

尿中麻黄碱类药物的 HPLC 定量分析

金 晓 王 杉 张长久

(国家体委运动医学研究所,北京 100029)

提要 以甲基苯丙胺为内标,在 C_{18} 柱上,用高效液相色谱技术分离并同时测定了尿中6种麻黄碱类药物。在25 min内,麻黄碱、伪麻黄碱、去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱、甲基麻黄碱、乙基麻黄碱和内标均达到基线分离,分离度大于1.80,且尿中其它杂质不干扰。方法回收率高,重现性好,在1.5~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度范围内有很好的线性关系,相关系数大于0.999。

关键词 麻黄碱;兴奋剂检测;HPLC

麻黄碱类药物有较强的中枢兴奋作用,在体育竞赛中作为刺激剂使用。国际奥委会在1989年将麻黄碱、伪麻黄碱、去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱、甲基麻黄碱和乙基麻黄碱列入禁用药物。鉴于麻黄碱类药物在临床上应用很广泛,是治疗伤风、哮喘和过敏等症的常用药物,而且在很多中西复方制剂中均含有此类药物,因此,国际业余田联又对其作了限量规定。由于麻黄碱类药物常以复合制剂形式存在,服后共存于同一尿样中,且乙基麻黄碱、甲基麻黄碱、麻黄碱和去甲麻黄碱间,伪麻黄碱与去甲伪麻黄碱间又有药物代谢关系,因此,建立一既能同时分离又能准确定量麻黄碱类药物的测定方法,对兴奋剂的检测与控制十分必要。

麻黄碱类药物最常用的检测方法为 GC/MS 法⁽¹⁾,即将其先进行选择衍生化后,GC/MS 分离测定,但由于同一药物会产生多于一种的衍生化产物,使方法重现性欠佳。崔凯荣等⁽²⁾进行了尿中四种麻黄碱类药物不经衍生化的直接 GC/MSD 方法测定,但所需时间较长,且两对差向异构体未能达到基线分离。HPLC 分离麻黄碱类药物也有报道,Barkan⁽³⁾和岩浪登⁽⁴⁾等人报道了在苯基和膦基键合固定相上分离麻黄碱、伪麻黄碱的方法。梁宏晔等用共轭方向法优化流动相条件,进行了麻黄碱、伪麻黄碱的分离报道⁽⁵⁾,并测定了九分散中两者的含量⁽⁶⁾。在本文中,我们以甲基苯丙胺为内标,在 C_{18} 柱上建立了分离并同时测定麻黄碱、伪麻黄碱,去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱两对差向异构体和甲基麻黄碱、乙基麻黄碱的 HPLC 法,此法操作简单、快速;麻黄碱类分离好,尿中其它成分无干扰;回收率高,重现性好;在1.5~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内各药物有很好的线性关系。

实 验 部 分

仪器、试剂和药品

高效液相色谱仪:HP 1090M 型,系统配有二元梯度泵、柱温箱,自动进样器,二极管阵列检测器(DAD)和 Pascal 工作站(Hewlett-Packard Company, Waldbronn, Germany);LD₅-2A 离心机(北京医用离心机厂);pH 计(Beckman, $\Phi 40$),Milli-Q 纯水器(Millipore, USA)。

甲醇(色谱纯,北京昌化精细化工厂);高纯水(用 Milli-Q 纯水器制得);其余试剂均为国产分析纯。

麻黄碱(ephedrine, EPH)、伪麻黄碱(pseudoephedrine, PEPH)、去甲麻黄碱(norephedrine, NEPH)购自 Aldrich Chemical Company Inc. (USA);去甲伪麻黄碱(norpseudoephedrine, NPEPH)、甲基麻黄碱(methylephedrine, MEPH)、乙基麻黄碱(ethylephedrine, EEPH)和甲基苯丙胺(methylamphetamine)由加拿大 INRS-Sante 赠送。

标准溶液:麻黄碱类药物标准品和内标均用下述的流动相 A 溶解制成 1.0 mg/ml 的标准液,置 4℃ 冰箱中备用。

流动相: A. 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液,用三乙胺调到 pH 5.5,冰箱中存放,用前 G4 垂熔漏斗过滤。B. MeOH。

实验方法

色谱条件:色谱柱:Lichrospher 100 RP-18, 5 μm , 125 mm \times 4 mm;流动相 A, B. 梯度条件: 8 min B 0% \rightarrow 8.02 min B 1.0% \rightarrow 16 min B 2% \rightarrow 25 min B 5%;流速程序: 0 min 流速: 1.3 ml/min \rightarrow 18 min 流速: 1.3 ml/min \rightarrow 25 min 流速: 2.5 ml/min;柱温: 40℃。

检测器:检测波长 210 nm,带宽 4 nm;参比波长 350 nm,带宽 40 nm。

尿样前处理:于 5.0 ml 尿样中加入 50 μl 内标(浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、0.5 ml KOH 溶液(5 mol/L)、3 g 氯化钠和 4 ml 乙醚,振摇 15 min 后离心 10 min,吸取醚层用氮气流吹干,残渣用 300 μl 流动相 A 溶解,进样 10 μl 。

