

麻黄中麻黄生物碱的气相色谱测定法

崔建芳 牛长群 张建生*

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050; *北京医科大学药学院, 北京 100083)

提要 本文应用毛细管气相色谱法, 配备氮磷检测器对麻黄中六种生物碱: 麻黄碱、伪麻黄碱、去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱、甲基麻黄碱和甲基伪麻黄碱进行分离、测定。对生药样品预处理方法作了较大改进, 采用直接碱化醚提法, 简化操作步骤。用内标法、线性方程定量测定了国产十二种麻黄, 结果与高效液相色谱法基本一致。

关键词 麻黄; 麻黄生物碱; GC/NPD

麻黄为常用中药, 是我国产的世界著名药材。麻黄中主要有效成分为三对差向异构体, 即麻黄碱(ephedrine)、伪麻黄碱(pseudoephedrine)、去甲麻黄碱(norephedrine)、去甲伪麻黄碱(norpseudoephedrine)、甲基麻黄碱(methylephedrine)和甲基伪麻黄碱(methylpseudoephedrine)。这三对生物碱结构相近, 但药理作用、作用强度均有明显差异。为麻黄资源的合理利用和麻黄品质正确评价, 需对麻黄生物碱进行分别测定。国内外学者对麻黄碱类的分离定量方法进行了大量研究。色谱法有薄层扫描法^[1]、气相色谱法^[2]、高效液相色谱法^[4, 5]等。这些方法只测定麻黄中2~4种至多五种生物碱的含量, 且灵敏度低、分离也不完全。张建生等建立的高效液相色谱法^[1], 首次测定了我国24个产地的12种麻黄中六种生物碱的含量, 但仍存在样品预处理繁琐, 甲基麻黄碱与甲基伪麻黄碱峰形较宽, 量极微时检测困难等缺点。

本文采用高分辨毛细管柱, 高灵敏度的氮磷检测器, 以二苯胺为内标, 建立麻黄生物碱的线性方程, 同时测定生药中六种麻黄生物碱的含量。方法灵敏、准确性好。并对样品预处理方法作了较大改进, 用直接碱化醚提法, 简化操作步骤, 减少热敏感的麻黄生物碱的损失, 缩短分析时间。本法适用于生药及制剂中麻黄生物碱的快速分析。

实 验 部 分

一、仪器与药品

气相色谱仪, 惠普 HP-5890A; 装备氮磷检测器(NPD)及 HP-3393A 积分仪; 色谱柱, 柔性石英毛细管柱 HP-5, 25 m × 0.2 mm × 0.33 μm; 康氏振荡器(江苏盐城龙岗医疗仪器厂); 氢气发生器。

对照品: 盐酸麻黄碱(AR, Serva), 盐酸伪麻黄碱(pharmaceutical purity, Serva), 盐酸去甲麻黄碱(pharmaceutical purity, Serva), 盐酸去甲伪麻黄碱(pharmaceutical purity, Serva), 盐酸甲基麻黄碱(AR, Aldrich), 甲基伪麻黄碱(由赤峰药厂粗品经分离精制得, 经 mp, HPLC 和 GC/MS 鉴定核实); 内标二苯胺(AR); 无水乙醚(AR, 加入氯化钙重

蒸去过氧化物); 甲醇 (AR); 无水硫酸钠 (AR, 北京化工厂经 220 °C 干燥 8 h)。

二苯胺乙醚液 准确称量 5 mg 二苯胺, 加 500 ml 重蒸乙醚, 为 10 ppm 二苯胺溶液。
生药样品 由北京医科大学药学院张建生收集并鉴定学名。

二、实验方法

(一) 气相色谱条件

载气 He, 1.4 ml/min (室温); 温度程序: 90 °C 维持 1 min, 以 3 °C/min 升至 124 °C, 保持 3 min, 继以 20 °C/min 升至 250 °C, 总时间为 22 min; 分流比 1:10; H₂ 流速 3.2 ml/min; 空气流速 90 ml/min; 尾吹气 28 ml/min; 进样口温度 220 °C; 检测器温度 280 °C; 面积法定量。

