

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

罗虹¹, 刘博文², 杨慧¹, 贺英俊¹, 赵灵丽¹, 刘涛^{1*}

1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

2. 成都大学 四川省抗菌素工业研究所, 四川 成都 610106

摘要: 目的 基于“成分反映活性, 活性指向功效”的中药质量控制研究思路, 以网络药理学筛选得到的活性成分为评价指标, 对六味地黄系列制剂进行再评价研究。方法 采用网络药理学技术筛选出六味地黄系列制剂, 如丸剂(大蜜丸、浓缩丸)、胶囊剂(胶囊、软胶囊)、颗粒剂及口服液治疗 2 型糖尿病、高血压和肾病综合征的共有核心活性成分, 并以其中度值较高的 13 种活性成分(槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基萜花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤苷皂元、儿茶素、薯蓣皂苷元及亚麻酸乙酯)的量作为考察指标, 采用 HPLC 法通过切换波长同时测定, 色谱柱为 Waters 2695 Supersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.08% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L, 检测波长: 先在全波长 200~400 nm 下测定, 后根据对照品最大吸收波长切换检测波长; 并结合主成分分析(PCA)、相关性分析及聚类分析(CA)法综合评价和比较六味地黄系列制剂的质量差异。结果 相同生药量下, 六味地黄系列制剂中成分的含量存在显著差异($P<0.05$), 且部分制剂中部分成分缺失, 软胶囊未检测到槲皮素、儿茶素, 仅大蜜丸和颗粒检测到 β -谷甾醇; 相关性分析结果中六味地黄系列制剂之间的相似度为 0.170~0.897, 且大部分集中在 0.500~0.600, 大蜜丸与颗粒剂相似度最高, 浓缩丸和胶囊、软胶囊及口服液呈极显著相关($P<0.01$), 和大蜜丸、颗粒剂呈显著相关($P<0.05$); PCA 和 CA 结果中六味地黄系列制剂被归为 2 类, 其中大蜜丸、颗粒剂被归为一类, 浓缩丸、胶囊、软胶囊、口服液被归为一类。结论 六味地黄系列制剂存在一定的内在质量差异, 在一定程度上揭示了六味地黄系列制剂说明书中所标示功能主治完全一致的现象可能不合理。

关键词: 六味地黄系列制剂; 网络药理学; 含量差异; 质量研究; 大蜜丸; 浓缩丸; 胶囊; 颗粒剂; 口服液; 2 型糖尿病; 高血压; 肾病综合征; HPLC; 主成分分析; 相关性分析; 聚类分析; 槲皮素; 儿茶素; β -谷甾醇

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5462-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.010

Quality study on Liuwei Dihuang series preparations via network pharmacology and active ingredient determination

LUO Hong¹, LIU Bo-wen², YANG Hui¹, HE Ying-jun¹, ZHAO Ling-li¹, LIU Tao¹

1. School of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. Sichuan Institute of Antibiotic Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective According to the thinking of research on quality control of traditional Chinese medicine based on “components reflect activity, activity points to efficacy”, the active ingredients obtained through network pharmacology screening were used as evaluation indicators to conduct a re-evaluation study on Liuwei Dihuang series preparations (LDSP). **Methods** The network pharmacology technology was used to screen out LDSP, such as pills (big honey pills and concentrated pills), capsules (capsules and soft capsules), granules and oral liquids for the treatment of type 2 diabetes, hypertension and nephrotic syndrome of the common core active ingredients, and the amount of 13 active ingredients (quercetin, kaempferol, β -sitosterol, alisol B, alisol B23-acetate, taxifolin, hydroxygenkwanin, stigmaterol, cerevisterol, hederagenin, catechin, diosgenin and ethyl linolenate) with higher degrees was used as an index of investigation, the HPLC method was used to simultaneously measure the wavelength by switching, the determination was performed on Waters 2695 Supersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) column with mobile phase consisted of methanol-0.08% phosphoric

收稿日期: 2020-04-26

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(202011079035X); 四川省科技计划项目(2018ZR0107)

作者简介: 罗虹(1997—), 女, 在读本科生, 研究方向为中成药新药开发及再评价。Tel: (028)61302236 E-mail: 2735067207@qq.com

*通信作者 刘涛(1976—), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向为中成药新药开发及再评价。

Tel: (028)61302236 E-mail: liutao0578@sina.com

acid (gradient elution), volume flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 30 °C, sample size was 10 μL, detection wavelength: first measurement was at full wavelength 200—400 nm, then maximum absorption was switched to detect wavelength according to the reference wavelength; The principal components analysis (PCA) and cluster analysis (CA) method were used to comprehensively evaluate and compare the quality differences of LDSP. **Results** Under the same crude drug amount, the content of ingredients in LDSP was significantly different ($P < 0.05$), and some ingredients were missing in some preparations. Quercetin and catechin were not detected in soft capsules, β-sitosterol were detected only in big honey pills and granules. In the correlation analysis results, the similarity between LDSP was 0.170—0.897, and most of them were concentrated in 0.500—0.600. Big honey pills had the highest similarity with granules, concentrated pills and capsules, soft capsules and the oral solution showed a very significant correlation ($P < 0.01$), and was significantly related to big honey pills and granules ($P < 0.05$); The PCA and CA results of LDSP were classified into two categories, big honey pills and granules were classified into one category, and concentrated pills, capsules, soft capsules, and oral liquids were classified into one category. **Conclusion** There are certain inherent quality differences in LDSP, which reveals that the phenomenon of completely consistent functional indications in the instructions of LDSP may not be reasonable.

Key words: Liuwei Dihuang series preparations; network pharmacology; content differences; quality study; big honey pill; concentrated pill; capsule; granule; oral liquid; type 2 diabetes; hypertension; nephrotic syndrome; HPLC; principal component analysis; correlation analysis; cluster analysis; quercetin; catechin; β-sitosterol

理想的质量标准应能说明质量与疗效, 即物质基础与疗效的关系, 并能够指导临床用药, 但目前中成药的质量标准多以测定药品中指标性成分的量来控制其的质量, 远远达不到该水平, 特别在控制药品临床有效性方面, 尚有很大差距, 同时市场占有率高的厂家相对更加注重产品质量, 产品销售额决定企业对其质量的关注程度, 因此有必要对已上市中成药进行质量再评价研究^[1-2]。

传统中药强调“药有个性之特长, 方有合群之妙用”的组合应用形式, 重视“君臣佐使, 七情合和”的组合效果, 中医药被认为是古老又经典的系统生物学, 网络药理学是系统生物学的重要组成部分, 其整体性、系统性和注重药物间相互作用的特点与中医理念吻合, 是一门从系统层面揭示中药对机体调控网络作用的新型学科, 为研究传统中药与现代药理学搭建了桥梁^[3-7], 展开中药网络药理学研究能够明确中药药效物质基础和作用机制, 提升中药的研究水平。

六味地黄系列制剂 (Liuwei Dihuang series preparations, LDSP) 由熟地黄等 3 味补药及泽泻等 3 味泻药组成, 为传统“滋阴补肾”的名方剂, 以此为基础开发的多种剂型的中成药在临床应用中较广泛。目前各级标准中收录的六味地黄制剂有包括胶囊在内的 11 种剂型, 临床应用主要以丸剂 (大蜜丸、浓缩丸)、胶囊剂 (胶囊、软胶囊)、颗粒剂及口服液为主, 这些剂型虽然处方相同, 但生产工艺有异, 所含的物质基础可能有较大的区别, 且质量标准与控制水平参差不齐。本课题组前期研究表明 LDSP 在《中国药典》2015 年版一部中规定的定量

测定项目马钱苷和丹皮酚的每日服用量差异较大, 马钱苷 1.8~33.6 mg, 丹皮酚 1.2~43.2 mg^[8], 但由于中药的复杂性, 这些成分的差异及其与临床作用的相关性还不得而知。

LDSP 在临床上可用于多种疾病的治疗, 本研究选用文献报道较多的 LDSP 治疗糖尿病 (T2DM)、高血压以及肾病综合征 (NS)^[9-15] 的 3 种临床作用作为代表, 对 LDSP 的相关药效物质基础进行研究。通过网络药理学筛选得到的结果, 进行再评价实验, 选择六味地黄方治疗上述 3 种疾病共有的核心活性成分作为实验候选活性成分, 并选取其中 13 种活性成分采用 HPLC 法进行定量测定^[16], 以此为指标探索 LDSP (各 3 批次) 间药效物质基础的差异, 为进一步评价其质量提供依据, 同时为 LDSP 临床应用提供一定参考。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; PS-40 型超声波清洗器, 深圳得康清洗设备有限公司; FA2004 分析天平, 上海良平仪器仪表有限公司; HH-6 型数显恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司; BS-6KH 型电子天平, 上海友声衡器公司; TG20G 型高速离心机, 天津广丰科技有限公司。

对照品泽泻醇 B23 乙酸酯 (批号 110278-20190930, 质量分数 ≥ 98%)、泽泻醇 B (批号 111234-20190930, 质量分数 ≥ 98%)、槲皮素 (批号 112345-20190930, 质量分数 ≥ 98%)、山柰酚 (批号 110234-20190930, 质量分数 ≥ 98%)、儿茶素 (批号 112349-20190930, 质量分数 ≥ 98%)、β-谷甾醇 (批号 112567-20190930, 质量分数 ≥ 98%)、豆甾醇

