

# 基于指纹图谱结合多指标成分定量 用于麻黄汤的质量评价

黄英兰 杨芳

(南方医科大学南方医院药剂科, 广州, 510515)

**摘要** 目的:分析和评价指纹图谱和多指标成分定量结合用于麻黄汤主要成分的定量和质量。方法:采用线性范围试验和加样回收率实验考察高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱分析方法的严谨性,由2个厂家各提供6个不同批次麻黄汤药材,共12批次,以盐酸麻黄碱对照品、桂皮醛对照品、苦杏仁苷对照品、甘草酸对照品,多指标成分定量HPLC测定,分别计算各批次麻黄汤中这4种成分的含量;同时进行指纹图谱HPLC分析评价麻黄汤的质量。结果:麻黄汤中的有效成分盐酸麻黄碱、桂皮醛、苦杏仁苷、甘草酸在各自浓度范围内的线性关系良好,且这4种成分的平均回收率分别是100.0%、100.1%、99.39%、99.04%,RSD分别是1.7%、1.3%、1.1%、0.99%。D厂中的麻黄汤药材样品质量波动较大,相似度较低,而B厂中麻黄汤药材质量波动较小,相似度较高,一致性较好。结论:麻黄汤的主要成分是盐酸麻黄碱、桂皮醛、苦杏仁苷和甘草酸,B厂麻黄汤的药材质量优于D厂。

**关键词** 指纹图谱;成分;定量;麻黄汤;质量评价

## Quantitative Evaluation of Mahuang Decoction Based on Fingerprint and Multi Index Components

Huang Yinglan<sup>1</sup>, Yang Fang<sup>2</sup>

(Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract Objective:** To analyze the quantitative and qualitative evaluation of the main components of Mahuang Decoction by quantitative analysis of fingerprint and multi index components. **Methods:** The linear range test and recovery test were used on high performance liquid chromatography (HPLC) analysis method for the rigor of the fingerprint. Two manufacturers provided 6 different batches of Mahuang Decoction, with a total of 12 batches, and with ephedrine hydrochloride, cinnamaldehyde, bitter apricot kernel, licorice glycoside reference acid as control products. Quantitative determination of HPLC content in the 4 components of each batch in Mahuang Decoction was calculated; at the same time, fingerprint HPLC was used to evaluate the quality of Mahuang Decoction. **Results:** 1) In Mahuang Decoction, the effective ingredients including ephedrine, cinnamaldehyde, amygdalin and glycyrrhizic acid had good linear relationship within the scope of concentration was good, and the average recovery rate of 4 components were 100%, 100.1%, 99.39%, 99.04%, with RSD of 1.7%, 1.3%, 1.1%, 0.99%. 2) The quality fluctuation of Mahuang Decoction samples from D manufactures was larger and the similarity was lower, while the quality fluctuation was lower, with high similarity and good consistency in B manufacture. **Conclusion:** The main components of Mahuang Decoction are ephedrine hydrochloride, cinnamic aldehyde, amygdalin and glycyrrhizic acid. The quality of Mahuang Decoction of B manufacture was better than that of D manufacture.

**Key Words** Fingerprint; Quantitative analysis; Mahuang Decoction; Quality evaluation

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.052

麻黄汤出自医圣张仲景《伤寒论》,由麻黄、桂枝、杏仁、甘草4味药组合而成,主治外感风寒表实证,症见恶寒发热,头痛身疼,无汗而喘。现代药理学实验研究显示,麻黄汤具有抗流行性感、急性支气管炎、支气管哮喘的功效,具有明显消炎抗菌作用<sup>[1-6]</sup>。国内外诸多医家经过长期临床实践发现,疗

效确切。该药方化学成分较为复杂,指纹图谱技术可从整体上综合分析汤方的化学物质内涵,是目前国际公认的控制中药质量的质控标准模式<sup>[7-10]</sup>,我们利用高效液相色谱法(HPLC)技术全面分析麻黄汤的化学物质信息,以期中药汤剂使用提供客观依据,现报道如下。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪;精密电子秤(苏州奇乐电子科技有限公司,型号:FA2004C)。

