

基于 UPLC-DAD-TOF/MS 结合 HPLC-UV 法的麻黄“先煎去沫”样品的化学成分分析

成睿珍, 张春艳, 李 玥, 赵 静

天津市滨海新区中医医院, 天津 300450

摘要: **目的** 建立基于 UPLC-DAD-TOF/MS 结合 HPLC-UV 法检测麻黄样品化学成分的方法, 以明确麻黄“先煎去沫”样品化学成分间的差异。 **方法** UPLC-DAD-TOF/MS: Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 ℃, 正、负离子模式扫描; HPLC-UV: 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1%磷酸水溶液 (含 0.05%三乙胺)-乙腈溶液 (99:1) 为流动相, 等度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温 30 ℃。 **结果** 上沫中所含成分较少, 去沫下液和全煎煮液中化学成分基本一致。同时, 三者均可鉴定出去甲基麻黄碱、去甲基伪麻黄碱、麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱 5 个生物碱类成分和 1 个羧酸类成分 (4-羟基-7-甲氧基-2-喹啉羧酸)。但上沫中生物碱含量极低, 而全煎煮液中 3 种生物碱的含量略高于去沫下液。 **结论** 麻黄“先煎去沫”沫理论可能与生物碱类成分关系不大, 但仍需后期进行更深入的研究验证。

关键词: 麻黄; 先煎去沫; HPLC-DAD-TOF/MS; HPLC-UV; 去甲基麻黄碱; 去甲基伪麻黄碱; 麻黄碱; 伪麻黄碱; 甲基麻黄碱

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)08-1919-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.028

Study on chemical constituents of “decocted first and defoamed” of *Ephedra Herba* by UPLC-DAD-TOF/MS and HPLC-UV

CHENG Rui-zhen, ZHANG Chun-yan, LI Yue, ZHAO Jing

Tianjin Binhai New Area Hospital of TCM, Tianjin 300450, China

Abstract: Objective To establish a method for detecting the chemical compositions of “decocted first and defoamed” of *Ephedra Herba* by UPLC-DAD-TOF/MS coupled with HPLC-UV, so as to clarify the difference of chemical constituents among them. **Methods** The analysis was performed on an ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) by UPLC-DAD-TOF/MS with gradient elution. The mobile phase consists of methanol and 0.1% formic acid-water at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 40 ℃. The information of compounds was acquired on positive and negative mode. Similarly, HPLC-UV was applied for measuring the content of alkaloids respectively. The C₁₈ column was used, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (containing 0.05% triethylamine) (99:1) at the flow rate of 1 mL/min, the detective wavelength was set up at 210 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results** There were less content in the upper foam, and the chemical components in the lower liquid and the whole liquid were basically same. Five alkaloids and one carboxylic acid (4-hydroxy-7-methoxyl-2-quinoline carboxylic acid) was identified from all kinds of liquids. However, the content of alkaloids in the upper foam was very low, and the content of three alkaloids in the whole solution was slightly higher than that in the lower liquid. **Conclusion** The defoamed method may not be related to the chemical compositions of alkaloids, but it still needs further research and verification.

Key words: *Ephedrae Herba*; decocted first and defoamed; UPLC-DAD-TOF/MS; HPLC-UV; norephedrine; norpseudoephedrine; ephedrine; pseudoephedrine; methylephedrine

麻黄始载于《神农本草经》, 为临床常用中草药之一^[1]。对于其煎煮方法, 张仲景所著《伤寒论》麻黄汤中首次提出“先煎去沫”的特殊方法, 要求

“以水九升, 先煮麻黄, 减二升, 去上沫, 再内诸药”。课题组前期通过对古书籍及文献的调研, 发现仅有部分含麻黄方剂要求先煎去沫^[2]。而《中国药典》

收稿日期: 2018-01-09

基金项目: 天津市中医药管理局天津市卫生和计划生育委员会中西医结合科研课题 (2015142)

