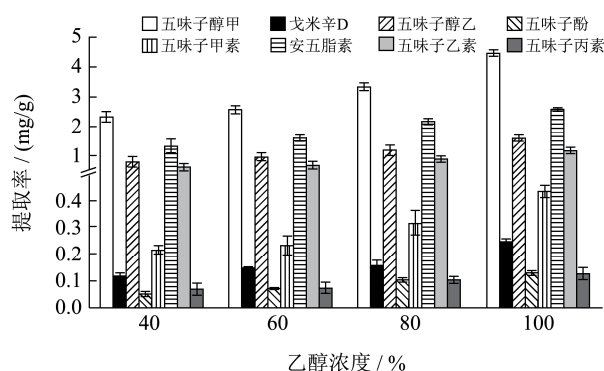


图4 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.4 Effect of ethanol concentration on extraction yield

注: 提取条件为: 提取压力 9 MPa, 乙醇体积 10 mL, 搅拌转速 50 r/min, 提取温度 50 °C, 提取时间 30 min。

2.1.3 乙醇体积

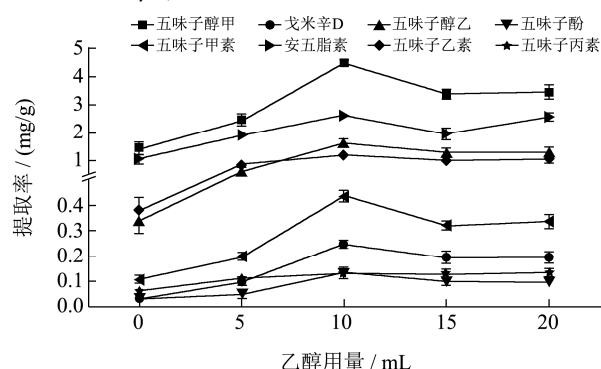


图5 乙醇用量对提取率的影响

Fig.5 Effect of ethanol dosage on extraction yield

注: 提取条件为: 提取压力 9 MPa, 乙醇浓度 100%, 搅拌转速 50 r/min, 提取温度 50 °C, 提取时间 30 min。

合适的样品质量与浸渍溶剂的比例有助于木脂素类化合物的提取。在本研究中, 由于所使用的萃取釜的体积为 30 mL, 因此, 考察了当样品质量为 5 g 时, 无水乙醇体积 (0、5、10、15 和 20 mL) 对目标物提取率的影响。实验结果如图 5 所示, 当不使用乙醇浸渍样品而直接采用超临界 CO_2 萃取样品时, 木脂素类化合物的提取率仅为 0.05~1.43 mg/g。随着乙醇体积的不断增大, 萃取率不断升高, 这可能是因为目标分析物具有联苯环辛二烯母核结构, 乙醇作为目标物和超临界 CO_2 的混溶试剂, 对超临界萃取效果具有极大的强化作用^[31,33]。当乙醇用量为 10 mL 时, 提取率达到最大值, 约为 0.13~4.45 mg/g。当继续增加乙醇用

量时, 目标化合物的提取率略有下降。从实验中能观察到, 这可能是在提取过程中, 由于乙醇用量的增加, 使萃取釜中液面升高, 导致部分五味子样品黏附于萃取釜壁及顶盖上, 无法与萃取溶剂接触, 从而使提取率略有下降, 此时, 总木脂素类化合物提取率仅为最大值的 85%。所以, 本实验选择乙醇用量为 10 mL。