(二) 样品预处理方法比较

准确称量 25 mg × 2 生药粉末, 分置 10 ml 旋盖试管中, 按以下 A, B 两法提取。

A. 酸水碱化醚提法: 加 0.5 mol/L H₂SO₄ 液 3.0 ml, 振荡提取 15 min, 离心 7 min, 取上清液 2.0 ml, 转移到另一旋盖试管中, 加 5 mol/L KOH 溶液 0.7 ml 调至 pH 13, 再加 NaCl 1.2 g 盐析, 准确加二苯胺乙醚液 2.0 ml, 振荡提取 15 min, 离心 7 min, 取醚层 1.5 ml, 加无水 Na₂SO₄ 0.1 g, 进样 2.0 μl, GC 分析。

B. 直接碱化醚提法: 加 0.65 mol/L KOH 液 2 ml 和 NaCl 1.2 g, 准确加二苯胺乙醚液 2.0 ml, 振荡提取 15 min, 离心 7 min, 取醚层 1.5 ml, 加无水 Na₂SO₄ 0.1 g, 进样 2.0 μl, GC 分析。

两法提取后的水相继用 2 ml 内标乙醚提 15 min, 醚层室温吹氮挥发约 20 倍, 气相色谱分析, 未见残留麻黄生物碱, 说明 A, B 两法均可基本提尽, 测得 A, B 两法的结果见表 1, 两法提取效率基本一致, 而以直接碱化醚提法更为简便。

Tab 1. Comparison of different extraction methods

Species	Place of collection	Method	Content (%)					
			E	PE	NE	NPE	ME	MPE
<i>E. sinica</i>	Huainan	A	0.798	0.284	0.100	0.137	0.050	trace
Stapf	Hebei	B	0.805	0.276	0.102	0.142	0.053	trace
<i>E. intermedia</i>	Dingxi	A	0.133	0.794	0.031	0.135	0.011	0.006
Schr et Mey	Gansu	B	0.134	0.805	0.030	0.130	0.013	0.008
<i>E. likiangensis</i>	Ludian	A	0.640	0.617	0.050	0.160	0.026	trace
Florin	Yunnan	B	0.630	0.606	0.051	0.170	0.027	trace

E: Ephedrine; PE: Pseudoephedrine; NE: Norephedrine; NPE: Norpseudoephedrine; ME: Methylephedrine; MPE: Methylpseudoephedrine; A: Extraction by alkalinization of acidic extract of crude drug; B: Extraction by direct alkalinization of crude drug.

(三) 线性方程

精密称取 0.5 mg 麻黄碱类盐酸盐, 置 5 ml 量瓶中, 用甲醇定容。依据各碱在生药中的量, 设定所测定线性范围, 精密取伪麻黄碱和麻黄碱 9 ~ 185 μg; 去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱和甲基麻黄碱 5 ~ 60 μg; 以上范围内取 7 个浓度点 (按游离碱计), 每一浓度平行三份, 将对照品溶液置试管中室温吹氮挥去甲醇, 以下按直接碱化醚提法, 从加 0.65 mol/L KOH 溶液 2.0 ml 做起。以每一浓度的三次平均测得值计算对照品与内标面积比值 (y); x 值为对照品与内标重量之比, 计算线性方程, 相关系数, 结果见表 2。GC 分离结果见图 1 和表 3。将以上对照品提取液冷藏, 连续测定 3 天, 其回归方程重现性较好。

Tab 2. Data of calibration curve

Alkaloid	Regression equation $y = a + bx$	Correlation coefficient	Linear range (ng)
Ephedrine	$y = -0.280 - 1.307x$	0.9991	9 ~ 160
Pseudoephedrine	$y = -0.280 - 1.050x$	0.9990	9 ~ 185
Norephedrine	$y = -0.025 + 0.680x$	0.9997	5 ~ 60
Norpseudoephedrine	$y = -0.081 + 0.540x$	0.9993	5 ~ 60
Methylephedrine	$y = -0.036 + 1.357x$	0.9992	5 ~ 60

