

• 药理与临床 •

基于平喘生物效价的麻黄品质评价研究

赵云生^{1,2,3}, 谢丽霞^{1,2}, 毛福英¹, 王 张⁴, 曹 喆^{1,2}, 张新慧^{1,2,3}

1. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004
2. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004
3. 回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004
4. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 610075

摘要: 目的 研究 37 个不同产地麻黄平喘作用及其生物效价的差异。方法 取豚鼠离体气管平滑肌建立平喘药效模型, 按累积计量法于麦氏浴槽中加入不同质量浓度梯度(剂间距 1:0.5)的麻黄水煎液, 计算不同产地麻黄解痉率; 按照《中国药典》2010 年版二部附录 XIV 生物检定统计法项下“量反应平行线法”(2, 2)法计算生物效价值; 采用 HPLC 法测定麻黄药材中麻黄碱和伪麻黄碱的量; 对不同产地麻黄生物效价值进行聚类分析。结果 麻黄对磷酸组胺(His)引起的豚鼠离体气管平滑肌收缩有解痉作用, 与麻黄对照药材相比, 有 20 个产地的麻黄达显著水平($P < 0.05$), 麻黄解痉作用与给药质量浓度呈剂量依赖性, 草麻黄与中麻黄种间解痉率无显著差异($P > 0.05$); 37 个产地的麻黄药材与对照药材相比平喘效价值存在显著差异($P < 0.05$ 、0.01), 平喘效价值为 22.35~489.04 U/g, 可信限率(FL) 13.15%~38.97%, 效价相差近 21.88 倍, 麻黄平喘生物效价与麻黄碱及伪麻黄碱总量之间相关不显著; 采用聚类分析法能够将不同平喘生物效价值的麻黄区分开来, 37 份麻黄药材中有 24 份生物效价值高于对照药材, 占麻黄样品总数的 64.86%。结论 平喘生物效价值可以定量评价不同产地麻黄的质量。

关键词: 麻黄; 平喘; 生物效价; 质量评价; 解痉作用; 麻黄碱; 伪麻黄碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)24-3695-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.015

Antiasthma biological potency applied for *Ephedra Herba* quality evaluation

ZHAO Yun-sheng^{1,2,3}, XIE Li-xia^{1,2}, MAO Fu-ying¹, WANG Zhang⁴, CAO Zhe^{1,2}, ZHANG Xin-hui^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China
2. Ningxia Research Center of Modern Hui Medicine Engineering and Technology, Yinchuan 750004, China
3. Key Laboratory for Modernization of Hui Medicine, Co-construction by Province and Ministry of Education, Yinchuan 750004, China
4. School of Ethnomedicine in Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To study the anti-asthma action and biological potency differences of *Ephedra Herba* from 37 different habitats. **Methods** Taking the isolated tracheal smooth muscle from guinea pig to establish antiasthma pharmacological model, the ephedra decoction at different concentration was added to the sink by cumulative metrology method, antispasmodic percentage and biological potency value of *Ephedra Herba* from different habitats were calculated and the cluster analysis for the biological potency value of *Ephedra Herba* from different habitats was conducted. **Results** *Ephedra Herba* had the antispasmodic action to the isolated tracheal smooth muscle of guinea pig caused by histamine phosphate, and compared with the control medicine, *Ephedra Herba* from 20 habitats showed significant differences ($P < 0.05$), and the antispasmodic action of *Ephedra Herba* was in a dose-dependent manner with administered concentration, when the concentration was raised and the antispasmodic percentage increased, and there were no significant difference in the antispasmodic percentage between *Ephedra sinica* and *E. intermedia* ($P > 0.05$); Compared with the control medicine, the antiasthma biological potency of *Ephedra Herba* from 37 different habitats existed significant or very significant differences ($P < 0.05$, 0.01), and the antiasthma biological potency value was 22.35—489.04 U/g, while FL% was 13.15%—38.97%, which revealed that the high potency level had a difference of 21.88 times from the low one. And the antiasthma biological potency of *Ephedra Herba* had lowly significant correlation differences with the total determination of ephedrine and *D*-pseudephedrine; The *Ephedra Herba* with different

收稿日期: 2015-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160505)

作者简介: 赵云生(1974—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药品质与资源研究。Tel: 13619501878 E-mail: zwhjzs@126.com

antiasthma biological potency could be identified by cluster analysis method, in which the biological potency from 24 ones in total of 37 *Ephedra Herba* was higher than that in the control medicine and accounted for 64.86% of the total samples. **Conclusion** The anti-asthma biological potency value of *Ephedra Herba* could quantitatively evaluate the quality of *Ephedra Herba* from different habitats.

Key words: *Ephedra Herba*; antiasthma; biological potency; quality evaluation; antispasmodic effect; ephedrine; D-pseudoephedrine

麻黄 *Ephedra Herba* 为常用中药, 临床应用广泛。《中国药典》2010 年版一部收载麻黄为麻黄科 (Ephedraceae) 植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey. 或木贼麻黄 *E. intermedia equisetina* Bge. 的干燥草质茎, 具有发汗散寒、宣肺平喘、利水消肿等功效^[1]。其可治疗风寒感冒、气喘、水肿及支气管哮喘等病。目前评价麻黄药材质量的方法主要有性状、显微及薄层鉴别、麻黄碱与伪麻黄碱定量测定、指纹图谱测定等, 由于麻黄治疗作用的发挥依赖于多成分、多靶点的综合调节作用, 通过控制单一指标成分的量来实现麻黄质量控制的方法不足以反映其作用特点, 指纹图谱技术与单一指标成分定量测定相比, 其所含信息是综合的、多层次的和具体量化的, 但也存在局限, 难以关联或反映中药安全性和有效性。中药与生物制剂有类似之处, 将生物活性测定法引入中药质量控制和评价体系, 不仅可以鉴定中药品种和控制质量, 而且可以评价药效, 尤其对于麻黄等化学成分复杂、理化测定不易反映其生物活性和临床疗效的中药而言, 此方法更能凸显其优越性。

