

高速液体クロマトグラフィーによるエフェドリン類縁化合物の分離条件の検討

唯是 稔*, 岡崎 龍介*, 石川 順一*, 樋野 干寿*, 寺内 豊*, 笹川 邦雄*

Examination of conditions to separate ephedrine-related compounds by High Performance Liquid Chromatography

Minoru YUIZE*, Ryusuke OKAZAKI*, Junichi ISHIKAWA*, Chitoshi HINO*, Yutaka TERAUCHI*
and Kunio SASAKAWA*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

Ephedrine-related compounds, which are controlled drugs, are sometimes difficult to identify because of their structural similarity. In such cases, retention time in high performance liquid chromatography (HPLC) is a useful means for identifying ephedrine-related compounds. Two kinds of HPLC method were examined for this purpose: ion-pair chromatography (IPC) using the acidic mobile phase, and reverse-phased chromatography (RPC) using the basic mobile phase. In the IPC method, a water-acetonitrile mixture is a good solvent, and the addition of triethylamine to the mobile phase is very effective for suppressing silanol effects. In the RPC method, a water-methanol mixture is a good solvent, and pyrrolidine is a suitable buffer. Each method gives good separation and peak shape, and the calibration curve is linear.

1. 緒 言

エフェドリン類縁化合物であるメタンフェタミン, MDMA, フェンテルミン等は, フェネチルアミン骨格を基本構造としている。これらの分析方法としてはガスクロマトグラフ質量分析計, 赤外線吸収スペクトル等が考えられるが, 製剤中には構造の類似した複数の成分を含有するものもあり, 同定が困難な場合がある。このような場合, 高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC)による保持時間を用いた定性分析を併用することにより, 分析結果の信頼性を向上させることができる。

また, エフェドリン, メチルエフェドリン等は, 覚せい剤原料として覚せい剤取締法に該当するが, 含有割合による除外規定があるため, その割合によっては規制対象外となり, 定量分析が必要となる。こうしたことから, 当該成分を分離する条件が望まれる。

エフェドリン類縁化合物は一般に塩基性のため, HPLC による分析では ODS カラムを用いた場合, 残存シラノール基によるピークのテーリングや酸性領域における親水性によりカラムへの保持が不足する等の課題があった。

今回, これらの課題を解決するため, 酸性移動相を用いたイ

オンペアクロマトグラフィー及び塩基性移動相を用いた逆相分配クロマトグラフィーにおけるエフェドリン類縁化合物10種類の分離条件について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

—エフェドリン類縁化合物 10種類—

- Ephedrine
- Pseudoephedrine
- Norephedrine
- Norpseudoephedrine
- Methylephedrine
- Methamphetamine
- Phentermine
- 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)
- N-Ethylmethylenedioxymphetamine (N-Ethyl MDA)
- N-Methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino) butane (MBDB)
- 錠剤 3種類—
- 市販風邪薬

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-56

- ・MDMA 及び N-エチルMDA を含有する錠剤
- ・MDMA 及びエフェドリンを含有する錠剤

2. 2 分析装置及び測定条件

2. 2. 1 装置

HPLC: HP1100及び HP1090(ヒューレット・パッカード社製)
検出器: ダイオードアレイ検出器 (DAD) (ヒューレット・パッカード社製)

2. 2. 2 測定条件

—酸性移動相を用いたイオンペアクロマトグラフィー

移動相: 水/アセトニトリル系に SDS (ドデシル硫酸ナトリウム), リン酸, TEA (トリエチルアミン) を添加した混合溶媒

カラム: HYPERSIL ODS 5 μ , 150 $\times$ 4.6mm id. (ヒューレット・パッカード社製)

検出波長: 210nm

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

流量: 1.0ml/min

注入量: 5 μ l

試料の注入はオートサンプラーを用いて行った。

—塩基性移動相を用いた逆相分配クロマトグラフィー

移動相: 水/メタノール系にバッファーを添加した混合溶媒

水/アセトニトリル系にバッファーを添加した混合溶媒

カラム: Extend C-18 5 μ , 150 $\times$ 4.6mm id. (ヒューレット・パッカード社製)

