

あへん中のあへんアルカロイド及びメコン酸の抽出とその確認分析

柴田 正志*, 渡部 聡*, 片岡 憲治*

Extraction and Identification of Alkaloids and Meconic Acid in Opium

Masashi SHIBATA*, Satoshi WATANABE*, Kenji KATAOKA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

A simple method of extracting alkaloids in opium and a method of separating meconic acid and opium-alkaloids by means of HPLC were examined. For the opium-alkaloids, the main alkaloids such as morphine, codeine, thebaine, noscapine and papaverine were extracted using a mixed solvent consisting of chloroform and methanol as an extracting solvent, and it was found that the respective components could be separated and identified by means of GC-MS. Furthermore, the mobile phase of HPLC was examined, and it was found that meconic acid could be separated and identified under a condition of pH 3 phosphate buffer/acetonitrile = 1/9 using an ODS column. Moreover, under a gradient condition of pH6 phosphate buffer/acetonitrile = 9/1 (2 minutes) → 2/8, not only meconic acid but also morphine, codeine, thebaine, noscapine and papaverine could be separated well. Therefore, it was found that this method could be used for simultaneously analyzing meconic acid, morphine, codeine, thebaine, noscapine and papaverine.

1. 緒 言

「あへん」とは、けしの液汁が凝固したもの及びこれに加工を施したもの（医薬品として加工を施したものを除く）をいい、あへん法によって輸入が規制されている。分析試料があへんであると判断するためには、その含有成分であるモルヒネ、コデイン、テバイン、ノスカピン、パパベリン等のアルカロイド成分の他に、あへん特有の成分であるメコン酸を化学的に確認する必要がある。

あへんは古くから用いられている薬物であり、その分析法も様々な方法が検討されている。湿式分析が主流であった時代は、呈色反応による確認が主体であったため、あへん成分を溶媒抽出によって分離することが不可欠であった。現在、税関分析で用いられているあへんの抽出法は、アルカロイド成分の単離を目的としたものであり、その抽出操作は煩雑である。

しかし、現在、麻薬、向精神薬等の薬物鑑定においては機器分析が主体となっており、呈色反応による確認はそれほど重要視されていない。例えば、GC-MSなどの機器分析を用いる方法では多くの成分を一斉に分離同定することが可能であるため、必ずしも従来の方法で各成分を分別する必要性はない。そこで、

我々はあへん中のアルカロイド成分の簡便な抽出法を検討した。

また、メコン酸はそのままではGC-MSで検出されないため、安藤ら¹⁾は誘導体化した後、検出する方法を検討している。一方、川口ら²⁾はメコン酸を誘導体化せず、分離生成した後、薄層クロマトグラフィーによる検出やHPLCによる検出を検討している。また、Ayyangarら³⁾はフェニル基を修飾したシリカゲルカラムを用いて、メコン酸を含めたその他のアルカロイド成分の一斉分析を試みているが、メコン酸以外のアルカロイド成分の分離が十分ではない。今回我々は税関の薬物分析で一般的に用いられているODSカラムを用いて、誘導体化処理を用いずに、メコン酸及びアルカロイド成分の一斉分析を検討した。

2. 実 験

2.1 試 料

あへん（関税中央分析所所有のもの）
塩酸モルヒネ（武田薬品工業製）
燐酸コデイン（武田薬品工業製）
ノスカピン（和光純薬製）
塩酸パパベリン（和光純薬製）
メコン酸（和光純薬製）

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

2. 2 装 置

ガスクロマトグラフ質量分析計HP6890/5973 (Agilent社製)

高速液体クロマトグラフHP1100 (Agilent社製)

2. 3 実 験

2. 3. 1 液/液抽出によるあへん中のアルカロイド成分の抽出

乾燥し、粉碎したあへん20mgをビーカーにとり、①pH1.4 (10%塩酸で調製したもの)、②pH13.0 (10%水酸化ナトリウム溶液で調製したもの)、③pH9.2 (10%塩酸及び10%水酸化ナトリウムで調製後、ほう酸溶液で微調製したもの)の各溶液で溶かし、5分間超音波振とうした。振とうした後、各溶液をろ過し、分液漏斗に移し入れ、10mlのクロロホルムを用いて抽出した。クロロホルム抽出液をGC-MSで測定した。

