

ノート

ガスクロマトグラフィーによるりん酸コデインの定量

大牧 克子^{*}, 天野 千秋^{*}, 山崎 幸彦^{**}, 鈴木 稔^{**}

Determination of Codeine Phosphate by Gas Chromatography

Katsuko OMAKI^{*}, Chiaki AMANO^{*}, Yukihiko YAMAZAKI^{**}
and Minoru SUZUKI^{**}

^{*}Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka-shi, Osaka, 552-0021, Japan

^{**}Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

Codeine and its salts are widely in market as an antitussive. But in case that Codeine and its salts content of the medicine is more than 1%, the Narcotics and Psychotropics Control Law regulates the importation of the medicine. Therefore determination of Codeine and its salts is necessary. Codeine Phosphate has been determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) or Titration.

We tried to determine by Gas Chromatograph installed the column 'MEGABRE' in. In the result, we could get the nearly straight calibration curve of Codeine Phosphate, and we could determine Codeine Phosphate actually.

1. 緒 言

近年, 旅客の携帯品, 国際郵便物, 国際宅配便等で国内に持ち込まれる薬物が増加しており, それについて, その薬物が規制対象薬物か否かの分析依頼も増加している。コデインは鎮咳作用があることから, りん酸コデインとして多くの市販の風邪薬に含有されている。りん酸コデインを 1%を超えて含有する場合, 麻薬及び向精神薬取締法の麻薬に該当することから、りん酸コデインを含有する薬物についてはりん酸コデインの定量分析が必要となる。

りん酸コデインの定量方法については, 日本薬局方において液体クロマトグラ法及び滴定法を用いることとされている。液体クロマトグラフは, 定量しようとする薬物毎にカラムや移動層を交換する必要があるため, 装置の安定に長時間を要する。また, 日本薬局方において, 滴定法では多量の試料を必要とし, 必要最少量での分析鑑定を求められる税関分析には, 日本薬局方に掲げられている定量法は適用できない場合がある。八島¹⁾らは, 滴定法により少量の試料でコデインの簡便な定量方法を検討しているが, 他成分からコデインを抽出する操作が複雑で熟練を要し, 定量に長時間を要する。

ガスクロマトグラフは移動層を交換する必要がない・装置の

安定が短時間・汎用性のあるカラムが多い等の利点があり, 比較的扱いが容易である。そこで今回, ガスクロマトグラフにより, 当関において他の薬物の定量分析にも使用している無極性のメガボアカラムを用いて, 少量の試料でりん酸コデインの定量が可能であるか検討した。ガスクロマトグラフィーで定量を行うには, 不揮発性のりん酸コデインを揮発性のコデインにして定量するため, コデインの検量線を作成する必要があり, りん酸コデインからコデインを抽出する際の回収率が問題となる。また, 錠剤中に含まれる賦形剤や他の薬効成分が定量にどのように影響するかについても検討したところ, 二, 三の知見が得られたので報告する。

2. 実験

2.1 試 薬

りん酸コデイン(武田薬品)

乳糖(和光純薬)

タルク(和光純薬)

馬鈴薯デンプン(関東化学)

アセトアミノフェン(和光純薬)

アスピリン(和光純薬)

バルビタールナトリウム(東京化成)

* 大阪税関業務部 〒552-0021 大阪府大阪市港区築港 4-10-3

**大蔵省関税中央分析所 〒271-0076 千葉県松戸市岩瀬 531

カフェイン (SIGMA)

n-ヘンエイコサン (東京化成)

2.2 分析装置及び測定条件

ガスクロマトグラフ : HP6890 (HEWLETT PACKARD 社製)

カラム : DB-1 [15m × 0.53mm, Film thickness 1.5 μm]

キャリアーガス : He

キャリアー線速度 : 40cm / sec

カラム温度 : 150 - 10 / min - 300 (5min)

注入量 : 1 μl (スプリットレス)

