

ノート

安定同位体を利用した不正薬物の定量法（第1報） エフェドリン

古賀智子, 平木利一, 氏原 覚*

Determination of Illicit Drugs by FAB-MS using Stable Isotope as an Internal Standard. . .
Ephedrine

Tomoko KOGA, Toshikazu HIRAKI and Satoru UJIHARA

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531 Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271-0076 Japan

Quantitative analysis of ephedrine by fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) was investigated using ephedrine labeled by stable isotope, "ephedrine-d5", as an internal standard.

It appeared that each protonated molecular ion of ephedrine and ephedrine-d5 had good proportional relation between the peak area ratio and the weight ratio, and that lactose and some coexistent effective substances gave no significant effect to the measured values of ephedrine content. Therefore, it was proved that this method would provide satisfactory results in determination of ephedrine rapidly and briefly. This method was difficult of precision determination of pseudoephedrine.

1. 緒言

エフェドリンは、天然には麻黄などの植物に含まれており、5000年以前から漢方薬として利用されている。特に、鎮咳・気管支拡張等の薬効を有するので、風邪薬（総合感冒薬）に配合されていることが多いが、エフェドリンは覚せい剤の原料物質であるため、覚せい剤取締法により輸入等が規制されている。しかし、エフェドリンとして10%以下を含有する製剤については、取締り対象外である（同法別表1、第1号）ため、定量分析が必要となる。

現在、エフェドリンの定量には、ガスクロマトグラフ(GC)¹⁾又は高速液体クロマトグラフ(HPLC)²⁾等が用いられているが、風邪薬のように多成分系の試料では、混合成分と分離するよう測定条件を検討することが重要な問題となる。また、定量を内部標準法で行う場合は、適切な内部標準物質を選定し、測定毎に検量線を作成しなければならない。一般に、エフェドリンは塩酸塩の形で含有されているため、成分の抽出、誘導体等の前処理に伴う抽出効率の問題も考慮する必要がある。

質量分析計(MS)を用いて定量する場合、内部標準物質は、その物質の安定同位体標識体が最適であるとされている³⁾。安

定同位体化合物は、未置換の目的物質と質量数は変化するが、その他の化学的、物理的性質はほとんど変わらないため、抽出効率を考慮する必要がない。また、あらかじめ検量線を作成しておけば、その都度作成する必要がない。

また、高速原子衝撃質量分析(FAB-MS)法は、試料をマトリックスと混合し、キセノン原子を衝突させるだけで測定が可能なため、簡単、迅速な質量分析法として、近年、急速に普及した方法である⁴⁾。

そこで、今回は、ベンゼン-d6より合成した塩酸エフェドリン-d5を内部標準に用いたFAB-MS法によるエフェドリンの定量を試みた。

2. 実験

2.1 試薬

ベンゼン-d6(MERCK)

プロピオン酸クロリド(東京化成)

N-メチルベンジルアミン(和光純薬)

無水塩化アルミニウム(和光純薬)

塩酸エフェドリン(大日本製薬)

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：二重収束型質量分析装置 JMS-700 (日本電子)
 衝撃ガス：キセノン
 測定モード：正イオンモード
 加速電圧：7 kV
 FABエネルギー：5 keV, 2 mA
 質量分解能：1000
 スキャン質量範囲：100 ~ 300
 スキャン時間：6.5 秒
 マトリックス：チオグリセリン

2.2.2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)
 装置：LC-10 (島津製作所)
 カラム：CAPCELL PAK C18 (4.6 × 150 mm)

