



论文

基于“成分-药效”关联分析的六味地黄丸质量控制方法

朱东亮^①, 张海^②, 田文君^②, 陈啸飞^①, 安睿^③, 柴逸峰^{①*}, 王新宏^{③*}^① 上海第二军医大学药物分析教研室, 上海 200433^② 上海东方肝胆医院药材科, 上海 200433^③ 上海中医药大学中药化学教研室, 上海 200032

*通讯作者, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

收稿日期: 2010-02-22; 接受日期: 2010-04-07

摘要 本文以中药复方制剂六味地黄丸为研究示例, 分别进行六味地黄丸药效成分明确化鉴别、典型药理模型的药效实验、成分与药效的关联分析, 共鉴别出六味地黄丸中 16 个成分. 通过成分与药效的关联性分析, 得出 4 个与典型药理模型药效相关的成分. 建立了指标性成分的含量测定方法学, 通过“成分与药效”的关联性分析所得出指标性成分的含量测定方法, 可实现对中药复方制剂六味地黄丸的质量控制.

关键词六味地黄丸
“成分-药效”关联
指纹图谱
含量测定

1 引言

长期以来, 中药的质量控制与评价一直借鉴西药的质量控制模式, 多通过测定中药中单个或几个成分的含量来控制中药质量. 但中药与西药不同, 是一个灰色或者黑色体系, 所含成分多且复杂. 依据中医药理论, 中药疗效的产生既不是单一活性成分的作用结果, 也不是多种活性成分作用的简单加合, 有限的活性成分或指标性成分难以反映中药所体现的整体疗效.

中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴定手段, 将能较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的种类与数量, 进而对药品质量进行整体描述和评价, 但指纹图谱中各色谱峰所代表的化学成分仍然不够明确, 中药的作用机制也不清楚, 且“成分与药效之间的关联性”在现阶段还没有得到有效的表达^[1-3]. 因此, 现有的中药质量控制模式还不足以说明中药的整体作用和多成分、多靶点协同作用特点, 中药分析也无法保证中药的安全、有效、稳定、可控. 因此, 建

立一种既重视指标性成分, 又关乎其他活性成分的质量评价方法, 才能达到全面控制中药质量的目的.

中药复方质量控制体系的建立必须以中医的复方配伍和方证相关理论为指导, 考虑“方-证-效-化学组分群”的内在联系, 根据中药多途径的作用靶点, 基于相应的动物药理模型, 采用现代分离分析手段, 通过信息解析, 确定相关评价指标^[4].

本研究选择经典的中医经方复方六味地黄丸和其成熟的中医病证模型为研究示范, 通过复方中药指纹谱及生物效应谱的建立, 探讨生物体内相关化学组分群与生物效应的相互关系, 运用色谱分离技术与计算机信息处理技术, 综合评价, 确定中药复方中的有效组分群, 建立符合中药复方多成分、多靶点、整体作用特点的质量控制方法.

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

美国 Agilent 公司 1200 系列液相色谱, 包括

Agilent MassHunter workstation 色谱质谱工作站. TDL-5-A 冷冻离心机(飞鸽牌系列离心机); HP-UV845 检测器; 水平离心机; 96孔聚乙烯细胞培养板; CO₂ 培养箱; ELX800 酶标仪; CKX41SF 型显微镜; 高压锅; 超净工作台; 电子天平; 移液器等.

乙腈为 HPLC 级, 美国 Fisher 公司; 95%乙醇为分析醇, 上海国药集团; 水为娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯. 莫诺昔、泽泻醇 B-23-单乙酸酯购自上海亚培生物科技有限公司, 没食子酸、马钱苷、芍药苷、獐芽菜苷和丹皮酚购自中国药品生物制品检定所, 5-羟甲基糠醛(5-HMF)购自美国 Sigma 公司, 纯度均在 98%以上.

六味地黄丸样品见表 1; 对照药品为醋酸甲羟孕酮复合胶囊(商品名: 妇复春胶囊, 北京蕾波制药厂), 每粒含醋酸甲羟孕酮 0.25 mg, 炔雌醇 0.625 μg, 葡萄糖酸钙和维生素 E、A、D 等. 批准文号: 国药准字 XF20000321.