2.1.4 磁力搅拌转速

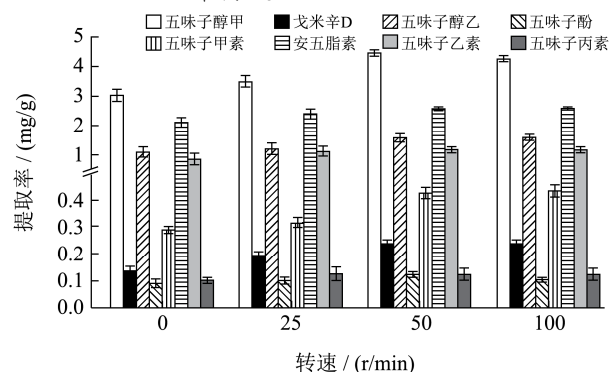


图6 磁力搅拌器转速对提取率的影响

Fig.6 Effect of rotating speed of magnetic stirrer on extraction yield

注: 提取条件为: 提取压力 9 MPa, 乙醇浓度 100%, 乙醇体积 10 mL, 提取温度 50 °C, 提取时间 30 min。

在传统超临界 CO_2 萃取基础上, 本研究改进了实验装置, 采用自制的萃取釜代替原有的萃取室, 这样可以方便在萃取釜外部加入磁力搅拌装置, 通过磁力搅拌有助于样品与萃取溶剂和无水乙醇充分混合, 增加萃取溶剂与样品之间的接触频率, 从而提高传质速率和萃取效率^[34]。因此, 本研究考察了磁力搅拌转速 (0、25、50、100 r/min) 对木脂素类化合物提取率的影响。实验结果如图 6 所示, 当不采用磁力搅拌时, 目标分析物的提取率较低, 总木脂素提取率不足 5.00 mg/g, 随着转速的不断增大, 提取率不断升高, 当转速达到 50 r/min 时, 提取率达到最高, 此时, 总木脂素类化合物提取率约为 11.80 mg/g, 继续增加转速时, 提取率几乎不变。因此, 本实验选择磁力搅拌转速为 50 r/min。

2.1.5 提取温度

在中药提取过程中, 加热可以促进分子运动, 增加目标分析物的溶解性, 从而提高传质速率和提取率。此外, 在本研究中, 温度也是形成超临界 CO_2 十分重要的条件, 只有当温度高于 31 °C、压力达到 7.19 MPa 时, CO_2 才能处于超临界状态。因此, 本实验考察了提取温度 (35、50、65 和 80 °C) 对超临界萃取木脂素类化合物的影响。实验结果如图 7 所示, 从图中可以看出, 随温度的升高, 目标分析物的提取率几乎不变。这可能是因为, 在相对较长的时间范围内, 超临界