目前市售麻黄药材产地众多, 质量参差不齐, 严重影响到麻黄的临床疗效, 对于形态、生药性状及化学成分等高度相似的不同产地的麻黄药材, 基于麻黄宣肺平喘功效, 测定不同产地麻黄对豚鼠离体气管平滑肌的解痉率, 在此基础上建立不同产地麻黄平喘生物效价 (potency) 的质量评价方法, 将麻黄药理作用与药材质量联系起来, 为麻黄质量评价研究提供一种新的研究思路。

1 材料

1.1 动物

健康 Hartley 系豚鼠 80 只, 雄性, 体质量 (350±50) g, 购自济南金丰实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (鲁) 2014-0006。

1.2 药材

麻黄样品共 37 份, 分别采自甘肃、宁夏、内蒙古、新疆、山西、陕西, 由西北师范大学晏民生副教授鉴定, 确定 20 份为草麻黄 *E. sinica* Stapf, 17 份为中麻黄 *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey., 样品具体信息见表 1。麻黄对照药材为草麻黄, 购自中国食品药品检定研究院 (批号 121051-201005),

表 1 不同产地麻黄样品信息

Table 1 Information of *Ephedrae Herba* samples from different habitats

编号	产地	品种	采收时间	编号	产地	品种	采收时间
Y1	山西天镇	草麻黄	2012-08	Y20	甘肃安宁 1	草麻黄	2012-08
Y2	宁夏青铜峡	草麻黄	2012-09	Y21	甘肃泾川	中麻黄	2012-08
Y3	新疆和硕	草麻黄	2012-09	Y22	甘肃永昌	中麻黄	2012-08
Y4	甘肃古浪	草麻黄	2012-08	Y23	甘肃宁县	中麻黄	2012-08
Y5	甘肃庆阳	草麻黄	2012-08	Y24	甘肃会宁	中麻黄	2012-08
Y6	内蒙赤峰巴林左旗	草麻黄	2012-08	Y25	甘肃天祝	中麻黄	2012-08
Y7	山西右玉	草麻黄	2012-08	Y26	宁夏彭阳	中麻黄	2012-08
Y8	内蒙奈曼旗	草麻黄	2012-10	Y27	甘肃凉州	中麻黄	2012-08
Y9	甘肃山丹	草麻黄	2012-08	Y28	甘肃安宁 2	中麻黄	2012-08
Y10	宁夏盐池	草麻黄	2012-08	Y29	甘肃崆峒	中麻黄	2012-08
Y11	甘肃华池	草麻黄	2012-08	Y30	甘肃陇西	中麻黄	2012-08
Y12	内蒙翁牛特旗	草麻黄	2012-10	Y31	甘肃庄浪	中麻黄	2012-08
Y13	宁夏灵武	草麻黄	2012-08	Y32	甘肃武山	中麻黄	2012-08
Y14	陕西蒲城	草麻黄	2012-10	Y33	甘肃景泰	中麻黄	2012-08
Y15	内蒙兴安盟	草麻黄	2012-10	Y34	宁夏原州区	中麻黄	2012-08
Y16	内蒙鄂托克 (野生)	草麻黄	2012-10	Y35	甘肃秦安	中麻黄	2012-08
Y17	内蒙科尔沁	草麻黄	2012-08	Y36	宁夏隆德	中麻黄	2012-08
Y18	内蒙鄂托克 (栽培)	草麻黄	2012-10	Y37	甘肃安宁堡	中麻黄	2012-08
Y19	山西大同	草麻黄	2012-08				

凭证标本存放于宁夏医科大学回药现代化工程技术研究中心 207-1 室。

1.3 药品与试剂

氨茶碱片(太原市振兴制药有限责任公司生产,批号 H14021628),K-H(Krebs-Henselei)液(用 NaCl、KCl、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、NaHCO₃、CaCl₂、葡萄糖等分析纯试剂配制),磷酸组胺(His)为分析纯。

1.4 仪器

BL-420F 生物信号采集处理系统、HW200S 恒温平滑肌实验系统、FT-100 生物张力传感器(成都泰盟软件有限公司);Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(大连依利特分析仪器有限公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

2 方法

2.1 供试品与对照药材溶液的制备

取生麻黄样品 25 g,加 10 倍量水,浸泡 40 min,用武火煮沸后,改用文火煎煮 30 min,纱布滤过取汁;再加 8 倍量水,煎煮方法、时间同前,纱布滤过取汁,合并 2 次药液,浓缩成 1 g/mL 的药液^[2-3],即得供试品溶液。

麻黄对照药材同上述煎煮法制成对照药材溶液。

2.2 豚鼠离体气管条平喘模型的制备

用木槌击毙豚鼠,从甲状软骨下至气管下端分叉处取整段气管,剪成宽 3 mm、长 30 mm 的螺旋条,一端固定于盛有 Kreb's 营养液的麦氏浴槽内,另一端挂于张力换能器下端金属钩上,换能器连接 BL-420F 生物信号采集处理系统,调节基础张力为 2 g,稳定 1 h。实验时取一根气管条置于麦氏浴槽内,记录一段正常曲线作基线,加入 His 200 mg/mL,观察自动平衡记录仪曲线变化,当气管平滑肌张力升到最高点时,麻黄给药组采用累积剂量法滴加麻黄供试品溶液,使之终质量浓度分别为 20、40 mg/mL;同理,氨茶碱(阳性对照药)组亦按照上述方法采用累积剂量法滴加氨茶碱溶液,使之终质量浓度分别为 0.125、0.250 mg/mL;对照(生理盐水)组也以同法加等体积生理盐水,记录给药后 3 min 气管条张力变化,每个质量浓度重复 4 次,按公式计算解痉率[解痉率=(给药前张力值-给药后张力值)/给药前张力值]。

