

六味地黄丸定量分析方法和评价体系的建立

陈荣, 钟水生*, 王亚琼, 张超, 陈卫*
(苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104)

[摘要] 目的:建立六味地黄丸14种成分含量测定方法,并应用评分体系对各厂家样品进行评价。方法:建立超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS)对市售12个厂家、4种剂型共109批六味地黄丸样品中尿囊素、没食子酸、地黄苷D、獐牙菜苷、芍药苷等14种成分进行定量分析;同时,参照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中六味地黄丸含量检测项下方法对莫诺苷、马钱苷、丹皮酚进行定量,根据不同剂型和厂家进行含量分布考察。将各成分(除5-羟甲基糠醛)按含量排名、药味归属及药味的君臣佐使进行赋值,对各厂家样品进行综合评价。结果:建立的六味地黄丸14种成分含量测定方法,各成分在其质量浓度范围内线性关系良好,专属性、重复性、耐用性、准确度良好。评价结果显示,大蜜丸厂家山西B厂和广东E厂基本全部批次为优等,大蜜丸广西D厂、水蜜丸云南I厂、小蜜丸湖南J厂、水丸吉林K厂几乎全部低于70分。大蜜丸B厂和E厂整体质量较好,前者体现在归属熟地黄、泽泻、酒萸肉、茯苓的成分含量较高,后者则在泽泻和熟地黄归属成分上占优。湖南J厂、广西D厂归属熟地黄和泽泻的成分评分较低,提示厂家应重视这2味药材投料的品质,云南I厂归属熟地黄、牡丹皮的有效成分含量低,投料的牡丹皮同时还存在硫熏情况。结论:建立的六味地黄丸定量分析方法和评价体系能直观、系统地区分厂家样品优劣,提示厂家对于现行版《中国药典》中未进行含量监控的药味特别是熟地黄、泽泻,应引起重视,同时需关注投料牡丹皮的硫熏问题。

[关键词] 六味地黄丸;液相色谱-质谱法;特征成分;熟地黄;酒萸肉;中药炮制;评价体系

[中图分类号] R22;R28;O657;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)16-0177-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240667 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240206.1549.002>

[网络出版日期] 2024-02-08 20:32:56

Establishment of Quantitative Analysis Method and Evaluation System for Liuwei Dihuangwan

CHEN Rong, ZHONG Shuisheng*, WANG Yaqiong, ZHANG Chao, CHEN Wei*
(Suzhou Drug Inspection and Testing Research Center, Suzhou 215104, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of 14 components in Liuwei Dihuangwan and set up a scoring system to evaluate the samples from different manufacturers. **Method:** Ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS) was established for the quantification of 14 components (allantoin, gallic acid, rehmannioside D and so on) in 109 batches of Liuwei Dihuangwan from 12 manufacturers and 4 dosage forms. At the same time, morroniside, loganin and paeonol were quantified according to the methods under the content detection item of Liuwei Dihuangwan in the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, and the content distributions were investigated on the basis of different dosage forms and manufacturers. Each component(except 5-hydroxymethylfurfural) was assigned a value according to the ranking of its content, the attribution and monarch, minister, assistant and

[收稿日期] 2023-12-25

[基金项目] 国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目(RS2024Z006-079);苏州市科技计划项目(SKYD2023049)

[第一作者] 陈荣,硕士,副主任中药师,从事中药质量与标准研究,Tel:0512-68223525,E-mail:693115193@qq.com

[通信作者] *钟水生,硕士,副主任中药师,从事中药质量与标准研究,E-mail:522353072@qq.com;

*陈卫,硕士,主任药师,从事中药饮片炮制及质量控制研究,E-mail:18321308070@139.com

guide of the medicinal flavors. The samples from each manufacturer were evaluated by the system established above. **Result:** The established method for the determination of 14 components in Liuwei Dihuangwan showed good linear relationship within their concentration ranges, good specificity, repeatability, durability and accuracy. The evaluation results showed that the quality of basically all batches from large honeyed pill manufacturers including Shanxi B and Guangdong E were excellent, while almost all scores were below 70 including large honeyed pill manufacture Guangxi D, water-honeyed pill manufacture Yunnan I, small honeyed pill manufacture Hunan J and watered pill manufacture Jilin K. Heat maps displayed that contents of components attributed to Rehmanniae Radix Praeparata, Alismatis Rhizoma, wine-steamed Corni Fructus, Poria in large honeyed pill manufacturer Shanxi B, components attributed to Alismatis Rhizoma, Rehmanniae Radix Praeparata in manufacturer Guangdong E were much higher than others. The scores of components belonged to Rehmanniae Radix Praeparata and Alismatis Rhizoma in manufacture Hunan J and Guangxi D were low, suggesting that these two manufactures should pay attention to the quality of the two crude drugs. Manufacture Yunnan I samples had low contents of components in Rehmanniae Radix Praeparata and Moutan Cortex, and devoted Moutan Cortex was also analyzed to be sulphur fumed. **Conclusion:** The established quantitative analysis method and evaluation system of Liuwei Dihuangwan can distinguish the quality of the manufacturers' samples intuitively and systematically, suggesting that manufacturers should pay attention to the medicinal flavors that are not monitored for content in the current edition of *Chinese Pharmacopoeia*, especially Rehmanniae Radix Praeparata and Alismatis Rhizoma, and need to pay attention to the sulfur fumigation of Moutan Cortex.