作者简介: 成睿珍 (1970—), 女, 副主任药师, 主要从事中药质量控制及临床药学研究。E-mail: m13752718318@163.com

2015 年版中麻黄尚未收载该煎煮法^[3], 且临床应用亦极少。那么, 临床医师纷纷纠结麻黄到底是否需要“先煎去沫”, 其“先煎去沫”理论的用意又何在, 临床药师亦在考虑麻黄经先煎去沫后其药效及有效成分是否发生变化。

然而, 目前对此尚无明确的理论解说^[4-7]。因此, 本研究以麻黄“先煎去沫”理论为切入点, 对比分析麻黄先煎去沫前后及“上沫”间化学成分的差异, 试图明确“先煎去沫”理论的物质基础, 同时为麻黄“先煎去沫”理论体系的形成机制提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

LC-20AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); IT-TOF-MS 离子阱-飞行时间质谱仪 (日本岛津公司); AL-204 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; Thermo Sorvall ST 16 R 低温离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); Millipore 超纯水系统 (美国默克密理博公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪及紫外检测器。

1.2 药品与试剂

对照品麻黄碱 (批号 171241-201007)、伪麻黄碱 (批号 171237-201208)、甲基麻黄碱 (批号 171247-200503) 均购于中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%; 质谱级甲醇、甲酸 (Fisher 公司, 美国); 色谱纯乙腈 (Sigma 公司); 分析纯磷酸 (天津市风船化学试剂有限公司); 分析纯三乙胺 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 麻黄 (批号 1507174、1503029、1508075、1508084) 由天津市滨海新区中医医院药学科提供, 经刘海副主任中药师鉴定为麻黄科植物草麻黄 *Ephedrae sinica* Stapf 的干燥草质茎。

2 方法与结果

2.1 UPLC-DAD-TOF/MS 法分析麻黄“先煎去沫”样品的化学成分

2.1.1 供试品的制备

(1) 麻黄全煎煮液的制备: 取麻黄药材约 100 g, 加入 1.0 L 蒸馏水置蒸煮容器中, 浸泡 30 min。加热煎煮, 自煮沸起计时, 煎煮 30 min, 放冷至室温滤过, 将滤液用甲醇定容至 500 mL。取滤液适量, 14 000 r/min 离心 10 min×2, 取上清液, 进样。

(2) 麻黄上沫及去沫下液的制备: 取麻黄药材约 100 g, 加入 1.0 L 蒸馏水置蒸煮容器中, 浸泡 30

min。加热煎煮, 煎煮至沸腾出现上沫时开始收集上沫, 得上沫约 0.1 g, 用适量甲醇溶解, 定容至 5 mL, 14 000 r/min 离心 10 min×2, 取上清液, 进样; 待上沫收集彻底后, 继续煎煮 15 min, 放冷至室温滤过, 将滤液用甲醇定容至 500 mL。取滤液适量, 14 000 r/min 离心 10 min×2, 取上清液, 进样。

2.1.2 色谱条件 色谱柱 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40 °C; 进样体积 2 μL; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 190~400 nm; 流动相为甲醇 (A)-0.1%甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	A/%	B/%
0	2	98
10	2	98
14	14	86
20	14	86
36	38	62
41	95	5

2.1.3 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 雾化气 (氮气) 体积流量 1.5 L/min; 曲形脱溶剂管温度: 200 °C; 加热模块温度: 200 °C; 检测器电压: 1.58 kV; 扫描模式: 正、负离子模式; 扫描范围: 一级 (m/z 100~600), 二级 (m/z 50~500); 碰撞能量: 40%; 碰撞气: 50%; 离子累积时间: 30 ms; 利用三氟醋酸钠 (2.5 mmol/L) 进行质量数校正, 校正范围为 200~1 000。麻黄 3 个样品在正、负离子模式下的总离子流图 (TIC) 如图 1 所示。麻黄样品中各化合物的离子碎片如图 2 所示。

2.1.4 化合物裂解特征分析 以麻黄碱为例, 正离子模式下形成准分子离子峰 m/z 166 $[M+H]^+$ 为基峰, 脱去 1 分子 H₂O 后形成碎片 m/z 148 $[M+H-H_2O]^+$, 在此基础上脱去甲基形成 m/z 133 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$, 另外, 麻黄碱脱去 1 分子 H₂O 后, 还可脱去氨甲基形成碎片 m/z 117 $[M+H-H_2O-NHCH_3]^+$ 。根据参考文献报道^[8-11], 麻黄碱和伪麻黄碱裂解规律一致, 但出峰时间不同, 推断 3 号峰为麻黄碱, 4 号峰为伪麻黄碱。麻黄碱的质谱裂解规律见图 3。各化合物的鉴定结果见表 2。

