

麻黄饮片等级质量标准研究*

毛睿, 刘亚男, 李丽红, 田盼, 王迎, 窦志英, 王飘
(天津中医药大学, 天津 301617)

摘要:[目的]以31批麻黄饮片为研究对象,采用高效液相色谱(HPLC)结合化学计量学的方法初步建立麻黄饮片的等级质量标准。[方法]依照《中华人民共和国药典》对31批次麻黄饮片的浸出物、灰分、水分进行检测;采用HPLC测定31批麻黄饮片中麻黄碱和伪麻黄碱的含量;通过建立主成分分析(PCA)、聚类分析(CA)和偏最小二判别分析(PLS-DA)多种化学模式识别模型对麻黄进行等级分类研究。[结果]31批麻黄饮片的水溶性浸出物含量在13.05%~28.11%;总灰分为5.84%~8.94%;平均含水量为3.75%。麻黄碱及伪麻黄碱含量为1.21%~3.35%。[结论]该实验初步将麻黄饮片分为优等、统货两个等级,为其他中药饮片数据化和标准化研究提供新思路。

关键词:麻黄;等级质量评价;化学计量学;HPLC

中图分类号:R285.6

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2019)03-0274-05

麻黄为麻黄科植物草麻黄(*Ephedra sinica* Stapf)中麻黄(*Ephedra intermedia* Schrenk et C.A.Mey.)或木贼麻黄(*Ephedra equisetina* Bye.)的干燥草质茎,是一种常用中药,其性温,味辛、微苦,具有发汗解表、宣肺平喘、利水消肿的功能^[1]。首载于《神农本草经》:“主中风,伤寒头痛,温疟,发表出汗,去邪热气,止咳逆上气,除寒热,破症坚积聚。”^[2-3]麻黄的化学成分复杂,含有生物碱类、黄酮类、挥发油、有机酚酸、糖类及鞣质、单萜糖苷类、木脂素类等多种化学成分^[4-5],药理作用丰富^[6-7]。2015年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)规定以盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总质量分数不得少于0.80%作为麻黄质量控制的标准,而麻黄有诸多功效,且其量有限,导致市场混乱。

本研究共收集31个批次的麻黄饮片,依照《中国药典》进行浸出物、灰分、水分检测;采用HPLC测定31批麻黄饮片中麻黄碱和伪麻黄碱的含量;运用化学计量学,即利用计算机系统和相应的程序分析采集到的药材及饮片的总成分提取物的光谱、色谱数据以及某些经量化后的指标,获取用于中药材分析鉴别的有用信息,运用计算机代替人力对中

药材进行分类和鉴别真伪。近年来CA、PCA及PLS-DA已广泛应用于中药质量评价^[8-11]。建立两种无监督的化学模式识别方法:CA、PCA以及一种有监督的化学模式识别方法PLS-DA对麻黄饮片质量进行整体分析,初步阐述了麻黄饮片的质量等级分类标准,对临床安全用药及制剂、调剂都具有重要的意义。

1 实验材料与仪器

1.1 实验仪器 HPLC 高效(岛津 LC-2010AHT, LC solution 工作站),超声波清洗器 KQ-250E(昆山市超声仪器有限公司),数显恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司),FA2004 电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),FW100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 实验材料 采集中国31个不同厂家批次的麻黄饮片,经天津中医药大学中药学院李天祥教授鉴定均为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf. 的干燥草质茎,详见表1。乙腈为色谱纯(SIGMA-ALORICH),水为娃哈哈纯净水,磷酸及三乙胺购自天津市化学试剂供销公司,麻黄碱对照品(No.171241-201508)、伪麻黄碱对照品(No.171237-2015010)购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 含水量、总灰分及水溶性浸出物的含量测定 按2015年版《中国药典》通则0832项下水分测定中烘干法、通则2201项下冷浸法中水溶性浸出物