主要试剂: 脱脂脱纤维绵羊红细胞(SRBC), 上海青阳有限公司, 使用前用生理盐水离心洗 3 次, 用生理盐水制备不同浓度的 SRBC 悬液备用; 都氏试剂; 青霉素; 链霉素; RPMI-1640 培养基; 胎盘蓝; 噻唑蓝(MTT); 二甲亚砜(DMSO); 胎牛血清(FCS); 淋巴细胞分离液; 吉氏染色液; 细胞重悬液; 无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液等.

2.2 实验动物

3~4 月龄 SD 健康雌性未孕大鼠, 115 只, 体重 180~200 g, 均为清洁级动物. 由上海中医药大学动物实验中心提供.

动物饲养环境: 二级实验室, 室温为 22~25 °C,

表 1 六味地黄丸样品信息

编号	品牌	批号	剂型
1	童涵春	081112	浓缩丸
2	仲景	081204	浓缩丸
3	同仁堂	7071016	浓缩丸
4	九芝堂	20070773	浓缩丸
5	佛慈	2008184	浓缩丸
6	颐海	070905	滴丸
7	同仁堂	8012117	大蜜丸
8	同仁堂	8173902	软胶囊
9	同仁堂	8034243	水蜜丸
10	仲景	070623	浓缩丸
11	仲景	081268	浓缩丸

湿度为 45%~65%, 昼夜明暗交替时间为 12:12. 分笼适应性喂养 5 天.

2.3 样品制备方法

将六味地黄丸粉碎, 称取粉末 5 g, 加入 50%乙醇约 50 mL, 超声波振荡提取 2 次, 每次 15 min, 合并提取液, 过滤. 将滤液减压浓缩, 用 50%乙醇定容至 50 mL, 定容后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液作为 HPLC/MS 分析样品.

2.4 六味地黄丸中分析-色谱和质谱条件

色谱柱为 Agilent ZorbaxSB-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为二元梯度系统, 其中溶剂 A 为乙腈, 溶剂 B 为 0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: (0 min, A 为 3%; 3 min, A 为 5%; 28 min, A 为 22%; 42 min, A 为 60%; 53 min, A 为 75%; 60 min, A 为 90%), 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 °C; 二极管阵列检测器, 设定波长 240 nm; 自动进样 10 μL.

质谱条件: ESI 离子源, 正离子检出模式; 雾化气压力: 40 psi; 干燥气(N₂)流速: 10 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 碎片裂解电压: 180 V; 柱后分流比: 1/3; 扫描质量范围 100~1100 amu.

2.5 药理实验

2.5.1 实验分组

随机选择 10 只假手术, 其余均摘除双侧卵巢去势, 肌注青霉素生理盐水液(8 万 u/mL)抗炎, 每只肌注 1 mL, 连续 5 天. 1 周后对所有受试大鼠进行阴道涂片, 连续 5 天, 淘汰没有去势彻底的大鼠.

将 10 只假手术大鼠为假手术空白组, 其余大鼠随机分为 13 组, 分别为: 模型组, 阳性对照组, 各六味地黄样品组等, 各 10 只, 适应性喂养 2 天.

2.5.2 给药方法与剂量

阳性药物对照组: 妇复春胶囊混悬剂(成人每日用量为 1.5 粒/60 公斤体重, 按人和大鼠体表面积折算的等效剂量比值, 即按每公斤体重 0.25 粒原胶囊给药)配置时将 1 粒胶囊粉末加入 40 mL 生理盐水中充分混匀, 按照 1 mL/100 g 体重灌胃, 每日 1 次, 连续 20 天, 作为阳性药物对照组.

