〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
28 (5) 286-290 (1982)

高速液体クロマトグラフィーによる鎮咳シロップ剤中の *dl*-塩酸メチルエフェドリン
およびリン酸ジヒドロコデインの同時定量法¹⁾

中島慶子, 安田敏子
千葉県衛生研究所

Simultaneous Determination of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride
and Dihydrocodeine Phosphate in Antitussive Syrups by
High Performance Liquid Chromatography

KEIKO NAKAJIMA and TOSHIKO YASUDA
Public Health Laboratory of Chiba Prefecture,
Nitona-cho, Chiba-shi, Chiba

(Received June 17, 1982)

A method for the simultaneous determination of *dl*-methylephedrine hydrochloride (ME-H) and dihydrocodeine phosphate (DC-P) in antitussive syrups by using high performance liquid chromatography (HPLC) was described.

A sample solution for HPLC was prepared as follows. A sample syrup was poured into cation exchange resin column (Amberlite CG 50 NH₄ type, 1 cm i.d. × 8 cm). After washing the column with water, ME-H and DC-P were eluted with 0.1 N HCl. The eluate was alkalized and extracted with chloroform. The chloroform solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in methanol containing acetaminophen as an internal standard.

An aliquot of the sample solution was injected into HPLC equipped with UV-254 nm detector. *dl*-Methylephedrine and dihydrocodeine were separated on a styrene-divinyl benzene copolymer column (4 mm i.d. × 15 cm) by using ammonia-methanol (1 : 99, v/v) as a mobile phase. By washing the cation exchange resin column sufficiently, influence of caffeine on the recovery of DC-P was removed.

This procedure was found to be applicable to almost all commercial syrups and to give satisfactory accuracy.

Keywords—antitussive syrup; *dl*-methylephedrine hydrochloride; dihydrocodeine phosphate; ion exchange column chromatography; high performance liquid chromatography

緒 言

dl-塩酸メチルエフェドリン (ME-H, その遊離塩基を ME と記す) およびリン酸ジヒドロコデイン (DC-P, その遊離塩基を DC と記す) は本邦における鎮咳剤中の主成分である。²⁾ 混合製剤中の ME-H の定量法には酸化により生成するベンズアルデヒドを定量する方法,³⁾ スルフォフタレイン系色素を用いる比色定量法,⁴⁾ ガスクロマトグラフィー法⁵⁾ 等がある。一方, 混合製剤中の DC-P の定量法には 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン

を用いる比色定量法⁶⁾ やカルボキシメチルセルロース水系のモデルシロップからの精製法⁷⁾ が報告されている。

ME-H と DC-P の分離分析法にはカラムクロマトグラフィーにより両成分を分離し, 非水滴定する方法⁸⁾ や, ガスクロマトグラフィー法⁹⁾ がある。しかし, これらの, 混合製剤への応用例はなく, 混合製剤中の ME-H と DC-P の分離定量法には向流分配を応用した方法¹⁰⁾ があるのみである。

近年、高速液体クロマトグラフィーを用いて、種々の鎮咳成分の分析¹¹⁾がなされているが、本邦以外では使用されることの少ない ME-H、DC-P に関する報告は少ない。¹²⁾ 今回、著者らは鎮咳シロップ剤中の ME-H および DC-P の同時定量法を高速液体クロマトグラフィーを用いて検討したので報告する。

実 験

1. 試薬 ME-H：局方品（丸石製薬）を 105℃ で 3 時間乾燥したもの。DC-P：局方品（武田薬品）。アセトアミノフェン（AA）：局方品。その他：試薬特級（和光純薬）。

2. 装置 (1) 高速液体クロマトグラフ（HPLC）——ポンプ：日本精密科学製 NSP-800-3。検出器：ヤマトロニユビグラフ LC-1（UV-254 nm）。記録計：日本電子科学製卓上形自動平衡記録計。

(2) 自記分光光度計——日立 EPS-3T 型（セル層長 1 cm）。

3. HPLC の条件 カラム：イアトロビーズ 6cp-2020（スチレン-ジビニルベンゼン共重合体）を内径 4 mm、長さ 15 cm のステンレスカラムに充填したもの。溶離液：メタノール-アンモニア水（99：1，v/v）。流速：0.8 ml/min。カラム温度：室温。

4. 弱酸性イオン交換樹脂カラム アンバーライト CG-50（Type I）を常法により NH₄ 型とし、内径 1 cm、長さ 30 cm のガラスカラムに層長 8 cm となるように充填したもの。

