

尿液中甲基麻黃鹼檢驗方法之建立 及服用後含量之變化

李淑玲 國立體育學院運動科學研究所
邱彥成 國立體育學院運動科學研究所
詹貴惠 國立體育學院運動科學研究所
許美智 國立體育學院運動科學研究所教授

摘要

本研究目的在於以 HPLC 建立一套檢驗尿液中甲基麻黃鹼的分析方法，並測量服用 50 mg 之甲基麻黃鹼後尿液中含量的變化。實驗以 Alltec Alltima C₁₈ 5 μm 管柱 (250 mm×4.6 mm)，磷酸及乙腈溶液為移動相，4-aminoacetophenone 為內標準品；結果顯示以 0.035 M 磷酸及乙腈溶液 (85:15；V/V) 於 1.0 ml/min 的流速下可將 methylephedrine 與 4-aminoacetophenone 分離，且於 206 nm 的紫外光吸收下層析圖顯示 methylephedrine 與 4-aminoacetophenone 之滯留時間分別為 5 及 14 分鐘。且 methylephedrine 的濃度為 2.5~80 μg/ml 時層析圖中 methylephedrine 與 4-aminoacetophenone 波峰面積的比值成一線性相關 ($R^2=0.9999$)。尿液標準添加之平均回收率為 84.4±2.6%。另外，讓四位受試者服用 50mg 之甲基麻黃鹼，並收集其第 1、2、3、4、6、12、24、48 小時之尿液，以分析甲基麻黃鹼之含量，實驗結果發現，第一天尿液中之總量為第二天之兩倍，且在 48 小時後尿液中仍存在有甲基麻黃鹼。

關鍵字：甲基麻黃鹼、高效液相層析法

壹、前言

甲基麻黃鹼 (methylephedrine) 是一種興奮劑，其藥理作用類似交感神經興奮作用，當交感神經興奮時 α 接受器之作用可以使血管收縮、血壓上升、瞳孔放大、腸胃蠕動減少； β_1 接受器之作用會使心跳加速、心收縮性增加； β_2 接受器之作用會使支氣管肌肉鬆弛，因此常用於治療感冒、氣喘、咳嗽，也因為此類藥物對中樞神經及心臟血管有刺激作用而被國際奧林匹克委員會 (International olympic committee, IOC) 所禁用。

目前市面上含 methylephedrine 的製劑有膠囊、錠劑、顆粒劑、散劑糖漿、注射液及栓劑，這些製劑用於感冒時鼻塞、流鼻水、打噴嚏、咽喉痛、頭痛、咳嗽之緩解。國內含有甲基麻黃鹼藥物不但出現於醫師的處方藥中，亦常見於「須由醫師指示使用」及「成藥」中；衛生署對於「須由醫師指示使用」之藥物並沒有規定要持有醫師處方才能購買，而「成藥」一般藥房就可以買到且不需要醫師處方，所以運動員會在生病時自行購買藥物服用，若不加以注意則很容易誤服此類之運動禁藥，在民國 83 年及 86 年台灣區運動會中就各有一位選手之尿液被檢驗出含 methylephedrine (王翠敏、許美智，1998)。常見含 methylephedrine 之市售感冒藥，包括一陣風感冒液、友露安感冒液、全多祿膠囊、克風邪感冒顆粒、克風邪感冒液、治痛丹液、風熱友液、國安感冒糖漿、斯斯感冒膠囊、斯斯咳嗽膠囊、風邪斯巴錠、傷風克錠等 (許美智、黃志綉，2000)。因此尿液中 methylephedrine 的檢測方法之建立對運動禁藥方面的研究是必要的。

分析在尿液中麻黃鹼的方法有許多，包含使用 electron-capture gas-liquid chromatography (EC-GLC) (Ling et al., 1981; Midha, et al., 1979)、Gas-liquid chromatography (GLC) (Sun et al., 1979) 或高效液相層析法 (high performance liquid chromatography; HPLC) (Nieder et al., 1988; Imaz et al., 1993; Merwe et al., 1994)，但目前研究中大多還是使用 HPLC 作為分析麻黃鹼的方法，因此本篇目的在建立一套 HPLC 的方法，以檢測尿液中之 methylephedrine，並進而測量口服 methylephedrine 後其在尿液中之含量變化。

貳、材料與方法

一、儀器

(一) 高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)