移動相：水：アセトニトリル：SDS：りん酸 = 65 : 35 : 0.5 : 0.1

カラム温度：40

流速：1.4 ml/min

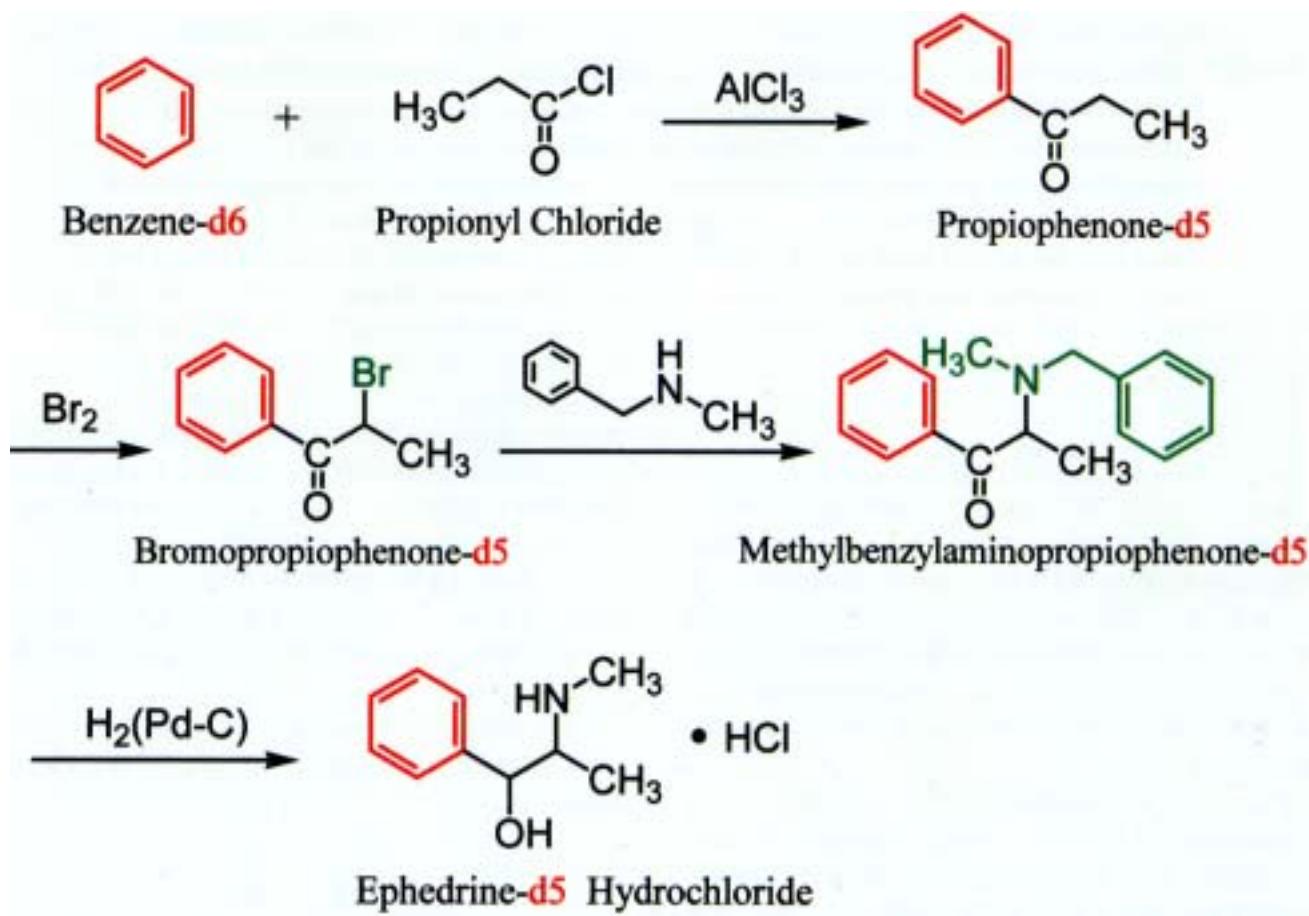
注入量：30 μl

検出器：UV (210 nm)

2.3 実験方法

2.3.1 塩酸エフェドリン-d5 の合成

無水塩化アルミニウム触媒の下、ベンゼン-d6 とプロピオニ酸クロリドの混合物を加熱還流し、プロピオフェノン-d5 を合成した。これを臭素化後、N-メチルベンジルアミンを用いてメチルアミノ化を行い、直接還元して塩酸エフェドリン-d5 を合成した⁵。合成経路を Scheme 1 に示す。合成した塩酸エフェドリン-d5 は、クロロホルムより再結晶して精製した。



