

正交试验优选五味子体外胃内仿生转化工艺

胡朝奇¹, 陈新^{1*}, 徐会丹²

(1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 长春市英平药业有限公司, 长春 130033)

[摘要] **目的:** 优选五味子的体外胃内仿生转化工艺。**方法:** 以出膏率及五味子醇甲含量作为指标, 采用正交试验和单因素试验考察五味子水煎液质量浓度、水煎液与人工胃液的体积比、转化时间、转化次数、转化温度及转速对五味子体外胃内仿生转化工艺的影响。通过 HPLC 测定五味子醇甲含量。**结果:** 五味子的最佳体外胃内仿生转化工艺为五味子水煎液质量浓度 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 水煎液与人工胃液体积比(1:1), 转化温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 溶出仪转速 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 转化时间 1 h, 转化数 1 次。**结论:** 优选的五味子体外胃内仿生转化工艺稳定可靠, 为五味子人体代谢转化研究提供实验依据。

[关键词] 五味子; 胃内; 仿生转化; 仿生转化工艺; 正交试验; 单因素试验

[中图分类号] R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0033-04

[doi] 10.11653/syfy2013210033

Optimization of *in vitro* Stomach Bionic Transformation Technology for Schisandrae Chinensis Fructus by Orthogonal Test

HU Chao-qi¹, CHEN Xin^{1*}, XU Hui-dan²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
2. Changchun Yingping Pharmaceutical Co. Ltd, Changchun 130033, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize *in vitro* stomach bionic transformation process of Schisandrae Chinensis Fructus. **Method:** With the cream rate and the content of schisandrin as indexes, orthogonal test and single factor tests were adopted to investigate effects of the concentration of Schisandrae Chinensis Fructus decoction, volume ratio of decoction and artificial gastric juice, transformation time, transformation times, speed and temperature on *in vitro* stomach bionic transformation process. The content of schisandrin was determined by HPLC. **Result:** Optimun process was as following: decoction concentration $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, volume ratio of decoction and artificial gastric juice (1:1), temperature $37 \text{ }^\circ\text{C}$, speed $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, transformation time 1 h, conversion of 1 times. **Conclusion:** Optimized *in vitro* stomach bionic transformation process was stable and reliable, which established experimental basis for human metabolism transformation of Schisandrae Chinensis Fructus.

[Key words] Schisandrae Chinensis Fructus; stomach; bionic transformation process; orthogonal test; single factor test

五味子中木脂素类成分具有良好的保肝、抗癌、镇静催眠作用^[1-3]。目前中药研究多集中于有效成分研究, 忽视了中药在人体内的代谢、转化过程, 同

时也与中药“多成分、多靶点、整体作用”的基本特点不符^[4-5], 从而导致中药药效物质研究存在一定的盲目性, 因此有必要开展中药体外仿生代谢转化

[收稿日期] 20130607(010)

[基金项目] 吉林省中医药管理局项目(2010-pt011)

[第一作者] 胡朝奇, 在读硕士, 从事中药药效物质基础开发与利用研究, Tel:15044040887, E-mail:xuhu28301@sina.com

[通讯作者] * 陈新, 教授, 从事中药药效物质基础开发与利用研究, Tel:0431-86172150, E-mail:chenxinjl@126.com

模拟研究。本试验以出膏率和五味子醇甲含量为综合评价指标,通过单因素试验和正交试验优选五味子的体外胃内仿生转化工艺。

1 材料

DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),FA1204B 型电子分析天平(上海天平仪器厂),ZRS-6G 型智能溶出试验仪(天津天大天发有限公司),LXJ-IIIB 型低速大容量离心机(上海飞鸽有限公司),SPD-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津)。