2. 3. 2 固/液抽出によるあへん中のアルカロイド成分の抽出

乾燥し、粉碎したあへん20mgをメスフラスコ10mlにとり、溶媒を加え、10分間超音波振とう後メスアップし、上澄みをメンブランフィルターでろ過したものをGC-MSで測定した。GC-MSの条件は次のとおりである。

カラム：HP-5MS (0.32mm I.D.×30m, 膜厚0.25 μ m) (Agilent社製)

注入口温度：320℃

検出器温度：320℃

キャリアガス：ヘリウム (スプリット比20：1)

オープン温度：200℃ (10分) → 10℃/分 → 320℃ (5分)

2. 3. 3 メタノール・クロロホルム混合溶液によるあへん中のアルカロイド成分の抽出効率の検討

乾燥し、粉碎したあへん20mgを10mlメスフラスコにとり、

メタノール・クロロホルム混合溶液を加え10分間超音波振とう後メスアップした。上澄みをメンブランフィルターでろ過し、ろ液5mlを正確にとり、10mlメスフラスコに移し入れ、さらにカフェイン溶液 (0.5g/l) を内標準溶液として1ml加え、メスアップしたものをGC-MSで測定した。

2. 3. 4 HPLCによるあへん中のメコン酸及びアルカロイド成分の分離条件の検討

乾燥し、粉碎したあへん100mgを10mlメスフラスコにとり、溶媒を加え10分間超音波振とう後メスアップし、上澄みをメンブランフィルターでろ過したものをHPLCで測定した。HPLCの条件は次のとおりである。

カラム：L-column ODS (4.6mm I.D.×250mm) ((財)化学物質評価研究機構製)

検出器：ダイオードアレイ検出器 (230nm)

流 速：0.5ml/分

移動相：リン酸緩衝溶液 (5mM) / アセトニトリル

3. 結果及び考察

3. 1 液/液抽出によるあへん中のアルカロイド成分の抽出

条件①～③で抽出したものをGC-MSで測定した結果をFig.1に示す。pH1.4で抽出したものからは、パパベリン、ノスカピン及びテバインが検出された。pH13.0で抽出したものからは、コデイン、テバイン及びパパベリンが検出された。pH9.2で抽出したものからは、モルヒネ、コデイン、テバイン及びパパベリンが検出された。