2.3 麻黄平喘作用量效线性关系考察

取麻黄对照药材,按“2.1”项方法制备对照药

材溶液,按“2.2”项方法测定 2.5、5.0、10、20、40、80 mg/mL 对照药材溶液解痉率,以质量浓度的对数为横坐标,解痉率为纵坐标作图,考察麻黄平喘作用量效曲线,根据该曲线确定不同产地麻黄测定生物效价的供试品液质量浓度。

2.4 麻黄平喘效价测定方法

将所配麻黄对照药材溶液和供试品溶液,按 1:0.5 剂间距稀释,以麻黄对照药材溶液为工作对照组(S),不同产地麻黄样品溶液为供试品组(T),按“2.2”项下方法分别测定工作对照组和供试品组解痉率,平行测定 4 次。按照《中国药典》2010 年版二部附录 XIV 生物检定统计法项下“量反应平行线法”(2,2)法,对麻黄对照药材进行原始效价赋值,定义麻黄对照药材效价为 100 U/g,计算不同产地麻黄样品的效价(PT)和效价的可信限率(FL),并检验其可靠性^[4]。

2.5 麻黄样品中麻黄碱与伪麻黄碱定量测定

采用高效液相色谱法,Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相 A 相为乙腈,B 相为含 0.1%磷酸和 0.1%三乙胺的混合水溶液,梯度洗脱,0~15 min,98%~95% B;15~20 min,95% B;20~25 min,95%~93% B;25~45 min,93%~91% B;45~90 min,91%~85% B;运行时间 90 min;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 210 nm;进样量 10 μL;柱温 30 ℃。同时测定不同产地麻黄样品中的麻黄碱与伪麻黄碱的量,二者之和即为麻黄碱与伪麻黄碱总量。本色谱条件下得到麻黄碱回归方程为 $Y=19.641X+5.9408$ ($R^2=0.9998$),线性范围为 0.004~0.800 mg/mL,伪麻黄碱回归方程为 $Y=20.691X+3.5623$ ($R^2=0.9999$),线性范围为 0.006~1.800 mg/mL。

2.6 数据处理

生物效价以中国药典生物检定统计程序 BS2000 计算,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据采用单因素方差分析(ANOVA)检验,应用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理。

3 结果与分析

3.1 生物效价测定方法学考察

3.1.1 精密度考察 取同一份麻黄供试品溶液,按“2.4”项方法测定 6 次生物效价值,计算麻黄平均平喘效价值为 167.79 U/g,RSD 3.1%。

3.1.2 重复性考察 取同一批样品分 6 次提取,制成供试品溶液,按“2.4”项方法测定,计算麻黄平

均效价值为 168.34 U/g, RSD 3.9%。

3.1.3 中间精密度考察 本实验室 2 名不同实验人员在 2 个不同时间, 分别按“2.4”项方法重复测定 6 次, 计算麻黄平均效价值为 166.94 U/g, RSD 4.8%, 说明不同实验人员对测定结果影响较小。

3.1.4 麻黄生物效价检测可靠性检验 《中国药典》2010 年版二部附录 XIV 对量反应平行线测定法要求如下: (1) 在一定剂量范围内, 对照品 (S) 和供试品 (T) 的对数剂量 (X) 和反应或反应的特定函数 (Y) 呈直线关系; (2) 当 S 和 T 的活性组分基本相同时, 两直线平行; (3) 要求回归项应非常显著 ($P < 0.01$), 偏离平行应不显著 ($P > 0.05$)。

本实验对麻黄对照药材解痉作用量效关系进行了考察, 结果表明, 麻黄对照药材的对数剂量 (X) 与解痉率 (Y) 具有良好的线性关系, 在 10~80 mg/mL, 回归方程 $Y = 59.080X - 44.860 (r = 0.9885)$ 。选择麻黄剂量 20 与 40 mg/mL 对不同产地麻黄生物效价测定进行可靠性检验, 结果该剂量下回归项均有极显著差异 ($P < 0.01$), 偏离平行线均无显著差异 ($P > 0.05$), 说明随着剂量的增加, 解痉率有规律地增加, 同时供试品和对照品呈平行直线关系, 因而可用“量反应平行线法”(2, 2) 法检测不同产地麻黄药材平喘效价。

3.2 不同产地麻黄解痉率比较

实验结果见表 2。麻黄对 His 引起的豚鼠离体平滑肌收缩有良好的解痉作用, 与对照药材相比, 20 mg/mL 给药量, 不同产地麻黄中有 15 份达显著水平 ($P < 0.05$), 40 mg/mL 给药量, 不同产地麻黄中有 20 份差异达显著水平 ($P < 0.05$)。20 或 40 mg/mL 给药量的麻黄解痉率均以甘肃泾川产中麻黄解痉率最低, 以甘肃安宁草麻黄解痉率最高, 二者均达显著水平 ($P < 0.05$)。同一产地不同剂量的麻黄解痉作用与麻黄质量浓度呈剂量依赖性, 麻黄质量浓度增加解痉率增大, 平喘作用增强。

