基于中药炮制“醋制入肝”理论醋五味子对急性肝损伤作用谱效关系研究

葛宏霞[1]，李思琪[2]，梅景晨[1]，王 莹[1]，陈大忠[1*]

1. 黑龙江中医药大学，黑龙江 哈尔滨 150040

2. 河南中医药大学第二临床医学院，河南 郑州 450000

摘 要：目的 以“醋制入肝”中药炮制理论为基础，采用HPLC法分析不同醋制时间五味子成分变化，探讨成分变化与抗肝损伤作用关联，明确醋五味子保肝活性物质基础。**方法** 应用HPLC法建立10批生五味子及醋制1、2、3、4、5、6 h五味子指纹图谱，检测五味子醇甲、五味子乙素、五味子甲素、丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛（5-HMF）、五味子酯甲水平。以CCl_4诱导小鼠急性肝损伤为动物模型，结合血清生化指标天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）、丙二醛（MDA）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）的变化，运用灰色关联度法联合偏最小二乘法分析其保肝作用成分与药效之间的关联性。**结果** 10批五味子指纹图谱中，以五味子醇甲色谱峰为参比峰，标定出共有峰23个，其中特征峰6个；对10批生五味子及不同醋制时间下五味子指纹图谱与对照指纹图谱相似度组内对比发现，相似度均在0.913～0.999；随着蒸制时间的延长，五味子中5-HMF整体呈上升趋势；醋制3 h时五味子酯甲较生五味子质量分数略有增加，而后随着时间延长逐渐减小；醋制1～6 h内五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素质量分数较生五味子变化不大。与模型组比较，醋制2、3、6 h组AST、ALT、TNF-α、MDA水平显著降低，SOD水平显著升高（$P<0.01$）；醋制1 h组AST、MDA水平显著降低，SOD水平显著升高（$P<0.01$）；醋制4 h组AST、ALT水平显著降低，SOD水平显著升高（$P<0.01$）；醋制5 h组AST、ALT、TNF-α水平显著降低，SOD水平显著升高（$P<0.01$）。组间对比发现，醋制3 h组药效学指标明显较好，随着炮制时间延长，与醋制3 h组比较，醋制4、5、6 h组血清中AST、ALT、TNF-α、MDA水平有不同程度升高，SOD含量下降。故以醋制3 h五味子指纹图谱与药效学之间关联性建立谱-效关系研究，经灰色关联度法联合偏最小二乘法分析，5-HMF、五味子乙素、五味子醇甲为改善小鼠肝损伤的主要贡献成分。**结论** 醋制3 h五味子对CCl_4诱导急性肝损伤小鼠的作用效果最佳，其中五味子乙素、5-HMF及五味子醇甲对小鼠生化指标影响较显著。

关键词：五味子（醋制）；肝损伤；谱效关系；灰色关联分析；偏最小二乘法；5-羟甲基糠醛（5-HMF）；五味子乙素；五味子醇甲

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1674-6376（2023）09-1897-11

DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2023.09.009

Study on relationship of vinegar *Schisandra chinensis* on acute liver injury based on theory of "vinegar into liver" in traditional Chinese medicine processing

GE Hongxia[1], LI Siqi[2], MEI Jingchen[1], WANG Ying[1], CHEN Dazhong[1]

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The Second Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the composition changes of *Schisandra chinensis* with different vinegar preparation times, based on the traditional Chinese medicine processing theory of "vinegar preparation into liver", HPLC method was used to analyze the active ingredients in *S. Chinensis* with different vinegar preparation times, and identify the basis of the active substances protecting liver. **Methods** HPLC was used to establish 10 batches of raw *S. chinensis* and 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h fingerprint spectra of *S. chinensis* prepared with vinegar. The levels of schisandra alcohol A, schisandra B, schisandra A, acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), and schisandra ester A were detected. Using CCl_4 induced acute liver injury in mice as an animal model. Combined with

收稿日期：2023-03-20

基金项目：黑龙江省应用技术研究与开发计划重点项目（GA19C009）

第一作者：葛宏霞（1998—），女，硕士研究生，研究方向为药剂学。E-mail：ge18845125687@163.com

***通信作者：**陈大忠（1970—），男，硕士，研究员，硕士研究生导师，研究方向为中药物质基础及药剂学。E-mail：cdz89@163.com

serum biochemical indicators such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total superoxide dismutase (T-SOD), malondialdehyde (MDA), and tumor necrosis factor-α (TNF-α), using the grey correlation method combined with partial least squares method to analyze the correlation between its liver protective components and drug efficacy. **Results** In the fingerprint spectra of 10 batches of *S. chinensis*, a total of 23 peaks were identified using the schisandra alcohol methyl chromatographic peak as the reference peak, including six characteristic peaks. Comparing the similarity between the fingerprint of *S. chinensis* from 10 batches of raw *S. chinensis* and the control fingerprint under different vinegar processing times, it was found that the similarity was between 0.913 and 0.999 within the group. With the extension of steaming time, the overall 5-HMF content in *S. chinensis* shows an upward trend. When vinegar was used for 3 h, the mass fraction of *S. chinensis* ester A slightly increased compared to raw *S. chinensis*, and then gradually decreased with time. Within 1—6 hours of vinegar production, the mass fractions of schisandrin A, schisandrin A, and schisandrin B showed little change compared to those of raw *S. chinensis*. Compared with model group, the MDA, AST, ALT, and TNF-α level in the vinegar treated groups for 2, 3, and 6 h significantly decreased, while the SOD level significantly increased ($P < 0.01$), the levels of AST and MDA in the 1 h vinegar group significantly decreased, while the levels of SOD significantly increased ($P < 0.01$), the levels of AST and ALT in the 4 h vinegar group were significantly reduced, while the levels of SOD were significantly increased ($P < 0.01$); the level of AST, ALT, TNF-α significantly decreased and the SOD level significantly increased in 5 h vinegar group ($P < 0.01$). Comparison between groups showed that the pharmacodynamic indicators of the vinegar treated 3-hour group were significantly better. As the processing time prolonged, compared with the vinegar treated 3-hour group, the AST, ALT, and TNF-α levels in the serum of the vinegar treated 4, 5, and 6 hour groups were increased to varying degrees, while SOD content decreased. Therefore, a spectrum effect relationship study was established based on the correlation between the 3-hour fingerprint of *S. chinensis* prepared with vinegar and its pharmacodynamics. According to the combination of grey correlation analysis and partial least squares analysis, 5-HMF, schisandrin B, and schisandrin A are the main contributing components to improve liver injury in mice. **Conclusion** The best effect of 3-hour vinegar preparation of *S. chinensis* on CCl_4 induced acute liver injury in mice was observed, with schisandra B, 5-HMF, and schisandra alcohol A having significant effects on biochemical indicators in mice.