従って、pHを調整して目的とする5成分をすべて抽出するためには、少なくとも酸性及び微アルカリ性での2つの条件での抽出が必要となる。

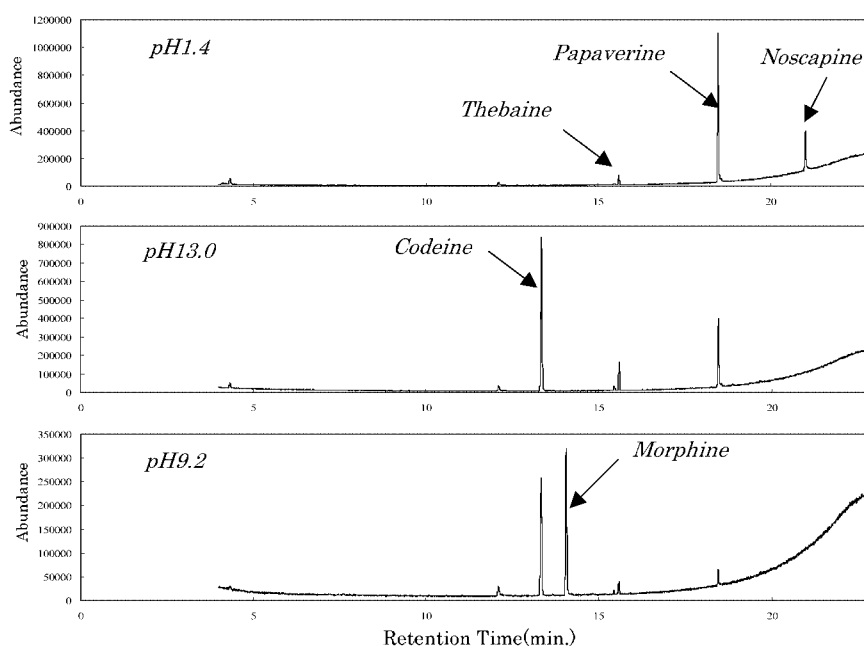


Fig. 1 Total Ion Chromatograms

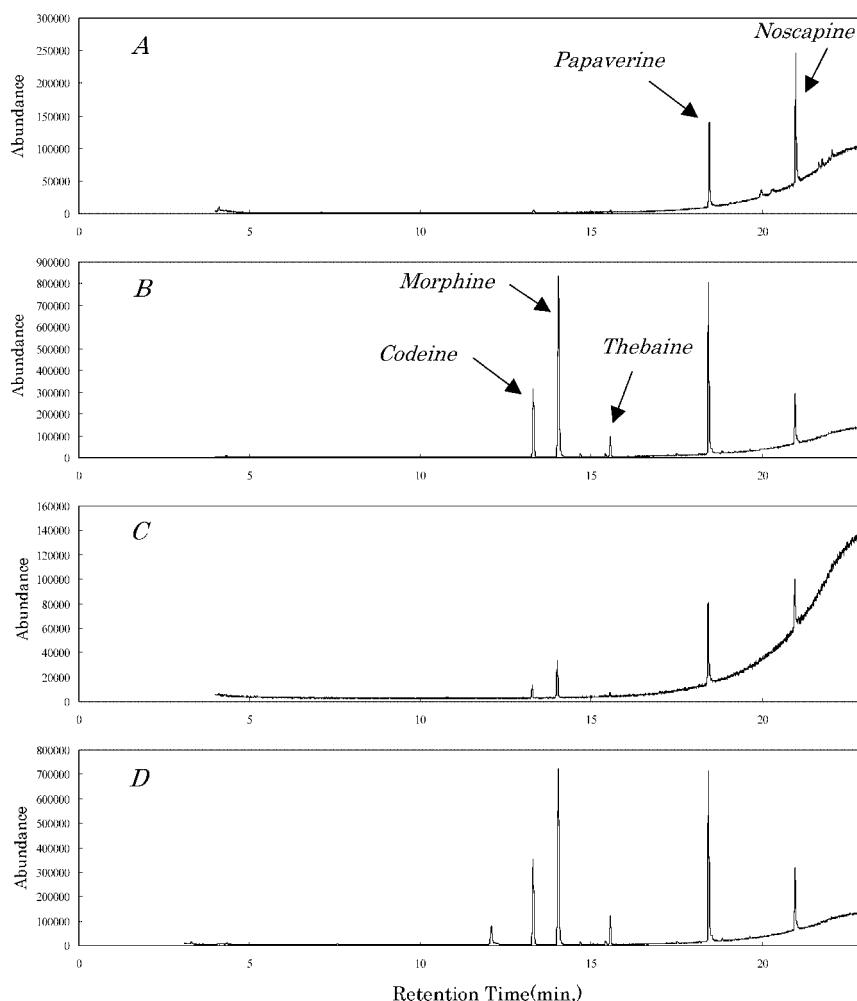


Fig. 2 Total Ion Chromatograms
 A: Extracts with Chloroform
 B: Extracts with Methanol
 C: Extracts with Isopropanol
 D: Extracts with Methanol /Chloroform=1/3

3. 2 固／液抽出によるあへん中のアルカロイド成分の抽出
 試料を直接クロロホルムで抽出したところ、パパベリン及びノスカピンが検出された (Fig.2)。

メタノールで抽出したところ、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンが検出された。同じアルコール系のイソプロピルアルコール抽出したところ、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンが検出されたが、メタノールで抽出した場合と比較すると、各ピークの強度は弱い。また、メタノールとクロロホルムの混合溶媒 (1 : 3) で抽出から、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンが検出された。