2.2 HPLC-UV 法检测麻黄“先煎去沫”样品中生物碱的含量

2.2.1 混合对照品溶液的制备 各取麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇

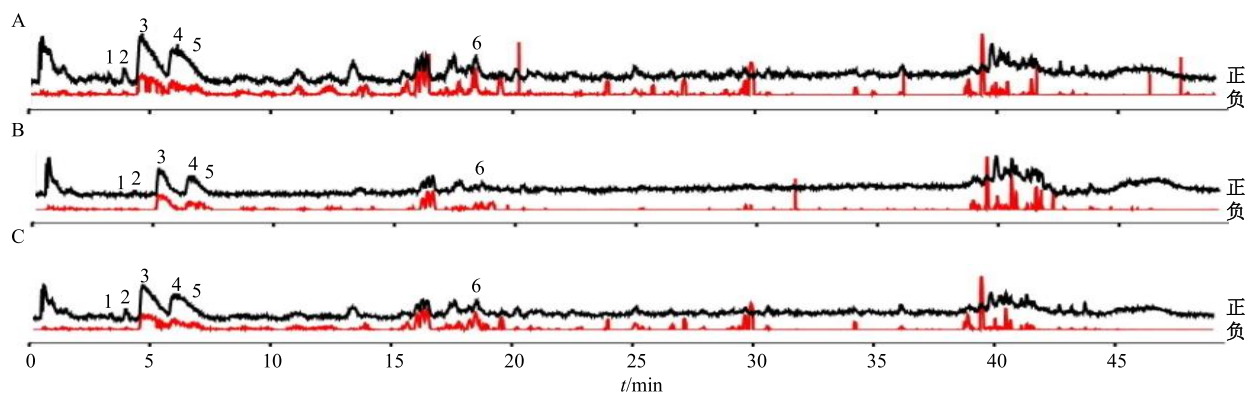


图 1 麻黄样品全煎煮液 (A)、上沫 (B)、去沫下液 (C) 在正、负离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms in negative ion and positive ion mode for different samples of *Ephedra Herba*