回收率实验:分别精密吸取 10, 60, 110 μl 上述各药物标准品溶液,氮气流下小心吹干,准确加入 5 ml 空白尿液(相当于标准的浓度分别为 2, 12 和 22 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 50 μl 内标,按上述的尿样前处理方法提取测定;另取等量的药物标准品和内标溶液,于氮气流下吹干后,直接用 300 μl 流动相 A 溶解,取 10 μl 进样。通过提取后药物标准品与内标峰面积比和未经提取的相应标准品与内标峰面积比,计算方法的回收率。

标准曲线:分别精密吸取上述药物标准品溶液 7.5, 25, 50, 75, 100, 125 μl 于旋盖试管中,氮气流下小心吹干,准确加入 5 ml 空白尿液(相当于各药物浓度分别为 1.5, 5.0, 10, 15, 20 和 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 50 μl 内标。依上述样品前处理方法提取后,进样 10 μl ,在 210 nm 波长下检测,以尿中浓度为横坐标,药物峰面积与内标峰面积之比为纵坐标绘标准曲线。

结果和讨论

麻黄碱标准品的分离

空白尿、标准品和一甲基麻黄碱的阳性尿的色谱图见图 1。从图中得知,上述 6 种麻黄碱类药物和内标都得到很好的基线分离,各对峰的分高度大于 1.80,且尿中杂质峰均不干扰测定。

HPLC 分离条件的优化

麻黄碱类药物差向异构体的分离较为困难,据文献⁽⁵⁾报道,麻黄碱和伪麻黄碱在不同比例的甲醇和水流动相中不能分开,而在此流动相中加入一些缓冲液则可导致差向异构体的分离。在实验中我们选用 0.05 mol/L KH_2PO_4 ,并用磷酸和三乙胺调 pH 值来优化麻黄碱类药物的分离。图 2 的结果表明,当 pH 为 5.5 时,除去甲麻黄碱和去甲伪麻黄碱外,其余各对药物分离度均达最大值,尤其是伪麻黄碱和甲基麻黄碱只有在该 pH 值时,才能达到完全的基线分离($R = 1.86$);选用三乙胺调流动相 pH,是由于麻黄碱类结构中的羟基会与柱上自由硅烷醇基团相互

作用,而流动相中加入三乙胺可以减少这种作用⁽⁷⁾。另外用适当浓度的甲醇,可以减少分析时间,并可使后洗脱峰的峰形变窄,但甲醇的浓度不可过大,否则会影响麻黄碱、伪麻黄碱与甲基麻黄碱之间的分离。

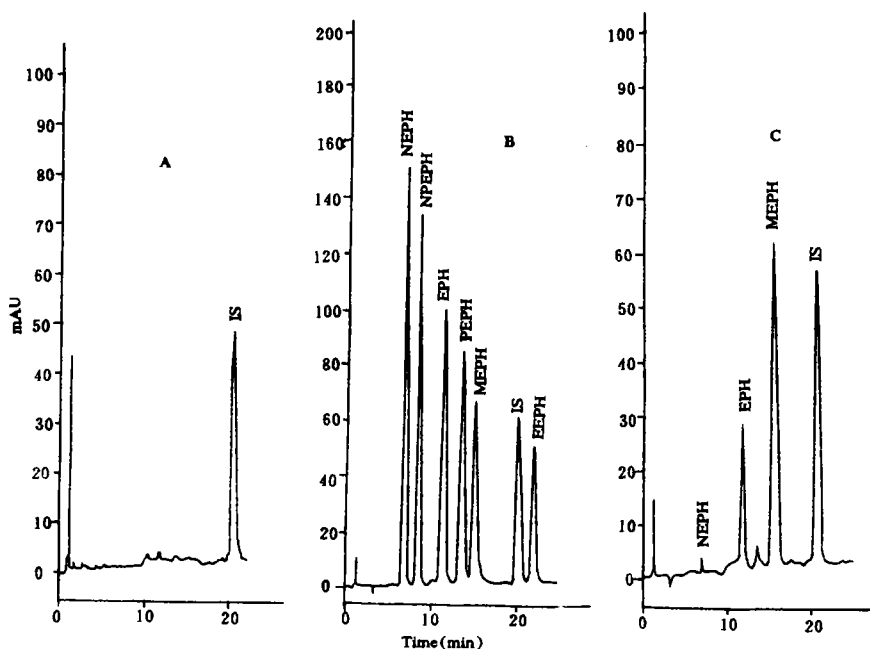


Fig 1 Chromatograms of blank urine with IS concentration at $10 \mu\text{g/ml}$ (A), urine standard with concentration of all ephedrines studied at $10 \mu\text{g/ml}$ (B), and positive urine of methylephedrine, which contained MEPH $9.97 \mu\text{g/ml}$, EPH $0.46 \mu\text{g/ml}$ and very low level of NEPH (C). NEPH; norephedrine; NPEPH; norpseudoephedrine; EPH; ephedrine; PEPH; pseudoephedrine; MEPH; methylephedrine; EEPH; ethylephedrine; IS; internal standard.