(批号 112543-20190930, 质量分数 \geq 98%)、薯蓣皂苷元(批号 112098-20190930, 质量分数 \geq 98%)、花旗松素(批号 112657-20190930, 质量分数 \geq 98%)、亚麻酸乙酯(批号 112709-20190930, 质量分数 \geq 95%)、羟基茺花素(批号 111211-20190930, 质量分数 \geq 98%)、常春藤皂苷元(批号 111412-20190930, 质量分数 \geq 98%)、啤酒甾醇(批号 112789-20190930, 质量分数 \geq 98%)均购自四川省维克奇生物科技有限公司。

大蜜丸 9 g/丸(批号 18011726、17012504、17012473, 编号 S1~S3); 浓缩丸 0.18 g/丸(每 8 丸相当于饮片 3 g, 批号 18071341、18074529、18073459, 编号 S4~S6); 软胶囊 0.38 g/粒(批号 18070319、18170316、18170314, 编号 S7~S9)购自北京同仁堂科技发展股份有限公司; 胶囊 0.3 g/粒(批号 20181205、20190105、20171014, 编号 S10~S12)购自修正药业有限公司; 颗粒 5 g/袋(批号 20170602、20170604、20171001, 编号 S13~S15)购自保和堂(焦作)制药有限公司; 口服液 10 mL/支(批号 170701、170801、180304, 编号 S16~S18)购自黄山市天目药业有限公司; 甲醇(批号 20191013)、石油醚(30~60 °C, 批号 20190811)为分析纯, 甲醇(批号 20191014)、磷酸(批号 20190922)为色谱纯, 均购于成都市科隆化学品有限公司; 水为蒸馏水。

2 方法

2.1 网络药理学研究方法^[17-19]

2.1.1 六味地黄方活性成分的筛选及潜在靶点预测 TCMSP(中药系统药理学数据库和成分分析平台)其中包括《中国药典》在册的 499 种中药, 含 29 384 种成分, 3 311 个靶标和 837 个相关疾病。根据中药的药动学特性, 本研究运用 TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)数据库对六味地黄方进行成分的收集及筛选。实验筛选六味地黄方中熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮 6 味药材口服生物利用度(OB) \geq 30%且类药性(DL) \geq 0.18 的化合物作为候选活性成分, 利用 Unitprot 数据库(<https://www.Unitprot.org/>)预测候选活性成分对应的靶点。

2.1.2 疾病靶点预测 通过 GeneCards 数据库分别以“type 2 diabetes mellitus”(2 型糖尿病)、“hypertension”(高血压)、“nephrotic syndrome”(肾病综合征)进行检索, 分别获取单一疾病蛋白靶点,

将这些靶点作为疾病候选靶点, 并在 Unitprot 数据库(<https://www.Unitprot.org/>)中查询蛋白靶点的基因名。

2.1.3 药物成分-疾病相互作用靶点的获取及药物成分-靶点-疾病相互作用网络构建 将所得到的六味地黄方候选活性成分的对应该靶点与单一疾病蛋白靶点上传至 Venny 2.1.0 数据库取交集, 得到二者之间的潜在交集蛋白靶点, 选用 Multiple proteins 工具, 限定物种为“人(homo sapiens)”, 并通过 Cytoscape 3.6.1 软件将潜在交集蛋白靶点进行蛋白网络结构可视化处理, 根据获取的靶点数据结果, 构建六味地黄方预防和治疗 T2DM、高血压、NS 的药物成分-靶点-疾病相互作用网络, 通过选择节点 degree 值 \geq 平均 degree 值的节点, 构建其药物成分-靶点-疾病核心作用网络; 在 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)绘制蛋白相互作用(PPI)网络图。

2.1.4 基因本体功能(GO)分析及 KEGG 基因与信号通路富集分析 使用 DAVID 软件(<https://david.ncifcrf.gov/>)将网络合并后获取的核心靶点蛋白进行 GO 富集分析, 用统计学超几何分布定量评估蛋白质群, 以 P 值反映蛋白质生物学功能的显著性, 选择生物工程、分子功能、细胞组分 3 个模块; 使用 DAVID 软件(<https://david.ncifcrf.gov/>)对药物成分-疾病交集核心蛋白靶标基因进行 KEGG 基因与信号通路富集分析, 通过富集分析的功能条目, 得到六味地黄方预防和治疗 T2DM、高血压、NS 的主要作用通路。

2.2 含量测定方法^[20-21]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Supersil C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 柱温为 30 °C, 进样量 10 μ L, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长: 先在全波长 200~400 nm 下测定, 后根据对照品最大吸收波长切换检测波长, 流动相为色谱甲醇-0.08%磷酸水溶液, 梯度洗脱条件: 0~15 min, 20%~30%甲醇; 15~25 min, 30%~40%甲醇; 25~40 min, 40%~75%甲醇; 40~60 min, 75%~90%甲醇。理论塔板数以各定量成分峰计算均大于 4 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基茺花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤皂苷元、儿茶素、薯蓣皂苷元、亚麻酸乙酯对照品适量, 精密称定, 用甲醇分别配制成含槲皮素 33.43 μ g/mL、

山柰酚 824.00 $\mu\text{g/mL}$ 、 β -谷甾醇 703.60 $\mu\text{g/mL}$ 、泽泻醇 B 72.20 $\mu\text{g/mL}$ 、泽泻醇 B23 乙酸酯 123.90 $\mu\text{g/mL}$ 、花旗松素 824.80 $\mu\text{g/mL}$ 、羟基蒽花素 213.40 $\mu\text{g/mL}$ 、豆甾醇 250.00 $\mu\text{g/mL}$ 、啤酒甾醇 223.60 $\mu\text{g/mL}$ 、常春藤苷皂元 238.80 $\mu\text{g/mL}$ 、儿茶素 210.80 $\mu\text{g/mL}$ 、薯蓣皂苷元 232.80 $\mu\text{g/mL}$ 、亚麻酸乙酯 800.00 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 待用。

2.2.3 供试品溶液的制备

(1) 六味地黄丸供试品溶液的制备: 取样品 S1~S3, 适量剪碎, 按相同生药量, 各取 2.4 g, 精密称定, 分别置于具塞锥形瓶中, 精密加入分析甲醇 25 mL, 称定质量, 振摇 5 min, 使溶散, 超声提取 (30 $^{\circ}\text{C}$ 、300 W、50 Hz) 60 min, 放冷, 称定质量, 用分析甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取 8 mL 于 10 mL 离心管中置高速离心机中 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

(2) 六味地黄丸 (浓缩丸) 供试品溶液的制备: 取样品 S4~S6, 粉碎 (过 2 号筛目), 按六味地黄处方生药量相同, 各取 0.96 g, 精密称定, 照“2.2.3 (2)”项下六味地黄丸供试品溶液制备方法自“分别置于具塞锥形瓶……”起, 同法操作。

(3) 六味地黄软胶囊供试品溶液的制备: 取样品 S7~S9 内容物, 按六味地黄处方生药量相同, 各取 0.62 g, 精密称定, 分别置于具塞锥形瓶中, 加入石油醚 (30~60 $^{\circ}\text{C}$) 30 mL, 加热回流 1 h, 50 $^{\circ}\text{C}$, 放冷, 倾去石油醚液, 照“2.2.3 (1)”项下六味地黄丸供试品溶液制备方法中自“精密加入分析甲醇 25 mL……”起, 同法操作。

(4) 六味地黄胶囊供试品溶液的制备: 取样品 S10~S12 内容物, 按六味地黄处方生药量相同, 各取 0.14 g, 精密称定, 照“2.2.3 (1)”项下六味地黄丸供试品溶液制备方法中自“分别置于具塞锥形瓶……”起, 同法操作。

(5) 六味地黄颗粒供试品溶液的制备: 取样品 S13~S15, 按六味地黄处方生药量相同, 各取 2.0 g, 精密称定, 照“2.2.3 (1)”项下六味地黄丸供试品溶液制备方法中自“分别置于具塞锥形瓶……”起, 同法操作。

(6) 六味地黄口服液供试品溶液的制备: 取样品 S16~S18, 按六味地黄处方生药量相同, 各取 2.71 mL, 精密量取, 分别置于蒸发皿中, 85 $^{\circ}\text{C}$ (制

备溶媒为水), 蒸干, 加入分析甲醇 25 mL, 溶解, 照“2.2.3 (1)”项下六味地黄丸供试品溶液制备方法中自“分别置于具塞锥形瓶中, 称定质量……”起, 同法操作。

2.2.4 方法学考察

(1) 系统适用性试验: 精密移取“2.2.2”项下对照品溶液、“2.2.3 (1)”项下供试品溶液 (S1) 各 10 μL , 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明, 供试品溶液在对照品相同保留时间的出峰位置处分别与对照品色谱峰对应一致。

