

# 高速液体クロマトグラフ法による感冒薬中の 1-フェニル-2-メチルアミノプロパノール-1の 定量法の検討

池田 勝\*、堀田 佳江\*、平木 利一\*、中村 文雄\*

## Determination of 1-phenyl-2-methylaminopropanol-1 in Cold Medicines by High-Performance Liquid Chromatography

Masaru IKEDA\*, Yoshie HORITA\*, Toshikazu HIRAKI\*, Fumio NAKAMURA\*

\*Osaka Customs laboratory

4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031, Japan

An HPLC method for determining ephedrine in cold medicines was studied. It was found that ephedrine and pseudoephedrine could be separated from 20 other active ingredients in cold medicines by HPLC using an Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 250 mm) column, eluted with SDS aq. (1→128)/acetonitrile/phosphoric acid (600/400/1) as mobile phase with UV detection at 210 nm. This method showed good repeatability and recovery.

### 1. 緒 言

### 2. 実 験

1-フェニル-2-メチルアミノプロパノール-1（エフェドリン）は鎮咳作用を有することから感冒薬の有効成分として用いられ、他の有効成分（抗ヒスタミン剤や解熱・鎮痛剤等）とともに感冒薬中に含まれている。

エフェドリン及びその塩類は覚せい剤取締法第2条第5項（別表第1号）において覚せい剤原料として規制されているが、エフェドリンとして10%以下を含有する物は除かれるため、エフェドリンを定量する必要がある。

エフェドリンの定量方法としては、結晶状で純品に近い場合には非水滴定法<sup>1)</sup>で、その他の場合はガスクロマトグラフ法で行うことが知られている<sup>1)</sup>。しかし、感冒薬のように他の有効成分等が含まれているものは非水滴定法を適用できず、ガスクロマトグラフ法はバックドカラムを使用すること及び内標準物質として向精神薬であるフェンテルミンを使用することなどから、適当でない。また、日本薬局方におけるマオウ中のエフェドリンの定量法は液体クロマトグラフ法により行っている<sup>2)</sup>。

そこで本研究では、日本薬局方の条件をもとに液体クロマトグラフ法（HPLC法）により、エフェドリンと他の有効成分の分離条件を確認し、エフェドリンの定量方法を検討した。

#### 2. 1 標準品及び試料

##### 2. 1. 1 標準品

イブプロフェン、グアイフェネシン、クロルフェニラミンマレイン酸塩、ケタミン塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩、デキストロメトルフアン臭化水素酸塩一水和物、ナプロキセン、ブロムフェニラミンマレイン酸塩、ロラタジン及びアトロピン硫酸塩一水和物（和光純薬）、カルピノキサミンマレイン酸塩、スコボラミンメチル硝酸塩、テルフェナジン、ドキシラミンコハク酸塩及びトリプロリジン塩酸塩（SIGMA）、カフェイン及びニコチン酸（キシダ化学）アセトアミノフェン及びテオフィリン（東京化成）、コデインりん酸塩（武田薬品）、エフェドリン塩酸塩、プソイドエフェドリン及びメチルエフェドリン塩酸塩（大日本製薬）