Shodex ODP-50D 5 μ , 150 $\times$ 4.6mm id.(昭和電工(株)製)

検出波長, カラム温度, 流量, 注入量及び注入方法については, 酸性移動相を用いたイオンペアクロマトグラフィーと同条件である。

2. 3 試料調製

エフェドリン類緑化合物に純水を加え, 0.5mg/ml の濃度に調製し, 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過した。

2. 4 酸性移動相を用いたイオンペアクロマトグラフィーの測定条件の検討

移動相として, 水/アセトニトリル系, 水/メタノール系及び水/テトラヒドロフラン系の3種類について比較検討した。

SDS を1-5g まで変化させることにより, SDS 濃度と保持係数及びピーク対称度の関係を調べ, 最適な SDS 濃度について検討した。

移動相改質剤として使用される TEA を添加した場合としない場合との比較を行った。

なおバッファーは, リン酸を用いることでいずれの条件下でも pH を3程度に固定した。

2. 5 塩基性移動相を用いた逆相分配クロマトグラフィーの測定条件の検討

バッファーとしてピロリジン, TEA, グリシン, TRIS (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール) 及びリン酸ナトリウムの5種類について検討した。

バッファーの添加量を変化させ, 最適な添加量について検討した。

ポリマー系の逆相カラムである ODP-50D を使用した場合と比較した。

2. 6 検量線の作成

覚せい剤原料として規制されているエフェドリン, プソイドエフェドリン, メチルエフェドリン及びノルエフェドリンについて, 0.08-1.0mg/ml の濃度範囲で6点調製し, 検量線を作成した。

2. 7 錠剤の分析

3種類の錠剤を純水で抽出し, HPLC により測定した。

3. 結果及び考察

3. 1 酸性移動相を用いたイオンペアクロマトグラフィー

3. 1. 1 移動相の選択

HPLC でよく使用される水/アセトニトリル系, 水/メタノール系及び水/テトラヒドロフラン系を検討した。

水/アセトニトリル=65/35の混合比が分析時間及び分離から考えて適当であった。

3. 1. 2 SDS 濃度と保持係数及びピーク対称度の関係

SDS の最適な添加量を決定するため, 添加量に対する保持容量の変化を調べた (Fig.1)。その結果, SDS 濃度1-4g/l までは保持容量が増加するが, 4g/l を超えると大きな変化はみられない。