(2) 线性关系考察: 分别移取“2.2.2”项下对照品溶液 10 μL , 分别注入高效液相色谱仪, 测定, 以峰面积积分为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 分别得回归方程为槲皮素 $Y=1\ 506.64 X-176.19$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 11.7~196.5 $\mu\text{g/mL}$ 、山柰酚 $Y=44.28 X-9.375$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 80.0~1 140.0 $\mu\text{g/mL}$ 、 β -谷甾醇 $Y=47.34 X-8.455$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 10.0~940.0 $\mu\text{g/mL}$ 、泽泻醇 B $Y=12.368 X-52.329$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 1.6~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 、泽泻醇 B23 乙酸酯 $Y=54.939 X-252.03$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 2.4~150.0 $\mu\text{g/mL}$ 、花旗松素 $Y=41.17 X-6.677$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 150.0~2 960.0 $\mu\text{g/mL}$ 、羟基蒽花素 $Y=77.142 X-130.27$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 14.0~300.0 $\mu\text{g/mL}$ 、豆甾醇 $Y=82.426 X-768.23$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 10.0~250.0 $\mu\text{g/mL}$ 、啤酒甾醇 $Y=84.416 X-763.23$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 100.0~2 960.0 $\mu\text{g/mL}$ 、常春藤苷皂元 $Y=87.454 X-354.33$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 100.0~2 470.0 $\mu\text{g/mL}$ 、儿茶素 $Y=83.206 X-123.43$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 112.0~5 000.0 $\mu\text{g/mL}$ 、薯蓣皂苷元 $Y=76.206 X-621.23$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 180.0~3 960.0 $\mu\text{g/mL}$ 、亚麻酸乙酯 $Y=64.28 X-4.375$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 180.0~1 560.0 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 上述对照品在各自的质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

(3) 精密度试验: 按“2.2.3 (1)”项下方法制备同一供试品溶液 (S1), 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得样品中槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基蒽花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤苷皂元、儿茶素、薯蓣皂苷元、亚麻酸乙酯的峰面积 RSD 均小于 5%, 表明该方法精密度良好。

(4) 稳定性试验: 按“2.2.3 (1)”项下方法制

备同一供试品溶液 (S1), 分别于 0、2、4、8、12、16 h 进样, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 测得样品中槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基蒽花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤苷皂元、儿茶素、薯蓣皂苷元、亚麻酸乙酯的峰面积 RSD 均小于 5%, 表明供试品溶液于室温下放置 16 h 稳定性良好。

(5) 重复性试验: 取同一批次样品 (S1), 按“2.2.3 (1)”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 测得样品中槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基蒽花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤苷皂元、儿茶素、薯蓣皂苷元、亚麻酸乙酯的峰面积 RSD 均小于 5%, 表明该方法重复性良好。

(6) 加样回收率试验: 精密称取已测定样品 (S1) 适量, 共 6 份, 精密加入槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基蒽花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤苷皂元、儿茶素、薯蓣皂苷元、亚麻酸乙酯对照品适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 测定 13 种活性成分的量, 计算加样回收率。结果表明, 槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、泽泻醇 B、泽泻醇 B23 乙酸酯、花旗松素、羟基蒽花素、豆甾醇、啤酒甾醇、常春藤苷皂元、儿茶素、薯蓣皂苷元、亚麻酸乙酯的平均加样回收率均在 95.0%~104.6%, RSD \leq 3.03%。

2.2.5 样品测定 将“2.2.3”项下制备的供试品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。

3 结果与分析

3.1 网络药理学预测结果

3.1.1 六味地黄方活性成分的筛选及潜在靶点预测结果 从 TCMSP 数据库中检索六味地黄方中六味药材的化学成分, 根据 OB \geq 30% 及 DL \geq 0.18 为筛选标准, 删除重复值, 得到活性度值较高的活性成分。利用 Unitprot 数据库 (<https://www.Unitprot.org/>) 获得活性成分对应的靶标。在 GeneCards 数据库分别以“type 2 diabetes mellitus” (2 型糖尿病)、“hypertension” (高血压)、“nephrotic syndrome” (肾病综合征) 进行检索, 分别获取单一疾病蛋白靶点, 得到 7 828 个 T2DM 疾病靶点、6 284 个高血压疾病靶点、1 057 个 NS 疾病靶点。

3.1.2 药物成分-疾病相互作用靶点的获取及药物成分-靶点-疾病相互作用网络构建结果 筛选出六味地黄方成分与 T2DM 交集靶点 169 个、高血压交

集靶点 169 个、NS 交集靶点 69 个。将活性成分及对应靶点信息导入 Cytoscape 3.6.1 软件绘制相互作用网络图, 提取出药物成分-靶点-疾病核心作用网络, 得到六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 的核心活性成分分别为 40、40、32 个, 且六味地黄方治疗 T2DM、高血压的核心活性成分的种类和数目都相同, 除菜油甾醇、丁子香萜、巴比妥酸、麦角甾醇-7,22E-二烯-3 β -醇、麦角甾醇过氧化物、多孔-5-烯-3 β -醇、油酸乙酯、24-甲基胆碱-5-烯 3 β -O-吡喃葡萄糖苷_qt (24-methylcholest-5-enyl-3 β -O-glucopyranoside_qt) (带有_qt 的化合物相对分子质量一般比未带有后缀的少 162 和代表化合物失去了糖苷键, 成为苷元) 8 种核心活性成分外, 其余的与治疗 NS 的核心活性成分在种类和数量上都相同, 相关信息见表 1。在 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中绘制的蛋白相互作用 (PPI) 网络, 见图 1。

3.1.3 基因本体功能 (GO) 分析及 KEGG 基因与信号通路富集分析部分结果 为了进一步阐释候选靶点的可能作用, 用 DAVID 软件 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 将网络合并后获取的核心蛋白靶点进行 GO 分析, 进一步对药物成分-疾病交集核心蛋白靶点基因进行 KEGG 基因与信号通路富集分析, 相关信息见图 2、3。

3.1.4 六味地黄方成分-靶点-疾病相互作用网络构建 选择节点 degree 值 (度值) \geq 平均 degree 值 (平均度值) 的节点, 发现 degree 值 (度值) 在平均值以上均有 30 个, 选为六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 关键靶标, 度值较高的靶标有 AKT1、IL6、MAPK1、VEGFA 等, 见图 4, 将成分及对应靶点信息导入 Cytoscape 3.6.1 软件构建六味地黄方成分-靶点-疾病相互作用网络, 每种活性成分作用于多个靶点, 每个靶点也可由多个活性成分产生作用, 见图 5。

结合筛选结果及文献挖掘的方法可确定活性成分的归属为泽泻醇 B 和泽泻醇 B23 乙酸酯是泽泻的化学成分, 花旗松素、啤酒甾醇、常春藤苷皂元是茯苓的化学成分, 槲皮素、山柰酚、儿茶素是牡丹皮的化学成分, 羟基蒽花素和亚麻酸乙酯是山茱萸的化学成分, β -谷甾醇是山茱萸、泽泻、牡丹皮的化学成分, 豆甾醇是山药、山茱萸的化学成分, 薯蓣皂苷元是山药的化学成分。单独的活性成分可能只针对某一节点, 而 2 种或以上的组合能产生协同作用, 可能针对的是整个网络。在《中国药典》中

表 1 六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 共有核心活性成分

Table 1 Common core active ingredients of Liuwei Dihuang Formula in treating T2DM, hypertension and NS

分子 ID	化合物名称	药材来源
MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	山茱萸、泽泻、牡丹皮
MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	山药、山茱萸
MOL001559	萆拔宁 (piperlonguminine)	山药
MOL001736	花旗松素 [(-)-taxifolin]	茯苓
MOL000322	海风藤酮 (kadsurenone)	茯苓
MOL005430	山酮 C (hancinone C)	茯苓
MOL005440	异岩藻酯醇 (isofucosterol)	山药
MOL005458	黄山药皂苷 C (dioscoreside C _{qt})	山药
MOL000546	薯蓣皂苷元 (diosgenin)	山药
MOL005465	AIDS180907	山药
MOL000953	胆固醇 (CLR)	山药
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	牡丹皮
MOL000492	(+)-儿茶素 ((+)-catechin)	牡丹皮
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	牡丹皮
MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	茯苓
MOL000275	氢化松苓酸 (trametenolic acid)	茯苓
MOL000279	啤酒甾醇 (cerevisterol)	茯苓
MOL000296	常春藤皂苷元 (hederagenin)	茯苓
MOL000831	泽泻醇 B23 乙酸酯 (alisol B23-acetate)	泽泻
MOL000849	16-methoxyalisol B monoacetate	泽泻
MOL000853	泽泻醇 B (alisol B)	泽泻
MOL002464	1-monolinolein	泽泻
MOL000862	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta [a] phenanthren-17-yl] butyl] acetate	泽泻
MOL001494	十八碳-6,9 二烯酸乙酯 (mandenol)	山茱萸
MOL001495	亚麻酸乙酯 (ethyl linolenate)	山茱萸
MOL002879	diop	山茱萸
MOL000358	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	山茱萸、泽泻、牡丹皮
MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene	山茱萸
MOL005503	腺齿紫金牛虱 (cornudentanone)	山茱萸
MOL005531	远华蟾蜍精 (telocinobufagin)	山茱萸
MOL008457	四氢鸭脚木碱 (tetrahydroalstonine)	山茱萸
MOL005530	羟基莞花素 (hydroxygenkwanin)	山茱萸