Scheme 1

2.3.2 塩酸エフェドリン-d5 を内部標準に用いた塩酸エフェドリンの定量

2.3.2.1 試料採取量の検討

まず、定量にあたりマトリックス 1 μl に対する最適

な試料採取量を検討した。塩酸エフェドリン-d5 と標準塩酸エフェドリンをそれぞれ約 5, 30, 50, 100, 150 nmol づつ含有する試料をマトリックス 1 μl と混合し、FAB-MS により繰り返し測定して、その平均ピー

ク面積比や変動係数を求め、最適な試料採取量を検討した。

2.3.2.2 検量線の作成

塩酸エフェドリンと塩酸エフェドリン-d5 を重量比でそれぞれ 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 となるように調製し、FAB-MS により繰り返し測定して、重量比とピーク面積比の検量線を作成した。

2.3.2.3 共存物質の定量値に与える影響

乳糖と塩酸エフェドリンを塩酸エフェドリンの含有量が 10%となるように試料を調製し、2.3.2.2 で作成した検量線を用いて FAB-MS 法で定量を行い、乳糖が定量値に与える影響を調べた。また、風邪薬に含まれていることの多い9種類の薬効成分について、FAB-MS 法で測定し、現れたピークを確認した。

2.3.3 エフェドリンを含有する製剤一般への応用

2.3.3.1 試 料

エフェドリンを含有する製剤3種類（錠剤2種類、カプセル剤1種類）

2.3.3.2 試料調製及び測定方法

均一に粉碎したサンプルを約 30mg、塩酸エフェドリ

ン-d5 約 3 mg を 1.5ml エッペンドルフチューブに精秤し、エタノール + 水約 1 ml で抽出した。遠心分離後、上澄み 2 μl をチオグリセリン（マトリックス）1 μl と試料ホルダー上で混合し、FAB-MS で測定し、2.3.2.2 の検量線からエフェドリンの含有量を算出した。また、HPLC 法でも定量を行い、定量値を比較検討した。

2.3.4 プソイドエフェドリンの定量への応用

塩酸プロイドエフェドリンと塩酸エフェドリン-d5 を約 30nmol づつ混合した試料を用いて、FAB-MS 法で塩酸プロイドエフェドリンを定量し、結果をエフェドリンの場合と比較することにより、エフェドリンのジアステロマーであるプロイドエフェドリンの定量に、塩酸エフェドリン-d5 が内部標準物質として使用可能かどうかを検討した。