また, SDS 濃度とピーク対称度の関係を Fig.2に示す。

ピーク対称度1.0でピークは左右対称を示し, 1.0より大きいとリーディング, 小さいとテーリングを意味している。

SDS 濃度1-2g/l ではリーディング又はテーリングが激しいが, 3g/l を超えると全体的に1.0付近で落ち着くことがわかる。

したがって, SDS 濃度は保持係数及びピーク対称度の変化から判断して, 3-4g/l が適当と考えられる。

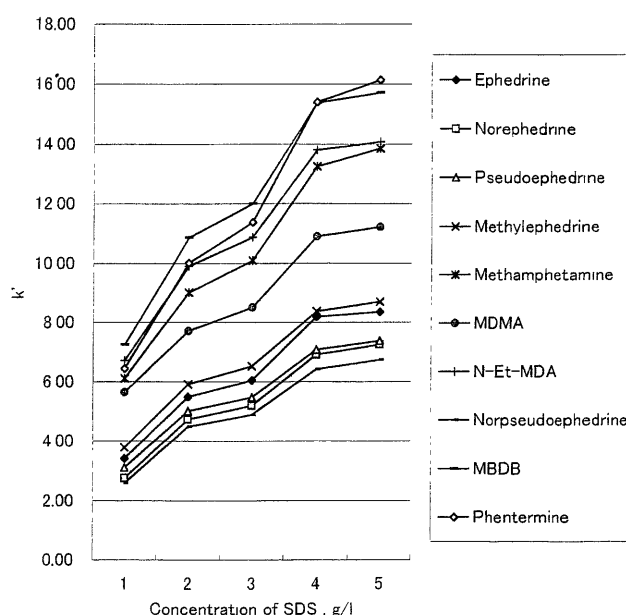


Fig. 1 Relationship between concentration of SDS and retention factor

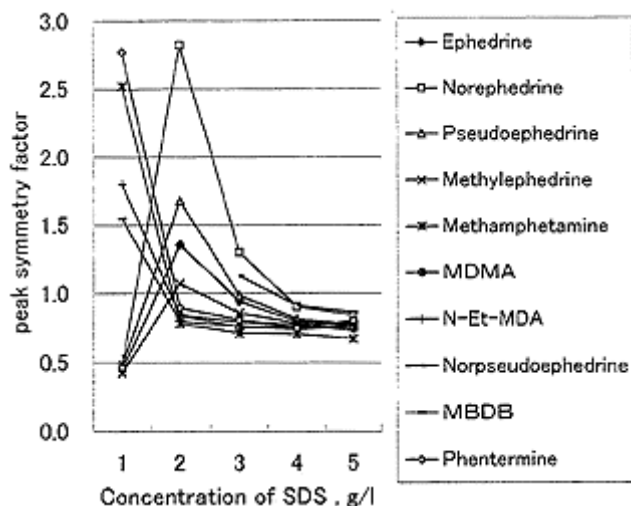


Fig. 2 Relationship between concentration of SDS and peak symmetry factor

3. 1. 3 TEAの有無による比較

移動相を水/アセトニトリル=65/35の混合溶媒, SDS 濃度 3g/l, リン酸濃度2ml/l とし, TEA の有無による比較を行った。TEA を移動相に添加していないクロマトグラム (Fig.3) と比較するとテーリングが小さくなり, ピーク形状及び分離が大幅に改善されている (Fig.4)。

塩基性化合物であるエフェドリン類縁化合物は, ODS カラムでは残存シラノール基の吸着により, テーリングを起こしやすい。TEA は, 塩基性化合物とシラノール基との相互作用を減少させる効果を示すと考えられる。しかし, 酸性溶媒中では SDS とイオンペアを形成するため, 試料のイオンペア試薬による固定相への保持効果を減少させる作用がある。このため TEA はピーク形状の改善効果が得られる最低量の添加が望ましい。

TEA の添加量については, シラノール基の影響の大小つまりカラムによって異なり, 一般的に最適な添加量を決定することは難しいが, 文献¹⁾ よれば TEA のような第3級アミンの移動相改質剤を10–50mM 程度の濃度で添加することは, 二次的保持を生ずるシラノール基を選択的に封鎖するのに有効とされている。以上の理由から添加量を濃度20mM とした。

3. 2 塩基性移動相を用いた逆相分配クロマトグラフィー

3. 2. 1 カラムについて

塩基性移動相を用いた場合, エフェドリン類縁化合物のような塩基性化合物はプロトン化が抑制され, 遊離塩基の状態で存在する。このため塩基性化合物は, 酸性移動相を用いる場合よりも強く ODS カラムに保持される。

また, エフェドリン類縁化合物は, 酸解離定数 (pKa) が9.5 付近であるため十分にプロトン化を抑制するためには pH が11 以上の移動相を使用する必要がある。しかし, 一般的な ODS カラムはシリカが溶解してしまうため, 塩基性移動相を用いることはできない。本実験では, オクタデシル基にプロピレンブリッジを加え二座配位構造とした結合相とダブルエンドキャピ

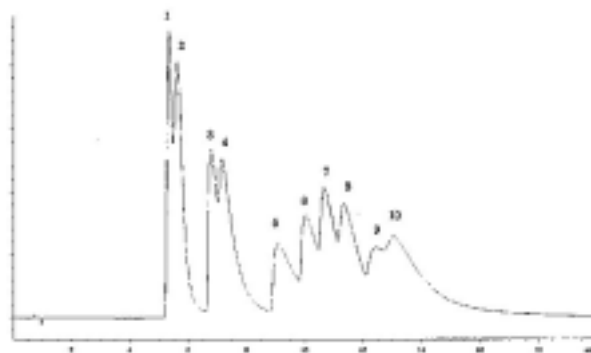


Fig. 3 HPLC chromatogram of the standard mixture of ephedrine-related compounds in ion-pair chromatography under acidic conditions without TEA (UV 210nm)
1:Norpseudoephedrine; 2:Norephedrine;
3:Pseudoephedrine; 4:Ephedrine; 5:Methylephedrine;
6:MDMA; 7:Phentermine; 8:N-Ethyl-MDA;
9:Methamphetamine; 10:MBDB