[Keywords] Liuwei Dihuangwan; liquid chromatography-mass spectrometry; characteristic components; Rehmanniae Radix Praeparata; wine-steamed Corni Fructus; processing of traditional Chinese medicine; evaluation system

六味地黄丸处方可溯源于张仲景《金匮要略》的肾气丸,再由钱乙加减药味成六味地黄丸,全方由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻组成,始载于《小儿药证直诀》,具有滋补肾阴、填补肾精的功效^[1]。六味地黄丸有水丸、水蜜丸、小蜜丸、大蜜丸、浓缩丸5种剂型,其中前4种均为原粉入药,在2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中含量测定考察了酒萸肉(莫诺苷、马钱苷)和牡丹皮(丹皮酚),薄层鉴别分别收录了莫诺苷、马钱苷、丹皮酚3种成分和泽泻药材的鉴定,浓缩丸因其制备工艺涉及加水煎煮、提取挥发油等步骤,另行规定标准,且增加了熟地黄、山药和茯苓的薄层鉴别项目^[2]。本次考察的六味地黄丸仅涉及前4种丸剂,现行标准中对于熟地黄、山药、茯苓、泽泻均缺少含量控制项目。企业在投料时若只重视现行版《中国药典》要求含量测定的酒萸肉和牡丹皮,而忽视其他药味的投料质量,势必会影响六味地黄丸整体的有效性,导致质量参差不齐。

目前针对六味地黄丸的多组分含量测定主要集中在熟地黄、酒萸肉、牡丹皮和泽泻这4味,利用化学模式识别和网络药理学,筛选出不同剂型间的

差异标志物^[3],但对于方中山药和茯苓考察较少。也有研究通过网络药理学筛选,选取其中13种活性成分进行定量^[4],但选定的多个组分如羟基茼蒿素、花旗松素、啤酒甾醇、亚麻酸乙酯等在六味地黄丸中含量较低,较难检出,存在专属性不强的问题。中药遣药组方遵循“整体”的理念,选取的指标应兼顾有效性、特有性、可测性,同时体现配伍、传递和溯源等特性。本研究从六味地黄丸本身发挥药效成分或特征成分出发,兼顾成药中含量基础,同时考虑到药材炮制过程中含量变化显著的成分及牡丹皮药材硫熏处理后的特征成分。采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS)测定六味地黄丸中14种代表性成分,涵盖所有药味,考察市售109批次样品的含量分布情况,并将各成分测定结果进行排名,结合方中各药味配伍及所占比重赋以分值,建立评价体系,以期为综合评述和控制六味地黄丸质量提供参考。

1 材料

8050型三重四级杆液质联用仪(日本岛津公司),e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),Millipore Synergy型超纯水机(美国Millipore公司),

Mettler Toledo XS105DU 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),KQ-300SM 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

莫诺苷、马钱苷、丹皮酚、没食子酸、地黄苷 D、獐牙菜苷、尿囊素、芍药苷、23-乙酰泽泻醇 C、23-乙酰泽泻醇 B、5-羟甲基糠醛对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111998-202205、111640-201808、110708-201908、110831-201906、112063-201203、111742-200501、111501-200202、110736-202145、112062-202102、111846-201705、111626-202316,纯度分别为 98.4%、99.0%、99.8%、91.5%、94.2%、100%、100%、94.6%、99.2%、99.7%、98.4%),苯甲酰芍药苷、芍药苷亚硫酸酯对照品(上海施丹德技术标准服务有限公司,批号分别为 13193、15002,纯度分别为 97.4%、99.1%),茯苓酸、茯苓新酸 A、去氢土莫酸、山药素 I 对照品(广州佳途科技股份有限公司,批号分别为 0731-RE-0042、0728-RE-0023、0726-RE-0013、0726-RE-0012,纯度分别为 98.3%、97.6%、98.3%、99.9%)。乙腈和甲酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

收集北京、山西、广西、广东、黑龙江、内蒙古、云南、湖南、吉林不同厂家的 109 批六味地黄丸为市售样品,另有 12 批次各药味大蜜丸和水蜜丸阴性样品,由北京 A 厂提供,所有样品均经 2020 年版《中国药典》一部相关标准进行检验,全部符合规定。样品信息详见表 1。

表 1 六味地黄丸样品信息

Table 1 Sample information of Liuwei Dihuangwan

剂型	生产企业	批数	编号	剂型	生产企业	批数	编号
大蜜丸	北京 A	17	A1~A17	水蜜丸	北京 A	13	A18~A30
	山西 B	8	B1~B8		云南 H	11	H1~H11
	山西 C	7	C1~C7		云南 I	7	I1~I7
	广西 D	6	D1~D6	小蜜丸	湖南 J	16	J1~J16
	广东 E	6	E1~E6	水丸	吉林 K	3	K1~K3
	黑龙江 F	6	F1~F6		内蒙古 G	3	G7~G9
	内蒙古 G	6	G1~G6				

