

基于中空纤维液相微萃取的麻黄碱和伪麻黄碱 优势构象的确定及含量测定

陈璇, 白小红*, 王晓, 王婧, 卜玮

(山西医科大学药学院, 山西太原 030001)

摘要 利用中空纤维液相微萃取方法(HF-LPME)分析麻黄碱和伪麻黄碱在不同基质中的优势构象,阐明了麻黄碱和伪麻黄碱的萃取机理;结合高效液相色谱(HPLC)建立了微量麻黄碱和伪麻黄碱的分离测定方法。以聚偏氟乙烯中空纤维为有机溶剂载体,正己醇为萃取溶剂,麻黄碱和伪麻黄碱的NaOH(5 mol/L)溶液为样品相,0.01 mol/L H₂SO₄溶液为接收相,在1 200 r/min转速下萃取35 min,收集萃取液直接进行HPLC分析。麻黄碱和伪麻黄碱在水溶液中的线性范围为5~100 μg/L,检出限分别为1.9 μg/L和1.2 μg/L,富集倍数分别为38和61倍,平均回收率分别为100.6%±1.2%和103.2%±3.5%;在鼠尿液中的线性范围为100~5×10⁴ μg/L,检出限分别为30 μg/L和42 μg/L,富集倍数分别为20和17倍,平均回收率分别为108.4%±4.4%和106.1%±5.4%。研究表明该方法操作简单,选择性高,适用于微量麻黄碱的含量测定和分析。

关键词 中空纤维液相微萃取;优势构象;萃取机理;麻黄碱;伪麻黄碱;草麻黄;鼠尿

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)12-1144-06

Analysis of the preferred conformations and determination of the concentrations of ephedrine and pseudoephedrine based on hollow fiber liquid-phase microextraction

CHEN Xuan, BAI Xiaohong*, WANG Xiao, WANG Jing, BU Wei

(Department of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: The preferred conformations of the ephedrine and pseudoephedrine in *Ephedra sinica Stapf* and rat urine were analyzed by the hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) and their extraction mechanisms were illuminated. The method of the separation of the ephedrine and pseudoephedrine and the determination of their concentrations with high performance liquid chromatography (HPLC) were established. The optimal experimental conditions were as follows: the organic phase carrier was the hollow fiber of polyvinylidene fluoride (MOF-503), organic solvent was *n*-hexanol, the extraction time was 35 min, the stirring rate was 1 200 r/min, the sample phase was the NaOH solution (5 mol/L) of the analyte, the acceptor was 0.01 mol/L H₂SO₄ solution. The extracts were analyzed by HPLC. Under the optimal conditions, the method is convenient and highly sensitive. In *Ephedra sinica Stapf*, the linear ranges of ephedrine and pseudoephedrine were 5–100 μg/L, the detection limits were 1.9 μg/L and 1.2 μg/L and the enrichment factors were 38 and 61, respectively. The average recoveries of ephedrine and pseudoephedrine were 100.6%±1.2% and 103.2%±3.5%, respectively. In rat urine, their linear ranges were 100–5×10⁴ μg/L, the detection limits were 30 μg/L and 42 μg/L and the enrichment factors were 20 and 17, respectively. In rat urine, their average recoveries were 108.4%±4.4% and 106.1%±5.4%, respectively. The obtained results indicated that the method can be successfully applied for the extraction and determination of the ephedrine and pseudoephedrine in *Ephedra sinica Stapf* and rat urine.

* 通讯联系人:白小红, 硕士, 教授, 研究方向为复杂样品的提取、分离与富集和体内药物及代谢物分析。E-mail: bxh246@163.com.
基金项目:山西省自然科学基金(No. 2007011086)和山西医科大学创新基金。

收稿日期:2010-09-02

Key words : hollow fiber liquid-phase microextraction ; preferred conformation ; extraction mechanism ; ephedrine ; pseudoephedrine ; *Ephedra sinica* Stapf ; rat urine