萃取已经达到了平衡状态,从而使温度对提取率并未产生显著的影响^[35,36]。因此,本研究选择提取温度为 35℃。

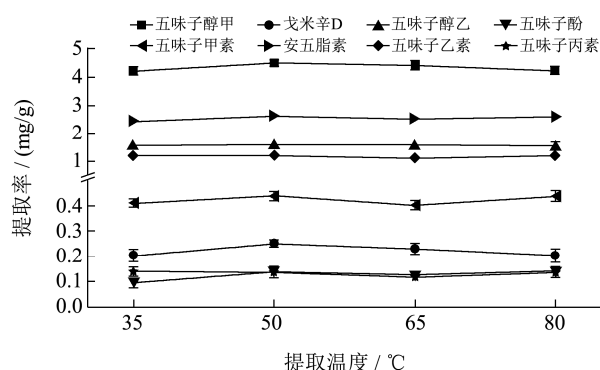


图7 提取温度对提取率的影响

Fig.7 Effect of extraction temperature on extraction yield

注: 提取条件为: 提取压力 9 MPa, 乙醇浓度 100%, 乙醇体积 10 mL, 搅拌转速 50 r/min, 提取时间 30 min。

2.1.6 提取时间

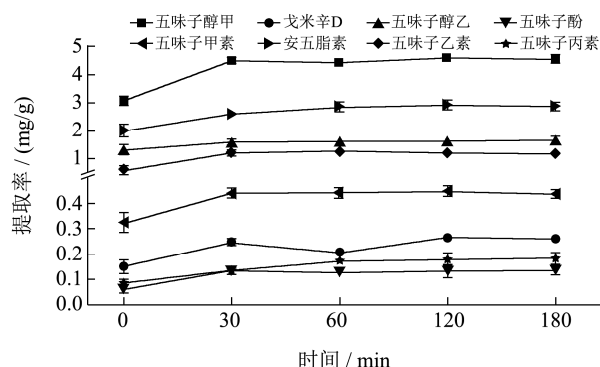


图8 提取时间对提取率的影响

Fig.8 Effect of extraction time on extraction yield

注: 提取条件为: 提取压力 9 MPa, 乙醇浓度 100%, 乙醇体积 10 mL, 搅拌转速 50 r/min, 取温度 35℃。

提取时间是中药提取过程中一个非常重要的参数,通常情况下,随着提取时间的增加,提取率越来越高,直至目标物提取完全为止^[35,36]。因此,本研究

考察了提取时间分别为 15、30、60、120 和 180 min 时目标分析物的提取率。实验结果如图 8 所示,当提取时间达到 30 min 时,目标分析物的提取率不再显著增加,这说明超临界 CO₂ 萃取木脂素类化合物已经达到平衡状态。所以,本研究选择的提取时间为 30 min。

2.2 方法评价

2.2.1 标准曲线、检出限、定量限、日内和日间精密度

配制含有 8 种木脂素类化合物的一系列不同浓度的混合标准溶液,进行色谱分析,以目标分析物浓度 (c) 为横坐标,峰面积 (A) 为纵坐标,绘制标准曲线,通过 Origin 8.0.6 软件得出线性回归方程。实验结果如表 1 所示,各目标分析物在线性范围内具有良好的线性关系,相关系数 $r > 0.9998$ 。检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 是指信噪比分别为 3 和 10 时,仪器所能检出或准确定量的目标分析物的最低浓度。实验结果表明,目标分析物的 LOD 和 LOQ 分别为 21.30~990.20 ng/mL 和 60.80~2992.80 ng/mL。采用本研究所建立的分析检测方法 1 d 内连续分析 6 次样品所获得提取率的相对标准偏差 (RSD) 为日内精密度,通过连续分析 3 d、每天分析 2 次样品所获得提取率的相对标准偏差 (RSD) 为日间精密度,从实验结果可以看出,除五味子酚和五味子甲素外,各目标分析物的日内和日间精密度分别低于 4.75% 和 4.07%,这说明本研究方法的重现性是可以接受的。

2.2.2 回收率的测定

为了研究本方法的准确度,本实验对加标样品的回收率进行了分析。实验结果如表 2 所示,各目标化合物回收率为 75.00%~97.78%,其相对标准偏差 (RSD) 均低于 5.36%,这表明本法具有满意的回收率和精密度,可用于中药中木脂素类化合物的提取与检测。

表 1 性能分析

Table 1 Analytical performance

分析物	线性关系	相关系数 (r)	线性范围/ ($\mu\text{g/mL}$)	LOD/ (ng/mL)	LOQ/ (ng/mL)	日内精密度/ (%, $n=6$)	日间精密度/ (%, $n=6$)
五味子醇甲	$A=37.6c+1.6$	0.9999	0.12~800	41.00	122.30	2.61	3.42
戈米辛 D	$A=26.2c-4.5$	1.0000	0.16~100	52.90	160.20	4.75	3.38
五味子醇乙	$A=37.7c-3.2$	0.9998	0.18~200	63.40	186.20	3.37	3.02
五味子酚	$A=39.2c-3.6$	1.0000	0.08~100	27.30	80.80	5.85	7.63
五味子甲素	$A=84.7c-4.8$	0.9999	0.06~200	21.30	60.80	5.72	4.08
安五脂素	$A=4.8c-1.0$	0.9998	3.00~200	990.20	2992.80	4.63	4.07
五味子乙素	$A=43.6c-4.5$	0.9999	0.14~200	45.40	135.40	2.71	4.04
五味子丙素	$A=35.1c-3.6$	0.9999	0.14~100	49.90	145.80	1.97	3.11