* 基金项目:国家中医药管理局国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-TJ-43)。

作者简介:毛睿(1994-),女,硕士研究生,研究方向为中药成分研究及质量控制。

通讯作者:刘亚男, E-mail: tianyanan2007@163.com。

表1 实验麻黄饮片

序号	产地	批号	序号	产地	批号
S1	内蒙	201611010	S17	内蒙	D201610061
S2	内蒙	201611011	S18	内蒙	D201610015
S3	内蒙	201611012	S19	内蒙	1003
S4	内蒙	201611013	S20	内蒙	1004
S5	内蒙	2016090303	S21	内蒙	1005
S6	内蒙	C101703070	S22	内蒙	1006
S7	内蒙	20160830	S23	内蒙	1007
S8	内蒙	20160812	S24	内蒙	1008
S9	内蒙	X201715101907	S25	内蒙	0914
S10	内蒙	2017010207	S26	内蒙	0987
S11	内蒙	20170301931	S27	内蒙	MH-28
S12	内蒙	20161210	S28	内蒙	MH-35
S13	内蒙	2016063003	S29	内蒙	MH-32
S14	内蒙	201702077	S30	内蒙	MH-27
S15	内蒙	201702010	S31	内蒙	MH-29
S16	内蒙	201706087			

测定法、通则 2302 项下总灰分测定法测定。31 批麻黄饮片含水量范围为 2.36%~5.33%；浸出物含量范围 13.05%~28.11%；灰分含量范围为 5.84%~8.94%，均符合 2015 年版《中国药典》的要求。

2.2 麻黄碱与伪麻黄碱含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱条件的选择,对《中国药典》2015 年版 1 部的规定中麻黄药材的色谱条件进行优化,文献记录研究者采用乙腈:0.1%磷酸水溶液(3:97)为流动相,测定麻黄碱与伪麻黄碱,分离度良好。通过实践发现,流动相中加入 0.1%的三乙胺,可以将麻黄碱、伪麻黄碱完全分离,且分离度良好。本实验采用色谱条件如下:色谱柱:Kromasil C₁₈ 柱 250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 流动相:0.1%磷酸溶液(0.1%三乙胺)(A)-乙腈(B)=96:4, 等度洗脱, 流速:

1 mL/min, 柱温:25 ℃, 检测波长:210 nm, 进样量 10 μL。麻黄药材及标准品 HPLC 色谱图见图 1, 分离效果很好。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸麻黄碱对照品、盐酸伪麻黄碱对照品适量于 100 mL 容量瓶, 加甲醇制得麻黄碱 42 μg/mL、伪麻黄碱 38 μg/mL 的混合对照品溶液。

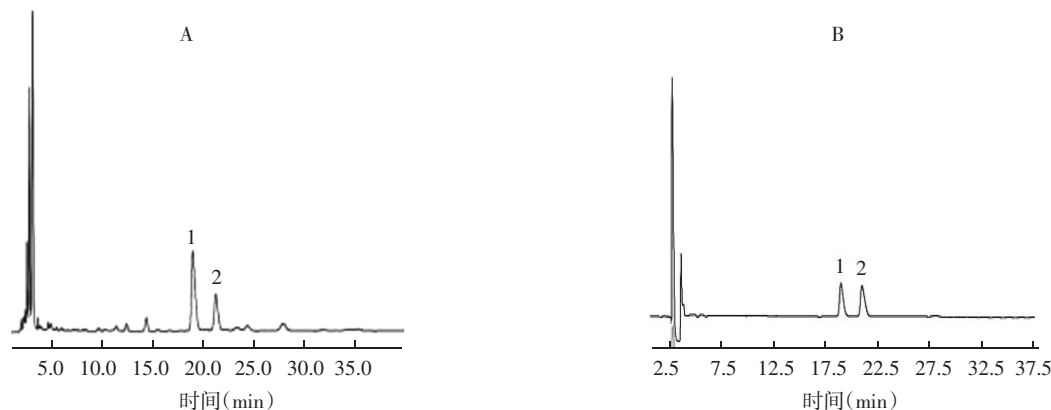
2.2.3 供试品溶液的制备 取本品细粉约 0.500 0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 1.44%磷酸溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 600 W, 频率 50 kHz)20 min, 放冷, 再称定质量, 用 1.44%磷酸溶液补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 分别精密移取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱储备液适量, 用甲醇稀释一系列浓度的对照品溶液, 盐酸麻黄碱的浓度分别为, 盐酸伪麻黄碱的浓度分别为, 进样量 10 μL, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标(\hat{Y}), 质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 盐酸麻黄碱的线性方程为 $\hat{Y}=530\ 3761.71X-468\ 444\ 5.67$, 线性范围在 50~1 210 μg/mL, $r=0.999\ 9$; 盐酸伪麻黄碱的线性方程为 $\hat{Y}=16\ 169\ 601.74X+104\ 113\ 9.70$, 线性范围在 40~960 μg/mL, $r=0.999\ 9$ 。