六味地黄丸给药组: 取六味地黄样品(见表 1), 碾成粉末, 给药量按人和大鼠体表面积折算的等效

剂量比值, 配成 1 g/mL 生药量, 灌胃, 每日 1 次, 连续 20 天。

2.5.3 动物模型的建立

2.5.3.1 手术去势

去势大鼠 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉成功后, 备皮、大鼠侧卧于手术台上, 消毒后, 在选定的切口地方(腋中线末肋下约 2 cm 处)剪开一长约 2 cm 的切口, 钝性分离(经筋膜, 肌层)逐层进入腹腔, 可见乳白色脂肪组织, 轻轻将之提出腹腔, 即可见被之包裹之粉红色绿豆大小“桑椹样”大鼠卵巢, 分离后钳夹、结扎、剪去卵巢, 检查无渗血, 将脂肪组织和子宫角送回腹腔内, 分二层间断缝合, 关闭腹腔和缝合皮肤; 以碘伏消毒创面, 同法处理对侧卵巢。手术当天麻醉死一只, 剩下 99 只。术后连续五天肌注青霉素生理盐水液(8 万 u/mL)抗炎, 每只肌注 1 mL。观察结果连续 5 天 CI<50%者, 即认为手术去势成功, 纳入研究对象。阴道涂片仍有动情周期变化者认为去势不彻底, 予以剔除。假手术组大鼠阴道脱落细胞涂片出现规律动情周期者用做正常对照。

2.5.3.2 阴道上皮脱离细胞涂片

阴道上皮细胞的成熟程度与体内雌激素水平成正比。雌激素的主要作用是上皮增生、细胞成熟。其影响程度一般以角化细胞指数为依据。当雌激素水平增高时, 阴道细胞出现较多的角化细胞及核致密现象。当雌激素水平低下时, 细胞涂片出现小圆形、卵圆形、核疏松之中层及低层细胞。

操作方法。沾取法: 将装有消毒生理盐水的点滴管轻轻插入大鼠阴道内, 按压点滴管橡皮头, 将生理盐水打入阴道, 然后又吸出, 如此 2~3 次, 最后将滴管中的阴道冲洗液滴在载玻片上, 自然风干后, 放入 95%乙醇固定液中固定 15 分钟后取出自然干燥备用。将固定好的载玻片置于 40×10 显微镜观察, 计数 200 个细胞, 其中角化细胞所占的比例即为阴道脱落细胞角化指数(CI), 以 CI>50%定为雌激素阳性反应, 连续 5 天无阳性反应定为性周期消失。间情期阴道涂片表现为: 以大量多核白细胞为主, 可见少量上皮细胞。动情期阴道涂片表现为: 以大量角化上皮细胞为主, 形状大而不规则, 间有少量上皮细胞。

2.5.3.3 标本的采集与处理

(1) 血标本的采集与处理

末次给药 24 小时后, 采用腹主动脉取血, 先于室温下, 静置 30 min 后, 3000 r/min 离心 20 min, 吸出血清, -20 °C 冰箱保存。

(2) 组织标本的采集与处理

称取大鼠体重, 取血后处死, 取出大鼠子宫, 将周围脂肪组织剥离干净, 并以电子分析天平称出湿重。

2.5.3.4 检测指标与方法

(1) 血清 E2、LH、FSH 的检测

采用 γ 放射免疫分析法测定血清 E2、LH、FSH 含量。使用双抗法。操作规程按试剂盒说明书进行。

E2 的批号: 20081023, LH 的批号: 20081021, FSH 的批号: 20081019。

(2) 子宫重量法

将称得的子宫湿重分别除以体重, 按以下公式计算:

$$\text{子宫指数} = \frac{\text{子宫湿重}(\text{mg})}{\text{体重}(\text{g})} \times 100\%$$

2.6 数据分析

所有数据均采用 SPSS11.5 统计软件进行处理, 定量指标用 One-Way ANOVA 方差分析, 组间比较采用 LSD、S-N-K 分析和 Tamhane's T2 检验。

2.6.1 六味地黄丸对雌性去势大鼠生殖内分泌失调的调节作用

六味地黄丸被广泛应用于上百种疾病的治疗, 其中许多疾病和下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴平衡失调有关。HPG 轴是神经内分泌免疫调节(NIM)网络的重要组成部分, HPG 轴平衡失调是 NIM 网络平衡失调的重要原因之一^[5-7]。

本实验主要研究六味地黄浓缩丸摘除双侧卵巢后, 雌性大鼠下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴各环节激素水平的变化。

2.6.2 药物对大鼠生殖激素的影响

从表 2 可以看出, 去势后, 去势空白组(模型组)的 E2 水平显著降低, 与假手术空白组比较有极显著差异($P<0.01$)。用药后各组 E2 水平均有升高趋势, 给药组与模型组之间有显著性差异($P<0.05$)。但是不同