表 2 加标样品回收率

Table 2 Recovery of spiked samples

分析物	初始量/(mg/g)	加标量/(mg/g)	检出量/(mg/g)	回收率/%	RSD/(%, n=3)
五味子醇甲	4.62	0.93	5.47	91.40	2.23
戈米辛 D	0.38	0.12	0.48	83.33	0.78
五味子醇乙	1.75	0.45	2.19	97.78	0.59
五味子酚	0.13	0.04	0.16	75.00	5.36
五味子甲素	0.54	0.12	0.64	83.33	1.51
安五脂素	3.02	0.84	3.79	91.67	3.65
五味子乙素	1.42	0.38	1.76	89.47	3.52
五味子丙素	0.13	0.04	0.16	75.00	1.56

表 3 实际样品分析

Table 3 Analysis of real samples

分析物/(mg/g)	样品 1 (辽宁)	样品 2 (吉林)	样品 3 (黑龙江)	样品 4 (内蒙古)	样品 5 (陕西)	北五味子 ^[37]	南五味子 ^[37]	北五味子 ^[38]
五味子醇甲	4.62±0.12 ^a	5.54±0.12	4.36±0.15	4.84±0.11	0.61±0.03	4.72	0.61	4.25
戈米辛 D	0.38±0.02	0.47±0.01	0.34±0.01	0.41±0.01	0.13±0.01	- ^b	-	0.33
五味子醇乙	1.75±0.01	2.23±0.01	1.51±0.09	1.92±0.05	0.47±0.01	1.70	0.45	1.12
五味子酚	0.13±0.02	0.14±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	1.37±0.13	-	-	-
五味子甲素	0.54±0.02	0.52±0.01	0.57±0.02	0.43±0.02	1.35±0.19	0.52	2.29	0.93
安五脂素	3.02±0.02	2.41±0.15	1.72±0.19	2.55±0.10	3.34±0.12	-	-	-
五味子乙素	1.42±0.04	1.01±0.04	0.91±0.04	1.12±0.05	0.14±0.01	1.15	0.12	1.81
五味子丙素	0.13±0.02	0.12±0.01	0.14±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.13	0.09	0.14
总木脂素	11.99	12.44	9.70	1.53	7.05	10.36	5.29	10.31

注：a，标准偏差，n=3；b，参考文献中无此化合物的检测结果。

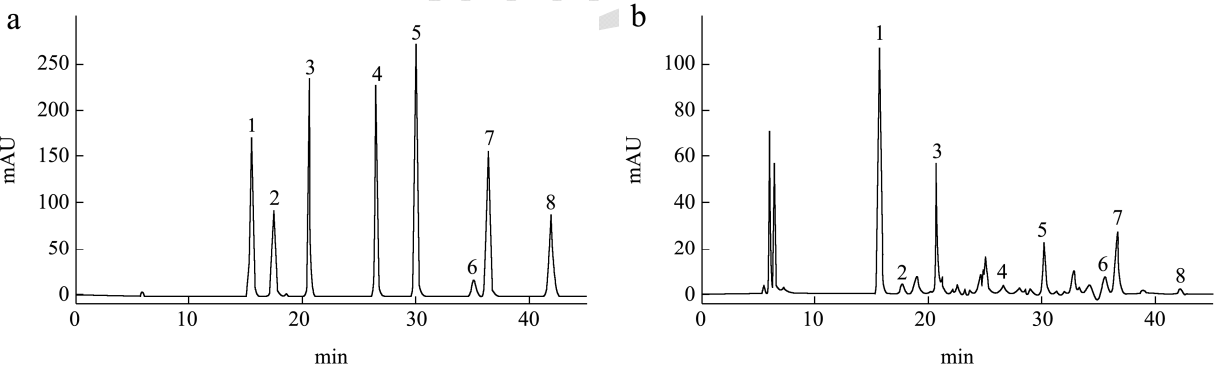


图 9 木脂素标准品溶液

Fig. 9 Chromatograms of the standard solution

注：图 a：样品提取物溶液；图 b：色谱图。1.五味子醇甲；2.戈米辛 D；3.五味子醇乙；4.五味子酚；5.五味子甲素；6.安五脂素；7.五味子乙素；8.五味子丙素。

