

ノート

安定同位体を利用した不正薬物の定量法（第2報） りん酸コデイン

東郷 雅子, 坂本 隆宏, 古賀 智子, 平木 利一, 氏原 覚*

**Determination of Illicit Drug by FAB-MS using stable isotope as an internal standard.
codeine phosphate**

Masako TOGO, Takahiro SAKAMOTO, Tomoko KOGA, Toshikazu HIRAKI and Satoru UJIHARA

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531 Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271-0076 Japan

A method for the quantitative estimation of codeine phosphate has been developed using fast atom bombardment mass spectrometer (FAB-MS). This method used trideuterated codeine phosphate (codeine phosphate-d3) as an internal standard. Codeine phosphate was determined based on the peak area ratio of the protonated molecular ions of codeine phosphate and codeine phosphate-d3. This method showed a good reproducibility and recovery.

1. 緒 言

アヘンアルカロイドの一種であるコデインは、風邪薬などの市販薬に配合されていることが多く、麻薬及び向精神薬取締法において含有率が1%を超えるものは規制の対象となる。このため、ガスクロマトグラフィー(GC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)¹⁾等を用い、内部標準法で定量分析が行われている。これらの方法では、精度のよい定量結果を得るために、測定条件の設定や内部標準物質の選定が重要となる。また、コデインは通常りん酸塩の形で使用されているため、試料からの抽出や誘導体化などの煩雑な操作が必要であり、分析に長時間を要する。

近年、質量分析計の内部標準物質として標的化合物の重水素置換体(d体)を用いる方法が開発され、広く利用されている²⁾。このd体は、未置換の標的化合物と化学的性質がほぼ同じで比較的安価に合成できるため、質量分析計を用いた定量分析において最もよい内部標準物質とされている。内部標準物質に標的化合物の安定同位体を用いる利点として、一度検量線を作成すれば次の定量から検量線を作成する必要がないこと、化学的物理的挙動がほぼ同じであることから試料の抽出効率を考える必要がないこと等が挙げられる。

今回はイオン化法として、測定が非常に簡単で迅速であり、

塩のままで測定が可能であるなどの利点をもつFAB法を用い、ヘロインから合成したりん酸コデイン-d3を内部標準物質として、りん酸コデインを定量する方法について検討した。

2. 実験

2.1 試 料

Heroin(厚生省から入手)
Paraformaldehyde-d2(Aldrich Chem. Co.)
Formic acid-d2(MERCK)
Glycerol(東京化成工業株)
Codeine phosphate(武田薬品工業株)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 高速原子衝撃質量分析法(FAB-MS)
装置: JMS-700(日本電子株)
衝撃ガス: キセノン
加速電圧: 7kV
FABエネルギー: 5keV, 2mA
質量分解能: 1,000
スキャン質量範囲: 180~330
スキャン時間: 10秒
測定モード: 正イオンモード

マトリックス: Glycerol

2.2.2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装 置: LC-10 (株)島津製作所

カラム: CAPCELLPAK C 18 (4.6 × 150mm)

移動相: SDS4.8 g をりん酸水溶液 (1000) 2.4 l に溶かし, 10% 水酸化ナトリウム水溶液により pH3.0 に調整した後, THF 0.7 l と混合したもの

カラム温度: 40

流 速: 1.0ml/min.

注 入 量: 20 μl

検 出 器: UV (280nm)

2.2.3 ガスクロマトグラフ・質量分析法 (GC-MS)

装 置: HP-5973 (HP)

カラム: DB-WAX30m × 0.25 mm × 0.25 μm

注入口温度: 250

インターフェース温度: 250

イオン源温度: 230

Qポール温度: 106

オープン温度: 250 (定温)

