

• 药剂与工艺 •

基于均匀设计的泽泻体外抗草酸钙结晶的有效组分配伍研究

黄锦芳¹, 李小艳¹, 黄小强¹, 吴婷婷¹, 许文^{1,2*}, 吴水生^{1*}

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 福建中医药大学生物医学研发中心, 福建 福州 350122

摘要: 目的 研究泽泻中6种主要三萜成分(泽泻醇A、24-乙酰泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B、泽泻醇F和24-乙酰泽泻醇F)及其组分配伍对体外抗草酸钙结晶的作用。方法 采用均匀设计法设计不同泽泻三萜组分配伍组,应用标准钙离子种晶技术分别检测不同配伍组对草酸钙结晶生长的抑制指数。结果 6种成分及其不同比例配伍组溶液均能抑制草酸钙晶体生长($P < 0.05$),其中泽泻醇A-24-乙酰泽泻醇A-泽泻醇B-23-乙酰泽泻醇B-泽泻醇F-24-乙酰泽泻醇F(2.2:3.8:1:3.5:2.2:1)组分配伍时体外抑制草酸钙结晶效果最佳($P < 0.05$),抑制指数为188.29%。结论 泽泻三萜成分是泽泻抑制草酸钙结晶的重要药效物质基础,泽泻醇A、24-乙酰泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B、泽泻醇F和24-乙酰泽泻醇F均具有体外抑制草酸钙结晶生长的作用,且6种成分合用作用更强,其最佳组分配比为泽泻醇A-24-乙酰泽泻醇A-泽泻醇B-23-乙酰泽泻醇B-泽泻醇F-24-乙酰泽泻醇F(2.2:3.8:1:3.5:2.2:1)。

关键词: 泽泻; 三萜; 配伍; 草酸钙结晶; 结晶; 均匀设计; 组分配伍; 泽泻醇A; 24-乙酰泽泻醇A; 泽泻醇B; 23-乙酰泽泻醇B; 泽泻醇F; 24-乙酰泽泻醇F; 抑制指数

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)23-4160-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.008

Research on effective components compatibility of *Alismatis Rhizoma* resisting calcium oxalate calculus *in vitro* based on uniform designHUANG Jin-fang¹, LI Xiao-yan¹, HUANG Xiao-qiang¹, WU Ting-ting¹, XU Wen^{1,2}, WU Shui-sheng¹

1. Fujian university of traditional Chinese medicine of pharmacy, Fuzhou 350122, China

2. Biological medicine research and development center of fujian university of traditional Chinese medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of six active triterenoids and their compatibility from *Alisma orientale* on the formation of urinary calcium oxalate calculus *in vitro*. **Methods** A uniform design method was used to design the different compatibilities from six triterenoids. The inhibitory effects of the six triterenoids along with their different compatibility groups were evaluated *in vitro* using a standard seeded crystallization technique. **Results** The six active triterenoids and their compatible preparations could significantly inhibit calcium oxalate crystal formation *in vitro* ($P < 0.05$), and the group of alisol A-alisol A 24-acetate-alisol B-alisol B 23-acetate-alisol F-alisol F 24-acetate (2.2:3.8:1:3.5:2.2:1) was the most efficient with an inhibitory index of 188.29%. **Conclusion** The triterenoids in *A. orientale* play a key role in the inhibition of calcium oxalate calculus formation and compatibility of alisol A, alisol A 24-acetate, alisol B, alisol B 23-acetate, alisol F, and alisol F 24-acetate can inhibit the calcium oxalate calculus well *in vitro* especially cooperated with each other, and the best compatibility proportion is 2.2:3.8:1:3.5:2.2:1, respectively.