3. 結果及び考察

3.1 塩酸エフェドリン-d5 の FAB-MS

合成した塩酸エフェドリン-d5 及び標準塩酸エフェド

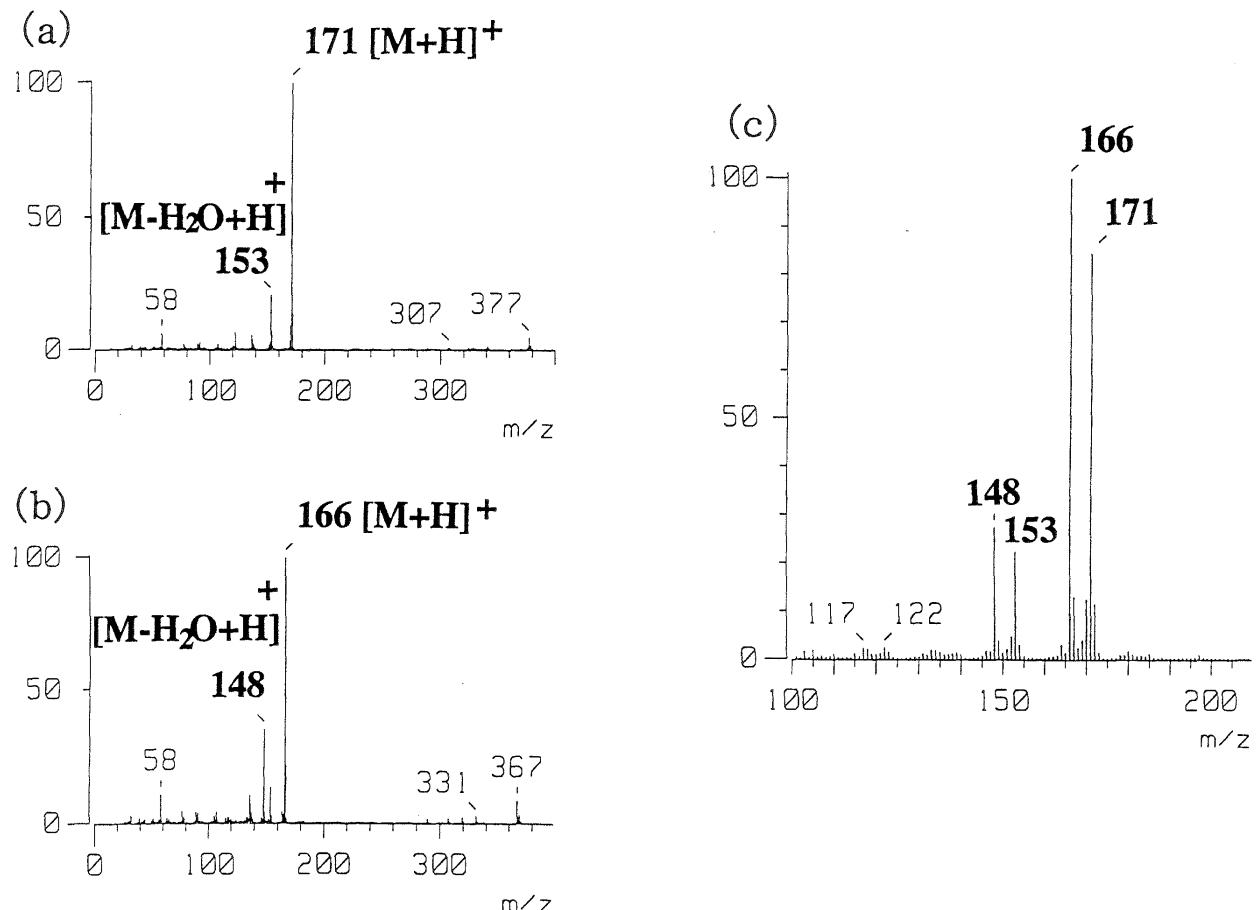


Fig.1 Spectra of FAB-MS

(a)Ephedrine-d 5 Hydrochloride

(b)Ephedrine Hydrochloride

(c)Ephedrine-d 5 Hydrochloride + Ephedrine Hydrochloride

リンのFAB-MSをFig.1(a), (b)に示す。エフェドリンのプロトン付加分子イオンピーク($m/z166$)及び脱水イオンピーク($m/z148$)が、エフェドリン-d5ではそれぞれ5マスズつ増えて、 $m/z171, 153$ となっていることが確認された。今回は、それぞれのプロトン付加分子イオンピークである $m/z166$ 及び $m/z171$ を選択して定量分析を行った。

3.2 試料採取量の検討

Fig.2(a)に、塩酸エフェドリン-d5の試料採取量と

ピーク面積比($m/z166 / m/z171$)を示す。塩酸エフェドリン-d5のmol数が30nmol以上の場合、ピーク面積比はほぼ一定の値をとることが分かった。5nmolの時の値が大きいが、これは、今回使用したマトリックスのチオグリセリンに極微量だが、 $m/z166$ のピークが存在するため、試料採取量が少量の場合には、その影響が大きくなることによるものと考えられる。