2.3.2 精密度实验 取“2.2.2”项下混标溶液, 在“2.2.1”项下色谱条件下, 连续进样 6 针, 记录麻黄碱与伪麻黄碱的峰面积并计算 RSD 值。麻黄碱、伪麻黄碱 RSD 值分别为 0.29%、0.62%。表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性实验 取同一供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件在 0、2、4、8、12 h 分别进样, 进样 10 μL, 记录峰面积并计算 RSD 值。麻黄碱与伪麻黄碱 RSD 值分别为 2.14%、1.87%。表明样品溶液在室温



1:麻黄碱;2:伪麻黄碱。

图1 麻黄药材(A)和标准品(B)HPLC 色谱图

条件下 12 h 内稳定。

2.3.4 重复性实验 精密称取同一个样品 6 份,按“2.2.3”提取处理方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积,计算各对照品的质量分数,结果显示麻黄碱与伪麻黄碱 RSD 值分别为 2.17%、2.15%,表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率实验 精密称取已知含量的麻黄饮片粉末 9 份,每份 0.25 g,按照表加入对照品溶液。按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分析,结果见表 2。

2.3.6 将 31 批样品按“2.3.3”提取处理方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项下色谱条件进行分析,测定峰面积,计算含量,结果见表 3。

2.4 数据分析

2.4.1 无监督化学模式识别 运用 SPSS 19.0 软件对 31 批麻黄饮片进行系统聚类分析。本研究以其水分、灰分、浸出物、麻黄碱含量、伪麻黄碱含量和总含量为指标,采用组间连接法,利用欧式距离作为样品的测度,对数据进行分析,结果见图 4。本次系统聚类分析可分为两大类:S12、S13、S14、S15、S6、S30、S31 分为一类,剩余为另一类,与 PCA、PLS-DA 分类一致,且 S12、S13、S14、S15、S6、S30、S31 麻黄饮片质量均一,麻黄碱、伪麻黄碱总含量较高。

将 31 批麻黄饮片的水分、灰分、浸出物、麻黄碱含量、伪麻黄碱含量和两者总含量为分析变量,导入 SIMCA-P 11.5 统计软件进行主成分分析,主成份分析法作为数据挖掘的一种方法,将高维空间的问题转化到低维空间处理,在不损失或较少损失原有指标信息特征的情况下,将多个具有相关性的指标转换成少数几个相互独立的综合指标(即主成分),从而使繁多的求解目标简化^[2],见图 2。采用主成份分析来描述生麻黄饮片质量的分布情况,根据特征值获取的结果两个主成份的累积贡献率达到了 98.0%,其中 PC1(即麻黄碱与伪麻黄碱总含量)贡献率达到了 71.2%,为分类中的关键因素,能反映大部分质量信息。交叉验证系数为 0.766,说明模型预测能力合理,见图 3。主成份分析分析结果表明,麻黄饮片可分为两类。