1.2 试剂 购于中国食品药品生物制品鉴定院的桂皮醛对照品(批号:111595-200604)、苦杏仁苷对照品(批号:110777-200406)、甘草酸对照品(批号:110752-20012)、盐酸麻黄碱对照品(批号:110738-2000501)。

1.3 分析样品 麻黄汤采用《伤寒论》中配伍比例3:2:2:1,麻黄药用部位为麻黄科植物草麻黄的干燥草质茎,桂枝药用部分为樟科植物肉桂的干燥嫩枝,杏仁药用部分为蔷薇科植物山杏的干燥成熟种子,甘草药用部分为豆科植物甘草的干燥根和根茎。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 精密量取 20  $\mu\text{L}$  的样品进样量或对照品溶液,采用 250 mm  $\times$  4.6 mm, 4  $\mu\text{m}$  的色谱柱(Agilent ZORBAX XDB-C<sub>18</sub>柱),在乙腈和 0.1% 磷酸的流动相中,流速为 1 mL/min,柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,根据高效液相色谱(HPLC)(Agilent 1100 型高效液相色谱仪)多指标成分定量测定色谱条件和指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验。见表 1、表 2。

表 1 多指标成分定量测定的色谱条件

时间 (min)	流动相乙腈 (%)	流动相 0.1% 磷酸 (%)	波长 (nm)
0.01	7	93	250
5.00	7	93	
20.00	11	89	
23.00	15	85	
30.00	17	83	270
35.00	33	77	
48.00	33	77	290
50.00	48	52	
50.5.0	48	52	278
51.00	85	15	
59.00	85	15	
64.00	90	10	
70.00	7	93	
80.00	7	93	

2.2 对照品溶液制备 精密称取购于中国食品药品生物制品鉴定院的桂皮醛对照品(批号:111595-200604)36.29 mg、苦杏仁苷对照品(批号:110777-200406)12.5 mg、甘草酸对照品(批号:110752-20012)14.45 mg、盐酸麻黄碱对照品(批号:110738-2000501)9.82 mg,分别定溶于甲醇中待用;再各取 2 mL 加甲醇配置混合对照品溶液,终浓度为 0.1132 mg/mL。

表 2 HPLC 指纹图谱梯度洗脱程序(检测波长为 278 nm)

时间(min)	流动相乙腈(%)	流动相 0.1% 磷酸(%)
0.01	7	93
5.00	7	93
20.00	11	89
23.00	15	85
30.00	17	83
35.00	33	77
50.00	48	52
51.00	85	15
59.00	85	15
64.00	90	10
70.00	7	93
80.00	7	93

2.3 供试品溶液制备 麻黄药用部位为麻黄科植物草麻黄的干燥草质茎,桂枝药用部分为樟科植物肉桂的干燥嫩枝,杏仁药用部分为蔷薇科植物山杏的干燥成熟种子,甘草药用部分为豆科植物甘草的干燥根和根茎,麻黄汤采用《伤寒论》中配伍比例3:2:2:1,采用回流法煎煮,于敞口药盆中称取 9 g 麻黄,加 400 mL 水,浸泡 30 min,煮沸后文火 45 min,去沫减 200 mL 再加入 6 g 桂枝和杏仁、3 g 甘草取煮沸文火 20 min,取 100 mL 药液,在 60  $^{\circ}\text{C}$  下减压浓缩,定容至 50 mL,折合麻黄汤浓度未 0.4 g/mL。取 5 mL 柴胡黄芩浓缩液用 100% 甲醇定容 10 mL,混合均匀,取 2 mL 离心取上清液在 0.45  $\mu\text{m}$  超微膜滤过即可。

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据 2.3 制备的供试品溶液,采用薄层层析的方法对麻黄汤进行专属性试验,结果显示专属性良好。

2.5 线性关系考察 根据 1.1 制备的对照品溶液,精密取 0.1  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ,分别编号 1-7 并连续进样,以峰面积为 Y 轴,5  $\mu\text{L}$  进样浓度为 X 轴,绘制标准曲线,并根据对照品的回归方程计算各有效成分在各自浓度范围内的线性关系。