Tab 3. The retention time of *Ephedra* alkaloids

Alkaloid	NPE	NE	E	PE	ME	MPE
t_R (min)	13.547	13.735	15.821	15.965	17.048	17.410
t_R (i)/ t_R (s)	0.678	0.688	0.792	0.800	0.854	0.872

NPE: Norpseudoephedrine; NE: Norephedrine; E: Ephedrine;

PE: Pseudoephedrine; ME: Methylephedrine; MPE: Methylpseudoephedrine.

(四) 加样回收试验

精密取以上标准品甲醇溶液, 相当于各游离碱 20 μ g, 60 μ g 置 10 ml 试管中, 室温吹氮挥去甲醇, 准确加入 25 mg 生药粉末, 用直接碱化醚提法提取, 平行 3 份, 等量生药样品随行, 按线性方程计算, 扣除生药中各碱量, 以测得量与加入量比较, 计算回收率, 平均回收率见表 4, 两量回收率值间误差变异系数小于 5% ($n = 6$).

(五) 最小检出量

将标准品溶液稀释, 测得本实验选用气相色谱条件下最小检出量 (表 4), 各碱均可在 2 ng 之内检出。

Tab 4. Results of recovery and detection limit ($n = 6$)

Alkaloid	Recovery (%)	Detection limit (ng)
Ephedrine	98.8	1
Pseudoephedrine	97.9	1
Norephedrine	100.1	2
Norpseudoephedrine	98.3	2
Methylephedrine	96.6	0.5

(六) 生药样品分析

精密称取麻黄生药粉末 (40 目), 置 10 ml 旋盖试管中, 加入 0.65 mol/L KOH 溶液 2 ml 和 1.2 g NaCl, 再准确加二苯胺内标乙醚液 2 ml, 加盖, 置振荡器振荡提取 15 min, 离心 7 min (3500 r/min), 吸取醚层 1.5 ml, 加 0.1 g 无水 Na_2SO_4 干燥, 进样 2 μ l 进行气相色谱分析, 平行 2 份, 两次测得组分与内标面积比平均值 (A_s/A_{is}), 代入线性方程, 以下

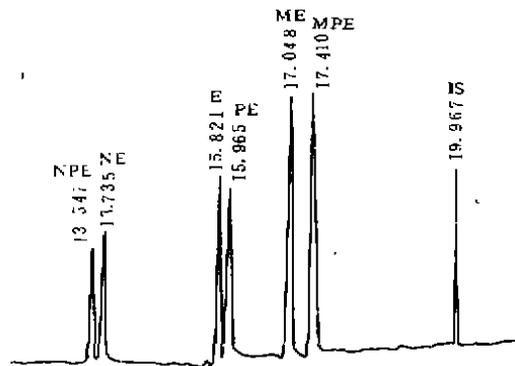


Fig 1. Chromatogram of *Ephedra* alkaloids. NPE: Norpseudoephedrine; NE: Norephedrine; E: Ephedrine; PE: Pseudoephedrine; ME: Methylephedrine; MPE: Methylpseudoephedrine; IS: Diphenylamine as internal standard.

式计算组分百分含量 (W%)。

$$W\% = 2(As/Ais - a)/bWs$$

a: 截距; b: 斜率; Ws: 称样量 (mg)

