

C30カラムを用いたHPLC法によるエフェドリン類の定量分析法の検討

富田 一範*，磯村 要*，高野 香織*，大嶽 秀之*

A quantitative analysis of ephedrines by the HPLC method with a C30 column

Kazunori TOMITA*, Kaname ISOMURA*, Kaori TAKANO* and Hideyuki OTAKE*

*Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-8535 Japan

We investigated environmentally-friendly and low-cost analysis conditions for performing the quantitative analysis of ephedrines by the HPLC method using a C30 column instead of an ODS column. The C30 column is one type of reverse-phase column in which a triacontyl group is introduced into the packing material. Analysis was conducted with a C30 column using a 100% water based buffer solution instead of organic solutions of acetonitrile and sodium lauryl sulfate, as the mobile phase of the HPLC. For the quantitative analysis of ephedrines using a C30 column, it was found that etilefrine hydrochloride could be used as an internal standard substance, and its calibration curve showed linearity.

1. 緒 言

エフェドリン及びその類似化合物（以下エフェドリン類といふ。）には、覚せい剤取締法の覚せい剤原料に規定されているものがあり、所持、輸入等の規制がされているが、含有割合の規定を満たせば規制の対象外となる。エフェドリン類は覚せい剤製造の際の原料になるが、一方で気管支拡張作用などの薬効があることから、風邪薬やぜんそく治療薬などに使用されている¹⁾。海外で流通する市販薬には、エフェドリン類の含有割合が高く、覚せい剤取締法の規制の対象になるものがあることから、外国郵便や旅行者の携帯品等として輸入される含エフェドリン類薬の定量分析は重要であり、迅速性と正確性が求められている。

高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）法によるエフェドリン類の定量分析は一般的にODSカラムを使用し、移動相にアセトニトリル及びラウリル硫酸ナトリウムを用いている²⁾。しかし、アセトニトリルは、毒物及び劇物取締法の劇物や水質汚濁防止法の有害物質等の化学物質関連法令により規制され、廃液の保管・廃棄の負担が生じている。また、世界的な供給量不足により価格も高騰していることから購入の負担も大きい。さらに、ラウリル硫酸ナトリウムの使用はカラムを汚染しやすい。

そこで、人体に影響がなく廃液処理の負担も少ない水100%移動相が使用可能なシリカゲルにトリアコンチル基を修飾したカラム（以下「C30カラム」という。）を用いて³⁾、HPLC法によるエフェドリン類の定量分析法の検討を行ったので報告する。

* 名古屋税關業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船2-3-12

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

エフェドリン塩酸塩
プロイドエフェドリン塩酸塩
メチルエフェドリン塩酸塩
ノルエフェドリン塩酸塩
リン酸二水素ナトリウム二水和物（関東化学）
リン酸（和光純薬）
ラウリル硫酸ナトリウム（和光純薬）
アセトニトリル（片山化学）
クエン酸ナトリウム二水和物（ハヤシ化成）
クエン酸一水和物（関東化学）
エチレフリン塩酸塩（東京化成工業）

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 高速液体クロマトグラフ

装置：LaChrom ELITE（日立ハイテクノロジーズ）
検出器：ダイオードアレイ検出器（日立ハイテクノロジーズL-2455）

2.2.2 C30カラム条件

カラム：Develosil RP-AQUEOUS-AR-5 (4.6 mm × 250 mm)
(野村化学)
カラム温度：40°C

流速 : 2.5 mL/min
 移動相 : 50 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 (pH = 2.8)
 注入量 : 10 μ L
 検出波長 : 210 nm

2.3 実験方法

2.3.1 移動相の検討

超純水、20 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) 及び 50 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.8) の pH の異なる 3 種の移動相についてエフェドリンの分析に最適な条件を検討した。試料は、エフェドリン塩酸塩を 20 mg/mL 水溶液に調整し測定した。なお、pH が塩基性の移動相条件下では、C30 カラムの使用 pH 範囲外である。