Fig.2(b)には、試料採取量と測定毎の変動係数を示した。30nmol前後が変動係数も1%以下で安定した値が

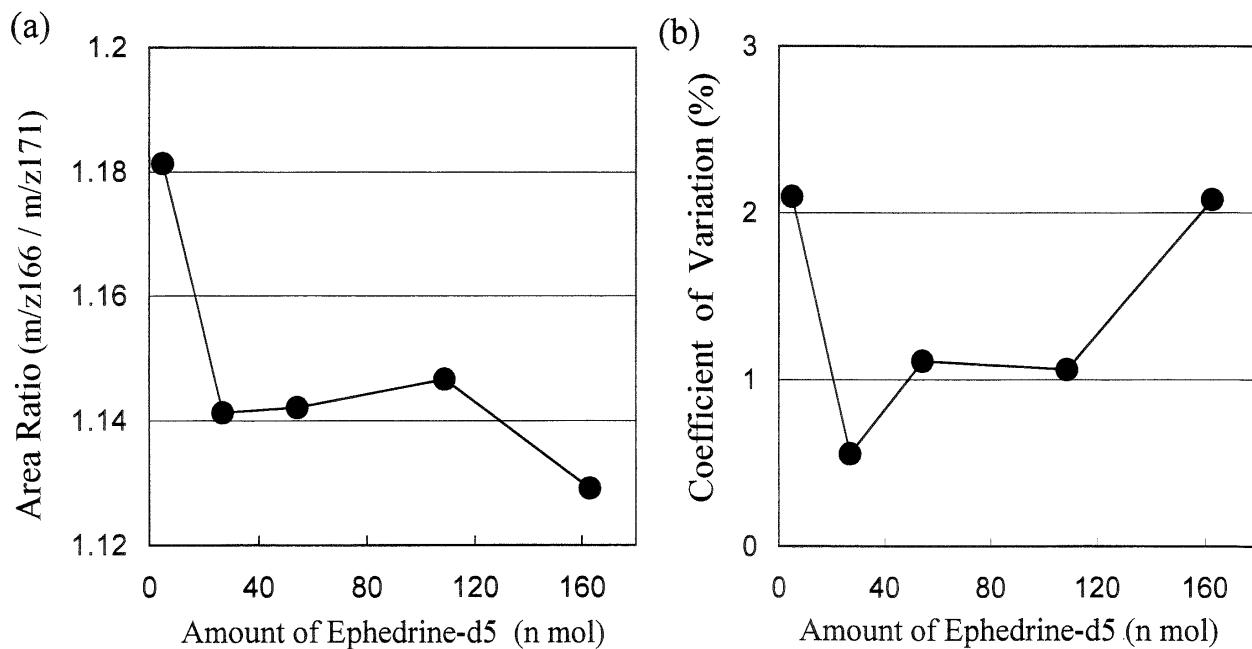


Fig.2 Investigation of sample amount to determine Ephedrine

(a)The relationship between amount of ephedrine-d5 and average area ratio ($n = 100$)

(b)The relationship between amount of ephedrine-d5 and coefficient of variation ($n = 100$)