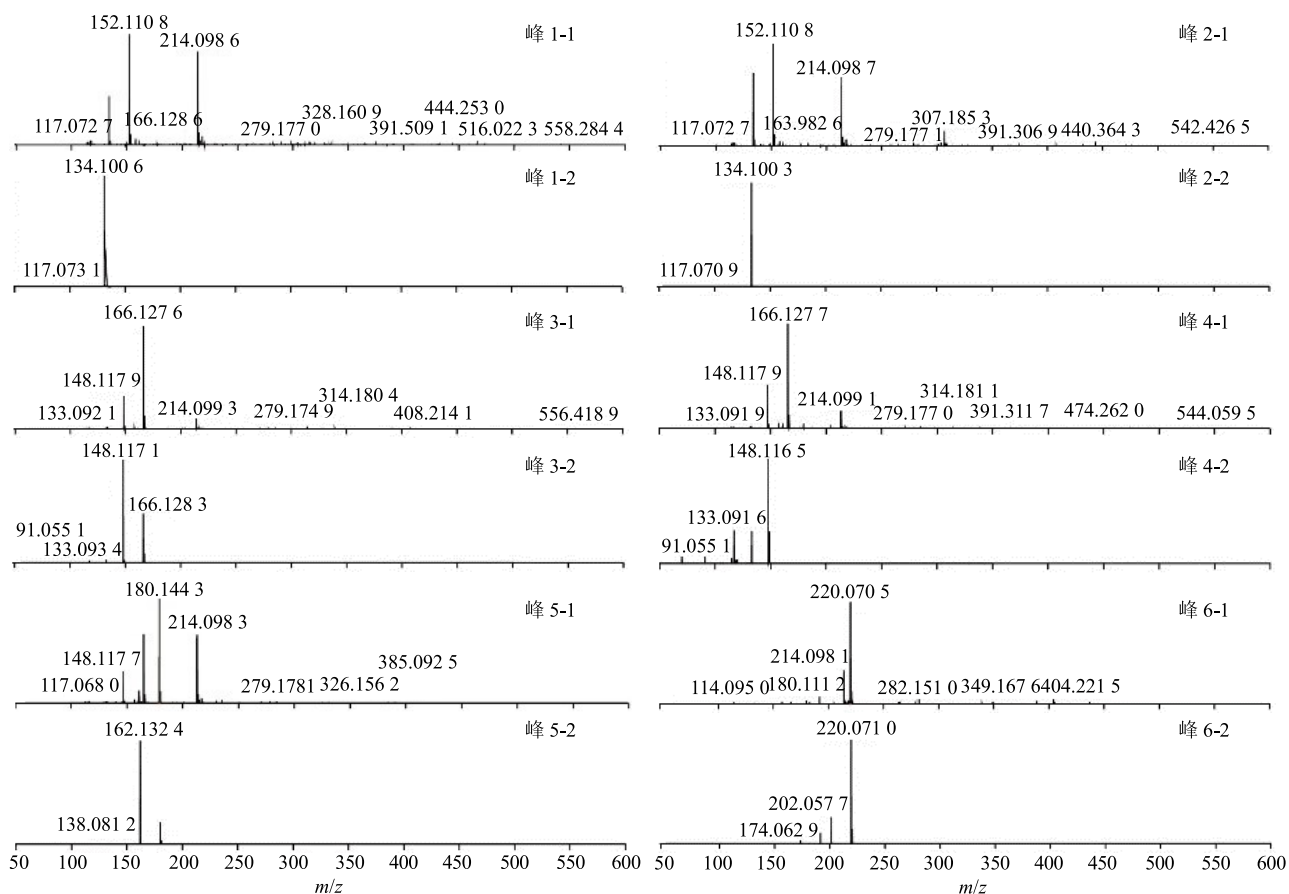


图 2 麻黄样品中各化合物的正离子碎片图

Fig. 2 Ion fragment of each compound in *Ephedra Herba*

制成质量浓度分别为 978.75、324.00、81.30 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品母液。

2.2.2 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸水溶液 (含 0.05% 三乙胺) - 乙腈溶液为流动相, 99:1 等度洗脱; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL ; 检

测波长为 210 nm。

2.2.3 专属性试验 精密吸取空白样品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各 5 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定。色谱图见图 4。

2.2.4 线性关系和检出限考察 精密量取上述混合对照品母液, 用 1.44% H_3PO_4 水溶液逐级稀释, 制

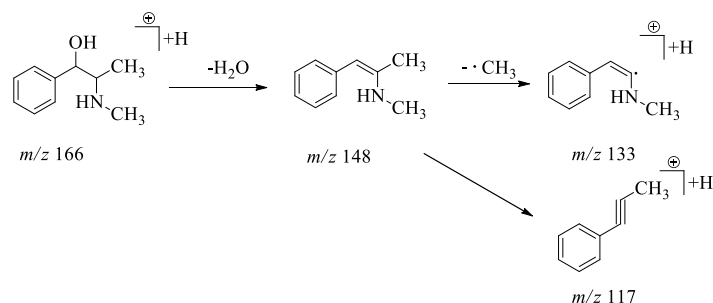


图 3 麻黄碱的质谱裂解规律

Fig. 3 MS fragmentation pattern of *Ephedra Herba*

表 2 化合物的信息

Table 2 Basic information of compounds

峰号	名称	相对分子质量	分子式
1	去甲基麻黄碱	151	$C_9H_{13}NO$
2	去甲基伪麻黄碱	151	$C_9H_{13}NO$
3	麻黄碱	166	$C_{10}H_{15}NO$
4	伪麻黄碱	166	$C_{10}H_{15}NO$
5	甲基麻黄碱	179	$C_{11}H_{17}NO$
6	4-羟基-7-甲氧基-2-喹啉羧酸	219	$C_{11}H_{17}NO$