用本法分析比较了我国十六个产地的十二种麻黄中六种生物碱含量, 结果见表 5。部分样品的色谱分离情况见图 2。

Tab 5. Contents of *Ephedra* alkaloids in *Ephedrae herba*

Chinese name	Species	Place of collection	Content (%)						Total
			NPE	NE	E	PE	ME	MPE	
卓麻黄	<i>E. sinica</i>	Datong, Shanxi	0.110	0.040	0.760	0.280	0.069	trace	1.259
	Stapf	Huainan, Hebei	0.142	0.102	0.805	0.276	0.053	trace	1.378
木贼麻黄	<i>E. equisetina</i>	Zhaosu, Xinjiang	0.155	0.198	1.250	0.580	0.025	-	2.208
中麻黄	<i>E. intermedia</i>	Urumchi, Xinjiang	0.111	0.075	0.550	0.912	0.026	-	1.674
	Schr et	Datong, Qinghai	0.113	0.063	0.140	0.798	0.013	0.009	1.136
	Mey.	Dingxi, Gansu	0.130	0.030	0.134	0.805	0.013	0.008	1.120
西藏中麻黄	<i>E. intermedia</i> var. <i>tibetica</i>	Jiacha, Xizang	0.026	0.040	1.150	0.084	0.170	-	1.470
丽江麻黄	<i>E. likiangensis</i>	Ludian, Yunnan	0.170	0.051	0.630	0.606	0.027	trace	1.484
单子麻黄	<i>E. monosperma</i>	Abazhou, Sichuan	0.330	0.180	1.401	0.860	0.054	0.005	2.830
异株矮麻黄	<i>E. minuta</i> var. <i>dworca</i>	Kangding, Sichuan	0.069	0.075	0.722	0.235	0.041	trace	1.142
	Cheng	Daofu, Sichuan	0.016	0.047	0.371	0.220	0.054	-	0.708
山岭麻黄	<i>E. gerardiana</i>	Lhasa, Xizang	0.074	0.078	0.765	0.101	0.040	trace	1.058
藏麻黄	<i>E. saxatilis</i>	Lhasa, Xizang	0.023	0.063	0.590	0.050	0.063	-	0.798
窄膜麻黄	<i>E. tomatolepis</i>	Kashu, Xinjiang	0.320	0.037	0.167	0.830	0.005	trace	1.359
斑叶麻黄	<i>E. lepidosperma</i>	Mt. Helan, Ningxia	0.007	0.005	0.012	0.017	0.001	trace	0.042
膜果麻黄	<i>E. przewalskii</i>	Qitai, Xinjiang	0.005	0.003	0.029	0.006	0.003	-	0.046

Notes: "-" means undetected, NPE: Norpseudoephedrine; NE: Norephedrine; EP: Ephedrine; PE: Pseudoephedrine; ME: Methylephedrine; MPE: Methylpseudoephedrine.

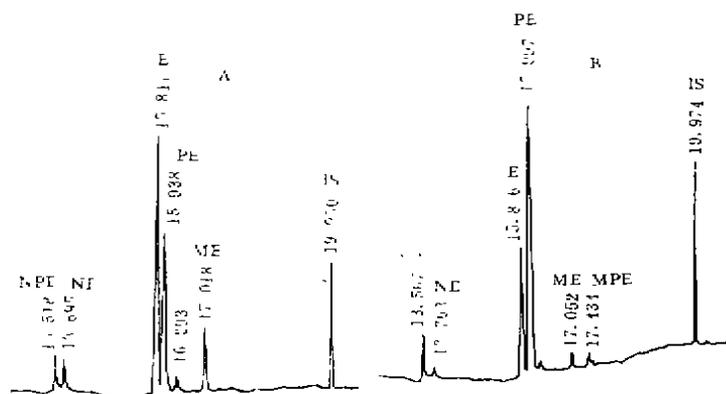


Fig 2. Chromatogram of alkaloids in Ephedrae herba (A. *E. sinua* Stapf, Huaian, Hebei; B. *E. intermedia* Schr et Mey., Dingxi, Gansu). NPE: Norpseudoephedrine; NE: Norephedrine; E: Ephedrine; PE: Pseudoephedrine; ME: Methylephedrine; MPE: Methylpseudoephedrine; IS: Diphenylamine as internal standard.