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),以乙腈(A)-0.3%甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~6 min, 4%~15%A; 6~12 min, 15%~60%A; 12~16 min, 60%~85%A; 16~20 min, 85%A; 20~21 min, 85%~4%A;

21~30 min, 4%A),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 1 μL。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),多反应监测模式(MRM)检测,正负离子模式扫描;接口电压 4.0 kV,转换打拿极电压 10.0 kV,检测器电压 1.88 kV,接口温度 300 °C,去溶剂化温度 250 °C,加热块温度 400 °C,雾化器流量 3.0 L·min⁻¹,干燥气流量 10.0 L·min⁻¹,加热气流量 10.0 L·min⁻¹。各目标化合物保留时间和质谱参数详见表 2。

2.3 供试品溶液制备 取水丸,研细,取约 1 g,或取水蜜丸,研细,取约 1.4 g,或取蜜丸,剪碎,取约 2 g,精密称定。置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min(功率 160 W,频率 50 kHz),放冷,再用 50%甲醇补足减失质量,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 混合对照品溶液的制备 取尿囊素、没食子酸、地黄苷 D、獐牙菜苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、山药素 I、去氢土莫酸、茯苓新酸 A、茯苓酸、23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C、5-羟甲基糠醛、芍药苷亚硫酸酯对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 分别含尿囊素 4 μg、没食子酸 8 μg、地黄苷 D 25 μg、獐牙菜苷 8 μg、芍药苷 10 μg、苯甲酰芍药苷 5 μg、山药素 I 1 μg、去氢土莫酸 2 μg、茯苓新酸 A 2 μg、茯苓酸 10 μg、23-乙酰泽泻醇 B 6 μg、23-乙酰泽泻醇 C 2 μg、5-羟甲基糠醛 60 μg、芍药苷亚硫酸酯 26 μg 的混合对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取 2.4 项下所得混合对照品溶液,按 2.1 和 2.2 项下条件进样检测。取大蜜丸 A1、水蜜丸 A18 和北京 A 厂提供的各药味阴性样品,按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备,按 2.1 及 2.2 项下条件进样检测。结果显示,供试品溶液在各对照品相同的保留时间处有色谱峰,且质谱行为一致,阴性样品未检出相应特征成分,表明专属性良好。在 A1 和 A18 样品中加入芍药苷亚硫酸酯单对照品溶液,与未加入该对照品样品比较,可检出相应含量对照品成分,专属性良好。见增强出版附加材料。

2.5.2 线性关系考察 取混合对照品溶液,按比例稀释成系列梯度浓度,按 2.1 和 2.2 项下条件进样检测,记录色谱、质谱图,以各成分峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),制作标准曲线,各成分在线性范围内线性关系良好,详见表 3。

2.5.3 重复性考察 取 G1 样品,按 2.3 项下方法平

表2 各目标化合物保留时间和质谱参数

Table 2 Retention time and mass spectrum parameters of each target compound

化合物	<i>t_R</i> /min	离子模式	定量离子对	碰撞能 1/eV	定性离子对	碰撞能 2/eV
尿囊素	0.98	ESI ⁺	159.10~116.10	-15	159.10~99.10	-15
没食子酸	3.37	ESI ⁻	169.20~125.20	20	169.20~69.15	50
地黄苷D	6.03	ESI ⁻	731.40~263.30	25	685.35~263.25	15
獐牙菜苷	9.74	ESI ⁻	403.35~357.35	15	403.35~195.40	15
芍药苷	10.02	ESI ⁻	525.35~449.35	15	449.35~327.35	15
苯甲酰芍药苷	12.11	ESI ⁻	629.35~553.35	15	583.35~431.35	15
山药素 I	14.70	ESI ⁺	285.25~254.25	-25	285.25~225.20	-25
去氢土莫酸	16.58	ESI ⁺	467.50~311.40	-25	485.50~467.50	-15
茯苓新酸 A	16.66	ESI ⁺	481.50~325.35	-25	481.50~223.25	-45
茯苓酸	19.36	ESI ⁺	511.50~451.50	-25	511.50~295.40	-25
23-乙酰泽泻醇 B	19.25	ESI ⁺	497.50~201.25	-25	497.50~365.40	-25
23-乙酰泽泻醇 C	15.46	ESI ⁺	529.45~415.20	-25	529.45~433.40	-25
5-羟甲基糠醛	5.03	ESI ⁺	127.10~109.15	-15	127.10~81.10	-15
芍药苷亚硫酸酯	9.12	ESI ⁻	543.10~259.05	35	543.10~121.00	35