Key words: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; liver injury; spectral effect relationship; grey correlation analysis; partial least square method; 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF); schisandra B; schisandra alcohol A

以药性论和中医五行学说的“五味归五脏”为理论基础的中药炮制，是中医药临床遣药组方的特色。《素问·至真人论》曰：“夫五味入胃，各归所喜，故酸先入肝”。《医学入门》言“入肝用醋”。“醋制入肝”是中药炮制药物性味、归经和临床疾病治疗相结合的理论之一，中药经醋制后，引药入肝经，增强疏肝解郁、散瘀止痛，降低毒性、缓和药性等作用[1]。

中药五味子系木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis*（Turcz.）Baill. 的干燥成熟果实，味酸、甘、性温，有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功[2]。现代常见炮制方法以是否加入辅料为依据，分为炒制、蒸制及醋制、酒制、蜜制、酒蜜制等，其炮制程度也因其不同方法而不同论述，多为颜色或质感而定[3]。

文献报道五味子功效主要集中在中枢神经系统、心血管系统、消化系统、内分泌系统等[4-6]，其中对肝损伤研究颇多。现代药理研究发现，五味子中的木质素类成分与保肝活性相关联，构效关系中重要的活性基团是位于苯环上的亚二甲氧基，其数量与活性呈正相关[7]。五味子中代表性木质素类成分五味子甲素和五味子乙素通过调节细胞色素P450酶[8]、抑制肝细胞凋亡、促进肝再生[9]等发挥护肝作用。五味子工艺依据《中国药典》2020版四部（通则0231）醋炙项下“每100 kg炮制品用米醋20 kg，……炒至规定程度……”，其“规定程度”以外观色泽来判定，而在相近的外观、色泽等主观判断下，包含着不同的时间梯度和温度差异。这种炮制温度、炮制时间长度轴的不同，其物质组分的变化规律以及与临床药效差异的关联性，值得关注。

本研究以同等炮制温度下不同炮制时间的醋五味子为对象，结合“醋制入肝”的炮制理论[10]，桥接CCl_4致小鼠急性肝损伤模型药效学实验[11-12]，建立醋制五味子物质组分与肝损伤作用之间的谱-效关系[13]，探究谱-效之间的相互联系和规律，为中药炮制的工艺条件和质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器与试药

Waters 2695高效液相色谱仪；Kromasil C_{18}色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；AL-204型电子分析天

平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；CX-250型超声清洗仪（北京医疗设备二厂）；DZF-6020真空干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；WJX-A500型高速多功能粉碎机（上海缘沃工贸有限公司）；KDC-160HR高速冷冻离心机（上海予卓仪器有限公司）；SYNERGY H1型酶标仪（BioTek Instruments.Inc）；多管涡旋振荡器（TARGIN）。

天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）、丙二醛（MDA）试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为C010-2-1、C009-2-1、A001-1、A003-1）；肿瘤坏死因子-α（TNF-α）试剂盒（江苏酶标生物科技有限公司，批号MB-172/A）；五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、5-羟甲基糠醛（5-HMF）（中国食品药品检定研究院，批号分别为110857-201412、111529-201706、110764-201111、110765-200710、111626-201912，质量分数分别为99.4%、99.2%、99.5%、99.0%、99.9%）；丙烯酰胺（德国Dr.Ehrenstorfer GmbH公司）；纯净水、乙腈为色谱纯级别，其他试剂均为分析纯级别。

药材五味子来源见表1，经黑龙江中医药大学孙慧峰教授鉴定为木兰科植物五味子*S. chinensis*（Turcz.）Bail.的干燥成熟果实，习称“北五味子”，符合《中国药典》2020年版一部相关项下的规定。

表1 10批生五味子产地及批号

Table 1 Origin and number of 10 batches of raw *Schisandra chinensis*

样品编号	产地	批号
S1	亳州市远光中药饮片厂	2009005
S2	亳州市远光中药饮片厂	2009006
S3	亳州市远光中药饮片厂	2009007
S4	四川新荷花中药饮片股份有限公司	020111046
S5	四川新荷花中药饮片股份有限公司	020111047
S6	四川新荷花中药饮片股份有限公司	020111048
S7	安徽普仁中药饮片有限公司	2012021
S8	安徽普仁中药饮片有限公司	2012022
S9	安徽普仁中药饮片有限公司	2012023
S10	黑龙江德顺长中药饮片有限公司	200401

1.2 实验动物

清洁级健康ICR雄性小鼠90只，体质量为（20±2）g，小鼠和饲料均购自黑龙江中医药大学实验动物中心，实验动物生产许可证编号为SCXK（黑）2018-005，动物实验经黑龙江中医药大学伦理委员会批准，实验动物伦理号为2019071801，按3R原则给予人道关怀。

2 方法与结果

2.1 HPLC指纹图谱的建立

2.1.1 醋五味子炮制 参照《中国药典》2020年版四部（通则0231）项下醋炙法，每批药材均取6份生五味子，每份100 g，加米醋20 g，拌匀后闷润2 h，在米醋沸点条件下，分别蒸至1、2、3、4、5、6 h后，放凉，干燥，即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 分别取10批生五味子和对应批次的不同醋制时间下的醋五味子，粉碎，取粉末3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇50 mL，称定质量，超声处理（功率250 W、频率40 kHz）20 min，放冷，再精密称定质量，用甲醇补足减失质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 对照品溶液制备 分别精密称取五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、5-HMF和丙烯酰胺适量，置棕色量瓶中，分别加甲醇制成质量浓度为：五味子醇甲0.304 mg·mL^{-1}、五味子酯甲0.302 mg·mL^{-1}、五味子甲素0.302 mg·mL^{-1}、五味子乙素0.304 mg·mL^{-1}、5-HMF 0.117 28 mg·mL^{-1}和丙烯酰胺0.314 mg·mL^{-1}的对照品溶液。

2.1.4 色谱条件 Kromasil C_{18}色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相选择水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0～10 min，95% A；10～25 min，95%～49% A；25～30 min，49% A；30～40 min，49%～15% A；40～50 min，15% A），体积流量0.8 mL·min^{-1}；检测波长220～280 nm，二极管阵列检测器（DAD）；柱温30 ℃；进样量10 μL。

2.1.5 精密度考察 取醋制3 h S7五味子供试品溶液，按“2.1.4”项下色谱条件连续进样6次，进样量10 μL，记录色谱图，以13号峰五味子醇甲为参比峰，计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均＜3.0%，表明仪器精密度良好。