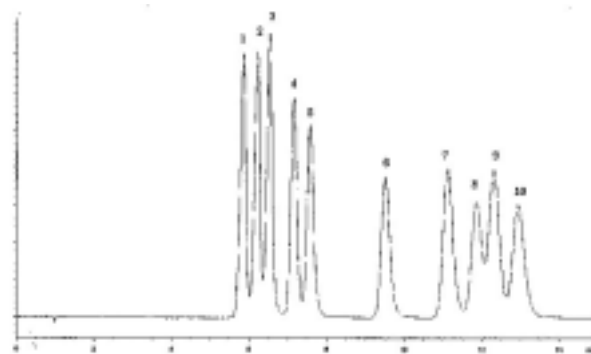


Fig. 4 HPLC chromatogram of the standard mixture of ephedrine-related compounds in ion-pair chromatography under acidic conditions with TEA (UV 210nm)
1:Norpseudoephedrine; 2:Norephedrine;
3:Pseudoephedrine; 4:Ephedrine; 5:Methylephedrine;
6:MDMA; 7:Methamphetamine; 8:N-Ethyl-MDA;
9:Phentermine; 10:MBDB

ング処理により, 強い塩基性溶媒下での安定性を高めた ExtendC-18カラムを用いた。このカラムは pH11.5までの移動相で使用可能である。さらにポリマーを支持体としオクタデシル基のようなアルキル基を化学結合したポリマー系逆相カラムである ODP50-D を使用した場合と比較した。

3. 2. 2 移動相の選択

HPLC でよく使用される水/アセトニトリル系, 水/メタノール系及び水/テトラヒドロフラン系を比較した。

水/メタノール系が最も良い分離を示し, 水/メタノール=55/45の混合比が分析時間及び分離から考えて適当であった。

3. 2. 3 バッファの選択

移動相 pH を塩基性に傾けるためのバッファーとして, ピロリジン, TEA, グリシン, TRIS 及びリン酸ナトリウムを検討した。

グリシン、TRIS 及びリン酸ナトリウムについては、分離及びピーク形状共に満足な結果を得ることはできなかった。

TEA は、200nm–220nm でピークを検出することが難しかったため、254nm での測定を行った。このため、良好な分離及びピーク形状が得られたが、最大吸収波長でないため、感度が低い結果となった。

ピロリジンは、210nm で10種類の化合物のほぼ完全な分離が可能であった。ピロリジンは水に溶けやすく、希薄な水溶液は、今回の実験に適した塩基性 (pH11.5~12.0) を示すため、移動相調製の際に他の酸又は塩基による微妙な pH 調整の必要がない。こうしたことから、今回試みた中ではピロリジンが最も分離及びピーク形状が良く、移動相調製が簡便なバッファーといえる。

なお、TEA、ピロリジンなどの有機アミン系のバッファーを使用した場合に良好なピーク形状を示した理由としては、これらのバッファーが、pH 調整としての役割だけでなく、ODS カラムのシラノール基の影響を軽減する役割も同時に果たしていると考えられる。

3.2.4 ピロリジン添加量

バッファーとして使用したピロリジンの添加量を検討した。濃度を0.5ml/l から 1.5ml/l まで変化させたところ、ピーク面積は減少した (Fig.5)。この理由は不明であるが、本実験ではピロリジンの濃度を0.5ml/l とした。