Diode Array Detector : Shimadzu SPD-M10A。

Liquid Chromatograph : Shimadzu LC-10AT。

Auto Injector : Shimadzu SIL-10A。

Communications Bus Module : CBM-10A。

Degasser : DGU-4A。

(二) 酸鹼測定儀 : Corning pH Meter

二、材料

Acetonitrile, methanol, diethylether (購自 BDH); phosphoric acid (購自 Kanto); 4-aminoacetophenone, methylephedrine (購自 Sigma); acetic acid, sodium hydroxide, triethylamine (購自 Merck); methylephedrine tablets (50 mg; 購自景德製藥)。

三、尿液之萃取步驟

於 10ml 的硬質試管中，加入 2 ml 的尿液以及 50 μ l 的內標準品溶液。再加入 2 ml 的 diethylether 及 10% NaOH 溶液 200 μ l 作為萃取液，震盪混合 2 分鐘後離心 10 分鐘，於 -35 $^{\circ}$ C 環境下冰凍 30 分鐘後，取有機層；重複 diethylether 之萃取一次。有機層加入 1 滴含 10% acetic acid 的 diethylether 溶液後，用氮氣吹乾；再加入 200 μ l 的 methanol 震盪 1 分鐘，以 0.2 μ m syringe filters 過濾後即可，注入 HPLC。

四、溶液之配製

(一) 標準品溶液之配製：取 100 mg 的 methylephedrine 以水定量至 100 ml，配置成 stock solution。

(二) 內標準品溶液之配製：精確稱取 4-aminoacetophenone 10 mg，加入 methanol 定量至 50 ml，使成為 200 μ g/ml 的溶液。

五、尿液濃度線性迴歸測試

以 stock solution 加入空白尿液中，配製成 methylephedrine 濃度為 1.0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ g/ml 之尿液檢體，並加入內標準品溶液，使濃度成為 50 μ g/ml，經萃取步驟後再注入 30 μ l 於 HPLC 中分析。

六、Methylephedrine 的回收率

在 10ml 的硬質試管中，加入 2 ml 的空白尿液和 10 μ l 的內標準品溶液，並分別加入濃度為 6.25、12.5、25、50、100 μ g/ml 的 methylephedrine 溶液 200 μ l，同三之 diethylether 萃取步驟後注入 HPLC 並計算回收率。

七、再現性測試 (reproducibility)

以同日間差異 (intraday) 和異日間差異 (interday) 來評估方法的再現性。在同一天內，以 stock solution 加入空白尿液中，配製成 methylephedrine 濃度成 6.25、25、100 μ g/ml 之尿液檢體 (每濃度各 5 個樣本)，經萃取步驟後注入 HPLC 中，將值代入線性中，而後計算 methylephedrine 層析後的量和標準差 (SD; standard deviation)，以及其相對差異係數 (relative standard deviation; RSD; (標準差 \times 100/平均數)，得到同日間變異係數，再於不同的五天重覆配製相同濃度之溶液，予以測量層析後的量和標準差，以及其相對差異係數，如此得到五個不同天的數值，再加以求得的平均值即為異日間變異係數。

八、人體實驗及尿中 methylephedrine 含量之變化

健康自願之受試者 4 名，並於實驗進行開始前讓受試者了解實驗的目的以及各種可能發生的不適現象。受試者在早上 9:00 服用含有 50 mg methylephedrine 的錠劑，收集服用之後的第 1、2、3、4、6、12、24、48 小時，同時測量尿量；尿液檢體均儲存於 -20°C 的冰箱中。尿液檢體經萃取後，以 HPLC 作定量分析。

參、結果與討論

一、Methylephedrine 分析方法之建立

本研究選定 4-aminoacetophenone 當做內標準品，以磷酸 (H_3PO_4) 與 乙 (acetonitrile) 溶液為移動相，經一連串的實驗，找出最合適的 HPLC 分析條件，其結果如下：

(一)分離管：Alltec Alltima C_{18} ，5 μ m column，250 mm \times 4.6 mm。

(二)移動相：0.035M H_3PO_4 : acetonitrile = 85 : 15 (V/V)。磷酸溶液的配製方法為 3.4 g 的 phosphoric acid 以水定量至 1000 ml，再以 triethylamine 調成 pH 值等於 3.0 的溶液。