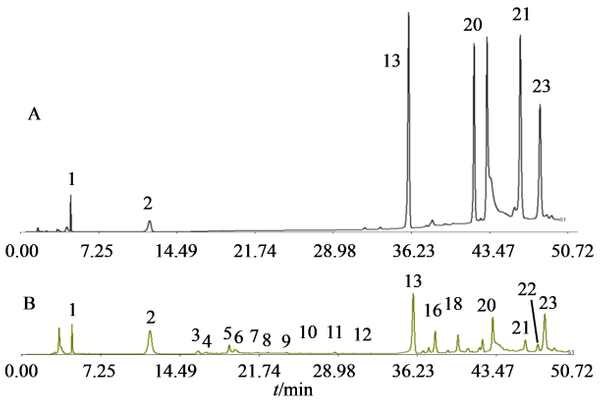
2.1.6 稳定性考察 取醋制3 h S7五味子供试品溶液，按“2.1.4”项下的色谱条件，在0、2、4、6、8、12 h测定，记录色谱图，以13号峰五味子醇甲为参比峰，计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均＜3.0%，表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.1.7 重复性考察 取醋制3 h S7五味子供试品溶液6份，精密称定，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.4”项下色谱条件测定，以13号峰五味子醇甲为参比峰，计算各共有峰相对峰面积和相对保

留时间的RSD均＜3.0%，表明本方法重复性良好。

2.1.8 样品测定及相似度评价 分别精密吸取生五味子和醋制五味子供试品溶液，按“2.1.4”项下色谱条件测定，记录色谱图。相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”（2012A版），以S1为参照色谱，自动匹配图谱，利用中位数法生成指纹图谱和对照指纹图谱。根据色谱图中物质组分的分离度、保留时间结合峰面积值，确定五味子醇甲（13号色谱峰）作为参比峰，共匹配出6个特征峰，与对照品色谱峰比对，确定1号峰为丙烯酰胺、2号峰为5-HMF、13号峰为五味子醇甲、20号峰为五味子酯甲、21号峰为五味子甲素、23号峰为五味子乙素。采用自动匹配模式计算出10批醋制五味子指纹图谱相似度评价结果，见图1、2及表2。

对10批次不同醋制时间五味子指纹图谱与对照指纹图谱相似度组内对比发现，相似度均在0.913～0.999，相似度良好，说明了组内10批醋制五味子质量的均一性及稳定性。



1-丙烯酰胺；2-5-HMF；13-五味子醇甲；20-五味子酯甲；21-五味子甲素；23-五味子乙素

1-acrylamide; 2-5-HMF; 13-schisandra alcohol A; 20-schisandra ester A; 21-schisandrin A; 23-schisandrin B

图1 混合对照品（A）、醋制五味子对照（B）的HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of mixed reference substance (A) and vinegar *S. chinensis* reference substance (B)

2.2 醋制五味子各成分含量测定

2.2.1 对照品溶液的配制 同“2.1.3”项下对照品溶液配制方法。

2.2.2 供试品溶液的配制 同“2.1.2”项下供试品溶液配制方法。

2.2.3 色谱条件 同“2.1.4”项下色谱条件。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，置于1 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀。精密吸取上述系列溶液各20 μL，注入色谱仪，按“2.1.4”项下的色谱条件测定峰面积。

以峰面积积分值为纵坐标，进样量为横坐标，得各组分回归方程、线性范围和相关系数。其中丙烯酰胺：$Y=2\times10^6X+2.972\,6$（$r^2=0.999\,2$）；5-HMF：$Y=1\times10^7X-35\,764$（$r^2=0.998\,3$）；五味子醇甲：$Y=5\times10^7X+454\,414$（$r^2=0.997\,4$）；五味子酯甲：$Y=4\times10^7X+24\,556$（$r^2=0.997\,5$）；五味子甲素：$Y=1\times10^8X+689\,522$（$r^2=0.997\,0$）；五味子乙素 $Y=5\times10^7X+463\,458$（$r^2=0.999\,7$），结果表明丙烯酰胺、5-HMF、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素分别在0.096 96～0.969 60 mg·mL^{-1}、0.058 64～0.586 40 mg·mL^{-1}、0.043 32～0.433 20 mg·mL^{-1}、1.449 6～14.496 0 μg·mL^{-1}、0.011 52～0.115 20 mg·mL^{-1}、0.041 52～0.415 20 mg·mL^{-1}内呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取“2.1.3”项下的混合对照品溶液，连续进样6次，按“2.1.4”项下的色谱条件测定，结果显示五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丙烯酰胺和5-HMF保留时间RSD值＜0.3%，峰面积RSD＜2%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取醋制3 h S7五味子供试品溶液6份，每份约3 g，精密称定，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.4”项下色谱条件连续进样，进样量10 μL，结果显示五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丙烯酰胺和5-HMF保留时间RSD值＜0.3%，峰面积RSD＜2%，说明本方法具有良好重复性。

2.2.7 稳定性试验 取醋制3 h S7五味子供试品溶液，按“2.1.4”项下的色谱条件在0、2、4、6、8、12 h进样，进样量10 μL，结果显示五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、丙烯酰胺和5-HMF保留时间RSD值＜0.4%，峰面积RSD＜2%，说明在12 h测定范围内，供试品溶液稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密称定已知各待测成分质量分数的五味子药材约1 g，共9份，分别加入约药材中各成分质量分数的80%、100%、120%对照品，按“2.1.3”项下的方法制成供试品溶液，每个质量浓度平行3份，按“2.1.4”项下的色谱条件测定，并计算加样回收率和RSD。结果显示，加样回收率在95%～105%，按照丙烯酰胺、5-HMF、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素的顺序，平均回收率分别为101.8%、101.9%、100.5%、101.0%、100.3%、101.4%，RSD分别为1.21%、2.02%、2.14%、