将 20 份草麻黄与 17 份中麻黄分别作为 2 个群体作解痉率箱型图 (图 1), 可以看出在给药质量浓度 20 mg/mL 时草麻黄比中麻黄解痉率箱型图位置略高, 在给药质量浓度 40 mg/mL 时草麻黄解痉率箱型图位置明显高于中麻黄, 草麻黄解痉率为 34.45%~110.18%, 中麻黄解痉率为 14.45%~84.62%。给药质量浓度 20 或 40 mg/mL 的 20 份草

麻黄解痉率分布范围基本涵盖了 17 份中麻黄解痉率分布范围, 二者箱型图重叠部分较大。为了进一步比较草麻黄与中麻黄解痉率的差异, 将 20 份草麻黄与 17 份中麻黄分别作为 2 个群体进行显著性检验, 结果表明草麻黄与中麻黄解痉率无显著性差异 ($P > 0.05$), 因而草麻黄与中麻黄种间平喘作用有差异, 但差异不显著。

3.3 氨茶碱生物效价测定

本实验不同产地麻黄的生物效价值是以麻黄对照药材平喘效价值为 100 U/g 测定而得, 但麻黄对照药材所含化学成分复杂, 为了进一步说明麻黄对豚鼠离体平滑肌的平喘效价, 本实验用麻黄对照药材对平喘化学药氨茶碱进行了生物效价的测定, 可靠性检验结果见表 3, 回归项呈极显著差异 ($P < 0.01$), 偏离平行不显著 ($P > 0.05$), 氨茶碱的平喘效价值为 27.998 U/mg, FL 为 9.664 2%, 即 1 g 麻黄对照药材的平喘效价 100 U 相当于 3.572 mg 氨茶碱的平喘效价。

3.4 不同产地麻黄样品生物效价比较

实验结果见表 2。37 个不同产地的麻黄药材与对照麻黄药材相比存在显著或非常显著差异 ($P < 0.05$ 、0.01), 平喘效价值为 22.350~489.040 U/g, FL 为 13.154%~38.968%, 效价相差近 21.88 倍, 37 个产地的麻黄平均平喘效价值为 161.310 U/g, 比麻黄对照药材效价值高 61.310 U/g。其中草麻黄平喘效价值 53.328~489.040 U/g, 平均效价值为 185.800 U/g, 以甘肃安宁草麻黄效价最高, 山西大同其次, 二者生物效价值均大于 400 U/g, 以新疆和硕草麻黄效价值最低。中麻黄的平均效价值为 132.490 U/g, 以宁夏隆德中麻黄效价值最高为 280.700 U/g, 甘肃泾川效价值最低为 22.350 U/g。草麻黄的平均平喘效价值要高于中麻黄。

将 20 份草麻黄与 17 份中麻黄分别作为 2 个群体作生物效价值箱型图 (图 2), 可以看出草麻黄生物效价值整体上要高于中麻黄, 草麻黄生物效价值下边缘线与中麻黄生物效价值下 4 分位数接近, 而草麻黄上 4 分位数比中麻黄上边缘线略低, 因而草麻黄的平喘效价整体上高于中麻黄, 但具体到某一产地中麻黄的平喘生物效价并不一定低于草麻黄, 草麻黄平喘生物效价分布范围基本涵盖了中麻黄分布范围, 二者箱型图重叠部分较大。

表2 不同产地麻黄解痉率、平喘生物效价及麻黄碱与伪麻黄碱总量比较

Table 2 Comparison on antispasmodic percentage, biological potency value, total contents of ephedrine and pseudoephedrine of *Ephedrae Herba* samples from different habitats

编号	解痉率/%		生物效价/ (U·g ⁻¹)	FL/%	麻黄碱与伪麻 黄碱总量/%
	20 mg·mL ⁻¹	40 mg·mL ⁻¹			
Y1	20.10±1.65	35.34±10.82*	64.769**	31.501	1.467±0.000
Y2	23.06±5.98	36.32±3.61	67.090**	19.754	1.071±0.078
Y3	23.52±9.94	34.45±11.51*	53.328**	26.278	3.064±0.276
Y4	24.87±5.46	35.49±7.20	74.640**	17.909	2.409±1.268
Y5	29.88±9.60	40.12±12.09	65.793**	31.501	1.030±0.212
Y6	33.70±9.65	43.65±13.29	85.147	27.135	0.972±0.030
Y7	33.75±3.25	45.71±3.41	109.300	19.357	2.468±0.000
Y8	35.57±6.08	46.43±4.12	112.790	13.154	2.288±0.528
Y9	35.63±3.77	53.38±8.08	130.160*	22.257	2.873±0.653
Y10	38.39±10.67	58.08±9.77	167.790**	18.820	2.568±1.673
Y11	40.61±7.40	60.22±4.79*	160.540**	23.998	1.866±0.185
Y12	42.49±1.99*	65.00±7.75*	174.240**	20.918	1.490±0.060
Y13	43.33±9.34*	67.78±7.37*	180.350**	33.032	0.925±0.479
Y14	47.08±5.34*	73.29±4.92*	222.740**	14.856	0.943±0.402
Y15	47.78±11.00*	68.34±2.35*	210.150**	32.889	2.595±1.133
Y16	52.53±15.59*	66.10±16.06*	281.930**	22.415	3.296±1.674
Y17	53.17±12.05*	76.72±26.66*	316.290**	55.070	1.742±0.000
Y18	62.25±7.21*	93.93±7.23*	338.930**	37.507	1.655±0.318
Y19	63.66±9.17*	85.42±6.16*	411.070**	33.517	1.350±0.170
Y20	78.15±19.57*	110.18±11.23*	489.040**	28.780	0.833±0.677
Y21	12.83±2.39*	15.45±4.29*	22.350**	27.530	1.404±0.107
Y22	18.59±3.44	27.89±5.15	52.705**	31.480	1.092±0.248
Y23	20.13±2.02	26.87±6.67*	49.669**	24.427	0.514±0.046
Y24	23.16±8.40	31.28±7.98*	55.094**	29.830	2.334±1.206
Y25	28.32±6.65	33.18±3.65*	59.130**	15.760	1.536±0.059
Y26	29.46±8.45	40.53±8.52	76.504**	19.133	1.039±0.238
Y27	30.99±13.10	44.93±16.04	79.597*	24.640	3.080±0.529
Y28	33.20±7.49	51.36±9.26	118.930	29.546	2.876±0.529
Y29	33.33±5.44	43.61±4.75	101.040	13.673	0.639±0.105
Y30	34.94±4.47	58.52±2.56	123.600*	20.784	1.474±0.149
Y31	38.00±7.53	48.45±12.87	148.870**	22.970	0.924±0.293
Y32	40.23±6.35	56.78±8.39	170.010**	14.979	2.134±0.867
Y33	42.94±9.31*	57.06±9.31	190.740**	30.423	3.067±0.170
Y34	48.64±6.14*	76.29±10.94*	214.110**	37.382	0.879±0.401
Y35	49.61±5.20*	62.20±3.91*	231.850**	28.992	1.291±0.192
Y36	53.75±11.15*	63.99±10.40*	280.700**	37.181	1.046±0.636
Y37	55.11±9.37*	84.62±3.66*	277.460**	38.968	2.277±0.608
麻黄对照药材	29.29±1.01	46.43±5.05	100.000	—	—
氨茶碱	44.16±3.16 (0.125 mg·mL ⁻¹)	64.42±3.98 (0.250 mg·mL ⁻¹)	—	—	—