2.2.3 实际样品分析

为了评价本方法的适用性，本研究对五种不同产地的五味子样品进行了分析，其中，1~4 号样品为北五味子，产地分别为辽宁、吉林、黑龙江以及内蒙古，5 号样品为南五味子，产地为陕西。实验结果如表 3 所示，研究发现南、北五味子中木脂素含量差异较大，北五味子中木脂素的含量明显高于南五味子，而且，

在所检测的 8 种目标分析物中，五味子醇甲含量最高，可达可达 4.36~5.54 mg/g，它常作为五味子药材的标志性成分。此外，无论是北五味子还是南五味子，在五味子醇甲等单个化合物以及总木脂素类化合物的提取率方面，本法所获得的结果与文献报道的方法相一致^[37,38]，这说明本方法就有良好的适用性。此外，北五味子不同产地间 8 种木脂素的含量也存在一定

的差异,以标志性成分五味子醇甲为例,样品2的含量明显高于其他三种样品。出现这种差异的原因可能是光照时间、采收时间、当地气候以及土壤条件等因素的差异对五味子中的活性成分造成了一定的影响。木脂素标准溶液和样品提取物色谱图如图9所示。

2.2.4 方法比较

为了评价本方法的实用性,将本方法与药典方法(即超声提取法)、热回流提取法、微波提取法进行了比较,实验结果如表4所示。与其他方法相比,本法在提取时间和实验成本上并不无显著性优势,但从提取效果方面来看,除五味子醇甲、安五脂素和五味子乙素三种化合物外,本法所获得的提取率明显高于微波提取法和热回流提取法,通过 t 检验发现,本法与药典方法所获得的提取率相似,无显著性差异。此外,

热回流提取法作为传统的萃取方法,经常被应用于工业化生产,然而该方法提取过程中使用大量的有机溶剂,且提取时间长,萃取效率低。超声提取法和微波提取法作为近些年出现的新提取方法,具有操作简单、时间短、提取率高等优点,然而这两种方法却无法大量的处理样品,不适合工业化生产,也需要使用较多的有机溶剂。本法使用超临界 CO_2 作为萃取剂,绿色环保无污染,尽管在萃取过程中使用了少量的乙醇作为浸渍溶剂,但料液比仅为1:2,是其他方法的1/25~1/50。本法使用超临界 CO_2 代替传统有机溶剂作为萃取剂,大大减少有机溶剂的用量,具有样品处理量大、操作简单、绿色环保、萃取效率高、提取时间短等优点,后期将着手研究 CO_2 的回收装置,以降低成本。

表4 方法比较

Table 4 Comparison between the proposed method and other methods

分析物	药典方法	P	微波提取法	P	热回流提取法	P	本方法
五味子醇甲/(mg/g)	4.71±0.17 ^a	0.737	4.55±0.12	0.478	4.54±0.15	0.511	4.62±0.12
戈米辛 D/(mg/g)	0.37±0.02	0.404	0.32±0.01 ^{*b}	0.032	0.29±0.01 [*]	0.020	0.38±0.02
五味子醇乙/(mg/g)	1.72±0.11	0.803	1.68±0.02 [*]	0.014	1.65±0.01 [*]	0.011	1.75±0.01
五味子酚/(mg/g)	0.11±0.02	0.425	0.06±0.01 [*]	0.007	0.05±0.01 [*]	0.003	0.13±0.02
五味子甲素/(mg/g)	0.52±0.01	0.320	0.41±0.03 [*]	0.001	0.44±0.02 [*]	0.002	0.54±0.02
安五脂素/(mg/g)	3.06±0.19	0.735	2.91±0.16	0.373	2.65±0.16	0.299	3.02±0.02
五味子乙素/(mg/g)	1.51±0.07	0.289	1.36±0.03	0.465	1.35±0.01	0.476 ^b	1.42±0.04
五味子丙素/(mg/g)	0.12±0.03	0.382	0.08±0.01 [*]	0.033	0.06±0.01 [*]	0.019 ^c	0.13±0.03
样品用量/g	0.25		0.5		0.5		5
溶剂种类	甲醇		50%乙醇		50%乙醇		超临界 CO_2
溶剂用量/mL	25 mL		25 mL		25 mL		9 MPa
料液比/(g/mL)	1:100		1:25		1:25		1:2 ^c
提取时间/min	20		1		120		30