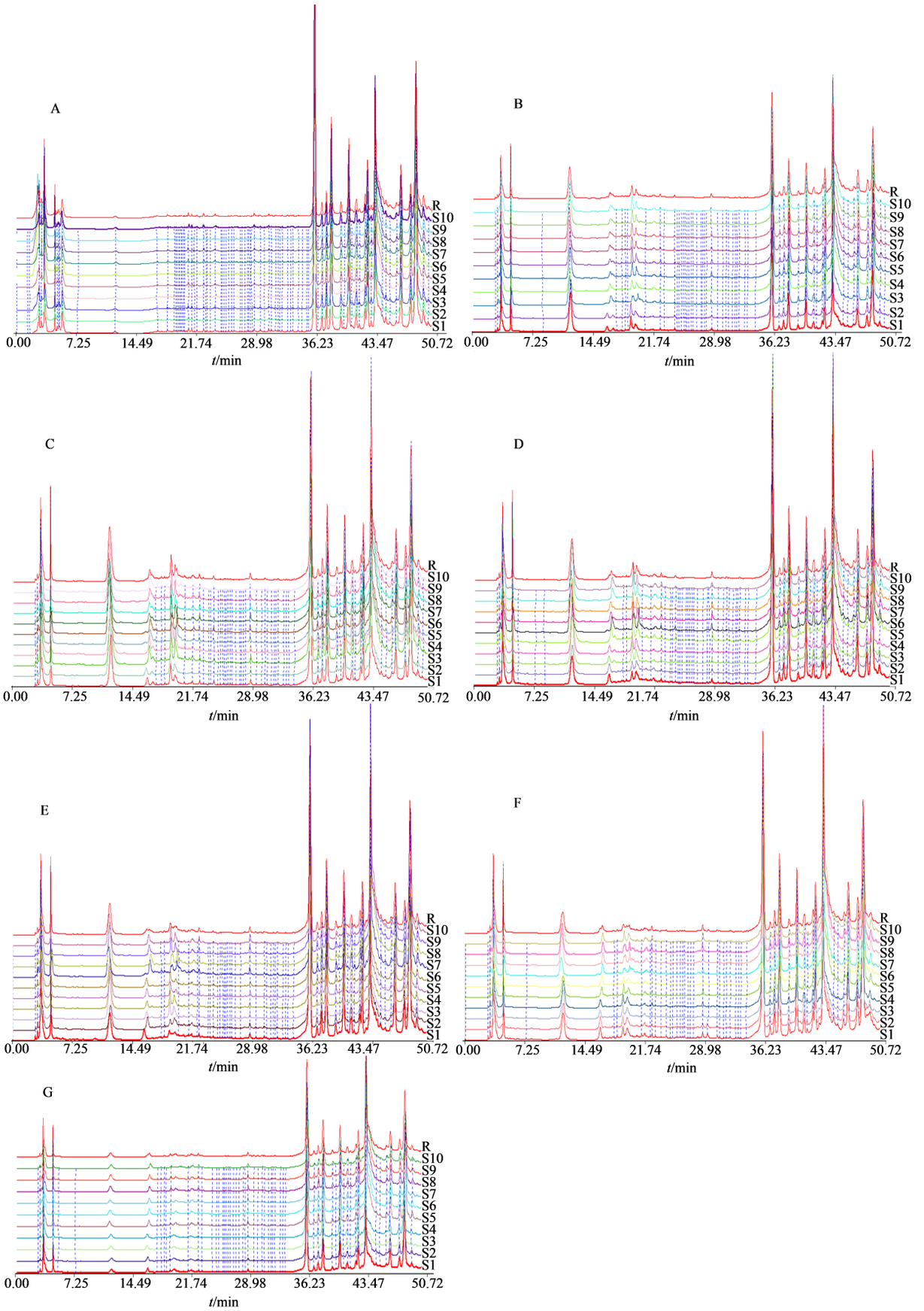


图 2 生五味子（A）以及醋制 6（B）、5（C）、4（D）、3（E）、2（F）、1（G）h 五味子指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of *S. chinensis* (A) and vinegar made 6 (B), 5 (C), 4 (D), 3 (E), 2 (F), and 1 (G) h sample

表 2 醋制五味子指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation fingerprint of *S. chinensis* prepared with vinegar

批次	醋制 1 h	醋制 2 h	醋制 3 h	醋制 4 h	醋制 5 h	醋制 6 h
S1	0.987	0.937	0.976	0.955	0.984	0.983
S2	0.913	0.922	0.984	0.936	0.960	0.981
S3	0.980	0.945	0.984	0.963	0.908	0.931
S4	0.952	0.955	0.988	0.963	0.908	0.996
S5	0.995	0.995	0.985	0.981	0.974	0.998
S6	0.996	0.997	0.991	0.920	0.974	0.999
S7	0.998	0.981	0.968	0.938	0.976	0.999
S8	0.999	0.977	0.930	0.937	0.975	0.999
S9	0.999	0.970	0.927	0.978	0.991	0.998
S10	0.996	0.978	0.907	0.977	0.990	0.998

1.50%、2.66%、1.69%，提示该方法准确性良好。

2.2.9 含量测定 按“2.1.4”项下色谱条件进样分析，测定不同醋制时间下五味子中不同物质组分变化趋势。对生五味子及不同炮制时间五味子物质组分对比，随着蒸制时间的延长，五味子中 5-HMF 整体呈上升趋势；醋制 3 h 时五味子酯甲较生五味子质量分数略有增加，而后随着时间延长逐渐减小；醋制 1～6 h 内五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素质量分数较生五味子变化不大，见图 3。

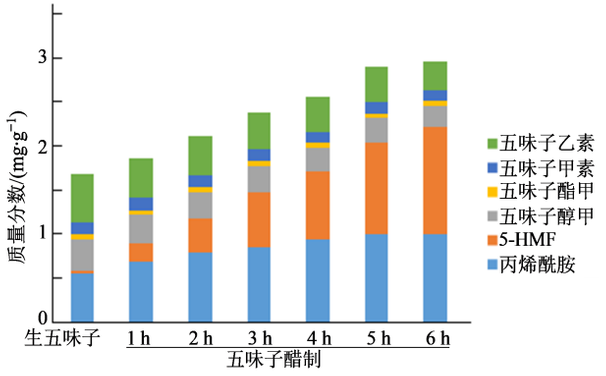


图 3 10 批不同炮制方法五味子成分含量均值

Fig. 3 Mean content of *S. chinensis* components in 10 batches with different processing methods

2.3 醋制五味子对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤保护作用

2.3.1 动物模型制备与给药 将小鼠随机分为醋制 1、2、3、4、5、6 h 五味子（S7）给药（C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6，相当于生药量 26.000 g·kg^{-1}）组，对照组，双环醇（阳性药，0.325 g·kg^{-1}）组和模型组，每组 10 只，雌雄各半，对照组和模型组 ig 给予等体积 0.9% 氯化钠溶液，连续给药 7 d。末次给药 1 h 后，除对照组外，其余各组小鼠 ip 0.2% 的 CCl_4 橄榄油溶液（10 mL·kg^{-1}）[11-12]。

2.3.2 生化指标检测及数据分析 建立 CCl_4 致肝损伤小鼠模型后，禁食不禁水 16 h，眼眶取血，3 000 r·min^{-1} 离心 15 min 分离血清，最后置于 4 ℃冰箱中保存备用。分别按照 AST、ALT、TNF-α、MDA 和 SOD 各自的试剂盒说明书操作，测定相应含量。

所采集的数据均利用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量数据，t 检验进行两两比较。

2.3.3 肝损伤保护作用考察 与对照组比较，模型组小鼠血清中 AST、ALT、TNF-α、MDA 水平均显著升高（$P<0.01$），SOD 水平显著下降（$P<0.05$、0.01）。与模型组比较，C_2、C_3、C_6 组 AST、ALT、TNF-α、MDA 水平显著降低，SOD 水平显著升高（$P<0.01$）；C_1 组 AST、MDA 水平显著降低，SOD 水平显著升高（$P<0.01$）；C_4 组 AST、ALT 水平显著降低，SOD 水平显著升高（$P<0.01$）；C_5 组 AST、ALT、TNF-α 水平显著降低，SOD 水平显著升高（$P<0.01$）。组间对比发现，随着炮制时间延长，C_3 组 AST、ALT 与模型组对比下降明显，TNF-α、MDA 较模型组有所下降，SOD 较模型组升高明显，药效学指标明显较好，其后 C_4、C_5 组血清中 AST、ALT、TNF-α、MDA 水平逐渐升高，SOD 水平逐渐下降，C_6 组除了 ALT、TNF-α 持续上升外，AST、MDA、SOD 水平逐渐较 C_4、C_5 组有所降低。故以醋制 3 h 五味子指纹图谱与药效学之间关联性建立谱-效关系研究。见表 3。