3. 3 メタノール・クロロホルム混合溶液によるあへん中のアルカロイド成分の抽出効率の検討

メタノール・クロロホルム混合溶液 (メタノール10,20,33.3及び50 v/v %) で各アルカロイド成分を抽出し、GC-MSで測定

した。内部標準物質 (カフェイン) に対する各成分のピーク面積の比をプロットしたものをFig.3に示す。クロロホルムだけの抽出では、パパベリン及びノスカピンのみが検出され、しかもそのピーク面積は小さいものであるが、メタノールを少量混合するだけで、全ての成分を抽出できることがわかった。また、各アルカロイド成分について、メタノールのみで抽出した結果が最も抽出効率が低いということもわかった。しかしながら、メタノールだけの抽出では、あへん中の糖質等の成分を多量に抽出してしまう可能性が考えられ、GC-MSで繰り返し測定すると、注入口、カラム、検出器等が汚染される。したがって、あへん中の含有成分を確認するという目的においては、メタノールを少量混合したクロロホルムで抽出する方法が望ましいと考えられる。

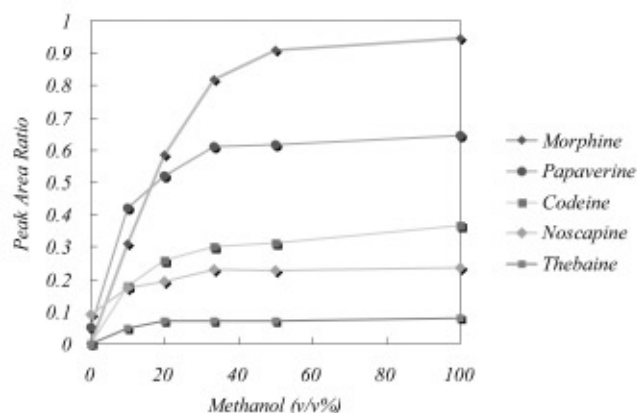


Fig. 3 Peak Area Ratio of Extracts with chloroform/ methyl alcohol solution

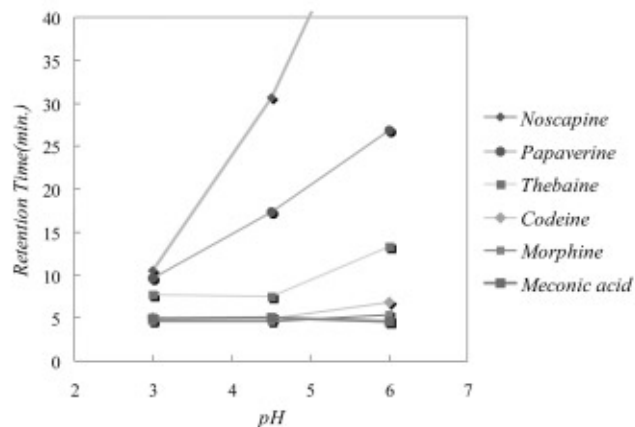


Fig. 5 Retention Time of Methanol-Extracts of Opium

3. 4 HPLCによるあへん中のメコン酸及びアルカロイド成分の分離条件の検討

3. 4. 1 移動相のpHによる各成分の分離挙動

HPLCの移動相として5 mMリン酸緩衝液：アセトニトリル=7:3を用い、リン酸緩衝液のpHを3.0, 4.5及び6.0に調製し、各あへん成分のピークの分離挙動を調べた。それぞれのpHにおけるクロマトグラム（検出波長230nm）をFig.4に示す。各クロマトグラムには、メコン酸、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンの他にも、その他のアルカロイド成

分や有機酸と考えられる多数のピークが検出された。いずれの条件においても、メコン酸はアルカロイド成分やその他の成分と分離できていない。

メコン酸、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンについてpH変化による保持時間の変化をプロットしたものをFig.5に示す。pHが大きくなるほど、各アルカロイド成分は全体的に保持時間が遅くなり、一方、メコン酸はpHに関わらずほとんど保持時間が変化しないということがわかった。