表3 六味地黄丸中14种特征成分的线性关系考察

Table 3 Linear relationship of 14 characteristic components in Liuwei Dihuangwan

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg·L ⁻¹
尿囊素	$Y=2.00\times10^5X+5.41\times10^3$	0.999 9	0.197~19.675
没食子酸	$Y=4.83\times10^5X-1.12\times10^5$	0.999 3	0.388~38.750
地黄苷D	$Y=6.87\times10^5X+1.56\times10^5$	0.999 7	0.251~25.057
獐牙菜苷	$Y=1.88\times10^5X+1.74\times10^4$	0.999 4	0.381~38.100
芍药苷	$Y=2.09\times10^6X+7.33\times10^4$	1.000 0	0.480~47.962
苯甲酰芍药苷	$Y=2.29\times10^6X+2.04\times10^4$	0.999 9	0.237~23.717
山药素 I	$Y=6.02\times10^6X-4.56\times10^4$	1.000 0	0.083~8.332
去氢土莫酸	$Y=1.39\times10^7X+1.12\times10^5$	0.999 9	0.113~11.255
茯苓新酸 A	$Y=4.01\times10^6X-4.40\times10^4$	0.999 9	0.065~6.451
茯苓酸	$Y=2.16\times10^6X+1.12\times10^6$	0.999 0	0.125~12.533
23-乙酰泽泻醇 B	$Y=3.95\times10^6X+5.89\times10^5$	0.999 0	0.279~27.916
23-乙酰泽泻醇 C	$Y=3.46\times10^6X+2.12\times10^5$	0.999 5	0.124~12.533
5-羟甲基糠醛	$Y=3.71\times10^6X+5.25\times10^5$	0.999 9	0.584~58.410
芍药苷亚硫酸酯	$Y=2.97\times10^5X+1.11\times10^5$	0.999 2	0.266~26.608

行制备6份供试品溶液,以2.1和2.2项下条件进样,记录峰面积,根据标准曲线计算各成分质量分数,及其相对标准偏差(RSD),结果显示14种成分质量分数的RSD均<5%,表明本方法重复性良好。

2.5.4 耐用性考察 取G1样品,按2.3项下供试品溶液制备方法制备,分别于0、4、8、12、16、24 h进样,按2.1和2.2项下条件测定峰面积,各成分RSD

均<5%,说明样品溶液在24 h内稳定性良好。将流动相B相0.3%甲酸调整为0.2%和0.4%后,按2.1和2.2项下条件进样检测,结果G1样品主要色谱峰保留时间、分离度无明显变化。取G1样品,2.3项下方法制备供试品溶液,采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 3个批号(02023731118375、02363013515165、02313932615105),按2.1和2.2项下方法进样检测,G1样品各特征成分分离度良好,峰面积RSD均<3%,表明耐用性良好。

2.5.5 加样回收率考察 精密量取G1样品2 g,精密称定,按含量测定值的50%、100%、150%量加入对照品,再按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1和2.2项下方法测定,计算回收率。各成分回收率85.6%~109.6%,RSD均<6%,表明该方法准确可靠。

2.6 样品测定 将上述11个厂家供109批样品,按2.3项下供试品溶液制备方法制备,按2.1及2.2项下方法进样,所得色谱峰代入回归方程计算含量。另按2020年版《中国药典》中六味地黄丸“含量测定”项下方法制备莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的对照品溶液,以及六味地黄丸供试品溶液,并进样检测。结果显示,与同类丸剂比较,各厂家六味地黄丸中酒萸肉所含成分莫诺苷和马钱苷质量分数之和,大蜜丸中山西B厂、水蜜丸中云南H厂含量较高,水丸中内蒙古G厂与吉林K厂差异明显,前者是后者2.4~2.8倍。酒萸肉中成分獐牙菜苷,大蜜丸、小蜜丸厂

家间差异较小,但水蜜丸中云南I厂、水丸中内蒙古G厂质量分数较高。牡丹皮成分丹皮酚在大蜜丸中山西C厂、水蜜丸中北京A厂、水丸中吉林K厂质量分数较高,在芍药苷和苯甲酰芍药苷含量方面,水蜜丸中云南I厂质量分数均明显偏低,而水丸中同丹皮酚一致吉林K厂相对较高。山药成分尿囊素和山药素I含量云南I厂水蜜丸、内蒙古G厂水丸明显高于其他相同丸剂生产厂家,大蜜丸厂家则差异不明显。地黄特征成分地黄苷D含量内蒙古G厂大蜜丸、水丸明显较高,湖南J厂的小蜜丸与炼蜜投入量基本相当的大蜜丸进行比较,含量最低,其地黄投料可能存在问题。茯苓中三萜类成分茯苓酸、去氢土莫酸均为大蜜丸中山西B厂明显偏高,而其他厂家差异不明显,而另一三萜类成分茯苓新酸A则是广东E厂明显高于其他厂家。造成3种成分含量各厂家分布差异较大的原因可能是茯苓不同药用部位三萜类成分含量和种类差异较大,据文献报道,茯苓皮中总三萜含量和种类明显高于菌核,通过建立茯苓皮和去皮的白茯苓HPLC指纹图谱和化学模式识别,茯苓皮中去氢土莫酸和茯苓酸含量均高于白茯苓,而茯苓新酸A则远高于白茯苓^[5-7]。前期调研中发现六味地黄丸生产企业采用的茯苓块或茯苓片部分带皮,且带皮情况各异。2020年版《中国药典》中泽泻药材是以乙酰泽泻醇B和乙酰泽泻醇C总量来进行质量控制,这2种成分在六味地黄丸样品中含量分布情况不完全一致,但北京A厂的大蜜丸和水蜜丸2种成分含量均明显低于其他同类型丸剂厂家样品,说明其泽泻投料质量可能存在一定问题,湖南J厂生产的小蜜丸这2种三萜类含量相较大蜜丸厂家明显偏低。没食子酸和5-羟甲基糠醛来源于多个药材或辅料,其中水丸中吉林K厂样品没食子酸、5-羟甲基糠醛质量分数较高,大蜜丸中广西E厂、黑龙江F厂、小蜜丸湖南J厂5-羟甲基糠醛偏高。内蒙古G厂的大蜜丸和水丸5-羟甲基糠醛含量则明显偏低。针对牡丹皮硫熏情况的考察,云南I厂和内蒙古G厂检出的芍药苷亚硫酸酯含量较高,提示其投料的-牡丹皮可能存在硫熏情况。见增强出版附加材料。