表2 各组大鼠血清 E2、LH、FSH 比较($\bar{x} \pm s$)($n=10$)

组别	E ₂ (pg/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	子宫指数 (mg/100 g, w)
正常组	13.57±2.46	2.57±1.10	1.34±0.65	150.25±16.32
模型组	7.75±2.01 **	4.54±0.85 **	4.54±0.86 **	32.70±4.72 **
阳性对照组	12.46±2.48▲	3.25±1.05▲	2.43±0.96▲	42.40±3.99▲
1	12.44±1.74▲	3.54±1.00	2.65±1.07▲	34.99±3.59
2	12.27±1.98▲	3.51±0.97	2.71±0.96▲	38.69±5.63
3	12.19±1.70▲	3.53±0.55	2.77±0.93▲	40.42±5.07
4	12.37±1.65▲	3.50±0.86	2.96±0.90▲	43.09±3.65
5	12.29±1.66▲	3.51±0.70	2.81±0.91▲	40.68±3.62
6	12.10±1.34▲	3.71±1.41	3.18±0.85▲	44.26±4.56
7	12.03±1.20▲	3.57±0.47	2.79±0.72▲	39.75±3.21
8	11.89±1.32▲	3.47±0.32	2.51±0.63▲	38.08±3.99
9	12.24±1.29▲	3.48±0.41	2.60±0.44▲	41.10±3.07
10	12.37±1.71▲	3.55±0.44	2.68±0.57▲	39.92±2.65
11	12.34±1.22▲	3.47±0.63	2.78±0.70▲	39.25±2.76

注: **与假手术空白组(正常组)比较 $P<0.01$; ▲与手术组(模型组)比较 $P<0.01$.

给药组之间无显著差异($P>0.05$)说明药物对内分泌失调有疗效,但是不同药物之间没有显著性差异,即不同厂家六味给药后均有疗效.

从表2可以得去势空白组(模型组)的 FSH、LH 的水平明显升高,与假手术空白组比较有极显著差异($P<0.01$).用药后各组 FSH、LH 的水平明显降低,但 FSH 只有阳性药有显著性差异,其他药物无显著差异($P>0.05$),而阳性组、佛慈组、童涵春组、怀化正好的 LH 与模型组有显著性差异($P<0.05$),阳性药与正常组有显著性差异($P<0.05$),各给药组 LH 下降并不明显,说明药物不能使升高的 LH 水平降低.

2.6.3 药物对大鼠子宫指数的影响

分析表2结果,去势后,大鼠子宫指数明显降低,与假手术空白组比较有极显著差异($P<0.01$),给药组子宫指数比去势空白组均有增高趋势,其中阳性对照组与去势空白组有显著性差异($P<0.05$).

2.6.4 LRAS方法进行药效指标成分筛选

由于中药物质基础的复杂性,在定量描述中药化学成分与药理效应之间关系时,必须借助复杂系统建模的方法.就本研究所选样本数及所获信息的特点,选用 LARS(Least Angle Regression Algorithm)算法的非线性多元回归方法进行分析.该算法是2004年由美国学者提出的一种回归算法,是一个残

差拟合过程,当选择了一个变量以后,把结果中减去该变量的影响,得到的便是残差,然后再在该残差的基础上选择新的特征,因此拟合过程也就是残差不断减小的过程,据此, LARS 算法可同时实现显著性变量的选择和对应参数的估计.适合“非线性、离散性、小样本”数据分析^[8,9].本研究采用该算法在指纹谱中寻找与药效相关的成分,可为建立中药指纹图谱与药效学相关的复方中药质量控制模式与评价方法奠定基础.

将不同厂家的六味地黄丸的色谱指纹谱得到的8个共有峰,结合药效实验所得指标,采用 LARS 算法对六味地黄丸色谱指纹谱信息与药效进行相关性分析.具体步骤如图1.