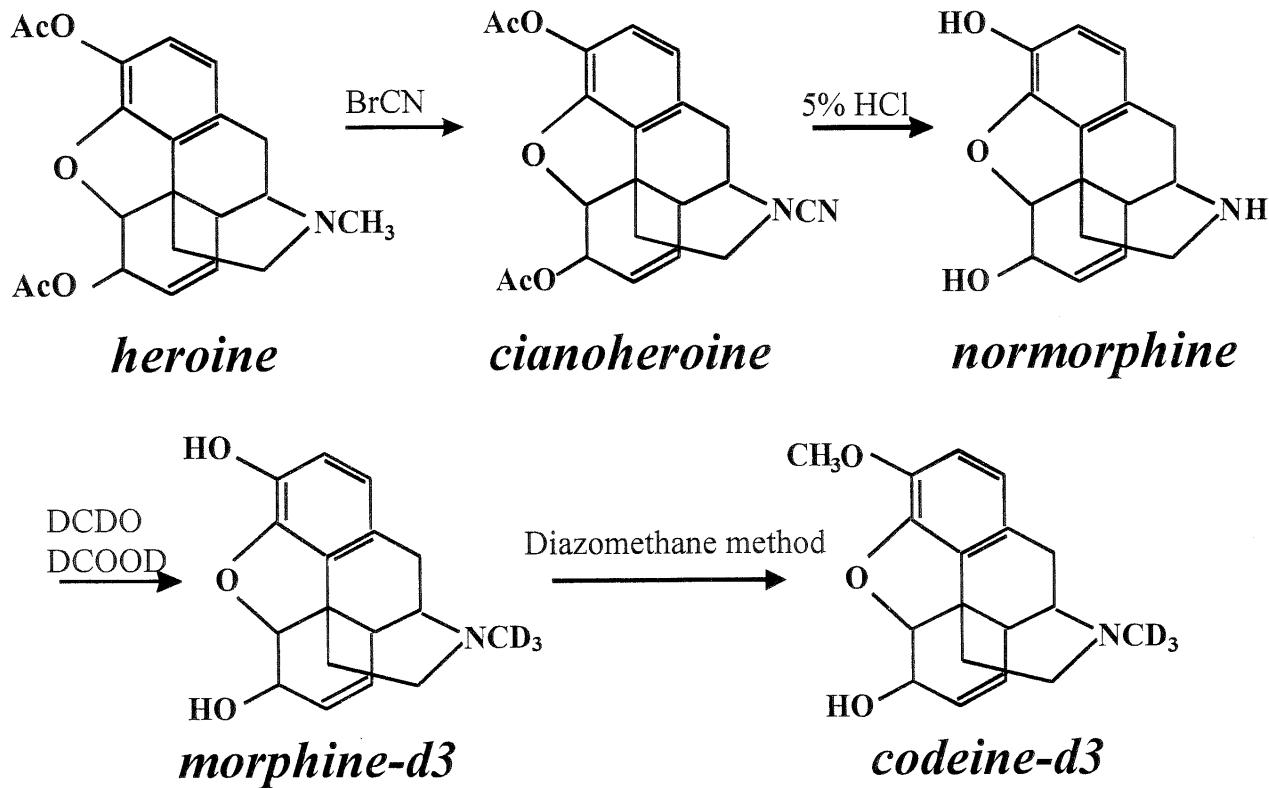
測定モード: SIM

測定イオン (ターゲットイオン): m/z299, m/z302

2.3 実験方法

2.3.1 りん酸コデイン-d3 の合成

ジアセチルモルヒネ (ヘロイン) から, ノルモルヒネを合成し, これにパラホルムアルデヒド-d2 及び蟻酸-d2 を加え, 加熱還流し, モルヒネ-d3 を合成した³⁾。合成したモルヒネ-d3 をジアゾメタン法により, メチルエーテル化し, さらにリン酸で処理して, りん酸コデイン-d3 を合成した^{1)3)~5)} (Scheme 1)。



Scheme 1 Synthesis of codeine-d3

2.3.2 試料採取量の検討

りん酸コデインとりん酸コデイン-d3 を重量比で 1:1 としたものをそれぞれ 0.5mg, 1mg, 2mg, 3mg, 5mg 採取し, 水 1ml に溶解後, 4 μl を採取し, 試料ホルダー上でマトリックス 1 μl と混合したものを FAB-MS で各 100 スキャンずつ測定し, りん酸コデイン (ターゲットイオン m/z300) とりん酸コデイン-d3 (ターゲットイオン m/z303) のピーク面積比の変化とその再現性を検討した。