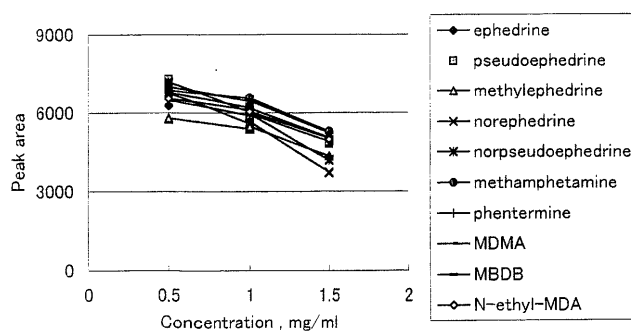


Fig. 5 Relationship between concentration of pyrrolidine and peak area

3.2.5 ODSカラムとポリマー系逆相カラムとの比較

以上の結果から、塩基性移動相の条件下で耐久性のある ODS カラムを使用し、移動相を水/メタノール=55/45、ピロリジン濃度0.5ml/l の混合溶媒 (pH=11.5) により得られたクロマトグラムを示す (Fig.6)。塩基性移動相での分析に、一般的に使用されるポリマー系逆相カラムを使用して得られたクロマトグラム (Fig.7) と比較すると、より優れたピーク形状及び分離を示している。

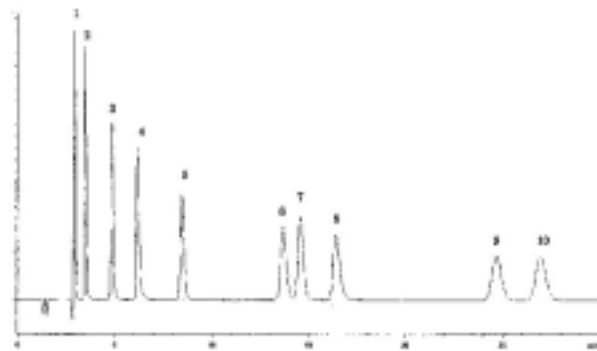


Fig. 6 HPLC chromatogram of the standard mixture of ephedrine-related compounds in reverse-phased chromatography under basic conditions (UV210nm)
1:Norephedrine; 2:Norpseudoephedrine; 3:Ephedrine; 4:Pseudoephedrine; 5:Methylephedrine; 6:MDMA; 7:Phentermine; 8:Methamphetamine; 9:N-Ethyl-MDA; 10:MBDB

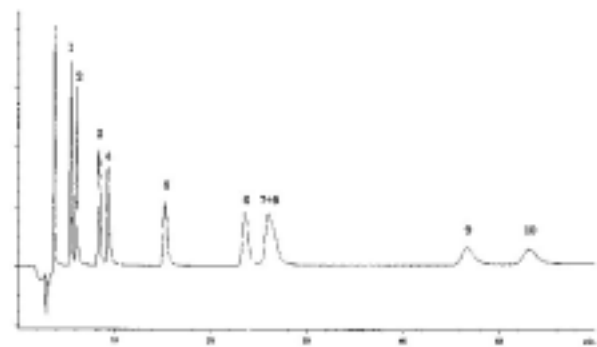


Fig. 7 HPLC chromatogram of the standard mixture of ephedrine-related compounds in reverse-phased chromatography under basic conditions using a column based on porous-polymer supports (Column: Shodex ODP-50D, column temp; 40°C, UV 210nm, Flow; 0.5ml/min, Mobile phase; water/acetonitrile=75/25 30mM phosphate buffer pH11.5)
1:Norephedrine; 2:Norpseudoephedrine; 3:Ephedrine; 4:Pseudoephedrine; 5:Methylephedrine; 6:Phentermine; 7:Methamphetamine; 8:MDMA; 9:N-Ethyl-MDA; 10:MBDB

3.3 クロマトグラムの評価及び比較

2つの分離モードで得られた各クロマトグラムより、理論段数 N 、分離度 R_s 、保持係数 k' を以下のように算出した (Table.1)。

$$\text{理論段数 } N = 5.54(tr/W_h)^2$$

$$\text{分離度 } R_s = 1.18(tr_2 - tr_1)/(W_{h1} + W_{h2})$$

$$\text{保持係数 } k' = (tr - t_0)/t_0$$

但し、 tr : リテンションタイム

t_0 : 移動相がカラムを通過する時間

W_h : ピーク半値幅

分離度については一般的に 1.0 以下では定量に不適であり、正確で厳密な定量では 1.5 以上が必要とされている¹⁾が、どちら

の方法も一斉分析で定性を行うのに十分な分離を示している。

一斉分析の場合、クロマトグラムのすべてのピークについて保持係数は、 $k'=1-20$ の範囲にあることが望ましいとされている¹⁾が、両者の方法ともその条件を満たしている。