麻黄碱(ephedrine)和伪麻黄碱(pseudo-ephedrine)是临床上常用的肾上腺素受体激动剂,具有中枢兴奋作用和很强的抗炎、利尿作用^[1]。近年来,随着麻黄碱类药物导致心脏病、麻痹等一系列副作用事件的报道,麻黄碱类药物的安全性引起人们的关注^[1,2]。因此,研究生物样品中麻黄碱类药物不同构象的比率及其与生物大分子的结合能力,建立高灵敏度测定微量游离麻黄碱含量的方法具有重要意义。目前麻黄碱和伪麻黄碱的分离和构象分析主要侧重于结构研究,而不同基质对药物构象的影响均未作报道^[3-5]。中空纤维液相微萃取^[6-9](hollow fiber liquid-phase microextraction, HF-LPME)是近年发展起来的一种浓缩倍数大、操作简单、快捷、廉价的新型样品前处理技术,主要包括两相中空纤维液相微萃取(2p-HF-LPME)和三相中空纤维液相微萃取(3p-HF-LPME)。目前, HF-LPME 已成功应用于中药有效成分^[10-12]和生物样品中药物及其代谢产物^[13,14]的分离、纯化和浓缩。本文在 3p-HF-LPME 的优化条件下,结合高效液相色谱法(HPLC)阐述了麻黄碱和伪麻黄碱在不同基质中可能的优势构象及其构象变化,讨论和分析了麻黄碱和伪麻黄碱可能的萃取机理;建立了测定药材麻黄和尿样中微量麻黄碱和伪麻黄碱含量的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1200, G1314B 紫外检测器),自制液相微萃取装置,中空纤维(聚偏氟乙烯:型号 MOF 503,内径 0.8 mm,孔径 0.2 μm ;聚偏氟乙烯:型号 MIF 503,内径 0.8 mm,孔径 0.1 μm ;聚醚砜:型号 UEIS 503,内径 0.8 mm,孔径 0.2 μm ;聚砜:型号 UPIS 503,内径 0.8 mm,孔径 0.2 μm ,天津膜天膜工程技术有限公司)。盐酸麻黄碱(批号 171237-200505)、盐酸伪麻黄碱(批号 171241-200506)均为中国生物制品检定所化学对照品。麻黄药材为麻黄科植物麻黄草,产地为内蒙古。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的配制

精密称取盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品各 2 mg,用蒸馏水溶解于 100 mL 容量瓶中,配制成质

量浓度为 20 mg/L 的麻黄碱和伪麻黄碱混合对照品溶液,避光保存。

1.2.2 中药样品的制备

取药材麻黄草细粉约 0.4 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 40 mL 1 mol/L 盐酸-20% 乙醇(1:10, v/v)混合溶液,浸泡 12 h,超声处理(功率 100 W,频率 40 kHz)1 h,冷却,过滤,将滤液收集在 100 mL 容量瓶中,残渣中加入 40 mL 1 mol/L 盐酸-20% 乙醇(1:10, v/v)混合溶液重复操作 1 次。合并滤液,用 1 mol/L 盐酸-20% 乙醇(1:10, v/v)混合溶液稀释至刻度^[1]。用蒸馏水稀释 10^4 倍即得药材供试品溶液。

1.2.3 大鼠尿样的采集与制备

雄性 Wistar 大鼠(200 \pm 5.5) g,置于代谢笼中,禁食 12 h 收集空白尿样,然后胃饲麻黄碱和伪麻黄碱对照品各 1 mg,连续收集 24 h 尿液,过滤处理,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

1.2.4 实验步骤

将 2.5 mL 平底玻璃管固定于磁力搅拌器上,加入盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的氢氧化钠(5 mol/L)溶液 1.5 mL,将两根洗净并吹干的中空纤维(10 cm)浸泡在正己醇中 30 s 后取出,用注射器吹出纤维管腔内多余的正己醇,并以 0.01 mol/L 硫酸溶液(50 μL)作为接收相注满管腔;将其弯曲成 U 形,浸入样品相溶液中,在 1200 r/min 搅拌速度下萃取 35 min,收集接收相,供 HPLC 分析。

1.2.5 HPLC 条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相:乙腈-0.1% 磷酸溶液(3:97, v/v);流速:1.0 mL/min;检测波长 210 nm;进样量 20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 3p-HF-LPME 条件的选择

2.1.1 中空纤维的选择

考察了聚偏氟乙烯、聚砜、聚醚砜中空纤维在水和尿液中对麻黄碱和伪麻黄碱萃取效率的影响,结果如图 1 所示。4 种型号的纤维萃取效率依次为 MOF 503 聚偏氟乙烯 > MIF 503 聚偏氟乙烯 > UPIS 503 聚砜 > UEIS 910 聚醚砜。故选取 MOF 503 聚偏氟乙烯纤维作为有机溶剂载体。