3 结果与讨论

3.1 HPLC-MS鉴别六味地黄丸中的化学成分分析

六味地黄丸提取物中化学成分十分复杂,必须采用梯度洗脱程序才能得到较好的分离,采用乙腈-0.1%甲酸作为洗脱溶剂,得到了较好的分离色谱图片,在 HPLC-TOF-MS 总离子流图谱(图2)中,相对于质谱负离子检测模式而言,正离子检出模式下各种化学成分具有较好的响应,故最终采用正离子检测

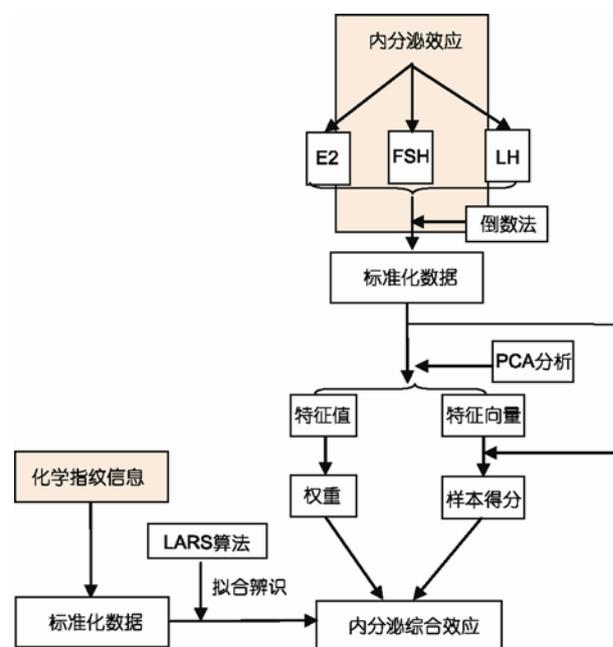


图1 LARS用于化学指纹图谱与内分泌效应相关分析图

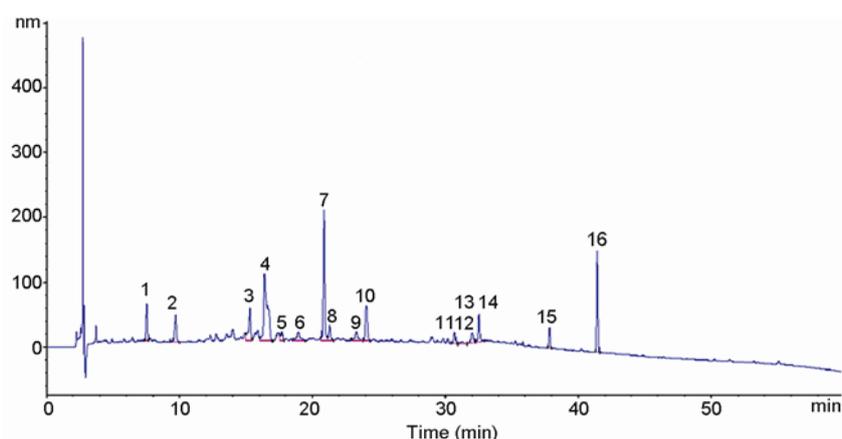


图2 六味地黄丸 HPLC 色谱图

模式。

对得到的色谱图利用 MassHunter qualitative 软件的自动匹配功能, 利用 TOF 获得的化合物精确分子量, 结合对照品和文献中报道的化学成分进行自动匹配, 搜寻质量偏差为 5 ppm 的色谱峰, 最终得到如表 3 中的成分鉴别结果。对 11 个批号的样品分别进行了分析, 得到的图谱采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱评价系统》软件进行分析, 建立了色谱峰的共有模式, 得到了共有峰(见图 3)。

研究采用了不同厂家(批号)的样品, 分为蜜丸、浓缩丸、胶囊和滴丸等四个不同剂型, 它们的生产工艺也不同, 如蜜丸主要以药材粉末直接入药, 而浓缩丸是各味药材分别提取后混合制剂等, 而中药中很多的化学成分主要是微量成分, 对工艺的敏感度较高,

很容易由于提取、前处理等不同工艺而造成对不同成分提取效率不同, 提取的含量不相同, 导致最终在成分以及成分的含量上均存在差异, 同时分析结果表明, 同一厂家(如仲景)同一剂型的不同批号的成分也有一定差异, 应该主要是不同批号的组方药材的差异造成的, 不同厂家之间也存在同样的问题, 提示厂家在生产中应加强原药材的质量控制, 能够保持药材质量的稳定性, 也就能够保证了最终产品质量的稳定性。