Key words: *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.; triterenoids; compatibility; calcium oxalate calculus; calculus; uniform design; component compatibility; alisol A; alisol A 24-acetate; alisol B; alisol B 23-acetate; alisol F; alisol F 24-acetate; inhibition index

收稿日期: 2016-08-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1205022); 福建省教育厅A类科技课题(JA15242); 福建中医药大学校管课题(X2014107-学科, X2015011-平台); 福建省大学生创新创业训练计划项目(201610393059)

作者简介: 黄锦芳(1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: 820873026@qq.com

*通信作者 许文, 助理研究员, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: yaouxuwxw@163.com

吴水生, 教授, 研究方向为中药复方药效物质及作用机制研究。E-mail: wushuishengwss@163.com

泽泻 *Alismatis Rhizoma* 为泽泻科泽泻属植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎, 具有利水渗湿、泄热、化浊降脂等功效, 临床用于治疗小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、痰饮眩晕、热淋痛、高脂血症等^[1-2]。泌尿系结石是一种世界范围的常见病, 其中大多数为草酸钙结石^[3]。泽泻临床上是治疗泌尿系结石的常用传统中药, 现代药理研究表明泽泻提取物对体内、外草酸钙结石的生长与聚集有明显的抑制作用^[2]。樊龙昌等^[4]通过考察泽泻水煎剂对肾及输尿管草酸钙结石患者的结石形成和排出的影响, 发现泽泻水煎剂能有效地减少草酸钙晶体的生长, 从而抑制肾、输尿管结石的形成。区淑蕴等^[5-6]通过体外药理实验进一步确认醋酸乙酯部位为泽泻防治泌尿系统结石的有效部位, 再通过研究泽泻三萜提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的影响, 发现总三萜是泽泻防治泌尿系统结石的有效成分。周雪峰等^[7]应用生物活性导向分离法, 从泽泻抗草酸钙结石的醋酸乙酯活性部位分离得到 24-乙酰泽泻醇 F 和 24-乙酰泽泻醇 A 等化合物。

Jin 等^[8]从泽泻中分离得到了一些三萜类化合物, 经核磁共振鉴定为 23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 B、泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 Q 等。Liu 等^[9]采用 UPLC/Q-TOF-MS 法从泽泻中分离得到 20 个三萜类成分, 经鉴定为泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 F 等。到目前为止, 从泽泻中分离的三萜成分已达 60 多种^[10-11], 而哪些三萜成分是泽泻抗草酸钙结晶的活性成分鲜有报道, 并且中药是多种活性成分组合群共同发挥作用^[12-13], 但是关于泽泻活性组分配伍体外抗草酸钙结晶的研究也未见报道。因此, 本实验围绕泽泻中 6 种主要三萜成分^[14-15], 包括泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 F 和 24-乙酰泽泻醇 F, 通过研究其体外抗草酸钙结晶活性, 明确泽泻抗草酸钙结石的药效物质, 并进一步采用均匀设计法筛选最佳抑石效果的泽泻三萜配伍组分配比, 为泽泻抗结石活性成分及其组分配伍新药研发提供实验依据, 也为中药组分^[16-17]研究提供一种思路 and 手段。

1 仪器与材料

SHY-2A 型水浴恒温振荡器, 江苏金伟实验仪器厂; 0.22 μm 微孔滤膜, 天津市津腾实验设备有限公司; AA240FS 型火焰原子吸收分光光度计, 美国安捷伦科技有限公司; AR223CN 型电子分析天

平, 上海奥豪斯仪器有限公司; PHS-3C 型 pH 精密酸度计, 上海雷磁仪器厂。

三羟甲基氨基甲烷 (批号 77-86-1)、氯化钙 (批号 10043-52-4), 北京索莱宝科技有限公司; 柠檬酸, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 批号 XK 13-011-00013; 草酸钠, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20151218; 草酸钙, 上海源叶生物科技有限公司, 批号 563-73-4; 氯化锶, 西陇化工股份有限公司, 批号 10025-70-4; 对照品泽泻醇 A (批号 MUST-16032402, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、24-乙酰泽泻醇 A (批号 MUST-15022104, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 和泽泻醇 F (批号 MUST-15052014, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 对照品 23-乙酰泽泻醇 B (中国食品药品检定研究院, 批号 111846-201102, 质量分数 $\geq 98.5\%$); 对照品泽泻醇 B 和 24-乙酰泽泻醇 F 为本实验室自制, 经 HPLC 检测质量分数均大于 98.0%; 甲醇, 德国默克公司。

2 方法与结果

2.1 药物制备

分别称取 10 mg 的泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 F 和 24-乙酰泽泻醇 F 单体粉末, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 制成质量浓度 1.0 mg/mL 的溶液, 以备用。