2.3.3 検量線の作成

りん酸コデイン 0.5mg, 1.0mg, 2.0mg, 3.0mg, 5.0mg, 10.0mg と内部標準物質であるりん酸コデイン-d3 2mg をそれぞれ混合した水溶液を調製後, FAB-MS で測定し, 重量比とピーク面積比の関係より検量線を作成した。

2.3.4 共存物質の影響

市販の風邪薬に含まれると考えられる乳糖やその他の薬効成分を, FAB-MS により測定し, りん酸コデインの定量に与える影響について検討した。

2.3.5 調製試料中のりん酸コデインの定量
りん酸コデインの含有量が1%になるようりん酸コデインと乳糖からなる試料を調製し、先に作成した検量線からりん酸コデインの定量を行った。

2.3.6 他の測定法との比較

HPLC法及びGC-MS法で、2.3.5で調製した試料中のりん酸コデインを定量し、FAB-MS法との比較、検討を行った。なお、内部標準物質として、HPLC法ではエチレフリン、GC-MS法ではりん酸コデイン-d3を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 ターゲットイオンの検討

標準試料のFAB-MSの一例をFig.1に示す。りん酸コデインのプロトン付加分子イオンはm/z300に、りん酸コデイン-d3はm/z303に強いピークを示す。りん酸コデインはm/z303に、りん酸コデイン-d3はm/z300に定量を妨害するピークは認められない。また、ポジティブモードでよく用いられるマト

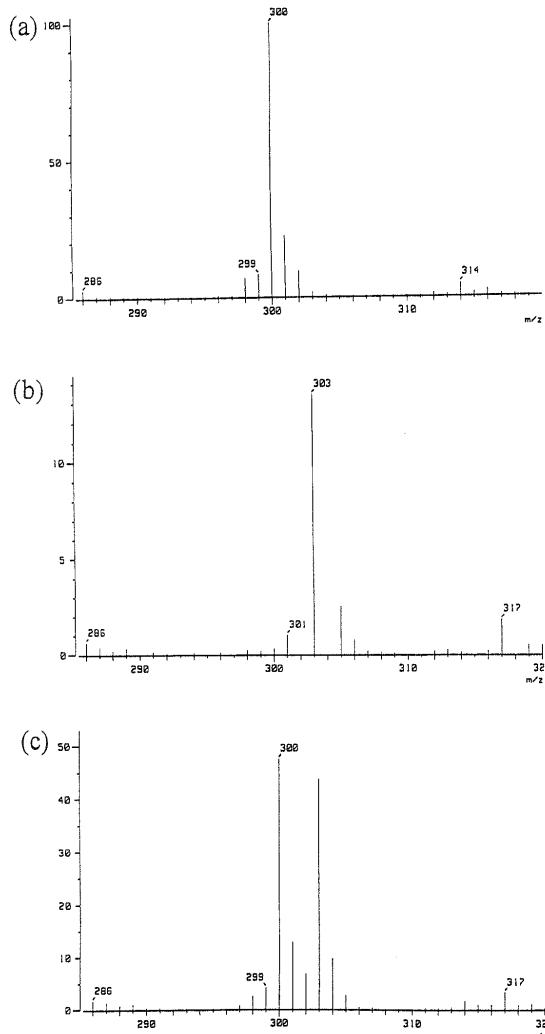


Fig.1 Spectra of FAB-MS
(a)codeine phosphate
(b)codeine phosphate-d3
(c)codeine phosphate and codeine phosphate-d3

リックスであるグリセロール、チオグリセロール、ニトロベンジルアルコール(NBA)について、ターゲットイオンに対する影響を検討した結果、m/z300及びm/z303にピーク強度が最も小さいグリセロールをマトリックスとすることにした。

3.2 試料採取量の検討

試料採取量に対するりん酸コデインとりん酸コデイン-d3の面積比の変化とその変動係数をFig.2に示す。

Fig.2における試料採取量の範囲内においてはピーク強度比は1.1前後で推移し、ほぼ一定の値を取ることが認められた。また、変動係数は試料採取量が小さい場合においては1%を超えるものの、それ以外では1%以下となり良好な再現性を示した。これらの結果より、試料採取量は変動係数が最も小さい約2mgが適当と判断し、今後の測定にこの値を用いることとした。