(三)偵測波長：206 nm (此為 methylephedrine 的最大吸收波)。

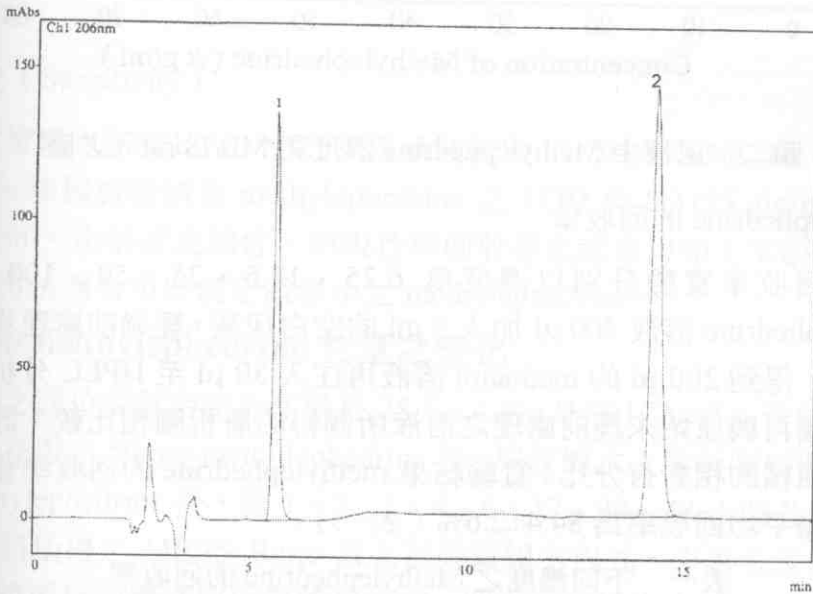
(四)流速：1.0 ml/min。

(五)分離管溫度：室溫($25\pm 3^{\circ}\text{C}$)。

(六)內標準品：4-aminoacetophenone ($200\ \mu\text{g/ml}$)。

(七)注射量： $30\ \mu\text{l}$ 。

圖一是 methylephedrine 和 4-aminoacetophenone 之標準品層析圖，圖上的波峰由左至右依次為 methylephedrine 和 4-aminoacetophenone，滯留時間分別約為 5 分鐘及 14 分鐘。

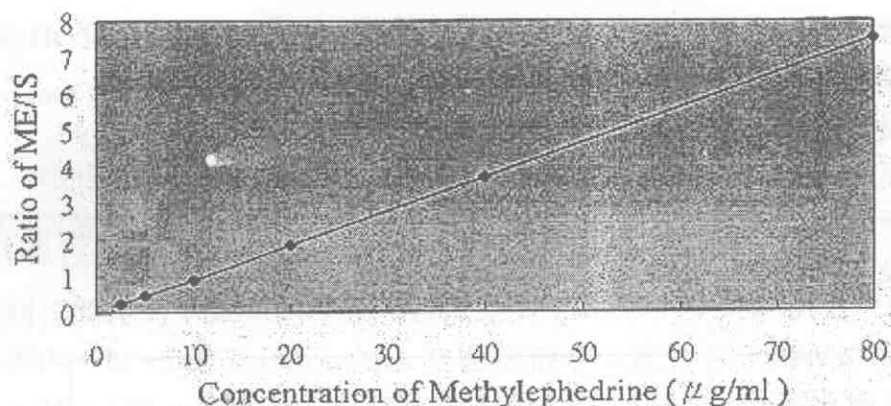


圖一 methylephedrine 和 4-aminoacetophenone 之標準品層析圖
(1 為 methylephedrine ; 2 為 4-aminoacetophenone)

二、尿液中 methylephedrine 測定方法的線性、回收率、再現性與靈敏度

(一)線性

按照實驗方法步驟，分別配置濃度為 2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 的 methylephedrine 尿液溶液（均含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 之 4-aminoacetophenone），注入 HPLC 中，再將所求得的 methylephedrine (ME) 與 4-aminoacetophenone (IS) 波峰面積比值做線性迴歸，所得的迴歸方程式為 $Y=10.658X+0.191$ ($R^2=0.9999$; $X=\text{ME conc.}$, $Y=\text{ME/IS peak area ratio}$)，如圖二所示。



圖二 尿液中 Methylephedrine 濃度與 ME/IS ratio 之圖

(二) Methylephedrine 的回收率

本回收率實驗分別以濃度為 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的 methylephedrine 溶液 200 μl 加入 2 ml 的空白尿液，經過前處理步驟加以萃取之後，得到 200 μl 的 methanol 溶液再注入 30 μl 至 HPLC 分析。所得到的層析圖再與原始未經前處理之溶液所測得的層析圖相比較，計算兩者波峰所佔面積的相對百分比；實驗結果 methylephedrine 的回收率普遍達 80% 以上，總平均回收率為 $84.4 \pm 2.6\%$ (表一)。