2.2 对草酸钙结晶体外生长抑制指数^[5]的测定

取 pH 6.5 Tris 缓冲液 48 mL, 加入 0.03 mol/L 氯化钙和 0.03 mol/L 草酸钠各 1.0 mL, 混匀得 0.6 mmol/L 的草酸钙亚稳饱和液^[5] 50 mL。取 50 mL 草酸钙亚稳饱和液, 加入待测溶液 1 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱振荡 10 min, 取样 3 mL 用针头过滤器经直径 0.22 μm 微孔滤膜滤过于离心管内, 然后加入 0.5 mL 质量浓度 5 mg/mL 的一水草酸钙籽晶^[5] 悬液 ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 搅拌 30 s, 继续置恒温水浴箱振荡孵育 1.5 h, 再取 3 mL 溶液同样经 0.22 μm 微孔滤膜, 并收集在离心管内。分别取各续滤液 0.5 mL 于另外的离心管内, 然后均加入 0.25% 氯化锶 4.5 mL (稀释 10 倍), 再用原子吸收分光光度计测定加籽晶前后各离心管内滤液中 Ca^{2+} 的浓度 (C)^[5]。根据公式计算草酸钙结晶生长抑制指数。

$$\text{抑制指数} = 1 - (C_0 - C_i) / C_0$$

C_0 为加晶前滤液中 Ca^{2+} 浓度, C_i 为加晶后孵育 1.5 h 后滤液中 Ca^{2+} 浓度

2.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 其中 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。均匀设计结果应用 DPS 软件, 进行多种回归分析, 然后选择最合适的一个分析方法。

2.4 泽泻单体成分体外抗草酸钙结晶活性筛选

取适量配制好的泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 F 和 24-乙酰泽泻醇 F 单体溶液分别稀释成 10、100、200 $\mu\text{g/mL}$, 按“2.2”项下方法测定各个单体不同质量浓度体外抗草酸钙结晶的作用, 然后从中筛选出最适合的质量浓度范围进行组分配伍。

对不同质量浓度 6 种泽泻单体体外抗草酸钙结

晶作用进行测定, 结果见表 1。发现大部分单体在 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时的效果是较好的, 而 200 $\mu\text{g/mL}$ 时可能由于三萜类因质量浓度过高而有小部分分析出导致药效不佳, 因此, 最终筛选 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度作为均匀设计实验的剂量范围。

2.5 运用均匀设计^[18-19]进行泽泻组分配方设计

2.5.1 均匀试验设计

将 24-乙酰泽泻醇 A、泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 F 和泽泻醇 F 6 种抗草酸钙结晶活性成分作为考察因素, 每个因素在筛选的活性范围内各设 12 个水平。通过 DPS 设计均匀设计表 (表 2), 共得 12 种组方 (N1~N12)。每个组方形成的待测溶液按“2.2”项中的方法, 测定其对体外草酸钙结晶生长的抑制指数。

表 1 不同质量浓度的泽泻单体成分体外抗草酸钙结晶作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of *Alismatis Rhizoma* with different concentration on resisting calcium oxalate calculus *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制指数/%					
空白 (甲醇)	泽泻醇 A	24-乙酰泽泻醇 A	泽泻醇 B	23-乙酰泽泻醇 B	泽泻醇 F	24-乙酰泽泻醇 F
10	67.33 $\pm$ 5.14	112.00 $\pm$ 9.12**	102.33 $\pm$ 7.42**	87.67 $\pm$ 6.93*	115.00 $\pm$ 10.92**	77.67 $\pm$ 8.65
100		115.67 $\pm$ 11.27**	133.00 $\pm$ 10.08**	75.33 $\pm$ 6.11	94.33 $\pm$ 8.06*	83.33 $\pm$ 6.54*
200		161.67 $\pm$ 15.26**	84.67 $\pm$ 7.53*	104.33 $\pm$ 12.74**	88.33 $\pm$ 9.37*	88.00 $\pm$ 9.01*

