

# 尿中麻黄碱类药物的气相色谱检测法

李 临 崔建芳 崔凯荣\* 周 屹\* 王慕邹

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050; \* 国家体委运动医学研究所, 北京100061)

麻黄碱及其类似物有兴奋作用, 属体育比赛禁用药。这类化合物的化学结构相似, 故有相似的鉴别特征。本文报道了以气相色谱对尿中麻黄碱(ephedrine)、甲基麻黄碱(methylephedrine)、乙基麻黄碱(ethylephedrine)、去甲麻黄碱(norephedrine)及去甲伪麻黄碱(cathine)进行检测, 最后以气质联用法进行确证。本法操作简便, 灵敏度高, 结果可靠。

## 实 验 部 分

### 一. 仪器和药品

气相色谱仪 Hewlett Packard (HP) 5890A, 氮磷检测器(NPD), 带有 HP 3393 A 积分仪和7673A 自动进样器; 气相色谱 HP 5890A—质谱检测器 HP 5970B, 带有 300 型计算机和 7673A 自动进样器; 干热浴装置 Pierce Reacti-Therm™; 康氏振荡器(江苏盐城龙岗医疗仪器厂); 盐酸麻黄碱(Fluka); 盐酸甲基麻黄碱(Serva); 盐酸乙基麻黄碱(南朝鲜兴奋剂控制实验室); 盐酸去甲麻黄碱(Serva); 三氟醋酐(Merck); 盐酸去甲伪麻黄碱(Serva); 二苯胺(Serva); 奋乃静(Serva)。乙醚、乙酸乙酯、甲醇为分析纯, 并经过重蒸; 氯化钠、氢氧化钾和无水硫酸钠为分析纯。

### 二. 实验方法

#### (一) 样品处理

1. 取尿样 5 ml, 置于 10 ml 带盖试管中, 滴加 5 mol/L KOH 溶液调至 pH 10, 加入固体 NaCl 3 g、二苯胺乙醚溶液(10 ppm) 2 ml, 拧紧瓶盖, 勿使泄漏, 置康氏振荡器上振荡 10 min, 再以 4000 r/min 速率离心 5 min, 将上清液转移至小瓶, 加 0.1 g 无水硫酸钠, 封口, 留待进样。

2. 同上操作, 但将离心后所得上清液移入 5 ml 带盖试管(盖内衬有聚四氟乙烯垫), 室温下缓缓吹氮使干, 向管中加入三氟醋酐—乙酸乙酯溶液(1:1) 200  $\mu$ l。拧紧盖子, 旋涡混合后, 置 70  $^{\circ}$ C 热浴上反应 20 min 后, 以干燥氮气流吹干, 向管中加入 0.5 ml 吩噻嗪内标溶液, 溶解后吸入小瓶, 封口, 进样。

#### (二) 色谱条件及仪器参数

1. 气相色谱 色谱柱 HP -5, 长 17 m, 内径 0.2 mm, 膜厚 0.33  $\mu$ m, 载气 He, 2.0 ml/min; 升温方法: 100  $^{\circ}$ C, 维持 1 min, 以 10  $^{\circ}$ C/min 速率升至 200  $^{\circ}$ C, 继以 20  $^{\circ}$ C/min 速率升至 300  $^{\circ}$ C, 维持 4 min, 总时间为 21 min; 检测器 NPD; 检测器参数: 温度 300  $^{\circ}$ C,

H<sub>2</sub> 流速 3.5 ml/min, 空气流速 100 ml/min, 尾吹气 27 ml/min; 进样口温度 250 °C; 分流比 1:10。

2. 气质联用 色谱柱 HP-5, 长 25 m, 内径 0.2 mm, 膜厚 0.33 μm; 载气 He, 0.95 ml/min; 接口温度 280 °C; 进样口温度 250 °C; 质量扫描范围 50 ~ 500。

## 结 果

### 一. 各标准品在 GC 和 GC-MS 上的分离情况

标准品混合进样所得气相色谱图见图 1, 色谱峰 1 至 7 依次为去甲伪麻黄碱、去甲麻黄碱、麻黄碱、甲基麻黄碱、乙基麻黄碱、内标物二苯胺。各标准品单独进样均得单峰。

标准品混合进样于 GC-MS, 所得总离子流图见图 2。峰 1 至 5 依次为去甲伪麻黄碱和去甲麻黄碱、麻黄碱、甲基麻黄碱、乙基麻黄碱和内标物二苯胺。去甲伪麻黄碱和去甲麻黄碱未分开。

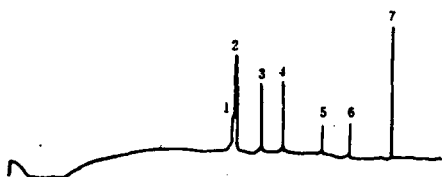


Fig 1. The chromatogram of standards. 1. Cathine; 2. Norephedrine; 3. Ephedrine; 4. Methylephedrine; 5. Ethylephedrine; 6. Impurity; 7. Diphenylamine (IS).