2.3.2 移動相の流速の検討

2.3.1 で決定した移動相を用いて、エフェドリンの定量に最適な流速条件を検討した。

2.3.3 試料濃度の検討

エフェドリン塩酸塩を 20 mg/mL、2 mg/mL 及び 0.2 mg/mL の水溶液に調整した試料をそれぞれ測定し、エフェドリンの定量のための最適な濃度を検討した。

2.3.4 エフェドリン類の分離

2.2 及び 2.3 の条件下でエフェドリン塩酸塩、プロイドエフェドリン塩酸塩、メチルエフェドリン塩酸塩及びノルエフェドリン塩酸塩の 4 種のエフェドリン類について、それぞれ 6 mg/mL 水溶液に調整した試料を測定し、エフェドリン類の分離について確認した。

2.3.5 内部標準物質の検討

日本薬局方及び税関分析法では、内部標準物質としてエチレフリン塩酸塩を使用している。そこで、エチレフリン塩酸塩を 6 mg/mL 水溶液に調製した試料を測定し、2.3.4 で測定した 4 種類のエフェドリン類とエチレフリンが分離するか検討した。

2.3.6 検量線の作成

2.3.6 (1) 試料の調製

エフェドリン塩酸塩約 25 mg をイオン交換水で 100 mL に定容した。この溶液 2、4、6、8、10 及び 12 mL に、内部標準物質の 0.1 mg/mL エチレフリン塩酸塩水溶液 5 mL を加え、イオン交換水で 25 mL に定容した。

2.3.6 (2) 検量線の直線性の確認

2.3.6 (1) で作製した 6 種類の試料溶液を、2.2 の HPLC 条件でそれぞれ測定した。エフェドリンの重量 (W_x) と内部標準物質の重量 (W_s) の重量比 (W_x/W_s) と、得られたクロマトグラムのエ

フェドリンのピーク面積 (A_x) と内部標準物質のピーク面積 (A_s) の比 (A_x/A_s) から検量線を作成し、検量線の直線性を確認した。

3. 結果及び考察

3.1 移動相の検討

pH の異なる 3 種類の移動相で測定した結果、pH 7.0 の超純水、及び pH 4.7 の 20 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液の移動相条件では、エフェドリンの検出が確認されなかった。pH 2.8 の 50 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液の移動相では、エフェドリンが良好なピークとして検出された。

以下、移動相を pH 2.8 の 50 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液を用いて実験を行った。

3.2 移動相の流速の検討

C30 カラムで異なる流速で測定した結果を Fig.1 に示す。流速を上げるとエフェドリンの保持時間は短縮され、カラムの耐圧上限を超えない 2.5 mL/min の流速条件が最も良好であった。

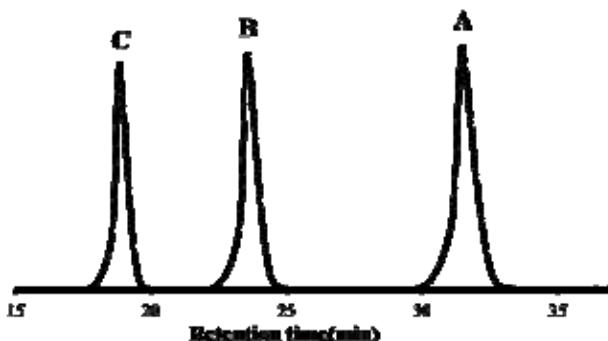


Fig.1 HPLC chromatograms of ephedrine/HCl by C30 column (column flow rate).

Chromatographic conditions were as described in 2.2.