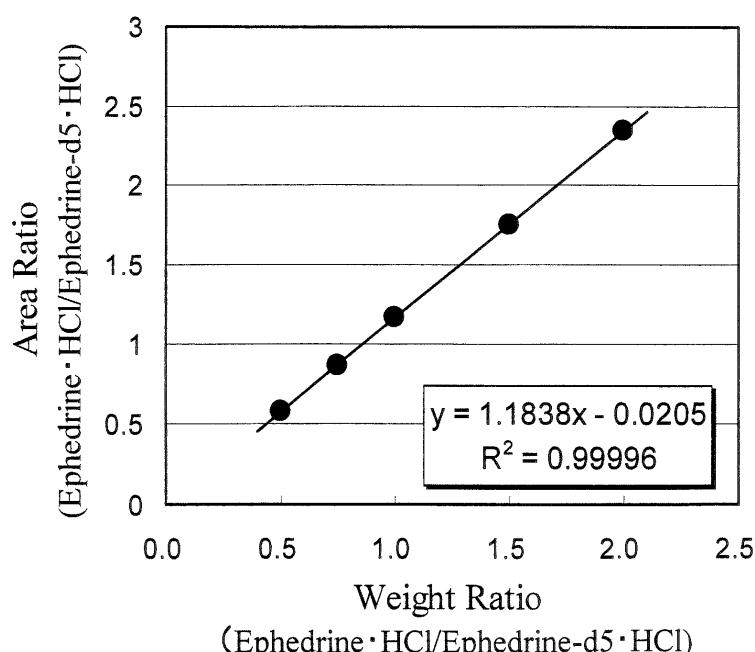


Fig.3 Calibration Curve of Ephedrine by FAB-MS

得られたため、塩酸エフェドリン-d5 の試料採取量は約 30nmol が適當と判断した。

3.3 検量線の作成

塩酸エフェドリンと塩酸エフェドリン-d5 の重量比とピーク面積比の検量線を Fig. 3 に示す。両者の重量比が 0.5 から 2 までの範囲では、相関係数 $r^2 = 0.99996$ と非常に良好な相関関係が得られた。

3.4 製剤中の共存物質の影響

3.4.1 乳糖の影響

Table 1 に、調製試料（乳糖と塩酸エフェドリン 10%）の定量結果を示す。定量値は、10.08% とほぼ正確に定量できており、乳糖は FAB-MS 法でのエフェドリンの定量値に影響を与えないことが分かった。

Table 1. Determination of Ephedrine in preparation (prepared ephedrine content : 10%)

Method	Ephedrine·HCl(%)	Recovery(%)
FAB-MS	10.08	100.8
HPLC	10.09	100.9

3.4.2 その他の薬効成分

Table 2 に示した 9 成分は、定量用に用いる $m/z 166, 171$ にピークが検出されなかつたため、これらの成分が共存していても、FAB-MS 法でエフェドリンの定量が可能と考えられる。

3.5 エフェドリンを含有する製剤一般への応用

Table 3 に 3 種類の製剤についての FAB-MS 法及び HPLC 法による定量結果を示す。定量値はエフェドリンとしての含有量である。どちらの方法でもほぼ等しい値と

Table 2 Effective substances investigated by FAB-MS

Substance	Therapeutic Category (in humans)
Acetaminophen	Analgesic,Antipyretic
Aminopyrine	Analgesic,Antipyretic
Aspirin	Analgesic,Anti-inflammatory,Antipyretic
Caffeine	Central nervous system stimulants , Analeptics,Diuretics
Chlorpheniramine (maleate)	Antihistamine
Dextromethorphan (hydrobromide)	Antitussive
Ibuprofen	Analgesic,Anti-inflammatory,Antipyretic
Phenacetin	Analgesic,Antipyretic
Phenobarbital	Sedative hypnotic,Antipyretic

なっているが、試料 B は HPLC 法の値が大きい。これは、HPLC 法では、エフェドリンのピークと他の混合成分のピークが重なっているためと推定される。

また、HPLC 法では、装置の安定等を含めると、測定に 1, 2 日要したが、FAB-MS 法の場合は、数十分で高精度な定量が可能であった。

Table 3 Determination of Ephedrine in some preparations

Sample	Form	Ephedrine content (%)	
		FAB-MS	HPLC
A	Blue Tablet	1.62	1.60
B	Blue Capsule	5.26	5.67
C	White Tablet	9.42	9.01