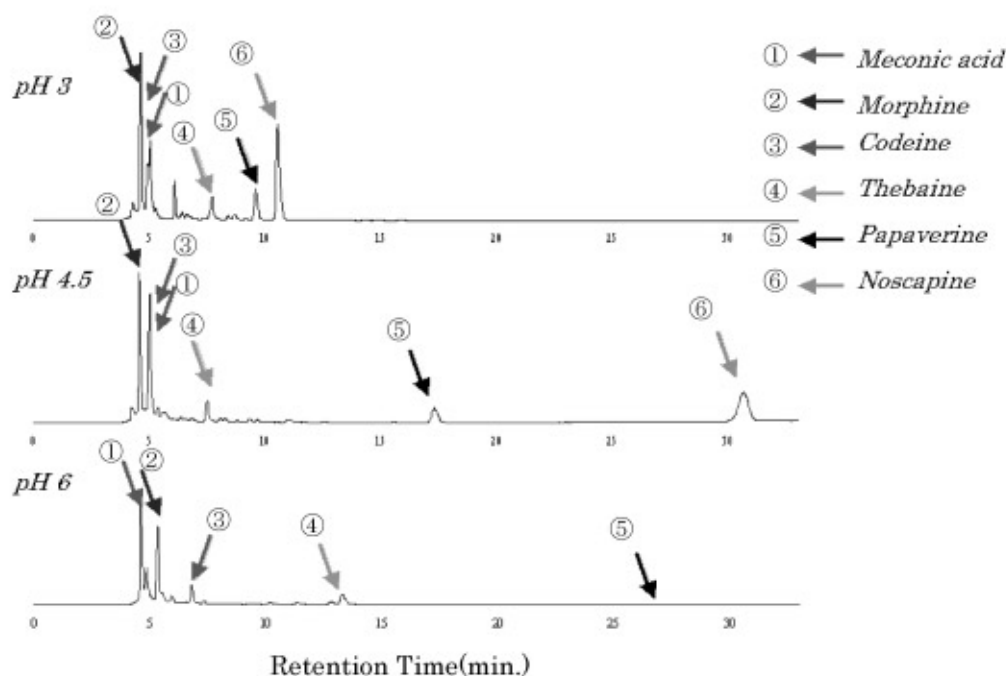


Fig. 4 HPLC Chromatograms of Methanol-Extracts of Opium (Phosphate buffer/Acetonitrile =7/3)

3. 4. 2 移動相のアセトニトリルの割合による各成分の分離挙動

HPLCの移動相として5 mMリン酸緩衝液 (pH6.0) /アセトニトリルを用い、アセトニトリルの割合を30, 50, 70及び90%に調製し、各あへん成分のピークの分離挙動を調べた。それぞれの移動相におけるクロマトグラム (検出波長230nm) をFig.6に示す。各クロマトグラムには、メコン酸、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンの他にも、その他のアルカロイド成分や有機酸と考えられる多数のピークが検出された。いずれの条件においても、メコン酸はアルカロイド成分やその他の成分と分離できていない。

メコン酸、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンについてアセトニトリルの含有割合による保持時間の変化をプロットしたものをFig.7に示す。アセトニトリルの割合が増加するほど、各アルカロイド成分は全体的に保持時間が早くなるが、メコン酸は逆に遅くなるのがわかった。

3. 4. 3 メコン酸及びアルカロイド成分の分離条件の検討

メコン酸を他の成分と分離するための条件として、次の2つの場合を考えた。

- ①先にアルカロイド成分等を溶出させ、後でメコン酸を溶出させる
- ②先にメコン酸だけを溶出させ、後でアルカロイド成分を溶出させる

3.4.1 及び 3.4.2 の結果から、①の場合にはpHを減少させ、アセトニトリルの割合を増加させればよいと考えられる。そこで、pH3リン酸緩衝液/アセトニトリル=1/9の移動相条件で測定を行った (Fig.8)。この結果、メコン酸は他の成分と完全に分離することができた。しかしながら、この条件ではメコン酸のピークはテーリングしてしまっている。そこで、アセトニトリルの割合を若干減少させ、pH3リン酸緩衝液/アセトニトリル=2/8の移動相条件で測定を行った (Fig.9) ところ、メコン酸のピークは他の成分と分離し、またピーク形状も良好であった。