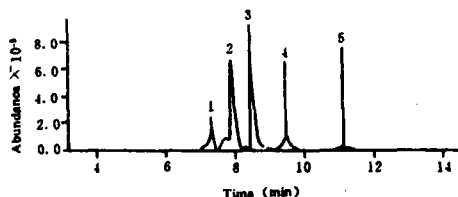


Fig 2. The total ion chromatogram of standards. 1. Cathine-Norephedrine; 2. Ephedrine; 3. Methylephedrine; 4. Ethylephedrine; 5. Diphenylamine (IS).

### 二. 回收率

取两份 50 μl 标准品贮备液 (分别含麻黄碱、甲基麻黄碱、乙基麻黄碱、去甲麻黄碱和去甲伪麻黄碱盐酸盐约 0.75 mg/ml), 分置 10 ml 旋盖试管中, 在干燥氮气流下挥干。一管加入 5 ml 空白尿, 按样品处理步骤 1 操作; 另一管加入 1 ml 蒸馏水、0.5 g 氯化钠, 滴加 5 mol/L KOH 溶液使 pH 至 10, 用乙醚萃取 3 次, 每次 2 mL。合并醚液, 室温下用干燥氮气小心吹干, 残留物以 2 ml 内标溶液溶解, 进样。结果见表 1。

### 三. 检测限

以 S/N=2 计算检测限。各药尿中检测限均低于 200 ng/ml 尿, 故较为满意。结果见表 2。

### 四. 保留时间

GC 及 GC-MS 的保留时间见表 3。

### 五. 样品的 TFA 衍生化

用三氟醋酐 (TFAA) 可将去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱和麻黄碱分子中的 -NH<sub>2</sub> 或 >NH 基团衍生化生成  $\text{>N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CF}_3$ , 这样既可以改善色谱峰的对称性, 增加检测灵敏度, 也为鉴别提供了更多的信息。表 4 为各衍生物的保留时间。

**Tab 1. The recoveries (n = 3)**

Compound	Amount added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Amount measured ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%)	Average (%)	CV (%)
Ephedrine	30.1	30.7	102	98.6	.05
		29.5	98.1		
		28.6	95.2		
Methylephedrine	31.6	36.0	114	111	2.00
		34.4	109		
		35.1	111		
Ethylephedrine	34.2	32.7	95.6	101	4.30
		34.9	102		
		36.2	106		
Norephedrine	31.1	28.2	90.8	88.3	6.14
		29.3	94.3		
		24.8	79.9		
Cathine	30.8	26.9	87.4	91.1	2.70
		28.4	92.1		
		28.9	93.9		

**Tab 2. The detection limits (n = 3)**

Item	Ephedrine	Methylephedrine	Ethylephedrine	Norephedrine	Cathine
Standard (ng/ml)	521	419	260	217	490
Drug in urine (ng/ml urine)	208	167	104	86.7	106

**Tab 3. The retention times on GC and GC-MS (n = 2)**

Item	Ephedrine	Methylephedrine	Ethylephedrine	Norephedrine	Cathine	Epinephrine	
GC	RT	5.996	6.530	7.466	5.414	5.365	9.063
	RRT	0.6616	0.7205	0.8238	0.5974	0.5920	1.000
GC-MS	RT	7.902	8.477	9.457	7.287*	7.221*	11.135
	RRT	0.7097	0.7613	0.8493	0.6544	0.6485	1.000

\* Obtained from separate injections

**Tab 4. The retention times of TFA-derivatives (n = 2)**

Item	Norephedrine	Cathine	Ephedrine	Phenazine (IS)
GC	RT	5.435	5.385	10.300
	RRT	0.527	0.522	1.000
GC-MS	RT	7.099	7.052	10.170
	RRT	0.703	0.693	1.000

## 六. 乙基麻黄碱阳性尿的测定

按样品操作步骤 1 处理尿样得气相色谱图, 见图 3。图中峰 1 至 4 依次为去甲麻黄碱、麻黄碱、去甲基麻黄碱和乙基麻黄碱。峰 5 为内标二苯胺。同时亦可按步骤 2 处理样品, 将其中的去甲麻黄碱、麻黄碱和去甲基麻黄碱做成 TFA 衍生物, 其质谱图见图 4。

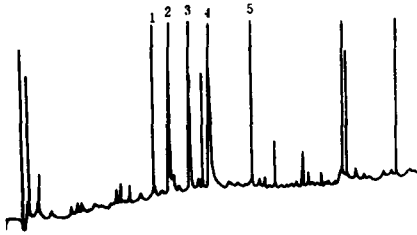


Fig 3. The chromatogram of an ethylephedrine<sup>+</sup> positive urine sample. 1. Norephedrine; 2. Ephedrine; 3. Norethylephedrine; 4. Ethylephedrine; 5. Diphenylamine (IS).