药质量标准研究制定技术要求中含量测定的测定指标一般为根据中药的功能主治或活性实验结果选择出的活性成分，而 LDSP 的功能主治为滋阴补肾，临床上 T2DM、高血压、NS 等疾病多为肾阴亏损

所致，同时本研究所测定的 13 种活性成分为度值较高同时在网络药理学研究中常见且易获取的成分，结合筛选结果及文献数据^[22-24]，上述 13 种活性成分为临床治疗 T2DM、高血压、NS 的核心活性成分，

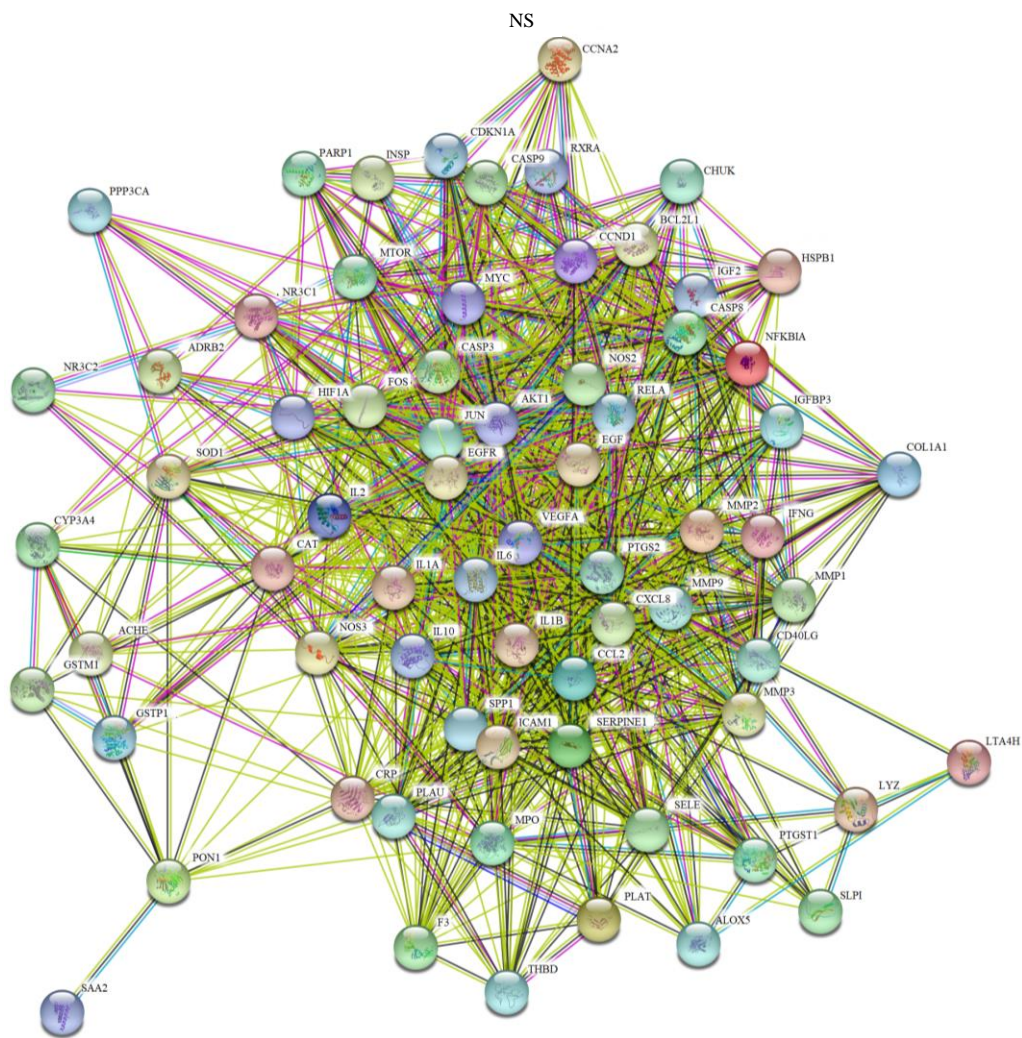
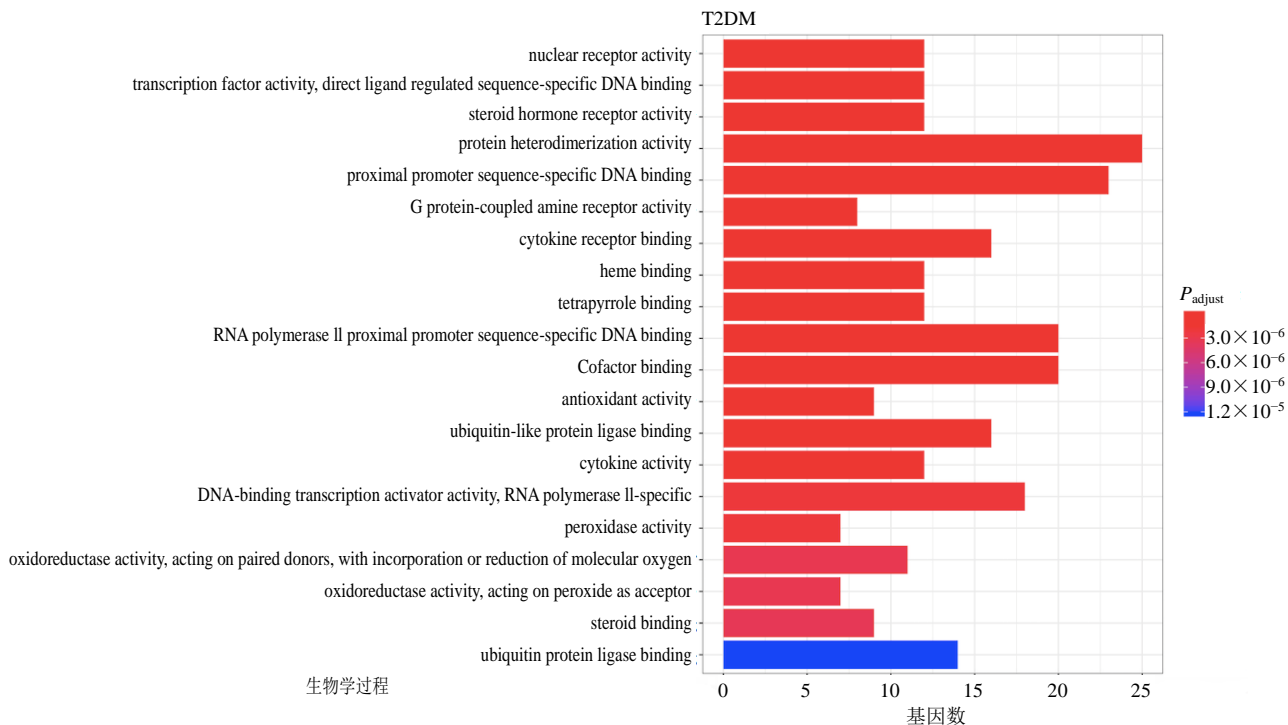


图 1 六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 核心蛋白 PPI 网络

Fig. 1 Core protein PPI network of Liuwei Dihuang Formula in treating T2DM, hypertension and NS