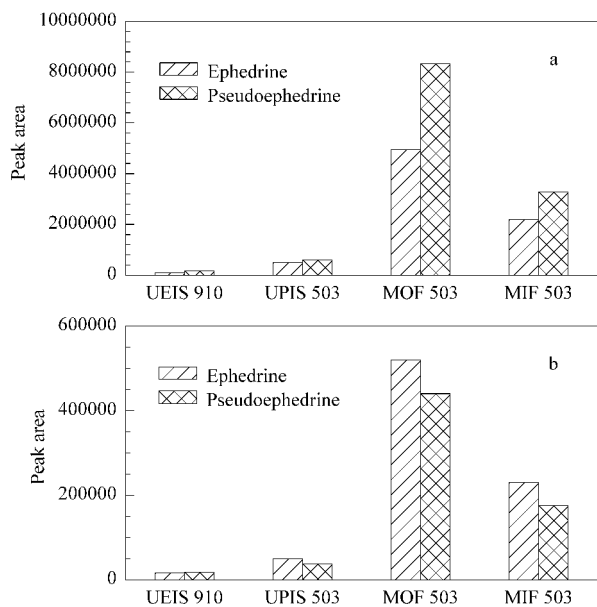


图 1 中空纤维类型对萃取效率的影响

Fig. 1 Effect of hollow fiber types on the extraction efficiency

a. 50 µg/L ephedrine and pseudoephedrine in water ; b. 1 mg/L ephedrine and pseudoephedrine in rat urine.

2.1.2 有机溶剂的选择

考察了醇、烷烃及芳烃类等 30 余种有机溶剂对水和尿液中麻黄碱和伪麻黄碱萃取效率的影响,结果见图 2。可见正构醇的萃取效率远高于其他有机

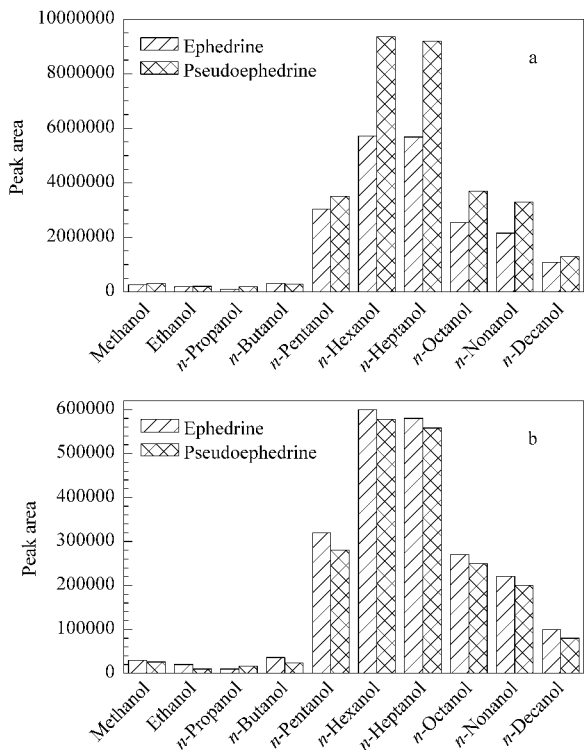


图 2 正构醇类型对萃取效率的影响

Fig. 2 Effect of *n*-alkanol types on the extraction efficiency

The a and b are the same as in Fig. 1.

溶剂,小分子醇的萃取效率低,长链醇的萃取效率高,其中以正己醇最高,之后随着碳原子数的增加,萃取效率逐渐降低。故选择正己醇为萃取溶剂。

2.1.3 样品相中氢氧化钠浓度的选择

考察了样品相中氢氧化钠浓度对水和尿液中两分析物萃取效率的影响,结果见图 3。当氢氧化钠浓度小于 5 mol/L 时,萃取效率随着浓度的增大明显提高,当氢氧化钠浓度大于 5 mol/L 时,萃取效率不再增加。故选择样品相中的氢氧化钠浓度为 5 mol/L。