3.2 六味地黄丸对雌性去势大鼠生殖内分泌失调的调节作用综合主成分评价

对雌性去势大鼠生殖内分泌失调的调节作用各指标标准化后的数据矩阵进行主成分分析, 获得相

表3 六味地黄丸成分定性鉴别结果

Peak No	化合物	M+X	RT	Mass	Mass (Tgt)	ppm	Formula (Tgt)	文献
1	没食子酸	M+H-H ₂ O	9.77	170.0235	170.0215	1.91	C ₇ H ₆ O ₅	对照品比对
2	5-羟甲基糠醛	M+H	10.88	126.0311	126.0317	-4.44	C ₆ H ₆ O ₃	对照品比对
3	乙酰梓醇	M+Na; 2M+Na	17.155	404.1313	404.1319	-1.36	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	[10]
4	莫诺昔	M+Na	18.098	406.1429	406.1475	-1.3	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	对照品比对
5	氧化芍药苷	M+Na-H ₂ O	20.4	496.1638	496.1581	1.55	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	[11]
6	mudanpioside E	M+Na	21.982	526.1696	526.1686	1.87	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	[11]
7	马钱苷	M+Na; M+K	22.941	390.1531	390.1526	1.34	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	对照品比对
8	獐芽菜苷	M+Na; 2M+Na	23.229	358.1269	358.1264	1.49	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	对照品比对
9	洋地黄叶苷 C	M+Na	28.648	800.2757	800.2739	2.21	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	[12]
10	芍药苷	M+Na	26.458	480.1645	480.1632	2.77	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	对照品比对
11	mudanpioside D	M+Na	29.863	510.1750	510.1737	2.58	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	[11]
12	没食子酰芍药苷	M+Na	32.676	632.1752	632.1741	1.66	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	[11]
13	1,2,3,4,5-五-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	M+Na	34.019	940.1180	940.1180	-0.37	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	[13]
14	山茱萸新苷 I	M+Na	34.371	542.1654	542.1636	3.37	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₄	[14]
15	苯甲酰芍药苷	M+Na	39.390	584.1916	584.1894	3.79	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	[11]
16	丹皮酚	M+H	42.667	166.0589	166.0630	3.01	C ₉ H ₁₀ O ₃	对照品比对

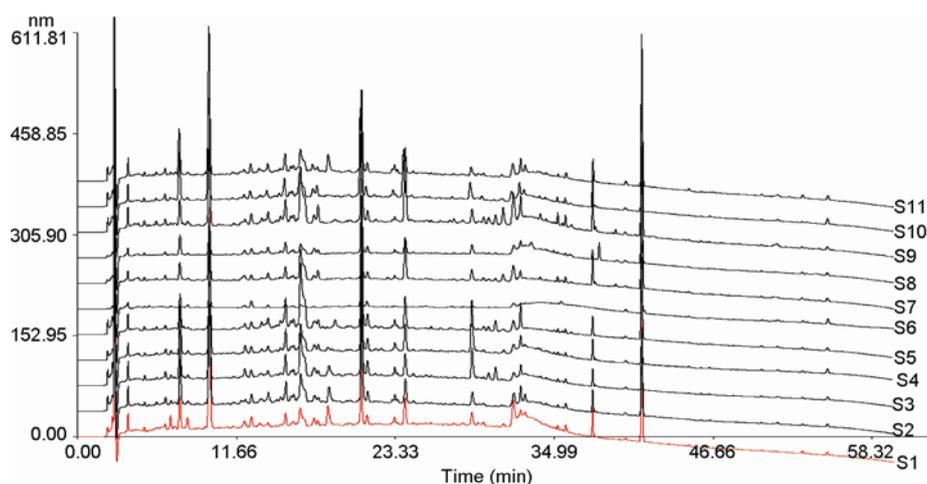


图3 六味地黄丸指纹图谱叠加图(11个批次)