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group, same as below

表 2 $U_{12}(12^6)$ 均匀设计试验分配及结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Disposition and result of $U_{12}(12^6)$ uniform design experiment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)						抑制指数/%
	泽泻醇 A	24-乙酰泽泻醇 A	泽泻醇 B	23-乙酰泽泻醇 B	泽泻醇 F	24-乙酰泽泻醇 F	
空白	—	—	—	—	—	—	62.33 $\pm$ 6.24
N1	18.18	75.45	83.63	18.18	42.73	34.55	128.67 $\pm$ 21.83**
N2	75.45	50.91	10.00	10.00	75.45	59.09	139.00 $\pm$ 3.00**
N3	83.64	10.00	67.27	26.36	50.91	91.82	149.33 $\pm$ 17.47**
N4	67.27	26.36	100.00	83.64	26.36	50.91	138.33 $\pm$ 27.64**
N5	100.00	83.64	42.73	50.91	18.18	67.27	126.67 $\pm$ 17.78**
N6	26.36	18.18	34.55	59.09	100.00	42.73	133.67 $\pm$ 21.78**
N7	10.00	42.73	59.09	100.00	67.27	75.45	156.67 $\pm$ 16.50**
N8	91.82	59.09	75.45	75.45	83.64	18.18	124.00 $\pm$ 7.00**
N9	50.91	91.82	91.82	42.73	91.82	83.64	139.33 $\pm$ 11.72**
N10	34.55	67.27	18.18	67.27	34.55	100.00	145.33 $\pm$ 15.01**
N11	59.09	100.00	26.36	91.82	59.09	26.36	186.00 $\pm$ 25.06**
N12	42.73	34.55	50.91	34.55	10.00	10.00	153.67 $\pm$ 26.00**
阳性对照 (枸橼酸)	—	—	—	—	—	—	130.33 $\pm$ 10.15**

2.5.2 泽泻中 6 种化学分配伍体外抗草酸钙作用的测定结果 通过 DPS 软件设计均匀设计表, 该均匀设计表的中心化偏差 $CD=0.198\ 2$, 开展 6 因素 12 水平的均匀设计试验, 结果见表 2, 其中阳性药为枸橼酸溶液 (0.2 g/mL)。

2.5.3 泽泻中 6 种组分配伍筛选结果统计分析 通

过 DPS 软件, 将均匀设计的结果进行多种回归分析, 考察各个参考因素的值, 综合各个因素选择一个最合适的分析方法。每种分析方法的结果见表 3。

从结果可以看出, 采用多因子及平方项逐步回归分析的效果是最佳的, 所以最终选择其作为均匀设计实验结果的分析方法。

表 3 每种方法分析的结果

Table 3 Analysis results of each method

参考因素	逐步回归	多因子及互作项逐步回归	线性回归	多因子及平方项逐步回归
P 值	0.845 0	0.082 6	0.845 0	0.031 5
r 值	0.000 0	0.993 8	0.687 6	0.999 1
d 值	2.056 3	2.049 6	2.056 3	2.005 4

均匀设计实验的数据经多因子及平方项逐步回归分析, 得拟合回归方程为 $Y=102.463\ 3+2.036\ 2\ X_1-0.446\ 7\ X_2+1.503\ 4\ X_3-1.380\ 5\ X_4-0.107\ 6\ X_5+0.096\ 3\ X_6-0.018\ 7\ X_1^2+0.005\ 0\ X_2^2-0.014\ 8\ X_3^2+0.014\ 6\ X_4^2$ (X_1 为泽泻醇 A 质量浓度, X_2 为 24-乙酰泽泻醇 A 质量浓度, X_3 为泽泻醇 B 质量浓度, X_4 为 23-乙酰泽泻醇 B 质量浓度, X_5 为泽泻醇 F 质量浓度, X_6 为 24-乙酰泽泻醇 F 质量浓度), 方程调整后相关系数 $r=0.999\ 1$, $P=0.031\ 5<0.05$, 回归方程具有统计学意义, Durbin-Watson 统计量 $d=2.005\ 4$, 接近 2.0, 提示方程拟合较好, 其方差分析结果见表 4。均匀设计所得活性组分最佳配伍优化理论值为 $X_1=59.0\ \mu\text{g/mL}$, $X_2=100.0\ \mu\text{g/mL}$, $X_3=26.4\ \mu\text{g/mL}$, $X_4=91.8\ \mu\text{g/mL}$, $X_5=59.0\ \mu\text{g/mL}$, $X_6=26.4\ \mu\text{g/mL}$, 即最佳组分配比为泽泻醇 A-24-乙酰泽泻醇 A-泽泻醇 B-23-乙酰泽泻醇 B-泽泻醇 F-24-乙酰泽泻醇 F (2.2:3.8:1:3.5:2.2:1), 理论抑制指数为 188.29%。