2.6 中间精密度试验 精密吸取 10  $\mu\text{L}$  同一供试品溶液,连续进样 5 次,结果显示相对标注偏差 RSD 是 0.92%,精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 精密吸取 10  $\mu\text{L}$  同一供试品溶液,配置后分别放置 0、2、4、8、16、24、48 h 后进样检测,结果显示 48 h 内供试品溶液基本稳定,RSD 是 0.95%。

2.8 重复性试验 精密吸取 10  $\mu\text{L}$  同一供试品溶液,在相同色谱条件,相同液相分析仪上检测 5 次,结果显示标准偏差 RSD 为 0.89%,重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取6份同一供试品溶液根据1.1制备的供试品溶液,编号A-F并分别加入盐酸麻黄碱对照品、桂皮醛对照品、苦杏仁苷对照品、甘草酸对照品,计算各有效成分在HPLC中的加样回收率。

麻黄汤中的有效成分盐酸麻黄碱、桂皮醛、苦杏仁苷、甘草酸在各自浓度范围内的线性关系良好,且这4中成分的平均回收率分别是100.0%、100.1%、99.39%、99.04%,RSD分别是1.7%、1.3%、1.1%、0.99%。见表3、表4。

表3 麻黄汤有效成分线性测定结果

编号	峰面积平均值			
	盐酸麻黄碱	桂皮醛	苦杏仁苷	甘草酸
1	51 994	17 908	14 520	9 335
2	246 286	83 309	72 893	43 548
3	48 774	162 685	143 368	83 820
4	972 581	325 340	285 153	168 487
5	241 534	805 352	716 141	416 112
6	4 720 371	1 561 469	1 405 901	811 736
7	9 127 424	3 049 453	2 841 003	1 614 898

表4 麻黄汤有效成分加样回收率结果

编号	回收率(%)			
	盐酸麻黄碱	桂皮醛	苦杏仁苷	甘草酸
A	100.1	99.89	98.57	99.68
B	99.09	100.6	100.0	99.20
C	101.0	98.95	101.0	98.13
D	98.82	101.0	99.07	99.11
E	99.90	99.55	99.83	99.65
F	101.3	100.8	97.97	98.47
平均回收率(%)	100.0	100.1	99.39	99.04
RSD(%)	1.7	1.3	1.1	0.99

2.10 样品测定结果

2.10.1 多指标成分定量 东莞仁济大药房(简称D厂)提供6个不同批次麻黄汤药材,根据1.1制备供试品溶液,分别编号S1、S2……S6中国北京同仁堂(集团)有限责任公司(简称B厂)提供6个不同批次麻黄汤药材,根据1.1制备供试品溶液,分别编号S7、S8……S12,根据1.2中表1的色谱条件,以盐酸麻黄碱对照品、桂皮醛对照品、苦杏仁苷对照品、甘草酸对照品,分别计算各批次麻黄汤中这4种成分的含量。

12批麻黄汤HPLC多指标成分定量分析各批次麻黄汤中的主要成分是盐酸麻黄碱、桂皮醛、苦杏仁苷、甘草酸和其定量分析结果。见图1、表5。

2.10.2 指纹图谱 同上12个批次麻黄汤药材,制备成供试品溶液后精密吸取5 μL,根据1.2中表2

的色谱条件依次测定并记录12批麻黄汤的色谱图。

根据《中药指纹图谱相似度评价系统2004A》中相似度的评价方法,选用夹角余弦法,由图2、3显示D厂中的麻黄汤药材样品质量波动较大,相似度较低,而B厂中麻黄汤药材质量波动较小,相似度较高,一致性较好。

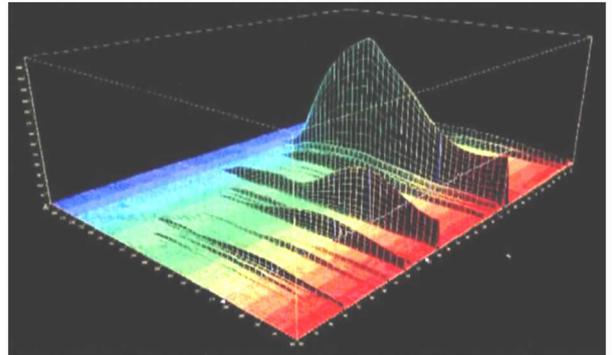


图1 麻黄汤HPLC的3D谱图

表5 麻黄汤样品含量测定结果(mg/g)