注入口温度 : 300

検出器 : FID

検出器温度 : 300

差動型示差熱天秤 : TG-8120

標準試料 Al₂O₃

昇温速度 5 /min

測定範囲 室温 ~ 300

雰囲気 静止空気

2.3 実験方法

2.3.1 内部標準溶液の調製

n-ヘンエイコサン 100mg をクロロホルムに溶かし 200ml としたものを内部標準溶液とし、また、りん酸コデインからコデインを抽出する溶媒として使用した。

2.3.2 検量線の作成

2.3.2.1 コデインの調製

今回、コデインは国内では入手が困難であったため、りん酸コデインから次のようにしてコデインを調製した。

りん酸コデインに水酸化ナトリウム水溶液を加えてアルカリ性とし、コデインを遊離させ、クロロホルムを加えてよく振とうし、コデインを抽出する。クロロホルム層を常圧 60 で濃縮し、石油エーテルを加えてコデインを再結晶させる。60 でクロロホルムを揮発させ、得られた結晶を 105 で乾燥した。

2.3.2.2 コデインの純度測定

2.3.2.1 で調製したコデインに結晶水が含まれているか否か確認するために、熱分析装置を用いて融点と重量変化を測定した。Fig.1 に示すように、調製したコデインの融点は 153.4 °C であり、融点に至るまでの重量変化がみられないことから、コデインは無水コデインで、分子量が 299.4 のものであると確認した。

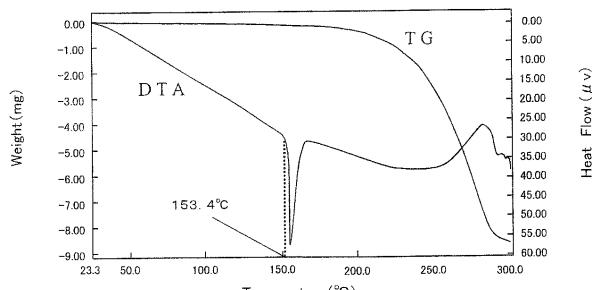


Fig.1 Thermogravimetric and differential thermal analysis curves of Codeine

また、コデインの純度測定は、日本薬局方のりん酸コデインの定量法に準じて行った。コデイン 500mg を精秤し、冰酢酸 70ml に溶かし、指示薬として塩化メチルロザニリン試薬を 3 滴加え、これを 0.1N-過塩素酸酢酸溶液で滴定し、溶液の紫色が青色をへて、帯緑青色に変わったところを終点とした。同様の方法で空試験を行い、滴定消費量を補正し、純度を計算したところ 99.0% であった。

2.3.2.3 コデインの検量線の作成

2.3.2.1 で調製したコデイン 50mg を 50ml メスフラスコに精秤し、内部標準溶液で 50ml に定容した。これを 10ml メスフラスコにそれぞれ 2,4,6,8,10ml 入れ、内部標準溶液で 10ml に定容したものをガスクロマトグラフに注入して、内部標準物質との面積比及び重量比から検量線を作成した。

2.3.2.4 りん酸コデインの回収率

りん酸コデイン 5mg を共栓付き試験管に取り、0.5N-水酸化ナトリウム水溶液 10ml、内部標準溶液 10ml を加え、よく振とうし、クロロホルム層をガスクロマトグラフに注入し、2.3.2.3 で作成したコデインの検量線により回収率を求め、同様の操作を 10 回繰り返し、回収率の再現性を求めた。

2.3.2.5 りん酸コデインの検量線の作成

りん酸コデイン 2mg, 4mg, 6mg, 8mg, 10mg を共栓付試験管にそれぞれ精秤し、0.5N-水酸化ナトリウム水溶液 10ml 及び内部標準溶液 10ml を加え、よく振とうし、暫く静置する。クロロホルム層をガスクロマトグラフに注入して、内部標準物質との面積比及び重量比から検量線を作成した。