表4 主成分分析的特征值, 特征向量及方差贡献率

主分数	Pc1	Pc2	Pc3	Pc4
E2	0.082	0.960	-0.070	0.258
FSH	0.618	-0.252	0.009	0.744
LH	0.548	0.119	0.711	-0.424
子宫指数	-0.557	-0.021	0.700	0.447
特征值	2.263	1.057	0.559	0.121
权重	0.566	0.264	0.140	0.030

表5 六味地黄丸各样本得分结果

样品	Pc1	Pc2	Pc3	Pc4	综合主成分 F 值
1	1.583	1.070	-1.563	-0.101	0.957
2	0.669	0.204	-0.164	-0.106	0.406
3	-0.175	-0.238	0.091	-0.012	-0.149
4	-1.017	1.142	1.161	-0.243	-0.119
5	-0.176	0.425	0.335	-0.125	0.056
6	-3.776	-0.575	-0.619	0.090	-2.372
7	-0.465	-1.173	-0.405	-0.247	-0.637
8	1.742	-2.238	0.247	-0.084	0.426
9	0.814	-0.099	0.897	0.585	0.578
10	0.188	0.663	-0.336	0.700	0.256
11	0.612	0.819	0.357	-0.458	0.599

应的特征值、特征向量及样本得分, 结果见表4、5。

将各成分进行线性组合, 即可构造出可综合体现对雌性去势大鼠生殖内分泌失调的调节作用的综合主成分 F, 由表5可见童涵春浓缩丸的综合调节作用相对较强, 而颐海药业的六味地黄滴丸的综合调节作用相对较弱。

表7测定的含量结果表明, 不同剂型、不同厂家的产品中主要化学成分的含量存在差异, 童涵春浓缩丸的主要化学成分的含量最高, 对药效具有正

效应的成分如 5-HMF 也最高, 而颐海滴丸则含量则最低, 同时 5-HMF 含量也是最低的, 这与免疫综合调节作用强弱的结论一致, 反映出不同剂型的综合调节作用的差异主要还是由于化学成分的差异造成的, 也表明化学成分的差异才是药效差异的根源所在。

3.3 色谱指纹谱的共有峰与药效相关性分析

将色谱指纹谱得到的 8 个共有峰与相应药理效应采用 LARS 算法进行相关性分析, 结果见表6。

将色谱指纹谱得到的 8 个共有峰与相应药理效应采用 LARS 算法进行相关性分析, 结果发现, 保留时间为 3.704、9.679、15.266、20.837、31.986、41.407 min 的色谱峰对内分泌综合效应具有正效应。其中保留时间 9.679 min 的为测定的指标成分 5-羟甲基糠醛, 保留时间 20.837、41.407 min 的分别为测定的指标成分马钱苷和丹皮酚对内分泌综合效应具有正效应; 在六味地黄丸中常用的指标成分芍药苷(保留时间为 31.101 min)经相关性分析,

表6 色谱指纹谱共有峰与内分泌综合效应值拟合结果

共有峰保留时间	系数	与该药效关系	成分
3.704	0.065	正效应	
9.679	0.237	正效应	5-羟甲基糠醛
12.74	0		
15.266	0.059	正效应	
20.837	0.159	正效应	马钱苷
21.262	0		獐牙菜苷
31.986	0.096	正效应	
41.407	0.093	正效应	丹皮酚

表7 六味地黄丸含量测定结果(mg/g)

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5-羟甲基糠醛	5.56	3.95	1.92	3.02	0.74	0.71	0.35	1.26	0.80	2.64	3.95
没食子酸	1.13	1.45	1.62	1.11	1.16	0.06	0.14	1.30	0.32	1.65	1.45
马钱苷	0.89	1.43	1.54	1.77	1.83	0.42	0.21	1.69	0.63	1.34	1.43
丹皮酚	2.38	1.55	0.37	2.15	1.77	0.35	0.66	3.84	1.46	0.32	1.55

与药效的相关性不大。而保留时间为31.986 min的色谱峰对免疫综合效应及内分泌综合效应具有正效应,对六味地黄丸进行质量控制时,这一成分是十分重要的,其结构有待进一步研究。