2.7 评分体系建立 将本次检测的代表6味药材质量的14种成分连同标准检验中的莫诺苷、马钱苷、丹皮酚,按其含量进行排名后,综合药味的君臣佐使赋予分值^[8]。上述14种成分按同一丸剂下含量排名进行打分(小蜜丸因仅有1个生产厂家,与处方中炼蜜占比一致的大蜜丸厂家合并计算),质量

较好的前1/3评分为该成分赋分的满分,中等为赋分的2/3,质量较差的后1/3为赋分的1/3。各组分按含量排名赋分情况见表4。硫熏可导致药材和制剂化学成分发生变化,药材硫熏程度应予以控制,多数厂家样品并未检出牡丹皮因硫熏产生的芍药苷亚硫酸酯成分或检出含量较低,该成分设为扣分项,即低于定量限不扣分(大蜜丸和小蜜丸定量限为 $5.32\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,水蜜丸为 $7.60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,水丸为 $10.64\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),高于定量限而低于10倍定量限扣3分,高于定量限10倍扣6分。5-羟甲基糠醛作为一种具有药理活性和毒性双重作用的物质,在六味地黄丸中来源复杂,除辅料炼蜜在制备时会随着加热过程产生外,酒萸肉^[9]、熟地黄^[10-11]的炮制过程中也会产生并随处方带入(增加的程度酒萸肉远高于熟地黄)。设置六味地黄丸中5-羟甲基糠醛含量上限来控制制剂的毒性,或设置下限来防范酒萸肉或熟地黄的炮制不到位,还需综合考虑其含量高低对于药理活性贡献的重要性^[12],并进行系统的实验补充,在本次实验中暂不将5-羟甲基糠醛纳入评分。按上述评分规则判定4种丸剂厂家样品,以85分及以上为优,70~84分为中,70分以下为差。

经评分系统评价,大蜜丸、水蜜丸、水丸均划分了优、中、差批次,湖南J厂作为唯一的小蜜丸厂家,因处方中大蜜丸、小蜜丸除体积差异外,其他基本一致,纳入到大蜜丸厂家的排名中,结果几乎所有批次为差。另外大蜜丸广西D厂、水蜜丸云南I厂、水丸吉林K厂,均在评分中处于差等,见图1。将所有批次样品赋分后导入ChemPattern 2020软件中,汇总数据生成样品所有成分评分热图,结果显示大蜜丸B厂和E厂质量较好,前者体现在归属熟地黄、泽泻、酒萸肉、茯苓的成分含量较高,后者则在泽泻和熟地黄成分上占优。湖南J厂、广西D厂归属熟地黄和泽泻的成分基本评分较低,提示这2家应重视这2味药材投料的品质,水蜜丸云南I厂归属熟地黄、牡丹皮的有效成分含量低,投料牡丹皮同时还存在硫熏情况,水丸吉林K厂因酒萸肉、山药、地黄这3味药与内蒙古G厂比较,含量排名靠后,相对较差。见增强出版附加材料。

3 讨论

六味地黄丸中的化学成分或者起作用的药效物质尚不完全清楚,如何选择合适的代表性成分能够比较全面地反映其整体质量差异是难点。目前有关六味地黄丸含量测定的文献中选取的指标主要存在以下问题:未能全部覆盖6种药味的特征成

表4 六味地黄丸各组分按含量排名赋分情况

Table 4 Score of each component of Liuwei Dihuangwan according to content ranking

分

成分	归属	赋分			成分	归属	赋分		
		优	中	差			优	中	差
莫诺苷	酒萸肉	6	4	2	地黄苷D	地黄	21	14	7
马钱苷	酒萸肉	6	4	2	去氢土莫酸	茯苓	6	4	2
獐牙菜苷	酒萸肉	6	4	2	茯苓新酸A	茯苓	6	4	2
丹皮酚	牡丹皮	6	4	2	茯苓酸	茯苓	6	4	2
芍药苷	牡丹皮	6	4	2	23-乙酰泽泻醇B	泽泻	9	6	3
苯甲酰芍药苷	牡丹皮	6	4	2	23-乙酰泽泻醇C	泽泻	9	6	3
山药素I	山药	9	6	3	没食子酸	酒萸肉、牡丹皮	6	4	2
尿囊素	山药	9	6	3	芍药苷亚硫酸酯	硫熏牡丹皮	0	-3	-6