与麻黄对照药材比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control medicinal materials

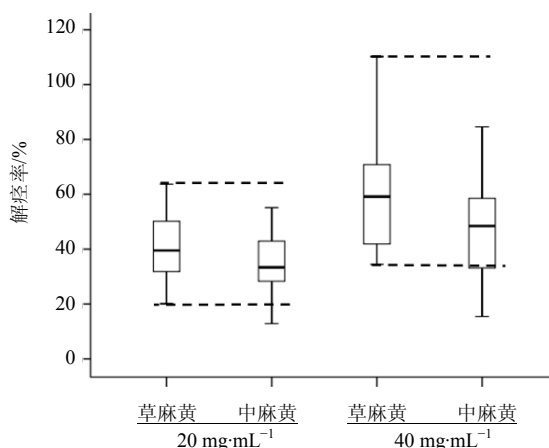


图 1 20、40 mg/mL 草麻黄与中麻黄解痉率箱型图
Fig. 1 Antispasmodic percentage box plot of *E. sinica* and *E. intermedia* in 20 and 40 mg/mL

表 3 氨茶碱平喘效价可靠性检验结果

Table 3 Reliability test of antiasthma biological potency by aminophylline

变异来源	df	差方和	方差	F 值	P 值
试品间	1	73.745	73.745	11.436	<0.01
回归	1	1 984.9	1 984.9	307.82	<0.01
偏离平行	1	16.221	16.221	2.515 5	>0.05
剂间	3	2 074.9	691.63	107.26	<0.01
误差	12	77.379	6.448 2		

3.5 麻黄解痉率与生物效价值变化趋势分析

不同产地草麻黄解痉率与生物效价值的变化趋势见图 3。新疆和硕 (Y3) 解痉率与生物效价值均最低, 甘肃安宁 1 (Y20) 草麻黄解痉率与生物效价值均最高, 地理位置相近的草麻黄生物效价值与解痉率并不一定接近, 如山西天镇 (Y1) 与山西大同 (Y19) 均属山西大同市辖区, 但二者解痉率

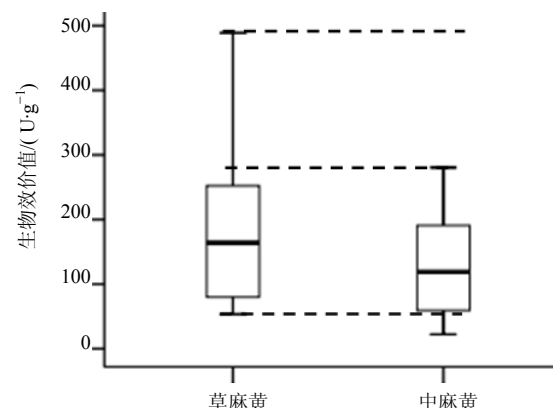


图 2 草麻黄与中麻黄生物效价箱型图

Fig. 2 Antiasthma biological potency box plot of *E. sinica* and *E. intermedia*

与生物效价值相差较大。一般来说草麻黄生物效价值的变化趋势与其解痉率变化趋势一致, 即解痉率高的草麻黄生物效价值高, 但二者并不总是一致, 如内蒙古鄂托克野生 (Y16) 质量浓度 40 mg/mL 麻黄的解痉率低于陕西蒲城 (Y14), 而其生物效价值却高于陕西蒲城, 就某一产地的麻黄而言, 质量浓度高者解痉率亦高, 二者具有量效关系。采自内蒙鄂托克的栽培 (Y18) 与野生 (Y16) 麻黄, 来自同一村庄, 检测结果表明栽培麻黄的生物效价值比野生麻黄略高, 因来自同一村庄, 自然气候条件相似, 均为草麻黄, 二者的差别应主要表现在栽培措施上, 可见采用合理的栽培措施能够提高草麻黄的平喘效价值。