Table 1 Comparison of HPLC parameters between two separation mode

level	IPC under acidic conditions			RPC under basic conditions		
	N	Rs	k'	N	Rs	k'
1	7780	1.4	4.9	7390	3.8	1.3
2	8550	1.2	5.3	7320	7.4	1.7
3	9310	2.2	5.6	8290	5.4	2.8
4	8950	1.3	6.2	7810	7.6	3.9
5	8540	5.2	6.6	10700	12.7	5.7
6	8360	3.6	8.6	12300	1.8	9.8
7	8900	1.6	10.2	13100	3.2	10.5
8	9810	0.9	10.9	12300	11.7	11.9
9	9170	1.1	11.4	13400	2.4	18.5
10	8080	-	12.0	13400	-	20.2

3.4 検量線

エフェドリンについて、2つの分離モードを用いて測定した各検量線を Fig.8 及び 9 に示す。いずれの場合も良好な直線性が得られた。また、プソイドエフェドリン、メチルエフェドリン、ノルエフェドリンについて同様に測定した結果の相関係数を Table.2 に示す。エフェドリンと同様にいずれも良好な直線性を示した。

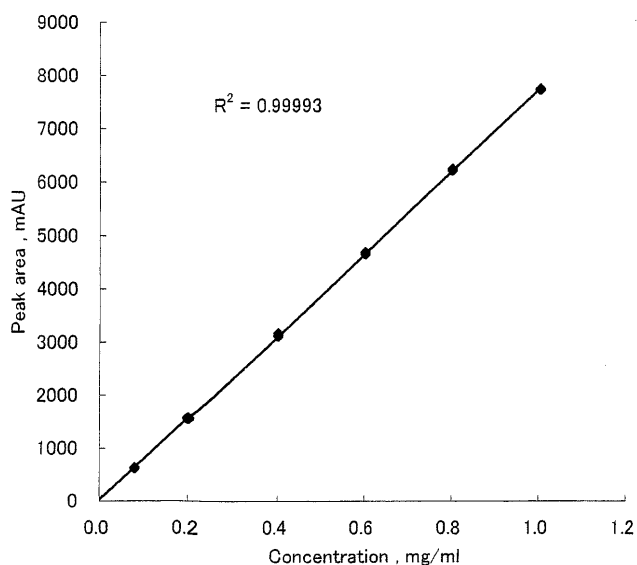


Fig. 8 Calibration curve of Ephedrine in ion-pair chromatography under acidic conditions

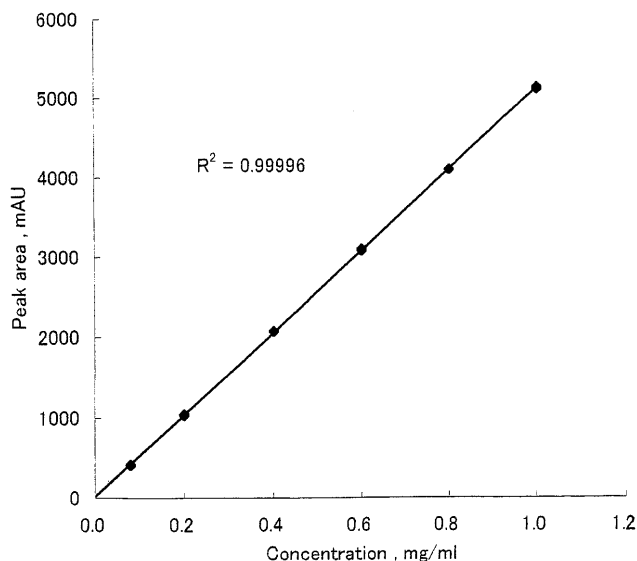


Fig. 9 Calibration curve of Ephedrine in reverse-phased chromatography under basic conditions