注: a, 标准偏差, $n=3$; b、*, 与本方法比, 具有显著性差异, $p<0.05$; c, 表示样品与浸渍溶剂乙醇的比例。

3 结论

本研究首次将磁力搅拌与超临界流体萃取相结合,建立了一种简单、高效、绿色的磁力搅拌辅助的超临界 CO_2 萃取高效液相色谱法,用于测定五味子中的木脂素类化合物。本方法在传统超临界 CO_2 萃取基础上,改进了实验装置,采用自制的萃取釜代替原有的萃取室,这样可以方便在萃取釜外部加入磁力搅拌装置,有利于将萃取溶剂与样品充分混合,增加萃取溶剂与样品之间的接触频率,从而提高萃取效率。而且,本法改变了传统超临界 CO_2 萃取模式,即以静态萃取代替传统方法中的动态萃取,在不降低萃取率的前提下,与文献报道的方法^[28,29]相比,节约 CO_2 用量可达30%~60%。此外,本法在超临界 CO_2 萃取前,

预先采用少量无水乙醇作为辅助萃取溶剂浸渍样品,增强了萃取过程中超临界 CO_2 的溶解力和选择性,降低了萃取压力。研究表明,磁力搅拌辅助萃取、乙醇浸渍样品与超临界 CO_2 萃取相组合的萃取方式,明显优于传统的热回流提取法和微波辅助提取法,并获得了与药典方法相近的提取率,本法具有操作简单、环境友好、提取率高等优点,可广泛用于中药中木脂素类化合物的提取分析。

参考文献

- [1] 中国药典委员会(编). 中华人民共和国药典[M]. 国家药典科学技术出版社, 2015, 80-81
Chinese Pharmacopoeia Committee (edited). Pharmacopoeia of the people's Republic of China [M]. State Pharmacopoeia