不同产地中麻黄解痉率与生物效价的变化趋势见图 4。甘肃泾川 (Y21) 中麻黄解痉率与生物效价值均最低, 宁夏隆德 (Y36) 中麻黄生物效价值最高, 但质量浓度 40 mg/mL 时解痉率低于甘肃

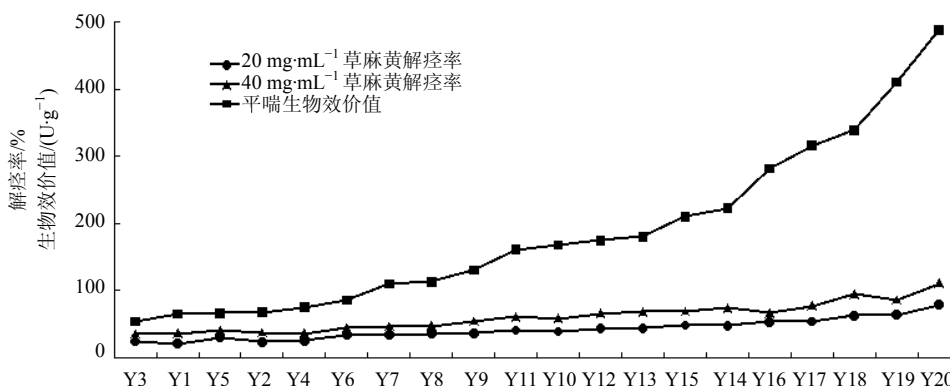


图 3 不同产地草麻黄解痉率与生物效价值

Fig. 3 Antispasmodic percentage and biological potency of *E. sinica* from different habitats

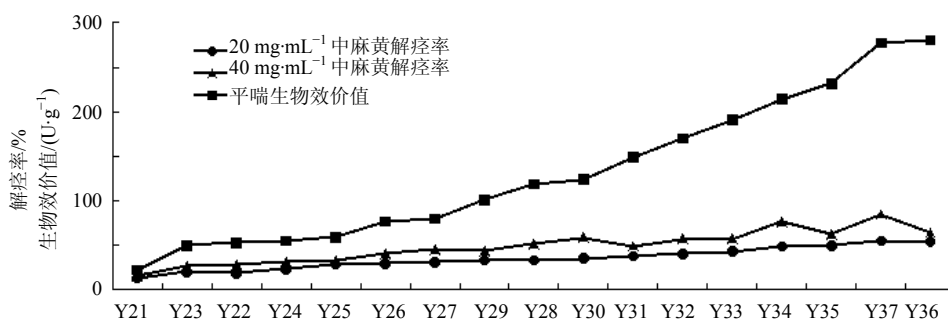


图 4 不同产地中麻黄解痉率与生物效价值

Fig. 4 Antispasmodic percentage and biological potency of *E. intermedia* from different habitats

安宁堡 (Y37) 中麻黄, 地理位置相近的中麻黄生物效价值与解痉率并不一定接近, 如宁夏彭阳 (Y26)、隆德 (Y36) 与原州区 (Y34) 均属宁夏固原市辖区, 但三者解痉率与生物效价值相差较大, 这种差异可能主要源自于这 3 个地区不同的气候条件, 隆德年均温 5.1 °C, 年均降雨量 745.4 mm; 原州区年均温 6 °C, 年均降雨量 600 mm 以上; 彭阳年均温 7.4 °C, 年均降雨量 350~550 mm, 这种不同的气候差异造成了中麻黄平喘生物效价值的不同。中麻黄生物效价值的变化趋势与其解痉率变化趋势亦一致, 即解痉率高的中麻黄生物效价值一般高, 但二者不完全一致, 如甘肃安宁堡 (Y37) 质量浓度 40 mg/mL 中麻黄的解痉率高于宁夏隆德 (Y36), 而其生物效价值却低于宁夏隆德, 就某一产地的中麻黄而言, 质量浓度高者解痉率亦高, 二者具有量效关系。

3.6 麻黄平喘效价与麻黄碱、伪麻黄碱总量相关性分析

《中国药典》2010 年版将麻黄碱与伪麻黄碱的总量作为麻黄质量评价指标性成分, 规定麻黄中麻黄碱与伪麻黄碱总量不得少于 0.80%, 将不同产地麻黄平喘效价与对应的麻黄碱与伪麻黄碱总量进行相关性分析, 结果表明, 麻黄平喘效价与麻黄碱与伪麻黄碱总量之间相关性不显著。其中甘肃安宁草麻黄生物效价值最高, 为 489.040 U/g, 而麻黄碱与伪麻黄碱总量为 0.833%, 新疆和硕草麻黄生物效价为 53.328 U/g, 其麻黄碱与伪麻黄碱总量为 3.064%, 提示麻黄的宣肺平喘功效与麻黄碱及伪麻黄碱总量之间无必然的相关性。