Table 2 Correlation factor of each ephedrine-related compound

	IPC under acidic conditions	RPC under basic conditions
Ephedrine	0.9999	0.9999
Pseudoephedrine	0.9999	0.9999
Methylephedrine	0.9999	0.9999
Norephedrine	0.9999	0.9995

3.5 分析事例

実際に市販風邪薬及び分析依頼のあった錠剤を 2 つの分離モードで分析した事例を次に示す。

Fig.10 及び 11 は市販風邪薬, Fig. 12 及び 13 は MDMA と N-エチル MDA を含有する錠剤, Fig. 14 及び 15 はエフェドリンと MDMA を含有する錠剤である。

4. 要 約

10 種類のエフェドリン類縁化合物について、2 つの分離モードで分離条件の検討を行った。

酸性移動相を用いたイオンペアクロマトグラフィーでは、残存シラノール基の影響によるピークのテーリングを最小限に抑えることができ、良好な分離が得られた。また溶媒系については水/アセトニトリル、水/メタノール及び水/テトラヒドロフラン系の中では水/アセトニトリル系が最も良い結果となった。

塩基性移動相を用いた逆相分配クロマトグラフィーでは、塩基性移動相で使用可能な ODS カラムを使用し、水/メタノール系溶媒にピロリジンをバッファーとして添加した移動相で、10 種類のエフェドリン類縁化合物を短時間でほぼ完全に分離する

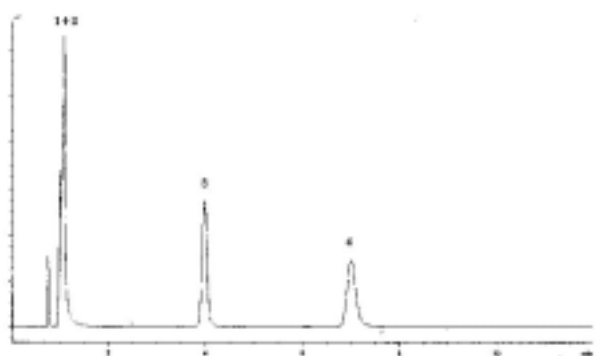


Fig. 10 HPLC chromatogram of a tablet of cold medicine in ion-pair chromatography under acidic conditions (UV 210nm)
1:Acetoaminophen; 2:Caffeine; 3:Methylephedrine;
4:Dihydrocodeine

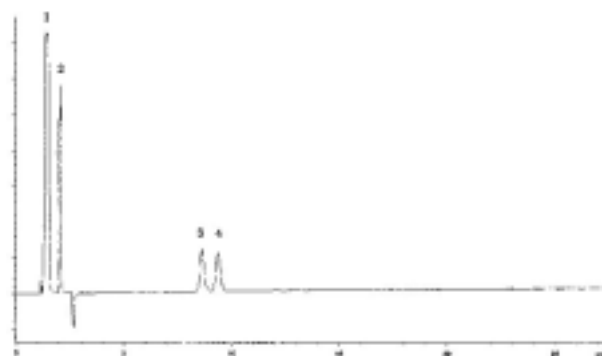


Fig. 11 HPLC chromatogram of a tablet of cold medicine in reverse-phased chromatography under basic conditions (UV 210nm)
1:Acetoaminophen; 2:Caffeine; 3:Methylephedrine;
4:Dihydrocodeine

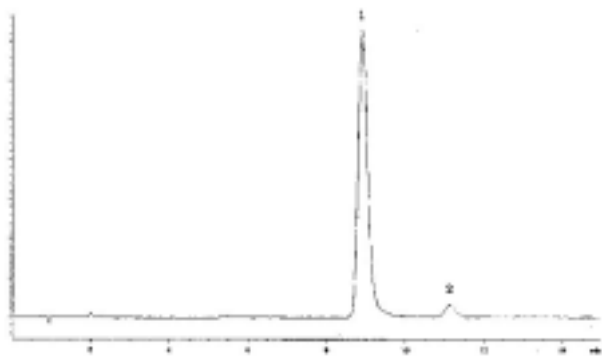


Fig. 12 HPLC chromatogram of a tablet containing MDMA and N-Ethyl-MDA in ion-pair chromatography under acidic conditions (UV 210nm)
1:MDMA; 2:N-Ethyl-MDA