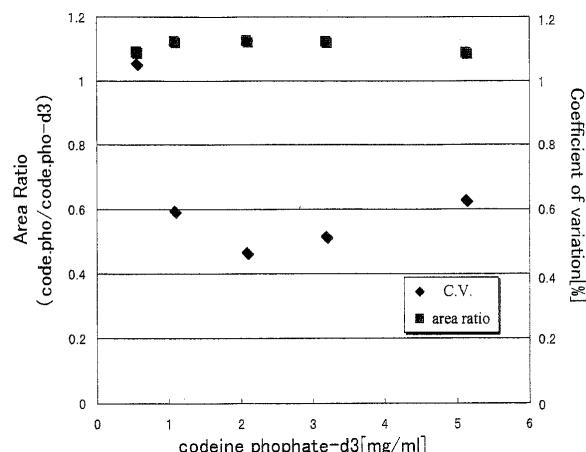


Fig.2 Investigation of sample weight to determine codeine phosphate

3.3 検量線の作成

りん酸コデインとりん酸コデイン-d3の重量比とピーク面積比の検量線をFig.3に示す。りん酸コデインの重量が0.5~5.0mgの範囲内において、相関係数は $r^2 = 0.9999$ で非常に良好な直線関係が得られた。

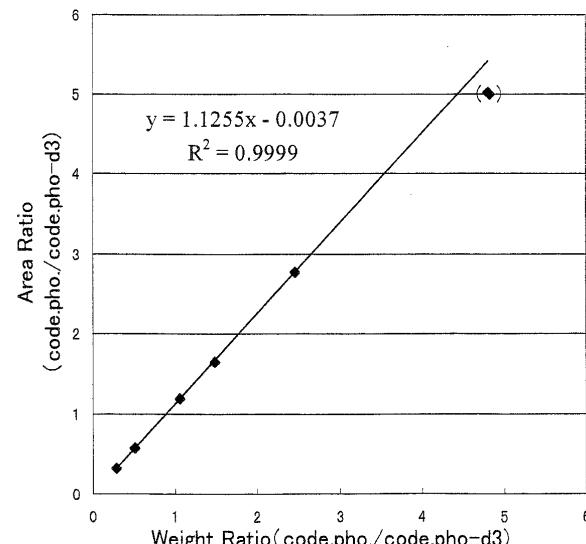


Fig.3 Calibration curve of codeine phosphate by FAB-MS

3.4 共存物質の影響

市販の風邪薬中によく配合されている乳糖や8種の薬効成分アスピリン、アミノピリン、カフェイン、クロロフェニラミン、デキストロメトルファン、イブプロフェン、フェナセチン及びフェノバルビタールについてはいずれもりん酸コデインの定量の際に使用する $m/z 300$, $m/z 303$ にピークは認められなかったが、アセトアミノフェンについては、りん酸コデイン-d3 と同じ $m/z 303$ にアセトアミノフェンの二量体と考えられるピークが検出された (Fig. 4(a))。りん酸コデインの定量の際に、アセトアミノフェンが含まれていた場合に、りん酸コデイン及びりん酸コデイン-d3 の強度比に変化が認められた (Fig. 4(b))。これに塩化ナトリウムを添加したところ、アセトアミノフェンの二量体と考えられるピークが消滅し、りん酸コデイン及びりん酸コデイン-d3 のピーク面積比は、塩化ナトリウム及びアセトアミノフェンを含まない場合のピーク面積比とほぼ同じ結果となった (Fig. 4(c)) 及び 4(d))。アセトアミノフェンの二量体と考えられるピークが消滅したのは、ナトリウムイオンがアセ