5. 内部標準溶液 AA 50 mg をメタノールで 100 ml とし、その 10 ml をメタノールで 100 ml としたものの。

6. 操作 ME-H 320 mg および DC-P 120 mg を正確に量り、両者を合せて水で 100 ml としたものの 5 ml を弱酸性イオン交換樹脂カラムに流入する。次に水 400 ml を用いてカラムを洗浄し、0.1 N 塩酸 100 ml で溶出する。カラムからの流下速度は 3—4 ml/min とする。溶出液に塩化ナトリウム 10 g および 1 N 水酸化ナトリウム液 15 ml を加え、クロロホルム 30 ml ずつで 3 回抽出する。抽出液を合して無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去する。残留物を内部標準溶液 2 ml に溶かして標準溶液とする。

試料（鎮咳シロップ剤）の ME-H 16 mg 相当量または DC-P 6 mg 相当量を標準と同様に操作して試料溶液とする。標準溶液および試料溶液の 4 μ l ずつを HPLC に注入し、得られた ME および DC の、内部標準物質に対するピーク高比を用いて定量を行なう。

結果および考察

1. HPLC 条件の検討

スチレン-ジビニルベンゼン共重合体系 ポーラスポリマー樹脂であるイアトロビーズ 6cp-2020 を固定相とし、メタノール-アンモニア水（99：1，v/v）を移動相としたところ、AA、ME、DC の 3 成分とも対称性のよいピークが得られ、それぞれの分離も良好であった（Fig. 1）。

Fig. 1. Chromatogram of *dl*-Methylephedrine and Dihydrocodeine

Column: Iatrobeds 6cp-2020 (4 mm $\times$ 15 cm), carrier: 28% ammonia-methanol (1:99), flow rate: 0.8 ml/min, detector: UV 254 nm.
peaks: A, acetaminophen; B, *dl*-methylephedrine; C, dihydrocodeine.

2. ピーク高比の再現性および検量線

ME-H 16 mg および DC-P 6 mg を含む水溶液 5 ml を 0.1 N 塩酸 100 ml に加え、これを 6. 操作のイオン交換樹脂カラムからの溶出液と同様に以下の操作を行なった。得られた ME および DC の内部標準溶液 4 μ l ずつを 10 回連続して HPLC に注入した。AA に対する ME、DC のピーク高比は、それぞれ 1.39 ± 0.005 、 0.522 ± 0.004 （ともに平均値 $\pm$ 標準偏差）であった。

また、ME、DC の検量線を作成したところ、ME-H として 0—8 mg/ml まで、DC-P として 0—3 mg/ml まで原点を通る直線となった。

3. イオン交換樹脂カラムによる精製の検討

シロップ剤試料をそのままクロロホルム抽出することはエマルジョン生成のため困難である。イオン交換樹脂カラム処理を行なうことにより、着色料や甘味料を効率よく除去でき、後の操作が容易である。ME-H の精製には弱酸性イオン交換樹脂が、¹²⁻¹⁴⁾ DC-P の精製には強

Fig. 2. Effect of Column Length of Amberlite CG 50 (i.d. 1 cm) on the Recovery of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride (ME-H) and Dihydrocodeine Phosphate (DC-P)

—○—: ME-H, —△—: DC-P.

Fig. 3. Effect of pH of Samples on the Recovery of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride (ME-H) and Dihydrocodeine Phosphate (DC-P)

pH was adjusted with HCl and CH₃COONa.

—○—: ME-H, —△—: DC-P.

酸性イオン交換樹脂が用いられている。¹⁴⁾ 今回、著者らは弱酸性イオン交換樹脂を用いて、ME-H および DC-P を同時に精製することを試みた。

初めに、4. 弱酸性イオン交換樹脂 カラムの層長を 5 cm から 10 cm まで変えて、ME-H および DC-P の回収率を調べた。その結果、Fig. 2 に示すとおり、層長 6 cm 以上で ME-H、DC-P とも良好な回収率が得られたので、本実験では層長を 8 cm とした。次に、市販のシロップ剤 17 試料の pH を測定したところ、その値は 2.99—5.71 であった (Table III)。pH の低い試料では ME-H、DC-P のイオン交換樹脂カラムからの回収率が低くなる可能性がある。そこで、試料の pH と回収率の関係調べるために、ME-H 16 mg および DC-P 6 mg を種々の Walpole の緩衝液 (酢酸ナトリウム-塩酸系) 5 ml に溶かし (pH 1.09—4.91)、回収実験を行なった。その結果、Fig. 3 に示すとおり pH 2.07 以上で ME-H、DC-P とも良好な回収率であった。このことから、試料は pH 調整をせずにそのままイオン交換樹脂カラムに流入することとした。

通常の試料の場合、イオン交換樹脂カラムの洗浄は水 100 ml で充分である。しかし、カフェイン配合試料の場合、水 100 ml では洗浄が不十分で、カフェインが DC のピークを妨害することがある。そこで、適正なカラム水洗量を調べるため、次の実験を行なった。カフェインの 10 mg/ml 水溶液 1, 2, 4, 6 ml をカラムに流入し、それぞれのカラムについて水洗量を 100 ml から 400 ml まで (1 ml を流入したカラムについては 250 ml まで)

Fig. 4. Elimination of Caffeine by the Washing of Amberlite CG Column

Various milligrams of caffeine were passed through columns and washed out with various milliliters of water.