2.3.3 標準試料の調製

錠剤やカプセル中の賦形剤、他の薬効成分がりん酸コデインの定量にどのような影響を及ぼすかについて検討するために、賦形剤、他の薬効成分を適量混合した標準試料を調製した。この場合、りん酸コデインを 1% を超えて含有する場合麻薬に該当することから、りん酸コデインを 1% 程度含有するように、賦形剤として乳糖、タルク、デンプンを、他の薬効成分としてアセトアミノフェン、アスピリン、バルビタールナトリウム、カフェインを適量混合した標準試料を調製した。

2.3.4 実験操作

2.3.4.1 賦形剤が乳糖又はタルクの場合

- (1) りん酸コデイン 5mg 相当量の標準試料を共栓付き試験管に正確に量り取る。
- (2) 0.5N-水酸化ナトリウム水溶液 10ml を加える。
- (3) 内部標準溶液 10ml を加え、よく振とうし、静置する（水層とクロロホルム層の分離が十分でない場合は、超音波振とう機で十分に攪拌し分離を良くする。）。
- (4) (3)のクロロホルム層を必要に応じて 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過後、ガスクロマトグラフに注入する。
- (5) (4)で得られたガスクロマトグラムと 2.3.2.5 で作成したりん酸コデインの検量線から、試料中のりん酸コデインの含有量を求める。

2.3.4.2 賦形剤がデンプンの場合

- (1) りん酸コデイン 5mg 相当量の標準試料を共栓付き試験管

に正確に量り取る。

- (2) 水 20ml をホールピペットで加え、充分に振とうした後、静置する。
- (3) デンプンが試験管の下層に沈殿してから、上澄み液を 10ml ホールピペットで、共栓付き試験管に移し入れる。
- (4) 移し入れた試験管に 10N-水酸化ナトリウム水溶液 0.5ml を入れ、水層がほぼ 0.5N になるようする。
- (5) 内部標準溶液 10ml を加え、よく振とうし、静置する。
- (6) (5)のクロロホルム層を必要に応じて $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過後、ガスクロマトグラフに注入する。
- (7) (6)で得られたガスクロマトグラムと 2.3.2.5 で作成したりん酸コデインの検量線から、試料中のコデインの含有量を求める。

3. 結果及び考察

3.1 ガスクロマトグラム

n-ヘンエイコサンを内部標準として用いたコデインのガスクロマトグラムを Fig.2 に示す。良好に分離していることから、この条件でコデインを定量することは可能であると考えられる。

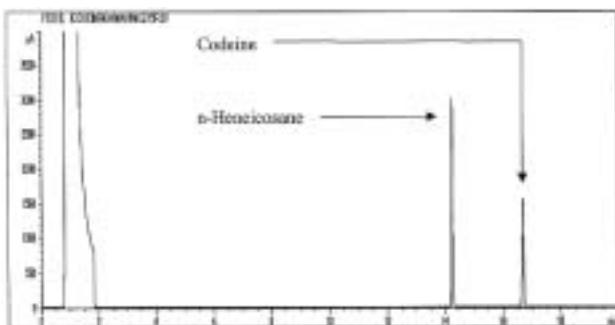


Fig.2 Gas chromatogram of Codeine

3.2 検量線の検討

n-ヘンエイコサンを内部標準として作成したコデインの検量線を Fig.3 に示す。実際に分析依頼される試料は、りん酸コデインの含有量が不明のものが多いので、広範囲にわたって定量可能であることが必要と考えられる。そこで、コデイン 0.2 ~ 1.0mg / ml の濃度範囲における検量線を作成したところ、相関係数 0.9999 の良好な直線関係が得られた。

この検量線を用いて、りん酸コデインの希アルカリ性下クロロホルム一回抽出でのコデインの回収率を求めたものを Table 1 に示す。10 回平均で 99.7% の良好な回収率を示し、変動係数も 0.49% と良好な再現性が得られた。