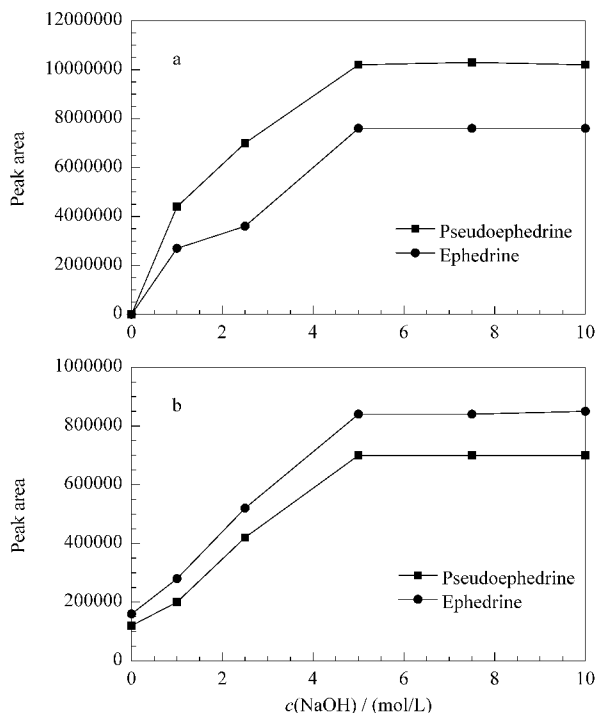


图 3 样品相中氢氧化钠浓度对萃取效率的影响

Fig. 3 Effect of the NaOH concentration in sample phase on the extraction efficiency

The a and b are the same as in Fig. 1.

2.1.4 接收相的选择

考察了接收相分别为 0.001 ~ 1.0 mol/L 的盐酸、醋酸、硫酸、磷酸溶液时对分析物萃取效率的影响。结果表明,硫酸溶液明显优于其他 3 种溶液,且浓度为 0.01 mol/L (pH 2) 时萃取效率最高。故选择 0.01 mol/L 硫酸溶液为接收相。

2.1.5 萃取时间的选择

考察了 0 ~ 90 min 的萃取时间对两分析物萃取效率的影响。结果表明,分析物在萃取 35 min 时达到平衡,之后随着萃取时间的延长萃取效率明显下降。故选择萃取时间为 35 min。

2.1.6 搅拌速度的选择

考察了搅拌速度为 300 ~ 1 800 r/min 时对萃取效率的影响。结果表明,随着搅拌速度的提高,萃取

效率逐渐增加,至 1 200 r/min 时萃取效率最高,之后逐渐下降。故选择搅拌速度为 1 200 r/min。

2.2 麻黄碱和伪麻黄碱含量测定的方法学考察

2.2.1 工作曲线及检出限

分别配制盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品混

合溶液质量浓度为 100、80、50、10、5 $\mu\text{g/L}$ 的水溶液和 5×10^4 、 1×10^4 、 1×10^3 、200、100 $\mu\text{g/L}$ 的尿液,按 1.2.4 节实验步骤操作,在最佳实验条件下对接收相进行 HPLC 分析,以分析物的峰面积(y)和其质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)进行线性回归,结果见表 1。

表 1 水和尿液中麻黄碱和伪麻黄碱的回归方程及检出限($n=5$)

Table 1 Regression equations and detection limits of ephedrine and pseudoephedrine in water and urine ($n=5$)

Sample	Analyte	Regression equation	r	Linear range/($\mu\text{g/L}$)	Detection limit/($\mu\text{g/L}$)
Water	ephedrine	$y = 246532x + 7158.1$	0.9953	5 - 100	1.9
	pseudoephedrine	$y = 302807x + 5667.3$	0.9958	5 - 100	1.2
Urine	ephedrine	$y = 426.12x - 25.413$	0.9929	$100 - 50 \times 10^4$	30
	pseudoephedrine	$y = 396.92x - 14.769$	0.9958	$100 - 50 \times 10^4$	42

y : peak area; x : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

2.2.2 加标回收率和精密度

精密量取 9 份适量的麻黄药材供试品溶液,分为 3 组,分别加入质量浓度为 10、50、80 $\mu\text{g/L}$ 的盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品溶液,配制成药材基质混合对照品溶液;精密量取两分析物对照品溶液适量置于代谢 24 h 的鼠尿中,分别配制成质量浓度为 200、 1×10^3 、 2×10^4 $\mu\text{g/L}$ 的生物基质混合对照品溶液。将上述两种基质混合对照品溶液按 1.2.4 节实验步骤操作,在最佳实验条件下萃取并进行 HPLC 分析,计算平均回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明,在药材麻黄中,麻黄碱和伪麻黄碱的平均回收率分别为 $100.6\% \pm 1.2\%$ 和 $103.2\% \pm 3.5\%$;在尿液中,麻黄碱和伪麻黄碱的平均回收率分别为 $108.4\% \pm 4.4\%$ 和 $106.1\% \pm 5.4\%$ 。