2.4 指纹图谱与抗肝损伤作用灰色关联分析（GRA）

2.4.1 原始数据的无量化处理 以醋制 3 h 五味子指纹图谱中代表性的 6 个特征峰峰面积（表 4）数据，对 ALT、AST、TNF-α、MDA 和 SOD 量值进行 GRA[14]。本研究采用均值法，均值化 ALT、AST、TNF-α、MDA 和 SOD 数据，见表 5。

$$X_i'_{(k)}=X_{i(k)}/\overline{X}_{i(k)}$$

$X_{i(k)}$ 为样本中的原始数据，$\overline{X}_{i(k)}$ 为样本中原始数据的均值，$X_i'_{(k)}$ 为处理后数据

2.4.2 计算参考数列与比较数列的灰色关联系数 将药效学指标 ALT、AST、TNF-α、MDA 和 SOD 的水平设定为母序列（参考序列，Y_j），依次记为 Y_1～Y_5，色谱图中各特征峰峰面积设定为子序列（比较序列，X_i），即 X_1～X_6，计算特征峰峰面积与 5 组药效学指标的关联系数。由表 6 可知，设定关联度＞

表3 醋五味子对ALT、AST、AST、TNF-α、MDA、SOD活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Table 3 Effects of *S. Chinensis* vinegar on activities of ALT, AST, AST, TNF-α, MDA, and SOD ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	剂量/（g·kg^{-1}）	ALT/（U·L^{-1}）	AST/（U·L^{-1}）	TNF-α/（pg·mL^{-1}）	MDA/（nmol·g^{-1}）	SOD/（U·mg^{-1}）
对照	—	72.53±8.39	102.69±11.25	418.00±21.96	2.28±0.28	442.18±20.92
模型	—	301.91±16.78$^{\#\#}$	519.36±24.49$^{\#\#}$	571.84±15.83$^{\#}$	4.48±0.35$^{\#}$	172.42±13.42$^{\#\#}$
阳性	0.325	84.42±8.99*	155.24±16.52**	437.33±17.28*	3.23±0.21**	336.48±15.12**
C_1	26.000	205.67±11.39	322.99±25.22**	473.31±18.60	3.71±0.22**	305.55±13.09**
C_2	26.000	136.42±9.65**	382.07±21.48**	438.63±22.06**	4.15±0.24**	305.85±13.08**
C_3	26.000	113.71±9.55**	238.09±17.69**	442.57±11.70**	3.62±0.21**	305.70±13.39**
C_4	26.000	154.68±9.44**	461.04±23.64**	450.55±23.11	4.35±0.23	296.38±12.79**
C_5	26.000	185.52±9.78**	479.34±17.79**	451.47±12.02**	4.26±0.24	290.79±13.11**
C_6	26.000	191.99±8.96**	374.82±29.43**	458.21±23.06**	3.74±0.21**	285.53±10.94**

与对照组：$^{\#}P$＜0.05 $^{\#\#}P$＜0.01；与模型组比较：$^{*}P$＜0.05 $^{**}P$＜0.01

$^{\#}P$ < 0.05 $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* control group；$^{*}P$ < 0.05 $^{**}P$ < 0.01 *vs* model group

表4 醋制3 h五味子HPLC指纹图谱中特征峰峰面积数值

Table 4 Characteristic peak area values of *S. chinensis* HPLC fingerprints after 3 h preparation of vinegar

组别	丙烯酰胺	5-HMF	五味子醇甲	五味子酯甲	五味子甲素	五味子乙素
C3S1	1 279 183	5 423 503	7 346 091	666 112	1 765 845	5 132 029
C3S2	1 364 649	6 479 960	7 149 158	847 730	2 035 883	5 016 784
C3S3	1 297 859	6 529 774	7 227 598	854 966	1 825 855	4 785 472
C3S4	1 350 950	6 663 579	7 090 667	805 706	1 852 667	5 053 292
C3S5	1 378 415	6 692 277	7 030 491	645 664	1 786 287	5 057 071
C3S6	1 383 418	5 424 324	7 381 856	642 840	1 780 396	5 148 951
C3S7	1 224 558	5 570 004	7 693 982	679 206	1 914 701	5 851 550
C3S8	1 115 858	5 180 850	7 250 713	636 111	1 803 492	5 263 620
C3S9	1 414 183	6 465 921	7 024 162	716 049	1 545 344	4 739 459
C3S10	1 415 145	6 404 470	7 015 888	775 993	1 696 052	4 883 586

表5 药效学指标均值化处理结果

Table 5 Results of pharmacodynamic indexes averaging

编号	均值化处理后数值				
	ALT	AST	TNF-α	MDA	SOD
S1	1.090 2	1.079 2	1.014 6	0.937 7	0.920 5
S2	1.078 3	1.006 7	1.018 3	1.016 4	0.988 9
S3	0.994 1	1.070 0	1.000 0	0.991 1	0.978 5
S4	0.988 0	0.997 8	1.023 8	0.947 7	1.097 6
S5	0.834 0	1.000 0	0.983 7	0.918 1	0.987 5
S6	0.997 1	0.971 4	0.978 3	1.043 8	0.992 7
S7	1.018 3	0.852 4	0.996 3	1.040 8	0.999 1
S8	0.989 5	0.936 6	1.020 1	1.079 0	1.018 8
S9	1.002 5	1.006 7	1.023 8	1.065 0	1.000 6
S10	1.008 0	1.079 2	0.941 2	0.960 3	1.015 8