样品	盐酸麻黄碱	桂皮醛	苦杏仁苷	甘草酸
S1	8.283	0.8566	0.6286	0.1848
S2	6.786	0.8963	0.6128	0.2013
S3	4.487	0.5038	0.4814	0.1174
S4	3.475	0.7588	0.4797	0.1168
S5	6.986	0.8483	0.6024	0.1534
S6	7.981	0.8264	0.5933	0.2010
S7	8.277	0.9135	0.5894	0.2140
S8	7.345	0.9255	0.6109	0.1987
S9	7.568	0.9227	0.6308	0.1685
S10	8.055	0.8415	0.5997	0.1579
S11	7.134	0.8569	0.6114	0.2009
S12	8.069	0.9012	0.589	0.2171

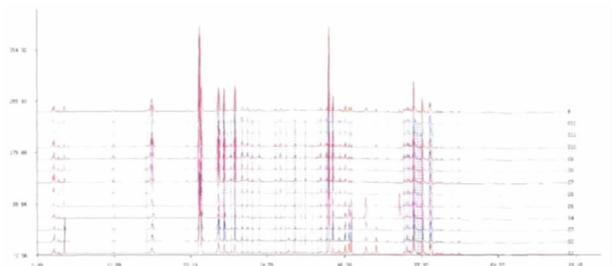


图2 12批麻黄汤HPLC指纹图谱

3 讨论

本研究利用梯度洗脱方法对麻黄汤中标志性指标盐酸麻黄碱、桂皮醛、苦杏仁苷、甘草酸进行含量测定,并对12批次的麻黄汤药材进行含量测定。在流动相选择时本团队曾经尝试使用流动相相同梯度方法进行洗脱,结果存在部分峰拖尾严重的现象,而曾经我们亦尝试使用乙腈与0.1%甲酸、乙腈与0.1%乙酸为流动相用相同梯度进行洗脱,结果发现

基线无法实现平稳,我们认为产生这一结果的原因可能与甲酸、乙酸在 270 nm 出现吸收现象有关。最终研究中我们将乙腈及 0.1% 磷酸最终设定为流动相的成分,结果显示此流动相设置下所得的图谱基线具有明显平稳性,且波峰结果理想,分离效果理想,保留时间适中。

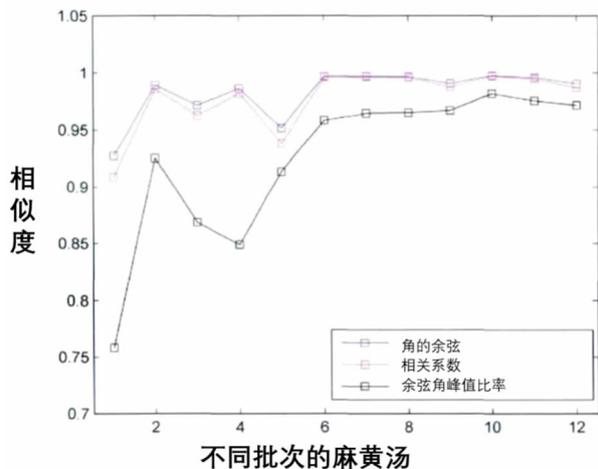


图3 12批不同批次的麻黄汤指纹图谱的相似度结果

在所选择的色谱柱条件下我们发现各成分分离度高,色谱峰尖锐,分离时间亦理想,实验结果充分可靠。该研究采用各地的不同批次进行指纹图谱检查分析,结果显示不同批次的图谱结果基本一致,在相似度检测中各批药材的相似度尚可,这说明经过国家药物质量监督部分的努力,现中药药材市场上的药材质量较前明显改善。我们采用最大吸收波长作为不同有效成分的检测指标,此类方法不但减少了实验误差,且可提高检测灵敏度。