主成份分析与聚类分析过程中能自动生成各主成份的权重,在很大程度上避免了人为因素在评价过程中的干扰;主成份分析能够找到隐藏在众多共性下的差异,对提取的数据进行客观充分的多元分析,因此两者能较好地保证评价结果的客观性。

2.4.2 有监督化学模式识别 偏最小二乘法判别分析,是判别分析的多变量统计分析方法。判别分析是一种根据观察或测量到的若干变量值,来判断研究对象如何分类的常用统计分析方法。其原理是

表 2 加样回收率实验结果

成分	质量比(%)	样品中含量(mg/g)	加入对照品量(mg/g)	测得量(mg/g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
麻黄碱	80	0.315	0.258	0.577	102	101	0.01
		0.317	0.258	0.575	100		
		0.318	0.258	0.576	100		
	100	0.317	0.315	0.643	103	104	0.01
		0.315	0.315	0.644	104		
		0.320	0.315	0.644	103		
	120	0.319	0.370	0.690	100	100	0.01
		0.317	0.370	0.688	100		
		0.320	0.370	0.685	99		
伪麻黄碱	80	0.223	0.179	0.407	103	103	0.02
		0.224	0.179	0.411	104		
		0.225	0.179	0.406	101		
	100	0.224	0.224	0.453	102	101	0.01
		0.222	0.224	0.446	100		
		0.226	0.224	0.455	102		
	120	0.225	0.268	0.499	102	102	0.01
		0.224	0.268	0.500	103		
		0.226	0.268	0.500	102		

表3 31批麻黄饮片中麻黄碱与伪麻黄碱浸出物、水分、总灰分、麻黄碱、伪麻黄碱含量测定结果(n=6) %

序号	浸出物	水分	灰分	麻黄碱	伪麻黄碱
S1	19.66	3.67	8.20	1.40	1.21
S2	17.80	3.81	8.27	0.75	1.24
S3	18.98	3.80	8.12	0.84	0.69
S4	19.02	3.29	8.25	0.62	0.82
S5	28.11	4.14	6.55	1.04	0.70
S6	17.03	4.75	8.25	1.25	0.89
S7	15.45	4.23	8.24	0.72	0.63
S8	17.21	4.27	8.12	0.93	0.61
S9	15.76	4.90	8.30	0.84	0.55
S10	18.33	3.28	8.66	0.79	0.65
S11	22.59	2.97	5.84	0.87	0.46
S12	19.50	4.22	7.74	1.04	0.72
S13	18.25	4.28	7.30	1.25	1.16
S14	20.61	4.94	7.60	0.72	0.50
S15	21.13	3.41	7.10	1.43	1.33
S16	19.26	2.93	8.53	1.27	1.36
S17	13.66	4.89	8.01	1.15	1.41
S18	13.83	4.50	7.73	0.72	1.39
S19	13.05	4.25	6.29	1.29	1.11
S20	13.55	3.57	8.04	1.28	1.80
S21	13.17	5.33	8.33	1.30	0.95
S22	13.94	4.47	8.56	1.05	0.23
S23	12.69	4.31	8.60	1.53	0.99
S24	13.96	4.11	8.77	1.50	0.85
S25	13.64	2.68	8.91	1.36	0.82
S26	17.25	2.70	8.94	1.90	1.00
S27	18.97	2.36	8.73	1.51	1.05
S28	17.30	2.50	7.99	2.34	1.01
S29	16.21	2.71	7.88	1.34	1.20
S30	19.94	2.42	8.23	1.55	0.83
S31	13.10	2.50	8.88	1.40	1.21