2.2.3 稳定性

分别精密量取盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品溶液适量置于水或空白尿液中,在 0 ~ 48 h 内不同时间按 1.2.4 节实验步骤操作,结果表明,麻黄碱和伪麻黄碱在两种基质中的稳定性均较好,在水中两者的 RSD 分别为 2.2% 和 1.8%,在尿液中的 RSD 分别为 6.0% 和 6.6%。

2.3 样品测定

2.3.1 麻黄药材中麻黄碱和伪麻黄碱的含量测定

取麻黄药材供试品溶液 3 份,按 1.2.4 节实验步骤操作,对接收相进行 HPLC 分析,结果见图 4a。经 3p-HF-LPME 浓缩富集后,麻黄碱和伪麻黄碱的富集倍数分别为 38 和 61 倍。纯水中麻黄碱和伪麻黄碱的质量浓度均为 50 $\mu\text{g/L}$ 时,左、右旋麻黄碱的含量之比(R/S)为 1/1.61;药材中两者的平均含量分别为 9.25 mg/g (RSD = 0.8%, $n=3$) 和 2.53 mg/g (RSD = 1.2%, $n=3$), R/S 为 3.66/1。

2.3.2 尿样中麻黄碱和伪麻黄碱浓度的测定

取模拟尿样或代谢 24 h 鼠尿,按 1.2.4 节实验

步骤操作,对接收相进行 HPLC 分析,结果见图 4b。经 3p-HF-LPME 浓缩富集后,麻黄碱和伪麻黄碱的富集倍数分别为 20 和 17 倍。模拟尿样中麻黄碱和伪麻黄碱的质量浓度均为 100 $\mu\text{g/L}$ 时, R/S 为 1.18/1;代谢尿样中两者的平均含量分别为 112 $\mu\text{g/L}$ (RSD = 1.9%, $n=3$) 和 109 $\mu\text{g/L}$ (RSD = 2.3%, $n=3$), R/S 为 1.03/1。

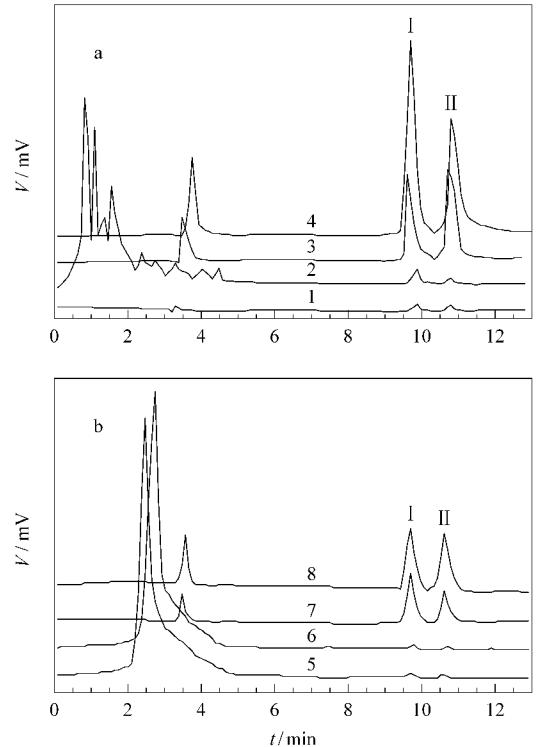


图 4 (a) 中药样品和 (b) 尿样的色谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms of (a) *Ephedra sinica Stapf* and (b) urine sample

1. not extracted reference substance solution (50 $\mu\text{g/L}$); 2. not extracted test articles solution of *Ephedra sinica Stapf*; 3. extracted reference substance solution (50 $\mu\text{g/L}$); 4. extracted test articles solution of *Ephedra sinica Stapf*; 5. not extracted analogue urine sample; 6. not extracted urine sample; 7. extracted urine sample; 8. extracted analogue urine sample.