结果与讨论

一、本文方法较好地分离和测定了麻黄中六种生物碱，气相色谱图见图 1 ~ 2。

二、本文比较了酸水碱化醚提法和直接碱化醚提法，并作了残留量检查，提出了一个好的方法，即直接碱化醚提法，不仅简化了操作步骤，同时减少了由于大量醚的加热回收而使热敏感的、易挥发的麻黄生物碱破坏和损失。同理在挥去少量溶媒时宜用室温吹氮的方式。对照品溶液也宜冷藏。

三、采用内标法，分析结果的重现性较好，线性方程在月内测得结果一致，在此期间进行样品分析一般不需重复线性方程，必要时可核对其中几个浓度。由于麻黄碱和伪麻黄碱在生药中的量分布不一致，故取线性方程范围较宽。甲基伪麻黄碱对照品经 GC/MS 鉴定和 GC 测定，证明已部分转化为甲基麻黄碱，考察其线性方程大致接近于甲基麻黄碱，故采用甲基麻黄碱方程计算。

四、本文测定的生药样品均先用气质联用法，鉴定其中六个生物碱的存在，然后测定含量。我国 16 个产地的 12 种麻黄中六个生物碱含量的测定结果，与文献报道的高效液相色谱法^[1]的结果基本一致。由于本文的方法灵敏度高，可准确测定文献报道为痕量或未检出的甲基麻黄碱或甲基伪麻黄碱。对于部分生物碱含量极低的麻黄样品（如斑茅麻黄、膜果麻黄）可将提取液吹氮浓缩 20 倍，再进行测定。

五、通过加样回收试验，说明生药粉末的存在不干扰生物碱的回收量，虽线性方程实验以碱水为空白，但与在生药情况下结果基本一致。提取离心后，生药粉末分布于水相，不干扰测定。

六、氮磷检测器铷盐对水敏感，故在醚提取液中加少量无水硫酸钠可起脱水作用。

参 考 文 献

1. 张建生等. 十二种国产麻黄的品质评价. 药学报 1989; 24: 865.
2. 桥本庸平, 他. マオ - 中 *L*-ephedrine あよび *D*- ψ -ephedrine の薄层クロマトグラフィーによる分離定量. 薬学雑誌 1977; 97: 594.
3. Yamasaki K, et al. Separation and quantitative analysis of *Ephedra* alkaloids by gas chromatography and its application to evaluation of some *Ephedra* species collected around Himalaya. *Chem Pharm Bull* 1974; 22: 2898.
4. Sagara K, et al. A simultaneous determination of norephedrine, pseudoephedrine, ephedrine and methylephedrine in *Ephedrae herba* and oriental pharmaceutical preparations by ion-pair high performance liquid chromatography. *Ibid* 1983; 31: 2359.
5. Moriyasu M, et al. High performance liquid chromatographic determination of organic substances by metal chelate derivatization. III. Analysis of *Ephedra* bases. *Ibid* 1984; 32: 744.

DETERMINATION OF SIX EPHEDRA ALKALOIDS IN CHINESE EPHEDRA (MA HUANG) BY GAS CHROMATOGRAPHY

JF Cui, CQ Niu and JS Zhang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050; * School of Pharmacy, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT Six *Ephedra* alkaloids, namely ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine, norpseudoephedrine, methylephedrine and methylpseudoephedrine, in 12 species of Chinese *Ephedra* were successfully separated and determined by gas chromatography with the highly specific and sensitive nitrogen phosphorus detector (GC/NPD). The column used (HP-5) had a cross linked 5% phenylmethylsilicone phase. Diphenylamine was used as the internal standard to check the reproducibility of the extraction yields of the alkaloids, the stability of the detector response and to quantify the alkaloids. The contents of the six alkaloids were calculated according to their regression equations.

The way for the preparation of crude drug samples was improved, the diethyl ether extract of the alkalinized crude sample was directly analysed by GC.

The method is simple, rapid and sensitive. The results are in agreement with those of the HPLC method.

Key words *Ephedrae herba*; *Ephedra* alkaloids; GC/NPD