对不同处理样本(如观测样本、对照样本)的特性分别进行训练,产生训练集,并检验训练集的可信度。本研究将31批麻黄饮片的水分、灰分、浸出物、麻黄碱含量、伪麻黄碱含量和两者总含量为分析变量,导入SIMCA-P 11.5统计软件进行偏最小二乘回归的计算,建立有监督的模式识别模型偏最小二乘法判别分析,根据软件自动拟合31批麻黄饮片的质量信息,将31批麻黄饮片分为两类,可验证主成份分析结果,得散点图4,本实验所拟合的模型解释能力参数 $R^2X=0.705$, $R^2Y=0.809$,预测能力参数 $Q=0.788$,表示所建模型稳定、合理。故由以上实验结果可将麻黄饮片分为两个等级。

3 讨论与结论

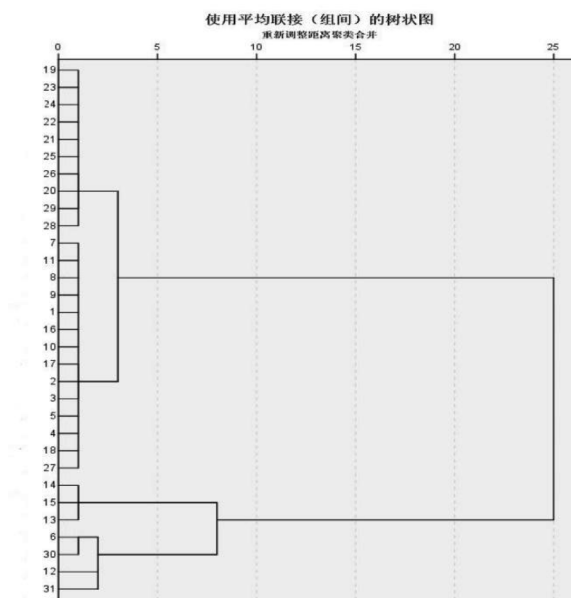


图2 31批麻黄饮片聚类图

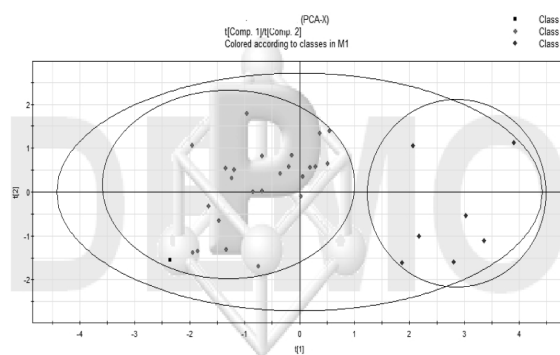


图3 31批麻黄饮片主成份分析分析图

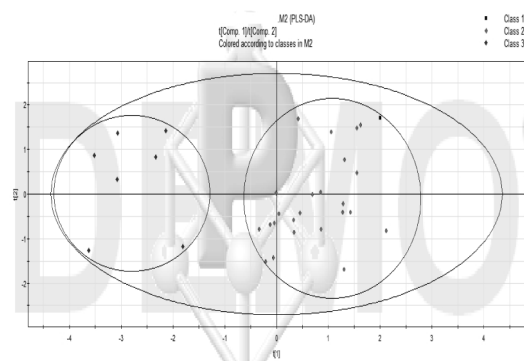


图4 31批麻黄饮片偏最小二乘法回归分析结果

本研究共收集了31批麻黄饮片,建立优化的HPLC含量测定条件,增加水溶性浸出物作为检测指标,并依据2015年版《中国药典》进行了水分、灰分以及水溶性浸出物含量测定,初步评价了麻黄饮片的质量。但目前《中国药典》仅规定了药材的合格标准,而优质的中药饮片是生产优质中成药的必要