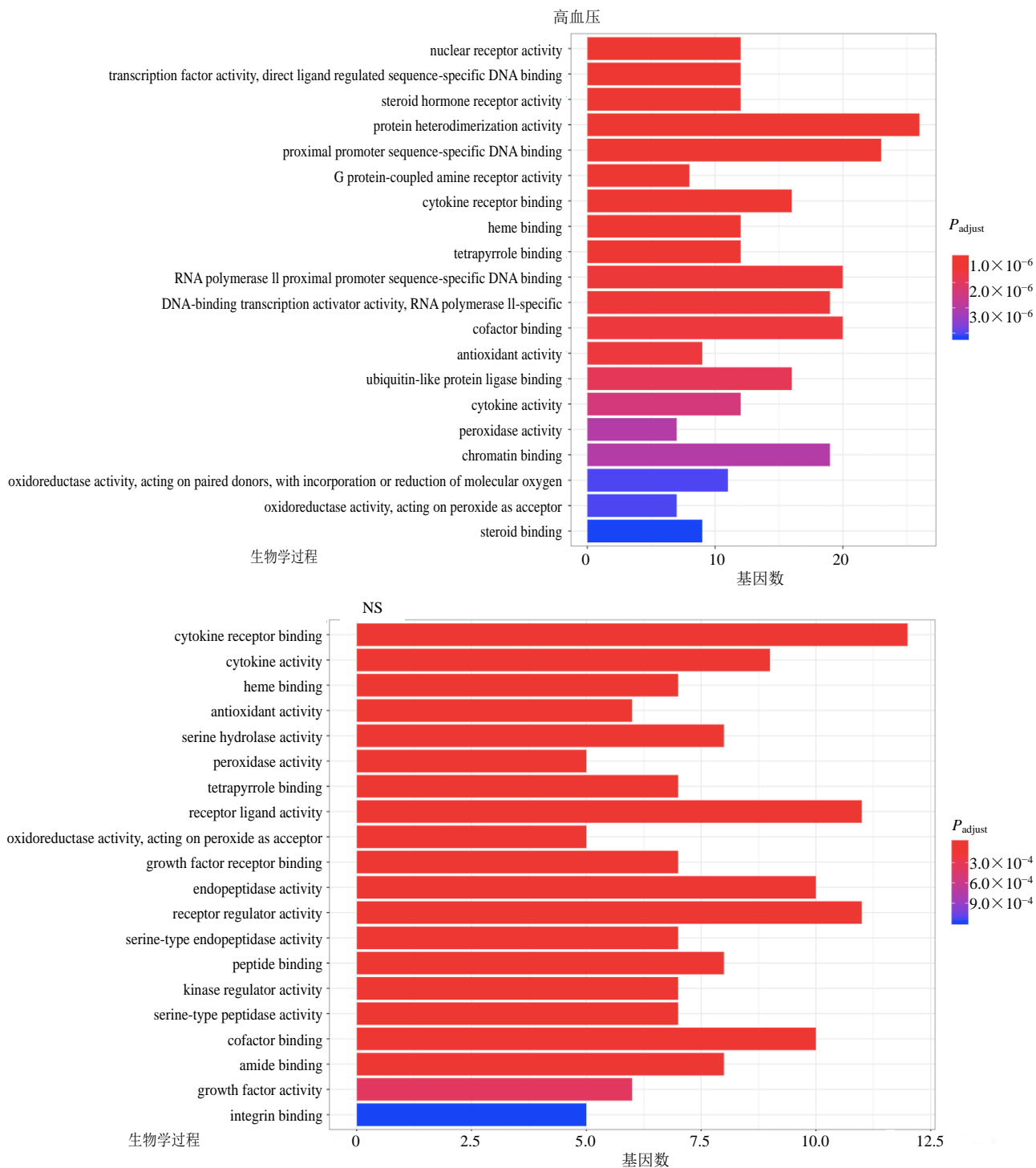


图 2 六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS GO 分析 (只显示前 20 条)

Fig. 2 GO analysis of Liuwei Dihuang Formula in treating T2DM, hypertension and NS (only top 20)

故选其作为含量测定指标，在一定程度上更具有代表性。

3.2 含量测定结果

限于篇幅，仅列举部分色谱图，见图 6、7。LDSP 中 13 种活性成分测定结果见表 2。表 3 是将单一成分在每个制剂各 3 批中的含量总和看成一个整体，

比较其在大蜜丸、浓缩丸、胶囊、软胶囊、颗粒、口服液 6 种制剂中的差异，同时结合表 2 不同制剂不同批次间的含量测定结果，在一定程度上表明 LDSP 间所测成分含量有较大差异，如 β -谷甾醇在六味地黄丸与六味地黄颗粒中含量较高，但在胶囊剂（胶囊、软胶囊）、口服液、浓缩丸中含量极低甚

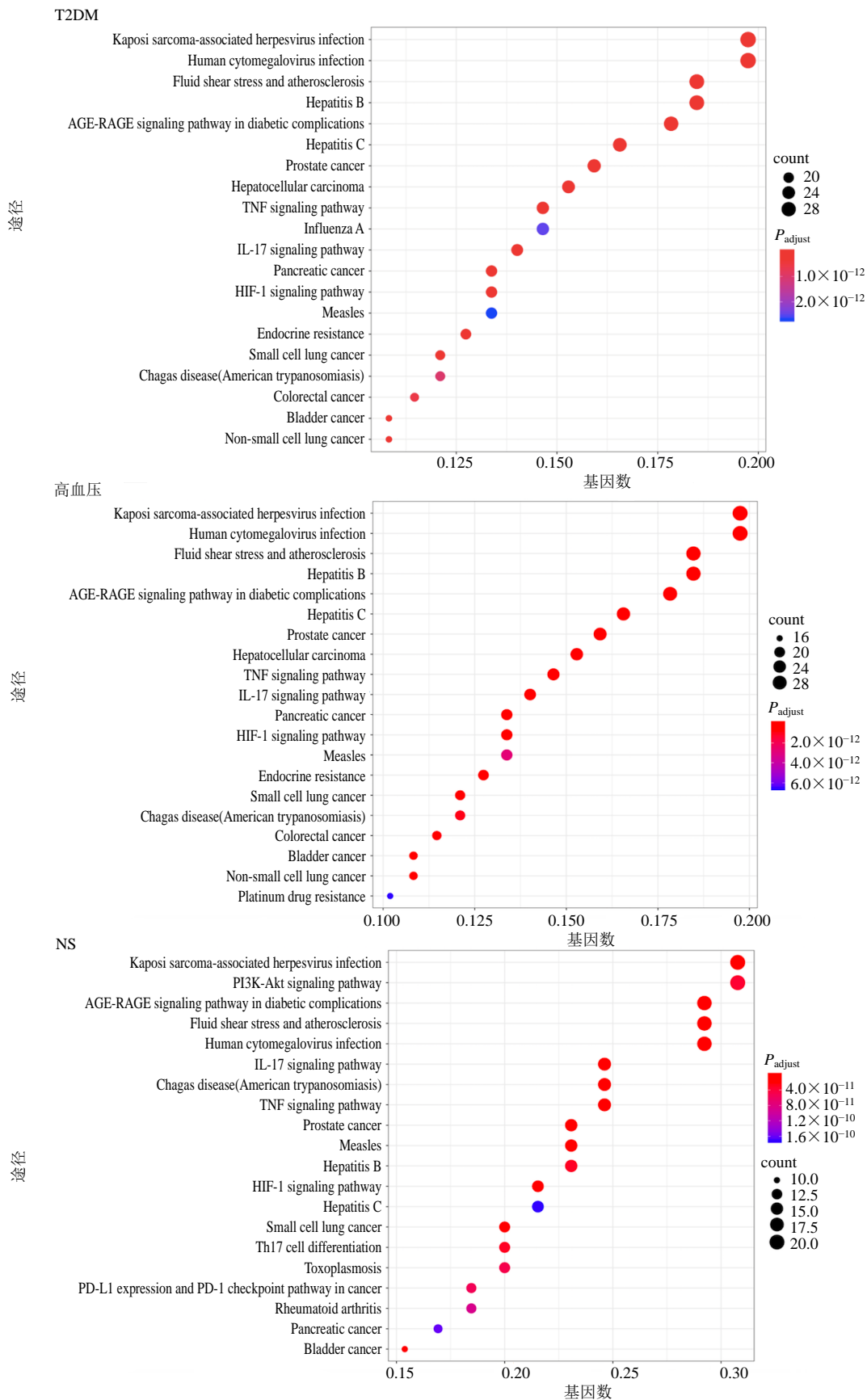


图 3 六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 的 KEGG 信号通路分析

Fig. 3 KEGG signaling pathway analysis of Liuwei Dihuang Formula in treating T2DM, hypertension and NS