3.7 不同产地麻黄平喘生物效价系统聚类分析

对不同产地麻黄生物效价进行聚类分析, 结果见图 5。37 个产地麻黄被分为 4 类, 山西大同与甘

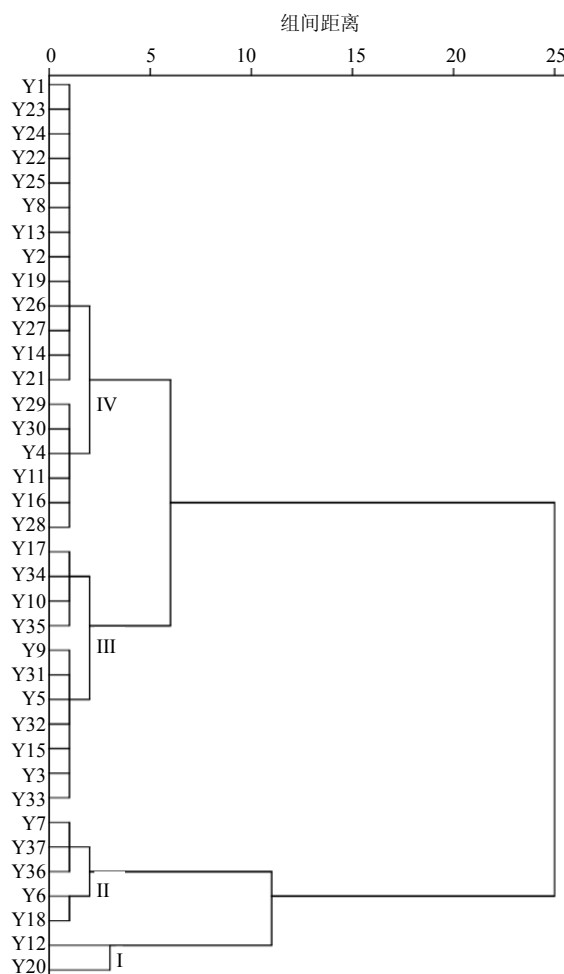


图 5 不同产地麻黄系统聚类树

Fig. 5 Cluster analysis dendrogram of *Ephedrae Herba* samples from different habitats

肃安宁 2 个产地的草麻黄被聚为一类, 生物效价值均在 400 U/g 以上, 比对照药材平喘效价高 4 倍多, 因而这两个产地的麻黄平喘药效显著; 第 II 类含有 5 个产地的麻黄, 生物效价值亦较高, 在 277.460~338.930 U/g, 是麻黄对照药材平喘药效的 2.77~3.38 倍, 平喘药效居其次; 第 III 类有 11 个产地的

麻黄,生物效价值在 148.870~231.850 U/g,是麻黄对照药材平喘药效的 1.49~2.32 倍,平喘药效居第 3;第 IV 类有 19 个产地的麻黄,生物效价值在 22.350~130.160 U/g,这类麻黄又可分为 2 个亚类,大于对照药材效价的麻黄有 6 份,小于对照药材平喘效价 100 U/g 的麻黄有 13 份,因而第 IV 类麻黄是平喘药效较差的一类麻黄,在低于对照药材效价的 13 份麻黄中,生物效价值低于 60 U/g 的有甘肃泾川、宁县、永昌、会宁、天祝 5 个产地的中麻黄,新疆和硕 1 个产地的草麻黄,这些产地的麻黄平喘效价不及对照药材的 3/5,在麻黄临床用药中可能需增加用量,以提高平喘效果。可见聚类分析能够将不同平喘效价值的麻黄鉴别开来,37 份麻黄药材中有 24 份麻黄生物效价值高于对照药材,占麻黄样品总数的 64.86%。

4 讨论

中药的质量控制和评价方法是中药现代化的重要基础和关键,也一直是中医药研究的难点和热点。目前,国内外对麻黄的研究主要集中于化学成分的分离、鉴定以及在发汗、平喘、止咳、利尿等方面的药理药效作用,现行关于麻黄等药材的质量管理模式主要是基于定性鉴别和指标成分定量测定而制定,沿用了天然药物或化学药质量控制模式的理化分析,难以全面评价中药的有效性与安全性,更难以体现中医药的整体观和整体效应,偏离了传统中医药的精华所在^[5]。

生物评价因具有药效相关、整体可控等技术优势,符合中医药特点,已成为中药质量标准化的一个重要发展方向。《中国药典》2010 年版规定水蛭、胰岛素、缩宫素、肝素、卵泡刺激素、黄体生成素、加压素、硫酸鱼精蛋白、洋地黄、生长激素、降钙素等均需用生物测定方法来测定效价。我国学者楼之岑^[6]早在 1950 年就建立了植物性泻剂的生物检定方法。黄连、大黄、益母草、板蓝根、连翘、角类动物药等^[6-11]也有生物效价检测方法的报道。这种基于药物-生物反应的质量控制理念已得到越来越多的认同^[12-14]。

生物评价可分为生物效价测定(定量的测定方法或量反应法)和生物活性限值测定(半定量的测定方法或质反应法)^[15]。一般优先选用生物效价测定法,未能建立生物效价测定的品种才考虑生物活性限值测定^[16]。生物效价测定是以药物的药理作用为基础,利用生物体(包括整体动物及离体组织、

器官、细胞和微生物等)评估药物的生物活性(包括药效和毒性),以生物统计为工具,运用特定的实验设计,在严格控制的实验条件下比较供试品和相当的标准品或对照品所产生的特定生物效应,通过等反应剂量间比例的运算,测得供试品的效价^[17],从而评价和控制供试品的质量或活性。

生物效价检测除了要与临床疗效、药理作用相关外,还须符合中药质量控制的要求,即尽可能采用简单、准确、稳定、易于推广的方法^[5],须具备定量药理学与药检分析的双重属性和要求^[16]。预试验中选择中药平喘经典实验豚鼠离体平滑肌解痉率作为药理检测的方法,分别对药物的剂量、剂间距、线性关系、精密度、重复性等逐一进行了筛选,实验结果可为麻黄生物效价的检测提供参考。

麻黄的生物效价测定有 2 个技术问题需解决,一是工作参照物,即“和谁比”的问题,二是测定方法,即“如何比”的问题。理想的生物测定用参照物应与供试品是同质的,在一定剂量范围内,参照物可视为供试品不同程度的浓缩物或稀释物,以最大限度地消除测定系统误差,即参照物和供试品的量反应曲线平行,才能进行生物效价的对比和换算^[7],为此本实验选择中国食品药品检定研究院提供的麻黄对照药材作为中药质量生物评价与控制用工作参照物,同质性较好,符合传统中医评价麻黄质量多成分、多靶点和整体作用的特点,同时本实验还选用了氨茶碱片作对照,这种类效化学药的参照物同质性较差,但能够为麻黄临床使用制定合理的用药剂量提供参考。