3.6 プソイドエフェドリンの定量への応用

プロイドエフェドリンの定量値のバラツキは、変動係数 (c.v.) 2.53% (スキャン回数: 100 回) となり、エフェド

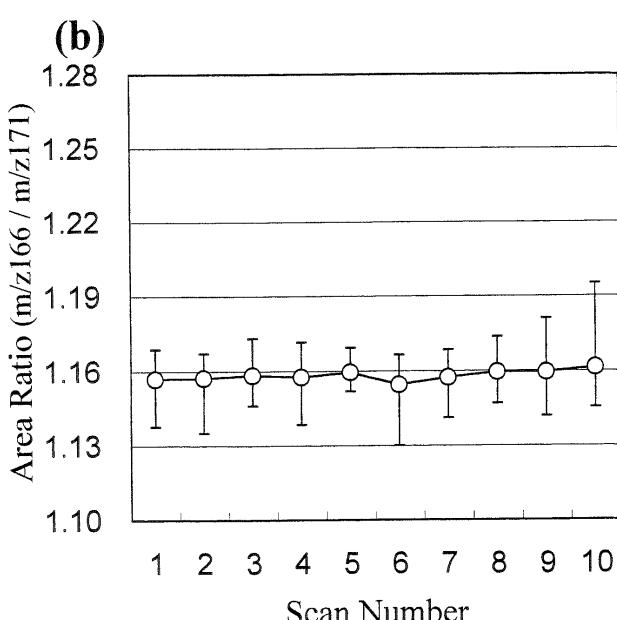
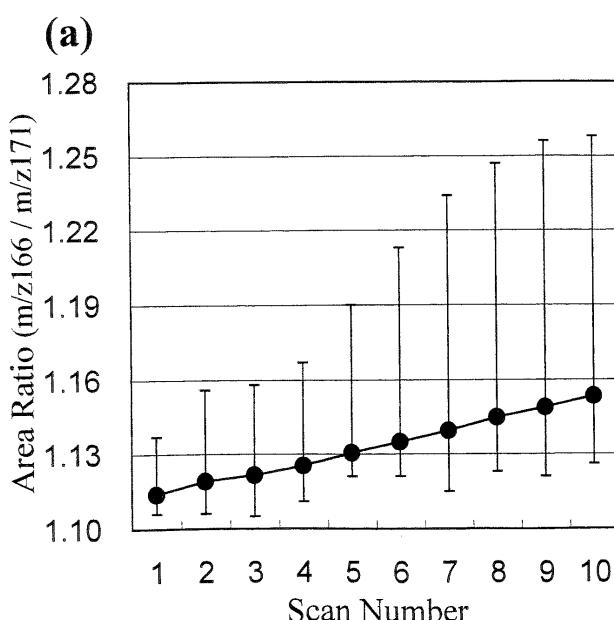


Fig.4 Variation of peak area ratio with scan number

(a)Pseudoephedrine (b)Ephedrine

'Bars of each plot : maximum and minimum value (n=10)

リンの定量値の c.v.0.805% と比較すると、かなり値がばらつくことが分かった。また、各スキャン毎のピーク面積比を Fig. 4 に示した。各プロットは 10 回の平均値、エラーバーはその最大、最小値を現している。Fig. 4 (a) より、プソイドエフェドリンの場合は、スキャン回数が増加するにつれ値が大きくなる傾向がみられ、ピーク面積比に経時変化がおきていると判断できる。よって、この方法では、プソイドエフェドリンを正確に定量することは困難と考えられる。

4. 要 約

塩酸エフェドリン-d5 と標準塩酸エフェドリンを混合した際、それぞれのプロトン付加分子イオンピークの強度比は一定であり、その値は、重量比に比例した（相関係数 $r^2 = 0.99996$ ）。

乳糖、その他の薬効成分等、製剤中の共存物質がエフェドリンの定量値に与える影響はみられなかった。

塩酸エフェドリン-d5 を内部標準に用いた FAB-MS 法によるエフェドリンの定量は、単純な操作で、精度よく、しかも短時間で行うことができた。

また、プソイドエフェドリンの定量に、塩酸エフェドリン-d5 を内部標準として用いた場合、正確な定量は困難であった。

文 献

- 1) a) 猪間 進、宮城好弘、秋枝 毅、本誌、30, 21 (1991)。
b) 小曾根一欽、松崎隆一、佐藤重剛、山崎光廣、古川 広、本誌 36, 27 (1997)。
- 2) Kazuhiko SAGARA, Toshiyuki OSHIMA, Tetsuo MISAKI, Chem. Pharm. Bull., 31(7), 2359 (1983)。
- 3) 南原利夫、後藤順一、『GC-MS の医学・生化学への応用』、立松 晃、土屋利一、山川民夫、山科郁夫、山村雄一編、化学同人 (1980)、4 章。
- 4) 丹羽利充、『最新のマススペクトロメトリー』、化学同人 (1995)、Part 1。
- 5) 長瀬雄三、馬場茂雄、山田泰司、松山陽太郎、薬学雑誌、81, 1479 (1961)。