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
回归	3 154.399 4	10	609.808 7	0.031 5
残差	0.517 3	1		
总变异	3 154.916 7	11		

2.6 优化结果验证实验

将均匀设计实验的结果进行数据分析, 对 DPS 软件给出的最优组合进行验证, 对比最优组合的预测值与实测值之间的接近程度。

将软件拟合的方程进行计算, 对比计算的值与

通过实验得到的值之间接近的程度 (图 1), 结果两值基本一致。并且对软件筛选的最佳理论配伍优化值进行验证实验, 按照 “2.5.3” 项中优化理论值的各质量浓度进行 3 次验证, 其抑制指数分别为 179.21%、185.37% 和 193.04%, 结果该方程可信度较高, 且实测值与预测值接近。

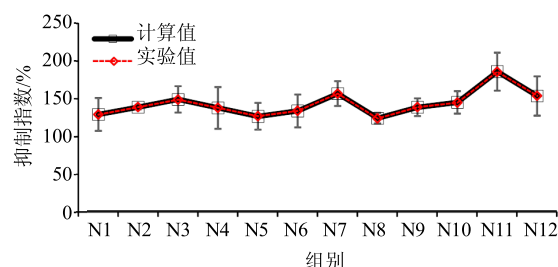


图 1 计算值与实验值的折线图

Fig. 1 Line chart of calculated and experimental values

3 讨论

3.1 组分配伍均匀设计浓度范围的选择

首先, 在设置 12 个水平的均匀设计之前, 本实验对 6 种三萜成分各个单体 (单因素) 进行活性评价研究, 每个单体设置了 10、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度水平, 经过测试发现各个单体在 10 $\mu\text{g/mL}$ 和/或 100 $\mu\text{g/mL}$ 时均表现有良好的效果, 而设置 200 $\mu\text{g/mL}$ 时虽然各个化合物依然表现良好的效果, 但是由于三萜类的疏水性, 其在抗草酸钙结晶体系中有少部分的析出导致质量浓度准确性和可靠性下降; 并且另一方面 100 $\mu\text{g/mL}$ 的药效与 200 $\mu\text{g/mL}$ 相比, 除了泽泻醇 A 和 B 有增加外, 其他 4 个化合物没有显著性差别, 甚至发生活性下降现象 (可能与析出干扰有关), 因此, 根据 6 个单体评价

的结果,设置 12 个水平的均匀设计质量浓度范围为 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 组分配伍前后药效比较

从表 1 和表 2 结果可知,泽泻三萜单体组抗草酸钙活性抑制指数为 88%~133%,而经过组分配伍后各配伍组的活性抑制指数为 124%~180%,多数配伍组的活性显著优于单一三萜化合物,并且与阳性药相比,单一组分的泽泻三萜抗草酸钙结晶的活性基本都低于阳性药组,而进行 6 种单体组分配伍后,发现一些配伍组(如 N7、N11、N12)的活性及最终优化的最佳比例组活性均高于阳性药组。

3.3 组分配伍筛选统计分析

均匀设计^[18-19]只考虑试验点在试验范围内均匀散布,它可保证试验点具有均匀分布的统计特性,可使每个因素的每个水平做 1 次且仅做 1 次试验,着重在试验范围内考虑试验点均匀散布以求通过最少的试验来获得最多的信息,因而其试验次数比正交设计明显的减少,使均匀设计特别适合于多因素多水平的试验,因此适合于组分配伍最佳比例的优化研究。但是其统计分析则复杂于正交设计,本实验通过系统的比较逐步回归、多因子及互作项逐步回归、线性回归、多因子及平方项逐步回归 4 种均匀设计统计方法,优选后多因子及平方项逐步回归最能满足泽泻三萜抗草酸钙结晶模型的拟合,经过模型计算,拟合值和实验值基本吻合,方差分析结果 $P<0.05$,有统计学意义。最佳模型拟合的组分配伍组经过活性验证,验证值与预测值非常接近,从而优化筛选出泽泻体外抗草酸钙结晶的最佳组分配比。