成一系列不同质量浓度的对照品溶液，进样 5 μ L，记录色谱图和峰面积。分别以 3 种生物碱的峰面积为纵坐标 (A)，以对照品质量浓度为横坐标 (C) 进行线性回归分析，得标准曲线的回归方程和相关系数。以信噪比 $S/N=3$ 为检测限，以 $S/N=10$ 为定量限，结果见表 3。结果表明，麻黄 3 种生物碱在各自的浓度范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取生麻黄样品 (批号 1507174)，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件取同一供试品溶液，连续进

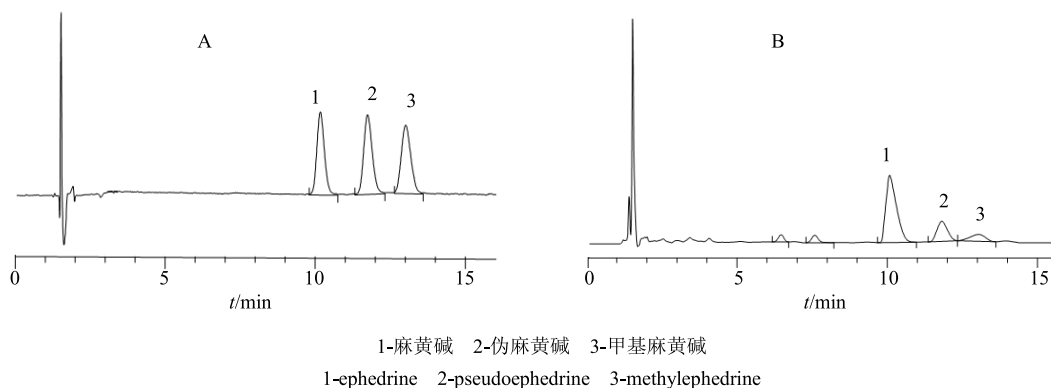


图 4 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 溶液 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC of mixed reference solution (A) and samples of *Ephedra Herba*表 3 麻黄 3 种生物碱的回归方程、相关系数、线性范围、定量限和检测限 ($n=3$)Table 3 Regression equation, correlation coefficient, linear range, LOQ, and LOD of three alkaloids in *Ephedrae herba* ($n=3$)

化合物	回归方程	r	线性范围/ $(\mu g \cdot mL^{-1})$	定量限/ $(\mu g \cdot mL^{-1})$	检测限/ $(\mu g \cdot mL^{-1})$
麻黄碱	$A=10.259 C+37.197$	0.999 9	30.59~978.75	1.91	0.48
伪麻黄碱	$A=10.964 C+13.661$	0.999 9	10.13~324.00	1.27	0.32
甲基麻黄碱	$A=10.147 C+7.203 8$	0.999 9	2.54~81.30	1.27	0.32

样分析 6 次，测定 3 种成分的峰面积，计算各化合物含量，计算日内精密度，其 RSD 值分别为 0.80%、0.49%、1.80%。取同一供试品溶液连续进样 3 d，每天 6 次进样测定峰面积，计算各化合物含量，计算日间精密度，其 RSD 值分别为 1.36%、2.14%、

2.84%。

2.2.6 重复性试验 取生麻黄样品 (批号 1507174)，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.2.2”项下色谱条件分析，测定 3 种成分的峰面积，计算各化合物含量，其 RSD 值分别为

0.59%、1.55%和 1.41%。

2.2.7 稳定性试验 取生麻黄样品（批号 1507174），按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样，测定 3 种成分的峰面积，考察供试品溶液的稳定性。结果表明，供试品溶液于室温下 12 h 内稳定，且 RSD 值分别为 0.48%、0.67%和 2.90%。

2.2.8 加样回收率试验 取生麻黄样品（批号 1507174）6 份各 0.125 g，分别加入 1.566 mg/mL 麻黄碱对照品溶液 1 mL、1.080 mg/mL 伪麻黄碱对照品

溶液 0.445 mL、1.084 mg/mL 甲基麻黄碱对照品溶液 0.092 mL，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件分析，测定 3 种成分的峰面积，计算回收率。其回收率分别为 102.40%、98.11%和 99.35%，RSD 值分别为 2.34%、1.14%和 1.27%。