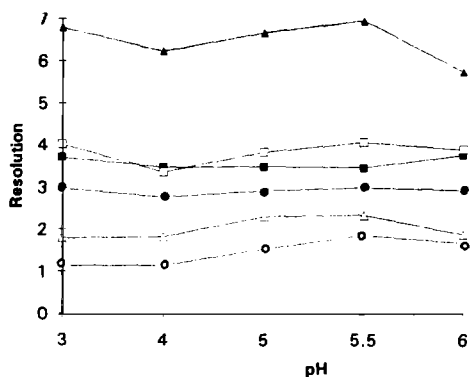


Fig 2 Effect of pH on resolution. —■— NEPH-NPEPH; —□— NPEPH-EPH; —●— EPH-PEPH; —○— PEPH-MEPH; —▲— MEPH-IS; —△— IS-EEPH.

标准曲线

在1.5~25 µg/ml 尿浓度范围内,上述的6种麻黄碱类药物均有很好的线性关系。回归方程及相关系数见表1。

Tab 1 Equations and correlation coefficients of linear calibration for the ephedrines studied

Drug	Equation	Correlation coefficient
Norephedrine	$Y = 0.1297X - 0.0179$	0.9995
Norpseudoephedrine	$Y = 0.1262X - 0.0104$	0.9998
Ephedrine	$Y = 0.1383X - 0.0042$	0.9993
Pseudoephedrine	$Y = 0.1402X - 0.0047$	0.9994
Methylephedrin	$Y = 0.1220X - 0.0032$	0.9992
Ethylephedrine	$Y = 0.0956X - 0.0156$	0.9990

回收率测定

分别在高、中、低不同的浓度下,测定了上述6种麻黄碱类药物的回收率,每个浓度组均进行了6次测定,用该法所有的麻黄碱类药物均有较高的回收率,结果见表2。

Tab 2 Recovery of ephedrines from urine with different concentrations added

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Drug	2 µg/ml	12 µg/ml	22 µg/ml	Average recovery (n=18)
Ephedrine	99.31±0.53	98.08±0.14	98.78±0.10	98.73±0.50
Pseudoephedrine	101.52±0.55	101.79±0.16	101.70±0.15	101.67±0.13
Norephedrine	82.51±0.52	81.57±0.44	79.75±0.11	81.24±1.20
Norpseudoephedrine	88.12±0.50	87.84±0.16	87.42±0.14	87.79±0.28
Methylephedrine	100.26±0.38	100.18±0.20	99.14±0.15	99.86±0.51
Ethylephedrine	100.02±0.78	101.57±0.21	101.05±0.17	100.50±0.78

方法重现性

以12 µg/ml 药物浓度组的6次测定结果计算方法的重现性,结果见表3。

Tab 3 Retention time and peak area reproducibility (n=6)

Drug	Retention time		Peak area	
	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
Norephedrine	6.69±0.03	0.45	2411±5.88	0.24
Norpseudoephedrine	8.31±0.07	0.84	2371±5.25	0.22
Ephedrine	11.29±0.05	0.44	2591±4.67	0.18
Pseudoephedrine	13.50±0.05	0.37	2645±3.31	0.13
Methylephedrine	15.05±0.04	0.26	2210±5.12	0.23
Ethylephedrine	22.13±0.02	0.09	1771±4.76	0.27

参 考 文 献

- 1 Donike M, et al. Quantitative analysis of ephedrines by GC/MC. 9th Workshop on Dope Analysis. Cologne; Mar. 1991:17~22.
- 2 崔凯荣,等.尿中4种麻黄碱类药物的 GC/MSD 测定. 高等学校化学学报 1992;13:1553.
- 3 Barkan S, et al. Determination of cross-contamination of the diastereomers of ephedrine and pseudoephedrine by HPLC, TLC and ¹³CNMR. *J Chromatogr* 1981;219:81.
- 4 岩浪登,等.高效液相色谱法对麻黄及其方剂中麻黄碱生物碱的定量. 药学通报 1985;20:149.
- 5 梁宏晔,等.共轭方向法在 HPLC 流动相条件优化中的应用——麻黄碱、伪麻黄碱的分离. 药理学报 1990;26:49.
- 6 梁宏晔,等. HPLC 测定九分散中麻黄碱、伪麻黄碱和士的宁的含量. 药理学报 1990;25:849.
- 7 Varga-Puchony Z, et al. Role of silanophilic retention in the reversed phase chromatography of chloramphenicol intermediates. *J Chromatogr* 1983;257:380.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF EPHEDRINES IN URINE BY HPLC

X Jin, S Wang and CJ Zhang

(National Research Institute of Sports Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT Simultaneous determination of six ephedrines in urine sample has been achieved by high performance liquid chromatography on a Lichrospher RP-18 column, using methylamphetamine as internal standard. The 6 ephedrines are well separated in 25 minutes with resolution better than 1.8. This method has high recovery, selectivity and reproducibility, and the linearity is satisfactory from 1.5 µg/ml to 25 µg/ml with correlation coefficients better than 0.999.

Key words Ephedrines; Doping control; HPLC