0.6为影响谱-效的主要贡献者[14]，醋制3 h五味子中五味子醇甲、五味子乙素、五味子甲素、丙烯酰胺和5-HMF对各药效学指标有明显的影响。

2.5 指纹图谱与肝损伤指标的正交偏最小二乘法（OPLS）分析

2.5.1 OPLS回归方程的建立及分析 以各共有峰的峰面积作为自变量，肝损伤指标AST、ALT、TNF-α、MDA、SOD作为因变量，利用SIMCA 14.1软件，将其分别进行OPLS相关性回归分析，自动拟合到回归方程：

$$Y_{AST}=m_1+a_1X_1+a_2X_2+\cdots\cdots a_6X_6$$

$$Y_{ALT}=m_2+b_1X_1+b_2X_2+\cdots\cdots b_6X_6$$

$$Y_{TNF\text{-}\alpha}=m_3+c_1X_1+c_2X_2+\cdots\cdots c_6X_6$$

$$Y_{MDA}=m_4+d_1X_1+d_2X_2+\cdots\cdots d_6X_6$$

$$Y_{SOD}=m_5+e_1X_1++e_2X_2+\cdots\cdots e_6X_6$$

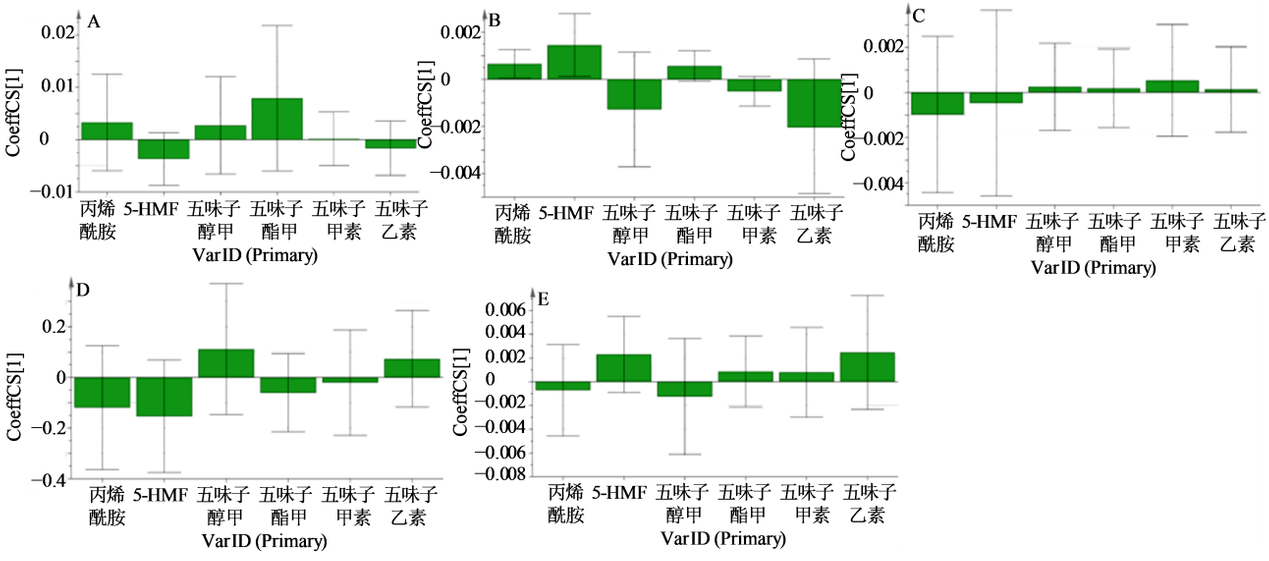
X_1～X_6为共有峰峰面积数值，a_1～a_6、b_1～b_6、c_1～c_6、d_1～d_6、e_1～e_6为共有峰与肝损伤指标的回归系数，m_1～m_5为常数项

结果如图4所示，相关系数符号反映与小鼠肝损伤指标的相关性，由于小鼠肝损伤指标AST、ALT、TNF-α、MDA与药效呈负相关，故回归系数为负数的色谱峰是对药效的贡献峰。肝损伤指标

表 6 醋制 3 h 五味子特征峰相对峰面积与药效学指标的谱效关系分析

Table 6 Analysis of relationship between characteristic peak area and pharmacodynamic indexes of *S. chinensis* after 3 h of vinegar preparation

子序列	关联度						综合
	ALT	AST	TNF-α	MDA	SOD	均值	排序
丙烯酰胺	0.671 2	0.744 8	0.648 9	0.709 7	0.644 5	0.683 8	4
5-HMF	0.605 8	0.705 4	0.514 3	0.572 5	0.611 0	0.601 8	5
五味子醇甲	0.796 7	0.743 8	0.780 4	0.764 3	0.743 8	0.765 8	1
五味子酯甲	0.614 8	0.660 9	0.476 1	0.539 5	0.612 8	0.580 8	6
五味子甲素	0.733 3	0.682 0	0.757 1	0.671 8	0.679 1	0.704 6	3
五味子乙素	0.709 6	0.709 3	0.722 8	0.701 5	0.705 4	0.709 7	2



A-AST；B-ALT；C-TNF-α；D-MDA；E-SOD

图 4 醋制 3 h 五味子指纹图谱与各肝损伤指标标准化回归系数

Fig. 4 Fingerprint of *S. chinensis* after 3 h of vinegar preparation and standardized regression coefficients of liver injury indexes

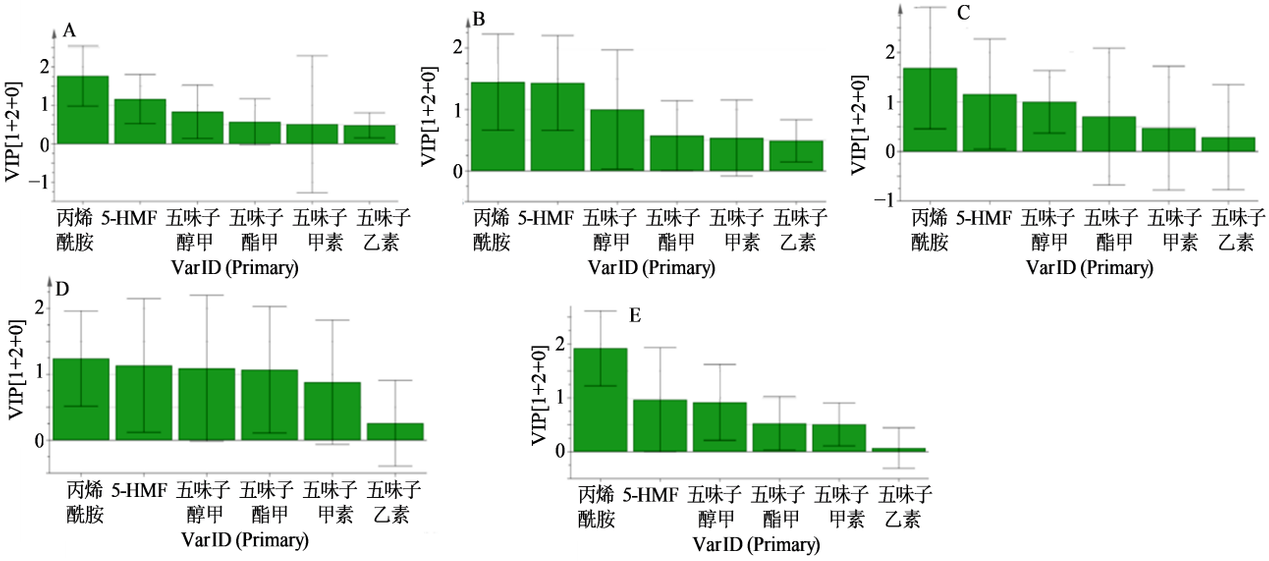
AST：5-HMF、五味子乙素的回归系数为负数；肝损伤指标 ALT：五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的回归系数为负数，五味子乙素、5-HMF 及五味子醇甲对小鼠肝损伤作用影响较明显。对于指标 TNF-α、MDA、SOD，5-HMF、五味子醇甲对小鼠肝损伤作用影响较明显。