中药组分配伍^[16-17,20]是中药配伍的一种崭新的模式,它是经过各种优化设计方案筛选出对临床适应症有效的中药处方或单味中药活性成分最优配比组分,可以提高临床疗效。从中医药理论体系来说,单一的有效成分研究不是最终目的,在物质成分不断被揭示的基础上如何遵循复方配伍理论,回归到“中药组分配伍”,将是未来中药现代研究的方法和内容。

中药泽泻自古具有排石利尿功效,可与多种中草药配伍组成治疗尿路结石的传统方剂,如猪苓汤、五苓散等。现代药理研究表明泽泻肾草酸钙结晶主要有效部位为泽泻醋酸乙酯部位^[5],但是其药效物质没有完全明确,本实验考察了泽泻 6 个三萜类成分,其均具有体外抑制草酸钙结晶的作用,提示泽

泻三萜类化合物是其抗结石的主要药效物质,并且本实验进一步采用均匀设计对其 6 种主要三萜类成分泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 F 和 24-乙酰泽泻醇 F 进行组分配伍,研究它们体外抑制草酸钙的作用,筛选出 6 种三萜类成分的最佳组分配伍为 2.2:3.8:1:3.5:2.2:1,该比例下能最有效地抑制体外草酸钙结晶的形成。

参考文献

- [1] 钟赣生,刘树民,宋洁民,等. 中药学 [M]. 北京:中国中医药出版社,2012.
- [2] 程志红,萧伟,王振中,等. 泽泻调血脂活性成分及其药理和临床应用研究进展 [J]. 中草药,2015,46(22): 3420-3426.
- [3] 王施广,王娟,王振,等. 泌尿系结石的流行病学研究进展 [J]. 现代生物医学进展,2016,16(3): 597-600.
- [4] 樊龙昌,尹春萍,刘继红,等. 泽泻水煎剂对尿草酸钙结晶影响的临床与实验研究 [J]. 中国药师,2010,13(12): 1701-1704.
- [5] 区淑蕴. 泽泻防治泌尿系结石新药临床前研究 [D]. 武汉:华中科技大学,2010.
- [6] 区淑蕴,苏倩,彭可奎,等. 泽泻总三萜提取物对大鼠泌尿系草酸钙结晶形成的影响 [J]. 华中科技大学学报:医学版,2011,40(6): 634-639.
- [7] 周雪峰,尹仁杰,阮汉利,等. 泽泻抑制尿草酸钙结晶形成活性成分的 2D NMR 分析 [J]. 波谱学杂志,2005,22(2): 195-200.
- [8] Jin H G, Jin Q L, Kim A R, et al. A new triterpenoid from *Alisma orientale* and their antibacterial effect [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(11): 1919-1926.
- [9] Liu X, Li S L, Zhou Y, et al. Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1514-1522.
- [10] 许文,徐明涛,赵万里,等. 泽泻提取物三萜类成分含量测定研究 [J]. 药物分析杂志,2015,35(2): 210-217.
- [11] 徐硕,夏路风,金鹏飞,等. 泽泻的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国医药导报,2015,12(27): 53-57.
- [12] 陶丽,范方田,刘玉萍,等. 中药及其组分配伍的整合作用研究实践与进展 [J]. 中国药理学通报,2013,29(2): 153-156.
- [13] 严红梅,陈小云,张振海,等. 基于中药组分和“组分结构”理论的中药研究模式的探讨 [J]. 中草药,2015,46(8): 1103-1110.

- [14] Zhao W L, Huang X Q, Li X Y, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of major triterpenoids in *Alismatis Rhizoma* by high performance liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2015, 20(8): 13958-13981.
- [15] 赵万里, 黄小强, 许文, 等. RP-HPLC-DAD 同时测定泽泻中 11 个三萜类成分 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2933-2937.
- [16] 王艳. 四逆汤有效组分配伍对甲状腺功能减退症的治疗作用及其机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [17] 赵天增, 张海艳, 董建军, 等. 中药组分配伍理论与 IGD ¹³C-NMR 偶联指纹图谱 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3131-3136.
- [18] 邱颖, 朱玲, 孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用 [J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 18-20.
- [19] 王璐璐, 刘炳周, 王满, 等. 主成分分析结合均匀设计法用于优选桂芍巴布贴制备工艺的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1682-1689.
- [20] 于剑. 基于代谢组学方法研究维 C 银翘片的毒性及其组分配伍 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.