A: 1.5 mL/min, B: 2.0 mL/min, C: 2.5 mL/min

以下、HPLC における移動相の流速は 2.5 mL/min にて実験を行った。

3.3 試料濃度の検討

エフェドリン塩酸塩を 20 mg/mL、2 mg/mL 及び 0.2 mg/mL の水溶液に調整した試料を、C30 カラムでそれぞれ測定した結果を Fig.2 に示す。また、シグナルノイズ比 (S/N 比) を Table 1 に示す。試料濃度が 20 mg/mL 及び 2 mg/mL のクロマトグラムは、ベースラインのノイズの影響を受けず、良好なピークを示した。

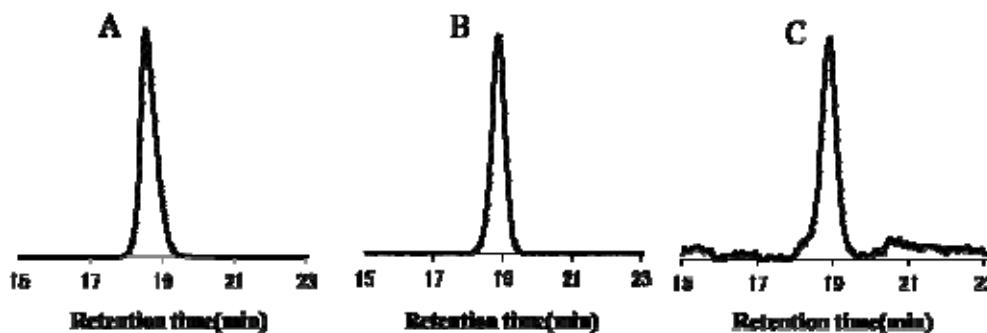


Fig.2 HPLC chromatograms of ephedrine/HCl by C30 column (sample concentration).

Chromatographic conditions were as described in 2.2.

A: 20 mg/mL, B: 2 mg/mL, C: 0.2 mg/mL

Table 1 Relationship between sample concentration and signal to noise ratio of ephedrine in C30 column.

sample concentration	Signal to Noise ratio
20 mg/mL	2545.01
2 mg/mL	274.92
0.2 mg/mL	26.00

3.4 エフェドリン類の分離

2.3.4 における 4 種類のエフェドリン類のクロマトグラムを Fig.3 に示す。クロマトグラムは、それぞれ、A : ノルエフェドリン、B : エフェドリン、C : プソイドエフェドリン、D : メチルエフェドリンを示す。4 種類のエフェドリン類の分離は良好であった。

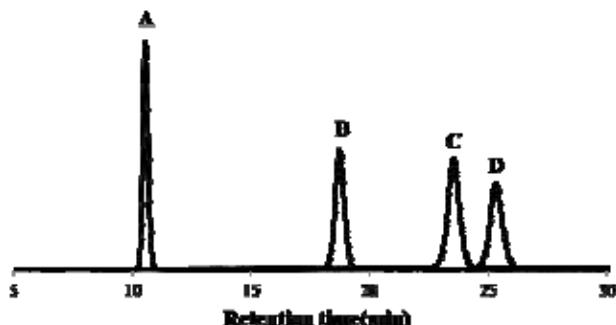


Fig.3 HPLC chromatograms of ephedrines sample by C30 column.

Chromatographic conditions were as described in 2.2.

A: Norephedrine/HCl, B: Ephedrine/HCl, C: Pseudoephedrine/HCl,
D: Methylephedrine/HCl

3.5 内部標準物質の検討

2.3.5 における 4 種類のエフェドリン類及びエチレフリンのクロマトグラムを Fig.4 に示す。クロマトグラムは、それぞれ、X : エチレフリン、A : ノルエフェドリン、B : エフェドリン、C : プソイドエフェドリン、D : メチルエフェドリンを示す。4 種類のエフェドリン類の保持時間とエチレフリンの保持時間は重ならないことがわかった。このことから、内部標準物質としてエチレフリン塩酸塩を使用することにした。