また、②の場合には、pHを増大させ、アセトニトリルの割合を減少させればよいと考えられる。そこで、pH6.0リン酸緩衝液/アセトニトリル=9/1の移動相条件で測定を行った (Fig.10)。この結果、メコン酸は他の成分と完全に分離することができた。しかしながら、この条件ではメコン酸以外の成分の保持時間が極端に遅くなるため、この移動相条件からアセトニトリルの割合を増加させていくグラジエント溶離を試みた。Fig.11にpH6リン酸buffer /アセトニトリル=9/1 (2分) →2/8 (20分) (リニアグラジエント) の条件でグラジエント溶離させた結果を示す。この結果、メコン酸だけでなく、モルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン及びノスカピンを完全に分離することができた。したがって、この条件において、あへんの鑑定に必要な6成分を一斉に分離検出できる。

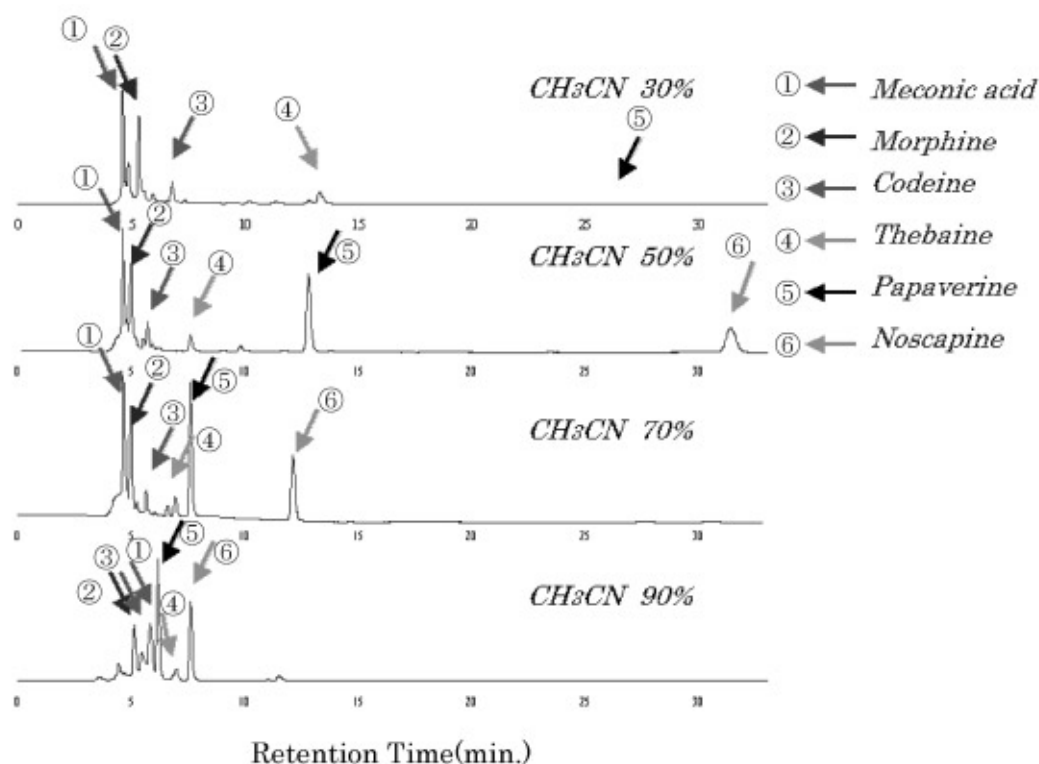


Fig. 6 HPLC Chromatograms of Methanol-Extracts of Opium (pH6.0 Phosphate buffer/Acetonitrile)