##### 2. 1. 2 試料

市販の感冒薬：2錠中にプソイドエフェドリン塩酸塩 60mg 含有と表示されているもの

#### 2. 2 装置及び測定条件

##### 2. 2. 1 装置

高速液体クロマトグラフ（HPLC）：HP1100（Hewlett Packard）

##### 2. 2. 2 測定条件

カラム：Inertsil ODS-3 5 µm 4.6mm i.d. × 250mm

\* 大阪税関業務部 〒559-0031 大阪市住之江区南港東 4-11-28

カラム温度：40℃

流速：1.0 及び 1.5 ml/min

注入量：10  $\mu$  l

検出器：DAD

検出波長：210nm

測定試料調製：移動相 C 液で調製（2. 3. 1 を除く）

内標準物質：アトロピン硫酸塩一水和物

移動相 A 液：ドデシル硫酸ナトリウム水溶液（1→128）／りん酸＝（640：1）

移動相 B 液：アセトニトリル

移動相 C 液：ドデシル硫酸ナトリウム水溶液（1→128）／アセトニトリル／りん酸＝（600：400：1）

## 2. 3 実験方法

### 2. 3. 1 移動相組成の検討

エフェドリン塩酸塩及び内標準物質の濃度がそれぞれ約 0.5mg/ml のものを、HPLC に注入した。移動相は、グラジエントにより移動相 A 液と B 液の混合比を変化させて、保持時間と移動相の混合比との関係を調べ、最適な移動相組成を求めた。測定試料の調製は、ドデシル硫酸ナトリウム水溶液（1→128）／アセトニトリル／りん酸＝（640：360：1）で希釈した。

最適な移動相組成で混合した移動相 C 液を調製し、再度 HPLC に注入し、流速を変化させて、最適な条件を求めた。

### 2. 3. 2 標準品の分離

移動相を C 液とした HPLC に、各標準品の濃度が約 0.5mg/ml の混合液を注入し、エフェドリン類と他の有効成分が分離することを確認した。なお、保持時間が非常に長いものもあるため、プソイドエフェドリン、エフェドリン塩酸塩及び内標準物質が検出された後、グラジエントにより移動相 B 液を混合し、分析終了時間の短縮化を図った。以下、このグラジエント条件で測定を行うこととした。

### 2. 3. 3 繰り返し精度

プソイドエフェドリン、エフェドリン塩酸塩及び内標準物質の濃度がそれぞれ約 0.5mg/ml の混合液を HPLC に 5 回注入し、ピーク面積比の繰り返し精度を調べた。

### 2. 3. 4 検量線

#### 2. 3. 4 (1) 絶対検量線法

0.1～1 mg/ml のエフェドリン塩酸塩を含む溶液をそれぞれ HPLC に注入し、ピーク面積と濃度との関係を調べた。

#### 2. 3. 4 (2) 内標準法

0.06～1.2 mg/ml のエフェドリン塩酸塩を含む溶液に内標準物質が約 0.6 mg/ml となるように加え、それぞれ HPLC に注入し、ピーク面積比と濃度比との関係を調べた。

### 2. 3. 5 模擬サンプル（3種）におけるエフェドリンの回収率

別々の 100 ml 容メスフラスコにそれぞれ乳糖約 880 mg 及びエフェドリン塩酸塩約 120mg、グアイフェネシン約 880mg 及びエフェドリン塩酸塩約 120mg、アセトアミノフェン約 880mg 及びエフェドリン塩酸塩約 120mg を精秤し定容する。

これらの溶液から各々 10ml 採取し、それぞれ 20ml 容メスフラスコへ移し、内標準液（内標準物質の濃度：約 12mg/ml）を 1ml 加え、定容する。

これを 0.45  $\mu$  m メンブランフィルターに通し、得られた検液を HPLC に注入し、エフェドリンの回収率を求めた。

### 2. 3. 6 市販薬中のエフェドリンの定量

市販薬（1錠あたり約 300mg）を乳鉢で細かく粉碎したもの約 100 mg を 20ml 容メスフラスコに精秤し、内標準液（内標準物質の濃度約 10mg/ml）を 1ml 加え、定容する。

これを 0.45  $\mu$  m メンブランフィルターに通し、得られた検液を HPLC に注入し、プソイドエフェドリンの含有量を求めた。

なお、エフェドリンとプソイドエフェドリンの吸光度は等しいとされている<sup>3)</sup>ので、エフェドリンの検量線を用いて定量を行った。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 移動相組成の検討

エフェドリン塩酸塩及び内標準物質の保持時間と移動相組成の関係を Fig.1 に示す。

移動相 A 液の組成割合が多くなるにしたがい、それぞれ保持時間が長くなり、ピークの間隔は大きくなる。またエフェドリン塩酸塩と内標準物質の分離度は、移動相 A 液 60% では 1.34、65% では 2.24 であり、定量に必要な最低限の分離度は 1.5 以上とされていることから<sup>4)</sup>、最適な移動相組成は 60～65% であると考えられる。そこで、ドデシル硫酸ナトリウム水溶液（1→128）／アセトニトリル／りん酸（600/400/1）の移動相 C 液を用いて、再度測定を行ったところ、分離度 1.52 となり良好な結果が得られた。さらに、流速を 1.0ml/min から 1.5ml/min とした場合、分離度に変化なく保持時間は短くなった。