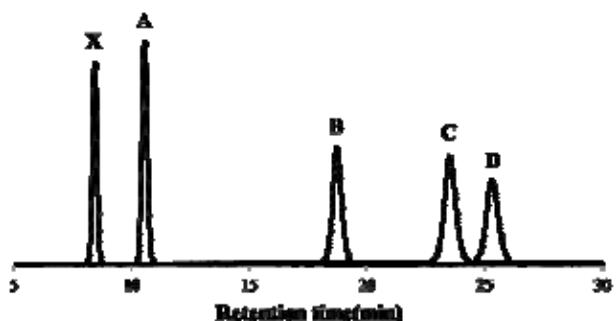


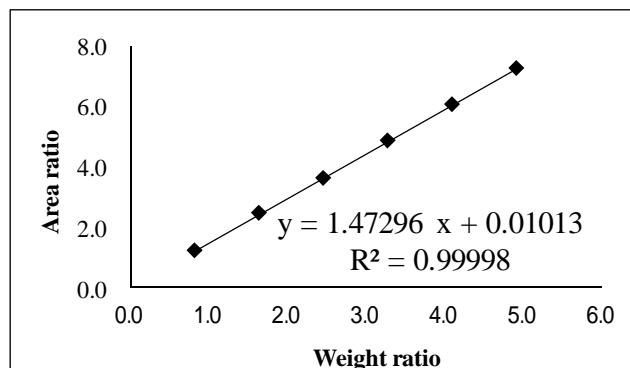
Fig.4 HPLC chromatograms of internal standards and ephedrines sample by C30 column.

Chromatographic conditions were as described in 2.2.

X: Etilefrine/HCl, A: Norephedrine/HCl, B: Ephedrine/HCl, C:
Pseudoephedrine/HCl, D: Methylephedrine/HCl

3.6 検量線の作成

2.3.6(2) より得られた検量線を Fig.5 に示す。今回測定した濃度範囲において、エフェドリン塩酸塩の相関係数は 0.99998 となり、0.999 以上の良好な直線性を示した。

Fig.5 Calibration curve of ephedrine/HCl by HPLC method with C30 column.
Chromatographic conditions were as described in 2.2.

以上のことから、C30 カラムを用いた、HPLC 法によるエフェドリン類の定量分析は、りん酸ナトリウム緩衝液を移動相として用いることで、ODS カラムを使用した分析法の移動相として使用していた、アセトニトリルの廃棄処理にかかる負担が無くなることや購入経費の削減につながること、さらにラウリル硫酸ナトリウムによるカラム劣化が抑えられることから、エフェドリン類の定量に有効な分析法の一つと考えられる。

しかし、複数成分が含まれている市販薬については、各成分と、エフェドリン類が同法の条件において良好に分離するかの検証を行っていないことから、今後検討を行っていく必要がある。

4. 要 約

今回、C30 カラムを用いた、HPLC 法による移動相に水系 100% 緩衝液を用いたエフェドリン類の分離・定量方法を検討した。

現在、我々が行っている HPLC 法によるエフェドリン類の定量分析は、ODS カラムを用いて 20 mg/mL のエフェドリン濃度で測定しているが、C30 カラムを用いた本研究では、2 mg/mL から 12 mg/mL のエフェドリン濃度範囲で検量線が良好な直線性を示した。このことから C30 カラムを用いたエフェドリン類の定量分析は、2 mg/mL から 12 mg/mL の濃度域でも分析可能であることが判明した。内部標準物質には、エチレフリン塩酸塩が使用可能であった。

文 献

- 1) 池田勝, 堀田佳江, 平木利一, 中村文雄: 関税中央分析所報, **48**, 51(2008)
- 2) 日本薬局方解説書編集委員会編: “第十五改正日本薬局方解説書”, P.718(2006)、(廣川書店)
- 3) 高野香織, 岡本健, 大嶽秀之, 武藤辰雄: 関税中央分析所報, **54**, 57(2014)