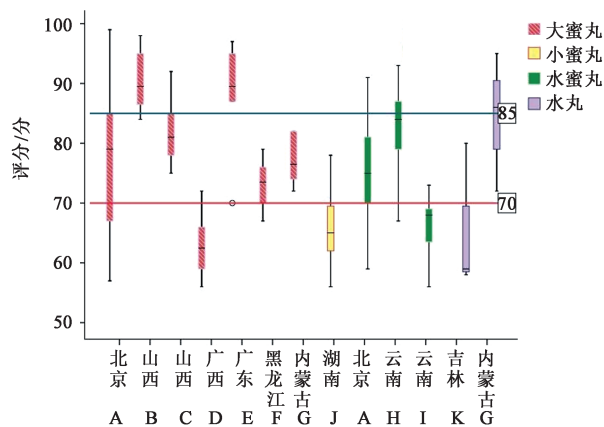


图1 六味地黄丸各厂家评分情况

Fig. 1 Grades of Liuwei Dihuangwan samples from different manufacturers

分(如未涵盖山药、茯苓);测定的指标成分或因含量较低或因成分本身紫外吸收弱,难以定量。本文在选择代表性成分时尽力包含各药味中含量较高且具有一定特征性的成分,既关注药材本身发挥药效成分,又考虑药材炮制过程中成分含量的变化。

六味地黄丸中熟地黄作为君药,在方中排除炼蜜投料量占总处方量的32%,2020年版《中国药典》中与生地黄相比,熟地黄含量测定仅保留地黄苷D,是因梓醇、益母草苷等环烯醚萜类稳定性差,毛蕊花糖苷等苯氧醇苷类也易在加工炮制过程中发生水解,而糖类如水苏糖蒸制时以脱果糖为主,但缺乏专属性,因此本实验以地黄苷D分析熟地黄质量^[13]。牡丹皮中苯乙酮类、萜类、苷类是其主要活性成分^[14],2020年版《中国药典》中六味地黄丸含量测定项目中丹皮酚为苯乙酮类,本实验增加含量较高的单帖及其苷类成分芍药苷、苯甲酰芍药苷以丰富牡丹皮的检测。酒萸肉中环烯醚萜类是含量最

高的成分类群^[15],目前莫诺苷、马钱苷已作为特征成分进行含量测定,獐芽菜苷是同类型成分的有效补充。有学者基于超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS),开展六味地黄丸的特征化合物表征研究,建立了包含68个成分的六味地黄丸稳定性特征化合物库,其中山药筛选出的特征成分为尿囊素^[16]。文献报道山药素I具有抑制 α -D-葡萄糖苷酶的活性,为山药在糖尿病方面治疗提供物质基础^[17-18],且该物质在山药素类成分中含量较高,作为专属性更强的成分与尿囊素同时作为评价山药的指标。茯苓中三萜类和多糖类化合物是其主要活性成分,其中三萜类化学成分与传统功效相符,是茯苓传统药效的物质基础,被认为是含茯苓方剂中质量标志物(Q-Marker)的筛选指标^[19]。茯苓酸、茯苓新酸A、去氢土莫酸是这类物质中代表性成分,对照品较容易获取,故而作为茯苓的评价指标。泽泻中原萜烷型四环三萜及愈创木烷型倍半萜为其特征化合物,2020年版《中国药典》中泽泻药材标准含量测定中23-乙酰泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇C即为此类化合物,报道显示三萜结构上的羟基、乙酰基等基团可能受炮制温度和时间影响发生不同程度的断裂,去乙酰基并生成其他结构三萜^[20]。泽泻饮片为药材去除杂质,稍浸,润透,切厚片后进行干燥,厂家寄送的泽泻饮片中部分存在炕货温度过高、碎块呈焦黄色的情况,过高的温度容易导致23-乙酰泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇C发生转变,影响总含量,沿用2020年版《中国药典》中这2种成分的测定,一定程度上引导六味地黄丸厂家在采购泽泻药材时关注炮制条件。没食子酸为酒萸肉和牡丹皮共有成分,山茱萸酒制后会大量增加,同时该成分抗炎、抗氧化作用与六味地黄丸的

功效方向一致^[21],被多篇文献推荐为六味地黄丸的质量标志物^[3,9],因此本实验将其纳入考察。有学者认为二氢槲皮素是山茱萸酒制后含量变化最为显著成分,可代表黄酮素类成分作为酒萸肉质控指标^[9],但经本实验验证,山茱萸和酒萸肉均含有二氢槲皮素,且含量上并无显著差异,无法成为质控指标。硫熏会导致牡丹皮活性成分转化为含硫衍生物,对牡丹皮的有效性存在潜在影响,特征含硫衍生物的量相比二氧化硫残留,更能反映牡丹皮药材的硫熏程度^[22],本实验选择结构明确的芍药苷亚硫酸酯作为硫熏考察指标。山茱萸饮片中5-羟甲基糠醛含量极少,但是在炮制成酒萸肉的过程中会不断增加^[23],蒸制时辅料黄酒的带入和自身糖类成分转化是其产生的原因^[24-26],但后者产生的比例更高,同时也是六味地黄丸中5-羟甲基糠醛的主要来源,可作为评价六味地黄丸中酒萸肉炮制程度的一项指标。前期研究中将其与莫诺苷、马钱苷含量进行Pearson相关性分析,结果表明4种丸剂中5-羟甲基糠醛均与莫诺苷、马钱苷含量呈负相关。联系文献报道,厂家可能存在因保证标准检验中莫诺苷和马钱苷的含量而采用炮制不到位酒萸肉的情况^[27]。本研究中,各厂家5-羟甲基糠醛含量差异较为明显,含量最高值和最低值相差至20倍。大量摄取5-羟甲基糠醛,易对人体内脏、皮肤、横纹肌等产生损伤,并有致癌等健康风险^[28]。因此对于六味地黄丸而言,设置合适的5-羟甲基糠醛上下限度十分必要。