五味子购于长春药材公司,经长春中医药大学中药鉴定教研室主任姜大成教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实;五味子醇甲对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110857-200304),胃蛋白酶(中国惠世生化试剂有限公司),甲醇为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 五味子水煎液的制备 称取五味子药材 100 g,依次加入 10,10,8 倍量水分别煎煮 1 h,离心(4 800 r·min⁻¹,20 min)分离药渣,合并水煎液,将水煎液浓缩至生药质量浓度 1 g·mL⁻¹,即得。

2.2 出膏率的测定 精密量取五味子水煎液适量,按不同仿生转化工艺制备仿生转化液,于 60 °C 减压浓缩至 1 g·mL⁻¹,置于已精密称定的干燥恒重蒸发皿中,60 °C 真空干燥至恒重,精密称定质量,计算出膏率。

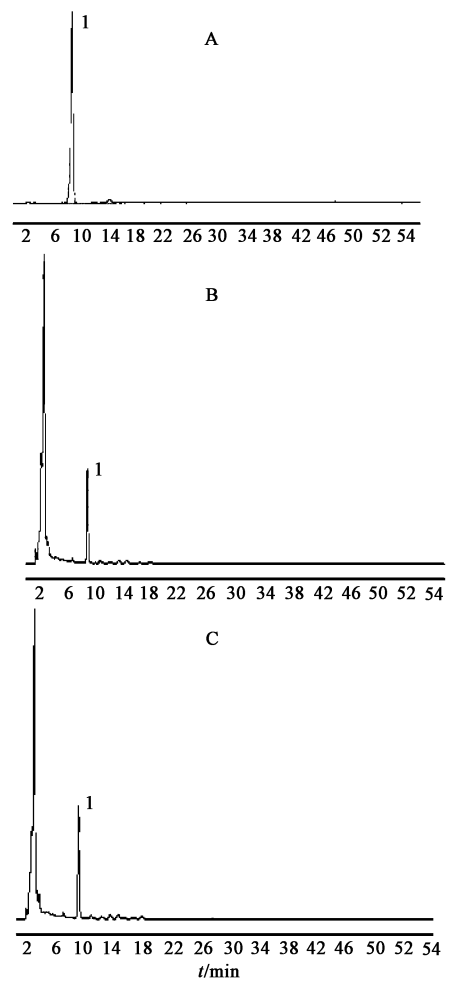
2.3 五味子醇甲的含量测定

2.3.1 色谱条件 以十八烷基键合硅胶作为固定相,流动相甲醇-水(65:35),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 250 nm,柱温室温,见图 1。

2.3.2 供试品溶液的制备 取五味子水煎液适量,按不同仿生转化工艺制备仿生转化液,60 °C 减压浓缩至 1 g·mL⁻¹,精密量取 25 mL 置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取 2 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 对照品储备液的制备 精密称定五味子醇甲对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系考察 依次精密量取五味子醇甲对照品储备液 0.7,1.1,1.4,1.8,2.1 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,配成系列浓度对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,以对照品溶液质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 23\,568X - 28.155 (r = 0.999\,9)$,表明五味子醇甲在



A. 对照品;B. 水煎液;C. 仿生转化物;1. 五味子醇甲
图 1 五味子 HPLC

0.14 ~ 0.42 g·L⁻¹与峰面积呈良好线性关系。

2.4 仿生转化工艺的初筛 使用溶出仪作为中药胃代谢体外模拟装置,选取五味子水煎液质量浓度、水煎液与人工胃液的体积比、转化时间、转化次数、转化温度及转速为考察因素,按 L₈(2⁷) 正交表对五味子的转化工艺进行初步筛选,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

由直观分析可知,因素 A,B,C 对仿生转化工艺的影响较小,因素 D,E,F 对仿生转化工艺的影响较为显著,初步确定仿生转化工艺为 A₁B₁C₁D₂E₂F₂,即水煎液质量浓度 0.5 g·mL⁻¹,水煎液与人工胃液体积比(2:1),转化时间 1 h,转化数 2 次,转化温度 37 °C,转速 75 r·min⁻¹。