本研究我们将2个厂家的12批次药材的指纹图谱利用MATLAB软件进行主要成分统计,结果发现D厂中的麻黄汤药材样品质量波动较大,相似度较低,而B厂中麻黄汤药材质量波动较小,相似度较高,一致性较好。说明不同厂家药材化学成分存在一定差异,我们认为不同厂家所选药材可能因产地、种属等差异,此外生产工艺亦存在一定差异,所以导致药材产品质量存在一定差异。在成分测定中我们看出麻黄碱吸收最大波长在250 nm,桂皮醛吸收最大波长为290 nm,苦杏仁苷及甘草酸分别为270 nm及278 nm,因为苦杏仁苷及甘草酸出峰的间隔时间较短,来不及变换明显波长,而在250 nm波长麻黄碱有较强的吸收,在290 nm桂皮醛有明显吸收,这

一结果与国内外诸多文献<sup>[11-16]</sup>数据一致。因此,对于检测组方中不同成分尽量采用其最大吸收波长作为检测波长,即可提高检测灵敏度,又可减少误差。

HPLC完整体现了麻黄汤的组方特征,同时验证了该药对产生最大药物效价,以期指导临床运用。

#### 参考文献

- [1] 肖小河,金城,鄢丹,等. 中药大质量观及实践[J]. 中草药,2010,41(4):505-508.
- [2] 房德敏. 中药指纹图谱技术的研究与应用[J]. 中草药,2005,36(4):632-634.
- [3] Cui J X, Hong W X, Zhou R J, et al. Feature extraction of Chinese materia medica fingerprint based on star plot representation of multivariate data[J]. Chin Herb Med,2011,3(2):140-143.
- [4] Yu F, Kong L, Zou H, et al. Progress on the screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines by biological fingerprinting analysis[J]. Comb Chem High Throughput Screen,2010,13(10):855-868.
- [5] 孙国祥,胡玥珊,智雪枝. 用复杂性科学原理揭示中药指纹图谱的本质特征[J]. 中南药学,2008,6(5):600-605.
- [6] 谢培山. 刍议中药指纹图谱的现状、发展和问题[J]. 中药材,2007,30(3):257-259.
- [7] 贺丰,罗佳波,陈飞龙,等. 麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱在人体药代动力学研究[J]. 中药药理与临床,2005,21(1):1-3.
- [8] 朱秋双,任春清,刘蕾,等. 麻黄汤不同配伍解热药效实验研究[J]. 黑龙江医药科学,2005,28(2):12-13.
- [9] 魏惠珍,王信,王跃生,等. 炒苦杏仁饮片指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):71-74.
- [10] 杨琳,赵庆春,谭菁菁,等. 桂枝的化学成分研究[J]. 实用药物与临床,2010,13(3):183-185.
- [11] 魏凤环,罗佳波,沈群,等. 麻黄汤及单味麻黄中麻黄碱与伪麻黄碱在小鼠组织中的药动学研究[J]. 中草药,2004,35(7):781-784.
- [12] 魏凤环,罗佳波,谭晓梅,等. 麻黄汤对大鼠大脑额叶皮层氨基酸类神经递质水平的影响[J]. 中草药,2005,36(12):1841-1844.
- [13] 朱全红,陈飞龙,白霜,等. GC-MS法测定尿液中麻黄汤代谢产物麻黄类生物碱的浓度[J]. 药物分析杂志,2005,25(9):1030-1034.
- [14] 李吉来,陈飞龙,刘传明,等. 麻黄汤中麻黄碱与伪麻黄碱的GC-MS法测定及配伍因素对汤剂中该成分含量的影响[J]. 中草药,2002,33(4):307-309.
- [15] 魏凤环,罗佳波,陈飞龙,等. GC-MS法测定麻黄汤不同配伍对桂皮醛含量的影响[J]. 中草药,2004,35(6):635-638.
- [16] 雷载权. 中药学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:240.
- [17] 赵文斌,刘金荣,黄韶光,等. 新疆地产苦杏仁及油的营养成分研究[J]. 中国油脂,2002,27(2):31-32.