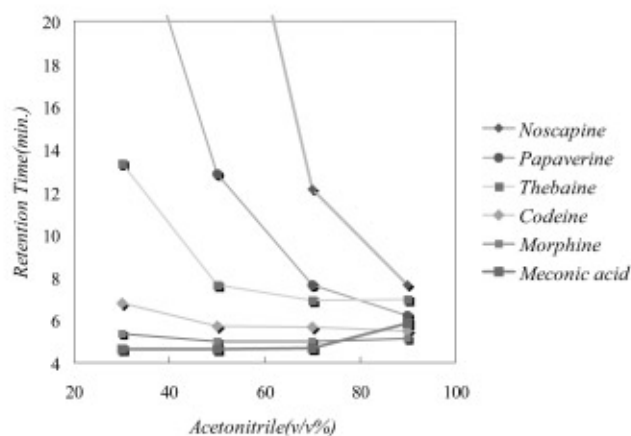


Fig. 7 Retention Time of Methanol-Extracts of Opium

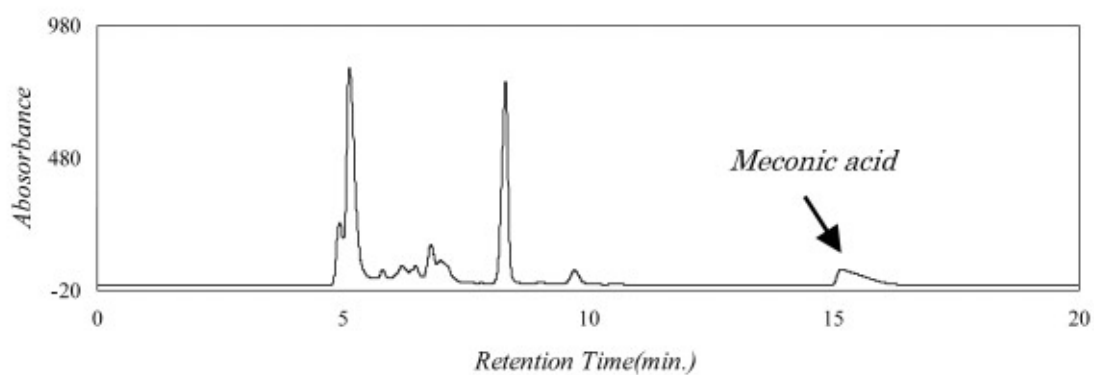


Fig. 8 HPLC Chromatograms of Methanol-Extracts of Opium (pH3.0 Phosphate buffer/Acetonitrile = 1/9)

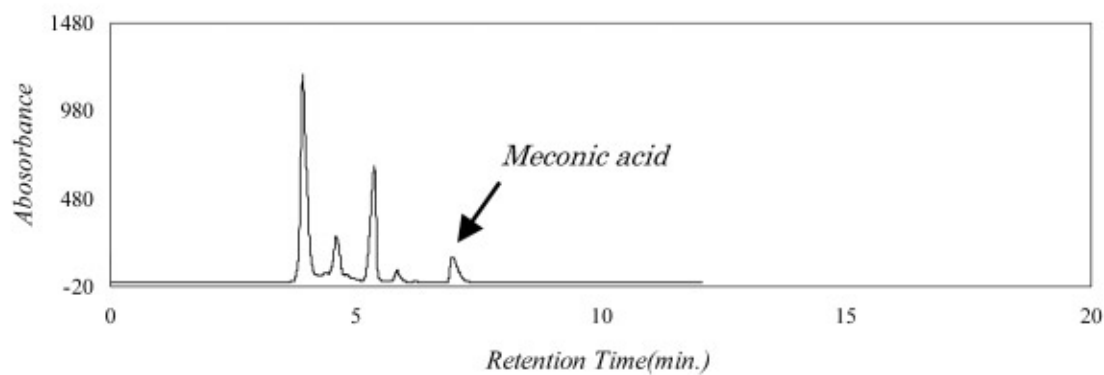


Fig. 9 HPLC Chromatograms of Methanol-Extracts of Opium (pH3.0 Phosphate buffer/Acetonitrile = 2/8)