2.5 单因素试验考察

2.5.1 水煎液质量浓度 依次制备质量浓度为 0.5,1.0,1.5 g·mL⁻¹的不同水煎液,各 3 份,按初步仿生转化工艺依次对五味子水煎液进行仿生转化处理,结果出膏率分别为 20.65%,21.34%,21.07%,

表1 五味子的仿生转化工艺初步筛选正交试验因素水平

水平	A 水煎液质量浓度 /g·mL ⁻¹	B 水煎液与人工胃 液体积比	C 转化时间 /h	D 转化数 /次	E 转化温度 /℃	F 转速 /r·min ⁻¹	G 空白
1	0.5	2:1	1	1	30	50	1
2	1.0	1:2	2	2	37	75	2

表2 五味子的仿生转化工艺初步筛选正交试验安排

No.	A	B	C	D	E	F	G(空白)	出膏率 /%	五味子醇甲 质量分数/%	综合评分
1	1	1	1	1	1	1	1	18.87	0.43	76.09
2	1	1	1	2	2	2	2	22.58	0.59	100.00
3	1	2	2	1	1	2	2	20.42	0.49	85.27
4	1	2	2	2	2	1	1	19.98	0.51	87.05
5	2	1	2	1	2	1	2	20.23	0.48	83.83
6	2	1	2	2	1	2	1	20.15	0.50	86.09
7	2	2	1	1	2	2	1	18.94	0.58	93.98
8	2	2	1	2	1	1	2	20.78	0.47	83.37
K ₁	348.41	346.01	353.44	339.17	330.82	330.34	343.21			
K ₂	347.27	349.67	342.24	356.51	364.86	365.34	352.47			
R	0.57	1.83	5.6	8.67	17.02	17.5	4.63			

注:综合评分=(出膏率 i /出膏率 $_{max}$) \times 30+(五味子醇甲 $_i$ /五味子醇甲 $_{max}$) \times 70(表4同)。

五味子醇甲质量分数分别为0.46%,0.55%,0.53%,故选择1.0 g·mL⁻¹。

2.5.2 水煎液与人工胃液体积比 分别量取1.0 g·mL⁻¹五味子水煎液3份,每份100 mL,分别加入50,100,200 mL人工胃液,按初步仿生转化工艺依次进行处理,结果出膏率分别为19.85%,21.21%,20.34%,五味子醇甲质量分数分别为0.43%,0.59%,0.52%,故选择1:1。

2.5.3 转化时间 依次取1.0 g·mL⁻¹五味子水煎液3份,每份100 mL,分别加入人工胃液100 mL,分别按初步仿生转化工艺处理1.0,1.5,2.0 h,结果出膏率分别为21.22%,21.25%,21.31%,五味子醇甲质量分数分别为0.59%,0.59%,0.60%,故选择转化1.0 h。

2.6 正交试验优选 选取转化次数、转化温度及溶出仪转速为考察因素,按L₉(3⁴)正交表进行优化,因素水平见表3,试验安排及结果见表4,方差分析见表5。

由直观分析可知,各因素对仿生转化工艺的影响顺序为E>F>D。方差分析结果表明因素E、F对转化物的出膏率和五味子醇甲含量均具有显著性影响,因素D则无显著性影响,确定最优工艺为D₁E₂F₂,即转化

表3 五味子的仿生转化工艺L₉(3⁴)正交试验因素水平

水平	D 转化数 /次	E 转化 温度/℃	F 转速 /r·min ⁻¹	G(空白)
1	1	30	50	1
2	2	37	75	2
3	3	45	100	3

表4 五味子的仿生转化工艺L₉(3⁴)正交试验安排

No.	D	E	F	G (空白)	出膏率 /%	五味子 醇甲 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	18.31	0.44	74.7
2	1	2	2	2	22.69	0.61	100
3	1	3	3	3	18.98	0.57	90.5
4	2	1	2	3	19.54	0.43	75.18
5	2	2	3	1	20.88	0.55	90.72
6	2	3	1	2	19.87	0.46	79.06
7	3	1	3	2	20.69	0.48	82.44
8	3	2	1	3	20.32	0.55	89.98
9	3	3	2	1	20.01	0.58	93.01
K ₁	265.2	232.32	243.74	258.43			
K ₂	244.96	280.70	268.19	261.50			
K ₃	265.43	262.57	263.66	255.66			
R	6.82	16.13	8.15	1.95			