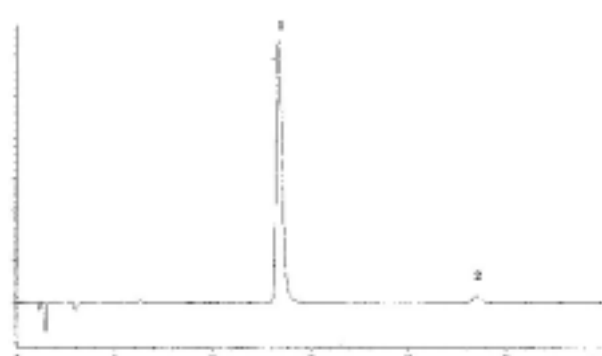


Fig. 13 HPLC chromatogram of a tablet containing MDMA and N-Ethyl-MDA in reverse-phased chromatography under basic conditions (UV 210nm)
1:MDMA; 2:N-Ethyl-MDA

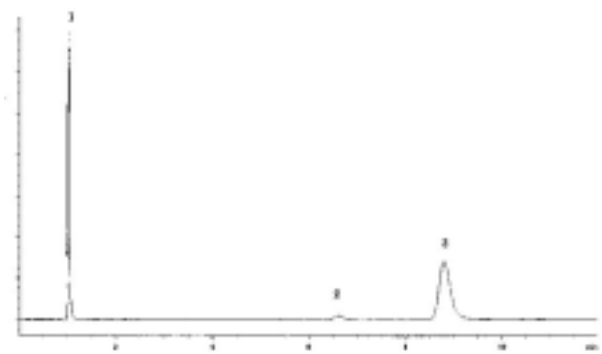


Fig. 14 HPLC chromatogram of a tablet containing MDMA and Ephedrine in ion-pair chromatography under acidic conditions (UV 210nm)
1:Caffeine; 2:Ephedrine; 3:MDMA;

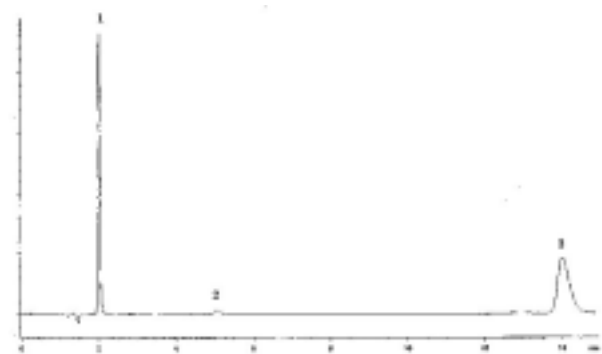


Fig. 15 HPLC chromatogram of a tablet containing MDMA and Ephedrine in reverse-phased chromatography under basic conditions (UV 210nm)
1:Caffeine; 2:Ephedrine; 3:MDMA;

ことができた。

エフェドリン類縁化合物の分離に際して、検討した結果の最適条件を次に示す。

—酸性移動相を用いたイオンペアクロマトグラフィー

移動相：水／アセトニトリル＝65/35

SDS 3g/l

リン酸 2ml/l

TEA 20mM

カラム：HYPERASIL ODS 5 μ , 150 $\times$ 4.6mm id. (ヒューレッツ

ト・パッカー社製)

—塩基性移動相を用いた逆相分配クロマトグラフィー

移動相：水／メタノール＝55/45

ピロリジン 0.5ml/l (pH＝11.5)

カラム：Extend C-18 5 μ , 150 $\times$ 4.6mm id. (ヒューレット・パッカー社製)

検量線については 0.08—1.0mg/ml の濃度範囲でいずれの方法も直線性を確認することができた。

文 献

- 1) 高橋 昭他共訳：“高速液体クロマトグラフィーの実際”(1996)(東京化学同人)