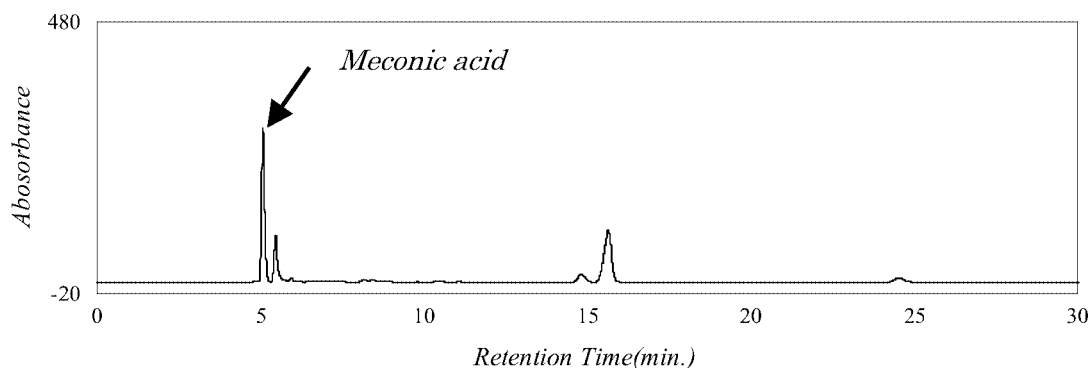


Fig. 10 HPLC Chromatograms of Methanol-Extracts of Opium (pH6 phosphate buffer/acetonitrile =9/1)

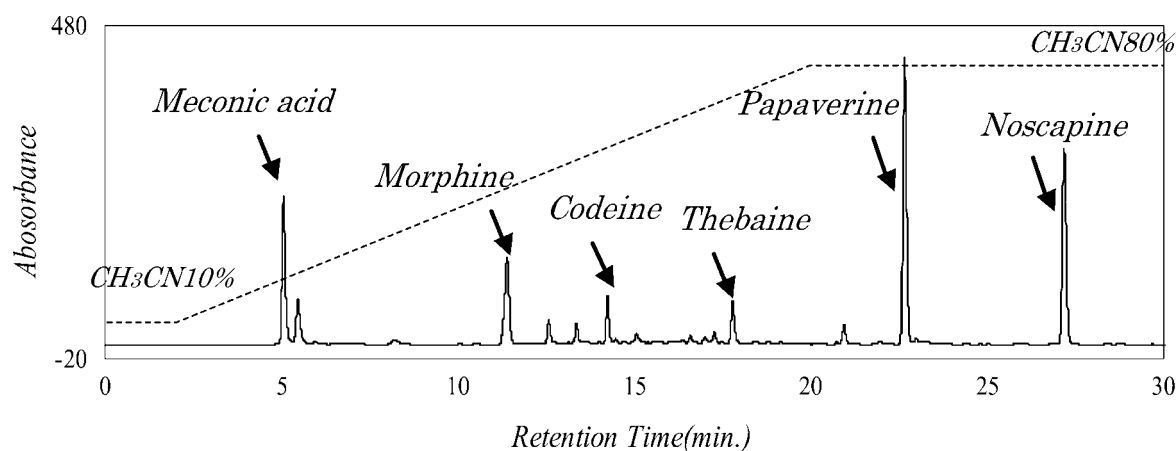


Fig. 11 HPLC Chromatograms of Methanol-Extracts of Opium (pH6 phosphate buffer/acetonitrile =9/1 →2/8)

4. 要 約

あへん中のアルカロイド成分の簡便な抽出法及びHPLCによるメコン酸及びあへんアルカロイド成分の分離法について検討した。あへんアルカロイド成分については、抽出溶媒としてクロロホルム・メタノール混合溶液を用いることにより、モルヒネ、コデイン、テバイン、ノスカピン、パパペリン等の主要アルカロイド成分が抽出され、GC-MSより各成分を分離同定で

きることがわかった。また、HPLCの移動相を検討した結果、ODSカラムを用い、pH3リン酸緩衝液/アセトニトリル=1/9の条件でメコン酸を分離同定できることがわかった。さらに、pH6リン酸buffer/アセトニトリル=9/1 (2分)→2/8 (20分)のグラジエント条件でメコン酸だけでなく、モルヒネ、コデイン、テバイン、ノスカピン及びパパペリンも良好に分離され、アルカロイド成分を含めた同時一斉分析も可能であることがわかった。

文 献

- 1) 安藤皓章, 大下敏隆, 阿部猛, 科学警察研究所報告, 40, 103 (1987)
- 2) 川口公明, 千葉光伸, 磯野秀夫, 衛生科学, 38, 517 (1992)
- 3) N.R.Ayyangar, S.R.Bhide, *J.Chromatogr.*, 436, 455 (1988)