中药质量生物效价检测并非简单意义的套用现有的生物检定方法,更不是常规药效试验的定量化,而是在生物检定思想的基础上,切合中药的自身特点,在满足药物质量控制操作可行性的前提下,最大程度地表征中药的内在质量,达到质量评价与控制的目的^[5]。与采用化学成分进行中药质量控制相比,具有独特优势,但目前尚存在较多困难,主要集中在反应模型及观察指标的选择上,生物-药物反应受到许多因素的影响,尤其在整体实验中,动物的吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程及对药物反应的差异都可能导致实验稳定性和均一性的劣化。本实验建立了基于对豚鼠离体平滑肌测定的麻黄平喘效价检测方法,为宣肺平喘中药麻黄的质量控制和品质评价提供了新的思路和方法。

本实验在预试验中考察了气管条的重复使用,

一只豚鼠的气管条可以剪成2个螺旋条,这2个螺旋条分别用于测定2个不同产地麻黄的解痉率,有个别豚鼠气管条可以重复使用检测2~3个产地的麻黄解痉率,但大部分气管条重复使用后灵敏度降低,这可能与动物本身、Kreb's营养液的新鲜程度、O₂通入量、麻黄提取液的使用次数等因素有关,通过改进实验条件,有可能提高气管条的重复使用率,减少实验动物的使用。

麻黄含有多种生物碱、挥发性物质、糖类、矿物质元素等,其中生物碱的量最高,麻黄生物碱中以麻黄碱与伪麻黄碱的量为高^[18-20],麻黄碱与伪麻黄碱也是《中国药典》2010年版规定的进行质量控制的指标成分,然而本实验结果表明,不同产地麻黄平喘效价与麻黄碱及伪麻黄碱总量之间相关不显著,提示麻黄中可能含有更强的具有平喘作用的化学物质或麻黄平喘作用是多种成分协同作用的结果,故需要寻求与麻黄平喘效价相关性更高的活性成分来建立更加完备的麻黄品质评价体系。

目前作为药材在临床上使用的麻黄产地众多,品种不一。本实验结果显示:不同产地和品种的麻黄解痉率与平喘生物效价差异很大,麻黄的平喘作用受产地与气象因子影响较大。

本实验对20份草麻黄与17份中麻黄作为2个群体进行麻黄种间解痉率分析,发现20、40 mg/mL草麻黄对豚鼠离体平滑肌收缩解痉率整体上高于中麻黄,实验结果与已有文献报道^[21]的草麻黄对豚鼠离体平滑肌松弛作用大于中麻黄的结果相同,但草麻黄箱型图基本涵盖了中麻黄箱型图,二者解痉率差别并不显著($P>0.05$)。与解痉率相似,草麻黄平喘生物效价值整体上亦高于中麻黄,但相差亦不显著($P>0.05$),可见《中国药典》2010年版一部将草麻黄与中麻黄均作为药材麻黄使用是合理的。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [3] 侯小双. 相关因素对麻黄发汗作用及麻黄碱煎出量影响的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [4] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [5] 方艺霖. 含小檗碱类中药品质生物评价与控制的初步研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
- [6] 楼之岑. 植物性泻药的生物测定法 [J]. 药学学报, 1953, 1(1): 49-71.
- [7] 鄢丹, 肖小河. 基于道地药材和生物测定的中药质量控制模式与方法研究——工作参照物 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1249-1252.
- [8] 王伽伯, 李慧芳, 金城, 等. 泻下类中药质量的生物控制方法及基本问题探讨 [J]. 药科学报, 2009, 44(5): 500-505.
- [9] 李寒冰, 鄢丹, 王伽伯, 等. 基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质的生物评价 [J]. 药科学报, 2009, 44(2): 162-166.
- [10] Wei L, Jin C, Li Y, et al. Methodological research on the quality evaluation of *Radix Isatidis* based on antibacterial potency [J]. *Mode Tradit Chin Med Mater Med*, 2008, 10(2): 33-36.
- [11] Yan D, Han Y M, Luo J Y, et al. The action of medicinal animal horns on *Escherichia coli* growth investigated by microcalorimetry and chemometric analysis [J]. *Chin Sci Bull*, 2010, 55(26): 2945-2950.
- [12] 黄璐琦, 胡之璧. 中药鉴定新技术新方法及其应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [13] 张海珠, 肖小河, 王伽伯, 等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.
- [14] 肖贵南, 李瑾翡, 陈浩桢. 生物活性测定在中药质量控制中应用的可行性及研究思路 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 473-475.
- [15] 肖小河. 中医药转化医学中的关键科学问题——中药质量生物评价与控制 [J]. 中药与临床, 2010, 1(4): 1-7.
- [16] 肖小河, 王伽伯, 鄢丹. 生物评价在中药质量标准化中的研究与应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 514-518.
- [17] 周海钧. 药品生物检定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [18] 姜寒玉. 麻黄亲缘关系分析及主要药用成分测定研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [19] 赵轩. 川牛膝、麻黄 HPLC-MS 指纹图谱研究 [D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [20] 刘龔, 石倩, 杨洋, 等. 麻黄碱与伪麻黄碱平喘效果及机制比较研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 771-774.
- [21] 安春娜, 洪浩, 蒲小平, 等. 草麻黄与中麻黄生物碱提取物对离体豚鼠气管松弛作用的比较 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(5): 437-440.