- science and Technology Press, 2015, 80-81
- [2] ZHU Peili, LI Junkui, FU Xiuqiong, et al. *Schisandra* fruits for the management of drug-induced liver injury in China: a review [J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2019, 59: 152760
- [3] Zhu M, Link F, Yeung R Y R, et al. Evaluation of the protective effects of *Schisandra chinensis* on phase I drug metabolism using a CCl₄ intoxication model [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 67: 61-68
- [4] Chang Leewen, Yen Wenjye, Huang Shiowchyn, et al. Antioxidant activity of sesame coat [J]. *Food Chemistry*, 2002, 78: 347-354
- [5] ZHONG Shan, NIE Yi-chu, GAN Zhen-yong, et al. Effects of *Schisandra chinensis* extracts on cough and pulmonary inflammation in a cough hypersensitivity guinea pig model induced by cigarette smoke exposure [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 165: 73-82
- [6] SUN Hai-ling, WANG Tian-tian, LV Zhi-liang, et al. Synthesis, chiral resolution, and determination of novel furan lignan derivatives with potent anti-tumor activity [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20: 1961-1964
- [7] Zhang Hongjie, Tan Gheeteng, Hoang Vudinh, et al. Natural anti-HIV agents. Part 3: litseaverticillols A-H, novel sesquiterpenes from *Litsea verticillata* [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(2):141-148
- [8] 张旻昱,吴宏伟,许利平,等.五味子及其活性成分治疗心脑血管疾病药理作用的研究进展[J].*中国中药杂志*,2018,43(8):1536-1546
- ZHANG Min-yu, WU Hong-wei, XU Li-ping, et al. Research progress of *Schisandrae* and its active components in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 43(8): 1536-1546
- [9] 葛春蕾,张兴彩,李珂珂.单味中药及其提取物在肺纤维化治疗中的研究进展[J].*中医药学报*,2020,48(6):67-72
- GE Chun-lei, ZHANG Xing-cai, LI Ke-ke. Research progress of single Chinese medicine and its extract in the treatment of pulmonary fibrosis [J]. *Journal of Chinese Medicine*, 2020, 48(6): 67-72
- [10] 周婧媛.基于中医传承辅助平台系统研究中药治疗肺炎喘嗽的用药规律[D].南京:南京中医药大学,2019
- ZHOU Jing-yuan. A systematic study on the law of traditional Chinese medicine in the treatment of pneumonia and asthma based on the TCM inheritance assistance platform [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2019
- [11] WANG Zhao-yi, XIA Qing, LIU Xin, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl: a review [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 210: 318-339
- [12] 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):39-40
- LIU Xu, LIN Sen, ZHAO Yu-qing. Determination of total lignin in different parts of fructus schisandrae [J]. *Chinese Modern Chinese Medicine*, 2009, 11(5): 39-40
- [13] ZHANG Qi, ZHU Wen-quan, GUAN Hong, et al. Development of a matrix solid-phase dispersion extraction combined with high-performance liquid chromatography for determination of five lignans from the *Schisandra chinensis* [J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1011: 151-157
- [14] WANG Bao-lian, HU Jin-ping, TAN Wei, et al. Simultaneous quantification of four active *Schisandra* lignans from a traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* (Wuweizi) in rat plasma using liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865: 114-120
- [15] 邓秀平,王佳,张兵,等.清肺汤中 8 种有效成分同时测定及其指纹图谱研究[J].*中草药*,2020,51(5):1242-1250
- DENG Xiu-ping, WANG Jia, ZHANG Bing, et al. Simultaneous determination of 8 active components in Qingfei soup and study on its fingerprint [J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2020, 51(5): 1242-1250
- [16] YU Chan-juan, XU Yang, WANG Mei-ling, et al. Application of characteristic fragment filtering with ultra high performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry for comprehensive identification of components in *Schisandrae chinensis* fructus [J]. *Journal of Separation Science*, 2019, 42(7): 1323-1331
- [17] 李慧,王恩鹏,朱敏,等.液相色谱-四级杆-飞行时间质谱检测人参奶粉中的皂苷类成分[J].*现代食品科技*,2020,36(3): 281-287
- LI Hui, WANG En-peng, ZHU Min, et al. Determination of saponins in ginseng milk powder by liquid chromatography-four-bar time-of-flight mass spectrometry [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(3): 281-287
- [18] CHEN An-jia, LI Cun-hong, GAO Wen-hua, et al. Separation and determination of active components in *Schisandra chinensis* Baill. and its medicinal preparations by non-aqueous capillary electrophoresis [J]. *Biomedical*