2.5.2 变量重要投影（VIP）分析 VIP 是评价变量对分类贡献的常用指标，VIP 值越大表明其对该成分的贡献率越大，结果见图 5。综合肝损伤各指标的分类贡献，发现 ALT、AST、TNF-α、SOD 和 MDA 中，色谱成分峰的 5-HMF、五味子乙素、五味子醇甲 VIP 值较大，推测这 3 种成分为改善小鼠肝损伤的主要贡献成分。其中 5-HMF、五味子乙素各指标 VIP 值＞1，五味子醇甲部分指标 VIP 值＞1。

3 讨论

“醋制入肝”，始载于《内经》中的五脏理论，“肝欲散，急食辛以散之，用辛补之，酸泻之”，传统中医理论认为酸既有泻肝，亦有补肝等功效。随着中药现代化发展，醋制中药中的药性及成分变化研究逐渐兴起[15]。谱效关系分析利用现代分析技术，以合理的数据处理方法与合适的药理模型进行中药现代化分析[16]。本研究结合 GRA 及 OPLS 分析 2 种谱效关系分析方法，通过 HPLC 色谱图筛选，在检测波长为 280 nm 时，共匹配出 6 个特征峰，与对照品色谱峰比对，确定 1 号峰为丙烯酰胺，2 号峰为 5-HMF，13 号峰为五味子醇甲，20 号峰为五味子酯甲，21 号峰为五味子甲素，23 号峰为五味子乙素。

在《中国药典》2020 年版中，并未明确给出醋制项下五味子的最佳具体时间，高慧等[17]通过单因素



A-AST；B-ALT；C-TNF-α；D-MDA；E-SOD

图5 醋制3 h五味子指纹图谱与肝损伤各指标的贡献

Fig. 5 Contribution of fingerprints and liver damage indexes of *S. chinensis* after 3 h of vinegar preparation

考察蒸制和闷润时间对五味子醋制过程中6种木质素类成分变化，确定最佳炮制工艺为闷润1.5 h，蒸制3 h；葛会奇等[18]也通过正交试验，探究蒸煮时间，加醋量，闷润时间对醋制五味子的最佳炮制工艺，发现最佳工艺为闷润时间2 h，蒸制时间3 h，结合以上实验结果最佳工艺，定量闷润时间及给醋量后，考察1～6 h不同醋制时间的五味子内物质成分变化及其对肝损伤小鼠的抗肝损伤程度。值得注意的是，随着蒸制时间的延长，不同时间的五味子呈现不同程度的颜色变化，0～3 h时颜色逐渐由红转为黑，4 h后颜色趋于稳定，同时，随着蒸制时间的延长，五味子中5-HMF呈上升趋势，说明此时五味子内发生了美拉德反应，组间对比发现，醋制3 h时五味子酯甲较生五味子含量增加，而后随着时间延长逐渐减小，五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素较生五味子变化不大。考虑作为炮制过后美拉德反应的副产物5-HMF成分[19]，在抑制肝损伤层面，与含量增加的有效成分五味子酯甲协同作用。

CCl_4致小鼠急性肝损伤模型是经典实验性肝损伤动物模型，在人类与动物中表现出相似的病理变化，通过将CCl_4溶于脂溶性基质中以ip等方法实现给药过程[20-21]。肝脏为氨基酸代谢和核苷酸合成的主要器官，当其受到CCl_4影响时，氨基酸代谢发生紊乱[22]，当CCl_4进入机体后，激活体内CCl_4代谢反应，产生三氯甲基自由基等自由基活性中间体，此类中间体会结合细胞膜上磷脂类分子，改变细胞膜通透性，致使膜内活性物质AST、ALT等流出，故此部分指标可用以判断肝损伤程度，且呈正相关。当CCl_4与膜上脂质接触时，则产生大量脂质过氧化物MDA。SOD是体内一种重要的过氧化酶，其一般用作清除氧化自由基的重要指标，活性程度反映机体抗氧化能力，测定MDA与SOD可有效评判肝损伤的程度[23]。而TNF-α是介导肝损伤的主要因子，具有一定的促炎症性[24]，降低其含量可起到抑制炎症，从而保护肝脏的作用。通过测定小鼠肝组织中MDA、SOD和TNF-α的含量，从炎症因子水平的角度探索中药五味子炮制前后对CCl_4致小鼠急性肝损伤的保护作用。

动物实验结果发现醋制五味子治疗组与模型组相比，MDA水平明显降低，SOD含量显著升高，TNF-α含量降低，提示醋制五味子可抑制肝细胞的氧化应激，阻止肝细胞脂质过氧化，维持细胞质膜的正常结构，并降低炎症因子的释放，从而保护受损肝脏。通过5个药效学指标的数据对比分析发现醋制3 h的五味子对急性肝损伤的保护作用最强，进一步将醋制3 h五味子特征峰相对峰面积与药效学指标进行谱效关系分析。设定特征峰峰面积与5组药效学指标的关联度＞0.6，主要贡献者排序为五味子醇甲＞五味子乙素＞五味子甲素＞丙烯酰胺＞5-HMF＞五味子酯甲。由于小鼠肝损伤指标AST和ALT与药效呈负相关，五味子乙素、5-HMF及五味子醇甲对小鼠肝损伤作用影响较显著。对于指标TNF-α、MDA、SOD，5-HMF、五味子醇甲对小鼠肝损伤作用影响较明显。VIP综合肝损伤各指

标的分类贡献，发现ALT、AST、TNF-α、SOD和MDA中，色谱成分峰的5-HMF、五味子乙素、五味子醇甲VIP值均值＞1，推测这3种成分为改善小鼠肝损伤的主要贡献成分。但不同炮制方法与不同温度的变化对醋制五味子有效成分含量变化与治疗肝损伤功效的相关性，仍需继续研究。

本研究初步探讨了固定温度下不同炮制时间的醋五味子的稳定均一性及有效成分含量变化，结合中医传统理论“醋制入肝”，确定了醋五味子抑制急性肝损伤的主要有效成分，同时将炮制过程中产生的美拉德反应副产物与有效成分的含量变化对肝损伤治疗的作用，一并纳入研究内容，确认了多个有效成分（五味子乙素、五味子醇甲、5-HMF等）对肝损伤作用，有助于规范中药饮片炮制、生产及质量控制，为推动中药炮制向科学化、现代化发展提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘圆圆, 孟庆岩, 纪立金. 中医学五行哲学的思源与正误 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(11): 6337-6340.
Liu Y Y, Meng Q Y, Ji L J. Exploration and interpretation of the five elements philosophy of traditional Chinese medicine [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37 (11): 6337-6340.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.