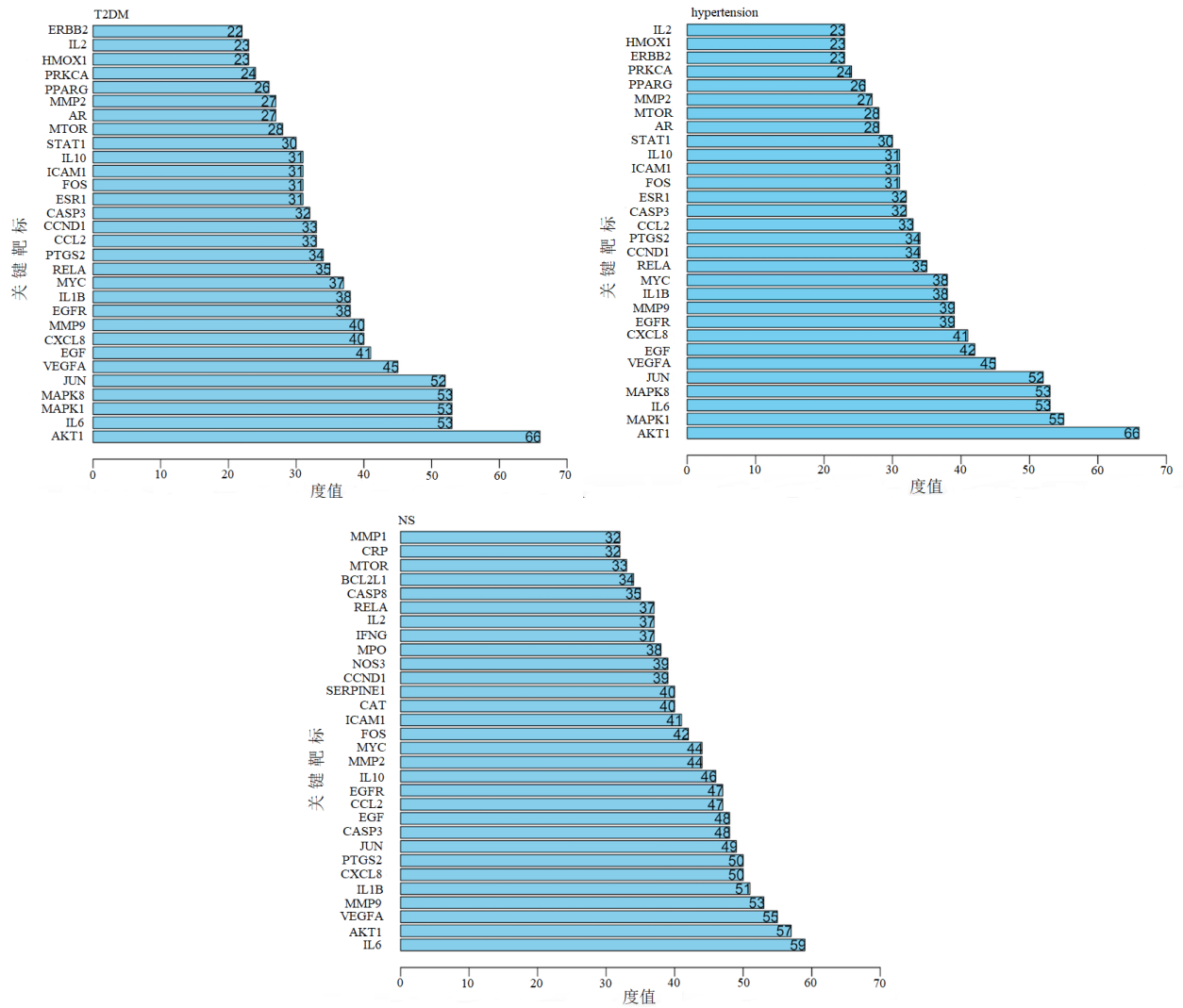
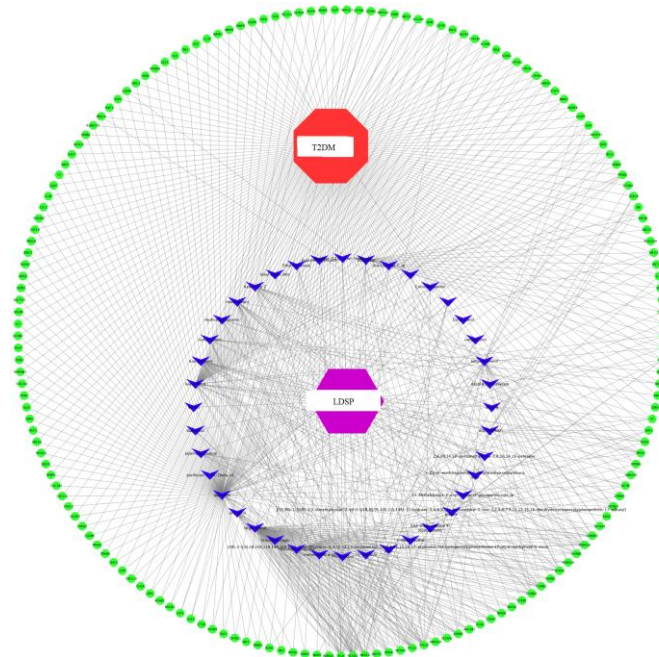


图 4 六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 的关键靶标

Fig. 4 Key targets of Liuwei Dihuang Formula in treating T2DM, hypertension and NS



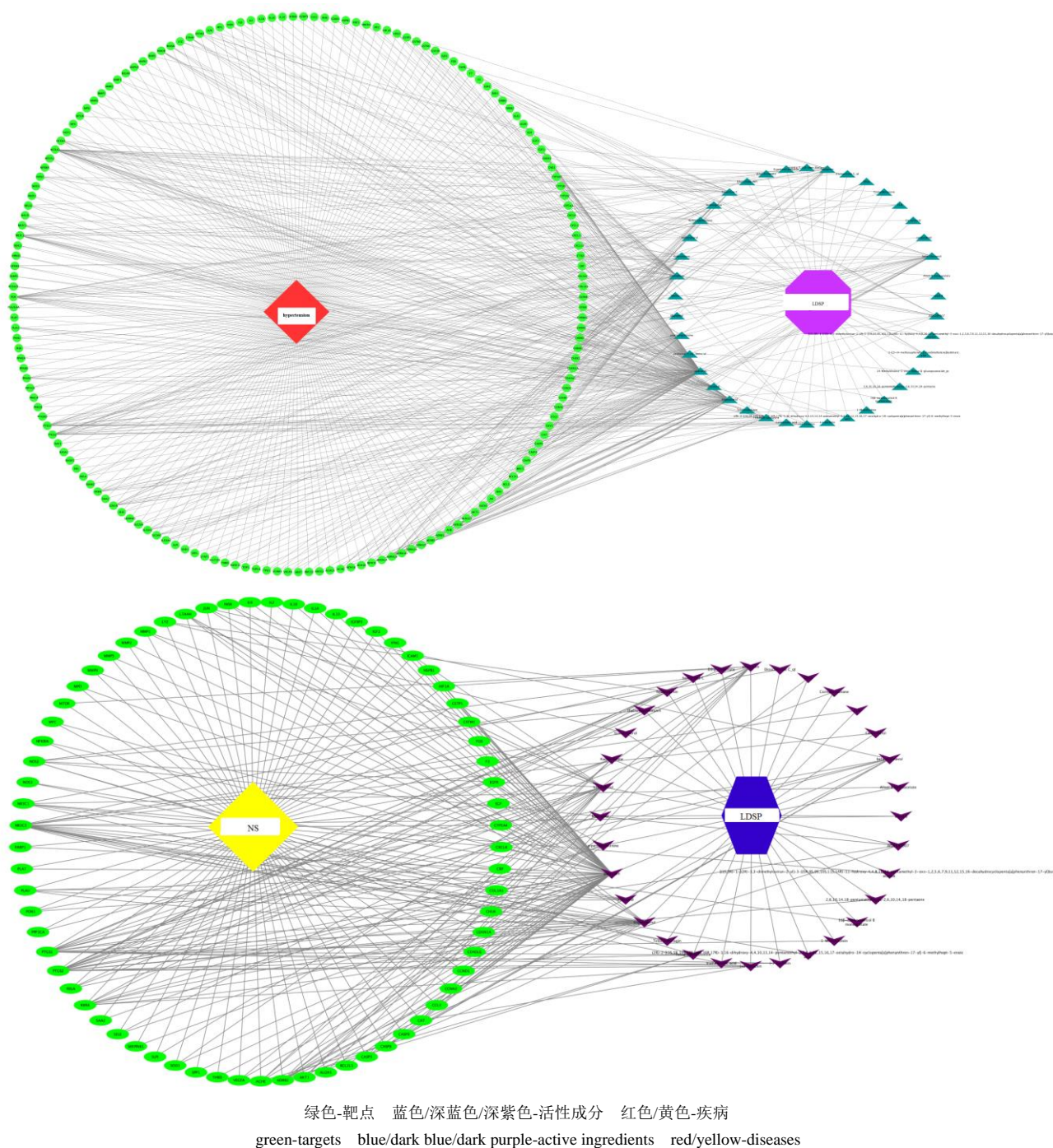


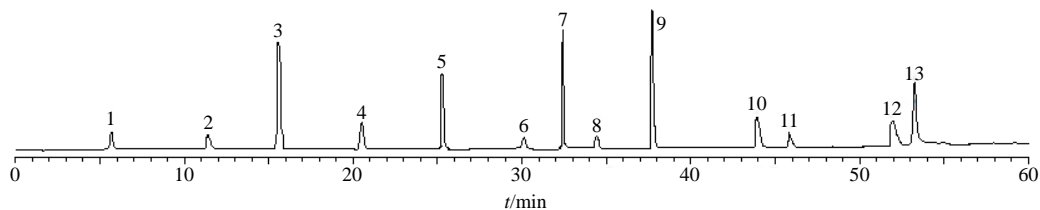
图 5 六味地黄方治疗 T2DM、高血压、NS 成分-靶点-疾病相互作用网络

Fig. 5 Ingredients-target-disease interaction network of Liuwei Dihuang Formula in treating T2DM, hypertension and NS

至无；软胶囊中槲皮素和儿茶素含量较丸剂（浓缩丸、大蜜丸）、胶囊、颗粒、口服液中含量极低甚至无，且单一制剂不同批次间含量也存在差异（浓缩丸 3 个批次中 S6 中泽泻醇 B23 乙酸酯的含量接近 S4 或 S5 的 2 倍；大蜜丸 3 个批次中 S3 山柰酚的含量接近 S1 或 S2 的 2 倍等），同时可得大蜜丸中 13 种活性成分含量总和最多，颗粒次之，浓缩丸、胶囊、软胶囊及口服液接近。

3.3 主成分结合相关性分析和系统聚类分析

通过“Statistical Product and Service Solutions”软件，采用双变量分析法，以 6 种制剂为横坐标，以每种制剂共 3 批的单一成分含量总和的平均值为纵坐标。结果 LDSP 间相似度在 0.170~0.897，且大部分制剂间集中在 0.500~0.600，其中大蜜丸与颗粒相似度最高，与软胶囊最低，仅为 0.170，与口服液相似度为 0.256。此外浓缩丸、胶囊及软胶囊