综上所述,本研究针对性选取六味地黄丸中各药味特征性成分及影响多味药材质量成分,加以测定并整合,运用统计软件将结果可视化,对于深入分析各厂家样品药材和饮片投料质量评价提供参考,为实际生产过程质量控制提供依据。但本评价模式在指标的选择上仍有改进空间,结合药效学,寻找更科学的代表性成分,同时可采用组合权重赋权法(如乘法合成法和线性加权组合法)^[29],减少主观判断的影响,使评价结果更加合理、可靠。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 韩苗苗,黑峥峥,华浩明. 理中丸、肾气丸和六味地黄丸等方解不可缺蜜论[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(6): 1170-1172.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 742-743.
- [3] 杨华杰,魏惠珍,吕尚,等. 基于化学模式识别和网络药理学的六味地黄丸中标志物的预测[J]. 中药新药

与临床药理, 2021, 32(9): 1345-1352.

- [4] 罗虹,刘博文,杨慧,等. 基于网络药理学及活性成分测定的六味地黄系列制剂质量研究[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5462-5477.
- [5] 占慧慧,丁婵,彭思源,等. 茯苓皮与白茯苓中三萜类成分的HPLC指纹图谱与化学模式识别研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(9): 1469-1479.
- [6] 浦雪梅,李雪,何旭东,等. 药食同源大品种茯苓中多糖与三萜研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(7): 2561-2573.
- [7] 高楚倩,伍蕙岚,唐旭阳,等. 不同“发汗”工艺处理茯苓及茯苓皮的UPLC指纹图谱研究[J]. 中国现代中药, 2023, 25(5): 1064-1070.
- [8] 王迪,张宁,陈雪,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS和网络药理学探讨六味地黄丸治疗AD潜在作用机制[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(4): 580-589.
- [9] 贾红梅,庾延和,于猛,等. 基于化学计量学的酒萸肉特征性成分识别及定量测定[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1294-1301.
- [10] 杨明明,袁晓旭,李洪波,等. 熟地黄和茯苓对山茱萸中3种成分煎出量的影响[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1642-1645.
- [11] 杜珂,高晓霞,王锋,等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(6): 1477-1484.
- [12] 曾林燕,曾鸿莲,谭淑仪,等. 基于5-HMF的产生机理、代谢、生物活性及其在中药加工过程变化的研究概述[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(3): 507-514.
- [13] 周丽,徐金娣,毛茜,等. 地黄加工炮制研究新进展及展望[J]. 中药材, 2016, 39(5): 1184-1190.
- [14] 张树蓉,赵宏苏,佟沫儒,等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(16): 5215-5224.
- [15] 林碧珊,陈锦霞,史紫娟,等. 山茱萸炮制前后的UPLC特征图谱研究[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 30-33.
- [16] 王侠. 基于高效色谱-质谱联合策略的中成药六味地黄丸(浓缩丸)整体质量鉴别研究[D]. 上海:中国科学院上海药物研究所, 2019: 49.
- [17] 朱金花,东莹莹,胡卫平,等. 高效液相色谱法同时测定怀山药中4个山药素化合物[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 396-400.
- [18] 丁浚峰,涂珺. 中药治疗糖尿病微血管病变的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(6): 260-267.
- [19] 邓桃妹,彭代银,俞年军,等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2703-2717.
- [20] 戴梦翔,金姝娜,宋成武,等. 泽泻及其炮制品化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(5):

- 1620-1635.
- [21] YI Z Y, CHEN L, WANG Y, et al. The potential mechanism of Liu-Wei-Di-Huang pills in treatment of type 2 diabetic mellitus: From gut microbiota to short-chain fatty acids metabolism[J]. Acta Diabetol, 2022, 59(10):1295-1308.
- [22] 李秀杨,段素敏,刘欢欢,等. 特征含硫衍生物对硫熏牡丹皮检控的意义[J]. 药学学报, 2016, 51(6): 972-978.
- [23] 范倩,陈雪冰,荣莉,等. 山茱萸化学成分、生物活性、复方应用及质量控制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7):1244-1258.
- [24] 戴冰,黄雍,张嘉妮,等. 中药炮制辅料黄酒的现代研究概况[J]. 中医药导报, 2018, 24(20):114-116.
- [25] 段浩瀚,贾豪,雷敬卫,等. 基于颜色-成分关联分析比较不同产地牛膝炮制过程中质量变化的规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5):143-151.
- [26] 朱娟娟,林丽,周巧,等. 基于化学分析和感官技术的传统经验和药典法炮制蜜百合的质量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240965.
- [27] 逯雯洁,刘亚蓉,吴立斌,等. 山茱萸饮片全国评价性抽验结果分析与调研情况总结[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10):2514-2516.
- [28] SHAPLA U M, SOLAYMAN M, ALAM N, et al. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health[J]. Chem Cent J, 2018, 12(1):35.
- [29] 贺方良,程显隆,李明华,等. 权重赋值法在多指标综合评价中的研究进展及其在中药质量评价中的应用展望[J]. 中国现代中药, 2024, 26(1):224-232.
- [责任编辑 李嘉麟]