—▽—: 10 mg, —△—: 20 mg, —■—: 40 mg, —□—: 60 mg.

変えて、以下、6. 操作に準じて試料溶液を得た。これを同条件の HPLC に注入し、カフェインの定量を行なった。その結果、水洗量とカフェイン残存量との間に Fig. 4 の関係が得られた。市販試料の定量の際にカラムに流入するカフェイン量は通常 10—50 mg であるので、イオン交換樹脂カラムの水洗量は 400 ml に設定した。

また、より直接的にカフェインの流出終了を確認するため、カラム洗出液にタンニン酸試液を加え白濁の消失

Fig. 5. Relation between the Amounts of Caffeine in the Sample Solutions and the Absorbance of the Effluents from Amberlite CG Columns on a Log Scale

Various milligrams of caffeine were passed through columns according to the procedure in Fig. 4. Absorbance of 4 ml of the final effluent obtained by the washing of Amberlite CG column was measured at 273 nm.

▼: 10 mg, ▽: 20 mg, ■: 40 mg, □: 60 mg.

を見る方法を検討したが、感度が低く目的を達することができなかった。そこで、先と同様に 10–60 mg のカフェインをイオン交換樹脂カラムに流入した後、洗出液 400 ml を 50 ml 間隔で 4 ml ずつカラム下端から採取し、カフェインの極大吸収波長である 273 nm での吸光度を水を対照として測定した。吸光度の測定値は Fig. 4 のカフェイン量と同様、水洗量の増加に伴い減少した。カラム洗出液の吸光度から、試料溶液中のカフェイン量を予測する目的で、両者の関係を図示したものが Fig. 5 である。Fig. 5 から、流入したカフェイン量によらず、吸光度の対数と試料溶液中のカフェイン量とが対応することが認められた。試料溶液中のカフェインは 0.03 mg 以下であれば DC のピーク高に影響を与えないので、カラムの水洗は洗出液の 273 nm における吸光度が 0.01 以下になるまで行なえばよいことになる。個々の試料の定量に際して、水 400 ml で洗浄した後、この方法を用いればカフェインの流出終了をより直接的に確認することができる。

4. 回収率および定量の再現性

Table I に示した成分含量の混合シロップを試料として 5 回の定量操作を行ない、得られた回収率を Table II に示した。平均回収率は ME-H, DC-P がそれぞれ

TABLE I. Concentration of Ingredients in a Mixed Sample

Ingredients	Added
<i>dl</i> -Methylephedrine hydrochloride	1.6 mg/ml
Dihydrocodeine phosphate	0.9 mg/ml
Chlorpheniramine maleate	0.25 mg/ml
Potassium guaiacolsulfonate	5 mg/ml
Dehydrated caffeine	5 mg/ml
Sucrose	15 %

TABLE II. Recovery of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride (ME-H) and Dihydrocodeine Phosphate (DC-P) in the Mixed Sample

	Recovery (%)	
	ME-H	DC-P
1	100.5	100.0
2	100.4	99.67
3	101.1	100.2
4	100.5	98.98
5	101.2	101.5
Mean	100.7	100.1
C. V. (%)	0.38	0.93

The mixed sample was prepared as shown in Table I.

100.7%, 100.1% であった。また、回収率の変動係数はおのおの 0.38%, 0.93% と満足すべき値であった。

5. 市販試料の定量

市販の鎮咳シロップ剤 17 試料に本定量法を適用した結果を表示濃度に対するパーセントで示した (Table III)。併せて、ME-H, DC-P の表示濃度、試料の pH、他の配合成分を示した。試料 No. 7 は粘稠なため、イオン交換樹脂カラムを通過せず、別の操作が必要であった。水蒸気蒸留法では ME-H は留出するが、DC-P は留出しない。No. 7 は DC-P 不含試料であったので、水蒸気蒸留により留液 250 ml をとり、それを試料として定量を行なった。No. 7 以外の試料にはすべて本定量法をそのまま適用することができた。得られた定量値は No. 13 の DC-P を除いて、すべて表示濃度 $\pm 10\%$ の範囲であった。