1-啤酒甾醇 2-儿茶素 3-亚麻酸乙酯 4-豆甾醇 5-β-谷甾醇 6-薯蓣皂苷元 7-花旗松素 8-槲皮素 9-山柰酚 10-常春藤皂苷元 11-泽泻醇 B 12-羟基茺花素 13-泽泻醇 B23 乙酸酯
 1-cerevisterol 2-catechin 3-ethyl linolenate 4-stigmasterol 5-β-sitosterol 6-diosgenin 7-taxifolin 8-quercetin 9-kaempferol
 10-hederagenin 11-alisol B 12-hydroxygenkwanin 13-alisol B23-acetate

图 6 13 种混合对照品的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chart of 13 mixed controls

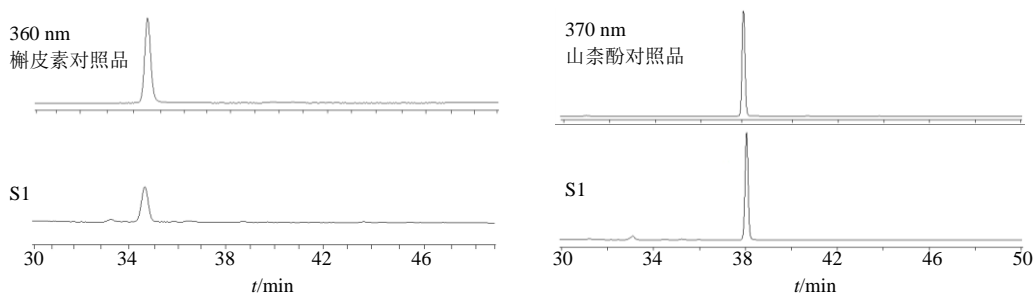


图 7 山柰酚、槲皮素对照品和 LDSP 样品的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC chart of kaempferol, quercetin reference standards and LDSP sample

表 2 LDSP 中 13 种活性成分含量测定结果

Table 2 Content determination results of 13 active ingredients from LDSP

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)												
	泽泻醇 B23 乙酸酯	泽泻醇 B	槲皮素	山柰酚	儿茶素	β-谷甾醇	豆甾醇	薯蓣皂苷元	花旗松素	亚麻酸乙酯	羟基茺花素	常春藤皂苷元	啤酒甾醇
S1	0.35	1.15	0.06	1.83	0.50	184.4	0.13	0.85	1.60	0.76	0.81	3.77	0.44
S2	0.38	1.18	0.06	1.61	0.45	181.5	0.14	0.82	1.57	0.74	0.72	3.78	0.40
S3	0.39	1.15	0.06	2.63	0.67	172.9	0.13	0.86	1.54	0.72	0.79	3.68	0.42
S4	0.39	1.08	0.02	0.56	0.64	—	0.11	0.82	1.49	0.71	0.77	3.34	0.41
S5	0.38	1.09	0.03	0.69	0.78	—	0.06	0.83	1.43	0.71	0.84	3.38	0.41
S6	0.75	1.55	0.02	0.57	0.52	—	0.07	0.85	1.46	0.73	0.86	3.51	0.40
S7	0.79	1.63	—	0.10	—	—	0.31	1.71	1.06	0.05	1.66	4.22	0.06
S8	0.79	1.59	—	0.09	—	—	0.29	1.80	1.16	0.07	1.68	4.23	0.06
S9	0.77	1.54	—	0.08	—	—	0.28	1.86	1.12	0.05	1.68	4.24	0.06
S10	0.40	1.09	0.04	1.09	0.22	—	0.08	0.84	1.34	0.70	0.74	3.50	0.39
S11	0.39	1.15	0.03	0.95	0.28	—	0.08	0.81	1.34	0.75	0.76	3.41	0.38
S12	0.40	1.10	0.04	1.13	0.17	—	0.06	0.85	1.35	0.77	0.84	3.35	0.39
S13	0.37	1.15	0.04	1.05	0.59	149.5	0.07	1.02	1.51	0.71	0.80	3.44	0.42
S14	0.37	1.08	0.04	1.12	0.91	156.2	0.08	0.85	1.54	0.72	0.79	3.45	0.42
S15	0.37	1.12	0.04	1.15	0.96	173.3	0.08	0.89	1.52	0.70	0.82	3.42	0.42
S16	0.80	1.48	0.01	0.15	0.90	—	0.05	1.82	0.56	0.38	1.66	4.03	0.12
S17	0.79	1.51	0.01	0.14	1.38	—	0.05	1.84	0.67	0.37	1.70	4.20	0.14
S18	0.75	1.50	0.01	0.16	1.06	—	0.04	1.87	0.64	0.39	1.69	4.29	0.13

表 3 LDSP 中 13 种活性成分含量比较
Table 3 Comparison on 13 active ingredients of LDSP

制剂	质量分数/(mg·g ⁻¹)												
	泽泻醇 B23 乙酸酯	泽泻醇 B	槲皮素	山柰酚	儿茶素	β-谷甾醇	豆甾醇	薯蓣皂 苷元	花旗松素	亚麻酸 乙酯	羟基萜 花素	常春藤皂 苷元	啤酒甾醇
大蜜丸	1.12	3.48	0.18	6.07	1.62	538.8	0.40	2.53	4.71	2.22	2.32	11.23	1.26
颗粒	1.11	3.35	0.12	3.32	2.46	479.0	0.23	2.76	4.57	2.13	2.41	10.31	1.26
口服液	2.34	4.49	0.03	0.45	3.34	0	0.14	5.53	1.87	1.14	5.05	12.52	0.39
胶囊	1.19	3.34	0.11	3.17	0.67	0	0.22	2.50	4.03	2.22	2.34	10.26	1.16
软胶囊	2.35	4.76	0.00	0.27	0.00	0	0.88	5.37	3.34	0.17	5.02	12.69	0.18
浓缩丸	1.52	3.72	0.07	1.82	1.94	0	0.24	2.50	4.38	2.15	2.47	10.23	1.22

和口服液呈极显著相关 ($P < 0.01$), 上述 4 种制剂和大蜜丸、颗粒呈显著相关 ($P < 0.05$), 结果见表 4; 聚类分析是将数据按距离或相似性分类到不同的类的过程, 本研究按在 LDSP (各 3 批) 中 13 种成分间的含量差异距离进行分类, 不仅仅以某一种或者几种成分的有无进行分类, 采用组间均联法, 选用平方 Euclidean 距离作刻度, 用树状图进行绘制, 将 LDSP 进行系统聚类分析, 该树状图能直观地反映本研究中不同制剂间的分类情况, 见图 8; 采用因子分析法进行主成分分析, 2 个主成分因子的累积方差贡献率为 91.310%, 大蜜丸、颗粒与浓缩丸、

胶囊、软胶囊及口服液被明显区分开, 见图 9、10。主成分、相关性分析及系统聚类分析结果一致, 将 LDSP 分为 2 类, 大蜜丸、颗粒被归为一类, 13 种成分差异相对较小; 浓缩丸、胶囊、软胶囊、口服液被归为一类。主成分、相关性分析及聚类分析可以更全面地评价质量差异。13 种活性成分含量测定结果及 3 种分析结果可得 LDSP 存在质量差异。

由上可知, 结合含量测定、相关性分析及聚类分析结果, 可预测 LDSP 治疗 2 型糖尿病、高血压、肾病综合征治疗效果存在差异, 大蜜丸、颗粒治疗上述疾病的效果可能较其他 4 种制剂好。相同生药量

表 4 LDSP 相关性分析
Table 4 Relevance analysis of LDSP

制剂	Kendall's tau-b 秩相关系数	大蜜丸	浓缩丸	胶囊	软胶囊	颗粒	口服液
大蜜丸	相关系数	1.000	0.513*	0.564**	0.170	0.897**	0.256
	Sig. (双侧)	—	0.015	0.007	0.425	0.000	0.222
	N	13	13	13	13	13	13
浓缩丸	相关系数	0.513*	1.000	0.846**	0.562**	0.513*	0.744**
	Sig. (双侧)	0.015	—	0.000	0.008	0.015	0.000
	N	13	13	13	13	13	13
胶囊	相关系数	0.564**	0.846**	1.000	0.562**	0.564**	0.590**
	Sig. (双侧)	0.007	0.000	—	0.008	0.007	0.005
	N	13	13	13	13	13	13
软胶囊	相关系数	0.170	0.562**	0.562**	1.000	0.170	0.667**
	Sig. (双侧)	0.425	0.008	0.008	—	0.425	0.002
	N	13	13	13	13	13	13
颗粒	相关系数	0.897**	0.513*	0.564**	0.170	1.000	0.308
	Sig. (双侧)	0.000	0.015	0.007	0.425	—	0.143
	N	13	13	13	13	13	13
口服液	相关系数	0.256	0.744**	0.590**	0.667**	0.308	1.000
	Sig. (双侧)	0.222	0.000	0.005	0.002	0.143	—
	N	13	13	13	13	13	13