[3] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范(1988年版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
Ministry of health of the People's republic of China. *Traditional Chinese Medicine Processing Specifications (1988 version)* [M]. Beijing: People's Health Publishing Press, 1988.

[4] 陈岩, 贾夏丽, 熊爱珍, 等. 五味子醇甲对千里光碱致小鼠肝损伤的改善作用 [J]. 药学学报, 2022, 57(12): 3626-3633.
Chen Y, Jia X L, Xiong A Z, et al. The protective effect of schisandrol A against senecionine-induced hepatotoxicity in mice [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(12): 3626-3633.

[5] 王玲, 黄佳. 五味子乙素调控Jak2/Stat3信号通路抑制心肌细胞氧化应激损伤 [J]. 西部中医药, 2020, 33(2): 11-14.
Wang L, Huang J. Schisandrin B regulating Jak2/Stat3 signaling pathway in the inhibition of oxidative stress damage of myocardial cells [J]. West J Tradit Chin Med, 2020, 33(2): 11-14.

[6] 张晓云, 赵海梅, 刘億, 等. 五味子甲素对结肠炎大鼠氧化应激水平的调控作用 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (2): 166-169, 后插25.
Zhang X Y, Zhao H M, Liu Y, et al. Regulation of schisandrin A on oxidative stress and ulcerative colitis in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(2): 166-169, Back insert 25.

[7] Hu D, Han N, Yao X C, et al. Structure-activity relationship study of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis* on lipopolysaccharide-induced microglia activation [J]. Planta Med, 2014, 80(8/9): 671-675.

[8] Li B, Li D N, Wang Y H, et al. Schisantherin A alleviated alcohol-induced liver injury by the regulation of alcohol metabolism and NF-κB pathway [J]. Exp Anim, 2018, 67 (4): 451-461.

[9] Jiang Y M, Fan X M, Wang Y, et al. Schisandrol B protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of liver regeneration [J]. Toxicol Sci, 2015, 143 (1): 107-115.

[10] 张倩, 薛蓉, 徐瑞杰, 等. 中药"醋制入肝"炮制理论的研究进展与探讨 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(18): 4854-4862.
Zhang Q, Xue R, Xu R J, et al. Processing theory of leading vinegar-processing Chinese medicine into liver [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(18): 4854-4862.

[11] 黎旸, 李瑾翡, 蒋忠军, 等. CCl_4致小鼠急性肝损伤模型的研究 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(6): 657-659.
Li Y, Li J F, Jiang Z J, et al. Acute hepatic injury caused by carbon tetrachloride [J]. J Trop Med, 2010, 10(6): 657-659.

[12] 范慧君, 邢婕, 孙慧敏, 等. CCl_4致大鼠慢性肝损伤模型参数优化及代谢组学评价 [J]. 药物评价研究, 2019, 42 (3): 412-421.
Fan H J, Xing J, Sun H M, et al. Parameter optimization and metabolomics study of CCl_4-induced chronic liver injury model [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(3): 412-421.

[13] 蔡靓, 张倩, 杨丰庆. 中药谱效学的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 5005-5011.
Cai L, Zhang Q, Yang F Q. Applications progress on spectrum-effect relationship in study of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(23): 5005-5011.

[14] 帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1303-1311.
Tie X Y, Dai H R, Xin G X, et al. Spectrum-effect relationship of petroleum ether fraction of *Aconitum sinomontanum* for promoting qi before and after steaming

with licorice juice based on grey correlation analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(5): 1303-1311.

[15] 苏联麟, 李昱, 徐祯, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的五味子醋制前后质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4643-4653.
Prediction and analysis of Q-markers between crude and vinegar *Schisandrae Chinensis Fructus* based on multivariate statistical analysis and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19): 4643-4653.

[16] 晏朝操, 张建锋. 基于谱效关联技术的中药研究现状 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1735-1740.
Yan C C, Zhang J F. Research status of traditional Chinese medicine based on spectrum effect correlation technology [J]. Mod Chin Med, 2020, 22(10): 1735-1740.

[17] 高慧, 佟鑫, 裴启洋, 等. 五味子醋制过程中6种木脂素类成分含量变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 32-35.
Gao H, Tong X, Pei Q Y, et al. Contents change of six kinds of lignans from *Schisandrae chinensis* Fructusin processing by vinegar [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(19): 32-35.

[18] 葛会奇, 贾天柱. 醋制北五味子最佳炮制工艺研究 [A]//中华中医药学会中药炮制分会, 山东鼎立中药材科技有限公司. 中华中医药学会第六届中药炮制学术会议论文集 [C]. 淄博, 2006.
Ge H Q, Jia T Z. Study on the best processing technology of *Schisandrae chinensis* in vinegar [A]//Chinese Medicine Association Chinese Medicine Processing Branch, Shandong Dingli Chinese Medicine Science and Technology Co., LTD. The sixth TCM firing of China association of Chinese medicine academic conference proceedings [C]. Zibo, 2006.

[19] 杨光明, 张玉玲, 戴婷婷, 等. 山茱萸美拉德反应产物对CCl_4致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(6): 786-790.
Yang G M, Zhang Y L, Dai T T, et al. Protective effect of Maillard reaction products of fructus corni on CCl_4-induced liver injury in mice [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2015, 26(6): 786-790.

[20] 方春秋, 张文军, 张景洲, 等. 常见肝损伤动物模型构建和应用的研究状况 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(3): 276-280.
Fang C Q, Zhang W J, Zhang J Z, et al. Research status of the construction and application of common liver injury animal models [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(3): 276-280.

[21] Lin L T, Li R, Cai M Y, et al. Andrographolide ameliorates liver fibrosis in mice: Involvement of TLR4/NF-κB and TGF-β1/Smad2 signaling pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7808656.

[22] Eidi A, Mortazavi P, Behzadi K, et al. Hepatoprotective effect of Manganese chloride against CCl_4-induced liver injury in rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 155(2): 267-275.

[23] 王君明, 崔瑛, 王峥涛, 等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 265-269.
Wang J M, Cui Y, Wang Z T, et al. Research progress of superoxide dismutase involved in liver injury [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2011, 17(7): 265-269.

[24] 曹盼, 胡浩, 罗威伟, 等. 抗病毒天然免疫、炎症与癌变机制 [J]. 中国基础科学, 2018, 20(1): 22-24, 29.
Cao P, Hu H, Luo W W, et al. Mechanisms of antiviral innate immunity, inflamma-tions and tumorigenesis [J]. China Basic Sci, 2018, 20(1): 22-24, 29.

[责任编辑 兰新新]