ま と め

市販の鎮咳シロップ剤中の ME-H および DC-P をイオン交換樹脂カラムを用いて精製した後、HPLC により同時定量する方法について検討し、簡便で精度のよい定量法を得た。イオン交換樹脂として、アンバーライト CG-50 の NH₄ 型を用い、試料流入後 400 ml の水で洗浄することにより、主な妨害成分であるカフェインを除去

TABLE III. Determination of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride (ME-H) and Dihydrocodeine Phosphate (DC-P) in Commercial Antitussive Syrups

Sample	ME-H		DC-P		pH of sample	Other ingredients ^{c)}
	I. C. ^{a)} (mg/ml)	% ^{b)}	I. C. ^{a)} (mg/ml)	% ^{b)}		
1	2.5	98.7	1	101.7	4.86	CM EXT
2	0.8	100.1	0.5	94.3	3.95	CM GG EXT
3	0.95	96.8	0.4	96.6	4.20	CM GG
4	0.75	98.6	—	—	4.78	CM GG DH
5	0.83	98.4	0.33	96.6	3.72	CAM EXT
6	1.6	100.9	1	97.9	5.70	CM EXT
7	0.83	94.6	—	—	5.71	CM GG CZ
8	0.9	99.0	0.5	98.0	4.91	CM CF EXT
9	1.25	100.1	0.5	101.0	3.65	CM CF PG
10	2	100.4	1	99.9	4.78	CM CF EXT
11	1.25	97.3	0.5	96.3	5.49	CM CF PG
12	1.25	96.3	—	—	3.21	TC EXT
13	2.67	101.5	1.11	114.2	3.78	BM EXT
14	1.25	99.8	0.5	102.0	4.80	PG IH
15	3	97.4	1	101.1	3.65	CAM EXT
16	1.6	103.8	1	103.2	2.99	CM PG
17	1.04	100.0	—	—	5.61	CM DP

a) Indicated concentration.

b) Concentration found by this procedure: percentage of indicated concentration.

c) CM: chlorpheniramine maleate, EXT: extract of crude drug, GG: glyceryl guaiacolether, DH: dextromethorphan hydrobromide, CAM: carbinoxamine maleate, CZ: cloperastine fendizoate, CF: caffeine, PG: potassium guaiacolsulfonate, TC: tipecidine citrate, BM: bromopheniramine maleate, IH: isopropylaminomethylheptane hydrochloride, DP: diprophylline.

することができた。HPLCの充填剤には スチレン-ジビニルベンゼン共重合体を用いた。検量線、回収率、再現性ともに良好で、市販試料への応用の結果、17試料中16試料で表示量に近い定量値が得られた。

本法は ME-H および DC-P の同時定量という点に有用性があり、今後、医薬品の一斉収去試験等のスクリーニング法として応用が可能であると思われる。

引用文献

- 1) 本報告は日本薬学会第102年会(大阪, 1982年4月)で発表した。
- 2) 鎮咳去痰薬製造承認基準(昭和51年11月25日薬発第1216号薬務局長通知)。
- 3) 井上哲男, 立沢政義, 大河原 晃, 薬誌, **91**, 1158 (1971); 海東常敏, 相楽和彦, 分析化学, **20**, 610 (1971); 井上哲男, 立沢政義, 医薬品研究, **4**, 132 (1973)。
- 4) 堀岡正義, 薬誌, **77**, 200 (1957); 堀岡正義, 薬誌, **77**, 206 (1957)。
- 5) 鯉淵昌信, 江島 昭, 衛生化学, **25**, 295 (1979); L. S. Chen, *Tai-wan Yao Hsueh Tsa Chih*, **29**, 7 (1977) [*C. A.*, **90**, 157115x (1979)]。
- 6) 桜井 寛, 佐藤和男, 津田 健, 薬誌, **82**, 1684 (1962)。
- 7) N. Tsunakawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2585 (1971)。
- 8) 郡 定之, 河野通文, 薬誌, **81**, 728 (1961)。
- 9) 河野喜美彦, 松本紀子, 第一薬科大学研究年報, **10**, 45 (1979)。
- 10) 尾西良一, 川村邦夫, 山本 馨, 薬誌, **91**, 534 (1971)。
- 11) P. J. Twitchett, A. C. Moffat, *J. Chromatogr.*, **111**, 149 (1975); T. L. Spriek, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 591 (1974); I. L. Honigberg, J. T. Stewart, A. P. Smith, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 766 (1974)。
- 12) 立沢政義, 橋場茂子, 江島 昭, 衛生化学, **23**, 282 (1977)。
- 13) 服部哲靖, 西海 里, 薬剤学, **21**, 9 (1961)。
- 14) 日本公定書協会編, “かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法,” 薬業時報社, 東京, 1980。