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

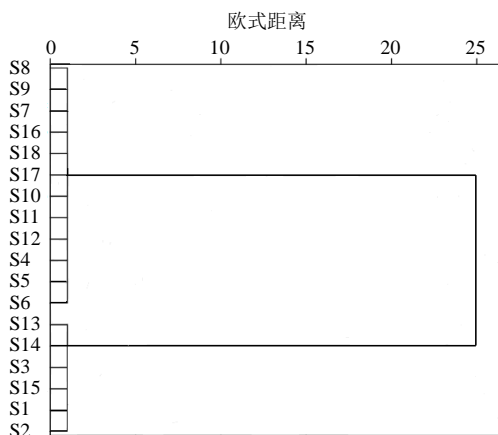


图 8 LDSP 系统聚类分析树状图

Fig. 8 Dendrogram of system cluster analysis on of LDSP

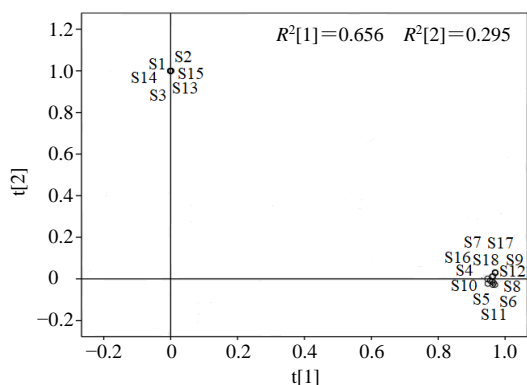


图 9 LDSP 主成分分析散点图

Fig. 9 Scatter plot of LDSP by PCA

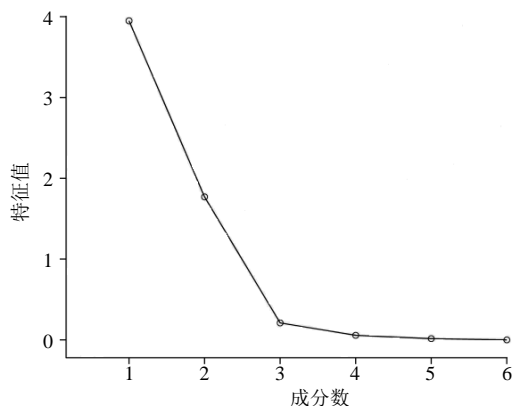


图 10 LDSP 主成分分析碎石图

Fig. 10 Breakstone chart of LDSP by PCA

下, 结合再评价研究结果, 部分已上市的 LDSP 存在一定的质量差异, 可能由于制备工艺、药材来源等不同, 导致物质基础不同。

4 讨论

目前 LDSP 有 827 个批准文号, 临床应用以丸剂居多, 其中丸剂 (主要有大蜜丸、浓缩丸等) 有 653 个批准文号, 胶囊剂 (胶囊、软胶囊) 有 113

个批准文号, 而颗粒有 1 个批准文号, 口服液有 3 个批准文号, 同品种厂家数达 349 家, 对于文号和市售产品多的剂型, 选取公认产品质量较好的企业产品以代表该品种的最高质量水平 (如同仁堂), 而对于文号较少的产品, 则是通过在流通市场上采购相关产品以表征该剂型产品的临床使用情况, 按照《中药新药质量标准研究技术指导原则》(征求意见稿) 的相关要求, 为了保证产品的代表性, 每个企业品种力争取样 3 批, 因此, 样品有一定的代表性。各厂家的 LDSP 虽然都参照《中国药典》所收载该品种的制法, 但各种剂型的制法有较大差异, 有的是原药材直接粉碎, 有的是一部分提取后与原药材混合, 一部分是全浸膏制备。在生产过程中, 参数控制也有异, 导致不同厂家及批次间的质量一致性难以保证, 而质量差异往往直接影响临床疗效。目前各级标准中仅依靠几个指标对 LDSP 进行质量控制, 不足以反映中药多组分、多靶点的特性, 无法对产品的质量进行有效地评价。

LDSP 功能主治为滋阴补肾, 临床应用研究广泛, 临床上 T2DM、高血压及 NS 等疾病多为肾阴亏损所致, 但其药效物质基础不明确、药理作用及机制不明晰, 网络药理学在一定程度上能解决上述问题。本研究以网络药理学为研究手段, 对 LDSP 临床治疗 T2DM、高血压及 NS 的物质基础进行研究筛选, 结合筛选结果及文献数据, 发现目前文献研究多为治疗上述疾病的作用机制研究, 而本研究在此基础上采用 HPLC 法对其中的 13 种指标性成分进行定量分析。结果表明, LDSP 间物质基础在质和量上有较大的差异, 本研究结果在一定程度上揭示 LDSP 说明书中所标示功能主治完全一致的现象可能不合理。

本研究在含量测定方法学考察中根据制剂处方和制备工艺, 按相同生药量取样, 选择代表性的六味地黄丸为探索最佳液相含量测定条件的剂型, 但研究中发现软胶囊所含辅料油脂类对 HPLC 图谱有较大干扰, 故软胶囊应进行脱脂处理; 其他剂型中有的原药材直接粉碎, 有的是一部分提取后与原药材混合, 一部分是全浸膏制备, 因此, 供试液的制备方法有异。同时在被测定的 13 种成分中, 不同的制剂含有的成分和种类不完全相同, 为保证分析方法的准确性, 本研究采用 6 个不同的制剂 (各 1 批) 分别进行方法学考察, 以保证实验结果的准确性, 但本研究方法学考察中只列出 1 批数据进行表

征。含量测定方法学实验还考察提取溶媒为甲醇、乙醇及水和乙腈,发现乙醇、乙腈为提取溶媒,色谱峰出现偏移且检出较少,分离度较差;水为提取溶媒,色谱峰密集且拖尾;考察流动相为甲醇-0.08%磷酸水溶液、甲醇-0.05%磷酸水溶液及甲醇-0.01%磷酸水溶液;提取时间为 30、60、90 min 以及 10 个色谱条件等,综合考虑峰形、峰分离度等因素,最终确定含量测定的供试品溶液的制备方法(提取溶媒为甲醇、提取时间 60 min 等)及色谱条件。

参考文献

- [1] 何伟. 中药上市后证候疗效再评价的研究思路及方法探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2173-2176.
- [2] 汪慧琪, 魏林, 吴伟, 等. 中医药治疗慢性肾功能衰竭的系统评价再评价 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 738-744.
- [3] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [4] 袁彩英, 刘本涛, 黄嘉咏, 等. 网络药理学在中药药效物质筛选和作用机制中的应用 [J]. 广州化工, 2019, 47(20): 20-22.
- [5] 张弛, 马师雷. 基于万方数据知识服务平台的中医药网络药理学论文特征分析 [J]. 现代中医临床, 2019, 26(5): 51-55.
- [6] 马清林, 杜丽东, 臧凯宏, 等. 网络药理学在复方中药研究中的应用及其存在的问题 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(26): 21-24.
- [7] 陶嘉磊, 汪受传, 陈彦臻, 等. 中药复方网络药理学研究述评 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 3903-3907.
- [8] 刘涛, 苟小军, 郭晓恒, 等. 基于中成药工艺与质量控制的再评价模式商建 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1873-1877.
- [9] 王琼琼. 糖尿病肾病的中医辨治经验 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(29): 21, 32.
- [10] 赵英杰. 卡托普利联合厄贝沙坦治疗肾实质性高血压患者的临床疗效 [J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2019, 16(5): 13-16.
- [11] 王军. 联用复方丹参注射液、参芪降糖片和六味地黄丸治疗糖尿病临床研究 [J]. 光明中医, 2019, 34(23): 3539-3541.
- [12] 郑文彬. 六味地黄软胶囊在消渴病(肾阴虚证)治疗中的临床应用研究 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(28): 104-106.
- [13] 李曼, 于博. 六味地黄软胶囊治疗肾阴虚型高血压病的临床研究 [J]. 光明中医, 2019, 34(20): 3132-3134.
- [14] 元铸刚. 六味地黄丸治疗糖尿病肾阴虚证的临床分析 [J]. 糖尿病新世界, 2019, 22(6): 93-94.
- [15] 许绍芳. 六味地黄丸对肾病综合征激素治疗者副作用的影响 [J]. 北方药学, 2017, 14(12): 51.
- [16] 封亮, 贾晓斌, 李长春, 等. HPLC 同时测定六味地黄浓缩丸中 4 种主要成分的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 59-61.
- [17] 周海, 吴晓玲, 林明欣, 等. 基于网络药理学探讨加味桃核承气汤防治糖尿病肾病的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 176-186.
- [18] 张晶, 李冰冰, 黄敏仪, 等. 基于网络药理学的参芪降糖颗粒治疗 2 型糖尿病机制探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4873-4883.
- [19] Wang Y, Liu Z, Li C, *et al.* Drug target prediction based on the herbs components: The study on the multitargets pharmacological mechanism of Qishenkeli acting on the coronary heart disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi:10.1155/2012/698531.
- [20] 刘培, 孙芮芮, 张莉丹, 等. 基于网络药理学的四君子汤治疗 2 型糖尿病的作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1548-1558.
- [21] 邱伊星. 六味地黄丸及其相关制剂的指纹图谱质量控制方法研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [22] 余琰, 姜晔, 郭玫, 等. 六味调更汤治疗更年期 II 型糖尿病的网络药理学机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(4): 448-454.
- [23] 裴媛, 王瑞, 周贺伟. 罗布麻治疗高血压作用机制的网络药理学研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1997-2001.
- [24] 张新雨, 黄娜娜, 孙凯滨, 等. 柴胡龙骨牡蛎汤治疗原发性高血压作用网络与机制预测 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5162-5169.