- Chromatography, 2005, 19: 481-487
- [19] 熊川,陈祖琴,吴正云,等.中药米曲中活性成分的提取及其免疫调节作用[J].现代食品科技,2018,34(11):132-137
- XIONG Chuan, CHEN Zu-qin, WU Zheng-yun, et al. Extraction of active components from rice qu and its immunomodulator [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 34(11): 132-137
- [20] 吴艳玲,朴惠善.北五味子活性成分提取工艺的研究[J].时珍国医国药,2007,18(5):1176-1177
- WU Yan-ling, PIAO Hui-shan. Study on extraction technology of active components of fructus *Schisandrae chinensis* [J]. Shi Z M, 2007, 18(5): 1176-1177
- [21] LI Hua, ZHANG Ji-dan, KE Hua-xiang, et al. Nonlinear response surface in the study of aqueous two-phase system and ionic liquid extraction of lignans from *Schisandrae chinensis* and mechanism clarification [J]. Separation Science and Technology, 2020, 55(7): 1330-1338
- [22] 胡佳,徐文广,乐莎.响应面法优化双水相萃取南五味子中木脂素的研究[J].企业技术开发,2017,36(2):6-9
- HU Jia, XU Wen-guang, LE Sha. Optimization of aqueous two-phase extraction of lignans from *Schisandra sphenanthera* [J]. Enterprise Technology Development, 2017, 36(2): 6-9
- [23] 赵大伟,王浩博,李佳丽,等.Box-Behnken 响应曲面法优化五味子中木脂素的微波提取工艺[J].吉林农业,2019,6:46-48
- ZHAO Da-wei, WANG Hao-bo, LI Jia-li, et al. Microwave extraction of lignans from *Schisandra chinensis* by box-Behnken response surface method [J]. Jilin Agriculture, 2019, 6: 46-48
- [24] TU Qiu-yun, ZHOU Chun-shan, TANG Jian-ping. Microwave assisted-semi bionic extraction of lignan compounds from fructus forsythiae by orthogonal design [J]. Journal of Central South University of Technology, 2008, 15(1): 59-63
- [25] H Sovová, L Opletal, M Bártlová, et al. Supercritical fluid extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis* [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2007, 42: 88-95
- [26] Huang Tailing, Lin Chunte, Chyau Charngherng, et al. Purification of lignans from *Schisandra chinensis* fruit by using column fractionation and supercritical antisolvent precipitation [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1282: 27-37
- [27] ZHU Hong-yan, ZHANG Li-na, WANG Guo-li, et al. Sedative and hypnotic effects of supercritical carbon dioxide fluid extraction from *Schisandra chinensis* in mice [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24: 831-838
- [28] 崔敬爱,陈晓平.超临界 CO₂ 萃取北五味子木脂素工艺参数的优化[J].吉林农业大学学报,2012,34(1):94-98
- CUI Jing-ai, CHEN Xiao-ping. Optimization of technological parameters of supercritical CO₂ extraction of north Wuweizi lignin [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2012, 34(1): 94-98
- [29] 程敏,赵艳艳,贾朝,等.超临界 CO₂ 萃取南五味子木脂素的工艺研究[J].现代中医药,2016,36(5):86-89
- CHENG Min, ZHAO Yan-yan, JIA Chao, et al. Study on the technology of supercritical CO₂ extraction of rhizoma coptidis [J]. Modern Chinese Medicine, 2016, 36(5): 86-89
- [30] 聂江力.北五味子产地质量的评价及木脂素提取工艺的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2003
- NIE Jiang-li. Evaluation of producing quality of fructus *Schisandrae chinensis* and study on lignin extraction technology [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2003
- [31] H Sovová, Opletal L, M Bártlová, et al. Supercritical fluid extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis* [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2007, 42(1): 88-95
- [32] Mayya Razgonova, Alexander Zakharenko, Konstantin Pikula, et al. Rapid mass spectrometric study of a supercritical CO₂-extract from woody liana *Schisandra chinensis* by HPLC-SPD-ESI-MS/MS [J]. Molecules, 2020, 25(11): 2689
- [33] 王青遥.联苯环辛二烯类木脂素衍生物制备及其部分生物活性研究[D].贵阳:贵州大学,2015
- WANG Qing-yao. Preparation and some biological activities of biphenylcyclooctadiene lignans [D]. Guiyang: Guizhou University, 2015
- [34] 贾晓伟,马静,潘浩,等.中药提取自动化的研究[J].中国新技术新产品,2020,1:14-15
- JIA Xiao-wei, MA Jing, PAN Hao, et al. Study on automatic extraction of traditional Chinese medicine [J]. New Technology and New Products in China, 2020, 1: 14-15
- [35] WANG Long-hu, SONG Yan-ting, CHENG Yi-yu, et al. Orthogonal array design for the optimization of supercritical fluid extraction of tanshinones from Danshen [J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(2): 321-325