条件,因此,制定药材的等级标准势在必行。研究采用两种无监督的化学模式识别模型将麻黄饮片分为两类,由主成份分析给出麻黄碱与伪麻黄碱总含量为优质分类的关键因素,且水分、灰分、浸出物受人为影响较大,故本实验以麻黄碱与伪麻黄碱的总含量为分级标准将31批麻黄饮片分为两个等级,优等:麻黄碱及伪麻黄碱总含量 $\geq 2.6\%$;统货:麻黄碱及伪麻黄碱总含量在 $0.8\% \sim 2.6\%$ 。并利用偏最小二乘法判别分析进一步验证,以科学、客观的质量评价标准,取代以往仅凭外观、经验等主观的质量评价方法,对于有效监控饮片质量具有现实意义^[13]。本实验只对麻黄中草麻黄的麻黄饮片进行了研究,拟定的各项指标限量在蜜炙麻黄以及木贼麻黄和中麻黄中有待进一步研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
[2] 杨继荣,王艳宏,关枫.麻黄本草考证概览[J].中医药学报,2010,38(2):51-52.
[3] 陈利平,孙志高,王发渭,等.麻黄临床功用探悉[J].中华中医药学刊,2012,30(7):1576-1578.
[4] 周玲,吴德康,唐于平,等.麻黄中化学成分研究进展[J].南京中医药大学学报,2008,24(1):71-72,74

[5] 赵巍.草麻黄化学成分研究[D].北京:中国协和医科大学,2009.
[6] 丁丽丽,施松善,崔健,等.麻黄化学成分与药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(20):1661-1664.
[7] 范彦博.麻黄中非生物碱类成分活性研究[D].武汉:湖北中医药大学,2010.
[8] 郝燕,董鸿晔,姜楠,等.基于主成分分析的中药色谱指纹图谱多维多息特征数据挖掘方法研究[J].中中药学,2007,5(3):267-272.
[9] 戴晓燕,盛振华,郝云云,等.不同产地大黄中微量元素含量的主成分分析及聚类分析[J].中华中医药杂志,2012,27(5):1445-1448.
[10] Isabella E, Flavia G, Marit R, et al. Interpretation, validation and segmentation of preference mapping models [J]. Food Quality and Preference, 2014, 32:302.
[11] 窦婷,欧阳慧子,王兴蕊,等. HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中麻黄碱、伪麻黄碱浓度及药动学研究[J]. 天津中医药大学学报,2014,33(6):355-358.
[12] 陈军辉,谢明勇,王凤美,等.聚类分析法用于西洋参样品分类研究[J].分析测试学报,2006,25(2):20-24,28
[13] 覃洁萍,王智猛,李梦龙.化学计量学方法在中药鉴别及质量控制方面的应用[J].数理医药学杂志,2004,17(4):351-355.

(收稿日期:2019-01-20)

Study on the grade quality standard of Ephedra Sinica

MAO Rui, LIU Yanan, LI Lihong, TIAN Pan, WANG Ying, DOU Zhiying, WANG Piao
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Abstract: [Objective] Study on 31 batches of Ephedra Sinica. The quality standard of Ephedra Sinica tablets was established by High-performance liquid chromatography (HPLC) combined with chemometrics method. **[Methods]** According to the Chinese Pharmacopoeia, the extracts, ash and moisture of 31 batches of Ephedra Sinica Yinpian were tested; determination of ephedrine and pseudoephedrine in 31 batches of Ephedra Sinica Yinpian; grade classification study on Ephedra Sinica by establishing chemical composition identification model (PCA), cluster analysis (CA) and partial least two discriminant analysis (PLS-DA). **[Results]** The moisture diffuse content of 31 batches of Ephedra tablets was 13.05% -28.11%; the total ash was 5.84% -8.94%; the average water content was 3.75%. The content of ephedrine and pseudoephedrine was 1.21% -3.35%. **[Conclusion]** This experiment initially divided the Mahuang decoction into two grades, namely, superior and unified goods. Chinese Herbal Medicine and other standardized data WH study provides a new idea.

Key words: Ephedra; grade quality evaluation; stoichiometrically science; HPLC