·书讯·

加速康复外科在腹腔镜子宫内腺癌根治术中的应用 ——评《女性恶性肿瘤围术期管理与快速康复》

子宫内腺癌是一种最常见的妇科肿瘤,且呈年轻化趋势,对女性健康构成了极大的威胁。近年来,随着微创手术理念的不断发展和更新,腹腔镜对子宫内腺癌的治疗疗效显著,能有效地延缓病情的发展,延长患者的寿命。而腹腔镜手术因其创伤小、术后恢复快等优点,已成为目前治疗子宫内腺癌的首选手术方式。但手术仍属于创伤性操作,多数患者担心疾病预后差,手术失败及增加家庭经济负担等,围手术期常会出现焦虑、恐惧情绪,主观舒适度较差,不仅不利于手术开展还会增加术后不良反应风险,同时,以往常规手术期管理中多由医护人员凭借以往主观经验对患者进行管理,管理措施缺乏科学依据,难以有效地促进患者康复。因此,加强对腹腔镜子宫内腺癌根治术患者手术期间的管理尤为重要。

加速康复外科(ERAS)是通过对手术患者采取一系列具有循证医学证据的围手术期措施,减轻手术带给患者的创伤。研究表明,加速康复外科在手术期管理联合腹腔镜技术可提高子宫内腺癌患者术前主观舒适度,减轻术中应激反应,降低术后不良反应率,从而加快患者术后康复。在此基础上,对子宫内腺癌进行快速康复治疗,可以促进患者康复,降低患者死亡率,进一步证实加速康复外科围手术期管理的应用价值。《女性恶性肿瘤围术期管理与快速康复》由科学出版社出版,作者唐丽萍,王立萍,孙立春。本书共13章,第一章首先介绍围术期医学及快速康复外科理论,第二至十三章分别从女性恶性肿瘤的特点、术前评估及术前准备、手术方式、麻醉管理、液体管理和输血、营养支持、术后并发症的防治、合并疾病的处理等术前、术中、术后各阶段对女性恶性肿瘤与术后快速康复的管理策略进行了详细阐述。书中指出,ERAS是指通过对患者进行心理干预,术前胃肠道准备,选择适宜的麻醉方法,微创技术,以及合理的术后医疗护理,从而减少并发症,降低医疗费用,提高患者满意度。该书更是涵盖女性恶性肿瘤围术期医学最新进展,同时密切结合临床实践,层次清晰、内容丰富,适合妇产科、肿瘤科、外科医师及研究人员参考。子宫内腺癌直接扩散和转移是发生在子宫内腺癌的早期,通常会影响到宫颈管和阴道。现阶段对子宫内腺癌最佳的治疗方法为将癌变部位手术切除,必要时对患者进行激素或者化疗等辅助治疗。快速康复外科护理是多种护理措施的综合,其以循证医学作为理论基础,通过一系列的围术期优化措施,减少患者的心理压力,减少并发症发生率,达到提高医疗质量和保证手术安全性的目的。将腹腔镜微创手术技术和加速康复外科理念相结合,应用于子宫内腺癌根治术,整合手术期的各项有效措施,建立有序的、规范的、个体化的快速康复流程,为患者提供针对性、全面化的手术及康复期间的服务。术前给予患者有针对性的知识教育,让患者有一个更好的心态去面对病情。同时,加速康复外科理念中提出缩短禁食水时间,可减轻因禁食时间过长带来的蛋白质消耗,也不会引起麻醉期间误吸,从而减少胰岛素抵抗的发生,提高患者主观舒适度。术中加强体温保护和液体限制,能避免低体温发生,有效维持体温正常水平,稳定内环境,进一步减轻手术的创伤和应激反应,促进患者术后恢复。早期拔除引流管,不仅能减轻患者带管不适感,还为早期下床活动创造良好条件。术后优化疼痛管理,可提高患者疼痛阈值,有效减轻患者术后疼痛,并指导患者早日进食,可使患者得到充分的营养支持,有助于尽早下床活动,最大限度降低不良反应风险,保障患者治疗安全,进一步加速康复进程。此外,在手术后进行预防性的抗生素应用,可以避免伤口感染的出现。同时,术后各种类型的引流管尽早拔出,对患者的尽快康复起到促进作用。

综上所述,加速康复外科管理在腹腔镜子宫内腺癌根治术中的应用效果良好,通过对常规干预措施进行优化,可为患者提供系统化管理,能够提高患者术前主观舒适度,利于手术顺利展开,不良反应更少,促进术后快速康复,值得临床推广应用。

基金项目:邢台市科技计划项目(2019ZC192)

(作者李勇晋¹,孙鑫晔², 1.邢台市人民医院,河北邢台 054000; 2.邢台市中心医院(原邢台市第三医院)质控办,河北邢台 054000)