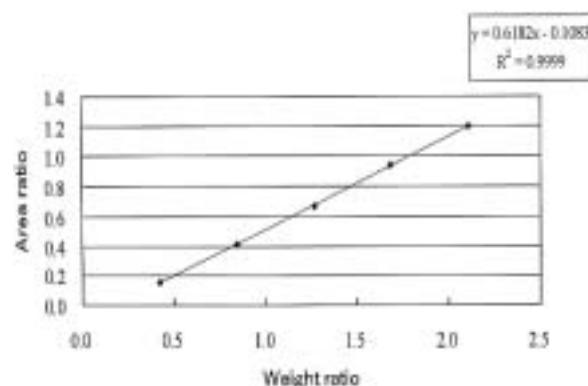


Fig.3 Calibration curve of Codeine

Table 1 Recoveries of Codeine phosphate

Sample No.	Recoveries (%)
1	98.4
2	99.4
3	99.6
4	100.0
5	99.8
6	99.8
7	100.3
8	100.1
9	99.5
10	99.9
Average	99.7
CV(%)	0.49

希アルカリ性下クロロホルム抽出でコデインがほぼ完全に抽出されたことから、りん酸コデインを用いて直接、検量線を作成した。0.2 ~ 1.0mg / ml の濃度範囲でりん酸コデインを希アルカリ性下でクロロホルム抽出し、検量線を作成したところ、Fig.4 に示したように、相関係数 0.9999 の良好な直線関係が得られた。

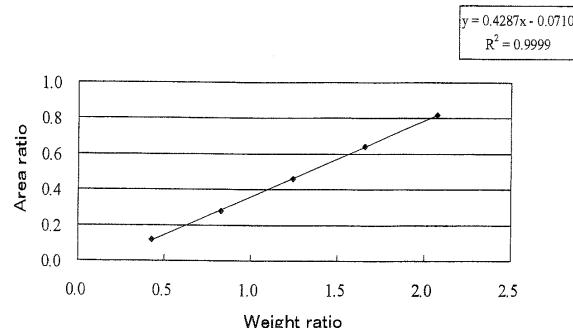


Fig.4 Calibration curve of Codeine phosphate

のことから、国内では入手が困難なコデインを用いることなく、また、りん酸コデインからコデインを調製することなく、直接りん酸コデインから作成した検量線を使用して、りん酸コデインの定量が可能であることが判明した。

3.3 回収率の検討

3.3.1 抽出方法の検討

実際の試料では、賦形剤として乳糖、タルク及びデンプンを使用していることが多い。また、薬効成分としてりん酸コデイン以外にもアセトアミノフェン、アスピリン、バルビタールナトリウム、カフェインを含有しているものもある。実際の試料からコデインの抽出を行なう場合には、これらの成分による影響についても考慮する必要がある。

そこで、りん酸コデインを1%程度含有するように、賦形剤として乳糖又はデンプン、薬効成分としてアセトアミノフェン又はアスピリンを適量混合した標準試料のりん酸コデインの回収率を求め、抽出に際して使用する水酸化ナトリウム水溶液の適正な濃度と量を検討した。

その結果をTable 2に示す。乳糖を賦形剤とした場合、アセトアミノフェンを含有する標準試料では0.1N-水酸化ナトリウム水溶液5mlで良好な回収率が得られた。しかし、アスピリンを含有する標準試料では0.1N-水酸化ナトリウム水溶液5mlでは十分な回収率が得られなかった。0.5N-水酸化ナトリウム水溶液10mlと濃度を上げることにより良好な回収率が得られた。また、デンプンを賦形剤とした場合、デンプンが多量存在すると、0.1Nの低濃度であっても糊化し、抽出は不可能であった。デンプンが少量の場合、アセトアミノフェンを含有する試料では0.1N-水酸化ナトリウム水溶液5mlで良好な回収率が得られたが、アスピリンを含有する試料では0.1Nの濃度では十分な回収率が得られず、0.5N-水酸化ナトリウム水溶液10mlと濃度を上げると糊化し抽出は不可能となった。

これらのことから、乳糖又はタルクを含む標準試料とデンプンを含む標準試料と操作を変えて定量を行うこととした。

Table 2 Relation between recoveries of Codeine phosphate (1%) and different alkaline solution