2.2.9 定量测定 取各麻黄样品适量，分别按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μ L，按“2.2.2”项下色谱条件进样分析，测定 3 种成分的峰面积，计算各样品中 3 种生物碱的质量分数，结果见表 4。

表 4 麻黄相关样品中 3 种生物碱的含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Contents of three alkaloids of relative samples in *Ephedrae herba* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批号	样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
		麻黄碱	伪麻黄碱	甲基麻黄碱
1507174	上沫	0.014±0.000	0.004±0.000	0.001±0.000
	去沫下液	5.780±0.070	1.780±0.060	0.340±0.010
	全煎煮液	7.790±0.000	2.240±0.020	0.500±0.010
1503029	上沫	0.021±0.001	0.011±0.000	0.001±0.000
	去沫下液	9.680±0.040	6.330±0.090	0.570±0.010
	全煎煮液	10.420±0.090	6.550±0.080	0.530±0.000
1508075	上沫	0.011±0.000	0.008±0.001	0.002±0.000
	去沫下液	6.950±0.160	3.440±0.030	0.660±0.010
	全煎煮液	7.580±0.030	3.940±0.040	0.880±0.020
1508084	上沫	0.017±0.001	0.009±0.001	0.001±0.000
	去沫下液	7.790±0.070	3.900±0.070	0.820±0.020
	全煎煮液	8.930±0.090	5.520±0.070	0.560±0.020

3 讨论

本实验采用 UPLC-DAD-TOF/MS 技术对麻黄“先煎去沫”样品（包括上沫、去沫下液和全煎煮液）中化学成分进行了检识。由 TIC 图中可以看出，上沫中所含成分较少，去沫下液和全煎煮液中化学成分基本一致。但从三者均可鉴定出麻黄碱等 5 个生物碱成分和 1 个羧酸类成分 4-羟基-7-甲氧基-2-喹啉羧酸。

麻黄类生物碱成分结构相似，在定量分析过程中需要缓冲盐的加入。因此，本实验将采用 HPLC 法对其化学成分进行定量检识分析，以寻找到麻黄“先煎去沫”样品物质成分间的差异。结果表明麻黄上沫中含有少量的生物碱，而全煎煮液中 3 种生物碱的含量略高于去沫下液。

综上所述，麻黄去沫理论可能与生物碱类成分关系不大，但仍需后期进行更深入的研究验证。

参考文献

[1] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
[2] 成睿珍, 张春艳, 高大伟. 麻黄“去节、先煎去沫”理论及其解说的古今考证 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(5): 657-660.

[3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[4] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
[5] 陆维承. 麻黄入药须先煎 [J]. 吉林中医药, 1997(1): 39.
[6] 李广胜, 孟杰, 胡兆祥. 小议《伤寒杂病论》中麻黄之用法 [J]. 河南中医药学刊, 1995, 10(1): 12-13.
[7] 张宁, 闫美琳, 金东明. 《伤寒论》方中药物先煎的机理探讨 [J]. 吉林中医药, 2008, 28(1): 52.
[8] 孟翔宇. 麻黄中主要化合物的串联质谱研究 [A] // 中国物理学会质谱分会. 2006 年世界华人质谱学术研讨会暨中国质谱学会第八届全国学术交流会论文集 [C]. 乌鲁木齐: 中国物理学会质谱分会, 2006.
[9] 陈勇, 沈少林, 陈怀侠, 等. HPLC-ESI-ITMSⁿ 法鉴定麻黄碱及其大鼠体内主要代谢产物 [J]. 药学学报, 2005, 40(9): 838-841.
[10] Song F R, Liu Z Y, Sun W X, et al. New method of mass spectrometry for distinguishing ephedrine and isoephedrine [J]. Chin J Anal Chem 1999, 27(9): 1000-1002.
[11] Mine Y, Yoshikawa T, Oku S, et al. Comparison of effect of mosapride citrate and existing 5-HT₄ receptor agonists on gastrointestinal motility *in vivo* and *in vitro* [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 283(3): 1000-1008.