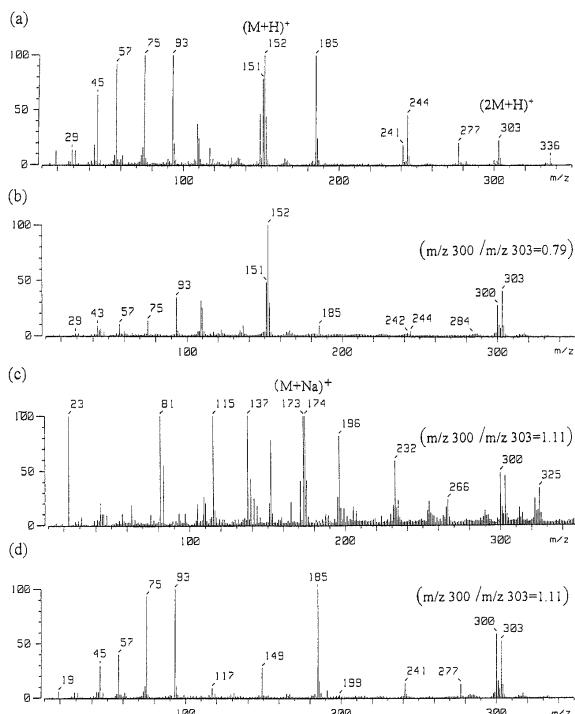


Fig.4 Spectra of FAB-MS in case of containing acetaminophen as an interfering substance

- (a) Acetaminophen
- (b) Codeine phosphate, codeine phosphate-d3 and acetaminophen
- (c) Codeine phosphate, codeine phosphate-d3, acetaminophen and sodium chloride
- (d) Codeine phosphate and codeine phosphate-d3

*M : Acetaminophen

トアミノフェンに結合し、二量体の形成が阻害されたためと考えられる。このように妨害物質がある場合においても、妨害物質を特定し、適切な処理を行えば、定量は可能であると考えられる。

3.5 調製試料中のりん酸コデインの定量

調製した試料を 3.3 で作成した検量線を用いて FAB-MS 法で定量を行った結果を Table 1 に示す。変動係数は 1% 以下となり、測定値は仕込み量に近い値となった。

Table 1 Determination of codeine phosphate in preparation by FAB-MS

Prepared codeine phosphate content (%)	Results of determination value (%)	Standard deviation	Coefficient of variation (%)
0.980	0.957	0.009765	0.9122

3.6 他の測定方法との比較

Table 2 に、調製した試料を HPLC 法及び GC-MS 法で定量を行った結果を示す。いずれの測定値も仕込み量に近い値となり、また変動係数も 1% 以下と良好な結果が得られた。

ただし、実際の風邪薬等では多くの共存物質が存在することが考えられるため、その影響等を考慮し、HPLC 法の場合は測定条件の最適化などがさらに必要であると考えられる。

GC-MS 法の場合は、りん酸コデイン-d3 を内部標準物質に用いることにより抽出効率を考慮する必要がなくなるが、りん酸コデインから遊離のコデインを抽出するという前処理が必要となる。また、ピークの波形処理等で測定値が変化することから、カラムの選択や測定条件の最適化などさらに検討が必要であると考えられる。

Table 2 Determination of codeine phosphate in preparation by HPLC and GC-MS

	Results of determination value (%)	Standard deviation	Coefficient of variation (%)
HPLC	0.973	0.007034	0.4723
GC-MS	0.962	0.001923	0.1820

Prepared codeine phosphate content : 0.980%

4.要 約

ヘロインからりん酸コデインの重水素置換体 (d 体) を合成し、それを内部標準物質として FAB-MS によるりん酸コデインの定量を検討した。検量線は一定の濃度範囲内で良好な直線関係を示した。また妨害ピークへの対処も比較的容易に行え、迅速で簡便な測定方法で精度の高い定量が可能であることがわかった。さらに、GC-MS においては、さらなる検討が必要であるが、りん酸コデイン-d3 を内部標準物質に用いることにより、試料の抽出効率を考慮せず比較的簡便に定量が可能であると考えられ、税関分析への応用も考えられる。

文 献

- 1) 鈴木郁夫ら：“第13改正 日本薬局方解説書”，東京廣川書店，(1996)
- 2) 南原利夫，後藤順一：“GC-MSの医学・生化学への応用”，立松 晃(共編)化学同人，(1980)第4章
- 3) 中原雄二：“生体試料の薬物鑑定フォーラム'94”，204, 205, (1994)
- 4) “薬毒物化学試験法と注解”，日本薬学会編，南山堂，(1992)
- 5) 石川静逸，丸田省三郎：衛生試報38, 1-9, (1931)