Excipient	Concomitant component	Recoveries (%)		
		0.1 N NaOH5ml	0.1 N NaOH10ml	0.5 N NaOH10ml
Lactose	(19%) Acetaminophen (80%)	100.8	100.1	99.8
	(49%) Aspirin (50%)	29.0	43.3	99.5
	(99%) —	100.3	99.0	100.2
Potato starch	(19%) Acetaminophen (80%)	100.6	98.4	99.4
	(49%) Aspirin (50%)	28.7	61.8	×
	(99%) —	×	×	×

×..... impossible to determine (for gelatinization)

3.3.2 回収率の検討

りん酸コデインを1%程度含有するように、賦形剤（乳糖又はタルク又はデンプン）と混合した標準試料のりん酸コデインの回収率を測定した結果をTable 3に示す。乳糖又はタルクを含む標準試料の場合は2.3.4.1の操作により、クロロホルム（内部標準溶液）一回抽出でいずれも良好な回収率と再現性が得られ、りん酸コデインをほぼ100%回収できた。また、デンプンを含有する試料であっても、2.3.4.2の操作より

デンプンを除いた後、同様の操作を行うことにより、りん酸コデインの定量が可能であった。

Table 3 Recoveries of Codeine phosphate (1%) of standard mixtures

Sample No.	Recoveries (%)		
	Lactose (99%)	Talc (99%)	Potato starch (99%)
1	99.7	98.9	95.8
2	100.3	97.5	97.2
3	100.1	101.2	95.3
4	97.4	99.1	97.1
5	98.2	98.5	95.5
6	100.1	98.2	95.3
7	100.5	98.0	96.9
8	101.5	98.3	95.1
9	101.7	99.9	95.1
10	102.7	100.3	94.6
Average	100.2	99.0	95.9
CV(%)	1.50	1.10	0.01

また、賦形剤と他の薬効成分（アセトアミノフェン、アスピリン、バルビタールナトリウム、カフェイン）を混合した標準試料からのりん酸コデインの回収率を測定した結果をTable 4に示す。この場合も乳糖又はタルクを含む試料の場合は2.3.4.1、デンプンを含む試料の場合は2.3.4.2の操作を行ったが、いずれも良好な回収率が得られた。よって、これらの成分はりん酸コデインの定量に影響を与えないものと考えられる。

Table 4 Recoveries of Codeine phosphate (1%) of standard mixtures

Excipient	Concomitant component	Recoveries (%)
Lactose	(19%) Acetaminophen (80%)	99.8
	(49%) Aspirin (50%)	99.5
	(49%) Barbital Sodium (50%)	99.5
	(49%) Caffeine (50%)	98.8
Talc	(19%) Acetaminophen (80%)	99.9
	(49%) Aspirin (50%)	99.3
	(49%) Barbital Sodium (50%)	97.8
	(49%) Caffeine (50%)	100.5
Potato starch	(19%) Acetaminophen (80%)	99.4
	(49%) Aspirin (50%)	101.5
	(49%) Barbital Sodium (50%)	100.4
	(49%) Caffeine (50%)	97.4

4.要 約

ガスクロマトグラフィーにより、りん酸コデインの定量法を検討した。コデインの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、りん酸コデインを用いて作成した検量線も 0.2~1.0mg / ml の濃度範囲で良好な直線関係を示したことから、りん酸コデインを標準として、ガスクロマトグラフィーによりりん酸コデインの定量が可能であることが判明した。りん

酸コデインは、賦形剤等が共存していても、適当な処理方法を用いることにより、希アルカリ性下で内部標準物質を含有するクロロホルムで抽出する簡易な操作で、良好な回収率と再現性が得られ、定量分析に十分利用できるものと考えられる。

文 献

- 1) 八島理乃, 落合正男, 鈴木英治: 関税中央分析所報, 31, 149-155 (1992)
- 2) 日本薬局方解説書, 第十三改正, C2785-2790