4 六味地黄丸指标性成分的含量测定

4.1 含量测定指标的选择

通过指纹谱共有峰与药效相关性的分析结果,发现5-羟甲基糠醛、马钱苷和丹皮酚对内分泌综合效应具有正效应,同时对六味地黄丸化学成分的分析表明,没食子酸是山茱萸和牡丹皮中共同存在的物质,它的含量分析有助于控制二者的质量,故选择没食子酸、5-羟甲基糠醛、马钱苷和丹皮酚四个成分作为含量测定的指标成分,对其进行含量测定。

4.2 含量测定

对11个批次(见表1)的六味地黄丸样品进行了含量测定,分别进行了精密度、加样回收率、重复性等试验,均能得到满意的结果,其中精密度和重复性RSD%在4%以内,加样回收率在94%到103%之间,含量测定结果见表7。

5 结论

本研究选择经典的中医经方复方六味地黄丸和其成熟的中医病证模型为研究示范,通过复方中药指纹谱及生物效应谱的建立,探讨生物体内相关化学组分群与生物效应的相互关系,运用色谱分离技术与计算机信息处理技术,综合评价,确定中药复方中的有效组分群,建立符合中药复方六味地黄丸多成分、多靶点、整体作用特点的质量控制方法。

致谢 本工作得到国家科技部“十一五”科技支撑计划(2006BAI08B03-07)项目资助,特此致谢。

参考文献

- 1 罗国安,王义明,曹进,杨学东. 建立我国现代中药质量标准体系的研究. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 4: 5—11
- 2 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用. 中药新药与临床药理, 2001, 12: 135—140
- 3 曹进,王义明,罗国安,李萌葆. 中药指纹图谱与全面质量管理. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 4: 32-36
- 4 张海. 现代联用分析技术在中药药效成分辨识中的应用研究. 第二军医大学, 硕士研究生论文, 2005—2008
- 5 吴春芝,谷福根,刘红在. 六味地黄丸(汤)的临床应用进展. 中国医院用药评价与分析, 2005, 5: 189—192
- 6 黄健. 六味地黄丸合甘麦大枣汤对35例围绝经期综合征患者生殖内分泌功能的调节. 福建中医药, 2008, 39: 1—2
- 7 赵建生,叶振邦,赵涛,陈京江,钟建国,王磊. 六味地黄丸延缓衰老的临床研究及其药理实验研究. 2006, 8: 117—122
- 8 Efron B, Hastie T, Johnstone I, Tibshirani R. Least angle regression. *Annals of Statistics*, 2004, 32: 407—451
- 9 吴宏伟,陈建新,杨洪军,李德凤,唐仕. 丹参成分组合与抗氧化活性相关性分析. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15: 68—71
- 10 Zhang RX, Li M, Jia ZP. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacology*, 2008, 117: 199—214
- 11 He Q, Hu XJ, Cheng YY. Analysis of 'SHUANGDAN' granules by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41: 485—492
- 12 曾艳,贾正平,张汝学. 地黄化学成分及药理研究进展. 中成药, 2006, 28: 609—611
- 13 Chen LL, Qi Jin, Chang YX, Zhu DN, Yu BY. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 5: 127—137
- 14 Tsutomu H, Taeko Y, Ryoko A, Takuo O. A galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolysable tannin from *Cornus officinalis*. *Phytochemistry*, 1990, 29: 2975—2978

Study on quality control of Liu Wei Di Huang Wan based on components & efficacy relationship

ZHU DongLiang¹, ZHANG Hai², TIAN WenJun², CHEN XiaoFei¹, AN Rui³, CHAI YiFeng¹ & WANG XinHong³

1 Department of Pharmaceutical Analysis, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2 Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Shanghai 200433, China

3 College of Pharmacy, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

Abstract: Study on Liu Wei Di Huang Wan was carried about clear identification of Efficacy components, typical experimental pharmacological model of efficacy and Components & Efficacy relationship. A total of 16 components was identified through HPLC-TOF/MS analysis. By analyzing Components & Efficacy relationship through 11 samples, four components were determined with relationship to Pharmacological effects. The determination method was established to assay the contents of 5-HMF, Loganin, Paeonol and gallic acid in 11 samples. The fingerprint of Liu Wei Di Huang Wan was also established. The methods can achieve the quality control of TCM Liu Wei Di Huang Wan preparation.

Keywords: Liu Wei Di Huang Wan, components & efficacy relationship, fingerprint, determination