I. ephedrine; II. pseudoephedrine.

2.4 麻黄碱和伪麻黄碱的 3p-HF-LPME 萃取机理

在 3p-HF-LPME 中正构醇分子可通过氢键形成由 4 或 6 个羟基组成的环状超分子^[15],其中正己醇的环状超分子与麻黄碱和伪麻黄碱的空间取向和性质匹配度最高,可形成稳定、致密的包结超分子化合物。当麻黄碱和伪麻黄碱与附着在聚偏氯乙烯中

空纤维壁上的正己醇形成包结超分子化合物的同时又与纤维壁上的 F 取代基相遇。F 具有强烈的吸电子性质,而麻黄碱和伪麻黄碱结构中的氨基和羟基的吸电子作用,使苯环缺电子,缺电子苯环与富电子的 F 可进一步形成电荷转移超分子^[11,12](见图 5),因此,提高了两分析物的萃取效率和浓缩倍数。

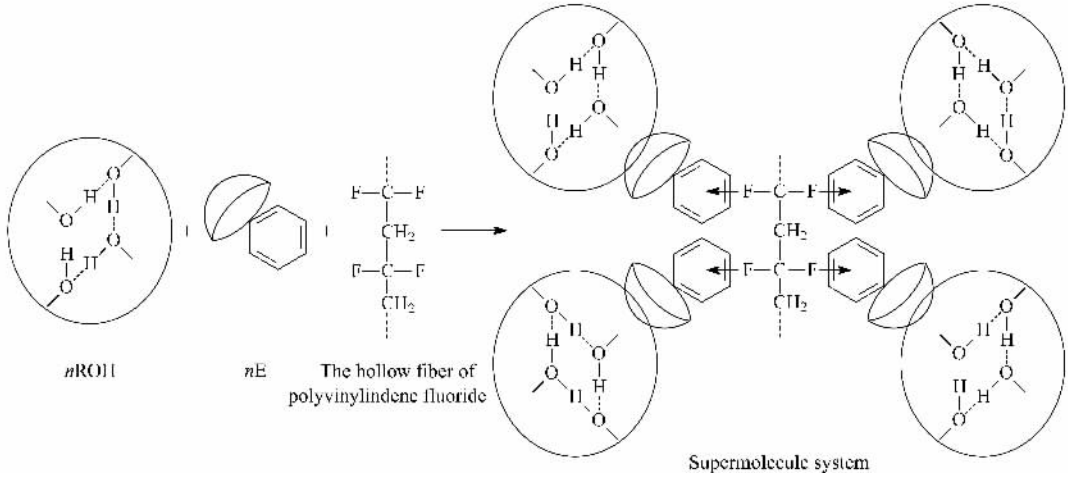


图 5 萃取过程中的超分子体系

Fig. 5 Supermolecule system in microextraction process

2.5 3p-HF-LPME 对麻黄碱和伪麻黄碱优势构象的确定

实验发现,在水中伪麻黄碱的 3p-HF-LPME 萃取效率总是高于麻黄碱,尿样中则相反(见图 1~3),即相同条件、不同样品基质对两分析物的萃取选择性完全不同。导致这一结果的原因可能是它们在空间构象(见图 6)上的差异。我们认为在水中麻黄碱的优势构象可能为 I 和 II,伪麻黄碱的优势构象可能为 III。构象 I 和 II 中的羟基和氨基处在邻位,可通过五元环形成分子内氢键,在萃取中不易与正己醇形成包结超分子化合物。如果考虑空间位阻

的影响,麻黄碱的优势构象应为 I;构象 III 中的羟基和氨基处在对位,能更大程度地与正己醇的羟基形成氢键,故提高了萃取效率和浓缩倍数。因此,在水中正构醇对伪麻黄碱的萃取选择性明显高于麻黄碱。而在生物基质中,生物大分子对在空间上存在微小差异的麻黄碱和伪麻黄碱有不同的立体选择性或亲和力,二者的优势构象可能发生转换。因此,在尿液中正构醇对麻黄碱的萃取选择性明显高于伪麻黄碱。我们用正构醇对等量麻黄碱和伪麻黄碱在水溶液($R/S = 1/1.61$)和模拟尿样($R/S = 1.18/1$)萃取后的 R/S 结果和代谢尿样($R/S = 1.03/1$)的 R/S