以下、移動相 C 液（ドデシル硫酸ナトリウム水溶液（1→128）／アセトニトリル／りん酸＝600/400/1）を用い、流速を 1.5ml/min として実験を行った。

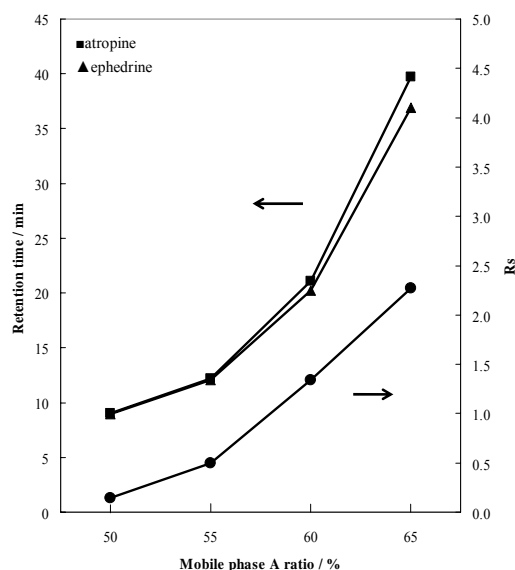


Fig.1 Relationship between retention time and mobile phase A ratio.

### 3. 2 標準品の分離

Fig.2 に全標準品の混合物のクロマトグラム及びメチルエフェドリン塩酸塩を除く標準品の混合物のクロマトグラムを示す。また各成分の保持時間と保持係数 ( $k'$ ) を Table に示す。

ほとんどの成分ではピークは 1 本検出されるが、デキストロメトर्फアン臭化水素酸塩、スコボラミンメチル硝酸塩、カルビノキサミンマレイン酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩及びブロモフェニラミンマレイン酸塩の 5 成分については 2 本のピークが検出される。

プソイドエフェドリン、エフェドリン塩酸塩及び内標準物質の保持時間は、13.6 分、14.5 分及び 15.2 分で、それぞれ他の標準品とは完全に分離していることがわかる。しかし、内標準物質とメチルエフェドリン塩酸塩は分離することができなかった。

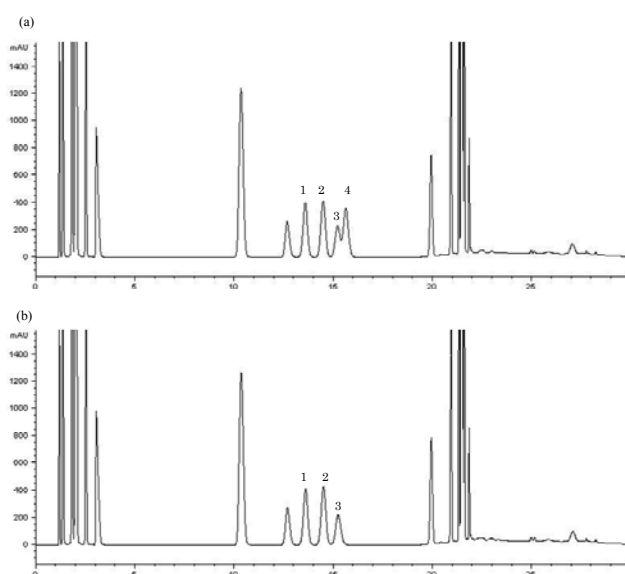


Fig.2 HPLC Chromatograms of standard samples using mobile phase A at 1.5ml/min.

(a) Compound of all standard samples

(b) Compound of standard samples except methylephedrine

Gradient method :

0min→17min mobile phase C (100%)

17min→20min mobile phase C (100%→0%),  
mobile phase B (0%→100%)

20min→25min mobile phase B (100%)

Peak number : 1,pseudoephedrine; 2,ephedrine;  
3,atropine; 4,methylephedrine.