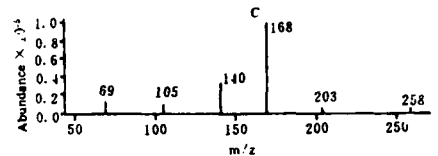
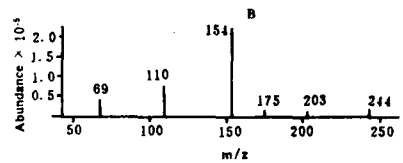
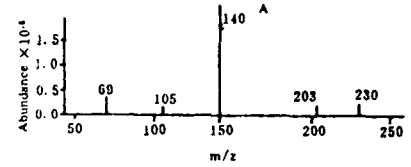


Fig 4. Mass spectrum of norephedrine - TFA (A), ephedrine - TFA (B) and norethylephedrine - TFA (C).

## 讨论

一. NPD 作为 GC 的检测器可以大大增加含氮化合物的灵敏度, 较之 FID 约高 50 倍<sup>(1)</sup>, 且因其高度选择性可以减少溶剂峰拖尾, 从而简化图谱。NPD 的响应受铂珠加热电流和 H<sub>2</sub> 流速影响较大, 一般铂珠加热电流不宜过高, 否则不仅不能降低最低检测限, 还会增大基线噪音。在一定范围内, 氢气流速减小, 检测灵敏度增加<sup>(2)</sup>。

二. 由图 1 可见, 去甲麻黄碱和去甲伪麻黄碱未完全分离, 其它分离度均满意。去甲麻黄碱与去甲伪麻黄碱为光学异构体, 在普通色谱条件下较难分离完全。180 °C 恒温条件下测得柱效为 3400 塔板 /m (以二苯胺为基准物), 故较满意。

由图 2 可见, 去甲麻黄碱和去甲伪麻黄碱分离度为零。180 °C 恒温条件下, 以内标物二苯胺为基准物测得柱效为 1990 塔板 /m。显然, 由于质谱仪的高真空抽气作用, 柱效降低, 致使去甲麻黄碱和去甲伪麻黄碱不能达到分离。

三. 由于本法提取溶剂为乙醚, 故进样时室温应低于 25 °C。实验表明, 当室温为 27 °C 时, 靠近进样口的上部空间温度为 39 °C, 因此往往导致进样失败。

四. 麻黄碱类药物可循一定的代谢途径在人体内进行一定程度的相互转变。在乙基麻黄碱阳性尿中 (图 3), 不仅可以见到母体药物, 也可见到其代谢产物麻黄碱、去甲麻黄碱和去甲基麻黄碱。

本法操作简便、快速、灵敏、可靠, 可用于对运动员进行尿样分析。

关键词 麻黄碱; 甲基麻黄碱; 乙基麻黄碱; 去甲麻黄碱; 去甲伪麻黄碱; 气相色谱; 气质联用

### 参 考 文 献

1. Kolb B, et al. Reaction mechanism in an ionization detector with tunable selectivity for carbon, nitrogen and phosphorus. *J Chromatogr Sci* 1977; 15: 53.
2. Zhang LF, et al. *Proceedings of Sino-West German Symposium On Chromatography*. Beijing: Science Press, 1983: 253.

## THE IDENTIFICATION OF EPHEDRINE AND ITS ANALOGUES IN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

L Li, JF Cui, KR Cui\*, Y Zhou\* and MZ Wang

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050; \*National Institute of Sports Medicine, the Sports Committee of China, Beijing 100061)

**ABSTRACT** A sensitive and reliable method of analysis for ephedrine and its analogues was established by using GC and GC-MS. The columns used for both GC and GC-MS were HP-5, and the carrier gas was helium. NPD was used as the detector for GC. The urine sample was extracted with ether and submitted to GC. If positive, it was then submitted to GC-MS to identify its structure. The detection limits for ephedrine and its analogues are lower than 200 ng/ml urine. The recoveries are above 80%.

**Key words** Ephedrine; Methylephedrine; Ethylephedrine; Norephedrine; Cathine; GC; GC-MS