1次,转化温度37℃,转速75 r·min⁻¹。

表 5 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
D	92.081	2	16.185	>0.05
E	398.265	2	70.003	<0.05
F	112.792	2	19.825	<0.05
G(误差)	5.689	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

2.7 验证试验 按最优仿生工艺分别制备 3 份五味子仿生转化物,结果平均出膏率 22.98% (1.73%),五味子醇甲平均质量分数 0.625% (1.21%),说明优选的工艺稳定可靠。

3 讨论

代谢组学和生物技术等新兴学科在中药药效物质研究中应用给中药药效物质的研究提供了新思路和新方法^[6],凸显出中药体内代谢研究已成为未来中药研究方向,但代谢组学和生物技术均存在无法避免的弊端,如代谢组学多以大鼠、小鼠为试验动物,难以模拟中药在人体内的代谢转化过程。为进一步模拟中药在人体内的代谢转化过程,基于“还原论”的思维体系建立了中药仿生转化理论,即以中药粗提物或部位作为底物,添加至一定量的仿生溶媒(人工胃液、肠液)体系中,在温和条件下,动态地进行培养,使水煎液中化学成分与仿生溶媒中生物酶进行相互作用,从而模拟中药水煎液在人体内转化、吸收过程。本实验使用智能溶出仪模拟人体胃环境,同时采用人工胃液作为转化介质,模拟人体胃环境温度,通过正交试验设计及单因素试验分析^[7-8],以出膏率及五味子入血有效成分——五味子醇甲作为评价指标^[9],建立了五味子的体外胃内仿生转化工艺。一方面可通过生物酶的转化作用获得大量结构新颖的化合物,其中部分化合物极有可能可作为新药研制过程中极为有效的先导化合物;

另一方面,通过对中药粗提物进行“预消化”处理,可能增加中药药效物质的生物利用度,从而改善中药生物利用度低的弊端^[10]。

[参考文献]

[1] 黄晓东,任旷.五味子木脂素研究进展[J].吉林医药学院学报,2010,31(1):46.

[2] HUANG M, JIN J, SUN H, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of cancer cells by five schizandrins isolated from the Chinese herb Fructus Schizandrae[J]. Cancer Chemoth Pharm, 2008, 62(6):1015.

[3] 石绘,万丽华,李贺,等.北五味子木脂素对小鼠镇静催眠作用的实验研究[J].中国老年保健医学,2012,10(5):27.

[4] 张兆旺,孙秀梅.半仿生提取法的特点与应用[J].世界科学技术——中药现代化,2000,2(1):35.

[5] 杨秀伟.基于体内过程的中药有效成分和有效效应物质的发现策略[J].中国中药杂志,2007,32(5):365.

[6] 梁逸曾,余雁,易智彪,等.代谢组学与中药现代化[J].中国医学科学院学报,2007,29(6):823.

[7] 黄弦,罗光明,左月明,等.正交试验法优选炒栀子的炮制工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):12.

[8] 殷钢,吴健.正交试验法优选山楂袋泡茶的水提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):56.

[9] 沈丹萍,杨莉,陶艳艳,等.HPLC-MSⁿ分析扶正化癆方中五味子的入血成分[J].中国中药杂志,2011,36(7):854.

[10] 陈新,胡朝奇,张洪长,等.仿生化提取人参皂苷类成分的初步研究[J].中国药房,2012,23(19):1752.

[责任编辑 仝燕]