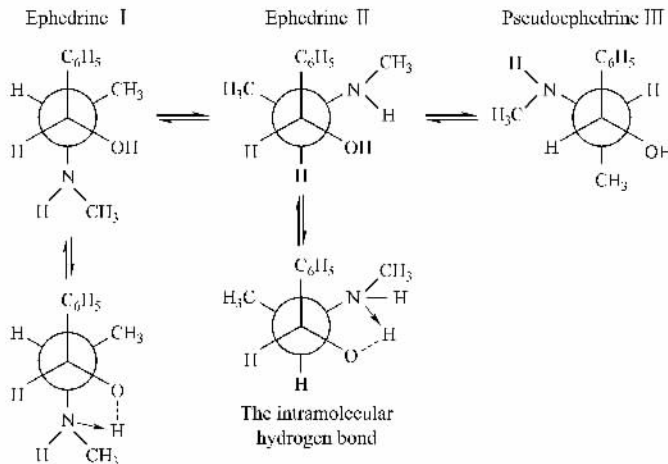


图 6 麻黄碱和伪麻黄碱的优势构象

Fig. 6 Preferred conformations of ephedrine and pseudoephedrine

结果比较,证实了生物大分子对 *R*、*S* 构象有一定的影响,二者可能发生转换。这一研究结果还有待于用光谱法进一步证实。

2.6 样品基质对麻黄碱和伪麻黄碱的萃取和测定的影响

由图 1~3 可知:麻黄碱和伪麻黄碱在尿液中经萃取和 HPLC 测定所产生的峰高信号比在水中低。其主要原因是(1)尿液中大量含氮生物大分子可与麻黄碱和伪麻黄碱通过氢键形成含药物大分子而被中空纤维阻挡,不能进入接收相中,使测定的灵敏度降低,二者在尿液中的萃取效率和浓缩倍数明显低于水中(2)尿液中大量内源性化合物和极性小分子使 HPLC 的基线噪声增大,信噪比减小,使二者在尿液中的检出限比在水中高 20~30 倍。因此即使麻黄碱和伪麻黄碱的测定浓度相同,在水和尿液中所形成的峰高信号也会有明显的区别。

3 结论

本文在探讨麻黄碱和伪麻黄碱 3p-HF-LPME 萃取机理的同时,分析和阐述了二者在不同样品基质中可能的优势构象及构象变化,并结合 HPLC 实现了二者的定量分析。研究表明:通过 3p-HF-LPME 萃取过程中电荷转移超分子的形成,能够使麻黄碱和伪麻黄碱获得较高的萃取效率和富集倍数。此外,在麻黄碱和伪麻黄碱 3p-HF-LPME 的条件优化过程中和方法学考察时必须考虑样品基质的重要影响。

参考文献:

- [1] Lin K, Fan Q, Yang C G, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (林凯,范琦,杨成钢,等. 中草药), 2006, 37(2): 282
- [2] Chen Y, Shen S L, Chen H X, et al. Acta Pharmaceutica Sinica (陈勇,沈少林,陈怀侠,等. 药学学报), 2005, 40(9): 838
- [3] Prankerd R J, Elsabee M Z. Thermochim Acta, 1995, 248: 147
- [4] Zou D, Wu X J, Jiang W Q, et al. Chinese Journal of Pharmaceuticals (邹定,吴学军,姜文清,等. 中国药学杂志), 2001, 36(10): 688
- [5] Liu G, Chen D J, Wang J D, et al. Chinese Journal of Applied Chemistry (刘罡,陈德军,王吉德,等. 应用化学), 2008, 25(2): 173
- [6] Jeannot M A, Cantwell F F. Anal Chem, 1997, 69: 235
- [7] Ma M H, Cantwell F F. Anal Chem, 1998, 70: 3912
- [8] Zhao L M, Lee H K. J Chromatogr A, 2001, 931: 95
- [9] Zhao L M, Lee H K. Anal Chem, 2002, 74: 2486
- [10] Wang C, Li C R, Zang X H, et al. J Chromatogr A, 2007, 1143: 270
- [11] Zhu Y, Chen X, Bai X H, et al. Chinese Journal of Chromatography (朱颖,陈璇,白小红,等. 色谱), 2009, 27(6): 769
- [12] Wang X Y, Chen X, Bai X H. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王晓园,陈璇,白小红. 分析化学), 2009, 37(1): 35
- [13] Ugland H G, Krogh M, Reubsæet L. J Chromatogr B, 2003, 798: 127
- [14] Leinonen A, Vuorensola K, Lepola L M, et al. Anal Chim Acta, 2006, 559: 166
- [15] Steed J W, Atwood J L. Supramolecular Chemistry. Zhao Y P, Sun Z, transl. Beijing: Chemical Industry Press (斯蒂德 J W,阿特伍德 J L. 超分子化学. 赵耀鹏,孙震,译. 北京:化学工业出版社), 2006: 299