Table Retention time and capacity factor of standard samples by HPLC

Standard sample	Retention time (min)		Capacity factor ( $k'$ )	
	①	②	①	②
Dextromethorphan	1.17	21.46	1.41	25.85
Scopolamine methyl	1.18	12.67	1.42	15.26
Carbinoxamine	1.36	21.45	1.63	25.84
Brompheniramine	1.36	21.51	1.64	25.92
Chlorpheniramine	1.36	21.48	1.64	25.88
Theophylline	1.82		2.20	
Acetaminophen	1.98		2.38	
Caffeine	2.04		2.46	
Guaifenesin	2.51		3.03	
Nicotinic acid	3.06		3.69	
Codeine	10.30		12.41	
Naproxen	10.40		12.52	
Pseudoephedrine	13.58		16.36	
Ephedrine	14.46		17.42	
Atropine	15.19		18.30	
Methylephedrine	15.61		18.81	
Ketamine	19.92		24.00	
Ibuprofen	20.93		25.21	
Diphenhydramine	21.32		25.69	
Doxylamine	21.44		25.83	
Triprolidine	21.48		25.88	
Loratadine	21.60		26.02	
Terfenadine	21.84		26.31	

### 3. 3 繰り返し精度

エフェドリン塩酸塩と内標準物質、プソイドエフェドリンと内標準物質について、それぞれのピーク面積比の再現性を求めると、平均値は 1.46 (変動係数 0.044%,  $n=5$ ) と 1.59 (変動係数 0.044%,  $n=5$ ) となり、良好な結果が得られた。

### 3. 4 検量線

#### 3. 4. 1 絶対検量線法

エフェドリン塩酸塩のピーク面積と濃度との関係を求めると、相関式 :  $Y = 14.1475X + 26.60085$  (相関係数 = 0.99997) となり、原点付近を通る良好な直線性が得られた。

#### 3. 4. 2 内標準法

エフェドリン塩酸塩と内標準物質について、濃度比とピーク面積比との関係を求めると、相関式 :  $Y = 1.7303X + 0.0140$  (相関係数 = 0.99995) となり、原点付近を通る良好な直線性が得られた。

### 3. 5 模擬サンプルにおけるエフェドリンの回収率

模擬サンプル 3 種のエフェドリンの回収率を求めると、エフェドリン塩酸塩と乳糖は 100.5% ( $n=5$ )、エフェドリン塩酸塩とグアイフェネシンは 100.1% ( $n=5$ )、エフェドリン塩酸塩とアセトアミノフェンは 100.1% ( $n=5$ ) となり、良好な回収率が得られた。

### 3. 6 市販薬中のエフェドリンの定量

市販薬について、HPLC 法によりプソイドエフェドリン塩酸塩の定量を行うと、1 錠あたり 30.7mg 含有する結果となった。2. 1. 2 でも記したが、当該市販薬 2 錠中には 60mg のプソイドエフェドリン塩酸塩が含有しており、実験の結果と良く一致している。

#### 4. ま と め

今回、日本薬局方における HPLC 条件を参考に、感冒薬中のエフェドリンの定量方法を検討した。その結果、HPLC により、エフェドリン塩酸塩とプソイドエフェドリンが他の有効成分 (20 種) と

分離し、良好な繰り返し精度と回収率を示すことがわかった。

しかし、内標準物質のアトロピンとメチルエフェドリン塩酸塩の保持時間は非常に近接しており、分離することができなかった。従って、メチルエフェドリンを定量するためには、絶対検量線法を用いるか、他の内標準物質を検討する必要がある。

#### 文 献

- 1) 日本薬学会編：“第2版薬毒物化学試験法注解”、P.237 (1982)、(南山堂)
- 2) 日本薬局方解説書編集委員会編：“第十四改正日本薬局方解説書”、P.569 (2001)、(廣川書店)
- 3) 日本薬局方解説書編集委員会編：“第十四改正日本薬局方解説書”、P.1092 (2001)、(廣川書店)
- 4) L.R.Snyder・J.L.Glajch・J.J.Kirkland：“高速液体クロマトグラフィーの基礎”、P.25 (1992)、(東京化学同人)