表一 不同濃度之 Methylephedrine 的回收率

Methylephedrine Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery rate \pm SD (%)
6.25	82.82 ± 1.78
12.5	81.92 ± 3.25
25	80.98 ± 1.26
50	84.96 ± 3.06
100	89.11 ± 1.58
Average recovery rate	84.43 ± 2.60

(三) 再現性 (reproducibility)

表二為 intraday 及 interday 所測得的含量，平均 intraday 的 RSD 為 1.83%，interday 的 RSD 為 2.79%。

表二 Methylephedrine 的再現性

實際量 (µg/ml)	測得量 (mean ± SD)			
	Intraday*(µg/ml)	R.S.D	Interday*(µg/ml)	R.S.D.
6.25	5.18±0.11	2.15	4.94±0.18	3.99
25.00	20.23±0.32	1.56	20.42±0.40	2.01
100.00	89.10±1.58	1.77	84.96±1.90	2.36

*n=5

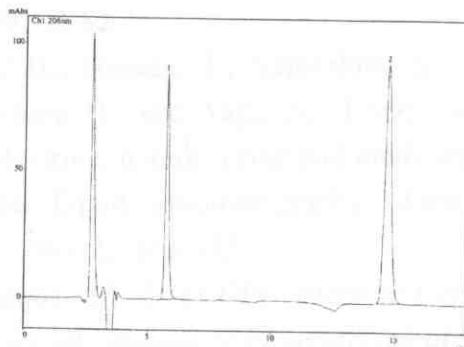
四、靈敏度 (Sensitivity)

本實驗以訊雜比 (S/N) ≥ 3 為偵測極限 (LOD), S/N ≥ 10 為定量極限 (LOQ)。依據實驗結果 methylephedrine 之 LOD 為 0.3125 µg/ml, LOQ 為 1.0 µg/ml。由前述之線性、再現性與回收率之結果得知：本研究所建立之 HPLC 方法適合用於測定尿液中之 methylephedrine。

三、尿液中 methylephedrine 含量之變化

本實驗之四位受試者平均年齡為 28.5 ± 4 歲、身高 172 ± 3.6 公分、體重 65.6 ± 5.1 公斤，在服用 50 mg methylephedrine 後，尿液樣本之層析圖如圖三；另外，在服用 methylephedrine 後，第 1、2、3、4、6、12、24、48 小時各時間點收集尿液樣本，將所得之 ME/IS Ratio 代入迴歸直線方程式，求得各尿液樣本的原始濃度，再將所得的濃度與尿量體積相乘，即為尿液樣本中 methylephedrine 的含量，並累計後計算出 48 小時尿液中 methylephedrine 的總排出量 (表三)。

實驗結果顯示，受試者服用 methylephedrine 後尿中的排泄量差異極大，在服用後 2~6 小時最高。而服用 50 mg methylephedrine 後 24 小時內及 24~48 小時內，尿液中 methylephedrine 排出總量分別為 16.9 ± 5.0 mg 及 7.4 ± 1.7 mg，其中第一天的排出量約為第二天的 2.3 倍。



圖三 服用 Methylephedrine 後尿液分析之層析圖譜
(1: methylephedrine ; 2: 4-aminoacetophenone)

表三 受試者服用 Methylephedrine 50mg 後，在第 1、2、3、4、6、12、24、48 小時尿液中 Methylephedrine 的總排出量

受試者	Methylephedrine 排出量 (mg)								
	1h	2h	3h	4h	6hr	12hr	24hr	48hr	總量
A	0.7	1.1	0.2	0.5	2.0	5.9	7.0	7.6	25.0
B	0.1	0.5	0.6	1.2	0.3	4.3	6.5	7.0	20.5
C	0.9	1.2	0.2	0.3	0.7	4.3	5.3	5.4	18.3
D	1.1	0.9	0.8	1.7	1.3	8.7	9.2	9.5	33.2

甲基麻黃鹼一般用於治療感冒，有支氣管擴張作用，一般濫用是因它具有欣快感，也可能因感冒誤服成藥，由於判定故意使用或誤用間較為困難，所以在早期 IOC 規定，只要尿液中測出 methylephedrine，即判定為陽性反應，而在 2000 年訂為超過 5 $\mu\text{g/ml}$ 為陽性，但 2001 年 IOC 的新規定，尿液中 methylephedrine 的濃度更改放寬超過 10 $\mu\text{g/ml}$ 則為陽性反應。目前市面上的市售之感冒用藥，其單次劑量所含 methylephedrine 不盡相同，一般錠劑含量約為 0.2~2.5 mg、鎮咳糖漿每 100 ml 約含 5~20 mg，而感冒注射液中最大劑量可高達 50 mg/2 ml，本研究顯示服用 50 mg 的 methylephedrine 在 48 小時時，在尿液中仍易檢測出 methylephedrine 的存在，所以當運動員連續服藥或增加劑量時，必會延長藥物排空的時間，因此在尿液檢測上成陽性反應的機率勢必增加，教練及選手最想知道的是萬一不慎誤服了，此藥多久時間會離開體內，在尿液中不會呈陽性反應，然而影響藥物排出因素有許多，例如藥物本身特性、腎絲球之過濾情形、藥物之濃度、尿液的 pH 值，其他如性別、疾病等因素亦會影響，因此最好還是避免服用此類藥物，尤其是在競賽期間。

參考文獻

1. 王翠敏、許美智 (1998)。台灣區運動會 83-86 年選手用藥之調查研究。中華體育, 12, 2, 120-128。
2. 許美智 (2000)。運動禁藥。合記圖書出版社, 台北, 台灣, 43-46 頁。
3. 許美智、黃志綉 (2000)。常見含運動禁藥之市售感冒藥。大專體育, 49, 199-203。
4. 許順吉、黃明星 (2000)。麻黃生物鹼之逆相層析探討。藥物食品分析, 8, 4, 337-341。
5. Gurley, B. J., Gardner, S. F., White, L. M. and Wang P. L. (1998). Ephedrine pharmacokinetics after the ingestion of nutritional supplements containing Ephedra sinica (Ma huang). *The Drug Monit*, 20(4), 439-445.
6. Imaz, C., Carreras, D., Navajas, R., Rodriguez, C., Rodriguez, A. F., Maynar, J. and Cortes, R. (1993). Determination of ephedrine in urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 631, 201-205.
7. Ling, Y. L., Graham, L. and Alan, B. (1981). Sensitive assay for pseudoephedrine and its metabolite, norpseudoephedrine in plasma and urine using gas-liquid chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography*, 222, 297-302.
8. Merwe, P. J., Brown, L. W. and Hendrikz, S. E. (1994). Simultaneous quantification of ephedrine in urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 661, 357-361.
9. Midha, K. K., Cooper, J. K. and McGilveray, I. J. (1979). Simple and specific Electron-capture GLC assay for plasma and urine ephedrine concentrations following single doses. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(5), 557-560.
10. Nieder, M. and Jaeger, H. (1988). Sensitive quantification of pseudoephedrine in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 424, 73-82.
11. Okamura, N., Miki, H., Harada, T., Yamashita, S., Masaoka, T., Nakamoto, Y., Tsuguma, M., Yoshitomi H., and Yagi, A. (1999). Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20(1-2), 363-372.
12. Sun, S. R. & Leveque, M. J. (1979). Electron-Capture GLC Determination of Pseudoephedrine in Serum. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(12), 1567-1568.

Determination of Methylephedrine in Urine by HPLC and the Variation of Concentrations after Oral Methylephedrine

Shu-Lin Li; Yen-Chen Chu; Quen Huen Jan; Mei-Chich Hsu

Abstract

A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the analysis of methylephedrine in urine samples. The analysis can be accomplished within a Alltec Alltima C₁₈ 5 μ m column (250 mm \times 4.6 mm) by isocratic elution using a mixture of 0.035M phosphate buffer and acetonitrile ((85 : 15, V/V) as a mobile phase at a flow-rate of 1.0 ml/min, and UV absorbance detection at 206 nm. 4-aminoacetophenone was used as an internal standard. The retention times of methylephedrine and 4-aminoacetophenone were 5 and 14 minutes. An equation was presented for linear relationship between peak height ratios of methylephedrine to 4-aminoacetophenone and the methylephedrine amount over a range of 2.5~80 μ g/ml ($R^2=0.9999$). Standard addition recoveries of urine were 84.4 \pm 2.6%. Four volunteers took fifty milligram of methylephedrine, and urine samples were collected at the time of 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 hour. Results showed that excreting amount of methylephedrine on the first day was two-fold of that on the second day. Methylephedrine was still found in the urine after 48 hours.

Key words: methylephedrine, high performance liquid chromatography